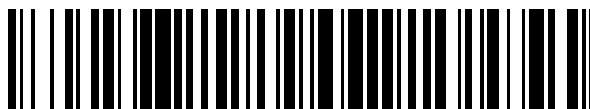


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 818**

51 Int. Cl.:

**A61K 41/00** (2006.01)  
**A61K 47/58** (2007.01)  
**A61K 47/60** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 47/32** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2016** **PCT/AT2016/000033**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017** **WO17054017**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2016** **E 16718843 (2)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 3237010**

54 Título: **Formulación de hipericina para la terapia fotodinámica**

30 Prioridad:

**28.09.2015 AT 6302015**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2020**

73 Titular/es:

**SANOCHEMIA PHARMAZEUTIKA AG (100.0%)**  
**Boltzmanngasse 11**  
**1090 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**ABRAHAMSBERG, CHRISTINA;**  
**FRANTSITS, WERNER;**  
**GERDES, KLAUS;**  
**GUNGL, JÖZSEF;**  
**KÄLZ, BEATE;**  
**MEDINGER, GREGOR y**  
**WELZIG, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

ES 2 750 818 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulación de hipericina para la terapia fotodinámica

5 La invención se refiere a una formulación para la preparación de una solución de instilación para su uso en la terapia fotodinámica, que contiene una hipericina unida a un agente complejante polimérico, en concreto, un polietilenglicol o una poli-N-vinilamida, en forma de una sal de metal alcalino, en particular en forma de la sal de potasio o de la sal de sodio, de acuerdo con las reivindicaciones.

10 La terapia fotodinámica (PDT) es un procedimiento que es adecuado para el tratamiento de tumores y alteraciones premalignas de la piel y mucosa de distintos órganos huecos (Juarranz et al., 2008; Agostinis et al., 2011).

La PDT se basa en la interacción de tres componentes: fotosensibilizador, luz en la región visible y oxígeno.

15 Después de la aplicación sistémica o tópica de un fotosensibilizador, tiene lugar una acumulación del fotosensibilizador en el tejido maligno. Con ayuda de luz de longitud de onda adecuada, el fotosensibilizador puede excitarse. En el estado excitado, se transfiere energía a un reactivo, por ejemplo, oxígeno molecular. A este respecto se generan moléculas de oxígeno reactivas, que a su vez dañan las estructuras celulares del tejido tumoral, mediante lo cual se inician procesos celulares tales como apoptosis y necrosis (Agostinis, et al., 2011; Allison y  
20 Sibata, 2010).

Un fotosensibilizador ideal para la PDT muestra acumulación selectiva en células tumorales, toxicidad sistémica nula o mínima y es fotoquímicamente eficiente.

25 Hipericina, 1,3,4,6,8,13-hexahidroxi-10,11-dimetilfenantro (1,10,9,8-opqra)perileno-7,14-diona se describió ya en la bibliografía como potencial fotosensibilizador (Agostinis et al., 2002).

En ensayos *in vitro*, pudo mostrarse la eficacia de hipericina en la PDT en una serie de líneas celulares (Karioti y Bilia, 2010).

30 Además, estudios en animales *in vivo* confirman el potencial de hipericina para una aplicación en la PDT (Bhuvaneswari et al., 2010/ Chen et al., 2003/ Liu et al., 2000/ Sanovic et al., 2011).

35 La hipericina es hidrófoba e insoluble en agua. Por este motivo, en el pasado, la hipericina se disolvió con ayuda del disolvente orgánico dimetilsulfóxido (DMSO) o de un polímero soluble en agua, polietilenglicol (PEG).

Experimentos en animales en un modelo de rata mostraron resultados alentadores sobre la PDT del carcinoma vesical. A este respecto, hipericina se introdujo en las células tumorales con ayuda de polietilenglicol. Con una dosis de hipericina de 30  $\mu\text{M}$  y una irradiación con luz (595 nm) de una intensidad de 25 a 50  $\text{mW}/\text{cm}^2$  pudieron destruirse  
40 hasta el 98 % de las células tumorales (Kamuhabwa et al., 2003).

Sin embargo, para una aplicación clínica, se necesita una formulación soluble en agua de hipericina, que tiene selectividad tumoral, y que puede excitarse con luz en la región visible.

45 El documento WO 01/89576 A2 describe cómo puede aumentarse la solubilidad de hipericina mediante el excipiente polivinilpirrolidona (povidona, PVP).

El uso de PVP-hipericina en la PDT se describe también en el documento WO 2014/079972 A1. El documento WO 2014/079972 A1 trata en particular un aparato que puede emplearse en la PDT de órganos huecos, tal como la  
50 vejiga humana.

