

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 390**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/58** (2007.01)

**A61K 41/00** (2010.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2019 PCT/EP2019/068775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20011960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2019 E 19736763 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3820524**

54 Título: **Complejo de hipericina-polivinilpirrolidona (PVP) con alto contenido de hipericina**

30 Prioridad:

**13.07.2018 EP 18183435**

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

**05.04.2024**

73 Titular/es:

**HYPERICUM LIFESCIENCE GMBH (100.0%)  
Erlgasse 48/2  
1120 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**KUBIN, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**SOLER LERMA, Santiago**

ES 2 964 390 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Complejo de hipericina-polivinilpirrolidona (PVP) con alto contenido de hipericina

- 5 La presente invención es concerniente con un complejo formado por hipericina o una sal de hipericina y polivinilpirrolidona (PVP), el complejo tiene una proporción particularmente alta de hipericina.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La hipericina se puede encontrar como componente de varias plantas, en particular en *Hypericum* sp. y como pigmento en protozoos, en ciertos insectos australianos y con cadenas laterales, como fagopirina en alforfón.

Debido a sus propiedades fotodinámicas y fotoquímicas, una variedad de proyectos de investigación que investigan la aplicación del fotosensibilizador en diagnóstico y terapia de tumores se han centrado una y otra vez en hipericina.

- 15 En los últimos 50 años, la terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas en inglés) de tumores se ha desarrollado al margen de oncología. Sin embargo, los mecanismos de PDT se han dilucidado ampliamente y se han definido métodos. Después de la aplicación sistémica o local del fotosensibilizador, el fotosensibilizador se acumula en el tejido maligno. Cuando el fotosensibilizador es excitado con la ayuda de luz de una longitud de onda apropiada, puede transferir energía a un socio de reacción, por ejemplo, a oxígeno molecular. Las moléculas reactivas de oxígeno que se generan mediante esto pueden dañar a su vez las estructuras celulares del tejido tumoral.

- 20 Sin embargo, hasta ahora, ha habido una escasez de fotosensibilizadores realmente apropiados que se concentren en células tumorales, sean altamente compatibles y cumplan con los requisitos físicos y químicos para PDT. En particular, el método que usa ácido delta-aminolevulínico (5-ALA) como "profármaco" para protoporfirina IX en órganos huecos (estómago, intestinos, vejiga, pulmones, etc.) se ha desarrollado más. La desventaja con 5-ALA o protoporfirina IX es la inestabilidad: las porfirinas son sensibles a la luz y se decoloran durante la terapia, pierden concentración en el tejido y las dosis son difíciles de calcular.

- 30 La estabilidad de hipericina como fotosensibilizador es conocida, también como el hecho de que este constituyente vegetal se concentra en células tumorales. Junto con las propiedades químicas y físicas, estos son los requisitos óptimos para emplear un sensibilizador en PDT. Mediante experimentos in vitro, se ha demostrado la eficacia de hipericina en PDT en una serie de líneas celulares y además, estudios en animales in vivo han confirmado el potencial de hipericina en PDT. La hipericina es una sustancia hidrófoba que es completamente insoluble en agua y requiere las formulaciones más diferentes para poder ser usada para propósitos médicos. Las formulaciones de este tipo contienen así varios solventes que, sin embargo, a menudo no son muy compatibles y sufren de efectos secundarios (por ejemplo, alcohol, DMSO, etc.) o agentes solubilizantes, liposomas, micelas o nanopartículas.

- 35 En primer lugar, WO 01/89576 A2 describe un procedimiento práctico para fabricar hipericina soluble en agua y así capaz de aplicación al acomplejarse con polivinilpirrolidona (PVP). En el mismo se describen complejos que tienen una proporción

molar de hipericina a PVP de aproximadamente 1:1. La página 3 describe que tanto hipericina como PVP pueden estar presentes en una concentración de 1  $\mu\text{mol/L}$ . De acuerdo con el intervalo de masa molar para PVP que se afirma como preferido en la aplicación (10000-90000 g/mol) y la masa molar de hipericina (504.44 g/mol), esto corresponde a una proporción en peso de hipericina a complejo de hipericina-PVP de entre 0.6% y 5% en peso.

5

Kubin et. Alabama. (Pharmazie 63 (2008) 263-269) describen un método de producción basado en WO 01/89576 A2, en el cual se calienta hipericina ya disuelta en etanol con PVP y agua a 70°C y a continuación se evapora la solución obtenida de esta manera. El residuo obtenido contiene entonces el complejo soluble en agua de hipericina-PVP. En la figura 8, se describe una solución con una concentración de 50  $\mu\text{mol/L}$  de hipericina y 100  $\mu\text{mol/L}$  de PVP (PVP 10, PVP 25 o PVP 40). De las masas molares de hipericina (504.44 g/mol) y de PVP (10000 g/mol para PVP 10, 25000 g/mol para PVP 25, 40000 g/mol para PVP 40), las proporciones molares se pueden convertir a proporciones en peso. De esta manera, para el complejo con PVP 10 se obtiene un valor de aproximadamente 2.5% en peso, para PVP 25 se obtiene un valor de aproximadamente 1% en peso y para PVP 40 se obtiene un valor de aproximadamente 0.6% en peso.

