



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 359**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02721896 .5**  
96 Fecha de presentación : **10.04.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1377274**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

54 Título: **Sistema de administración de fármacos para agentes fotosensibilizadores.**

30 Prioridad: **11.04.2001 US 833406**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **QLT Inc.**  
**887 Great Northern Way**  
**Vancouver, British Columbia V5T 4T5, CA**

72 Inventor/es: **Boch, Ronald, E.;**  
**Singh, Dev, Mitra, Ranji y**  
**Karmadi, Iman**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 315 359 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).

# ES 2 315 359 T3

## DESCRIPCIÓN

Sistema de administración de fármacos para agentes fotosensibilizadores.

### 5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a microagregados solubles en agua de fotosensibilizantes y fosfolípidos que se pueden usar desde un punto de vista farmacéutico, agrícola o industrial. Estas composiciones de microagregados se pueden usar para suministrar fotosensibilizantes como formulación farmacéutica, fotosensibilizantes relativos al crecimiento de las plantas como producto agrícola y fotosensibilizantes como material industrial. Por otra parte, los microagregados de la invención comprenden combinaciones de fosfolípidos naturales y/o sintéticos que permiten la agregación con los fotosensibilizantes para dar como resultado micelas, liposomas y mezclas de los mismos. Combinaciones particulares de fotosensibilizantes y fosfolípidos o lípidos producen microagregados que son vehículos eficaces para el suministro de dichos compuestos.

Adicionalmente, la invención se refiere a procedimientos para la producción de dichos microagregados como sistemas de suministro. Estos procedimientos incluyen: microfluidización (molienda de chorro de líquido), mezclamiento de alto cizallamiento y exposición a ultrasonidos. Los procedimientos particulares, que implican el uso de combinaciones específicas de fotosensibilizantes y fosfolípidos o lípidos, permiten la preparación a gran escala de vehículos eficaces para el suministro de fotosensibilizantes.

### **Descripción de la técnica relacionada**

Se conoce en la técnica la existencia de una amplia serie de agentes hidrófobos o de otro modo insolubles en agua, activos. Similarmente se conoce la necesidad de suministrar dichos agentes activos a entornos a base de agua o de otro modo acuosos. Como tales, se han desarrollado múltiples sistemas como vehículos de suministro de dichos agentes. Éstos incluyen el uso de disolventes orgánicos, mezclas acuosas/detergentes, mezclas acuosas/disolvente orgánico (tales como disolventes conjuntos), emulsiones, liposomas y micelas. Cada uno de estos sistemas, sin embargo, presenta limitaciones que surgen de consideraciones tales como el grado de insolubilidad en agua y el entorno en que se desea el suministro.

Un ejemplo de agentes hidrófobos en liposomas se explica por Farmer *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.776.991, que describen la encapsulación a gran escala de hemoglobina. Kappas *et al.*, Patente de EE.UU. N° 5.010.073, describen la preparación de liposomas que contienen una metaloporfirina con fosfatidil colina del huevo ("EPC", por sus siglas en inglés), que se usa como lípido. Schneider *et al.*, Patente de EE.UU. N° 5.270.053, describen formulaciones de liposomas que se dice que están exentas de partículas sólidas y agregados de lípidos mayores. Parikh *et al.*, Patente de EE.UU. 5.922.355, describen micropartículas que comprenden sustancias insolubles. Lasic (Nature, Vol. 355, págs. 379-380 (1992)) describe el uso de micelas mixtas que comprenden un fármaco y lípidos biológicos.

Similarmente, también se han usado micelas para suministrar medicamentos a pacientes (Brodin *et al.*, Acta Pharm. Suec. 19, 267-284 (1982)) y se han usado micelas como portadores de fármacos y para el suministro de fármacos a objetivos (Supersaxo *et al.*, Pharm. Res. 8: 1.286-1.291 (1991)), incluyendo medicamentos para el cáncer (Fung *et al.*, Biomater. Artif. Cells. Artif. Organs 16: 439 y siguientes (1988) y Yokoyama *et al.*, Cancer Res. 51: 3.229-3.236 (1991)).

Agentes hidrófobos de gran interés incluyen los compuestos fotosensibilizantes a base de macrociclo polipirrólico y, en particular porfirinas verdes tales como BPD-MA (anillo A de derivado monoácido de benzoporfirina, también conocida por su nombre genérico, verteporfina). Durante algún tiempo se ha sabido que estos compuestos son útiles, cuando se combinan con la luz, para el tratamiento y el diagnóstico de una variedad de afecciones, incluyendo tumores, angiogénesis y neovasculatura, reestenosis y placas ateroscleróticas y artritis reumatoide. Las porfirinas presentan una tendencia natural a "localizarse" en tejido maligno o proliferante, en el caso de que absorban luz a ciertas longitudes de onda cuando se irradian. La luz absorbida puede dar como resultado un efecto citotóxico en las células y las células vecinas, en las que se hayan localizado las porfirinas. (Véase, por ej., Diamond *et al.*, Lancet, 2: 1.175-77 (1972); Dougherty *et al.*, "The Science of Photo Medicine", 625-38 (Regan *et al.* eds. 1982) y Dougherty *et al.*, "Cancer: Principles and Practice of Oncology", 1.836-44 (DeVita Jr *et al.*, eds. 1982)). Se ha postulado que el efecto citotóxico de las porfirinas es debido a la formación de oxígeno singlete cuando se expone a la luz (Weishaupt *et al.*, Cancer Research, 36: 2.326-29 (1976)).

De acuerdo con esto, las preparaciones que contienen las porfirinas son útiles en el diagnóstico y la detección de células y tejido importantes (véase, por ej., "Porphyrin Photosensitization", Plenum Press (Kessel *et al.*, eds. 1983)), tales como los relacionados con tumores, crecimiento de la vasculatura, bloqueo arterial y autoinmunidad. Se han usado fotosensibilizantes similares en la detección y el tratamiento de placas ateroscleróticas, como se describe en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.512.762 y 4.577.636. Además del uso sistémico para el diagnóstico y el tratamiento de diversas afecciones, las porfirinas se pueden usar en una variedad de distintas aplicaciones terapéuticas. Los compuestos de porfirina se han usado por vía tópica para tratar diversas enfermedades de la piel, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.753.958.

## ES 2 315 359 T3

Se ha descrito una serie de preparaciones de fotosensibilizante de porfirina para aplicaciones terapéuticas. Una preparación de fotosensibilizante ampliamente usada durante los primeros días de la terapia fotodinámica tanto para la detección como para el tratamiento, fue un derivado bruto de hematoporfirina, también denominado derivado de hematoporfirina ("HPD", por sus siglas en inglés) o derivado de Lipson, preparado como se describe por Lipson *et al.*,  
5 *J. Natl. Cancer Inst.* 26: 1-8 (1961). Una forma purificada del (de los) componente(s) activo(s) de HPD fue preparada por Dougherty y col., por ajuste del pH para causar la agregación, seguido por la recuperación del agregado, como se describe en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.649.151; 4.866.168; 4.889.129 y 4.932.934. Se está usando clínicamente una forma purificada de este producto con la marca registrada Photofrin® (Axcan Pharmaceuticals), que es porfímero de sodio.

Es de particular interés un grupo de porfirinas modificadas, conocidas como "porfirinas verdes" (Gp, por sus siglas en inglés), que tienen uno o más máximos de absorción de la luz entre aproximadamente 670-780 nm. Se ha demostrado que estos compuestos Gp confieren citotoxicidad contra células objetivo a concentraciones inferiores a las requeridas para la hematoporfirina o HPD. Se pueden obtener compuestos Gp usando reacciones de Diels-Alder  
15 de protoporfirina con diversos derivados de acetileno en las condiciones apropiadas. Las formas preferidas de Gp son los derivados de hidro-monobenzoporfirina (los "BPD", por sus siglas en inglés) así como BPD-MA, EA6 y B3 en particular. La preparación y el uso de los compuestos Gp y BPD se describen en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.920.143, 4.883.790 y 5.095.030. La preparación y los usos de EA6 y B3 se describen en las Patentes de EE.UU. Nos. 6.153.639 y 5.990.149, respectivamente.

Muchos fotosensibilizantes de hidro-monobenzoporfirina, deseables, tales como BPD-MA, no sólo son insolubles en agua a pH fisiológico sino que también son insolubles en: (1) disolventes conjuntos acuoso-orgánicos farmacéuticamente aceptables, (2) disoluciones poliméricas acuosas y (3) disoluciones de tensioactivo/micelares. Se ha demostrado recientemente que la encapsulación de ciertos fármacos en liposomas, previamente a su administración, presenta un  
25 efecto importante en la farmacocinética, la distribución de tejidos, el metabolismo y la eficacia del agente terapéutico. En un esfuerzo para aumentar la selectividad por los tumores de los fotosensibilizantes de porfirina, se han incorporado compuestos de porfirina en liposomas unilaminares, dando como resultado una mayor acumulación y una retención más prolongada del fotosensibilizante por, tanto células malignas cultivadas como en tumores experimentales *in vivo*. Jori *et al.*, *Br. J. Cancer*, 48: 307-309 (1983); Cozzani *et al.*, *In Porphyrins in Tumor Phototherapy*, 177-183, Plenum  
30 Press (Andreoni *et al.* eds. 1984). Este objetivo más eficaz de los tejidos tumorales por porfirinas asociadas a liposomas puede ser debido en parte a la distribución específica de vesículas de fosfolípidos a lipoproteínas del suero, que se ha demostrado que interactúan preferentemente con tejido hiperproliferativo, tal como tumores, por endocitosis mediada por receptores. De esta manera, se ha aumentado la selectividad de la absorción de porfirina por tumores, cuando se compara con fotosensibilizantes disueltos en disolución acuosa. Véase Zhou *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*,  
35 48: 487-92 (1988).

De acuerdo con esto, se han formulado hematoporfirina y ésteres dimetilícos de hematoporfirina en vesículas unilaminares de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC, por sus siglas en inglés) y liposomas de dimiristoil (DMPC) y diestearoil fosfatidil colina (DSPC) (ambos también por sus siglas en inglés). Zhou *et al.*, *supra*; Ricchelli, *New Direc-*  
40 *tions in Photodynamic Therapy*, 847: 101-106 (1987); Milanesi, *Int. J. Radiat. Biol.* 55: 59-69 (1989). Similarmente, se han formulado HP, porfímero de sodio y tetrabenzoporfirinas, en liposomas que constan de fosfatidil colina del huevo (EPC). Johnson *et al.*, *Proc. Photodynamic Therapy: Mechanisms II*, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.; 1,203: 266-80 (1990). Adicionalmente, se puede "solubilizar" BPD-MA a una concentración de aproximadamente 2,0 mg/ml en disolución acuosa usando una mezcla apropiada de fosfolípidos para formar liposomas para encapsulación. Dichas  
45 composiciones de liposomas "solubilizados" son adecuadas para administración parenteral.

Además, se han preparado formulaciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden un fotosensibilizante de porfirina, un disacárido o polisacárido y uno o más fosfolípidos (tales como EFG y DMPC). Estas formulaciones forman liposomas que contienen una cantidad eficaz de fotosensibilizante de porfirina en la reconstitución con un vehículo  
50 acuoso adecuado y como se describe en Desai *et al.*, Patente de EE.UU. N° 6.074.666.

En la Patente de EE.UU. N° 5.707.608 se describen métodos para la producción a gran escala de liposomas DMPC/EFG que contienen un fotosensibilizante.

El documento FR-A-2715846 describe composiciones farmacéuticas en forma de micelas mezcladas, congeladas o liofilizadas que son una dispersión supersaturada, homogénea, de un taxoide en una mezcla de uno o más fosfolípidos y una o más sales biliares.

Tatman *et al.*, *Photochemistry and Photobiology* 68(4), 459-466 (1998) se refieren a caroteno-hematoporfirinas como colorantes para diagnóstico de tumores. Se usaron vehículos de liposomas para estudiar las características foto-  
60 físicas de los colorantes *in vitro*.

Ha sido una estimulación encontrar formulaciones farmacéuticas adecuadas para fotosensibilizantes a base de macrociclos polipirrólicos, hidrófobos, que se pueden filtrar esterilizados y liofilizados y se pueden reconstituir rápidamente también en un medio acuoso previamente a su administración, al tiempo que se mantiene un tamaño de  
65 partícula pequeño después de volver a hidratarlos. Los compuestos fotosensibles tales como la verteporfina (BPD-MA) y QLT 0074 (EA6) deben liofilizarse para su almacenamiento, debido a su inestabilidad en un entorno acuoso.

**Compendio de la invención**

La presente invención proporciona una composición de fosfolípidos en que se pueden incorporar fotosensibilizantes hidrófobos que se podían preparar en un producto de liposomas, estable, suficientemente pequeño para ser filtrado  
 5 estéril, liofilizado para su almacenamiento y se disolvería rápidamente en un medio acuoso para su administración, al tiempo que se mantiene el tamaño de partícula pequeño. Se creía inicialmente que los fosfolípidos de elección contendrían sólo lípidos saturados, debido a que los lípidos saturados son más estables, eliminándose la necesidad de antioxidantes en la preparación farmacéutica. Los intentos iniciales para una composición usando fosfolípidos saturados fracasaron. Sorprendentemente, se encontró que la presencia de al menos algún lípido insaturado en la composición  
 10 era esencial para un producto robusto, estable, que sobreviviera intacto al proceso de liofilización. Adicionalmente, se encontró que la presencia de al menos algunos fosfolípidos con grupos cabeza polares, cargados negativamente, contribuía a la estabilidad de la composición.

Otra observación totalmente inesperada fue que los fosfolípidos formadores de bicapa, que comprende una proporción de lípidos cargados insaturados, podían asumir una estructura de micelas (con o sin la incorporación de una molécula hidrófoba) si se sometía el material a un proceso de alta energía, tal como la microfluidización. Se cree que la producción de micelas a partir de lípidos formadores de bicapa es completamente novedosa y no se habría pronosticado a partir de la bibliografía sobre lípidos formadores de bicapa.

La presente invención se refiere a microagregados de lípidos y fotosensibilizantes. En particular, los microagregados se producen por combinación de fosfolípidos y fotosensibilizantes activos. Dichas composiciones se pueden usar en cualquier entorno terapéutico, agrícola o industrial y como tales, son vehículos para el suministro de los fotosensibilizantes activos. Preferiblemente, los microagregados comprenden micelas y liposomas pequeños que contienen una cantidad terapéuticamente aceptable de un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina. Los lípidos usados para la  
 25 producción de microagregados comprenden lípidos insaturados y se pueden estabilizar por la presencia de antioxidantes. Preferiblemente, los microagregados comprenden una mezcla de lípidos saturados e insaturados. Preferiblemente, los microagregados comprenden fosfolípidos con un grupo cabeza que está cargado negativamente por el intervalo de pH de 5-7. Alternativamente, los microagregados pueden comprender tanto micelas como liposomas producidos a partir de, o conteniendo, la misma combinación de fosfolípidos.

En particular, la invención proporciona:

- una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas fosfolípidos saturados e insaturados y uno o más fotosensibilizantes en las que dicho fosfolípido insaturado no es fosfatidil glicerol del huevo  
 35 y en las que los agregados tienen un diámetro medio menor que 100 nm;

- una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas fosfolípidos saturados e insaturados, al menos uno de los cuales comprende un grupo cabeza cargado negativamente y uno o más fotosensibilizantes, en las que dicho fosfolípido insaturado no es fosfatidil glicerol del huevo y en las que los agregados tienen un  
 40 diámetro medio menor que 100 nm y

- una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas fosfolípidos saturados e insaturados y uno o más fotosensibilizantes, en los que bien:

a) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y no comprenden fosfolípido de huevo o fosfatidil glicerol de huevo o

b) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y uno o más de dichos fotosensibilizantes no es una combinación de cantidades iguales de BFD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub> y en los que los agregados tienen un  
 50 diámetro medio menor que 100 nm.

La presente invención también se refiere a métodos para producir microagregados que comprenden lípidos y agentes hidrófobos. Se ha descubierto que con la selección apropiada de lípidos, condiciones de sal, temperaturas y proceso de reducción de tamaño, se pueden producir microagregados que comprenden diferentes cantidades de liposomas y micelas. Las combinaciones apropiadamente seleccionadas de lípidos, condiciones de poca sal y un proceso de alta energía tal como la microfluidización, pueden dar como resultado la producción de composiciones de microagregados que comprenden predominantemente micelas.

En particular, la invención proporciona un método para preparar una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas uno o más fotosensibilizantes y una mezcla de fosfolípidos saturados e insaturados, en la que dicho método comprende las etapas de:

producir una mezcla de un disolvente orgánico y los fosfolípidos capaces de formar una bicapa de lípidos para formar un "complejo intermedio";

65 eliminar dicho disolvente para producir un material "presoma";

hidratar dicho material "presoma" con un disolvente acuoso;

## ES 2 315 359 T3

preparar dicho material hidratado para producir agregados que comprenden micelas usando manipulación de alta energía seleccionada del grupo que consiste en: microfluidización, exposición a los ultrasonidos, cizallamiento de alta velocidad, extrusión, exposición a los ultrasonidos y homogeneización, en los que bien:

- 5 a) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y no comprenden fosfolípido de huevo ni fosfatidil glicerol de huevo, bien
- b) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y uno o más de dichos fotosensibilizantes no es una combinación de cantidades iguales de BPD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub>; en los que los agregados tienen un diámetro medio menor que 100 nm.

