



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

 Internationales Büro

 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE

 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/44</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/17072</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Mai 1997 (15.05.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02009</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Oktober 1996 (23.10.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 41 405.5 7. November 1995 (07.11.95) DE</p> <p>(71) Anmelder: ASTA MEDICA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; An der Pikardie 10, D-01277 Dresden (DE).</p> <p>(72) Erfinder: PERGANDE, Gabriela; Elisabethenstrasse 38, D-63071 Offenbach (DE). MÜLLER, Werner, E., G.; Semmelweisstrasse 12, D-65203 Wiesbaden (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SK, UA, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: USE OF FLUPIRTIN FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF DISEASES WHICH ARE ASSOCIATED WITH DAMAGE TO THE HAEMOPOIETIC CELL SYSTEM</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON FLUPIRTIN ZUR PROPHYLAXE UND THERAPIE VON ERKRANKUNGEN, DIE MIT EINER BEEINTRÄCHTIGUNG DES HÄMATOPOETISCHEN ZELLSYSTEMS EINHERGEHEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of flupirtin or the salts thereof as a drug for the prevention and treatment of diseases which are associated with damage to the haemopoietic cell system, for example lymphocytes. It is particularly important in the treatment of HIV-infected patients or AIDS patients.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Flupirtin oder dessen Salze als Arzneimittel zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, die mit einer Beeinträchtigung des hämatopoetischen Zellsystems, beispielsweise der Lymphozyten, einhergehen. Besonderer Bedeutung kommt dabei der Behandlung von HIV- infizierten/AIDS-Patienten zu.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Verwendung von Flupirtin zur Prophylaxe und Therapie von
Erkrankungen, die mit einer Beeinträchtigung des
hämatopoetischen Zellsystems einhergehen**

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Flupirtin oder dessen Salze als Arzneimittel zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, die mit einer Beeinträchtigung des hämatopoetischen Zellsystems, beispielsweise der Lymphozyten, einhergehen.

10

Flupirtin ist ein bekanntes eingeführtes zentral wirksames, nicht-opiates Analgetikum.

Seine analgetischen Wirkungen entfaltet Flupirtin über andere Wirkmechanismen als die Opiat/Opioid-Analgetika
15 (Nickel, B., Postgrad, Med. J. 63 (Suppl.3), 19 (1987); Szelenyi, I., Nickel, B., Borbe, H. O., Brune K., Br. J. Pharmacol. 143,89 (1989)). In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß Flupirtin sowohl auf der supraspinalen als auch auf der spinalen Ebene in das
20 nozizeptive Geschehen einzugreifen vermag (Carisson, K. H., Jurna, I., Eur. J. Pharmacol. 143,89 (1987); Bleyer, H., Carlsson K. H., Erkel, H. J., Jurna, I., Eur. J. Pharmacol. 151,259 (1988); Nickel, B., Aledter, A., Postgrad Med. J. 63 (Suppl.3) 41 (1987)).

25 Flupirtin wird auch bei akuten Schmerzzuständen, die durch Erkrankungen des Bewegungsapparates verursacht werden, zur Therapie verwendet.

Weiterhin wird Flupirtin erfolgreich bei Patienten mit degenerativen oder rheumatischen Erkrankungen eingesetzt.

30

Neben guten analgetische Eigenschaften verfügt Flupirtin über muskelrelaxierende Eigenschaften, so daß Flupirtin auch für die Behandlung von Muskelverspannungen oder bei Erkrankungen, die auf Muskelverspannungen beruhen, eingesetzt werden kann (DE 40 22 442).

Desweiteren wurde bei Untersuchungen der muskelrelaxierenden Wirkung von Flupirtin an der Ratte gefunden, daß die Flupirtin-Wirkung sich durch die excitatorische Aminosäure N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) hemmen läßt. Aufgrund dieser NMDA-antagonistischen Wirkung ist Flupirtin auch zur Behandlung von NMDA vermittelten ZNS-Erkrankungen, wie zum Beispiel zerebraler Ischämie, neurodegenerativer Erkrankungen, epileptischer Anfälle geeignet (DE 43 27 516).

Chemisch gesehen handelt es sich bei Flupirtin um 2-Amino-3-ethoxycarbonylamino-6-(p-fluor-benzylamino)-pyridin.

