(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 791 004**

(51) Int. CI.:

***C07D 487/22*** (2006.01)
***A61K 31/41*** (2006.01)
***A61P 3/00*** (2006.01)
***A61P 9/00*** (2006.01)
***A61P 17/00*** (2006.01)
***A61P 19/00*** (2006.01)
***A61P 31/00*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
***A61P 43/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/GB2013/053285**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14091241**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13821500 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2931728**

(54) Título: **Derivado de la clorina de utilidad en terapia y diagnóstico fotodinámico**

(30) Prioridad:

**14.12.2012 GB 201222544**
**23.05.2013 GB 201309337**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**30.10.2020**

(73) Titular/es:

**RMW CHO GROUP LIMITED (100.0%)**
**Room 2003 20/F Tower A New Trade Plaza 6 On Ping Street**
**Hong Kong, CN**

(72) Inventor/es:

**CHO, HONSUE**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

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

Derivado de la clorina de utilidad en terapia y diagnóstico fotodinámico

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a la clorina e4 de sodio y a un procedimiento para su preparación. La clorina e4 de sodio es adecuada para su uso en terapia fotodinámica, terapia citoluminiscente y diagnóstico fotodinámico, por ejemplo, para tratar o detectar un tumor. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende clorina e4 de sodio, al uso de clorina e4 de sodio en la fabricación de un de un agente fototerapéutico o de fotodiagnóstico, y a la clorina e4 de sodio para su uso en terapia fotodinámica, terapia citoluminiscente o diagnóstico fotodinámico, por ejemplo, para su uso en el tratamiento o la detección de un tumor.

**Técnica anterior**

Las porfirinas y sus derivados son compuestos químicos fotosensibles conocidos, que pueden absorber fotones de luz y emitirlos a longitudes de onda más altas. Hay muchas aplicaciones para tales propiedades únicas y la PDT (terapia fotodinámica) es una de ellas.

Durante la activación de la luz, una molécula pasa desde el estado fundamental ($S_0$) a un estado excitado singlete ($S_1$), (transición $S_0 \rightarrow S_1$) y, a continuación, vuelve hasta el estado fundamental ($S_0$), (transición $S_1 \rightarrow S_0$), emitiendo luz a longitudes de onda más altas en forma de fluorescencia. Existe otro estado de energía conocido como el estado de triplete ($T_1$). El estado de triplete ($T_1$) no se puede llenar de manera eficiente por excitación directa. Sin embargo, el cruce entre sistemas $S_1 \rightarrow T_1$ se produce isoenergéticamente seguido por la desactivación a $T_1$. El cambio $S_1 \rightarrow T_1$ está formalmente prohibido por rotación, pero es un proceso de descenso y, en algunas moléculas, el cruce entre sistemas se produce de manera tan eficiente que la fluorescencia se apaga. Tales compuestos son útiles para generar tripletes excitados por transferencia de excitación (un fenómeno conocido como sensibilización) en moléculas en las que el cruce entre sistemas es mínimo.

La figura 1 muestra un diagrama de Jablonski modificado para un fotosensibilizador típico, que describe los principales procesos fotofísicos de interés.

En el estado de triplete ($T_1$) las moléculas se vuelven muy inestables y pueden reaccionar con el oxígeno molecular ($^3O_2$), dividiendo este último en dos oxígenos singlete ($^1O_2$). El oxígeno singlete ($^1O_2$) se conoce como un «eliminador» y puede destruir células biológicas anormales y eliminar los radicales libres.

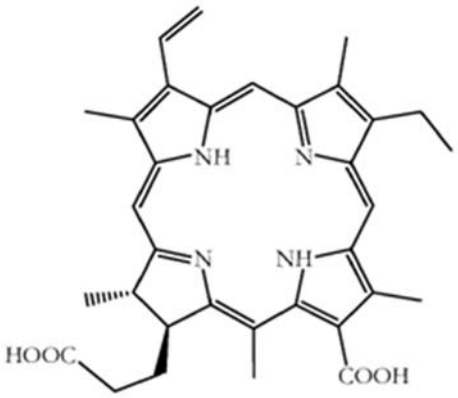
Tales propiedades únicas hacen que muchas moléculas fotosensibles sean buenos fotosensibilizadores para la PDT.

En la actualidad, existen dos generaciones de fotosensibilizadores para la PDT. La primera generación comprende porfirinas de hemo (derivados de la sangre), y la segunda en su mayor parte son derivados de clorofila. Los compuestos posteriores se conocen como clorinas y bacterioclorinas.

Las clorinas muestran propiedades fotofísicas similares a las de los sistemas de porfirina, pero tienen una banda Q mejorada, desplazada hacia el rojo (670 nm) que hace que los sistemas que contienen clorina sean mejores candidatos para la PDT. La *clorofila a,* el pigmento fotosintético verde, es un prototipo de la clase de clorina de los productos naturales. Este o sus derivados pueden extraerse de ciertas especies de *Spirulina platensis* sin ninguna contaminación con *clorofila b,* evitando así una tediosa separación cromatográfica.

Se ha utilizado un derivado de clorofila soluble en agua, conocido como clorina e6 trisódica de cobre (II), en el tratamiento de diversas dolencias humanas sin evidencia de toxicidad, sensibilización de la piel u otros efectos secundarios graves.

Wong et al. (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1967, vol. 155 (1), páginas 50-57) describen las acciones cardiotropicas de la clorina e4. La clorina e4 se estudió recientemente y se demostró que muestra una buena actividad fotosensible. Se indicó que la clorina e4 tiene un efecto protector contra las lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratas y las lesiones hepáticas agudas inducidas por TAA o $CCl_4$ en ratones. Por lo tanto, se sugirió que la clorina e4 puede ser un nuevo fármaco candidato prometedor contra la gastrelcosis y las lesiones hepáticas. El documento WO 2009/040411 sugiere el uso de un complejo de clorina e4 zinc en la terapia fotodinámica. Li et al. (Oncology Reports, 2012, vol. 27, páginas 1455-1460) describen la clorina e4 como un fotosensibilizador en el tratamiento de líneas celulares de cáncer de vejiga.

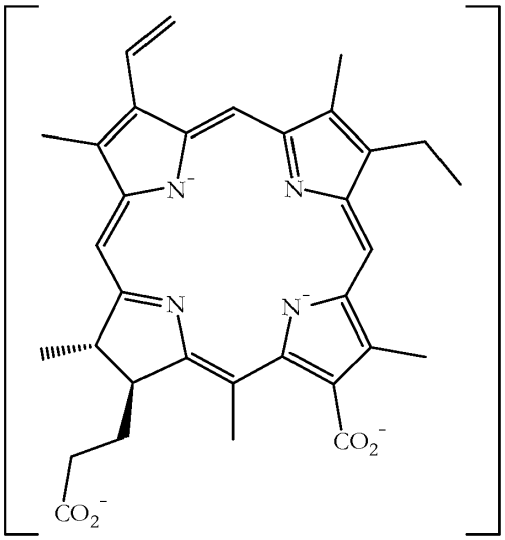



clorina e4

Sin embargo, existe una necesidad continua de mejores fotosensibilizadores. Existe una necesidad de compuestos que tengan un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete y de compuestos que tengan una fuerte capacidad fotosensibilizante, preferiblemente en medios orgánicos y acuosos. También existe la necesidad de compuestos que tengan un alto rendimiento cuántico de fluorescencia.

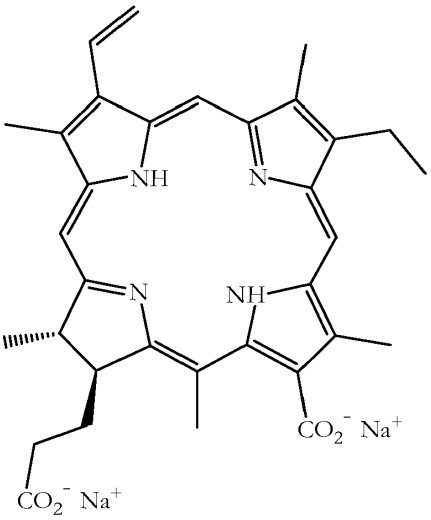
**Resumen de la invención**

Un primer aspecto de la presente invención proporciona clorina e4 de sodio, que tiene la estructura:




$[H^+]_2$ $[Na^+]_2$

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio tiene la estructura:




La persona experta apreciará que las cargas negativas en las estructuras de cloro mostradas en las representaciones anteriores se deslocalizan sobre el sistema conjugado.

La clorina e4 de sodio tiene dos centros quirales. La clorina e4 sodio de la presente invención es preferiblemente sustancialmente enantioméricamente pura, lo que significa que la clorina e4 sodio comprende menos del 10 % de otros estereoisómeros, preferiblemente menos del 5 %, preferiblemente menos del 3 %, preferiblemente menos del 2 %, preferiblemente menos del 1 %.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un proceso de preparación de clorina e4 de sodio de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, que comprende la etapa de hacer reaccionar clorina e4 con un compuesto de sodio.

Preferiblemente el compuesto de sodio es hidróxido de sodio, carbonato de sodio, una sal de sodio de ácido carboxílico (como estearato de sodio o acetato de sodio), un haluro de sodio (como fluoruro de sodio) o hidruro de sodio. Preferiblemente el compuesto de sodio es hidróxido de sodio, carbonato de sodio, una sal de sodio de ácido carboxílico (como estearato de sodio o acetato de sodio), un haluro de sodio (como fluoruro de sodio) o hidruro de sodio. Preferiblemente, el compuesto de sodio es hidróxido de sodio o carbonato de sodio. Más preferiblemente, el compuesto de sodio es hidróxido de sodio.

Opcionalmente, se hace reaccionar clorina e4 con el compuesto de sodio en presencia de una base. Preferiblemente, la base es una base de amina, preferiblemente una base de amina aromática como el pirofosfato de tiamina o DMAP. Si se utiliza, la base es preferiblemente pirofosfato de tiamina.

Preferiblemente, la clorina e4, el compuesto de sodio y la base opcional se utilizan en una proporción molar de 0.15-1 : 45-60 : 0-12.

Preferiblemente, se hace reaccionar clorina e4 con el compuesto de sodio en presencia de un disolvente. Preferiblemente, el disolvente se selecciona de un alcohol (tal como metanol, etanol, n-propanol o isopropanol), agua, DMF, cloroformo, DMSO, tolueno o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el disolvente se selecciona de metanol, etanol, agua o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el disolvente se selecciona de metanol, agua o una mezcla de los mismos. Preferiblemente el disolvente es una mezcla de metanol y agua.

Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 60 °C o menos. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 25-60 ºC.

Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo entre 1 y 12 horas, preferiblemente entre 3 y 8 horas.

La clorina e4 de sodio obtenida puede purificarse mediante filtración, por ejemplo, a través de un filtro Millipore de 45 µm. Alternativa o adicionalmente, la clorina e4 de sodio obtenida puede purificarse por cromatografía, por ejemplo, por cromatografía instantánea en una columna de gel de sílice. La clorina e4 de sodio puede aislarse por liofilización.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende clorina e4 de

sodio según el primer aspecto de la presente invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención es adecuada para su uso en medicina.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para su uso en terapia fotodinámica o terapia citoluminiscente.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; un tumor benigno o maligno; cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por hiperproliferación celular benigna o maligna o por áreas de neovascularización.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para su uso en terapia fotodinámica o terapia citoluminiscente.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para el tratamiento del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer de cabeza y cuello; cáncer oral o de boca; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, son adecuadas para el tratamiento del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos. Preferiblemente, son adecuadas para el tratamiento del linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, cuello uterino, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, pulmón, esófago, riñón, hígado, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, son adecuadas para el tratamiento del linfoma; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, cuello uterino, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, pulmón, esófago, huesos o piel.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para su uso en el diagnóstico fotodinámico.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para la detección de una enfermedad caracterizada por una hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; un tumor benigno o maligno; cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para la detección de un área que está afectada por hiperproliferación celular benigna o maligna o por neovascularización.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para la detección de un tumor benigno o maligno.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para la detección de un cáncer temprano; displasia

cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer de cabeza y cuello; cáncer oral o de boca; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, son adecuadas para la detección del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos. Preferiblemente, son adecuadas para la detección del linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, cuello uterino, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, pulmón, esófago, riñón, hígado, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, son adecuadas para la detección del linfoma; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, de cuello uterino, de vagina u otros anexos femeninos, de mama, de nasofaringe, de pulmón, de esófago, de huesos o de piel.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son adecuadas para la detección fluorescente o fosforescente de las enfermedades enumeradas anteriormente, preferiblemente para la detección y cuantificación fluorescente o fosforescente de las enfermedades mencionadas.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención y la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención está adaptada para la administración simultánea con o previa a la administración de la irradiación o el sonido, preferiblemente para la administración previa a la administración de la irradiación.

Si la clorina e4 de sodio según el primer o aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son para su uso en terapia fotodinámica o terapia citoluminiscente, entonces se adaptan preferiblemente para la administración de 5 a 100 horas antes de la irradiación, preferiblemente de 6 a 72 horas antes de la irradiación, preferiblemente de 24 a 48 horas antes de la irradiación.

Si la clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención son para su uso en diagnóstico fotodinámico, entonces se adaptan preferiblemente para la administración de 3 a 60 horas antes de la irradiación, preferiblemente de 8 a 40 horas antes de la irradiación.

Preferiblemente, la irradiación utilizada en la terapia fotodinámica, la terapia citoluminiscente o el diagnóstico fotodinámico es radiación electromagnética con una longitud de onda en el intervalo de 500 nm a 1000 nm, preferiblemente de 600 nm a 790 nm. La radiación electromagnética se puede administrar durante aproximadamente 5-60 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 15-20 minutos, a aproximadamente 0,1-5 W, preferiblemente a aproximadamente 1 W. En una realización de la presente invención, se utilizan dos fuentes de radiación electromagnética (por ejemplo, una luz láser y una luz LED), una fuente con una longitud de onda en el intervalo de 600 nm a 690 nm, preferiblemente alrededor de 660 nm, la otra fuente con una longitud de onda en el intervalo de 700 nm a 790 nm, preferiblemente alrededor de 760 nm. En otra realización de la presente invención, se utilizan dos fuentes de radiación electromagnética (por ejemplo, una luz láser y una luz LED), ambas fuentes adaptadas para proporcionar irradiación con una longitud de onda en el intervalo de 600 nm a 690 nm, preferiblemente alrededor de 660 nm, e irradiación con una longitud de onda en el intervalo de 700 nm a 790 nm, preferiblemente alrededor de 760 nm. En otra realización de la presente invención, la irradiación puede proporcionarse mediante un dispositivo de próstata, anal, vaginal, bucal y nasal para su inserción en una cavidad corporal. En otra realización de la presente invención, la irradiación puede proporcionarse mediante activación de la luz intersticial, por ejemplo, utilizando una aguja fina para insertar un láser de fibra óptica en el pulmón, hígado, ganglios linfáticos o mama. En otra realización de la presente invención, la irradiación puede proporcionarse mediante activación de luz endoscópica, por ejemplo, para suministrar luz al pulmón, estómago, colon, vejiga o cuello.

