

RAD: 11-179486- -7	FECHA: 2014-02-21 16:42:57
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 10
ACT: 519 PRESENTACION	

Abogado(a)/Señor(a)
JUAN CARLOS URIBE RESTREPO

Asunto:	Radicación:	11-179486- 7
	Trámite:	11
	Evento:	378
	Actuación:	519
	Oficio:	2396
	Folios:	10

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	EP2010/3531				
Fecha de Presentación Internacional	11/06/2010				

Descripción:	Radicación 11-179486-00000	27/Diciembre/2011
Reivindicaciones:	Radicación 11-179486-00000	27/Diciembre/2011
	Radicación 11-179486-00006	05/Septiembre/2013
Figuras:	Radicación 11-179486-00000	27/Diciembre/2011
Prioridad:	EP092515380.6	11/Junio/2009

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada. En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones 1 a 18 del capítulo reivindicatorio.

Título de la solicitud: “Composiciones solidas que comprenden ácido 5- aminolevulínico”.

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de desarrollar formulaciones alternativas para la administración oral de ácido 5-aminolevulinico (5-ALA) y ésteres del mismo, para el diagnóstico fotodinámico de lesiones neoplásicas en la parte inferior del tracto gastrointestinal, en particular el colon y el recto.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una composición sólida para administración oral que comprende: (a) un ingrediente activo seleccionado de 5-ALA, un éster o una sal, (b) uno o más triglicéridos, (c) uno o más emulsificantes no iónicos, donde el producto farmacéutico comprende uno o más recubrimientos entéricos que permiten la liberación del activo por un sistema pH dependiente en el rango comprendido entre 6,5 y 7,5.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K 31/197 // 9/20

4. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art. 14 D 486)

El objeto de las reivindicaciones 16 y 17 no es patentable de acuerdo con el artículo citado. Si bien se encabezan en la forma de composición se definen en términos del uso como medicamento o para el diagnóstico fotodinámico de una condición cancerosa. Se sugiere eliminar las reivindicaciones señaladas.

5. Excepción a la Patentabilidad (Art. 14 D 486)

El objeto de las reivindicación 18 no es patentable de acuerdo con el artículo citado. Si bien la solicitante encabeza la citada reivindicación en términos de producto farmacéutico sólido, dicha reivindicación presenta elementos que son propios del método de diagnóstico como son: la administración del producto a un humano o animal no humano, la metabolización del mismo con la reacción de fotosensibilización, la fotoactivación del fotosensibilizador y el diagnóstico por medio de la detección de fluorescencia para determinar la existencia de condiciones cancerosas, pre-cancerosas y no cancerosas. Se sugiere eliminar la reivindicación señalada.

6. De la solicitud de patente

Título

De acuerdo con la modificación al capítulo reivindicatorio se sugiere precisar el título en los siguientes términos: “Composiciones orales de liberación controlada pH dependiente que comprenden ácido 5-aminolevulínico en combinación con triglicéridos y emulsionantes no iónicos”.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Se recuerda a la solicitante que las reivindicaciones de producto tipo composición se deben definir en términos de los ingredientes activos, excipientes y de sus proporciones por su denominación común y no solo en términos funcionales o del grupo químico al cual pertenecen como es el caso de la definición de emulsionantes no iónicos y/o triglicéridos. Así mismo, el pH de liberación se reporta en términos del resultado que se pretende alcanzar, indicando que el ingrediente activo 5-ALA se libera en el intervalo de pH entre 6,5 y 7,5 como consecuencia de la presencia de un recubrimiento entérico sin indicar la composición del

mismo.

Por otra parte, la reivindicación 3 y sus dependientes aun cuando presenta relación con el contenido de la reivindicación 1 no presenta una modalidad de la invención en cuanto al principio activo incorporado en las composiciones, sino que amplía el alcance de la misma de composiciones que incluyen ácido 5-amino-levulínico (5-ALA) a composiciones que incluyen cualquier ingrediente activo que se derive de la fórmula (I). Se recuerda a la solicitante que la materia se debe definir considerando que la reivindicación independiente debe incluir todas las características esenciales de la composición y si el ingrediente activo se puede seleccionar a partir de una fórmula general, dicha indicación debe aparecer desde la reivindicación 1, por su parte, las reivindicaciones dependientes se destinan para definir modalidades particulares y no modalidades generalizadas de lo indicado en la reivindicación 1, de acuerdo con lo que indica el art. 30 D 486, por lo que se sugiere corregir la presentación y dependencia de las reivindicaciones.

Las reivindicaciones 1 a 10 definen un producto farmacéutico, por su parte, las reivindicaciones 11 a 17 definen una composición sólida para administración oral. Al respecto es pertinente señalar que no existen características esenciales que diferencien uno de otro y se entiende que una modalidad de la invención de producto corresponde a las composiciones farmacéuticas, en el presente caso de tipo comprimido sólido para administración oral. En consecuencia, el capítulo reivindicatorio presenta el defecto de falta de concisión porque repite de manera innecesaria los elementos esenciales de las composiciones, en el primer grupo encabezándolas como producto farmacéutico y en el segundo grupo identificándolo como composiciones farmacéuticas sólidas. Se sugiere realizar las correcciones a que haya lugar.

7. Determinación del estado de la técnica.

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 11 de junio de 2009, que corresponde a la fecha de presentación de la solicitud de la cual se invoca prioridad.

Consultadas las fuentes de información con que se cuenta, se encontraron el (los) siguiente(s) documento(s) que anticipa(n) el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Donelly, R.F., et al. Biopharm. Drug Dispos 2009 Marzo, 30: 55-70.	"Influence of Formulation Factors on PpIX Production and Photodynamic Action of Novel ALA-loaded Microparticles"	23/Enero/2008
D2	McCarron, Paul A., et al.	Formulation and Characterization of Poly(ethylene-glycol)-based, 5- Aminolevulinic Acid-Loaded Solid-Dosage Forms Intended for Photodynamic and Photodiagnostic Methodologies in the Colorectal Region"	2007
D3	US6248363	"Solid carriers for improved delivery of active ingredients in pharmaceutical compositions"	19/Junio/2001

El documento D1¹ divulga micropartículas que contienen 5-ALA empleadas en la evaluación de la producción de protoporfirina IX y el efecto fototóxico subsecuente en un modelo tumoral in vivo (resumen). Las micropartículas son formuladas con coco glicéridos hidrogenados (Witepsol® 15), t-octilfenoxipolietoxietanol 2% p/p (Triton X-100®) y 1, 2, 3, 5 y 10% p/p de 5-ALA y fueron obtenidas mediante congelación por aspersión (Pág. 56, Párr. [005] a Pág. 57, Párr. [001]). Estas micropartículas se incorporan en un vehículo tipo gel obtenido a partir de

¹ http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=EP&NR=1880715A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20080123&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP

una mezcla de propilenglicol y un polímero de ácido acrílico con éteres de pentaeritritol (Carbopol 974®) al 3% o en un vehículo tipo crema (Pág. 57, Párr. [002]). Al evaluar la producción de protoporfirina IX se encontró un comportamiento comparable entre las micropartículas y la crema con 5-ALA y valores menores para la formulación en gel con carga de 5-ALA del 5%, mientras que al evaluar las formulaciones de 5-ALA al 10% se encontraron mayores valores de protoporfirina IX para la formulación de micropartículas en gel (Pág. 61, Tabla 1).