Die Synthese von Flupirtin und dessen pharmazeutisch verwendbaren Salze wird in den Patenten DE 17 95 858, DE 31 33 519 und DE 34 16 609 beschrieben.

20

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Flupirtin in der Lage ist, den apoptotischen Zelltod von Zellen des hämatopoetischen Zellsystems, beispielsweise der Lymphozyten, zu hemmen.

Damit eröffnet sich die Möglichkeit, Flupirtin zur Behandlung von Erkrankungen, die mit der Beeinträchtigung des hämatopoetischen Zellsystems einhergehen, einzusetzen.

Besondere Bedeutung kommt dabei der Behandlung von HIV-infizierten Patienten / AIDS-Patienten zu.

30

Anhand der pharmakologischen Untersuchungen soll die neue erfindungsgemäße Wirkung näher erläutert werden.

Pharmakologische Untersuchungen

5 **Materialien**

Flupirtin-Maleat [2-Amino-3-ethoxycarbonylamino-6-(p-fluorbenzylamino)-pyridin-maleat], zur Präparation von HIV-1-gp120 wurde der HIV-1 Virusstamm HTLV_{IIIB} eingesetzt (Popovic et al., 1984). Die erhaltene, isolierte gp120-Präparation war > 95% rein, wie durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde (Müller et al., 1988).

Antiretroviraler Versuchsansatz

15 Die Methodologie für den HIV-1-Ansatz wurde bereits früher beschrieben (Sarin et al., 1987). Zellen der menschlichen T-Lymphoblasten-Linie **CEM** (Einsaat-Konzentration: 1×10^5 Zellen/ml) wurden in Medium suspendiert und mit dem HIV-1-Virus (Stamm HTLV_{IIIB}) infiziert. Hierzu wurde das 50-fache einer 50%-Zellkultur-Infektionsdosis [CCID₅₀] gewählt. Eine CCID₅₀ ist diejenige infektiöse Dosis bei der 50% der Zellen pro ml Zellsuspension infiziert werden. 1 ml-Kulturen wurden für 5 Tage inkubiert. Flupirtin wurde den Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen 2 Stunden vor
20 der Infektion zugesetzt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde unter Anwendung des 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid [**MTT**] kolorimetrischen Testsystems bestimmt (Scudiero et al., 1988). Die Auswertung geschah mit einem ELISA-Reader, wie früher
30 publiziert (Müller et al., 1991). Nach der Inkubation machten die nichtinfizierten CEM-Zellen 2,16 und die infizierten Zellen 0,13 Verdoppelungsschritte durch.

Blutproben

Proben menschlichen peripheren Blutes wurden (i) von 12 HIV-1-infizierten homosexuellen Männern erhalten [mittleres Alter: 35 Jahre; Spanne: 22 - 43 Jahre] sowie (ii) von 5 8 gesunden, HIV-1-seronegativen und ansonsten risikogleichen Männern der nahezu gleichen Altersgruppe (mittleres Alter: 30 Jahre; Spanne: 23 - 35 Jahre) entnommen. Die Patienten wurden entsprechend der Klassifikation des "Centers for Disease Control (CDC)" 10 eingestuft (CDC, 1992). Die Untersuchungen mit HIV-1-seropositiven Patienten wurden mit Blutproben von asymptomatischen Virusträgern durchgeführt (CDC: A1, A2, mittlere CD4-Zellzahl 407/ μ l, Spanne: 209 - 698/ μ l). Keiner der Patienten zeigte Anzeichen von Tumorerkrankun- 15 gen, symptomatischen Infektionen oder war 10 Wochen vor der Blutentnahme einer immunsuppressiven Behandlung, z.B. mit Corticosteroiden, unterzogen worden.

Zellpräparationen und deren Behandlung

20 Mononukleäre Zellen [MNZ] wurden aus heparinisiertem Blut durch Zentrifugation durch einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten gewonnen und angereichert (Rossol et al., 1990). 0,5 x 10⁶ Zellen wurden in Kulturmedium in einem Endvolumen von 500 μ l kultiviert; als Medium wurde MEM-Medium 25 eingesetzt, das mit 10 mM HEPES-Puffer, 2,6% Natriumbicarbonat, 100 U/l Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 10% fötalem Kälberserum [FKS] und 1 mM Glutamat angereichert wurde. Wo angegeben, wurden die Zellen sofort nach Isolierung mit der chemischen Substanz behandelt.