Los microagregados de la invención proporcionan casi el 100% de incorporación de un agente hidrófobo tal como un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina, que puede ser caro y normalmente requieren producir un procedi-  
15 miento sintético complicado. Así, es necesario trabajar poco y hay muy pocos residuos del fotosensibilizante. Además, debido a su pequeño tamaño de partícula, los presentes microagregados presentan una importante aptitud para ser filtra- dos, mejorada, en la producción de grandes cantidades de vehículos de distribución que contienen fotosensibilizantes. Además, los microagregados conservan su pequeño tamaño después de la liofilización y reconstitución con un medio acuoso para distribución farmacéutica. Dichas composiciones de microagregados fotosensibilizantes son útiles en la mediación de la destrucción de células o tejidos no deseados u otros materiales indeseables o para detectar su presen-  
20 cia por fluorescencia, en la irradiación apropiada. Los fotosensibilizantes de hidromonobenzoporfirina particularmente preferidos, usados en la práctica de esta invención incluyen los que tienen uno o más máximos de absorción de la luz en el intervalo de 670-780 nm.

### Breve descripción de los dibujos

25 Otros objetos, características y ventajas son evidentes a partir de las siguientes descripciones de las diversas reali- zaciones y los dibujos adjuntos, en que:

La Figura 1 es una representación gráfica de RMN de <sup>31</sup>P de liposomas y micelas en presencia de Mn<sup>2+</sup>.

30

### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a microagregados (MA) solubles en agua de fotosensibilizantes y fosfolípidos o lípidos. Los microagregados solubles en agua son los que son miscibles en agua u otras disoluciones acuosas. Microagregados  
35 se refiere a agregados de tamaño de submicrómetros de conformación regular o irregular y esférica o no esférica. Para agregados de conformación más o menos esférica, los diámetros aproximados son menores que un micrómetro. Para agregados significativamente no esféricos, el diámetro aproximado del agregado cuando se rota es menor que un micrómetro. Agregados se refiere a composiciones que comprenden cualquier complejo agregado de moléculas constituyentes. Agentes hidrófobos se refiere a los que son poco solubles (menos de 5 mg/ml de agua) o insolubles en  
40 agua u otras disoluciones acuosas.

Agentes particularmente preferidos incluyen fotosensibilizantes de porfirina tales como “porfirinas verdes” tales como BPD-MA, EA6 y B3. En general, se puede usar en la invención cualquier compuesto fotosensible macrocíclico polipirrólico que sea hidrófobo.

45

Ejemplos de estos y otros fotosensibilizantes para uso en la presente invención incluyen: angelicinas, algunas macromoléculas biológicas tales como lipofuscina, centros de reacción del fotosistema II y centros de reacción del fotosistema II D1-D2-cyt b-559, colorantes de calcogenapirilio, clorinas, clorofilas, cumarinas, cianinas, ADN de ceratinas y compuestos relacionados tales como: adenosina, citosina, 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, ácido des-  
50 oxirribonucleico, guanina, 4-tiouridina, 2'-timidina-5'-monofosfato, timidilil(3',5')-2'-desoxiadenosina, timidilil(3'- 5')-2'-desoxiguanosina, timina y uracilo, algunos fármacos tales como: adriamicina, aflocualona, dihidrocloruro de amodiaquina, difosfato de cloroquina, hidroclicloruro de clorpromacina, daunomicina, daunomicinona, 5-iminodau- nomicina, doxiciclina, furosemida, gilvocarcina M, gilvocarcina V, sulfato de hidroxicloquinona, lumidoxiciclina, hidroclicloruro de mefloquina, mequitacina, merbromina (mercurocromo), difosfato de primaquina, dihidrocloruro de quinacrina, sulfato de quinina e hidroclicloruro de tetraciclina, ciertas flavinas y compuestos relacionados tales como:  
55 aloxacina, flavina mononucleótido, 3-hidroxi-3-flavona, limicromo, limiflavina, 6-metilaloxazina, 7-metilaloxazina, 8- metilaloxazina, 9-metilaloxazina, 1-metilimicromo, metil-2-metoxibenzoato, ácido 5-nitrosalicílico, proflavina y ri- boflavina, fulerenos, metaloporfirinas, metaloftalocianinas, derivados de azul de metileno, naftalimidias, naftalociani- nas, algunos compuestos naturales tales como bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona, 4-(4-hidroxi-3- metoxifenil)-3-buten-2-ona; N-formilcinurenina, ácido cinurénico, cinurenina, 3-hidroxicinurenina, DL-3-hidroxici- nurenina, sanguinarina, berberina, carmano y 5,7,9(11),22-ergostatetraeno-3 β-ol, derivados de azul de Nil, los AINE  
60 (fármacos antiinflamatorios no esteroideos), perilenquinonas, fenoles, feoforbidas, feofitinas, dímeros y conjugados fotosensibilizantes, ftalocianinas, porfíricos, porfirinas, psoralenos, purpurinas, quinonas, retinoides, rodaminas, tio- fenos, verdinas, vitaminas y colorantes de xanteno (Redmond and Gamlin, *Photochem. Photobiol.*, 70(4): 391-475  
65 (1999)).

Angelicinas ilustrativas incluyen: 3-aceto-angelicina, angelicina, 3,4'-dimetilangelicina, 4,4'-dimetilangelicina, 4,5'-dimetilangelicina, 6,4'-dimetilangelicina, 6,4-dimetilangelicina, 4,4',5'-trimetilangelicina, 4,4',5'-trimetil-1'-

## ES 2 315 359 T3

tioangelicina, 4,6,4'-trimetil-1'-tioangelicina, 4,6,4'-trimetilangelicina, 4,6,5'-trimetil-1'-tioangelicina, 6,4,4'-trime-  
tilangelicina, 6,4',5'-trimetilangelicina, 4,6,4',5'-tetrametil-1'-tioangelicina y 4,6,4',5'-tetrametilangelicina.

Colorantes de calcogenapirilio ilustrativos incluyen: perclorato de 4,4'-(1,3-propenil)-*bis*-[2,6-di(1,1-dimete-  
5 til)]pirilio, perclorato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]selenopiran-4-iliden]-3-propenilpiri-  
lio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l]selenopiran-4-iliden]-3-propenilpirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*  
(1,1-dimete)l]selenopiran-4-iliden]-3-propenilpirilio, perclorato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dime-  
10 te)l]teluropiran-4-iliden]-3-propenilpirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete-  
l]teluropiran-4-iliden]-3-propenilpirilio, perclorato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]tiapiran-  
4-iliden]-3-propenilpirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]selenopiran-4-  
15 iliden]-3-propenil]selenopirilio, 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]selenopiran-4-iliden]-3-prope-  
nil]selenopirilio, perclorato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]te-  
luropiran-4-iliden]-3-propenil]selenopirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete-  
20 l]teluropiran-4-iliden]-3-propenil]selenopirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{2-[2,6-*bis*(1,1-di-  
mete)l]selenopiran-4-iliden]-4-(2-butenil)]selenopirilio, tetrafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{2-[2,6-*bis*  
(1,1-dimete)l]selenopiran-4-iliden]-4-(2-pentenil)]selenopirilio, tetrafluoroborato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-  
[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]teluropiran-4-iliden]-3-propenil]teluropirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-  
{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]teluropiran-4-iliden]-3-propenil]teluropirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-  
{1-[2,6-*bis*(1,1-dimete)l]teluropiran-4-iliden]etilteluropirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-  
26 [2,6-*bis*(1,1-dimete)l]teluropiran-4-iliden]metilteluropirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-  
*bis*(1,1-dimete)l]tiopiran-4-iliden]3-propenil]tiopirilio, hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-  
*bis*(1,1-dimete)l]selenopiran-4-iliden]-3-propenil]tiopirilio y hexafluorofosfato de 2,6-*bis*(1,1-dimete)l-4-{1-[2,6-  
*bis*(1,1-dimete)l]teluropiran-4-iliden]-3-propenil]tiopirilio.

Los colorantes de clorinas ilustrativos incluyen derivado del éster dimetílico de 5-azaclorina; 5,10,15,20-tetrakis-  
(*m*-hidroxifenil)bacterioclorina; anillo A de derivado monoácido de benzoporfirina; anillo A de derivado monoácido  
de benzoporfirina; éster dimetílico del ácido 7-[2-dimetilamino]-2-oxoetil]-8-etiliden-7,8-dihidro-3,7,12,17-tetrame-  
30 tilporfina-2,18-dipropanoico, éster Z dimetílico del ácido 7-[2-dimetilamino]-2-oxoetil]-8-etiliden-8-etil-7,8-dihidro-  
3,7,12,17-tetrametilporfina-2,18-dipropanoico, éster Z ECHL dimetílico del ácido 7-[2-dimetilamino]-2-oxoetil]-8-  
etiliden-8-etil-7,8-dihidro-3,7,12,17-tetrametilporfina-2,18-dipropanoico, éster Z dimetílico del ácido 7-[2-dimete-  
35 l]amino)-2-oxoetil]-8-etiliden-8-*n*-heptil-7,8-dihidro-3,7,12,17-tetrametilporfina-2,18-dipropanoico, éster Z dimetílico  
del ácido 7-[2-(dimetilamino-2-oxoetil)-8-etiliden-8-*n*-heptil-7,8-dihidro-3,7,12,17-tetrametilestaño (II) porfina-2,18-  
dipropanoico, clorina e<sub>6</sub>, éster dimetílico de clorina e<sub>6</sub>, clorina e<sub>6</sub> k<sub>3</sub>, éster monometílico de clorina e<sub>6</sub>, clorina e<sub>6</sub>  
Na<sub>3</sub>, clorina p<sub>6</sub>, éster trimetílico de clorina p<sub>6</sub>, éster Z dimetílico del ácido 7-[2-(dimetilamino)-2-oxoetil]-8-etiliden-  
8-*n*-heptil-7,8-dihidro-3,7,12,17-tetrametilclorina derivado de zinc (II)-porfina-2,18-dipropanoico, di-terc-butilaspar-  
40 tato de 13<sup>1</sup>-desoxi-20-formil-*vic*-dihidroxibacterioclorina, di-terc-butilaspartato de 13<sup>1</sup>-desoxi-20-formil-4-ceto-bac-  
terioclorina, di-L-aspartilclorina e<sub>6</sub>, mesoclorina, 5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hidroxifenil)clorina, *meta*-(tetrahidroxifenil)  
clorina, metil-13<sup>1</sup>-desoxi-20-formil-4-ceto-bacterioclorina, mono-L-aspartilclorina e<sub>6</sub>, éster dimetílico de fotoproto-  
porfirina IX, éster dimetílico de ficocianobilina, protoclorofilida *a*, clorina e<sub>6</sub> de estaño (IV), clorina e<sub>6</sub> de estaño, L-  
45 aspartilclorina e<sub>6</sub> de estaño, octaetilbenzoclorina de estaño, clorina de estaño (IV), clorina e<sub>6</sub> de zinc y L-aspartilclorina  
e<sub>6</sub> de zinc.

Colorantes de clorofilas ilustrativos incluyen: clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila soluble en aceite, bacterioclorofila  
*a*, bacterioclorofila *b*, bacterioclorofila *c*, bacterioclorofila *d*, protoclorofila, protoclorofila *a*, derivado 1 de clorofila  
50 anfílica y derivado 2 de clorofila anfílica.

Cumarinas ilustrativas incluyen: 3-benzoil-7-metoxicumarina, 7-dietilamino-3-tenoilcumarina, 5,7-dimetoxi-3-  
(1-naftoil)cumarina, 6-metilcumarina, 2H-selenolo[3.2g][1]benzopiran-2-ona, 2H-selenolo[3.2-g][1]benzotiopiran-2-  
ona, 7H-selenolo[3.2g][1]benzoselenopiran-7-ona, 7H-selenopiran[3.2-f][1]benzofuran-7-ona, 7H-selenopiran[3.2-  
55 f][1]benzotiofen-7-ona, 2H-tienol[3.2-g][1]benzopiran-2-ona, 7H-tienol[3.2-g][1]benzotiopiran-7-ona, 7H-tiopiran  
[3.2-f][1]benzofuran-7-ona, mezcla de alquitrán de hulla, khellina, RG 708, RG277 y visnagina.

Cianinas ilustrativas incluyen: colorante de benzoselenazol, colorante de benzoxazol, 1,1'-dietiloxacarbocianina,  
1,1'-dietiloxadicarbocianina, 1,1'-dietiltiacarbocianina, 3,3'-dialquiltiacarbocianinas (n = 2-18), yoduro de 3,3'-dietil-  
55 tiacarbocianina, 3,3'-dihexilselenacarbocianina, kriptocianina, derivado de benzoxazol MC540, derivado de quinolina  
MC540, merocianina 540 y *meso*-etil-3,3'-dihexilselenacarbocianina.

Fulerenos ilustrativos incluyen C<sub>60</sub>; C<sub>70</sub>; C<sub>76</sub>; dihidrofulereno, 1,9-(4-hidroxiciclohexano)buckminsterfulereno, [1-  
metilsuccinato-4-metil-ciclohexadieno-2,3]buckminsterfulereno y tetrahidrofulereno.

Metaloporfirinas ilustrativas incluyen: clorotexafirinanitrato de cadmio (II), *meso*-difenitetrabenzoporfirina de  
cadmio (II), *meso*-tetra-(4-N-metilpiridil)porfina de cadmio, texafirina de cadmio (II), texafirinanitrato de cadmio  
(II), *meso*-tetra-(4-N-metilpiridil)porfina de cobalto, *meso*(4-sulfonatofenil)porfina de cobalto (II), hematoporfiri-  
na de cobre, *meso*-tetra-(4-N-metilpiridil)porfina de cobre, *meso*(4-sulfonatofenil)porfina de cobre (II), dimetite-  
65 xafirinadihidróxido de europio (III), tetrafenilporfina de galio, *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de hierro, tetra-  
za(N-metil-3-piridil)porfirinacloruro de lutecio (III), *meso*-difeniltetrabenzoporfirina de magnesio (II), tetraben-  
zoporfirina de magnesio, tetrafenilporfina de magnesio, *meso*(4-sulfonatofenil)porfina de magnesio (II), texa-  
firinhidróxidometaloporfirina de magnesio (II), *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de magnesio, *meso*-tetra(4-N-

## ES 2 315 359 T3

metilpiridil)porfina de manganeso, *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de níquel, *meso*-tetra(4-sulfonatofenil)porfina de níquel (II), *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de paladio (II), *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de paladio, tetrafenilporfina de paladio, *meso*-(4-sulfonatofenil)porfina de paladio (II), *meso*-(4-sulfonatofenil)porfina de platino (II), dimetilhexafirinadihidróxido de samario (II), *meso*-(4-sulfonatofenil)porfina de plata (II), protoporfirina de estaño (IV), *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de estaño, *meso*-tetra(4-sulfonatofenil)porfina de estaño, tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinadioruro de estaño (IV), éster dimetílico del ácido 15-aza-3,7,12,18-tetrametilporfirinato de zinc (II)-13,17-diildipropiónico, clorotexafirincloruro de zinc (II), coproporfirina III de zinc, 2,11,20,30-tetra-(1,1-dimetiletil)trinafto(2,3-b:2',3'-g:2''3'''-1:2'''3''''-c)porfirazina de zinc (II), 2-(3-piridiloxi)benzo[b]10,19,28-tri(1,1-dimetiletil)trinafto[2',3'-g:2''3'''1:2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), 2,18-bis-(3-piridiloxi)dibenzo[b.1]-10,26-di(1,1-dimetiletil)dinafto[2',3'-g:2''3'''-c]porfirazina de zinc (II), 2,9-bis-(3-piridiloxi)dibenzo[b.g]-17,26-di(1,1-dimetiletil)dinafto[2'',3''-1:2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), 2,9,16-tris-(3-piridiloxi)tribenzo[b.g.1]-24=(1,1-dimetiletil)nafto[2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), 2,3-bis-(3-piridiloxi)benzo[b]10,19,28-tri(1,1-dimetiletil)trinafto[2',3'-g:2''3'''1:2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), 2,3,18,19-tetrakis-(3-piridiloxi)dibenzo[b.1]-10,26-di(1,1-dimetiletil)trinafto[2',3'-g:2''3'''-c]porfirazina de zinc (II), 2,3,9,10-tetrakis-(3-piridiloxi)dibenzo[b.g]-17,26-di(1,1-dimetiletil)dinafto-[2'',3''-1:2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), 2,3,9,10,16,17-hexakis-(3-piridiloxi)tribenzo[b.g.1]-24-(1,1-dimetiletil)nafto[2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), monoyoduro de 2-(3-N-metil)piridiloxi)benzo[b]-10,19,28-tri(1,1-dimetiletil)trinafto[2',3'-g:2''3'''1:2''',3''''-c]porfirazina de zinc (II), 2,18-bis-(3-N-metil)piridiloxi)dibenzo[b.1]-10,26-di(1,1-dimetiletil)dinafto[2',3'-g:2''3'''-c]porfirazinadiyoduro de zinc (II), 2,9-bis-(3-N-metil)piridiloxi)dibenzo[b.g]-17,26-di(1,1-dimetiletil)dinafto[2'',3''-1:2''',3''''-c]porfirazinadiyoduro de zinc (II), 2,9,16-tris-(3-N-metil)piridiloxi)tribenzo[b.g.1]-24-(1,1-dimetiletil)nafto[2''',3''''-c]porfirazinatriyoduro de zinc (II), 2,3-bis-(3-N-metil)piridiloxi)benzo[b]-10,19,28-tri(1,1-dimetiletil)trinafto{2',3'-g:2''3'''1:2''',3''''-c}porfirazinadiyoduro de zinc (II), 2,3,18,19-tetrakis-(3-N-metil)piridiloxi)dibenzo[b.1]-10, 26-di(1,1-dimetil)dinafto{2',3'-g:2''3'''-c}porfirazinatetrayoduro de zinc (II), 2,3,9,10-tetrakis-(3-N-metil)piridiloxi)dibenzo[g.g]-17,26-di(1,1-dimetiletil)dinafto{2''',3''''-1:2''',3''''-c}porfirazinatetrayoduro de zinc (II), 2,3,9,10,16,17-hexakis-(3-N-metil)piridiloxi)tribenzo[b.g.1]-24-(1,1-dimetiletil)nafto{2''',3''''-c}porfirazinahexayoduro de zinc (II), *meso*-difeniltetrabenzoporfirina de zinc (II), *meso*-trifeniltetrabenzoporfirina de zinc (II), *meso*-tetrakis(2,6-dicloro-3-sulfonatofenil)porfirina de zinc (II), *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina de zinc (II), 5,10,15,20-*meso*-tetra(4-oxifenilpropinil)porfina de zinc (II), porfirina *c* de zinc, protoporfirina de zinc, protoporfirina IX de zinc, *meso*-trifeniltetrabenzoporfirina de zinc (II), tetrabenzoporfirina de zinc, tetrabenzoporfirina de zinc (II), tetra-naftaloporfirina de zinc, tetrafenilporfirina de zinc, 5,10,15,20-tetrafenilporfirina de zinc (II), *meso*-(4-sulfonatofenil)porfirina de zinc (II) y texafirinacloruro de zinc (II).

