



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 24 421 T2 2005.03.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 007 043 B1

(51) Int Cl.⁷: A61K 31/445

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 24 421.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/00031

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 901 673.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/030219

(86) PCT-Anmeldetag: 13.01.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 16.07.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 14.06.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 09.06.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.03.2005

(30) Unionspriorität:

782321 13.01.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Monsanto Co., St. Louis, Mo., US

(72) Erfinder:

PLATT, M., Frances, Oxford OX1 3QU, GB;
NEISES, R., Gabrielle, Chesterfield, US; DWEK, A.,
Raymond, Oxford OX1 3QU, GB; BUTTERS, Terry
D., Oxford OX1 3QU, GB

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Behandlung von lysosomalen Speicherkrankheiten mit ZNS-Beteiligung

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 eingelebt, 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 UND GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Erfindung betrifft die Verwendung einer Arzneimittelzubereitung zur Behandlung von lysosomalen Speicherkrankheiten unter erheblicher Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS). Diese Krankheiten werden durch genetische Mutationen ausgelöst, die zum Fehlen oder zur Defizienz lysosomaler Enzyme führen. Sie beinhalten zum Beispiel die Tay-Sachs-Erkrankung, die Sandhoff-Erkrankung, die GM1-Gangliosidose und die Fabry-Erkrankung.

[0002] Eine Literaturliste der in Klammern angegebenen Nummern ist am Ende angehängt.

TAY-SACHS-ERKRANKUNG

[0003] Dies ist eine tödlich verlaufende erbliche Störung des Fettstoffwechsel, die sich aufgrund einer Defizienz des A-(sauren)-Isoenzymes der B-Hexosaminidase, insbesondere im ZNS-Gewebe manifestiert. Die Defizienz des A-Isoenzymes wird durch Mutationen im HEXA-Gen ausgelöst, das für die α-Untereinheit der β-Hexosaminidase kodiert.

[0004] Tay-Sachs-Erkrankung ist ein Prototyp für eine Gruppe von durch einen fehlerhaften GM2-Gangliosid-Abbau gekennzeichneter Störungen, der GM2-Gangliosidosen. Das GM2-Gangliosid (monosialyliertes Gangliosid 2) akkumuliert in den Neuronen, was bereits im Fötus-Stadium beginnt.

SANDHOFF-ERKRANKUNG

[0005] Die Sandhoff-Erkrankung entsteht aus einer Defizienz sowohl der A- als auch B-(basischen)-Isoenzyme von β-Hexosaminidase. Mutationen im HexB-Gen, das für die B-Untereinheit der β-Hexosaminidase kodiert, verursachen die B-Isoenzym Defizienz.

GM1-GANGLIOSIDOSE

[0006] GM1-Gangliosidose wird durch eine Defizienz der β-Galactosidase ausgelöst, die zu lysosomaler Speicherung von GM1-Gangliosid (monosialyliertes Gangliosid 1) führt.

FABRY-ERKRANKUNG

[0007] Fabry-Erkrankung wird durch eine zu lysosomaler Ablagerung von Ceramidtrihexosid führende Defizienz der α-Galactosidase ausgelöst.

[0008] Krankheiten mit Speicherung von Glycosphingolipid (GSL) sind eine Gruppe human autosomal rezessiver Störungen (mit Ausnahme von X-ge-

koppelten Fabry-Erkrankungen), von denen jede eine charakteristische Pathologie zeigt (1). Sie entstehen durch Vererbung von Defekten in Genen, die für die für den vollständigen Abbau von GSLs innerhalb der Lysosomen erforderlichen abbauenden Enzyme kodieren.

[0009] Derzeit gibt es keine wirksame Therapie für die Tay-Sachs-Erkrankung oder andere lysosomale Speicherkrankheiten mit ZNS-Beteiligung. Vorgeschlagene Behandlungsstrategien dieser zur Debilität führenden und häufig tödlichen Krankheit beinhalteten Enzymersatz-Therapie, Gentherapie, Substrat-Deprivation, allogene Knochenmarktransplantation und Palliativmaßnahmen (2). Bei diesen (Behandlungsstrategien) ist eine Handhabung der Symptome bei den meisten dieser Störungen der einzige Behandlungsansatz, obwohl Transplantations-Techniken bei einigen dieser Krankheiten angewandt worden sind.

[0010] Gegenwärtig ist nur die einzige nicht-neuropathologische Form der Gaucher-Erkrankung (Typ 1), eine durch Glucocerebrosidase-Mangel gekennzeichnete Erkrankung, die mit hoher Frequenz bei Ashkenasi-Juden auftritt, unter Verwendung einer Enzymersatz-Therapie erfolgreich behandelt worden (3, 4). Jedoch sprechen die mit der Krankheit verbundenen Skelett-Abnormitäten nur langsam auf diese Behandlung an (4) und der seltene Typ 2 (akute Neuropathie, infantil) und der seltene Typ 3 (chronisch, juvenil) sind therapie-refraktär.

[0011] Dementsprechend werden neue Therapien zur Behandlung der lysosomalen Speicherkrankheit mit bedeutender ZNS-Beteiligung (neuronopathisch) dringend benötigt.

KURZBESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0012] Erfindungsgemäß wird eine Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur in vivo-Behandlung von an einer lysosomalen Speicherkrankheit mit bedeutender ZNS-Beteiligung leidenden Patienten bereitgestellt.

[0013] Diese Verwendung umfasst die Verabreichung einer kleinen, aber zur Inhibition der Speicherung wirksamen Menge eines N-Alkyl-Derivats eines 1,5-Iminozuckers, worin die Alkyl-Gruppe 2 bis 8 Kohlenstoffatome enthält und der 1,5-Iminozucker 1,5-Dideoxy-1,5-imino-D-glucitol oder ein O-acyliertes Pro-Arzneimittel des 1,5-Iminozuckers ist.

[0014] Bevorzugte 1,5-Iminozucker sind: 1,5-(Butylimino)-1,5-dideoxy-D-glucitol, das auch als N-Butyl-deoxynojirimycin oder unter der abgekürzten Bezeichnung N-Butyl-DNJ bekannt ist und 1,5-(Butylimino)-1,5-dideoxy-D-glucitol, Tetrabutyryl.