El documento D2 divulga formulaciones que incluyen ácido 5-aminolevulínico que incluyen una base de polietilenglicol para la obtención de formas de dosificación fotodinámicas para fotodiagnóstico a nivel colo-rectal (Págs. 135 a 142).

El documento D3² divulga la composición de los soportes sólidos que mejoran la liberación de los ingredientes farmacéuticos, tal es el caso de agentes de diagnóstico mediante encapsulación (Resumen). Las composiciones divulgadas incluyen un soporte sólido formado por el ingrediente activo, tensioactivos hidrofílicos, tensioactivos lipofílicos y triglicéridos. La cubierta para encapsulación puede incluir al menos un tensioactivo iónico o no iónico de tipo hidrofílico (Col. 2 líneas 58 a 67).

8 . Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo.

La reivindicación 1 se refiere a: *“Producto farmacéutico sólido para administración oral en el diagnóstico fotodinámico del cáncer, condiciones pre-cancerosas y no cancerosas en el tracto gastrointestinal inferior que comprende: a) un ingrediente activo seleccionado a partir de 5-ALA, un éster de 5-ALA o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, b) uno o más triglicéridos; y c) uno o más emulsionantes no iónicos; en el que dicho producto farmacéutico comprende uno o más recubrimientos entéricos y proporciona la liberación controlada del pH del ingrediente activo a) en el intervalo de pH de 6,5 a pH 7,5”.* (Pág. 9, Rad. 11-179486-00006-0000 del 05 de septiembre de 2013).

Tabla 1.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D2	D3
Producto farmacéutico sólido para administración oral Diagnóstico fotodinámico del cáncer	Composición sólida del tipo micropartículas que comprende:	Composiciones para fotodiagnóstico del cáncer colo-rectal	Composición de vehículos sólidos para administración de agentes de diagnóstico
(a) un ingrediente activo seleccionado a partir de 5-ALA, un éster de 5-ALA, una sal,	1, 2, 3, 5 y 10% p/p de 5-ALA	5-ALA	No menciona
(b) uno o más triglicéridos (triglicéridos de la manteca de cacao, sebo, grasa endurecida, coco-glicéridos hidrogenados, aceite de palma hidrogenado, triestearina, triplamitina, trimiristina o triglicéridos líquidos de tricaprilina,	coco glicéridos hidrogenados (Witepsol® 15)	No menciona	Componente lipofílico tipo triglicérido (Cols. 32 a 35)

2 http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20010619&CC=US&NR=6248363B1&K C=B1

tricaproina, triheptanoína, triglicéridos caprílicos/cápricos, triglicéridos caprílicos/cápricos/linoleicos)			
(c) uno o más emulsionantes no iónicos (reacción de PEG-aceite natural o hidrogenado)	t-octilfenoxipolietoxietanol p/p (Triton X-100®) 2%	PEG	Tensioactivos hidrofílicos formados por reacción de esterificación del PEG con ácidos grasos (Tabla 1 Cols. 11 y 12)
Comprende uno o más recubrimientos entéricos y proporciona la liberación controlada por el pH del ingrediente activo en el intervalo de pH entre 6,5 y 7,5.	No menciona	No menciona	Recubrimiento entérico, revestimiento de sellado, recubrimiento protector (Cols. 55 y 56).

Nivel Inventivo frente a D1 y D3

El documento D3 es considerado el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga la composición cualitativa de los soportes sólidos que se utilizan para mejorar la liberación de los ingredientes farmacéuticos, tal es el caso de agentes de diagnóstico, mediante la técnica de encapsulación (Resumen). Las composiciones divulgadas incluyen un soporte sólido formado por el ingrediente activo, tensioactivos hidrofílicos, tensioactivos lipofílicos entre ellos, triglicéridos. La cubierta para encapsulación puede incluir al menos un tensioactivo iónico o no iónico de tipo hidrofílico (Col. 2 líneas 58 a 67).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1, y la composición divulgada en el documento D3 consiste en que está presente el activo ácido 5-aminolevulínico para fotodiagnóstico fotodinámico del cáncer colo-rectal, mientras que en el documento D3 solo se menciona que la técnica para el diseño de soportes sólidos para mejorar la liberación de ingredientes activos se puede aplicar a agentes de diagnóstico.

El efecto técnico que causa el diseño de una composición sólida para administración oral y específica con base en el ácido 5-aminolevulínico consiste en el diagnóstico y tratamiento del cáncer colo-rectal.

El problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: cómo diseñar composiciones para administración oral de liberación pH dependiente del activo ácido 5-aminolevulínico.

Sin embargo, el documento D1 divulga composiciones de micropartículas que contienen 5-ALA, empleadas en la evaluación de la producción de protoporfirina IX y del efecto fototóxico subsecuente en un modelo tumoral in vivo (resumen). Las micropartículas son formuladas con coco-glicéridos hidrogenados (Witepsol® 15), t-octilfenoxipolietoxietanol al 2% p/p (Triton X-100®) y 1, 2, 3, 5 y 10% p/p de 5-ALA y fueron obtenidas mediante el proceso de congelación por aspersión (Pág. 56, Párr. [005] a Pág. 57, Párr. [001]). Estas micropartículas se incorporan en un vehículo tipo gel obtenido a partir de una mezcla de propilenglicol y un polímero de ácido acrílico con éteres de pentaeritritol (Carbopol 974®) al 3% o en un vehículo tipo crema (Pág. 57, Párr. [002]). Al evaluar la producción de protoporfirina IX se encontró un comportamiento comparable entre las micropartículas y la crema con 5-ALA y valores menores para la formulación en gel con carga de 5-ALA del 5%, mientras que al evaluar las formulaciones de 5-ALA al 10% se encontraron mayores valores de protoporfirina

IX para la formulación de micropartículas en gel (Pág. 61, Tabla 1).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia contaba con la sugerencia o motivación razonable para diseñar formulaciones sólidas para administración oral y con recubrimiento para controlar la liberación del agente de diagnóstico/tratamiento a un pH específico del tracto gastrointestinal, como se divulga en el documento D3, y de incluir el agente activo 5-ALA en las micropartículas formadas por coco-glicéridos hidrogenados en combinación con agentes emulsificantes como lo divulga el documento D1 para lograr la liberación a nivel colon del ingrediente activo para el tratamiento del cáncer, por lo cual, la reivindicación 1 se considera obvia y sin nivel inventivo.

