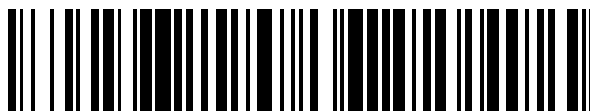


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 725**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/22** (2006.01)

**A61K 31/409** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2016 PCT/IB2016/051552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2016 E 16716286 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3271363**

54 Título: **Atropisómeros de tetrafenilbacterioclorinas y clorinas halogenadas y su uso en terapia fotodinámica**

30 Prioridad:

**20.03.2015 PT 2015108310**

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

**22.10.2020**

73 Titular/es:

**LUZITIN S.A. (50.0%)  
Edifício Bluepharma, S. Martinho do Bispo  
3045-016 Coimbra, PT y  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FERREIRA GONÇALVES, NUNO PAULO;  
CERCA MARTINS DOS SANTOS, TANIA  
PATRICIA;  
PEREIRA NASCIMENTO COSTA, GONÇALO;  
PEREIRA MONTEIRO, CARLOS JORGE;  
SCHABERLE, FABIO ANTONIO;  
CORREIA ALFAR, SONIA;  
REIS DE ABREU, ARTUR CARLOS;  
MIGUÉNS PEREIRA, MARIA y  
DA SILVA ARNAUT MOREIRA, LUÍS GUILHERME**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 788 725 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

Atropisómeros de tetrafenilbacterioclorinas y clorinas halogenadas y su uso en terapia fotodinámica

## CAMPO TÉCNICO

5 La presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica enriquecida con atropisómeros de tetrafenilbacterioclorinas y clorinas halogenadas, así como a su proceso de preparación y utilización en terapia fotodinámica.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se descubrió que la sulfonamida y las tetrafenilbacterioclorinas con átomos de halógeno en las posiciones de los grupos fenilos tenían propiedades particularmente útiles para la terapia fotodinámica (TFD o PDT, por sus siglas en inglés; Photodynamic Therapy) (1-4). La TFD es un tipo de tratamiento médico que combina el uso de una sustancia fotosensible, luz de una longitud de onda absorbida por dicha sustancia, y oxígeno molecular para generar especies de oxígeno reactivo (EOR) en el tejido a tratar. El efecto terapéutico está mediado por el estrés oxidativo producido localmente por las EOR. Las tetrafenilporfirinas, las tetrafenilclorinas y los derivados de las tetrafenilbacterioclorinas se utilizan a menudo como fotosensibilizadores en la TFD (5). Estas moléculas tienen enlaces fenil-macrosciclo simples con rotaciones restringidas. Cuando los grupos fenilos contienen átomos de halógeno en las posiciones orto, la rotación sobre el único vínculo entre el grupo fenilo y el macrosciclo puede verse impedida o reducida en gran medida. Aunque el impedimento estérico de la rotación del único enlace del fenil-macrosciclo puede, en principio, superarse a altas temperaturas, el periodo de semidesintegración de esta rotación en las tetrafenilporfirinas, tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas puede ser suficientemente largo a temperatura ambiente y a temperatura corporal para permitir la separación y el uso independiente de los estereoisómeros que posible existen en esta clase de moléculas. Los estereoisómeros se observan con mayor frecuencia como resultado de los átomos quirales. Se sabe que los enantiómeros o diastereómeros resultantes de la presencia de átomos quirales están en el origen de fármacos con interacciones claramente diferenciadas con objetivos biológicos. Las tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, las tetrafenilclorinas y las tetrafenilbacterioclorinas no tienen átomos quirales en el macrosciclo ni en los grupos fenilos, pero tienen estereoisómeros separables porque el enlace único restringido del fenil-macrosciclo puede generar una distribución espacial diferente de los sustitutos voluminosos. Este es el caso de tales moléculas cuando contienen sustitutos asimétricos en las posiciones orto y/o meta y la restricción para la rotación del enlace único del fenil-macrosciclo sea alta. Los estereoisómeros resultantes de la rotación axial lenta se denominan atropisómeros (6).

30 Atropisómeros de tetrafenilporfirinas halogenadas cuando los sustitutos en las dos meta posiciones de los grupos fenilos son diferentes (7-9). Los compuestos de la invención presentan las primeras pruebas de que los atropisómeros de las tetrafenilclorinas ortohalogenadas y de las tetrafenilbacterioclorinas ortohalogenadas son separables y que los atropisómeros poseen un efecto terapéutico diferencial como fotosensibilizadores para la TFD.

35 Puede resultar sorprendente que los atropisómeros que difieren sólo por la conformación en torno a un solo enlace puedan generar tensiones oxidativas con resultados terapéuticos radicalmente diferentes. Inesperadamente, los inventores del presente invento descubrieron que el enriquecimiento de una mezcla de atropisómeros con los atropisómeros con grupos más voluminosos en el mismo lado del plano definido por el macrosciclo puede curar a ratones con tumores implantados subcutáneamente en las mismas condiciones en las que una mezcla enriquecida con los atropisómeros con el mismo número de grupos voluminosos a ambos lados del plano del macrosciclo no cura a ningún animal. El experto en la materia no pudo prever la mayor eficacia de la TFD cuando se usaba una composición de atropisómeros enriquecida en atropisómeros en la que la mayoría de los meta-sustituyentes del grupo fenilo ligados al macrosciclo se encontraban en un mismo lado del plano definido por dicho macrosciclo. De hecho, anteriores estudios sobre fototoxicidad con tetrafenilporfirinas parecían indicar precisamente lo contrario, es decir, se sugería que los cuatro atropisómeros aislables de las tetrafenilporfirinas "picket fence" no presentaban diferencias en cuanto a su capacidad de fotosensibilización (10). Además, los dos regioisómeros del monoácido derivado de la benzoporfirina anillo A, conocida como verteporfina y que se utiliza en la práctica clínica como fotosensibilizante en la TFD de la degeneración macular asociada a la edad, son igualmente potentes fotosensibilizantes de las células tumorales in vitro e in vivo (11). También, los dos regioisómeros de la verteporfina consisten cada uno en una mezcla racémica de dos enantiómeros, y todos los enantiómeros tienen una actividad farmacológica similar (12). En base a todos los datos disponibles, se hace creer al experto en la materia que los atropisómeros de cualquier fotosensibilizador interactúan con la luz y el oxígeno de manera muy similar, y se llega a la conclusión de que el grado de eficacia de los atropisómeros para la TFD debe ser muy similar. La presente invención revela, por primera vez, composiciones farmacéuticas terapéuticamente beneficiosas de atropisómeros de tetrafenilclorina halogenada o derivados de tetrafenilbacterioclorinas halogenada para su uso en TFD que están enriquecidos con el atropisómero con todos los meta sustitutos del grupo fenilo ligados al macrosciclo en el mismo lado del plano definido por dicho macrosciclo (atropisómero  $\alpha_4$ ), de manera que la cantidad relativa del atropisómero  $\alpha_4$  en la composición farmacéutica es más del 20%. En contra de todas las expectativas, se ha demostrado que la eficacia de la TFD in vitro del atropisómero preferido  $\alpha_4$  puede ser de órdenes de magnitud mayores que la eficacia de la TFD in vitro del atropisómero  $\alpha\beta\beta$ , que es menos fotoactivo y donde los sustitutos voluminosos en las meta posiciones de los anillos fenilos adyacentes se encuentran en lados opuestos del plano definido por el anillo del macrosciclo.

En la figura 1 se ilustran los diversos estereoisómeros existentes en las tetrafenilbacterioclorinas sulfonamidas halogenadas con halógenos en las posiciones orto de los anillos fenilos y los grupos sulfonamidas en una de las posiciones meta. La orientación tridimensional de los átomos de los estereoisómeros que se muestran en la Figura 1 es diferente y puede ser interconvertida por la rotación de los enlaces simples de fenil-macrocielo. Dicha interconversión es muy lenta a temperatura ambiente, o a temperatura corporal, debido a la presencia de átomos halógenos (F, Cl, Br) en las posiciones orto de los anillos fenilos, lo que permite la separación y el uso individual de cada uno de los atropisómeros. Las líneas en negrita de las estructuras moleculares en la Figura 1 indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente como para que existan por encima del plano aproximadamente definido por el anillo de macrocielo, que se sabe que está algo distorsionado por la geometría plana pero que, no obstante, definen una orientación espacial restringida de los grupos R'. La presencia de todos los grupos R' en el mismo lado del plano definido por el macrocielo se representa como  $\alpha_4$ , cuando tres grupos R' están en el mismo lado del plano y el último grupo R' está en el otro lado el atropisómero se representa como  $\alpha_3\beta$ , cuando dos de los grupos R' están en cada lado y adyacentes entre sí, la representación del atropisómero es  $\alpha_2\beta_2$ , y finalmente, cuando dos de los grupos R' están en cada lado pero se alternan en las posiciones con respecto al plano del macrocielo la representación del atropisómero es  $\alpha\beta\alpha\beta$ .

Se ha demostrado que los atropisómeros de las tetrafenilporfirinas halogenadas pueden separarse y pueden tener diferentes coeficientes de absorción molar en la región roja del espectro electromagnético (7, 9). Un alto coeficiente de absorción molar en el rojo, donde los tejidos humanos tienen mayor transparencia que en las otras regiones del espectro visible, es una propiedad deseable para la TFD porque un colorante que absorba más luz tiene más probabilidades de iniciar la cascada de reacciones fotoquímicas que generan EOR. Por otra parte, los atropisómeros de las tetrafenilporfirinas halogenadas, las tetrafenilclorinas y las tetrafenilbacterioclorinas pueden tener diferentes tiempos de vida en estado de excitación (13) que pueden influir en su eficacia para la TFD. Los tiempos de vida más cortos de los tripletes en soluciones aireadas están asociados con interacciones más fuertes con el oxígeno molecular, posiblemente mediadas por las interacciones de la transferencia de carga (4). Sorprendentemente, los atropisómeros de la Figura 1 tienen diferentes números y diferentes orientaciones de los grupos polares a cada lado del macrocielo y, en consecuencia, tienen diferentes polaridades. Las diferencias de polaridad, forma y volumen molecular excluido pueden servir de base para su separación, y también afectar a su actividad biológica. Por lo tanto, las diferencias en el coeficiente de absorción molar, la vida en estado excitado, la polaridad y el volumen molecular excluido de los atropisómeros pueden dar lugar a diferencias en sus interacciones con el oxígeno molecular y con los objetivos biológicos, y tener un impacto hasta ahora no revelado respecto a su actividad en la TFD. Además, basándose al menos en lo anterior, una persona con conocimientos medios en la materia habría esperado que los atropisómeros con coeficientes de absorción molar más altos fueran más eficaces en la terapia fotodinámica. Sin embargo, sorprendentemente, el atropisómero de la presente invención que ha demostrado ser el más eficiente en la terapia fotodinámica no es el atropisómero que absorbe más luz.

Las tetrafenilbacterioclorinas son relativamente inestables (14, 15) y no se podía prever que la separación de sus atropisómeros fuera factible mediante procedimientos viables económicamente. La introducción de átomos halógenos en las posiciones orto de los anillos fenilos obstaculiza la rotación del enlace fenil-macrocielo y estabiliza el macrocielo contra la oxidación. De ahí que las tetrafenilbacterioclorinas halogenadas tengan atropisómeros excepcionalmente estables, con barreras rotacionales de alto ciclo de fenil-macro y potenciales de oxidación tan altos como los de las tetrafenilporfirinas. Estas propiedades permiten la separación de los atropisómeros de las tetrafenilbacterioclorinas halogenadas a temperaturas iguales o superiores a la temperatura ambiente y en presencia de luz y oxígeno. Por lo tanto, la separación de esos atropisómeros es viable en cuanto a costos.

Hay varios EOR que pueden ser generados por los fotosensibilizadores. Los más importantes EOR generados por las bacterioclorinas en presencia de luz de una longitud de onda apropiada y de oxígeno molecular son: el oxígeno singlete (es decir, el estado de excitación electrónica más bajo del oxígeno molecular), el ión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (16). El radical hidroxilo es el más reactivo de estos EOR. Puede reaccionar con una amplia gama de objetivos biológicos y también puede reaccionar con el fotosensibilizador, lo que lleva a su blanqueamiento. Un fotosensibilizador excitado electrónicamente puede considerarse como un catalizador muy especial que genera EOR cuando se encuentra con el oxígeno molecular. Sin embargo, cuando el fotosensibilizador es blanqueado por el EOR no puede generar más EOR. Así pues, la eficacia de un fotosensibilizador viene dada por un delicado equilibrio entre la capacidad de un fotosensibilizador de interactuar fuertemente con el oxígeno molecular y su capacidad de sobrevivir a dicha interacción sin ser blanqueado (4). Las diferentes orientaciones espaciales de los meta-sustitutivos en los atropisómeros  $\alpha_4$ ,  $\alpha_3\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$  y  $\alpha\beta\alpha\beta$  pueden ofrecer interacciones distintas e insospechadas con el oxígeno molecular. Este invento demuestra por primera vez que los atropisómeros  $\alpha_4$ ,  $\alpha_3\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$  y  $\alpha\beta\alpha\beta$  poseen diferentes interacciones con el oxígeno molecular y/o los EOR, que se manifiestan en los diferentes periodos de vida de los tripletes y/o en los rendimientos cuánticos de la fotodescomposición. Estas diferencias pueden ser la explicación de las diferencias en la actividad de los atropisómeros en la TFD.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

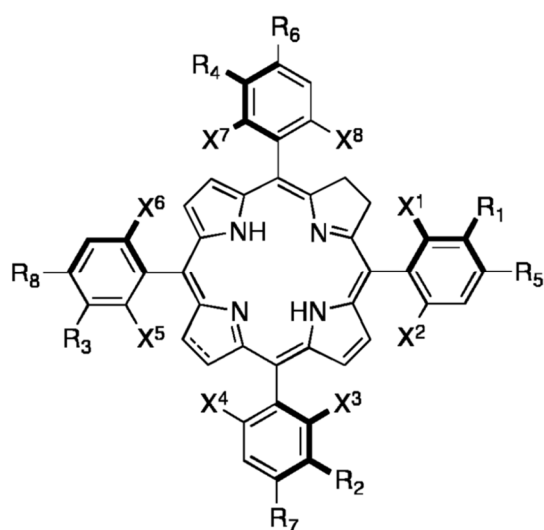
La separación de los atropisómeros  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$  y las composiciones farmacéuticas enriquecidas en los atropisómeros  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$  reveladas en este invento son la primera evidencia de que los atropisómeros poseen una actividad diferencial en la TFD y que sus diferencias pueden ser explotadas para mejorar el resultado terapéutico de la TFD. Por "compuesto de atropisómero enriquecido" se entiende una mezcla de atropisómeros obtenidos mediante la síntesis

de tetrafenilclorinas halogenadas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas que se ha purificado para eliminar, en parte, los atropisómeros  $\alpha\beta\alpha\beta$  y  $\alpha_2\beta_2$ , menos fotoactivos, presentes en la mezcla estadística de atropisómeros obtenida mediante la síntesis; donde las tetrafenilclorinas y las tetrafenilbacterioclorinas tienen átomos de halógeno en al menos una de las posiciones orto de los grupos fenilos o, en los casos en los que ambas posiciones orto están ocupadas por el mismo átomo de halógeno, cuando tienen diferentes sustitutos en las dos posiciones meta de los grupos fenilos.

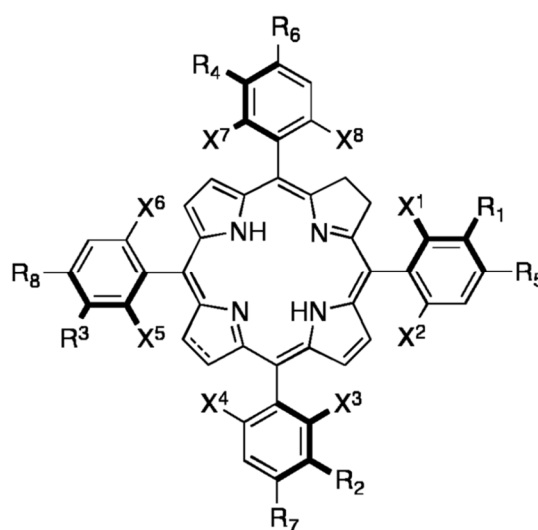
La presente invención proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica enriquecida en atropisómeros  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$  que proporciona un nuevo conjunto de compuestos fotoactivos con mayor actividad en la TFD. Se incluyen las composiciones farmacéuticas en las que los atropisómeros de la Figura 1, con más de la mitad de los grupos R' en el mismo lado del plano definido por el macrociclo, constituyen más del 70% de la cantidad total de atropisómeros presentes en la composición.

El proceso de preparación de la composición farmacéutica de esta invención aprovecha la capacidad de separar los atropisómeros de las tetrafenilclorinas halogenadas o de las tetrafenilbacterioclorinas halogenadas a temperatura ambiente, o incluso a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, eventualmente en presencia de luz y oxígeno, al utilizar sus diferencias de solubilidad, o de coeficientes de partición, en los disolventes adecuados, o mediante diferentes tiempos de retención de la cromatografía. La diferente orientación espacial de los grupos polares presentes en los anillos fenilos de las tetrafenilporfirinas, las tetrafenilclorinas o las tetrafenilbacterioclorinas dan lugar a diferentes polaridades, formas y volúmenes excluidos, y permiten las separaciones cromatográficas de los atropisómeros. Además, las diferencias en la solubilidad, o en los coeficientes de partición, de los atropisómeros según los diferentes disolventes utilizados permiten cambios en la composición de los atropisómeros mediante la precipitación selectiva, la recristalización preferencial, la extracción mediante disolventes o simplemente lavando de la mezcla de atropisómeros con un disolvente apropiado. Es posible reducir la fracción de un atropisómero concreto presente en la mezcla y de menor eficacia en la TFD, o incluso aumentar la fracción de otro atropisómero también presente en la mezcla y de mayor eficacia en la TFD, simplemente mediante la disolución selectivamente de parte del atropisómero deseado, o del no deseado, gracias a la utilización del disolvente que tenga la polaridad apropiada. También es posible convertir parcialmente un atropisómero en otro mediante tratamiento térmico o fotoquímico, de manera que las moléculas adquieran suficiente energía para superar la restricción de la rotación de los enlaces individuales de fenil-macrosciclo, y así cambiar la composición de la mezcla de atropisómeros.

La presente invención revela los atropisómeros más eficientes de las tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas para la terapia fotodinámica de los trastornos hiperproliferativos y de las infecciones bacterianas y virales, además de una composición farmacéutica enriquecida mediante los dos atropisómeros más eficaces de las tetrafenilclorinas halogenadas, a saber,  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$ , presentados en fórmulas (I-C) y (I-D), respectivamente y que se caracterizan por tener la mayoría de los sustitutos voluminosos en la posición meta de los grupos fenilos en el mismo lado del plano del macrociclo,



Fórmula (I-C)



Fórmula (I-D)

En la que:

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

las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrosciclo;

X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>6</sup> y X<sup>8</sup> son de flúor;

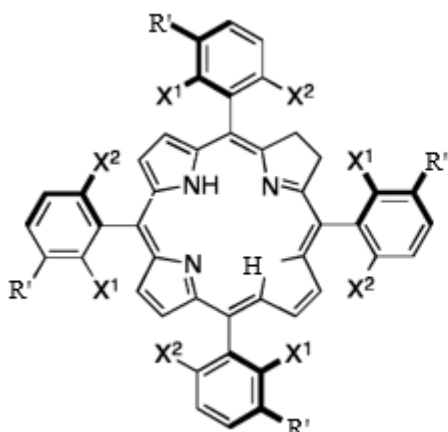
X<sup>1</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>5</sup> y X<sup>7</sup> son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

5 Los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente -OH, -OR o -SO<sub>2</sub>R", donde los R" se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o -NR<sub>2</sub> donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o R<sub>2</sub> representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

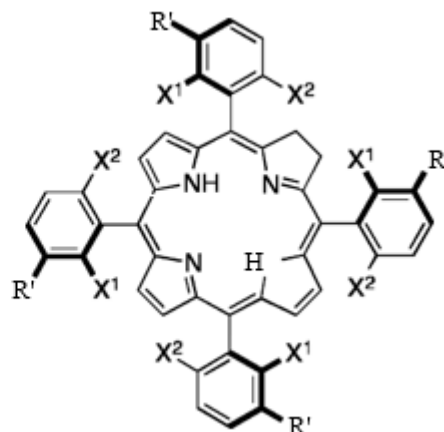
R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>, independientemente H, -OH, -OR, -Cl, o -NHR donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono; o sus sales farmacéuticamente aceptables, en las que la cantidad relativa de dichos atropisómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables, es superior al 70% de los estereoisómeros presentes en dicha composición farmacéutica.

10 En otra versión de la presente invención, la composición farmacéutica está enriquecida con los atropisómeros más eficaces de tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, α<sub>3β</sub> y α<sub>4</sub>, de tal manera que dichos atropisómeros eficientes o sus sales farmacéuticamente aceptables constituyen (combinados) más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de los atropisómeros presentes en dicha composición farmacéutica.

Por lo tanto, los compuestos de las fórmulas (I-C) y (I-D) pueden ser derivados del cloro que tienen las fórmulas:



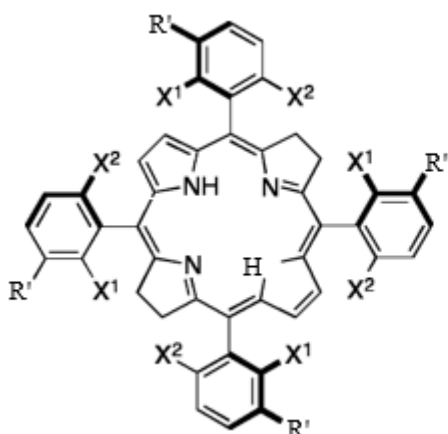
Fórmula (II-C)



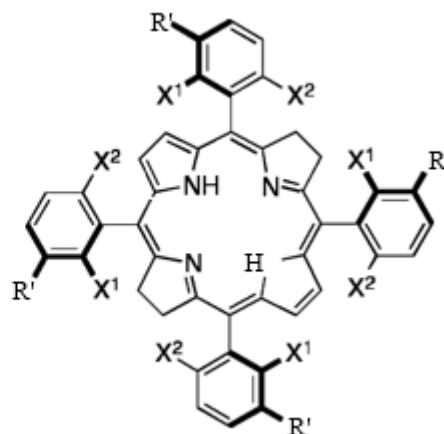
Fórmula (II-D)

15

Opcionalmente, los compuestos de las fórmulas (I-C) y (I-D) pueden ser derivados del cloro que tienen las fórmulas:



Fórmula (III-C)



Fórmula (III-D)

20 En la que:

las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

Los grupos X<sup>2</sup> adecuados son de flúor;

Los grupos X<sup>1</sup> adecuados son hidrógenos o halógenos (F, Cl, Br);

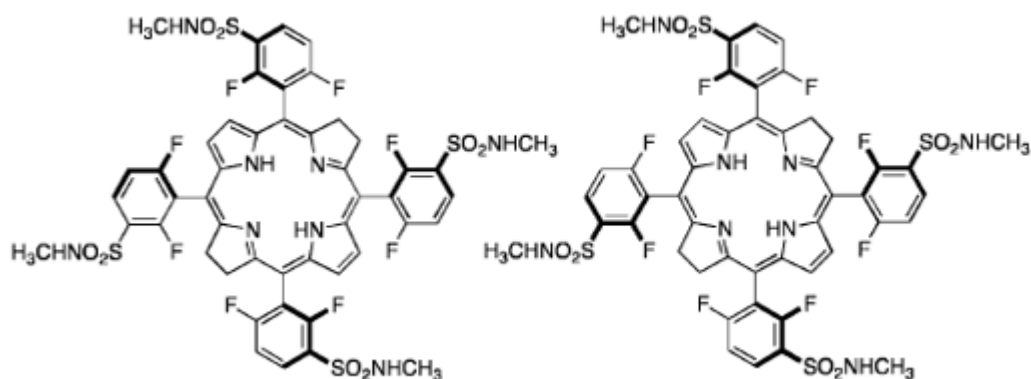
Los grupos R' adecuados son -SO<sub>2</sub>R", donde los grupos R" se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o -NR<sub>2</sub> donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o R<sub>2</sub> representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

5 o sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los atropisómeros preferidos de las fórmulas (III-C) y (III-D) son aquellos donde X<sub>2</sub> son flúor o cloro, y X<sub>1</sub> son flúor o cloro o hidrógeno, y R' son -SO<sub>2</sub>NHR' donde R' son alquilo de 1 a 6 átomos de carbono.

