



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 30 241 T2** 2006.01.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 058 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 30 241.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/03004**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 906 475.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/035685**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.01.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/70** (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

41221 P 14.02.1997 US

(73) Patentinhaber:

G.D. Searle LLC, Chicago, Ill., US

(74) Vertreter:

Hansmann & Vogeser, 81369 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**JACOB, S., Gary, Chicago, US; BLOCK, M.,
Timothy, Jenkintown, US; DWEK, Raymond A.,
North Hinksey, Oxford OX2 9AU, GB**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON N-SUBSTITUIERTEN 1,5-DIDEOXY-1,5-IMINO-D-GLUCITOL VERBINDUN-
GEN IN DER KOMBINATIONSTHERAPIE DER VOM HEPATITISVIRUS VERURSACHTEN INFEKTIONEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Behandlung von Hepatitisvirus-Infektionen, speziell Hepatitis B-Infektionen bei Säugern, speziell beim Menschen. Die Zusammensetzungen umfassen N-substituierte 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen in Verbindung mit Nukleosiden als antiviralen Mitteln. Solche Kombinationen von anti-viralen Mitteln gegen Hepatitis zeigen unerwartete Wirksamkeit bei der Replikationsinhibition und dem Sezernieren von Hepatitis-Viren in mit diesen Viren infizierten Säugerzellen.

Beschreibung des Stands der Technik

Hepatitis-Viren

[0002] Das Hepatitis-B Virus (HBV, HepB) ist der Verursacher von akuten und chronischen Lebererkrankungen einschließlich Leberfibrose, Zirrhose, entzündlichen Lebererkrankungen und Leberkrebs, der bei einigen Patienten zum Tod führen kann (Joklik, Wolfgang K., Virology, 3te Ausgabe, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1988 (ISBN 0-8385-9462-X). Obwohl wirksame Impfstoffe verfügbar sind, sind weltweit immer noch mehr als 300 Millionen Menschen, d.h. 5% der Weltbevölkerung, chronisch mit dem Virus infiziert (Locarnini, S.A., et al., Antiviral Chemistry & Chemotherapy (1996), 7(2), 53-64). Solche Impfstoffe haben keinen therapeutischen Wert für bereits mit dem Virus infizierte Personen. In Europa und Nordamerika sind zwischen 0,1% und 1% der Bevölkerung infiziert. Nach Schätzungen entwickeln 15% bis 20% der Personen, die sich die Infektion zuziehen, Leberzirrhose oder eine andere chronische Behinderung durch die HBV-Infektion. Wenn die Leberzirrhose sich erst einmal etabliert hat, treten in beträchtlichem Maße Morbidität und Mortalität mit einer etwa 5-jährigen Überlebenszeit der Patienten auf (Blume, H. E. et al., Advanced Drug Delivery Reviews (1995) 17, 321-331). Es ist deshalb erforderlich und von hoher Priorität, verbesserte und wirksame Anti-HBV-Anti-Hepatitis-Therapien zu finden (Locarnini, S. A. et al., Antiviral Chemistry & Chemotherapy (1996) 7(2), 53-64).

[0003] Andere, als Verursacher menschlicher Erkrankungen bedeutende Hepatitisviren umfassen Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis Delta, Hepatitis E, Hepatitis F und Hepatitis G (Coates, J.A.V. et al., Exp. Opin. Ther. Patents (1995) 5(8), 747-756). Außerdem gibt es tierische Hepatitisviren, die speziesspezifisch sind. Diese umfassen zum Beispiel diejenen, die Enten, Waldmurmeltiere und Mäuse infizieren.

1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen

[0004] 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit (auch als 1-Desoxynojirimycin, DNJ) bekannt und seine N-Alkylderivate sind bekannte Inhibitoren der N-vernetzte Oligosaccharide verarbeitenden Enzyme α -Glucosidase I und II (Saunier et al., J. Biol. Chem. (1982), 257, 14155-14161; Elbein, Ann. Rev. Biochem. (1987) 56, 497-534). Als Glucose-Analoga haben sie auch die Fähigkeit zur Inhibition des Glucose-Transports, der Glucosyl-Transferasen und/oder Glycolipid-Synthese (Newbrun et al., Arch. Oral Biol. (1983) 28, 516-536, Wang et al., Tetrahedron Lett. (1993) 34, 403-406). Ihre Inhibitionsaktivität gegen Glucosidasen hat zu der Weiterentwicklung dieser Komponenten als antihyperglykämische und antivirale Mittel geführt. Vgl. zum Beispiel Internationale PCT-Veröffentlichung WO 87/03903 und die US-Patente 4 065 562, 4 182 767, 4 533 668, 4 639 436, 4 849 430, 4 957 926, 5 011 829 und 5 030 638.

[0005] Für Glucosidase-Inhibitoren wie zum Beispiel N-Alkyl-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen, worin die Alkylgruppe zwischen 3 und 6 Kohlenstoffatome enthält, ist gezeigt worden, dass sie bei der Behandlung der Hepatitis-B-Infektion wirksam sind (Internationale PCT-Veröffentlichung WO 95/19172). Zum Beispiel ist n-Butyl-desoxynojirimycin (n-Butyl-DNJ, N-Butyl-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit) für diesen Verwendungszweck wirksam (Block, T.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 2235-2239, Ganem, B., Chemtracts: Organic Chemistry (1994), 7(2), 106-107). N-Butyl-DNJ ist ebenfalls als anti-HIV-1-Mittel bei HIV-infizierten Patienten getestet worden und es als gut verträglich bekannt. Ein weiterer α -Glucose-Inhibitor, Desoxynojirimycin (DNJ), ist ebenfalls als antivirales Mittel zur Verwendung in Kombination mit N-(Phosphonoacetyl)-L-asparaginsäure (PALA) vorgeschlagen worden (WO 93/18763). Kombinationen von N-substituierten Imino-D-glucit-Derivaten und anderen antiviralen Mitteln zur Behandlung von Hepatitisvirus-Infektionen sind jedoch zuvor noch nicht offenbart oder vorgeschlagen worden.

[0006] Inhibitoren der reversen Transkriptase, einschließlich der Klasse von Nukleosid- und Nukleotid-Analoga, wurden zuerst als Arzneimittel zur Behandlung von Retroviren wie des menschlichen Immunschwächevirus (HIV), des Verursachers von AIDS, entwickelt. In zunehmendem Maße haben diese Verbindungen durch virales Screenen und chemische Modifikationsverfahren Verwendung gegen weitere Viren gefunden, einschließlich sowohl RNA- als auch DNA-Viren.

[0007] Nukleosid- und Nukleotid-Analoga üben ihre antivirale Aktivität durch Hemmung der entsprechenden, für die Synthese der viralen DNA bzw. RNA verantwortlichen DNA- und RNA-Polymerasen aus. Da Viren verschiedene Formen von Polymerasen enthalten, kann dieselbe Nukleosid-/Nukleotidverbindung sich auf verschiedene Viren in dramatisch unterschiedlicher Weise auswirken. Zum Beispiel scheint Lamivudin (3TC[®]) nützlich gegen die HBV-Infektion zu sein, wohingegen Zidovudin (AZT[®]) wenig Nutzen gegen dasselbe Virus zu haben scheint (Gish, R.G. et al., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1995) 4(2), 95-115).

[0008] Die Toxizität ist bei einigen antiviralen Nukleosid-Analoga erheblich gewesen. So wurden zum Beispiel klinische Versuche zur Verwendung des Nukleosid-Analogons Fialuridin (FIAU) zur Behandlung der chronischen Hepatitis B wegen des unlängst aufgetretenen, durch das Arzneimittel verursachten Leberversagens, das bei einigen Patienten zum Tode führte, ausgesetzt. Folglich besteht immer noch Bedarf an sicheren Arzneimitteldosierungsschemen zur Behandlung von Hepatitis B-Infektionen und Hepatitis (Mutchnick, M.G., et al., *Antiviral Research* (1994) 24, 245-257).

Immunmodulatoren und Immunstimulanzien

[0009] Immunmodulatoren/Immunstimulantien wie zum Beispiel α -Interferon und andere Zytokine sind bei der Behandlung der HBV-Infektion mit viel versprechenden Ergebnissen eingesetzt worden. Unglücklicherweise waren die Ausmaße der Reaktionen geringer als erwünscht. Die Interferonbehandlung wird derzeit von der FDA zur Behandlung von Hepatitis B zugelassen. Weitere, das Immunsystem beeinflussende Arzneimittelkandidaten werden gegenwärtig untersucht. Diese beinhalten Thymuspeptide zur Verwendung bei der Behandlung der chronischen Hepatitis B (CHB), Isoprinosin, Steroide, Schiff'sche Basen bildende Salicylaldehyd-Derivate wie Tucaresol, Levamisol und dergleichen (Gish, R.G. et al., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1995) 4(2), 95-115), Coates, J.A.V. et al., *Exp. Opin. Ther. Patents* (1995) 5(8), 747-765).