Nivel Inventivo frente a D2 y D3

El documento D3 es considerado el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga la composición cualitativa de los soportes sólidos que se utilizan para mejorar la liberación de los ingredientes farmacéuticos, tal es el caso de agentes de diagnóstico, mediante la técnica de encapsulación (Resumen). Las composiciones divulgadas incluyen un soporte sólido formado por el ingrediente activo, tensioactivos hidrofílicos, tensioactivos lipofílicos entre ellos, triglicéridos. La cubierta para encapsulación puede incluir al menos un tensioactivo iónico o no iónico de tipo hidrofílico (Col. 2 líneas 58 a 67).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1, y la composición divulgada en el documento D3 consiste en que está presente el activo ácido 5-aminolevulínico para fotodiagnóstico fotodinámico del cáncer colo-rectal, mientras que en el documento D3 solo se menciona que la técnica para el diseño de soportes sólidos para mejorar la liberación de ingredientes activos se puede aplicar a agentes de diagnóstico.

El efecto técnico que causa el diseño de una composición sólida para administración oral y específica con base en el ácido 5-aminolevulínico consiste en el diagnóstico y tratamiento del cáncer colo-rectal.

El problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: cómo diseñar composiciones para administración oral de liberación pH dependiente del activo ácido 5-aminolevulínico.

Sin embargo, el documento D2 divulga formulaciones que incluyen ácido 5-aminolevulínico que incluyen una base de polietilenglicol para la obtención de formas de dosificación fotodinámicas para fotodiagnóstico a nivel colo-rectal (Págs. 135 a 142).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia contaba con la sugerencia o motivación razonable para diseñar formulaciones para administración oral tipo sólido compuestas por triglicéridos y emulsificantes producto de la reacción entre PEG y ácidos grasos, recubiertas con agentes que permiten la liberación del activo de diagnóstico a un pH determinado para controlar la liberación del activo, como se divulga en el documento D3, el incluir el agente de diagnóstico 5-ALA en composiciones sólidas compuestas por PEG tal y como se divulga en el documento D2, por lo cual, la reivindicación 1 se considera obvia y sin nivel inventivo.

Puesto que las reivindicaciones 2 a 8 y 11 a 15 no presentan características adicionales, se considera que tales reivindicaciones tampoco cumplen con el requisito de nivel inventivo.

La reivindicación 9 se refiere a: *“Producto farmacéutico sólido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más de los siguientes: d) uno o*

más mucoadhesivos; e) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables diferentes de b), c) y d); f) uno o más agentes de penetración de superficie; y g) uno o más agentes quelantes”. (Pág. 10, Rad. 11-179486-00006-0000 del 05 de septiembre de 2013).

Tabla 2.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D3
Producto farmacéutico sólido para administración oral Diagnóstico fotodinámico del cáncer	Composición sólida del tipo micropartículas que comprende:	Composición de vehículos sólidos para administración de agentes de diagnóstico
(a) un ingrediente activo seleccionado a partir de 5-ALA, un éster de 5-ALA, una sal,	1, 2, 3, 5 y 10% p/p de 5-ALA	No menciona
(b) uno o más triglicéridos (triglicéridos de la manteca de cacao, sebo, grasa endurecida, coco-glicéridos hidrogenados, aceite de palma hidrogenado, triestearina, triplamitina, trimiristina o triglicéridos líquidos de tricaprilina, tricaproina, triheptanoína, triglicéridos caprílicos/cápricos, triglicéridos caprílicos/cápricos/linoleicos)	coco glicéridos hidrogenados (Witepsol® 15)	Componente lipofílico tipo triglicérido (Cols. 32 a 35)
(c) uno o más emulsionantes no iónicos (reacción de PEG-aceite natural o hidrogenado)	t-octilfenoxipolietoxietanol 2% p/p (Triton X-100®)	Tensioactivos hidrofílicos formados por reacción de esterificación del PEG con ácidos grasos (Tabla 1 Cols. 11 y 12)
Comprende uno o más recubrimientos entéricos y proporciona la liberación controlada por el pH del ingrediente activo en el intervalo de pH entre 6,5 y 7,5. Y que puede comprender uno o más de los siguientes excipientes:	No menciona	Recubrimiento entérico, revestimiento de sellado, recubrimiento protector (Cols. 55 y 56).
(j) uno o más mucoadhesivos	No menciona	Mucoadhesivos: polímeros de poliacrilato, quitosan, celulosas, quitosan-EDTA. (Col. 38, Líneas 53 a 57)
e) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables diferentes de b), c) y d)	No menciona	Otros aditivos: Antiadherentes como talco, estearato de magnesio, sílica micronizada, tensioactivos, ácido esteárico, aceites vegetales hidrogenados, PEG-4000, entre otros. (Cols. 39 y 40)
f) uno o más agentes de penetración de superficie;	No menciona	No menciona
g) uno o más agentes quelantes	No menciona	EDTA (Col. 40, línea 10)

El documento D1 es considerado el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 9 porque divulga micropartículas que contienen 5-ALA empleadas en la evaluación de la producción de protoporfirina IX y el efecto fototóxico subsecuente en un modelo tumoral in vivo (resumen). Las micropartículas son formuladas con coco glicéridos hidrogenados (Witepsol® 15), t-octilfenoxipolietoxietanol 2% p/p (Triton X-100®) y 1, 2, 3, 5 y 10% p/p de 5-ALA y fueron obtenidas mediante congelación por aspersión (Pág. 56, Párr. [005] a Pág. 57, Párr. [001]). Estas micropartículas se incorporan en un vehículo tipo gel obtenido a partir de una mezcla de propilenglicol y un polímero de ácido acrílico con éteres

de pentaeritritol (Carbopol 974®) al 3% o en un vehículo tipo crema (Pág. 57, Párr. [002]). Al evaluar la producción de protoporfirina IX se encontró un comportamiento comparable entre las micropartículas y la crema con 5-ALA y valores menores para la formulación en gel con carga de 5-ALA del 5%, mientras que al evaluar las formulaciones de 5-ALA al 10% se encontraron mayores valores de protoporfirina IX para la formulación de micropartículas en gel (Pág. 61, Tabla 1).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 9, y la composición divulgada en el documento D1 consiste en que no se menciona la liberación pH dependiente del fármaco para diagnóstico fotodinámico por la adición de un recubrimiento entérico.

El efecto técnico que causa el diseño de una composición sólida para administración oral con base en el ácido 5-aminolevulínico consiste en la liberación colon específica para el diagnóstico y tratamiento del cáncer colo-rectal.

El problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: cómo diseñar composiciones para administración oral de liberación pH dependiente del activo ácido 5-aminolevulínico.

Sin embargo, el documento D3 divulga formulaciones que incluyen fármacos para diagnóstico y que se formulan en un vehículo compuesto por triglicéridos de ácidos grasos y emulsionantes no iónicos formados por la reacción entre PEG y un aceite natural no hidrogenado (Págs. 135 a 142). Asimismo, el documento D3 divulga la composición cualitativa de los soportes sólidos que se utilizan para mejorar la liberación de los ingredientes farmacéuticos mediante la técnica de encapsulación (Resumen). Las composiciones divulgadas incluyen un soporte sólido formado por el ingrediente activo, tensioactivos hidrofílicos, tensioactivos lipofílicos entre ellos, triglicéridos. La cubierta para encapsulación puede incluir al menos un tensioactivo iónico o no iónico de tipo hidrofílico (Col. 2 líneas 58 a 67).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia contaba con la sugerencia o motivación razonable para diseñar formulaciones para administración oral tipo sólido compuestas por triglicéridos y emulsificantes producto de la reacción entre PEG y ácidos grasos, recubiertas con agentes que permiten la liberación del activo de diagnóstico a un pH determinado para controlar la liberación del activo, como se divulga en el documento D3, e incluir el agente de diagnóstico 5-ALA en composiciones sólidas compuestas por coco glicéridos hidrogenados (Witepsol® 15) más emulsificantes como t-octilfenoxipoliétoxietanol 2% p/p (Triton X-100®) tal y como se divulga en el documento D1, por lo cual, la reivindicación 9 se considera obvia y sin nivel inventivo.