Más específicamente, el atropisómero preferido α<sub>4</sub> de la Fórmula (III-D), donde X<sub>2</sub> son flúor o cloro, y X<sub>1</sub> son flúor o cloro o hidrógeno, y R' son -SO<sub>2</sub>NHRn donde R' son alquilo de 1 a 6 átomos de carbono.

10 Los compuestos específicos preferidos de la invención incluyen el atropisómero α<sub>4</sub> de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) bacterioclorina, de fórmula LUZ11-D, y el atropisómero de α<sub>3β</sub> de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) bacterioclorina, de fórmula LUZ11-C.



Fórmula (LUZ11-C)

Fórmula (LUZ11-D)

15 En otra versión de la presente invención, la composición farmacéutica está enriquecida con el atropisómero más eficiente de tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, α<sub>4</sub>, que tiene todos los sustitutos voluminosos en el mismo lado del plano definido por el macrociclo, de manera que dicho atropisómero eficiente o su sal aceptada farmacéuticamente constituye más del 20% de los atropisómeros presentes en la composición farmacéutica mencionada.

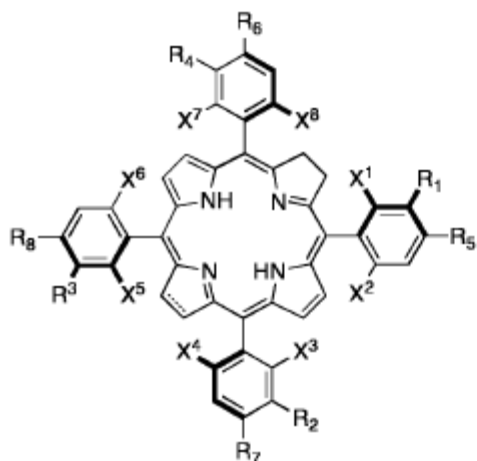
20 En otra versión de la presente invención, la composición farmacéutica está enriquecida mediante el segundo atropisómero más eficiente de las tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, α<sub>3β</sub>, que tiene la mayoría de los sustitutos voluminosos en el mismo lado del plano definido por el macrociclo, de manera que dicho atropisómero eficiente o su sal aceptada farmacéuticamente constituye más del 60% de los atropisómeros presentes en dicha composición farmacéutica.

25 En otra versión de la presente invención, la composición farmacéutica está enriquecida con el segundo atropisómero más eficiente de tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, α<sub>3β</sub>, que tiene todos los sustitutos voluminosos en el mismo lado del plano definido por el macrociclo, de manera que dicho atropisómero eficiente o su sal aceptada farmacéuticamente constituye más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de los atropisómeros presentes en la composición farmacéutica mencionada.

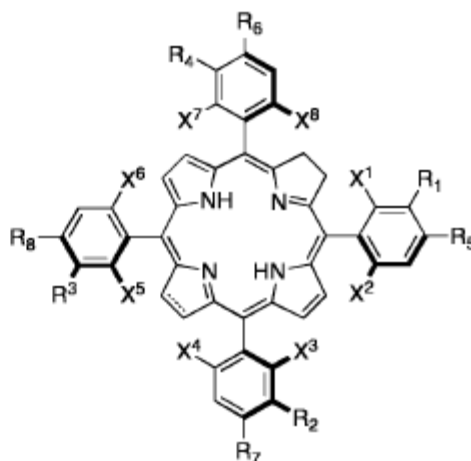
30 En otra versión de la presente invención, la composición farmacéutica está enriquecida mediante el atropisómero más eficiente de tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, α<sub>4</sub>, de manera que dicho atropisómero eficiente o su sal farmacéuticamente aceptada constituye más del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de los atropisómeros presentes en dicha composición farmacéutica.

35 En otra versión de la presente invención, la composición farmacéutica comprende además un portador aceptado farmacéuticamente.

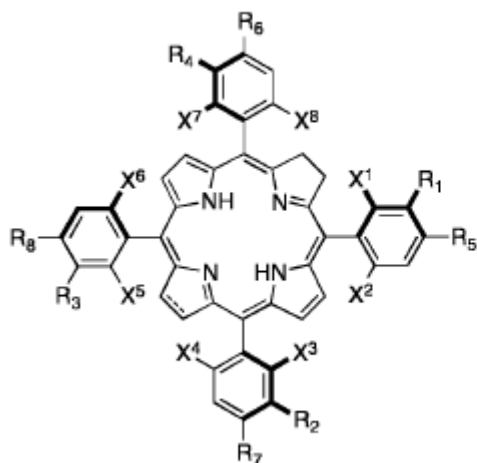
40 La presente invención también revela un proceso para la preparación de una composición farmacéutica enriquecida con los dos atropisómeros más eficaces de las tetrafenilclorinas y tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, a saber, atropisómeros α<sub>3β</sub> y α<sub>4</sub>, que tienen la mayoría de los sustitutos voluminosos en el mismo lado del plano definido por el macrociclo, que supone un paso para aislar la mezcla de cloro o atropisómeros de bacterioclorina de las fórmulas:



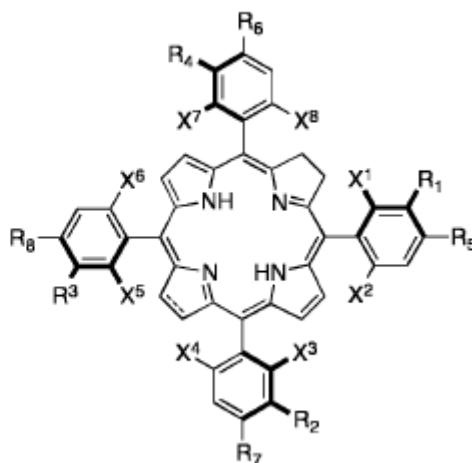
Fórmula (I-A) = atropisómero  $\alpha\beta\alpha\beta$



Fórmula (I-B) = atropisómero  $\alpha_2\beta_2$



Fórmula (I-C) = atropisómero  $\alpha_3\beta$



Fórmula (I-D) = atropisómero  $\alpha_4$

5 en la que:



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

las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

$X^2$ ,  $X^4$ ,  $X^6$  y  $X^8$  son de flúor;

10  $X^1$ ,  $X^3$ ,  $X^5$  y  $X^7$  son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

Los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son independientemente  $-OH$ ,  $-OR$  o  $-SO_2R''$ , donde los  $R''$  se eligen independientemente de  $-Cl$ ,  $-OH$ ,  $-aminoácido$ ,  $-OR$ ,  $-NHR$  o  $-NR_2$  donde los  $R$  son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o  $R_2$  representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

$R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$ , independientemente H,  $-OH$ ,  $-OR$ ,  $-Cl$ , o  $-NHR$  donde los  $R$  son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono;

15 en el que los atropisómeros con la mayoría de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  o  $R_4$  en el mismo lado del plano del macrociclo están separados, al menos parcialmente, por precipitación selectiva, cromatografía, extracción de disolventes, isomerización rotacional térmica o fotoquímica o fotodescomposición selectiva. Así, las composiciones farmacéuticas que están enriquecidas con los atropisómeros deseados de las fórmulas aquí incluidas (p. ej., enriquecidas con  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$ ,  $\alpha_3\beta$  o  $\alpha_4$ ) pueden ser obtenidas por cualquier método, incluyendo la precipitación selectiva, cromatografía,

20 extracción solvente, isomerización rotacional térmica o fotoquímica o la fotodescomposición selectiva, o pueden ser enriquecidas combinando lotes aislados o enriquecidos con un solo atropisómero o con una combinación de

atropisómeros para proporcionar una composición que tenga la proporción deseada de atropisómeros de las fórmulas aquí incluidas.

5 El enriquecimiento de la composición farmacéutica es factible dado que es posible separar parcialmente los atropisómeros  $\alpha\beta\alpha\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$  aprovechando la diferencia de polaridad y/o volumen y/o forma excluidos y/o fotoestabilidad de los atropisómeros que tienen la mayoría de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  o  $R_4$  en el mismo lado del plano con respecto a los atropisómeros que tienen el mismo número de grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  o  $R_4$  en ambos lados del plano. Esta separación es posible gracias a la estabilidad de cada atropisómero junto con la alta restricción de la rotación del macrociclo del enlace fenilo de los atropisómeros de la Fórmula (I).

10 En otra versión de la presente invención, la precipitación selectiva de la mezcla de atropisómeros de cloro o bacterioclorina, disuelta primero en un disolvente de polaridad más alta y luego precipitada selectivamente por la adición a la solución de un disolvente de polaridad más baja, da como resultado un precipitado enriquecido con los atropisómeros  $\alpha\beta\alpha\beta$  y  $\alpha_2\beta_2$  y una solución enriquecida con los atropisómeros  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$  de forma que sus concentraciones suman, al menos, un 70% (por ejemplo, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) de la concentración de todos los atropisómeros presentes en la solución. Mutatis mutandis, la mezcla de atropisómeros puede disolverse primero en un disolvente de menor polaridad y la precipitación selectiva se logra mediante la adición de un disolvente de mayor polaridad.

15 En otra versión de la presente invención, la extracción con disolvente incluye un primer paso de disolución de la mezcla de atropisómeros de cloro o bacterioclorina con un disolvente polar; y un segundo paso, en el que se añade un disolvente menos polar, que produce una separación de fase líquido-líquido con el disolvente polar, extrayendo así los atropisómeros de menor polaridad.

En otra versión de la presente invención, la recristalización comprende la formación de cristales que contienen los atropisómeros con la mayoría de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  o  $R_4$  en el mismo lado del plano del macrociclo que es complementario de la composición de atropisómeros en el licor madre.

25 En otra versión de la presente invención, la isomerización rotacional térmica o fotoquímica incluye un primer paso que consiste en enlazar preferentemente al menos un atropisómero de la mezcla de atropisómeros de cloro o de bacterioclorina con un soporte al que dicho atropisómero tiene gran afinidad, y un segundo paso, que consiste en proporcionar suficiente energía térmica o radiativa para promover la isomerización rotacional preferencial de los atropisómeros menos enlazados con el soporte.

30 En otra versión de la presente invención el soporte es preferentemente gel de sílice y el atropisómero preferentemente enlazado al soporte es el atropisómero con la Fórmula (I-D).

En otra versión de la presente invención, la fotodescomposición selectiva incluye un primer paso que consiste en la disolución de la mezcla de atropisómeros de cloro o de bacterioclorina en un disolvente aerado; y un segundo paso, que consiste en la irradiación con luz que es absorbida por la mezcla de atropisómeros para fotodescomponer en mayor grado los atropisómeros menos fotoestables.

35 Una de las ventajas de los atropisómeros  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$  de la presente invención radica en su capacidad de interactuar fuertemente con el oxígeno molecular para generar especies de oxígeno más reactivas y producir localmente un estrés oxidativo mayor. Otra ventaja es su mayor fotoestabilidad, que aumenta el recambio de las especies de oxígeno reactivo que hace que se absorban más fotones.

40 Es también el objetivo de esta invención revelar el uso de las composiciones farmacéuticas descritas aquí para el tratamiento de desórdenes hiperproliferativos incluyendo, entre otros, cánceres o carcinomas, mielomas, psoriasis, degeneración macular, así como condiciones precancerosas incluyendo, entre otros la displasia cervical y la displasia oral.

45 Es también el objetivo de esta invención revelar el uso de las composiciones farmacéuticas descritas aquí para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos incluyendo, entre otros, virus, bacterias, rickettsia, micoplasma, protozoos, hongos; y parásitos incluidos, pero sin limitarse a, los invertebrados multicelulares generalmente microscópicos o muy pequeños, además de los óvulos o formas no adultas de los mismos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Sin intención de limitar esta divulgación, esta solicitud presenta los dibujos adjuntos de representaciones ilustradas para una más fácil comprensión.

50 Figura 1. Atropisómeros de tetrafenilbacterioclorinas halogenadas, donde las líneas en negrita representan enlaces que están por encima del plano del macrociclo y definen la orientación del grupo R por encima o por debajo de ese plano, como lo ilustran los esquemas que se encuentran debajo de las estructuras. El grupo R' representa  $-\text{SO}_2\text{R}''$ , donde los R'' son elegidos independientemente de  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{aminoácido}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NHR}$  y  $-\text{NR}_2$  donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o  $\text{R}_2$  representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono. Los átomos  $\text{X}^1$  y  $\text{X}^2$  son cada



uno elegido independientemente del halógeno (F, Cl, Br) y átomos de hidrógeno, siempre que al menos todos los átomos X<sup>2</sup> sean halógenos.

Figura 2. Cromatograma UHPLC con detección a 380 nm de una muestra de 5,10,15,20-tetrakis (2,6-difluoro- 3-N-metilsulfamoilfenilo) cloro obtenida de la síntesis sin disolvente.

- 5 Figura 3. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de una muestra de cloro de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) obtenida de la síntesis sin disolvente.

Figura 4. Cromatograma HPLC de una muestra de bacterioclorina de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) obtenida de la síntesis sin disolvente.

- 10 Figura 5. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de una muestra de bacterioclorina 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) obtenida de la síntesis sin disolvente.

Figuras 6A, 6B, 6C y 6D. Cromatogramas HPLC de muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D separadas por HPLC preparatorio.

Figura 7. El espectro <sup>1</sup>H-RMN de la muestra LUZ11-A.

Figura 8. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la muestra LUZ11-B.

- 15 Figura 9. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la muestra LUZ11-C.

Figura 10. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la muestra LUZ11-D.

Figura 11. Estructura de rayos X del atropisómero α<sub>4</sub> de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina, donde los átomos de flúor están representados en amarillo, los átomos de nitrógeno en azul, los átomos de azufre en verde, los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de carbono en negro.

- 20 Figura 12. A) Espectros de absorción en etanol de las muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D. B) Las gráficas de Beer-Lambert de las mismas muestras empleadas para calcular los coeficientes de absorción molar de las muestras suponiendo que toda la masa que se ha pesado es la masa de LUZ11.

Figura 13. Los cromatogramas HPLC de las fracciones X e Y que revelan el enriquecimiento de la fracción Y en cuanto a la cantidad de atropisómeros α<sub>3β</sub> y α<sub>4</sub>.

- 25 Figura 14. Caída de la absorción en el pico de la longitud de onda más alta de las muestras de LUZ11-A (744,5 nm), LUZ11-B (744,5 nm), LUZ11-C (745 nm) y LUZ11-D (746 nm) en metanol:PBS (3:2), en función de la duración de la irradiación.

- 30 Figura 15. Las fracciones de supervivencia de las células HT-29 para aumentar las dosis de fotosensibilizador de las muestras LUZ11, LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D y una dosis de luz constante de 1 J/cm<sup>2</sup> utilizada para obtener los valores IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> que se presentan en la Tabla 5.

Figura 16. Las fracciones de supervivencia de las células CT26 para aumentar las dosis de fotosensibilizador de las muestras LUZ11, LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D y una dosis de luz constante de 1 J/cm<sup>2</sup> utilizada para obtener los valores IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> presentados en las Tablas 1 y 5.

- 35 Figura 17. Gráfica de Kaplan-Meier del recurrencia de un tumor CT26 en ratones BALB/C después la TFD con 0,7 mg/kg del fotosensibilizador indicado en la gráfica, y una fluencia de luz de 41 J/cm<sup>2</sup>. Los ratones que permanecieron libres de tumores 60 días después del tratamiento se consideraron curados.

- 40 Figura 18. Gráfica de Kaplan-Meier del recurrencia de un tumor CT26 en ratones BALB/C después de la TFD con 0,7 mg/kg de las composiciones de atropisómeros indicadas en la gráfica, y una fluencia de luz de 41 J/cm<sup>2</sup>. Los ratones que permanecieron libres de tumores 60 días después del tratamiento se consideraron curados. La muestra X y la muestra Y son del Ejemplo 3.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS VERSIONES

En relación con los dibujos, en el presente documento se describen con más detalle las versiones opcionales, que no obstante no pretenden limitar el alcance de la presente solicitud.

##### A. Definiciones

- 45 A los efectos de la presente solicitud, se aplicarán las siguientes definiciones:

El término "estereoisómero" se refiere a los compuestos que tienen idéntica constitución química pero que difieren en cuanto a la disposición de los átomos o de los grupos de átomos en el espacio.

"Atropisómero" es un estereoisómero que resulta de la rotación axial lenta sobre un solo enlace, puede interconvertirse térmica o fotoquímicamente pero la interconversión es lo suficientemente lenta a temperatura ambiente bajo luz ambiente como para permitir su separación analítica.

5 Por "mezcla estadística de atropisómeros" de tetrafenilporfirinas, tetrafenilclorinas o tetrafenilbacterioclorinas halogenadas se entiende la mezcla de atropisómeros  $\alpha\beta\alpha\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$ , C(atropisómeros 3 y  $\alpha_4$  obtenidos mediante síntesis, donde dichos atropisómeros están presentes en las siguientes proporciones:  $(\alpha_2\beta_2)/(\alpha\beta\alpha\beta)$  entre 1,5 y 2,5,  $(\alpha_4)/(\alpha\beta\alpha\beta)$  entre 3,0 y 4,5,  $(\alpha_4)/(\alpha\beta\alpha\beta)$  entre 0,6 y 1,2.

10 Se entiende por composiciones farmacéuticas "enriquecidas con atropisómeros  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$ " las mezclas de atropisómeros que tienen un contenido relativo menor de los atropisómeros menos fotoactivos  $\alpha\beta\alpha\beta$  y  $\alpha_2\beta_2$  con respecto al contenido de los atropisómeros más fotoactivos,  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$ , presentes en la mezcla estadística de atropisómeros obtenida mediante la síntesis del compuesto fotoactivo, de manera que los atropisómeros  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$  constituyen más del 70% de dicha mezcla.

15 La "eficacia de la TDP" es la capacidad del compuesto fotoactivo para matar células, bacterias o virus, o para destruir el tejido enfermo, mediante una dosis determinada de una determinada sustancia y de luz. Una mayor eficacia de la TDP corresponde a un mayor grado de muerte celular, muerte de microorganismos o de necrosis tisular para una misma dosis del compuesto fotoactivo y de luz.

La "dosis de luz" es una medida del número de fotones suministrados al objetivo donde está presente el compuesto fotoactivo.

20 "LUZ11" es el nombre en clave de la bacterioclorina 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo). "LUZ11-A" es una muestra compuesta en una parte importante por el atropisómero  $\alpha\beta\alpha\beta$  de LUZ11. "LUZ11-B" es una muestra compuesta en una parte importante por el atropisómero  $\alpha_2\beta_2$  de LUZ11. "LUZ11-C" es una muestra compuesta en una parte importante por el atropisómero  $\alpha_3\beta$  de LUZ11. "LUZ11-D" es una muestra compuesta en una parte importante por el atropisómero  $\alpha_4$  de LUZ11.

25 "Compuesto en una parte importante" en este contexto se refiere a una composición en la que el atropisómero es por lo menos el 80% de los atropisómeros presentes en la muestra.

El acrónimo HPLC se usa para indicar Cromatografía Líquida de Alta Presión.

30 En el presente documento, por "trastornos hiperproliferativos" se entienden los trastornos que comparten como patología subyacente la proliferación celular excesiva causada por el crecimiento celular no regulado o anormal, e incluyen la angiogénesis no controlada. Entre los ejemplos de trastornos hiperproliferativos se encuentran, entre otros, los cánceres o carcinomas, los mielomas, la psoriasis y la degeneración macular.

La expresión "tejido hiperproliferativo", tal como se utiliza aquí, se refiere al tejido que crece fuera de control, incluidos los tumores y el crecimiento desenfrenado de vasos sanguíneos, como el que se da en la degeneración macular relacionada con la edad.

35 Tal y como se usa en este documento, "agente infeccioso" se refiere a microorganismos o parásitos invasores. Tal y como se utiliza en este documento, "microorganismo" se refiere a los virus, bacterias, rickettsia, micoplasma, protozoos, hongos o microorganismos similares, y "parásito" se refiere a los invertebrados multicelulares infecciosos, generalmente microscópicos o muy pequeños, o a sus óvulos o formas no adultas.

40 La invención también proporciona una composición farmacéutica, que se compone de una cantidad efectiva del compuesto descrito aquí (por ejemplo, atropisómeros de las fórmulas incluidas en este documento) y un portador farmacéuticamente aceptable.

45 Los niveles de dosificación real y el curso de tiempo para la administración de los ingredientes activos de las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser modificados con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz en cuanto a la respuesta terapéutica deseada en un paciente en particular, siempre empleando una composición y modo de administración que no sean tóxicos (o inaceptablemente tóxicos) para dicho paciente. En la práctica, al menos un compuesto según la presente invención (por ejemplo, atropisómeros de las fórmulas incluidas este documento) se administra en una cantidad farmacéuticamente efectiva a un sujeto que la necesita mediante un portador farmacéutico por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesional o intracerebroventricular o por administración oral o aplicación tópica. De acuerdo con la presente invención, un compuesto de la invención puede ser administrado sólo o en combinación con un segundo, terapéutico diferente. Por 50 "en combinación con" se entiende juntos, principalmente de forma simultánea o secuencial. En una versión, un compuesto de la invención se administra de forma intensa. Por lo tanto, el compuesto de la invención puede ser administrado para un tratamiento de corta duración, por ejemplo, un día o una semana. En otra versión, el compuesto de la invención puede ser administrado durante un período de tiempo más largo para mejorar los trastornos crónicos, como, por ejemplo, durante una semana o varios meses, dependiendo de la patología que se vaya a tratar.

La expresión "cantidad farmacéuticamente efectiva" tal y como se utiliza en el presente documento indica una cantidad de un compuesto de la invención (por ejemplo, atropisómeros de las fórmulas del presente documento), lo suficientemente alta como para modificar significativamente de forma positiva la patología a tratar pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves (en una proporción beneficio/riesgo razonable), dentro de lo que se considera un criterio médico correcto. La cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la invención variará en función del objetivo concreto que se desee conseguir, la edad y el estado físico del paciente que se esté tratando, la gravedad de la enfermedad subyacente, la duración del tratamiento, la naturaleza de terapias concurrentes y el compuesto específico empleado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención administrado a un niño o a un recién nacido se reducirá proporcionalmente de acuerdo con el buen juicio médico. La cantidad efectiva de un compuesto de la invención será, por lo tanto, la cantidad mínima que causará el efecto deseado. Además, con la terapia fotodinámica, la "cantidad farmacéuticamente efectiva" de la composición o el compuesto farmacéutico depende en parte de otros factores, tales como la dosis de luz y oxígeno que son necesarios para lograr un efecto terapéutico. Así pues, también habrá una "cantidad efectiva" de luz así como de oxígeno cuando se trate a un sujeto o paciente. Otros factores importantes que contribuyen a la determinación de la "cantidad farmacéuticamente efectiva" de la sustancia, la luz y el oxígeno son los intervalos entre la sustancia y la luz (el tiempo transcurrido entre la administración de la sustancia y la aplicación de luz a los tejidos). El intervalo entre medicamentos y luz es importante ya que, por ejemplo, la administración de una dosis más alta del medicamento, de 50 mg/kg, y la iluminación del tejido una semana después con una dosis de luz de 500 J/cm<sup>2</sup> puede ser tan ineficiente o ineficaz como utilizar una dosis del medicamento de 0,01 mg/kg y aplicar luz al tejido 10 minutos después de su administración con una dosis de luz de 0,1 J/cm<sup>2</sup>. La eliminación de la sustancia (metabolización) por parte del organismo entre la administración de la misma y la aplicación de luz puede disminuir la eficacia de la terapia cuando aumenta (se prolonga) el intervalo de tiempo entre la sustancia y la iluminación. Sin embargo, el aumento del intervalo de tiempo entre la administración de la sustancia y la luz puede dar lugar a un tratamiento más selectivo y a reducir los posibles efectos adversos. Así pues, por lo menos en base a esas razones, el intervalo de tiempo entre la sustancia y la luz es un factor importante que debe tenerse en cuenta a la hora de determinar la "cantidad farmacéuticamente efectiva" de las composiciones de la presente invención.

Además de los factores examinados anteriormente que afectan a la determinación de la "cantidad efectiva" de sustancia, luz, oxígeno e intervalo de tiempo entre la droga y la luz, una persona con conocimientos medios en la materia también tendría en cuenta la tasa de fluencia de la luz (cuántos fotones se administran en cada unidad de superficie por unidad de tiempo). La tasa de fluencia es importante debido a que una administración excesiva de fotones en un breve tiempo puede agotar el oxígeno del tejido y hacer que la terapia sea ineficiente o ineficaz.

