



(19)

REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 408 835 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 896/2000 (51) Int. Cl.⁷: **A61K 31/122**
(22) Anmeldetag: 23.05.2000 A61K 31/79, A61P 35/00
(42) Beginn der Patentdauer: 15.08.2001
(45) Ausgabetag: 25.03.2002

(56) Entgegenhaltungen:
EP 0702957B1 DE 19756677A1 US 5952311A
WO 9414956A1

(73) Patentinhaber:
KUBIN ANDREAS DIPL.ING. DR.
A-1120 WIEN (AT).
LÖW HANS GÜNTHER MAG.
A-1090 WIEN (AT).

(72) Erfinder:
KUBIN ANDREAS DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
LÖW HANS GÜNTHER MAG.
WIEN (AT).

(54) PRÄPARATION VON HYPERICIN GEBUNDEN AN POLYVINYLPIRROLIDON (PVP)
VERSCHIEDENEN POLYMERISATIONS- UND VERNETZUNGSGRADES

(57) Hypericin, ein Naturstoff der in verschiedenen Pflanzen, Pilzen aber auch in Protozoen und sogar Wanzen vorkommt. Die lipiden und wasserunlöslichen Eigenschaften von Hypericin erschweren die Applikation im menschlichen Körper.

Durch die Bindung der Reinsubstanz Hypericin an Polyvinylpyrrolidon (PVP) kann ein gut wasserlöslicher Komplex dargestellt werden, der für therapeutische und diagnostische Anwendungen geeignet ist.

Die wasserlösliche Wirkstoffkombination kann beispielsweise zur Durchführung der photophysikalischen Diagnostik (PPD) eingesetzt werden.

Nach selektiver Bindung des Komplexes an Läsionen humanen Gewebes wird mit elektromagnetischer Strahlung (Licht) oder Ultraschall der Farbstoff angeregt und der physikalische bzw. chemische Response zur Diagnostik genützt.

Die Wirkstoffkombination ist folgendermassen zusammengesetzt: die Reinsubstanz Hypericin aus Pflanzen isoliert (oder synthetisches Hypericin etwa aus Emodin synthetisiert) gebunden oder komplexiert an Polyvinylpyr-

rolidon (PVP) verschiedenen Polymerisations- und Vernetzungsgrades. Dadurch kann der ansonsten wasserunlösliche Farbstoff Hypericin zu verschiedenen medizinischen Zwecken in wässriger Form verabreicht werden.

AT 408 835 B

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine wässrige Lösung des Pflanzeninhaltsstoffes Hypericin durch Bindung an Polyvinylpyrrolidon (PVP) verschiedenen Polymerisations- und Vernetzungsgrades zur Verwendung für therapeutische oder diagnostische Anwendungen, wie zum Beispiel als Photosensitizer in der photophysikalischen Diagnostik.

Besonders für die systemische Applikation grösserer Mengen (bis 5 mg / kg KG) fehlt bis heute die entsprechende wässrige Verabreichungsform.

Hypericin kommt in der Natur häufig vor und ist ein Pflanzeninhaltsstoff, der nicht nur in *Hypericum perforatum* (Johanniskraut) enthalten ist, sondern auch in vielen anderen *Hypericum* Species (*Hypericum hirsutum*, *H. montanum*, etc.) sowie in verschiedenen anderen Pflanzen (zB. in Buchweizen mit Seitenketten als Fagopyrin). Weiters ist dieses Pigment in Protozoen (*Blepharisma*, *Stentor coeruleus*) zu finden, in Halbflügler (Wanzen, *Hemiptera*) und als Vorstufe im Blätterpilz *Dermocybe austroveneta*. Die Flechtenart *Nephroma laevigatum* enthält ebenfalls Hypericinderivate.

Über Emodin aus *Cortex fangulae* (Faulbaumrinde) ergibt sich ein einfacher semisynthetischer Weg zu Hypericin.

