

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.03.29	(73) Titular(es): PHOTOCURE ASA	
(30) Prioridade(s): 2004.03.26 GB 0406917	HOFFSVEIEN 4 0275 OSLO	NO
(43) Data de publicação do pedido: 2006.12.06	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.29 129/2011	JO KLAVENESS	NO
	ASLAK GODAL	NO
	JON ERIK BRAENDEN	NO
	NILS OLAV NILSEN	NO
	(74) Mandatário:	
	PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA	
	RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **SAIS DE ADIÇÃO ÁCIDA DE ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO OU SEUS DERIVADOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM SAL DE ADIÇÃO ÁCIDA DE ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO (5-ALA) OU DE UM DERIVADO DE 5-ALA (E. G. UM ÉSTER DE 5-ALA) COM UM ÁCIDO QUE POSSUI UM PKA DE CERCA DE 5 OU INFERIOR, DE UM MODO PREFERIDO, CERCA DE 3 OU INFERIOR, COM A CONDIÇÃO DE O ÁCIDO SER OUTRO QUE NÃO O ÁCIDO CLORÍDRICO. OS SAIS PARTICULARMENTE PREFERIDOS SÃO OS DERIVADOS DE ÁCIDOS SELECIONADOS DO GRUPO COMPREENDENDO ÁCIDO SULFÓNICO E SEUS DERIVADOS, ÁCIDO BROMÍDRICO, ÁCIDO SULFÚRICO, ÁCIDO NÍTRICO E ÁCIDO FOSFÓRICO. OS SAIS DE ACORDO COM A INVENÇÃO SÃO PARTICULARMENTE ADEQUADOS PARA UTILIZAÇÃO COMO AGENTES DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO E FOTOQUIMIOTERAPIA DE DISTÚRBIOS OU ANOMALIAS DE SUPERFÍCIES EXTERNAS OU INTERNAS DO CORPO.

DESCRIÇÃO

"SAIS DE ADIÇÃO ÁCIDA DE ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO OU SEUS DERIVADOS"

Compostos

A presente invenção refere-se a determinados sais de ésteres do ácido 5-aminolevulínico (ésteres de 5-ALA), sua preparação e sua utilização, em particular como agentes de fotossensibilização em fotoquimioterapia ou diagnóstico. A invenção refere-se particularmente a novos sais de ésteres de 5-ALA.

A fotoquimioterapia, ou terapia fotodinâmica (PDT) como é também conhecida, é uma técnica para o tratamento de várias anomalias ou distúrbios da pele ou outros órgãos epiteliais ou mucosa, especialmente cancros ou lesões pré-cancerosas, assim como determinadas lesões não malignas, por exemplo, queixas de pele, tal como psoríase. A fotoquimioterapia envolve a aplicação de agentes de fotossensibilização (fototerapêuticos) na área do corpo afectada, seguida por exposição a luz fotoactivadora de modo a activar os agentes de fotossensibilização e convertê-los na forma citotóxica, enquanto as células afectadas são mortas ou o seu potencial proliferativo diminuído.

São conhecidos vários agentes de fotossensibilização, incluindo, nomeadamente, os psoralenos, as porfirinas (e. g.

Photofrin[®]) as clorinas e as ftalocianinas. Estes fármacos tornam-se tóxicos quando expostos à luz.

De entre os agentes de fotossensibilização clinicamente mais úteis conhecidos na técnica estão o ácido 5-aminolevulínico e seus derivados, por exemplo ésteres, tal como ésteres de 5-ALA. Estas são descritas, por exemplo, nos documentos W091/01727, W096/28412 e W002/10120. Até ao presente, estes compostos foram apenas propostos para utilização clínica na forma dos seus sais de cloridrato, por exemplo, como ALA-HCl em Levulans[®] (disponível de Dusa Pharmaceuticals Inc., Wilmington, US), como éster metílico de ALA e HCl em Metvix[®] (PhotoCure ASA, Oslo, Noruega) e como éster hexílico de ALA e HCl em Hexvix[®] (também PhotoCure ASA).

Embora a fotoquimioterapia com ALA e derivados de ALA seja clinicamente útil no tratamento de uma vasta gama de doenças pré-cancerosas e cancerosas, e outros estados, estes compostos exibem, no entanto, algumas limitações quando formuladas para utilização como produtos farmacêuticos, *e. g.*, em PDT. Por exemplo, estes compostos (em particular, ALA e seu sal cloridrato) tendem a ser instáveis nas formulações farmacêuticas. Em alguns casos, estes compostos podem também ser associados com problemas relacionados com as suas propriedades físico-químicas, por exemplo, as suas propriedades cristalinas, solubilidade ou propriedades higroscópicas.

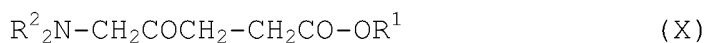
Deste modo, existe uma necessidade para agentes fototerapêuticos alternativos. Em particular, existe uma necessidade para estes agentes que são melhores produtos farmacêuticos, por exemplo, agentes fototerapêuticos que possuem

propriedades físico-químicas melhoradas (*e. g.*, que são mais estáveis, menos higroscópicos, etc.) em comparação com os conhecidos na técnica. É também desejável que estes agentes devam apresentar eficácia equivalente ou, de um modo preferido, melhorada (*i. e.*, um efeito fotoaminoterapêutico equivalente ou melhorado) sobre os fotossensibilizadores conhecidos quando utilizados em PDT.

Surpreendentemente, verificou-se agora que determinados sais de ésteres de ácido 5-aminolevulínico possuem propriedades desejadas para utilização em formulações farmacêuticas (*e. g.* formulações para utilização em fotoquimioterapia) e que vários destes sais melhoraram as propriedades relativas aos compostos de ALA conhecidos e utilizados na técnica. Especificamente, verificou-se que sais de adição de ácido de determinados ésteres de ALA com um ácido que é um ácido sulfônico ou um derivado do ácido sulfônico são particularmente adequados para utilização em formulações farmacêuticas, *e. g.*, formulações para utilização em fotoquimioterapia. Verificou-se agora, por exemplo, que estes compostos possuíam propriedades físico-químicas melhoradas, tais como estabilidade melhorada (*e. g.*, menor higroscopicidade), em comparação com compostos de ALA conhecidos. Verificou-se também que alguns destes compostos apresentaram eficácia melhorada (*i. e.* um efeito fotoaminoterapêutico melhorado) sobre compostos de ALA que estão presentemente em utilização clínica, por exemplo em relação com os sais cloridrato de ALA correspondentes e de ésteres de ALA.

Deste modo, vista por um aspecto, a invenção proporciona um sal de adição de ácido de um éster de ácido 5-aminolevulínico (éster de 5-ALA) com um ácido que é um ácido sulfônico ou um

derivado de ácido sulfónico, em que o referido éster de 5-ALA é um composto de fórmula X:



(em que R¹ representa um grupo alquilo C₁₋₆ de cadeia linear não substituído;

R² representa cada, independentemente, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclico opcionalmente substituído, contendo até 20 átomos de carbono que podem ser opcionalmente interrompidos com um ou mais grupos -O-, -NR³-, -S- ou PR³-; e R³ é um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo C₁₋₆.

De um modo preferido, os sais de adição de ácido de acordo com a invenção são farmacologicamente aceitáveis. Deste modo, é preferido que os ácidos a partir dos quais os sais da invenção são derivados sejam eles próprios farmacologicamente aceitáveis.

Num outro aspecto a invenção também proporciona estes compostos (*i. e.*, sais de adição de ácido) para utilização como produtos farmacêuticos, *e. g.*, produtos farmacêuticos para utilização em fotoquimioterapia ou diagnóstico.

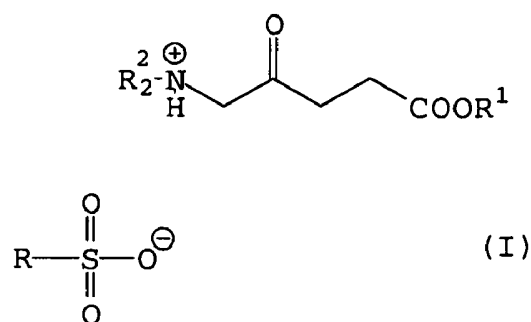
Como aqui utilizados, os termos "ácido 5-aminolevulínico", "ALA" e "5-ALA" são utilizados indiferentemente e incluem o ácido 5-amino-4-oxopentanóico. Os ésteres de 5-ALA são geralmente conhecidos e descritos na técnica anterior, *e. g.*, nos documentos WO96/28412 e WO02/10120, sendo todos os conteúdos aqui incorporados por referência. Os ésteres preferidos de 5-ALA

para utilização na invenção são os ésteres de compostos de 5-ALA em que o grupo 5-amino não é substituído

Como aqui utilizado, o termo "ácido sulfónico" pretende incluir qualquer composto orgânico contendo, pelo menos, um grupo $-SO_3H$. De um modo preferido, isto pode compreender 1, 2 ou 3 grupos $-SO_3H$, de um modo muito preferido 1 ou 2, e. g., 1. Quando utilizado em relação com o ácido sulfónico, o termo "derivados" pretende incluir qualquer destes compostos contendo pelo menos um (de um modo preferido, 1, 2 ou 3, de um modo muito preferido, 1 ou 2, e. g., 1) grupo $-SO_3X$ (em que X é um catião fisiologicamente tolerável, tal como um catião de sódio, cálcio, potássio, magnésio ou meglumina).