10

15

Kubin et. Alabama. (Photochemistry Photobiology 84 (2008) 1560-1563) describen un estudio clínico en el cual se usa hipericina-PVP. En este caso, la hipericina también tiene una proporción en peso del 1% en peso del complejo de hipericina-PVP.

20

WO 2014/079972 A1 describe un equipo para PDT en órganos huecos tales como la vejiga y menciona el uso de hipericina-PVP, entre otros. La cantidad total se da como 0.25 mg de hipericina enlazada a 25 mg de PVP. La proporción en peso de hipericina al complejo de hipericina-PVP es, así, como máximo 1% en peso.

25

WO 2017/054017 A1 describe formulaciones de hipericina en forma de sal para terapia fotodinámica. En el método de producción de hipericina-PVP descrito en el Ejemplo 1, se producen 250.0 g de una solución amortiguadora de fosfato que contiene un total de 1875 mg de PVP k25 y 0.0225 mg de hipericina por gramo de solución. Por consiguiente, la proporción en peso de hipericina en el complejo de hipericina-PVP es 0.3% en peso.

30

WO 2017/054018 A1 describe formulaciones de hipericina en forma de sal para diagnóstico fotodinámico. En el método de producción para hipericina-PVP descrito en el Ejemplo 1, se producen 250.0 g de una solución amortiguadora de fosfato que contiene un total de 562.5 mg de PVP k25 y 0.0225 mg de hipericina por gramo de solución. La proporción en peso de hipericina al complejo de hipericina-PVP es, por consiguiente, 1% en peso.

35

Feinweber y col. (Photochemical & Photobiological Sciences 13.11 (2014): 1607-1620) describen conjugados que consisten de hipericina y polifosfacenos hidrolíticamente degradables. Con el fin de producir conjugados no covalentes de hipericina y poldi-[2-(2-oxo-1-pirrolidinil) etoxi]fosfaceno (PYRP), se disuelve hipericina (2.4 mg) en 2 ml de etanol y se añade a PYRP (200 mg), tras lo cual el disolvente es removido bajo vacío. Como comparación, se usa hipericina-PVP, en donde aquel complejo de hipericina-PVP se produce al usar PVP40 "de manera análoga". La proporción en peso de hipericina a complejo de hipericina-PVP es entonces como máximo 1.2% en peso.

40

El diagnóstico fotodinámico con ayuda de hipericina-PVP en combinación con endoscopia de fluorescencia, como se conoce

en la técnica anterior, es un método muy sensible y se puede realizar con cantidades muy pequeñas de material. Como ya se ha publicado muchas veces, en la vejiga, por ejemplo, solo se introducen 0.25 mg de hipericina (en total 25 mg de complejo de hipericina-PVP que contiene 1% en peso de hipericina) en forma disuelta. Esta cantidad es suficiente para teñir los tumores y lesiones lo suficiente como para que el urólogo los identifique y pueda removerlos. La pequeña proporción en peso de hipericina en el complejo de hipericina-PVP y la alta proporción asociada de PVP, por consiguiente, no provoca ningún problema para el diagnóstico fotodinámico, debido a la pequeña cantidad de material usado.

Sin embargo, este no es el caso para aplicaciones que requieren mayores cantidades de hipericina, tal como terapia fotodinámica, por ejemplo. La dosis más alta de hipericina en este caso es asociada con una gran cantidad de PVP. Así, hay necesidad de complejos de hipericina-PVP que contengan una mayor proporción de hipericina. Así, un objetivo de la presente invención es proveer tales complejos.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Este objetivo se obtiene por medio de un complejo formado de hipericina o una sal de hipericina y polivinilpirrolidona (PVP), en donde la proporción media en peso de hipericina o de sal de hipericina en el complejo total es más de 6% en peso.

**Cuando se menciona "hipericina" a continuación, este término se debe entender que incluye tanto el ácido libre como sales de hipericina, preferiblemente sales alcalinas, en particular preferiblemente la sal de sodio o potasio.**

Se pueden preparar composiciones solubles en agua con el complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención, que contienen grandes cantidades de hipericina sin que esto esté asociado con una cantidad desventajosamente grande de PVP. Con esto, se pueden proveer formulaciones que usan incluso menos material que antes. Debido a que se pueden evitar grandes cantidades de adyuvantes (PVP) y efectos secundarios asociados, la presente invención facilita aplicaciones que requieren mayores cantidades de hipericina. En particular, esto implica métodos terapéuticos tales como terapia fotodinámica (PDT) para el tratamiento de enfermedades tumorales.

