**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : | | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/03792 |
|---|---|---|
| A61K 31/195, 31/22 | A1 | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Februar 1995 (09.02.95) |

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02505

(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juli 1994 (28.07.94)

(30) Prioritätsdaten:
P 43 25 547.7 29. Juli 1993 (29.07.93) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: WEISS, Ludwig [DE/DE]; Münchner Strasse 20, D-86438 Kissing b. Augsburg (DE).

(74) Anwalt: DEUFEL, Paul; Müller-Boré & Partner, Isartorplatz 6, D-80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
*Mit internationalem Recherchenbericht.*
*Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.*

(54) Title: USE OF THIOL COMPOUNDS IN THE THERAPY OF VIRAL DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON THIOLVERBINDUNGEN ZUR THERAPIE VON VIRALEN ERKRANKUNGEN

(57) Abstract

A new use of thiol compounds is disclosed for preparing a pharmaceutical composition for treating virus-induced diseases. In particular, the use of thiol compounds is disclosed for preparing a pharmaceutical composition for treating virus-induced diseases, in which the used thiol compounds destroy the disulphide bridges in the virus proteins.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung Virus-induzierter Erkrankungen. Insbesondere betrifft die Erfindung eine Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung Virus-induzierter Erkrankungen, wobei die verwendeten Thiolverbindungen in Virus-Proteinen vorhandene Disulfid-Brücken zerstören.

*LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

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

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **AT** | Österreich | **GA** | Gabon | **MR** | Mauretanien |
| **AU** | Australien | **GB** | Vereinigtes Königreich | **MW** | Malawi |
| **BB** | Barbados | **GE** | Georgien | **NE** | Niger |
| **BE** | Belgien | **GN** | Guinea | **NL** | Niederlande |
| **BF** | Burkina Faso | **GR** | Griechenland | **NO** | Norwegen |
| **BG** | Bulgarien | **HU** | Ungarn | **NZ** | Neuseeland |
| **BJ** | Benin | **IE** | Irland | **PL** | Polen |
| **BR** | Brasilien | **IT** | Italien | **PT** | Portugal |
| **BY** | Belarus | **JP** | Japan | **RO** | Rumänien |
| **CA** | Kanada | **KE** | Kenya | **RU** | Russische Föderation |
| **CF** | Zentrale Afrikanische Republik | **KG** | Kirgisistan | **SD** | Sudan |
| **CG** | Kongo | **KP** | Demokratische Volksrepublik Korea | **SE** | Schweden |
| **CH** | Schweiz | **KR** | Republik Korea | **SI** | Slowenien |
| **CI** | Côte d'Ivoire | **KZ** | Kasachstan | **SK** | Slowakei |
| **CM** | Kamerun | **LI** | Liechtenstein | **SN** | Senegal |
| **CN** | China | **LK** | Sri Lanka | **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 |
| **ES** | Spanien | **MG** | Madagaskar | **US** | Vereinigte Staaten von Amerika |
| **FI** | Finnland | **ML** | Mali | **UZ** | Usbekistan |
| **FR** | Frankreich | **MN** | Mongolei | **VN** | Vietnam |

**Verwendung von Thiolverbindungen zur Therapie von viralen Erkrankungen**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung Virus-induzierter Erkrankungen. Insbesondere betrifft die Erfindung eine Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung Virus-induzierter Erkrankungen, wobei die verwendeten Thiolverbindungen in Virus-Proteinen vorhandene Disulfid-Brücken zerstören.

Akute und chronische Infektionen von Pflanzen, Tieren und Menschen durch verschiedene virale Erreger stellen ein ernstzunehmendes medizinisches und wirtschaftliches Problem dar. Tatsächlich werden vermutlich 60% der in den industrialisierten Ländern auftretenden Krankheiten durch Viren verursacht. So zählen z.B. durch Hepatitis-Viren hervorgerufene Krankheiten weltweit zu den häufigsten Infektionen. Da die genannten Virusinfektionen im wesentlichen die Leber betreffen, kann die fortschreitende Zerstörung dieses Organs mit anschließender Entwicklung zur Zirrhose letztendlich zur Ausbildung eines hepatozellulären Carcinoms führen.

Ein wesentliches Erfordernis für ein antivirales Therapeutikum ist in einer hohen Spezifität für den viralen Erreger bei gleichzeitiger Abwesenheit bzw. Minimierung von gesundheitsschädlichen Nebenwirkungen zu sehen. Als besonders problematisch erweist sich in diesem Zusammenhang die enge Koppelung des viralen Vermehrungszyklus mit den Stoffwechsel- und Replikationsfunktionen der Wirtszelle. Gegenwärtig konzentriert sich die medizinische Forschung auf die Entwicklung von antiviralen Agenzien, die die Replikation des Virusgenoms beeinträchtigen oder verhindern, wobei insbesondere chemisch synthetisierten Nucleosid-Analoga große Bedeutung zukommt.

Eines der Hauptprobleme der antiviralen Chemotherapie ist jedoch darin zu sehen, daß für eine Vielzahl bedeutsamer Infektionserreger, wie z.B. dem Hepatitis B-Virus, keine wirksamen Substanzen zur therapeutischen Behandlung zur Verfügung stehen.

Dementsprechend liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, weitere therapeutisch wirksame und gleichzeitig pharmazeutisch verträgliche Substanzen zur Bekämpfung viraler Erkrankungen zur Verfügung zu stellen.

Die Lösung dieses technischen Problems wird dadurch erreicht, daß die in den Patentansprüchen näher gekennzeichneten Ausführungsformen bereitgestellt werden. Insbesondere wird das technische Problem dadurch gelöst, daß die vorliegende Erfindung die therapeutisch wirksame Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Bekämpfung Virus-induzierter Erkrankungen offenbart, wobei in Virus-Proteinen vorhandene Disulfidbrücken durch die Thiolverbindungen zerstört werden.