La composición farmacéutica según el cuarto aspecto de la presente invención se puede presentar en una forma adecuada para su administración oral, parenteral (incluidas la intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intratraqueal, intraperitoneal, intraarticular, intraabdominal, intracraneal y epidural), transdérmica, por vía respiratoria (aerosol), rectal, vaginal o tópica (incluidas la bucal, mucosa y sublingual). La composición farmacéutica también se puede presentar en una forma adecuada para su administración por enema o para la administración por inyección en un tumor. Preferiblemente, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para su administración oral, parenteral o por vía aérea, preferiblemente en una forma adecuada para su administración oral o parenteral, preferiblemente en una forma adecuada para su administración oral.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para su administración oral. Preferiblemente, la composición farmacéutica se proporciona en la forma de un comprimido, cápsula, cápsula de gelatina dura o blanda, comprimido oblongo, troche o pastilla, como un polvo o gránulos, o como una solución acuosa, suspensión o dispersión. Más preferiblemente, la composición farmacéutica se proporciona en forma de una solución acuosa, suspensión o dispersión para administración oral o, alternativamente, en forma de un polvo liofilizado que se puede mezclar con agua antes de su administración para proporcionar una solución acuosa, suspensión o dispersión para la administración oral. Preferiblemente, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para proporcionar entre 0,01 y 10 mg/kg/día de clorina e4 de sodio, preferiblemente entre 0,1 y 5 mg/kg/día, preferiblemente alrededor de 3 mg/kg/día.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para la administración parenteral. Preferiblemente, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para la administración intravenosa. Preferiblemente, la composición farmacéutica se proporciona en forma de una solución acuosa para la administración parenteral o, alternativamente, en forma de un polvo liofilizado que se puede mezclar con agua antes de su administración para proporcionar una solución acuosa para la administración parenteral. Preferiblemente, la composición farmacéutica es una solución acuosa o suspensión que tiene un pH entre 6 y 8,5.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para la administración por vía aérea. Preferiblemente, la composición farmacéutica se proporciona en forma de una solución acuosa, suspensión o dispersión para administración por vía aérea o, alternativamente, en forma de un polvo liofilizado que se puede mezclar con agua antes de su administración para proporcionar una solución acuosa, suspensión o dispersión para la administración por vía aérea. Preferiblemente, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para proporcionar entre 0,01 y 10 mg/kg/día de clorina e4 de sodio, preferiblemente entre 0,1 y 5 mg/kg/día, preferiblemente alrededor de 3 mg/kg/día.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; un tumor benigno o maligno; cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos.

El quinto aspecto de la presente invención también proporciona clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención para su uso en terapia fotodinámica o terapia citoluminiscente. Preferiblemente, el agente fototerapéutico es adecuado para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; un tumor benigno o maligno; cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio o el agente fototerapéutico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la hiperproliferación celular benigna o maligna o por áreas de neovascularización.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio o el agente fototerapéutico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para el tratamiento de un tumor benigno o maligno.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio o el agente fototerapéutico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para el tratamiento del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer de cabeza y cuello; cáncer oral o de boca; o cáncer de sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, es adecuada para el tratamiento del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos. Preferiblemente, es adecuada para el tratamiento del linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, cuello uterino, vagina u otros anexos femeninos, de mama, de nasofaringe, de pulmón, de esófago, de riñón, de hígado, de cerebro, de sistema linfático, de huesos, de piel o de

páncreas. Preferiblemente, es adecuada para el tratamiento del linfoma; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, de cuello uterino, de vagina u otros anexos femeninos, de mama, de nasofaringe, de pulmón, de esófago, de huesos o de piel.

El quinto aspecto de la presente invención también proporciona clorina e4 de sodio según el primer aspecto de la presente invención para su uso en el diagnóstico fotodinámico.

Preferiblemente, el agente de fotodiagnóstico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para la detección de una enfermedad caracterizada por la hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; un tumor benigno o maligno; cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cérvix, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos.

Preferiblemente, el agente de fotodiagnóstico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para la detección de un área que está afectada por la hiperproliferación celular benigna o maligna o por la neovascularización.

Preferiblemente, el agente de fotodiagnóstico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para la detección de un tumor benigno o maligno.

Preferiblemente, el agente de fotodiagnóstico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para la detección del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer de cabeza y cuello; cáncer oral o de boca; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, es adecuado para la detección del cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma de Hodgkin; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático o huesos. Preferiblemente, es adecuado para la detección de linfomas; linfoma de Hodgkin; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, cuello uterino, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, pulmón, esófago, riñón, hígado, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas. Preferiblemente, es adecuado para la detección de linfomas; cáncer oral o de boca; o cáncer de próstata, de cuello uterino, de vagina u otros anexos femeninos, de mama, de nasofaringe, de pulmón, de esófago, de huesos o de piel.

Preferiblemente, el agente de fotodiagnóstico del quinto aspecto de la presente invención es adecuado para la detección fluorescente o fosforescente de dichas enfermedades, preferiblemente la detección y cuantificación fluorescente o fosforescente de dichas enfermedades.

Preferiblemente, la clorina e4 de sodio, el agente fototerapéutico o el agente de fotodiagnóstico se adapta para su administración simultánea con o previa a la administración de la irradiación o el sonido, preferiblemente para su administración previa a la administración de la irradiación.

Si la clorina e4 de sodio o el agente fototerapéutico es para su uso en la terapia fotodinámica o en la terapia citoluminiscente, entonces se adapta preferiblemente para su administración de 5 a 100 horas antes de la irradiación, preferiblemente de 6 a 72 horas antes de la irradiación, preferiblemente de 24 a 48 horas antes de la irradiación.

Si el agente de fotodiagnóstico es para su uso en el diagnóstico fotodinámico, entonces es preferible adaptarlo para su administración de 3 a 60 horas antes de la irradiación, preferiblemente de 8 a 40 horas antes de la irradiación.

Preferiblemente, la irradiación utilizada en la terapia fotodinámica, la terapia citoluminiscente o el diagnóstico fotodinámico es radiación electromagnética con una longitud de onda en el intervalo de 500 nm a 1000 nm, preferiblemente de 600 nm a 790 nm. La radiación electromagnética se puede administrar durante aproximadamente 5-60 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 15-20 minutos, a aproximadamente 0,1-5 W, preferiblemente a aproximadamente 1 W. En una realización de la presente invención, se utilizan dos fuentes de radiación electromagnética (por ejemplo, una luz láser y una luz LED), una fuente con una longitud de onda en el intervalo de 600 nm a 690 nm, preferiblemente alrededor de 660 nm, la otra fuente con una longitud de onda en el intervalo de 700 nm a 790 nm, preferiblemente alrededor de 760 nm. En otra realización de la presente invención, se utilizan dos fuentes de radiación electromagnética (por ejemplo, una luz láser y una luz LED), ambas fuentes adaptadas para proporcionar irradiación con una longitud de onda en el intervalo de 600 nm a 690 nm, preferiblemente alrededor de

660 nm, e irradiación con una longitud de onda en el intervalo de 700 nm a 790 nm, preferiblemente alrededor de 760 nm. En otra realización de la presente invención, la irradiación puede proporcionarse mediante un dispositivo de próstata, anal, vaginal, bucal y nasal para su inserción en una cavidad corporal. En otra realización de la presente invención, la irradiación puede proporcionarse mediante activación de la luz intersticial, por ejemplo, utilizando una aguja fina para insertar un láser de fibra óptica en el pulmón, hígado, ganglios linfáticos o mama. En otra realización de la presente invención, la irradiación puede proporcionarse mediante activación de luz endoscópica, por ejemplo, para suministrar luz al pulmón, estómago, colon, vejiga o cuello.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra un diagrama de Jablonski modificado para un fotosensibilizador típico, que describe los principales procesos fotofísicos de interés.

La figura 2 representa esquemáticamente la metalación y la desmetalación de un anillo de porfirina.

La figura 3 representa esquemáticamente la reacción de 1,3-difenilisobenzofurano (DPIBF) con dos oxígenos singlete ($^1O_2$).

La figura 4 muestra el espectro de absorción de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en etanol.

La figura 5 muestra el espectro de absorción de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en agua.

La figura 6 muestra el espectro de absorción de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en agua con detergente 0,2 M dodecil sulfato de sodio (SDS).

La figura 7 muestra el espectro de fluorescencia de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en etanol. La longitud de onda de excitación fue de 403 nm; la absorbancia a esta longitud de onda fue de 0,10; tamaño de la cubeta 1 cm.

La figura 8 muestra el espectro de fluorescencia de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en agua. La longitud de onda de excitación fue de 403 nm; la absorbancia a esta longitud de onda fue de 0,13; tamaño de la cubeta 1 cm.

La figura 9 muestra el espectro de fluorescencia de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en agua con detergente 0,2 M dodecil sulfato de sodio (SDS). La longitud de onda de excitación fue de 403 nm; la absorbancia a esta longitud de onda fue de 0,13; tamaño de la cubeta 1 cm.

La figura 10 muestra el espectro de excitación de una solución de clorina e4 de sodio (aproximadamente 10 µM) en etanol. La fluorescencia se midió a 710 nm; la absorbancia a 403 nm fue de 0,15 en 1 cm; la trayectoria óptica fue de 0,5 cm.

La figura 11 muestra los espectros de absorción de una solución de DPIBF y clorina e4 de sodio en etanol antes y 14 minutos después de la irradiación con luz roja (660 nm).

La figura 12 muestra las trazas cinéticas (1) y el espectro (2) de la fosforescencia de oxígeno singlete después de la excitación láser pulsada de la clorina e4 de sodio en etanol.

La figura 13 muestra las trazas cinéticas (1) y el espectro (2) de la fosforescencia de oxígeno singlete después de la excitación láser pulsada de la clorina e4 de sodio en agua.

La figura 14 muestra las trazas cinéticas de fosforescencia de oxígeno singlete después de la excitación láser pulsada de la clorina e4 de sodio en el agua con el detergente 0,2 M dodecil sulfato de sodio (SDS).

**Descripción detallada de la invención**

La inserción de metal en la parte central de un anillo de porfirina o clorina se conoce como metalación y el proceso químico general se representa en la figura 2. Las porfirinas y las clorinas pueden formar complejos con una amplia variedad de metales (M). Estos complejos metálicos no solo protegen los átomos de nitrógeno internos de los reactivos electrofílicos y las bases fuertes, sino que también tienen un efecto pronunciado sobre la reactividad de los macrociclos. Una geometría común de estos complejos es octaédrica, con los iones metálicos ocupando el centro del plano de

porfirina $N_4$ y los ligandos metálicos en posiciones *trans* (figura 2).

La clorina e4 tiene nueve cadenas laterales, dos de las cuales llevan un resto de ácido carboxílico. Estos restos de ácido carboxílico pueden formar sales con una amplia variedad de metales (M).

**Detalles experimentales**

**Ejemplo: detalles de síntesis generales**

Método 1: se disuelven 0,15-1 mmol de clorina e4 en 60-100 ml de metanol. A esta solución se le añaden 15-20 ml de hidróxido de sodio (solución de agua 3 M). La mezcla se agita hasta que la síntesis se completa después de, aproximadamente, 6 horas. A continuación, la mezcla se filtra a través de un filtro Millipore de 45 µm. El producto se purifica mediante cromatografía instantánea con una fase móvil de metanol. Posteriormente, la solución se destila y se liofiliza. En una realización preferida de la presente invención, la reacción se produce a una temperatura en el intervalo de 25-60 °C.

Método 2: se disuelven 0,15-1 mmol de clorina e4 en 60-100 ml de metanol. A esta solución se le añaden 15-20 ml de hidróxido de sodio (solución de agua 3 M). Por separado, se disuelven 5-12 mmol de pirofosfato de tiamina en 40-60 ml de agua, y esta última solución se añade a la anterior. La mezcla se agita hasta que la síntesis se completa después de, aproximadamente, 6 horas. A continuación, la mezcla se filtra a través de un filtro Millipore de 45 µm. El producto se purifica mediante cromatografía instantánea con una fase móvil de metanol. Posteriormente, la solución se destila y se liofiliza. En una realización preferida de la presente invención, la reacción se produce a una temperatura en el intervalo de 25-60 °C.

**Ejemplo: síntesis de clorina e4 de sodio**

Método 1: se disolvieron 0,5 mmol (276 mg) de clorina e4 en 60 ml de metanol, y la solución se agitó lentamente durante 10 minutos a 40 °C. Se añadieron 15 ml de hidróxido de sodio (solución de agua 3 M) y se siguió agitando durante otras 6 horas a 60 °C. A continuación, la mezcla de la reacción se filtró a través de un filtro Millipore de 45 µm. El producto se purificó por cromatografía instantánea en una columna de gel de sílice seca usando una fase móvil de metanol. Posteriormente, la solución se redujo en volumen en un evaporador rotativo y el producto se aisló como polvo seco mediante liofilización con un rendimiento del 85 %.

El producto de sodio clorina e4 se caracterizó por una RMN de $^{1}H$ y $^{13}C$.

RMN de $^{1}H$ ($D_2O$) (ppm): 8,82 (1H), 8,64 (1H), 6,52 (1H), 6,35 (1H), 5,25 (1H), 5,12 (1H), 4,68 (2H), 4,09 (3H), 3,52 (3H), 2,87 (1H), 2,71 (2H), 2,59 (3H), 2,44 (2H), 2,06 (1H), 1,82 (3H), 0,99 (6H).

RMN de $^{13}C$ ($D_2O$) (ppm): 185,7 ($CO_2H$), 180,8 ($CO_2H$), 171,6 ($C_{quat}$=), 170,7 ($C_{quat}$=), 148,0 ($C_{quat}$=), 144,7 ($C_{quat}$=), 139,0 ($C_{quat}$=), 137,5 ($C_{quat}$=), 136,5 ($C_{quat}$=), 136,2 ($C_{quat}$=), 135,3 ($C_{quat}$=), 133,9 ($C_{quat}$=), 133,6 ($C_{quat}$=), 132,5 ($C_{quat}$=), 131,2 ($C_{quat}$=), 129,5 (CH=), 121,6 ($CH_2$=), 121,4 ($C_{quat}$=), 109,4 ($C_{quat}$=), 101,2 (CH=), 97,4 (CH=), 96,2 (CH=), 56,8 (CH), 50,9 (CH), 38,0 ($CH_2$), 34,5 ($CH_2$), 26,1 (Me), 21,7 (Me), 20,1 ($CH_2$), 18,7 (Me), 14,0 (Me), 12,6 (Me), 10,7 (Me).

Método 2: se disolvieron 0,5 mmol (276 mg) de clorina e4 en 60 ml de metanol, y la solución se agitó lentamente durante 10 minutos a 40 °C. Se añadieron 15 ml de hidróxido de sodio (solución de agua 3 M) y se siguió agitando durante otros 20 minutos. Por separado, se disolvieron 6 mmol (378 mg) de pirofosfato de tiamina en 50 ml de agua, y la solución se agitó a 60 °C. La solución de pirofosfato de tiamina se añadió a la solución de clorina e4, y la mezcla de reacción se agitó lentamente durante 6 horas a 60 °C. A continuación, la mezcla de la reacción se filtró a través de un filtro Millipore de 45 µm. El producto se purificó por cromatografía instantánea en una columna de gel de sílice seca usando una fase móvil de metanol. Posteriormente, la solución se redujo en volumen en un evaporador rotativo y el producto se aisló como polvo seco mediante liofilización con un rendimiento del 85 %.

El producto de clorina e4 de sodio se caracterizó por una RMN de $^{1}H$ y $^{13}C$. Se obtuvieron los mismos resultados que para el método 1.

**Ejemplo: estudios *in vitro***

Se realizaron los siguientes experimentos para estudiar los espectros de absorción y fluorescencia de la clorina e4 de sodio, los rendimientos cuánticos de la fluorescencia de la clorina e4 de sodio y la capacidad de fotosensibilización de la clorina e4 de sodio en tres sistemas: soluciones en etanol, agua pura y agua que contiene detergente sulfato de dodecil sodio (SDS).