9. Respuesta a los argumentos de la solicitante:

La solicitante señala que D1 no describe un producto farmacéutico o composición que contiene todas las características de a) 5-ALA, un precursor del mismo, un derivado y las sales de los mismos; (b) uno o más triglicéridos; y, c) uno o más emulsionantes, donde las reivindicaciones corregidas presentan la característica adicional de uno más revestimientos entéricos. Según la solicitante, en D1, 5-ALA en el estado sólido se incorpora en micropartículas que se producen a partir de Witepsol H15. Con el fin de evitar la aglomeración se formulan con el tensioactivo Triton X-100. Sin embargo, no hay ninguna referencia en D1 frente a una administración oral y ninguna mención al recubrimiento entérico, por lo que la novedad debiera ser reconocida.

Al respecto este Despacho se permite señalar que si bien la solicitante restringe la materia reclamada a aquellas modalidades en las que se presentan composiciones para

administración oral, no se caracteriza la composición del recubrimiento entérico sino que se menciona en términos del resultado que se pretende alcanzar, cual es, la liberación del activo para fotodiagnóstico fotodinámico (5-ALA) en una región específica del intestino a un pH entre 6,5 y 7,5. Frente a las enseñanzas de D1, es pertinente señalar que la composición allí divulgada si bien no corresponde a un sistema para administración oral si se divulga la composición de la base o vehículo para administrar fármacos poco solubles conformada por triglicéridos más un emulsionante no iónico.

Por otra parte señala la solicitante que el producto o composición reivindicada se proporciona en una forma de dosificación que tiene uno o más recubrimientos entéricos y a partir de una combinación específica de excipientes, a saber, uno o más triglicéridos y uno o más emulsionantes no iónicos.

Frente a la definición de la materia es pertinente reiterar lo señalado en el primer requerimiento, en cuanto a que los ingredientes de una composición se deben definir por su denominación común y no por la función que cumplen o por el grupo químico funcional que presentan, dado que esto corresponde a una generalización poco razonable de la materia que se encuentra debidamente divulgada en el capítulo descriptivo de la solicitud, en donde se divulgan cápsulas que incluyen: HAL HCl y los excipientes: i) Miglyol 812, ii) docusato sódico, iii) Pluronic L44 y iv) gelucir 44/14 en 8 versiones de composiciones, es decir, combinaciones de ácido 5-amino levulínico con: i) triglicéridos de ácido caprílico/cáprico (Miglyol 812), ii) dioctil-sulfosuccinato sódico (docusato sódico), iii) Poloxámeros o copolímeros de tres bloques con cadena central hidrófoba de polioxipropileno flanqueadas por cadenas hidrofílicas de polioxietileno de peso molecular 2200 (Pluronic L44) y iv) lauroil-glicérido de macrogol-32 (Gelucir 44/14). En consecuencia, nuevamente se invita a la solicitante a definir composiciones concretas de los vehículos que han sido debidamente ensayados y probados para la administración de 5-ALA. Asimismo, se reitera que la introducción de una fórmula general Markush en la reivindicación 3 incluye en el capítulo reivindicatorio ingredientes activos con los que no se presentan composiciones ejemplificadas.

10. Conclusión

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Donelly, R.F., et al. Biopharm. Drug Dispos 2009 Marzo, 30: 55-70.	1 a 18	Nivel Inventivo
D2	McCarron, Paul A., et al.	1 a 18	Nivel Inventivo
D3	US6248363	1 a 18	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2014-02-25

Elaboró: John Fredy Hernandez Montaño
Revisó: Gloria Jacqueline Alfonso Roza
Revisó: Jose Luis Salazar Lopez

Formulation and Characterization of Poly(ethylene Glycol)-Based, 5-Aminolevulinic Acid-Loaded Solid-Dosage Forms Intended for Photodynamic and Photodiagnostic Methodologies in the Colorectal Region

*Paul A. McCarron, Gavin P. Andrews, Desmond I. J. Morrow, A. David Woolfson, & Ryan F. Donnelly**

School of Pharmacy, Queen's University Belfast, Medical Biology Centre,
97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, UK

***Corresponding author.** E-mail: r.donnelly@qub.ac.uk

Aminolevulinic acid-loaded, poly(ethylene glycol) disks prepared using three molecular weights (1000, 6000, and 10,000) were shown to be of potential for rectal administration as part of photodynamic and photodiagnostic colorectal procedures. The disk-shaped delivery system was mechanically robust, as judged by friability measurements. Calorimetric analysis confirmed that low concentrations of ALA (1% w/w) were dispersed completely throughout the PEG matrix, but higher concentrations (5% w/w and 10% w/w) formed crystalline suspensions. The molecular weight of the PEG determined the melting temperature, with PEG 1000 being suitable for melting around body temperature. The drug release kinetics were shown to be a function of both molecular weight and drug loading. Although the higher molecular weight PEG disks were resistant to surface erosion arising from an aqueous receptor phase, this effect was counterbalanced by more rapid and complete release when the ALA loading was increased. The lowest loading used (1% w/w) produced incomplete release, often not exceeding 30% of the total amount of drug. Results suggest that this simple formulation containing ALA can be administered directly to the colorectal area and is a feasible alternative to peroral dosing of ALA.

KEY WORDS: photodynamic, colorectal, 5-aminolevulinic acid, drug delivery

Introduction

Serious cellular abnormalities in the colorectal region are a leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries, with an estimated 300,000 new cases and 200,000 related deaths annually in Europe and the U.S.¹ Survival rates for colorectal cancer have improved in recent years, from 23% in the early 1970s to 40% as of recently.² In advanced disease, however, the five year survival rate is still less than 5%.³ Prognosis depends on the stage of disease at diagnosis, as well as patient- and treatment-related factors.⁴ Dysplasia and early stage cancer are difficult to locate and biopsy procedures do not guarantee detection, resulting in a significant number of undiagnosed lesions. This is particularly pertinent given that early detection of colorectal cancer or premalignant dysplasias improves survival and prognosis.⁵ The development of technologies to improve the detection process or enhance treatment would be a welcomed addition to current treatment methods. Two such promising procedures are photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD). These techniques rely on specific accumulation of photosensitizer in a neoplastic lesion, with the former therapy used to bring about selective destruction and the latter only making it more conspicuous on fluorescent emission.