Os sais de acordo com a invenção serão tipicamente derivados do éster de ALA e de um ácido mono-prótico, e. g., um ácido sulfónico, tal como ácido metanossulfónico, formando deste modo um sal 1:1. Alternativamente, os sais podem ser formados entre o éster de ALA e um di- ou tri-prótico, e. g., um ácido sulfónico tal como ácido etano-1,2-dissulfónico. No caso em que é utilizado um ácido possuindo mais do que um protão ácido, o composto resultante pode ter uma proporção estequiométrica que não 1:1, por exemplo 2:1 (éster de ALA:ácido) ou 3:1 (éster de ALA:ácido) ou pode compreender uma mistura de sais possuindo vários níveis de estequiometria. Os ácidos polipróticos são também capazes de formar outros sais com o éster de ALA. Além disso, os ácidos polipróticos podem também formar outros sais, e. g., sais 1:1, com os ésteres de ALA na forma de sais com outras bases fisiologicamente aceitáveis, tais como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio e meglumina.

De um modo mais preferido, a presente a presente invenção proporciona compostos de fórmula I:



(em que

R é um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo C₁₋₂₀ opcionalmente substituído ou um grupo arilo até 20 átomos de carbono; e R¹ e R² são como anteriormente aqui definido.

Como aqui utilizado, salvo indicação em contrário, o termo "alquilo" inclui qualquer grupo hidrocarboneto de cadeia longa ou curta, de cadeia linear, ramificada ou alifática cíclica, saturada ou insaturada. Opcionalmente, este grupo pode ser substituído (e. g., mono- ou poli-substituído), por exemplo, com grupos hidroxilo, alcóxilo, acilóxilo, nitro, alcóxilocarbonilóxilo, amino, arilo, oxo, halo (e. g., fluoro ou cloro), -SR³, -NR³₂ ou -PR³₂ (em que R³ é como anteriormente aqui definido). Os grupos alquilo insaturados podem ser mono- ou poli-insaturados e incluem ambos os grupos alcenilo e alcinilo.

Os compostos preferidos de acordo com a invenção são os de fórmula I, em que R é um grupo alquilo opcionalmente substituído (i. e. mono- ou poli-substituído), linear, ramificado ou cíclico (e. g. mono- ou bicíclico, ligado em ponte ou não ligado em

ponte) que pode conter até 20 átomos de carbono, ou um grupo arilo opcionalmente substituído (*i. e.*, mono- ou poli-substituído) que, de um modo preferido, contém até 20 átomos de carbono. Os substituintes preferidos que podem estar presentes no grupo R incluem alquilo C₁₋₆ (*e. g.*, metilo), hidroxilo, alcoxilo, aciloxilo, nitro, alcoxilocarboniloxilo, amino, arilo, oxo e halo (*e. g.*, fluoro ou cloro).

Em geral, os sais de acordo com a invenção que são formados entre o éster de ALA e um composto de ácido sulfônico compreendem uma única unidade de ácido sulfônico, *i. e.*, um ácido mono-prótico. No entanto, como notado acima, são contemplados os compostos possuindo mais do que uma unidade de ácido sulfônico (*e. g.*, 2 ou 3 destes grupos) no âmbito da invenção. Outros substituintes que podem estar presentes no grupo R incluem, deste modo, um ou mais grupos, de um modo preferido, um grupo -SO₂OH, -SO₂OX (em que X é como anteriormente aqui definido) ou -SO₂O^σ. Os exemplos representativos de ácidos dissulfônicos que podem ser utilizados para preparar os sais de acordo com a invenção incluem o ácido etano-1,2-dissulfônico e ácido naftaleno-1,5-dissulfônico.

No caso do grupo R, os grupos alquilo preferidos podem conter até 20 mas, de um modo preferido, até 15, *e. g.*, até 12 átomos de carbono. No entanto, os grupos alquilo contendo até 10, *e. g.*, até 5, de um modo mais preferido, 1, 2 ou 3 átomos de carbono são preferidos. Em particular, são preferidos os grupos alquilo lineares possuindo até 10 átomos de carbono, *e. g.*, grupos metilo, etilo ou propilo. Embora estes grupos possam ser substituídos ou não substituídos, de um modo preferido, estes serão não substituídos.

No caso do grupo R, os grupos arilo preferidos incluem grupos fenilo ou naftilo opcionalmente substituídos. De um modo preferido, o grupo arilo é substituído, por exemplo, com um ou mais (e. g., com um, dois ou três) substituintes que podem incluir grupos alquilo C₁₋₆ (de um modo preferido, alquilo C₁₋₄, e. g., metilo), grupos alcoxilo (e. g., metoxilo), nitro, halo (e. g., fluoro ou cloro), -SO₃H, -SO₃X (em que X é como anteriormente aqui definido), -SO₂O⁻ ou trifluorometilo. Os exemplos representativos de grupos arilo incluem tolueno (e. g., p-tolueno), benzeno, naftaleno e naftalenossulfonato (e. g., 2-naftalenossulfonato).

No caso de R², os grupos alquilo são aqueles contendo até 20, e. g., até 10 átomos de carbono. Em particular, os hidrocarbonetos saturados possuindo até 10 átomos de carbono são preferidos, e. g., grupos hexilo, heptilo ou octilo. Os alquilos inferiores, tais como metilo, etilo e propilo podem ser, no entanto, alternativamente utilizados. Os grupos alquilo adequados podem ser lineares ou ramificados. Os exemplos representativos de grupos alquilo ramificados adequados incluem 2-metilpentilo e 4-metilpentilo. Geralmente, são preferidos grupos alquilo lineares, não ramificados.

Os grupos alquilo substituídos podem ser mono ou poli-substituídos. Deste modo, os grupos R² adequados incluem, por exemplo, alquilo não substituído, alcoxiloalquilo, hidroxialcoxiloalquilo, poli-hidroxialquilo, hidroxipolialquiloeneoxialquilo, oxalquilo, polioxalquilo e semelhantes.

Os grupos R^2 alquilo substituídos representativos incluem grupos alcoximetilo, alcoxietilo e alcoxipropilo ou grupos aciloximetilo, aciloxietilo e aciloxipropilo, e. g. pivaloiloximetilo.

Os compostos preferidos de acordo com a invenção incluem os de fórmula I, em que R^2 representa um grupo alquilo não substituído ou um grupo alquilo substituído com arilo (e. g., um grupo benzilo), em que o próprio grupo arilo pode também ser substituído como aqui descrito. Especialmente, R^1 é um grupo alquilo C_1 ou C_6 . Particularmente, de um modo preferido, estes compostos são sais de ésteres de ALA, i. e., R^1 é como descrito acima, e no N-terminal ambos os grupos R^2 são átomos de hidrogénio

Os compostos particularmente preferidos de acordo com a invenção são os compostos de fórmula I, em que R^1 representa um grupo alquilo C_{1-6} não substituído e/ou cada R^2 representa um átomo de hidrogénio.

Os compostos mais preferidos de acordo com a invenção são os sais de ácido sulfónico ou os sais derivados do ácido sulfónico de éster metílico de ALA, éster hexílico de ALA.

Os compostos especialmente preferidos da invenção incluem os sais de adição de ácido de ésteres de ALA com um ácido sulfónico seleccionado do seguinte:

Ácido naftaleno-1,5-dissulfónico,
ácido etano-1,2-dissulfónico,
ácido ciclâmico,

ácido p-toluenossulfônico,
ácido metanossulfônico,
ácido dodecilsulfônico,
ácido naftaleno-2-sulfônico,
ácido benzenossulfônico,
ácido 2-hidroxi-etanossulfônico,
ácido etanossulfônico, e
ácido (+)-canfor-10-sulfônico.

Os sais derivados de ácido metanossulfônico, ácido benzenossulfônico e ácido p-toluenossulfônico são especialmente preferidos.

Os exemplos particularmente preferidos de compostos incluem:

5-amino-4-oxopentanoatotoluenossulfonato de hexilo;
5-amino-4-oxopentanoatotoluenossulfonato de metilo;
5-amino-4-oxopentanoatometanossulfonato de hexilo;
5-amino-4-oxopentanoatometanossulfonato de metilo;

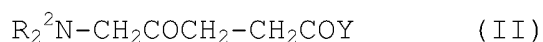
Os compostos da invenção ou para utilização na invenção podem ser preparados utilizando processos convencionais e procedimentos bem conhecidos na técnica para a formulação de sal.

Os materiais de partida para a preparação de sais de acordo com a invenção incluem ésteres de ALA que podem reagir com um ácido, tal como um ácido sulfônico, e. g., ácido p-toluenossulfônico, ácido metanossulfônico, etc.

Pode, deste modo, verificar-se que a invenção proporciona um processo para preparar os compostos da invenção, compreendendo o referido processo a reacção de um éster de ALA com um ácido sulfónico ou derivado de ácido sulfónico.

Alternativamente, de modo a preparar um sal de um éster de ALA de acordo com a invenção, pode ser utilizada uma reacção num vaso que envolve a reacção de ácido 5-aminolevulínico, ou um seu derivado esterificável, com um álcool ou um seu derivado formador de éster (e. g., com um álcool) na presença de um ácido sulfónico ou derivado de ácido sulfónico. Este processo forma um outro aspecto da invenção.