[0015] Die erfindungsgemäße Verwendung wird nachfolgend im Einzelnen anhand der bevorzugten Verbindung N-Butyl-DNJ veranschaulicht. Wie nachfolgend detailliert beschrieben, wird das Maus-Modell der Tay-Sachs-Erkrankung (9) verwendet, um die in vivo-Wirkung des 1,5-Iminozuckers bei der Behandlung der lysosomalen Speicherkrankheit mit erheblicher ZNS-Beteiligung zu veranschaulichen. Unter Verwendung dieses Maus-Modells wurde mit dem veranschaulichenden N-Butyl-DNJ gezeigt, dass dieses Mittel unerwarteterweise in der Lage war, die Blut-Hirn-Schranke in einem Ausmaß zu überwinden, das die Speicherung von GM2-Gangliosid im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Mäusen hemmt, die eine progressive Speicherung des Gangliosids zeigten.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0016] Es wird davon ausgegangen, dass die Erfindung durch die folgende, veranschaulichende, detaillierte Beschreibung in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen besser verstanden wird, wobei die mit den Ansprüchen abschließende Beschreibung dessen, was als Gegenstand der Erfindung anzusehen ist, speziell ausführt und ausdrücklich beansprucht wird.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] **Fig. 1** zeigt eine Dünnschichtchromatographie-Analyse (TLC) der GM2-Gangliosid-Speicherung in der Tay-Sachs-Maus in Gegenwart oder Abwesenheit von N-Butyl-Deoxynojirimycin (NB-DNJ). Die Mäuse wurden im Alter von 4 bis 12 Wochen mit NB-DNJ behandelt und ihre GSL(Glycosphingolipid)-Profile mit 4, 8 und 12 Wochen, bezogen auf die unbehandelte, entsprechend angepasste Kontrollgruppe, verglichen. Jede Spur auf der Dünnschichtchromatographie(TLC)-Platte stellt die aus dem Gesamthirn einer einzelnen Maus gewonnenen, gegenüber Base resistenten GSLs dar. Die Daten sind für jeden Zeitpunkt für mit fünf Mäusen durchgeführte Studien repräsentativ. Die Wanderungsposition des authentischen GM2-Standards ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

[0018] **Fig. 2** zeigt in zwei Teilen, A und B, die Hinderung der GM2-Speicherung bei 12 Wochen alten Mäusen. Um die Variation der GM2-Speicherung bei mit NB-DNJ behandelten Mäusen zu zeigen, wurde eine Gruppe von drei unbehandelten und drei NB-DNJ Mäusen im Alter von 12 Wochen verglichen.

[0019] **Fig. 2A:** Dünnschichtchromatographie(TLC)-Profile für GSLs aus Gesamthirn von drei unbehandelten Mäusen (–) und drei NB-DNJ behandelten Mäusen (+)

[0020] **Fig. 2B:** Densitometrische Bestimmung der GM2-Arten aus **Fig. 2A** ausgedrückt in willkürlichen Einheiten. Die Mittelwerte +/- der Standardabweichung werden gezeigt.

[0021] **Fig. 3** zeigt in vier Teilen, A bis D, die GM2-Speicherung im ventromedialen Hypothalamus bei unbehandelten und NB-DNJ behandelten Mäusen (im Alter von 12 Wochen). Gefrierschnitte wurden mit periodischem Schiffsschem-Reagenz (PAS) gefärbt, um die optische Darstellung der GM2-speichernden Neuronen zu ermöglichen.

[0022] **Fig. 3A:** Unbehandelte Maus, Vergrößerung 10fach,

[0023] **Fig. 3B:** NB-DNJ behandelte Maus, Vergrößerung 10fach,

[0024] **Fig. 3C:** Unbehandelte Maus, Vergrößerung 25fach und

[0025] **Fig. 3D:** NB-DNJ behandelte Maus, Vergrößerung 25fach.

[0026] Die Schnitte wurden ausgewählt, um sicherzustellen, dass Schnitte von zwei Tieren in Bezug auf die räumliche Orientierung innerhalb des Gehirns vergleichbar waren. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die von 4 verschiedenen Maus-Paaren abgeleiteten Daten. Die Abnahme der PAS-Färbung bei mit NB-DNJ behandelten Mäusen wurde auch in anderen Speicherbereichen des Gehirns beobachtet.

[0027] **Fig. 4** zeigt in vier Teilen, A bis D, die elektronenmikroskopische Untersuchung der Gehirne unbehandelter und mit NB-DNJ behandelter Mäuse.

[0028] **Fig. 4A:** GM2-Speicher-Neuron aus dem Gehirn einer unbehandelten Maus.

[0029] **Fig. 4B:** GM2-Speicher-Neuron aus dem Gehirn einer NB-DNJ behandelten Maus (der Maßstabsbalken für A und B bedeutet 1 µm).

[0030] **Fig. 4C:** MCBs (membranöse cytoplasmatische Körperchen) aus dem Gehirn einer unbehandelten Maus,

[0031] **Fig. 4D:** MCBs aus dem Gehirn einer mit NB-DHJ behandelten Maus (der Maßstabsbalken für C und D bedeutet 0,1 µm).

[0032] Die gezeigten Daten sind repräsentativ auf der Grundlage einer Analyse mehrerer Schnitte aus verschiedenen Speicherregionen des Gehirns von zwei unbehandelten und zwei mit NB-DNJ behandelten Tieren, wobei die Analyse bei zwei unabhängigen Gruppen durchgeführt wurde.

[0033] **Fig. 5** ist ein schematisches Fließdiagramm, das den Glycolipid-Abbau der lysosomalen Speicherkrankheit in Abwesenheit oder bei Defizienz relevanter Enzyme zum Abbau eines gegebenen Gangliosids oder Globosids zeigt. Bei den lysosomalen Speicherkrankheiten, die eine bedeutende ZNS-Beteiligung haben

- wird für GM1-Gangliosidose gezeigt, dass sie durch eine Defizienz der β -Galaktosidase ausgelöst wird,
- wird für die Tay-Sachs-Erkrankung, die eine GM2-Gangliosidose ist, gezeigt, dass sie durch eine Defizienz der β -Hexosaminidase A (saures Isoenzym) ausgelöst wird,
- wird für die Sandhoff-Erkrankung gezeigt, dass sie durch eine Defizienz der β -Hexosaminidasen A und B (saures und basisches Isoenzym) ausgelöst wird und
- wird für die Fabry-Erkrankung gezeigt, dass sie durch eine Defizienz der α -Galactosidase ausgelöst wird.