Unter dem Begriff "Thiolverbindung" werden chemische Verbindungen verstanden, die durch das Vorhandensein einer reduzierten Thiolgruppe (SH-Gruppe) gekennzeichnet sind, sowie Verbindungen, die im Zuge des zellulären Stofwechsels in Thiolverbindungen umgewandelt werden können. Bevorzugte Beispiele derartiger Thiolverbindungen sind Cystein, Cysteinderivate, Mercaptoalkanole, wie Methanthiol, Ethanthiol oder Mercaptoethanol, Dithiocarbamat, Thiophenol und 2-Mercaptoethansulfonsäure. Erfindungsgemäße Beispiele für Cysteinderivate sind N-Acetyl-cysteinderivate, wie N-Acetylhomocystein, N-Acetylcystein-ethylester oder N,S-Diacetylcystein-ethylester. Besonders bevorzugt sind N-Acetylcystein (NAC) und N,S.Diacetylcystein-ethylester (DACEE) sowie deren Derivate. Die erfindungsgemäß verwendeten Thiolverbindungen sind ferner durch ihre Nicht-Toxizität im üblicherweise bei therapeutischen Behandlungen verwendeten Konzentrationsbereich (bei NAC: beispielsweise 600 mg täglich über mehrere Wochen) gekennzeichnet. NAC wird im medizinischen Bereich bisher als Mukolytikum, bei Paracetamolvergiftung und experimentell als HIV- und Herpes-Therapeutikum verwendet (Roederer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990), 4884-4888, US-Patent 4 708 965). Die erfindungsgemäßen Thiolverbindungen zeichnen sich insbesondere durch eine gute Verträglichkeit und geringe Nebenwirkungen aus. Da-

durch unterscheiden sie sich besonders von bisher zur Virustherapie eingesetzten Nucleosidanaloga.

Unter dem Begriff "Virus-induzierte Erkrankung" werden Erkrankungen des tierischen und menschlichen Körpers verstanden, die durch Viren hervorgerufen oder verstärkt werden. Erfindungsgemäß sind dies insbesondere DNA-Viren, wie Hepadnaviridae, Vacciniaviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Poxviridae, Iridoviridae, oder RNA-Viren, wie Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae. Im Sinne dieser Definition sind Herpesviren nicht als DNA-Viren und AIDS-Viren nicht als RNA-Viren zu verstehen. Die Erfindung betrifft bevorzugt die Verwendung von Thiolverbindungen für die Bekämpfung von Virus-induzierten Erkrankungen, die durch Hepatitis-Viren, wie dem Hepatitis A, B, C oder Delta-Virus hervorgerufen werden. Insbesondere kann die Virus-induzierte Erkrankung eine chronische oder akute Hepatitis-B-Infektion oder ein hepatocelluläres Carcinom sein. Insbesondere werden unter dem Begriff "Virus-induzierte Erkrankungen" Erkrankungen verstanden, die durch Hepadnaviren, wie z.B. dem Hepatitis B Virus, dem "Woodchuck Hepatitis Virus" (WHV), dem Ground Squirrel Hepatitis Virus" (GSHV), dem "Tree Squirrel Hepatitis Virus" (TSHV) oder dem "Duck Hepatitis Virus" (DHBV) hervorgerufen werden. Ferner umfaßt die Erfindung auch die Verwendung von Thiolverbindungen zur Bekämpfung pflanzlicher Erkrankungen, die durch virale Erreger, wie dem Tabakmosaikvirus (TMV) oder dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) hervorgerufen werden.

Der Begriff "in Virus-Proteinen vorhandene Disulfidbrücken" bezeichnet Disulfidbrücken, die die räumliche Struktur und/oder die Funktion von viralen Proteinen durch intra- oder intermolekulare kovalente Bindungen beeinflussen. Demgemäß enthalten die Virus-Proteine, zumindest aber ein Virus-Protein der erfindungsgemäßen Verwendung der Thiolverbindungen wenigstens einen Cysteinrest. Vorzugsweise enthält das Virus-Protein mehrere Cysteinreste,

wie beispielsweise das HBsAg des Hepatitis B Virus. Es ist bekannt, daß andererseits Disulfidbrücken durch die Konformation des Proteins stabilisiert werden. Daher hängt die einzusetzende Menge an Thiolverbindung, die zur Spaltung der intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken notwendig ist, von der Zugänglichkeit der jeweiligen Disulfidbrücke(n) ab.

Unter dem Begriff "Virus-Proteine" werden Proteine, vorzugsweise Hüllproteine, wie HBcAg und HBsAg, eines Virus verstanden. Insbesondere werden unter diesem Begriff Oberflächenantigen-Proteine, wie z.B. HBsAg, verstanden.

Erfindungsgemäß werden unter dem Begriff "Virus-Proteine" auch Vorläufer-Proteine für Hüllproteine verstanden, also Proteine, die nicht im endgültigen Virus vorhanden sind.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung Virus-induzierter Erkrankungen, wobei in Virus-Proteinen vorhandene Disulfidbrükken durch die Thiolverbindung zerstört werden und die Thiolverbindung die Replikation des Virusgenoms nicht beeinflußt.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Figur 1 zeigt den Gehalt, also die über eine immunologische Wechselwirkung von viralem Oberflächenantigen mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper detektierte Menge, des viralen Antigens HBsAg im Zellkulturüberstand von HepG2-4A5-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen NAC-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit,

Figur 2 zeigt den Gehalt des viralen Antigens HBeAg im Zellkulturüberstand von HepG2-4A5-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen NAC-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit,

Figur 3a,b zeigt den Gehalt intakter HBV-Viruspartikel im Zellkulturüberstand von HepG2-4A5, wobei die Zellinie HepG2-4A5 zusätzlich mit unterschiedlichen NAC-Konzentrationen inkubiert wurde, ferner als Kontrolle den Zellüberstand der keine HBV-Partikel produzierenden Zellinie HepG2 (ATCC HB 8065; Nature 282 (1979), 615-616),

Figur 4 zeigt den Gehalt von HBsAg und HBeAg in einem käuflichen HBsAg-positiven Serum, wobei das Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen von NAC, Cystein bzw. DACEE inkubiert wurde, und

Figur 5 zeigt den Gehalt infektiöser Vaccinia-Virus-Partikel, gemessen an der Plaque-Zahl im Zellkulturmonolayer von mit Vaccinia-Virus infizierten CV1-Zellen (ATCC CCL70), wobei die Viren vor der Infektion mit unterschiedlichen Konzentrationen von NAC präinkubiert wurden.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele näher erläutert.

**Beispiel 1: Einfluß von Thiolverbindungen auf die Replikation des Hepatitis B-Virus**

Um den Einfluß von Thiolverbindungen auf die Vermehrung des Hepatitis B-Virus zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten, potentiell infektiöse HBV-Partikel produzierenden Zellinien HepG2 2.2.15 (Sells et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987), 1005-1009) und HepG2.4A5 (mit dem Plasmid pSPT1, 2xHBVneo (vgl. Beispiel 4) stabil transfizierte HepG2 Zellinie) verwendet. Als Thiolverbindungen wurden NAC, Cystein, Cysteinhydrochlorid und DACEE verwendet. Als Negativkontrolle wurde Cystin verwendet.

