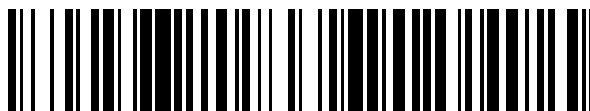


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 681**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 41/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2004** **E 12161556 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2471512**

54 Título: **Formulaciones de fotosensibilizadores no polares para terapia fotodinámica**

30 Prioridad:

**26.08.2003 US 648168**

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

**14.04.2016**

73 Titular/es:

**BIOLITEC UNTERNEHMENS BETEILIGUNGS LL  
AG (100.0%)  
Untere Viaduktgasse 6/9  
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**ALBRECHT, VOLKER;  
FAHR, ALFRED;  
SCHEGLMANN, DIETRICH;  
GRÄFE, SUSANNA y  
NEUBERGER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

### Observaciones :

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

ES 2 566 681 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de fotosensibilizadores no polares para terapia fotodinámica

## Antecedentes de la invención

## 1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la preparación de formulaciones liposómicas que contienen Temoporina u otros fotosensibilizadores no polares y a su uso en terapia, en particular usando inyección intravenosa.

## 2. Declaración de Divulgación de Información

10 Los liposomas son vesículas artificiales compuestas de bicapas lipídicas concéntricas separadas por compartimientos de agua y se han investigado extensamente como vehículos de administración de fármacos. Debido a su estructura, composición química y tamaño coloidal, los cuales pueden ser bien controlados por los métodos de preparación, los liposomas presentan varias propiedades que pueden ser útiles en diversas aplicaciones. Las propiedades más importantes son el tamaño coloidal, es decir, distribuciones de tamaño de partícula más bien uniforme en el rango de 20 nm a 10 µm, y características especiales de membrana y superficie.

15 Los liposomas se usan como vehículos para fármacos y antígenos porque pueden servir para varios propósitos diferentes (Storm y Crommelin, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **1**, 19-31 1998). Los fármacos encapsulados en liposomas son inaccesibles a las enzimas metabolizadoras. Por el contrario, los componentes del cuerpo (tales como eritrocitos o tejidos en el sitio de la inyección) no están directamente expuestos a la dosis completa del fármaco. La duración de la acción del fármaco puede ser prolongada por los liposomas debido a una liberación más lenta del fármaco en el cuerpo. Los liposomas que poseen un potencial de dirección, lo que significa, 20 opciones de focalización cambian la distribución del fármaco en el cuerpo. Las células usan los mecanismos de endocitosis o fagocitosis para incorporar los liposomas al citosol. Además, los liposomas pueden proteger a un fármaco contra la degradación (por ejemplo, la degradación metabólica). Aunque a veces tienen éxito, los liposomas tienen limitaciones. Los liposomas no sólo administran fármacos al tejido enfermo, sino que también entran rápidamente en el hígado, el bazo, los riñones y los sistemas reticuloendoteliales, y pierden fármacos mientras están 25 en circulación (Harris y Chess, *Nature*, marzo 2003, **2**, 214-221).

La pegilación es un método alternativo para superar estas deficiencias. En primer lugar, la pegilación mantiene los niveles del fármaco dentro de la ventana terapéutica durante períodos de tiempo más largos y proporciona el fármaco como un resto de circulación duradera que se degrada gradualmente en fragmentos más pequeños, más activos, y/o más fáciles de eliminar. En segundo lugar, permite que las micropartículas que contienen fármaco de 30 circulación duradera o las grandes macromoléculas se acumulen lentamente en sitios patológicos con vasculatura o expresión de receptores afectada y mejora o intensifica la administración de fármacos en esas áreas. En tercer lugar, puede ayudar a conseguir un mejor efecto de focalización para aquellos fármacos dirigidos y vehículos de fármacos, que se supone que alcanzan las áreas patológicas con flujo sanguíneo disminuido o con una baja concentración de un antígeno diana. Los beneficios de la pegilación típicamente resultan en una estabilidad incrementada (temperatura, pH, disolvente, etc.), una inmunogenicidad y antigenicidad significativamente reducidas, una 35 resistencia a las proteasas, un mantenimiento de la actividad catalítica, y mejoras en la solubilidad, entre otras características, y una estabilidad líquida incrementada del producto y una agregación inducida por agitación reducida.

