



(12) Oversettelse av
europeisk patentskrift

(11) NO/EP 3237010 B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/58 (2017.01)

A61K 47/60 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2019.12.09
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2019.08.14
(86)	Europeisk søknadsnr	16718843.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2016.04.07
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2017.11.01
(30)	Prioritet	2015.09.28, AT, 6302015
(84)	Utpekte stater	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Innehaver	Sanochemia Pharmazeutika AG, Boltzmanngasse 11, 1090 Wien, Østerrike
(72)	Oppfinner	ABRAHAMSBURG, Christina, Charasgasse 3/31, 1030 Wien, Østerrike FRANTSITS, Werner, Nothartgasse 19, 1130 Wien, Østerrike GERDES, Klaus, Antoniusstrasse 20, 41564 Kaarst Vorst, Tyskland GUNGL, József, Kosbor Utca 19, 9423 Ágfalva, Ungarn KÄLZ, Beate, Gartengasse 11, 7035 Steinbrunn, Østerrike MEDINGER, Gregor, POB 117610 Elizabeth Street, Sag Harbor, NY 11963, USA WELZIG, Stefan, Boerhaavegasse 8A/2/6.17, 1030 Wien, Østerrike
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	FORMULATION OF HYPERICIN FOR PHOTODYNAMIC THERAPY
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2015/131891 WO-A2-01/89576 WO-A1-2009/066294 ANDREAS KUBIN ET AL: "Fluorescence Diagnosis of Bladder Cancer with New Water Soluble Hypericin Bound to Polyvinylpyrrolidone: PVP-Hypericin", PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, Bd. 84, Nr. 6, 1. November 2008 (2008-11-01), Seiten 1560-1563, XP055285844, US ISSN: 0031-8655, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00384.x

JOACHIM VANDEPITTE ET AL: "Biodistribution of PVP-hypericin and hexaminolevulinate-induced PpIX in normal and orthotopic tumor-bearing rat urinary bladder", CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY., Bd. 67, Nr. 4, 1. April 2011 (2011-04-01), Seiten 775-781, XP055286423, BERLIN. ISSN: 0344-5704, DOI: 10.1007/s00280-010-1375-0 in der Anmeldung erwähnt

DANIELA FEINWEBER ET AL: "Applicability of new degradable hypericin-polymer-conjugates as photosensitizers: principal mode of action demonstrated by in vitro models", PHOTOCHEMICAL AND PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES, Bd. 13, Nr. 11, 1. Januar 2014 (2014-01-01), Seiten 1607-1620, XP055286452, GB ISSN: 1474-905X, DOI: 10.1039/C4PP00251B

HUYGENS A ET AL: "Stability of different formulations and ion pairs of hypericin", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, Bd. 59, Nr. 3, 1. April 2005 (2005-04-01), Seiten 461-468, XP027805033, ISSN: 0939-6411 [gefunden am 2005-04-01]

Vedlagt foreligger en oversettelse av patentkravene til norsk. I hht patentloven § 66i gjelder patentvernet i Norge bare så langt som det er samsvar mellom oversettelsen og teksten på behandlingsspråket. I saker om gyldighet av patentet skal kun teksten på behandlingsspråket legges til grunn for avgjørelsen. Patentdokument utgitt av EPO er tilgjengelig via Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>), eller via søkemotoren på vår hjemmeside her: <https://search.patentstyret.no/>

Oppfinnelsen vedrører en formulering for fremstilling av en instillasjonsløsning for bruk ved fotodynamisk terapi, inneholdende hypericin i form av et alkalimetallsalt, spesielt i form av kaliumsalt eller natriumsalt, bundet til en polymer kompleksdanner, nemlig en polyetylenglykol eller et poly-N-vinylamid, i samsvar med kravene.

Fotodynamisk terapi (PDT) er en metode som er egnet til behandling av tumorer og premaligne endringer i huden og mukosa til forskjellige hulorganer (Juarranz m.fl., 2008; Agostinis m.fl., 2011).

PDT-metoden baserer seg på vekselvirkning mellom tre komponenter:
fotosensibilisator, lys i synlig område og oksygen.

Etter systemisk eller topisk påføring av en fotosensibilisator følger en akkumulering av fotosensibilisatoren i det maligne vevet. Ved hjelp av lys med passende bølgelengde kan fotosensibilisatoren stimuleres. I stimulert tilstand blir energi overført til en reaksjonspartner, f.eks. molekylært oksygen. Med det genereres reaktive oksygenmolekyler, som igjen skader cellulære strukturer i tumorvevet, hvorigjennom cellulære prosesser som apoptose og nekrose innledes (Agostinis, m.fl., 2011; Allison og Sibata, 2010).

En ideell fotosensibilisator for PDT fremviser selektiv akkumulering i tumorceller, ingen eller minimal systemisk toksisitet og er fotokjemisk virksom.