In den letzten 25 Jahren entwickelte sich die selektive Photosensibilisierung von malignen Geweben, oder Gewebeerkrankungen anderer Art zu einem eigenständigen medizinischen Gebiet [1, 2, 6]. Darin finden insbesondere zwei Methoden klinische Anwendung [3]:

- Ausnutzung physikalischer Effekte (zB. lichtinduzierte Fluoreszenz) zur Diagnose (Photophysikalische Diagnose (PPD))
- Ausnutzung der lichtinduzierten photodynamischen Prozesse als Therapieform (Photodynamische Therapie (PDT))

Die Entwicklung der PDT und PPD zeigt heute einen progressiven Verlauf. Seit 1992 hat sich der monatliche Output an wissenschaftlichen Publikationen nahezu verdreifacht (Current Contents: Life Sciences). Dieses Faktum ist einerseits darauf zurückzuführen, daß sich die PDT als effektive Tumorthherapie erwiesen hat und andererseits auch für nichtmaligne Erkrankungen wie zB. Gefäß-, Viruserkrankungen Anwendung findet.

PDT und PPD bedienen sich Mechanismen, die der Wechselwirkung zwischen Licht und Gewebe zugrundeliegen. Vermittler dieser Wechselwirkungen sind ein geeigneter Photosensitizer und Sauerstoff. So ergeben sich vier Einflußbereiche - **Licht, Sensitizer, Sauerstoff und Gewebematrix** (physikalisch-optische und chemische Gewebeeigenschaften [4, 5]), deren Zusammenwirken die zielführende Anwendung von PDT und PPD ermöglicht. Photosensitizern, die geringe systemische Toxizität aufweisen und sich im Idealfall im malignen Tumor anreichern, werden verabreicht. Darauf folgende Belichtung mit sichtbarem Licht induziert photochemische Reaktionen vor allem vom Typ II, aber auch Typ I, die weitgehend eine Zerstörung von Biomembranen, Biomolekülen und subzellulären Organellen hervorrufen [3].

Diese Reaktionen werden therapeutisch in der photodynamischen Tumorthherapie genutzt, in dem cytotoxische Reaktanden der aktivierten Photosensitizer Tumorzellen zerstören. Weiters können bei malignen Läsionen angereicherte Sensitizer über ihr Fluoreszenzlicht für diagnostischen Methoden herangezogen werden.

Die beiden Dokumente EP 0 702 957 B1 und DE 197 56 677 A1 beschreiben Arzneistoffextrakte aus verschiedenen Pflanzen, die nach Zugabe von PVP bis zur Trockene eingeengt werden. Es entsteht dabei eine heterogene Mischung aus einigen hundert bis tausend verschiedene Pflanzeninhaltsstoffen und PVP, die schließlich für **peroralen** Einnahme Anwendung finden soll.

In der vorliegenden Anmeldung soll jedoch eine definierte Reinsubstanz (Hypericin, synthetisiert oder als Naturstoff isoliert und hochgereinigt) eingesetzt werden und eine echte Komplexbindung mit PVP hergestellt werden, und keine Mischung.

Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit einer neuen Verabreichungsform von Sensitizern (Hypericin komplexiert mit PVP = Farbstoffkomplex) zur Diagnostik oder Behandlung von malignen aber auch nichtmalignen Erkrankungen.

Erfindungsgemäß ist ein solches Heilmittel folgendermassen zu einem Farbstoffkomplex zusammengesetzt:

- **Hypericin (aus *Hypericum perforatum* isoliert, oder synthetisiert zB. aus Emodin):**
- **in wässriger Lösung (etwa physiolog. Kochsalzlösung) und**
- **Polyvinylpyrrolidon (PVP)**

Durch PVP ist es möglich den wasserunlöslichen Sensitizer Hypericin in wässriger Lösung zu verabreichen. Dadurch ist die Verwendung von stark gewebeirritierenden organischen Lösungsmitteln vermeidbar und eine physiologisch günstige Applikationsform für verschiedenste diagnostische und therapeutische Anwendungen darstellbar..