[0034] In einem anderen Schritt des GlcCer-Stoffwechsels wird für die Gaucher-Erkrankung gezeigt, dass sie durch eine Defizienz der β -Glucocerebrosidase ausgelöst wird. Für drei der unten in **Fig. 5** gezeigten Krankheiten, nämlich für die metachromatische Leukodystrophie (MLD), die Krabbe-Erkrankung und die Niemann-Pick-Erkrankung wird gezeigt, dass verschiedene Stoffwechselwege beteiligt sind, nämlich der GalCer-Stoffwechselweg und der Sphingomyelinase-(SM)-Stoffwechselweg.

[0035] Das Maus-Modell der Tay-Sachs-Erkrankung (9) ist ein nützliches Modell zum Nachweis der *in vivo*-Wirksamkeit des 1,5-Iminozuckers zur Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten mit erheblicher ZNS-Beteiligung, da dieses Modell alle Kennzeichen der Tay-Sachs-Erkrankung hat.

[0036] Die Tay-Sachs-Erkrankung entsteht aus Mutationen im HEXA-Gen, das für eine α -Untereinheit der β -Hexosaminidase kodiert, was zu einer Defizienz im A-Isoenzym führt. Das A-Isoenzym ist für den Abbau der GM2-Ganglioside verantwortlich. Bei Defizienz dieses Enzyms akkumuliert das GM2-Gangliosid zunehmend und führt zu schwerer neurologischer Degeneration (10).

[0037] Im Maus-Modell der Tay-Sachs-Erkrankung (erzeugt durch gezielte Disruption des HEXA-Gens) speichern die Mäuse in zunehmender Weise das GM2-Gangliosid, aber die Spiegel überschreiten nie die zur Auslösung der Neurodegeneration erforderliche Schwelle (9).

[0038] Dies liegt darin, dass in der Maus (nicht aber beim Menschen) eine Sialidase in ausreichendem Überschuss vorliegt, die GM2 zu GA2 (Asialo-Gangliosid 2) umwandeln kann, das dann durch das Hexo-

saminidase-B-Isoenzym abgebaut werden kann (11). Dieses Modell hat deshalb alle Kennzeichen der Tay-Sachs-Erkrankung, insofern als das GM2-Gangliosid im ZNS gespeichert wird, aber sich nie die neurologischen Symptome entwickeln, die für die menschliche Erkrankung charakteristisch sind (9, 11, 12).

[0039] Um somit die Erfindung weiter zu veranschaulichen, wurden die folgenden detaillierten Beispiele durchgeführt.

BEISPIEL I

[0040] Tay-Sachs-Mäuse wurden mit Standard-Mäusefutter bis zum Entwöhnungsalter (4 Wochen nach der Geburt) aufgezogen und dann wie folgt auf eine pulverförmige, NB-DNJ enthaltende Mäusefutter-Nahrung gesetzt:

[0041] Die Mäuse wurde von der Entwöhnung an (4 Wochen) mit pulverförmigem NB-DNJ-haltigem Mäusefutter als Nahrung gefüttert (ergänztes Ratten- und Mäuse-Futter 1, gemahlen, SDS Ltd., Witham, Essex, UK). Die Nahrung und die Verbindung (beides trockene Feststoffe) wurden vor der Verwendung gründlich gemischt, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 7 Tagen nach Mischen verwendet. Wasser stand den Mäusen zur freien Verfügung bereit. Die Mäuse wurden unter unsterilen Standardbedingungen gehalten. Den Mäusen wurde nach einem Dosierungsplan 4800 mg/kg/Tag NB-DNJ verabreicht, was einen Serumspiegel von etwa 50 μ M ergab.

[0042] Ähnliche Serumspiegel (unterer Spiegel im stabilen Fließgleichgewicht etwa 20 μ M) wurden beim Menschen während der Beurteilung dieser Verbindung als anti-virales Mittel erzielt, wenn die Patienten mit 43 mg/kg/Tag behandelt wurden (12).

[0043] Die Pharmakokinetik von NB-DNJ ist bei Mäusen im Vergleich zu Menschen um zwei Größenordnungen schlechter, was höhere Dosen bei Mäusen erfordert, um Serumspiegel im zuvor festgelegten therapeutischen Bereich von 5 bis 50 μ M bei GSL-Speicherstörungen zu erzielen (5–8).

BEISPIEL II

[0044] Die Wirkungen, die die Arzneimittelverabreichung auf die GM2-Speicherung in der Tay-Sachs-Maus hatte, wurden in verschiedenen Altersstufen durch Extraktion der Gesamthirnlipide, Abtrennen der basenresistenten GSL-Fraktion durch Dünnschichtchromatographie (TLC) (**Fig. 1**) und Identifizieren der GM2-Spezies auf der Grundlage der Co-Migration des authentischen GM2-Standards bestimmt. Das folgende Verfahren wurde eingesetzt:

[0045] Die Tiere wurden narkotisiert, mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, pH 7,2, perfundiert und das intakte Gehirn entfernt. Das Hirngewebe wurde manuell in Wasser homogenisiert, gefriergetrocknet und zweimal mit Chloroform : Methanol (2 : 1, v/v) während 2 h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C extrahiert.

[0046] Ein zu 5 mg Trockengewicht jeden Gehirns äquivalentes Volumen an Lösungsmittlextrakt wurde unter Stickstoff getrocknet, in 500 µl Chloroform/Methanol (1 : 1, v/v) aufgenommen, 83 µl 0,35 M NaOH in 96% Methanol zugegeben und bei Raumtemperatur während 90 min inkubiert. Die Proben wurden durch Zugabe von 83 µl H₂O : Methanol (9 : 1, v/v), 166,5 µl H₂O und 416 µl Chloroform ausgeschüttelt, in einer Microfuge während 1 min zentrifugiert und die Oberphase zurückbehalten. Die Unterphase wurde zweimal mit Folchs theoretischer Oberphase (Chloroform : Methanol : Wasser, 1 : 10 : 10 v/v/v) gewaschen, die Oberphasen zurückbehalten und mit der ursprünglichen Oberphase vereinigt.