Systemic administration of preformed photosensitizers, such as the porphyrin derivatives, is known to cause selective accumulation in neoplastic and dysplastic tissue, as driven by numerous by tumor-specific characteristics.⁶ However, accumulation of preformed photosensitizers in skin, leading to prolonged cutaneous photosensitivity, often lasting several weeks, is prohibitively problematic and limits applicability in colorectal cancer or premalignant dysplasias.^{7,8} An alternative using photosensitizer precursors, such as aminolevulinic acid (ALA) and its ester derivatives, are common in PDT and PD. Dosing with ALA leads to selective accumulation of the photosensitizer protoporphyrin IX (PPIX) in neoplastic and dysplastic cells.⁹ Most use is seen in the PDT of superficial skin lesions⁶ and PD of bladder cancer.¹⁰ Prolonged cutaneous photosensitivity is not a common problem following systemic or topical administration because both ALA and PPIX are cleared from the body typically

within 24 to 48 hours of a systemic dose. Importantly, ALA, unlike preformed photosensitizers, can be given orally.¹¹

ALA has been investigated for both PDT and PD in experimental and clinical studies of colorectal cancer, given orally in solution or in an ALA-containing enema.^{8,12,13} When used clinically for PDT of neoplastic lesions of the colon and rectum, only superficial (< 1.8 mm) necrosis has been produced.^{13–16} It has been suggested that this may be due to the fact that the systemic dose of ALA is limited to an upper ceiling of 60 mg kg⁻¹ dictated for the most part by the onset of side effects. Further problems are encountered in that ALA solutions must be made up immediately prior to use due to chemical instability and have a low pH, leading to possible local irritation.

Sophisticated ALA-containing dosage forms for topical application have been described by our group¹⁷ and so the aim of the present study was to investigate the possibility of formulating a solid dosage form that would negate the need for preparation of solutions immediately prior to administration. This would be a generic dosage form that could be administered rectally for PDT or PD of rectal lesions or those in the descending colon, thereby avoiding side effects associated with the oral route and improving localized PPIX production.

Materials and Methods

Chemicals

5-Aminolaevulinic acid and hydrochloride salt was obtained from Crawford Pharmaceuticals, Milton Keynes, UK. Poly(ethylene glycol) (PEG) molecular weights 1000, 6000, and 10,000 were obtained from Sigma Aldrich, Dorset, UK. All other chemicals used were of analytical reagent quality. Poly(ester) film, one-side siliconized, release liner (FL2000™ PET 75 μ 1S) was obtained from Rexam Release B.V., Apeldoorn, The Netherlands. Plastisol® medical grade poly(vinyl chloride) emulsion containing diethylphthalate as plasticizer was obtained from BASF Coatings Ltd., Cluyd, UK.

Preparation of Solid Dosage Forms Containing ALA

PVC molds, with circular orifices of inside diameter 14.0 mm and depth 3.5 mm, as illustrated in Fig. 1A, were prepared from Platisol. Appropriate masses of poly(ethylene glycol) (PEG) of a particular mo-

lecular weight and ALA were melted together and poured into the PVC mold with a small square of release liner placed on top of each individual disk. The disks were allowed to cool and solidify at room temperature before removal from the mold. The resulting disks possessed a flat and smooth upper surface.

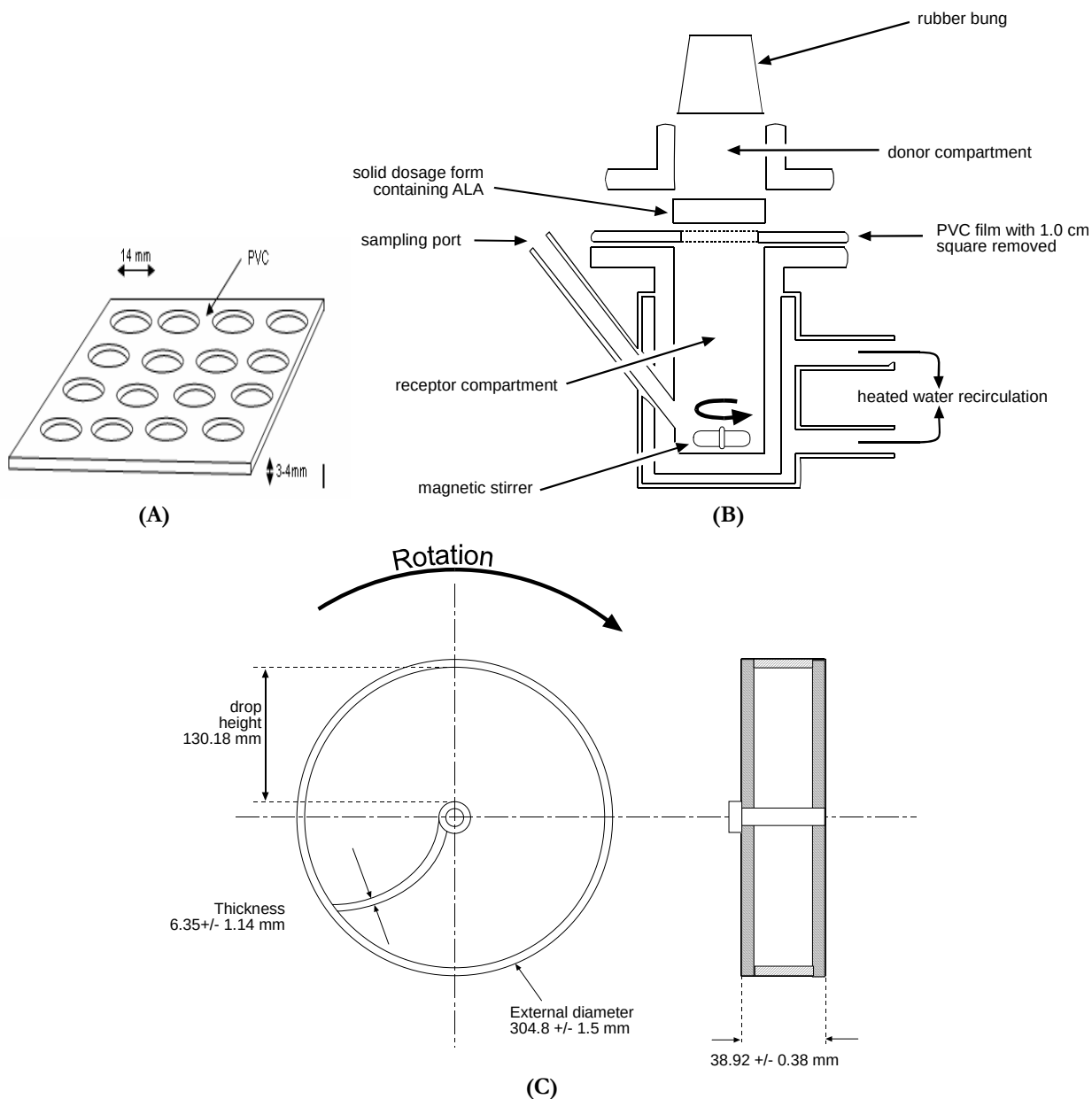


FIGURE 1. PVC mold used to prepare solid dosage forms containing (A) 5-aminolevulinic acid and (B) apparatus used to investigate drug release from such systems. (C) Schematic representation of the apparatus used to determine tablet friability. The rotational movement creates a standardized impact arising from the drop to the internal face of the chamber wall, which is used to subject the formulation to a reproducible and disintegrative force.