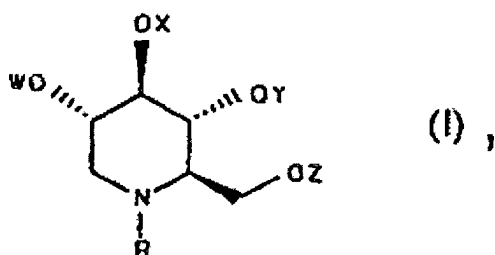
[0010] Die Verwendung von N-substituierten Imino-D-glucit-Verbindungen in Kombination mit immunmodulierenden/immunstimulierenden Mitteln ist neu.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Wie oben erwähnt, ist die Kombination von N-substituierten Imino-D-glucit-Verbindungen und Derivaten davon mit weiteren Anti-Hepatitisvirus-Verbindungen nach dem Kenntnisstand der Erfinder der vorliegenden Erfindung weder vorgeschlagen noch offenbart worden. Die Verwendung von zwei oder mehr antiviralen Mitteln zur Bereitstellung einer verbesserten Therapie bei der Behandlung von Hepatitis-B-Virusinfektionen ist aufgrund der Morbidität und Mortalität der Erkrankung wünschenswert. Kombinationstherapien sind ebenfalls wünschenswert, da sie die Toxizität für die Patienten vermindern sollten, weil sie es dem Arzt gestatten, niedrigere Dosen von einem oder mehreren der Arzneimittel zu verabreichen, die der Patient erhält. Kombinationstherapie kann außerdem helfen, die Entwicklung der Arzneimittelresistenz beim Patienten zu verhindern (Wiltink, E.H.H., *Pharmaceutish Weekblads Scientific Edition* (1992) 14, (4A), 268-274). Das Ergebnis einer verbesserten Wirksamkeitskonfiguration kombiniert mit einem relativen Fehlen von Toxizität und Resistenzentwicklung könnte ein stark verbessertes Arzneimittel-Behandlungsprofil bereitstellen.

[0012] Es ist überraschenderweise von den Erfindern entdeckt worden, dass die kombinierte Verwendung von N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen und antiviralen Nukleosid-Verbindungen oder Kombinationen davon, zu einer in unerwartendem Maße größeren Wirksamkeit der Verbindungen im Vergleich zu der kombinierten antiviralen, von den Einzelkomponenten erwarteten Aktivität führte. Ob dies auf verschiedene Wirkmechanismen der verschiedenen verwendeten Arzneimittelklassen oder auf andere biologische Phänomene zurückzuführen ist, ist gegenwärtig unklar.

[0013] Entsprechend stellt die vorliegende Erfindung in einer ersten Ausführungsform eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer Hepatitisvirus-Infektion bei einem Säuger bereit, umfassend eine erste Menge einer N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung der Formel I



worin

R aus der Gruppe bestehend aus geradkettigem Alkyl mit einer Kettenlänge von C₆ bis C₁₂ ausgewählt ist, und W, X, Y und Z jeweils unabhängig voneinander aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und Butanoyl ausgewählt sind; und

einer zweiten Menge einer antiviralen, aus der Gruppe bestehend aus 2',3'-Didesoxycytidin, (-)-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin, (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat ausgewählten Verbindung und Mischungen davon; und

einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, Verdünnungsmittel oder Hilfsstoff; und

worin die erste und zweite Menge der Verbindungen zusammen eine Anti-Hepatitisvirus wirksame Menge dieser Verbindungen umfassen.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Behandlung einer Hepatitis-B-Virus-Infektion bei einem Säugler bereit, umfassend die Verabreichung von etwa 0,1 mg/kg/Tag bis etwa 100 mg/kg/Tag einer N-substituierten 1,5-Dideoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung der Formel I wie oben an den Säugler und von etwa 0,1 mg/Person/Tag bis etwa 500 mg/Person/Tag einer aus der Gruppe bestehend aus einem antiviralen Nukleosid ausgewählten Verbindung.

[0015] Die vorliegende Verbindung stellt ebenfalls ein Verfahren zur Behandlung einer Hepatitis-B-Virusinfektion bei einem menschlichen Patienten bereit, umfassend die Verabreichung von etwa 0,1 mg/kg/Tag bis etwa 100 mg/kg/Tag N-(n-Nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucit und von etwa 0,1 mg/Person/Tag bis etwa 500 mg/Person/Tag von (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat an den Patienten.

[0016] Die Erfindung stellt weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer Hepatitis-B-Virusinfektion bei einem Säugern bereit, umfassend etwa 0,1 mg bis etwa 100 mg der Verbindung von Formel I wie oben und von etwa 0,1 mg bis etwa 500 mg einer aus der Gruppe bestehend aus antiviralen Nukleosiden ausgewählten Verbindung.

[0017] Ebenfalls wird eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer Hepatitis-B-Virusinfektion bei einem menschlichen Patienten bereitgestellt, umfassend von etwa 0,1 mg bis etwa 100 mg N-(n-Nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucit und von etwa 0,1 mg bis etwa 500 mg (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat.

[0018] Der weitere Umfang der Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung wird aus der detaillierten Beschreibung und den nachfolgenden Zeichnungen offensichtlich. Es sollte jedoch verstanden werden, dass die nachfolgende detaillierte Beschreibung und die Beispiele, während sie bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung angeben, nur zur Veranschaulichung der Erfindung dienen, wobei verschiedene Veränderungen und Modifikationen im Geiste und Schutzzumfang der Erfindung für den Fachmann aus dieser detaillierten Beschreibung offensichtlich werden.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0019] Die obigen und weitere Ziele, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden besser verstanden aus der nachfolgenden detaillierten Beschreibung in Verbindung mit den begleitenden, nur zur Veranschaulichung und nicht zur Einschränkung der vorliegenden Erfindung vorgelegten Zeichnungen, die wie folgt sind:

[0020] [Fig. 1](#) zeigt die Anti-Hepatitis-B-Virus Aktivität von (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat (3TC) allein und in Kombination mit N-Nonyl-DNJ in vitro.

[0021] [Fig. 2](#) zeigt die Plasmakonzentration von N-Nonyl-DNJ im Vergleich zur Dosisgabe von N-Nonyl-DNJ in während der Dosisaufnahme entnommenen Proben bei jedem Versuchstier in Beispiel 4. Versuchstiere werden mit Einzelbuchstaben gekennzeichnet und ein geringes Maß an „statistischem Hintergrundrauschen“ ist

bei dem Dosiswert zugegeben worden, so dass überlappende Werfe zu unterscheiden waren.

[0022] Fig. 3 zeigt die Steigung von Log (IPDNA + 10) von „Woche gegenüber Dosis“. Ein bestimmter Buchstabe ist für jedes Versuchstier verwendet worden. Die angepasste Verbindungslinie gilt für ein logistisches Modell mit vier Parametern. Die Parameter der angepassten Verbindungskurve und ihre ungefähren Standardfehler sind in der grafischen Darstellung (plot) gezeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0023] Die folgende detaillierte Beschreibung wird bereitgestellt, um dem Fachmann eine Hilfe zur Anwendung der Erfindung zu geben. Trotzdem soll diese detaillierte Beschreibung nicht in unzulässiger Weise als Einschränkung der Erfindung ausgelegt werden, wenn Modifikationen und Variationen der Ausführungsformen hierin diskutiert werden, die der Fachmann vornehmen kann, ohne vom Geist und Schutzzumfang der Erfindung abzurücken.

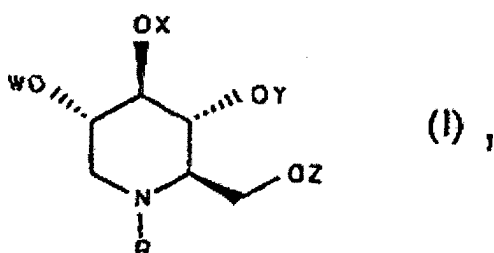
[0024] Der Erfinder hat entdeckt, dass Kombinationen von N-substituierten-1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen mit Anti-Hepatitisvirus-Nukleosid-Analoga auf die Hepatitis-Virus-Replikation eine stärkere Hemmwirkung ausüben, als diejenige, die durch die kombinierte Verwendung der Einzelverbindung zu erwarten wäre.