[0047] Die Proben wurden zur Entfernung des Lösungsmittels unter Stickstoff partiell getrocknet und der wässrige Probenrückstand mit H₂O auf 1 ml gebracht und zum Entsalzen über Nacht gegen 2 l Wasser dialysiert. Die Proben wurden gefriergetrocknet, mit 500 µl Chloroform : Methanol 2 : 1, v/v, extrahiert, bei 13 000 rpm während 2 min zentrifugiert, der Überstand zurückbehalten, unter N₂ getrocknet, in 10 µl Chloroform : Methanol : 0,22% Calciumchlorid (60 : 35 : 8 v/v/v) resuspendiert und über Dünnschichtchromatographie (TLC) (Kieselgel 60-Platten, Merck, BDH, Poole, Dorset, UK) in Chloroform/Methanol/Calciumchlorid (60 : 35 : 0,22%) aufgetrennt, mit Orcinol besprüht und durch Erhitzen auf 80°C während 10 min sichtbar gemacht.

[0048] Im Alter von 4 Wochen war bei unbehandelten Mäusen in Übereinstimmung mit unlängst veröffentlichten Berichten über dieses Maus-Modell eine GM2 entsprechende Speicher-Bande nachweisbar (9). Wie auf der Grundlage veröffentlichter Studien (9) erwartet, nahm die Akkumulation von GM2 bei den unbehandelten Mäusen progressiv mit zunehmendem Alter der Mäuse zu (**Fig. 1**).

[0049] Jedoch gab es bei den NB-DNJ behandelten Mäusen im Alter von 8 Wochen (vier Wochen von der Geburt bis zur Entwöhnung unbehandelt, 4 Wochen NB-DNJ behandelt nach Entwöhnung) eine unerwartete Abnahme der Intensität der GM2-Gangliosid-Bande, was einen in Gegenwart des Arzneimittels reduzierten Spiegel an Speicherprodukt anzeigen. Die Mäuse wurden während 12 Wochen beobachtet und es ergab sich bei allen Tieren der mit NB-DNJ behandelten Gruppe unabhängig vom Alter eine konsistente Reduktion der gespeicherten GM2-Ganglioside (**Fig. 1**).

[0050] Um die Allgemeingültigkeit dieser Daten zu überprüfen, wurde eine Gruppe von 3 unbehandelten und drei NB-DNJ behandelten Mäusen über 12 Wochen untersucht (**Fig. 2A**). In allen Fällen war die Intensität der GM2-Bande bei den behandelten Tieren im Verhältnis zu den unbehandelten, angepassten Kontrollen signifikant reduziert. Bei der Durchführung einer Scanning-Densitometrie bezüglich der Dünnschichtchromatographie-Profile zeigte sich, dass eine etwa 50%ige Reduktion des GM2-Gangliosids bei den Gehirnen behandelter Mäuse bezogen auf die unbehandelten Kontrollen auftrat (**Fig. 2B**).

BEISPIEL III

[0051] Die Neuronen innerhalb der Gehirne an Tay-Sachs-erkrankter Mäuse, die für die in Gesamthirnlipid-Extrakten beobachtete GM2-Speicherung verantwortlich sind, sind auf gewisse spezielle Bereiche des Gehirns beschränkt (12). Es wurde deshalb unter Verwendung der Färbung mit periodischem Schiffschem Reagenz (PAS) eine cytochemische Analyse an Gewebschnitten von unbehandelten und während 16 Wochen mit NB-DNJ behandelten Mäusen durchgeführt, um das gespeicherte Gangliosid innerhalb der Speicherneuronen (9) wie folgt nachzuweisen:

[0052] Die Mäuse wurden narkotisiert, mit 4% Paraformaldehyd enthaltendem Phosphatpuffer, pH 7,4 perfundiert, die Gehirne herauspräpariert und bis zum Kryokonservieren und der Anfertigung von Dünnschnitten in Fixativ belassen. Die gefrorenen Gehirn-Dünnschnitte (7 µm) wurden auf Raumtemperatur erwärmt, mit periodischem Schiffschem Reagenz (PAS) gemäß den Anweisungen des Herstellers (Sigma, Poole Dorset UK) gefärbt, mit Ehrlichs Hematoxylin gegengefärbt und in DPX (BDH) auf Objekträger plaziert.

[0053] Es ist unlängst bei diesen unbehandelten Mäusen gezeigt worden, dass die Verteilung der mit PAS gefärbten Neuronen übereinstimmt mit der Immunfärbung mit einem für GM2-Gangliosid spezifischen Antikörper (9).

[0054] In den Speicherbereichen des Gehirns wie zum Beispiel im ventromedialen Kernbereich des Hypothalamus hatten die NB-DNJ behandelten Mäuse weniger PAS positive Neuronen und die Intensität der Färbung war bei jedem Neuron (**Fig. 3B** und **3D**), bezogen auf die unbehandelten, altersmäßig angepassten Kontrollhirnregionen, die extensive Speicherung zeigten (**Fig. 3A** und **3C**), reduziert.

[0055] Der Status der GM2-Speicherung in einzelnen Neuronen von Gehirnen behandelter und unbehandelter Mäuse wurde elektronenmikroskopisch (EM) wie folgt untersucht:

[0056] Die Mäuse wurden narkotisiert und durch Perfusion mit 2%-Paraformaldehyd, 2% Glutaraldehyd gemischt mit PBS fixierbehandelt. Das Gehirn wurde herauspräpariert und in derselben Fixierlösung über Nacht bei 4°C fixiert. Das Gehirn wurde zurechtgeschnitten und mit einem Vibrotom Schnitte von 100 µm angefertigt, die Schnitte 3 Mal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und mit Osmiumtetroxid (1% in 0,1 M Phosphat) während 35 min gefärbt. Die Schnitte wurden durch eine Waschserie mit Ethanol entwässert, mit Propylenoxid (2 × 15 min) behandelt und über Nacht bei Raumtemperatur in Durcupan-Harz eingebettet, auf Objekträger transferiert und während 48 h bei 60°C gehalten.