In Tabelle I ist der HBsAg- und HBeAg-Gehalt des Zellkulturüberstandes der

HepG2-4A5 Zellinie, 48 Stunden nach Behandlung der Zellen mit den vorstehenden Verbindungen dargestellt. Dabei wurde der HBsAg bzw. HBeAg-Gehalt der unbehandelten Zellen willkürlich gleich 1 gesetzt und der inhibitorische Index der genannten Verbindungen in Relation dazu bestimmt. Die Antigen-Bestimmungen wurden, ebenso wie in Beispiel 2 und 3 mittels eines kommerziell erhältlichen HBsAg- bzw. HBeAg-Enzymimmuntests (Abbott-Laboratories) durchgeführt.

**Tabelle I**

| Substanz | Konz. | HBsAg | HBeAg |
|---|---|---|---|
| unbehandelt | | 0,189 ± 0,016 | 0,386 ± 0,048 |
| NAC | 3 mM | 0,085 ± 0,011 | 0,323 ± 0,029 |
| | 10 mM | 0,023 ± 0,002 | 0,295 ± 0,034 |
| | 30 mM | 0,003 ± 0,001 | 0,113 ± 0,012 |
| Cystein | 3 mM | 0,154 ± 0,039 | 0,348 ± 0,039 |
| | 10 mM | 0,129 ± 0,024 | 0,302 ± 0,029 |
| | 30 mM | 0,053 ± 0,006 | 0,084 ± 0,006 |
| µg/ml DACEE | | | |
| | 0 | 0,241 ± 0,056 | 0,310 ± 0,009 |
| | 0,05 | 0,173 ± 0,034 | 0,281 ± 0,020 |
| | 0,5 | 0,197 ± 0,031 | 0,283 ± 0,004 |
| | 5 | 0,226 ± 0,023 | 0,318 ± 0,009 |
| | 10 | 0,206 ± 0,018 | 0,302 ± 0,026 |
| | 20 | 0,206 ± 0,004 | 0,332 ± 0,019 |
| | 50 | 0,157 ± 0,009 | 0,323 ± 0,013 |
| | 100 | 0,079 ± 0,006 | 0,267 ± 0,007 |
| | 150 | 0,077 ± 0,009 | 0,249 ± 0,013 |
| | 300 | 0,004 ± 0,002 | 0,211 ± 0,007 |
| | 600 | 0,002 ± 0,001 | 0,179 ± 0,004 |
| | 2000 | 0,002 ± 0,001 | 0,139 ± 0,009 |

Die in Tabelle I dargestellten Ergebnisse wurden für NAC außerdem auch mit

der Zellinie HepG2 2.2.15 und, nach transienter Transfektion von HepG2 Zellen (bzw. HuH7 Zellen), mit dem replikationskompetenten HBV-Plasmid pSPT1,2xHBV erhalten. pSPT1,2xHBV wurde wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt.

Sowohl für NAC- als auch Cystein-, und DACEE-behandelte Zellen konnte eine deutliche Verringerung von HBsAg im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Eine graphische Darstellung vorstehender Daten findet sich in Fig. 4. Demgegenüber zeigte die Kontrollverbindung Cystin keinen Einfluß auf den Gehalt der sezernierbaren viralen Antigene, HBsAg und HBeAg (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde mittels des vorstehenden HBsAg bzw. HBeAg-Enzymimmuntests die dosisabhängige, inhibitorische Wirkung von NAC auf den Gehalt viraler Antigene im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer untersucht (Figuren 1 und 2). Die dabei verwendeten NAC-Konzentrationen zeigen keinen cytotoxischen Effekt auf die Zellen der verwendeten Zellkultur. Die in den Figuren dargestellten Daten zeigen eine deutlich dosisabhängige, inhibitorische Wirkung auf den Gehalt der untersuchten viralen Antigene im Zellkulturüberstand.

Um aufzuzeigen, daß der Gehalt an intakten und damit potentiell infektiösen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand der HepG2-4A5-Zellinie nach Behandlung der Zellen mit Thiolverbindungen vermindert ist, wurde eine Endogene-Polymerase-Reaktion durchgeführt. Diese Reaktion macht sich die Tatsache zunutze, daß die im Viruscapsid vorhandene virale Polymerase das partiell doppelsträngige HBV-Genom in vitro vervollständigen kann. Durch Zugabe radioaktiv markierter Nucleotide und anschließenden Einbau in das HBV-Genom kann daher die Anwesenheit intakter, potentiell infektiöser Viruspartikel in einem Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Die in Fig. 3a dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß der Gehalt potentiell infektiöser, intakter Viruspartikel im Zellkulturüberstand nach Behandlung der Zellen

mit NAC deutlich vermindert ist.

Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren, in Fig. 3b dargestellten Versuch bestätigt. Dazu wurden die Viruspartikel im Zellkulturüberstand der mit verschiedenen NAC-Konzentrationen behandelten Zellinie HepG2-4A5, nach Entfernung ihrer äußeren Hülle, durch Immunpräzipitation mit einem HBcAg-Antikörper (DAKO GmbH, Hamburg) spezifisch angereichert und anschließend eine Endogene-Polymerase-Reaktion durchgeführt. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Hepatitis-B-Virionen im Zellkulturüberstand nach NAC-Behandlung.

**Beispiel 2: Untersuchungen zur Wirkungsweise von NAC, Cystein und DACEE**

Um zu untersuchen, ob der antivirale Wirkungsmechanismus von NAC, Cystein bzw. DACEE auf der Zerstörung der im Virus-Protein vorhandenen Disulfidbrücken beruht, wurde der Zellkulturüberstand der HepG2-4A5-Zellinie über Nacht mit den in Tabelle II angegebenen Konzentrationen an NAC inkubiert und anschließend wurde der HBsAg-Gehalt mit einem käuflichen Testverfahren (Abbott-Laboratories) bestimmt.

Ebenso wurde käufliches HBsAg-positives Serum (Abbott-Laboratories) für 5 Min. mit den in Tabelle III angegebenen Konzentrationen von NAC, Cystein DACEE und Cysteinhydrochlorid präinkubiert und anschließend wurde der Gehalt an HBsAg und HBeAg mit vorstehendem Testverfahren bestimmt.