Mais particularmente, este aspecto da invenção proporciona um processo para a preparação de um sal de adição de ácido como aqui descrito anteriormente (e. g. um composto de fórmula I), compreendendo o referido processo o passo de fazer reagir um composto de fórmula II:



(em que

Y representa um grupo de saída, por exemplo, um grupo hidroxilo, um átomo de halogénio ou grupo alcoxilo, ou COY representa um grupo de anidrido ácido e R^2 é como anteriormente aqui definido) com um composto de fórmula III:



(em que R^1 é como anteriormente aqui definido) na presença de um ácido como anteriormente aqui definido, e. g., um ácido sulfónico de fórmula IV:



(em que R é como aqui definido anteriormente)

Estas reacções podem convenientemente ser efectuadas num solvente ou mistura de solventes, tais como água, acetona, metanol, etanol ou tetra-hidrofurano etc., de um modo preferido, água a temperaturas até 100 °C, de um modo preferido à temperatura ambiente. As condições para as reacções dependerão dos reagentes utilizados e as condições podem ser seleccionadas de modo a que seja obtido o rendimento máximo de sal.

Os compostos da invenção podem também ser preparados a partir dos sais cloridrato correspondentes, por exemplo, utilizando métodos de permuta iónica ou através de um método "sal de prata" como delineado a seguir. Estes métodos formam outros aspectos da presente invenção.

O método de permuta iónica envolve tipicamente um primeiro passo de passar uma solução contendo um sal cloridrato do éster de ALA através de uma coluna de permuta iónica e um segundo passo de adição do eluato da coluna numa solução de um ácido (e. g. um ácido sulfónico). Qualquer resina de permuta iónica capaz de trocar Cl^- por um anião básico (e. g., um ião hidróxido) pode ser utilizada. Os permutadores de iões adequados incluem resinas de troca aniónica fortemente básicas (e. g., Dowex[®] 11, Amberlyst[®] A26 (OH) e semelhantes). Neste método os iões cloro do

sal cloridrato do éster de ALA são trocados por iões básicos (e. g., hidróxido) durante a passagem através da coluna. Isto proporciona a base livre que é então neutralizada com um ácido sulfónico ou derivado de ácido sulfónico, formando deste modo, simultaneamente, o sal de adição de ácido sulfónico do éster de ALA correspondente.

Deste modo, considerando outro aspecto, a invenção proporciona um processo para a preparação de um sal de adição de ácido de acordo com a invenção (e. g., um composto de fórmula I), compreendendo o referido processo:

(i) o contacto de uma solução compreendendo um composto da fórmula $\text{Cl}^- \text{R}^2 \text{N}^+ \text{H} - \text{CH}_2 \text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{R}^1$ em que R^1 e R^2 são como anteriormente aqui definido com uma resina básica de permuta iónica

(ii) opcionalmente remover a referida resina; e

(iii) mistura da solução resultante com uma solução compreendendo um ácido sulfónico ou um derivado de ácido sulfónico (e. g., um composto da fórmula RSO_3H ou RSO_3X em que R e X são como anteriormente aqui definido).

No método de sal de prata um sal cloridrato de éster de ALA é feito reagir com o sal de prata de um ácido sulfónico ou derivado de ácido sulfónico num solvente em que AgCl é insolúvel (e. g., água). Os exemplos de sais de prata adequados incluem metanossulfonato de prata, p-toluenossulfonato de prata, benzenossulfonato de prata, etc.

Neste método, a prata pode ser substituída por qualquer outro catião que forme um composto insolúvel com iões cloreto num solvente em que o sal cloridrato do éster de ALA e o sal de adição de ácido apropriado (e. g., sal de ácido sulfónico) são pelo menos, parcialmente, (e. g., substancialmente) solúveis. Por exemplo, um sal cloridrato de éster de ALA pode ser feito reagir com o sal de sódio, potássio, cálcio ou magnésio de um ácido sulfónico num solvente em que NaCl/KCl/CaCl₂/MgCl₂ é insolúvel (e. g., solventes orgânicos não aquosos).

Deste modo, considerando outro aspecto, a invenção proporciona um processo para a preparação de um composto de acordo com a invenção (e. g., um composto de fórmula I), compreendendo o referido processo:

(i) fazer reagir um composto da fórmula $\text{Cl}^- \text{R}^2_2 \text{N} + \text{H}-\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO}_2\text{R}^1$ em que R¹ e R² são como anteriormente aqui definido com um sal de prata de um ácido sulfónico ou um derivado de ácido sulfónico (e. g., um composto da fórmula RSO₃Ag em que R é como anteriormente aqui definido) num solvente em que AgCl é substancialmente insolúvel; e

(ii) opcionalmente separar AgCl do sal resultante (e. g., sal de ácido sulfónico).

Os compostos utilizados como materiais de partida são bem conhecidos da literatura e, em muitos casos, estão comercialmente disponíveis ou podem ser obtidos utilizando métodos conhecidos *per se*. ALA, por exemplo, está disponível na Sigma. Os métodos para a preparação de ésteres de ALA são

descritos, por exemplo, nos documentos WO96/28412 e WO02/10120, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

Alguns exemplos de sais cloridrato bem conhecidos na técnica anterior e adequados para utilização como materiais de partida para a síntese de sais de ácido sulfônico de acordo com a presente invenção incluem: éster metílico de ALA e HCl, éster hexílico de ALA e HCl, etc.

Como acima mencionado, os compostos da invenção e para utilização de acordo com a invenção possuem propriedades farmacológicas valiosas, nomeadamente como indutores de porfirinas intracelulares com propriedades de fotossensibilização que os tornam úteis como agentes fotoaminoterapêuticos. No entanto, os compostos da invenção possuem várias vantagens sobre os conhecidos sais de ALA e de ésteres de ALA, *e. g.*, os sais cloridrato. Em primeiro lugar, os compostos da invenção são geralmente mais estáveis e menos higroscópicos; isto tem a vantagem de armazenamento de longo prazo de preparações farmacêuticas sem qualquer degradação significativa da substância activa que pode levar a perda de eficácia. Em segundo lugar, verificou-se surpreendentemente que os sais de adição de ácido da invenção possuíam propriedades melhoradas de fotossensibilização; os níveis de fluorescência após administração dos sais de ácido sulfônico são superiores aos correspondentes sais cloridrato.

Um outro aspecto da presente invenção conseqüentemente proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um sal de adição de ácido da invenção, em conjunto com, pelo menos, um veículo ou excipiente farmacêutico

Num outro aspecto, é proporcionada uma composição farmacêutica, como aqui anteriormente descrito, para utilização como um medicamento, *e. g.*, em fotoquimioterapia ou diagnóstico.

Ainda num outro aspecto, é também proporcionada a utilização de um sal de adição de ácido da invenção para a preparação de um agente terapêutico para utilização em fotoquimioterapia e especialmente para o tratamento de distúrbios ou anomalias de superfície externa ou interna do corpo que são responsivas a fotoquimioterapia.

As anomalias e distúrbios que podem ser tratados de acordo com a presente invenção incluem quaisquer anomalias malignas, pré-malignas e não malignas ou distúrbios responsivos a fotoquimioterapia, *e. g.*, carcinoma de células basais (bcc), tumores ou outros crescimentos, distúrbios de pele, tais como psoríase ou queratoses actínicas e acne, abrasões de pele, e outras doenças ou infecções *e. g.*, infecções bacterianas, virais ou fúngicas, por exemplo, infecções por vírus Herpes. A invenção é particularmente adequada ao tratamento de doenças, distúrbios ou anomalias quando são formadas lesões discretas em que essas composições podem ser directamente aplicadas (lesões é aqui utilizados em senso lato que inclui tumores e semelhantes).

As superfícies interna e externa do corpo que podem ser tratadas de acordo com a invenção incluem a pele e todas as outras superfícies epiteliais e serosas, incluindo, por exemplo mucosa, os revestimentos de órgãos *e. g.*, os tractos respiratório, gastrointestinal e genito-urinário, e glândulas com ductos que desembocam nestas superfícies (*e. g.*, fígado,

folículos de pelo com glândulas sebáceas, glândulas mamárias, glândulas salivares e vesículas seminais). Adicionalmente à pele, estas superfícies incluem, por exemplo, o revestimento da vagina, o endométrio e o urotélio. Estas superfícies podem também incluir cavidades formadas no corpo após excisão de tecido doente ou canceroso e. g., cavidades cerebrais após a excisão de tumores tal como gliomas.

As superfícies exemplificativas incluem, deste modo: (i) pele e conjuntivo; (ii) o revestimento da boca, faringe, esófago, estômago, intestinos e apêndices intestinais, recto e canal anal; (iii) o revestimento das passagens nasais, sinus nasal, nasofaringe, traqueia, brônquios e bronquíolos; (iv) o revestimento dos ureteres, bexiga urinária e uretra; (v) o revestimento da vagina, cérvix uterino e útero; (vi) a pleura parietal e visceral; (vii) o revestimento das cavidades peritoneal e pélvica, e a superfície dos órgãos contidos nestas cavidades; (viii) a dura mater e meninges; (ix) quaisquer tumores em tecidos sólidos que podem ser tornados acessíveis à luz fotoactivadora e. g., seja directamente, na altura da cirurgia ou via uma fibra óptica inserida através de uma agulha.