5 Je nach Anwendungsbereich liegen etwa folgende Konzentrationen der Komplexverbindung vor:

| | |
|-----------|---------------------------------|
| Hypericin | von 1 μ Mol/l bis 0,1 Mol/l |
| PVP | von 1 μ Mol/l bis 0,1 Mol/l |

10 Das molare Verhältnis von PVP zu Hypericin ist abhängig vom Polymerisations- und Vernetzungsgrades des PVP. Je kleiner die molare Masse von PVP, desto höher muss dessen Konzentration im Verhältnis zu Hypericin vorliegen, um den Sensitizer vollständig zu lösen.

Bei topischer Verabreichung ist auf Grund der geringeren Diffusionsgeschwindigkeit die Konzentration von Hypericin noch höher anzusetzen.

15 Die erste Ausgestaltung dieses Verfahrens besteht darin, daß aktivierbare Komplexe bzw. Verbindungen hergestellt werden, die sich aus Hypericin zusammensetzt, das komplexiert oder kovalent gebunden ist an Polyvinylpyrrolidone verschiedenen Polymerisationsgrades. Figur 1 zeigt die zeitabhängige Löslichkeit von Hypericin nach Komplexierung durch PVP. Ohne PVP zeigt sich keine Absorption im relevanten Spektralbereich. Erst nach Zugabe von PVP entsteht das typische Absorptionsspektrum von Hypericin (max 600 nm) durch Lösung dieses Farbstoffes im wässrigen Medium.

20 Hypericin bildet in wässriger Umgebung sofort unlösliche Aggregate, die ausfallen und vor allem keine Fluoreszenz mehr zeigen (siehe Diwu Z. et al. [14]). Die vorliegende Lösung von Hypericin-PVP zeigt das typische Absorptionsspektrum und emittiert Fluoreszenzlicht bei etwa 600 nm Wellenlänge. Dies zeigt, dass Hypericin in gelöster Form vorliegt (Hypericin in aggregierter oder mikrodispersiver Form emittiert nach Anregung kein Fluoreszenzlicht).

25 **Es hat sich herausgestellt, daß durch die Bindung von Hypericin an PVP eine wasserlösliche Form des Farbstoffes zur Verfügung steht, die leicht applizierbar ist und eine bessere Verteilung der Sensitizer und verbesserte Anreicherung und Selektivität in pathologischem Gewebe erreicht werden kann.**

30 Bevorzugt werden als Träger Polyvinylpyrrolidone (PVP) mit einem Polymerisationsgrad von niedrigeren Molmassen (10.000 - 90.000 g/Mol), da diese durch Zellmembranen diffundieren können und ausscheidbar sind. PVP komplexieren Farbstoffe und es stellte sich in Experimenten heraus, daß auch lipophile Farbstoffe wie Hypericin so in wässrige Lösung gebracht werden können. Läsionen in der Blase (durch Spülung) konnten so angefärbt und über Fluoreszenzlicht nach Anregung erfolgreich detektiert werden. Nach Bedarf kann der Polymerisationsgrad von PVP auch höher festgelegt werden.

35 Verwendung finden diese PVPs als Blutserumersatz, künstliche Tränenflüssigkeit, zur Entgiftung und als Tablettenbinde- und Überzugsmittel (orale Anwendung). Als Blutserumersatz werden heute jedoch überwiegend Dextrane, Gelatine-Stärke-Derivate und Serumproteinlösungen verwendet, die ebenfalls Farbstoffe komplexieren können und in dem hier Beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommen können. Durch die Verwendung dieser unterschiedlichen Lösungsvermittler, wird auch die Gewebeselektivität und -affinität verändert und kann somit zu einer selektiveren Anreicherung im entsprechenden Gewebe begünstigen.