[0057] Die Speicherregionen des Gehirns wurden mikroskopisch ausgewählt, mit einer Skalpellklinge aus dem Dickschnitt herausgeschnitten und mit dem Kleber Loctite, Quick Tite, (Loctite Corp., Rock Hill, CT) auf Embed 800 Stub (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) befestigt. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat/Bleicitrat gefärbt und mit einem Hitachi 600 Mikroskop bei 75 kV betrachtet.

[0058] In den Speicherneuronen der Gehirne unbehandelter Tay-Sachs-Mäuse erschienen prominente, eine große Anzahl membranöser cytoplasmatischer Körperchen (MCBs) enthaltene Regionen des Cytoplasmas, die ihrerseits gespeicherte Fettprodukte enthielten (**Fig. 4A**). Im Gegensatz dazu erwies es sich bei den NB-DNJ behandelten Mäusen als schwierig, Speicherneuronen zu finden. Wenn jedoch Speicherzellen lokalisiert werden konnten, enthielten sie MCBs mit stark reduzierter Elektronendichte (**Fig. 4B**).

[0059] Darüber hinaus führte die innerhalb der Speicherneuronen unbehandelter Mäuse beobachtete extensive Speicherung bei den Organellen mit dem höchsten Speicherungsgrad zu Schwierigkeiten bei der Anfertigung von Dünnschnitten, wobei sich das Speicherprodukt häufig teilweise von der umgebenden Membran ablöste (**Fig. 4A**). In den Gehirnen NB-DNJ behandelter Mäuse war die Speicherung innerhalb der Neuronen in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen immer deutlich reduziert und als Ergebnis davon wurde das Ablösungsartefakt nicht beobachtet (**Fig. 4B**). Dies wurde übereinstimmend von zwei unabhängigen Gruppen beobachtet, die unabhängig voneinander das von diesen Mäusen stammende Material untersuchten. Ein repräsentativer Datensatz ist in **Fig. 4** gezeigt.

[0060] Die EM-Daten stimmen mit der cytochemischen Färbung überein, die zeigen, dass im Gehirn der behandelten Mäuse weniger Speicherneuronen auftreten, und dass die Speicherzellen bei den behandelten Tieren bezogen auf die unbehandelten Kontrollen einen reduzierten GM2-Speicherspiegel aufwiesen. Wenn die Morphologie einzelner MCBs

von unbehandelten und mit NB-DNJ behandelten Mäusen unter großer Vergrößerung verglichen wurde, zeigte sich ein tiefgreifender Unterschied in ihrer Morphologie.

[0061] Die NB-DNJ behandelten Mäuse hatten MCBs, die ein weniger elektronendichthes Speicherlipid enthielten (**Fig. 4D**), wiesen aber außerdem auch nicht die für die MCBs in Neuronen unbehandelter Mäuse charakteristischen auffallenden konzentrisch angeordneten Lamellen (**Fig. 4C**) auf. Stattdessen zeigten sie ein diffuses Speichermuster mit nur an der Peripherie der Organelle klar erkennbaren membranähnlichen Strukturen (**Fig. 4D**). Betrachtet man dies im Zusammenhang mit den cytochemischen Daten, zeigt sich, dass NB-DNJ in Übereinstimmung mit den biochemischen Daten bezüglich der Gesamthirn-Glycosphingolipide (GSLs) die lysosomale Speicherung verhindert und das Ausmaß der Speicherung pro Zelle und pro MCB dramatisch reduziert ist (**Fig. 1** und **2**).

[0062] Die hier dargestellten Daten zeigen, dass die orale Behandlung von Mäusen mit NB-DNJ gut vertragen wird und zu einer Inhibition der GSL-Biosynthese führt. Darüber hinaus konnte in der Tay-Sachs-Maus, die eine progressive Speicherung von GM2-Gangliosid aufweist, eine Speicherung als Folge der reduzierten GSL-Biosynthese verhindert werden. Dies zeigt, dass NB-DNJ die Blut-Hirn-Schranke in einem Ausmaß passieren kann, das die Speicherung verhindern kann.

[0063] Dies zeigt daher, dass die aus der NB-DNJ-Verabreichung folgende Substratdeprivation eine sinnvolle Strategie zur Behandlung der menschlichen lysosomalen GSL-Speicherkrankheit ist. Es wurde gezeigt, dass NB-DNJ *in vitro* den ersten Schritt in der GSL-Biosynthese, nämlich die durch die Glucosyl-Transferase katalysierte Biosynthese von GlcCer (5–7), spezifisch hemmt.

[0064] Da mehrere menschliche Glycosphingolipid(GSL)-Speicherkrankheiten die Speicherung von GSLs auf GlcCer-Grundlage umfassen, kann dieser therapeutische Ansatz bei all diesen Krankheitszuständen unabhängig vom speziellen Speicherprodukt angewandt werden. Dies würde die Gaucher Typ 2- und 3-Erkrankung, die Fabry-Erkrankung, die Tay-Sachs Erkrankung, die Sandhoff-Erkrankung, die GM1-Gangliosidose und die Fucosidose beinhalten.

[0065] Die gegenwärtige Anwendung von Enzymer-satz bei der Gaucher-Erkrankung ist durch die Tatsache beschränkt, dass das Enzym die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, und somit diese Therapie nur bei der keine Neuropathologie umfassenden Typ 1-Erkrankung wirksam ist. Das hier vorgelegte Ergebnis, dass die GSL-Depletion im

Zentralnervensystem erzielt werden kann, ist deshalb von größter Tragweite, da dies bedeutet, dass alle GSL-Speicherkrankheiten mit NB-DNJ behandelt werden können, da viele von diesen Neuropathologie im ZNS umfassen.

[0066] NB-DNJ scheint die Galactosyltransferase, die den Biosynthese-Stoffwechselweg initiiert, der zur Bildung von GalCer und Sulfatid führt, nicht zu hemmen. Es wird deshalb nicht angenommen, dass NB-DNJ gegen die Krabbe-Erkrankung und die metachromatische Leukodystrophie (MLD) wirksam ist. Diese Erkrankungen umfassen die Speicherung von GalCer bzw. Sulfatid wie in unten in **Fig. 5** gezeigt. Dies kann für die Erfahrung vorteilhaft sein, da die Bildung von GalCer und Sulfatid, die wichtige Bestandteile des Myelins sind, durch die Behandlung nicht beeinträchtigt wird. Es wären also die Myelinierung und die Myelininstabilität nicht beeinträchtigt.