Las membranas de los liposomas que contienen especies compatibles con bicapas, tales como poli(etilenglicol)-enlazados con lípidos (PEG-lípido) o gangliósidos se están usando para preparar los liposomas encubiertos 40 (Papahadjopoulos et al., *PNAS*, **88**, 11460-4 1991). Los liposomas encubiertos tienen una vida media relativamente larga en la circulación sanguínea y muestran una biodistribución alterada *in vivo*. Vaage et al. (*Int. J. of Cancer* **51**, 942-8, 1992) prepararon liposomas encubiertos de doxorubicina y los usaron para tratar carcinomas primarios de ratón con crecimiento bien establecido y recientemente implantados, y para inhibir el desarrollo de metástasis espontáneas de implantes tumorales intra-mamarios. Llegaron a la conclusión de que el tiempo de circulación largo de los liposomas encubiertos de formulación de doxorubicina explica su superior eficacia terapéutica. La presencia de lípidos derivatizados con MPEG (pegilados) en la membrana bicapa de liposomas estéricamente estabilizados proporciona efectivamente una barrera estérica contra las interacciones con las proteínas plasmáticas y los 45 receptores de la superficie celular que son responsables de la rápida desestabilización/ruptura intravascular y la remoción RES vista después de la administración i.v. de liposomas convencionales. Como resultado, los liposomas pegilados tienen una vida media de circulación prolongada, y la farmacocinética de cualquier agente encapsulado es alterada para ajustarse a aquellas del vehículo liposomal en lugar de las del fármaco atrapado (Stewart et al., *J. Clin. Oncol.* **16**, 683-691, 1998). Debido a que el mecanismo de localización del tumor de los liposomas pegilados es por medio de extravasación a través de vasos sanguíneos con fugas en el tumor (Northfelt et al., *J. Clin. Oncol.* **16**, 2445-2451, 1998; Muggia et al., *J. Clin. Oncol.* **15**, 987-993, 1997), la circulación prolongada es probable que 50 favorezca la acumulación en el tumor incrementando el número total de pasadas realizadas por los liposomas pegilados a través de la vasculatura del tumor.

La terapia fotodinámica (TFD) es una de las nuevas técnicas más prometedoras que se están explorando para su uso en una variedad de aplicaciones médicas y se conoce como un tratamiento bien reconocido para la destrucción

de tumores ("Pharmaceutical development and medical applications of porphyrin-type macrocycles", T.D. Mody, J. Porphyrins Phthalocyanines, **4**, 362-367 2000). Otra aplicación importante de la TFD es el tratamiento de enfermedades infecciosas debidas a microorganismos patogénicos incluyendo infecciones dérmicas, dentales, supurativas, respiratorias, gastrointestinales, genitales y otras infecciones.

- 5 Un problema constante en el tratamiento de enfermedades infecciosas es la falta de especificidad de los agentes usados para el tratamiento de la enfermedad, lo que resulta en que el paciente adquiera un nuevo conjunto de enfermedades derivadas de la terapia.

10 El uso de la TFD para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades es limitado debido a las características inherentes de los fotosensibilizadores. Éstas incluyen su alto costo, retención prolongada en el organismo huésped, sustancial fototoxicidad en la piel, toxicidad de fondo, baja solubilidad en disoluciones fisiológicas (lo que reduce su utilidad para la administración intravascular, ya que puede provocar accidentes tromboembólicos), y baja eficacia en la focalización. Estas desventajas conducen a la administración de dosis extremadamente altas de un fotosensibilizador, lo que incrementa dramáticamente la posibilidad de la acumulación del fotosensibilizador en tejidos no dañados y el consiguiente riesgo de afectar sitios no dañados.

- 15 Una de las estrategias prospectivas para incrementar la especificidad de los fotosensibilizadores y la eficacia de la TFD es la conjugación de un fotosensibilizador con un vector ligando, que se une específicamente a los receptores sobre la superficie de una célula diana. Se pueden utilizar varias moléculas naturales y sintéticas reconocidas por las células diana como tales vectores. Esta estrategia se usa ahora en el diseño de nuevas generaciones de fotosensibilizadores para el tratamiento de tumores. ("Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy" E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brueckner, Tetrahedron, **54**, 4151-4202 1998).

20 Otra estrategia para incrementar la selectividad para el tumor mediante la focalización de fotosensibilizadores a las células tumorales es usando liposomas, por ejemplo, liposomas conjugados con transferrina (Derycke y De Witte, Int. J. Oncology **20**, 181-187, 2002). Debido a que los liposomas no conjugados son a menudo fácilmente reconocidos y eliminados por el sistema reticuloendotelial, se usaron liposomas PEGilados. (Woodle y Lasic, Sterically stabilized liposomes, Biochim Biophys Acta **1113**, 171-199, 1992; Dass et al., Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes. J Pharm Pharmacol **49**, 972-975, 1997).

30 La publicación WO 01/08660 (Philbert et al) describe la destrucción celular a través de efectores radiativos sin fibras que encapsulan un generador de radicales libres. Los efectores radiativos sin fibras incluyen una matriz de polímero, un colorante fotodinámico, un material de camuflaje y al menos un elemento de reconocimiento molecular para focalización a una diana biológica. Este documento describe que el compuesto fotodinámico puede ser una porfirina y que los liposomas y los liposomas recubiertos de poli(etilenglicol), pueden usarse como un material de camuflaje.