Así, la presente invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden el complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención.

Durante el curso de los estudios experimentales llevados a cabo en el contexto de la presente invención, se demostró inesperadamente que se puede obtener una proporción en peso particularmente alta de hipericina en el complejo de hipericina-PVP cuando una mezcla de hipericina y PVP es calentada a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada.

Así, la presente invención también provee un método para la producción del complejo de acuerdo con la invención, que es caracterizado porque una mezcla de hipericina y PVP es calentada a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada.

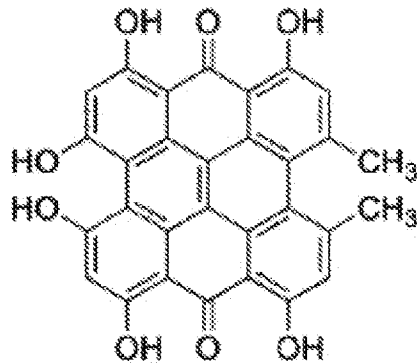
Mediante la aplicación de este método, se pudieron producir complejos de hipericina-PVP que contienen más de 6% en

peso, en particular más de 10% en peso, preferiblemente más de 15% en peso, en particular preferiblemente más de 20% en peso y más en particular preferiblemente más de 35% en peso de hipericina. Por consiguiente, la proporción de hipericina en los complejos de acuerdo con la invención supera significativamente la proporción de hipericina en complejos de hipericina-PVP de la técnica anterior y por consiguiente permite aplicaciones nuevas y más ventajosas para hipericina-PVP.

La aplicación de los complejos de hipericina-PVP a terapia fotodinámica (PDT) para el tratamiento de enfermedades tumorales es particularmente ventajosa.

También otras aplicaciones que requieren mayores cantidades de hipericina se facilitan considerablemente por la presente invención. Como ejemplo, en combinación con luz, la hipericina tiene acción antiviral y antibacteriana. El complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención se puede usar así para esterilizar y/o desinfectar superficies o líquidos. La proporción de PVP en una aplicación en este contexto sigue siendo manejablemente pequeña.

La hipericina también se puede describir como 1,3,4,6,8,13-hexahidroxi-10,11-dimetilfenantro[1,10,9,8-opqra]perilen-7,14-diona. La hipericina se puede representar por la siguiente fórmula estructural (en este caso en forma de ácido libre):



Además del ácido libre, la hipericina también puede estar presente en otras formas, tales como en forma de sal, por ejemplo, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio o potasio. En el contexto de la presente invención, el término "hipericina" describe todas las formas posibles de este tipo.

La polivinilpirrolidona (PVP), también conocida como polividona o povidona, es un polímero del compuesto vinilpirrolidona. La PVP está disponible comercialmente en diferentes grados de polimerización. El grado de polimerización determina la masa molar media del polímero.

La presente invención es concerniente con un complejo formado de hipericina o una sal de hipericina y polivinilpirrolidona (PVP), caracterizado porque la proporción media en peso de hipericina o de sal de hipericina en el complejo total es más de 6% en peso, preferiblemente más de 8% en peso, 10% en peso, 15% en peso, 20% en peso, 25% en peso o más de 30% en peso.

A no ser que se indique de otra manera, los porcentajes (%) dados en la presente invención se refieren respectivamente al porcentaje en peso (% en peso). La proporción en peso en este caso provee la proporción relativa de la masa de hipericina a la masa de todo el complejo (hipericina + PVP).

5 La proporción de hipericina en el complejo de hipericina-PVP también se puede expresar como la proporción molar. Como ejemplo, un complejo de hipericina-PVP que consiste en hipericina en forma de ácido libre (masa molar: 504.44 g/mol) y PVP con una masa molar media de 25 kD y que tiene una proporción media en peso de hipericina al complejo total de 10% en peso, tiene una proporción molar media de hipericina a PVP en el complejo de 5.5. La proporción molar media provee en este caso la proporción de la cantidad de hipericina a la cantidad de PVP.

10

Así, la presente invención también es concerniente con un complejo formado de hipericina y PVP, caracterizado porque la proporción molar media de hipericina a PVP en el complejo es de más de 2.5, preferiblemente más de 3, 4, 5, 7, 10 o 15.

15

La proporción (proporción en peso también como proporción molar) de hipericina en el complejo total se debe entender siempre como la proporción media. Un método apropiado para determinar la proporción media de hipericina en el complejo total es cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La persona experimentada en la técnica estará familiarizada con la realización de una determinación de este tipo, como se describe en Freytag W.E. (Deutsche Apothekerzeitung 124 No. 46 (1984) 2383-2386). Aquel de habilidad ordinaria en la técnica sabrá cómo pesar una cantidad exacta de complejo de hipericina-PVP, cómo ser capaz de determinar la concentración de una curva de calibración y una medición de HPLC y cómo calcular la proporción en peso de hipericina en el complejo total de la misma. Un ejemplo de cómo se puede hacer una determinación de este tipo se describe en el ejemplo 5.