El documento WO 2015/131891 A1 se refiere al uso de hipericina en forma de la sal de sodio tanto para el diagnóstico fotodinámico como para la terapia fotodinámica.

55 El producto divulgado en el documento WO 2015/131891 A1 se encuentra en forma de una solución anhidra en alcohol (en concreto, etanol) y contiene como solubilizante PEG. La solución ha de diluirse en una solución portadora (solución de glucosa) antes de su uso como fotosensibilizador.

La solución de infusión así obtenida contendrá de 0,01 a 0,05 mg de hipericinato de sodio y se administrará a lo  
60 largo de un periodo de 90 minutos.

PVP-hipericina muestra una acumulación selectiva en células tumorales *in vitro* e *in vivo* (Rubin et al., 2008; Vandepitte et al., 2011).

65 La invención se basa en el objetivo de proporcionar una formulación estéril y estable de hipericina, que puede emplearse para la aplicación clínica en la PDT.

Este objetivo se consigue con una formulación de hipericina que presenta las características de la reivindicación 1.

5 Formas de realización preferidas y ventajosas de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes.

Sorprendentemente, se ha demostrado que la formulación de hipericina de acuerdo con la invención es solo estable y, por lo tanto, aplicable en condiciones clínicas, cuando la hipericina se encuentra como sal.

10 Una evaluación de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención en experimentos en animales ha demostrado sorprendentemente que a una dosis de hipericina 30  $\mu\text{M}$  en una formulación estable con PVP de acuerdo con el Ejemplo 1, es suficiente una intensidad de luz necesaria de 5 o 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$  a una longitud de onda de 595 nm y un tiempo de exposición de 120 minutos en la vejiga (tiempo de instilación), para destruir el 98 % de las células tumorales. El mismo resultado del 98 % de células tumorales destruidas se consigue también con la misma  
15 intensidad de luz y hipericina 40  $\mu\text{M}$  a los 15 o 30 minutos de tiempo de exposición y tratamiento con luz de una longitud de onda de 610 nm. Asimismo, un tiempo de instilación de 1 hora, con hipericina 20  $\mu\text{M}$ , de igual intensidad de luz y frecuencia de luz de 570 nm, consigue una tasa de destrucción del 97 % y un tiempo de instilación de 120 minutos, con hipericina 9  $\mu\text{M}$ , de igual intensidad de luz y tratamiento a 600 nm, consigue una tasa de destrucción del 95 %. Con ello, con intensidades de luz de 5 a 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$  con frecuencias de luz de 570 a 610 nm, concentraciones de hipericina de 9 a 40  $\mu\text{M}$ , tiempos de exposición entre 15 y 120 minutos, se consigue una tasa de destrucción del 95 al 98 % de las células tumorales (ejemplos de aplicación 1, 2, 3 y 4).

La efectividad de una PDT depende esencialmente de la cantidad de luz total. Al mismo tiempo, con una intensidad de luz creciente, es elevada la probabilidad de efectos secundarios localizados.

25 Con la ayuda de la formulación de acuerdo con la invención, se consigue una acumulación mejorada en el tejido maligno, mediante lo cual una intensidad de luz claramente reducida de ya 5 hasta como máximo 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$  es suficiente para destruir las células tumorales.

30 El enriquecimiento selectivo de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención y la intensidad de luz sorprendentemente baja, que se necesitaba para una PDT en el modelo animal cuando se aplicaba la formulación de hipericina de acuerdo con la invención, permite la aplicación en la terapia de lesiones en diferentes cavidades del cuerpo, que pueden alcanzarse con la dosis de luz necesaria.

35 A continuación se describen ejemplos de la formulación de hipericina (complejo de hipericina-PVP) de acuerdo con la invención.

Modo de proceder general para la preparación de una formulación con el principio activo hipericinato de sodio:

40 El objetivo es preparar una formulación que contiene hipericina para la aplicación como fotosensibilizador en el ámbito de la terapia fotodinámica.

La formulación de acuerdo con la invención se prepara a partir de una sal de hipericina, en particular de hipericinato de sodio.

45 Para definir el contenido de hipericina del material de partida, se registran, además de la determinación del contenido, sobre todo el contenido de agua y en el caso de hipericinato de sodio, el porcentaje de sodio. Las propiedades fisicoquímicas pueden tener una influencia sobre la formulación del fármaco farmacéutico.