Metalofalocianinas ilustrativas incluyen: mono-(6-carboxipentilaminosulfonil)-trisulfoftalocianina de aluminio, di-(6-carboxipentilaminosulfonil)trisulfoftalocianina de aluminio, octa-*n*-butoxifalocianina de aluminio (III), ftalocianina de aluminio, ftalocianinadisulfonato de aluminio (III), ftalocianinadisulfonato de aluminio, ftalocianinadisulfonato de aluminio (isómero *cis*), ftalocianinadisulfonato de aluminio (prep. clínica), ftalocianinaftalimido-metilsulfonato de aluminio, ftalocianinasulfonato de aluminio, ftalocianinatrisulfonato de aluminio, ftalocianinatrisulfonato de aluminio (III), ftalocianinatetrasulfonato de aluminio (III), ftalocianinatetrasulfonato de aluminio, ftalocianina de cloroaluminio, ftalocianinasulfonato de cloroaluminio, ftalocianinadisulfonato de cloroaluminio, ftalocianinatetrasulfonato de cloroaluminio, *terc*-butilftalocianina de cloroaluminio, ftalocianinasulfonato de cobalto, ftalocianinasulfonato de cobre, tetra-carboxifalocianina de cobre (II), ftalocianina de cobre (II), *terc*-butilftalocianina de cobre, ftalocianinasulfonato de cobre, tetrakis[metilen-tio[(dimetilamino)-metilidin]]ftalocianinatetracloruro de cobre (II), ftalocianina de diclorosilicio, octa-*n*-butoxifalocianina de galio (III), ftalocianinadisulfonato de galio (II), ftalocianinadisulfonato de galio, ftalocianinatetrasulfonato-cloruro de galio, ftalocianinatetrasulfonato de galio (II), ftalocianinatrisulfonato-cloruro de galio, ftalocianinatrisulfonato de galio (II), GaPcS<sub>1</sub>tBu<sub>3</sub>, GaPcS<sub>2</sub>tBu<sub>2</sub>, GaPcS<sub>3</sub>tBu<sub>1</sub>, octa-*n*-butoxifalocianina de germanio (IV), derivado de ftalocianina de germanio, derivado de ftalocianina de silicio, octakis-alcoxi-derivados de ftalocianina de germanio (IV), ftalocianinasulfonato de hierro, 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis(3,6-dioxaheptiloxi)ftalocianina de plomo (II), *terc*-butilftalocianina de magnesio, 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis(3,6-dioxaheptiloxi)ftalocianina de níquel (II), octa-*n*-butoxifalocianina de paladio (II), tetra(*terc*-butil)ftalocianina de paladio (II); (diol)(*terc*-butil)<sub>3</sub>-ftalocianato de paladio (II), dipotasio-[bis(trifenilfosfinamonosulfonato)ftalocianina de rutenio (II), bis(tri-*n*-hexilsiloxi)ftalocianina de silicio, bis(trifenilsiloxi)ftalocianina de silicio, HOSiPcOSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, HOSiPcOSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, SiPc[OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, SiPc[OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, octa-*n*-butoxifalocianina de estaño (IV), ftalocianinasulfonato de vanadio, octa-*n*-butoxifalocianina de zinc (II), 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis(2-etoxietoxi)ftalocianina de zinc (II), 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis(3,6-dioxaheptiloxi)ftalocianina de zinc (II), 1,4,8,11,15,18,22,25-octa-*n*-butoxifalocianina de zinc (II), octabutoxifalocianina de Zn (II), ftalocianina de Zn (II), ftalocianina de zinc, ftalocianina de zinc (II), ftalocianina de zinc y ftalocianina de zinc perdeuterada, ftalocianinadisulfonato de zinc (II), ftalocianinadisulfonato de zinc, ftalocianinasulfonato de zinc, tetrabromofalocianina de zinc, tetra-*terc*-butilftalocianina de zinc (II), tetra-(*terc*-butil)ftalocianina de zinc (II), tetracarboxifalocianina de zinc, tetracloroftalocianina de zinc, tetrahidroxilftalocianina de zinc, tetrayodoftalocianina de zinc, tetrakis-(1,1-dimetil-2-ftalimido)etilftalocianina de zinc (II), tetrakis-(1,1-dimetil-2-amino)etilftalocianina de zinc (II), tetrayoduro de tetrakis-(1,1-dimetil-2-trimetilamonio)etilftalocianina de zinc (II), tetrasulfonatoftalocianina de zinc, ftalocianina de zinc, tetrasulfonatoftalocianina de zinc (II), trisulfonatoftalocianina de zinc (II), ftalocianinatrisulfonato de zinc, (*terc*-butil)<sub>3</sub>-ftalocianinadiol de zinc (II), tetradibenzobarrelenooctabutoxifalocianina de zinc, tetrayoduro 2,9,16,23-tetrakis-(3-(N-metil)piridiloxi)ftalocianina de zinc (II) y octayoduro del complejo de 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis-(3-(N-metil)piridiloxi)ftalocianina de zinc (II) y 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis-(3-piridiloxi)ftalocianina de zinc (II).

Derivados de azul de metileno ilustrativos incluyen: azul de 1-metilmetileno, azul de 1,9-dimetilmetileno, azul de metileno, azul de metileno (16 μM), azul de metileno (14 μM), violeta de metileno, violeta de bromometileno, violeta

## ES 2 315 359 T3

de 4-yodometileno, 1,9-dimetil-3-dimetilamino-7-dietilaminofenotiazina y 1,9-dimetil-3-dietilamino-7-dibutilaminofenotiazina.

Derivados de azul de naftalimidias ilustrativos incluyen: N, N'-bis-(hidroperoxi-2-metoxietil)-1,4,5,8-naftaldiimida, N-(hidroperoxi-2-metoxietil)-1,8-naftalimida, 1,8-naftalimida, N,N'-bis(2,2-dimetoxietil)-1,4,5,8-naftaldiimida y N,N'-bis(2,2-dimetilpropil)-1,4,5,8-naftaldiimida.

Naftalocianinas ilustrativas incluyen: *terc*-butilcloronaftalocianina de aluminio, *bis*(dimetiloctadecilsiloxi)-2,3-naftalocianina de silicio, *bis*(dimetiloctadecilsiloxi)naftalocianina de silicio, *bis*(dimetilhexilsiloxi)-2,3-naftalocianina de silicio, *bis*(dimetilhexilsiloxi)naftalocianina de silicio, *bis*(*terc*-butildimetilsiloxi)-2,3-naftalocianina de silicio, *bis*(*terc*-butildimetilsiloxi)naftalocianina de silicio, *bis*(tri-*n*-hexilsiloxi)-2,3-naftalocianina de silicio, *bis*(tri-*n*-hexilsiloxi)naftalocianina de silicio, naftalocianina de silicio, *terc*-butilnaftalocianina, naftalocianina de zinc (II), tetraacetilamidonaftalocianina de zinc (II), tetraaminonaftalocianina de zinc (II), tetrabenzamidonaftalocianina de zinc (II), tetrahexilamidonaftalocianina de zinc (II), tetrametoxibenzamidonaftalocianina de zinc (II), tetrametoxinaftalocianina de zinc (II), naftalocianinatetrasulfonato de zinc y tetradodecilamidonaftalocianina de zinc (II).

Derivados de azul de Nil ilustrativos incluyen: 5-amino-9-dietilamino-benzo[a]fenotiazinio, 5-amino-9-dietilamino-6-yodo-benzo[a]fenotiazinio, 5-bencilamino-9-dietilamino-benzo[a]fenotiazinio, 5-amino-6,8-dibromo-9-etilamino-benzo[a]fenoxazinio, 5-amino-6,8-diiodo-9-etilamino-benzo[a]fenoxazinio, 5-amino-6-bromo-9-dietilamino-benzo[a]fenoxazinio, 5-amino-9-dietilamino-(azul A de Nil)-benzo[a]fenoxazinio, 5-amino-9-dietilamino-2,6-diiodo-benzo[a]fenoxazinio, 5-amino-9-dietilamino-2-yodo-benzo[a]fenoxazinio, 5-amino-9-dietilamino-6-yodo-benzo[a]fenoxazinio, 5-bencilamino-9-dietilamino-(azul 2B de Nil)-benzo[a]fenoxazinio, cloruro de 5-etilamino-9-dietilamino-benzo[a]fenoselenazinio, cloruro de 5-etilamino-9-dietilamino-benzo[a]fenotiazinio y cloruro de 5-etilamino-9-dietilamino-benzo[a]fenoxazinio.

Los AINE ilustrativos (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) incluyen: benoxaprofeno, carprofeno, carprofeno desclorurado (ácido 2-(2-carbazolil)propiónico), carprofeno (3-clorocarbazol), clorobenoxaprofeno, 2,4-diclorobenoxaprofeno, cinoxacina, ciprofloxacina, descarboxicetoprofeno, descarboxisuprofeno, descarboxibenoxaprofeno, ácido descarboxitiapropénico, enoxacina, feroxacina, feroxacina-N-óxido, flumequina, indoprofeno, cetoprofeno, lomefloxacina, 2-metil-4-oxo-2H-1,2-benzotiazina-1,1-dióxido, N-demetilferoxacina, nabumetona, ácido nalidíxico, naproxeno, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, ácido pipemídico, piroxicam, suprofeno y ácido tiapropénico.

Las perilenquinonas ilustrativas incluyen hipericinas tales como: hipericina, sal sódica monobásica de hipericina, di-aluminiohipericina, di-cobrehipericina, gadolinio hipericina, terbiohipericina, hipocrelinas tales como: acetoxihipocrelina A, acetoxihipocrelina B, acetoxi-*iso*-hipocrelina A, acetoxi-*iso*-hipocrelina B, 3,10-*bis*[2-(2-aminoetilamino)etanol]hipocrelina B, 3,10-*bis*[2-(2-aminoetoxi)etanol]hipocrelina B, 3,10-*bis*[4-(2-aminoetil)morfolin]hipocrelina B, hipocrelina B *n*-butilaminada, 3,10-*bis*(butilamina)hipocrelina B, 4,9-*bis*(butilamina)hipocrelina B, (ácido carboxílico)-hipocrelina B, cistamina-hipocrelina B, 5-clorohipocrelina A u 8-clorohipocrelina A, 5-clorohipocrelina B u 8-clorohipocrelina B, 8-clorohipocrelina B, 8-clorohipocrelina A o 5-clorohipocrelina A, 8-clorohipocrelina B o 5-clorohipocrelina B, aldehído desacetilado de hipocrelina B, hipocrelina B desacetilada, hipocrelina B desacetilada, aldehído desacetilado de hipocrelina B, hipocrelina B desmetilada, 5,8-dibromohipocrelina A, 5,8-dibromohipocrelina B, 5,8-dibromo-*iso*-hipocrelina B, 5,8-dibromo[1,12-CBr=CMe CBr(COMe)]hipocrelina B, 5,8-dibromo[1,12-CHBrC(=CH<sub>2</sub>)CBr(COMe)] hipocrelina B, 5,8-dibromo[1-CH<sub>2</sub>COMe, 12-COCOCH<sub>2</sub>Br]-hipocrelina B, 5,8-diclorohipocrelina A, 5,8-diclorohipocrelina B, 5,8-diclorohipocrelina B desacetilada, 5,8-diyodohipocrelina A, 5,8-diyodohipocrelina B, 5,8-diyodo[1,12-CH=CMeCH(COCH<sub>2</sub>I<sub>2</sub>)]hipocrelina B, 5,8-diyodo[1,12-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>I)=C(COMe)]hipocrelina B, 2-(N,N-dietilamino)hipocrelina B etilaminada, 3,10-*bis*[2-(N,N-dietilamino)etilamino]hipocrelina B, 4,9-*bis*[2-(N,N-dietilamino)etilamino]iso-hipocrelina B, dihidro-1,4-tiazina(ácido carboxílico)hipocrelina B, dihidro-1,4-tiazinahipocrelina B, 2-(N,N-dimetilamino)propilamina-hipocrelina B, 1,3,5,8,10,12-hexametoxi-4,9-perilenquinona-6,7-diacetato de dimetilo, 5,8-dihidroxi-1,3,10,13-tetrametoxi-4,9-perilenquinona-6,7-diacetato de dimetilo, 2,11-dionahipocrelina A, etanolamina-hipocrelina B, etanolamina-*iso*-hipocrelina B, etilendiamina-hipocrelina B, 11-hidroxihipocrelina B o 2-hidroxihipocrelina B, hipocrelina A, hipocrelina B, 5-yodo[1, 12-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>I)=C(COMe)]hipocrelina B, 8-yodo[1, 12-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>I)=C(COMe)] hipocrelina B, 9-metilamino-*iso*-hipocrelina B, 3,10-*bis*[2-(N,N-metilamino)propilamino]hipocrelina B, 4,9-*bis*(metilamina-*iso*-hipocrelina B, 14-metilamina-*iso*-hipocrelina B, 4-metilamina-*iso*-hipocrelina B, metoxihipocrelina A, metoxihipocrelina B, metoxi-*iso*-hipocrelina A, metoxi-*iso*-hipocrelina B, metilamina-hipocrelina B, 2-morfolinohipocrelina B etilaminada, pentaacetoxihipocrelina A, derivado PQP, tetraacetoxihipocrelina B, 5,8,15-tribromohipocrelina B, calfostina C, Cercosporinas tales como: acetoxicercosporina, acetoxi-*iso*-cercosporina, aminocercosporina, cercosporina, cercosporina + *iso*-cercosporina (1/1 molar), diaminocercosporina, dimetilcercosporina, 5,8-ditiofenolcercosporina, *iso*-cercosporina, metoxicercosporina, metoxi-*iso*-cercosporina, metilcercosporina, noranhidro-cercosporina, elsinocromo A, elsinocromo B, fleicromo y rubelina A.

Fenoles ilustrativos incluyen: 2-bencilfenol, 2,2'-dihidroxibifenilo; 2,5-dihidroxibifenilo; 2-hidroxibifenilo; 2-metoxibifenilo y 4-hidroxibifenilo.

Feoforbidas ilustrativas incluyen: feoforbida *a*, metil-13<sup>1</sup>-desoxi-20-formil-7,8-*vic*-dihidro-bacterio-*meso*-feoforbida *a*, metil-2-(1-dodeciloxietil)-2-desvinilpirofeoforbida *a*, metil-2-(1-heptiloxietil)-2-desvinilpirofeoforbida *a*, metil-2-(1-hexiloxietil)-2-desvinilpirofeoforbida *a*, metil-2-(1-metoxietil)-2-desvinilpirofeoforbida *a*, metil-2-(1-pentiloxietil)-2-desvinilpirofeoforbida *a*, magnesiometilbacteriofeoforbida *d*, metilbacteriofeoforbida *d* y feoforbida.

## ES 2 315 359 T3

Feofitinas ilustrativas incluyen: bacteriofeofitina *a*, bacteriofeofitina *b*, bacteriofeofitina *c*, bacteriofeofitina *d*, 10-hidroxi-feofitina *a*, feofitina, feofitina *a* y protofeofitina.

Dímeros y conjugados de fotosensibilizantes ilustrativos incluyen: conjugado de albúmina de suero bovino y mono-  
5 (6-carboxipentilaminosulfonil)trisulfoftalocianina de aluminio, éter (éster) de dihematoporfirina, éter de dihematoporfirina, éter (éster) de dihematoporfirina-clorina, éster de hematóporfirina-clorina, conjugado de hematóporfirina y lipoproteína de alta densidad, ácido 13,13'-(1,3-propionodiol)bis[3,8,12,17-tetrametil]porfin-2,7,18-tripropanoico, ácido 13,13'-(1,11-undecanodiol)bis[3,8,12,17-tetrametil]porfin-2,7,18-tripropanoico, ácido 13,13'-(1,6-hexanodiol)bis[3,8,12,17-tetrametil]porfin-2,7,18-tripropanoico, conju-  
10 gado de SnCe6-Mab 1,7:1, conjugado de SnCe<sub>6</sub>-Mab 1,7:1, conjugado de SnCe6-MAb 6,8:1, conjugado de SnCe6-MAb 11,2:1, conjugado de SnCe6-MAb 18,9:1, conjugado de SnCe6-dextrano 0,9:1, conjugado de SnCe6-dextrano 3,5:1, conjugado de SnCe6-dextrano 5,5:1, conjugado de SnCe6-dextrano 9,9:1, conjugado de  $\alpha$ -tertienilo y albúmina de suero bovino (12:1), conjugado de  $\alpha$ -tertienilo y albúmina de suero bovino (4:1) y tetrafenilporfina unida a 7-cloroquinolina.

15 Ftalocianinas ilustrativas incluyen: (diol)(terc-butil)<sub>3</sub>-ftalocianina, (terc-butil)<sub>4</sub>-ftalocianina, *cis*-octabutoxidibenzodinaftoporfirazina, *trans*-octabutoxidibenzodinafto-porfirazina, 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis-2-etoxietoxi)ftalocianina, 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis-(3,6-dioxaheptiloxi)ftalocianina, octa-*n*-butoxiftalocianina, ftalocianina, sulfonato de ftalocianina, tetrasulfonato de ftalocianina, tetrasulfonato de ftalocianina, terc-butilftalocianina, tetra-terc-butilftalocianina y tetradibenzobarrelenooctabutoxiftalocianina.