20

La PVP comercial está disponible en una multitud de diferentes grados de polimerización y por consiguiente, de masas molares medias. Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, se prefieren masas molares en el intervalo de 10 kD a 40 kD, debido a que las moléculas de este tamaño pueden ser excretadas de los riñones fácilmente y sin ser metabolizadas (despeje).

25

Así, en una modalidad preferida de la presente invención, el complejo de hipericina-PVP es caracterizado porque la PVP tiene una masa molar media de 10 a 40 kD, preferiblemente de 12 a 25 kD.

30

Debido a la pequeña proporción de hipericina, los complejos de hipericina-PVP descritos en la técnica anterior no son apropiados para su uso como ingredientes en composiciones farmacéuticas. Con el fin de obtener cantidades suficientes de hipericina para aplicaciones farmacéuticas, se tendrían que emplear grandes cantidades del complejo de hipericina-PVP. Esto conduciría a un consumo de material desfavorablemente alto o una acumulación de PVP en el paciente. Este problema es resuelto con la presente invención. Debido a la proporción extensamente reducida de adyuvantes (PVP), son posibles dosis más altas de hipericina soluble en agua; estos son necesarios para terapia tumoral. Así, se pueden evitar efectos secundarios severos de PVP. Así, la nueva invención permite, entre otras cosas, el uso de hipericina en terapia fotodinámica de tumores.

35

40

Así, la presente invención también es concerniente con una composición farmacéutica que comprende el complejo de

hipericina-PVP de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida de la invención, la composición farmacéutica es caracterizada porque la composición contiene el complejo de hipericina-PVP, de acuerdo con la invención, con hipericina en una concentración de por lo menos 25 mg/L, preferiblemente por lo menos 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L o por lo menos 250 mg/L.

En el contexto de la presente invención, las "composiciones farmacéuticas" pueden, por ejemplo, ser administradas localmente para el tratamiento de tumores. De esta manera, debido a que la presente invención significa que, por primera vez, se pueden producir composiciones farmacéuticas que contienen altas concentraciones de hipericina sin tener que usar grandes cantidades de PVP, la presente invención también se puede usar para composiciones farmacéuticas que se pueden administrar intravenosamente. Así, también se pueden administrar por vía sistémica grandes cantidades de hipericina que posteriormente se concentran en células tumorales.

En otra modalidad preferida, la presente invención es concerniente con una composición farmacéutica que contiene el complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención, caracterizada porque la composición se provee para administración intravenosa.

En una modalidad particularmente preferida, la presente invención es concerniente con una composición farmacéutica que contiene el complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención, caracterizada porque la composición se provee para administración intravenosa y porque la composición contiene hipericina en una concentración de por lo menos 25 mg/L, preferiblemente por lo menos 50 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L o por lo menos 250 mg/L.

PVP, una sustancia amorfa, no tiene punto de fusión, pero tiene lo que se conoce como temperatura de transición vítrea. La temperatura de transición vítrea es dependiente del grado de polimerización, entre otras cosas, esto es, de la masa molar media de PVP (véase Tabla 1).

Tabla 1: Ejemplos para la temperatura de transición vítrea de PVP como función de la masa molar

Masa Molar de PVP	Temperatura de transición vítrea
12 kD	93 °C
17 kD	130 °C
25 kD	155 °C
30 kD	175 °C

En los estudios experimentales llevados a cabo durante el desarrollo de la presente invención, se demostró inesperadamente que se puede obtener una proporción en peso particularmente alta de hipericina en el complejo de hipericina-PVP cuando se calienta una mezcla de hipericina y polivinilpirrolidona a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada. La hipericina es estable hasta 300°C y así puede ser acomplejada con PVP como molécula intacta. Por consiguiente, este método permite producir el complejo de hipericina-PVP de acuerdo

con la invención.

Así, la presente invención también es concerniente con un método para la producción del complejo de polivinilpirrolidona de hipericina de acuerdo con la invención, caracterizado porque una mezcla de hipericina y PVP es calentada a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada.

En este contexto, se debe entender que el término "temperatura de transición vítrea de la PVP empleada" significa la temperatura a la cual se produce la transición vítrea de PVP en la mezcla pertinente con hipericina. La temperatura de transición vítrea de la PVP empleada puede ser influenciada por la composición de la mezcla, por ejemplo, cuando se añade solvente o agua a la mezcla. Métodos para determinar la temperatura de transición vítrea son conocidos para la persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, la temperatura de transición vítrea se puede determinar usando el método de la norma DIN apropiada.