40 Die Hypericinkomplexe werden bei systemischer Anwendung etwa 0,1 bis 36 Stunden vor der Behandlung verabreicht. Dabei erwiesen sich Dosierungen der Sensitizer von 0,1 mg bis 5,0 mg pro kg Körpergewicht als günstig. Die Anreicherung im Zielgewebe wird nach herkömmlichen Methoden (Fluoreszenzspektroskopie) bestimmt.

45 Geeignet zur Behandlung sind vor allem Tumore und Läsionen auf und unter der Haut, wie auch in Kavitäten und Lumina oder tiefer liegenden Gewebeteilen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es die zur Anregung erforderliche Lichtenergie (elektromagnetische Strahlung) mittels Lichtwellenleiter in das Zielgewebe zu bringen. In kavitären Regionen (Hohlräumen wie auch die Blase) kann durch Spülung des Gewebes auch mit höher molekularem PVP die Diffusion des Farbstoffkomplexes in die Läsionen ermöglicht werden. Hierbei wird auch die Wirkung des Ultraschalls auf die biologischen Transportvorgänge hervorgehoben.

55 Der Transport der Farbstoffkomplexe soll über die Gefäße oder durch Diffusion durch Haut

und/oder Gewebe zu den Läsionen erfolgen, wo eine selektive Anreicherung der Komplexe aufgrund unterschiedlicher Morphologie und Physiologie beispielsweise von Tumoren stattfinden soll. Nichtphysiologische (pathologische) Vorgänge im Organismus umfassen sowohl gutartige wie auch bösartige Erkrankungen. All diese Erkrankungen zeichnen sich durch erhöhten Stoffwechsel aus. Auf Grund auch dieser Tatsache lagert sich der Farbstoff komplex bevorzugt in diesen Körper-

5
 10
 Die genannten Verbindungen reichern sich also sowohl in malignen als auch in benignen Läsionen an, nicht aber in gesundem Gewebe. Dadurch ist die Detektion von Läsionen über emittiertes Fluoreszenzlicht möglich (Diagnostik). Die selektive Sensibilisierung ermöglicht weiters die therapeutische Behandlung (photodynamische Therapie).

Auch eine Kombination Ultraschall-Licht gewährleistet ein breiteres Anregungsspektrum und eröffnet eine selektivere Behandlungsform von malignen Gewebearealen und anderen Läsionen, die sich im Schnittpunkt der beiden physikalischen Energieeinträge befinden - wodurch umliegendes Gewebe von der Behandlung mehr oder weniger unbeeinträchtigt bleibt.

15
 Wenn bei der ersten erfindungsgemäßen Behandlung nicht die vollständige Entfernung malignen oder pathologischen Gewebes erreicht werden kann, ist eine Wiederholung der Therapie möglich. Es wird gegebenenfalls sodann mehrmals, im Abstand von einigen Wochen nachbehandelt.