Porfíenos ilustrativos incluyen: 2,3-(2<sup>3</sup>-carboxi-2<sup>4</sup>-metoxicarbonilbenzo)-7,12,17-*tris*(2-metoxietil)porfíeno, 2-(2-hidroxietil)-7,12,17-*tri*(2-metoxietil)porfíeno, 2-(2-hidroxietil)-7,12,17-*tri-n*-propilporfíeno, 2-(2-metoxietil)-7,12,17-*tri-n*-propilporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)porfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-hidroxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-metoxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-*n*-hexiloxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-acetoxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-caproiloxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-pelargoniloxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-estearoiloxiporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-(*N*-terc-butoxicarbonilglicinoxi)porfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-[4-( $\beta$ -apo-7-carotenil)benzoi]oxi]porfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-aminoporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-acetamidoporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-glutaramidoporfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-(metilglutaramido)porfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-9-(glutarimido)porfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-3-(*N,N*-dimetilaminometil)porfíeno, hidrocloreto de 2,7,12,17-tetrakis(2-metoxietil)-3-(*N,N*-dimetilaminometil)porfíeno, 2,7,12,17-tetrakis(2-etoxietil)porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propilporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-hidroxiporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-metoxiporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-acetoxiporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-(terc-butilglutaroxi)porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-(*N*-terc-butoxicarbonilglicinoxi)porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-(4-*N*-terc-butoxicarbonilbutiroxi)porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-aminoporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-acetamidoporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-glutaramidoporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-(metilglutaramido)porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-3-(*N,N*-dimetilaminometil)porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9,10-benzo-porfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propil-9-*p*-benzoi]carboxiporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*n*-propilporfíeno, 2,7,12,17-tetra-*terc*-butil-3,6,13,16-dibenzo-porfíeno, 2,7-*bis*(2-hidroxietil)-12,17-di-*n*-propilporfíeno, 2,7-*bis*(2-metoxietil)-12,17-di-*n*-propilporfíeno y porfíeno.

Porfirinas ilustrativas incluyen: éster dimetílico de 5-azaproporfirina, *bis*-porfirina, coproporfirina III, éster tetrametílico de coproporfirina III, deuteroporfirina, éster dimetílico de deuteroporfirina IX, éster dimetílico de diformildeuteroporfirina IX, dodecafenilporfirina, hematóporfirina, hematóporfirina (8  $\mu$ M), hematóporfirina (400  $\mu$ M), hematóporfirina (3  $\mu$ M), hematóporfirina (18  $\mu$ M), hematóporfirina (30  $\mu$ M), hematóporfirina (67  $\mu$ M), hematóporfirina (150  $\mu$ M), hematóporfirina IX, monómero de hematóporfirina, dímero de hematóporfirina, derivado de hematóporfirina, derivado de hematóporfirina (6  $\mu$ M), derivado de hematóporfirina (200  $\mu$ M), derivado A de hematóporfirina (20  $\mu$ M), dihidrocloreto de hematóporfirina IX, dihidrocloreto de hematóporfirina, éster dimetílico de hematóporfirina IX, éster dimetílico de hematóporfirina IX, éster dimetílico de mesoporfirina, éster dimetílico de mesoporfirina IX, éster dimetílico de monofórmilmonovinildeuteroporfirina IX, monohidroxietilvinildeuteroporfirina, 5,10,15,20-tetra(*o*-hidroxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetra(*m*-hidroxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hidroxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetra(*p*-hidroxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetrakis(3-metoxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetrakis(3,4-dimetoxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetrakis(3,5-dimetoxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetrakis(3,4,5-trimetoxifenil)porfirina, 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-5,10,15,20-tetrafenilporfina, Photofrin<sup>®</sup>, Photofrin<sup>®</sup> II, porfirina *c*, protoporfirina, protoporfirina IX, éster dimetílico de protoporfirina, éster dimetílico de protoporfirina IX, yoduro de protoporfirinpropilaminoetilformamida, protoporfirin-*N,N*-dimetilaminopropilformamida, yoduro de protoporfirinpropilaminopropilformamida, protoporfirinbutilformamida, protoporfirin-*N,N*-dimetilaminoformamida, protoporfirinformamida, safirin-1-3,12,13,22-tetraetil-2,7,18,23-tetrametilsafirin-8,17-dipropanol, safirin-2-3,12,13,22-tetraetil-2,7,18,23-tetrametilsafirin-8-monoglicósido, safirin 3, *meso*-tetra-(4-*N*-carboxifenil)porfina, tetra-(3-metoxifenil)porfina, tetra-(3-metoxi-2,4-difluorofenil)porfina, 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-metilpiridil)porfina, tetracloruro de *meso*-tetra-(4-*N*-metilpiridil)porfina, *meso*-tetra-(4-*N*-metilpiridil)porfina, *meso*-tetra-(3-*N*-metilpiridil)porfina, *meso*-tetra-(2-*N*-metilpiridil)porfina, tetra-(4-*N,N,N*-trimetilnilinio)porfina, tetracloruro de *meso*-tetra-(4-*N,N,N*'-trimetilaminofenil)porfina, tetra-naftaloporfirina, 5,10,15,20-tetrafenilporfirina, tetrafenilporfirina, *meso*-tetra-(4-*N*-sulfonatofenil)porfina, tetrasulfonato de tetrafenilporfina, *meso*-tetra-(4-sulfonatofenil)porfina, tetra-(4-sulfonatofenil)porfina, sulfonato de tetrafenilporfirina, *meso*-tetra-(4-sulfonatofenil)porfina, tetrakis-(4-sulfonatofenil)porfina, *meso*-tetra-(4-sulfonatofenil)porfina, *meso*-tetra-(4-*N*-trimetilnilinio)porfina, uroporfirina, uroporfirina I (17  $\mu$ M), uroporfirina IX y uroporfirina I (18  $\mu$ M).

## ES 2 315 359 T3

Psoralenos ilustrativos incluyen: psoraleno, 5-metoxipsoraleno, 8-metoxipsoraleno, 5,8-dimetoxipsoraleno, 3-carbetoxipsoraleno, 3-carbetoxipseudopsoraleno, 8-hidroxipsoraleno, pseudopsoraleno, 4,5',8-trimetilpsoraleno, allopsoraleno, 3-acetoallopsoraleno, 4,7-dimetilallopsoraleno, 4,7,4'-trimetilallopsoraleno, 4,7,5'-trimetilallopsoraleno, isopseudopsoraleno, 3-acetoisopseudopsoraleno, 4,5'-dimetilisopseudopsoraleno, 5',7-dimetilisopseudopsoraleno, pseudoisopsoraleno, 3-acetopseudoisopsoraleno, ¾',5'-trimetil-aza-psoraleno, 4,4',8-trimetil-5'-aminometilpsoraleno, 4,4',8-trimetilftalamil-psoraleno, 4,5',8-trimetil-4'-aminometilpsoraleno, 4,5',8-trimetilbromopsoraleno, 5-nitro-8-metoxipsoraleno, 5'-acetil-4,8-dimetilpsoraleno, 5'-aceto-8-metilpsoraleno y 5'-aceto-4,8-dimetilpsoraleno.

Purpurinas ilustrativas incluyen: octaetilpurpurina, zinc-octaetilpurpurina, octaetilpurpurina oxidada, octaetilpurpurina reducida, estaño-octaetilpurpurina reducida, purpurina 18, purpurina-18, éster metílico de purpurina-18, purpurina, estaño-etil-etiopurpurina I, éster etílico de Zn (II)-aetio-purpurina y zinc-etio-purpurina.

Quinonas ilustrativas incluyen: 1-amino-4,5-dimetoxiantraquinona, 1,5-diamino-4,8-dimetoxiantraquinona, 1,8-diamino-4,5-dimetoxiantraquinona, 2,5-diamino-1,8-dihidroxiantraquinona, 2,7-diamino-1,8-dihidroxiantraquinona, 4,5-diamino-1,8-dihidroxiantraquinona, 4,5- o 2,7-diamino-1,8-dihidroxiantraquinona monometilada, antralina (forma ceto), antralina, anión de antralina, 1,8-dihidroxiantraquinona, 1,8-dihidroxiantraquinona (Crisazina), 1,2-dihidroxiantraquinona, 1,2-dihidroxiantraquinona (Alizarina), 1,4-dihidroxiantraquinona (Quinizarina), 2,6-dihidroxiantraquinona, 2,6-dihidroxiantraquinona (Antraflavina), 1-hidroxiantraquinona (Eritroxi-antraquinona), 2-hidroxiantraquinona, 1,2,5,8-tetrahidroxiantraquinona (Quinalizarina), 3-metil-1,6,8-trihidroxiantraquinona (Emodina), antraquinona, ácido antraquinon-2-sulfónico, benzoquinona, tetrametilbenzoquinona, hidroquinona, clorohidroquinona, resorcinol y 4-clororesorcinol.

Retinoides ilustrativos incluyen: todo-*trans*-retinal, aldehído de 17 átomos de carbono, aldehído de 22 átomos de carbono, 11-*cis*-retinal, 13-*cis*-retinal, retinal y palmitato de retinal.

Rodaminas ilustrativas incluyen: éster metílico de 4,5-dibromorodamina, éster *n*-butílico de 4,5-dibromorodamina, éster metílico de rodamina 101, rodamina 123, rodamina 6G, éster hexílico de rodamina 6G, tetrabromorodamina 123 y éster etílico de tetrametilrodamina.

Tiofenos ilustrativos incluyen: tertiofenos tales como: 2,2':5',2''-tertiofeno, 2,2':5',2''-tertiofeno-5-carboxamida, ácido 2,2':5',2''-tertiofeno-5-carboxílico, éster etílico de 2,2':5',2''-tertiofeno-5-L-serina, 2,2':5',2''-tertiofeno-5-N-isopropinilformamida, 5-acetoximetil-2,2':5',2''-tertiofeno, sulfuro de 5-bencil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-bencil-2,2':5',2''-tertiofenosulfóxido, 5-bencil-2,2':5',2''-tertiofenosulfona, 5-bromo-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-(butinil-3'''-hidroxi)-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-carboxil-5'''-trimetilsilil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-ciano-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-dibromo-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-(1'''',1'''-dibromoetil)-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-diciano-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-diformil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-difluorometil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-diyodo-2,2':5',2''-tertiofeno, 3,3'''-dimetil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-dimetil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-(3'''',3'''-dimetilacrililoximetil)-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-di-(terc-butil)-2,2':5',2''-tertiofeno, 5,5'''-ditiometil-2,2':5',2''-tertiofeno, 3'-etoxi-2,2':5',2''-tertiofeno, ácido etil-2,2':5',2''-tertiofeno-5-carboxílico, 5-formil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-hidroxi-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-hidroximetil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-yodo-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-metoxi-2,2':5',2''-tertiofeno, 3'-metoxi-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-metil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-(3'''-metil-2'''-butenil)-2,2':5',2''-tertiofeno, 2,2':5',2''-tertiofen-5-[3'''-acrilato] de metilo, 2,2':5',2''-tertiofen-5-(3'''-propionato) de metilo, N-alil-2,2':5',2''-tertiofen-5-sulfonamida, N-bencil-2,2':5',2''-tertiofen-5-sulfonamida, N-butil-2,2':5',2''-tertiofen-5-sulfonamida, N,N-di-2,2':5',2''-tertiofen-5-sulfonamida, 3,3',4',3'''-tetrametil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-terc-butil-5'''-trimetilsilil-2,2':5',2''-tertiofeno, 3'-tiometil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-tiometil-2,2':5',2''-tertiofeno, 5-trimetilsilil-2,2':5',2''-tertiofeno, bitiofenos tales como: 2,2'-bitiofeno, 5-ciano-2,2'-bitiofeno, 5-formil-2,2'-bitiofeno, 5-fenil-2,2'-bitiofeno, 5-(propinil)-2,2'-bitiofeno, 5-(hexinil)-2,2'-bitiofeno, 5-(octinil)-2,2'-bitiofeno, 5-(butinil-4'''-hidroxi)-2,2'-bitiofeno, derivado de 5-(pentinil-5'''-hidroxi)-2,2'-bitiofeno, derivado de 5-(3'''-4'''-dihidroxibutinil)-2,2'-bitiofeno, derivado de 5-(etoxibutinil)-2,2'-bitiofeno y varios tiofenos tales como: 2,5-difeniltiofeno, 2,5-di(2-tienil)furano, 2,6-*bis*(2-tienil)piridina, 2,6-*bis*(tienil)piridina, 2-(1-naftalenil)tiofeno, 2-(2-naftalenil)tiofeno, 2,2'-(1,2-fenilen)*bis*-tiofeno, 2,2'-(1,3-fenilen)*bis*-tiofeno, 2,2'-(1,4-fenilen)*bis*-tiofeno, 2,2':5',2''-5'''-cuatertiofeno,  $\alpha$ -cuatertienilo,  $\alpha$ -tetratiofeno,  $\alpha$ -pentatiofeno,  $\alpha$ -hexatiofeno y  $\alpha$ -heptatiofeno.

Las verdinas ilustrativas incluyen: éster trimetílico de copro(II)-verdina, éster metílico de deuteroverdina, éster metílico de mesoverdina y metilpiroverdina de zinc.

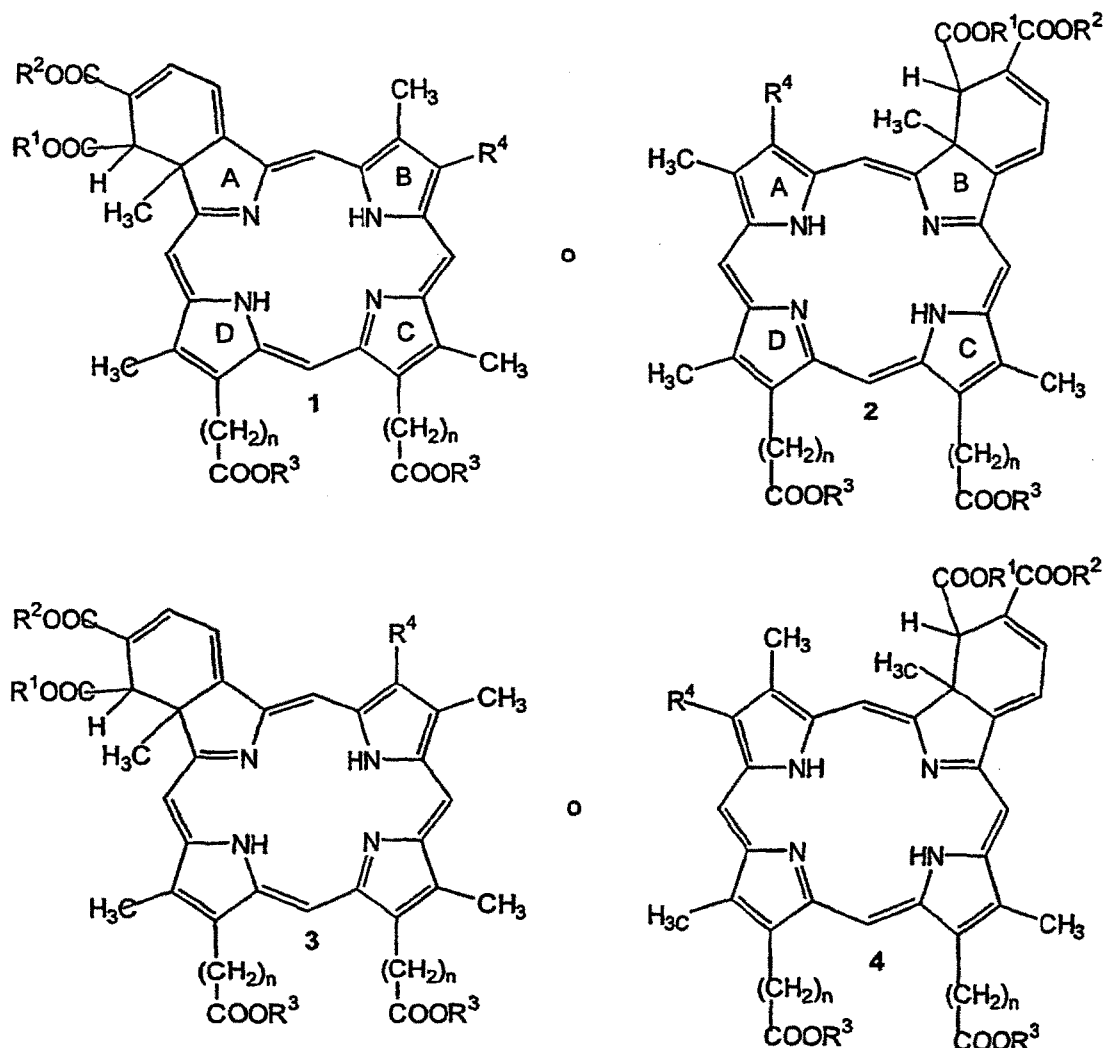
Las vitaminas ilustrativas incluyen: ergosterol (provitamina D2), hexametil-Co a Co *b*-diciano-7-des(carboximetil)-7,8-dideshidrocobirinato (Pyrocobester), pyrocobester y vitamina D3.