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt somit pharmazeutische Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung von Hepatitis-Virusinfektionen, insbesondere Hepatitis-B-Infektionen, beim Menschen, anderen Säugern und Zellen unter Verwendung einer Kombination von einer N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung mit einem antiviralen Nukleosid bereit. Die N-substituierten Didesoxy-1,5-imino-D-Glucit-Verbindungen haben basische Stickstoffatome und in können in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Arzneimittelkombinationen können ebenfalls für eine Zelle oder Zellen, für einen menschlichen oder anderen Säuger-Patienten entweder in getrennten pharmazeutisch annehmbaren Zubereitungen, Zubereitungen, die ein oder mehrere therapeutische Mittel enthalten, oder als Sortiment von ein einziges Mittel oder mehrere Mittel enthaltenden Zubereitungen bereitgestellt werden. Bei Verabreichung stellen diese Arzneimittelkombinationen jedoch eine Anti-Hepatitisvirus wirksame Menge der Komponenten dar.

[0026] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff „Anti-Hepatitisvirus wirksame Menge“ auf die kombinierte, zur Behandlung einer Hepatitisvirus-Infektion wirksame Menge von (1) einer N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung mit einem antiviralen Nukleosid. Die antivirale Wirksamkeit der vorgenannten Kombinationen kann eine Vielzahl verschiedener, mit der viralen Replikation und dem Assembly (Zusammenbau der Virushülle) assoziierter Phänomene umfassen. Diese können zum Beispiel die Blockade der Hepatitisvirus-DNA, der viralen Transkription, des Assemblys der Virushülle, der Freisetzung von Virionen oder deren Sezernierung aus infizierten Zellen, Blockade oder Veränderung der Funktion viraler Proteine, einschließlich der Funktion eines oder mehrerer viraler Hüllproteine, und/oder die Produktion nicht ausgereifter oder ansonsten nicht funktioneller Virionen umfassen. Die Gesamtwirkung erstreckt sich auf die virale Replikation und die Infektion weiterer Zellen und damit auf die Hemmung der Infektionsausbreitung im Patienten.

N-substituierte 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucose-Verbindungen

[0027] Erfindungsgemäß nützliche N-substituierte 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen werden durch die unten abgebildete Struktur I dargestellt,



worin:

R aus der Gruppe bestehend aus geradkettigem Alkyl mit einer Kettenlänge von C₆ bis C₁₂ ausgewählt ist, und W, X, Y und Z jeweils unabhängig voneinander aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und Butanoyl ausgewählt sind.

[0028] Erfindungsgemäß nützliche, repräsentative N-substituierte Imino-D-glucit-Verbindungen beinhalten die folgenden, ohne darauf beschränkt zu sein:

N-(n-Hexyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit,
 N-(n-Heptyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit,
 N-(n-Octyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit,
 N-(n-Octyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Decyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Undecyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit,
 N-(n-Decyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit,
 N-(n-Undecyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit
 N-(n-Dodecyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit,
 N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Decyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Undecyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat,
 N-(n-Dodecyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat.

[0029] Bevorzugte Verbindungen sind N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit und N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat.

[0030] Die erfindungsgemäß nützlichen N-substituierten Imino-D-glucit-Verbindungen können durch dem Fachmann bekannte, zum Beispiel in den US-Patenten 4 182 767, 4 639 436 und 5 003 072 sowie in der internationalen PCT-Veröffentlichung WO 95119172 und in den hierin zitierten Referenzen beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Verfahren zum Einführen von Sauerstoff in Alkyl-Seitenketten sind in Tan et al., (1994) Glycobiology 4(2), 141-149 offenbart. Nicht einschränkend zu verstehende, veranschaulichende Herstellungsverfahren sind nachfolgend in den Beispielen 1 und 2 dargestellt.

[0031] Bei der Behandlung von Hepatitisvirus-Infektionen können erfindungsgemäße Anti-Hepatitisvirus-Kombinationen oder Einzelverbindungen in Form von, von anorganischen oder organischen Säuren abstammenden Salzen verwendet werden. Diese Salze beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, die folgenden: Acetat, Adipat, Alginat, Citrat, Aspartat, Benzoat, Benzolsulfonat, Bisulfat, Butyrat, Kampferat, Kampfersulfonat, Digluconat, Cyclopentanpropionat, Dodecylsulfat, Ethansulfonat, Glucoheptanoat, Glycerolphosphat, Hemisulfat, Heptanoat, Hexanoat, Fumarat, Hydrochlorid, Hydrobromid, Hydroiodid, 2-Hydroxyethansulfonat, Lactat, Maleat, Methansulfonat, Nicotinat, 2-Naphthalinsulfonat, Oxalat, Palmoat, Pectinat, Persulfat, 3-Phenylpropionat, Pikrat, Pivalat, Propionat, Succinat, Tartrat, Thiocyanat, Tosylat, Mesylat und Undecanoat.

[0032] Die basischen, Stickstoff-enthaltenden Gruppen können mit Mitteln wie Niederalkylhalogeniden wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butylchlorid, Bromiden und Iodiden, Dialkylsulfaten wie Dimethyl-, Diethyl-, Dibutyl- und Diamylsulfaten, langkettigen Halogeniden wie Decyl-, Lauryl-, Myristyl- und Sterylchloriden, -bromiden und -iodiden, Aralkylhalogeniden wie Benzyl- und Phenethylbromiden und anderen quarternisiert werden. Wasser- und öl-lösliche oder -dispersierbare Produkte werden hierdurch wie erwünscht erhalten. Die Salze werden durch Kombination der basischen Verbindungen mit der gewünschten Säure gebildet.

[0033] Weitere Verbindungen der erfindungsgemäßen Kombinationen sind Säuren, die ebenfalls Salze bilden können. Beispiele beinhalten Salze mit Alkalimetallen oder Erdalkalimetallen wie zum Beispiel Natrium, Kalium, Calcium oder Magnesium oder mit organischen Basen oder basischen quaternären Ammoniumsalzen.

[0034] Verbindungen von erfindungsgemäßen Kombinationen können Säuren oder Basen sein. Als solche können sie zur Salzbildung miteinander verwendet werden. Zum Beispiel wird die Phosphorsäureform von (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat mit der basischen Form von N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit oder N-(n-Nonyl)-1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucittetrabutyrat ein Salz bilden. Dieser Salztyp kann dann für den Patienten in einer pharmazeutisch annehmbaren Zubereitung oder als reines Einzelsalz bereitgestellt werden.

[0035] In einigen Fällen können die Salze auch als Hilfsmittel bei der Isolierung, Reinigung oder Auflösung der erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden.

NUKLEOSIDE

[0036] Erfindungsgemäß nützliche Nukleoside sind:

(-)-2'-Desoxy-3'-thiocytydin-5'-triphosphat (3TC),
 (-)-2',3'-Didesoxy-3'-thiacytydin[(-)-SddC] und
 Didesoxycytydin.

[0037] Eine bevorzugte Verbindung ist (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytydin-5'-triphosphat (3TC).

[0038] Synthetische Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäß nützlichen Nukleosiden und Nucleotiden sind in Acta Biochim. Pol. 43, 25-36 (1996), Swed. Nucleosides Nucleotides 15, 361-378 (1996), Synthesis 12, 1465-1479 (1995), Carbohydr. Chem. 27, 242-276 (1995), Chem. Nucleosides Nucleotides 3,421-535 (1994), Ann. Reports in Med. Chem., Academic Press und Exp. Opin. Invest. Drugs 4, 95-115 (1995) offenbart und dem Fachmann gleichermaßen gut bekannt Die in den oben zitierten Referenzen beschriebenen chemischen Reaktionen werden allgemein im Hinblick auf ihre breiteste Anwendung zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen offenbart. Gelegentlich können die Reaktionen nicht wie beschrieben für alle der hier im Schutzzumfang der Erfindung offenbarten Verbindungen anwendbar sein. Die Verbindungen, bei denen dies auftritt, sind vom Fachmann leicht zu erkennen. In all diesen Fällen können die Reaktionen durch dem Fachmann bekannte konventionelle Modifikationen, z.B. durch entsprechenden Schutz störender Gruppen, durch Austausch gegen alternative konventionelle Reagenzien, durch routinemäßige Veränderung der Reaktionsbedingungen und dgl. erfolgreich durchgeführt werden, oder es sind andere hierin offenbarte oder sonstige konventionelle Reaktionen zur Herstellung der entsprechenden erfindungsgemäßen Verbindungen anwendbar. Bei allen präparativen Verfahren sind alle Ausgangsmaterialien bekannt oder leicht aus bekannten Ausgangsmaterialien herzustellen.