Por último, otro parámetro importante para un tratamiento eficaz es el margen del tumor o tejido que se está irradiando. Con los tratamientos fotodinámicos, el tejido irradiado es el objetivo principal del tratamiento y morirá primero, aunque también pueden observarse efectos sistémicos (fuera del campo de irradiación) como resultado de la estimulación del sistema inmunológico del huésped y/u otras cascadas de efectos biológicos provocados por el efecto del tratamiento fotodinámico en el objetivo principal. Así pues, la determinación del margen es tan importante al tratar a un sujeto o paciente con terapia fotodinámica como lo sería en el tratamiento quirúrgico.

Una ventaja práctica categórica de la presente invención es que el compuesto (p. ej., los atropisómeros de las fórmulas de este documento) puede ser administrado fácilmente de forma intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral, intralesional, o vía inyección intracerebroventricular o a través de su aplicación tópica, en forma de cremas o geles. En función de la vía de administración, es posible que los ingredientes activos presentes en un compuesto de la invención requieran ser recubiertos de un determinado material que proteja a dicho compuesto de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan causar su desactivación. A fin de administrar un compuesto de la invención por medios distintos de la administración parenteral, el compuesto puede ser recubierto o administrado con un material que impida su desactivación o mejore su disolución.

El compuesto (por ejemplo, los atropisómeros de las fórmulas que figuran en el presente documento) puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también pueden prepararse, por ejemplo, en glicerol, en polietilenglicol líquido o sus mezclas, y en aceites.

Las formas farmacéuticas aptas para el uso en inyectables incluyen soluciones estériles (cuando son solubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser lo suficientemente fluida como para que pueda ser administrada mediante jeringuilla fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, DMSO, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), las mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, al mantener el tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando al disolvente apropiado, el compuesto de la invención en la cantidad requerida junto con algunos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera y seguido de la esterilización del filtro. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos compuestos esterilizados a un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y el resto de ingredientes

necesarios entre los mencionados anteriormente. Cuando se empleen polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo además de otros ingredientes adicionales que se desee a partir de una solución estéril previamente filtrada de los mismos.

5 Para su administración terapéutica oral, el compuesto puede incorporarse a excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos tópicos orales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Las composiciones o preparaciones según la invención presente están preparadas de modo que cada unidad de dosificación oral, de la forma que sea, contiene una concentración suficiente del compuesto para tratar la afección de un sujeto.

10 Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir de portadoras farmacéuticas son los azúcares, como la lactosa, la glucosa y la sacarosa; los almidones como el de maíz y el de patata; la celulosa y sus derivados, como la carboximetilcelulosa sódica, la etilcelulosa y los acetatos de celulosa; el tragacanto en polvo; la malta; la gelatina; el talco; los ácidos esteáricos; el estearato de magnesio; el sulfato de calcio; aceites vegetales, como los aceites de cacahuete, de semilla de algodón, de sésamo, de oliva, de maíz y de theobroma; polioles como el propilenglicol, la glicerina, el sorbitol, el manitol y el polietilenglicol; agar; ácidos alginicos; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica y solución amortiguadora de fosfatos; leche desnatada en polvo; así como otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en formulaciones farmacéuticas como la vitamina C, el estrógeno y la equinácea, por ejemplo. También pueden estar presentes agentes humectantes y lubricantes como el lauril sulfato de sodio, así como colorantes, saborizantes, lubricantes, excipientes, aglutinantes, estabilizadores, antioxidantes y conservantes.

20 En otra versión, la invención proporciona una composición con una gama de dosificación o un método como el antes descrito, en el que la cantidad eficaz del compuesto descrito en este documento (p. ej. atropisómeros de las fórmulas descritas en este documento) varía entre aproximadamente 0,005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 200  $\text{mg}/\text{kg}$ . En ciertas versiones, la cantidad efectiva del compuesto de las fórmulas aquí incluidas (por ejemplo, atropisómeros de las fórmulas descritas en este documento) varía desde unos 0,02  $\text{mg}/\text{kg}$  hasta unos 20  $\text{mg}/\text{kg}$ . En otra versión, la cantidad efectiva de compuesto que aquí se describe oscila entre unos 0,2  $\text{mg}/\text{kg}$  y 2  $\text{mg}/\text{kg}$ . En otra versión, la cantidad efectiva del compuesto que aquí se describe oscila entre unos 0,2  $\text{mg}/\text{kg}$  y 1  $\text{mg}/\text{kg}$  y la dosis de luz oscila entre 30 y 300  $\text{J}/\text{cm}^2$ . En otra versión, la cantidad efectiva del compuesto que aquí se describe oscila entre unos 0,5  $\text{mg}/\text{kg}$  y 2  $\text{mg}/\text{kg}$  y la dosis de luz oscila entre 20 y 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ . En otra versión, la cantidad efectiva del compuesto que aquí se describe oscila entre unos 0,05  $\text{mg}/\text{kg}$  (50  $\text{ng}/\text{mL}$ ) y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , la dosis de luz está entre 3 y 300  $\text{J}/\text{cm}^2$  y el intervalo entre la droga y la luz se selecciona variando desde su administración de forma conjunta hasta una semana después de la administración de la sustancia.

En otras versiones, la invención proporciona un método, tal y como se describió anteriormente, en el que la cantidad eficaz del compuesto descrito aquí (p. ej. atropisómeros de las fórmulas incluidas en este documento) en el tejido objetivo en el momento de la irradiación varía aproximadamente entre 0,1 nM y aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ . En ciertas versiones, la cantidad efectiva varía entre 10,0 pM y 10 nM. En otra versión, la cantidad efectiva oscila entre unos 0,2 nM y unos 2 nM. En otra versión, la cantidad efectiva oscila entre unos 0,1  $\mu\text{M}$  y unos 100  $\mu\text{M}$ .

Otro de los objetos de la presente invención consiste en un kit que comprende una composición farmacéutica descrita aquí e instrucciones para la administración de dicha composición. El kit puede proporcionar la composición farmacéutica en cualquier recipiente adecuado (es decir, frasco, botella, jeringa, ampolla, tubo) e incluir instrucciones tales como para administración/terapia fotodinámica (por ejemplo, instrucciones sobre exposición a la luz, exposición a longitudes de onda e instrucciones sobre su duración).

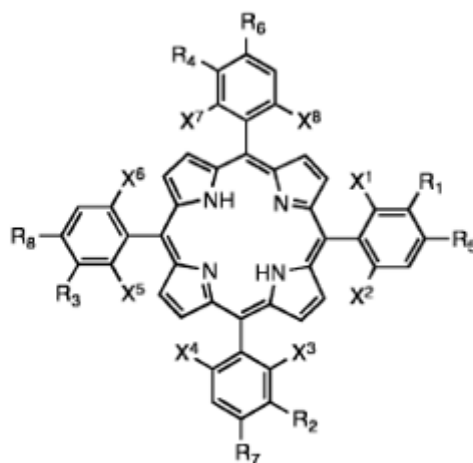
Otro objeto de la presente invención es el empleo de un compuesto tal y como se ha descrito aquí (p. ej., atropisómeros de las fórmulas descritas en este documento) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección o enfermedad descrita en este documento. Otro objeto de la presente invención es el empleo de un compuesto tal y como se ha descrito aquí (p. ej., atropisómeros de las fórmulas descritas en este documento) para el tratamiento de una afección o enfermedad descrita en este documento.

La mención de una lista de grupos químicos en cualquiera de las definiciones de las variables incluidas en el presente documento incluye tanto las definiciones de esa variable en particular como sus posibles combinaciones con el resto de grupos mencionados. La mención de una versión respecto a una de las variables incluidas en este documento incluye tanto a esa versión como a cualquier otra versión en particular o en combinación con cualquier otra versión o parte de ella. La mención de una versión en el presente documento incluye tanto a esa versión como a cualquier otra versión en particular o en combinación con cualquier otra versión o parte de ella.

#### B. Compuestos precursores

Los precursores de las porfirinas pueden prepararse mediante el proceso, descrito en las patentes PCT/EP/012212 (1) y PCT/PT2009/000057 (2), que comprende los siguientes pasos:

(i) reducción de la porfirina según la Fórmula (IV)



Fórmula (IV)

En la que:

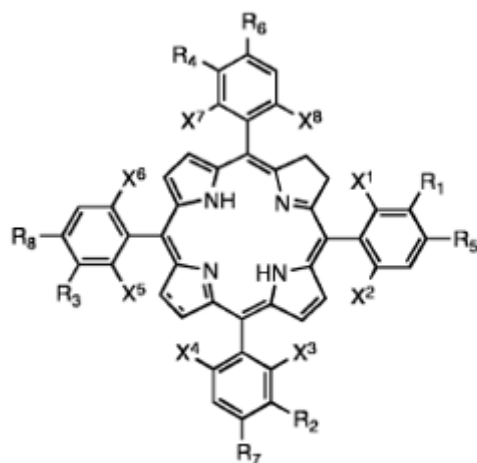
una mezcla estadística de atropisómeros está presente; X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>6</sup> y X<sup>8</sup> son de flúor;

5 X<sup>1</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>5</sup> y X<sup>7</sup> son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

Los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente -OH -OR o -SO<sub>2</sub>R", donde los R" se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o -NR<sub>2</sub> donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o R<sub>2</sub> representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>, independientemente H, -OH, -OR, -Cl, o -NHR donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono,

10 del derivado de cloro y/o los derivados de bacterioclorina de la fórmula



Fórmula (I)

En la que:



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

15 una mezcla estadística de atropisómeros está presente;

utilizando hidrazidas y en presencia de bases orgánicas restringidas, tal y como se describe en la patente PCT/EP/012212 (1); opcionalmente, la fase reductora puede realizarse en ausencia de disolventes y en ausencia de bases, tal y como se describe en la patente PCT/PT2009/000057 (2).

Convenientemente, la hidrazida sería p-toluenosulfonilhidrazida, 4-clorobencenosulfonilhidrazida, 4,4'-oxibis(bencenosulfonilo) hidrazida, bencenosulfonilhidrazida, 4-metoxibencenosulfonilhidrazida o hidrazida benzoica.

Convenientemente, la base estéricamente restringida se selecciona de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) y 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU).

- 5 Convenientemente, la fase de reducción se lleva a cabo a una temperatura de 70 a 200°C. Convenientemente, la fase de reducción se lleva a cabo a una temperatura de al menos 100°C. De manera adecuada, la fase de reducción se lleva a cabo durante al menos 5 minutos.

Convenientemente, la fase de reducción se lleva a cabo bajo una atmósfera inerte.

- 10 Convenientemente, la opción de llevar a cabo la reacción en ausencia de disolventes requiere el uso de una temperatura que esté por encima del punto de fusión de uno de los reactivos, de manera que el otro o los otros reactivos estén parcialmente disueltos, o dispersos, en el reactivo fundido. Para las reacciones en estado sólido entre los derivados de las hidrazidas y las porfirinas, la reacción en estado sólido se lleva a cabo convenientemente a temperatura por encima del punto de fusión de la hidrazida.

### C. Instrumentos

- 15 Los análisis elementales se llevaron a cabo en un analizador elemental Leco TruSpec CHNS. Los espectros EM-RMN y los espectros fueron grabados en un Bruker Avance 400 MHz. Las asignaciones de <sup>1</sup>H se realizaron mediante experimentos 2D COSY y NOESY. Los datos de la Espectrometría de Masas de Alta Resolución de ESI-FIA TOF fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas Micromass Autospec. HPLC Shimadzu Prominence equipado con una matriz de diodos (modelo SPD 20 AV). Se siguieron las separaciones a 743 nm, 23°C en una columna semipreparativa Inertsil-Phenyl (250\*10mm; 5µm).

- 20 Los espectros de absorción fueron registrados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100. Los espectros de fluorescencia se midieron con un espectrofotómetro Spex Fluorolog 3, con corrección para el sistema de dependencia de la longitud de onda (fotomultiplicador RCA C31034). Los espectros de absorción transitoria se midieron mediante un espectrómetro Applied Photophysics LKS para fotólisis cinética con destello láser de 60 nanosegundos usando el tercer armónico de un láser de excitación Spectra-Physics Quanta Ray GCR 130-01 Nd/YAG, un fotomultiplicador Hamamatsu 1P28 y un osciloscopio Hewlett-Packard Infinium (1 GS/s). Las mediciones de la fotólisis de los destellos se realizaron en presencia de aire y en soluciones saturadas de argón. La fosforescencia de oxígeno singlete a temperatura ambiente se midió a 1270 nm con un fotomultiplicador Hamamatsu R5509-42, enfriado a 193 K en una cámara de nitrógeno líquido (Products for Research modelo PC176TSCE005), tras la excitación láser de soluciones aereadas a 355 nm mediante un espectrómetro de Applied Photophysics adaptado. Para la irradiación de las bacterioclorinas en los experimentos de fotoblanqueo se empleó un láser CW de Omicron Laserage que emitía a 749 +/-3 nm.

### D. Métodos

- 35 Se disolvió una cantidad adecuada de cada fracción en un disolvente analítico a una concentración de 0.025 mg/ml. Una fracción de 15 µl de la solución preparada fue analizada mediante HPLC con detección UV-Vis. La separación de los atropisómeros se logró utilizando una columna Zorbax XDB Eclipse Phenyl (150\*4,6 mm; 5 µm) y un programa de gradientes de dos fases móviles: metanol (fase móvil A) y una solución de tampón de acetato de amonio, 100 mM, pH 9,5 con metanol a 25:75, v/v (fase móvil B) bombeada a una velocidad de flujo constante de 1,0 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo constante en 20°C. La cantidad relativa de los cuatro atropisómeros LUZ11 se determinó en 743 nm.

- 40 Los experimentos de fotoblanqueo se llevaron a cabo en soluciones de metanol:PBS (3:2), donde PBS se refiere a soluciones salinas tamponadas con fosfato. Las soluciones fueron irradiadas en una cubeta con una trayectoria óptica de 1 cm utilizando un láser CW de Omicron Laserage que emitía a 749 ± 3 nm. La potencia total de salida fue de 640 mW. Para cada compuesto, la absorbencia se registró a intervalos de tiempo variables desde unos pocos minutos hasta horas de irradiación. Las absorbencias iniciales de los compuestos fueron ca. 1.0. Los espectros de absorción de triplete-triplete y la vida útil de los atropisómeros ( $\tau_T$ ) se midieron con el equipo de espectros de absorción transitoria descrito anteriormente, con una excitación a 355nm, donde las soluciones tenían absorciones entre 0,25 y 0,30.

- 45 Los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete en etanol se obtuvieron mediante un procedimiento descrito en la literatura (17), utilizando la fenalenona como referencia. El valor encontrado en la literatura para el rendimiento cuántico de oxígeno singlete obtenido con fenalenona en etanol es  $\Phi_{\Delta}$  0,95 (18).

- 50 Las composiciones farmacéuticas aquí descritas han sido evaluadas en estudios in vitro utilizando células tumorales en cultivo e irradiación con láser de diodo a 749 nm. Las células HT-29 (carcinoma de colon humano) y CT26 (carcinoma de colon de ratón) se cultivaron en Modified Eagle Medium de Dulbecco (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), complementado con un 10% de serum bovino fetal (FBS) (Biochrom, Berlín, Alemania) desactivado por calor y 100 IU/ml de penicilina - 100 µg/ml de estreptomina (Lonza, Verviers, Bélgica). Las líneas celulares se mantuvieron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Orange Scientific, Brainc- l'Alleud, Bélgica) a 37°C en una atmósfera humidificada

5 con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células en la confluencia del 85-90% se separaron con solución de Trypsin-Versene-EDTA (Lonza, Verviers, Bélgica), se contaron y se cultivaron en placas DB Falcon black de 96 pozos con fondo plano transparente (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) a las densidades deseadas, en 100 µl de medio de cultivo, y se dejaron adherir durante la noche. Las soluciones madre de los compuestos de prueba se prepararon en dimetilsulfóxido y se diluyeron en un medio de cultivo para obtener la concentración deseada para la incubación con las células a 37°C durante 24 h en la oscuridad. Cada concentración fue probada al menos por triplicado. Después de la incubación, las células se lavaron una vez con 200 µl de PBS para eliminar el compuesto no internalizado y se añadieron 100 µl de medio de cultivo fresco. Las células fueron irradiadas (cada pozo individualmente) con un láser de diodo hecho a medida, modelo LDM750.300.CWA.L.M con controlador 1201-08P y cabeza láser 1201-08D (Omicron, Rodgau, Alemania) emitiendo a 749 nm. El rayo láser se acopló a una fibra óptica con una lente divergente regulable en el extremo de la fibra, que se fijó en un soporte y se dirigió perpendicularmente a la placa que contenía las células. La lente de la fibra fue ajustada para que el área de irradiación coincidiera exactamente con el área inferior de los pozos de la placa, asegurando que cada pozo fuera irradiado individualmente y completamente con una densidad de potencia de 8.0 mW/cm<sup>2</sup> a nivel de placa. La medición de la potencia del láser se realizó con un medidor portátil de potencia LaserCheck (Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA). El tiempo de irradiación correspondiente a una dosis de luz de 1.0 J/cm<sup>2</sup> es de 125 segundos.

10 La viabilidad de las células se evaluó 24 h después de la irradiación utilizando el ensayo de reducción con resazurina. Resumiendo, la solución madre de resazurina sal sódica (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) (0.1 mg/ml en PBS) se diluyó al 10% en un medio de cultivo sin FBS ni antibióticos, y se añadieron 200 µl a las células de cada pozo. Las placas se incubaron durante 3-4 h a 37°C. Los valores de absorbencia de cada pozo se midieron a 540 nm y 630 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan Ex (Thermo - Electron Corporation, Vartaa, Finlandia). Los resultados de viabilidad celular se expresan como promedio ± SD de las condiciones replicadas de al menos dos experimentos independientes.

15 Los estudios de viabilidad celular indican la citotoxicidad de las sustancias. Esto se cuantificó expresando la muerte celular respecto a las células no tratadas (% de células de control, mantenidas en la oscuridad). Los resultados se trazaron como curvas dosis-respuesta (% de viabilidad celular en función de la concentración de la sustancia), que permiten determinar la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50% (IC50) y la concentración que reduce la viabilidad celular en un 90% (IC90) bajo una dosis de luz determinada.

20 Los ratones utilizados en el presente estudio fueron hembras BALB/c con un peso de 20-25 g (Laboratorios Charles River, Barcelona, España). Los ratones se mantuvieron en una dieta estándar de laboratorio con libre acceso al agua potable. El uso de estos animales con fines experimentales fue aprobado por el National Veterinary Authority (autorización DGVA nº 0420/000/000/2011). Para la implantación del tumor, 350.000 células CT26 (CRL-2638TM ATCC-LCG Standards, Barcelona, España) fueron tomadas en 0.1 ml de PBS e inoculadas subcutáneamente en el muslo derecho de cada ratón. Los tumores fueron tratados 8-10 días después de la inoculación, cuando sus diámetros alcanzaron aproximadamente 5 mm. Se trató a los ratones con un protocolo de TFD vascular, que comenzó con la inyección intravenosa del compuesto (0.7 mg/kg) seguida 15 minutos más tarde por la irradiación del tumor con el láser de diodo Omicron a 749 nm con una potencia de láser de 173 mW. El rayo láser se acopló a una fibra óptica, con una lente divergente fija, que se colocó perpendicularmente a la superficie del tumor, con el fin de irradiar un área de 1,33 cm<sup>2</sup> y entregar una dosis total de luz de 55 J.

#### 40 E. Propiedades de los compuestos

Las absorptividades de los compuestos se midieron en varias concentraciones en el µM, y en todos los casos se observó que seguían la ley de Beer-Lambert. Además, la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ) en el infrarrojo no varió dentro del rango de concentración estudiado. Esto indica que hay poca agregación entre las moléculas, que existen en su mayoría como monómeros en estas concentraciones en los disolventes estudiados. En la Tabla 1 se presentan los coeficientes de absorción molar de infrarrojos ( $\epsilon_{\max}$ ) y los máximos de longitud de onda en el etanol obtenidos para la bacterioclorina 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoiifenilo) (muestra LUZ11) y sus atropisómeros purificados (muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C, LUZ11-D). Esta bacterioclorina tiene una intensa absorción de luz en el infrarrojo cercano, donde los tejidos humanos son más transparentes que en el visible, lo cual es una característica fotosensible preferida para la TFD. Los atropisómeros tienen pequeñas diferencias en su  $\epsilon_{\max}$ . Por ejemplo,  $\epsilon_{\max}$  disminuye en un 3% de las muestras LUZ11-A a LUZ11-D. La misma tabla también representa la vida de los tripletes ( $\tau_T$ ) en soluciones de etanol aereado, el rendimiento cuántico de la fotodescomposición ( $\Phi_{PD}$ ) en soluciones aireadas de metanol:PBS (3:2) y el rendimiento cuántico del oxígeno singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) en soluciones de etanol aereado.

55 Tabla 1. Propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las muestras de LUZ11 enriquecidas con sus diferentes atropisómeros en etanol, excepto por el rendimiento cuántico de fotodescomposición ( $\Phi_{PD}$ ) que se midió en metanol:PBS (3:2), y la fototoxicidad para las células CT26 in vitro aplicando una dosis de luz de 1 J/cm<sup>2</sup>.

Muestra	Enriquecido con atropisómero	$\lambda_{max}$ nm	$\epsilon / 10^3 (M^{-1} cm^{-1})$	$\tau_T$ (aire) ns	$\Phi_{PD} / 10^{-6}$	$\Phi_{\Delta}$	IC50 (CT26) $\mu M$
LUZ11-A	$\alpha\beta\alpha\beta$	743	126	$257 \pm 7$	15	0.39	67.35*
LUZ11-B	$\alpha_2\beta_2$	743	137	$296 \pm 33$	15	0.35	1.460
LUZ11-C	$\alpha_3\beta$	743	137	$268 \pm 23$	12	0.50	0.816
LUZ11-D	$\alpha_4$	743	122	$266 \pm 15$	9	0.49	0.207

\*Extrapolado de la curva de regresión no lineal.

Las vidas transitorias se midieron a 400, 610 y 790 nm. Todas las descomposiciones de los tripletes eran claramente mono-exponenciales y en el etanol saturado de aire los tiempos de vida de los tripletes estaban en el rango de 200-300 nanosegundos. Dichos valores son coherentes con la transferencia de energía de difusión limitada desde el estado de triplete del fotosensibilizador al oxígeno molecular mediante una interacción de transferencia de carga (4).

La fotodescomposición utilizó un láser CW que emitía a  $749 \pm 3$  nm y una potencia total de 640 mW. Todos los compuestos siguieron una disminución mono-exponencial de sus intensidades de absorción. El atropisómero más fotoestable de la Tabla 1 es la muestra LUZ11-D, con un rendimiento cuántico de fotodescomposición de  $\Phi_{PD} = 9 \times 10^{-6}$

Todas las emisiones de oxígeno singlete medidas en soluciones de etanol aereadas están muy bien descritas por descomposiciones mono-exponenciales, con tiempos de vida típicos del oxígeno singlete ( $\tau_{\Delta} \approx 16 \mu s$ ). Los valores  $\Phi_{\Delta}$  de la Tabla 1 se obtuvieron mediante los procedimientos descritos anteriormente.

Utilizando los métodos descritos anteriormente y más detallados en los ejemplos que figuran a continuación, las concentraciones de los diversos atropisómeros necesarios para matar el 50% de las células CT26 in vitro con una dosis de luz láser de 1 J/cm<sup>2</sup> también se presentan en la Tabla 1. La drástica diferencia de las fototoxicidades entre las muestras LUZ11-A y LUZ11-D no pudo ser prevista según la forma conocida de actuación de la TFD, que se basa en el estrés oxidativo causado por la generación de EOR cuando un fotosensibilizador absorbe la luz en presencia de oxígeno. De hecho, no se podía prever que el atropisómero  $\alpha\beta\alpha\beta$ , que presentaba sólo pequeñas diferencias en la absorción de la luz y en su eficiencia para la generación de oxígeno singlete con respecto al atropisómero  $\alpha_4$  sería un fotosensibilizador mucho más deficiente. En anteriores usos de fotosensibilizadores para la TFD no se ha apreciado que los atropisómeros con el mismo número de grupos voluminosos a cada lado del plano definido por el macrociclo no contribuyan de manera apreciable a la eficacia en la TFD de la mezcla de atropisómeros. Es un objeto central de la presente invención describir, por primera vez, las composiciones farmacéuticas enriquecidas en atropisómeros  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$ , donde estos atropisómeros representan más del 70% de todos los atropisómeros presentes en la mezcla, que superan la eficacia de la TFD de la mezcla estadística de atropisómeros obtenida de sus síntesis. También es objeto de la presente invención describir una composición farmacéutica enriquecida con el atropisómero  $\alpha_3\beta$ , donde dicho atropisómero representa más del 60% de todos los atropisómeros presentes en la mezcla y mejora su eficacia en la TFD. También es objeto de la presente invención describir una composición farmacéutica enriquecida con el atropisómero  $\alpha_4$ , donde dicho atropisómero representa más del 20% de todos los atropisómeros presentes en la mezcla y mejorar su eficacia en la TFD. La presente invención también pretende describir, por primera vez, el uso de los procesos de separación química a temperaturas superiores a los 20°C y en presencia de luz y oxígeno, con el fin de enriquecer la mezcla de atropisómeros con atropisómeros  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$  de tetrafenilbacterioclorinas, anteriormente consideradas lábiles.