Tabelle II

| | HBsAg |
|---|---|
| unbehandelt | 1 |
| 3 mM NAC | 0,95 ± 0,16 |
| 10 mM NAC | 0,54 ± 0,04 |
| 30 mM NAC | 0,22 ± 0,05 |
| 100 mM NAC | 0,03 ± 0,03 |

Tabelle III

| Substanz | Konzentration | HBsAg | HBeAg |
|---|---|---|---|
| unbehandelt | | 1,00 ± 0,05 | 1,00 ± 0,07 |
| NAC | 3 mM | 0,79 ± 0,05 | 1,09 ± 0,04 |
| | 10 mM | 0,49 ± 0,03 | 1,17 ± 0,04 |
| | 30 mM | 0,02 ± 0,00 | 1,27 ± 0,09 |
| Cystein | 3 mM | 0,91 ± 0,02 | 1,10 ± 0,06 |
| | 10 mM | 0,68 ± 0,04 | 1,22 ± 0,05 |
| | 30 mM | 0,27 ± 0,05 | 1,21 ± 0,06 |
| DACEE | 0,6 mg/ml | 0,35 ± 0,06 | 1,11 ± 0,04 |
| | 2 mg/ml | 0,06 ± 0,00 | 1,19 ± 0,04 |
| | 6 mg/ml | 0,00 ± 0,00 | 1,09 ± 0,03 |
| Cystein-hydrochlorid | 3 mM | 0,84 ± 0,004 | 1,17 ± 0,04 |
| | 10 mM | 0,33 ± 0,01 | 1,32 ± 0,05 |
| | 30 mM | 0,11 ± 0,01 | 1,30 ± 0,08 |

Tabellen II und III zeigen einen deutlichen Rückgang von HBsAg in Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen von NAC, DACEE bzw. Cysteinhydrochlorid. Aus der Gesamtheit dieser Daten läßt sich schließen, daß die antivirale Wirkung von NAC, Cystein, DACEE bzw. Cysteinhydrochlorid auf einer Reduktion der Disulfidbrücken im HBsAg-Komplex des Hepatitis B-Virus

beruht und es damit zu einer Störung des Zusammenbaus der Hepatitis B-Virushülle kommt.

**Beispiel 3: Einfluß von NAC auf den HBsAg-Gehalt von menschlichem Serum eines akut infizierten Patienten**

Um zu untersuchen, ob die in Beispiel 2 dargelegten in-vitro-Daten auch mit menschlichem Serum reproduzierbar sind, wurde die Serumprobe eines sich in der akuten Infektionsphase befindlichen HBV-Patienten mit steigender Menge NAC inkubiert. Analog zu dem in-vitro-Befund ergab sich auch hier ein deutlicher Rückgang des HBsAg-Gehalts in Abhängigkeit von der eingesetzten NAC-Konzentration (Tabelle VI).

**Tabelle IV**

| | HBsAg |
|---|---|
| unbehandelt | 1 |
| 3 mM NAC | 0,27 ± 0,07 |
| 10 mM NAC | 0,12 ± 0,05 |
| 30 mM NAC | 0,04 ± 0,00 |
| 100 mM NAC | 0,00 ± 0,01 |

Da die in Tabelle IV dargestellten Ergebnisse mit hochinfektiösem menschlichen Serum erhalten wurden, das einen sehr hohen HBsAg und HBeAg-Titer aufweist, wurde die Probe vor dem Test 1:200 verdünnt, um so im linearen Bereich des verwendeten HBsAg-Tests zu bleiben. Die Präinkubation in diesem repräsentativen Experiment betrug 30 Min.

Tabelle IV zeigt, daß auch in menschlichem Serum der HBsAg-Gehalt ebenso wie nach Inkubation des Zellkulturüberstandes mit NAC deutlich zurückgeht.

**Beispiel 4: Herstellung der Plasmide pSPT1,2xHBV und pSPT1,2xHBVneo**

Zur Herstellung von pSPT1,2xHBV wurde in den mit BamHI linearisierten Klonierungsvektor pSPT19 (Boehringer Mannheim, Best.Nr.: 909815) ein aus dem Plasmid pBRHBadr4 (Fujiama et al., NAR 11 (1983), 4601-4610) stammender HBV-Anteil kloniert. Demgemäß enthält das Plasmid pSPT1,2xHBV ein HBV-Genom voller Länge (BamHI-Fragment) und zusätzlich eine terminale Redundanz von 621 bp (BamHI/StuI-Fragment). Das Plasmid pSPT1,2xHBV enthält damit den minimalen Anteil, der zur Generierung aller viralen Transkripte, inklusive der 3,5 kb langen pregonomischen RNA unbedingt notwendig ist. Dieser HBV-Anteil befindet sich ausschließlich unter der Kontrolle autologer Promotoren.

Zur Herstellung von pSPT1,2xHBVneo wurde zusätzlich in den Vektor pSPT1,2xHBV ein unter der Kontrolle des Herpes simplex TK-Promotors stehendes Neomycinresistenzgen (Neomycinanteil aus pNEO, Pharmacia Best.-Nr.: 27-4924-01) kloniert. Dabei wurde die Klonierungsstrategie so gewählt, daß der HBV-Anteil und der Neomycinresistenzanteil 3'-3' zueinander liegen, um den Einfluß des TK-Promotors auf den HBV-Anteil möglichst gering zu halten.

**Beispiel 5: Einfluß von NAC auf die Replikation des Vaccinia-Virus**

Um den Einfluß von Thiolverbindungen, z.B. NAC, auf die Vermehrung des Vaccinia-Virus zu untersuchen, wurden Vaccinia-Viren zunächst 45 Min. mit 3, 10 bzw. 30 mM NAC präinkubiert. Dann wurden diese Viren 45 Min. mit CV1 Zellen (allgemein erhältliche Affennierenzellen) inkubiert, um eine Virusadsorbtion an die Zellen zu ermöglichen. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen wurden diese mit Softager überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von etwa 48 Std. wurden die nicht-lysierten Zellen mit Kristallviolett angefärbt und die entstandenen Plaques gezählt. Die Plaquezahl der unbehandelten

Kontrolle wurde auf 1.0 gesetzt und der inhibitorische Index der behandelten Zellen in Relation dazu gesetzt (vgl. Tabelle V).