Mechanical Analysis of Solid Dosage Forms

The mechanical strength of the solid dosage forms was investigated using the European Pharmacopoeia test for tablet friability (*Ph. Eur. method 2.9.7*). A specially designed Perspex® drum with an internal diameter of 285 mm and a depth of 38 mm and with polished internal surfaces to prevent static buildup was used for this test (Fig. 1C). Solid dosage forms were tumbled at each turn of the drum by a curved projection rotating at 25 ± 1 rpm. The sample was weighed accurately and placed in the drum, which was then rotated 100 times before the sample was removed. Any loose dust was brushed off and the sample reweighed. As recommended by the European Pharmacopoeia, the test was run once for each type of solid dosage form prepared. A maximum loss of 1% of the mass of the tablets tested is considered to be acceptable for most tablet products. The friability was expressed as the loss of mass in each case and it was calculated as a percentage of the initial mass (*Ph. Eur. method 2.9.7*) as

$$\text{friability} = \frac{\text{original combined mass of 5 solid dosage forms} - \text{final combined mass}}{\text{original combined mass of 5 solid dosage forms}} \times 100 \quad (1)$$

Thermal Analysis of Solid Dosage Forms

Interactions between PEG and ALA were investigated using differential scanning calorimetry (DSC). Samples of approximately 10.0 mg were taken from disks and placed in open-pan aluminum crucibles for analysis (DSC 2920 Differential Scanning Calorimeter with refrigerated cooling system, TA Instruments, Surrey, UK). An empty aluminum crucible was used as a reference. The instrument was calibrated using the melting temperature of indium. The temperature range investigated was 10–200°C in order to take in the melting points of ALA and each of the PEGs. The heating rate was 5°C min⁻¹.

Drug Release Studies

Drug release from the disks was investigated using a modified Franz cell, as shown in Fig. 1B. A thin

(2.0 mm) PVC film with a 1 cm² square removed was used to limit drug release from a well-defined area into a receptor compartment of calibrated volume. The Franz cell apparatus was allowed to equilibrate at 37°C, using water recirculated from a thermostatically controlled bath and stirred at 600 rpm. The receptor phase was 0.1 M borate buffer, pH 5.0. The assembly was completed by securing the donor compartment using spring clips. Disks of known weight were placed on top of the PVC membrane, with one side in contact with the surface of the borate buffer. Samples were taken after 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min.

Receptor phase sampling was carried out via the sampling port, whereby a sample (0.1 ml) was diluted to 5.0 ml with borate buffer and refrigerated until analysis. The solution removed from the receptor compartment was replaced immediately by 0.1 ml of blank borate buffer, thereby maintaining a constant volume.

Analysis of ALA

ALA released from disks was quantified using HPLC, employing precolumn derivatization with acetyl acetone and formaldehyde and fluorescence detection, as described by Oishi et al.¹⁸ Derivatization was based on a modification of the Hantzsch reaction, in which amine compounds react with acetyl acetone and formaldehyde. To an HPLC vial, 3.5 ml acetyl acetone reagent, 50 µl of sample, and 0.45 ml 10% w/w formaldehyde solution were added and mixed for approximately 5 s. This mixture was heated for 10 min at 100°C, then cooled in an ice bath and injected (10 µl, Waters WISP 712 autoinjector with refrigerated sample compartment, Waters associates, Harrow, UK) onto a Spherisorb® column (250 mm × 4.6 mm, C₁₈ ODS2 with 5 µm packing, Waters associates, Harrow, UK) equipped with a Spherisorb guard column (10 mm × 4.6 mm, C₁₈ ODS2 with 5 µm packing). The mobile phase was 49.5% methanol/49.5% water/1% glacial acetic acid v/v/v. The flow rate was 1.5 ml min⁻¹ (LKB Bromma 2150 liquid chromatography pump, LKB Company, Upsala, Sweden). Detection was by fluorescence with excitation at 370 nm and emission at 460 nm (Shimadzu SPD-6A UV spectrophotomet-

TABLE 1. Influence of PEG Molecular Weight and 5-aminolevulinic Acid Loading on the Onset of Melting of the Solid Dosage Form Matrix

ALA loading (% w/w)	Onset of melting (°C)		
	PEG 1000	PEG 6000	PEG 10,000
0	36.53 ± 2.10	61.81 ± 0.47	64.77 ± 0.76
1	39.23 ± 1.72	61.70 ± 0.54	63.98 ± 0.18
5	39.04 ± 1.77	62.35 ± 1.10	64.91 ± 0.18
10	39.33 ± 1.04	62.65 ± 3.29	66.64 ± 0.18

ric detector, Dyson Instruments Ltd, Tyne & Wear, UK). The chromatographs obtained were analyzed using proprietary Shimadzu Class VP™ software. The retention time of the fluorescent ALA derivative was 6 ± 0.53 min ($n = 5$). The derivative HPLC calibration curve for ALA was linear in the concentration range investigated, which was from 50 to 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of ALA in the original samples. The limit of detection was 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Statistical Analysis

Data was analyzed, where appropriate, using a one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons were made using Tukey's HSD test. In all cases $p < 0.05$ denoted significance.

Results

PEG polymers melted easily over a wide temperature range, approximating literature values for their melting points. The higher molecular weight PEGs were found to be viscous when molten and more difficult to pour. On solidifying, crystalline regions were clearly visible in disks of PEG 6000 and PEG 10,000. These disks were also harder and more brittle than those produced by PEG 1000, which had a smooth, waxy consistency. ALA crystals did not disperse readily in molten PEG, but after stirring for some time, low concentrations of ALA (1%) appeared to be completely dispersed. Higher concentrations of ALA (5% and 10%) did not completely disperse, even after prolonged stirring. The mixture had a gritty texture, and small crystals of ALA were visible as sediment at the bottom of the mixture, making even distribution of ALA difficult when pouring.

TABLE 2. Influence of Increasing PEG Molecular Weight and ALA Loading on Friability and ALA Melting Temperature Contained in Solid Dosage Forms

Formulation	Friability (%)	Melting temperature (°C)
0% w/w ALA		
PEG 1000	0.10	ND
PEG 6000	1.20	ND
PEG 10,000	1.38	ND
1% w/w ALA		
PEG 1000	0.15	ND
PEG 6000	0.66	ND
PEG 10,000	0.91	158.67 ± 0.08
5% w/w ALA		
PEG 1000	0.01	157.71 ± 1.02
PEG 6000	1.29	156.34 ± 0.76
PEG 10,000	1.05	157.33 ± 0.91
10% w/w ALA		
PEG 1000	0.02	157.04 ± 1.10
PEG 6000	0.57	156.65 ± 1.31
PEG 10,000	1.29	157.88 ± 1.01
100% ALA		158.10 ± 0.45

ND = not determined—no melting point for ALA was readily observable.