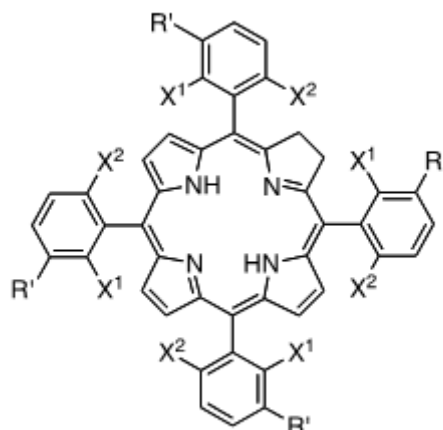
## EJEMPLOS

Este invento se describirá ahora con más detalle en los siguientes EJEMPLOS no excluyentes, con referencia a los siguientes dibujos:

### EJEMPLO 1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ATROPISÓMEROS PRESENTES EN TETRAFENILCLORINA DE SULFONAMIDA FLUORADA

La síntesis química de una mezcla de atropisómeros según establece la Fórmula (II),





Fórmula II

donde X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son átomos de flúor y R' es el grupo -SO<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub> y su caracterización, se realizó de la siguiente manera:

5 La síntesis de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) cloro se realiza mediante la reacción de la hidracida p-toluenosulfonilo (700 ± 10 mg) con 5,10,15,20-tetrakis(2,6- difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo)porfirina (100 ± 10 mg) a una presión inferior a 0,6 mbar, calentándose a 140 ± 1°C durante 15 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el crudo de la reacción se disuelve en diclorometano (≈50 mL) y se lava secuencialmente con hidróxido de sodio (0,5 M) y agua (3 veces). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y luego se concentró. La mezcla de compuestos se precipitó con hexano. El sólido se disolvió en dimetoxietano (DME) (20 mL) y se añadió FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (1 equiv.) a la solución, seguido de 0,1 mL de peróxido de hidrógeno (3% en agua). La solución final se mantuvo agitada a temperatura ambiente. Después de 90 minutos, se añadieron 0,1 mL de peróxido de hidrógeno (3% en agua) y la reacción se detuvo cuando el pico de absorción de la bacterioclorina (≈750 nm) hubo desaparecido (90 minutos). Se añadió carbonato de dietilo a la solución y la fase orgánica se lavó a continuación dos veces con una solución saturada de tiosulfato de sodio, dos veces con agua destilada, y luego, se secó sobre el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó y purificó mediante cromatografía en columna con gel de sílice (diclorometano/acetato de etileno). El cloro 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo) que contiene la mezcla de atropisómeros se obtuvo con un rendimiento del 80 ± 5% (80 ± 5 mg). La Figura 2 representa el cromatograma UHPLC con detección a 380 nm. La separación de todos los atropisómeros de cloro se logró utilizando una columna de Acquity BEH C18 (150\*2.1 mm; 1,7 μm) y un programa de gradiente de tres fases móviles: Tampón de acetato de amonio, 50mM (fase móvil A), isopropanol (fase móvil B) y una solución de metanol:acetonitrilo (70:30 v/v) (fase móvil C) bombeada a un flujo constante de 0,2 ml/min). La temperatura de la columna se mantuvo constante a 40°C. Sorprendentemente, el pico más grande, que se espera para la formación estadísticamente favorable del atropisómero α<sub>3</sub>β, se divide en dos. Esto se atribuye a la diferenciación entre la posición del pirrol reducido del macrociclo entre dos grupos fenilos con sustitutos voluminosos en el mismo lado del plano del macrociclo, y la posición del pirrol reducido entre dos grupos fenilos con sustitutos voluminosos en diferentes lados de dicho plano. Este ejemplo es ilustrativo de la viabilidad de la separación de los atropisómeros de los derivados de la tetrafenilclorina a 40°C en virtud de una combinación inesperada de la estabilidad de las tetrafenilclorinas y de la lentitud de la rotación de los enlaces macrociclo-fenilo a esa temperatura.

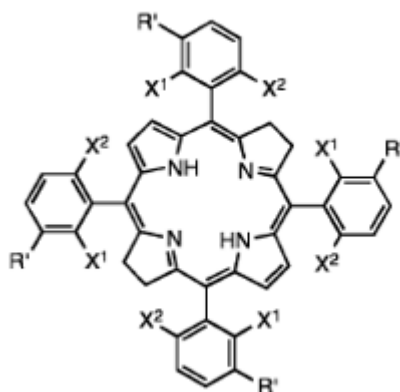
La RMN y la EM de la muestra de tetrafenilclorina son las siguientes:

30 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 8.57 (m, 4H, β-H); 8.33-8.21 (m, 8H, Ar-H + β-H) + 7.41-7.36 (m, 4H, Ar-H); 4.81-4.79 (m, 4H, NH); 4.22-4.19 (m, 4H, β-H); 2,82-2,76 (m, 12H, CH<sub>3</sub>); - 1.49 (s, 2H, NH). El espectro de RMN se muestra en la Figura 5.

EM (ESI-FIA-TOF): m/z calculado para (C<sub>48</sub>H<sub>37</sub>F<sub>8</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S<sub>4</sub>) [M+H]<sup>+</sup> : 1135.1484, encontrado [M+H]<sup>+</sup>: 1133.1466

### 35 EJEMPLO 2. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS ATROPISÓMEROS PRESENTES EN TETRAFENILBACTERIOCLORINA SULFONAMIDA FLUORADA

La síntesis química de una mezcla de atropisómeros según establece la Fórmula (III),



Fórmula III

donde  $X^1$  y  $X^2$  son átomos de flúor y  $R'$  es el grupo  $-\text{SO}_2\text{NHCH}_3$ , su separación en cada uno de los atropisómeros y su caracterización, se realizó de la siguiente manera:

- 5 La síntesis de 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo)cloro se realiza mediante la reacción de la hidracida p-toluenosulfonilo ( $7 \pm 0.1$  mg) con 5,10,15,20-tetrakis(2,6- difluoro-3-N-metilsulfamoilfenilo)porfirina ( $1 \pm 0.05$  mg) a una presión inferior a 0.6 mbar, calentándose a  $140^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante 60 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el crudo de la reacción se disuelve y se purifica mediante cromatografía en columna con gel de sílice (diclorometano/acetato de etileno). El cloro 5,10,15,20-tetrakis(2,6- difluoro -3-N-metilsulfamoilfenilo)bacterioclorina que contiene la mezcla de atropisómeros se obtuvo con un rendimiento del  $80 \pm 5\%$  ( $80 \pm 50$  mg) mediante HPLC de pureza  $> 95\%$ . La Figura 4 presenta el cromatograma HPLC de la muestra de LUZ11. Se disolvió una cantidad adecuada de muestra en un disolvente analítico (solución de N,N-dimetilformamida con Tween20 al 2% p/v). Una fracción de 20  $\mu\text{l}$  de la solución preparada fue analizada mediante HPLC con detección UV-Vis. La separación de los atropisómeros se logró utilizando una columna Inertsil Phenyl ( $250 \times 4,6$  mm;  $5 \mu\text{m}$ ) y un programa de gradientes de tres fases móviles: metanol (fase móvil A), una solución de trimetilamina, pH 7 (fase móvil B) y una mezcla de solución de trietilamina pH 7 con metanol (25:75, v/v) (fase móvil C) bombeada a un caudal constante de 0.5 ml/min). La temperatura de la columna se mantuvo constante a  $60^\circ\text{C}$ . Este ejemplo es ilustrativo de la viabilidad de la separación de los atropisómeros de los derivados de la tetrafenilbacterioclorina a  $60^\circ\text{C}$  en virtud de una combinación inesperada de la estabilidad de las tetrafenilbacterioclorinas y de la lentitud de la rotación de los enlaces macrociclo-fenilo a esa temperatura.

La RMN y la EM de la muestra aislada de LUZ11 son las siguientes:

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  ppm: 8.24 (m, 4H,  $\beta$ -H); 8.01-7.99 (m, 4H, Ar-H) + 7.39-7.31

(m, 4H, Ar-H); 4.76-4.67 (m, 4H, NH); 4.05 (s, 8H,  $\beta$ -H); 2,81-2,70 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); - 1.39 (s, 2H, NH). El espectro de RMN se muestra en la Figura 5.

- 25 EM (ESI-FIA-TOF): m/z calculado para  $(\text{C}_{48}\text{H}_{39}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4)$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 1135.1640, encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1135.1612

Análisis Elemental ( $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): calculado. C 50.00, H 3.50, N 9.72, S 11.12, encontrado C 49.88, H 3.47, N 9.38, S 10.94.

- El aislamiento de los cuatro atropisómeros presentes en la muestra de LUZ11 sintetizada como se ha indicado anteriormente se realizó disolviendo 300 mg de la muestra de LUZ11 en 12 mL de dimetilformamida (DMF) y 2,5 mL de agua. Después de la sonicación durante 5 minutos para obtener la solubilización completa de la muestra LUZ11, los atropisómeros se separaron por HPLC utilizando una columna preparatoria y las siguientes condiciones generales: columna = Inertsil-Fenilo ( $250 \times 10$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ), flujo = 3 ml/min, detección = 743 nm, horno =  $23^\circ\text{C}$ , volumen de inyección = 100  $\mu\text{l}$ , tiempo de funcionamiento = 70 min, fase móvil A = grado de gradiente de acetonitrilo (ACN), fase móvil B = agua. Los gradientes empleados en la separación de cada atropisómero se presentan en la Tabla 2:

35

Tabla 2. Gradientes utilizados en la separación de atropisómeros LUZ11 por HPLC preparatoria.

Tiempo (min)	Muestra			
	LUZ11-A (ACN:Agua)	LUZ11-B (ACN:Agua)	LUZ11-C (ACN:Agua)	LUZ11-D (ACN:Agua)
0	54:46	56:44	57:43	60:40
35	54:46	56:44	57:43	67:33
45	54:46	56:44	57:43	67:33
50	95:5	56:44	57:43	67:33
52	95:5	--	57:43	--
54	95:5	95:5	95:5	95:5
58	95:5	95:5	95:5	95:5
60	--	95:5	95:5	95:5
64	54:46	56:44	95:5	60:40
65	54:46	56:44	95:5	60:40
68	54:46	56:44	57:43	60:40
70	54:46	56:44	57:43	60:40

Las Figuras 6A, 6B, 6C y 6D representan los cromatogramas HPLC de las muestras separadas LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D obtenidas mediante el método descrito anteriormente. Las cuatro muestras se caracterizaron también mediante espectroscopia de RMN, espectrometría de masas y análisis elemental. Los resultados se presentan a continuación:

5

LUZ11-A (mayormente  $\alpha\beta\alpha\beta$ ):

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\Delta$ , ppm: 8.31-8.26 (m, 4H, Ar-H); 8.04 (s, 4H,  $\beta$ -H); 7.45-7.41 (m, 4H, Ar-H); 4.65-4.63 (m, 4H, NH); 4.08 (s, 8H,  $\beta$ -H); 2.85-2.83 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); -1.36 (s, 2H,

NH). El espectro de RMN se muestra en la Figura 7.

10 EM (ESI-FIA-TOF): m/z calculado para ( $\text{C}_{48}\text{H}_{39}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 1135.1640, encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1135,1665.

Análisis Elemental ( $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ ): calculado. C 50.79, H 3.37, N 9.87, encontrado C 50.27, H 3.89, N 9,30.

LUZ11-B (mayormente  $\alpha^2\beta_2$ ):

15 RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$ , ppm: 8.27-8.24 (m, 4H, Ar-H); 8.03-8.00 (m, 4H,  $\beta$ -H); 7.43-7.36 (m, 4H, Ar-H); 4,71-4,65 (m, 4H, NH); 4,06 (s,8H,  $\beta$ -H); 2,84-2,77 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); -1,38 (s, 2H, NH). El espectro de RMN se muestra en la Figura 8.

EM (ESI-FIA-TOF): m/z calculado para ( $\text{C}_{48}\text{H}_{39}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 1135.1640, encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1135,1586.

Análisis Elemental ( $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): calculado. C 50.98, H 3.37, N 9.87, encontrado C 50.98, H 3.67, N 9,47.

LUZ11-C (mayormente  $\alpha_3\beta$ ).

20 RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\Delta$ , ppm: 8.27-8.24 (m, 4H, Ar-H); 8.03-8.00 (m, 4H,  $\beta$ -H); 7.43-7.36 (m, 4H, Ar-H); 4,71-4,65 (m, 4H, NH); 4,06 (s,8H,  $\beta$ -H); 2,84-2,77 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); -1,38 (s, 2H, NH). El espectro de RMN se muestra en la Figura 9.

EM (ESI-FIA-TOF): m/z calculado para ( $\text{C}_{48}\text{H}_{39}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 1135.1640, encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1135,1657.

Análisis Elemental ( $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): calculado. C 50.79, H 3.37, N 9.87, encontrado C 50.00, H 3.50, N 9,72.

25 LUZ11-C (mayormente  $\alpha_4$ ).

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 8.29-8.26 (m, 4H, Ar-H); 8.04-8.02 (m, 4H,  $\beta$ -H); 7.46-7.41 (m, 4H, Ar-H); 4.65-4.64 (m, 4H, NH); 4.07 (s, 8H,  $\beta$ -H); 2.85-2.82 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); -1.37 (s, 2H, NH). El espectro de RMN se muestra en la Figura 10.

EM (ESI-FIA-TOF): m/z calculado para  $(\text{C}_{48}\text{H}_{39}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4)$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1135.1640, encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1135,1632.

5 Análisis Elemental ( $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): calculado. C 50.79, H 3.37, N 9.87, encontrado C 50.38, H 3.66, N 9.13.

Se obtuvo un cristal del atropisómero LUZ11-D para la determinación estructural mediante rayos X con el fin de confirmar la asignación. La estructura de rayos X obtenida del LUZ11-D se muestra en la Figura 11 y confirma que se trata del atropisómero  $\alpha_4$ . Las propiedades fotofísicas de las muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D fueron determinadas utilizando los instrumentos descritos anteriormente. La Figura 12 representa el espectro de absorción de las cuatro muestras. La Tabla 1 recoge los datos relevantes. La Figura 12 también representa las gráficas de Beer-Lambert empleadas para calcular los coeficientes de absorción de cada muestra suponiendo que toda la masa que se ha pesado es la masa de los atropisómeros de LUZ11.

Este ejemplo muestra que los atropisómeros  $\alpha_4$  y  $\alpha_3\beta$  son suficientemente estables para ser obtenidos con una alta pureza mediante procesos de separación química a temperaturas superiores a  $20^\circ\text{C}$  y en presencia de luz y oxígeno. Se investigó la estabilidad de estos atropisómeros calentando la muestra LUZ11-C en dimetilformamida a altas temperaturas y durante varios períodos de tiempo, como se ilustra en la Tabla 3. La interconversión de los atropisómeros se produce rápidamente a altas temperaturas sin que se produzca una descomposición apreciable de la bacterioclorina sulfonamida fluorada.

20 Tabla 3. Contenido relativo de atropisómeros después de calentar la muestra de LUZ11-C en dimetilformamida los períodos de tiempo y temperaturas indicados y abierta a la atmósfera.

	Proporción relativa de atropisómeros (%)				
	Inicial	Temperatura Tiempo	Temperatura Tiempo	Temperatura Tiempo	Temperatura Tiempo
		85°C 12 h	140°C 5 min.	140°C 10 min.	140°C 20 min.
Ensayo		(%w/w)	(%w/w)	(%w/w)	(%w/w)
$\alpha\beta\alpha\beta$	--	5	14	9	12
$\alpha_2\beta_2$	1	14	19	20	23
$\alpha_3\beta$	99	74	60	58	52
$\alpha_4$	--	7	5	11	11

### EJEMPLO 3. ENRIQUECIMIENTO DE LA MEZCLA DE ATROPISÓMEROS MEDIANTE PRECIPITACIÓN SELECTIVA

25 Este ejemplo muestra que la mezcla de atropisómeros resultante de la síntesis de tetrafenilbacterioclorinas halogenadas puede separarse en fracciones mediante métodos sencillos y escalables y que una fracción se enriquece selectivamente en atropisómeros  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$ .

Medio gramo de LUZ11 se disuelve en 50 mL de diclorometano en un matraz de fondo redondo. Se añaden 50 ml de hexano y el frasco se conecta a una bomba de vacío durante 1 minuto con una agitación suave. Parte del LUZ11 presente en la solución se precipita en el matraz. La muestra se filtra dando la muestra X. Este disolvente, que contiene diclorometano y hexano, se evapora hasta secarlo y produce la muestra Y. Ambas muestras fueron analizadas mediante HPLC para cuantificar la cantidad relativa de atropisómero presente en cada muestra. La Figura 13 representa los cromatogramas de HPLC con detección a 743 nm, descritos en la sección Métodos, que revelan que los picos de los atropisómeros  $\alpha\beta\alpha\beta$  y  $\alpha_2\beta$  aumentan en la muestra X con respecto a la muestra original de LUZ11, y que el pico del atropisómero  $\alpha_4$  aumenta en la muestra Y con respecto a la muestra original de LUZ11. La Tabla 4 presenta las cantidades relativas de los cuatro atropisómeros presentes en la muestra inicial LUZ11 y en las fracciones X e Y. El atropisómero  $\alpha_2\beta_2$  tiene dos picos, identificados como B1 y B2, ya que las bacterioclorinas de los grupos R' que están en el mismo lado del plano se pueden separar por un grupo metino ( $=\text{C}-$ ) o por un puente de metileno ( $-\text{CH}_2-$ ). Mientras que la muestra original de LUZ11 contiene el 65,9% de los atropisómeros  $\alpha_3\beta+\alpha_4$ , es notable que la muestra Y tiene un contenido del 80,4% de atropisómeros  $\alpha_3\beta+\alpha_4$ .

40 Así, la muestra Y es una composición en la que los atropisómeros con la mayoría de los grupos R' en el mismo lado del plano definido por el macrociclo constituyen más del 70% de la cantidad total de atropisómeros presentes en la composición.

Tabla 4. Contenido relativo de atropisómeros en la muestra LUZ11 y en las muestras X e Y.

	Proporción relativa de atropisómeros (%)		
	LUZ11	Muestra X	Muestra Y
Ensayo (%w/w)	74,7%	74,5%	69,8%
$\alpha\beta\alpha\beta$	13,2%	14,0%	6,1%
$\alpha_2\beta_2$	20,9%	23,0%	13,5%
$\alpha_3\beta$	53,0%	53,4%	42,0%
$\alpha_4$	12,9%	9,6%	38,4%

La cantidad relativa de atropisómeros  $\alpha_3\beta+\alpha_4$  en una muestra puede constituir cualquier valor hasta el 100% de la cantidad total de atropisómeros presentes en la composición.

5 **EJEMPLO 4. ESTABILIDAD DIFERENCIAL DE LOS ATROPISÓMEROS DE LAS BACTERIOCLORINAS HALOGENADAS Y SULFONADAS EN PRESENCIA DE LUZ INFRARROJA ABSORBIDA**

Este ejemplo demuestra que los atropisómeros de las bacterioclorinas halogenadas y sulfonadas tienen rendimientos cuánticos de fotodescomposición diferentes cuando se irradian con la misma luz infrarroja utilizada en la TFD, lo que puede dar lugar a diferentes eficacias de la TFD.

- 10 Las muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D obtenidas en el Ejemplo 2 anterior se disolvieron independientemente en soluciones de PBS:metanol (2:3), se transfirieron a células de cuarzo de 1 cm y se registraron sus espectros de absorción. Cada célula de cuarzo fue colocada secuencialmente en el rayo láser de diodo Omicron de 749 nm, previamente desenfocado para tener un diámetro de rayo coincidente con la ventana de la célula de cuarzo. La potencia del láser medida en estas condiciones fue de 640 mW. La irradiación se interrumpió a intervalos regulares y se registró un nuevo espectro de absorción. El fotoblanqueo se produce según la cinética de una reacción de primer orden en la ventana de tiempo del experimento. La Figura 14 muestra el declive de las absorciones en el pico de la mayor longitud de onda de absorción de las muestras en función del tiempo de irradiación. Las vidas medias de las muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D en estas condiciones son de 4,6, 4,8, 6,4 y 6,5 minutos respectivamente. Los rendimientos cuánticos de fotodescomposición se calcularon como la tasa inicial de desaparición de la molécula fotosensible dividida por la tasa inicial de absorción de fotones. Los resultados de estos cálculos se presentan en la Tabla 1. El atropisómero más estable es el  $\alpha_4$ , seguido del  $\alpha_3\beta$ .

20 **EJEMPLO 5. FOTOTOXICIDAD IN VITRO DE LOS ATROPISÓMEROS DE LUZ11**

- 25 Este ejemplo muestra que las muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D enriquecidas en cada uno de los atropisómeros aislados y la muestra original LUZ11 presentan eficacias diferenciadas en la TFD de las líneas celulares cancerígenas.

- 30 La actividad fotosensible de la muestra original LUZ11 y de las muestras LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D obtenidas en el Ejemplo 2 se midieron con los materiales y métodos descritos anteriormente. Los cromatogramas HPLC con detección a 380 nm indican que el contenido de las muestras LUZ11 enriquecidas con las muestras de atropisómeros separadas es superior al 80%. Las pequeñas diferencias en la pureza no sesgan los resultados de la fototoxicidad.

- 35 Las fracciones de supervivencia para dosis de luz de 1 J/cm<sup>2</sup> y un tiempo de incubación de 24 horas, en relación con la muestra de control en la oscuridad, se representan en la Figura 15 (HT-29) y en la figura 16 (CT26). Las concentraciones que produjeron el 50% o el 90% de la muerte celular para la dosis de luz de 1 J/cm<sup>2</sup> se presentan en la Tabla 5 y fueron calculadas por interpolación utilizando un análisis de regresión no lineal obtenido mediante el software GraphPad Prism 5 (log[inhibidor] frente a respuesta normalizada - pendiente variable), excepto los valores identificados mediante un asterisco, que se obtuvieron por extrapolación.

Tabla 5. Resultados de fototoxicidad In vitro para una dosis de luz de 1 J/cm<sup>2</sup> a 749 nm en términos de IC50 y IC90 para cada muestra en las líneas celulares HT-29 y CT26.

	HT-29		CT26	
	IC50 (μM)	IC90 (μM)	IC50 (μM)	IC90 (μM)
LUZ11	0,367	0,588	0,871	4,307
LUZ11-A	0,343	1,006	67.35*	2832*
LUZ11-B	0,178	0,433	1,460	7.530*
LUZ11-C	0,130	0,404	0,816	2,592
LUZ11-D	0,084	0,168	0,207	0,468
*Extrapolado de la curva de regresión no lineal				

Las fototoxicidades ilustradas en las Figuras 15 y 16 y en la Tabla 5 demuestran claramente que los atropisómeros de LUZ11 tienen una eficacia diferencial en la TFD in vitro. La fototoxicidad de las muestras aumenta de A a D. La muestra original LUZ11, que contiene la mezcla estadística de los atropisómeros resultantes de la síntesis, es menos fototóxica in vitro que las muestras enriquecidas en atropisómeros  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ . Un descubrimiento importante de esta invención es que los atropisómeros con la mayoría de los meta-sustituyentes de los grupos fenilos del mismo lado del plano definido por el macrociclo son más fototóxicos que los atropisómeros con un número igual de tales substitutivos a ambos lados de dicho plano. Este descubrimiento no podría haber sido previsto por una persona con conocimientos medios en la materia.

10 **EJEMPLO 6.** TFD DE CARCINOMA DE COLON DE RATÓN EN RATONES BALB/C CON ATROPÓMEROS DE LUZ1 I-A, LUZ1 I-B, LUZ1 I-C Y LUZ1 I-D

Este ejemplo muestra que cada atropisómero de LUZ11 presenta un perfil de eficacia a largo plazo distinto para el tratamiento de un modelo de tumor de ratón mediante TFD.