BEISPIEL IV

[0067] Wenn in den obigen Beispielen I, II und III 1,5-(Butylimino)-1,5-dideoxy-D-glucitol durch eine äquivalente Menge irgendeiner der folgenden Verbindungen ersetzt wird, wurden im wesentlichen dieselben Hemmergebnisse erhalten:

- A) 1,5-(Hexylimino)-1,5-dideoxy-D-glucitol
- B) 1,5-(Butylimino)-1,5-dideoxy-D-glucitol, Tetra-butyrat,
- C) 1,5-(Hexylimino)-1,5-dideoxy-D-glucitol, Tetra-acetat.

[0068] Die Verbindungen B) und C) werden wie im US-Patent 5 003 072 beschrieben synthetisiert.

[0069] Bei der Behandlung der gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelten Patienten kann der Wirkstoff durch herkömmliche Verabreichungsweisen, vorzugsweise in Zubereitungen mit pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmitteln und Trägern verabreicht werden. Der Wirkstoff kann in Form des freien Amins oder in Form des Salzes verwendet werden. Pharmazeutisch annehmbare Formen des Salzes beinhalten zum Beispiel das Hydrochlorid-Salz.

[0070] Die zu verabreichende Wirkstoffmenge muss eine wirksame Menge sein, d. h. eine Menge, die von medizinischem Nutzen ist, aber keine toxischen Wirkungen zeigt, die die mit der Verwendung verbundenen Vorteile überwiegen. Es ist zu erwarten, dass die Tagesdosis für einen durchschnittlichen Erwachsenen normalerweise im Bereich von etwa 0,1 mg bis etwa 1000 mg Wirkstoff liegen sollte.

[0071] Der bevorzugte Verabreichungsweg ist oral in Form von Kapseln, Tabletten, Sirupen, Elixieren und dergleichen, obwohl auch eine parenterale Verabreichung gewählt werden kann. Geeignete Zube-

reitungen des Wirkstoffs in therapeutischer Dosisform in pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmitteln und Trägern können unter Bezugsnahme auf allgemeine Lehrbücher auf diesem Gebiet, z. B. Remingtons Pharmaceutical Sciences. Ed. Arthur Osol, 16. Ausgabe, 1980, Mack Publishing Co., Easton, PA, und 18. Ausgabe, 1990, durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden. Herkömmliche Verdünnungsmittel und Träger sind zum Beispiel Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Zucker, Stärke und derartige Substanzen.

LITERATURLISTE

1. Neufeld, E. F. (1991) Ann. Rev. Biochem., 60, 257–280.
2. Beutler, B. (1992) Science, 256, 794–799.
3. Barton, N. W., Brady, R. O., Dambrosia, J. M., Di Bisceglie, A. M., Doppelt, S. H., Hill, S. C., Mankin, H. J., Murray, G. J., Parker, R. I., Argoff, C. E., Grewal, R. P., Yu, K-T. und Mitarbeiter (1991) N. Eng. J. Med. 324, 1464–1470.
4. Beutler, B., Kay, A., Saven, A., Garver, P., Thurstton, D., Dawson, A. und Rosenbloom, B. (1991) Blood, 78, 1183–1189.
5. Platt, F. M., Neises, G. R., Dwek, R. A. und Butters, T. D. (1994) J. Biol. Chem., 269, 8362–8365.
6. Platt, F. M., Neises, G. R., Dwek, R. A. und Butters, T. D. (1994) J. Biol. Chem., 269, 27108–27114.
7. Platt, F. M. und Butters, T. D. (1995) Inhibitors of Glycosphingolipid Biosynthesis, Trends in Glycoscience und Glycotechnology, 269, 495–511.
8. Yamanaka, S., Johnson, M. D., Grinberg, A., Westphal, H., Crawley, J. N., Taniike, M., Suzuki, K. und Proia, R. L. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9975–9979.
9. Sandhoff, K., Conzelmann, E., Neufeld, E. F., Kocabek, M. M., und Suzuki, K. (1989) in The Metabolic Basis of Inherited Disease, Eds. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. und Valle, D. (McGraw-Hill, New York, Bd. 2, S. 1807–1839).
10. Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M. P., Crawley, J. N., Sandhoff, K., Suzuki, K. und Proia, R. L. (1995), Nature Genet. 11, 170–176.
11. Taniike, M., Yamanaka, S., Proia, R. L., Langman, C., Bone-Turrentine, T. und Suzuki, K. (1995) Acta Neuropathol. 89, 296–304.
12. Fischl, M. A., Resnick, L., Coombs, R., Kremer, A. B., Pottage, J. C., Fass, R. J., Fife, K. H., Powderly, W. G., Collier, A. C., Aspinall, R. L., Smith, S. L., Kowalski, K. G. und Wallemark, C-B. (1994) J. AIDS 7, 139–147.

Patentansprüche

1. Verwendung eines N-Alkyl-Derivats eines 1,5-Iminozuckers zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer lysosomalen Speicherkrankheit mit erheblicher Beteiligung des zentralen Ner-

vensystems (ZNS) einschließlich der Gaucher-Erkrankung Typ 2 und 3, aber ausgenommen der Gaucher-Erkrankung Typ 1, worin die Alkyl-Gruppe von 2 bis 8 Kohlenstoffatome enthält und der 1,5-Iminozucker 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucitol oder ein O-acyliertes Pro-Arzneimittel davon ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Alkyl-Gruppe Butyl ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin der 1,5-Iminozucker 1,5-Didesoxy-1,5-imino-D-glucitol und die Alkyl-Gruppe Butyl ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, worin der 1,5-Iminozucker zur Bildung des Tetrabutyrate O-acyliert ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin die lysosomale Speicherkrankheit die Tay-Sachs-Erkrankung ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