Colorantes de xanteno ilustrativos incluyen: Eosina B (4',5'-dibromo, 2',7'-dinitrofluoresceína, dianión), eosina Y, eosina Y (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína, dianión), eosina (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína, dianión), éster metílico de eosina (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína, dianión), éster *p*-isopropilbencílico de eosina (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína, monoanión), derivado de eosina (2',7'-dibromo-fluoresceína, dianión), derivado de eosina (4',5'-dibromofluoresceína, dianión), derivado de eosina (2',7'-diclorofluoresceína, dianión), derivado de eosina (4',5'-diclorofluoresceína, dianión), derivado de eosina (2',7'-diyodofluoresceína, dianión), derivado de eosina (4',5'-diyodofluoresceína, dianión), derivado de eosina (tribromofluoresceína, dianión), derivado de eosina (2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, dianión), eosina, par de iones eosino y cloruro de dicetilpiridinio, eritrosina B (2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína, dianión), eritrosina, dianión eritrosina, eritrosina B, fluoresceína, dianión de fluoresceína, floxina B eosina Y (2',4',5',7'-tetrabromo-3,4,5,6-tetracloro-fluoresceína, dianión), floxina B (tetraclorotetrabromofluoresceína), floxina

B, rosa de bengala (3,4,5,6-tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína, dianión), rosa de bengala, dianión de rosa de bengala, éster O-metilmetílico de rosa de bengala, éster 6'-O-acetilefílico de rosa de bengala, sal de difenildiyodonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de trietilamonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de 2,4,6-trifenilpirilio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de benciltrifenilfosfonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de benciltrifenilfosfonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de difenilyodonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de difenilmetilsulfonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de difenilmetilsulfonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de trietilamonio del éster bencílico de rosa de bengala, sal de difenilpirilio-éster bencílico de rosa de bengala, sal de *bis*(trietilamonio) de rosa de bengala y sal de *bis*(trietilamonio)-3,4,5,6-tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína, sal de *bis*(trietilamonio) de rosa de bengala, sal de *bis*(benciltrifenilfosfonio) de rosa de bengala y (sal de *bis*(benciltrifenilfosfonio)-3,4,5,6-tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína), sal de *bis*(difenilyodonio) de rosa de bengala y (sal de *bis*(difenilyodonio)-3,4,5,6-tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína, par iónico de rosa de bengala y cloruro de dicetilpiridinio, sal de trietilamonio del éster etílico de rosa de bengala, sal de trietilamonio del éster etílico de rosa de bengala, éster etílico de rosa de bengala, éster metílico de rosa de bengala, sal RB de tri-*n*-butilamonio del éster octílico de rosa de bengala, éster 6'-O-acetílico y etílico de rosa de bengala.

Son fotosensibilizantes preferidos en particular las porfirinas verdes tales como: BPD-DA, -DB, -MA y -MB y en particular BPD-MA, EA6 y B3. Estos compuestos son derivados de porfirina obtenidos haciendo reaccionar un núcleo de porfirina con un alquino en una reacción de tipo Diels-Alder, para obtener una monohidrobenzoporfirina y se describen con detalle en la Patente de EE.UU. expedida N° 5.171.749. Por supuesto, también se pueden hacer combinaciones de fotosensibilizantes (es decir, más de un fotosensibilizante). Se prefiere que el espectro de absorción del fotosensibilizante esté en el intervalo visible, típicamente entre 350 nm y 1.200 nm, más preferiblemente entre 400-900 nm e incluso más preferiblemente entre 600-900 nm.

Se describe BPD-MA, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.171.749; se describen EA6 y B3 en las Patentes de EE.UU. Nos. de Serie 09/088.524 y 08/918.840, respectivamente. Las porfirinas verdes preferidas tienen la estructura básica:



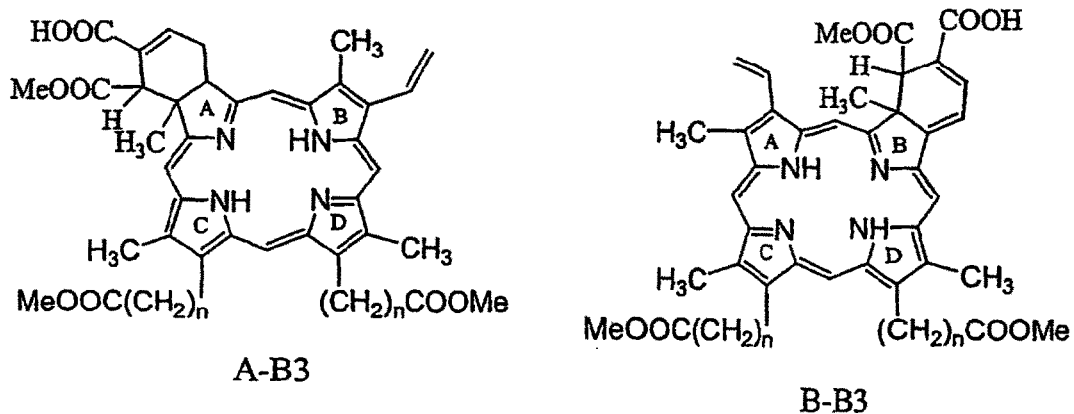
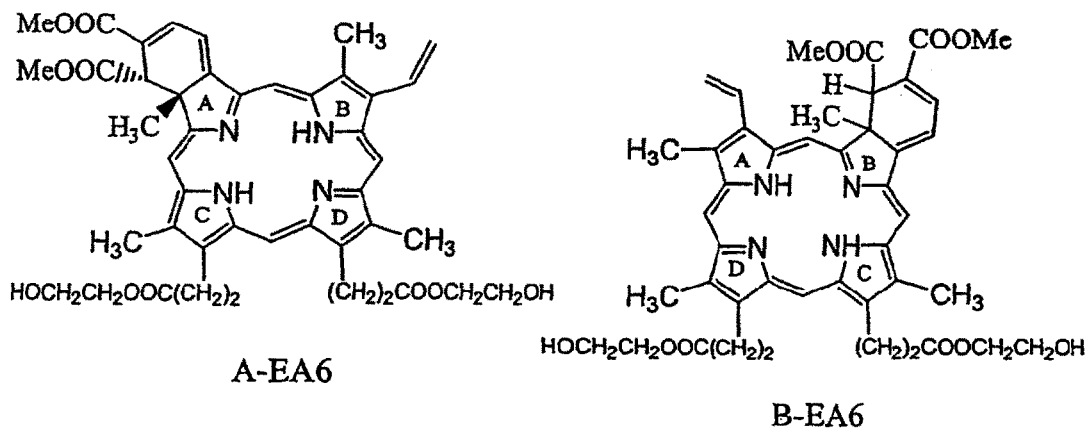
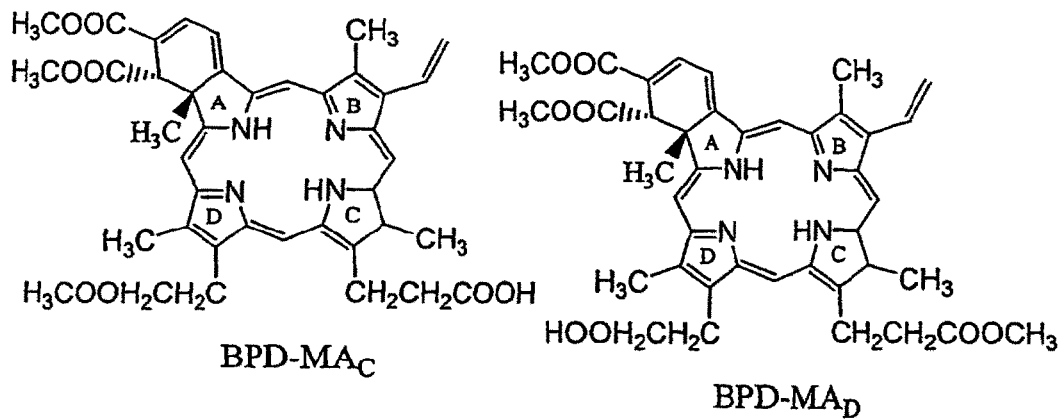
donde R<sup>4</sup> es vinilo o 1-hidroxietilo y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son H o alquilo o alquilo sustituido.

ES 2 315 359 T3

BPD-MA tiene la estructura mostrada en la fórmula 1 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son metilo, R<sup>4</sup> es vinilo y uno de R<sup>3</sup> es H y el otro es metilo. EA6 es de la fórmula 2 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son metilo y los dos R<sup>3</sup> son 2-hidroxiethyl (es decir, los ésteres de etilenglicol). B3 es de fórmula 2 en la que R<sup>1</sup> es metilo, R<sup>2</sup> es H y los dos R<sup>3</sup> son metilo. Tanto en EA6 como en B3, R<sup>4</sup> es también vinilo. En realizaciones preferidas de la invención, se usan combinaciones de uno o más fotosensibilizantes seleccionados de A-EA6, B-EA6 o una combinación de los mismos, en la práctica de la presente invención.

Visudyne™, que también se conoce como Verteporfina para inyección, comprende aproximadamente cantidades iguales de dos regioisómeros de BPD-MA (denominados BPD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub>). Los regioisómeros resultan del procedimiento usado para sintetizarlos, en el que tiene lugar la modificación de los anillos C y D sin especificidad química significativa. Los nombres químicos para los dos regioisómeros son *trans*-(±)-18-etenil-4,4a-dihidro-3,4-bis(metoxycarbonil)-4a,8,14,19-tetrametil-23H, 25H-benzo[b]porfina-9,13-dipropanoato de 9-metilo (BPD-MA<sub>C</sub>) y 13-metilo (BPD-MA<sub>D</sub>). La fórmula molecular es C<sub>41</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> con un peso molecular de aproximadamente 718,8. En una serie de realizaciones preferidas, los fotosensibilizantes usados en la práctica de la invención no son una combinación de cantidades aproximadamente iguales de los dos regioisómeros.

Las representaciones de los dos regioisómeros así como las ilustraciones de las formas de los anillos A y B de EA6 y B3, son como sigue:



## ES 2 315 359 T3

También son útiles los compuestos relacionados de fórmulas 3 y 4; en general, R<sup>4</sup> será vinilo o 1-hidroxietilo y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son H o alquilo o alquilo sustituido.

### *Microagregados*

5 El MA de la invención da como resultado la producción de fosfolípido que contiene micelas, liposomas y mezclas de los mismos. Los fosfolípidos adecuados para uso en la invención pueden ser cualquier fosfolípido que se encuentre en la naturaleza o sintético o saturado o insaturado. Incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: fosfatidil colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidil glicerol, ácido fosfatídico, lisofosfolípidos, fosfolípido  
10 de huevo o de soja o combinaciones de los mismos. Como se usa en la presente memoria, fosfolípidos de huevo o de soja se refieren a fosfolípidos aislados de fuentes de huevo y soja (por ej. huevos de gallina y soja cultivada).

Los fosfolípidos pueden estar en cualquier forma, incluyendo de sal o no de sal, hidrogenada o parcialmente hidrogenada o natural, semisintética (modificada) o sintética. En realizaciones preferidas de la invención, los fosfolípidos  
15 usados son los capaces de formar liposomas, pero también pueden dar como resultado la producción de micelas si se usa una etapa de tratamiento de alta energía para la reducción del tamaño de liposomas multilaminares. En una serie de realizaciones preferidas de la invención, no se usan fosfolípidos de huevo, incluyendo como fosfatidil glicerol de huevo (EFG, por sus siglas en inglés).

Incluso son más preferidos los fosfatidil gliceroles o fosfatidil colinas insaturadas con grupos de cabeza cargados. Dichas realizaciones preferidas incluyen el uso de fosfatidilgliceroles y fosfatidilcolinas mono- o poliinsaturados, cargados negativamente, tales como palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), di-  
20 palmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (todos por sus siglas en inglés) o combinaciones de los mismos. La cadena de ácidos grasos insaturados está preferiblemente en la misma molécula de fosfolípido que el grupo de cabeza cargado, pero  
25 alternativamente, se podía conseguir la combinación deseada de insaturación y carga, usando una molécula saturada, cargada, tal como DMPG junto con una molécula de fosfolípido insaturado. Será preferible en general limitar la cantidad del fosfolípido insaturado (en otras palabras, no hacer la composición total a partir de fosfolípidos insaturados) debido a la mayor estabilidad de los fosfolípidos saturados. Preferiblemente, la relación de fosfolípido cargado  
30 insaturado al fosfolípido saturado es al menos aproximadamente 1:99 y más preferiblemente la proporción es al menos aproximadamente 3:97 e incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10:90 o más. Lo más preferiblemente, la proporción está en el intervalo de aproximadamente 40:60 a aproximadamente 50:50, pero puede exceder de 50:50.

El número de insaturaciones (dobles enlaces) en la cadena de ácidos grasos puede oscilar desde aproximadamente  
35 1-6, pero es más preferiblemente aproximadamente 1 a 3 y lo más preferiblemente aproximadamente 1 o aproximadamente 2.

Sin estar limitados por la teoría, y con respecto al uso preferente de lípidos insaturados en el MA de la invención, se cree que las cadenas de acilo saturadas no pueden ser suficientemente flexibles durante la liofilización (eliminación de agua de) del MA. Así en el caso de los liposomas, donde se elimina agua del volumen atrapado del núcleo (para el que es aplicable una analogía de hacer las uvas pasas), cadenas de acilo insaturadas permiten más curvatura en la membrana lipídica y pueden introducir la flexibilidad necesaria para permitir el encogimiento durante el secado. Como tal, la micela que contiene MA de la invención, es menos susceptible a estos efectos puesto que probablemente carece de un núcleo de agua interna (o alternativamente tienen uno significativamente más pequeño). Esto puede explicar la  
45 robustez de la micela que contiene MA durante la liofilización. La flexibilidad de los lípidos insaturados puede ser una causa probable de la formación de una estructura micelar poco estable durante la microfluidización. La presencia de lípidos insaturados también disminuye la temperatura de transición de la fase (transición de líquido a gel) de la formulación a por debajo de la temperatura ambiente e induce una transición menos pronunciada. La cantidad de lípido insaturado determina el grado al que disminuye la temperatura de transición de la fase. También se cree que la  
50 presencia de un grupo de cabeza cargado en un fosfolípido (por ejemplo, en fosfatidilglicerol) estabiliza a liposomas pequeños y micelas debido a que la carga repulsiva evita la fusión en estructuras de liposomas mayores.

Todos los MA de la invención pueden comprender, consistir o constar de esencialmente uno o más fosfolípidos cualesquiera en asociación con un fotosensibilizante. Preferiblemente, los fosfolípidos usados en el MA de la invención  
55 son insaturados, sintéticos y/o procedentes de fuentes no animales. Más preferiblemente, los fosfolípidos usados en el MA de la invención incluyen DOPG (1,2-dioleoilfosfatidilglicerol), que es un lípido doblemente insaturado de origen vegetal.

También pueden estar presentes en el MA de la invención fosfatidilgliceroles (los PG, por sus siglas en inglés).  
60 Ejemplos de dichos PG incluyen dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), DLPG (ambos por sus siglas en inglés) y similares. La incorporación de dichos PG se puede usar para contribuir a la estabilización de las micelas. Otro tipos de lípidos adecuados que se pueden incluir son fosfatidiletanolaminas (las FE), ácidos fosfatídicos (los AF), fosfatidilserinas y fosfatidilinositoles.

Se puede usar un intervalo de proporciones de lípidos totales a fotosensibilizante, en la práctica de la invención. La proporción depende del fotosensibilizante que se esté usando, pero asegurará la presencia de un número suficiente de moléculas lipídicas para formar MA estable. Las proporciones apropiadas de lípidos totales:fotosensibilizante pueden ser de aproximadamente 7:1 y mayores, aunque tampoco presentan efectos desfavorables proporciones inferiores.

## ES 2 315 359 T3

Un intervalo preferido es de aproximadamente 7:1 a 10:1. Por supuesto todas las proporciones intermedias dentro de este intervalo, tal como aproximadamente 8:1 y aproximadamente 9:1, están dentro del alcance de la invención. Adicionalmente dentro del alcance de la invención están las proporciones subintermedias dentro del intervalo, tal como de aproximadamente 7,1:1 a 7,9:1, aproximadamente 8,1:1 a 8,9:1 y aproximadamente 9,1:1 a 9,9:1, están dentro del alcance de la invención. Cuando el número de moléculas de lípidos no es suficiente para formar un complejo estable, la fase lipofílica del MA puede llegar a estar saturada con moléculas de fotosensibilizante. Entonces, cualquier ligero cambio en las condiciones del proceso puede obligar al fotosensibilizante encapsulado previamente a filtrarse en la superficie del MA o incluso fuera en la fase acuosa.

Si la concentración de fotosensibilizante es suficientemente alta, puede precipitar realmente fuera de la capa acuosa y fomentar la agregación del MA. Cuanto más desencapsulado se presente el fotosensibilizante, mayor el grado de agregación. Cuanto más agregación, mayor será el tamaño medio del agregado y el MA ya no tendrá un tamaño suficientemente pequeño para el uso eficaz en las etapas tales como la esterilización por filtración. Así ligeros aumentos en el contenido lipídico puede aumentar significativamente la aptitud de la composición de liposomas para ser filtrada por aumento de la capacidad para formar y mantener pequeños agregados. Esto es particularmente ventajoso cuando se está trabajando con volúmenes significativos de 500 ml, un litro, cinco litros, 40 litros o más, cuando se compara con lotes menores de aproximadamente 100-500 ml o menos.

Cuando se preparan volúmenes mayores de MA, una relación molar mayor de fosfolípido proporciona más seguridad de aptitud para ser filtrados de manera aséptica, fiable, mediante la proporción de agregados más pequeños. Por otra parte, se pueden evitar así las pérdidas sustanciales de potencia, que son comunes en lotes de crecimiento a escala, debido al menos en parte a problemas de aptitud para ser filtrados. Otro medio para aumentar la aptitud para ser filtrado es por preparación de micelas que contienen MA puesto que las micelas son más pequeñas que los liposomas en general. Dicha micela que contiene MA se filtra más fácilmente esterilizada con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros) y una realización preferida de la invención. Ventajas adicionales en las micelas más pequeñas que contienen MA, es la pérdida reducida del fotosensibilizante activo por pérdida de grandes agregados durante la filtración u otros procesos y la estabilidad de los agregados más pequeños después de la reconstitución. Así una realización preferida de la invención es en el caso en que esté presente el fotosensibilizante en cantidades o en proporciones que favorezcan la formación de micelas.