15 El modelo de tumor era en ratones BALB/c con tumor CT26 subcutáneo. Las células CT26 fueron cultivadas en DMEM (dulbecco modified essential medium) complementadas con suero bovino fetal y antibióticos. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de COC. Las células CT26 (~350.000) fueron tomadas en 0,1 ml de PBS e implantadas subcutáneamente en el muslo derecho de los ratones BALB/C. Los tumores crecieron hasta alcanzar 5 mm de diámetro en unos 8 a 10 días después de la implantación. El tratamiento se inició cuando el tumor alcanzó los 5 mm de diámetro en cada animal. El día en que los tumores alcanzaron el tamaño de tratamiento, los ratones fueron inyectados con una dosis de 0,7 mg/kg del fotosensibilizador en un vehículo que contiene Cremophor EL (Ricinoleato de Macrogolglicerol), etanol y solución salina al 0,9% de NaCl en las proporciones 0,1:0,5:99,4 para LUZ11 y LUZ11-A y 0,5:0,5:99,0 para LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D, y tratado como se describe en la sección Métodos. La fluencia de la luz empleada en el tratamiento fue de 41 J/cm<sup>2</sup> (es decir, 50 J en una superficie de 1,33 cm<sup>2</sup>). Las dosis de cada compuesto se normalizaron teniendo en cuenta el contenido de LUZ11 de cada muestra. El grupo de control (n=6) recibió sólo el vehículo, sin fotosensibilizador, y fue irradiado en las mismas condiciones que el resto de los grupos de prueba.

20 Los ratones fueron revisados diariamente, los tumores fueron medidos usando dos mediciones ortogonales L y W (perpendicular a L) y se registraron los volúmenes calculados usando la fórmula  $V=LxW^2/2$ . Cuando el diámetro más largo de cualquier tumor alcanzaba los 15 mm (punto final humanitario), se sacrificaba el ratón que llevaba dicho tumor y se registraba el número de días transcurridos desde el tratamiento. La Figura 17 presenta el diagrama de Kaplan-Meier para las muestras LUZ11, LUZ11-A, LUZ11-B, LUZ11-C y LUZ11-D del Ejemplo 2. La fototoxicidad mucho más alta del atropisómero  $\alpha_4$  se manifiesta por la muerte inducida por la TFD, en el grupo de muestras LUZ11-D, de 2 ratones en los días posteriores al tratamiento. La sobredosis con el atropisómero  $\alpha_4$  se produce por la combinación de sustancia-luz sin que se produzca una letalidad inducida por la TFD en las otras mezclas de atropisómeros. Esta observación es consistente con la fototoxicidad in vitro y demuestra que el atropisómero  $\alpha_4$  tiene la mayor eficacia en la TFD.

35 **EJEMPLO 7.** TFD DE CARCINOMA DE COLON DE RATÓN EN RATONES BALB/C CON COMPOSICIONES DE ATROPISÓMEROS ENRIQUECIDOS

40 Este ejemplo muestra que una composición farmacéutica enriquecida en los atropisómeros más fotoactivos es preferible para la TFD porque presenta el perfil más eficaz a largo plazo para el tratamiento de un modelo de tumor de ratón mediante la TFD.

5 El modelo de ratón y tumor es el mismo que en el ejemplo 6. La TDP también se realizó con el mismo protocolo: inyección intravenosa de una dosis nominal de fotosensibilizante de 0,7 mg/kg seguida, 15 minutos más tarde, de la irradiación de un círculo de 1,33 cm<sup>2</sup> con 55 J. Esta concentración nominal, por peso de muestra, corresponde a una concentración de 52 mg/kg de la cantidad real de estereoisómeros de bacterioclorina presentes en las muestras LUZ11, LUZ11-X, relativa a la muestra X, y LUZ11-Y, relativa a la muestra Y. El vehículo empleado para la administración intravenosa fue el mismo que en el ejemplo 6, pero se emplearon las muestras X e Y del ejemplo 3, en paralelo con la muestra LUZ11 caracterizada en la Tabla 4. La Figura 18 representa el diagrama de Kaplan-Meier de la muestra LUZ11, y las muestras X e Y.

10 La Figura 18 muestra que con la fracción original de LUZ11 no es posible obtener curas a largo plazo con este protocolo de tratamiento. También se observó la ausencia de curas a largo plazo en el grupo tratado con la muestra X. Además, la mediana del tiempo de supervivencia en el tratamiento con la muestra X fue 2 días más corta (18 vs. 20 días) que la mediana del tiempo de supervivencia con la muestra LUZ11. Por otro lado, el grupo tratado con la muestra Y tuvo un tiempo de supervivencia medio más largo y alcanzó una tasa de curación del 50%.

15 La notable capacidad de las composiciones farmacéuticas con mezclas de atropisómeros enriquecidas con atropisómeros  $\alpha_3\beta$  y  $\alpha_4$  para mejorar las tasas de curación en la TFD era imprevisible y se revela por primera vez en este invento.

#### **EJEMPLO 8. AISLAMIENTO DEL ATROPISOMERO LUZ1 I-C ( $\alpha_3\beta$ ) POR CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA CLÁSICA DE FASE INVERSA Y HPLC SEMIPREPARATIVO**

20 La purificación de LUZ11-C se realizó en dos pasos: i) enriquecimiento de la muestra con  $\alpha_3\beta$  a partir de la mezcla de los cuatro atropisómeros ( $\alpha\beta\alpha\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta$ ,  $\alpha_4$  e impurezas de síntesis) mediante el uso de cromatografía de gravedad en fase inversa de gel de sílice (C-18), como fase estacionaria, con una mezcla de MeOH/CN<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:40:20, v/v) como fase móvil; ii) purificación de la mezcla enriquecida con  $\alpha_3\beta$  previamente obtenida mediante HPLC semipreparativa.

i) LUZ11-C ( $\alpha_3\beta$ ) enriquecimiento por cromatografía de fase inversa

25 La muestra LUZ11 (lg; ensayo 75%) se disolvió en acetonitrilo (10 mL) y metanol (10 mL), y la mezcla fue sonicada durante 5 min. Tras la solubilización total, se añadieron lentamente 5 mL de agua.

30 Se preparó una cromatografía en columna de vidrio (d= 3,5 cm \* h= 65 cm) utilizando una lechada de eluyente (MeOH/CN<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:40:20, v/v)) y la sílice de fase inversa C-18 (~150 g). La muestra preparada de LUZ11 fue cuidadosamente transferida a la columna. La mezcla de fase móvil se eludió lentamente a través de la columna y se recogieron las fracciones que contenían el atropisómero  $\alpha_3\beta$ . Durante todo el procedimiento cromatográfico, la cromatografía en columna de vidrio estaba protegida de la luz, así como las fracciones recogidas. El disolvente orgánico fue eliminado en el evaporador rotativo (T < 35°C). La mezcla fue transferida a un embudo de extracción y el LUZ11-C fue recuperado mediante extracción disolvente-disolvente usando diclorometano. La fase orgánica se secó y el disolvente se eliminó por evaporación rotativa (T < 35°C). El matraz con el producto fue conectado a una bomba de vacío durante al menos 72 h a 18-23°C protegido de la luz. Se obtuvieron unos 300 mg de LUZ11-C.

ii) LUZ11-C ( $\alpha_3\beta$ ) aislamiento por HPLC semipreparativa

Una muestra (300 mg) de la fracción enriquecida de LUZ11-C ( $\alpha_3\beta$ ), previamente preparada por el gel de sílice de fase inversa C-18, se disolvió en 12 mL de DMF y 2,5 mL de agua y se sometió a sonicado durante 5 minutos o hasta su completa disolución. Las condiciones de la HPLC para el aislamiento de LUZ11-C se describen a continuación:

40 Columna: Inertsil-Phenyl (250\*10 mm; 5  $\mu$ m) Caudal: 3 mL/min

Detección: Vis 743 nm Horno: 23°C

Volumen de la inyección: 100  $\mu$ L Tiempo de ejecución: 70 min.

Fase móvil: Fase móvil A: Grado de gradiente de acetonitrilo

Fase móvil: B: Agua

45 Tabla 6: Programa de gradiente:

Tiempo (min)	Fase móvil A	Fase móvil B
0	57	43
50	57	43
54	95	5
65	95	5
68	57	43
70	57	43

- 5 La mezcla fue transferida a un embudo de extracción y la muestra LUZ11-C fue recuperada mediante extracción por disolvente-disolvente usando diclorometano. La fase orgánica se secó y el disolvente se eliminó por evaporación rotativa ( $T < 35^{\circ}\text{C}$ ). El matraz con el producto fue conectado a una bomba de vacío durante al menos 72 h a  $18\text{-}23^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz. Con este método se obtuvo LUZ11-C con un ensayo entre el 94% y el 96%. El perfil de impurezas de esta fracción enriquecida de LUZ11-C ( $\alpha_3\beta$ ) mostró que los atropisómeros  $\alpha\beta\alpha\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$  y  $\alpha_4$  estaban presentes en menos del 2%.

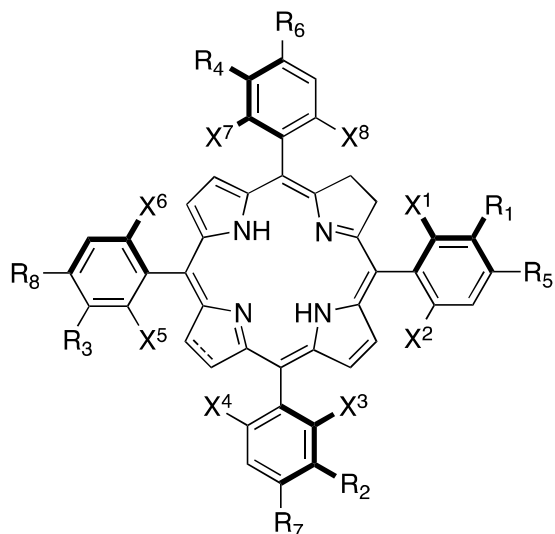


## DOCUMENTOS CITADOS

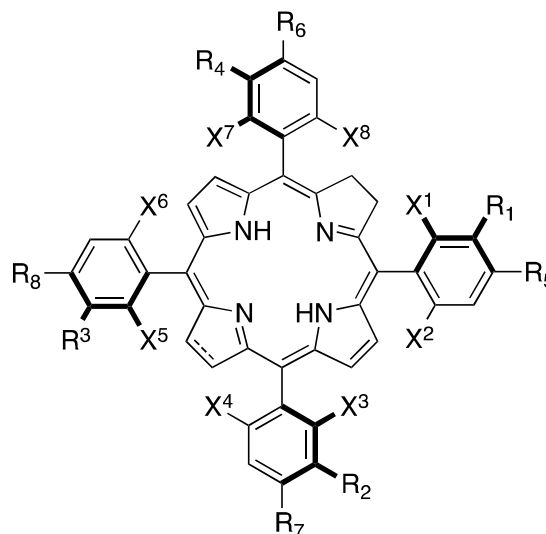
1. M. M. Pereira, L. G. Arnaut, S. J. Formosinho, C. J. P. Monteiro, PCT/EP/012212, Ed. (University of Coimbra, Portugal, 2005), chap. PCT/EP/012212.
- 5 2. L. G. Arnaut, M. M. Pereira, S. J. Formosinho, S. Simões, G. Stochel, K. Urbanska, PCT/PT2009/000057, Ed. (University of Coimbra, Portugal, 2009), chap. PCT/PT2009/000057.
- 3 J. M. Dabrowski, M. Krzykawska, L. G. Arnaut, M. M. Pereira, C. J. P. Monteiro, S. Simoes, K. Urbanska, G. Stochel, Tissue uptake and photodynamic therapy of mice bearing melanoma with a non-toxic, effective chlorin. *ChemMedChem* 6, 1715-1726 (2011).
- 10 4. L. G. Arnaut, M. M. Pereira, J. M. Dabrowski, E. F. F. Silva, F. A. Schaberle, A. R. Abreu, L. B. Rocha, M. M. Barsan, K. Urbanska, G. Stochel, C. M. A. Brett, Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. Eur. J.* 20, 5346-5357 (2014).
5. L. G. Arnaut, Design of Porphyrin-Based Photosensitizers. *Adv. Inorg. Chem.* 63, 187-233 (2011).
6. S. R. LaPlante, P. J. Edwards, L. D. Fader, A. Jakalian, O. Hucke, Revealing atropisomer axial chirality in drug discovery. *ChemMedChem* 6, 505-513 (2011).
- 15 7. A. S. M. Ressurreição, M. Pineiro, L. G. Arnaut, A. M. d. A. R. Gonsalves, Atropisomers of 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfamoyl-phenyl)porphyrins *J. Porphyrins Phthalocyanines* 11, 50-57 (2007).
8. A. C. Tomé, A. M. S. Silva, I. Alkorta, J. Elguero, Atropisomerism and conformational aspects of meso-tetraarylporphyrins and related compounds. *J. Phorphyrins Phthalocyanines* 15, 1-28 (2011).
- 20 9 C. J. P. Monteiro, M. M. Pereira, N. Gonçalves, C. G. Carvalho, A. R. Abreu, L. G. Arnaut, A. M. S. Silva, Separation and atropisomer isolation of ortho-halogenated tetraarylporphyrins by HPLC. Full characterization using ID and 2D NMR. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 16, 316-323 (2012).
10. W. J. Hagan, D. C. Barber, D. G. Whitten, M. Kelly, F. Albrecht, S. L. Gibson, R. Hilf, Picket-fence porphyrins as potential phototherapeutic agents. *Cancer res.* 48, 1148-1152 (1988).
- 25 11. C. J. P. Monteiro, J. Pina, M. M. Pereira, L. G. Arnaut, On the singlet states of porphyrins, chlorins and bacteriochlorins and their ability to harvest red/infrared light. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 1233-1238 (2012).
12. E. F. F. Silva, C. Serpa, J. M. Dabrowski, C. J. P. Monteiro, L. G. Arnaut, S. J. Formosinho, G. Stochel, K. Urbanska, S. Simoes, M. M. Pereira, Mechanisms of singlet oxygen and superoxide ion generation by porphyrins and bacteriochlorins. *Chem. Eur. J.* 16, 9273-9286 (2010).
- 30 13. J. M. Dabrowski, M. M. Pereira, L. G. Arnaut, C. J. P. Monteiro, A. F. Peixoto, A. Karocki, K. Urbanska, G. Stochel, Synthesis, photophysical studies and anticancer activity of a new halogenated water-soluble porphyrin. *Photochem. Photobiol.* 83, 897-903 (2007).
14. R. Schmidt, C. Tanielian, R. Dunsbach, C. Wolff, Phenalenone, a universal reference compounds for the determination of quantum yields of singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* 79, 11-17 (1994).
- 35 15. Sternberg ED, Dolphin D. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 1998;54:4151-202.
16. Silva EFF, Serpa C, Dabrowski JM, Monteiro CJP, Arnaut LG, Formosinho SJ, et al. Mechanisms of singlet oxygen and superoxide ion generation by porphyrins and bacteriochlorins. *Chem Eur J.* 2010;16:9273-86.

REIVINDICACIONES


1. Una composición farmacéutica que comprende los atropisómeros de las fórmulas:



Fórmula (I-C)



Fórmula (I-D)

5  en la que:

representa un enlace simple de carbono-carbono o un enlace doble de carbono-carbono; las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>6</sup> y X<sup>8</sup> son de flúor;

10 X<sup>1</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>5</sup> y X<sup>7</sup> son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

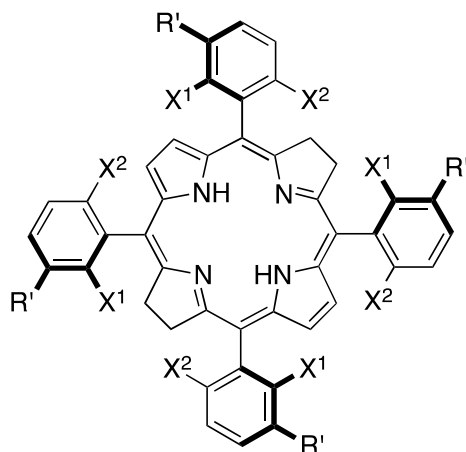
Los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente -OH, OR o -SO<sub>2</sub>R", donde los R" se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o -NR<sub>2</sub> donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o R<sub>2</sub> representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son independientemente H, -OH, -OR, -Cl, o -NHR donde R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono;

15 o sus sales farmacéuticamente aceptables;

en las que la cantidad relativa de dichos atropisómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables, es superior al 70% del total de atropisómeros presentes en dicha composición farmacéutica.

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que se indica la cantidad relativa del atropisómero de las fórmulas:



Fórmula (III-D)

en la que:

las líneas en **negrita** indican que los átomos en **negrita**, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

Los grupos  $X^2$  son de flúor;

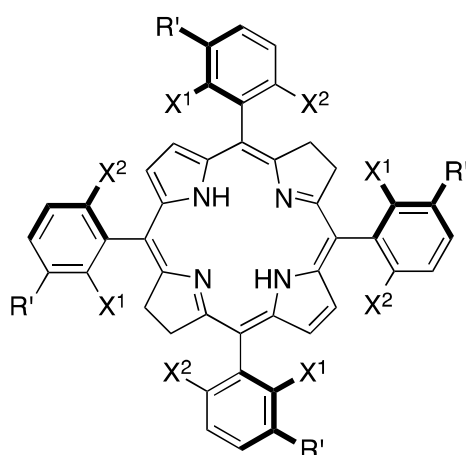
5  $X^1$  se eligen independientemente de los halógenos (F, Cl, Br) o del hidrógeno; y

Los  $R'$  son  $-SO_2R''$ , donde  $R''$  se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o  $-NR_2$  donde R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono y  $R_2$  representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

o sus sales farmacéuticamente aceptables;

es más del 20% del total de los atropisómeros de la composición farmacéutica referida.

10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que se indica la cantidad relativa del atropisómero de las fórmulas:



Fórmula (III-C)

en la que:

15 las líneas en **negrita** indican que los átomos en **negrita**, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

Los grupos  $X^2$  son de flúor;

$X^1$  se eligen independientemente de los halógenos (F, Cl, Br) o del hidrógeno; y

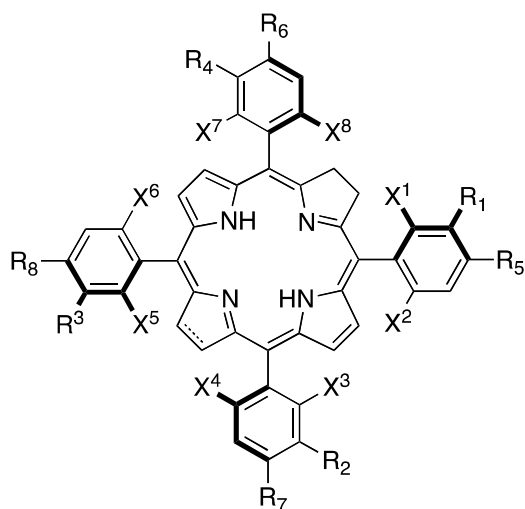
20 Los  $R'$  son  $-SO_2R''$ , donde  $R''$  se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o  $-NR_2$  donde R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o  $R_2$  representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

o sus sales farmacéuticamente aceptables;

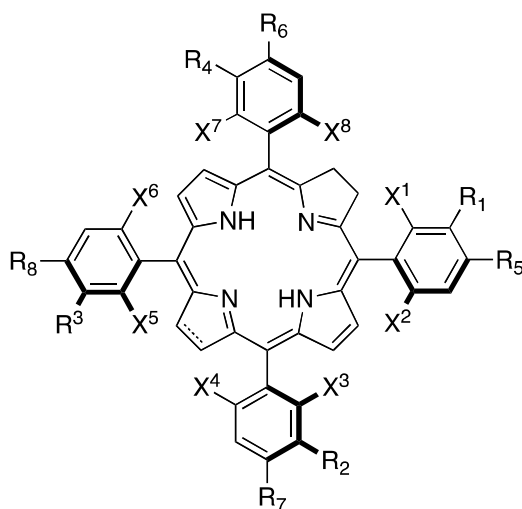
25 es más del 60% del total de los atropisómeros de la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 70% del total de los atropisómeros de la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 80% del total de los atropisómeros de la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 90% del total de los atropisómeros de la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 95% del total de los atropisómeros de la composición farmacéutica referida .

4. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde la composición farmacéutica comprende además un portador farmacéutico.

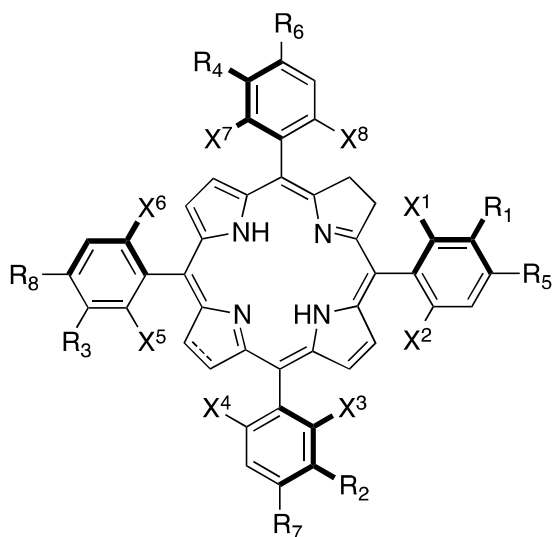
30 5. Proceso de preparación de la composición farmacéutica, descrito en las reivindicaciones 1- 4, que comprende una etapa de aislamiento de la mezcla de atropómeros de cloro o de bacterioclorina de las fórmulas:



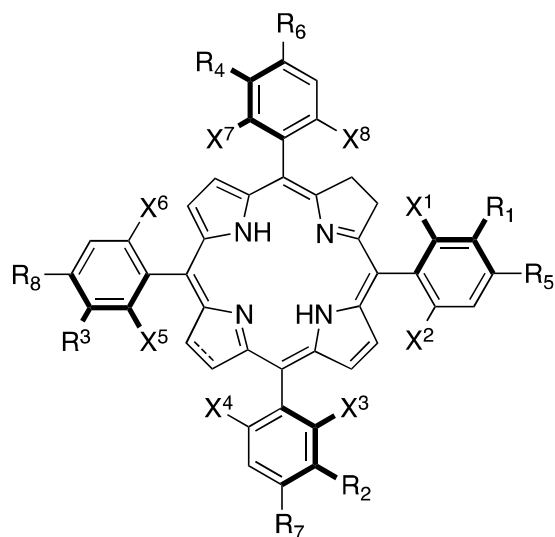
Fórmula (I-A)



Fórmula (I-B)



Fórmula (I-C)



Fórmula (I-D)

5

en la que:



Fórmula (I) representa un enlace simple de carbono-carbono o un enlace doble de carbono-carbono;

las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

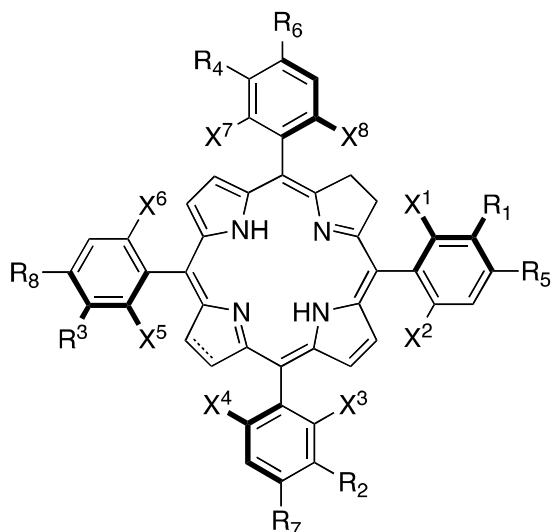
10  $X^2$ ,  $X^4$ ,  $X^6$  y  $X^8$  son de flúor; $X^1$ ,  $X^3$ ,  $X^5$  y  $X^7$  son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

Los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son independientemente -OH, -OR o  $-SO_2R''$ , donde los  $R''$  se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o  $-NR_2$  donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o  $R_2$  representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

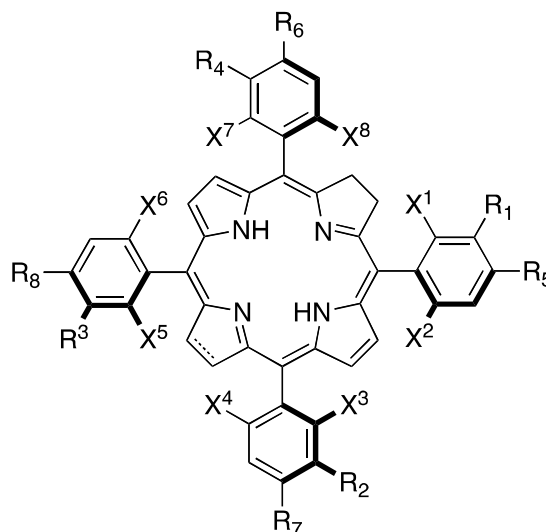
15  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  son independientemente H, -OH, -OR, -Cl, o -NHR donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono;

en el que los atropisómeros con la mayoría de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  o  $R_4$  en el mismo lado del plano del macrociclo están separados, al menos parcialmente, por precipitación selectiva, cromatografía, extracción de disolventes, isomerización rotacional térmica o fotoquímica o fotodescomposición selectiva.