As composições da invenção podem ser formuladas de qualquer forma convencional com um ou mais veículos ou excipientes fisiologicamente aceitáveis, de acordo com técnicas bem conhecidas na técnica. Quando apropriado, os compostos ou composições de acordo com a invenção são esterilizadas, e. g., por radiação γ , autoclavagem ou esterilização por calor, antes ou depois da adição de um veículo ou excipiente quando este está presente, para proporcionar formulações estéreis.

As composições podem ser administradas topicamente, oralmente ou sistemicamente. São preferidas composições tópicas, e incluem géis, cremes, unguentos, aspersões, loções, salvas, batons, sabões, pós, pessários, aerossóis, gotas, soluções e qualquer das outras formas farmacêuticas convencionais na técnica.

Os unguentos, géis e cremes podem, por exemplo, ser formulados com uma base aquosa ou oleosa com a adição de agentes adequados de espessamento e/ou gelificação. As loções podem ser formuladas com uma base aquosa ou oleosa e podem, em geral, também conter um ou mais agentes emulsificantes, dispersantes, de suspensão, espessantes ou corantes. Os pós podem ser formados com o auxílio de qualquer pó base adequado. Podem ser formuladas gotas e soluções com uma base aquosa ou não aquosa também compreendendo um ou mais agentes dispersantes, solubilizantes ou de suspensão. As aspersões de aerossol são convenientemente distribuídas em embalagens pressurizadas, com a utilização de um propulsor adequado.

Alternativamente, as composições podem ser proporcionadas numa forma adaptada para administração oral ou parentérica, por exemplo, por injeção intradérmica, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa. As formas farmacêuticas alternativas incluem, deste modo, comprimidos simples ou revestidos, cápsulas, suspensões e soluções contendo o componente activo opcionalmente em conjunto com um ou mais veículos convencionais inertes e/ou diluentes, e. g., com amido de milho, lactose, sacarose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, polivinilpirrolidona, ácido cítrico, ácido tartárico, água, água/etanol, água/glicerol, água/sorbitol,

água/polietilenoglicol, propilenoglicol, álcool estearílico, carboximetilcelulose ou substâncias gordas, tais como gordura dura ou suas misturas adequadas.

As composições podem adicionalmente incluir agentes lubrificantes, agentes de humedecimento, agentes de emulsificação, agentes de suspensão, agentes de conservação, agentes adoçantes, agentes aromatizantes, melhoradores de adsorção, e. g., agentes de penetração de superfície como mencionado a seguir, e semelhantes. As composições da invenção podem ser formuladas de modo a proporcionar libertação rápida, sustida ou retardada do ingrediente activo após administração ao doente empregando de procedimentos bem conhecidos na técnica. Os agentes de solubilização e/ou estabilização podem também ser utilizados, e. g., ciclodextrinas (CD) α , β , γ e HP-ciclodextrina. As composições podem ser em qualquer forma de dosagem apropriada, por exemplo, como uma emulsão ou em lipossomas, niossomas, microsferas, nanopartículas ou semelhantes. O composto da invenção pode então ser absorvido por, incorporado em ou ligado a estas formas.

A concentração dos compostos da invenção nas composições, depende da natureza do composto, da composição, modo de administração, do estado a ser tratado e o doente e pode ser variada ou ajustada de acordo com a selecção. Geralmente, no entanto, os intervalos de concentração de 0,01 a 50%, e. g., 0,05 a 20%, e. g., 1-100 (p/p) são adequados. Para aplicações terapêuticas verificou-se que os intervalos de concentração de 0,1 a 50% eram adequados, e. g., 0,2 a 30% (p/p). As doses podem ser utilizadas quando os compostos são altamente lipofílicos,

e. g., num intervalo de concentração de 0,01 a 10%, e. g., 0,02 a 10 (p/p).

A administração tópica a sítios inacessíveis pode ser conseguida por técnicas conhecidas na técnica, e. g. pela utilização de cateteres ou outros sistemas de distribuição de fármacos apropriado.

Após administração na superfície, a área tratada é exposta à luz para conseguir o efeito fotoquimioterapêutico. O tempo após a administração, em que a exposição à luz ocorre dependerá da natureza da composição, do estado a ser tratado e da forma de administração. Isto pode de um modo geral estar na ordem de 0,5 a 48 horas, e. g. 1 a 10 horas.

A irradiação será, em geral, aplicada a um nível de dose de 40 a 200 Joules/cm², por exemplo, a 100 Joules/cm².

O comprimento de onda da luz utilizada para irradiação pode ser seleccionado para conseguir um efeito fotoquimioterapêutico eficaz. A irradiação com luz branca, particularmente luz possuindo comprimentos de onda no intervalo de 300-800 nm, por exemplo, verificou-se que no intervalo de 500-700 nm era eficaz. Pode ser particularmente importante incluir os comprimentos de onda 630 e 690 nm.

Os sais de adição de ácido da invenção podem ser utilizados num método de tratamento fotoquimioterapêutico de distúrbios ou anomalias das superfícies externas ou internas do corpo, compreendendo a administração às superfícies afectadas, de um sal de adição de ácido ou composição como aqui anteriormente

definido, e a exposição das referidas superfícies à luz (e. g. luz branca), de um modo preferido à luz na região do comprimento de onda 300-800 nm (e. g., luz azul na região do comprimento de onda de 380-440 nm). Alternativamente, pode ser utilizada luz na região do comprimento de onda de 500-700 nm.

Os métodos para irradiação de diferentes áreas do corpo, e. g., por lâmpadas ou lasers são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Van den Bergh, *Chemistry in Britain*, Maio de 1986 p. 430-439). Para regiões inacessíveis isto pode ser convenientemente conseguido utilizando fibras ópticas.

Os compostos da invenção podem ser formulados e/ou administradas com outros agentes de fotossensibilização, por exemplo, Photofrin[®], ou com outros componentes activos que podem melhorar o efeito fotoaminoterapêutico. Por exemplo, os agentes quelantes podem ser benéficamente incluídos de modo a estimular a acumulação do potente fotossensibilizador protoporfirina IX (Pp); a quelação do ferro pelos agentes quelantes evita a sua incorporação na Pp para formar o hemo pela acção da enzima ferroquelatase, levando deste modo à construção de Pp. Desta forma, o efeito de fotossensibilização é melhorado.

Os agentes de quelação do ácido aminopolicarboxílico são particularmente adequados para utilização nesta perspectiva, incluindo qualquer dos quelantes descritos na literatura para a destoxificação metálica ou para a quelação dos iões metálicos paramagnéticos em agentes de contraste para imagiologia de ressonância magnética. Pode ser feita menção particular ao EDTA, CDTA (ácido ciclo-hexanodiaminatetraacético), DTPA e DOTA e derivados bem conhecidos/seus análogos. O EDTA é preferido. Para

conseguir o efeito de quelação de ferro, a desferrioxamina e outros sideróforos podem também ser utilizados, e. g., em conjunto com os agentes quelantes do ácido aminopolicarboxílico tal como EDTA. O agente quelante pode convenientemente ser utilizado a uma concentração de 0,05 a 20% e. g., 0,1 a 10% (p/p).

Como descrito no documento W095/07077, verificou-se também que os agentes auxiliares de penetração na superfície e especialmente os dialquilsulfóxidos, tal como o dimetilsulfóxido (DMSO) pode ter um efeito benéfico no melhoramento do efeito fotoaminoterapêuticos. Os agentes auxiliares de penetração na superfície para utilização na invenção podem ser qualquer dos agentes auxiliares de penetração na pele descritos na literatura farmacêutica e. g., quelantes (e. g., EDTA), tensioactivos (e. g., dodecilsulfato de sódio), não tensioactivos, sais biliares (e. g., desoxicolato de sódio) e ácidos gordos (e. g., ácido oleico). Os exemplos de agentes auxiliares de penetração na superfície apropriados incluem HPE-101 (disponível de Hisamitsu), DMSO e outros dialquilsulfóxidos, em particular n-decilmetil-sulfóxido (NDMS), dimetilsulfacetamida, dimetilformamida (DMFA), dimetilacetamida, glicóis, vários derivados de pirrolidona (Woodford *et al.*, *J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicology*, 1986, 5: 167-177), e Azone[®] (Stoughton *et al.*, *Drug Dpv. Ind. Pharm.* 1983, 9: 725-744) ou suas misturas.

O DMSO é, no entanto, preferido devido às suas actividades anti-histamínicas e anti-inflamatórias e ao seu efeito estimulador na actividade das enzimas ALA-sintase e ALA-desidrogenase (as enzimas que, respectivamente, formam e

condensam ALA a porfobilinogénio) melhorando deste modo a formação da forma activa, Pp.

O agente de penetração de superfície pode convenientemente ser proporcionado num intervalo de concentração de 0,2 a 50% (p/p), e. g., cerca de 10% (p/p).

As composições da invenção podem adicionalmente ser formuladas e/ou administradas com outros agentes, para melhorar a eficácia de PDT. Além disso, quando se tratam tumores, por exemplo, os inibidores de angiogénese (fármacos antiangiogénicos) que se verificou serem úteis para o tratamento de tumores (O'Reilly *et al.*, *Nature Medicine*, 2, p689-692, 1996; Yamamoto *et al.*, *Anticancer Research*, 14, pl-4, 1994; e Brooks *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 96, pl815-1822, 1995) podem ser utilizados em conjunto com as composições da invenção em PDT para danificar ainda mais o sistema vascular do tumor. Os inibidores de angiogénese que podem ser utilizados incluem TNP-470 (AGM-1470, um análogo sintético de um produto de secreção de fungos denominado fumagilina; Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka, Japão), angiostatina (Surgical Research Lab. no Children's Hospital Medical Center da Harvard Medical School) e integrina $\alpha_v\beta_3$ antagonistas (e. g., anticorpo monoclonal contra integrina $\alpha_v\beta_3$, The Scripps Research Institute, LaJolla, CA).