Tabelle V

| mM NAC | Vaccina |
|---|---|
| 0 | 1,00 |
| 3 | 0,89 ± 0,01 |
| 10 | 0,64 ± 0,07 |
| 30 | 0,33 ± 0,16 |

Aus Tabelle V geht hervor, daß auch bei Vaccinia-Virus durch eine Thiolverbindung, wie NAC, eine Reduktion der infektiösen Virus-Partikel erreicht wird. Eine graphische Darstellung dieses Ergebnisses findet sich in Fig. 5.

## Patentansprüche

1. Verwendung von Thiolverbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung Virus-induzierter Erkrankungen, wobei in Virus-Proteinen vorhandene Disulfidbrücken durch die Thiolverbindung zerstört werden.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus ein DNA-oder RNA-Virus ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Virus ein Hepatitis-Virus ist.

4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Virus ein Hepadna-Virus ist.

5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Virus das Hepatitis-B-Virus ist.

6. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Virus das Hepatitis-Delta-Virus ist.

7. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Virus ein Vaccinia-Virus ist.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Virus-Protein das Oberflächenantigen-Protein ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und 8, wobei die Virus-induzierte Erkrankung eine chronische oder akute Hepatitis-B-

Infektion oder ein hepatozelluläres Carcinom ist.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Thiolverbindung die Replikation des Virusgenoms nicht beeinflußt.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Thiolverbindung NAC, DACEE oder ein Derivat davon ist.

FIG. 1

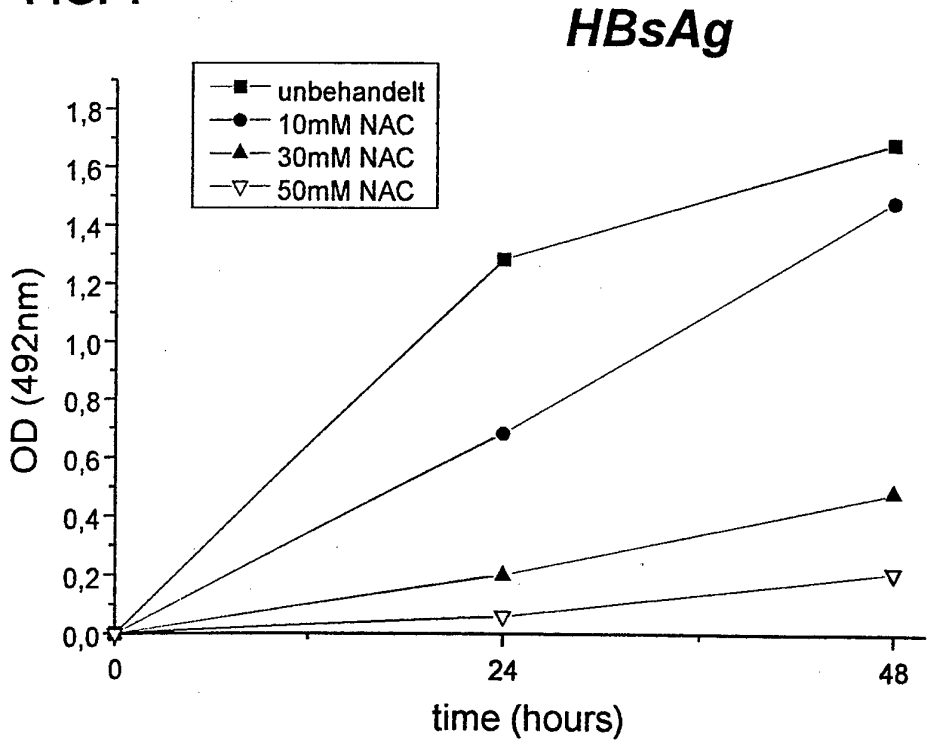
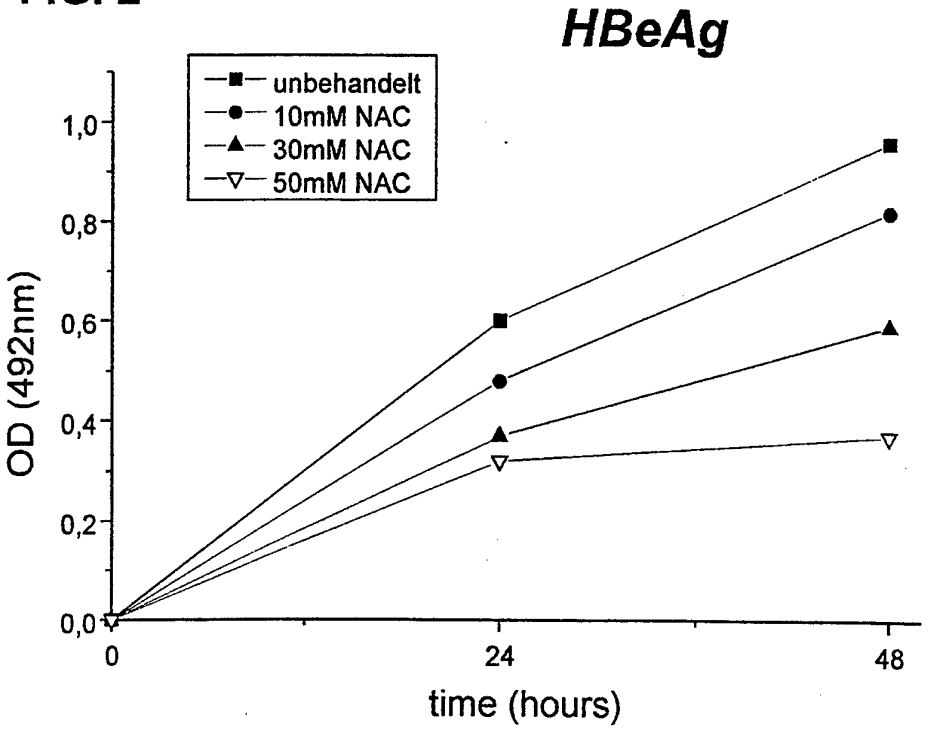
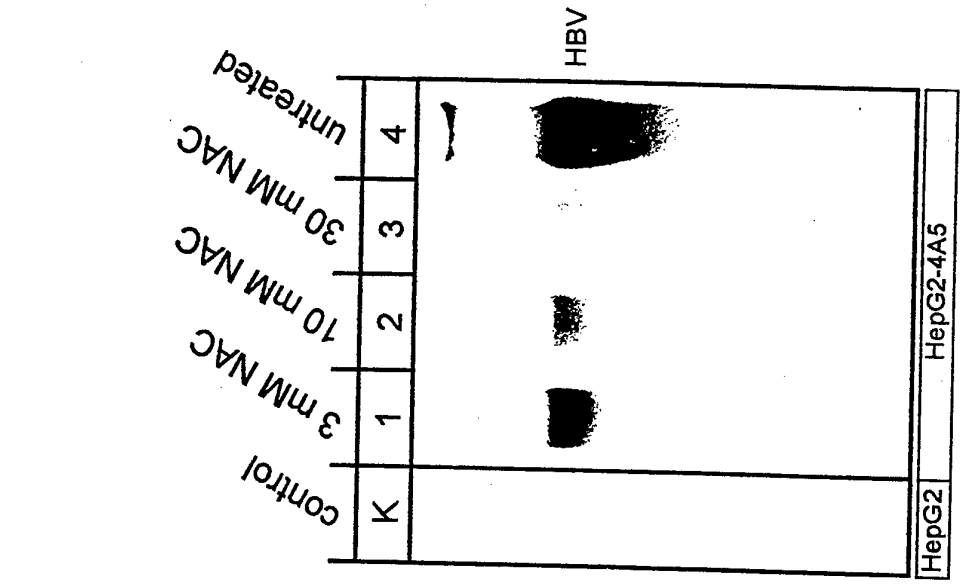