LITERATUR

- 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
- [1] DOUGHERTY T.J., MARCUS S.L.,
 Photodynamic Therapy.
 Eur J Cancer, 28 (1992) 1734-1742
 - [2] HILLEGERSBERG R., KORT W.J., WILSON J.H.P.,
 Current Status of Photodynamic Therapy in Oncology.
 Drugs, 48 (1994) 510-527
 - [3] SROKA R.,
 In-vivo Untersuchung Modifizierter Photosensibilisatoren und Entwicklung von Lichtapplikationssystemen für die PDT.
 Akademischer Verlag München, 1992
 - [4] BHATTA N., ISAACSON K., BHATTA K.M., ANDERSON R.R., SCHIFF I.,
 Comparative study of different laser systems
 Fertility and Sterility, 1994, 61, 4; 581-591
 - [5] BOCK G., HARNETT S.,
 Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use.
 Ciba Foundation Symposium 146
 John Wiley & Sons, 1989
 - [6] HENDERSON B.W., DOUGHERTY T.J.
 How does photodynamic therapy work
 Photochem. Photobiol. 55 (1992) 145-157
 - [7] KUBIN A., ALTH G., JINDRA R., JESSNER G., EBERMANN R.
 Wavelength dependent photoresponse of biological and aqueous model systems using the photodynamic plant pigment hypericin.
 J. Photochem. Photobiol. B: Biology 36 (1996) 103-108
 - [8] THOMAS C., PARDINI R. S.
 Oxygen Dependence of Hypericin-induced Phototoxicity to EMT6 Mouse
 Mammary Carcinoma Cells
 Photochemistry Photobiology, Vol. 55, No. 6, pp. 831-837, 1992
 - [9] KNOX J.P., DODGE A.D.
 Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin
 Plant, Cell and Environment 8 (1985), 19-25
 - [10] DURAN N., SONG P.S.,
 Hypericin and its Photodynamic action,
 Photochemistry and Photobiology, Yearly Review, Vol. 43, No. 6, pp. 677-680, 1986
 - [11] VANDENBOGAERDE AL., CUVEELE JF., PROOT P., HIMPENS BE., MERLEVEDE WJ.,

- deWITTE PA.
Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin.
J Photochem. Photobiol. B: Biology 38 (1997) 136-142
- 5 [12] KNOX JP., DODGE AD.
Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin
Plant Cell and Environment 8 (1985) 19-25
- [13] ANDREONI A., COLASANTI A., COLASANTI P., MASTROCINQUE M., RICCIO P.,
ROBERTI G.
10 Laser photosensitization of cells by hypericin
Photochem. Photobiol. 59 (1994) 529-533
- [14] DIWU Z.
Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins
Photochem. Photobiol. 61 (1995) 529-539
- 15 Weiterführende Literatur
- [15] HESSE M., MEIER H., ZEEH B.,
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie,
G. Thieme Vlg. Stuttgart New York 1984, pp. 1-32.
- 20 [16] ELSTNER E.F.,
Der Sauerstoff
Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich 1990, Band I
- [17] YOUNG S.W., QING F., et al.
25 Gadolinium(III)texaphyrin: A tumor selective radiation sensitizer that is detectable by
MRI.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996) pp. 6610-6615
- [18] NITZAN Y, GUTTERMAN M, MALIK Z, EHRENBERG B.
Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins.
30 Photochem. Photobiol. 55, 1992, 89-96
- [19] HILL J.S., KAHL S.B., STYLLI S.S., NAKAMURA Y., KOO M.S., KAYE A.H.,
Selective tumor kill of cerebral glioma by photodynamic therapy using a boronated por-
phyrin photosensitizer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 12126-12130
- 35 [20] SZEIMIES P.M., CALZAVARA PINTON PG., KARRER S., ORTEL B.,
LANDTHALER M.
Topical photodynamic therapy in dermatology.
J. Photochem. Photobiol. B: Biology 36 (1996) 213-219
- [21] PENG Q., WARLOE T., et al.
40 Distribution of 5-Aminolevulinic acid-induced Porphyrins in nodulocarcinoma
carcinoma.
Photochem. Photobiol. 62 (1995) 906-913
- [22] BRAICHOTTE D., SAVARY JF., GLANZMANN T., WESTERMANN P., FOLLI S.,
WAGNIERES G., MONNIER P., VAN DEN BERGH H.,
45 Clinical pharmacokinetic studies of tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorin in squamous cell
carcinoma by fluorescence spectroscopy at 2 wavelengths.
Int. J. Cancer 63 (1995) 198-204
- [23] SUSLICK KS.
50 Die chemische Wirkung von Ultraschall
Spektrum der Wissenschaften, 4 (1989) 60-66

PATENTANSPRÜCHE:

- 55 1. Wirkstoffkombination zur Diagnostik und Behandlung von Tumoren dadurch gekennzeich-
net, dass die Reinsubstanz Hypericin an Polyvinylpyrrolidon (PVP) gebunden beziehungs-

weise komplexiert ist.