*Mediciones de absorción y de fluorescencia*

Los espectros de absorción se registraron utilizando espectrofotómetros computarizados Hitachi 3400 (Japón) y SF-2000 (Rusia). Los espectros de fluorescencia se midieron con un espectrofluorímetro computarizado Perkin-Elmer MPF-44B. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 10 mm de ancho para las mediciones de absorción y fluorescencia. Se detectó fluorescencia en ángulo recto con el haz de excitación. El ancho de banda espectral del monocromador fue de 3 nm. Para evitar la reabsorción de fluorescencia por las moléculas de pigmento, se utilizaron soluciones diluidas de clorina e4 de sodio con una absorbancia a 403 nm que no excedió los 0,2 cm en la cubeta de 1 cm. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_F$) se determinaron utilizando como referencia soluciones de TPPS (m-tetrakis (p-sulfonatofenil) porfina) en etanol. Según la literatura, el rendimiento cuántico de fluorescencia más probable de TPPS en agua saturada de aire y etanol es igual a 0,08 (K. Kalyanasundaram y M. Neumann-Spallart, Photophysical and redox properties of water soluble porphyrins in aqueous media, J. Phys. Chem., 1982, 86, 5163-5169; y A. T. Gradyushko, A. N. Sevchenko, K. N. Solovyov y M. P. Tsvirko, Energetics of photophysical processes in chlorophyll-like molecules, Photochem. Photobiol., 1970, 11, 387-400). Se excitó la fluorescencia de las muestras con la luz monocromática correspondiente al máximo de las bandas de Soret: 415 nm para TPPS en etanol y 413 nm para TPPS en agua, y 403 nm para la clorina e4 de sodio en agua y etanol. El ancho de banda del monocromador fue de 3 nm. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_F$) se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\Phi_F = \Phi_{TPP} \cdot \frac{S_c \cdot (1-10^{-D_{TPP}})/(1-10^{-D_c})}{S_{TPP}}$$

donde $\mathbf{\Phi_{TPP}}$ es el rendimiento cuántico de la fluorescencia TPPS, $\mathbf{S_c}$ es el cuadrado bajo el espectro de fluorescencia de la clorina e4 de sodio, $\mathbf{S_{TPP}}$ es el cuadrado bajo el espectro de fluorescencia de TPPS, y $\mathbf{D_c}$ y $\mathbf{D_{TPP}}$ son la absorbancia (densidad óptica) de la clorina e4 de sodio y TPPS respectivamente en las longitudes de onda de excitación. Los resultados obtenidos se cotejaron utilizando unidades relativas de intensidad de la luz excitada en las longitudes de onda de excitación. Las intensidades de la luz monocromática se midieron utilizando un detector de silicio calibrado del Sistema de Medición de Potencia Óptica ThorLabs (Karlsfeld, Alemania).

*Detección de fosforescencia de oxígeno singlete*

La fosforescencia del oxígeno singlete se detectó mediante la medición de la fosforescencia infrarroja a 1270 nm, que corresponde a la transición de las moléculas de oxígeno del estado singlete al estado triplete. La fosforescencia se registró a temperatura ambiente con el espectrómetro de fosforescencia láser descrito en A. A. Krasnovsky Jr., Photodynamic action and singlet oxygen, Biofizika, 2004, 49, 305-321; y A. A. Krasnovsky Jr., Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases, In: Photodynamic therapy at the cellular level, ed. A. B. Uzdensky, Research Singpost, Kerala (India), 2007, 17-62. Para la excitación se emplearon pulsos de nanosegundos de radiación de 511 nm de un láser de vapor de cobre (Troitzk, Instituto de Física de la Academia de Ciencias de Rusia). La radiación láser pasó adicionalmente a través de un filtro de luz verde SZS-22 (4 mm), que transmitía luz láser y cortaba la radiación láser IR causada por el calentamiento del tubo láser. La duración del pulso fue de 20 ns, la energía del pulso varió de 18 a 40 µJ y la frecuencia de repetición del pulso fue de 12 kHz. La luz láser se colimó en la superficie de una cubeta rectangular de cuarzo de 1 cm. El diámetro del punto iluminado en la superficie de la celda era de 5 mm. Para las mediciones cinéticas se utilizó otro espectrómetro sin monocromador. En este caso, la fosforescencia resultante del ángulo recto del haz de excitación se concentró en el fotocátodo de un fotomultiplicador S-1 enfriado (FEU-112) a través de un filtro de luz infrarroja de corte y un filtro de interferencia con el máximo de transmisión a 1270 nm. Los espectros de fosforescencia se midieron con un monocromador de rejilla de alto rendimiento MS-80. En este caso, la fosforescencia se concentró en la ranura de entrada de este monocromador. El ancho de banda del monocromador se correspondía con un intervalo espectral de 20 nm. La luz monocromática se concentró en el fotocátodo de un fotomultiplicador S-1 enfriado (FEU-83). La señal del fotomultiplicador se registró utilizando un recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo y se promedió en muchos pulsos láser. En la mayoría de los experimentos, el tiempo de un canal fue igual a 81 ns. Cuando el blanqueo del pigmento alcanzó el 10 %, la solución se reemplazó por una nueva y se continuó la medición. Como la clorina e4 de sodio se blanqueó con bastante rapidez, las soluciones se cambiaron después de cada irradiación de 60-180 s. Se obtuvieron curvas fosforescentes razonables después de 10-20 minutos de acumulación de señal y, por lo tanto, las muestras se cambiaron muchas veces. Como se ha descrito anteriormente (D. A. Butorina, A. A. Krasnovsky Jr. y A. V. Priezzev, Investigation of the kinetic parameters of singlet molecular oxygen in aqueous porphyrin solutions, Influence of detergents and the quencher sodium azide, Biofizika, 2003, 48, 189-196; A. A. Krasnovsky Jr., Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2008, 196, 210-218; y N. Kuznetsova, D. Makarov, O. Yuzhakova, A. Strizhakov, Y. Roumbal, L. Ulanova, A. Krasnovsky y O. Kaliya, Photophysical properties and photodynamic activity of octacationic oxotitanium (IV) phthalocyanines, Photochemical Photobiological Sciences, 2009, 8, 1724-1733), para el análisis informático se utilizó la siguiente ecuación biexponencial:

$$I(t) = I_0 \cdot [\exp(-k_{decay} \cdot t) - \exp(-k_{rise} \cdot t)] + n$$

donde **$k_{decay}$** y **$k_{rise}$** son las constantes de velocidad de las fases de descomposición y ascenso de las curvas de fosforescencia después de un pulso láser, **n** es el ruido apagado del fotomultiplicador, **$I_0$** es la intensidad de la fosforescencia en el tiempo cero, e **I(t)** es la intensidad de la fosforescencia en el tiempo **t.**Para reducir la contribución de la luminiscencia del pigmento en la cubeta de cuarzo, que se observó poco después de los pulsos láser, se tomaron lecturas a partir de 400 ns después de los pulsos láser en etanol y 1 µs en agua. Además, se midieron también la fosforescencia y las trazas cinéticas de las soluciones de clorina e4 de sodio de control que contienen una alta concentración de azida sódica, que apagaron completamente el oxígeno singlete. Este procedimiento reveló un fuerte componente de descomposición rápida de la luminiscencia retardada en las soluciones de sodio con clorina e4, que la azida de sodio no apagaba tan fácilmente. Las curvas luminiscentes obtenidas de las soluciones de control se aproximaron mediante exponenciales y se restaron de las trazas cinéticas experimentales obtenidas para las soluciones de clorina e4 de sodio en las que no se añadió azida de sodio.

Para las mediciones, se utilizó el software Origen 6.0. Este software funciona utilizando el método de aproximación de mínimos cuadrados. El origen permitió la variación de los parámetros $I_0$, $k_{decay}$, $k_{rise}$ y n para obtener sus valores correspondientes al coeficiente mínimo $x^2$. En las soluciones de clorina e4 de sodio, las mediciones siempre produjeron $k_{decay}$, que era algo más reducida que en las soluciones de referencia de TPPS en los mismos disolventes. En los disolventes utilizados en este estudio, el tiempo de vida del oxígeno singlete, que es responsable de $k_{decay}$, es independiente de los pigmentos. Por lo tanto, este resultado indica que «el control azida» no permite eliminar completamente el componente de rápida descomposición de las curvas de descomposición general. Es posible que la luminiscencia responsable de este componente sea parcialmente apagada por la azida sódica. A fin de eliminar el error causado por este efecto, para las mediciones finales de las curvas fosforescentes en soluciones de clorina e4 de sodio, se utilizaron $k_{decay}$ fijos obtenidos en las soluciones TPPS. En este caso, como indicó Origin, el coeficiente de correlación $R^2$ no fue inferior al 98 % y el error de determinación de $k_{rise}$ fue inferior al ± 5 % en todos los disolventes. Los rendimientos cuánticos ($\Phi_\Delta$) de la fotogeneración de oxígeno singlete por clorina e4 de sodio se determinaron a partir de la comparación de las intensidades globales de fosforescencia de oxígeno singlete en las soluciones de clorina e4 de sodio y las soluciones de referencia de TPPS en los mismos solventes. Según la bibliografía, los valores más probables de los rendimientos cuánticos de la fotogeneración de oxígeno singlete por TPPS son 0,6 en agua y 0,7 en etanol y detergente que contiene agua (F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, Quantum yields of the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet states of molecular oxygen, J. Phys. Chem. Ref. Data, 1993, 22 (2), 113-262; y C. Tanielian, C. Wolf y M. Esch, Singlet oxygen production in water: Aggregation and charge transfer effects, J. Phys. Chem., 1996, 100, 6555-6560). La intensidad general de la fosforescencia se calculó integrando las trazas cinéticas de la fosforescencia. La absorbancia de las soluciones de pigmentos a 511 nm era normalmente de unos 0,1-0,2 en una cubeta de 5 mm. Esto correspondía a una concentración de pigmento igual a unos 20 µM.

*Detección de oxígeno singlete utilizando conjugados químicos*

El segundo método de detección de oxígeno singlete se basó en la oxigenación fotosensible del conjugado de oxígeno singlete 1,3-difenilisobenzofurano (DPIBF) (Acros Organics, Reino Unido). El DPIBF se une químicamente a dos oxígenos singlete ($^1O_2$) (figura 3). Este método se aplicó a las soluciones de clorina e4 de sodio en etanol. La mayor banda de absorción del DPIBF se encuentra a 414-415 nm. Se sabe que el coeficiente de absorción molar en este máximo, $\varepsilon_{DPIBF}$, es de 23500 $M^{-1}cm^{-1}$. Las soluciones probadas se irradiaron con la luz monocromática de una lámpara de xenón utilizando el sistema de excitación del espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-44B, correspondiendo el ancho espectral del ancho de banda del monocromador a 5 nm. La energía radiante se midió utilizando el detector calibrado ThorLabs PM-100 (Alemania). Los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ($\Phi_\Delta$) se calcularon de acuerdo con la ecuación:

$$\Phi_\Delta = \frac{\eta_P \cdot \frac{\Delta D_{DPIBF}}{\varepsilon_{DPIBF} \cdot l \cdot t_{irr}} \cdot V \cdot N_A}{\frac{I_{irr}}{h\nu(1-T)}}$$

donde **$\Delta D_{DPIBF}$** es la reducción de la densidad óptica del DPIBF a 414 nm durante el tiempo de irradiación, **$\varepsilon_{DPIBF}$** es el coeficiente de absorción molar del DPIBF a 414 nm, **1** es la trayectoria óptica igual a 1 cm, **V** es el volumen de las soluciones probadas (normalmente 1,2-1,5 ml), **$N_A$** es la constante de Avogadro, **$I_{irr}$** es la potencia radiante (en W) de la luz monocromática del sistema de excitación del espectrofluorímetro Perkin-Elmer que incluye la lámpara de xenón y el monocromador de excitación con el ancho de banda correspondiente al intervalo de longitud de onda de 5 nm, **hv**

es la energía de un fotón en J, **(1-T)** es el factor de absorción de las soluciones probadas, $t_{irr}$ es el tiempo de irradiación en segundos, y $\eta_P$ es la fracción de moléculas de $^1O_2$ que es capturada por el DPIBF en las soluciones estudiadas. Este parámetro se calculó utilizando ecuaciones cinéticas conocidas para el consumo de oxígeno singlete por los conjugados químicos y la constante de la velocidad de reacción del oxígeno singlete con DPIBF igual a $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ (véase A. A. Krasnovsky Jr., Y. V. Roumbal y A. A. Strizhakov, Rates of $^1O_2$ production upon direct excitation of molecular oxygen by 1270 nm laser radiation in air-saturated alcohols and micellar aqueous dispersions, Chem. Phys. Lett., 2008, 458, 195-199; y referencias en el mismo).

*Resultados*

Los espectros de absorción de la clorina e4 de sodio en etanol, agua pura y agua que contiene detergente de dodecil sulfato de sodio (SDS) se muestran en las figuras 4-6. Las principales bandas de absorción se enumeran en la tabla 1. Las más fuertes son la banda de Soret a 403 nm y la banda roja a 654-662 nm. El análisis de los espectros de absorción sugiere que la clorina e4 de sodio era mayormente monomérica en todos los disolventes. En el agua que no tenía detergente, el máximo de absorción del rojo se desplazó ligeramente a la región de longitudes de onda más cortas (de 662 a 654 nm) y se observó un hombro débil a unos 665-670 nm. Además, la absorbancia observada en la región del verde fue mayor en comparación con la del etanol y las soluciones que contienen detergente. Estos datos indican que la solución en agua sin detergente puede contener moléculas agregadas (diméricas y oligoméricas) de clorina e4 de sodio, que se desagregan en presencia del detergente.

| **Disolventes** | **Absorción máxima (nm ± 1 nm)** | **Fluorescencia máxima (nm ± 1 nm)** |
|---|---|---|
| Etanol | 403, 504, 606, 662 | 666, 720 |
| Agua | 402, 504, 602, 654 | 657, 710 |
| Agua + SDS 0,2 M | 403, 504, 608, 662 | 665, 720 |

Tabla 1: posiciones de las principales bandas de absorción y fluorescencia de las soluciones de clorina e4 de sodio

Las mediciones de fluorescencia confirmaron esta suposición (figuras 7-9). Los espectros de fluorescencia eran bastante similares en el etanol y en los SDS que contienen agua. La figura 10 muestra el espectro de excitación de la fluorescencia de la clorina e4 de sodio en etanol. Se observa que prácticamente coincide con el espectro de absorción de este pigmento. Esta observación indica que la fluorescencia pertenece a la clorina e4 de sodio. En el agua sin SDS, el máximo de fluorescencia se desplazó a longitudes de onda más cortas y un hombro, a unos 710 nm, se hizo notablemente más fuerte que en el etanol. El rendimiento cuántico de la fluorescencia fue más alto en el etanol, ligeramente inferior en los SDS que contienen agua y mucho más bajo en el agua sin SDS. Estos datos indican que la agregación de la clorina e4 de sodio se produce en el agua. Sin embargo, el rendimiento cuántico de la fluorescencia de la clorina e4 de sodio seguía siendo alto en el agua sin SDS, lo que demostraba que una cantidad apreciable de moléculas monoméricas de clorina e4 de sodio están presentes en soluciones acuosas sin detergente. Estos experimentos muestran que la clorina e4 de sodio es un pigmento altamente fluorescente y emite una gran cantidad de fotones. Por lo tanto, la clorina e4 de sodio se puede utilizar eficazmente como pigmento fluorescente para el diagnóstico fotodinámico.