Cuando se usa una combinación de fosfolípidos en el MA de la invención, se puede usar un intervalo de proporciones relativas de lípidos en asociación con las proporciones de lípidos totales:fotosensibilizante, descritas anteriormente. Las proporciones apropiadas de lípidos para combinaciones de dos fosfolípidos oscilan desde aproximadamente 50:50 a aproximadamente 97:1. Por supuesto todas las proporciones intermedias dentro de este intervalo, tales como aproximadamente 70:30, aproximadamente 80:20 y aproximadamente 90:10, están dentro del alcance de la invención. Como se indica por el uso de la proporción 99:1, las proporciones subintermedias dentro del intervalo, tales como desde aproximadamente 71:29 a 79:21, aproximadamente 81:19 a 89:11 y aproximadamente 91:9 a 97:3, están dentro del alcance de la invención. Ejemplos de combinaciones de dos fosfolípidos en que se pueden usar dichas proporciones incluyen: DMPC:DMPG, DMPC:POPG y DMPC:DOPG.

Una realización preferida en particular del MA de la invención comprende fotosensibilizante en una proporción fosfolípido total:fotosensibilizante 8:1 con una proporción de lípidos de 60:40 de una combinación de DMPC:DOPC que contiene antioxidantes BHT y AP. En particular, se pueden usar fotosensibilizantes tales como EA6 y/o BPD-MA en tal MA.

### *Antioxidantes*

En realizaciones preferidas que comprenden el uso de fosfolípidos insaturados, la invención incluye el uso de antioxidantes para evitar la oxidación de los fosfolípidos. Se ha demostrado que la autooxidación de cadenas de acilo insaturadas es un problema durante el almacenamiento prolongado de formulaciones de liposomas. El fracaso para evitar la descomposición oxidativa de los fosfolípidos insaturados da como resultado subcomponentes tales como lisolípidos y ácidos grasos, que pueden ser indeseables en algunas composiciones de MA. Como tales, se conocen en la técnica antioxidantes adecuados para su inclusión en microagregados que contengan fosfolípidos para mejorar el almacenamiento prolongado. Los ejemplos de dichos antioxidantes incluyen: hidroxitolueno butilado (BHT), alfa-tocoferol y palmitato de ascorbilo (PA), así como tampones de pH tales como fosfatos y glicina. Preferiblemente, está presente BHT a aproximadamente 0,01-0,02% en peso y PA a aproximadamente 0,1-0,2% en peso.

BHT es hidrófobo y se esperaría que se mantuviese en los entornos lipofílicos del MA de la invención. BHT presenta la capacidad para evitar la propagación de cadena durante la autooxidación, aceptando radicales formados durante la descomposición oxidativa de los lípidos. El ácido ascórbico presenta la capacidad de actuar como antioxidante y actuar con otros antioxidantes tales como el alfa-tocoferol. Se ha demostrado que el sistema BHT/ácido ascórbico permite la regeneración de BHT, después de su conversión a un radical fenoxilo después de la eliminación de los radicales libres de los lípidos oxidados, dando como resultado de ese modo la aparición de radicales ascórbico. Este último factor justifica la proporción en peso relativa de PA a BHT descrita anteriormente. Se usó PA en vez de ácido ascórbico debido a que se esperaría que la naturaleza hidrófoba del primero concentrara el antioxidante dentro de los entornos lipofílicos.

## ES 2 315 359 T3

Otras consideraciones de la antioxidación es el llenado de las cámaras de aire del envase con gas nitrógeno y el sellado de dichos envases. Adicionalmente, y debido a que los iones metálicos pueden catalizar procesos oxidativos, se prefiere el uso de fármaco, excipientes y envases, de alta calidad, la correcta limpieza del equipo de fabricación y el uso apropiado de quelatos de iones metálicos.

5

### *Agentes crioprotectores y Agentes isotónicos*

En una realización preferida de la invención, el MA se estabiliza por liofilización. Una ventaja para la micela que contiene el MA de la invención, es el hecho de que las micelas se pueden liofilizar más fácilmente en comparación con los liposomas debido a la ausencia de un núcleo de agua. La liofilización de los liposomas requiere el paso de agua por al menos una bicapa lipídica, dando como resultado tiempos de tratamiento y gasto aumentados. La ausencia de un núcleo de agua también permite que las micelas tengan una concentración mayor de fosfolípido por unidad de volumen. Así se puede solubilizar una cantidad mayor de agente hidrófobo por el fosfolípido por unidad de volumen de micela. Esto permite que el vehículo para la distribución de MA de las micelas, final, tenga una densidad de fármaco mayor por unidad de volumen que otros vehículos de distribución, tales como los liposomas sólo.

Los MA de la invención pueden contener un crioprotector para estabilizar el MA durante la liofilización. Alternativamente, se pueden conservar las estructuras físicas del MA por la presencia de suficiente agua después de la liofilización. Esto se puede realizar por el control apropiado del grado de liofilización. Puesto que no hay volumen atrapado en las micelas, la micela que contiene MA de la invención facilita un mayor control sobre los componentes solubles en agua, como disolvente o sal, para ser eliminados en la preparación de vehículos de distribución que requieran dicha eliminación.

Cualquier agente crioprotector que se sabe que es útil en la técnica de preparar formulaciones liofilizadas, tales como di- o polisacáridos u otros agentes volumétricos tales como la lisina, se puede usar en la invención reivindicada. Además, se pueden usar agentes isotónicos añadidos típicamente para mantener la isomolaridad con fluidos corporales. En realizaciones preferidas se usa un disacárido o polisacárido y funciona tanto como agente crioprotector como como un agente isotónico. En una realización preferida en especial, el disacárido o polisacárido se selecciona del grupo que consiste en: lactosa, trehalosa, maltosa, maltotriosa, palatinosa, lactulosa o sacarosa, prefiriéndose con lactosa o trehalosa. Los azúcares eficaces tales como la trehalosa y la lactosa, pueden formar puentes de hidrógeno con el grupo fosfolipídico de cabeza en vez de agua. Se ha supuesto también que los azúcares eficaces también actúan como matriz espaciadora para disminuir la oposición de los fosfolípidos en el exterior del MA adyacente, tal como los liposomas.

35

Cuando se prolonga el proceso de hidratación de una película lipídica, se tiende a formar más liposomas e incluso pueden precipitar agentes hidrófobos. La adición de un disacárido o polisacárido proporciona la mayor superficie para depositar una película fina de MA e hidratación posterior virtualmente instantánea. Esta película fina proporciona una hidratación más rápida a fin de que, cuando se forme inicialmente el MA por adición de la fase acuosa (hidratada), el MA será de un tamaño de partícula menor y más uniforme. Esto proporciona ventajas significativas en términos de facilidad de fabricación.

40

Sin embargo, también es posible que, cuando esté presente un sacárido en la composición de la invención, se añada después de la formación de película lipídica seca, como parte de la disolución acuosa usada en la hidratación. En una realización particularmente preferida, se añade un sacárido a la película lipídica seca de la invención durante la hidratación.

45

Se prefieren disacáridos o polisacáridos a monosacáridos para este fin. Para mantener la presión osmótica de las composiciones de MA de la invención, similar a la de la sangre, no se debería añadir más de 4-5% de monosacáridos. Por contraste, se puede usar aproximadamente 9-10% de un disacárido sin generar una presión osmótica inaceptable. La mayor cantidad de disacárido proporciona una mayor superficie, que da como resultado que se formen menores tamaños de partícula durante la hidratación de la película lipídica.

50

También, cuando está presente, el disacárido o polisacárido se formula en una proporción preferida de aproximadamente 10-20 sacáridos a 0,5-6,0 fosfolípidos totales, respectivamente, incluso más preferiblemente en una proporción de aproximadamente 10 a 1,5-4,0. En una realización, una formulación preferida pero no limitante es la lactosa o trehalosa y los fosfolípidos totales en una proporción de aproximadamente 10 a 0,94-1,88 a aproximadamente 0,65-1,30, respectivamente.

55

La presencia del disacárido o polisacárido en la composición no sólo tiende a producir MA con intervalos de tamaño de agregados extremadamente pequeños y reducidos sino que también proporciona composiciones de MA en que los agentes hidrófobos tales como un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina, se pueden incorporar de manera estable de una manera eficaz, es decir, con una eficacia de encapsulación que se acerca a 80-100%. Por otra parte, el MA preparado con un sacárido presenta típicamente estabilidad física y química mejorada, de manera que pueda retener un agente hidrófobo incorporado, tal como un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina, sin filtración en almacenamiento prolongado, bien como suspensión acuosa reconstituida bien como un polvo criodesecado.

60

65

## ES 2 315 359 T3

### *Liofilización*

Una vez formulado, se puede liofilizar el MA de la invención para almacenamiento prolongado si se desea. Por ejemplo, el BPD-MA, un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina preferido, ha mantenido su potencia en una composición de MA criodesecado durante un periodo de al menos nueve meses a temperatura ambiente y se ha pronosticado un tiempo de durabilidad de al menos dos años. Si se liofiliza la composición, se puede envasar en viales para su reconstitución posterior con una disolución acuosa adecuada, tal como agua estéril o agua estéril que contenga un sacárido y/u otros excipientes adecuados, justo antes de su uso. Por ejemplo, la reconstitución puede ser simplemente por adición de agua para inyección justo antes de su administración.

Se conocen en la técnica diversas técnicas de liofilización. Por ejemplo, se deben congelar primero los viales que contienen MA de la invención a  $-45^{\circ}\text{C}$  y después mantenerlos ahí durante un periodo de hasta aproximadamente 90 minutos. Esto puede ir seguido por un ciclo de secado primario a alto vacío en el que la temperatura aumenta lentamente hasta aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$  durante un periodo normalmente del orden de aproximadamente 50 horas. Esto puede ir seguido por un ciclo de secado secundario a  $20^{\circ}\text{C}$  de hasta aproximadamente 24 horas. Una vez que se estabiliza la presión del liofilizador a aproximadamente 55-65 mTorr (7,3-8,7 Pa), el ciclo se acaba. Después de eso, se pueden sellar los viales después de cubrir con gas nitrógeno. Una regla general para liofilizar es que se prefiera una torta sólida, frágil, no colapsada y homogénea, para su rehidratación con éxito.

Adicionalmente, el uso de liofilización puede evitar la hidrólisis de agentes hidrófobos susceptibles de dichas reacciones. Por ejemplo, el fotosensibilizante BPD-MA se puede hidrolizar a BPD-DA.

### *Tamaño*

En un aspecto de la invención, el MA es de un tamaño suficientemente pequeño y reducido para que se pueda realizar eficazmente la filtración aséptica de la composición por un filtro hidrófilo de  $0,22\ \mu\text{m}$  (micrómetros) y con grandes volúmenes de 500 ml a un litro o más sin obstrucción significativa del filtro. Como tal el MA que contiene micelas y pequeños liposomas es una realización preferida de la invención. Por otra parte, y dado su tamaño más pequeño, el MA de la invención puede contener principalmente o predominantemente micelas que soportan agente hidrófobo. El MA de la invención puede contener más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 60%, más de aproximadamente 75%, más de aproximadamente 80%, más de aproximadamente 90% y más de aproximadamente 95% de micelas. Incluso más preferiblemente, el MA de la invención puede contener más de aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% de micelas. Lo más preferiblemente en las circunstancias deseadas, el MA de la invención consiste sólo en micelas.

Micelas se refiere a microagregados con la porción de “cola” hidrófoba (lipófila) de los fosfolípidos orientados generalmente hacia el interior de la micela. Preferiblemente, las micelas tienen la porción de “cola” generalmente orientada hacia el centro de la micela. Las micelas no tienen una estructura de bicapa y así no se consideran vesículas o liposomas. Las micelas de la invención tienen diámetros medios menores que aproximadamente 30 nm (nanómetros). Preferiblemente, tienen diámetros medios menores que aproximadamente 20 nm.

Liposomas se refiere a microagregados que comprenden al menos una bicapa de fosfolípidos, compuesta por dos monocapas de lípidos con una región de “cola” hidrófoba y una región de “cabeza” hidrófila. La estructura de la bicapa de membrana es tal que las “colas” hidrófobas (no polares) de las monocapas lipídicas se orientan ellas mismas hacia el centro de la bicapa, al tiempo que las “cabezas” hidrófilas se orientan ellas mismas hacia la fase acuosa. Generalmente comprenden membranas de bicapa lipídica, completamente cerrada, que contienen un volumen acuoso atrapado. Dada la estructura de bicapa, una porción significativa (hasta aproximadamente la mitad) de los fosfolípidos tendrá su porción hidrófoba (lipófila) generalmente orientada alejándose del centro del liposoma. Los liposomas incluyen vesículas unilaminares con una bicapa de membrana única o vesículas multilaminares con bicapas de múltiples membranas, estando separada cada bicapa de la siguiente por una capa acuosa. Los diámetros medios de los liposomas son mayores que los de las micelas.

En los liposomas, un agente hidrófobo puede estar atrapado en la fase acuosa del liposoma o estar asociado con la porción de “cola” de los fosfolípidos en la bicapa lipídica. En las micelas, se deja que un agente hidrófobo se asocie sólo con la porción de “cola” de los fosfolípidos en el núcleo de la micela. Adicionalmente, se pueden usar tanto las micelas como los liposomas para ayudar a “fijar” un fármaco hidrófobo a un sitio activo o solubilizar fármacos hidrófobos para administración parenteral.

Un aspecto de la presente invención usa esta aptitud para formar micelas y liposomas por la misma mezcla de agente hidrófobo y fosfolípidos. Esto daría como resultado MA con una distribución bimodal en sus diámetros, indicando la presencia de tanto micelas como liposomas. En otro aspecto de la invención, las micelas y los liposomas se forman en condiciones que favorecen un tipo de microagregados sobre el otro en la misma mezcla. Las condiciones que favorecen la formación de micelas incluyen la presencia de poca sal en la mezcla así como el uso de disolución acuosa de poca sal para hidratar la mezcla seca. “Poca sal” se refiere a las condiciones que contienen menos de aproximadamente 0,1 N de cationes o aniones libres. Preferiblemente, se refiere a menos de aproximadamente 0,01 N de iones libres. Más preferiblemente se refiere a menos de aproximadamente 0,001 N de iones libres.

## ES 2 315 359 T3

El MA de la invención tiene un diámetro de tamaño medio de agregado por debajo de aproximadamente 100 nm y a veces, dependiendo de las condiciones elegidas, en el intervalo de 10-50 nm. Se ha evaluado el tamaño de los microagregados preparados comprendiendo: QLT 0074, DOPG y DMPC (véase el Ejemplo 1 a continuación) usando tres métodos diferentes (usando un Calibrador de Partículas de Submicrómetros NICOMP 370, por análisis de fractura por congelación y por HPLC de exclusión por tamaños). El análisis de fractura por congelación mostró una mezcla de micelas (7-15 nm de diámetro) y relativamente pocos liposomas (entre 6- y 270 nm de diámetro). HPLC de exclusión por tamaños indicó un tamaño medio de partícula de 28 nm cuando se ensayó en cuatro medios diferentes (PBS, cloruro de sodio al 0,9%, lactosa al 9,2% y dextrosa al 5%) con un intervalo de 25-35 nm.

Como se discute en la presente memoria, la invención controla cuatro parámetros principales que pueden afectar a la facilidad de reducción de tamaño del agregado a un grado inesperado. Como resultado, la aptitud para ser filtrado, en particular con filtración aséptica clásica, mejora significativamente en el MA de la invención. Estos parámetros son: (1) la producción de micelas y pequeños liposomas por el uso de condiciones de poca sal; (2) proporción molar adecuada de fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina a fosfolípidos totales; (3) temperatura durante la etapa de hidratación y (4) temperatura durante la etapa de homogeneización o reducción de tamaño. Los últimos dos parámetros se discuten a continuación.

Se puede ensayar la aptitud para ser filtrado haciendo pasar una composición de MA por un Microfluidizer™ tres veces y retirando una muestra con una jeringa. La jeringa se conecta a un filtro hidrófilo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros) y después se pone en una bomba de jeringa. Se ajusta la velocidad constante del movimiento del pistón a 10 ml/min y se recoge el líquido filtrado hasta que el filtro llega a estar bloqueado por agregados grandes. Se mide después el volumen del líquido filtrado y se registra en términos de ml/cm<sup>2</sup> o g/cm<sup>2</sup>, siendo un centímetro cuadrado el área de filtración eficaz. Así, se define la aptitud para ser filtrado para el propósito de la invención como el volumen o peso máximo de composición de MA que se puede filtrar por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros).

Se puede usar el MA de la invención como un vehículo de distribución para fijar el agente fotosensibilizante constituyente a cualquier célula o tejido para el que se desee contacto con el agente. En realizaciones preferidas de la invención, el fotosensibilizante que se tiene que suministrar previamente a su irradiación con luz como parte del tratamiento fotodinámico (TFD). El MA de la invención preferido en particular comprende un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina, incluyendo BPD-MA y EA6 para uso en tratamiento fotodinámico (TFD) o diagnóstico.

El MA de la invención también comprende micelas que se desestabilizan fácilmente y significativamente en presencia de proteínas, sales, elementos cargados y/o polímeros. Dicho MA es muy adecuado como formulación farmacéutica para suministrar fotosensibilizante a fluidos tales como la sangre, que contiene proteínas, sales, elementos cargados y polímeros. Dada la capacidad para desestabilizar después de la distribución en las condiciones fijadas, el MA de la invención puede suministrarse rápidamente a objetivos tales como el torrente circulatorio, donde los fármacos se pueden recoger o transferir a componentes sanguíneos durante el transporte adicional y/o fijar basándose en las especificidades de los componentes. Como tal, el MA se puede considerar "rotura rápida" en que el MA es estable *in vitro* pero, cuando se administra *in vivo*, se libera rápidamente el fotosensibilizante en el torrente circulatorio donde se asocia con componentes sanguíneos tales como las lipoproteínas del suero. Otro efecto beneficioso de esta transferencia es la deposición reducida de fotosensibilizante en diversos órganos, especialmente el hígado. Como tal, la farmacocinética de distribución del fotosensibilizante con tales micelas se modifica en comparación con el uso de otros vehículos o sistemas para su distribución, tales como los que no liberan el agente rápidamente o los que no transfieren el agente a componentes sanguíneos.