[0039] Während Nucleosid-Analoga allgemein wie sie sind als antivirale Mittel verwendet werden, müssen Nucleotide (Nucleosidphosphate) manchmal zu Nucleosiden umgewandelt werden, um ihren Transport durch Zellmembranen zu erleichtern. Ein Beispiel eines zum Eindringen in Zellen befähigten chemisch modifizierten Nucleotids ist S-1-3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropylcytosin (HPMPC, Gilead Sciences).

Dosierungen

[0040] Die erfindungsgemäß nützlichen N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen können Menschen in einer Menge im Bereich von etwa 0,1 mg/kg/Tag bis etwa 100 mg/kg/Tag, insbesondere von etwa 1 mg/kg/Tag bis etwa 75 mg/kg/Tag und besonders bevorzugt von etwa 5 mg/kg/Tag bis etwa 50 mg/kg/Tag verabreicht werden.

[0041] Die antivirale Nucleosid-Verbindung kann Menschen in einer Menge im Bereich von etwa 0,1 mg/Person/Tag bis etwa 500 mg/Person/Tag, vorzugsweise von etwa 10 mg/Person/Tag bis etwa 300 mg/Person/Tag, insbesondere von etwa 25 mg/Person/Tag bis etwa 200 mg/Person/Tag, besonders bevorzugt von etwa 50 mg/Person/Tag bis etwa 150 mg/Person/Tag und am stärksten bevorzugt im Bereich von etwa 1 mg/Person/Tag bis etwa 50 mg/Person/Tag verabreicht werden.

[0042] Patienten können während der Kombinationstherapie unter Einsatz von N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen und einem Nucleosid als antiviralem Mittel überwacht werden, um für jeden die niedrigst mögliche Dosis festzustellen.

[0043] Die oben beschriebenen Dosierungen können einem Patienten in einer Einzeldosis oder in mehreren anteiligen Sub-Dosierungen verabreicht werden. Im letzteren Fall kann die Dosierungseinheitszusammensetzung solche Mengen der Subdosis enthalten, dass sich die Tagesdosis daraus ergibt. Mehrfache Dosisgaben pro Tag können ebenfalls die Tagesdosis erhöhen, sollte dies von der das Arzneimittel verordnenden Person gewünscht werden.

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0044] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können als pharmazeutische Zusammensetzungen zubereitet werden. Solche Zusammensetzungen können oral, parenteral, durch Inhalationsspray, rektal, intradermal, transdermal oder topisch in Dosierungseinheitszubereitungen verabreicht werden, die, falls gewünscht, konventionelle nichttoxische Träger, Adjuvanzen und Hilfsstoffe enthalten. Die topische Verabreichung kann die Verwendung von transdermaler Verabreichung wie als transdermales Pflaster oder mit Iontophorese-Geräten

umfassen. Der Begriff parenteral, wie hier verwendet, beinhaltet subkutane, intravenöse, intramuskuläre oder intrasternale Injektion oder Infusionsverfahren. Die Arzneimittelzubereitung wird z. B. in Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1975) und Liberman, H.A. und Lachman, L., Hrsg., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y. (1980) diskutiert.

[0045] Injizierbare Zubereitungen von zum Beispiel sterilen, injizierbaren, wässrigen oder öligen Suspensionen können unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Dispergier- oder Benetzungsmitteln und Suspensionsmitteln zubereitet werden. Die sterile injizierbare Zubereitung kann auch eine sterile injizierbare Lösung oder Suspension in einem nicht-toxischen, für die parenterale Anwendung annehmbaren Verdünnungs- oder Lösungsmittel, zum Beispiel in einer Lösung in 1,3-Butandiol vorliegen. Unter den annehmbaren und verwendbaren Hilfsstoffen und Lösungsmitteln sind Wasser, Ringer-Lösung und isotonische Kochsalzlösung. Zusätzlich werden sterile, nicht-flüchtige Öle konventionell als Lösungs- oder Suspensionsmedien verwendet. Zu diesem Zweck kann jedes farblose, nicht-flüchtige Öl einschließlich synthetischer Mono- und Diglyceride eingesetzt werden. Zusätzlich können Fettsäuren wie Ölsäure bei der Zubereitung von Injektionslösungen nützlich sein. Dimethylacetamid, oberflächenaktive Mittel einschließlich ionischer und nichtionischer Detergenzien und Polyethylenglycol können verwendet werden. Mischungen von Lösungsmittel- und Benetzungsmitteln, wie die oben diskutierten, sind ebenfalls nützlich.

[0046] Suppositorien zur rektalen Verabreichung der hier diskutierten Verbindungen können durch Mischen des Wirkstoffs mit einem geeigneten, nicht reizenden Trägerstoff wie Kakaobutter oder Polyethylenglycol, die bei normalen Temperaturen fest, aber bei Rektaltemperatur flüssig sind und deshalb im Rektum schmelzen und den Wirkstoff freisetzen, hergestellt werden.

[0047] Feste Dosierungsformen zur oralen Verabreichung können Kapseln, Tabletten, Pillen, Pulver und Granulate beinhalten. In solchen festen Dosierungsformen werden die erfindungsgemäßen Verbindungen gewöhnlich mit einem oder mehreren für den angegebenen Verabreichungsweg geeigneten Adjuvantien kombiniert. Wenn sie per os verabreicht werden, können die Verbindungen mit Lactose, Saccharose, Stärkepulver, Celluloseestern von Alkansäuren, Cellulosealkylestern, Talkum, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Magnesiumoxid, Natrium- und Calciumsalzen von Phosphor- und Schwefelsäuren, Gelatine, Gummi arabicum, Natriumalginate, Polyvinylpyrrolidon und/oder Polyvinylalkohol vermischt und dann zur bequemen Verabreichung tablettiert oder in Kapseln gefüllt werden. Solche Kapseln oder Tabletten können eine Rezeptur zur kontrollierten Freisetzung enthalten wie sie in einer Dispersion des Wirkstoffs in Hydroxypropylmethylcellulose bereitgestellt werden kann. Im Fall von Kapseln, Tabletten und Pillen kann die Dosierungsform ebenfalls Puffermittel wie Natriumcitrat oder Magnesium- oder Calciumcarbonat oder -bicarbonat umfassen. Tabletten und Pillen können zusätzlich mit einer dünndarmlöslichen Beschichtung hergestellt werden.

[0048] Für therapeutische Zwecke können die Zubereitungen zur parenteralen Verabreichung in Form von wässrigen oder nicht wässrigen, isotonischen, sterilen Injektionslösungen oder Suspensionen vorliegen. Diese Lösungen oder Suspensionen können aus sterilen Pulvern oder Granula, die einen oder mehrere der oben zur Verwendung in Zubereitungen zur oralen Verabreichung erwähnten Träger- oder Verdünnungsstoffe enthalten, hergestellt werden. Die Verbindungen können in Wasser, Polyethylenglycol, Propylenglycol, Ethanol, Maisöl, Baumwollsamöl, Erdnussöl, Sesamöl, Benzylalkohol, Natriumchlorid und/oder verschiedenen Puffern gelöst werden. Weitere Adjuvantien und Verfahren zur Verabreichung sind dem Fachmann gut und umfassend bekannt.

[0049] Flüssige Dosierungsformen zur oralen Verabreichung können pharmazeutisch annehmbare, inerte, üblicherweise lege artis verwendete Verdünnungsmittel wie Wasser enthaltende Emulsionen, Lösungen, Suspensionen, Sirupe und Elixiere umfassen. Solche Zusammensetzungen können auch Adjuvantien, wie Benetzungsmittel, Emulgatoren und Suspensionsmittel sowie Süß-, Geschmacks- und Duftstoffe umfassen.

[0050] Die Wirkstoffmenge, die mit den Trägermaterialien zur Herstellung einer einzelnen Dosierungsform kombiniert werden kann, hängt vom Patienten und der besonderen Verabreichungsart ab.

[0051] Bestimmte der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Verbindungen, die in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Verfahren verabreicht werden, können als Pro-Arzneimittel für weitere erfindungsgemäße Verbindungen dienen. Pro-Arzneimittel sind Arzneimittel, die in vivo oder in vitro chemisch zu dem(n) aktiven Derivat oder Derivaten umgewandelt werden können. Pro-Arzneimittel werden im Wesentlichen auf die gleiche Weise verabreicht wie die anderen erfindungsgemäßen pharmazeutischen Verbindungen. Nicht limitierende Beispiele sind die Ester der erfindungsgemäßen N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindungen.