35 Dado que la aplicación de la terapia fotodinámica en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades está incrementando rápidamente, hay también una mayor demanda de nuevas formulaciones de fotosensibilizadores. Estas nuevas formulaciones de fotosensibilizadores necesitan ser más estables, fáciles de fabricar y de manejar. Además, especialmente los fotosensibilizadores no polares más hidrofóbicos, deberían ser capaces de focalizar el tejido de una manera eficiente y selectiva.

#### Objetivos y breve resumen de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una formulación de fotosensibilizador mejorada para su uso en terapia fotodinámica (TFD).

- 40 Es otro objeto de la presente invención incorporar fotosensibilizadores no polares en una membrana liposomal permitiendo así que las sustancias no polares y polares sean transportadas usando el mismo vehículo.

Es un objeto adicional de la presente invención preservar la estructura y el tamaño de las construcciones liposomales con fotosensibilizador no polar incorporado durante los procesos de liofilización mediante la adición de monosacáridos o polialcoholes como crioprotectores.

- 45 Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar una formulación de fotosensibilizador con propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Es todavía otro objeto de la presente invención mejorar el transporte de fotosensibilizadores no polares a través de la membrana celular y por lo tanto incrementar la eficacia de la TFD.

El contenido de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

- 50 Según un aspecto principal de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica liposomal para terapia fotodinámica, que comprende una bicapa liposomal, que consiste substancialmente en fosfolípidos que comprenden fosfolípidos conectados a poli(etilenglicol), dipalmitoil fosfatidil colina y dipalmitoil fosfatidil glicerol; y una cantidad terapéuticamente efectiva de fotosensibilizador no polar, en donde dicho fotosensibilizador es seleccionado del grupo que consiste en di- y tetra-hidroporfinas.

La presente invención implica una formulación farmacéutica liposomal para terapia fotodinámica que comprende un fotosensibilizador de porfirina no polar y uno o más fosfolípidos, los cuales son estables en almacenamiento sin requerir liofilización. La formulación liposomal proporciona cantidades terapéuticamente efectivas del fotosensibilizador para administración intravenosa. Los fosfolípidos conectados a poli(etilenglicol) son fosfolípidos modificados por pegilación, esto es, contienen poli etilenglicol como una parte integral de los fosfolípidos. Los liposomas formados contienen el fotosensibilizador no polar dentro de la membrana y son útiles para la focalización combinada de un fotosensibilizador no polar y una segunda sustancia polar. Cuando una formulación incluye la presencia de monosacáridos o polialcoholes, puede ser eficientemente liofilizada preservando el tamaño de los vehículos liposomales y el contenido de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente fotosensibilizador. También se describe la composición de liposomas formados después de la reconstitución con un vehículo acuoso. La formulación liofilizada tras la reconstitución con un vehículo acuoso adecuado forma liposomas que son también útiles para administración intravenosa.

Los objetivos, características y ventajas anteriores, y adicionales, de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción leída conjuntamente con las figuras adjuntas.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una curva de filtración en gel de una formulación liposomal de mTHPC. Tanto los componentes lipídicos como la mTHPC muestran la misma distribución en todas las fracciones recogidas.

La Figura 2 muestra la medición de fluorescencia inducida por luz (FIL) de tumores Colo 26 con la piel intacta, ratones Swiss nu/nu 0,5 mg /kg, con inyección intravenosa de mTHPC, producto A y B dando la acumulación en el tumor como función del tiempo de post-inyección.

La Figura 3 muestra el efecto de la TFD 6 h después de la inyección intravenosa de los productos A, B y mTHPC. Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) (0,25 ml) azul de Evans (1%) inmediatamente después del tratamiento con TFD y se sacrificaron después de 24 h.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se describe a continuación una formulación farmacéutica liposomal para terapia fotodinámica que comprende un fotosensibilizador de porfirina no polar y uno o más fosfolípidos, que son estables en almacenamiento sin requerir liofilización. La formulación liposomal proporciona cantidades terapéuticamente efectivas del fotosensibilizador para administración intravenosa. Los fosfolípidos conectados a poli(etilenglicol) son fosfolípidos modificados por pegilación, esto es, contienen poli etilenglicol como una parte integral de los fosfolípidos. Los liposomas formados contienen el fotosensibilizador no polar dentro de la membrana y son útiles para la focalización combinada de un fotosensibilizador no polar y una segunda sustancia polar.

La formulación se puede conservar por un procedimiento de liofilización usando un monosacárido o polialcohol, pero no tiene por qué serlo para tener una vida útil razonablemente estable. El ciclo del proceso conserva el tamaño del vehículo liposomal, así como el contenido en la membrana del compuesto fotosensibilizador.