Una modalidad preferida del método para la producción del complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención es caracterizado porque la masa molar de la PVP empleada es de por lo menos 12 kD y la mezcla es calentada a una temperatura de por lo menos 93°C.

Una modalidad particularmente preferida es caracterizada porque la masa molar de la PVP empleada es de por lo menos 17 kD y la mezcla es calentada a una temperatura de por lo menos 130°C.

Otra modalidad particularmente preferida es caracterizada porque la masa molar de la PVP empleada es de por lo menos 25 kD y la mezcla es calentada a una temperatura de por lo menos 155°C.

Otra modalidad particularmente preferida es caracterizada porque la masa molar de la PVP empleada es de por lo menos 35 kD y la mezcla es calentada a una temperatura de por lo menos 175°C.

Se ha demostrado que es ventajoso añadir un solvente o una mezcla de solventes a la mezcla de hipericina y PVP. Preferiblemente, la mezcla de hipericina y PVP es agitada para formar una pasta en un poco de solvente. Solventes adicionales pueden contribuir a distribuir los componentes homogéneamente y se pueden añadir mayores cantidades de hipericina a la PVP. Ejemplos de solventes apropiados son agua, etanol, metanol, piridina, acetona, etilmetilcetona y piridina o mezclas de los mismos. Se prefieren particularmente agua, etanol, metanol y piridina, especialmente agua y etanol.

Así, una modalidad preferida del método de acuerdo con la invención para la producción del complejo de hipericina-PVP es caracteriza porque un solvente o una mezcla de solventes, preferiblemente agua, etanol, metanol, piridina, acetona, etilmetilcetona y/o etilo, se añade acetato, más preferiblemente agua, etanol, metanol y/o piridina, aún más preferiblemente agua y/o etanol, a la mezcla de hipericina y PVP.

En el método de producción, se ha demostrado que es ventajoso mantener la mezcla de hipericina y PVP por un período de tiempo específico a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada. Se obtuvieron buenos resultados cuando la mezcla se mantuvo por encima de la temperatura de transición vítrea durante por lo

menos 5 minutos.

Así, una modalidad preferida del método de acuerdo con la invención para la producción del complejo de hipericina-PVP es caracterizado porque la mezcla se mantiene a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada durante por lo menos 5 minutos.

En los últimos 50 años, la terapia fotodinámica (PDT) de enfermedades tumorales se ha desarrollado más bien al margen de la oncología. Sin embargo, los mecanismos de PDT se han dilucidado ampliamente y se conocen métodos de la técnica anterior. Hasta ahora, sin embargo, ha habido una escasez de fotosensibilizadores realmente apropiados que se concentren en células tumorales, que sean altamente compatibles y que cumplan con los requisitos físicos y químicos para PDT. La presente invención provee complejos de hipericina-PVP que cumplen estos requisitos y que, debido a la alta proporción de hipericina, son altamente apropiados para aplicaciones terapéuticas. Debido a esto, los complejos de hipericina-PVP de acuerdo con la invención pueden ser administrados ya sea local o sistémicamente.

Así, la presente invención también es concerniente con composiciones farmacéuticas que contienen un complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención para uso en un método terapéutico, preferiblemente para aplicación en terapia fotodinámica (PDT) para el tratamiento de enfermedades tumorales.

La presente invención también es concerniente con un método para el tratamiento de enfermedades cancerosas, caracterizado porque se administra un complejo de hipericina-PVP, preferiblemente durante el curso de terapia fotodinámica (PDT).

En una modalidad preferida, la presente invención provee un método para el tratamiento de enfermedades cancerosas, que comprende los siguientes pasos:

Proveer una formulación farmacéuticamente aceptable que contiene un complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención y,  
Administrar una cantidad eficaz de esta composición a una persona que tiene cáncer.

Preferiblemente, el método para el tratamiento de enfermedades cancerosas incluye irradiación de la persona con luz como paso adicional. Preferiblemente, la luz tiene una longitud de onda de entre 400 nm y 800 nm, en particular entre 500 nm y 700 nm, más preferiblemente entre 550 nm y 650 nm. Preferiblemente, la luz tiene una intensidad de entre 1 mW/cm<sup>2</sup> y 250 mW/cm<sup>2</sup>, en particular preferiblemente entre 2 mW/cm<sup>2</sup> y 100 mW/cm<sup>2</sup>, más preferiblemente entre 3 mW/cm<sup>2</sup> y 50 mW/cm<sup>2</sup>, más preferiblemente entre 5 mW/cm<sup>2</sup> y 25 mW/cm<sup>2</sup>.

En combinación con luz, la hipericina tiene una acción antiviral y antibacteriana. Así, el complejo de acuerdo con la invención también se puede usar para esterilizar y/o desinfectar superficies o líquidos. La alta proporción de hipericina en el complejo de hipericina-PVP es una ventaja significativa a este respecto, debido a que de esta manera se minimiza el consumo de PVP.