As can be seen from Table 1, increasing the molecular weight of PEG from 1000 to 6000 significantly ($p < 0.0001$) increased the temperature at which the onset of melting occurred. A further increase in molecular weight from 6000 to 10,000 also significantly increased ($p = 0.0003$) the temperature at which the onset of melting occurred. Addition of ALA slightly increased the temperature at which the onset of melting occurred in each case. However, increasing the ALA loading did not further increase the melting temperature. The results in Table 2 show that all solid dosage forms prepared maintained the majority of their initial mass and possessed reasonably low friability values. In all cases, solid dosage forms prepared using PEG 1000 had friability values within pharmaceutically acceptable levels, while the friabilities of those prepared from PEG 6000 and 10,000 were slightly above the 1% weight loss cutoff prescribed by the European Pharmacopoeia. Increasing ALA loading had no significant effect on friability, regardless of the PEG molecular weight.

It was difficult to identify a melting temperature for ALA when its concentration was 1% w/w

in PEG 1000 and PEG 6000 (Table 2) and, as is the case in Fig. 2, the presence of ALA is barely perceptible at 1% w/w. There is a more distinctive melting point with the 5% and 10% w/w. It can also be seen from Table 2 and Fig. 2 that the melting temperature of ALA was not significantly affected by its concentration in the solid dosage forms or the molecular weight of PEG. Figure 2 also shows a sharp, well-defined melt for ALA, typical of a crystalline solid, in contrast to the broad melting peak for PEG 10,000, which is indicative of a polymeric material.

Only solid dosage forms prepared using PEG 10,000 remained intact after six hours during drug release experiments. Formulations prepared using the two lower molecular weight PEGs had completely dissolved by the end of the determination. As can be seen from Figs. 3A–3C, increasing the ALA loading significantly increased the percentage of total drug released in each case. Formulations prepared from PEG 1000 and PEG 6000 released similar amounts of ALA at each of the drug load-

ings investigated. Formulations prepared from PEG 10,000, perhaps due to incomplete dissolution, released significantly less ALA than formulations prepared with either of the other two PEGs at each of the drug loadings.

Discussion

The aim of the present study was to produce solid dosage forms containing ALA that would dispense with the need to prepare unstable ALA solutions immediately prior to use. The obvious alternative to systemic ALA delivery is local instillation into the colon,¹⁴ which has been shown to produce comparable PDT outcomes as those following oral administration.¹⁵ However, owing to chemical instability of ALA at physiological pH, solutions for instillation into the colon must be prepared immediately before use and buffered to low pH values, an approach likely to cause irritation or damage to the mucosa of the colon.¹⁵ To overcome these difficulties,

topical delivery such as that from the system described in this work should be capable of releasing its ALA payload when in the colon by either melting or dissolving. Poly(ethylene glycol)s possess these favorable attributes, being water soluble and melting around body temperature. They are commonly used pharmaceutical excipients in topical formulations, tablets, and suppositories, and are considered to be nontoxic,¹⁹ making them ideal for the design intended in this work.

The solid dosage forms produced from PEGs were mechanically robust and differential scanning calorimetry showed no interaction between any of the PEGs and ALA, apart from solubility of the drug in PEG 1000 and PEG 6000. ALA was rapidly released from the solid dosage forms, although it was noted that increasing the drug loading significantly increased the percentage of total drug released in each case. Interestingly, drug release from dosage forms containing 1% w/w ALA appeared to be far from com-

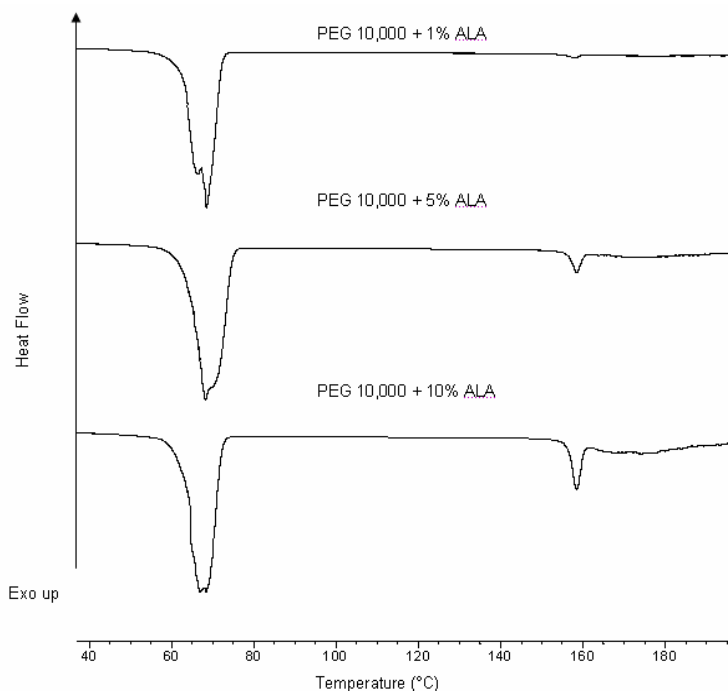


FIGURE 2. Thermal analysis curves for samples containing PEG 10,000 plus 1% w/w, 5% w/w, or 10% w/w ALA. It should be noted that as three curves are overlaid, there is no magnitude on the heat flow axis and the figure serves simply to illustrate the onset of melting of PEG 10,000 and ALA in solid dosage forms containing both.

plete in each case, despite formulations prepared using PEG 1000 and PEG 6000 having dissolved completely after six hours. Although speculative, this may be due to an interaction between ALA and poly(ethylene glycol). As shown previously using NMR spectroscopy, the formation of an ester between ALA and PEG 400 is possible, formed by reaction of the acidic functional group on ALA with the hydroxyl group of PEG.²⁰ This may account for the results seen here that showed less than 100% drug release. This phenomenon is more evident at low loadings because, as shown using differential scanning calorimetry, ALA is soluble in PEG and, hence, available for reaction. The effect becomes increasingly less apparent at higher loadings since a higher proportion of the total drug loading is in the crystalline (undissolved) form and, therefore, unavailable for reaction with PEG. It is interesting to note that ALA could be regenerated from this type of ester by enzyme-catalyzed or aqueous hydrolysis.²⁰ This means that following delivery to the co-

lon, the nonspecific esterases or water present could cleave the ester bond to release ALA, which would then be available for PDT and PD.