Los fotosensibilizadores no polares en esta invención son seleccionados del grupo que consiste en di- y tetra-hidroporfinas. En particular, los fotosensibilizadores que se emplean ventajosamente en la práctica de esta invención, están basados en fotosensibilizadores de macrociclo de porfirina, que incluyen deuteroporfirina, etioporfirina, protoporfirina, hematoporfirina, feofóbido y derivados de los mismos, especialmente di-y tetra-hidroporfinas, que tienen máximos de absorción de luz en el intervalo de 640-780 nanómetros.

Los fosfolípidos conectados a poli(etilenglicol) son fosfolípidos modificados por pegilación (contienen poli etilenglicol como parte integral). Los liposomas formados contienen el fotosensibilizador no polar dentro de la membrana y son útiles para la focalización combinada de un fotosensibilizador no polar y una segunda sustancia polar.

Las formulaciones de fotosensibilizador son útiles para dirigir la molécula de fotosensibilizador no polar a las células o tejidos no deseados u otros materiales indeseables y, después de la irradiación con una fuente de luz apropiada, para dañar la diana. Las formulaciones de fotosensibilizador son también útiles para monitorizar las células o tejidos no deseados u otros materiales no deseados mediante el uso de métodos de formación de imágenes por fluorescencia con o sin activación fotoquímica limitada del fotosensibilizador.

Especialmente, la formulación liposomal de la invención es útil para el transporte de fotosensibilizadores no polares. Las sustancias no polares están integradas dentro de la membrana de los vehículos, creando de este modo una estructura que se abre más fácilmente, liberando el fotosensibilizador para una acción directamente en la membrana celular. Este mecanismo administra el fotosensibilizador directamente al sistema de membrana celular, un lugar preferido de acción. Así, el fotosensibilizador, siendo activado eficazmente mediante la iluminación con una fuente de luz externa adecuada, puede dañar irreversiblemente las células, tejidos u otras estructuras no deseadas.

Las formulaciones liposomales construidas convencionalmente son usadas para el transporte de varios compuestos atrapados en la parte luminal del vehículo. La invención se centra en la combinación de dos compartimentos de transporte diferentes dentro de un liposoma permitiendo un transporte combinado de sustancias no polares y polares. De esta manera, al residir el fotosensibilizador dentro de la membrana, los agentes fotosensibilizadores se

dirigen efectivamente a su lugar de acción, pero la parte luminal dentro de la partícula liposomal se mantiene libre para la inclusión de otras sustancias, incluidos fármacos que pudieran tener un efecto beneficioso en la terapia.

Además, la combinación de monosacáridos como glucosa y el fotosensibilizador unido a fosfolípidos es una herramienta excelente para preservar el tamaño de los liposomas durante la liofilización y la rehidratación usando un carbohidrato fisiológico común en lugar de disacáridos.

Este concepto versátil permite la adición de sustancias, que tendrán un efecto beneficioso en la terapia. La combinación de dos o más sustancias, junto con un fotosensibilizador unido a la membrana dentro de un vehículo permitirá influir directa o indirectamente en el contenido de oxígeno de las células diana influyendo así en la eficacia de la terapia fotodinámica. Por ejemplo, tales efectos pueden lograrse mediante la adición de inhibidores de actividades enzimáticas, como los inhibidores de la tioredoxina reductasa (TrxR) de mamífero. Por lo tanto, siendo efectivo sólo después de alcanzar el citoplasma de las células diana, el inhibidor bloqueará la vía de Trx/TrxR que normalmente actúa como un antioxidante.

### **Ejemplo 1**

#### **Preparación de liposomas que contienen m-THPC**

mTHPC (Temoporfin) se sintetizó como se describe en las Pat. Nos. 4.992.257 y 5.162.519.

Los liposomas se prepararon de acuerdo con el siguiente procedimiento general:

El fotosensibilizador no polar, el palmitato ascórbico y los fosfolípidos se disuelven en cloroformo/metanol. La disolución luego se seca bajo vacío usando un evaporador rotatorio hasta que la mezcla cloroformo/metanol no es ya detectable por cromatografía de gases. Se añade agua para inyección para rehidratar la película lipídica a una temperatura de 50°C durante al menos 2 horas. La mezcla luego se pasa a través de un sistema de filtro homogeneizador usando un tamaño de poro final de 100 nanómetros. Opcionalmente, el agua de rehidratación se suplementa con monosacáridos o polialcoholes. El filtrado se recoge, se utiliza para rellenar viales y, opcionalmente, se liofiliza. La composición liofilizada se reconstituye con agua para inyección antes de la administración.