Behandlungsschema

[0052] Das Behandlungsschema eines an einer Hepatitisvirus-Infektion leidenden Patienten mit den erfindungsgemäßen Verbindungen und/oder Zusammensetzungen wird in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich Alter, Gewicht, Geschlecht, Ernährung und medizinischer Zustand des Patienten, Schwere der Infektion, Verabreichungsweg, pharmakologischen Überlegungen wie Aktivität, Wirksamkeit, Pharmakokinetik und den toxikologischen Profilen der speziellen verabreichten Verbindungen und ob ein System zur Wirkstoff-Freisetzung verwendet wird, ausgewählt.

[0053] Die Verabreichung der hier offenbarten Arzneimittelkombinationen sollte allgemein über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis mehreren Monaten oder Jahren fortgesetzt werden, bis die Virus-Titer annehmbare Spiegel erreichen, was anzeigt, dass die Infektion unter Kontrolle gebracht oder ausgerottet wurde. Wie oben angemerkt, können die sich der Behandlung unterziehenden Patienten routinemäßig durch Messen der Hepatitisvirus-DNA im Serum des Patienten durch Slot-Blot, Dot-Blot oder PCR-Verfahren oder durch Messen von Hepatitis-Antigenen, wie zum Beispiel dem Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) und dem Hepatitis-E-Antigen (HBeAg) im Serum zur Feststellung der Wirksamkeit der Therapie überwacht werden. Bei chronischer Hepatitis B können Remissionen zum Beispiel durch das Verschwinden der viralen Hepatitis-B-DNA gekennzeichnet sein, d.h. durch eine Reduktion auf nicht mehr nachweisbare Spiegel wie durch zum Nachweis von Spiegeln $\geq 10^5$ Genom/pro ml Serum und HBeAg aus Serum befähigten Hybridisierungs-Tests gemessen trotz fortgesetzter Präsenz von HBsAg. Diesen serologischen Ereignissen folgt eine Verbesserung der biochemischen und histologischen Krankheitscharakteristika. Der Endpunkt der erfolgreichen Behandlung in den meisten Versuchen zur antiviralen Therapie ist das Verschwinden von HBeAg und viraler DNA aus dem Serum. Bei Patienten, bei denen das e-Antigen verschwindet, wird die Remission üblicherweise aufrechterhalten und dies führt zu einem inaktiven Status als HBsAg-Träger. Viele Patienten werden letztendlich HBsAg-negativ (s. Hoofnagle et al., (1977) New Engl. Jour. Med. 336(5), 347-356 wegen eines Reviews).

[0054] Fortgesetzte Analysen der mit diesen Verfahren erhaltenen Ergebnisse gestatten eine Modifikation im Behandlungsplan während der Therapie, so dass optimale Menge jeder Komponente der Kombination verabreicht werden und damit außerdem die Behandlungsdauer festgelegt werden kann. Somit kann der Behandlungsplan/ das Dosierungsschema in vernünftiger Weise über den Therapieverlauf modifiziert werden, damit die niedrigsten Mengen der in Kombination verwendeten jeweiligen antiviralen Verbindungen, die zusammen eine zufriedenstellende Anti-Hepatitisvirus-Wirksamkeit zeigen, verabreicht werden und damit die Verabreichung solcher antiviralen Verbindungen in Kombination nur solange fortgesetzt wird, wie es zur erfolgreichen Behandlung der Infektion erforderlich ist.

[0055] Die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele dienen zur Illustration verschiedener Aspekte der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Herstellung von 1,5-(Butylimino)-1,5-didesoxy-D-glucit

[0056] Eine Lösung von 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit (5,14 g, 0,0315 M), Butyraldehyd (3,35 ml, 0,0380 M) und Palladiumschwarz (1 g) in 200 ml Methanol wurde hydriert (60 psi, 29°C/21 h). Nach Filtrieren der resultierenden Mischung wurde das Filtrat im Vakuum zu einem Öl eingengt. Die Titelverbindung wurde aus Aceton auskristallisiert und aus Methanol/Aceton umkristallisiert, Smp. ca. 132°C. Die Strukturzuordnung wurde durch NMR, Infrarotspektrum und Elementaranalyse unterstützt. Analyse berechnet für $C_{10}H_{21}NO_4$: C 54,78, H 9,65, N 6,39. Gefunden: C 54,46, H 9,33, N 6,46.

Beispiel 2

Herstellung von 1,5-(Butylimino)-1,5-didesoxy-D-glucittetraacetat

[0057] Essigsäureanhydrid (1,08 g, 0,0106 M) wurde zur Titelverbindung aus Beispiel 1 (0,50 g, 0,0023 M) in 5 ml Pyridin gegeben und während 17 Tagen bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde unter Stickstoffgas eingedampft. Die resultierende Titelverbindung wurde über Kieselgelchromatographie gereinigt. Die Strukturzuordnung wurde durch NMR, Infrarotspektrum und Elementaranalyse bestätigt. Analyse berechnet für $C_{18}H_{29}NO_8$: C 55,80, H 7,54, N 3,62. Gefunden: C 55,42, H 7,50, N 3,72.

Beispiel 3

Anti-Hepatitis-B-Virus-Aktivität von (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat (3TC) allein und in Kombination mit N-Nonyl-DNJ

[0058] Die Anti-Hepatitis-B-Virus-Wirkung von (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat (3TC) allein und in Kombination mit N-Nonyl-DNJ wurde nach Korba ((1996) Antiviral Research 29 (1), 49-51) unter Verwendung des „Combostat“-Verfahrens (Comstat Programm, Combostat Corp., Duluth, MN) bestimmt. Das Combostat-Verfahren umfasst serielle Verdünnung von IC-90 jeder Verbindung. Der IC-90 von N-Nonyl-DNJ wurde als zwischen 4 und 10 µg/ml liegend bestimmt (T. Block und G. Jacob, unveröffentlichte Beobachtungen). Der anerkannte IC-90 für 3TC in HepG 2.2.15 (2.2.15) Zellen ist 300 nM bis 500 nM (Doong et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8495-8499).

[0059] 2.2.15 Zellen, wie in Sells et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1005-1009 beschrieben, wurden in mit 10% fötalem Kälberserumalbumin (200 µg/ml G418, Gibco BRL 066-1811) supplementiertem RPMI 1640-Medium (Gibco BRL, # 31800-022) in Kultur gehalten. Die Zellen wurden bei 80% Konfluenz in 25 cm² Gewebekulturflaschen umgesiedelt. Fünf Tage später erhielten jeweils drei Kulturflaschen entweder keine Verbindung, Serienverdünnungen von 3TC allein oder Serienverdünnungen von 3TC plus N-Nonyl-DNJ. An den Tagen 2, 4 und 6 nach Zugabe der Verbindung (mit Austausch des Kulturmediums an diesen Tagen) wurde die Menge der Hepatitis-B-Virus-DNA durch PCR-Analyse aus mit Polyethylenglycol sedimentierten Partikeln bestimmt. Somit wurden in diesen Experimenten die in Virushüllen verpackten Virus-Partikel nicht von den Nukleokapsiden unterschieden. Die PCR-amplifizierten Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese (1,5 % Agarose) aufgetrennt und das Fragment mit einer Länge von 538 Nukleotiden durch Scannen der Bande (HP Jet Imager) quantifiziert. Die Menge der aus unbehandelten Zellen gewonnenen HBV wurde als 100% angenommen. Die Ergebnisse zum 6-Tage-Zeitpunkt sind in [Fig. 1](#) als Durchschnittswerte von mindestens 3 einzelnen Kulturflaschen dargestellt und die Standardabweichung war niemals größer als 20% mit einem Durchschnittsfehler von 12%.

[0060] Für jede der zu drei Zeitpunkten getesteten Serien war die Kombination von 3TC plus N-Nonyl-DNJ bezüglich der HBV Freisetzung signifikant stärker wirksam als jede der Verbindungen allein. Schlussfolgerungen auf der Grundlage der PCR-Analyse allein machten es schwer, exakte IC-50 Werte zuzuordnen. Die extreme Sensitivität und die empfindliche Arbeitsweise der PCR können beispielsweise für das Unvermögen in Betracht kommen mehr als 90% Hemmung mit 3TC, selbst bei 300 nM, zu erzielen. Jedes Experiment umfasste Kontrollen um sicherzustellen, dass die PCR im Bereich von DNA-Konzentrationen durchgeführt wurde, in denen die Reaktion zu der Menge an DNA in der Probe proportionale Ergebnisse ergibt. Die Auflösung ist etwa 3fach, d.h. 3fache Unterschiede in den DNA-Konzentrationen können nachgewiesen werden. Das Unvermögen, durchweg weniger als 3-fache Unterschiede nachweisen zu können, erklärt wahrscheinlich, dass 3TC allein beim Erreichen von mehr als 90% Hemmung scheiterte. Dies legt nahe, dass bei der PCR ein sehr hohes Niveau der Hemmung erreicht werden muss, um diese nachzuweisen. Folglich ist die Tendenz für drei getrennte Zeitpunkte klar: die kombinierte Wirkung von 3TC plus N-Nonyl-DNJ ist größer als die jeder Verbindung allein oder die additive Einzelwirkung jeder Verbindung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der IC-50 für 3TC von etwa 60 nM auf etwa 0,48 mM verschoben wurde, wenn 0,016 µg/ml N-Nonyl-DNJ zugegen sind.