La generación de oxígeno singlete se estudió en soluciones de etanol utilizando tanto el conjugado químico de oxígeno singlete DPIBF como la medición de la fosforescencia fotosensible de la clorina e4 de sodio del oxígeno singlete a 1270 nm. La figura 11 ilustra el experimento con DPIBF. El máximo de absorción de DPIBF se encuentra en 420 nm. Se observa en la figura 11 que la irradiación de una solución de etanol que contiene tanto la clorina e4 de sodio como el DPIBF por la luz roja (660 nm), la cual se absorbe por la clorina e4 de sodio, pero no por el DPIBF, provocó el blanqueo del DPIBF máximo a 420 nm. Este efecto es el resultado de la reacción del DPIBF con el oxígeno singlete, que se forma al irradiar la clorina e4 de sodio. Se demostró que el rendimiento cuántico de la generación de oxígeno singlete obtenido en este experimento era de 0,68 ± 0,05 en etanol. Las trazas cinéticas de la fosforescencia fotosensible de la clorina e4 de sodio del oxígeno singlete después de los pulsos láser se muestran en las figuras 12-14. La tabla 2 resume los parámetros cinéticos de las curvas de fosforescencia. El tiempo de subida refleja la tasa de generación de oxígeno singlete por moléculas de pigmento triplete. Se corresponde con el tiempo de vida del estado triplete del pigmento en una solución de pigmento saturada de aire. En el etanol, el tiempo de subida era igual a 300 ns. El tiempo de descomposición corresponde a la vida útil del oxígeno singlete en etanol (13,5 µs). El rendimiento cuántico del oxígeno singlete en etanol determinado mediante estas curvas cinéticas fue igual a 0,63 ± 0,05, lo que se aproxima al obtenido mediante el DPIBF. Así pues, ambos métodos proporcionaron resultados similares. La tabla 2 indica que la clorina e4 de sodio es un potente fotosensibilizante de la formación de oxígeno singlete tanto en sistemas alcohólicos como acuosos, aunque en el agua sin SDS la actividad fotosensibilizante fue menor que en etanol. Este

efecto puede haberse debido a la agregación parcial de las moléculas de pigmento, que es sabido que conduce a la pérdida de la actividad fotosensibilizante. Estos experimentos muestran que la clorina e4 de sodio tiene una fuerte capacidad fotosensibilizante en disolvente orgánico (alcohol) y en medio acuoso, con un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete. Por lo tanto, la clorina e4 de sodio puede utilizarse eficientemente en la terapia fotodinámica.

| **Disolventes** | **Tiempo de subida, µs** | **Tiempo de descomposición, µs** |
|---|---|---|
| Etanol | 0,3 ± 0,3 | 13,5 ± 0,3 |
| Agua | 1,8 ± 0,4 | 3,3 ± 0,3 |
| Agua + SDS 0,2 M | 1,2 ± 0,3 | 3,85 ± 0,3 |

Tabla 2: parámetros cinéticos de la fosforescencia de oxígeno singlete fotosensible en soluciones de clorina e4 de sodio saturadas de aire

*Conclusión*

La clorina e4 de sodio muestra una fuerte fluorescencia y una gran capacidad fotosensible en un disolvente orgánico (alcohol) y en un medio acuoso. En el agua, la actividad fotosensible de la clorina e4 de sodio disminuye debido a la agregación de las moléculas de pigmento, pero sigue siendo alta. La adición de detergente causa desagregación y un aumento tanto de la fluorescencia como de la capacidad fotosensible. Esto demuestra que clorina e4 de sodio está activa en ambos medios hidrófilos y acuosos. Por lo tanto, este pigmento es prometedor para su aplicación en medicina fotodinámica.

**Ejemplo: estudios *in vivo***

Los siguientes pacientes de cáncer se trataron eficazmente con clorina e4 de sodio. La mayoría de los pacientes eran pacientes con cáncer metastásico en fase avanzada que anteriormente se habían sometido sin éxito a las terapias de tratamiento tradicionales. La mayoría de los pacientes no gozaban de buena salud antes del tratamiento con clorina e4 de sodio.

*Ejemplo 1*

Se trató de forma eficaz a una paciente de 70 años con cáncer de mama dúctil invasivo y metástasis en los ganglios linfáticos de la axila derecha. Antes del tratamiento, se observó una gran masa cancerosa en la mama derecha y una pequeña masa cancerosa en la axila derecha. El tratamiento consistió en tres ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Después del tratamiento, el análisis de ultrasonido Doppler mostró que la gran masa cancerosa en la mama no mostraba casi ninguna vascularización, ni vasos sanguíneos que condujeran a ella. La masa cancerosa no se había reducido en tamaño; sin embargo, el contorno de la masa era sólido y liso, lo que indicaba un tumor inactivo y sin crecimiento. La masa cancerosa de los ganglios linfáticos más pequeños tampoco mostraba casi ninguna vascularidad y su tamaño se había reducido de 1,9 cm a 1 cm.

Posteriormente, se trató a la paciente con dos ciclos adicionales. De nuevo, para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm. Por otra parte, se realizó un tratamiento de luz intersticial empleando una aguja fina en la mama con un láser de fibra óptica que tenía una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

El análisis por ultrasonido Doppler obtenido después del cuarto ciclo de tratamiento mostró que la gran masa de cáncer en la mama se había reducido en tamaño en, aproximadamente, un 25 %. Las tomografías PET/TC obtenidas después del quinto y último ciclo de tratamiento mostraron una respuesta completa en la mama y los ganglios linfáticos. Después de cada ciclo de tratamiento, se observó una respuesta inflamatoria en el sitio del tumor de la mama, que es típica ya que el sistema inmunológico ataca el tumor. Hacia el final del segundo curso de tratamiento, la paciente experimentó una sensación de ardor en el lugar del tumor en su mama. La paciente se encuentra actualmente con vida y buena salud, dos años y tres meses después de haber comenzado su tratamiento y cinco meses después de haber completado su tratamiento.

*Ejemplo 2*

Se trató de forma eficaz a un paciente varón de 62 años que presentaba un carcinoma nasofaríngeo con extensión a un ganglio linfático del cuello izquierdo. El tratamiento consistió en tres ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Inmediatamente después del tratamiento, una biopsia del ganglio linfático tratado del cuello mostró un ganglio linfático benigno o no canceroso, y no se detectaron células cancerosas. Esto se confirmó mediante otra biopsia diez meses después del tratamiento. Una comparación de las tomografías computarizadas, obtenidas un mes antes y diez meses después del tratamiento, mostró que no había propagación de los tumores y que el tamaño de los tumores se había reducido.

Posteriormente, se trató al paciente con un ciclo adicional. De nuevo, para el curso del tratamiento, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las imágenes de ultrasonido y las biopsias obtenidas después del último tratamiento mostraron una respuesta completa. El paciente no sufrió ningún efecto secundario, pero se observó una respuesta inflamatoria después de cada tratamiento, lo cual es característico debido a que el sistema inmunológico ataca el tumor. Dos años y tres meses después de haber comenzado su tratamiento y cinco meses después de haber completado su tratamiento, se encuentra con vida y buena salud.

*Ejemplo 3*

Se trató de forma eficaz a un paciente varón de 71 años que padecía una enfermedad renal metastásica avanzada con metástasis en la vesícula biliar, el hígado y el pulmón. El tratamiento consistió en tres ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC, obtenidas justo antes del tratamiento y dos, tres, cinco y 15 meses después del tratamiento, mostraron que, en todo el cuerpo del paciente, algunos tumores desaparecieron por completo y los tumores restantes se redujeron en tamaño. No se observó metástasis adicional.

Posteriormente, se trató al paciente con dos ciclos adicionales. De nuevo, para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm. Por otra parte, se realizó un tratamiento de luz intersticial empleando una aguja fina en el hígado y el pulmón con un láser de fibra óptica que tenía una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC mostraron nuevamente una buena respuesta al tratamiento. El paciente no sufrió ningún efecto secundario debido al tratamiento. Por desgracia, el paciente falleció recientemente. Con anterioridad a los cinco cursos de tratamiento, se trataba de un paciente de cáncer en etapa avanzada con una esperanza de vida de solo seis meses, pero se las arregló para llevar una vida activa durante dos años y cuatro meses.

*Ejemplo 4*

Se trató con eficacia a una paciente de 20 años de edad que padecía un linfoma de Hodgkin en fase IVB con metástasis en el hígado, sistema linfático, bazo, pulmón y huesos. El tratamiento consistió en tres ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías computarizadas mostraron que, en las áreas del cuerpo de la paciente que fueron tratadas con láser y luz LED hasta ese momento, algunos tumores desaparecieron por completo y otros se redujeron en tamaño.

Posteriormente, se trató a la paciente con dos ciclos adicionales. De nuevo, para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC mostraron nuevamente una buena respuesta al tratamiento. Por desgracia, la paciente falleció recientemente. Con anterioridad a los cinco ciclos de tratamiento, se encontraba en muy mal estado de salud, y sufría de una pérdida de peso y un letargo extremos, estaba demasiado débil para caminar y requería un alivio del dolor constante. Antes del tratamiento, su esperanza de vida era de solo dos semanas, pero sobrevivió durante dos años y dos meses, al menos una parte de su vida activa.

*Ejemplo 5*

Se trató con eficacia a un paciente varón de 82 años con cáncer de pulmón. El tratamiento consistió en un ciclo de cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio administrada por vía oral durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Tres meses después del tratamiento, el paciente tosió sangre y tejido tumoral. Una tomografía computarizada mostró una descomposición del tumor.

*Ejemplo 6*

Se trató con eficacia a un paciente varón de 46 años con cáncer de pulmón. El tratamiento consistió en tres ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Una tomografía computarizada, obtenida inmediatamente después del último tratamiento, mostró una recuperación completa del cáncer de pulmón.

*Ejemplo 7*

Se trató de forma eficaz a una paciente de 54 años que presentaba un cáncer de páncreas avanzado con metástasis en el hígado. Antes de recibir el tratamiento, la paciente tenía mala salud en general y sufría una pérdida de peso extrema, dolor y otros síntomas típicos del cáncer de páncreas avanzado. El tratamiento consistió en tres ciclos. En cada ciclo, se administraron cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio por vía oral durante el transcurso de ocho días. Aproximadamente 24 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC del páncreas, obtenidas antes y después del tratamiento, mostraron mejoras y una buena respuesta al tratamiento en el área pancreática. La paciente no tuvo ninguna reacción fotosensible y sufrió menos dolor. Desafortunadamente, el bloqueo intestinal y la malnutrición causaron la muerte de la paciente.

*Ejemplo 8*

Se trató con eficacia a una paciente de 67 años que padecía cáncer de pulmón de células no pequeñas con metástasis en los nódulos linfáticos y los huesos. El tratamiento consistió en dos ciclos. En cada ciclo, se administraron cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio por vía oral durante el transcurso de ocho días. Aproximadamente 24 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC de los pulmones, obtenidas antes y después del tratamiento, mostraron una notable respuesta al tratamiento, con muchos tumores en proceso de desaparición y los tumores restantes mostrando una actividad metabólica nula o baja después del tratamiento. La paciente no sufrió ningún efecto secundario y su salud mejoró. La paciente actualmente se encuentra con vida y buena salud, 10 meses después de haber comenzado su tratamiento y siete meses después de haberlo completado.

*Ejemplo 9*

Se trató de forma eficaz a una paciente de 54 años con cáncer de mama en la mama derecha. El tratamiento consistió en tres ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las mamografías, ultrasonidos y tomografías de las mamas, obtenidas antes y después del tratamiento, mostraron

una respuesta completa. La paciente no sufrió ningún efecto secundario. La paciente se encuentra actualmente con vida y buena salud, un año y siete meses después de haber comenzado su tratamiento y 10 meses después de haber completado su tratamiento.

*Ejemplo 10*

Se trató de forma eficaz a un paciente varón de 33 años que padecía un carcinoma nasofaríngeo con metástasis en los ganglios linfáticos del cuello izquierdo y en el pulmón. El tratamiento consistió en cinco ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm. Por otra parte, se realizó un tratamiento de luz intersticial empleando una aguja fina en el hígado y el pulmón con un láser de fibra óptica que tenía una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC mostraron una muy buena respuesta al tratamiento. El paciente se encuentra actualmente con vida y buena salud, un año y cinco meses después de haber iniciado su tratamiento y dos meses después de haberlo completado.

*Ejemplo 11*

Se trató de forma eficaz a una paciente de 44 años que padecía cáncer de pulmón con metástasis en los ganglios linfáticos y el hueso sacro. La paciente fue intervenida para extirpar el tumor primario del pulmón y completó cuatro ciclos de quimioterapia. Las tomografías PET/TC posteriores mostraron tumores en los nódulos linfáticos del cuello, los nódulos linfáticos de la axila izquierda y el hueso sacro. El tratamiento consistió en cinco ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató a la paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm. Por otra parte, en dos de los ciclos de tratamiento, se realizó un tratamiento con luz intersticial empleando una aguja fina en el hueso sacro con un láser de fibra óptica con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm. Asimismo, se administró la terapia de crecimiento del hueso del mesotelio en los dos últimos ciclos.

Las tomografías PET/TC mostraron una respuesta completa, sin tumores activos en el cuerpo de la paciente. La paciente se encuentra actualmente con vida y buena salud, 10 meses después de haber comenzado su tratamiento y cuatro meses después de haber completado su tratamiento.

*Ejemplo 12*

Se trató de forma eficaz a un paciente varón de 52 años que padecía cáncer cerebral con metástasis en el pulmón y en los nódulos linfáticos. Una resonancia magnética mostró una gran masa tumoral en el cerebro. El paciente fue intervenido para eliminar el tumor que presionaba su cerebro, pero no recibió ninguna quimioterapia o radioterapia. Las tomografías PET/TC posteriores mostraron tumores activos en el cerebro con metástasis en ambos pulmones y en los ganglios linfáticos de las regiones cervical derecha y supraclavicular derecha. El paciente experimentó ocasionales ataques epilépticos y fuertes dolores de cabeza. El tratamiento consistió en dos ciclos. Para cada ciclo, se administraron por vía oral cinco dosis de 62,5-187,5 mg de clorina e4 de sodio durante el transcurso de ocho días. 24-48 horas después de cada dosis oral de clorina e4 de sodio, se trató al paciente con láser y luz LED con una longitud de onda de 660 nm y 760 nm.

Las tomografías PET/TC mostraron una respuesta completa en los pulmones y ninguna actividad metabólica en el área del tumor cerebral. Los nódulos linfáticos aún no estaban limpios, y el paciente se someterá a un tercer ciclo.

**Ejemplo: ensayo clínico con pacientes que padecen cáncer de pulmón avanzado de células no pequeñas**

A través del diagnóstico de patología o citología, se seleccionaron 66 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado y se dividieron al azar en dos grupos. El grupo A tenía 32 pacientes que fueron tratados con clorina e4 de sodio. El grupo B tenía 34 pacientes que fueron tratados tanto con quimioterapia como con radioterapia.