Usando el procedimiento anterior, varias preparaciones diferentes de la formulación liposomal se prepararon como sigue:

#### **Ejemplo 1a**

| Ingrediente                                 | Cantidad % p/v                                                        |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| mTHPC                                       | 0,05 a 0,15                                                           |
| Dipalmitoil fosfatidil colina               | 0,5 a 2,0                                                             |
| Dipalmitoil fosfatidil glicerol             | 0,05 a 0,2                                                            |
| Diestearoil fosfatidil etanolamina pegilada | 0,05 a 0,2                                                            |
| Palmitato ascórbico                         | 0,002 a 0,004                                                         |
| Agua para inyección                         | según se requiera para lograr las concentraciones deseadas anteriores |

*Ejemplo 1b (Referencia)*

|   |                                 |                                                                       |
|---|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|   | Ingrediente                     | Cantidad % p/v                                                        |
|   | mTHPC                           | 0,05 a 0,15                                                           |
|   | Dipalmitoil fosfatidil colina   | 0,5 a 2,0                                                             |
| 5 | Dipalmitoil fosfatidil glicerol | 0,05 a 0,2                                                            |
|   | Palmitato ascórbico             | 0,002 a 0,004                                                         |
|   | Agua para inyección             | según se requiera para lograr las concentraciones deseadas anteriores |

*Ejemplo 1c (Referencia)*

|    |                                 |                                                                       |
|----|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 10 | Ingrediente                     | Cantidad % p/v                                                        |
|    | mTHPC                           | 0,05 a 0,15                                                           |
|    | Dipalmitoil fosfatidil colina   | 0,5 a 2,0                                                             |
|    | Dipalmitoil fosfatidil glicerol | 0,05 a 0,2                                                            |
|    | Glucosa                         | 2,0 a 12,0                                                            |
| 15 | Palmitato ascórbico             | 0,002 a 0,004                                                         |
|    | Agua para inyección             | según se requiera para lograr las concentraciones deseadas anteriores |

Se encontraron que todas funcionan bien en su uso de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 2****20 Estabilidad física y química de m-THPC liposomal**

La estabilidad física de las formulaciones liposomales se midió monitorizando la distribución del tamaño de partícula mediante espectroscopía de correlación de fotones.

Estabilidad de mTHPC liposomal

|    |                               |                                                    |
|----|-------------------------------|----------------------------------------------------|
|    | Condiciones de almacenamiento | Distribución del tamaño promedio de partícula (nm) |
| 25 | Inicial                       | 166                                                |
|    | 23°C - 1 Mes                  | 177                                                |
|    | 23°C - 4 Meses                | 167                                                |

**Ejemplo 3****Localización de mTHPC dentro de la bicapa liposomal de la formulación**

30 La filtración en gel de la formulación liposomal se realiza en columnas Sephadex G50. Como se muestra en la Figura 1, los lípidos y la mTHPC muestran la misma distribución sobre todas las fracciones indicando una interacción física de ambos componentes, es decir, la integración de mTHPC en la bicapa de la membrana. La distribución no cambia notablemente después de la destrucción de la estructura liposomal por ultrasonificación, como se muestra en las Tablas 1 y 2.

**35 Ejemplo 4****Propiedades farmacocinéticas en ratones**

Se usó Colo 26, una línea celular de tumor colorrectal de ratón sin metástasis, singénico para ratones Balb/c.

40 Las células se mantuvieron como un cultivo monocapa en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 completado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10%, 1% de penicilina estreptomycin y 200 mM de L-glutamina, a 37°C en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Se inocularon ratones hembra de seis semanas atímicos (Swiss, nu/nu) por vía subcutánea en la pata trasera derecha con  $2 \times 10^6$  células Colo26. Dos semanas más tarde, cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5-7 mm, se inyectaron las formulaciones de m-THPC (0,5 mg/kg) por vía intravenosa.

Se han realizado mediciones de FIL no invasivas en tres sitios distintos: tumor con piel suprayacente, tejidos normales simétricos con piel suprayacente en la pata trasera izquierda y piel elevada a diferentes tiempos después de la administración del fármaco. En puntos de tiempo seleccionados, los ratones fueron sacrificados y las señales de fluorescencia de los tejidos tumorales y normales se midieron en contacto directo.

- 5 La Figura 2 presenta la acumulación de mTHPC, el producto A y B en el tumor como una función del tiempo post-inyección medido en cuatro ratones. Las mediciones no invasivas demostraron la tendencia para la mejor acumulación de mTHPC en el tumor en comparación con los tejidos normales con una mejor relación (1,3) a las 24 h. Las mediciones invasivas realizadas en contacto directo con el tumor y el músculo a las 24 h y 48 h después de la inyección dieron las relaciones de 2,7 y 3,0 respectivamente.
- 10 Las mediciones para el producto A se han realizado en un ratón a las 0,5h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h, y 72h post-dosis. El producto A ha mostrado un comportamiento farmacocinético similar a la mTHPC. En comparación con la mTHPC, la mayor intensidad de fluorescencia en el tejido tumoral ya se alcanzó después de 4 horas después de la inyección.
- 15 Las mediciones para el producto B se han realizado en un ratón a las 0,5h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h, y 72h post-dosis. La mayor intensidad de fluorescencia en el tumor se midió 8 horas después de la inyección i.v. En comparación con la mTHPC, el producto B muestra propiedades farmacocinéticas completamente diferentes. La concentración del producto B se incrementó en el tumor mucho más rápido (16h) que la mTHPC.