Beispiel 4

Anti-Hepatitis-B-Virus Wirkung von N-Nonyl-DNJ allein in einem Waldmurmeltier-Modell

[0061] Zur Bewertung der Wirksamkeit von N-Nonyl-DNJ in Kombination mit 3TC (oder anderen Nukleosid- oder Nukleotid-Analoga) gegen das Hepatitis-B-Virus in einem Waldmurmeltier-Tiermodell, wurde zuerst ein Monotherapie-Versuch unter Verwendung von N-Nonyl-DNJ allein durchgeführt. Dies war erforderlich, um festzulegen, falls N-Nonyl-DNJ irgendeine Anti-HBV-Wirkung beim Waldmurmeltier haben sollte und, falls N-Nonyl-DNJ eine nützliche Wirkung haben sollte, eine Kombinationstherapie auf der Basis der Dosis-Reaktions-Beziehung dieses Arzneimittels allein zu konzipieren.

[0062] Deshalb wurde 5 Gruppen mit jeweils 4 Tieren (alle Gruppen bestanden aus Tieren beider Geschlechter, außer bei den Kontrollen waren es jeweils zwei jeden Geschlechts) für Dosisgaben von 0, 12,5, 25, 50 und 100 mg/kg/Tag bei zweimaliger täglicher oraler Einnahme eingeteilt. Es handelte sich um im Labor aufgezogene Wildtiere. Alle Tiere wurden als Neugeborene mit dem Murmeltier-Hepatitisvirus (WHV) infiziert und in serologischen Tests als positiv für das WHV-Oberflächenantigen getestet. Blutproben wurden eine Woche vor Dosisgabe (-1 Woche), sofort nach Dosisgabe (0 Wochen), wöchentlich während der Dosisgabe (1, 2, 3 und

4 Wochen) und nach Beendigung der Dosisgabe (5, 6, 8 und 10 Wochen) entnommen.

[0063] Es gibt zwei Verfahren zur Messung der Arzneimittelwirksamkeit: Verminderung der HBV-Gesamt-DNA (gemessen mit quantitativer PCR) und Verminderung der HBV-DNA aus Kapsiden mit intaktem Oberflächenglycoproteinen, was die aktive Form des Virus darstellt (gemessen in einem ELISA-ähnlichen Immunpräzipitationsassay gefolgt von quantitativer PCR). Zellkulturversuche mit N-Nonyl-DNJ zeigten wenig oder keine Wirkung dieser Verbindung auf HBV-Gesamt-DNA, aber eine deutliche Wirkung auf die immunpräzipitierte DNA (IPDNA). Nicht überraschenderweise ist der IPDNA-Assay recht variabel; als partielle Kompensation dafür wurden vier Assays durchgeführt, die jeweils Proben aller Tiere, aber unterschiedliche Probenansätze für die Studienwochen enthielten.

[0064] Um die Ergebnisse zusammenzufassen, zeigte N-Nonyl-DNJ keine Auswirkung auf die HBV-Gesamt-DNA-Messungen, die für alle Dosisstufen während des Vor-Dosisgabeanteils und während des Dosisgabeanteils der Studie im Wesentlichen konstant waren. Auf der anderen Seite waren die IPDNA-Spiegel während des Studienzeitraums nicht konstant. Die Tiere mit niedriger Dosis zeigten eine Tendenz zu steigenden Spiegeln von IPDNA während des Dosisgabezeitraums (0-4 Wochen), während Tiere mit höheren Dosisgaben eine Tendenz zu abnehmenden Spiegeln von IPDNA über denselben Zeitraum zeigten. Legte man eine Gerade durch die wöchentlichen Reaktionen jedes Tieres, ergab sich ein deutlicher Unterschied in der Steigung dieser Geraden entweder auf Grund der Dosierung oder der Plasmaspiegel des Arzneimittels. Die Arzneimittelplasmaspiegel waren ebenfalls recht variabel: Tiere mit den niedrigsten Plasmaspiegeln in ihrer Dosisgruppe hatten niedrigere Plasmaspiegel als Tiere mit den höchsten Plasmaspiegeln aus der nächst niedrigeren Dosierungsgruppe. Es gab bei keiner der Messungen Unterschiede zwischen den Reaktionen männlicher und weiblicher Tiere.

Plasmaspiegel

[0065] Es gab kein klares Muster in den Änderungen der Plasmaspiegel von N-Nonyl-DNJ, die in Relation zur Woche der Dosisgabe oder zum Zeitpunkt der vorigen Dosisgabe hätten gesetzt werden können. Da die Plasmaspiegel bei einem Tier während der Dosisgabe einigermaßen konsistent waren, wurde der mittlere Plasmaspiegel jedes Tieres für die nachfolgende Modellbildung herangezogen. Die Plasmaspiegel für jede Woche des Dosisgabezeitraums wurden für jedes Tier über die Dosis aufgetragen (eine geringe Menge an „statistischem Hintergrundrauschen“ wurde den Dosispiegeln hinzugefügt, damit die Punkte, die bei dem Auftrag übereinander lagen, voneinander zu unterscheiden waren) ([Fig. 2](#)).

HBV-DNA

[0066] Die HBV-Gesamt-DNA-Spiegel waren für jedes Tier im Wesentlichen über die Zeit konstant (Ergebnisse nicht gezeigt). Es gab einen schwachen Hinweis auf eine Dosis-Reaktions-Beziehung mit abnehmenden Virusspiegeln bei zunehmenden Arzneimittelspiegeln, außer dass drei Tiere bei der höchsten Dosis sehr hohe Virusspiegel hatten. Es ist nicht möglich, die Schlussfolgerung zu ziehen, dass es irgendeine Beziehung zwischen der N-Nonyl-DNJ-Dosis und der HBV-Gesamt-DNA gibt. Es ist möglich, dass es zwei Populationen von Versuchstieren gibt, nämlich Responder (wie Versuchstier r) und Non-Responder (wie die Versuchstiere i, m und d), aber es sind mehr Daten erforderlich, um an diesem Punkt eine sichere Schlussfolgerung zu gestatten.

Immunpräzipitierte HBV-DNA

[0067] Es bestanden erhebliche Schwankungen bei den IPDNA-Assays, sowohl zwischen einzelnen Assay-Durchläufen als auch innerhalb eines Assay-Durchlaufs (Ergebnisse nicht gezeigt). Trotzdem war es möglich, während der Wochen 0-4 eine Steigung zu beobachten und auszugestalten, die allgemein bei Tieren mit niedrigen Dosisgaben zunimmt und bei Tieren mit hohen Dosisgaben abnimmt. Diese Änderung in der Steigung war statistisch signifikant ($p < 0,005$).

[0068] Bevor den Ergebnissen ein Modell zugeordnet wurde, wurde eine Log-Transformation angewandt, weil 1) die Varianz bei IPDNA bei zunehmenden IPDNA-Werten zunimmt; die Log-Transformation ergibt Werte mit einer nahezu konstanter Varianz, und 2) es erwartet wird, dass Arzneimittelwirkungen als konstanter Faktor auf der IPDNA-Ebene erscheint. Da es bei IPDNA Null-Werte gibt, wurde ein geringer Wert (etwa die Hälfte des kleinsten oberhalb von Null liegenden Wertes) vor der Log-Transformation auf alle Werte hinzugefügt.

[0069] Zwei Ansätze wurden verwendet, um die Änderungen in der Steigung bezüglich „Woche mit N-Nonyl-DNJ-Dosis“ zur Modellbildung zu benutzen: ein lineares Modell und ein nicht-lineares Modell. Beide Ansätze

ze gehen davon aus, dass das (lineare) Ausmaß der Log(IPDNA)-Messung über den Dosierungszeitraum die „richtige“ Messung zur Wiedergabe der Arzneimittelwirkung auf das Virus ist. Beide Ansätze sind phasenweise geeignet, und die erste Phase haben beide Ansätze gemeinsam. Zuerst ist ein Regressionsmodell in Form einer einfachen Geraden geeignet, das die Wochen 0-4 zur Vorhersage für Log(IPDNA + 10) getrennt für jedes Tier bei Kombination der Durchläufe benutzt. In der zweiten Phase ist die Reaktionsvariable die der ersten Phase angepasste Steigung.