FIG. 2




(HBsAg bzw. HBeAg Enzym Immuno Assay: Abbott Laboratories)


HBV
untreated
30 mM NAC
10 mM NAC
3 mM NAC
control
4
3
2
1
K
HepG2-4A5
HepG2
3 b

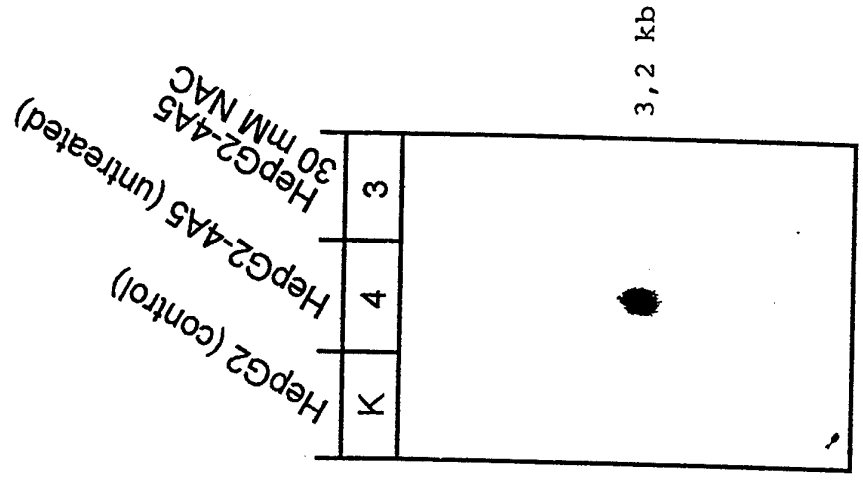

3,2 kb
HepG2-4A5
30 mM NAC
HepG2-4A5 (untreated)
HepG2 (control)
3
4
K
3 a

Fig. 3

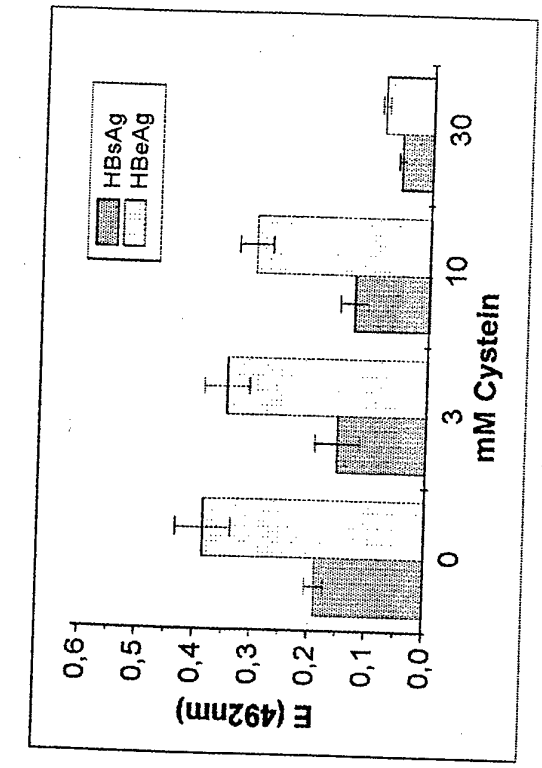



FIG. 4b

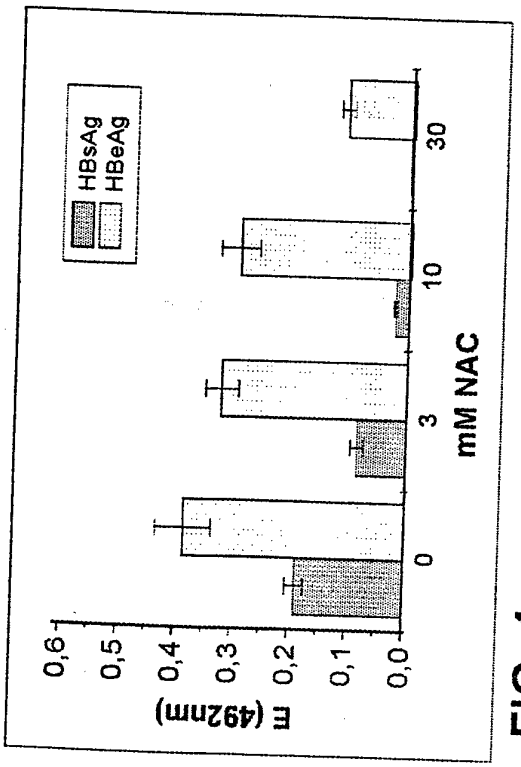



FIG. 4a

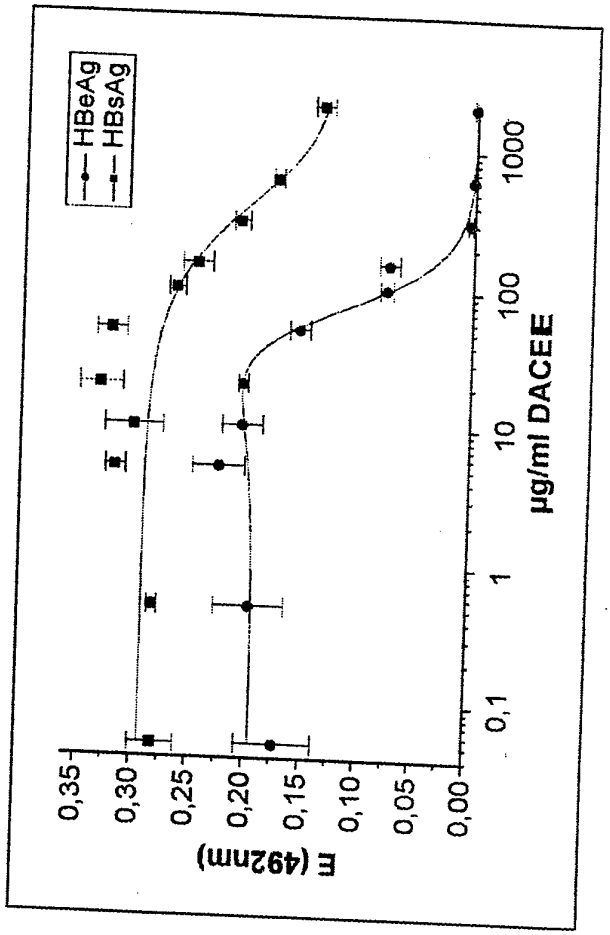



FIG. 4c

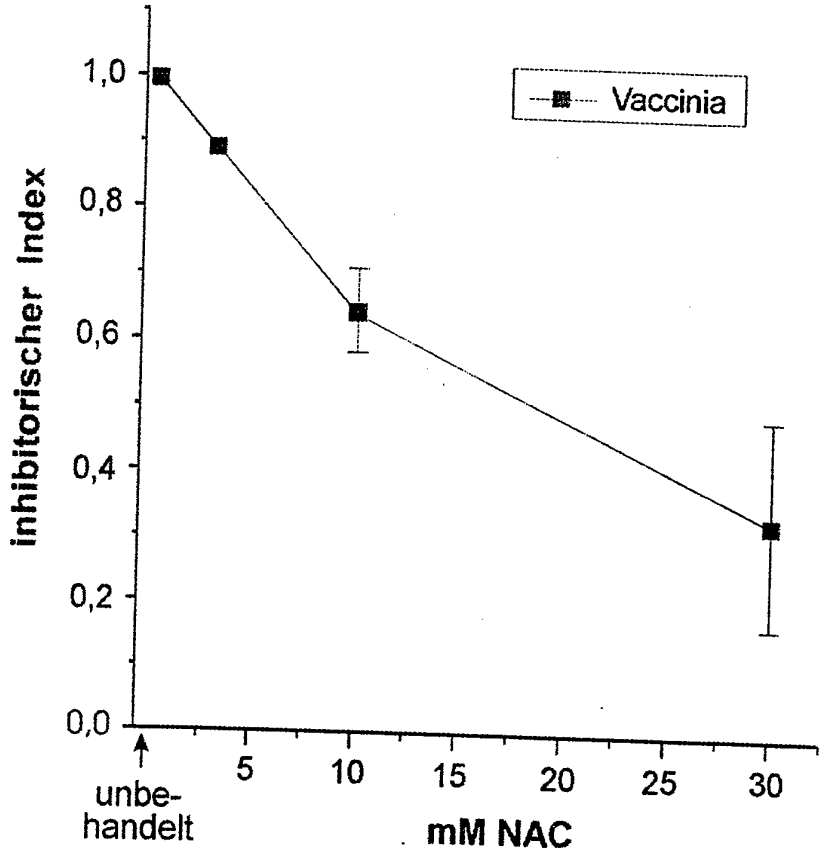

inhibitorischer Index
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Vaccinia
unbe-
handelt
5
10
15
20
25
30
mM NAC

FIG. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 94/02505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/195 A61K31/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| P,X | WO,A,94 14473 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 7 July 1994<br>see abstract; claims; examples | 1-6,8-11 |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 90, no. 9, 26 February 1979, Columbus, Ohio, US; abstract no. 66875, 'DISINFECTANT FOR HEPATITIS B VIRUS'<br>see abstract<br>& JP,A,53 118 516 (AJINOMOTO CO.) 17 October 1978 | 1-5,8-11 |
| X | WO,A,90 08540 (ZAMBON GROUP) 9 August 1990<br>see the whole document | 1,2,11 |
| X | US,A,4 708 965 (MORGAN) 24 November 1987<br>cited in the application<br>see the whole document | 1,2,11 |

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 18 November 1994 | 20. 12. 94 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Hoff, P |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | LABORATORIO,<br>vol.40, no.239, 1965<br>pages 401 - 423<br>L.A. PUERTAS ET AL. 'ACCION DE AGENTES QUIMICOS SOBRE EL VIRUS VACUNAL'<br>see the whole document | 1,2,7,11 |