6 - Proceso según la reivindicación 5, en el que la precipitación selectiva de los atropisómeros de cloro o de bacterioclorina se logra disolviendo primero la mezcla de atropisómeros en un disolvente de mayor polaridad y precipitando después selectivamente los atropisómeros de la fórmula (I-A) y (I-B)



Fórmula (I-A)



Fórmula (I-B)

5

en la que:



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

10

las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>6</sup> y X<sup>8</sup> son de flúor;

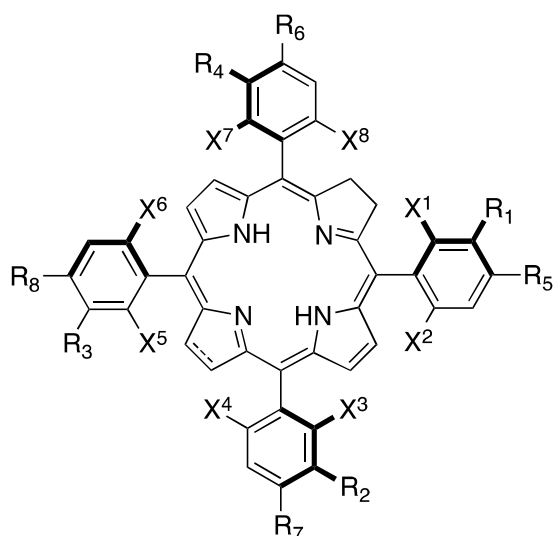
X<sup>1</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>5</sup> y X<sup>7</sup> son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

15

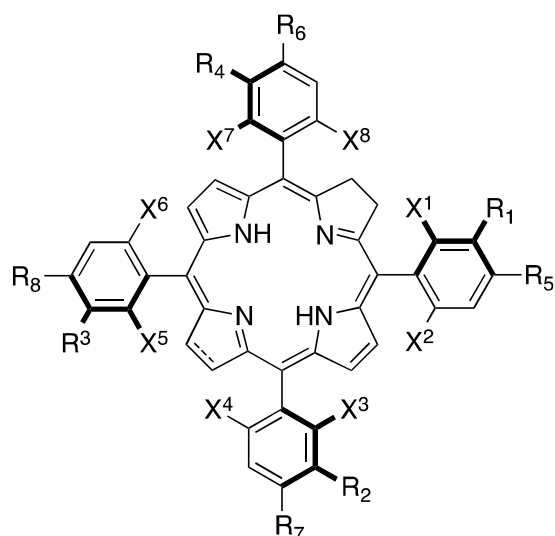
Los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente -OH, -OR o -SO<sub>2</sub>R", donde los R" se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o -NR<sub>2</sub> donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o R<sub>2</sub> representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son independientemente H, -OH, -OR, -Cl, o -NHR donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono;

mediante la adición de un disolvente de polaridad inferior a la solución, que deja la solución



Fórmula (I-C)



Fórmula (I-D)

en la que:

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

las líneas en negrita indican que los átomos en negrita, y los grupos unidos a ellos, están restringidos estéricamente para que existan por encima del plano definido por el anillo de macrociclo;

X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>6</sup> y X<sup>8</sup> son de flúor;

X<sup>1</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>5</sup> y X<sup>7</sup> son halógenos (F, Cl, Br) o hidrógeno;

10 Los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente -OH, -OR o -SO<sub>2</sub>R", donde los R" se eligen independientemente de -Cl, -OH, -aminoácido, -OR, -NHR o -NR<sub>2</sub> donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono o R<sub>2</sub> representa cicloalquilo con 2 a 12 átomos de carbono;

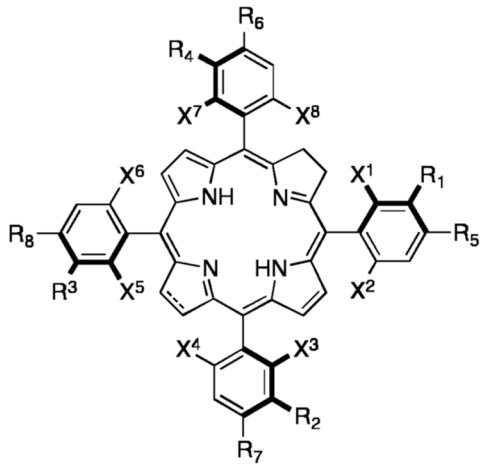
15 R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son independientemente H, -OH, -OR, -Cl, o -NHR donde los R son alquilo de 1 a 12 átomos de carbono; en la que la suma de las concentraciones de los atropisómeros Fórmula (I-C) y (I-D) en la solución se suma a por lo menos el 70% de la concentración de todos los atropisómeros presentes en la solución, o más preferentemente más del 70% del total de atropisómeros en la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 80% del total de atropisómeros de la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 90% del total de atropisómeros de la composición farmacéutica referida, o más preferentemente más del 95% del total de atropisómeros de la composición farmacéutica referida.

20 7 - Proceso según la reivindicación 5, en el que la extracción con disolvente comprende un primer paso de disolución de la mezcla de atropisómeros de cloro o bacteriocloro con un disolvente polar; y un segundo paso con la adición de un disolvente de menor polaridad que forma una separación de fase líquido-líquido con el disolvente polar, extrayendo así los atropisómeros de menor polaridad.

25 8 - Proceso según la reivindicación 5, en el que la recristalización comprende la formación de cristales que contienen los atropisómeros con la mayoría de los grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> o R<sub>4</sub> en el mismo lado del plano del macrociclo que es complementario de la composición de atropisómeros en el licor madre.

30 9 - Proceso según la reivindicación 5, en el que la isomerización rotacional térmica o fotoquímica comprende un primer paso que consiste en enlazar preferentemente al menos un atropisómero de la mezcla de atropisómeros de cloro o de bacterioclorina con un soporte al que dicho atropisómero tiene gran afinidad; y un segundo paso que consiste en proporcionar suficiente energía térmica o radiactiva para promover la isomerización rotacional preferencial de los atropisómeros menos enlazados con el soporte.

10 - Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 9, donde el soporte es preferentemente gel de sílice y el atropisómero preferentemente enlazado al soporte es el atropisómero con las fórmulas:



Fórmula (I-D)

- 11 - Proceso según la reivindicación 5, en el que la fotodescomposición selectiva comprende un primer paso  
 5 que consiste en la disolución de la mezcla de atropisómeros de cloro o de bacterioclorina en un disolvente aereado; y un segundo paso consistente en la irradiación con luz que es absorbida por la mezcla de atropisómeros para fotodescomponer en mayor grado los atropisómeros menos fotoestables.
12. La composición farmacéutica descrita en las reivindicaciones 1 a 4 y obtenida por el proceso descrito en las  
 10 reivindicaciones 5 a 11 para su utilización en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, cánceres o carcinomas, mielomas, psoriasis, degeneración macular y condiciones precancerosas.
13. La composición farmacéutica descrita en las reivindicaciones 1 a 4 y obtenida por el procedimiento descrito  
 15 en las reivindicaciones 5 a 11 para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, virus, bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos; o parásitos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, invertebrados multicelulares generalmente microscópicos o muy pequeños u óvulos o bien formas no adultas de los mismos.
14. Un kit que comprende una composición farmacéutica descrita en las reivindicaciones 1 a 4 e instrucciones para la terapia/administración fotodinámica de la composición a un sujeto.

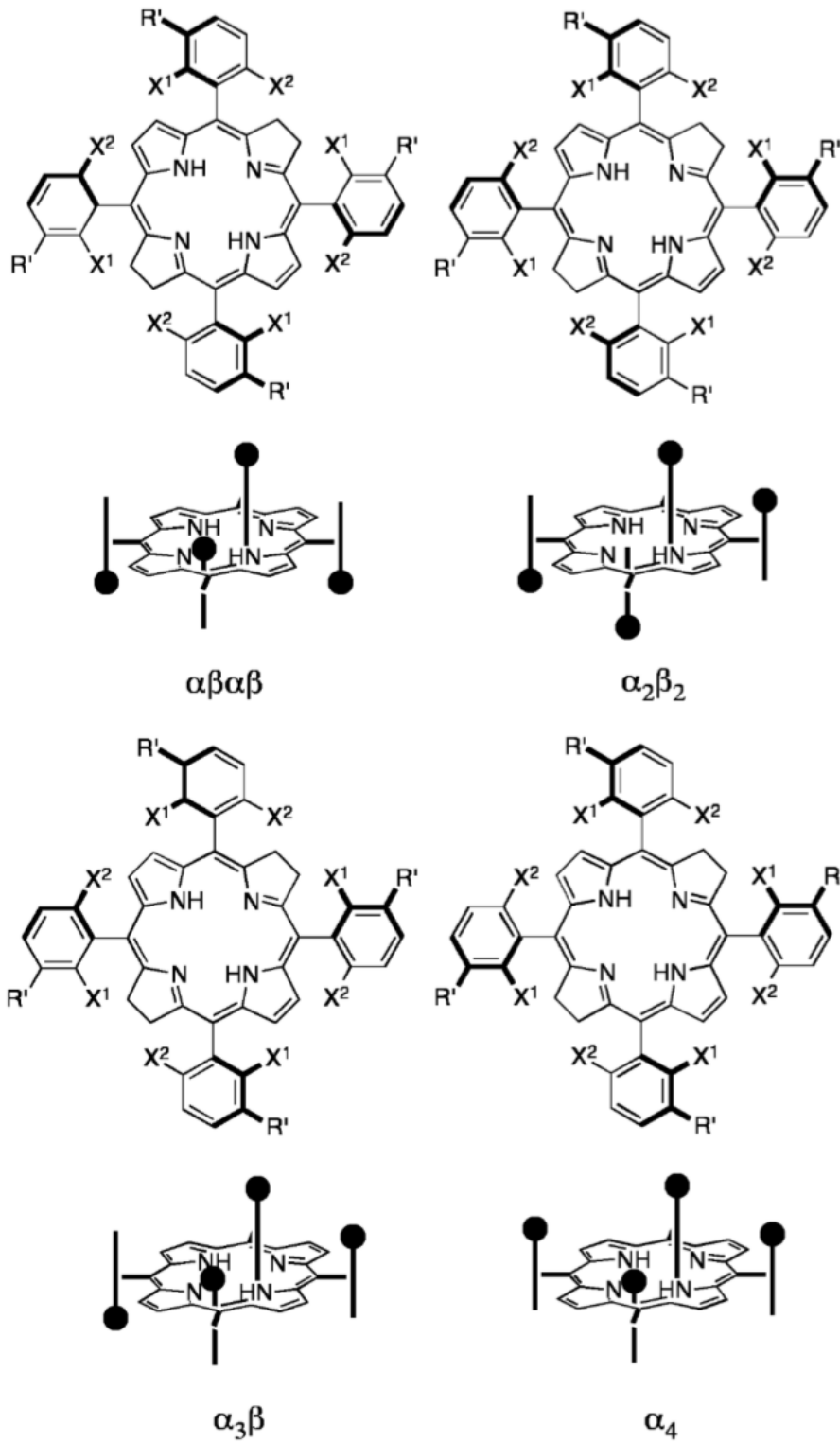


Figura 1



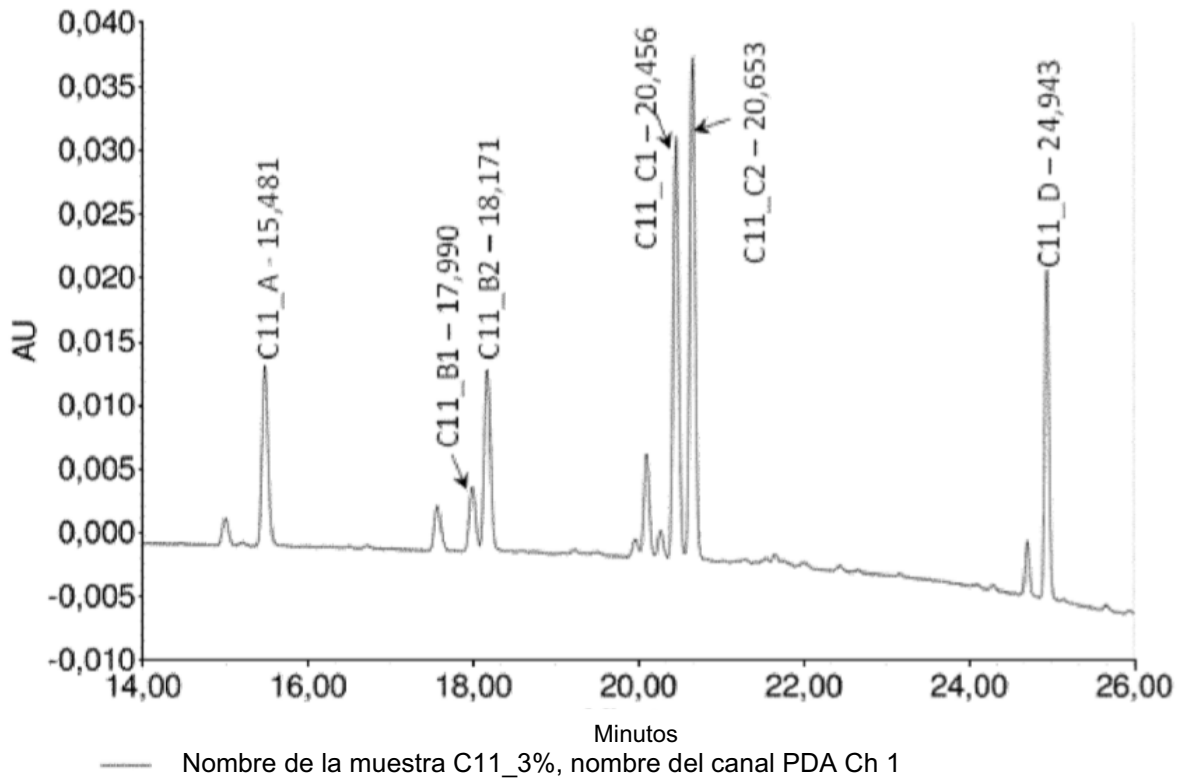


Figura 2

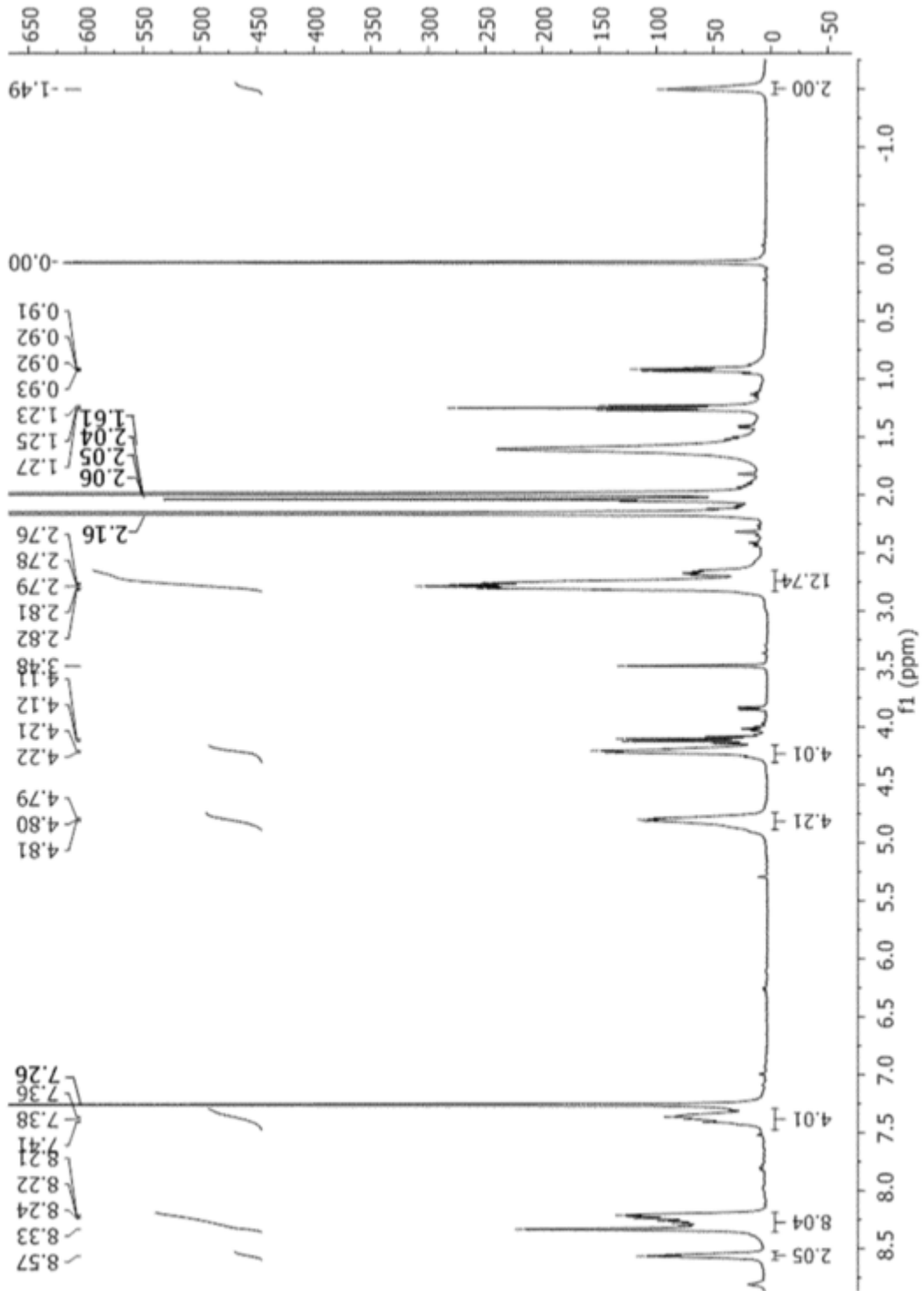
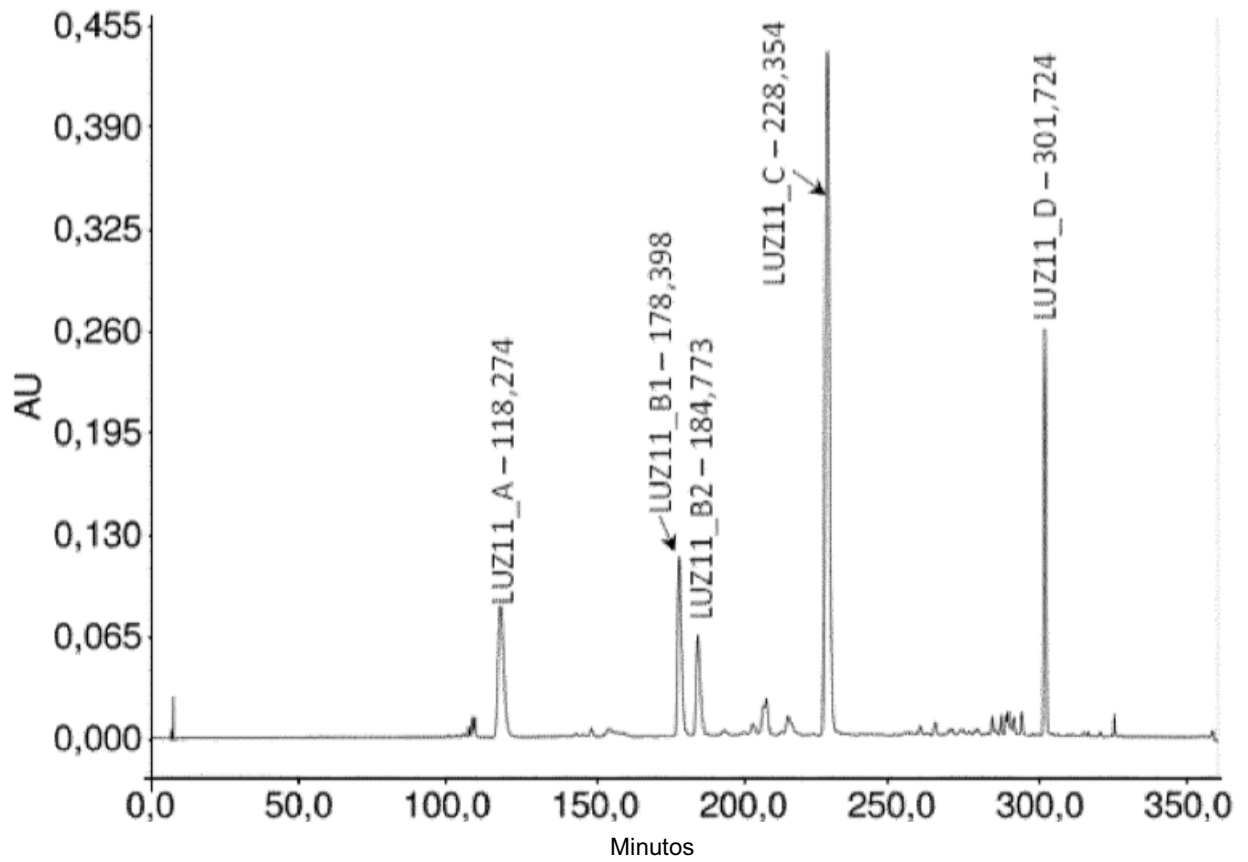


Figura 3



Nombre de la muestra LUZ11\_AS\_stability\_t=0\_120518LUZ11-02\_#1; Canal 2998 Ch1