En el grupo A, se administró clorina e4 de sodio en una dosis de 2 mg por kilogramo de peso corporal, dos tercios de la cual se administró por inhalación y un tercio por vía oral. Una vez determinado el objetivo o los objetivos de la irradiación, se introdujo una fibra óptica para el tratamiento con láser en el tumor o los tumores del pulmón mediante un procedimiento intersticial. La intensidad de la luz de la irradiación fue de 200 $J/cm^2$, la potencia de irradiación fue de 1000 mW, y la irradiación duró entre ocho y diez minutos. La irradiación con láser en el tumor era de dos a cinco centímetros de profundidad. La irradiación se realizó etapa por etapa (tratamiento de subpárrafo) según el tamaño del tumor o se realizó repetidamente.

En el grupo B, para la radioterapia, un campo de irradiación de radioterapia de rayos X de 15 MV cubrió la(s) lesión(es) de tumor(es) pulmonar(es) primario(s) y la zona de drenaje linfático mediastínico, con una dosis de 65-70 Gy, administrada cada primer día de una semana de radioterapia. Para la quimioterapia, se administraron 20 mg de cisplatino por vía intravenosa.

Las tasas de supervivencia de uno y dos años para los grupos A y B fueron de 93,75 %, 70,60 % y 68,75, 32,35 % respectivamente; la diferencia fue estadísticamente significativa (P<0,05). Las tasas de remisión completa y parcial combinadas para los grupos A y B fueron 56,20 % y 21,30 %; la tasa del grupo A fue significativamente superior a la del grupo B, y la diferencia fue estadísticamente significativa (P<0,05).

**Ejemplo: estudio con ratones que presentan un sarcoma subcutáneo S180**

En este experimento se observaron los efectos de la terapia fotodinámica mediada por tres fotosensibilizadores diferentes, en concreto duteroporfirina, clorina e4 de sodio y 5-ALA, en ratones con sarcoma S180. La duteroporfirina y el 5-ALA son derivados de porfirina.

Los 40 ratones Kunming con sarcoma subcutáneo S180 bien desarrollado se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos: (A) grupo de duteroporfirina (10 mg/kg), (B) grupo de clorina e4 de sodio (20 mg/kg), (C) grupo de 5-ALA (100 mg/kg) y (D) grupo de control en blanco. Se sometió a los ratones de los grupos A y B a una irradiación 8-10 horas después de la inyección de los fotosensibilizadores en la vena de la cola, mientras que se sometió a los ratones del grupo C a una irradiación 3 horas después de la inyección del fotosensibilizador en la vena de la cola. Se utilizó un láser con una longitud de onda de 630 nm para los grupos A y C, mientras que para el grupo B se utilizó un láser de doble frecuencia con longitudes de onda de 660 nm y 760 nm. Se irradiaron verticalmente las zonas tumorales locales, con el diámetro de los puntos de láser siendo de 1,2-1,5 cm. Se cubrió todo el tumor y 3-5 mm de tejido normal alrededor del tumor con el láser. Los láseres se aplicaron a los grupos A, B y C durante 20 minutos, con una densidad de potencia de 150 $mW/cm^2$ y una densidad de energía de 180 $J/cm^2$. Los ratones del grupo de control D no se sometieron a irradiación.

Después de los tratamientos, se observaron cambios en el aspecto del tumor. Se observaron escaras negras en los grupos A y B después de los tratamientos, mientras que las escaras observadas en el grupo C eran más delgadas y de color rojo parduzco. Las pieles y el pelaje se recuperaron completamente en todos los tres grupos de tratamiento después de que las escaras se hubieran caído; el grupo C fue el más rápido en la reparación de la piel.

A partir de las curvas de crecimiento de los tumores se pudo observar que no había diferencias obvias en los tamaños de los tumores entre los grupos de tratamiento A, B y C y el grupo de control D seis días después de los tratamientos. Esto probablemente se debió al edema y a las escaras causadas por el tratamiento que se produjo en los lugares de irradiación. La observación de los tamaños de los tumores 21 días después de los tratamientos indicó que las diferencias medias de volumen entre todos los grupos de tratamiento A, B y C y el grupo de control D eran estadísticamente significativas (P<0,05), siendo el volumen medio significativamente inferior, desde el punto de vista estadístico, en los grupos de tratamiento A, B y C que en el grupo de control D. La diferencia media de volumen entre el grupo B y el grupo C también fue estadísticamente significativa (P<0,05), siendo el volumen medio significativamente inferior, desde el punto de vista estadístico, en el grupo B que en el grupo C.

Por otra parte, todos los grupos de tratamiento mostraron una inhibición tumoral estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control D, y el grupo B mostró un efecto terapéutico significativamente superior desde el punto de vista estadístico al del grupo C (P<0,05). Las tasas de inhibición tumoral de los grupos A, B y C fueron, respectivamente, del 62,5 %, 75,4 % y 37,2 %.

Según el análisis de las células tumorales apoptóticas y necróticas del FCM 24 horas después de los tratamientos, las proporciones de células tumorales apoptóticas y necróticas fueron mucho mayores y las células vivas fueron obviamente menores en todos los grupos de tratamiento A, B y C que en el grupo de control D, lo que indica que todos los grupos de tratamiento mostraron efectos claros en la eliminación de las células cancerosas.

Se observaron las secciones patológicas de los tejidos tumorales mediante la tinción de HE. Los cambios patológicos de los tejidos tumorales en los grupos de tratamiento A, B y C 24 horas después del tratamiento incluyeron: una amplia gama de necrosis tumoral, disrupción vascular tumoral e infiltración de neutrófilos.

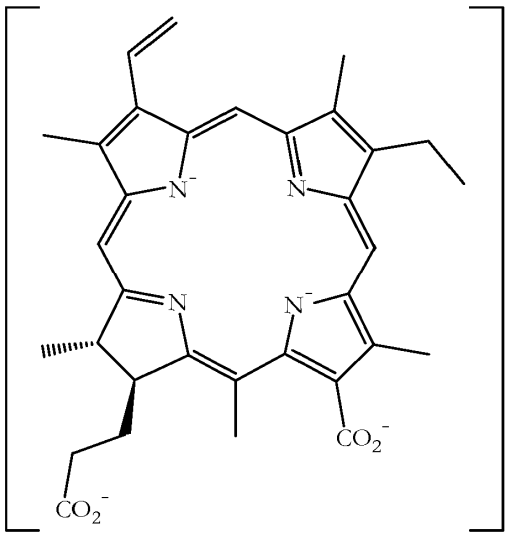
Los mecanismos para destruir las células tumorales mediante terapia fotodinámica incluyen destruir directamente las células tumorales, dañar los vasos sanguíneos del tumor y estimular el sistema inmunológico de los pacientes. Estos factores pueden beneficiarse entre sí y todos ellos son mecanismos de control tumoral a largo plazo.

En resumen, este estudio verificó que la terapia fotodinámica con duteroporfirina, clorina e4 de sodio y 5-ALA puede inhibir el crecimiento del sarcoma S180 en ratones. La clorina e4 de sodio tuvo un efecto terapéutico similar o ligeramente mejor que la duteroporfirina, y un efecto terapéutico significativo desde el punto de vista estadístico que el 5-ALA.

Se entenderá que la presente invención se ha descrito anteriormente únicamente a modo de ejemplo.

**REIVINDICACIONES**

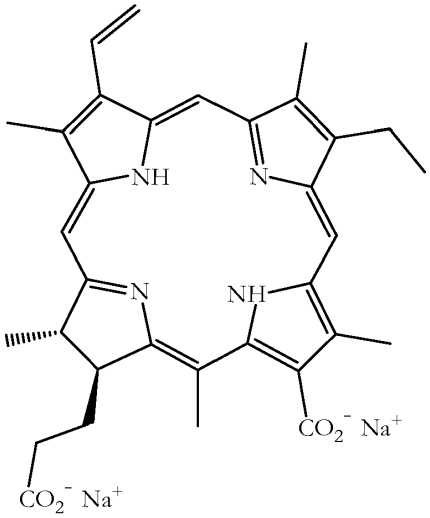
1. Clorina e4 de sodio, que tiene la estructura:



$[H^+]_2$ $[Na^+]_2$

.

2. La clorina e4 de sodio de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



3. Un proceso de preparación de la clorina e4 de sodio de la reivindicación 1 o 2, que comprende el paso de hacer reaccionar clorina e4 con un compuesto de sodio.

4. El proceso de la reivindicación 3, donde el compuesto de sodio es hidróxido de sodio.

5. El proceso de la reivindicación 3 o 4, donde se hace reaccionar clorina e4 con el compuesto de sodio en presencia de una base, preferiblemente una base amina, preferiblemente pirofosfato de tiamina.

6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde clorina e4, el compuesto de sodio y la base opcional se utilizan en una proporción molar de 0,15-1 : 45-60 : 0-12.

7. La clorina e4 de sodio de la reivindicación 1 o 2, para su uso en medicina.

8. La clorina e4 de sodio de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 7, para su uso en terapia fotodinámica o terapia citoluminiscente.

9. La clorina e4 de sodio de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 7 u 8, para su uso en el tratamiento de:

(i) una enfermedad **caracterizada por** hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; y/o
(ii) un tumor benigno o maligno; y/o
(iii) cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer de cabeza y cuello; cáncer oral o de boca; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas.

10. La clorina e4 de sodio de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 7, para su uso en diagnóstico fotodinámico.

11. La clorina e4 de sodio para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la clorina e4 de sodio se adapta para la administración previa a la administración de la irradiación, preferiblemente donde la irradiación es radiación electromagnética con una longitud de onda en el intervalo de 500 nm a 1000 nm.

12. Una composición farmacéutica que comprende la clorina e4 de sodio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o 7 a 11 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en terapia fotodinámica o terapia citoluminiscente.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 o 13, para su uso en el tratamiento de:
(i) una enfermedad **caracterizada por** hiperproliferación celular benigna o maligna o por zonas de neovascularización; y/o
(ii) un tumor benigno o maligno; y/o
(iii) cáncer temprano; displasia cervical; sarcoma de tejidos blandos; un tumor de células germinales; retinoblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; cáncer de cabeza y cuello; cáncer oral o de boca; o cáncer de la sangre, próstata, cuello uterino, útero, vagina u otros anexos femeninos, mama, nasofaringe, tráquea, laringe, bronquios, bronquiolos, pulmón, órganos huecos, esófago, estómago, conductos biliares, intestino, colon, colorrecto, recto, vejiga, uréter, riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, cerebro, sistema linfático, huesos, piel o páncreas.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en diagnóstico fotodinámico.

16. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde la composición farmacéutica se adapta para la administración previa a la administración de la irradiación, preferiblemente donde la irradiación es radiación electromagnética con una longitud de onda en el intervalo de 500 nm a 1000 nm.

17. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde la composición farmacéutica se encuentra en una forma adecuada para la administración oral, parenteral (incluidas intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intratraqueal, intraperitoneal, intraarticular, intraabdominal, intracraneal y epidural), transdérmica, por vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal o tópica (incluidas bucales, mucosas y sublinguales), preferiblemente donde la composición farmacéutica se encuentra en una forma adecuada para la administración oral o parenteral.

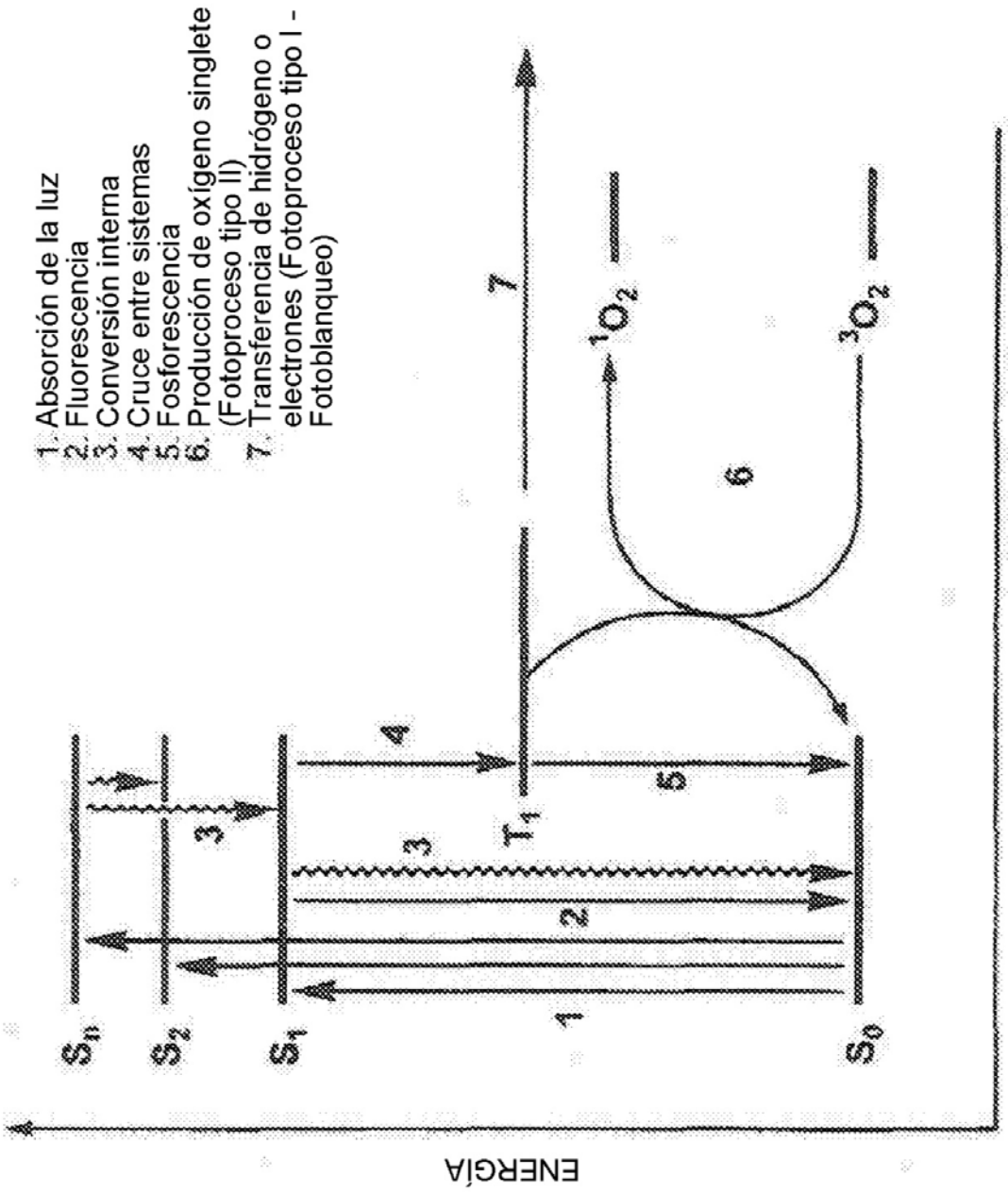

1. Absorción de la luz
2. Fluorescencia
3. Conversión interna
4. Cruce entre sistemas
5. Fosforescencia
6. Producción de oxígeno singlete (Fotoproceso tipo II)
7. Transferencia de hidrógeno o electrones (Fotoproceso tipo I - Fotoblanqueo)
ENERGÍA
$S_n$
$S_2$
$S_1$
$S_0$
$T_1$
$^1O_2$
$^3O_2$