### Preparación

Los métodos para la producción del MA de la invención comprenden, consisten en y/o constan esencialmente de la combinación de fotosensibilizantes y fosfolípidos y sometidos a condiciones capaces de formar micelas o combinaciones de micelas y pequeños liposomas, como se discutió anteriormente. Preferiblemente, los métodos comprenden el uso de fosfolípidos capaces de formar bicapas lipídicas y dar como resultado la producción de micelas estables y opcionalmente pequeños liposomas. El MA resultante, especialmente los que comprenden o consisten en micelas de la invención, no contienen detergentes usados normalmente para la producción de micelas. La ausencia de detergentes pueden reducir considerablemente la toxicidad, que se sabe que da como resultado hemólisis y lesión renal. Para favorecer la formación de micelas, el MA de la invención se formula en condiciones de poca sal debido a que, como se indicó anteriormente, las micelas de la invención son desestabilizadas por la sal.

En general, el MA de la invención se produce disolviendo las moléculas del componente constituyente de MA deseadas (tales como los fosfolípidos, fotosensibilizantes y opcionalmente antioxidantes y crioprotectores, deseados) en un disolvente para formar un "complejo intermedio". Los disolventes preferidos son orgánicos o de otro modo no acuosos. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen cualquier disolvente orgánico volátil, tal como: dietil éter, acetona, cloruro de metileno, cloroformo, piperidina, mezclas de piperidina y agua, metanol, terc-butanol, dimetilsulfóxido, N-metil-2-pirrolidona y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el disolvente orgánico es inmiscible en agua, tal como cloruro de metileno, pero no se requiere inmiscibilidad en agua. En todo caso, el disolvente elegido no sólo debería ser capaz de disolver todos los componentes de la película lipídica, sino que también debería no reaccionar con, o de otro modo afectar perjudicialmente, a estos componentes en cualquier grado significativo.

## ES 2 315 359 T3

Se retira después el disolvente orgánico de la disolución resultante para formar una película lipídica seca por cualquier técnica de laboratorio conocida que no sea significativamente perjudicial para la película lipídica seca y el agente hidrófobo. Dichas técnicas incluyen cualquiera que retire el disolvente por su fase gaseosa, incluyendo evaporación o vacío. En una realización, el disolvente se elimina poniendo la disolución a vacío hasta que se evapora el disolvente orgánico. El residuo sólido es la película lipídica seca de la invención, que contiene agregados de los componentes de MA, considerados la “*presoma*”. El espesor de la película lipídica no es crítico, pero normalmente varía de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 mg/cm<sup>2</sup>, dependiendo de la cantidad de sólido residual y la superficie del recipiente que lo contiene. En otra realización de la invención, el disolvente se elimina como parte del proceso “*presoma*” de Nanba *et al.* (Patente de EE.UU. 5.096.629), que calienta el “complejo intermedio” y lo somete a sequedad por un sistema de secado a vacío instantáneo tal como el CRUX 8B™ (Orient Chemical Ind., Ltd, Japón) para producir un polvo lipídico que contiene agregados de los componentes de MA.

Una vez formado, la película o el polvo se puede almacenar durante un periodo de tiempo prolongado, preferiblemente no más de 4 a 21 días, previamente a su hidratación. El almacenamiento puede ser en un gas apropiado, tal como argón. Aunque la temperatura durante el periodo de almacenamiento de una película lipídica o de polvo tampoco es un factor importante, está preferiblemente por debajo de la temperatura ambiente, lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente -20 a aproximadamente 4°C. Una ventaja para el procedimiento “*presoma*” de Nanba *et al.* es la reducción de la variabilidad lote a lote vista con película fina, que surge debido al uso de múltiples lotes en recipientes de evaporación.

La película lipídica seca o el polvo se pueden hidratar con una disolución acuosa, conteniendo preferiblemente un disacárido o polisacárido si no está presente previamente. Esto dará como resultado la formación de grandes liposomas multilaminares que se pueden tratar además por extrusión o un proceso de alta energía, tal como la microfluidización para formar el tamaño de partícula deseado. Los ejemplos de disoluciones acuosas útiles usadas durante la etapa de hidratación incluyen agua estéril o una disolución diluida de lactosa. En una realización de la invención, la disolución es fisiológicamente isotónica, tal como lactosa al 9,2%, que permite las inyecciones intravenosas rápidas. Preferiblemente la disolución acuosa es estéril. Lo mas preferiblemente para la producción de micelas y la estabilización de pequeños liposomas, la disolución es baja en sal. Se cree que la presencia de sales neutraliza las cargas repulsivas negativas, que evita la agregación o fusión de estas pequeñas partículas a liposomas más grandes.

El volumen de disolución acuosa usado durante la hidratación puede variar enormemente, pero no debería ser tan grande como aproximadamente 98% ni tan pequeño como aproximadamente 30-40%. Un intervalo típico de volúmenes útiles sería de aproximadamente 50 ó 60% a aproximadamente 95%, preferiblemente aproximadamente 75% a aproximadamente 95%, más preferiblemente aproximadamente 80% a aproximadamente 90% y lo más preferiblemente aproximadamente 85% a 90%. Por supuesto todos los subintervalos de aproximadamente 30% a aproximadamente 98% están incluidos como parte de la invención.

La manipulación física de material durante la hidratación se puede realizar por una variedad de medios, incluyendo la mezcla y rotación en un rotoevaporador, distribución manual de recipientes y el uso de agitador o medio de agitación de laboratorio clásico (incluyendo barras magnéticas con placas de agitación, mezcladoras de alto cizallamiento, paletas y combinaciones de los mismos). Se prefieren en la práctica de la invención métodos de alta agitación, tal como el uso de barras de mezclamiento de alto cizallamiento o de agitación en forma de huevo.

En la hidratación, se forman agregados gruesos que incorporan una cantidad terapéuticamente eficaz del fotosensibilizante. La “cantidad terapéuticamente eficaz” puede variar ampliamente, dependiendo del tejido que se tenga que tratar y si el agente hidrófobo está acoplado a un ligando específico del objetivo, tal como un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo. Típicamente, la cantidad terapéuticamente eficaz es tal que produce una dosis de fotosensibilizante dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,15-2,0 mg/kg e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,75 mg/kg. Preferiblemente, la concentración p/v del agente hidrófobo en el “complejo intermedio” oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 8,0-10,0 g/l, cuando la mezcla llega a ser tal como un gel espeso que no es posible manipular o administrar a un individuo por los medios normales. Lo más preferiblemente, la concentración es aproximadamente 2,0 a 2,5 g/l.

El agente es un fotosensibilizante a-d, los diversos parámetros usados para el tratamiento fotodinámico selectivo están interrelacionados. Por lo tanto, la cantidad terapéuticamente eficaz también se debería ajustar con respecto a otros parámetros, por ejemplo, la fluencia, radiación, duración de la luz usada en el tratamiento fotodinámico y el intervalo de tiempo entre la administración del agente fotosensibilizante y la irradiación terapéutica. Generalmente, todos estos parámetros se ajustan para producir una lesión significativa al tejido estimado indeseable, tal como tejido neovascular o de tumores, sin lesión significativa del tejido circundante o permitir la observación de dicho tejido indeseable sin dañar significativamente el tejido circundante.

La etapa de hidratación debería tener lugar a una temperatura que no exceda la de la temperatura de transición vítrea de los agregados de fosfolípidos y agente hidrófobo, formados. Para los fotosensibilizantes de la invención, esta temperatura es aproximadamente 30°C. Preferiblemente la temperatura es temperatura ambiente o inferior, tal como de 10-25 o incluso más preferido de 15-20°C o 17-22°C. Una temperatura especialmente preferida es aproximadamente 21°C. La temperatura de transición vítrea de los agregados de fosfolípido y agente hidrófobo se puede medir usando un microcalorímetro diferencial de barrido. Madden *et al.*, (“Spontaneous vesiculation of large multilamellar vesicles

## ES 2 315 359 T3

composed of saturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol mixtures” *Biochemistry*, Vol. 27, págs. 8.724-8.730, (1988)) describen los efectos de la temperatura y la fuerza iónica en la formación de vesículas.

El uso de lípidos cargados insaturados como se incluye en la invención puede disminuir eficazmente la temperatura de transición vítrea  $T_c$  (transición de líquido a gel) de la formulación a por debajo de la temperatura ambiente e inducir una transición menos pronunciada. La cantidad de lípido insaturado determina el grado de disminución de  $T_c$ .

Los tamaños de partícula de los agregados gruesos formados primero durante la hidratación se homogeneizan después a un tamaño más uniforme y/o reducido a un intervalo de tamaño menor que aproximadamente menos de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nm, dependiendo del método de reducción de tamaño usado. Preferiblemente, esta homogeneización y/o reducción también se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea del complejo agente hidrófobo-fosfolípido formado en la etapa de hidratación. Para fotosensibilizantes de la invención, dicha temperatura no excede la de aproximadamente 30°C y está preferiblemente por debajo de la temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Se ha encontrado que la temperatura de homogeneización con fotosensibilizantes es preferiblemente a temperatura ambiente o inferior, por ej., 15-20°C. A temperaturas de homogeneización superiores, tales como aproximadamente 32-42°C, la aptitud relativa para ser filtrada la composición de MA puede mejorar inicialmente debido a la fluidez mejorada como se espera, pero después, inesperadamente, tiende a disminuir con agitación continua debido a un aumento del tamaño de partícula.

Se pueden usar diversos procedimientos de agitación de alta velocidad o de manipulación del sistema de alta energía, durante la etapa de homogeneización. Ejemplos de tales procedimientos incluyen la microfluidización (molienda por chorro de líquido), mezclamiento a alto cizallamiento y exposición a ultrasonidos. Aunque eficaz, la exposición a ultrasonidos no es ideal para su uso en producción a gran escala de MA. El tratamiento por el sistema de alta energía mencionado da como resultado la producción de pequeñas partículas, normalmente una mezcla de pequeños liposomas y micelas. La extrusión, es otro método de reducción de tamaño. La extrusión da como resultado la producción de pequeños liposomas (tan pequeños como 50 a 100 nm), pero no se han observado micelas por los autores en la producción por este procedimiento. La extrusión implica forzar el material hidratado a presión y a temperaturas conocidas para preparar formulaciones fluidas de liposomas, por filtros de membrana de tamaños de poro definidos. Aunque adecuada para lotes de material a escala laboratorio, la extrusión puede no ser ideal para procesos a gran escala puesto que: (1) los poros llegan a obstruirse incluso a altas presiones, mayores que 6,89 MPa (1.000 psi) 2) la superficie de la membrana de filtro y el volumen de la extrusora son limitaciones y 3) los pases discontinuos múltiples por la extrusora aumentan la probabilidad de diferencias entre lotes.

Los dispositivos para los procesos descritos anteriormente incluyen un Microfluidizer™ (tal como un Microfluidics™ Modelo 110 F), un aparato de ultrasonidos, un mezclador de alto cizallamiento, un homogeneizador, un agitador de laboratorio clásico o agitador o cualquier otro dispositivo de agitación. Por supuesto las modificaciones en tales procedimientos para adaptar el agente hidrófobo particular de interés y la formación del MA deseado, están dentro del alcance de la invención. En una realización preferida de la invención, estos procedimientos se usan para la producción de MA que contiene principalmente micelas.

Dichos procedimientos se pueden usar para producir diversas proporciones de MA de micelas, liposomas y combinaciones de los mismos. En realizaciones donde se producen tanto micelas como liposomas, se pueden separar por la distribución de tamaños bimodal vista en combinaciones de los dos. Esto surge del tamaño significativamente menor de las micelas en comparación con los liposomas. El análisis del tamaño de MA se puede realizar por métodos que incluyen la microscopía electrónica, para excluir grandes agregados como liposomas y el uso de un calibrador de partículas, que se puede usar en combinación con rutinas de ajuste para distribuciones uni- y bimodales. Otro método es por el uso de resonancia magnética nuclear (RMN de  $^{31}\text{P}$ ) mediada por cloruro de manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ), donde los grupos de cabeza marcados con  $^{31}\text{F}$  fósforo, de lípidos en la capa interna de una bicapa lipídica de liposomas no se enfría rápidamente por el  $\text{Mn}^{2+}$  debido a que el  $\text{Mn}^{2+}$  no puede cruzar fácilmente la bicapa para penetrar en el volumen atrapado. Así los liposomas producirán una señal RMN residual de aproximadamente 30-40% para liposomas grandes y pequeños después de añadir  $\text{Mn}^{2+}$ . Todos los grupos de cabeza marcados con  $^{31}\text{P}$  de lípidos de una micela, sin embargo, están en la superficie y así están completamente expuestos a enfriamiento rápido con  $\text{Mn}^{2+}$ . Así las micelas no producen señal RMN restante debido al enfriamiento rápido después de añadir  $\text{Mn}^{2+}$  (véase la Figura 1).

En una realización preferida, se usa para agitación un dispositivo de alta presión tal como un Microfluidizer™. Algunos modelos de sistemas de microfluidización son procesadores de tamaño escalable continuos y semicontinuos. La microfluidización usa corrientes a alta presión de material hidratado que colisionan a velocidades ultra altas en microcanales precisamente definidos. En la cámara de interacción, dos corrientes de fluido a alta velocidad colisionan entre sí a un ángulo de 90°. Las fuerzas combinadas de cizallamiento, impacto y cavitación dan como resultado la producción de liposomas y micelas. En la microfluidización, se genera una gran cantidad de calor durante el corto periodo de tiempo durante el que pasa el fluido por una cámara de interacción de alta presión. A medida que aumenta la temperatura de microfluidización, la fluidez de la membrana también aumenta, que inicialmente hace más fácil la reducción del tamaño de partícula, como se espera. Por ejemplo, la aptitud para ser filtrado puede aumentar tanto como cuatro veces con los pocos pases iniciales por un dispositivo Microfluidizer™. El aumento en la fluidez de la membrana de la bicapa fomenta la reducción del tamaño de partícula, que hace más fácil la filtración de la composición final. En los diversos pases iniciales, este mecanismo de fluidez aumentada domina ventajosamente el procedimiento.

## ES 2 315 359 T3

Sin embargo, a medida que aumenta el número de pases y la temperatura, más moléculas de agente hidrófobo se aprietan aparentemente en casos que implican liposomas, aumentando la tendencia de los liposomas a agregarse a partículas más grandes. En el momento en que la agregación de vesículas empieza a dominar el proceso, no se pueden reducir más los tamaños.

5 Por esta razón, en los métodos de la invención, la temperatura de homogeneización se deja enfriar a y se mantiene a una temperatura no mayor que la temperatura ambiente después de que la composición pase por la zona de agitación máxima, por ej., la cámara de interacción de un dispositivo Microfluidizer™. Se puede proporcionar fácilmente un sistema de enfriamiento apropiado, por cualquier dispositivo de agitación clásico en que tiene que tener lugar la  
10 homogeneización, por ej., un Microfluidizer™, tal como por circulación de agua fría en una camisa de enfriamiento, apropiada, alrededor de la cámara de mezclamiento u otra zona de turbulencia máxima. Aunque la presión usada en tales dispositivos de alta presión no es crítica, las presiones de aproximadamente 68,9 a 110,3 MPa (aproximadamente 10.000 a aproximadamente 16.000 psi) no son infrecuentes.

15 No se habría esperado que mantener la temperatura de hidratación y la etapa de homogeneización/reducción a una temperatura por debajo de 30°C produjera tamaños de partícula menores. De hecho, la invención es contraria a la creencia convencional de que los tamaños de partícula pequeños se consiguen aumentando más bien que disminuyendo estas temperaturas. Véase, por ej., M. Lee *et al.*, "Size Distribution of Liposomes by Flow Field-Flow Fractionation", *J. Pharm. & Biomed. Analysis*, 11: 10, 911-20 (1993), ecuación (6) que muestra el diámetro "d" de  
20 partícula como inversamente proporcional a la temperatura "T" y mostrando la Figura 6b en la misma la preparación I de liposomas (preparada a aproximadamente 70°C) con tamaños de partícula menores que la preparación II (preparada a aproximadamente 23°C).

Como última etapa, las composiciones de MA de las invenciones se filtran preferiblemente asépticamente por  
25 un filtro con un tamaño de poro extremadamente pequeño, es decir, 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros). Aunque se conocen en la técnica otros métodos de esterilización tales como el calentamiento y la irradiación por rayos X, el uso de dichos métodos puede dar como resultado cambios estructurales irreversibles en los lípidos y en agentes hidrófobos tales como muchos fotosensibilizantes. Se conoce en la técnica una amplia variedad de sistemas de filtración incluyendo cartuchos Durapore TP, Millipak 100, Millidisk 40S y millidisk MCGL. Las presiones de filtro usadas durante la filtración  
30 estéril pueden variar ampliamente, dependiendo del volumen de la composición, la densidad, la temperatura, el tipo de filtro, el tamaño de poro del filtro y el tamaño del MA. Sin embargo, como guía, una serie típica de condiciones de filtración sería como sigue: presión de filtración de 103-172 KPa (15-25 psi), carga de filtración de 0,8 a 1,5 ml/cm<sup>2</sup> y temperatura de filtración de aproximadamente 25°C. Preferiblemente, se usa el Millidisk 40S hidrófilo, a una carga de aproximadamente 1 ml/cm<sup>2</sup>.