2. Wirkstoffkombination nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung beziehungsweise Komplexierung von Hypericin an Polyvinylpyrrolidon (PVP) verschiedenen Polymerisations- und Vernetzungsgrades vorliegt.
- 5 3. Verfahren zur Herstellung einer Wirkstoffkombination zur Behandlung von Tumoren und krankem Gewebe, beziehungsweise zur photophysikalischen und photodynamischen Diagnostik, beziehungsweise zur Krebsfrüherkennung, dadurch gekennzeichnet, dass Hypericin an PVP gebunden beziehungsweise komplexiert wird.
- 10 4. Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, dass die Komplexierung in wässriger gegebenenfalls abgepufferter Lösung vorgenommen wird.
- 15 5. Verfahren nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffkombination in an sich bekannter Weise zur intravenösen, intrakavitären, oralen, intraperitonealen und oberflächlichen Verabreichung, in hydrophilen oder hydrophoben Trägerstoffen vorzugsweise in Form einer Lösung, Creme eines Gels, Emulsionen oder Pflasters bereitgestellt wird.
- 20 6. Verfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffkombination zur inhalativen Verabreichung in Form eines Aerosoles bereitgestellt wird.
7. Verwendung der Wirkstoffkombination nach Anspruch 1 und 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren und krankem Gewebe.
8. Verwendung der Wirkstoffkombination nach Anspruch 1 und 2 zur Herstellung eines Diagnostiziermittels zur photophysikalischen beziehungsweise photodynamischen Diagnostik und zur Krebsfrüherkennung.

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN

25

30

35

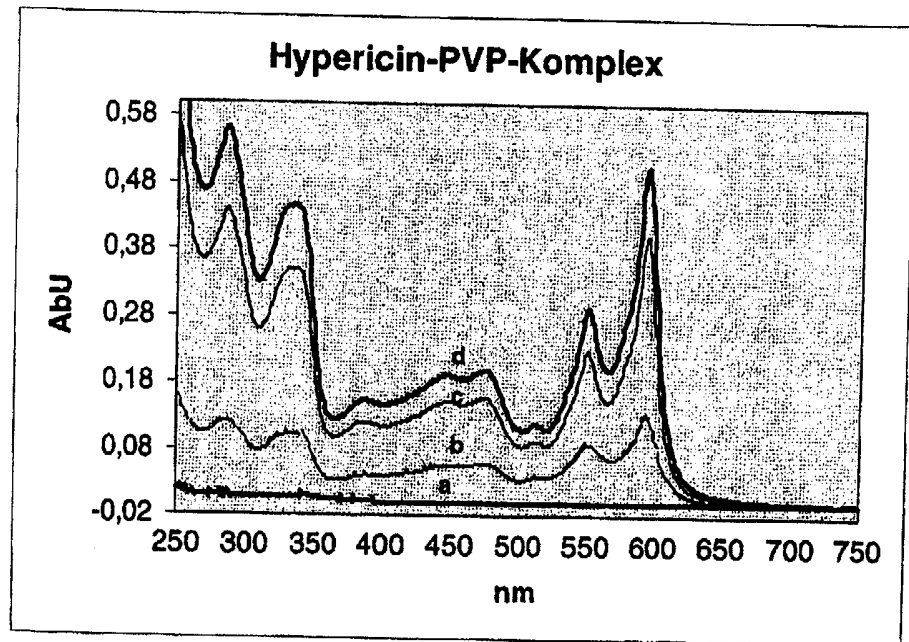
40

45

50

55

FIGUR 1:



Figur 1: Photometrischer Nachweis der Löslichkeit von Hypericin in Wasser nach Komplexierung durch PVP. a) Hypericin ohne PVP. b) Hypericin + PVP nach 30 Minuten. c) Hypericin + PVP nach 60 Minuten. d) Hypericin + PVP nach 180 Minuten.