[0070] Bei dem linearen Ansatz ist ein Modell mit einer Steigung über die Woche als Reaktion darauf, wo ein Durchlauf als ein Block angesehen wird, die Dosis eine signifikante Wirkung hat (fast diese gesamte Wirkung beruht auf Steigung gegenüber Dosis) und der relevante Fehler beim Testen der Dosiswirkung die Schwankung zwischen gleichbehandelten Tieren (nach Anpassung der Durchläufe als Blöcke) ist, geeignet. Dies ist ähnlich zur Verwendung der Kalibrierungsergebnisse innerhalb jedes Durchlaufs, um zuerst die Ergebnisse jeden Durchlaufs an die übliche Virus-DNA-Konzentration anzupassen; der Unterschied hier ist, dass die Ergebnisse von den Waldmurmeltieren vielmehr zur Durchlaufsanpassung als nur als Kalibrierungsergebnisse verwendet werden.

[0071] Bei dem nicht-linearen Ansatz wird ein logistisches Modell mit vier Parametern mit der Steigung über die Woche als Reaktion und der Dosis als Prädiktor angepasst. Wiederum wird ein Durchlauf als Block angesehen, weil aber kein Durchlauf alle Wochen umfasst, ist es nicht möglich, die Blockzuordnung in dem nicht-linearen Ansatz vollständig wiederzugeben. Trotzdem ergibt das nicht-lineare Modell einen EC-50-Wert von 7,88 mg/kg/2×tägliche Dosis. Die beobachtete durchschnittliche maximale Steigung war 2,71 zuzüglich Log(IPDNA µg/ml/Woche) oder eine Zunahme von etwa 150%/Woche, die für N-Nonyl-DNJ beobachtete durchschnittliche minimale Steigung 0,31 minus Log(IPDNA µg/ml/Woche oder etwa eine Abnahme von etwa 25%/Woche. Die Steigungen, das angepasste Modell, die aus dem Modell geschätzten Parameter und der ungefähre Standardfehler für diese Parameter sind in [Fig. 3](#) gezeigt. Die Ergebnisse zeigen eine ungefähre wirksame Monotherapie-Dosis von N-Nonyl-DNJ bei Waldmurmeltieren von etwa 16 mg/kg/Tag. Sowohl bei Waldmurmeltieren als auch bei Menschen kann die wirksame Dosis sowohl des N-Alkyl-DNJ und des damit als antivirales Mittel verabreichten Nucleosids oder Nucleotids in zwei gleichen täglichen Unterdosen (d.h. zweimal täglich) verabreicht werden.

[0072] [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) zeigen Buchstaben zur Bezeichnung von Tieren. Tabelle 2 zeigt zwei der für die Tiere verwendeten Codes, das Geschlecht und die Dosis.

TABELLE 2

Tier-Codierungen, Geschlecht und Dosis

Tier-Nummer	Buchstaben-Code	Geschlecht	Dosis
F95343	b	W	0
M96364	n	M	0
F96304	k	W	0
F96301	j	W	0
M96285	h	M	6,25
F96283	g	W	6,25
F96391	o	W	6,25
M96305	l	M	6,25
F96271	f	W	12,5
M96256	e	M	12,5
M96404	s	M	12,5
F96392	p	W	12,5
F96163	c	W	25
M96414	t	M	25
F96393	q	W	25
M95322	a	M	25
M96286	i	M	50
F96231	d	W	50
F96402	r	W	50
M96363	m	M	50

Beispiel 5

Antivirale Studien für den Aktivitätstest von N-Nonyl-DNJ in Kombination mit 3TC im Waldmurmeltiermodell der Hepatitis-B-Virus-Infektion

[0073] Die kombinierte Aktivität von N-Nonyl-DNJ und dem Nukleosid-Analogon 3TC kann unter Verwendung des Waldmurmeltier-Modells der Hepatitis-Virus-Infektion bewertet werden. 28 Waldmurmeltiere mit persistenter Hepatitis-Virus-Infektion (WHV) können eingesetzt werden. Gruppen von Waldmurmeltieren werden oral mit 3TC allein (einmal täglich), mit N-Nonyl-DNJ allein (zweimal täglich) oder mit einer Kombinationen beider Arzneimittel behandelt. Die antivirale Aktivität der Einzelarzneimittel und der Kombinationen können durch Messung der WHV-DNA im Serum während der Behandlung und durch Vergleich der behandelten Gruppen zu den mit Placebo behandelten Kontrollgruppen bewertet werden.

[0074] 28 Waldmurmeltiere mit etablierter, persistenter WHV-Infektion können eingesetzt werden, die alle während ihrer ersten Lebenswoche experimentell mit WHV infiziert wurden. Alle können zum Zeitpunkt des Studienbeginns WHsAg positiv sein.

[0075] Insgesamt können 8 Versuchsgruppen eingesetzt werden. Waldmurmeltiere können auf den Grundlage von Geschlecht, Körpergewicht und Alter jeweils den Gruppen zugeordnet werden. 3TC kann oral als wässrige Suspension von Epivir(Glaxo-Wellcome)-Tabletten einmal täglich verabreicht werden. N-Nonyl-DNJ kann

ebenfalls in wässriger Suspension verteilt auf zwei Dosen oral verabreicht werden. Der Behandlung mit den beiden Arzneimitteln kann die Verabreichung von 4 bis 5 ml eines halbsynthetischen flüssigen Waldmurmeltierfutters folgen, um die vollständige Aufnahme der Arzneimittel sicherzustellen.

[0076] Die Versuchsgruppen können wie folgt sein:

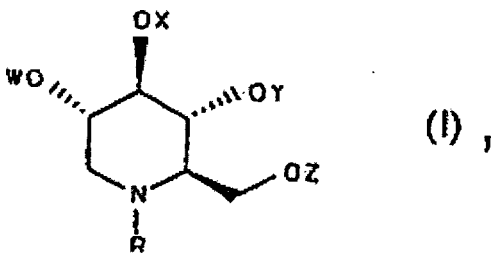
Gruppe ID	Nummer	3TC (mg/kg/Tag)	N-Nonyl-DNJ (mg/kg/Tag)
1	4	0,0	0,0
2	3	3,0	0,0
3	3	9,0	0,0
4	3	0,0	4,0
5	3	0,0	12,0
6	4	1,5	2,0
7	4	4,5	6,0
8	4	9,0	12,0

[0077] Die Waldmurmeltiere können narkotisiert (50 mg/kg Ketamin, 5 mg/kg Zylazin), gewogen und vor der ersten Behandlung, in wöchentlichen Intervallen während der 6wöchigen Behandlungsphase und 1, 2 und 4 Wochen nach Abschluss der Behandlung Blutproben entnommen werden. Serum kann gesammelt und in Aliquots aufgeteilt werden. Ein Aliquot kann zur Analyse der WHV-DNA mit Dot-Blot-Hybridisierung und für die ELISA-Bestimmung von WHsAg vor der Behandlung und am Ende der Behandlung verwendet werden. Ein zweiter Aliquot kann in einem Proben-Archiv verbleiben. Weitere Serumaliquots können zur Arzneimittelanalyse und für spezielle WHV-DNA-Analysen verwendet werden.