Figura 1

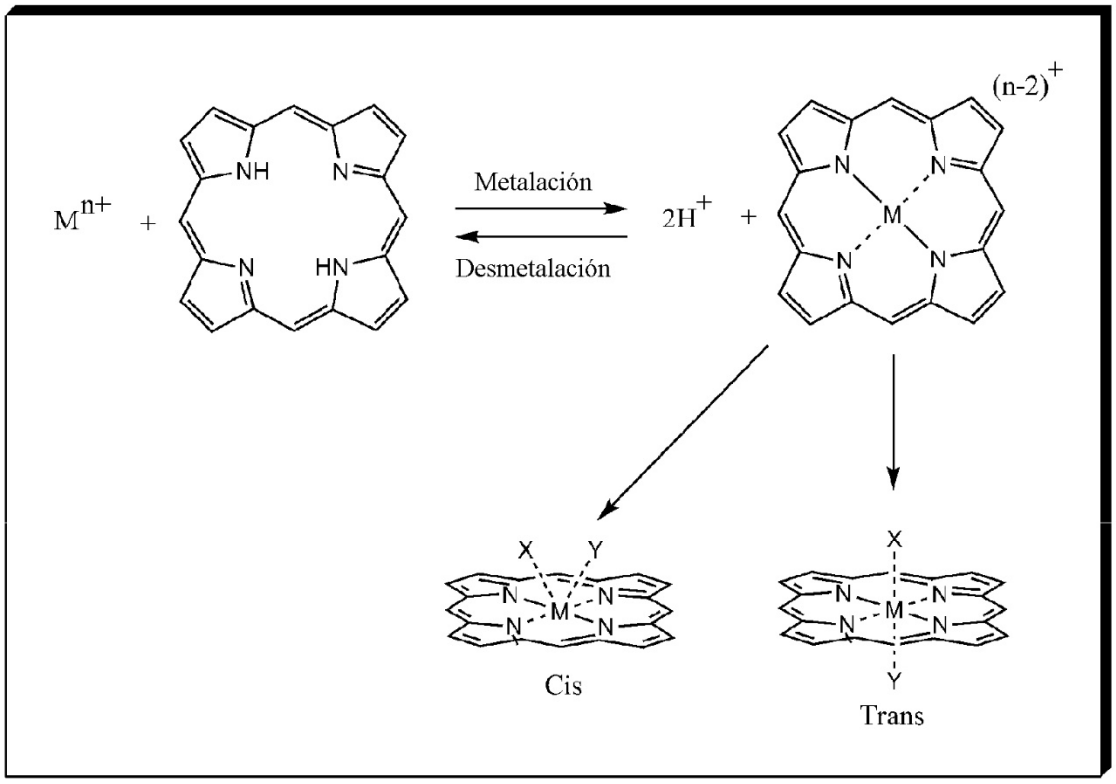



Figura 2

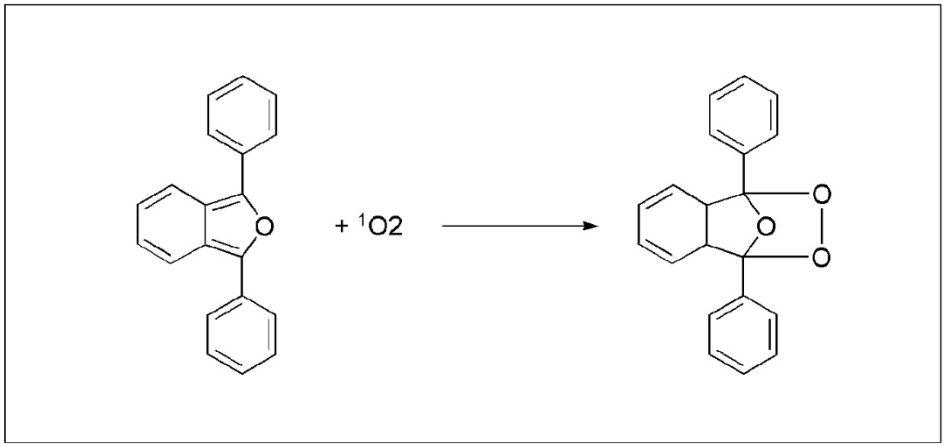



Figura 3

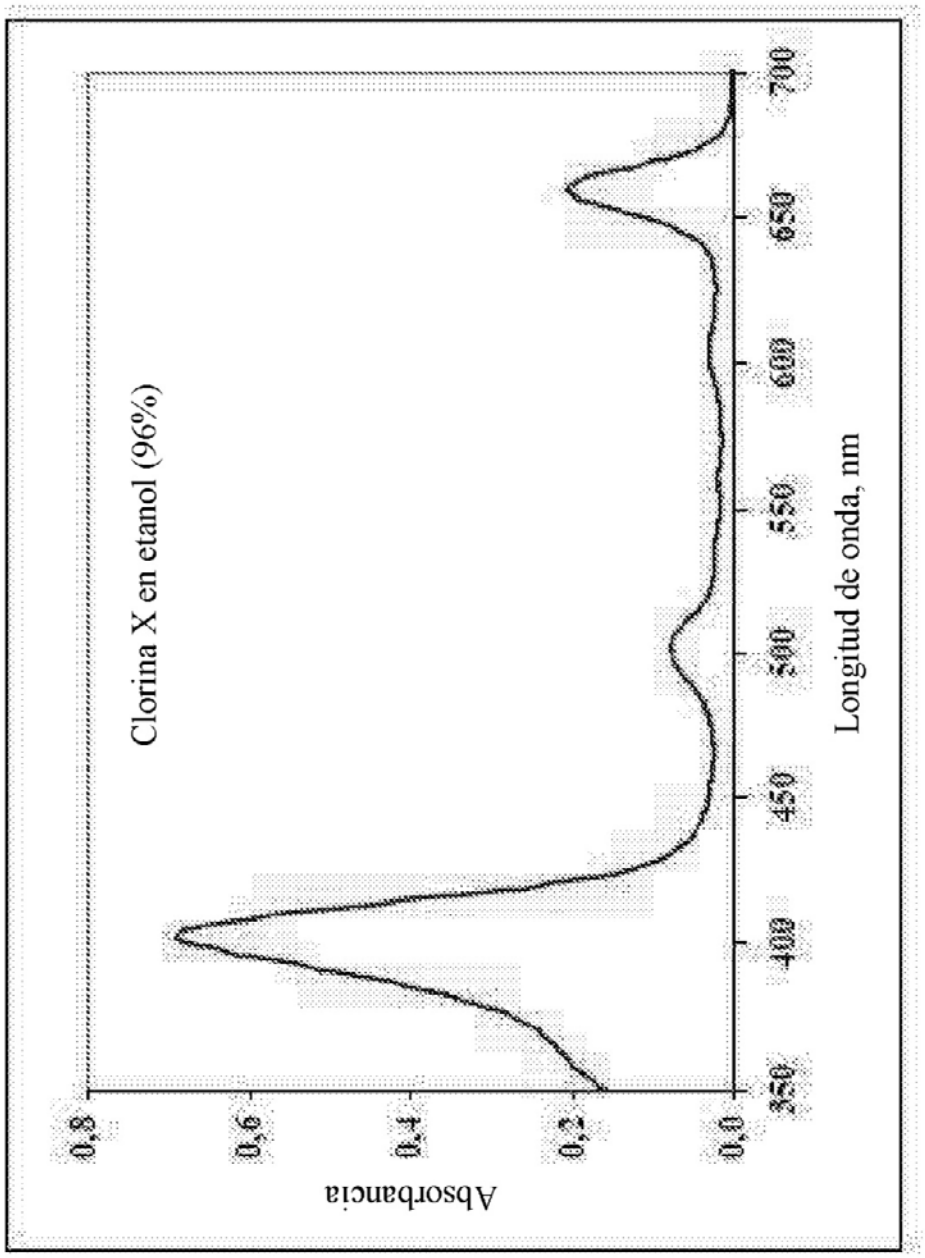

Clorina X en etanol (96%)
Absorbancia
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
350
400
450
500
550
600
650
700
Longitud de onda, nm

Figura 4

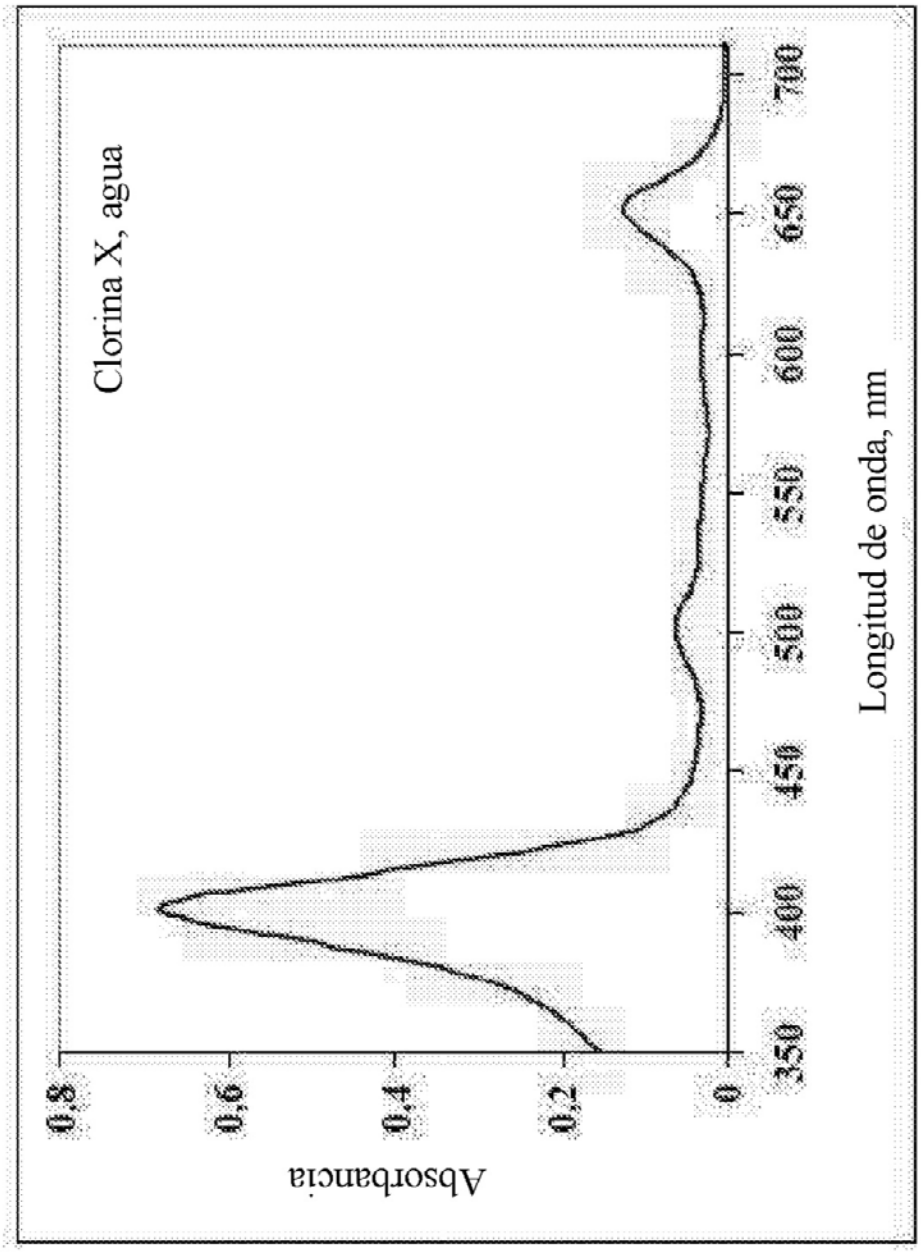

Clorina X, agua
Absorbancia
0,8
0,6
0,4
0,2
0
350
400
450
500
550
600
650
700
Longitud de onda, nm

Figura 5

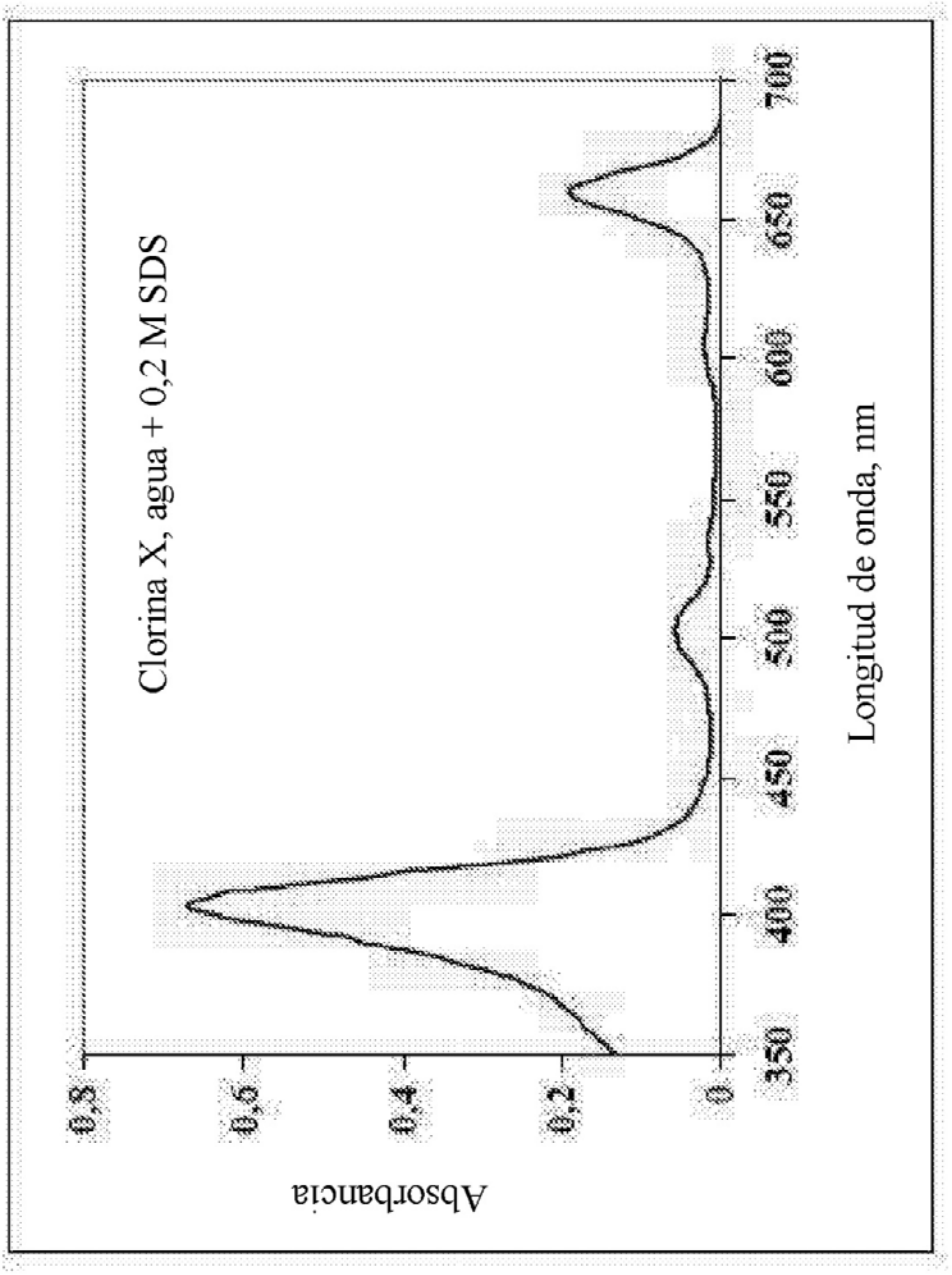

Clorina X, agua + 0,2 M SDS
Absorbancia
0,8
0,6
0,4
0,2
0
350
400
450
500
550
600
650
700
Longitud de onda, nm