Figura 4

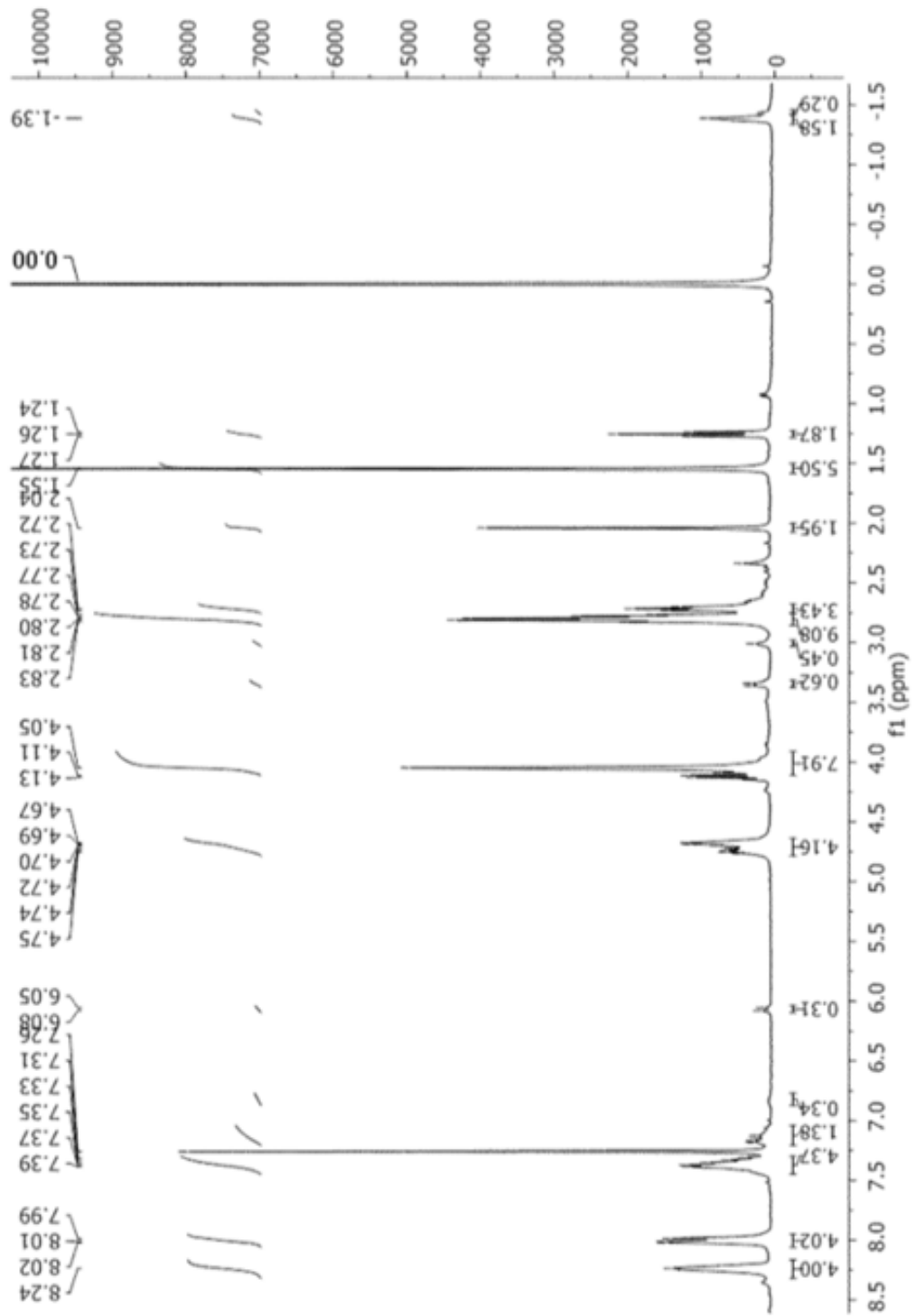
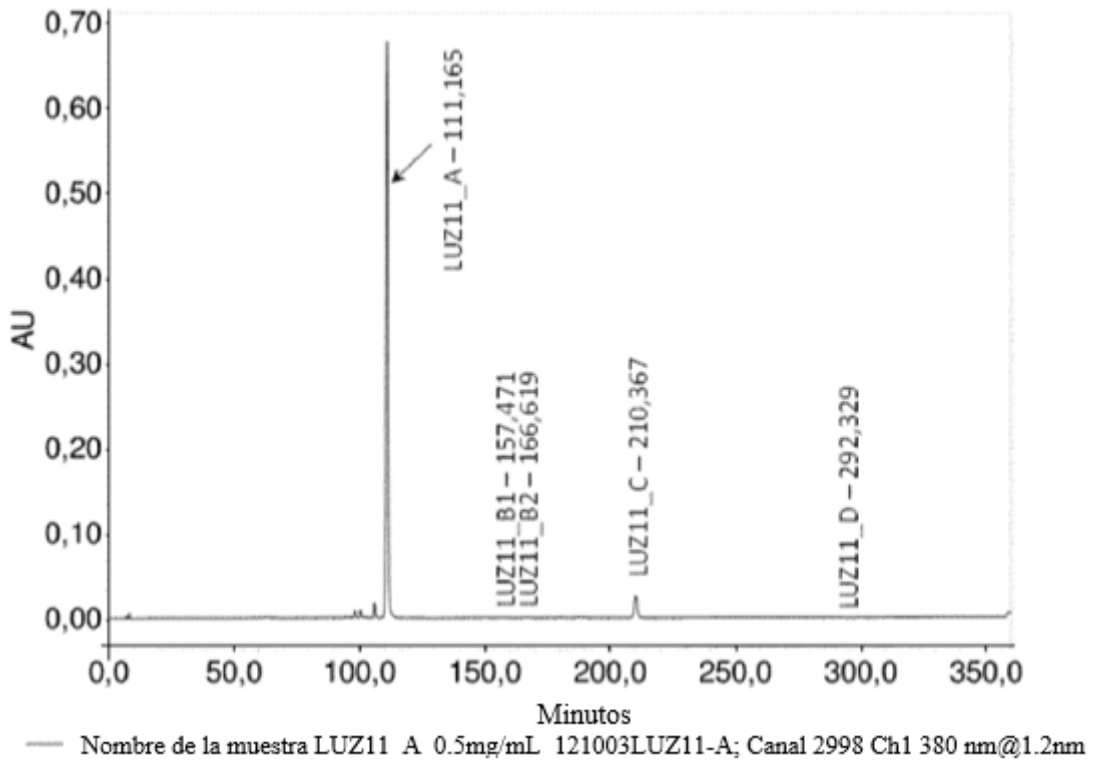
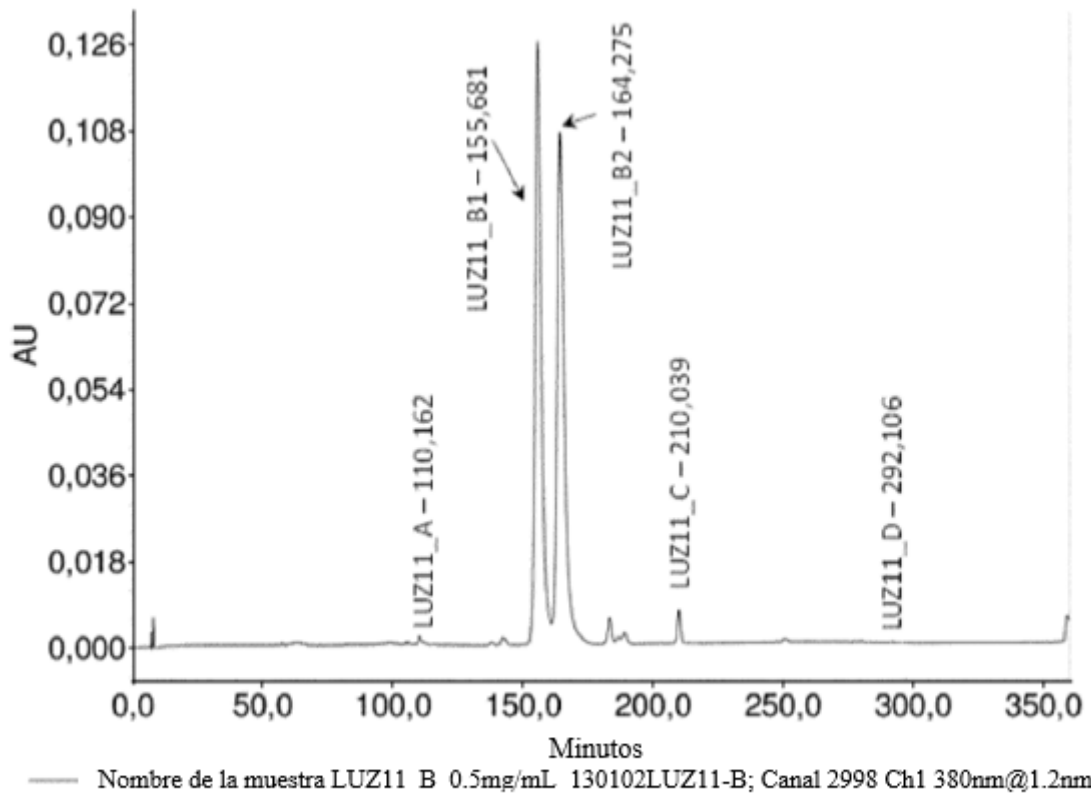