| X | US,A,4 474 759 (PETROVICH) 2 October 1984<br>see the whole document | 1,2,11 |
| X | US,A,4 378 351 (PETROVICH) 29 March 1983<br>see the whole document | 1,2,11 |
| X | THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE,<br>vol.91, no.3C, 1991<br>pages 122S - 130S<br>S. DE FLORA ET AL. 'ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OTHER MECHANISMS OF THIOLS INVOLVED IN CHEMOPREVENTION OF MUTATION AND CANCER'<br>see abstract<br>see page 129S | 1-6,8-11 |
| X | FR,M,7 688 (SOCIETE D'ETUDES ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES) 16 February 1970<br>see claims; example 1 | 1-3,11 |
| X | MINERVA MEDICA,<br>vol.69, no.22, 1978<br>pages 1495 - 1501<br>G. BOSIO ET AL. 'STUDIO CLINICO E STATISTICO SULL'IMPIEGO DI alpha-MPG NEL TRATTAMENTO DELL'EPATITE VIRALE'<br>see the whole document | 1-5,9-11 |
| A | FR,M,4 619 (P. WIRTH) 2 January 1967<br>see the whole document | 1-11 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 94/02505

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see annex

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/EP 94/02505

Annex Box 1.2

Owing to the large number of compounds defined under "thiolic compound", the search had to be limited for reasons of economy. The search was confined to the inventive part of the compounds and to the substances described in the examples.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/EP 94/02505