Figura 6

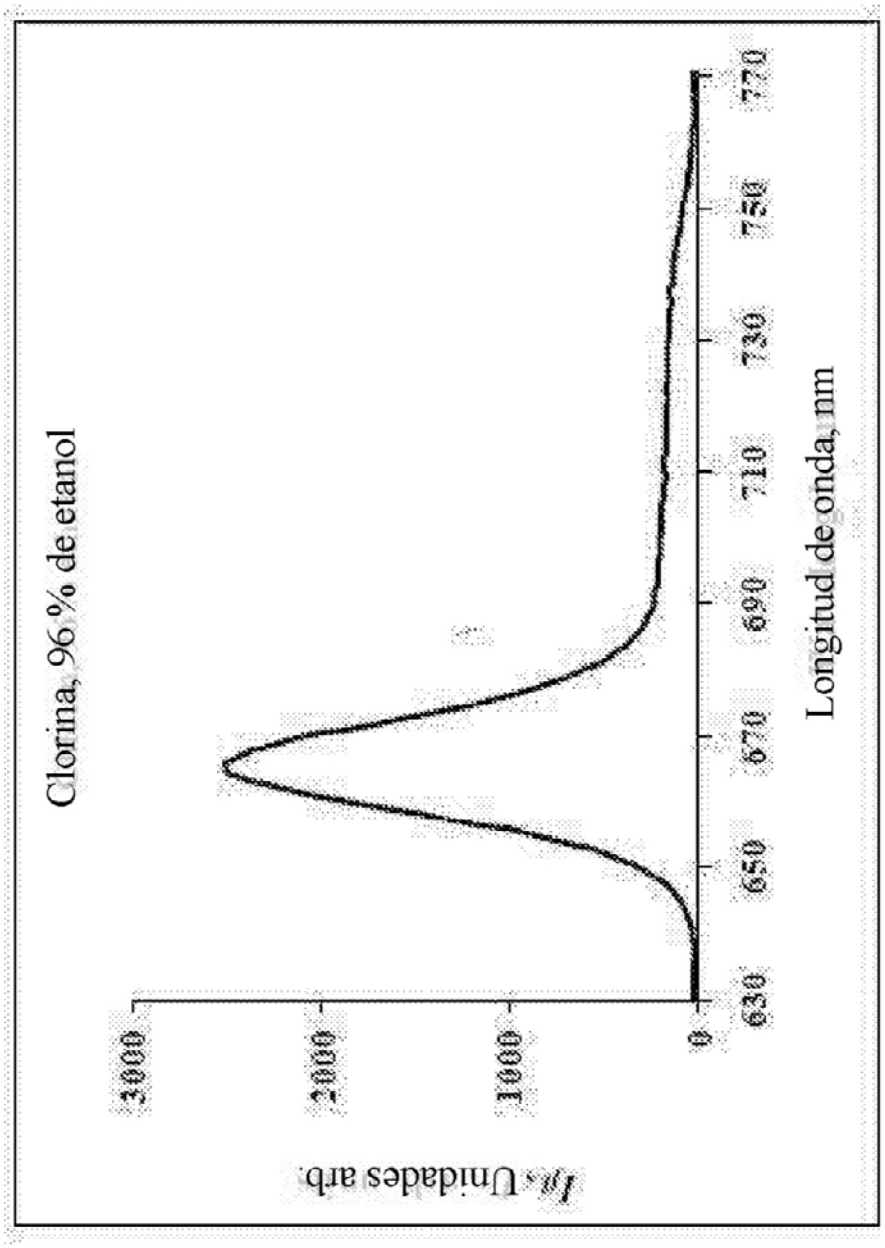

Clorina, 96 % de etanol
$I_{fl}$, Unidades arb
3000
2000
1000
0
630
650
670
690
710
730
750
770
Longitud de onda, nm

Figura 7

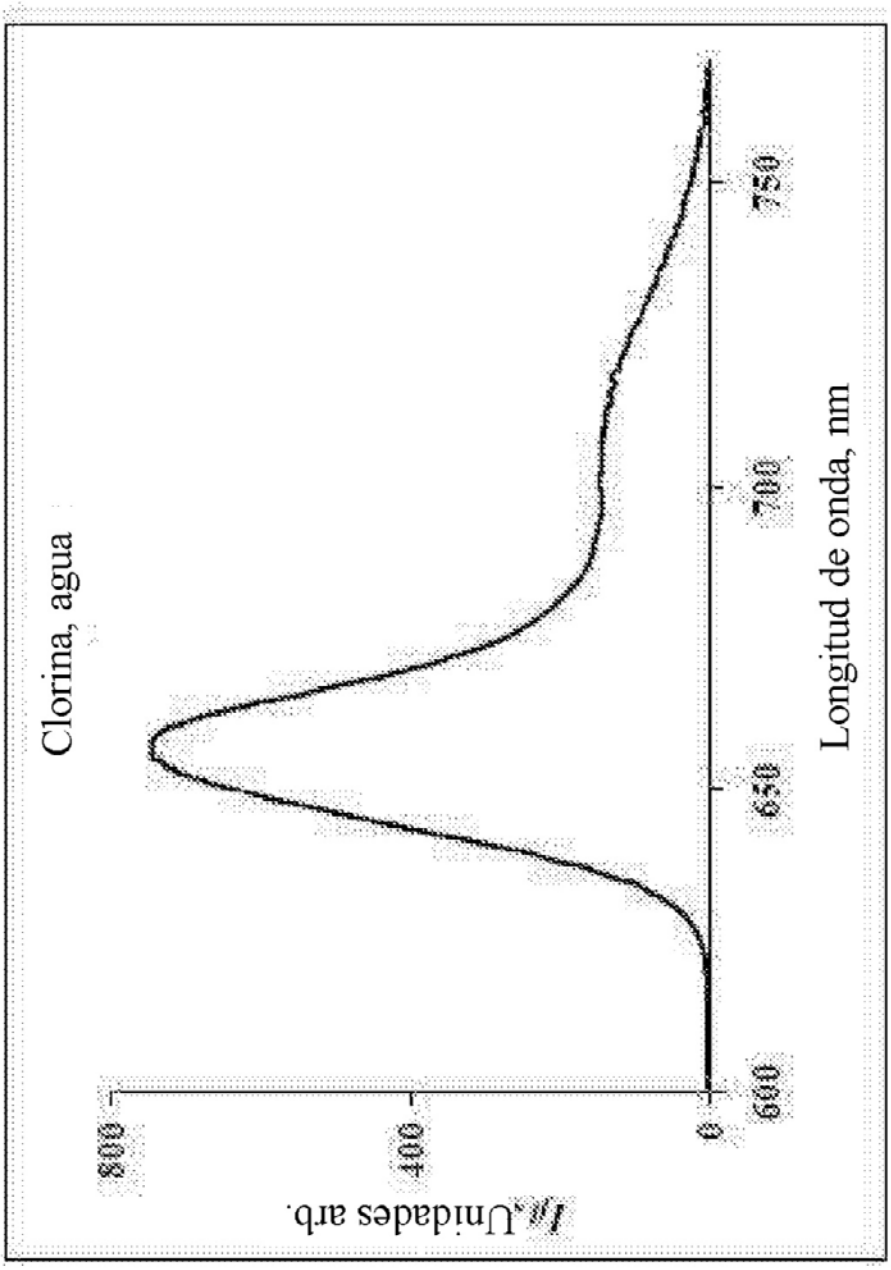

Clorina, agua
Longitud de onda, nm
600
650
700
750
0
400
800
Unidades arb.

Figura 8

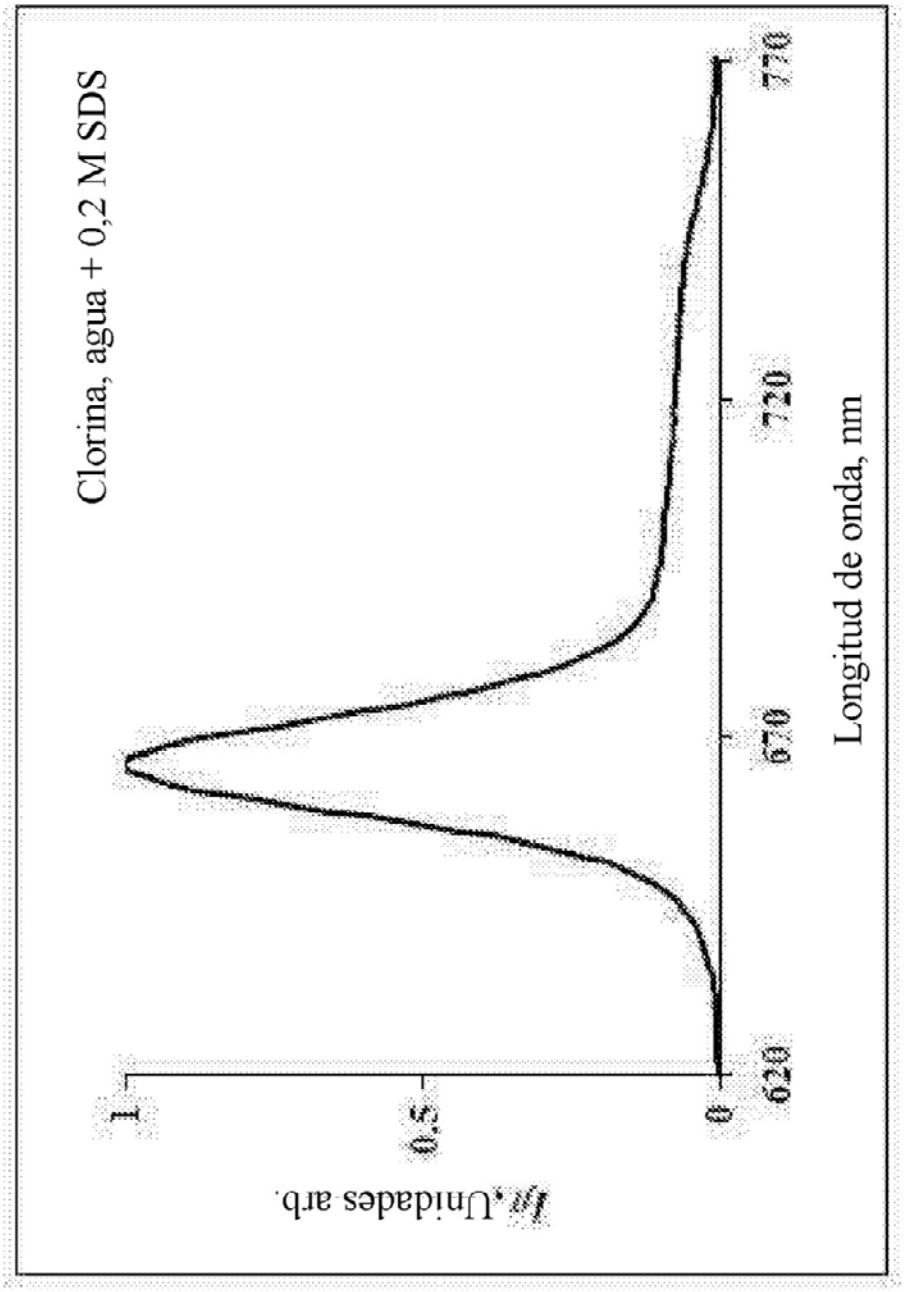

Clorina, agua + 0,2 M SDS
Longitud de onda, nm
620
670
720
770
0
0,5
1
Unidades arb.

Figura 9

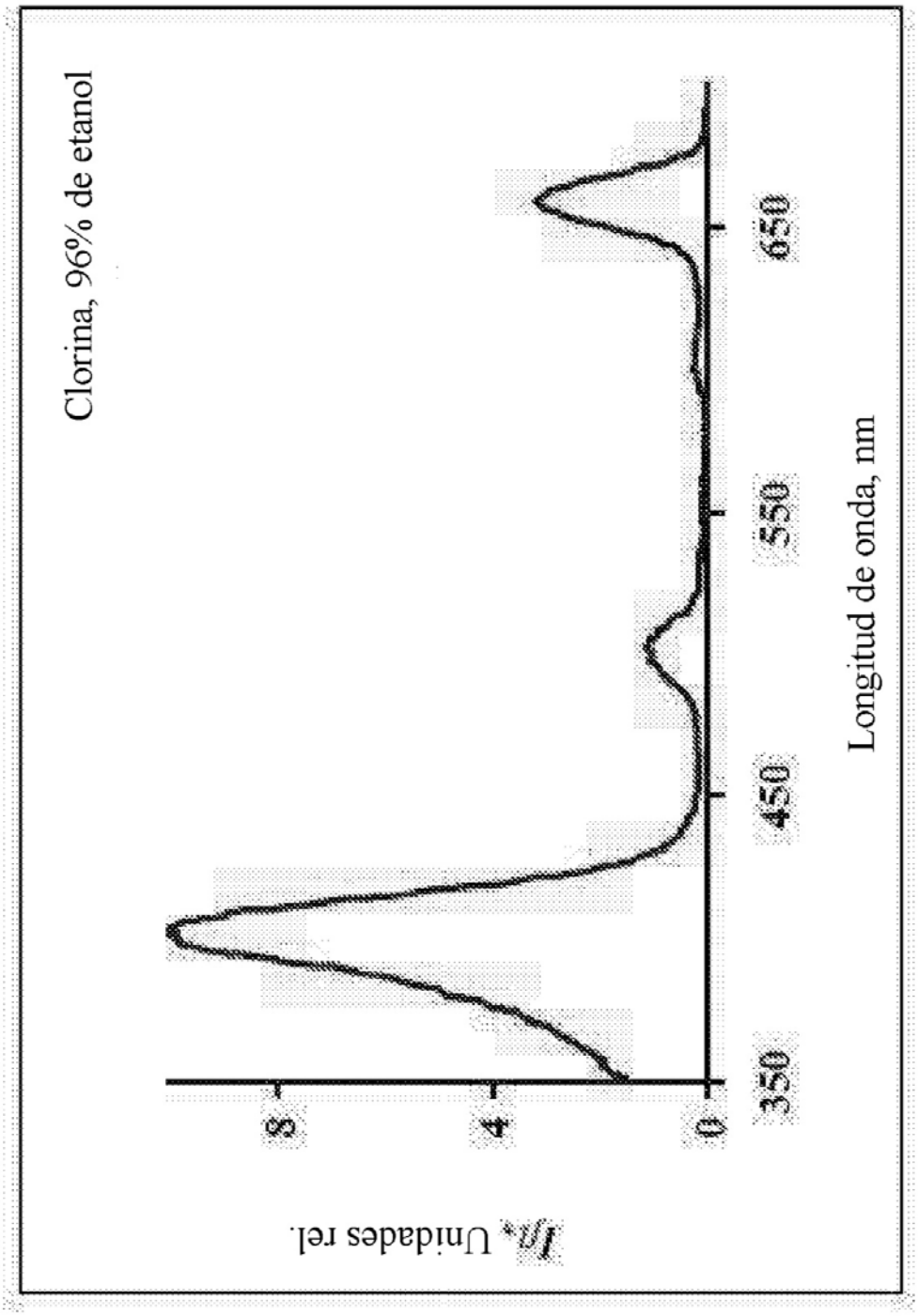

Clorina, 96% de etanol
$I_{fl.}$, Unidades rel.
8
4
0
350
450
550
650
Longitud de onda, nm