There is little doubt that photodynamic technology could make a significant and important impact in allowing expedient diagnosis or treatment of early stage lesions without the need for surgery or toxic chemotherapy regimens. In this respect, ALA has many advantages over preformed photosensitizers in both diagnosis and treatment of lesions of the gastrointestinal tract. Administration is followed by a rapid and uniform buildup of PPIX in the colonic mucosa, which may be up to seven times higher than that in the underlying submucosa and muscle layers.¹² If the concentration in the mucosa is above the threshold for photodynamic damage, whereas that in the muscle is not, illumination will result in selective necrosis of the mucosa. This means that ALA PDT should be able to destroy early stage tumors localized to the mucosa, while maintaining the mechanical integrity of the gastro-

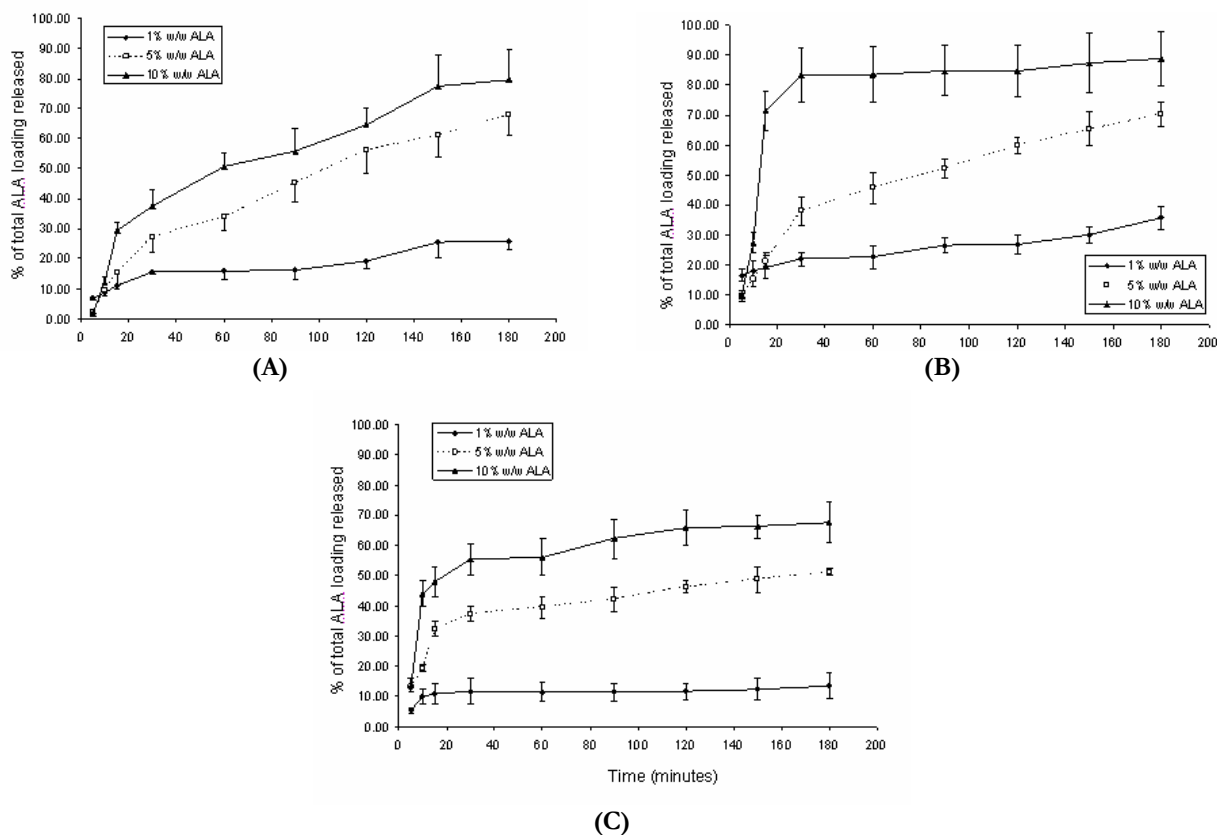


FIGURE 3. Influence of PEG molecular weight and ALA loading on the percentage of total ALA loading released from solid dosage forms over time: **(A)** PEG 1000; **(B)** PEG 6000; **(C)** PEG 10,000.

intestinal wall.

The preliminary studies carried out here suggest that dosage forms prepared from poly(ethylene glycol) may be suitable for delivery of ALA to the colorectal region for PDT or PD of colorectal cancer. Studies are currently underway to quantify PEG-ALA esters likely to form in such systems. Further work is planned to formulate the system to allow for colon-specific delivery after oral administration. Also, rectal delivery is to be optimized by shaping the dosage forms as suppositories.

References

1. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet*. 1999;353:391–9.
2. Waters C. Colorectal cancer—drug treatment. *Hospital Pharmacist*. 2004;11:179–92.
3. Young A, Rea D. ABC of colorectal cancer: treatment of advanced disease. *B Med J*. 2000;321:1278–81.
4. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2005;365:153–65.
5. Hermanek P Jr, Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P. Long-time results of surgical therapy for colorectal cancer. results of the German Study Group for Colorectal Cancer (SGCRC). *Chirurg*. 1994;65:287–97.
6. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:889–905.
7. Barr H, Krasner N, Boulos PB, Chatlani P, Bown SG. Photodynamic therapy for colorectal cancer- a quantitative pilot study. *Br J Surg*. 1990;77(1):93–6.
8. Milkv P, Messman H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy for gastrointestinal tumours using three photosensitisers—ALA induced PPIX, Photofrin and MTHPC. a pilot study. *Neoplasma*. 1998;45:157–61.
9. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX : basic principals and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 1990;6:143–8.
10. Lange N, Jichlinski P, Zellweger M, Forrer M, Marti A, Guillou L, Kucera P, Wagnieres G, Van Den Bergh H. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX. *Br J Cancer*. 1999;80(1/2):185–93.
11. Proost RL, Gahlen J. Fluorescence diagnosis of colorectal neoplasms: a review of clinical applications. *Int J Colorectal Disease*. 2002;17:1–10.
12. Loh CS, Vernon D, MacRobert AJ, Bedwell J, Bown SG, Brown SB. Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolevulinic acid in the tissue layers of the gastro-intestinal tract. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 1993;20(1):47–54.
13. Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, Hatfield ARW, Bown SG. Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX—a pilot study. *Gut*. 1995;36:67–75.
14. Gahlen J, Stern J, Pressmar J, Bohm J, Holle R, Herfarth, C. Local 5-aminolevulinic acid application for laser light-induced fluorescence diagnosis of early staged colon cancer in rats. *Lasers Surg Med*. 2000;26:302–7.
15. Gil M, Woszczyński M, Regula J, MacRobert AJ, Butruk E, Bown SG. (). Topical versus systemic 5-aminolevulinic acid administration for photodynamic therapy of the colon in B10.RBP mice. *J Biomed Opt*. 1999;4:286–91.
16. Fromm D, Kessel D, Webber J. Feasibility of photodynamic therapy using endogenous photosensitisation for colon cancer. *Arch Surg*. 1996;131:667–9.
17. Donnelly RF, McCarron PA, Woolfson AD. Drug delivery of aminolevulinic acid from topical formulations intended for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2005;81:750–67.
18. Oishi H, Nomiyama H, Nomiyama K, Tomokuni K. Fluorometric HPLC determination of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. *J Anal Toxicol*. 1996;20:106–10.
19. Parfitt K. Martindale: The Complete Drug Reference. Pharmaceutical Press: London; 1999.
20. McCarron PA, Donnelly RF, Andrews GP, Woolfson AD. Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application. *J Pharmaceut Sci*. 2005;94:1756–71.