30

Induktion der Apoptose mit reaktivem Sauerstoff

Reaktive Sauerstoff-Radikale wurden unter Anwendung des Hypoxanthin- [HX] und Xanthinoxidase [XOD] - Systemes hergestellt (Bruck et al., 1994).

35

MNZ wurden für 24 Stunden in einem Gesamtvolumen von 500 μ l MEM Medium (wie oben beschrieben) suspendiert.

Diesem Ansatz wurden 0 bis 80 mU/ml XOD und 1 mM HX

5 zugesetzt. Bei einer Konzentration von 80 mU/ml XOD (Sigma, München, FRG) unterlagen > 90% der Lymphozyten einem apoptotischen Zelltod.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden für die nachfolgenden Studien 10 mU/ml des Enzyms XOD und 1 mM HX eingesetzt.

10 Unter diesen Inkubationsbedingungen durchliefen etwa 50% der Zellen eine Apoptose. Es ist günstig, diesen Grad an Apoptose einzuhalten, wenn es zu testen gilt, ob eine bestimmte Verbindung einen potentiellen Inhibitor und/oder Stimulator von apoptotischem Zelltod darstellt.

15 Flupirtin wurde den Zellen 6 Stunden vor Zusatz des Sauerstoff-Radikal produzierenden Systemes zugegeben; die Inkubation wurde nach einem Tag abgeschlossen.

Analyse der Zellen mittels Durchfluß-Zytometrie

20 Die Apoptose wurde in einem Durchfluß-Zytometer FACScan (Becton-Dickinson) mit einer Argon-Laser-Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm, entsprechend der publizierten Methode, gemessen (Schmid et al., 1994). Die Lymphozyten wurden durch optische Methoden getrennt und somit

25 charakterisiert, dies geschah durch Kombination einer Vorwärts-Lichtstreuung als Maß für die Größe der Zellen [FSC] mit einer rechthöckigen Streuung als Maß für die Oberflächen-Beschaffenheit [SSC]. Zur Anfärbung apoptotischer MNZ-Zellen wurden diese mit 20 μ g/ml

30 7-Aminoactinomycin D [7-AAD] (Sigma), in PBS gelöst, für 20 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluß inkubiert.

Anschließend konnten die Zellen mit dem Durchfluß-Zytometer in der Färbelösung analysiert werden. Die rote Fluoreszenz, hervorgerufen durch 7-AAD wurde durch einen Filter der

35 Wellenlänge 650 nm erfaßt.

7-AAD penetriert in apoptotische Zellen aufgrund einer Desintegration der Zellmembran und färbt im Anschluß daran DNA über einen Interkalationsvorgang an. Die Datenanalyse erfolgte über das LYSIS II Programm.

- 5 Die mittleren Kanalzahlen wurden umgerechnet auf mittlere Fluoreszenz-Intensität, Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit.

**In situ-Fluoreszenzmarkierung mittels des TdT Ansatzes
10 sowie Oberflächenmarkierung**

- Um eine bestimmte Zell-Subpopulation, die einen apoptotischen Vorgang durchmacht, zu definieren, wurden die Zellen mit dem Terminal-Transferase-Systems [TdT] behandelt. Es wurde die Methode Gorczyca et al. (1993) mit
15 geringen Modifikationen eingesetzt. Zellen in Suspension wurden zweimal in PBS (Gibco) gewaschen und anschließend in 1%igem Paraformaldehyd (Riedel de Haen) für 10 Min. bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS
[dem 5% AB-Serum und 0,5% bovines Serum-Albumin (BSA)
20 zugesetzt waren] gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen pelletiert und in 50 µl einer 2,5 mM Kobalt-Chlorid-Lösung, der 0,5 nM Biotin-16-dUTP und 25 U TdT zugesetzt wurde, resuspendiert. Gepuffert war dieser Ansatz mit 200 mM Kalium-Kakodylat, 25 mM Tris-HCl und 0,25 mg/ml BSA; die
25 Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Min. entsprechend den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG). Die Zellen wurden anschließend zweimal in PBS
[5% AB-Serum und 0,5% BSA] gewaschen und in 100 µl einer gepufferter Farblösung, die 5 µg/ml Fluorescein-
30 Isothiocyanat [FITC]-markiertes Avidin [Zellanaly-
Reinheit]enthielt, resuspendiert. Zur gleichzeitigen Oberflächen-Markierung wurden die Zellen noch zusätzlich mit 20 µg/ml Phycoerythrin-markiertem monoklonalen Anti-
CD3-Antikörper (Becton-Dickinson) behandelt.
35 Die Fluoreszenz wurde mittels Durchfluß-Zytometrie, wie von Halliwell (1987) beschrieben, quantifiziert.