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---|---|---|---|
| WO-A-9414473 | 07-07-94 | AU-B- | 5707694 | 19-07-94 |
| | | FR-A- | 2699407 | 24-06-94 |
| | | JP-A- | 6234657 | 23-08-94 |
| JP-A-53118516 | 17-10-78 | NONE | | |
| WO-A-9008540 | 09-08-90 | AU-B- | 639686 | 05-08-93 |
| | | AU-A- | 4969490 | 24-08-90 |
| | | BE-A- | 1004168 | 06-10-92 |
| | | CH-A- | 683499 | 31-03-94 |
| | | DE-T- | 4090165 | 21-11-91 |
| | | FR-A- | 2643557 | 31-08-90 |
| | | GB-A,B | 2243296 | 30-10-91 |
| | | JP-T- | 4504570 | 13-08-92 |
| | | KR-B- | 9402820 | 04-04-94 |
| | | LU-A- | 87977 | 11-03-92 |
| | | NL-A- | 9020094 | 01-10-91 |
| | | OA-A- | 9503 | 15-11-92 |
| | | SE-A- | 9101815 | 13-06-91 |
| US-A-4708965 | 24-11-87 | EP-A- | 0300100 | 25-01-89 |
| | | US-A- | 4827016 | 02-05-89 |
| US-A-4474759 | 02-10-84 | US-A- | 4469678 | 04-09-84 |
| US-A-4378351 | 29-03-83 | US-A- | 4378349 | 29-03-83 |
| | | US-A- | 4378350 | 29-03-83 |
| | | US-A- | 4452781 | 05-06-84 |
| FR-M-7688 | 16-02-70 | NONE | | |
| FR-M-4619 | | NONE | | |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/02505

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/195 A61K31/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| P,X | WO,A,94 14473 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 7. Juli 1994<br>siehe Zusammenfassung; Ansprüche; Beispiele<br>--- | 1-6,8-11 |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 90, no. 9, 26. Februar 1979, Columbus, Ohio, US; abstract no. 66875, 'DISINFECTANT FOR HEPATITIS B VIRUS'<br>siehe Zusammenfassung<br>& JP,A,53 118 516 (AJINOMOTO CO.) 17. Oktober 1978<br>--- | 1-5,8-11 |
| X | WO,A,90 08540 (ZAMBON GROUP) 9. August 1990<br>siehe das ganze Dokument<br>--- | 1,2,11 |
| | -/-- | |

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
|---|---|
| 18. November 1994 | 20. 12. 94 |
| Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde<br>Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter<br>Hoff, P |

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| X | US,A,4 708 965 (MORGAN) 24. November 1987<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe das ganze Dokument | 1,2,11 |
| X | LABORATORIO,<br>Bd.40, Nr.239, 1965<br>Seiten 401 - 423<br>L.A. PUERTAS ET AL. 'ACCION DE AGENTES QUIMICOS SOBRE EL VIRUS VACUNAL'<br>siehe das ganze Dokument | 1,2,7,11 |
| X | US,A,4 474 759 (PETROVICH) 2. Oktober 1984<br>siehe das ganze Dokument | 1,2,11 |
| X | US,A,4 378 351 (PETROVICH) 29. März 1983<br>siehe das ganze Dokument | 1,2,11 |
| X | THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE,<br>Bd.91, Nr.3C, 1991<br>Seiten 122S - 130S<br>S. DE FLORA ET AL. 'ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OTHER MECHANISMS OF THIOLS INVOLVED IN CHEMOPREVENTION OF MUTATION AND CANCER'<br>siehe Zusammenfassung<br>siehe Seite 129S | 1-6,8-11 |
| X | FR,M,7 688 (SOCIETE D'ETUDES ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES) 16. Februar 1970<br>siehe Ansprüche; Beispiel 1 | 1-3,11 |
| X | MINERVA MEDICA,<br>Bd.69, Nr.22, 1978<br>Seiten 1495 - 1501<br>G. BOSIO ET AL. 'STUDIO CLINICO E STATISTICO SULL'IMPIEGO DI alpha-MPG NEL TRATTAMENTO DELL'EPATITE VIRALE'<br>siehe das ganze Dokument | 1-5,9-11 |
| A | FR,M,4 619 (P. WIRTH) 2. Januar 1967<br>siehe das ganze Dokument | 1-11 |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/02505

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
SIEHE ANHANG

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN PCT/ISA/ 210

Anhang Feld I.2

Wegen der grossen Zahl der Verbindungen die unter "Thiolverbindung" definiert sind, musste die Recherche aus ökonomischen Gründen eingeschränkt werden. Die Recherche beschränkte sich auf den erfinderischen Teil der Verbindungen und auf die in den Beispielen beschriebenen Substanzen.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/02505

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|---|---|---|---|
| WO-A-9414473 | 07-07-94 | AU-B- | 5707694 | 19-07-94 |
| | | FR-A- | 2699407 | 24-06-94 |
| | | JP-A- | 6234657 | 23-08-94 |
| JP-A-53118516 | 17-10-78 | KEINE | | |
| WO-A-9008540 | 09-08-90 | AU-B- | 639686 | 05-08-93 |
| | | AU-A- | 4969490 | 24-08-90 |
| | | BE-A- | 1004168 | 06-10-92 |
| | | CH-A- | 683499 | 31-03-94 |
| | | DE-T- | 4090165 | 21-11-91 |
| | | FR-A- | 2643557 | 31-08-90 |
| | | GB-A,B | 2243296 | 30-10-91 |
| | | JP-T- | 4504570 | 13-08-92 |
| | | KR-B- | 9402820 | 04-04-94 |
| | | LU-A- | 87977 | 11-03-92 |
| | | NL-A- | 9020094 | 01-10-91 |
| | | OA-A- | 9503 | 15-11-92 |
| | | SE-A- | 9101815 | 13-06-91 |
| US-A-4708965 | 24-11-87 | EP-A- | 0300100 | 25-01-89 |
| | | US-A- | 4827016 | 02-05-89 |
| US-A-4474759 | 02-10-84 | US-A- | 4469678 | 04-09-84 |
| US-A-4378351 | 29-03-83 | US-A- | 4378349 | 29-03-83 |
| | | US-A- | 4378350 | 29-03-83 |
| | | US-A- | 4452781 | 05-06-84 |
| FR-M-7688 | 16-02-70 | KEINE | | |
| FR-M-4619 | | KEINE | | |