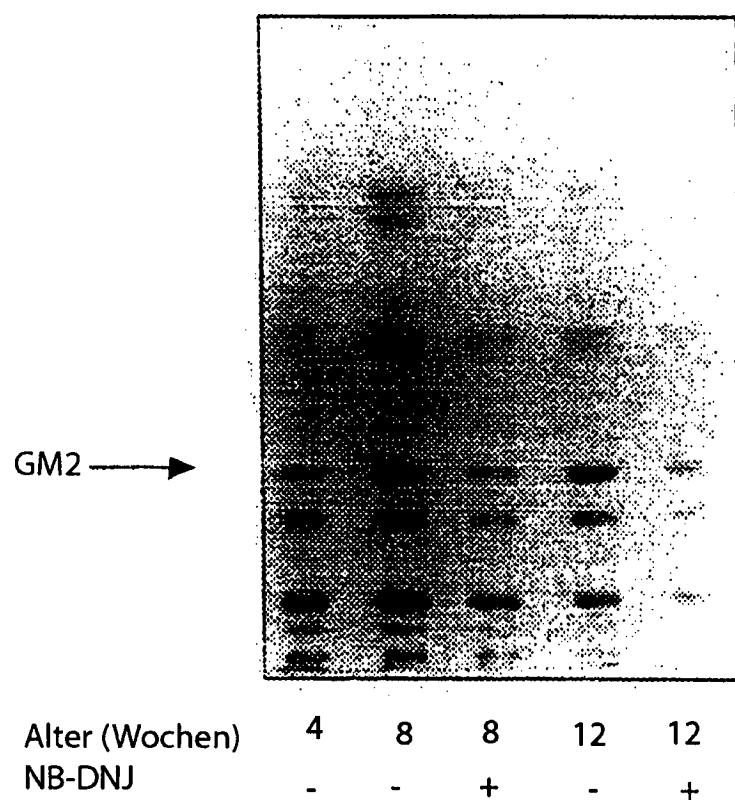


Fig. 1

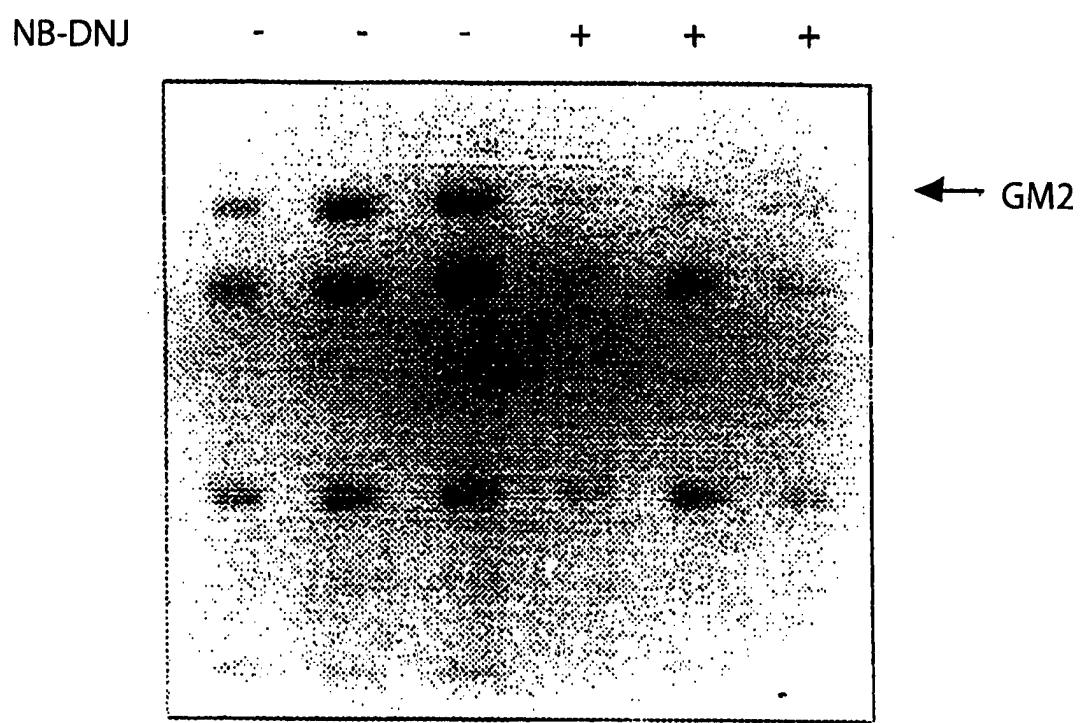


Fig. 2A

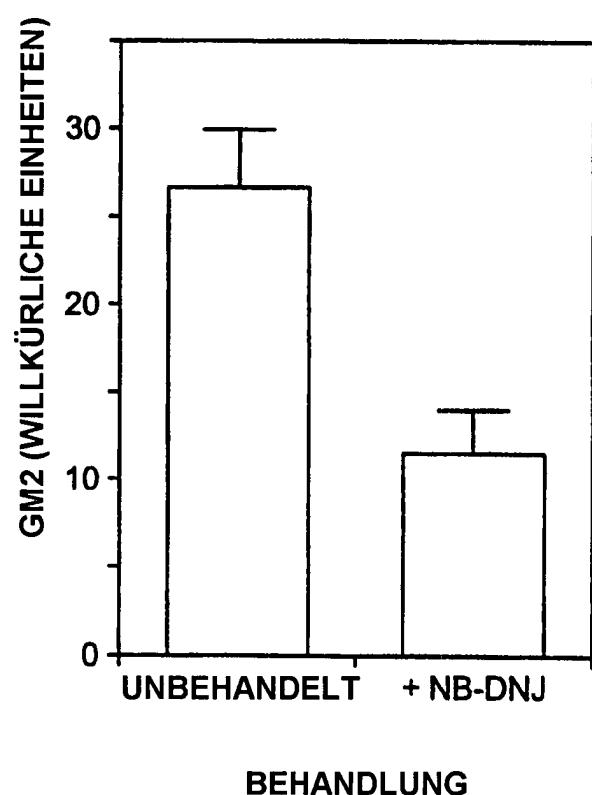


FIG. 2B

FIG. 3A



FIG. 3B

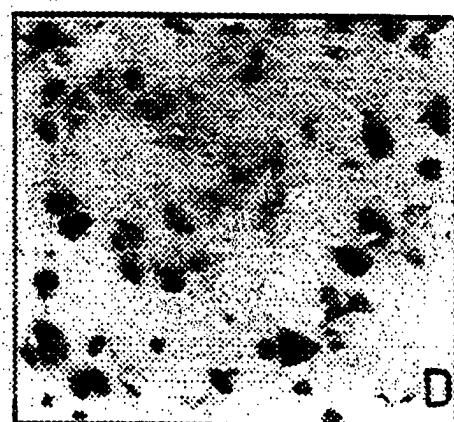