Ergebnisse

Behandlung von HIV-1 infizierten CEM-Zellen mit Flupirtin

5 CEM-Zellen wurden mit Flupirtin für 2 Stunden vorbehandelt und verblieben anschließend nicht-infiziert oder wurden in einem Parallel-Ansatz mit HIV-1 infiziert.

Nach 5 Tagen wurden die Zellzahlen in den betreffenden Ansätzen bestimmt. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht,
10 veränderte sich die Konzentration der Zellen sowohl in den nicht-infizierten als auch den infizierten Kulturen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Flupirtin nicht signifikant ($P > 0,1$).

Flupirtin wurde den Ansätzen in Endkonzentrationen zwischen
15 0,1 und 30 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Die Zell-Konzentration in den nicht-infizierten Ansätzen betrug 446.880 ± 31.020 Zellen/ml, in den HIV-1-infizierten Ansätzen 108.420 ± 6.710 Zellen/ml.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Flupirtin nicht toxisch auf
20 die Zellen wirkt, weiterhin aber auch keinen Einfluß auf eine HIV-1-Infektion in vitro unter den benutzten Inkubations-Bedingungen ausübt.

Einstellung des Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase-Systems

25 Die Konzentration an Xanthin-Oxidase [XOD] wurde so gewählt, das sich ein prozentualer Anteil an apoptotischen Zellen von etwa 50% einstellte.

Apoptotische Zellen zeigen eine Fluoreszenz-Intensität von > 10 arbiträren Kanalzahlen. Bei 0 mU an XOD lagen nur
30 $6,6 \pm 2,1\%$ der Zellen oberhalb dieser "cut off"-Grenzlinie von > 10 arbiträren Kanalzahlen, waren also zu 6,6% apoptotisch. Bei zunehmender Konzentration an XOD nahm der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen zu und erreichte bei 80 mU XOD einen Wert von $93,2 \pm 6,8\%$ an apoptotischen
35 Zellen. Bei 10 mU XOD durchliefen etwa 50% (genau $54,6 \pm 6,1$) der Zellen einen apoptotischen Prozess.

In Abwesenheit von XOD zeigen die Zellen ein FSC/SSC Verteilungsmuster wie folgt :

- 5 Zellgröße 349 ± 27 (arbiträre Kanalzahl) gegen eine Oberflächenbeschaffenheit von 112 ± 15 . Bei einer Enzymkonzentration von 80 mU nahm die Größe der Zellen ab und erreichte einen Wert von 256 ± 22 , während der Grad an Oberflächenbeschaffenheit auf 180 ± 29 zunahm. Solche
- 10 Veränderungen zeigen eine charakteristische Apoptose, begründet auf morphologischen Veränderungen der Zellen, an. Bei 10 mU XOD zeigen die Zellen ein Verteilungsmuster, das etwa in der Mitte dieser vorher gezeigten Extremwerte lag. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden 10 mU an Enzym
- 15 eingesetzt.

Effekt von Flupirtin auf die spontane Apoptoserate bei menschlichen Lymphozyten

- 20 Periphere Blut-MNZ sowohl von gesunden Probanden als auch von HIV-1-infizierten Patienten wurden im Hinblick auf eine spontane Apoptose untersucht. Die Zellen wurden einen Tag nach Blutentnahme bei den Probanden analysiert. Wie aus der Abbildung 2 ersichtlich ist, zeigten $6,32 \pm$
- 25 $0,82\%$ MNZ-Zellen von Kontrollgruppen nicht-infizierter Probanden nach diesem Zeitraum Apoptose, während $28,42 \pm 7,84\%$ der Zellen von HIV-1-infizierten Patienten eine Apoptose durchliefen. MNZ beider Gruppen wurden für 24
- 30 $30 \mu\text{g/ml}$ behandelt. Wie in der Abbildung 2 zusammengefasst, änderte sich die Rate der spontanen Apoptose von Lymphozyten unter Flupirtin-Einfluß nicht signifikant ($P > 0.1$). Dies trifft sowohl für Zellen von gesunden Probanden als auch von HIV-1-infizierten Patienten zu.