### **Ejemplo 5**

#### **Actividad antitumoral de m-THPC liposomal**

- 20 Se usó Colo 26, una línea celular de tumor colorrectal de ratón sin metástasis, singénico para ratones Balb/c.
- Las células se mantuvieron como un cultivo monocapa en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 completado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10%, 1% de penicilina estreptomicina y 200 mM de L-glutamina, a 37°C en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.
- 25 Se inocularon ratones hembra de seis semanas atímicos (Swiss, nu/nu) por vía subcutánea en la pata trasera derecha con  $2 \times 10^6$  células Colo26. Dos a tres semanas más tarde, cuando el tumor alcanzó un diámetro de 10-13 mm, se inyectaron las formulaciones de m-THPC (0,5 mg/kg) por vía intravenosa. A menos que se indique otra cosa, se usaron 3 ratones por grupo por producto para cada post-TFD.

#### **a. Tratamiento fotodinámico**

- 30 Se usaron intervalos Luz-Fármaco (ILD) de 0,5h, 4h, 6h, 72h para los productos como mTHPC, el producto A (liposomas y m-THPC) y el producto B (liposomas PEG-ilados y m-THPC). Cada animal fue anestesiado mediante inyección i.m. de ketamina (12,5 mg/ml), luego, fotoirradiados a 652 nm con 10J/cm<sup>2</sup> a 100 mW/cm<sup>2</sup> usando un láser de luz de diodo.

#### **b. Evaluación del efecto de TFD**

##### Método morfológico

- 35 Para evaluar la necrosis del tejido tumoral después del tratamiento con TFD, se usó el método de colorante azul de Evans.
- Se inyectó a los ratones i.p. (0,25 ml) azul de Evans (1%) inmediatamente después del tratamiento con TFD.
- Veinticuatro horas más tarde los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de halotano, los tumores se extirparon y cortaron longitudinalmente. Como se ejemplifica en la Figura 3, se tomaron fotos de los tumores enteros y de los cortes de tumor.
- 40 Las áreas necróticas sin teñir fueron consideradas como daño tumoral:
- i. Intervalo luz-fármaco (ILD) = 0,5h, no se observó necrosis independientemente de los productos utilizados.
- ii. Intervalo luz-fármaco (ILD) = 4h. Tres ratones tratados con mTHPC-TFD demostraron necrosis tumoral parcial. Dos ratones tratados con el producto A dieron necrosis tumoral parcial, mientras que el tumor del tercer ratón permaneció intacto. Tres ratones tratados con el producto B-TFD demostraron necrosis tumoral: en dos ratones se observó una clara necrosis tumoral, mientras que en un ratón la necrosis tumoral fue parcial.
- 45 iii. Intervalo luz-fármaco (ILD) = 6h; se usaron seis ratones para el producto A. Se observó una clara necrosis en los tumores de dos ratones tratados con producto A y otros cuatro estaban intactos. Para el producto B, en todos los ratones se observó una clara necrosis tumoral. Dos tumores tratados con mTHPC-TFD demostraron necrosis clara, un tumor carecía de necrosis. Los tumores mTHPC-TFD que presentaron necrosis fueron confirmados por observaciones oculares.
- 50

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación farmacéutica liposomal para terapia fotodinámica, que comprende una bicapa liposomal, que consiste sustancialmente en fosfolípidos que comprenden fosfolípidos conectados a poli(etilenglicol), dipalmitoil fosfatidil colina y dipalmitoil fosfatidil glicerol; y una cantidad terapéuticamente efectiva de un fotosensibilizador no polar, en donde dicho fotosensibilizador es seleccionado del grupo que consiste en di- y tetra-hidroporfirinas, que tienen máximos de absorción de luz en el intervalo de 640-780 nanómetros.  
5
2. La formulación liposomal según la reivindicación 1, la cual consiste en dipalmitoil fosfatidil colina y dipalmitoil fosfatidil glicerol en cantidades de 0,5-2,0 y 0,05-0,2 % p/v, respectivamente, y cantidades de temoporfina, glucosa, y palmitato ascórbico en cantidades de 0,05-0,15, 2,0-12,0, y 0,002-0,004% p/v, respectivamente, y agua para inyección según se requiera para alcanzar las concentraciones deseadas.  
10
3. La formulación liposomal según la reivindicación 1, en donde el fotosensibilizador es temoporfina.
4. La formulación liposomal según la reivindicación 1 en donde la concentración terapéuticamente efectiva del fotosensibilizador es de 0,0001 a 0,15 por ciento p/v.
5. La formulación liposomal según la reivindicación 1 que comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en hidroxitolueno butilado, palmitato ascórbico, y combinaciones de estos dos.  
15