Alternativamente, ou adicionalmente, os agentes de imunoterapia (e. g., anticorpos ou efectores, tal como factor de activação de macrófagos) ou agentes de quimioterapia podem ser utilizados para melhorar PDT de acordo com a invenção. A administração destes agentes suplementares deve ser realizada em

termos de via, concentração e formulação, de acordo com métodos conhecidos para utilizar estes agentes. Estes agentes adicionais podem ser administrados antes, após ou durante PDT, dependendo da sua função. Por exemplo, podem ser adicionados inibidores de angiogénese 5 a 10 dias após PDT para prevenir o redensolvimento tumoral.

De um modo semelhante podem ser utilizados outros agentes anti-cancro em combinação com uma composição da invenção, quer como parte da formulação ou como um tratamento separado para ser administrado simultaneamente, separadamente ou sequencialmente.

Também se verificou que a glucose auxilia PDT quando aplicada topicamente ou sistemicamente. Quando é contemplada a administração tópica, a formulação, de forma conveniente, e. g., um creme, pode conter 0,01% até 10% de glucose (p/p).

De acordo com o estado a ser tratado e a natureza da composição, os compostos para utilização na invenção podem ser co-administrados com esses outros agentes opcionais, por exemplo numa composição única ou podem ser administrados sequencialmente ou separadamente. Na verdade, em muitos casos, pode ser obtido um efeito fotoaminoterapêutico particularmente benéfico através de pré-tratamento com o agente de auxílio de penetração de superfície num passo separado, antes da administração dos compostos da invenção. Além disso, em algumas situações um pré-tratamento com o agente auxiliar de penetração de superfície, seguida por administração do fotoaminoterapêutico em conjunto com o agente auxiliar de penetração de superfície pode ser benéfico. Quando um agente auxiliar de penetração de superfície é utilizado no pré-tratamento este pode ser utilizado

em elevadas concentrações, e. g., até 100% (p/p). Se este passo de pré-tratamento é empregue, o agente fototerapêutico pode subsequentemente ser administrado até várias horas após pré-tratamento e. g., a um intervalo de 5-60 minutos após pré-tratamento.

Considerando um outro aspecto, a invenção proporciona, deste modo, um produto compreendendo um sal de adição de ácido da invenção, em conjunto com, pelo menos, um agente auxiliar de penetração de superfície e, opcionalmente, um ou mais agentes quelantes como uma preparação combinada para utilização simultânea, separada ou sequencial no tratamento de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que são responsivas a fotoquimioterapia.

Considerado alternativamente, este aspecto da invenção também proporciona um kit para utilização em fotoquimioterapia de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo compreendendo:

- a) um primeiro recipiente contendo um sal de adição de ácido da invenção,
- b) um Segundo recipiente contendo, pelo menos, um agente auxiliar de penetração de superfície; e opcionalmente
- c) um ou mais agentes de quelação contidos no referido primeiro recipiente ou num terceiro recipiente.

Deverá ser entendido que o método de terapia utilizando compostos, como aqui anteriormente descrito, inevitavelmente

envolve a provisão de porfirinas intracelulares que fluorescem no sítio do distúrbio ou anormalidade a ser tratados. Enquanto a intensidade desta fluorescência pode ser utilizada para eliminar as células anormais, a localização da fluorescência pode ser utilizada para visualizar o tamanho, extensão e situação da anormalidade ou distúrbio. A fluorescência pode ser produzida por excitação com luz azul (e. g., luz na região de comprimento de onda de 350-440 nm) e medição na região de comprimento de onda de 550-750 nm.

A anormalidade ou distúrbio assim identificados ou confirmados no sítio da investigação podem então ser tratados através de técnicas terapêuticas alternativas, e. g., cirurgia ou tratamento químico, ou pelo método de terapia da invenção por construção continuada de fluorescência ou através de outra aplicação de compostos da invenção no sítio apropriado. Será entendido que as técnicas de diagnóstico podem exigir menores níveis de fluorescência para visualização do que as utilizadas em tratamentos terapêuticos. Deste modo, geralmente, são adequados intervalos de concentração de 0,2 a 30% e. g., 1-5% (p/p).

Foram considerados anteriormente sítios, métodos e modos de administração em relação às utilizações terapêuticas e são aplicáveis também para diagnosticar utilizações aqui descritas.

Os compostos da invenção podem também ser utilizados para técnicas de diagnóstico *in vitro*, por exemplo, para examinação das células contidas em fluidos corporais. A fluorescência mais elevada associada a tecido não normal pode ser convenientemente indicativo de uma anormalidade ou distúrbio. Este método é

altamente sensível e pode ser utilizado para detecção precoce de anomalias ou distúrbios, por exemplo, carcinoma da bexiga ou do pulmão, através de exame de urina ou de expectoração, respectivamente. Outros fluidos corporais úteis que podem ser utilizados para diagnóstico além de urina e expectoração incluem sangue, sêmen, lágrimas, medula espinhal, etc. Podem ser avaliadas amostras ou preparações de tecidos, por exemplo, amostras de tecidos de biópsias ou de medula óssea. A presente invenção estende-se por isso à utilização de compostos da invenção para diagnóstico de acordo com os métodos acima mencionados para fotoquimioterapia, e produtos e kits para realizar o referido diagnóstico.

Outro aspecto da invenção refere-se a um método de diagnóstico *in vitro*, de anomalias ou distúrbios para ensaiar uma amostra de fluido corporal ou tecido de um doente, compreendendo o referido método, pelo menos, os seguintes passos:

- i) misturar o referido fluido corporal ou tecido com um sal de adição de ácido de acordo com a invenção,
- ii) expor a referida mistura à luz,
- iii) determinar o nível de fluorescência, e
- iv) comparar o nível de fluorescência com níveis de controlo.

A invenção será agora descrita em mais detalhe nos seguintes Exemplos não limitantes, com referência aos desenhos em que:

A Figura 1 apresenta fluorescência na pele após aplicação tópica de formulações de creme contendo sais de cloridrato e

metanossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo, as barras indicam o desvio padrão;

A Figura 2 apresenta a fluorescência na pele após aplicação tópica de formulações de creme contendo sais de cloridrato, metanossulfonato e toluenossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo, as barras indicam o desvio padrão;

A Figura 3 apresenta a higroscopicidade de sais de cloridrato, metanossulfonato e toluenossulfonato de ácido 5-amino-4-oxopentanóico de metilo;

A figura 4 apresenta a higroscopicidade de sais de metanossulfonato e toluenossulfonato de ácido 5-amino-4-oxopentanóico de hexilo.

O Exemplo 3 não forma uma parte da invenção, mas ilustra o método do sal de prata que é utilizado noutros exemplos para preparar compostos que estão de acordo com a invenção.

Exemplo 1 - Preparação de 5-amino-4-oxopentanoato toluenossulfonato de hexilo

Foi adicionado hidrogenocarbonato de sódio (0,42 g; 5,0 mmol) a uma solução de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo (0,5 g; 2,0 mmol) em água (10 mL) e diclorometano (5 mL). A mistura foi agitada exaustivamente e deixada a separar. A camada orgânica foi removida por pipetagem e adicionada a ácido p-toluenossulfônico (0,38 g; 2,0 mmol). A porção aquosa foi extraída com diclorometano (1 x 1 mL). As soluções orgânicas combinadas foram evaporadas, deixando um óleo

amarelo que solidificou sob armazenamento, de um dia para o outro, num congelador. O resíduo foi purificado por cromatografia flash numa coluna 60 de 170 x 25 mm de sílica gel eluída com acetonitrilo (150 mL), 5% metanol em acetonitrilo (500 mL) e 10% metanol em acetonitrilo (250 mL), recolhendo fracções de 15 x 50 mL. As fracções contendo o produto foram evaporadas, deixando 0,31 g (40%) de resíduo.

RMN de ^1H : (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 0,87 (3H, t, $J = 7$ Hz), 1,26 (6H, br s), 1,56 (2H, m), 2,29 (3H, s), 2,54 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2,79 (2H, t, $J = 6$ Hz), 4,0 (4H, m), 7,12 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,48 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8,04 (3H, br s).

Exemplo 2 - Preparação de 5-amino-4-oxopentanoato metanossulfonato de hexilo (método de permuta iónica)

Uma solução de 5-amino-4-oxopentanoato cloridrato de hexilo (1,0 g; 4,0 mmol) em água (5 mL) e 96% de etanol (5 mL) foi passada através de uma coluna de Amberlyst A-26 (OH) (2,1 g; 8,8 meq) numa solução de ácido metanossulfónico (0,38 g; 4,0 mmol) em água (3 mL). A coluna de resina foi lavada com 50% aq. etanol (10 mL) e os eluentes combinados foram evaporados até à secagem.