35

Reduktion der induzierten Apoptose in mononukleären Zellen durch Flupirtin

MNZ sowohl von gesunden Probanden als auch von HIV-1-
5 infizierten Patienten wurden mit dem HX/XOD-System
(Bildung von Sauerstoff-Radikalen), zur Induktion von
Apoptose, behandelt. Flupirtin wurde den Zellansätzen
6 Stunden vor Induktor-Exposition in verschiedenen
Konzentrationen zugegeben. Wie in Abbildung 3 gezeigt,
10 bewirkte Flupirtin bei Konzentrationen zwischen 0,1 und
3,0 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Reduktion des apoptotischen
Zelltodes ($P < 0,001$). Bei einer Flupirtin-Konzentration
von 10 $\mu\text{g/ml}$ war der protektive Effekt nur noch in Assays
mit Lymphozyten von infizierten Probanden signifikant.
15 Bei Konzentrationen von 0,3 bis 3,0 $\mu\text{g/ml}$ Flupirtin war der
protektive Effekt des Arzneimittels am ausgeprägtesten und
hemmte die induzierte Apoptose am stärksten.
Die Reduktion der induzierten Apoptose in den Ansätzen mit
Lymphozyten von gesunden Probanden betrug etwa 40% und in
20 solchen von HIV-1-infizierten Patienten etwa 60%.

Die Apoptose wurde in Lymphozyten auch über die Methode der
DNA-Fragmentierung nachgewiesen. Nach Inkubation der Zellen
mit dem HX/XOD-System wurde die DNA aus den Zellen
25 extrahiert, im Agarose-Gel aufgetrennt nach der Größe und
anschließend auf einen Blot übertragen.

Die DNA zerfiel in ein leiterartiges Muster aus Fragmenten
von 180 Basen-Paaren und Vielfachen davon. Ein solches
Fragmentierungsmuster ist charakteristisch für die DNA-
30 Zerstörung, die bei apoptotischen Prozessen auftritt
(Wyllie, 1980). Die Zellen, die mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Flupirtin
behandelt wurden, zeigten im Gegensatz dazu keine DNA-
Fragmentierung.

Repräsentative Dot-blot, die den Effekt von Flupirtin auf
35 Zellen zeigen, die sowohl eine spontane als auch eine
induzierte Apoptose durchmachen, liegen ebenfalls vor.

Zur Durchführung dieser Serie an Experimenten wurde in MNZ mittels des HX/20mU XOD-Systems Apoptose induziert. Unter diesen Bedingungen wurden - in Abwesenheit von Flupirtin - $64,2 \pm 7,9\%$ der Zellen apoptotisch.

- 5 Wenn diese Zellen jedoch für 24 Stunden mit Flupirtin behandelt wurden, nahm der Anteil an apoptotischen Zellen signifikant auf $18,3 \pm 5,8\%$ ab.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß Flupirtin ein
10 vielversprechendes Arzneimittel beispielsweise zur Behandlung des induzierten apoptotischen Zelltodes von Lymphozyten bei AIDS-Patienten ist.

In DE-OS 43 27 516 wird die neuroprotektive Wirkung von
15 Flupirtin beschrieben, beispielsweise bei cerebraler Ischämie, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, infektiös induzierten Neurodegenerationserkrankungen wie die AIDS-Enzephalopathie oder Jakob-Creutzfeld-Erkrankung.

Die Indikation AIDS-Enzephalopathie mit fortschreitender
20 Demenz stellt eine neurologische Komplikation der AIDS-Erkrankung dar. Als Ursache für das Entstehen der AIDS-Enzephalopathie wird unter anderem die HIV(gp 120) - induzierte Freisetzung von NMDA-agonistisch wirkenden Neurotoxinen wie Chinolinsäure aus infizierten Makrophagen
25 angesehen, die letztendlich zu einem Absterben der Nervenzellen führt.