Hypericin 1,3,4,6,8,13-heksahydrokso-10,11-dimetylphenantro (1,10,9,8-opqra)perylene-7,14-dion er allerede beskrevet som en mulig fotosensibilisator i litteraturen (Agostinis m.fl., 2002).

I *in vitro*-undersøkelser er virksomheten av hypericin i PDT vist i en rekke av cellelinjer (Karioti og Bilia, 2010).

Videre bekrefter *in vivo* dyrestudier hypericins potensiale for bruk i PDT (Bhuvaneswari m.fl., 2010; Chen m.fl., 2003; Liu m.fl., 2000; Sanovic m.fl., 2011).

Hypericin er hydrofobt og uløselig i vann. Av denne grunn ble tidligere hypericin bragt i løsning ved hjelp av det organiske løsemiddelet dimetylsulfoksid (DMSO) eller en vannløselig polymer, polyetylenglykol (PEG).

Dyreforsøk i en rottemodell viste oppmuntrende resultater med hensyn til PDT ved blærekarsinom. Der ble hypericin bragt inn i tumorcellene ved hjelp av polyetylenglykol. Med en hypericindose på 30 µM og en bestråling med lys (595 nm)

med en intensitet på 25 opp til 50 mW/cm² kunne inntil 98% av tumorcellene drepes (Kamu habwa m.fl. 2003).

For klinisk bruk kreves imidlertid en vannløselig formulering av hypericin som besitter
5 tumorselektivitet og kan stimuleres med lys i det synlige området.

Dokumentet WO 01/89576 A2 beskriver hvordan løseligheten til hypericin kan økes gjennom hjelpestoffet polyvinylpyrrolidon (povidon, PVP).

10 Bruk av PVP-hypericin i PDT er også beskrevet i WO 2014/079972 A1. WO 2014/079972 A1 befatter seg spesielt med en anordning som kan anvendes ved PDT av hulorganer, som menneskeblæren.

WO 2015/131891 A1 vedrører bruk av hypericin i form av natriumsalt både for
15 fotodynamisk diagnose og for fotodynamisk terapi.

Produktet som vises i WO 2015/131891 A1 foreligger i form av en vannfri løsning i alkohol (nemlig etanol) og inneholder PRG som løsningsformidler. Løsningen skal for sin bruk som fotosensibilisator fortynnes i en bærerløsning (glukoseløsning).

20

Den således frembragte infusjonsløsningen skal inneholde 0,01 til 0,05 mg natrium-hypericinat og skal administreres over et tidsrom på 90 minutter

PVP-hypericin fremviser en selektiv akkumulering i tumorceller *in vitro* og *in vivo*
25 (Kubin m.fl., 2008; Vandepitte m.fl., 2011).

Oppfinnelsen har som mål å tilveiebringe en steril og stabil formulering av hypericin, som kan anvendes for klinisk bruk i PDT.

30 Dette målet oppnås med en formulering av hypericin som utviser trekkene ifølge patentkrav 1.

Foretrukne og fordelaktige utførelsesformer av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen er gjenstand for underkravene.

35

Overraskende nok har det vist seg at formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen kun er stabil og dermed anvendelig under kliniske betingelser når hypericin foreligger som salt.

- 5 En evaluering av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen i dyreforsøk har, overraskende nok, vist at ved en dose på 30 μM hypericin i en stabil formulering med PVP i samsvar med eksempel 1 en påkrevet lysintensitet på 5 eller 25 mW/cm^2 ved en bølgelengde på 595 nm og 120 minutters virketid i blæren (instillasjonstid) er tilstrekkelig til å drepe 98% av tumorcellene. Det samme resultat med 98% drepte
- 10 tumorceller oppnås også ved samme lysintensitet og 40 μM hypericin med en virketid på 15 eller 30 minutter og behandling med lys med en bølgelengde på 610 nm. Likeledes oppnår en instillasjonstid på 1 time, ved 20 μM hypericin, samme lysintensitet og 570 nm lysfrekvens en dødsrate på 97%, og en instillasjonstid på 120 minutter, ved 9 μM hypericin, samme lysintensitet og behandling ved 600 nm en
- 15 dødsrate på 95%. Hvormed, ved lysintensiteter på 5 til 25 mW/cm^2 med lysfrekvenser på 570 til 610 nm, hypericinkonsentrasjoner fra 9 til 40 μM og virketider mellom 15 og 120 minutter, en dødsrate på 95 til 98% av tumorcellene (anvendelseseksemplene 1, 2, 3 og 4) oppnås.
- 20 Effektiviteten til en PDT-terapi avhenger i vesentlig grad av den totale mengden lys. Samtidig øker sannsynligheten for lokale bivirkninger med økende lysintensitet. Ved hjelp av formuleringen ifølge oppfinnelsen oppnås en forbedret akkumulering i malignt vev, hvorigjennom en betydelig redusert lysintensitet på allerede 5 til maksimalt 25 mW/cm^2 er tilstrekkelig til å drepe tumorcellene.
- 25 Den selektive konsentrasjonen av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen og den overraskende lave lysintensiteten som var nødvendig for en PDT-terapi i dyremodellen ved bruk av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen, tillater bruk ved terapi av lesjoner i forskjellige kroppslige hulrom som kan nås med den
- 30 nødvendige lysdose.
- Nedenfor vil eksempler på formuleringen av hypericin (hypericin-PVP kompleks) ifølge oppfinnelsen bli gjengitt.
- 35 Generell prosedyre for fremstilling av en formulering med virkestoffet natrium-hypericinat:

Målet er fremstilling av en formulering inneholdende hypericin for bruk som fotosensibilisator innen fotodynamisk terapi.

Formuleringen ifølge oppfinnelsen blir fremstilt fra et salt av hypericin, spesielt fra
5 natrium-hypericinat.

For å definere hypericin-innholdet i utgangsmaterialet blir i tillegg til innholdsbestemmelsen, framfor alt vanninnhold og, i tilfellet med natrium-hypericinat, natriumandelen spesifisert. De kjemisk-fysikalske egenskapene kan ha en innvirkning
10 på formuleringen av det farmasøytiske medikamentet.

For klinisk bruk er stabilitet av formuleringen ifølge oppfinnelsen nødvendig. Stabiliteten sikres gjennom sammensetningen til det ferdige produktet, og angår samtidig også fremstillingsmetoden. Gjennom buffersystemene som anvendes kan en
15 tilstrekkelig stabilitet av bulkløsningen oppnås også under fremstilling frem til lyofilisering av det ferdige produktet.

Som buffersystemer kan forskjellige tilsatzstoffer anvendes, som fortrinnsvis både for bulkløsningen og for den rekonstituerte løsningen oppnår en fysiologisk kompatibel
20 pH-verdi og et osmotisk trykk på 290 mOsmol/kg etter rekonstitusjonen med 50 ml vann for injeksjon. Fosfat- eller sitrat-buffersystemer kan i første rekke komme til anvendelse.

Etter at bulkløsningen med de ovennevnte bestanddeler er ferdig, blir den
25 motsvarende mengden av bulkløsningen fylt over på injeksjonsflasker og lyofilisert.

Eksempel 1:

Fra natrium-hypericinatet fremstilles en løsning med et målnettoinnhold på 90,0 mg
30 hypericin.

5,0 g av hypericinløsningen tilsettes til 1875 mg PVP k25 og løses fullstendig opp.

Denne løsningen blir kvantitativt utfylt til 250,0 g med en fosfatbufferløsning. Den
35 endelige konsentrasjonen til denne løsningen er 0,0225 mg hypericin/g løsning.

For lyofiliseringen blir en definert mengde av den således oppnådde bulkløsningen fylt over på injeksjonsflasker og det ferdige lyofilisatet fremstilt med et motsvarende lyo-program.

5 Eksempel 2:

Det blir fremarbeidet som angitt i eksempel 1, bortsett fra at PVP k17 blir anvendt for kompleksering av natrium-hypericinatet istedenfor PVP k25.

10 Eksempel 3:

Det blir fremarbeidet som angitt i eksempel 1, bortsett fra at PVP k30 blir anvendt for kompleksering av natrium-hypericinatet istedenfor PVP k25.

15 Eksempel 4:

Det blir fremarbeidet som angitt i eksemplene 1, 2 eller 3, bortsett fra at en sitronsyre-bufferløsning blir anvendt istedenfor fosfatbufferløsningen.

20 Bulkløsningene fremstilt som beskrevet i eksemplene 1 til 4 kan produseres med forskjellige hypericin-innhold.

Virksomheten til formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen ble kontrollert i et preklinisk studie med bruk av formuleringen som eksempel 1.

25

Anvendelseseksempler:

For dette formål ble formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen for PDT undersøkt i en preklinisk, ortotop modell av blæretumor hos rotter. I alle eksemplene ble

30 tumorene behandlet med formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen i forskjellige konsentrasjoner på 9 til 40 μM , ved forskjellige lysintensiteter på 5 eller 25 mW/cm^2 , forskjellige lysfrekvenser på 570 til 610 nm og forskjellige instillasjonstider.

Eksempel 1. Etter 2 timers instillasjon med 30 μM av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen og forskjellige lysintensiteter (5 eller 25 mW/cm^2) med lys med en

35 bølgelengde på 595 nm kunne opptil 98% av tumorcellene drepes.