Así, la presente invención también es concierne con el uso de un complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención para esterilizar y/o desinfectar superficies o líquidos.

5 "Hipericina-PVP" o "complejo de hipericina-PVP" como se usa en la presente se refiere a un producto que contiene hipericina y PVP y en donde se forma un compuesto entre moléculas de hipericina y PVP. La palabra "complejo" no limita de ninguna manera el tipo de compuesto, sino que simplemente significa que un compuesto se forma entre una o más moléculas de hipericina y una o más moléculas de PVP. El compuesto puede ser, por ejemplo, una adición no covalente de hipericina a PVP. El producto como un todo y no un complejo individual de hipericina-PVP a nivel molecular se debe entender que significa "hipericina-PVP" o "complejo de hipericina-PVP".

10 Las descripciones "proporción de complejo", "proporción en peso", "proporción molar" como se usan en la presente siempre se deben entender que se refieren a los valores medios. No se refieren a ningún complejo individual a nivel molecular, sino que se refieren a un valor medio para el producto como un todo.

15 La presente invención se ilustrará por los siguientes ejemplos y figuras, que claramente no limitan la invención.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1. Proporción en peso de hipericina en el complejo total en dos complejos de hipericina-PVP, de acuerdo con la invención, en comparación con un complejo de hipericina-PVP convencional. La PVP empleada para el complejo de acuerdo con la invención fue una PVP con una masa molar media de 12 kD ("HypPVP12 fundido") o 25 kD ("HypPVP25 fundido"). La PVP usada para la producción del complejo convencional fue PVP con una masa molar media de 25 kD ("HypPVP25 disuelta"). Los complejos de acuerdo con la invención se produjeron como se describe en el Ejemplo 1. El complejo convencional se produjo como se describe en el Ejemplo 3.

25 Figura 2. Comparación de los espectros de absorción de sodio-hipericinato-PVP, hipericina-PVP e hipericina. Las propiedades fotofísicas de hipericina fueron retenidas en el complejo de PVP, independientemente de si se empleó el ácido libre o la sal de sodio de hipericina o si hipericina estaba presente en forma acomplejada. Esto significa que la hipericina no pierde sus propiedades fotofísicas en la forma que se compleja con PVP.

30 Figura 3. Curva de calibración para la determinación de la proporción en peso de hipericina con respecto al complejo de hipericina-PVP mediante HPLC. Las pruebas de HPLC se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 5 con diferentes cantidades de hipericina. La concentración de la hipericina pesada (eje x) fue graficada contra el área del pico de absorción a 588 nm y se generó una regresión lineal.

#### EJEMPLOS

35 **Ejemplo 1** - Producción de un complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención

Se mezclaron en seco 30 mg de polivinilpirrolidona (PVP 25 kD) con 15 mg de hipericina (99%, HPLC). Se añadieron a la mezcla 200 µL (200 microlitros equivalen a 0.2 ml) de etanol y 100 µL de agua (100 microlitros equivalen a 0.1 ml). A

continuación, la mezcla fue agitada y se dejó reposar por 20 minutos. Después de esto, la mezcla fue calentada lentamente en una estufa de secado a 180°C. Se programó que la temperatura aumentara desde la temperatura ambiente a 180°C durante un período de aproximadamente 20 minutos. La mezcla se mantuvo a una temperatura de 180°C durante aproximadamente 8 minutos. Después de esto, la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron  
5 aproximadamente 3-6 ml de agua y se agitó durante 1 hora. Esto provocó que los componentes solubles, el complejo de hipericina-PVP, se absorbieran en solución. Los componentes insolubles y la hipericina no acomplejada se separaron por filtración (diámetro de poro 0.2 – 0.4 µm). El filtrado fue secado y almacenado para uso posterior.

**Ejemplo 2** - Producción de un complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la invención que contiene hipericina en forma de sal de sodio, como en el Ejemplo 1, excepto que en lugar de hipericina, se usó la sal de sodio: hipericinato de Na. El hipericinato de sodio se produjo de acuerdo con las instrucciones dadas por Kapinus et al. (*Monatshefte für Chemie* 130 (1999) 436-441).

**Ejemplo 3** - Producción de un complejo de hipericina-PVP de acuerdo con la técnica anterior se produjo un complejo de hipericina-PVP convencional como se describe por Kubin et. *Alabama*. "How to make hypericin water-soluble", *Die Pharmazie* 63 (2008) 263-269. A este respecto, se disolvieron 10 mg de hipericina en 2.5 mL de etanol mediante ultrasonido y posteriormente, 1000 mg de PVP 25 kD y 8 mL de agua destilada fueron añadidos. La mezcla fue calentada a 70°C por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 5 mL de agua y la mezcla fue agitada por 10 minutos más. A continuación, la solución fue secada en un dispositivo rotavapor y el complejo de hipericina-PVP obtenido fue almacenado  
20 seco para uso posterior.