Figura 10

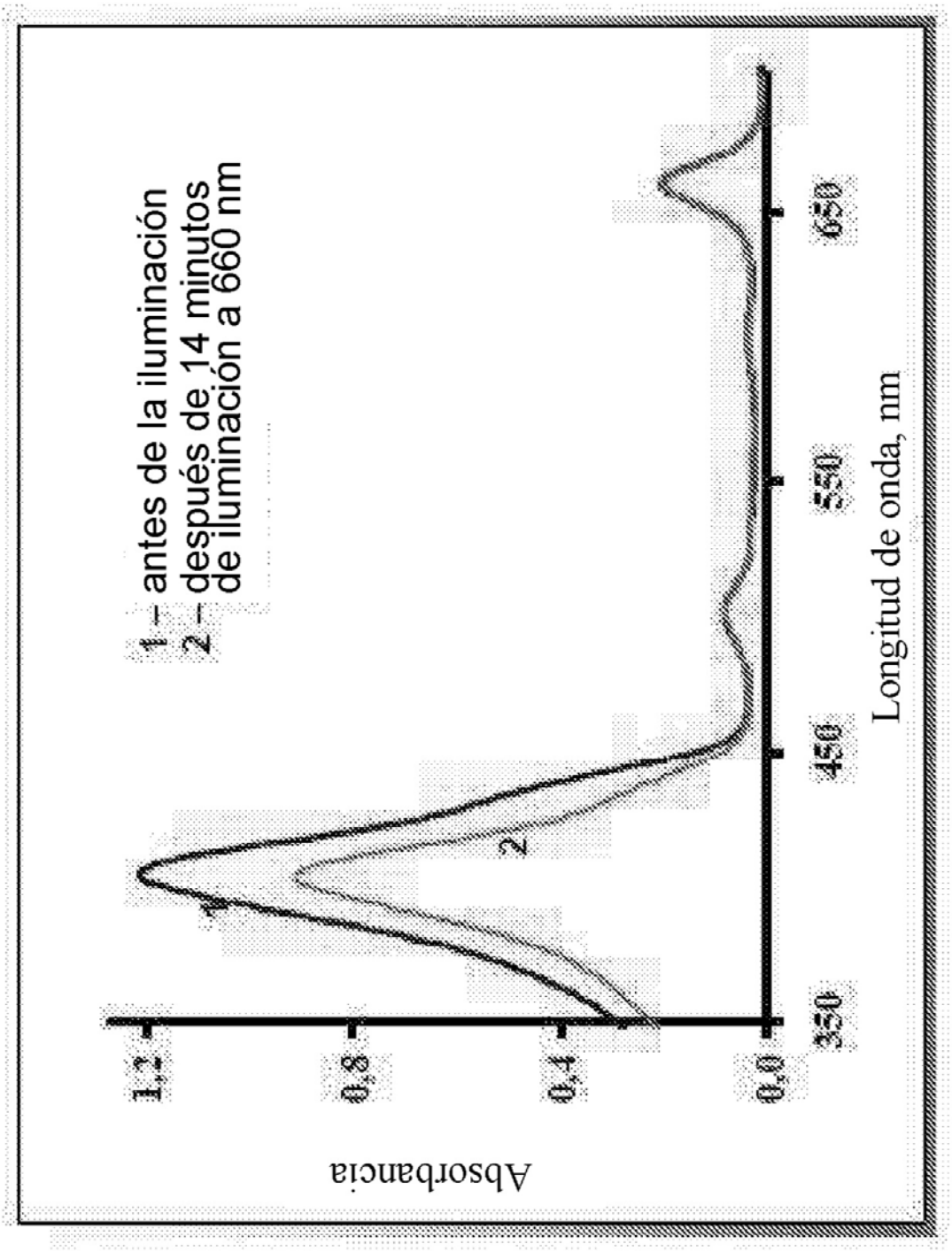

1 – antes de la iluminación
2 – después de 14 minutos de iluminación a 660 nm
Absorbancia
1,2
0,8
0,4
0,0
350
450
550
650
Longitud de onda, nm
1
2

Figura 11

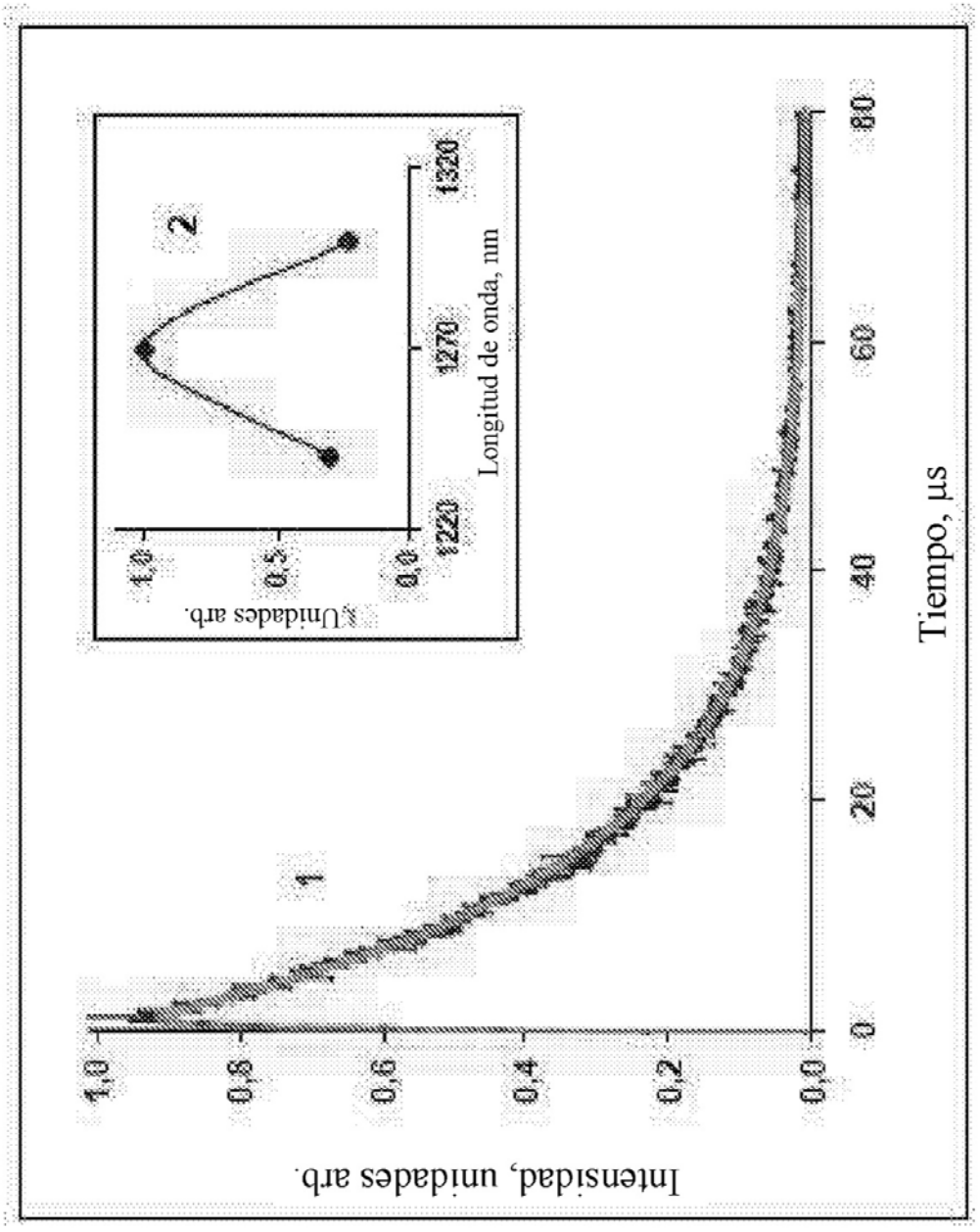

Intensidad, unidades arb.
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
20
40
60
80
Tiempo, µs
1
2
1320
1270
1220
Longitud de onda, nm
1,0
0,5
0,0
Unidades arb.

Figura 12

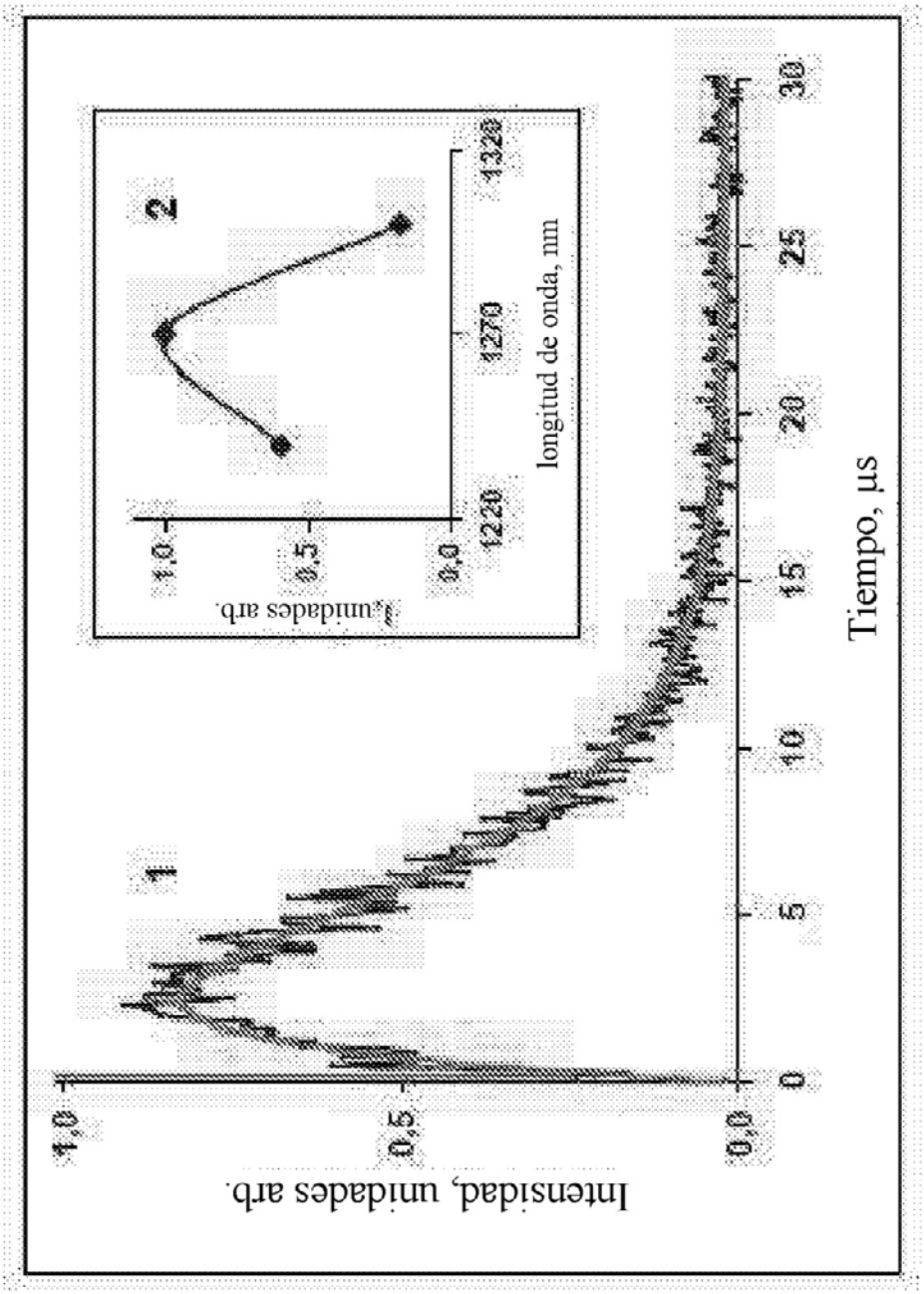

Intensidad, unidades arb.
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo, µs
1
2
longitud de onda, nm
1220
1270
1320
1,0
0,5
0,0
unidades arb.

Figura 13

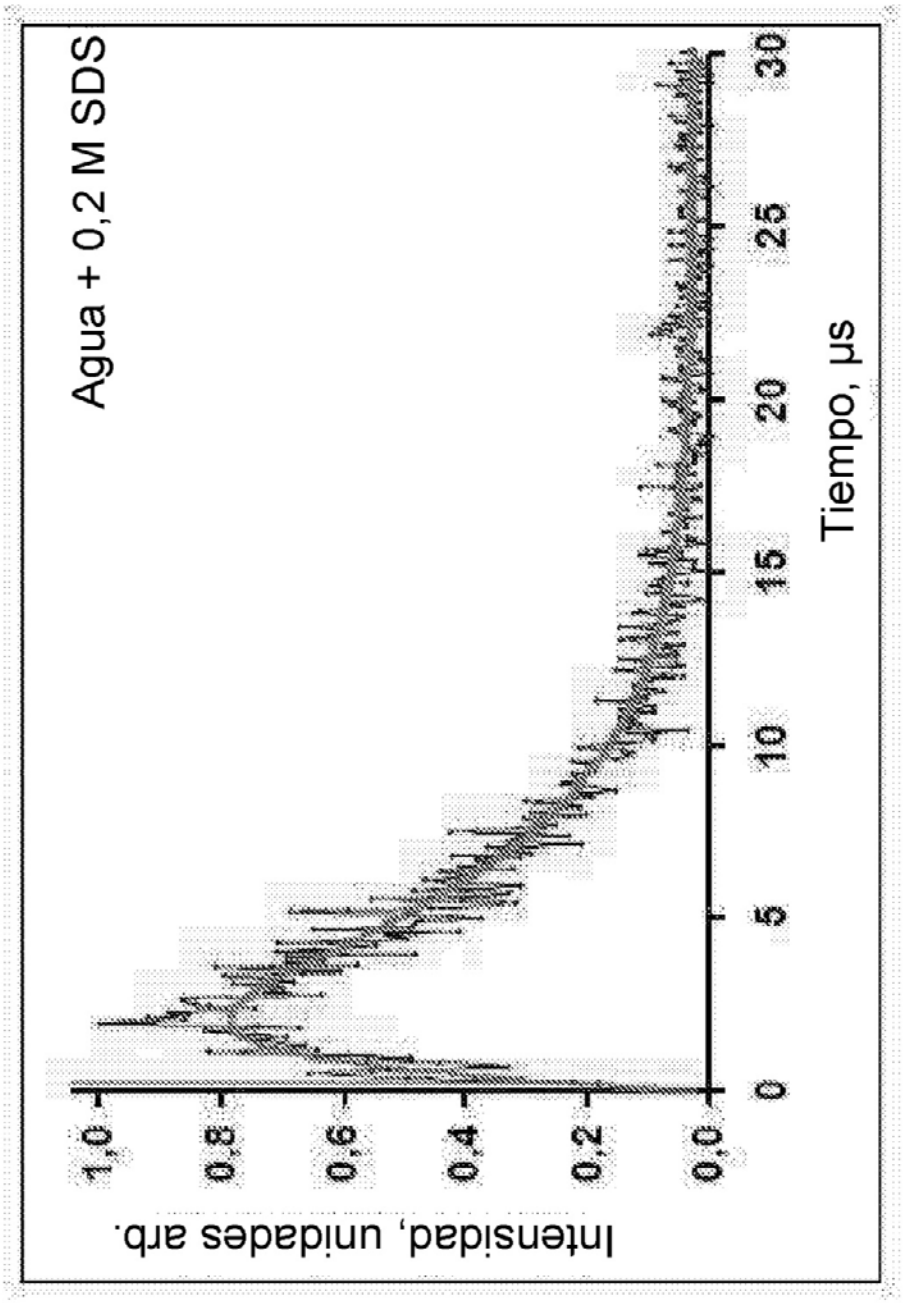

Agua + 0,2 M SDS
Intensidad, unidades arb.
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo, µs

Figura 14