Após secagem, de um dia para o outro, o resíduo foi purificado através de cromatografia flash numa coluna 60 de 170 x 25 mm de sílica gel com acetonitrilo (200 mL), 5% de metanol em acetonitrilo (500 mL), 7,5% de metanol em acetonitrilo (500 mL) e 10% de metanol em acetonitrilo (750 mL), recolhendo 27 fracções x 50 mL. A evaporação das fracções

contendo produto produziu 0,77 g (62%) de resíduo, pf 132-134 °C.

RMN de ^1H : (200 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 0,87 (3H, t, $J = 6$ Hz), 1,27 (6H, br s), 1,56 (2H, m, $J = 6$ Hz), 2,35 (3H, s), 2,55 (2H, t, $J = 6$ Hz), 2,80 (2H, t, $J = 6$ Hz), 4,00 (4H, m), 8,08 (3H, br s).

RMN de ^{13}C : (50 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 13,8, 21,8, 24,9, 27,0, 30,8, 34,1, 39,5, 46,6, 64,0, 171,8, 202,4.

Exemplo 3 - Preparação de metanossulfonato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (método de sal de prata).

Uma solução de cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) em água (5 mL) foi adicionada a uma solução agitada de metanossulfonato de prata (1,22 g; 6,0 mmol) em água (10 mL) num frasco de erlenmeyer com rolha embrulhada com película de alumínio. A mistura foi agitada, de um dia para o outro, e transferida para tubos de centrífuga. A mistura foi centrifugada e decantada. O resíduo foi lavado com água (2 x 1 mL). Após centrifugação, as soluções aquosas combinadas foram liofilizadas, de um dia para o outro, para produzir metanossulfonato de ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,3 g; 96% de rendimento), pf 153,5-154,5 °C.

RMN de ^1H : (200 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 2,39 (3H, s), 2,50 (2H, t, $J = 6$ Hz), 2,72 (2H, t, $J = 4$ Hz), 3,97 (2H, s), 8,08 (3H, br s).

RMN de ^{13}C : (50 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 27,2, 34,2, 39,5, 46,6, 173,2, 202,6

Exemplo 4 - Metanossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo

Preparado a partir de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo e metanossulfonato de prata utilizando o método de sal de prata, pf 135-137 °C.

RMN de ^1H : (200 MHz; DMSO- d_6): δ 2,29 (3H, s), 2,54 (2H, t, $J = 8$ Hz), 2,79 (2H, t, $J = 6$ Hz), 3,59 (3H, s), 3,98 (2H, s), 7,13 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,50 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8,07 (3H, br a).

RMN de ^{13}C : (50 MHz; DMSO- d_6): δ 20,7, 26,8, 34,1, 46,6, 51,4, 125,3, 127,9, 137,7, 145,1, 172,2, 202,4.

Exemplo 5 - 5-Amino-4-oxopentanoatotoluenossulfonato de metilo

Preparado a partir de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo e p-toluenossulfonato de prata utilizando o método de sal de prata, pf 138-140 °C.

RMN de ^1H : (200 MHz; DMSO- d_6): δ 2,29 (3H, s), 2,54 (2H, t, $J = 8$ Hz), 2,79 (2H, t, $J = 6$ Hz), 3,59 (3H, s), 3,98 (2H, s), 7,13 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,50 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8,07 (3H, br s).

RMN de ^{13}C : (50 MHz; DMSO- d_6): δ 20,7, 26,8, 34,1, 46,6, 51,4, 125,3, 127,9, 137,7, 145,1, 172,2, 202,4.

Exemplo 6 - 5-Amino-4-oxopentanoatometanossulfonato de hexilo

Preparado a partir de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo e metanossulfonato de prata utilizando o método de sal de prata, pf 125 °C e 134-136 °C (diferentes formas cristalinas).

RMN de ^1H : (200 MHz; DMSO- d_6): δ 0,87 (3H, t, $J = 6$ Hz), 1,27 (6H, br s), 1,56 (2H, m, $J = 6$ Hz), 2,35 (3H, s), 2,55 (2H, t, $J = 6$ Hz), 2,80 (2H, t, $J = 6$ Hz), 4,00 (4H, m), 8,08 (3H, br s).

RMN de ^{13}C : (50 MHz; DMSO- d_6): δ 13,8, 21,8, 24,9, 27,0, 30,8, 34,1, 39,5, 46,6, 64,0, 171,8, 202,4.

Exemplo 7 - 5-Amino-4-oxopentanoatotoluenossulfonato de hexilo

Preparado a partir de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo e p-toluenossulfonato de prata utilizando o método de sal de prata, pf 116-118 °C.

RMN de ^1H : (200 MHz; DMSO- d_6): δ 0,86 (3H, t, $J = 6$ Hz), 1,26 (6H, br s), 1,53 (2H, m), 2,29 (3H, s), 2,53 (2H, t, $J = 6$ Hz), 2,78 (2H, t, $J = 6$ Hz), 4,0 (4H, m), 7,12 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,50 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8,06 (3H, br s),

RMN de ^{13}C : (50 MHz; DMSO- d_6) δ 13, 8, 20,7, 21,9, 24,9, 27,0, 28,0, 30,8, 34,1, 46,6, 64,0, 125, 3, 127, 9,137, 6, 145,2, 171,8, 202,4.

Exemplo 8 - Formulações

Diferentes sais de ésteres 5-amino-4-oxopentanoico foram formulados em Unguentum Merck para estudos dérmicos. Todas as formulações de cremes continham 0,5 mmol de substância por 10 g de creme para assegurar a mesma concentração molar (assumindo que 10 g de creme iguala 10 mL, a concentração molar aprox. é 0,5 mmol/10 mL ou 50 mM). A preparação das formulações é delineada na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Formulações dérmicas

Substância-sal*	Peso Mol.	Formulação** (mg/10 g de creme)
5-amino-4-oxopentanoato-HCl de hexilo	251	125
5-amino-4-oxopentanoato-metanossulfonato de hexilo	294	150
5-amino-4-oxopentanoato-toluenossulfonato de hexilo	372	190
5-amino-4-oxopentanoato-HCl de metilo	181	100
5-amino-4-oxopentanoato-metanossulfonato de metilo	224	125
5-amino-4-oxopentanoato-toluenossulfonato de metilo	302	170

*Todos os sais foram preparados pelo método de sal de prata
**Todas as formulações continham 0,5 mmol de sal por 10 g de
creme

Exemplo 9 - Actividade biológica - Sais de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo

Método: Foram utilizadas no estudo fêmeas de murganhos nude atímicos Balb/c, pesando cerca de 22 g, obtidas a partir do Department of Laboratory Animals, O Norwegian Radium Hospital, Oslo, Noruega. Cada grupo consistiu em três murganhos.

Cada murganho recebeu 0,05-0,1 g de formulação (ver Exemplo 8) aplicado topicamente no flanco direito do corpo, distribuída equitativamente e coberta com uma ligadura (Opsite Flexigrid; Smith e Nephew Medical Ltd., Hull, Inglaterra).

O dispositivo que mede o ponto de fibra utilizado consistiu num feixe de fibras ópticas ligadas a um espectrofluorímetro que produziu a luz de excitação de 407 nm. A luz de excitação, que é capaz de penetrar 0,1-0,5 mm no tecido, foi conduzida através de metade das fibras para a pele do murganho. O espectro de fluorescência de emissão resultante (550-750) nm foi recolhido e conduzido através das fibras restantes para um fotomultiplicador para quantificação. O espectro de fluorescência da pele foi medido a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas após a administração e representado graficamente contra o tempo.

Pode ser observado a partir da Figura 1 que o sal de metanossulfonato de 5-aminolevulinato de metilo produziu um

aumento considerável na fluorescência da pele, em comparação com o sal de cloridrato.

Exemplo 10 - Actividade Biológica - Sais de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo

A preparação de formulações é descrita no Exemplo 8. Foi utilizado o mesmo sistema experimental que no Exemplo 9 e os resultados são apresentados na Figura 2.

Pode ser observado a partir da Figura 2 que os sais de metanossulfonato e toluenossulfonato de 5-aminolevulinato de hexilo produziu aproximadamente a mesma fluorescência da pele que o sal de cloridrato.

Exemplo 11 - Higróspicidade de cloridrato metanossulfonato e toluenossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo.

Amostras (2 mg) de cloridrato, metanossulfonato e toluenossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo foram mantidas à temperatura ambiente e à humidade ambiente durante 4 dias. Não foi observável alteração.

Amostras (2 mg) do cloridrato, metanossulfonato, e toluenossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo foram mantidas à temperatura ambiente e 100% de humidade. O cloridrato tinha deliquescido após estar em repouso, de um dia para o outro. O metanossulfonato tinha deliquescido após dois dias,

enquanto que o toluenossulfonato tinha deliquescido após quatro dias.

Exemplo 12 - Higroscopicidade de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo, metanossulfonato e toluenossulfonato.

Amostras de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo, metanossulfonato e toluenossulfonato foram pesadas e mantidas em copos de plástico de 30 mL numa câmara fechada a humidade relativa de 75-84% em solução de sulfato de amónio saturada à temperatura ambiente (ca 25 °C). As amostras foram então pesadas após diferentes intervalos de tempo para monitorizar a incorporação de água. O aspecto das amostras foi também verificado ao mesmo tempo para determinar o início da deliquescência. Os resultados são apresentados na Figura 3.

Pode ser observado a partir da Figura 3 que ambos os sais de cloridrato e de mesilato incorporaram água numa extensão considerável, como monitorizado em peso e que o início da deliquescência ocorreu após 22 h (como indicado pelos asteriscos na figura). Em contraste, o sal de tisolato de 5-amino-4-oxopentanoato de metilo não retirou água e não alterou o aspecto durante o período de teste.