50 Para la aplicación clínica, es necesaria una estabilidad de la formulación de acuerdo con la invención. La estabilidad se garantiza por la composición del producto acabado y también afecta al mismo tiempo al procedimiento de preparación. Debido a los sistemas tampón usados, también durante la preparación hasta la liofilización del producto acabado puede conseguirse una estabilidad suficiente de la solución a granel.

55 Como sistemas tampón puede recurrirse a distintos aditivos, que preferentemente tanto para la solución a granel como para la solución reconstituida, consiguen un valor de pH fisiológicamente compatible y una presión osmótica después de la reconstitución con 50 ml de agua para inyección de 290  $\text{mOsmol}/\text{kg}$ . Los sistemas tampón fosfato o citrato pueden emplearse en primer lugar.

60 Después de finalizar la solución a granel a partir de los constituyentes mencionados, se carga la cantidad correspondiente de la solución a granel en frascos para inyección y se liofiliza.

Ejemplo 1:

65 A partir del hipericinato de sodio, se prepara una solución con una pesada objetivo de 90,0 mg de hipericina.

A 1875 mg de PVP k25, se le añaden 5,0 g de la solución de hipericina y se disuelve por completo.

Esta solución se rellena cuantitativamente con una solución de tampón fosfato hasta 250,0 g. La concentración final de esta solución es 0,0225 mg de hipericina/g de solución.

5 Para la liofilización, se carga una cantidad definida de la solución a granel así obtenida en frascos para inyección y con un programa de liofilización correspondiente se prepara el liofilizado acabado.

Ejemplo 2:

10 Se trabaja tal como se indica en el Ejemplo 1, usándose PVP k17 en lugar de PVP k25 para la complejación del hipericinato de sodio.

Ejemplo 3:

15 Se trabaja tal como se indica en el Ejemplo 1, usándose PVP k30 en lugar de PVP k25 para la complejación del hipericinato de sodio.

Ejemplo 4:

20 Se trabaja tal como se indica en el Ejemplo 1, 2 o 3, usándose una solución tampón de ácido cítrico en lugar de la solución de tampón fosfato.

25 Las soluciones a granel preparadas tal como se describe en los Ejemplos 1 a 4 pueden producirse con diferentes contenidos de hipericina.

La eficacia de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención se probó en un estudio preclínico con el uso de la formulación como Ejemplo 1.

30 Ejemplos de aplicación:

Para ello se examinó la formulación de hipericina de acuerdo con la invención para la PDT en un modelo de tumor de vejiga preclínico, ortotópico, en ratas. En todos los ejemplos, los tumores se trataron con la formulación de hipericina de acuerdo con la invención en diferentes concentraciones de 9 a 40  $\mu\text{M}$ , a diferentes intensidades de luz de 5 o 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , diferentes frecuencias de luz de 570 a 610 nm y diferentes tiempos de instilación.

40 Ejemplo 1. Después de una instilación de 2 horas con 30  $\mu\text{M}$  de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención y diferentes intensidades de luz (5 o 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) con luz de una longitud de onda de 595 nm, pudieron destruirse hasta el 98 % de las células tumorales.

Ejemplo 2. Después de una instilación de 1 hora con 20  $\mu\text{M}$  de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención y diferentes intensidades de luz (5 o 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) con luz de la longitud de onda 570 nm, pudieron destruirse hasta el 97 % de las células tumorales.

45 Ejemplo 3. Después de una instilación de 15 o 30 minutos con 40  $\mu\text{M}$  de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención y diferentes intensidades de luz (5 o 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) con luz de longitud de onda de 610 nm, pudieron destruirse hasta el 98 % de las células tumorales.

50 Ejemplo 4. Después de una instilación de 2 horas con 9  $\mu\text{M}$  de la formulación de hipericina de acuerdo con la invención y diferentes intensidades de luz (5-25  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) con luz de la longitud de onda 600 nm, pudieron destruirse hasta el 95 % de las células tumorales.

55 Los resultados de los ensayos en el modelo de rata se reproducen en las Figuras 1 y 2. En los diagramas "ns" representa "no significativo" y "\*\*\*" representa "significativo". Los diagramas de las Figuras 1 y 2 muestran la supervivencia de células tumorales después del tratamiento con la formulación de hipericina de acuerdo con la invención y luz. 24 horas después del tratamiento, el tejido de vejiga se disoció y las células supervivientes se determinaron con ayuda de un ensayo clonogénico en comparación con el control (sin PVP-hipericina y luz).