[0078] Für die somit beschriebene Erfindung wird es offensichtlich sein, dass dasselbe auf viele Arten variiert werden kann.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer Hepatitis-Virusinfektion, bestehend aus einer ersten Menge einer N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung der Formel [1]



worin:

R aus der Gruppe bestehend aus geradkettigem Alkyl mit einer Kettenlänge von C₆ bis C₁₂ ausgewählt ist, und W, X, Y und Z jeweils unabhängig voneinander aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und Butanoyl ausgewählt sind; und

einer zweiten Menge einer antiviralen, aus der Gruppe bestehend aus 2',3'-Didesoxycytidin, (-)-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin, (-)-2'-Desoxy-3'-thiacytidin-5'-triphosphat ausgewählten Verbindung und Mischungen davon; und

einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, Verdünnungsmittel oder Hilfsstoff; und

worin die erste und zweite Menge der Verbindungen zusammen eine Anti-Hepatitisvirus wirksame Menge dieser Verbindungen umfassen.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin W, X, Y und Z jeweils Wasserstoff sind.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, worin R Nonyl ist.
4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin W, X, Y und Z jeweils Butanoyl sind.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 4, worin R Nonyl ist.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin die N-substituierte 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung aus der Gruppe bestehend aus N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit und N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucittetraburat ausgewählt ist und die antivirale Verbindung (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat ist.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, worin die N-substituierte 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit ist.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin die erste Menge der N-substituierten 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucit-Verbindung im Bereich von 0,1 bis 100 mg liegt.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin die zweite Menge der antiviralen Verbindung oder deren Mischung im Bereich von 0,1 mg bis 500 mg liegt.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Behandlung einer Hepatitis-B-Virusinfektion bei einem menschlichen Patienten, umfassend von 0,1 mg bis 100 mg N-(n-Nonyl)-1,5-didesoxy-1,5-imino-D-glucit und von 0,1 mg bis 500 mg (-)-2'-Desoxy-3'-thiocytidin-5'-triphosphat.
11. Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 1 bis 10 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Hepatitis-Virusinfektion.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

FIG.1

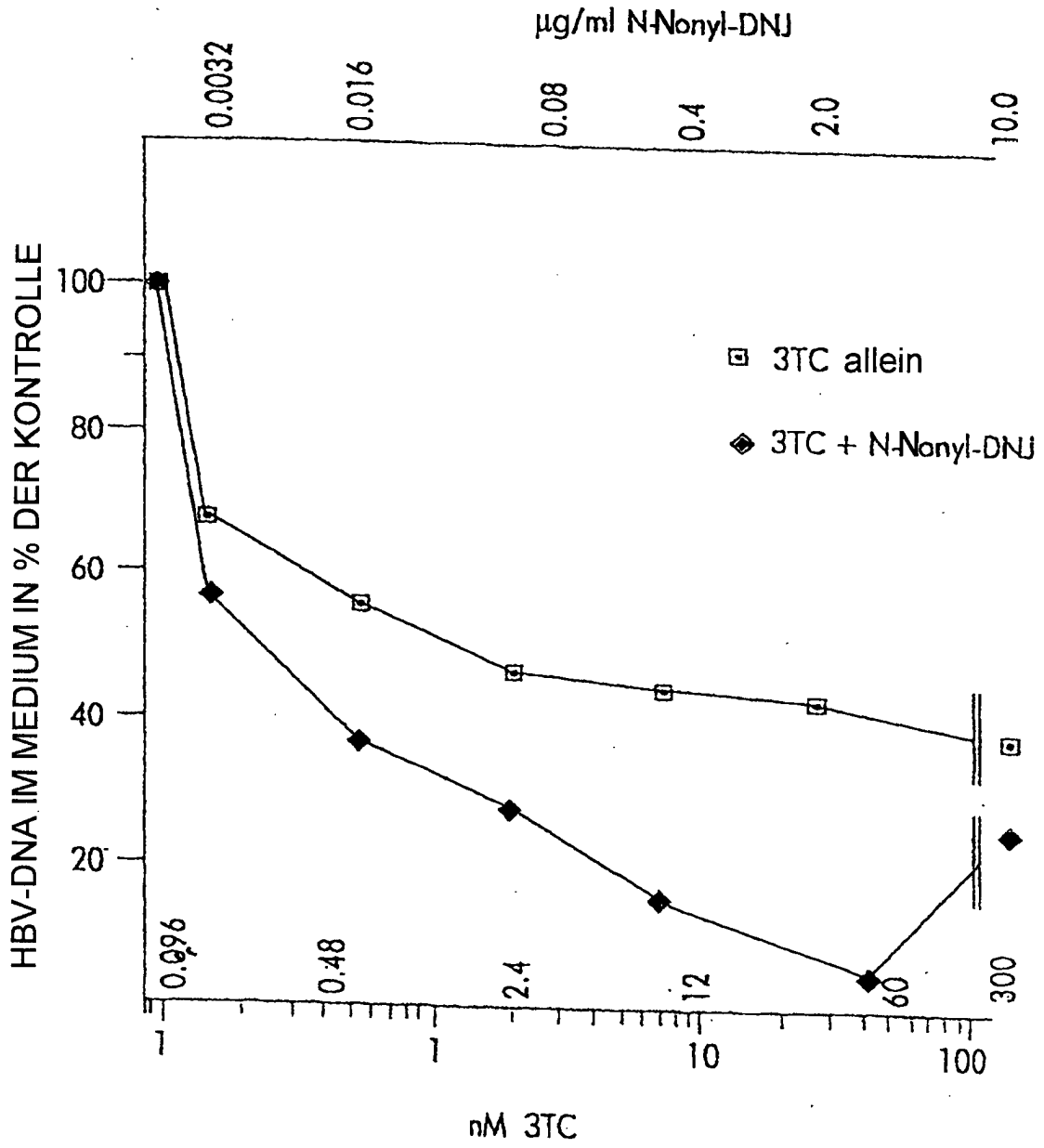


FIG.2

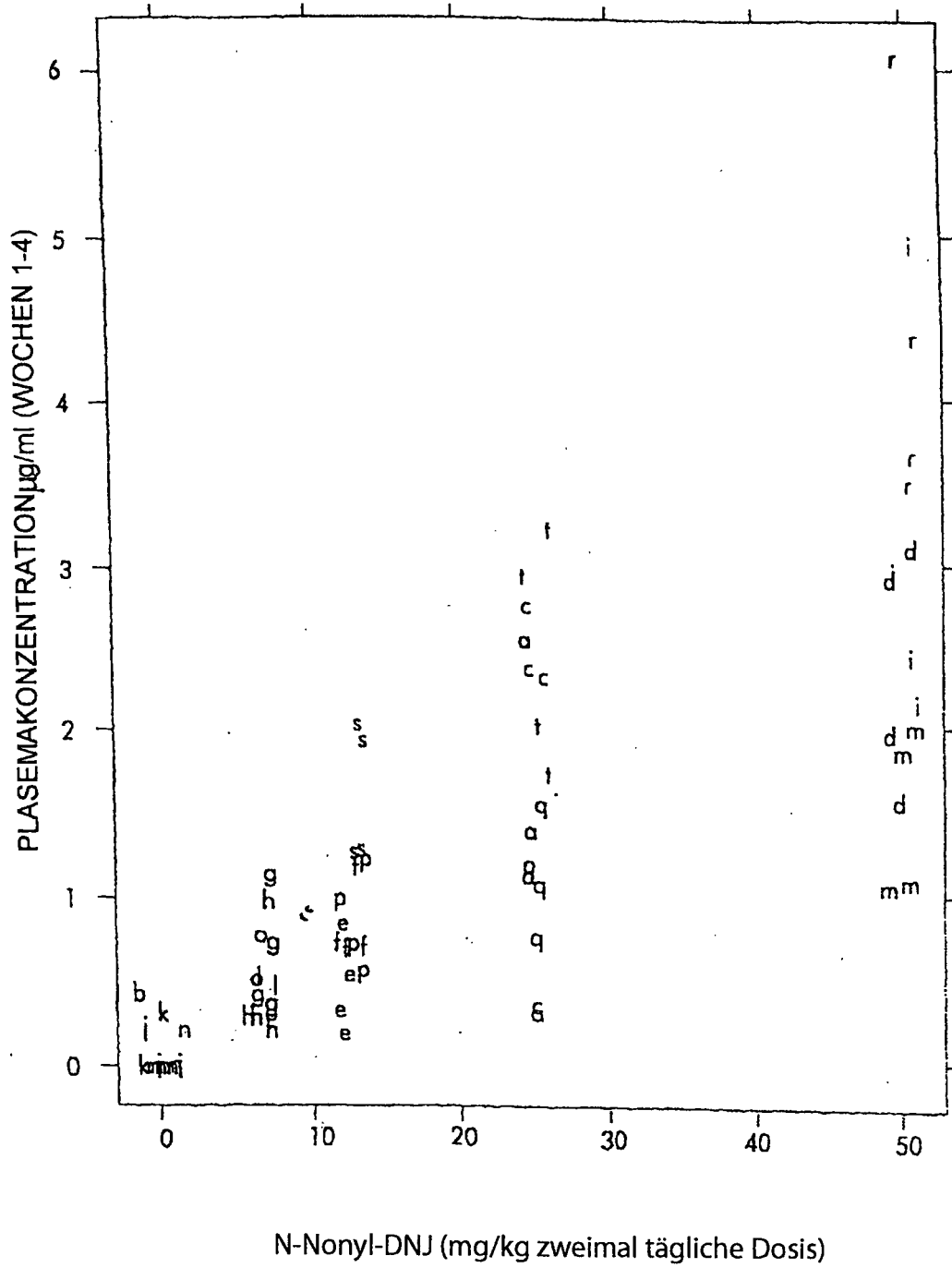


FIG.3