AIDS-Enzephalopathie und AIDS-Erkrankung (acquired immuno-
deficiency syndrome) sind verschiedene Organsysteme
betreffende Erkrankungen. Bei der ersten Erkrankung handelt
30 es sich, wie schon dargelegt, um eine neurologische Komplikation der AIDS-Erkrankung (Apoptose von Nervenzellen), während die zweite Erkrankung eine "erworbene Immuninsuffizienz" darstellt, die auf einer Störung des

zellulären Immunsystems mit ausgeprägter Verminderung der T-Helfer-Zellen beruht (Apoptose eines Bestandteiles des hämatopoetischen Zellsystems).

- 5 Die erfindungsgemäße Wirkung des Flupirtins , die Hemmung der induzierten Apoptose von Zellen des hämatopoetischen Zellsystems, beispielsweise von Lymphozyten, war auch umso überraschender , da die Existenz von NMDA-Rezeptoren außerhalb des Zentralnervensystems bisher nicht
- 10 nachgewiesen wurde. Demzufolge war es auch für einen Fachmann nicht möglich, von einem Schutz der Nervenzellen durch Flupirtin auf einen Schutz der Zellen des hämatopoetischen Zellsystems zu schließen.

- 15 Als weitere Erkrankungen, die prophylaktisch und therapeutisch aufgrund der erfindungsgemäßen Wirksamkeit des Flupirtins behandelbar sind, können beispielsweise genannt werden:

- Medikamenten(wie Cytostatika, Corticosteroide)-, Giftstoff-, Strahlen- und durch andere Erkrankungen induzierte Neutropenie/Lymphozytopenie
- 20 - Medikamenten- oder infektiös (beispielsweise HIV) induzierte Thrombozytopenie.

- 25 Flupirtin kann zur Prophylaxe und Therapie in bekannter Weise in folgenden Darreichungsformen verabreicht werden:

Tabletten, Filmtabletten, Hartgelatine kapseln, Weichgelatine kapseln, Pellets, Granulate, Dragees, Suppositorien,

Mikrokapseln, wäßrige oder ölige Suspensionen, ölige Lösungen, Injektionslösungen zur intramuskulären Verabreichung, Injektionslösungen zur intravenösen Verabreichung.

Geeignete Salze für die Herstellung des Arzneimittels sind
5 alle physiologisch verträglichen Salze des Flupirtins.
Beispielsweise kommen das Hydrochlorid, Maleat, Sulfat und Gluconat von Flupirtin in Frage.

Die Gehalte an Flupirtin in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln betragen 0,1 mg-3000 mg, vorzugsweise 10 mg-500 mg.
10 Die genannten Einzeldosen des Arzneimittels können 1 - 5 mal, vorzugsweise 1 - 3 mal täglich verabreicht werden.

Die Dosierungsangaben beziehen sich immer auf Flupirtin als Base. Werden Salze des Flupirtins eingesetzt, so ist entsprechend dem Molgewicht umzurechnen.

15

Die pharmazeutische und galenische Handhabung der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt nach den üblichen Standardmethoden. Beispielsweise wird Flupirtin und die Träger- und/oder Hilfsstoffe durch Rühren oder
20 Homogenisieren gut vermischt, wobei im allgemeinen bei Temperaturen zwischen 20 und 80°C, vorzugsweise 20 bis 50°C, gearbeitet wird.

25

Beschreibung der Abbildungen**Abbildung 1**

Inkubation von nicht-infizierten [●] und HIV-1-infizierten CEM Zellen [●] mit unterschiedlichen Konzentrationen an
5 Flupirtin. Die Mittelwerte von 10 Parallel-Experimenten sind angegeben; die Standardabweichungen waren nicht höher als 10%.

10 **Abbildung 2**

Effekt von Flupirtin auf die spontane Apoptose von Lymphozyten gewonnen von nicht-infizierten Probanden [offene Balken] und HIV-1-infizierten Patienten [diagonal-gestreifte Balken]. Nach einem Tag wurden die Zellen
15 mittels Durchflußzytometrie analysiert. Lymphozyten von 12 infizierten Patienten und 8 nicht-infizierten Probanden wurden untersucht; die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind angegeben.