FIGURA 1

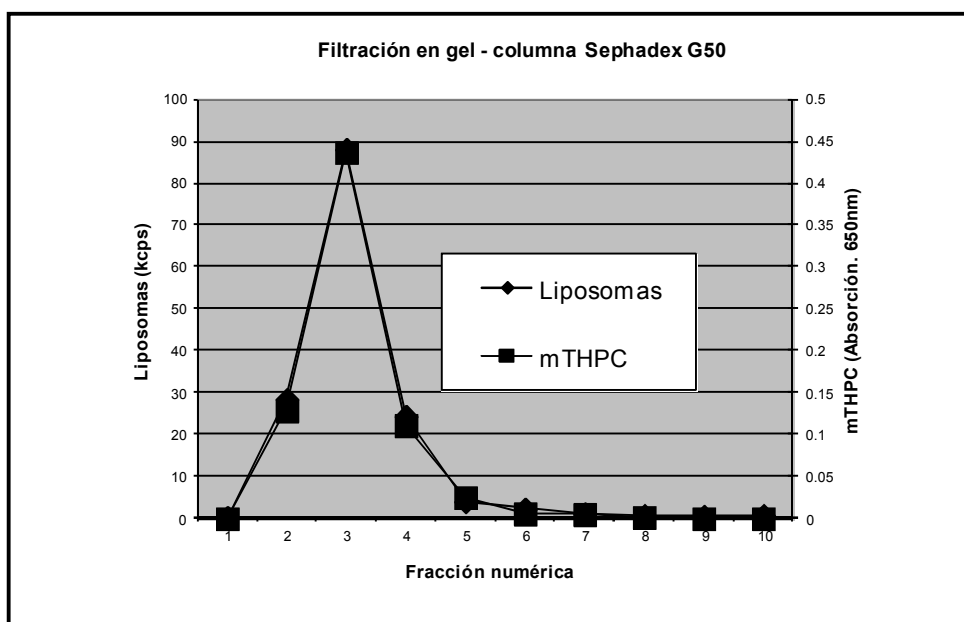
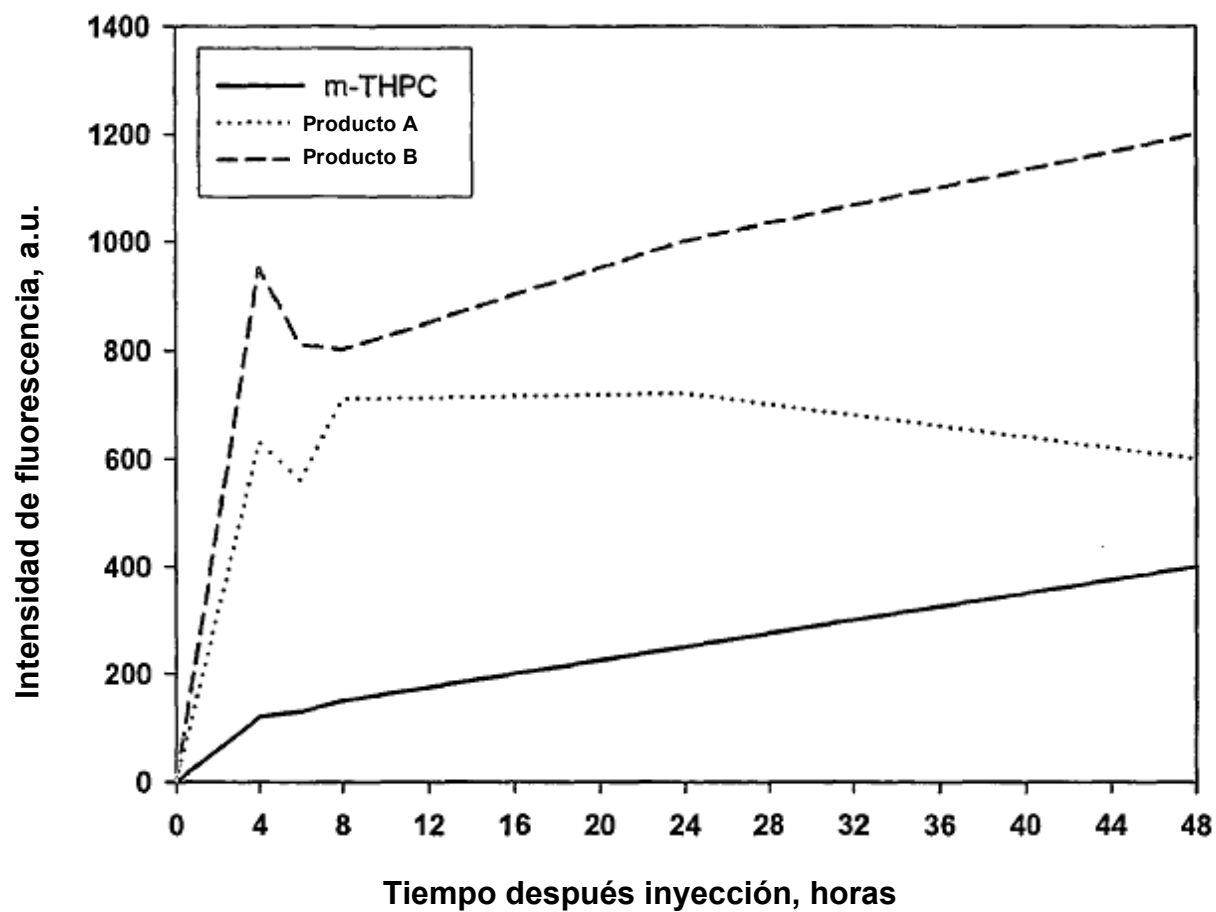
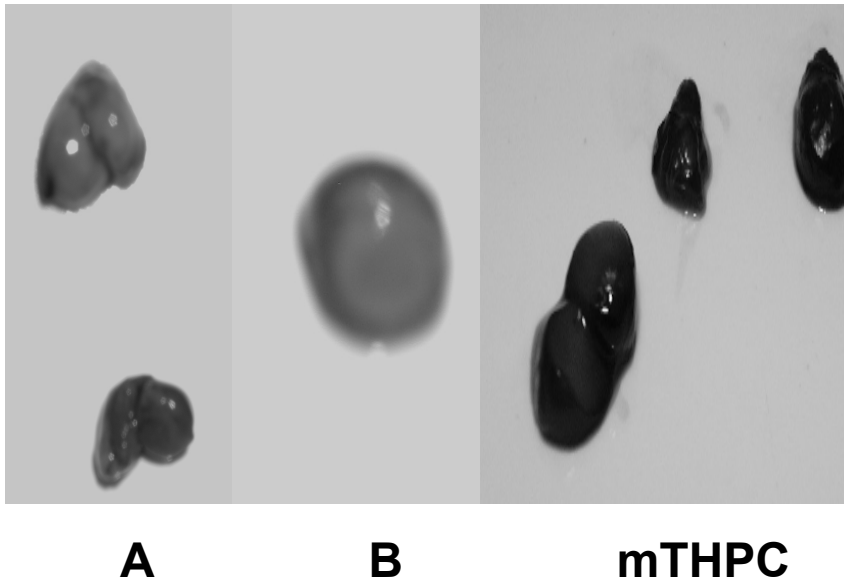