Al intentar añadir más hipericina al complejo, se formó un precipitado debido a que, en estas condiciones, no es posible formar ningún complejo con PVP de cantidades sustancialmente mayores de hipericina.

**Ejemplo 4** - Caracterización de los complejos hipericina-PVP

Los complejos de hipericina-PVP se produjeron de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos 1 a 3.

La proporción en peso de hipericina en los complejos de hipericina-PVP se determinó usando HPLC y usando la calibración apropiada de hipericina. El material de referencia usado fue hipericina estandarizada (> 99%, *Planta Naturstoffe Vertriebs GmbH*). La determinación de la proporción en peso de hipericina en el complejo total se llevó a cabo como se describe en el  
30 Ejemplo 5.

En los complejos de acuerdo con la invención se midió una proporción en peso de hasta 40% en peso (ácido libre de hipericina; producción de acuerdo con el ejemplo 1) o 41% en peso (hipericinato de sodio; producción de acuerdo con el ejemplo 2), mientras que la proporción en peso del complejo convencional fue 1% en peso (producción de acuerdo con Kubin et. al., *Die Pharmazie* 63 (2008) 263-269, como se describe en el Ejemplo 3). Por consiguiente, usando el método de acuerdo con la invención, la PVP podría ser cargada con casi 40 veces la cantidad de hipericina.

**Ejemplo 5** - Determinación de la proporción en peso de hipericina en el complejo total

40 La proporción en peso de hipericina en los complejos de hipericina-PVP se determinó usando HPLC y usando la calibración

apropiada con hipericina. El método de HPLC se llevó a cabo sustancialmente como se describe por Freytag W.E. (Deutsche Apothekerzeitung 124 No. 46 (1984) 2383-2386).

En detalle, el método de HPLC se llevó a cabo con:

- 5 Eluyente: 568.0 g de metanol, 157.8 g de acetato de etilo, 185.5 g de amortiguador (13.8 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua destilada con ácido ortofosfórico al 85% a un pH de 2.1)  
Columna: Nucleosil 120 3C18 (120 mm de largo, 4 mm de diámetro interno)  
Velocidad de flujo: 0.6 ml/min  
Detección: UV-vis a 588 nm.

10

Para la calibración se usó como material de referencia hipericina estandarizada (> 99%, Planta Naturstoffe Vertriebs GmbH). Se llevaron a cabo pruebas de HPLC con diferentes cantidades de material de referencia disuelto en eluyente de HPLC y se determinó el área del pico de absorción de hipericina a 588 nm. Se generó una curva de calibración de los valores medidos por medio de una regresión lineal (véase figura 3).

15

Con el fin de determinar la proporción de hipericina de un complejo de hipericina-PVP producido de acuerdo con el Ejemplo 1, se pesaron exactamente 5 mg del complejo de hipericina-PVP seco (polvo) y se disolvieron en eluyente de HPLC. Se llevó a cabo una prueba de HPLC como se describe anteriormente y se determinó la proporción de hipericina en el complejo total con la ayuda de la curva de calibración previamente construida de la señal de absorción obtenida a 588 nm. El resultado obtenido fue 40% en peso (esto es, 100 mg de complejo de hipericina-PVP contenían, por ejemplo, 40 mg de hipericina y 60 mg de PVP).

20

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un complejo formado de hipericina o una sal de hipericina y polivinilpirrolidona (PVP), caracterizado porque la proporción media en peso de hipericina o de sal de hipericina con respecto al complejo total es más de 6% en peso.
- 5 2. El complejo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la proporción molar media de hipericina a PVP en el complejo es más de 2.5.
3. El complejo de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la PVP tiene una masa molar media de 10 a 40 kD, preferiblemente de 12 a 25 kD.
- 10 4. Una composición farmacéutica caracterizada porque contiene un complejo de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque se provee para administración intravenosa y porque la composición contiene hipericina en una concentración de por lo menos 25 mg/L.
6. Un método para la producción de un complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque una mezcla de hipericina y PVP es calentada a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada.
- 15 7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque un solvente o una mezcla de solventes, preferiblemente agua, etanol, metanol, piridina, acetona, etilmetilcetona y/o acetato de etilo, más preferiblemente agua, etanol, metanol y/o piridina, más preferiblemente agua y/o etanol, se agrega a la mezcla de hipericina y PVP.
8. El método de conformidad con la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque la mezcla es mantenida a una temperatura mayor que la temperatura de transición vítrea de la PVP empleada por al menos 5 minutos.
- 20 9. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4 o 5, para usarse en un método terapéutico, preferiblemente para aplicación en terapia fotodinámica (PDT) para el tratamiento de enfermedades tumorales.
10. El uso del complejo de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 3, para esterilizar y/o desinfectar superficies o líquidos.