60 La supervivencia relativa de las células en condiciones de PDT (PVP-hipericina de acuerdo con el Ejemplo 1 y tratamiento con luz) asciende a (representada como valor medio + DE): 7,4 (+/- 6,4) % en el caso del uso de 5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  y 2,4 (+/- 4,0) % con 25  $\text{mW}/\text{cm}^2$  y una duración de tratamiento con luz de 60 minutos. Esto está representado en dos diagramas (Figuras 1 y 2).

Referencias:

65 Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D,

- Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* Julio-agosto de 2011;61(4):250-281
- 5 Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* Marzo de 2002;34(3):221-241
- Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* Junio de 2010;7(2):61-75
- 10 Bhuvaneswari R, Thong PS, Gan YY, Soo KC, Olivo M. Evaluation of hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with angiogenesis inhibitor bevacizumab using *in vivo* fluorescence confocal endomicroscopy. *J Biomed Opt.* Enero-febrero de 2010;15 (1):011114. Erratum in: *J Biomed Opt.* 2010
- 15 Chen B, Ahmed B, Landuyt W, Ni Y, Gaspar R, Roskams T, de Witte PA. Potentiation of photodynamic therapy with hypericin by mitomycin C in the radiation-induced fibrosarcoma-1 mouse tumor model. *Photochem Photobiol.* Septiembre de 2003;78 (3):278-282.
- Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* Marzo de 2008;10(3):148-154
- 20 Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci.* 4 de febrero de 2010;11 (2):562-594
- 25 Kubin A, Meissner P, Wierrani F, Burner U, Bodenteich A, Pytel A, Schmeller N. Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(6):1560-1563
- 30 Kamuhabwa AA, Roskams T, D'Hallewin MA, Baert L, Van Poppel H, de Witte PA. Whole bladder wall photodynamic therapy of transitional cell carcinoma rat bladder tumors using intravesically administered hypericin. *Int J Cancer.* 10 de noviembre de 2003;107 (3):460-467
- Liu CD, Kwan D, Saxton RE, McFadden DW. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *J Surg Res.* Septiembre de 2000; 93 (1) :137-143
- 35 Sanovic R1, Verwanger T, Hartl A, Krammer B. Low dose hypericin-PDT induces complete tumor regression in BALB/c mice bearing CT26 colon carcinoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* Diciembre de 2011;8(4):291-296
- 40 Vandepitte J, Van Cleynenbreugel B, Hettinger K, Van Poppel H, de Witte PA. Biodistribution of PVP-hypericin and hexaminolevulinate-induced PpIX in normal and orthotopic tumor-bearing rat urinary bladder. *Cancer Chemother Pharmacol.* Abril de 2011;67(4):775-781
- 45 Vandepitte J, Roelants M, Van Cleynenbreugel B, Hettinger K, Lerut E, Van Poppel H, de Witte PA. Biodistribution and photodynamic effects of polyvinylpyrrolidone-hypericin using multicellular spheroids composed of normal human urothelial and T24 transitional cell carcinoma cells. *J. Biomed Opt.* Enero-febrero de 2011;16(1):018001

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n para la preparaci3n de una soluci3n de instilaci3n, que puede usarse en la terapia fotodinámica, que contiene una hipericina unida a un agente complejante polimérico, en concreto, un polietilenglicol o una poli-N-vinilamida, en forma de una sal de metal alcalino, en particular en forma de la sal de potasio o de la sal de sodio, en la que la soluci3n de instilaci3n contiene hipericina en una concentraci3n de 9 a 40 µM, caracterizada por que la formulaci3n es un liofilizado estable, que se obtiene a partir de una soluci3n acuosa, que contiene la sal de metal alcalino de hipericina, el agente complejante y un sistema tamp3n, en particular un tamp3n fosfato o una soluci3n  
10 tamp3n de ácido cítrico.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada por que la poli-N-vinilamida es polivinilpirrolidona (PVP) de distinto grado de polimerizaci3n y reticulaci3n.
- 15 3. Procedimiento para la preparaci3n de una formulaci3n estable seg3n la reivindicaci3n 1 o 2, caracterizado por etapas de procedimiento sucesivas, posteriores,
  - a) se prepara una soluci3n acuosa de la sal de metal alcalino de hipericina,
  - 20 b) la soluci3n obtenida en la etapa a) se aña de al agente complejante, en particular polivinilpirrolidona y se disuelve,
  - c) a la soluci3n obtenida en la etapa b) se aña de un tamp3n fosfato o una soluci3n tamp3n de ácido cítrico, para obtener una concentraci3n de 0,0225 mg de hipericina/g de soluci3n y
  - d) se liofilizan partes de la soluci3n a granel obtenida despu3s de la etapa c).