Exemplo 13 - Higroscopicidade de cloridrato metanossulfonato e toluenossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo

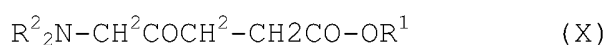
Amostras de cloridrato e toluenossulfonato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo foram pesadas e mantidas em copos de plástico de 30 mL numa câmara fechada a humidade relativa de 75-84% em solução de sulfato de amónio saturada à temperatura ambiente (ca. 25 °C). As amostras foram então pesadas após diferentes intervalos de tempo para monitorizar a incorporação de água. O aspecto das amostras foi também verificado ao mesmo tempo para determinar o início da deliquescência. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Pode ser observado na Figura 4 que o sal de cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de hexilo não retirou água numa extensão considerável, como monitorizado em peso, mas o início da deliquescência ocorreu após apenas 5,0 h (como indicado por um asterisco na figura). O sal de mesilato retirou água em alguma extensão, mas a deliquescência não ocorreu. O sal de tosilato de 5-amino-4-oxolevulinato de hexilo não retirou água e não alterou o aspecto durante o período de teste.

Lisboa, 30 de Junho de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Sal de adição de ácido de um éster de ácido 5-aminolevulínico (éster 5-ALA) com um ácido que é um ácido sulfónico ou um derivado de ácido sulfónico, em que o referido éster de 5-ALA é um composto de fórmula X:

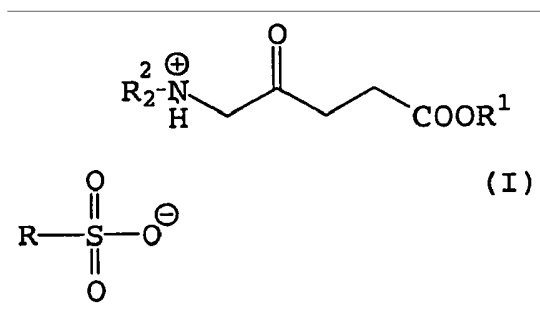


em que R^1 representa um grupo alquilo C_{1-6} de cadeia linear não substituído;

R^2 representa cada, independentemente, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclico opcionalmente substituído, contendo até 20 átomos de carbono que podem ser opcionalmente interrompidos com um ou mais grupos $-O-$, $-NR^3-$, $-S-$ ou PR^3- ; e

R^3 é um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo C_{1-6} .

2. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 1, em que na fórmula X, cada R^2 representa um átomo de hidrogénio.
3. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 1, em que o referido composto de fórmula X é éster metílico de 5-ALA ou éster hexílico de 5-ALA.
4. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 1 de fórmula 1:



em que

R é um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo C₁₋₂₀ opcionalmente substituído ou um grupo arilo até 20 átomos de carbono;

e

R¹ e R² são como definido na reivindicação 1.

5. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 4, em que R é alquilo ou arilo opcionalmente substituídos.
6. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 4, em que R é fenilo ou metilo opcionalmente substituídos.
7. Sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 4 a 6, em que na fórmula I, cada R² representa um átomo de hidrogénio.

8. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 4 que é um sal de adição de ácido sulfónico do éster metílico de 5-ALA ou éster hexílico de 5-ALA.
9. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 1 ou reivindicação 8, em que o referido ácido é ácido naftaleno-1,5-dissulfónico, ácido etano-1,2-dissulfónico, ácido p-toluenossulfónico, ácido metanossulfónico, ácido dodecilsulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido benzenossulfónico, ácido 2-hidroxi-etanossulfónico, ácido etanossulfónico ou ácido (+)-canfor-10-sulfónico.
10. Sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer reivindicação anterior, em que o referido ácido é farmacologicamente aceitável.
11. Processo para preparar um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, compreendendo o referido processo a reacção de um éster de ácido 5-aminolevulínico com um ácido, como definido na reivindicação 1.
12. Processo para a preparação de um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, compreendendo o referido processo a reacção do ácido 5-aminolevulínico, ou um seu derivado esterificável, com um álcool ou um seu derivado formador de éster na presença de um ácido, como definido na reivindicação 1.

13. Processo como reivindicado na reivindicação 12 que compreende a reacção de ácido 5-aminolevulínico, ou um seu derivado estrificável, com um alanol.
14. Processo para a preparação de um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, compreendendo o referido processo:
- i) colocar em contacto uma solução compreendendo um composto da fórmula $\text{Cl}^- \text{R}^2_2 \text{N}^+ \text{H} - \text{CH}_2 \text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{R}^1$, em que R^1 e R^2 são como definido na reivindicação 1, com uma resina de permuta iónica;
 - ii) opcionalmente a remoção da referida resina; e
 - iii) mistura da solução resultante com uma solução compreendendo um ácido sulfónico ou um derivado de ácido sulfónico.
15. Processo como reivindicado na reivindicação 14, em que o referido sal de adição de ácido é um composto de fórmula I como definido na reivindicação 4.
16. Processo para a preparação de um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, compreendendo o referido processo:
- i) fazer reagir um composto da fórmula $\text{Cl}^- \text{R}^2_2 \text{N}^+ \text{H} - \text{CH}_2 \text{COCH}_2 \text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{R}^1$, em que R^1 e R^2 são como definido na reivindicação 1, com um sal de prata de um

ácido sulfônico ou um derivado de ácido sulfônico, num solvente em que AgCl é substancialmente insolúvel; e

ii) opcionalmente separar o AgCl do sal resultante.

17. Processo como reivindicado na reivindicação 16, em que o referido sal de adição de ácido é um composto de fórmula I como definido na reivindicação 4.
18. Composição farmacêutica compreendendo um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em conjunto com, pelo menos, um veículo ou excipiente farmacêutico.
19. Sal de adição de ácido ou composição como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 18 para utilização como medicamento.
20. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 19 para utilização em terapia fotodinâmica.
21. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 19 para utilização em fotoquimioterapia.
22. Sal de adição de ácido como reivindicado na reivindicação 21 para o tratamento de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que são responsivas a fotoquimioterapia.
23. Utilização de um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 18, para a

preparação de um agente terapêutico para utilização em fotoquimioterapia.

24. Produto compreendendo um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 18, em conjunto com pelo menos um agente auxiliar de penetração na superfície, e opcionalmente um ou mais agentes quelantes como uma preparação combinada para a utilização simultânea, separada ou sequencial no tratamento de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que são responsivas a fotoquimioterapia.

25. Kit para utilização em fotoquimioterapia de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo compreendendo:
 - a) um primeiro recipiente contendo um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 18,

 - b) um segundo recipiente contendo, pelo menos, um agente auxiliar de penetração de superfície; e opcionalmente

 - c) um ou mais agentes de quelação contidos no referido primeiro recipiente ou num terceiro recipiente.

26. Método de diagnóstico *in vitro* de anomalias ou distúrbios por ensaio de uma amostra de fluido corporal ou tecido de um doente, compreendendo o referido método, pelo menos, um dos passos que se seguem:

- i) mistura do referido fluido corporal ou tecido com um sal de adição de ácido como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 18,
- ii) exposição da referida mistura à luz,
- iii) avaliação do nível de fluorescência, e
- iv) comparação do nível de fluorescência com os níveis de controlo.