35 Se describe a continuación un procedimiento típico general para producir MA que contiene fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina, de la invención, con un detalle ilustrativo adicional:

40 (1) Filtración estéril de cloruro de metileno como disolvente orgánico por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros), hidrófobo.

(2) Adición de DMPC:EFG:BPD-MA a una proporción de 4,7:3,25:1 y excipientes al disolvente orgánico filtrado, disolviendo los dos excipientes y el fotosensibilizante para formar el "complejo intermedio".

45 (3) Filtración de la disolución resultante por un filtro hidrófobo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros).

(4) Transferencia del líquido filtrado a un aparato rotoevaporador tal como el comercialmente disponible con el nombre Rotoevaporador.

50 (5) Eliminación del disolvente orgánico para formar una película lipídica seca.

(6) Análisis de la película lipídica para determinar el nivel de la concentración de disolvente orgánico, continuando opcionalmente la eliminación hasta que el nivel de disolvente orgánico esté por debajo de 0,01%,

55 (7) Preparación de una disolución de lactosa al 10%. Si se tiene que inyectar la formulación de MA, esta disolución debería ser inyectable.

(8) Filtración de la disolución de lactosa por un filtro hidrófobo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros), hidrófobo.

60 (9) Hidratación de la película lipídica con la disolución de lactosa al 10% filtrada, para formar agregados gruesos.

(10) Reducción de los tamaños de partícula de los agregados gruesos haciendo pasar por ellos por un Microfluidizador™, opcionalmente a 62 MPa [9.000 psi (libras por pulgada cuadrada)] durante aproximadamente 5 pases discretos para producir micelas.

65 (11) Determinación de la distribución reducida de tamaños de agregados de MA.

## ES 2 315 359 T3

(12) Filtración aséptica de la composición de MA por un filtro hidrófilo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros). (Opcionalmente, la disolución se puede prefiltrar primero con un prefiltro de 5,0  $\mu\text{m}$  (micrómetros) o más pequeño).

(13) Análisis de potencia del fotosensibilizante.

(14) Llenado de viales con la composición de MA.

(15) Liofilización.

Lo anterior se puede adaptar para la producción selectiva de micelas realizándose todas las etapas apropiadas en condiciones de poca sal para favorecer la producción micelar posterior después de la hidratación. Como tales, no se deben usar agentes voluminosos a base de sal. En dichas aplicaciones, las micelas resultantes son del orden de aproximadamente 15 nm de diámetro, que está en el límite inferior para tamaños factibles de los liposomas. La estructura de la micela se confirmó usando RMN de  $^{31}\text{P}$ .

A continuación se describe con detalle ilustrativo adicional un procedimiento general alternativo para producir MA con fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina de la invención, por el uso de un procedimiento “*presoma*” de Nanba *et al.*, (véase la Patente de EE.UU. 5.096.629):

(1) Filtración estéril de cloruro de metileno como disolvente orgánico por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros), hidrófobo.

(2) Adición de DMPC:DOPG a una proporción de 60:40 con una lípido total:EA6 a una proporción de 8:1 y antioxidantes BHT y PA al disolvente orgánico filtrado, disolviendo tanto los excipientes como el fotosensibilizante para formar el “complejo intermedio”.

(3) Filtración de la disolución resultante por un filtro hidrófobo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros).

(4) Transferencia del líquido filtrado al tanque de líquidos seguido por la alimentación a un calentador tubular calentado de manera externa.

(5) Eliminación del disolvente orgánico enviando la mezcla calentada a una cámara de vacío de no más de 40 KPa (300 mm de Hg) a una velocidad de más de 0,1 veces la velocidad del sonido para secar instantáneamente la mezcla para formar polvo lipídico.

(6) Análisis del polvo lipídico para determinar el nivel de la concentración de disolvente orgánico, continuar opcionalmente la eliminación hasta que el nivel de disolvente orgánico esté por debajo de 0,01%.

(7) Preparación de una disolución de lactosa al 10%. Si se tiene que inyectar la formulación de MA, esta disolución debería ser inyectable.

(8) Filtración de la disolución de lactosa por un filtro hidrófobo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros).

(9) Hidratación del polvo lipídico con la disolución de lactosa al 10% filtrada para formar agregados gruesos.

(10) Dispersión de los agregados gruesos por agitación a altas rpm, a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea de los agregados que contienen fotosensibilizante y fosfolípido.

(11) Determinación de la distribución reducida de tamaños de agregados de MA.

(12) Filtración aséptica de la composición de MA por un filtro hidrófobo de 0,22  $\mu\text{m}$  (micrómetros). Opcionalmente, la disolución se puede prefiltrar primero con un prefiltro de 5,0  $\mu\text{m}$  (micrómetros) o más pequeño).

(13) Análisis de la potencia del fotosensibilizante.

(14) Llenado de los viales con la composición de MA.

(15) Liofilización.

Un medio para realizar el secado instantáneo anterior es por el uso de un sistema de secado a vacío tal como el producto CRUX 8B<sup>TM</sup> de Orient Chemical Ind., Ltd.; Japón. Por otra parte, la etapa de dispersión anterior puede ser a velocidades de aproximadamente 1.047 rad/s (10.000 rpm) u oscilando de 837,6 a 1.570 rad/s (8.000 a 15.000 rpm). Dicho procedimiento “*presoma*” también se puede adaptar para la producción selectiva de micelas realizando todas las etapas apropiadas en condiciones de poca sal para favorecer la producción posterior de micelas después de la hidratación. Como tal, no se deben usar agentes voluminosos a base de sal.

Como se describió anteriormente, la práctica de los métodos de la invención para la producción de MA se puede realizar con una variedad de fosfolípidos y procedimientos. La invención incluye la observación, más allá del uso

## ES 2 315 359 T3

de condiciones de poca sal, que el uso de fosfolípidos insaturados, cargados, tales como DOPG así como aparece el tratamiento de alta energía (tal como microfluidización y exposición a ultrasonidos), para favorecer la formación de micelas en combinaciones formadoras de liposomas de otro modo de fosfolípidos y agentes hidrófobos. El uso de fosfolípidos insaturados proporciona una serie de características deseables. Estas incluyen la aptitud para realizar etapas de producción de MA a temperatura ambiente y producir MA más pequeño cuando se usan en combinación con lípidos saturados.

### Administración y uso

Con fotosensibilizantes incorporados, el MA se puede usar para cualquier condición o en cualquier método para el que sean adecuados los fotosensibilizantes en combinación con exposición a la luz u otra radiación electromagnética. Estas incluyen pero no se limitan a, el diagnóstico o tratamiento del cáncer, la reducción de leucocitos activados, el tratamiento de trastornos oculares, el tratamiento y la prevención de neovascularización y angiogénesis, la destrucción de virus y células infectadas de ese modo, el tratamiento de placas ateroscleróticas, el tratamiento de reestenosis y otros. Además, muchos fotosensibilizantes pueden ser fotoactivados por longitudes de onda de excitación apropiadas para fluorescer de manera visible. Esta fluorescencia puede ser usada entonces para localizar un tumor u otro tejido objetivo. Por incorporación de agentes hidrófobos en el MA de la invención, se pueden obtener envases más eficaces, distribución y por lo tanto administración de los agentes.

Por lo general, el MA de la invención se puede aplicar de una manera idéntica o análoga a la administración de micelas y liposomas. La concentración del agente hidrófobo en el MA de la invención depende de la naturaleza del agente así como de la naturaleza de la administración deseada. Esta dependencia también existe en la aplicación de fotosensibilizantes de hidromonobenzoporfirina por MA.

Las composiciones y formulaciones de MA de la invención se pueden administrar por vía parenteral o por inyección. La inyección puede ser: intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal o incluso intraperitoneal. Sin embargo, el MA también se puede administrar por aerosol por vía intranasal o por vía intrapulmonar o por vía tópica. Las formulaciones diseñadas para liberación prolongada también están dentro del alcance de la invención.

La cantidad de formulación de MA fotosensibilizante, que se tiene que administrar depende de la elección de los agentes activos, las condiciones que se tienen que tratar, el modo de administración, el individuo así como la destreza, experiencia y juicio del profesional habilitado. Por lo general, sin embargo, pueden ser apropiadas las dosis en el intervalo de 0,05-10 mg/kg. El intervalo anterior es, por supuesto, simplemente sugestivo, ya que el número de variables con respecto a un tratamiento individual es grande. Por lo tanto, se esperan considerables variaciones de estos valores recomendados.

Por ejemplo y con el uso de fotosensibilizantes como un diagnóstico en la localización de tejido de tumores o en la localización de placas ateroscleróticas, las composiciones de MA de la invención se administran de manera sistémica de la misma manera general que se conoce con respecto al tratamiento fotodinámico. El periodo de espera para permitir que los fármacos se aclaren de los tejidos en los que no se acumulan es aproximadamente el mismo, por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 10 horas. Después de que las composiciones de la invención hayan permitido la localización, se determina la posición del tejido objetivo por la detección de la presencia del fotosensibilizante.

En el diagnóstico, los fotosensibilizantes incorporados en MA se pueden usar junto con o se pueden marcar con, un radioisótopo u otro medio de detección. Si éste es el caso, el medio de detección depende de la naturaleza del marcador. Los marcadores escintigráficos tales como tecnecio o indio se pueden detectar usando escáneres *ex vivo*. También se pueden usar marcadores fluorescentes específicos pero como detección basada en la fluorescencia de los propios fotosensibilizantes, estos marcadores pueden requerir previa irradiación.

Para la activación del fotosensibilizante aplicado por el MA de la invención, se usa cualquier longitud de onda de absorción adecuada. Esta se puede suministrar usando los diversos métodos conocidos en la técnica para mediar la citotoxicidad o la emisión de fluorescencia, tal como radiación visible, incluyendo fuentes de luz incandescente o fluorescente o fotodiodos tales como los diodos de emisión de luz. También se puede usar la luz láser para distribuir *in situ* luz a un fotosensibilizante localizado. En un típico protocolo, por ejemplo, varias horas previas a la irradiación, se inyectan por vía intravenosa aproximadamente 0,5-1,5 mg/kg de MA que contiene fotosensibilizante de porfirina verde y después se excita por una longitud de onda apropiada.

### Ejemplo 1

#### Producción de QLT0074 para inyección

Se añadieron quinientos ml de cloruro de metileno a 0,001 g de hidroxitolueno butilado, 0,01 g de palmitato de ascorbilo, 3,2 g de dioleoilfosfatidilglicerol y 4,8 g de dimiristoilfosfatidilcolina en una unidad de presión y mezclado usando un agitador superior hasta que se obtuvo una disolución clara. Una vez que la disolución estuvo clara, se añadió lentamente 1 g de cristales QLT0074 con luz reducida y se mezcló usando un agitador superior hasta que se disolvieron los cristales completamente. La disolución se filtró después por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se transfirió a un matraz de fondo redondo. El matraz fue un evaporador rotatorio y se eliminó el cloruro de metileno a presión reducida,

## ES 2 315 359 T3

con secado continuo después de que se detuviera la destilación. Se rompió el vacío y se unió el matraz a un colector a vacío para secado adicional. Se añadieron quinientos ml de lactosa monohidratada al 9,2% p/v filtrada estéril, en agua para inyección, a la película fina de QLT0074/lípidos y se agitó a temperatura ambiente durante al menos 1 h para disolver y producir vesículas multilaminares. Se descargó un microfluidizador Modelo M-1105 con agua, después  
5 algo de disolución de lactosa y después la disolución de QLT0074/lípidos hasta que apareció una disolución verde en la descarga. Se usaron los parámetros siguientes: presión de aire 827 KPa (120 psi), presión de tratamiento, 69,2 MPa (10.030 psi), lectura del manómetro de la presión de aire de entrada 427 KPa (62 psi). El depósito del serpentín de enfriamiento se cargó con hielo picado y agua para mantener la temperatura del producto en un intervalo de 16-20°C. El material lipídico QLT/0047 se trató 5 veces por el microfluidizador. Se hizo pasar después el material resultante  
10 por filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se tomaron alícuotas en viales de liofilización marcados, con 1 ml por alícuota. El material se liofilizó usando un liofilizador BCCA, Labconco, serie 215369. Las muestras liofilizadas se almacenaron en la oscuridad a 2-8°C.

Como se usa en la presente memoria, se desea que cada terminología “un”, “uno” y “cualquier” incluya las formas tanto singular como plural.  
15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 315 359 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas fosfolípidos saturados e insaturados y uno o más fotosensibilizantes, en los que dicho fosfolípido insaturado no es fosfatidil glicerol de huevo y en la que los agregados tienen un diámetro medio menor que 100 nm.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además liposomas.
- 10 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que un fotosensibilizante o más son una porfirina verde.
4. La composición según la reivindicación 3, en la que la porfirina verde es un fotosensibilizante de hidromonobenzoporfirina.
- 15 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que un fotosensibilizante o más es A-EA6, B-EA6 o una combinación de los mismos.
- 20 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que uno o más de dichos fosfolípidos saturados o insaturados comprenden un grupo de cabeza cargado negativamente.
7. La composición según la reivindicación 6, en la que dichos fosfolípidos comprenden DOPG y DMPC.
8. La composición según la reivindicación 7, en la que la proporción de DOPG:DMPC es 40:60.
- 25 9. La composición según la reivindicación 8, en la que dichos agregados comprenden además al menos un antioxidante.
10. La composición según la reivindicación 9, en la que al menos dicho antioxidante es hidroxitolueno butilado (BHT) y/o palmitato de ascorbilo (PA).
- 30 11. La composición según cualquier reivindicación previa, en la que la proporción de fosfolípidos:fotosensibilizante es 8:1.
- 35 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que uno o más fotosensibilizantes es uno o más fotosensibilizantes de hidromonobenzoporfirina pero no es una combinación de partes iguales de BPD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub>.
13. La composición según la reivindicación 12, en la que dicho fotosensibilizante es A-EA6 o B-EA6 o combinaciones de los mismos.
- 40 14. La composición según la reivindicación 1, agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas fosfolípidos saturados e insaturados, al menos uno de los fosfolípidos comprende un grupo de cabeza cargado negativamente.
- 45 15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que el fosfolípido insaturado es de una fuente no animal.
- 50 16. Una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas fosfolípidos insaturados y saturados y uno o más fotosensibilizantes, en la que o
- a) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y no comprenden fosfolípido de huevo o fosfatidil glicerol de huevo o
- 55 b) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y uno o más de dichos fotosensibilizantes no es una combinación de cantidades iguales de BPD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub> y
- en la que los agregados tienen un diámetro medio menor que 100 nm.
- 60 17. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el diámetro medio es menor que 50 nm.
18. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el diámetro medio está en el intervalo de 10-50 nm.
- 65 19. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las micelas tienen diámetros medios menores que 30 nm.

## ES 2 315 359 T3

20. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las micelas tienen diámetros medios menores que 20 nm.

21. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o más fotosensibilizantes es BPD-MA, A-EA6 o combinaciones de los mismos.

22. Un método para preparar una composición de agregados que comprenden micelas, comprendiendo dichas micelas uno o más fotosensibilizantes y una mezcla de:

fosfolípidos insaturados y saturados, en los que dicho método comprende las etapas de:

producir una mezcla de un disolvente orgánico, un agente hidrófobo y los fosfolípidos capaces de formar una bicapa lipídica para formar un “complejo intermedio”;

eliminar dicho disolvente para producir un material “*presoma*”;

hidratar dicho material “*presoma*” con un disolvente acuoso;

tratar dicho material hidratado para producir agregados que contienen micelas, usando manipulación de alta energía seleccionada del grupo que consiste en: microfluidización, exposición a ultrasonidos, cizallamiento de alta velocidad, extrusión, exposición a ultrasonidos y homogeneización en la que o

a) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y no comprenden fosfolípido de huevo o fosfatidil glicerol de huevo o

b) dichos fosfolípidos pueden formar una bicapa lipídica y uno o más de dichos fotosensibilizantes no son una combinación de cantidades iguales de BPD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub>.

en la que los agregados tienen un diámetro medio menor que 100 nm.

23. El método según la reivindicación 22, en el que dicho fotosensibilizante no es una combinación de partes iguales de BPD-MA<sub>C</sub> y BPD-MA<sub>D</sub>.

24. El método según la reivindicación 23, en el que uno o más de dichos fotosensibilizantes es A-EA6, B-EA6 o una combinación de los mismos.

25. El método según la reivindicación 22, 23 ó 24, en el que dicho “complejo intermedio” y dicho disolvente acuoso son bajos en sal.

26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que dichas etapas de hidratación y tratamiento tienen lugar a una temperatura menor que 30°C.

27. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-26, en el que dichas etapas comprenden:

a) suministrar a una velocidad constante una disolución de disolvente orgánico de una mezcla de fosfolípidos capaces de formar una bicapa lipídica a un calentador tubular calentado de manera externa,

b) evaporar el disolvente orgánico en el calentador para preparar una mezcla sustancialmente de sólidos y sobrecalentar vapor de disolvente orgánico.

c) introducir esta mezcla a una alta velocidad sobre 0,1 veces la velocidad del sonido en una cámara de vacío de no más de 300 mm de Hg (40 KPa) para volatilizar el disolvente orgánico instantáneamente y secar los sólidos, de ese modo se obtiene polvo lipídico y

d) dispersar el polvo lipídico resultante en un disolvente acuoso bajo en sal a una temperatura menor que 30°C.

28. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-27, en el que el diámetro medio es menor que 50 nm.

29. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-28, en el que el diámetro medio está en el intervalo de 10-50 nm.

30. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-29, en el que las micelas tienen diámetros medios menores que 30 nm.

31. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-30, en el que las micelas tienen diámetros medios menores que 20 nm.

## ES 2 315 359 T3

32. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 22-31, en el que uno o más fotosensibilizantes es BPD-MA, A-EA6 o combinaciones de los mismos.

5 33. El método según la reivindicación 25, en el que las condiciones de poca sal contienen menos de 0,1 N de cationes o aniones libres.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