FIGURA 2



**FIGURA 3**



|                                 | Absorción | Volumen (μl) | A Volumen x    |
|---------------------------------|-----------|--------------|----------------|
| Fracción1                       | 0,0000    | 175          | 0,0000         |
| Fracción2                       | 0,1285    | 175          | 22,4875        |
| Fracción3                       | 0,4367    | 175          | 76,4225        |
| Fracción4                       | 0,1111    | 175          | 19,4425        |
| Fracción5                       | 0,0251    | 175          | 4,3925         |
| Fracción6                       | 0,0058    | 175          | 1,0150         |
| Fracción7                       | 0,0050    | 175          | 0,8750         |
| Fracción8                       | 0,0015    | 175          | 0,2625         |
| Fracción9                       | 0,0000    | 175          | 0,0000         |
| Fracción10                      | 0,0000    | 175          | 0,0000         |
| Fracciones totales              | 0,7137    | 175          | 124,8975       |
| Sonda                           | 0,6278    | 200          | 125,5600       |
| <b>Tasa de recuperación (%)</b> |           |              | <b>99,4724</b> |

Tabla 1: Tasa de recuperación de mTHPC después de filtración en gel G50

|                                 | kcps   | Volumen (μl) | kcps Volumen x |
|---------------------------------|--------|--------------|----------------|
| Fracción1                       | 0,30   | 175          | 52,50          |
| Fracción2                       | 28,50  | 175          | 4987,50        |
| Fracción3                       | 88,10  | 175          | 15417,50       |
| Fracción4                       | 24,40  | 175          | 4270,00        |
| Fracción5                       | 4,10   | 175          | 717,50         |
| Fracción6                       | 2,30   | 175          | 402,50         |
| Fracción7                       | 1,20   | 175          | 210,00         |
| Fracción8                       | 0,80   | 175          | 140,00         |
| Fracción9                       | 0,60   | 175          | 105,00         |
| Fracción10                      | 0,80   | 175          | 140,00         |
| Fracciones totales              | 151,10 | 175          | 26.442,50      |
| Sonda                           | 121,90 | 200          | 24.380,00      |
| <b>Tasa de recuperación (%)</b> |        |              | <b>108,46</b>  |

Tabla 2: Tasa de recuperación de lípidos después de filtración en gel G50