20

Abbildung 3

Reduktion des induzierten apoptotischen Absterbens von Lymphozyten nach Behandlung mit Flupirtin. MNZ von nicht-infizierten Probanden [offene Balken] und HIV-1-infizierten
25 Patienten [diagonal-gestreifte Balken] wurden mittels des HX/XOD-Systems zum apoptotischen Absterben gebracht. Flupirtin wurde den Zellen 6 Std. vor dem Sauerstoffradikal-generierenden System zugegeben. Einen Tag später wurden die Zellen mittels Durchflußzytometrie
30 analysiert. Die Werte für die Gesamt-Apoptose wurden ermittelt; davon wurden die Werte für die Spontan-Apoptose subtrahiert. Somit geben die dargestellten Werte das Ausmaß an induzierter Apoptose an. Lymphozyten von 12 infizierten Patienten und 8 nicht-infizierten Probanden wurden
35 untersucht; die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind angegeben.

Patentansprüche

1. Verwendung des Wirkstoffes Flupirtin oder dessen
5 pharmazeutisch verwendbaren Salze zur Herstellung eines
Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die mit
einer Beeinträchtigung des hämatopoetischen Zellsystems
einhergehen.

- 10 2. Verwendung des Wirkstoffes Flupirtin oder dessen
pharmazeutisch verwendbaren Salze gemäß Anspruch 1 zur
Behandlung von HIV-infizierten Patienten /AIDS-
Patienten.

- 15 3. Verwendung gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß
Flupirtin oder dessen Salze für die entsprechenden
Anwendungsformen mit pharmazeutisch geeigneten Träger-
und/oder Hilfsstoffen kombiniert werden.