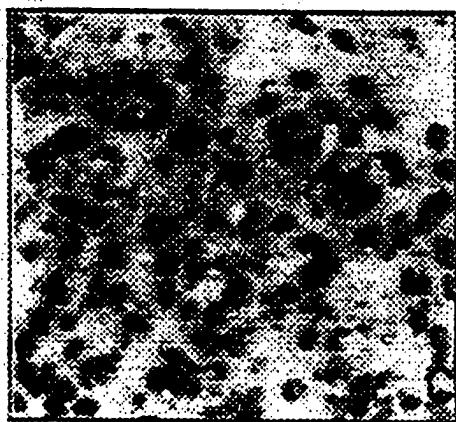
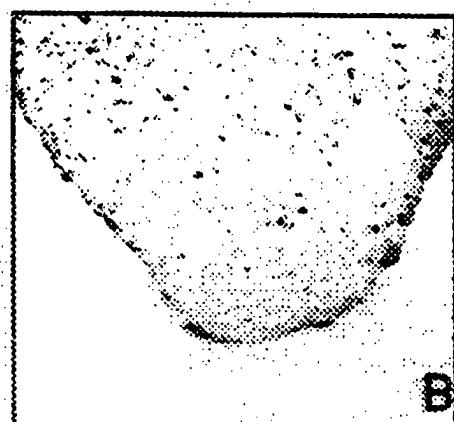


FIG. 3C

FIG. 3D

FIG. 4A



FIG. 4B

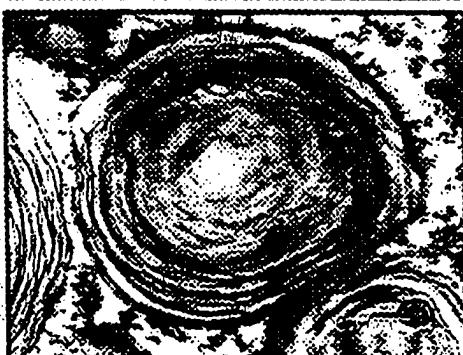


FIG. 4C

FIG. 4D

GLYCOLIPID-ABBAU

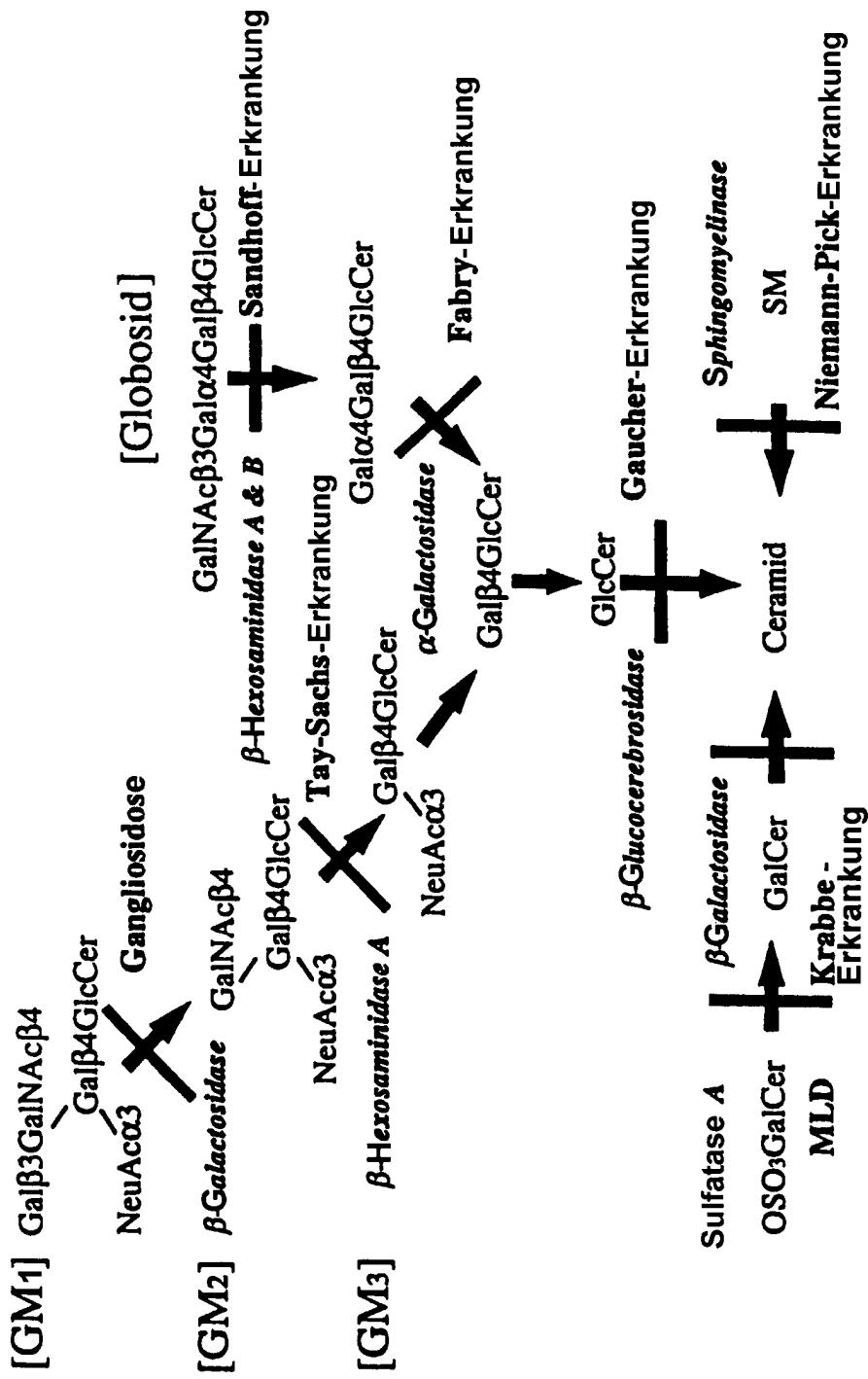


FIG. 5