25

FIGURA 1

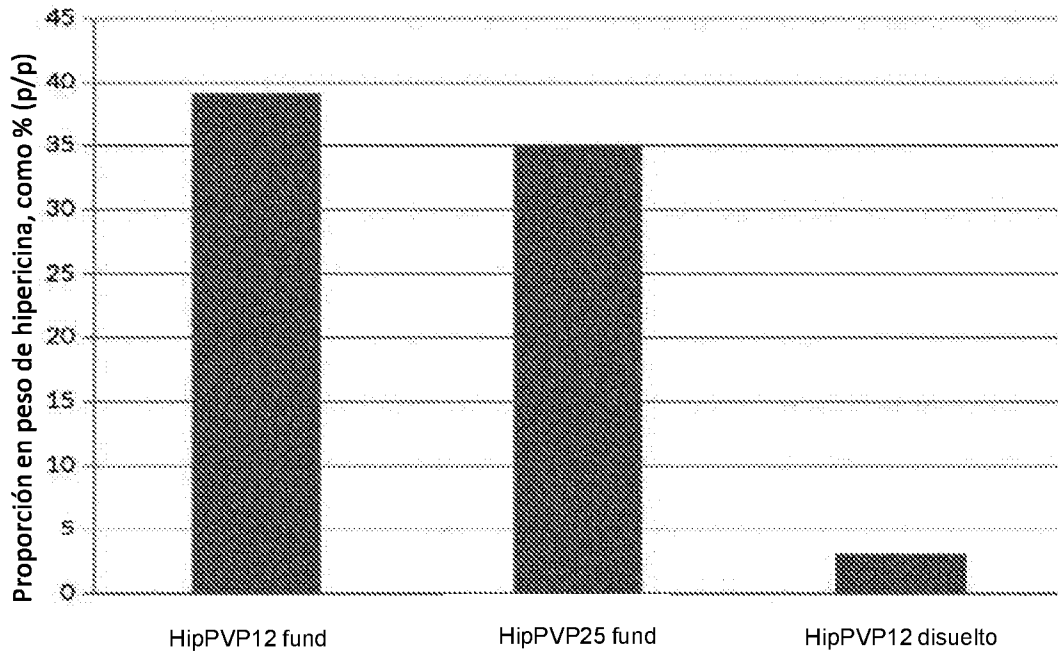


FIGURA 2

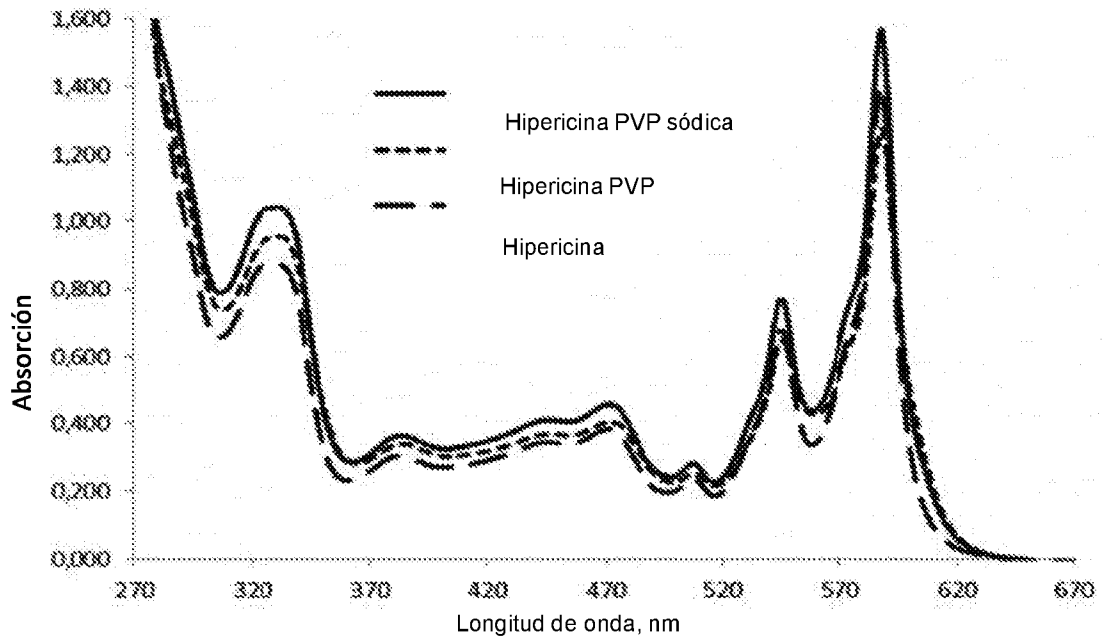


FIGURA 3