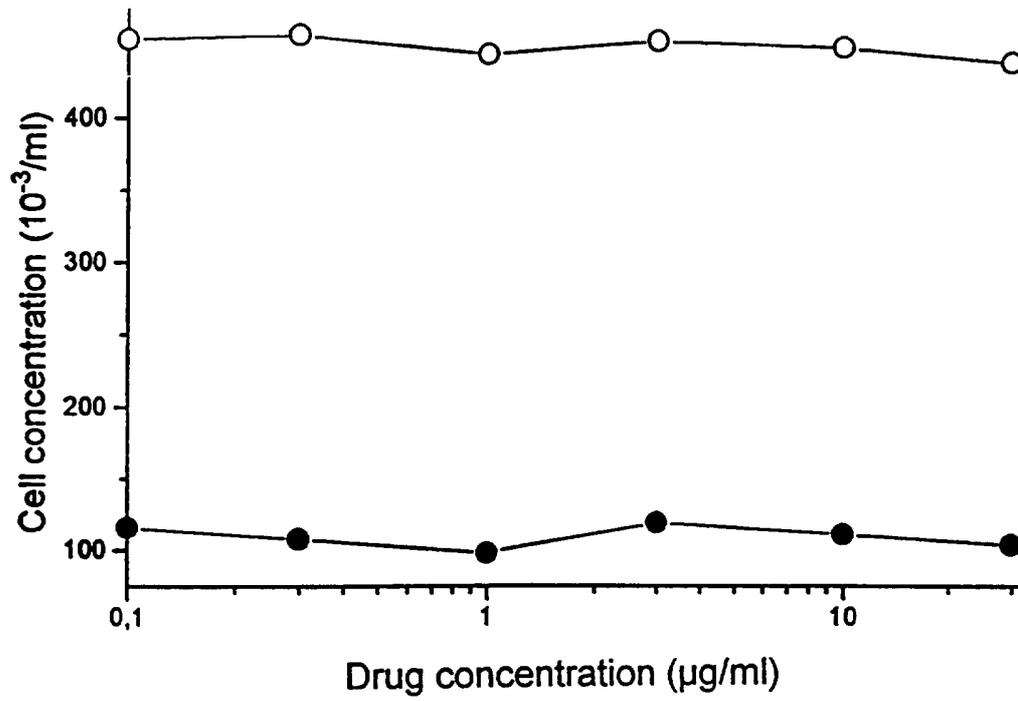


Abbildung 1

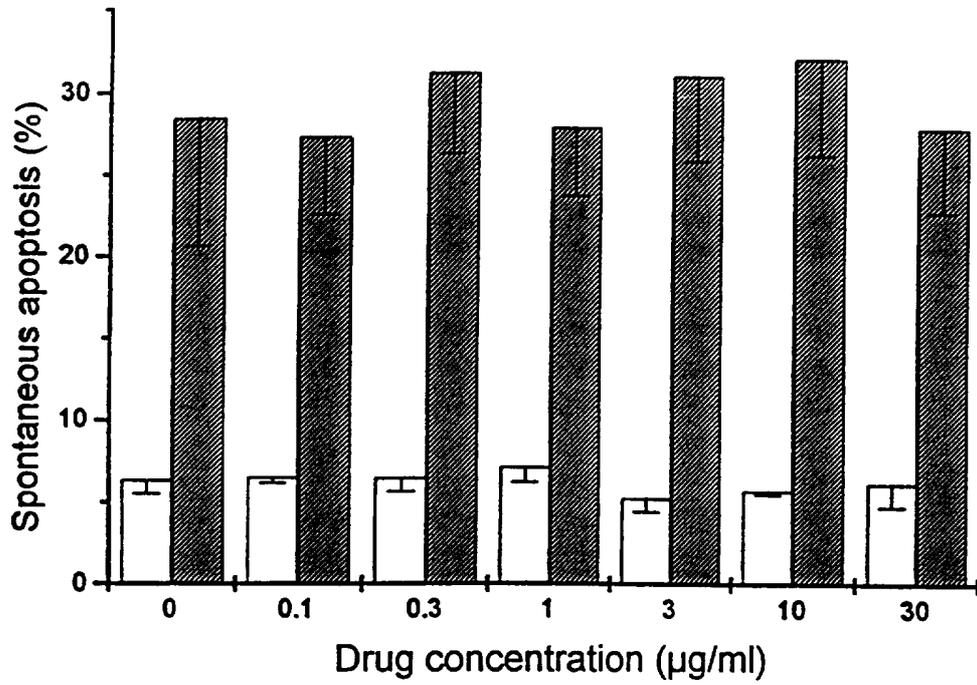
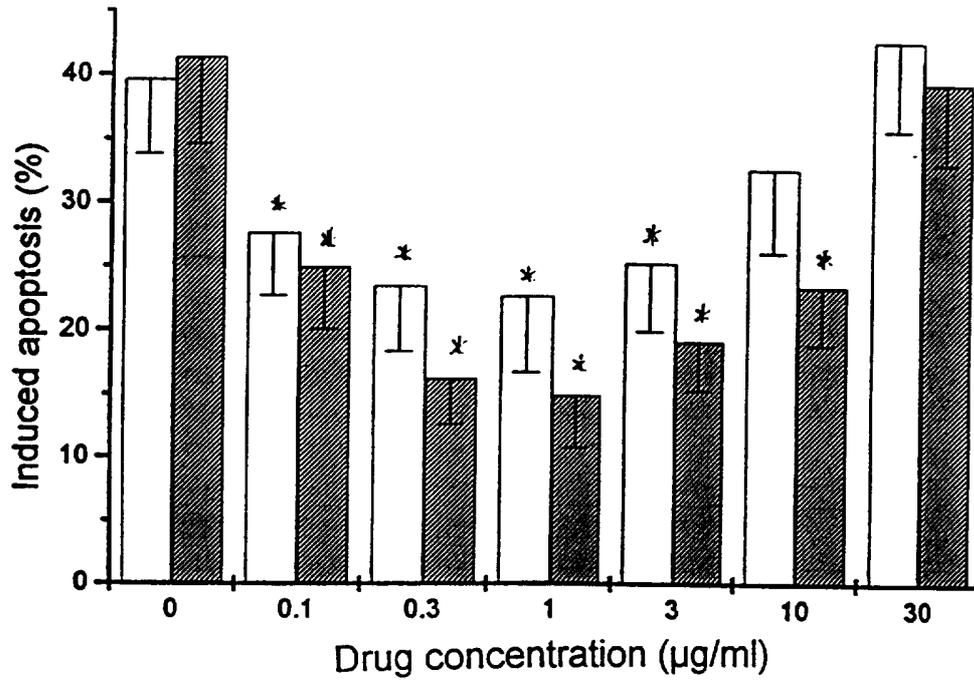


Abbildung 2



* $p < 0.001$

Abbildung 3