Figura 5



**Figura 6A**



**Figura 6B**

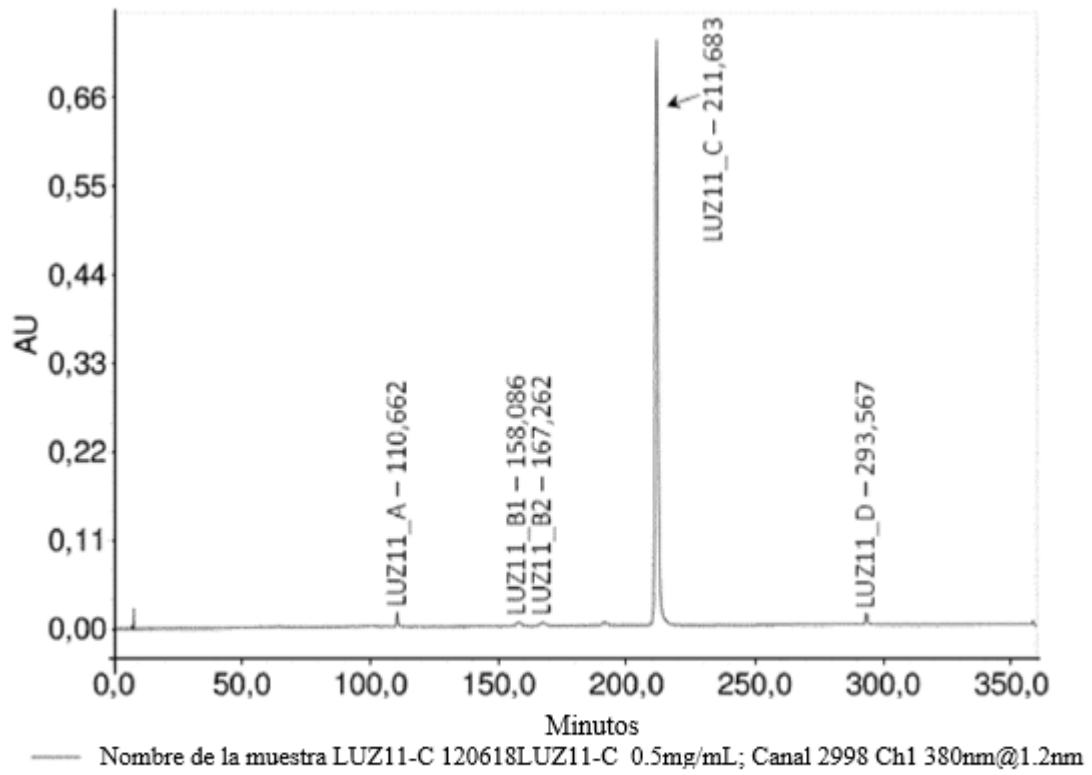


Figura 6C

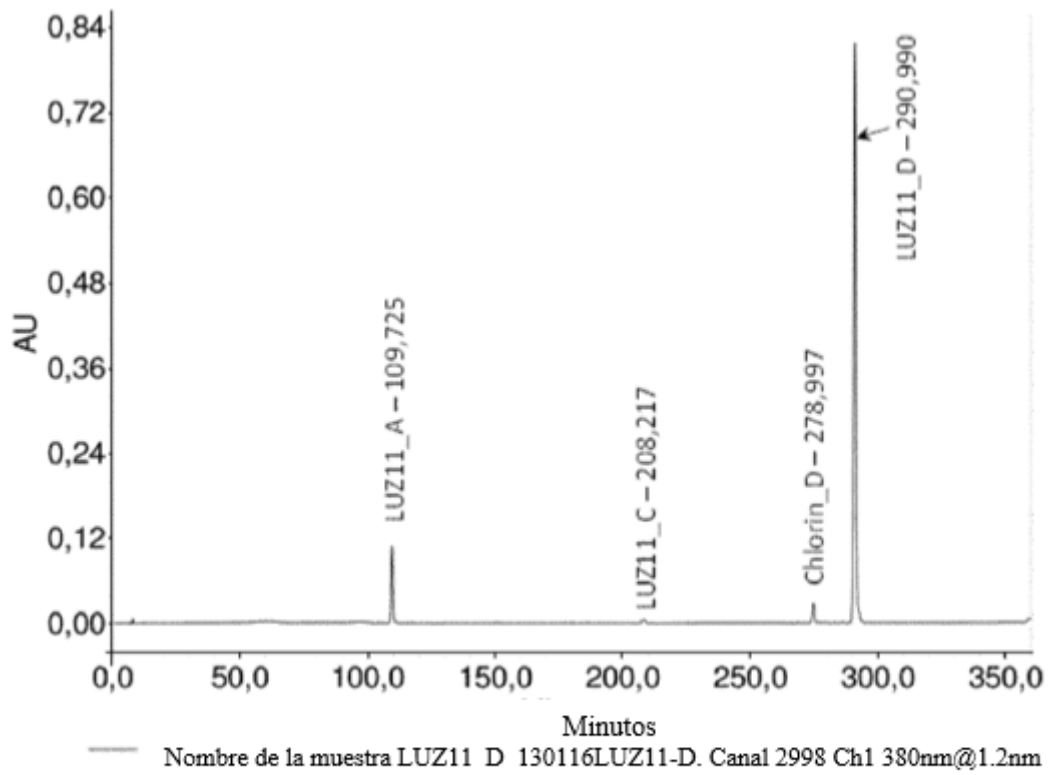


Figura 6D



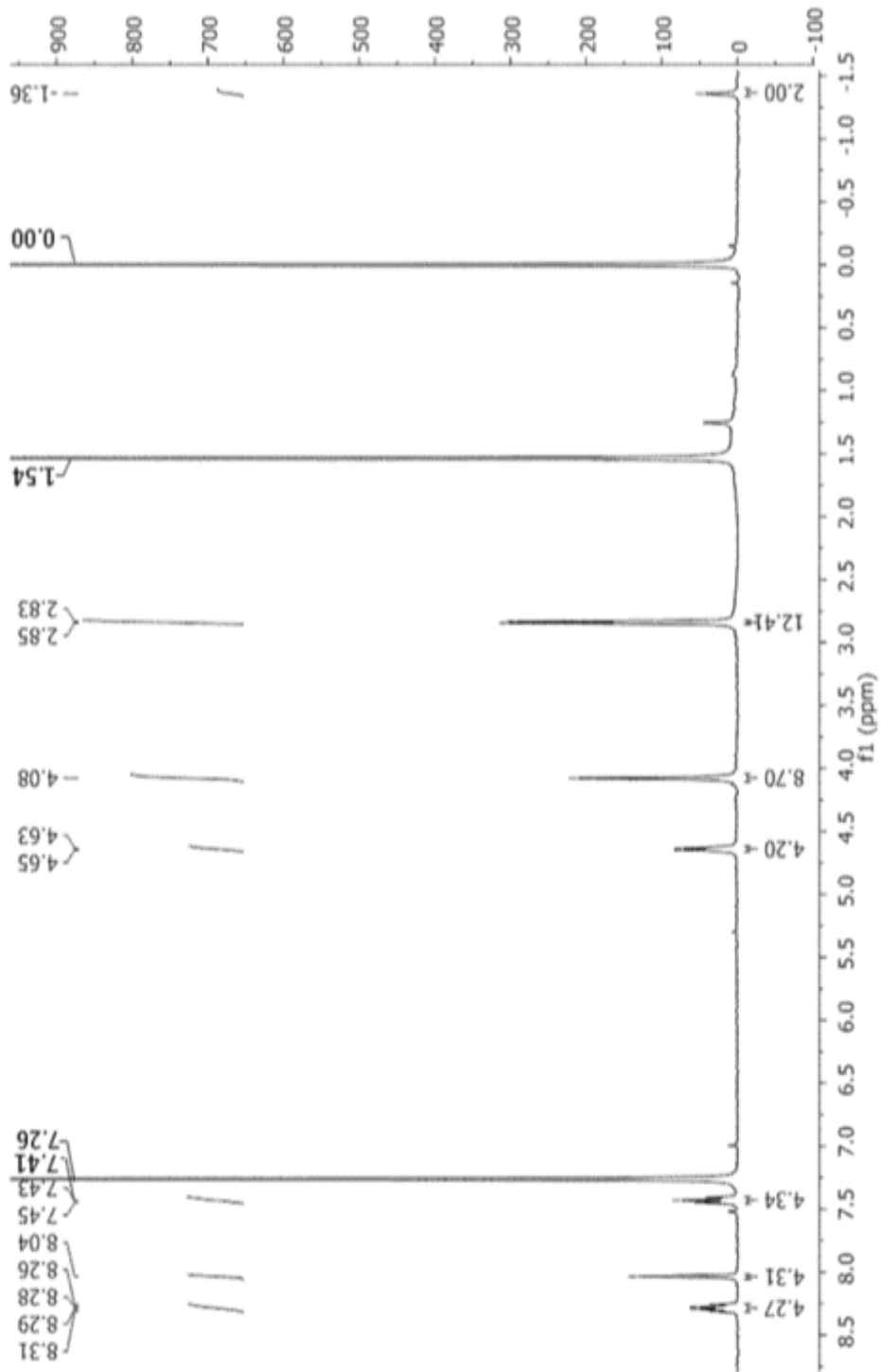


Figura 7

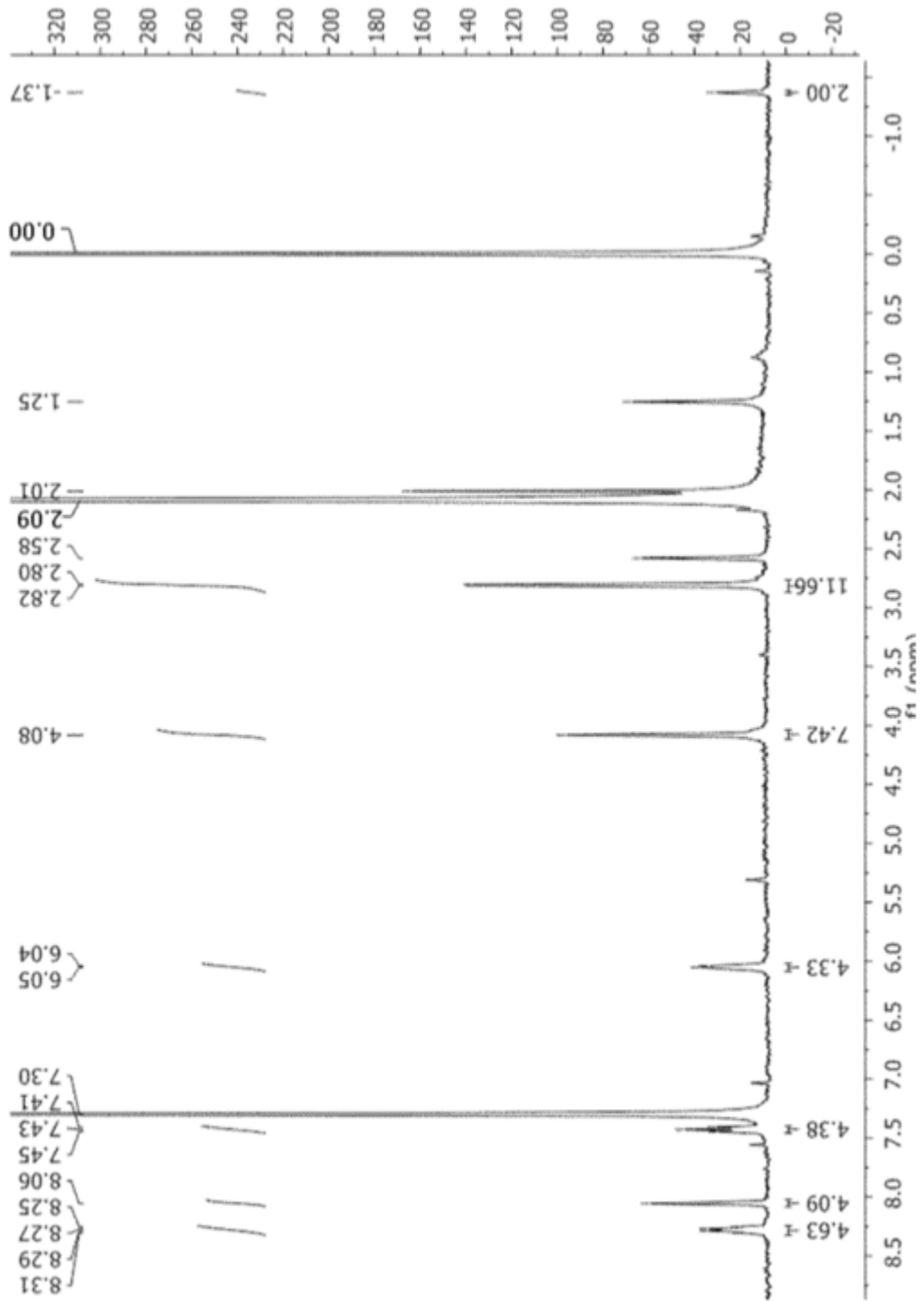


Figura 8

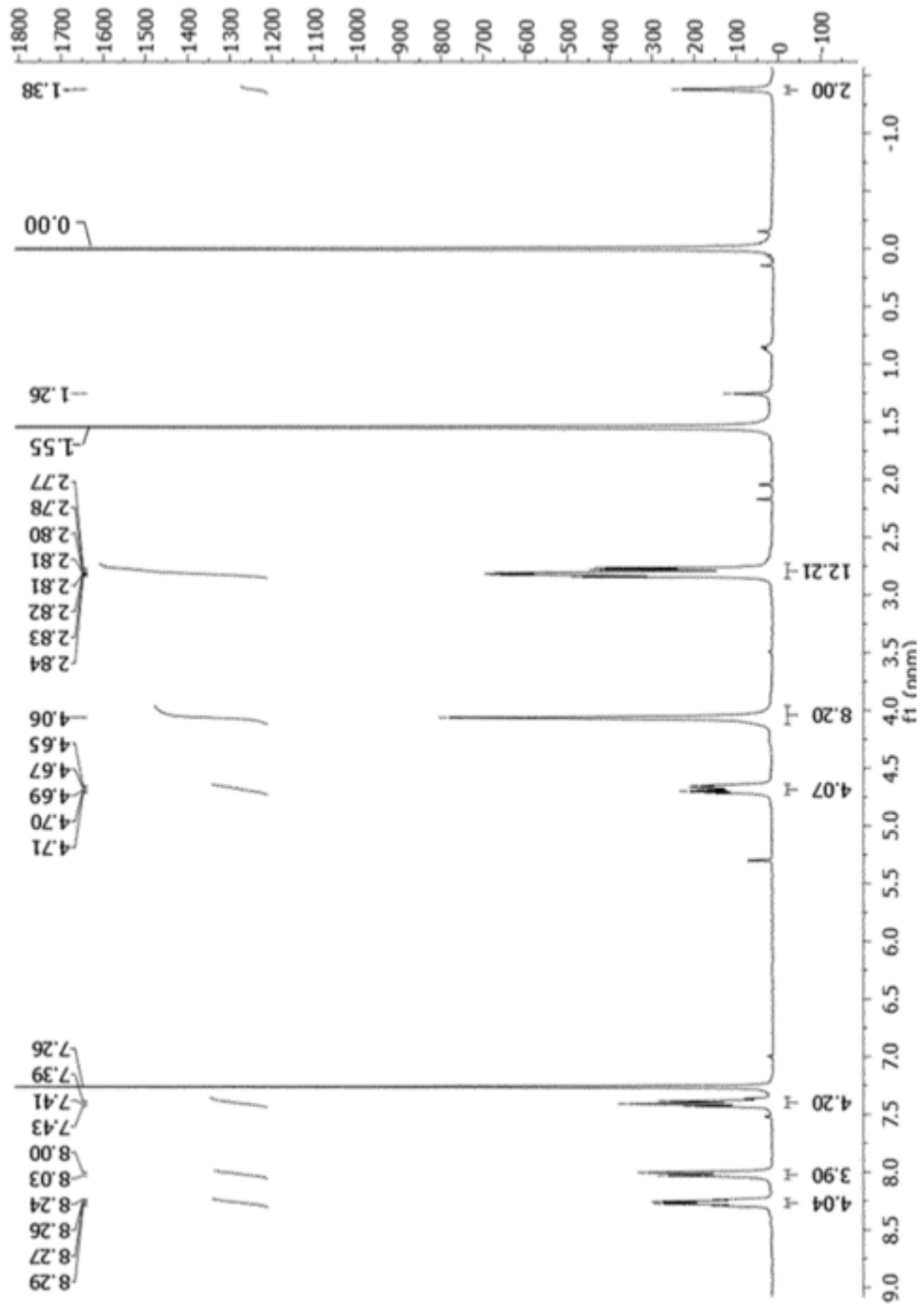


Figura 9

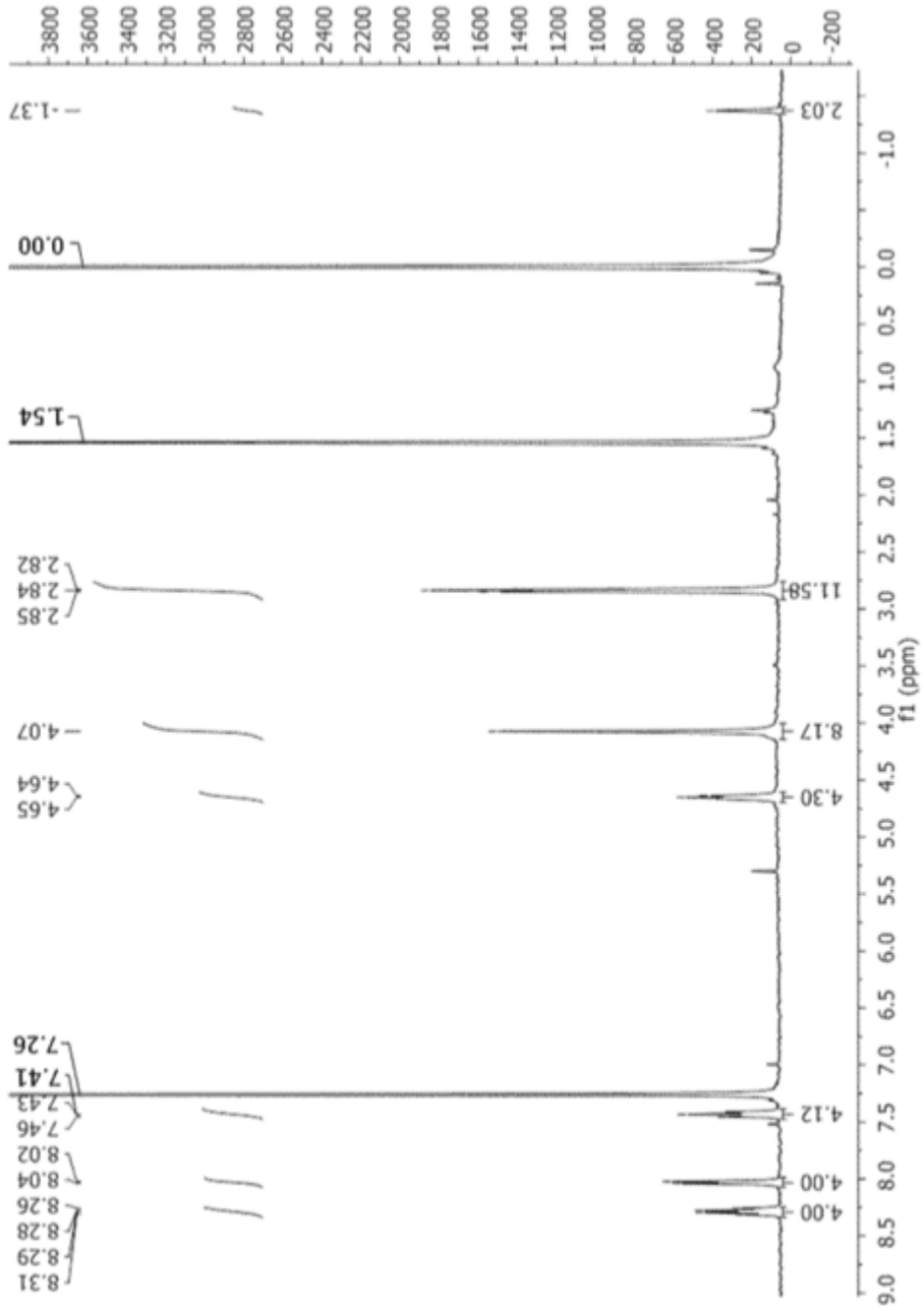
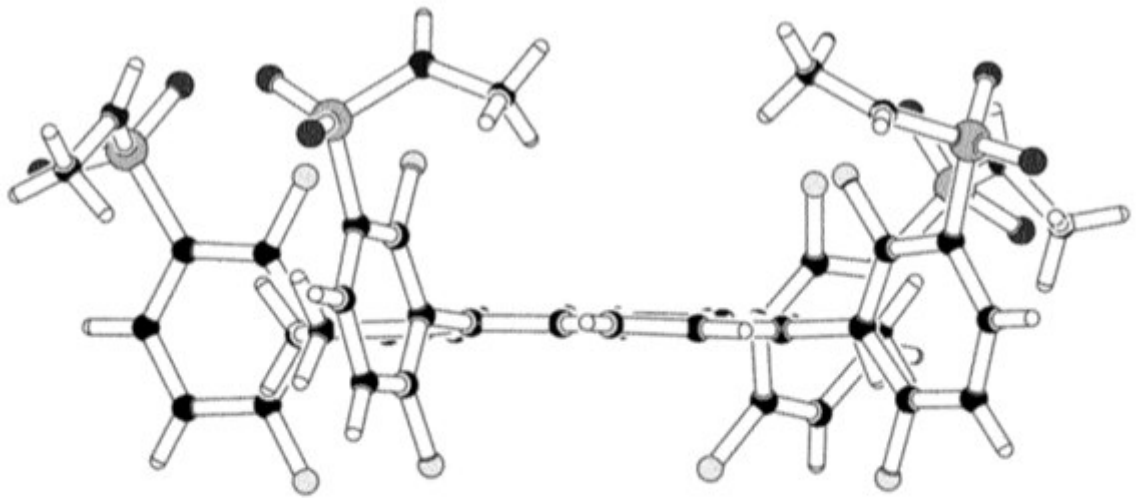


Figura 10



**Figura 11**

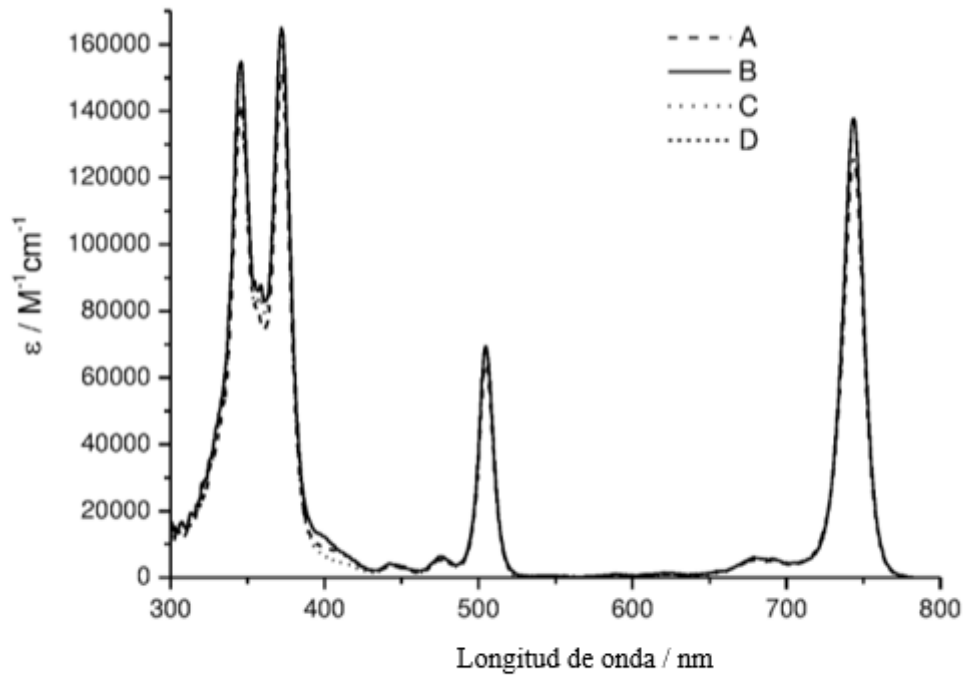


Figura 12A

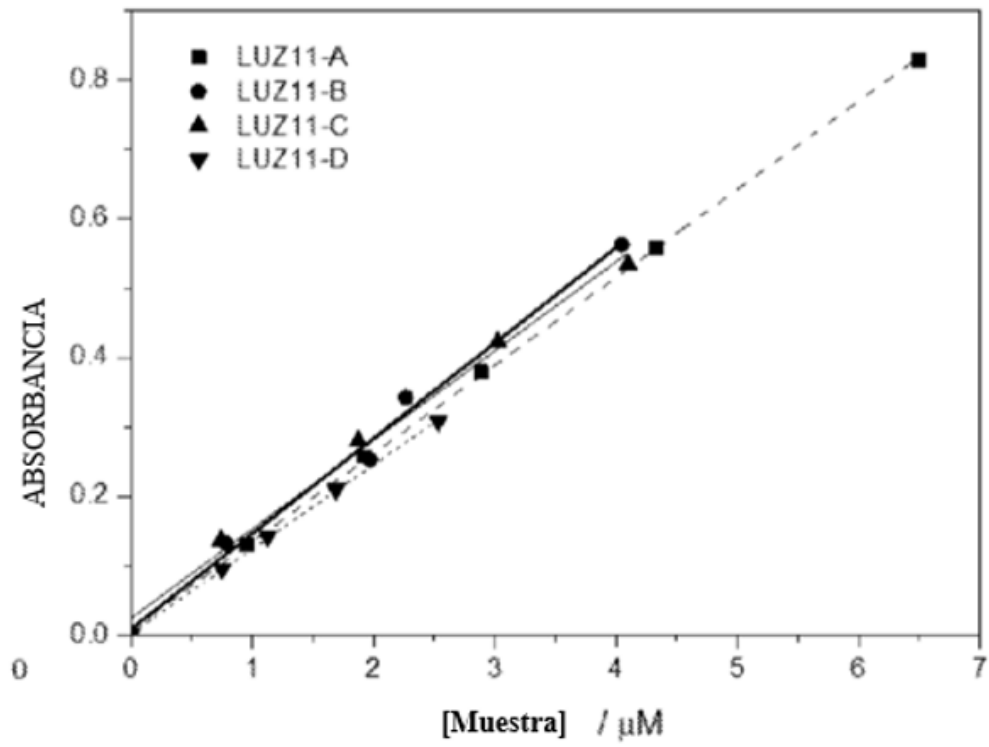
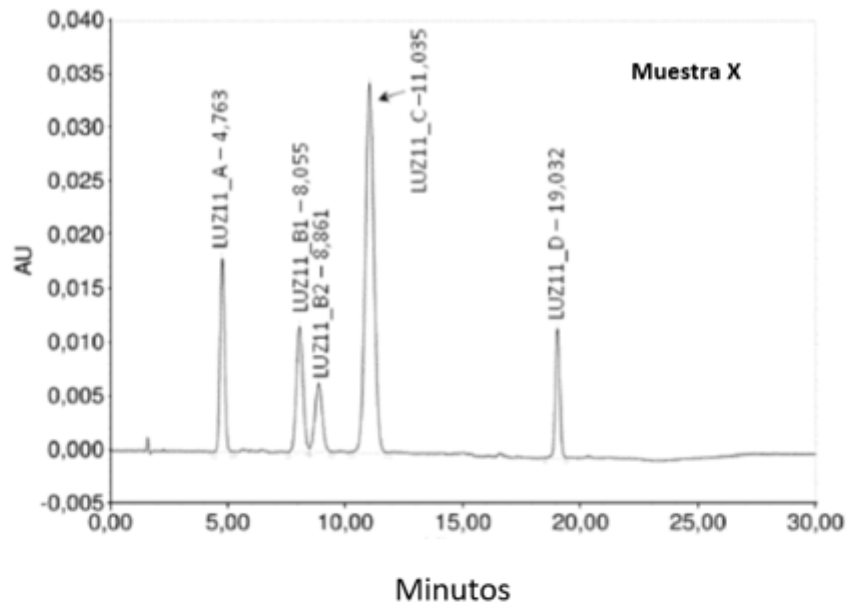
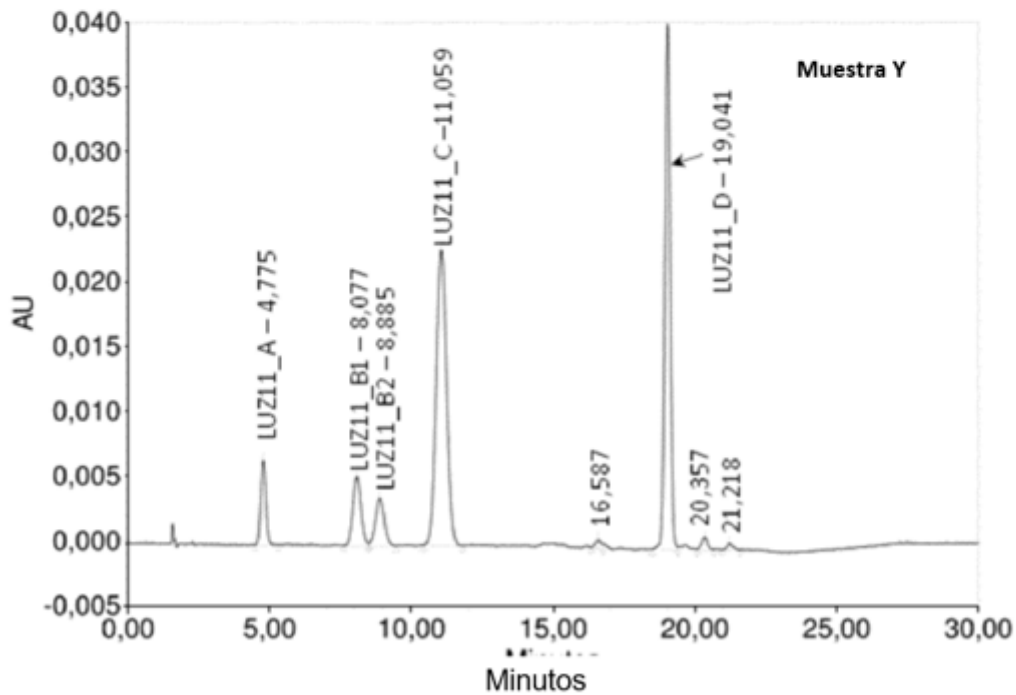


Figura 12B



Nombre de la muestra LUZ11 AS\_NGL376-3\_#1; Canal 2998 Ch1 743nm@ 1.2nm



Nombre de la muestra LUZ11 AS\_NGL376-4\_#1; Canal 2998 Ch1 743nm@1.2nm

Figura 13



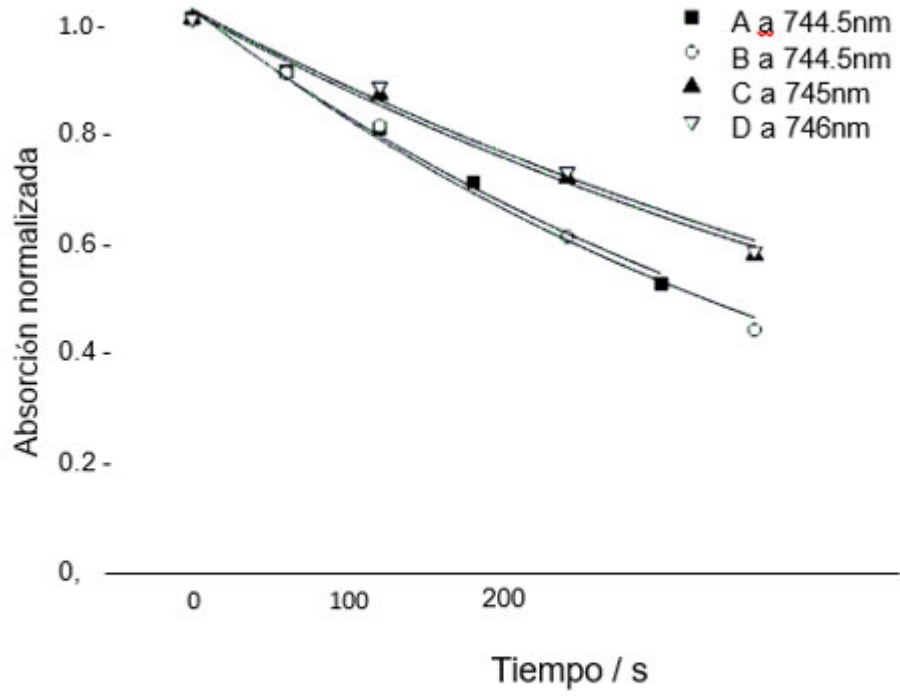


Figura 14

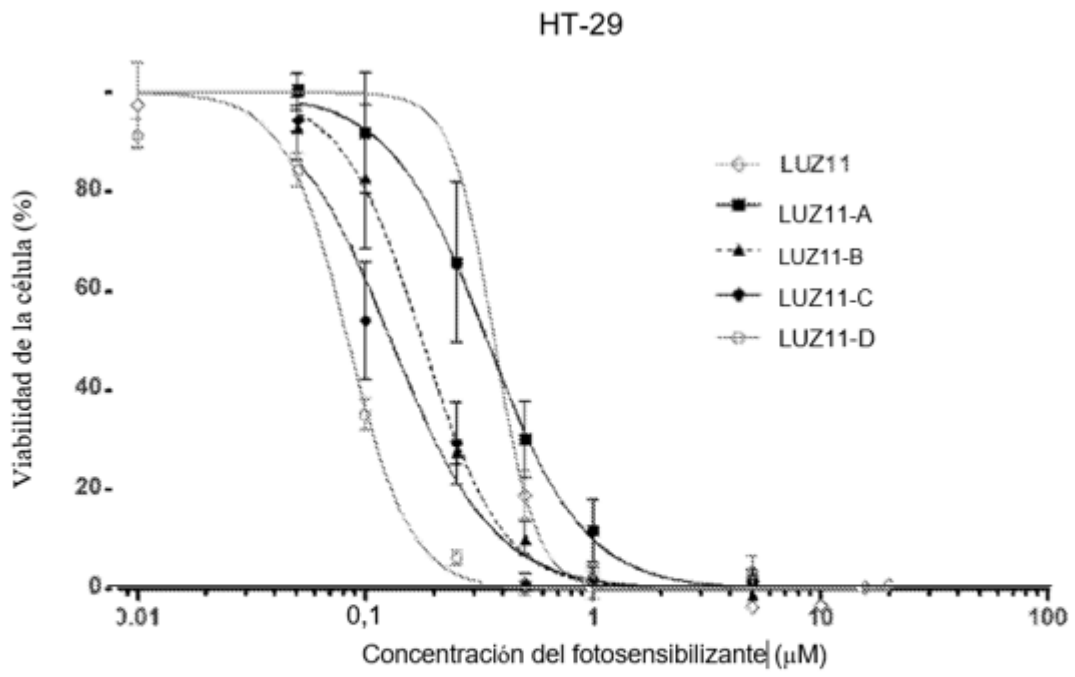


Figura 15

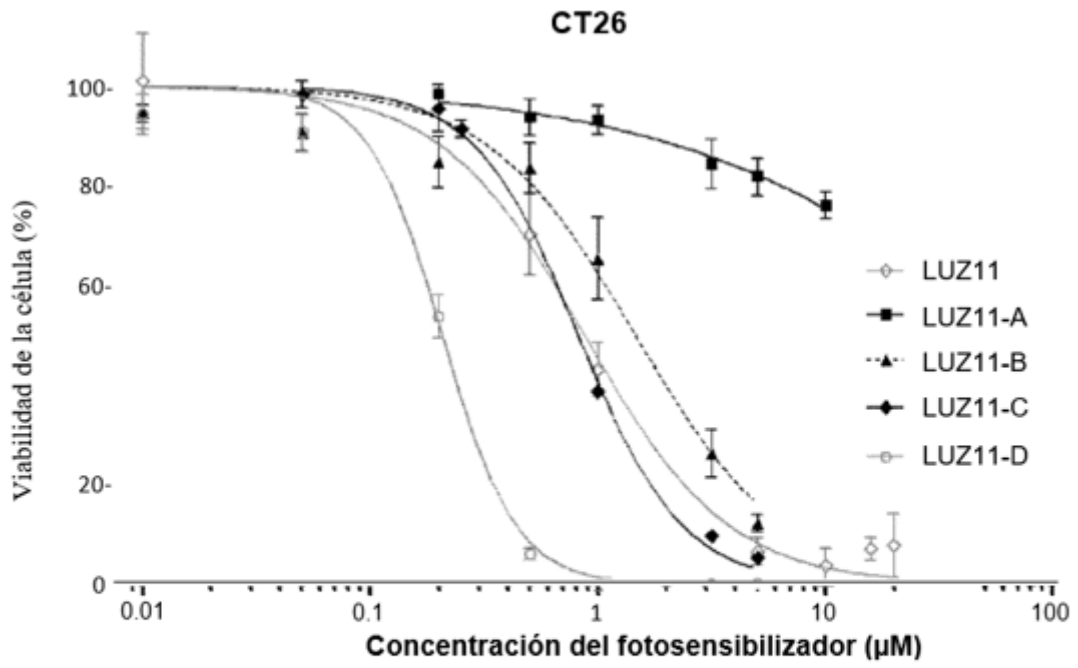


Figura 16

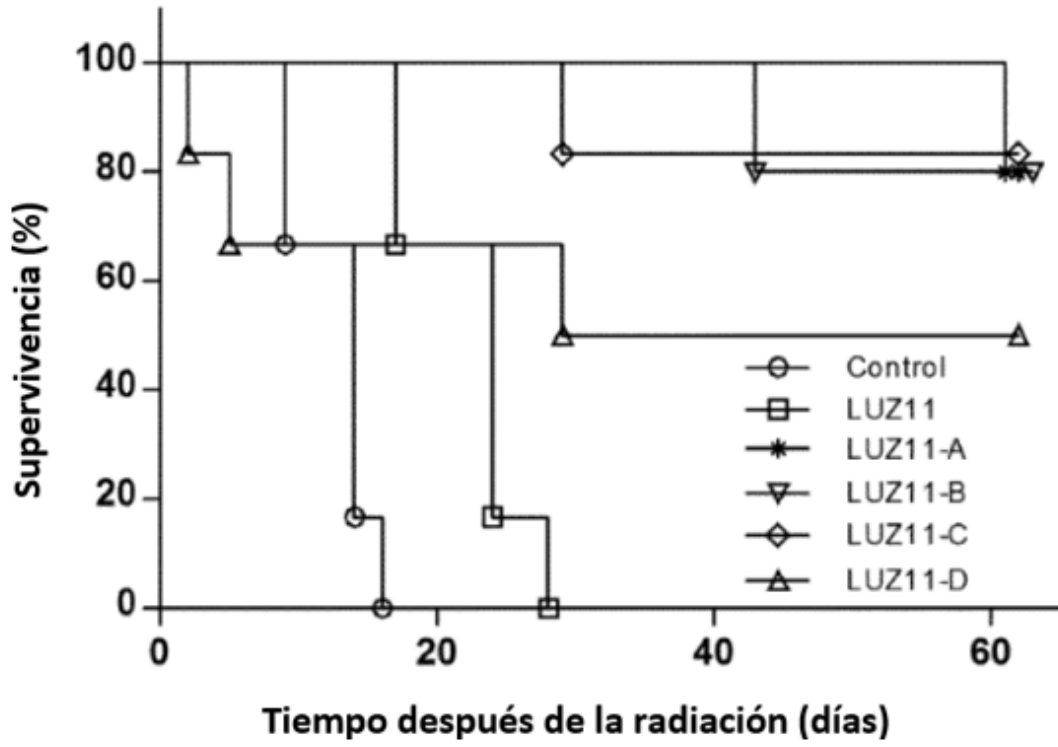


Figura 17

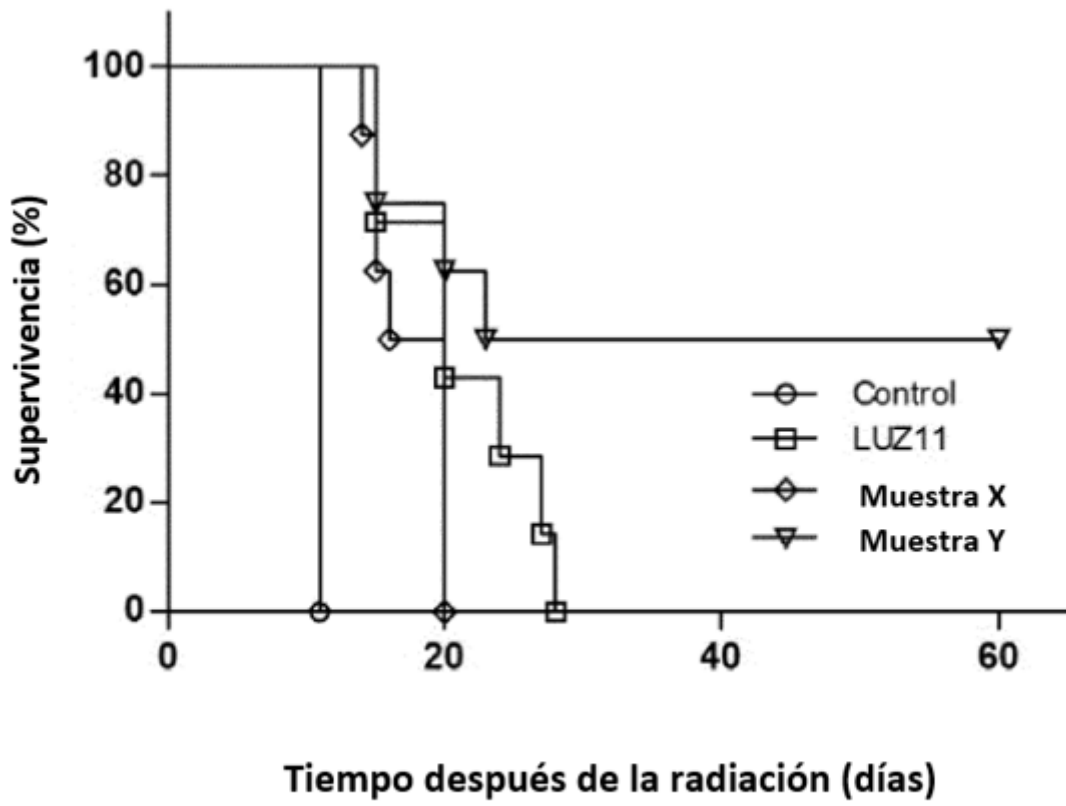


Figura 18