Eksempel 2. Etter 1 times instillasjon med 20 μM av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen og forskjellige lysintensiteter (5 eller 25 mW/cm^2) med lys med en bølgelengde på 570 nm kunne opptil 97% av tumorcellene drepes.

- 5 Eksempel 3. Etter 15 eller 30 minutters instillasjon med 40 μM av formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen og forskjellige lysintensiteter (5 eller 25 mW/cm^2) med lys med en bølgelengde på 610 nm kunne opptil 98% av tumorcellene drepes.

- Eksempel 4. Etter 2 timers instillasjon med 9 μM av formuleringen av hypericin ifølge
10 oppfinnelsen og forskjellige lysintensiteter (5-25 mW/cm^2) med lys med en bølgelengde på 600 nm kunne opptil 95% av tumorcellene drepes.

- Resultatene av undersøkelsene på rottemodellen er gjengitt i fig. 1 og 2. I diagrammene står "ns" for "ikke signifikant" og "*" står for "signifikant." Diagrammene
15 i fig. 1 og 2 viser overlevelsen av tumorceller etter behandling med formuleringen av hypericin ifølge oppfinnelsen og lys. 24 timer etter behandlingen var blærevevet dissosiert og de overlevende cellene ble bestemt med bruk av et klonogent assay i sammenlikning med kontrollene (uten PVP-hypericin og lys).

- 20 Den relative overlevelsen til cellene under PDT-betingelser (PVP-hypericin i samsvar med eksempel 1 og behandling med lys) er (representert som middelerdi + SD): 7,4 (+/- 6,4)% ved bruk av 5 mW/cm^2 og 2,4 (+/-4,0)% ved 25 mW/cm^2 og en lysbehandlingsvarighet på 60 minutter. Dette er vist i to diagrammer (fig. 1 og 2).

- 25 Referanser:

- 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. 2011 Juli-
30 August: 61(4): 250-281

Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. Int J Biochem Cell Biol. 2002 Mars; 34(3): 221-241

- 35 Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2010 Juni: 7(2): 61-75

- 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.* 2010 Jan-Feb.; 15(1): 011114. Erratum i: *J Biomed Opt.* 2010
- 5 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.* 2003 Sept.; 78(3): 278-282.
- 10 Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodriguez F, Cuevas J, Gonzalez S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* 2008 Mars; 10(3): 148-154 Mar. 30, 2017
- 15 Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2010 Feb. 4; 11(2): 562-594
- Kubin A, Meissner P, Wierrani F, Burner U, Bodenteich A, Pytel A, Schmeller N.
- 20 Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-Hypericin. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(6): 1560-1563
- Kamuhabwa AA, Roskams T, DHallewin MA, Baert L, Van Poppel H, de Witte PA. Whole bladder wall photodynamic therapy of transitional cell carcinoma rat bladder tumors.
- 25 using intravesically administered hypericin. *Int J Cancer.* 2003 Nov. 10; 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.* 2000 Sept.;
- 30 93(1): 137-143
- Sanovic RI, 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.* 2011 Des.; 8(4): 291-296.
- 35 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.* 2011 Apr.; 67(4): 775-781

5 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.* 2011 Jan-Feb.; 16(1): 018001

P a t e n t k r a v

1. Formulering for fremstilling av en instillasjonsløsning som er anvendelig ved fotodynamisk terapi, inneholdende hypericin i form av et alkalimetallsalt, spesielt i
5 form av kaliumsalt eller natriumsalt, bundet til en polymer kompleksdanner, nemlig en polyetylenglykol eller et poly-N-vinylamid, hvor instillasjonsløsningen inneholder hypericin i en konsentrasjon på 9 til 40 μM , karakterisert ved at formuleringen er et stabilt lyofilisitat som er utvunnet fra en vandig løsning, inneholdende alkalimetallsaltet av hypericin, kompleksdanneren og et buffersystem, spesielt et
10 fosfatbuffer eller en sitronsyre-bufferløsning.
2. Formulering ifølge krav 1, karakterisert ved at poly-N-vinylamidet er polyvinylpyrrolidon (PVP) med forskjellig polymeriserings- og tverrbindingsgrad.
- 15 3. Fremgangsmåte for fremstilling av en stabil formulering ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved følgende konsekutive fremgangsmåte-trinn,
 - a) en vandig løsning av alkalimetallsaltet av hypericin fremstilles,
 - b) løsningen frembragt i trinn a) tilsettes til kompleksdanneren, spesielt polyvinylpyrrolidon, og oppløses,
 - 20 c) et fosfatbuffer eller en sitronsyre-bufferløsning tilsettes til løsningen frembragt i trinn b), for å oppnå en konsentrasjon på 0,0225 mg hypericin/g løsning, og
 - d) andeler av bulkløsningen oppnådd etter trinn c) lyofiliseres.

10

1/1