Lisboa, 30 de Junho de 2011

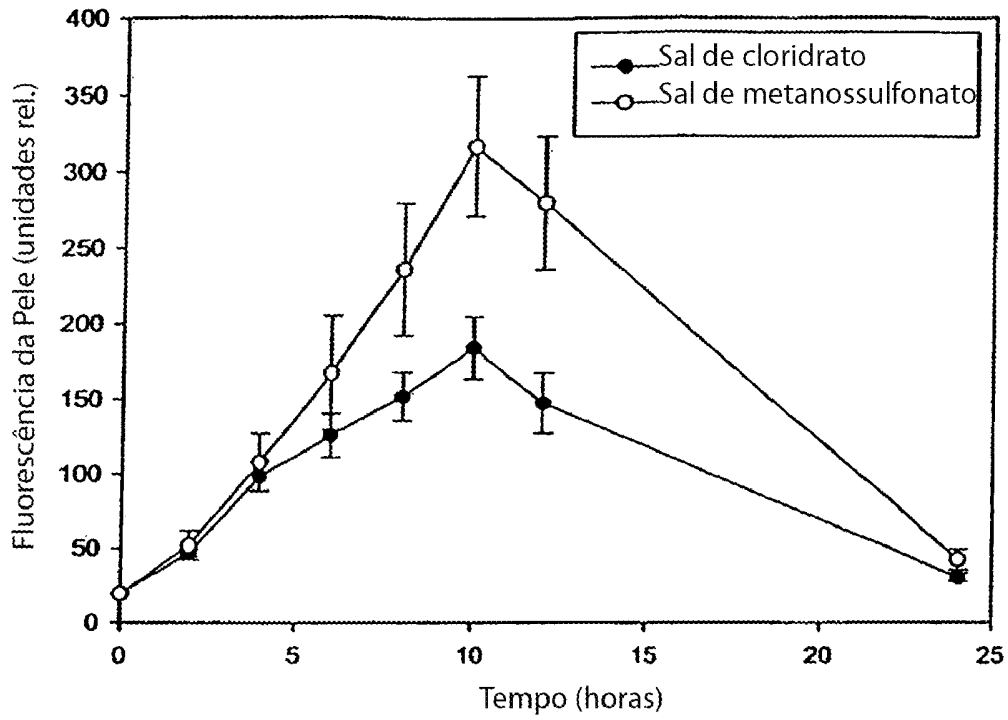


Figura 1

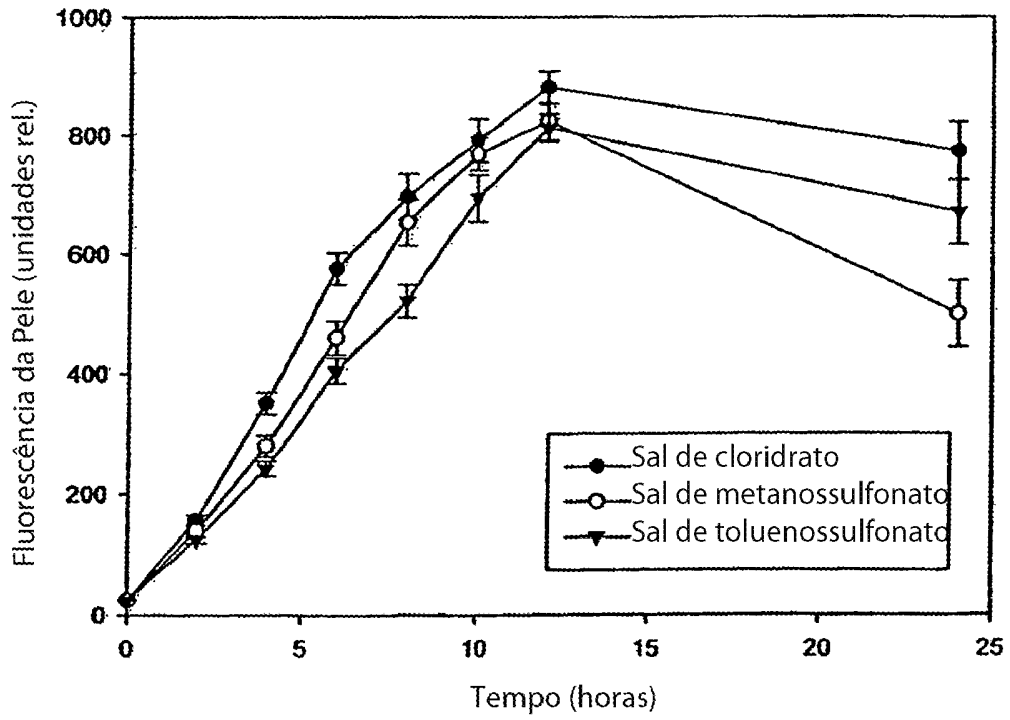


Figura 2

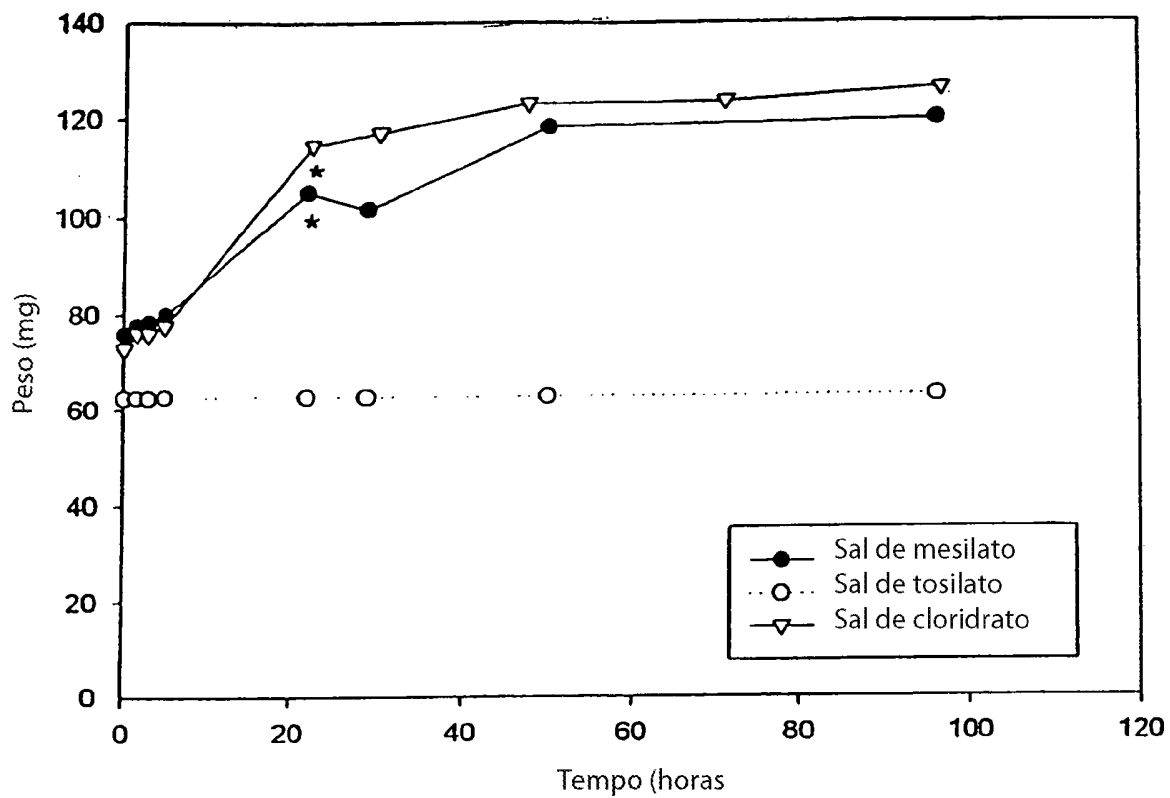


Figura 3

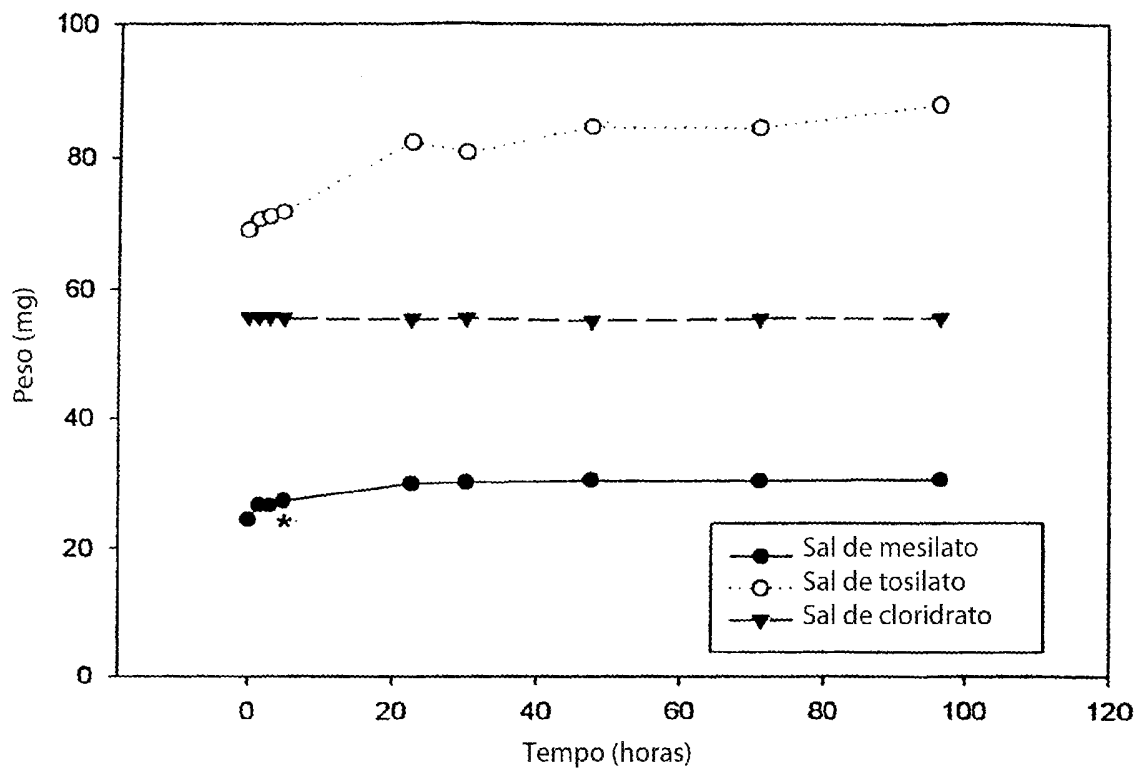


Figura 4

RESUMO

"SAIS DE ADIÇÃO ÁCIDA DE ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO OU SEUS DERIVADOS"

A presente invenção proporciona um sal de adição ácida de ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) ou de um derivado de 5-ALA (e. g. um éster de 5-ALA) com um ácido que possui um pKa de cerca de 5 ou inferior, de um modo preferido, cerca de 3 ou inferior, com a condição de o ácido ser outro que não o ácido clorídrico. Os sais particularmente preferidos são os derivados de ácidos seleccionados do grupo compreendendo ácido sulfónico e seus derivados, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido fosfórico. Os sais de acordo com a invenção são particularmente adequados para utilização como agentes de fotossensibilização em diagnóstico e fotoquimioterapia de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo.