



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 781**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/409** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02747627 .4**  
86 Fecha de presentación : **05.07.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1406616**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Formulación galénica inyectable para utilizar en un diagnóstico o una terapia fotodinámica y su procedimiento de preparación.**

30 Prioridad: **17.07.2001 EP 01810708**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2008**

73 Titular/es: **Steba Biotech N.V.**  
**Laan Copes van Cattenburch 52**  
**2585 GB Den Haag, NL**

72 Inventor/es: **Brun, Pierre-Hervé;**  
**Prudhomme, Alain y**  
**Barnoux, Jean-Luc**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 292 781 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

Formulación galénica inyectable para utilizar en un diagnóstico o una terapia fotodinámica y su procedimiento de preparación.

La presente invención se refiere a una formulación galénica inyectable para utilizar en un diagnóstico o una terapia fotodinámica (PDT), que contiene un agente de fotosensibilización derivado de una bacterioclorofila modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de esta formulación galénica inyectable.

Desde hace más de cincuenta años, se ha podido demostrar que se podían acumular porfirinas en tejidos tumorales y que, además, podían fluorescer en esos tejidos tumorales irradiados absorbiendo la luz *in situ*.

Debido a sus propiedades, esas porfirinas han demostrado que son capaces de constituir un medio interesante para detectar un tumor mediante localización de la fluorescencia.

Estos últimos años, el uso de agentes de fotosensibilización en el tratamiento del cáncer ha constituido el objeto de numerosos estudios, que han resultado ser muy prometedores, de manera que continúa incrementándose el interés en esta técnica, conocida como "terapia fotodinámica" (PDT).

En esta técnica de terapia fotodinámica (PDT), se administra un agente de fotosensibilización, que es capaz de fijarse preferentemente en los tejidos en los que las células proliferan y se iluminan estos tejidos con una luz que tiene una longitud de onda que sea absorbida por el producto de fotosensibilización, por medio de una luz monocromática (láser) o policromática (lámpara).

El producto de fotosensibilización, que no es tóxico en sí mismo, tiene la propiedad, después de haber sido excitado por la absorción de fotones, de regresar a su estado básico transfiriendo la energía hacia el oxígeno ambiental en forma de oxígeno singlete (foto-oxidación de tipo II) y/o de radicales libres oxigenados (foto-oxidación de tipo I).

Esos derivados del oxígeno son extremadamente reactivos y tóxicos y oxidan todos los constituyentes tisulares en contacto con ellos.

Además, difunden muy poco y su período de vida es corto, de manera que el efecto fototóxico inducido iluminando el agente de fotosensibilización permanece localizado.

Las principales indicaciones para la terapia fotodinámica se refieren principalmente al campo de la cancerología, la virología, la oftalmología, en particular para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (DMLA), cardiología (estenosis posterior a una angioplastia), la reumatología y la dermatología.

Se ha estudiado un número considerable de moléculas de fotosensibilización para su uso en terapia fotodinámica.

El uso de derivados de hematoporfirina y en particular de Photofrin® (el porfímero de sodio, una mezcla de éteres y de ésteres de dihematoporfirina comercializada por Quadra Logic Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá) en la terapia fotodinámica se ha investigado ampliamente (véase por ejemplo Dougherty, T. J., Photochem. Photobiol., 45; 569 (1987); Kessel *et al.*, Photochem. Photobiol. 46, 563 (1987); Dougherty, T. J., Semin. Surg. Oncol., 2, 24, (1986); McCaughan, J. S., Photochem. Photobiol. 46, 903 (1987); y Gomer, C. J., Semin. Hematol., 26 (1) 27 (1989)).

En la mayoría de los estudios clínicos, se ha utilizado un derivado de hematoporfirina (HPD) que estaba constituido por una mezcla de compuestos de porfirina (monómeros de porfirina, de hematoporfirina, de hidroxietil vinil deuteroporfirina, de protoporfirina y dímeros/polímeros de porfirina) (véase por ejemplo, Dougherty, T. J., Photochem. Photobiol. 46, 569 (1987)).

Como resultado de estos estudios, se ha descubierto que la utilización terapéutica de esos derivados de hematoporfirina adolecía de dos inconvenientes principales.

El primero es que, en la longitud de onda de la luz que activa el compuesto, la luz no penetra lo suficientemente profundo dentro del tejido (véase por ejemplo, Doiron *et al.*, pp. 281-291 en: Porphyrins in Tumor Phototherapy, Editado por A. Andreoni y R. Cuulbreddu, Plenum Press, New York, 1984), de manera que el uso de estos compuestos está limitado al tratamiento de tumores de tamaño reducido y no permite tratar tumores localizados profundos dentro del tejido.

El segundo inconveniente principal de estos derivados de hematoporfirina es que tienden a acumularse en los tejidos del paciente, ocasionando en particular una fotosensibilización cutánea y ocular, que puede prolongarse durante cuatro a ocho semanas después del tratamiento, lo que requerirá adoptar precauciones especiales como por ejemplo no exponerse al Sol, aplicar una crema de protección total y usar ropa adaptada y gafas de sol.



## ES 2 292 781 T3

R<sub>1</sub> representa un grupo fitilo

R<sub>2</sub> representa un átomo H

5 R<sub>3</sub> representa un grupo -COOCH<sub>3</sub>;

**Bchl**ide o bacterioclorofilida cuando:

10 M representa Mg

R<sub>1</sub> representa un átomo H

R<sub>2</sub> representa un átomo H

15 R<sub>3</sub> representa un grupo -COOCH<sub>3</sub>; y

**Bphe**ide o bacteriofeoforbida cuando:

20 M representa 2 átomos H y

R<sub>1</sub> representa un átomo H

25 R<sub>2</sub> representa un átomo H

R<sub>3</sub> representa un grupo -COOCH<sub>3</sub>.

30 Algunos de estos derivados se describen en particular en los documentos DE-A-41 21 876, EP-A-0 584 552 y WO 97/19081.

Otros derivados de bacterioclorofila que han demostrado ser particularmente interesantes son los derivados de bacterioclorofila en los que el átomo de magnesio ha sido reemplazado por un átomo de paladio, como los descritos por ejemplo en el documento WO 00/33833.

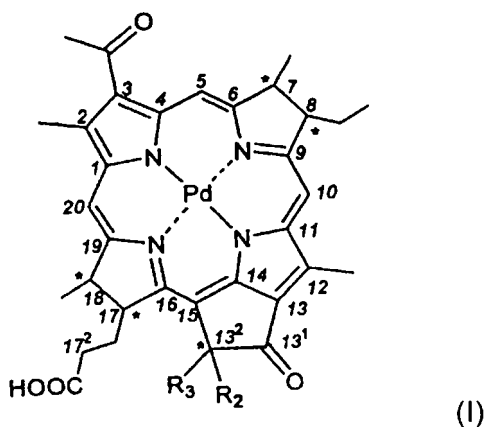
Entre estos derivados de bacterioclorofila modificados en el metal y descritos en el documento WO 00/33833, los compuestos que tienen la fórmula general (I) siguiente:

40

45

50

55



60 en los cuales:

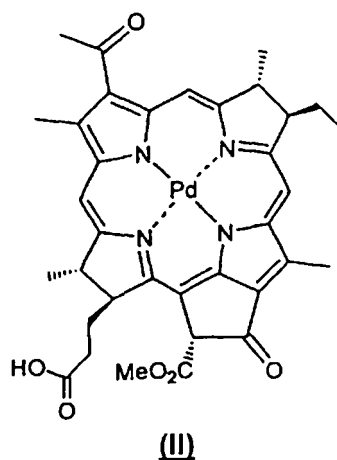
R<sub>2</sub> representa un grupo H, OH o COOR<sub>4</sub>, en la R<sub>4</sub> es un hidrógeno o un alquilo en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> o un cicloalquilo en C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>,

65 R<sub>3</sub> representa H, OH, o un alquilo o alcoxi en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> y

\* representa un carbono asimétrico,

## ES 2 292 781 T3

o sus sales, han demostrado ser de un particular interés y, entre estos compuestos de fórmula (I) anterior, la Pd-bacteriofeoforbida a, que tiene la siguiente Fórmula (II):



25 o una sal de la misma, ha demostrado tener una fototoxicidad y una estabilidad en el curso del tiempo superior a los otros derivados de la bacterioclorofila.

Además, la Pd-bacteriofeoforbida a, también llamada Pd-Bpheide a, absorbe la luz a una longitud de onda de aproximadamente 760 nm, es decir a una longitud de onda superior que los de otros agentes de fotosensibilización, lo cual permite una penetración más profunda de la luz dentro de los tejidos, y ocasiona poca o ninguna fotosensibilización cutánea.

Sin embargo, todos los compuestos que tienen la Fórmula (I) mencionada anteriormente, tienen un carácter lipófilo muy marcado con una tendencia muy fuerte a agregarse en un medio acuoso, lo cual hace difícil su uso farmacéutico a través de administración parenteral.

El documento WO 00/33833 reivindica en particular una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) mencionada anteriormente, preferentemente, la Pd-Bpheide a de fórmula (II) citada anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Sin embargo, en la descripción del documento WO 00/33833 se menciona que, para preparar dicha composición farmacéutica, la cual puede ser administrada por la ruta sistémica, es necesario añadir una cantidad de un agente tensioactivo no tóxico suficiente para solubilizar el compuesto.

Las composiciones que contienen la Pd-Bpheide a, descritas de manera específica en el documento WO 00/33833 y utilizadas en pruebas *in vivo* en animales, contienen una cantidad muy elevada de Crémophore® EL (20-50%) la cual ha demostrado ser necesaria para solubilizar el agente de fotosensibilización.

En esas composiciones, Crémophore® EL funciona como un agente tensioactivo capaz de disminuir la formación de agregados y de solubilizar la Pd-Bpheide a.

Crémophore® EL es un excipiente emulsificante del tipo aceite de ricino polioxietileno disponible comercialmente y que es conocido por su utilización en composiciones farmacéuticas debido a su capacidad para solubilizar una gran variedad de principios activos lipófilos.

Sin embargo, una composición que contiene más de 5% de Crémophore® EL es difícil de administrar a través de la vía sistémica en seres humanos, debido al conocido riesgo de ocasionar efectos indeseables de tipo alérgico.

Estas pruebas que prevén reemplazar el Crémophore® EL por otros agentes tensioactivos conocidos por su uso como agentes de solubilización de principios lipófilos, tales como el Solutol HS 15™, el propilenglicol, el polisorbato 80, las lecitinas de soja, las lecitinas de huevo y la N-metil-pirrolidona (Pharmasolve®) no han producido resultados satisfactorios.

Debido a las propiedades particularmente interesantes de los compuestos de fórmula (I) mencionada anteriormente y en particular de la Pd-Bpheide a de fórmula (II) citada anteriormente como agentes de fotosensibilización en terapia fotodinámica, es necesario proporcionar una formulación galénica que contenga un compuesto de fórmula (I) mencionada anteriormente que se puede administrar a seres humanos por vía intravenosa, sin el riesgo de complicaciones debidas a un excipiente.

## ES 2 292 781 T3

El objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación galénica inyectable en la que el compuesto de fórmula (I) mencionada anteriormente está completamente solubilizado y que contiene una cantidad muy reducida de agente tensioactivo.

5 Este objetivo se ha alcanzado cuando los inventores descubrieron que, de manera sorprendente, la adición de una pequeña cantidad de cosolventes no acuosos a saber la adición de una pequeña cantidad de una mezcla de alcohol bencílico/etanol o de propilenglicol a la Pd-Bpheide a, permitía solubilizar la Pd-Bpheide en una disolución acuosa después de su salificación.

10 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a una formulación galénica inyectable para uso en un diagnóstico o en una terapia fotodinámica (PDT), conteniendo la formulación galénica:

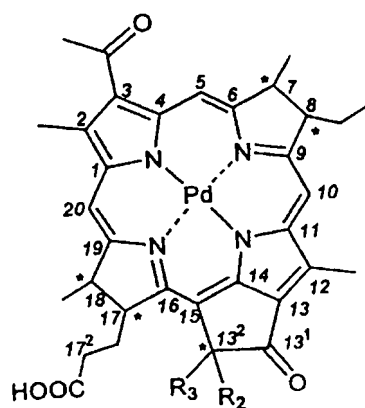
- un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I):

15

20

25

30



(I)

35

en la que

$R_2$  representa un grupo H, OH o  $COOR_4$ , en la que  $R_4$  es un hidrógeno o un alquilo en  $C_1-C_{12}$  o un cicloalquilo en  $C_3-C_{12}$ ,

40

$R_3$  representa H, OH o un alquilo o alcoxi en  $C_1-C_{12}$  y

\* representa un carbono asimétrico,

45

en forma de sal de metal alcalino, en una cantidad que no supera 10 mg/ml, como agente de fotosensibilización, y

- un vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable,

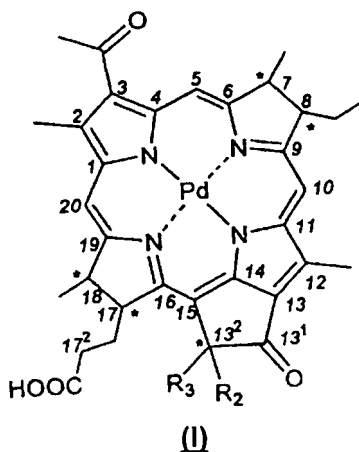
50 caracterizado porque el vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable contiene por lo menos una mezcla de alcohol bencílico-etanol con una relación de mezcla de 15:85 a 25:75 o propilenglicol, como agente de solubilización del agente de fotosensibilización y un agente tensioactivo que permite disminuir la agregación del agente de fotosensibilización, en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso total de la formulación, con la condición de que si el agente tensioactivo es un cremófor, su cantidad no debe superar 5% en peso con respecto al peso total.

55

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable (PDT) para su utilización en un diagnóstico o una terapia fotodinámica que contiene un compuesto representado por la siguiente Fórmula (I):

60

65



20 en la que

$R_2$  representa un grupo H, OH o  $COOR_4$ , en la que  $R_4$  es un hidrógeno o un alquilo en  $C_1-C_{12}$  o un cicloalquilo en  $C_3-C_{12}$ ,

25  $R_3$  representa H, OH o un alquilo o alcoxi en  $C_1-C_{12}$  y

\* representa un carbono asimétrico,

30 en forma de sal de metal alcalino, en una cantidad de hasta 10 mg/ml, como agente de fotosensibilización y un vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el procedimiento, en el orden indicado, las etapas que consisten en:

- 35
- 40
- 45
- (1) humectar el agente de fotosensibilización de fórmula (I) en su forma ácida con un agente de solubilización constituido por una mezcla de alcohol bencílico-etanol en una relación de 15:85 a 25:75, o de propilenglicol;
  - (2) añadir un agente tensioactivo en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso final de la formulación;
  - (3) añadir un hidróxido de metal alcalino en una cantidad suficiente para neutralizar la función ácida del agente de fotosensibilización de fórmula (I);
  - (4) agitar la mezcla en fase acuosa de manera suficiente para permitir la salificación completa del agente de fotosensibilización y su solubilización completa;
  - (5) añadir un agente tampón destinado a ajustar el pH a un valor fisiológicamente aceptable de  $7,2 \pm 0,4$ .
  - (6) si es necesario, ajustar el volumen de la formulación con agua para preparaciones inyectables.

50 De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una formulación galénica inyectable obtenida con éste procedimiento.

La formulación galénica de la presente invención contiene una cantidad muy reducida de agente tensioactivo cuya función esencial es disminuir la formación de agregados.

55 La presente invención proporciona así una formulación galénica en la que el agente de fotosensibilización, es decir un compuesto de fórmula (I) mencionada anteriormente en forma de sal es completamente solubilizado y que puede ser inyectada con riesgos mínimos en el ser humano en el contexto de una terapia fotodinámica.

60 Otras ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

### Descripción detallada de la invención

65 De acuerdo con la presente invención, la formulación galénica inyectable para uso en una terapia fotodinámica contiene:



## ES 2 292 781 T3

La cantidad de compuesto de fotosensibilización contenido en la formulación galénica inyectable de la presente invención no deberá ser superior a 10 mg/ml, puesto que con una cantidad superior a 10 mg/ml, el compuesto de fotosensibilización no se solubiliza por completo.

5 Cuando la formulación galénica inyectable está destinada a una utilización en el contexto de una terapia fotodinámica, la cantidad de agente de fotosensibilización contenido en la formulación no deberá ser preferentemente inferior a 0,1 mg/ml, puesto que por debajo de esta concentración, el volumen de formulación que se va a administrar sería importante.

10 Sin embargo, se pueden prever cantidades de agente de fotosensibilización inferiores a 0,1 mg/ml cuando la formulación galénica inyectable de la presente invención está destinada para ser utilizada en el contexto de un diagnóstico fotodinámico.

15 El vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable contenido en la formulación galénica inyectable de la presente invención tiene por objetivo solubilizar el agente de fotosensibilización asegurando al mismo tiempo la estabilidad a largo plazo de la formulación.

20 Este vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable contiene por lo menos una mezcla de alcohol bencílico-etanol o propilenglicol como agente de solubilización del agente de fotosensibilización y un agente tensioactivo que permite disminuir la agregación del agente de fotosensibilización, en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso total de la formulación.

25 Cuando el vehículo farmacéutico contiene una mezcla de alcohol bencílico-etanol como agente de solubilización, la relación de la mezcla de alcohol bencílico:etanol debe ser de 15:85 a 25:75 vol/vol

En el caso de una relación de mezcla inferior a 15 partes de alcohol bencílico, el agente de fotosensibilización no se solubiliza por completo.

30 En el caso de una relación de mezcla superior a 15 partes de alcohol bencílico, la mezcla ya no es miscible con agua.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el vehículo contiene una mezcla de alcohol bencílico-etanol en una relación de alcohol bencílico:etanol de 20:80.

35 La mezcla de alcohol bencílico-etanol está contenida preferentemente en el vehículo en una cantidad que no supera % vol, con relación al volumen total de la formulación.

40 El alcohol bencílico y el etanol contenidos en la formulación galénica inyectable de la presente invención debe satisfacer las exigencias de pureza requeridas para su utilización en formulaciones inyectables, de acuerdo con la Pharmacopea europea y la Pharmacopea americana (USP).

45 Cuando el vehículo farmacéutico contiene propilenglicol como agente de humectación, el propilenglicol está contenido preferentemente en el vehículo en una cantidad que no supera 5% vol con relación al volumen total de la formulación.

El propilenglicol contenido en la formulación galénica inyectable debe satisfacer las exigencias de pureza requeridas para su utilización en formulaciones inyectables, de acuerdo con la Pharmacopea europea y la Pharmacopea americana (USP).

50 El agente tensioactivo contenido en el vehículo farmacéuticamente aceptable de la fase acuosa puede ser cualquier agente tensioactivo que tenga la capacidad de disminuir la agregación del agente de fotosensibilización en la formulación galénica inyectable y debe estar contenido en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso total de la formulación.

55 Este agente tensioactivo puede ser por ejemplo el Crémophore® EL (BASF, Alemania), el Crémophore® EL P (BASF, Alemania), el Solutol HS 15™ (BASF, Alemania), el propilenglicol, el polisorbato 80, las lecitinas de soja, las lecitinas de huevo y la N-metil-pirrolidona (Pharmasolve®, BASF, Alemania).

60 Preferentemente, el agente tensioactivo es el Crémophore® EL, el Crémophore® EL P o el Solutol HS 15™.

Una formulación particularmente preferida de la presente invención contiene, como agente tensioactivo, Crémophore® EL o Crémophore® EL P en una cantidad que no supera 5% vol con relación al volumen total de la formulación.

65 En una versión particularmente preferida de la presente invención, la formulación contiene 0,25% peso/peso de Pd-Bpheid a, 5% vol/peso de una mezcla de alcohol bencílico-etanol que tiene una relación de alcohol bencílico:etanol de 20:80 y 5% peso/peso de Crémophore® EL P.

## ES 2 292 781 T3

La formulación galénica inyectable de la presente invención se puede preparar de acuerdo con el procedimiento que comprende, en el orden indicado, las etapas que consisten en:

- 5 (1) humectar el agente de fotosensibilización de fórmula (I) en su forma ácida o de fórmula (II) en su forma ácida con un agente de solubilización constituido por una mezcla de alcohol bencílico-etanol en una relación de mezcla de 15:85 a 25:75, o de propilenglicol;
- 10 (2) añadir un agente tensioactivo en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso final de la formulación;
- (3) añadir un hidróxido de metal alcalino en disolución acuosa en una cantidad suficiente para neutralizar la función del agente de fotosensibilización de fórmula (I) o de fórmula (II);
- 15 (4) agitar la mezcla en fase acuosa de manera suficiente para permitir la salificación completa del agente de fotosensibilización y su solubilización completa;
- (5) añadir un agente tampón destinado a ajustar el pH a un valor fisiológicamente aceptable de  $7,2 \pm 0,4$ .
- 20 (6) si es necesario, ajustar el volumen de la formulación con agua para preparaciones inyectables.

En una forma de realización preferida de la invención, el agente de solubilización se agrega preferentemente en una cantidad que no supera 5% vol con relación al volumen de la formulación total.

En un procedimiento según la presente invención, el agente de solubilización agregado para humectar el agente de fotosensibilización es preferentemente una mezcla de alcohol bencílico-etanol que tiene una relación de mezcla 20:80.

La humectación con alcohol bencílico no es posible, debido a la falta de miscibilidad del alcohol bencílico con la disolución de hidróxido de sosa diluida.

La adición de etanol al alcohol bencílico en las proporciones indicadas permite la miscibilidad de la fase orgánica de humectación con la disolución de hidróxido de sosa diluida.

El alcohol bencílico y el etanol o el propilenglicol agregados para humectar el agente de fotosensibilización deben satisfacer las exigencias de pureza requeridas para su uso en las formulaciones inyectables de acuerdo con la Pharmacopea europea y la Pharmacopea US (USP).

El agente tensioactivo añadido para disminuir la agregación del agente de fotosensibilización en la formulación galénica inyectable es por ejemplo el Crémophore® EL, el Crémophore® EL P, el Solutol HS 15™, el propilenglicol, el polisorbato 80, las lecitinas de soja, las lecitinas de huevo y la N-metil-pirrolidona (Pharmasolve®).

Preferentemente, el agente tensioactivo añadido es el Crémophore® EL, el Crémophore® EL P o el Solutol HS 15™.

La cantidad de agente tensioactivo que se añade variará en función del agente tensioactivo utilizado y de la concentración final del agente de fotosensibilización en la formulación.

Sin embargo, esta cantidad no superará 20% en peso con relación al peso final de la formulación.

En una forma de realización particularmente preferida del procedimiento de la presente invención, se añade como agente tensioactivo Crémophore® EL o Crémophore® EL P, en una cantidad que no supera 5% vol con relación al volumen total de la formulación.

El hidróxido de metal alcalino utilizado en el procedimiento de la presente invención puede ser el hidróxido de sodio o el hidróxido de potasio y se añade en forma de una disolución acuosa.

El hidróxido de metal alcalino se añade al compuesto de fórmula (I) en su forma ácida o al compuesto de fórmula (II) en su forma ácida, en una cantidad que permite salificar totalmente la función ácido del compuesto de fórmula (I) o del compuesto de fórmula (II).

De preferencia, el hidróxido de metal alcalino utilizado es el hidróxido de sodio, de manera que la formulación galénica inyectable obtenida contenga el compuesto de fórmula (I) y, de preferencia, el compuesto de fórmula (II) en forma de la sal de sodio.

Se deberá asegurar la agitación suficiente a fin de permitir la salificación completa del agente de fotosensibilización y la solubilización total de éste en el vehículo.

## ES 2 292 781 T3

El agente destinado a ajustar el pH utilizado en el procedimiento de la presente invención puede ser por ejemplo el ácido cítrico, el ácido fosfórico y sus sales de sodio (monobásica y dibásica), el ácido D-tátrico, el ácido L-tátrico, el ácido D-málico y el ácido L-málico.

5 El agente destinado a ajustar el pH se añade en una cantidad necesaria para tamponar la formulación inyectable a un pH fisiológicamente aceptable de  $7,2 \pm 0,4$ .

10 En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el agente destinado a ajustar el pH añadido es el ácido cítrico, debido a que confiere a la formulación una estabilidad mejorada en el tiempo y en presencia de aire.

15 A fin de mejorar la estabilidad de la formulación inyectable obtenida mediante el procedimiento de la presente invención, las diferentes etapas (1) a (6) del procedimiento se llevarán a cabo preferentemente bajo atmósfera de gas inerte.

En la formulación galénica inyectable obtenida mediante el procedimiento de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) o, preferentemente, el compuesto de fórmula (II) se solubiliza por completo, lo cual se demuestra por la limpidez y la ausencia total de precipitados.

20 Además, la formulación inyectable obtenida mediante el procedimiento de la presente invención presenta una excelente estabilidad en el tiempo.

25 En la composición galénica de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) y, de preferencia, el compuesto de fórmula (II), está en forma de monómero, sin embargo con una cierta cantidad del compuesto en forma de agregado (oligómeros).

30 Sin embargo, al inyectar la formulación galénica inyectable de la presente invención, la forma oligomérica presente en la formulación se transforma rápidamente en monómero en cuanto entra en contacto con el líquido fisiológico, en particular con la sangre, de manera que el producto de fotosensibilización activo está completamente en forma de monómero.

35 El análisis de la formulación inyectable de la presente invención mediante espectroscopia UV puede proporcionar interesantes indicaciones sobre la Pd-Bpheide a contenida en la formulación, ya que la Pd-Bpheide a presenta un pico próximo a 760 nm, la agregación de éste se puede determinar a partir de la aparición de un pico cercano a aproximadamente 815 nm y la degradación de éste, en particular por oxidación, se puede determinar a partir de los desplazamientos hipsocrómicos de los máximos, en particular del próximo a los 760 nm.

40 Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar la invención. Sin embargo, en ningún caso se considerarán como limitativos del alcance de la presente invención.

### Ejemplos

45 A menos que se especifique de otra manera, todos los reactivos utilizados en los ejemplos siguientes son reactivos que están comercialmente disponibles, en particular de SDS (BP 4-Valdonne, F-13124 Peypin) Merck Eurolab (Europarc, F-33608 Pessac Cedex) BASF (Alemania), Fluka (Buchs, Suiza) etc.

#### *Preparación del agente de fotosensibilización Pd-Bpheide a*

50 Nota: el conjunto del procedimiento se llevó a cabo bajo luz no actínica y bajo una atmósfera de nitrógeno.

#### 1) *Extracción de la bacterioclorofila a (BChla)*

##### *Reactivos utilizados*

55	Células <i>Rhodovolum Sulfidophilum</i>	11 kg
	Metanol [SDS o Merck, puro para síntesis, pureza $\geq 99,8\%$ ]	126 l

##### *Procedimiento utilizado*

60 Las células *Rhodovolum Sulfidophilum* liofilizadas (11 kg) fueron extraídas con metanol (57 l) a 25°C y se filtró el medio. El residuo celular fue recogido con 47 l de metanol y filtrado. Después de enjuagar el residuo con 22 l de metanol, los filtrados fueron agrupados y concentrados bajo presión reducida.

65 Se obtuvieron aproximadamente 3.500 g de un producto bruto que contiene 70 g BChla (cantidad de BChla determinada por UV).

## ES 2 292 781 T3

### 2) Síntesis de la bacteriofeoforbida a

#### Reactivos utilizados

5	Producto bruto que contiene 70 g de bacterioclorofila a obtenida en la etapa 1)	3.500 g
	Ácido trifluoroacético [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99\%$ ]	7 l
	Cloroformo [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99\%$ ]	11,2 l

#### Procedimiento utilizado

15 El producto bruto que contiene 70 g de bacterioclorofila a (3.500 g) se solubilizó en cloroformo (11,2 l) y se añadió ácido trifluoroacético (7 l). La progresión de la reacción se monitoreo mediante TLC. Cuando ya no se detectaba más producto inicial, se añadieron 56 l de agua y 14 l de cloroformo al medio de reacción. Después de agitar y decantar la mezcla, se separaron las dos fases. La fase orgánica fue lavada con agua (25 l) y el cloroformo se concentró bajo presión reducida hasta un volumen de 6 l.

La Bpheide bruta se obtuvo en disolución en el cloroformo y no se aisló antes de su purificación.

### 3. Purificación de la bacteriofeoforbida a

#### Reactivos

25	Disolución de Bpheide bruta en cloroformo, obtenida en la etapa 2)	
	Ciclohexano [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99\%$ ]	10 l
	Pentano [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99\%$ ]	7 l
	Metanol [SDS o Merck, puro para síntesis, pureza $\geq 99,8\%$ ]	3 l
	Sílice [SDS, 60 A C.C., 70-200 $\mu\text{m}$ ]	300 g
30	Acetato de etilo [Merck, puro, pureza $\geq 99,5\%$ ]	6 l

#### Procedimiento utilizado

35 El ciclohexano (10 l) se añadió a la disolución de Bpheide en el cloroformo y los solventes se destilaron bajo presión reducida, con adición de ciclohexano hasta que se eliminó el cloroformo y se alcanzó un volumen de 7 l. El producto fue precipitado después por medio de la adición de pentano (7 l), agitado durante 15 minutos a 30°C y filtrado. Después del secado en un horno al vacío (30°C) se obtuvieron 60 g de producto semi-purificado (pureza UV: 50-60%).

40 El producto semi-purificado (60 g) se disolvió en una mezcla de cloroformo/metanol 95/5 (6 l) y se añadieron 300 g de sílice. Después de agitación durante 10 minutos, se filtró el medio. El filtrado fue diluido con 6 l de acetato de etilo y se destilaron los solventes bajo presión reducida. A medida que avanzaba la concentración, se añadió acetato de etilo hasta obtener una densidad del destilado igual a 0,9. El volumen de la disolución se ajustó entonces hasta 3,0 l. La disolución fue filtrada y el polvo obtenido se secó en un horno bajo vacío a 30°C.

45 Se aislaron aproximadamente 35 g de Bpheide purificada (pureza UV: 80%).

### 4) Síntesis de la paladio-bacteriofeoforbida a

#### Reactivos

50	Bpheide purificada, obtenida en la etapa 3)	6,25 g
	Acetato de paladio [SDS o Merck, contenido $\geq 99\%$ p/p]	13,15 g
	Ácido ascórbico [SDS, pureza $\geq 99\%$ ]	105 g
55	Cloroformo [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99,9\%$ ]	2,2 l
	Metanol [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99,8\%$ ]	3,3 l
	Sulfato de sodio anhidro [SDS, para análisis, pureza $\geq 99,5\%$ ]	1,5 g

#### Procedimiento utilizado

65 Se disolvió ácido ascórbico (105 g) en 3,3 l de metanol y se calentó el medio hasta 35°C. La Bpheide (6,25 g) solubilizada en 1,5 l de cloroformo se añadió en 10 minutos al medio anterior. Después de la agitación durante 10 minutos, el acetato de paladio (13,15 g) solubilizado en 0,7 l de cloroformo se añadió en 10 minutos al medio de reacción. La progresión de la reacción fue monitorizada por UV. Después de 15 minutos, la mezcla se enfrió hasta 20°C y se vertió en 20 l de agua. Después de agitar y decantar la mezcla, se separaron las fases. La fase orgánica fue lavada con agua (20 l) hasta que se alcanzó un pH  $\geq 5$  y después se secó sobre sulfato de sodio (1,5 kg). Después de la concentración de los solventes bajo presión reducida, se obtuvieron 5,85 g de producto bruto (pureza UV: 85%).

## ES 2 292 781 T3

### 5) Purificación de la paladio-bacteriofeoforbida a

#### Reactivos utilizados

5	Pd-Bpheidre bruta obtenida en la etapa 4)	5,85 g
		(pureza UV: 85%)
	Cloroformo [SDS, puro para síntesis, pureza $\geq 99,9\%$ ]	175 ml

#### 10 Procedimiento utilizado

El producto bruto (5,85 g) fue recogido en cloroformo (175 ml) y agitado durante 5 minutos. La suspensión fue filtrada y el sólido obtenido se secó bajo vacío en una estufa (30°C).

15 Se aislaron 5,0 g de Pd-Bpheidre a (pureza HLPC >97%).

UV/VIS en el cloroformo:  $\lambda_{\max}$  [nm], intensidad relativa 330 (0,798); 385 (0,597); 535 (0,292); 760 (1,711).

20 NMR-<sup>1</sup>H en acetona-D<sub>6</sub>[ppm]: 9,27, 8,86 8,77 (cada s, 1H, 5-, 10-, 20-H); 6,01 (s, 1H, 13<sup>2</sup>-H); 4,7 hasta 4,0 (4 m, 1H, 7-, 8-, 17-, 18-H); 3,86 (s, 3H, 13<sup>2</sup>-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,51 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>); 3,34 (s, 3H, 12-CH<sub>3</sub>); 3,07 (s, 3H, 3-COCH<sub>3</sub>); 2,7 hasta 2,1 (3m, 2H, 8-, 17<sup>1</sup>-, 17<sup>2</sup>-CH<sub>2</sub>); 1,79, 1,69 (cada d, 3H, 7-, 18-CH<sub>3</sub>); 1,09 (t, 3H, 8-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

MS calculado para C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Pd: 714,1670 (M<sup>+</sup>). Encontrado: 714,1688 (M<sup>+</sup>).

25 Análisis elemental:

Calculado %: C: 58,79 H: 5,07 N: 7,83 O: 13,42 Pd: 14,88

Encontrado: C: 59,13 H: 5,12 N: 7,72 O: 13,33 Pd: 14,69

30

La Pd-Bpheidre a obtenida anteriormente se utilizó para preparar las formulaciones inyectables siguientes.

#### 35 Formulación inyectable 1

La formulación 1 que contiene 2,5 mg/ml de Pb-Bpheidre a como agente de fotosensibilización.

Vehículo:

40 Fase orgánica: alcohol bencílico/etanol (20/80) 5% vol/peso.

Agente tensioactivo: Crémophore® EL P 5% peso/peso.

45 NaOH: 0,028 M

pH ajustado hasta 7,2  $\pm$  0,4 con ácido cítrico 0,01M

La formulación 1 se preparó como sigue:

50 En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 2,5 mg de Pd-Bpheidre a preparada como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de una mezcla 20:80 vol/vol de alcohol bencílico y de etanol y la mezcla fue agitada en forma moderada.

55 Después, se añadieron a la mezcla 50 mg de Crémophore® EL P y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 8,4 x 10<sup>-3</sup> M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura <25°C) mientras se agitaba ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a 7,2  $\pm$  0,4 con ácido cítrico 0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

60 La composición exacta de la Formulación 1 se indica en la tabla 1 a continuación:

65

# ES 2 292 781 T3

TABLA 1

Nombre de los componentes	Fórmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
<b>Agente de fotosensibilización</b>				
Pd-Bpheide a	2,5 mg	0,25% p/p	PA	
<b>Otros componentes</b>				
Etanol absoluto	40 µl	4% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 1318, A2000
Alcohol bencílico	10 µl	1% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 0256, 1997
Crémophore® EL P	50 mg	5% peso/peso	Agente tensioactivo	PE 4ª edición 1082, 1997
NaOH 8,4 x 10 <sup>-3</sup> M	500 µl	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edición 0677, 1997
Ácido cítrico 0,01 M	QS 7,2 ± 0,4	QS7,2 ± 0,4	Agente tampón	PE 4ª edición 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edición 0169, A2000

Esta Formulación 1 de la presente invención es límpida, con un intenso color (púrpura oscuro) y no contiene ninguna traza de precipitado, lo cual indica que la Pd-Bpheide a está completamente solubilizada.

El espectro de absorción UV de la Pd-Bpheide a en esta Formulación 1 de la presente invención mostraba 5 picos principales a 344, 385, 538, 763 y 818 nm, con una relación OD 763/818 superior a 1, que indica que el monómero representa a nivel espectral más del 50% del producto.

Bajo condiciones ICH, esta formulación 1 es estable a 4°C durante por lo menos 6 meses, como se verificó mediante HPLC y UV.

Se llevaron a cabo estudios de toxicidad de la formulación inyectable 1 a diferentes especies animales después de la administración intravenosa única o repetida:

- En la rata macho (Sprague Dawley): 6 a 12 animales por dosis (2 x 5, 2 x 10 y 2 x 20 mg/kg). El producto fue inyectado por vía intravenosa en la vena caudal.
- En el conejo (albinos de Nueva Zelanda): 5 animales a dosis de 5 mg/kg. El producto fue inyectado por vía intravenosa 3 veces, 1 vez por vía intra-arterial y 1 vez por vía perivenosa.
- En el mono (Cynomolgus, de un peso comprendido entre 2,5 y 3,2 kg): 6 a 10 animales por sexo y por dosis (1, 2, 5 y 6 mg/kg). El producto fue inyectado por vía intravenosa en la vena safena o en la vena cefálica, una vez al día durante 14 días.
- En el mono (Cynomolgus de un peso comprendido entre 2,25 y 4,7 kg): 3 a 6 animales por dosis (2 y 5 mg/kg). El producto fue inyectado por vía intravenosa en la vena safena o en la vena cefálica.

La evaluación de los animales se realizó analizando los signos clínicos, exámenes biológicos a nivel de la sangre y de la orina, exámenes cardiovasculares y exámenes histopatológicos.

Esos estudios demostraron que la Pd-Bpheide a y su Formulación inyectable 1 eran bien toleradas a velocidades de inyección de hasta 4 ml/min.

## Formulación Inyectable 2

Formulación 2 que contiene 5 mg/ml de Pd-Bpheide a como agente de fotosensibilización.

Vehículo:

Fase orgánica: alcohol bencílico/etanol (20/80) 5% vol/peso.

Agente tensioactivo: Crémophore® EL 5% peso/peso.

NaOH: 0,028 M

pH ajustado a 7,2 ± 0,4 con ácido cítrico 0,01 M

## ES 2 292 781 T3

La formulación 2 se preparó como sigue:

En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 5 mg de Pd-Bpheide a preparada como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de una mezcla 20:80 vol/vol de alcohol bencílico y de etanol y la mezcla fue agitada en forma moderada.

Después, se añadieron a la mezcla 50 mg de Crémophore<sup>®</sup> EL y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 0,028 M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura <25°C) agitando ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a 7,2  $\pm$  0,4 con ácido cítrico 0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

La composición exacta de la Formulación 2 está representada en la tabla 2 siguiente:

TABLA 2

Nombre de los componentes	Fórmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
<b>Agente de fotosensibilización</b>				
Pd-Bpheide a	5 mg	0,5% p/p	PA	
<b>Otros componentes</b>				
Etanol absoluto	40 $\mu$ l	4% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 1318, A2000
Alcohol bencílico	10 $\mu$ l	1% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 0256, 1997
Crémophore <sup>®</sup> EL	50 mg	5% peso/peso	Agente tensioactivo	PE 4ª edición 1082, 1997
NaOH 0,028 M	500 $\mu$ l	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edición 0677, 1997
Ácido cítrico 0,01 M	QS 7,2 $\pm$ 0,4	QS 7,2 $\pm$ 0,4	Agente tampón	PE 4ª edición 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edición 0169, A2000

Esta Formulación 2 de la presente invención es límpida, con un intenso color (púrpura oscuro) y no contiene ninguna traza de precipitado, lo que demuestra que la Pd-Bpheide a está completamente solubilizada.

El espectro de absorción UV de la Pd-Bpheide a en esta Formulación 2 de la presente invención mostraba 5 picos principales a 344, 385, 538, 763 y 818 nm, con una relación OD 763/818 próxima a 1, que indica que el monómero representa a nivel espectral 50% del producto.

Bajo condiciones ICH, esta Formulación 2 es estable a 4°C durante por lo menos 6 meses, como se verificó mediante HPLC y UV.

Las siguientes pruebas biológicas han permitido demostrar el importante rol y la necesidad de una buena solubilización del principio activo, así como de la reducción de la forma agregado con respecto a la forma monómero.

Se realizó una prueba que prevé estudiar la desagregación del producto formulado, una vez inyectado en el conejo blanco de Nueva Zelanda, que pesa de 3 a 4 kg.

Se utilizaron tres conejos en este estudio.

Los conejos recibieron una dosis de 5 mg/kg en la vena auricular, a saber 3 ml de la Formulación inyectable 1 que contiene 5 mg/ml para un conejo de 3 kg.

La velocidad de infusión varió desde 0,3 hasta 1 ml/min.

El espectro de absorción de la Pd-Bpheide a fue medido continuamente por medio de reflectancia espectroscópica, utilizando un sistema de detección multicanal. Este sistema permite la detección del producto a nivel tisular en el animal vivo. Permite así monitorizar la evolución de los agregados en el organismo.

Bajo estas condiciones, la desagregación *in vivo* del oligómero en forma monomérica se realiza muy rápidamente entre 15 y 30 minutos.

## ES 2 292 781 T3

La ausencia de Crémophore en la formulación no permitía esta desagregación *in vivo* y la concentración de monómero producido permanecía entonces muy baja.

Se llevaron a cabo unos estudios de toxicidad de la Formulación inyectable 2 a diferentes especies animales después de la administración intravenosa única o repetida:

- 1- En el ratón (OF, de un peso comprendido entre 25 y 35 gramos): en 10 animales por sexo y por dosis (0,2 x 25, 2 x 50, 2 x 75 y 1 x 100 mg/kg). El producto fue inyectado en la vena caudal.
- 2- En la rata (Sprague Dawley, de un peso comprendido entre 150 y 230 gramos): en 4 a 10 animales por sexo y por dosis (de 4 a 200 mg/kg). El producto fue inyectado en la vena caudal.
- 3- En el mono (Cynomolgus, de un peso comprendido entre 1,8 y 3,5 kg): en 1 animal por sexo y por dosis (8, 16 y 24 mg/kg). El producto fue inyectado en la vena safena o cefálica, una vez por día durante 7 días.

La evaluación de los animales se realizó mediante análisis de los signos clínicos, exámenes a nivel de la sangre y la orina. exámenes histopatológicos.

Esos estudios demostraron que la Pd-Bpheid a y su Formulación inyectable 2 eran bien tolerados, a condición de que las inyecciones se realizaran lentamente, de manera que los oligómeros presentes pudieran desagregarse de manera progresiva en forma monomérica.

### Formulación Inyectable 3

Formulación 3 que contiene 5 mg/ml de Pd-Bpheid a como agente de fotosensibilización.

Vehículo:

Fase orgánica: alcohol bencílico/etanol (20/80) 5% vol/peso.

Agente tensioactivo: Solutol HS 15, 10% peso/peso.

NNaOH: 0,028 M

pH ajustado a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01M

La formulación 3 se preparó como sigue:

En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 5 mg de Pd-Bpheid a preparada como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de una mezcla 20:80 vol/vol de alcohol bencílico y de etanol y la mezcla fue agitada en forma moderada. Después, se añadieron a la mezcla 100 mg de Solutol HS 15 10% p/p y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 0,028 M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura  $<25^{\circ}\text{C}$ ) agitando ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

La composición exacta de la Formulación 3 está representada en la tabla 3 siguiente:

TABLA 3

Nombre de los componentes	Fórmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
<b>Agente de fotosensibilización</b>				
Pd-Bpheid a	5 mg	0,5 % p/p	PA	
<b>Otros componentes</b>				
Etolol absoluto	40 $\mu$ l	4% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 1318, A2000
Alcohol bencílico	10 $\mu$ l	1% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 0256, 1997
Solutol HS 15	100 mg	10% peso/peso	Agente tensioactivo	
NaOH 0,028 M	500 $\mu$ l	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edición 0677, 1997
Ácido cítrico 0,01 M	QS $7,2 \pm 0,4$	QS $7,2 \pm 0,4$	Agente tampón	PE 4ª edición 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edición 0169, A2000

## ES 2 292 781 T3

Esta Formulación 3 de la presente invención es límpida, con un intenso color (púrpura oscuro) y no contiene ninguna traza de precipitado, lo cual indica que la Pd-Bpheide a está completamente solubilizada.

El espectro de absorción UV de la Pd-Bpheide a en esta Formulación 3 de la presente invención mostraba 5 picos principales a 344, 385, 538, 763 y 818 nm, con una relación OD 763/818 próxima a 1, que indica que el monómero representa a nivel espectral 50% del producto.

Según las condiciones ICH, esta Formulación 3 es estable a 4°C durante por lo menos 6 meses, como se verificó mediante HPLC y UV.

### Formulación Inyectable 4

Formulación 4 que contiene 1 mg/ml de Pd-Bpheide a como agente de fotosensibilización.

Vehículo:

Fase orgánica: alcohol bencílico/etanol (20/80) 5% vol/peso.

Agente tensioactivo: Crémophore® EL 5% peso/peso.

NaOH: 0,007 M

pH ajustado hasta  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01M

La formulación 4 se preparó como sigue:

En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 1 mg de Pd-Bpheide a preparado como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de una mezcla 20:80 vol/vol de alcohol bencílico y de etanol y la mezcla fue agitada en forma moderada. Después, se añadieron a la mezcla 50 mg de Crémophore® EL y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 0,007 M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura <25°C) agitando ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

La composición exacta de la Formulación 4 está representada en la tabla 4 siguiente:

TABLA 4

Nombre de los componentes	Fórmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
<b>Agente de fotosensibilización</b>				
Pd-Bpheide a	1 mg	0,1% p/p	PA	
<b>Otros componentes</b>				
Etanol absoluto	40 $\mu$ l	4% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 1318, A2000
Alcohol bencílico	10 $\mu$ l	1% vol/ peso	Cosolvente	PE 4ª edición 0256, 1997
Crémophore® EL	50 mg	5% peso/peso	Agente tensioactivo	PE 4ª edición 1082, 1997
NaOH 0,007 M	500 $\mu$ l	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edición 0677, 1997
Ácido cítrico 0,01 M	QS $7,2 \pm 0,4$	QS $7,2 \pm 0,4$	Agente tampón	PE 4ª edición 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edición 0169, A2000

Esta Formulación 4 de la presente invención es límpida, con un intenso color (púrpura oscuro) y no contiene ninguna traza de precipitado, lo cual indica que la Pd-Bpheide a está completamente solubilizada.

El espectro de absorción UV de la Pd-Bpheide a en esta Formulación 4 de la presente invención mostraba 5 picos principales a 344, 385, 538, 763 y 818 nm, con una relación OD 763/818 de 80/20, que indica que el monómero representa a nivel espectral 80% del producto.

## ES 2 292 781 T3

Según las condiciones ICH, esta formulación 4 es estable a 4°C durante por lo menos 6 meses, como se verificó mediante HPLC y UV.

### 5 *Formulación Inyectable 5*

Formulación 5 que contiene 1 mg/ml de Pd-Bpheide a como agente de fotosensibilización.

Vehículo en fase acuosa:

10 Fase orgánica: propilenglicol 5% vol/peso.

Agente tensioactivo: Crémophore® EL 5% peso/peso.

15 NaOH: 0,007 M

pH ajustado a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01M

La formulación 5 se preparó como sigue:

20 En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 1 mg de Pd-Bpheide a preparado como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de propilenglicol y la mezcla fue agitada en forma moderada. Después, se añadieron a la mezcla 50 mg de Crémophore® EL y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 0,007 M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura <25°C) agitando ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

La composición exacta de la Formulación 5 está representada en la tabla 5 siguiente:

TABLA 5

Nombre de los componentes	Fórmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
<b>Agente de fotosensibilización</b>				
Pd-Bpheide a	1 mg	0,01% p/p	PA	
<b>Otros componentes</b>				
Propilenglicol	50 $\mu$ l	5% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edición 0430, 1997
Crémophore® EL	50 mg	5% peso/peso	Agente tensioactivo	PE 4ª edición 1082, 1997
NaOH 0,007 M	500 $\mu$ l	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edición 0677, 1997
Ácido cítrico 0,01 M	QS $7,2 \pm 0,4$	QS $7,2 \pm 0,4$	Agente tampón	PE 4ª edición 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edición 0169, A2000

55 Esta Formulación 5 de la presente invención es límpida, con un intenso color (púrpura oscuro) y no contiene ninguna traza de precipitado, lo cual indica que la Pd-Bpheide a está completamente solubilizada.

60 El espectro de absorción UV de la Pd-Bpheide a en esta Formulación 5 de la presente invención mostraba 5 picos principales a 344, 385, 538, 763 y 818 nm, con una relación OD 763/818 de 60/40, que indica que el monómero representa a nivel espectral 60% del producto.

65 Bajo condiciones ICH, esta Formulación 5 es estable a 4°C durante por lo menos 6 meses, como se verificó mediante HPLC y UV.

## ES 2 292 781 T3

### Formulación Comparativa 1

Formulación Comparativa 1 que contiene 1 mg/ml de Pd-Bpheide a.

5 Vehículo:

Agente tensioactivo: Crémophore® EL 5% peso/peso.

NaOH: 0,007 M

10

pH ajustado hasta  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01M

La Formulación Comparativa 1 se preparó como sigue:

15

En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 1 mg de Pd-Bpheide a preparado como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50 mg de Crémophore® y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Después, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 0,007 M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura  $<25^{\circ}\text{C}$ ) agitando ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico

20

0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

La composición exacta de la Formulación Comparativa 1 está representada en la tabla 6 siguiente:

TABLA 6

25

Nombre de los componentes	Fórmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
Pd-Bpheide a	1 mg	0,1 % p/p	PA	
Crémophore® EL	50 mg	5% peso/peso	Agente tensioactivo	PE 4ª edición 1082, 1997
NaOH 0,007 M	500 $\mu$ l	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edición 0677, 1997
Ácido cítrico 0,01 M	QS $7,2 \pm 0,4$	QS $7,2 \pm 0,4$	Agente tampón	PE 4ª edición 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edición 0169, A2000

40

Esta Formulación Comparativa 1 contiene un precipitado, lo cual demuestra que la Pd-Bpheide a no está completamente solubilizada, en ausencia de la mezcla de alcohol bencílico/etanol o de propilenglicol.

45

### Formulación Comparativa 2

Formulación Comparativa 2 que contiene 1 mg/ml de Pd-Bpheide a.

Vehículo:

50

Etanol 5%

Agente tensioactivo: Crémophore® EL 5% peso/peso.

NaOH: 0,007 M

55

pH ajustado hasta  $7,2 \pm 0,4$

La Formulación Comparativa 2 se preparó como sigue:

60

En un recipiente de vidrio adecuadamente dimensionado que contiene 1 mg de Pd-Bpheide a preparado como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de etanol y la mezcla fue agitada en forma moderada. Después, se añadieron 50 mg de Crémophore® EL y la mezcla fue agitada con un "Vortex". Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500  $\mu$ l de una disolución de hidróxido de sodio NaOH 0,007 M y la mezcla fue agitada durante unos cuantos segundos con el "Vortex". La mezcla fue sometida después a ultrasonidos durante 30 minutos (temperatura  $<25^{\circ}\text{C}$ ) agitando ocasionalmente de forma manual. Después, se ajustó el pH a  $7,2 \pm 0,4$  con ácido cítrico 0,01 M y la mezcla se completó hasta 1 g con agua para preparaciones inyectables (EPPI).

65

## ES 2 292 781 T3

La composición exacta de la Formulaci3n Comparativa 2 est1 representada en la tabla 7 siguiente:

TABLA 7

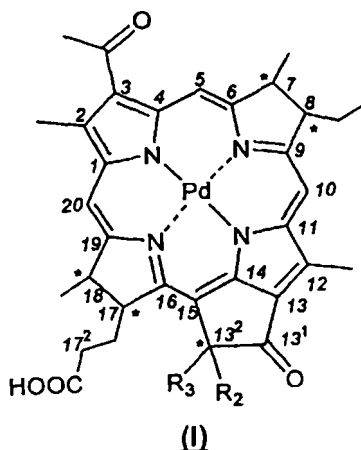
Nombre de los componentes	F3rmula		Funciones	Referencia a las normas
	Unitaria	Centesimal (%)		
Pd-Bpheid e a	1 mg	0,1 % p/p	PA	
Etanol	50 µl	5% vol/peso	Cosolvente	PE 4ª edici3n 1318, A2000
Cr3mophore® EL	50 mg	5% peso/peso	Agente tensioactivo	PE 4ª edici3n 1082, 1997
NaOH 0,007 M	500 µl	50 % vol/peso	Agente salificante	PE 4ª edici3n 0677, 1997
11cido c3trico 0,01 M	QS 7,2 ± 0,4	QS 7,2 ± 0,4	Agente tamp3n	PE 4ª edici3n 0456, 1997
EPPI QS	1 g	100	Diluyente	PE 4ª edici3n 0169, A2000

Esta Formulaci3n Comparativa 2 flocula, lo cual demuestra que la Pd-Bpheid e a no est1 completamente solubilizada, en ausencia del alcohol benc3lico.

REIVINDICACIONES

1. Formulación galénica inyectable para uso en diagnóstico o en una terapia fotodinámica (PDT), conteniendo dicha formulación galénica:

- un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I):



en la que

R<sub>2</sub> representa un grupo H, OH o COOR<sub>4</sub>, en la R<sub>4</sub> es un hidrógeno o un alquilo en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> o un cicloalquilo en C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>,

R<sub>3</sub> representa H, OH, o un alquilo o alcoxi en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> y

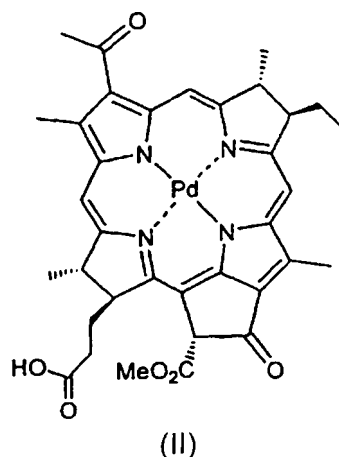
\* representa un carbono asimétrico,

en forma de sal de metal alcalino, en una cantidad que no supera 10 mg/ml, como agente de fotosensibilización, y

- un vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable,

**caracterizada** porque el vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable contiene por lo menos una mezcla de alcohol bencílico-etanol en una relación de mezcla de 15:85 a 25:75 o propilenglicol, como agente de solubilización del agente de fotosensibilización y un agente tensioactivo capaz de disminuir la agregación del agente de fotosensibilización, estando dicho agente tensioactivo contenido en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso total de la formulación, con la condición de que cuando el agente tensioactivo sea un Crémophore, su cantidad no debe superar 5% en peso con relación al peso total de la formulación.

2. Formulación inyectable según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el agente de fotosensibilización de fórmula (I) es la paladio-bacteriofeoforbida a (Pd-Bpheid a) representada por la siguiente Fórmula (II):



en forma de sal de metal alcalino.

## ES 2 292 781 T3

3. Formulación galénica según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (I) o el compuesto de fórmula (II) está en forma de la sal de sodio.

4. Formulación inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque el agente de solubilización es una mezcla de alcohol bencílico-etanol contenida en la formulación en una cantidad que no supera 5% vol con relación al peso total de la formulación.

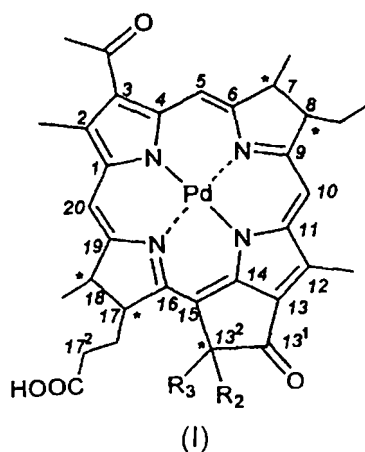
5. Formulación galénica inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el agente de solubilización es una mezcla de alcohol bencílico-etanol con una relación de 20:80 vol/vol.

6. Formulación inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque el agente de solubilización es propilenglicol, contenido en la formulación en una cantidad que no supera 5% en volumen con relación al peso total de la formulación.

7. Formulación inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque el agente tensioactivo es el Crémophore<sup>®</sup> EL, el Crémophore<sup>®</sup> EL P o el Solutol HS 15<sup>™</sup>.

8. Formulación galénica inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque contiene, como agente tensioactivo, Crémophore<sup>®</sup> EL o Crémophore<sup>®</sup> EL P en una cantidad que no supera 5% en peso con relación al peso total de la formulación.

9. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable para uso en un diagnóstico o una terapia fotodinámica (PDT) que contiene un compuesto representado por la siguiente Fórmula (I):



en la que

R<sub>2</sub> representa un grupo H, OH o COOR<sub>4</sub>, en la que R<sub>4</sub> es un hidrógeno o un alquilo en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> o un cicloalquilo en C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>,

R<sub>3</sub> representa H, OH, o un alquilo o alcoxi en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> y

\* representa un carbono asimétrico,

en forma de sal de metal alcalino, en una cantidad de hasta 10 mg/ml, como agente de fotosensibilización, y un vehículo en fase acuosa farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho procedimiento, en el orden indicado, las etapas que consisten en:

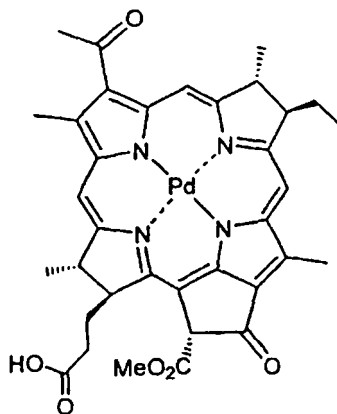
- (1) humectar el agente de fotosensibilización de fórmula (I) en su forma ácida con un agente de solubilización constituido por una mezcla de alcohol bencílico-etanol en una relación de 15:85 a 25:75, o de propilenglicol;
- (2) agregar un agente tensioactivo en una cantidad que no supera 20% en peso con relación al peso final de la formulación;
- (3) agregar un hidróxido de metal alcalino en una cantidad suficiente para neutralizar la función ácida del agente de fotosensibilización de fórmula (I);
- (4) agitar la mezcla en fase acuosa de manera suficiente para permitir la salificación completa del agente de fotosensibilización y su solubilización completa;

## ES 2 292 781 T3

(5) agregar un agente tampón destinado a ajustar el pH a un valor fisiológicamente aceptable de  $7,2 \pm 0,4$ .

(6) si es necesario, ajustar el volumen de la formulación con agua para preparaciones inyectables.

5 10. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el agente de fotosensibilización de fórmula (I) en su forma ácida es paladio-bacteriofeoforbida a (Pd-Bpheide a) representado por la siguiente Fórmula (II):



(II)

11. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según la reivindicación 9 ó 10, **caracterizado** porque el agente de solubilización se añade en una cantidad que no supera % vol con relación al peso total de la disolución.

12. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según una de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque el agente de solubilización agregado es una mezcla de alcohol bencílico-etanol con una relación de 20:80.

13. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según una de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado** porque el agente tensioactivo agregado es el Crémophore® EL o el Crémophore® EL P o el Solutol HS 15™.

14. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado** porque el agente tensioactivo agregado es el Crémophore® EL o el Crémophore® EL P y porque se añade en una cantidad que no supera 5% en peso con relación al peso total de la formulación.

15. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según una de las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizado** porque el hidróxido de metal alcalino es el hidróxido de sodio.

16. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según una de las reivindicaciones 9 a 15, **caracterizado** porque el agente tampón destinado a ajustar el pH añadido es el ácido cítrico.

17. Procedimiento de preparación de una formulación galénica inyectable según una de las reivindicaciones 9 a 16, **caracterizado** porque las etapas (1) a (6) se llevan a cabo bajo una atmósfera de gas inerte.

18. Formulación galénica inyectable obtenida mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17.