



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 21 426 T2** 2007.02.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 263 435 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 21 426.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR01/00320**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 910 188.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/064215**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **07.09.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.12.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.02.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/497** (2006.01)

**A61K 31/357** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**2000010540 02.03.2000 KR**

(73) Patentinhaber:

**Kim, Sang Geon, Seoul/Soul, KR**

(74) Vertreter:

**Hansmann & Vogeser, 81369 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**KIM, Geon, Sang, Seoul 140-727, KR; KANG,  
Wook, Keon, Seoul 136-113, KR**

(54) Bezeichnung: **PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR BEHANDLUNG UND PRÄVENTION DER LEBERFIBROSE UND-ZIRRHOSE**

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

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

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

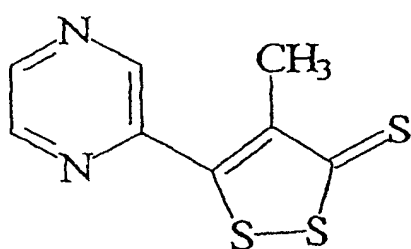
**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung und Prävention der Leberfibrose und -zirrhose. Speziell betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zur Behandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose umfassend 5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thion (Oltipraz) und Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylat (DDB) als Hauptwirkstoffe.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Die Leber spielt beim Metabolismus von Fremdstoffen und endogenen Substanzen eine Schlüsselrolle und ist ein wichtiges Organ mit stetigen enzymatischen Reaktionen und stetigem Energiemetabolismus. Unter den vielen chronischen Erkrankungen in Korea sind Hepatitis, Leberzirrhose und -krebs neben kardiovaskulären Erkrankungen die am meisten verbreiteten und lebensbedrohenden Erkrankungen. Da Korea im Vergleich zu entwickelten Ländern eine verhältnismäßig große Population an Trinkern hat und da die aus exzessiven Trinkgelagen resultierenden Beschädigungen der Leber ziemlich hoch sind, ist der Behandlung von Lebererkrankungen eine Menge Aufmerksamkeit zuteil geworden. Vielfach führt ein von einer chronischen Virusinfektion oder vom Alkoholgenuss herrührender chronischer Leberschaden zu Leberzirrhose oder -krebs. Unter Berücksichtigung der physiologischen Charakteristika und der Bedeutung des Lebergewebes und im Lichte der Wichtigkeit der Behandlung und Prävention von Lebererkrankungen besteht ein Bedarf bei der ultimativen Entwicklung von therapeutischen und präventiven Arzneimitteln gegen den Leberschaden.

**[0003]** Verschiedene Substanzen einschließlich mehrerer synthetischer Verbindungen und galenischer Zubereitungen zeigen sowohl in vitro als auch in vivo Leberschutzfunktionen. Obwohl bekannt war, dass Silymarin oder Betain Leberschutzwirkungen mit dem Wirkmechanismus der Cytokinhemmung und Erhöhung des Glutathionspiegels haben, wäre wegen deren geringer Wirksamkeit eine heilende Wirkung nur schwerlich zu erwarten. Da derzeit keine geeigneten Heilmittel gegen Lebererkrankungen zur Verfügung stehen, werden diese Mittel häufig für klinische Versuche verwendet. Malotilal und seine Derivate mit Indikation zur Behandlung der Leberfibrose schützen die Leber vor toxischen Chemikalien und der mögliche Wirkmechanismus umfasst die Induktion der konjugierenden Enzyme der Phase II und die Hemmung mehrerer P450-Cytochrome. Jedoch hemmen die Verbindungen in nicht selektiver Weise mehrere P450-Cytochrome und zeigen nur eine präventive Wirkung.

**[0004]** Es ist bekannt, dass mehrere Substituenten des in Kreuzblütler-Pflanzen natürlich vorkommenden, Schwefelhaltigen Dithiolthions Leberschutzwirkung haben. Von diesen wurde Oltipraz mit der folgenden Formel



als Heilmittel gegen Schistosomiasis verwendet.

**[0005]** Oltipraz erhöht den zellulären Thiol-Gehalt und induziert die Expression der für die Aufrechterhaltung des Glutathion(GSH)-Reservoirs und die Entgiftung des Gewebes von elektrophilen Molekülen verantwortlichen Enzyme. Die Aktivitäten der folgenden Enzyme werden durch Oltipraz erhöht: NAD(P)H-Chinonreduktase, mikrosomale Epoxidhydrolase, Glutathion-S-transferase (GST) und UDP-GT. Insbesondere schützt GST die Leber vor einigen toxischen Chemikalien wie zum Beispiel Tetrachlorkohlenstoff oder Acetaminophen (Ansher SS, Dolan P, und Bueding E., Chemoprotective effects of two dithiolthiones and of butylhydroxyanisole against carbon tetrachloride and acetaminophen toxicity, 1983, Hepatology 3, 932-935).

**[0006]** Darüber hinaus inhibiert Oltipraz die durch Benzo[a]pyren, NDEA und Uracil-Senf induzierte chemische Carcinogenese sowie auch die durch Aflatoxin B1-induzierte Lebertumorgenese und die durch Azoxymethan induzierte Colonicarcinogenese (Bolton, MG, Munoz, A., Jacobson, LP, Groopman, JP, Maxuitenko, YY,

Roebuck, BD und Kensler TW., Transient intervention with Oltipraz protects against aflatoxininduced hepatic tumorigenesis, 1993, Cancer Res. 53, 3499–3504).

**[0007]** Die bekannten Hemm-Mechanismen der Carcinogenese durch Oltipraz sind die folgenden: Zunächst erhöht Oltipraz den Spiegel eines Antioxidanz, nämlich des reduzierten GSH, in Geweben. Zweitens inhibiert es die Bioaktivierung von Carcinogenen durch Inhibierung von Enzymen der Phase 1 wie zum Beispiel P450-Cytochrom. Drittens fördert es die Entgiftung von Carcinogenen durch Induzieren von Entgiftungsenzymen der Phase II einschließlich GST und UDP-GT. Viertens inhibiert Oltipraz die Replikation des menschlichen Immundefizienz-Virus (HIV) Type I in vitro. Fünftens entfernt es reaktive Zwischenstufen in Zellen durch Erhöhung der Thiol-Spiegel und es fördert die DNA-Reparatur. Es ist berichtet worden, dass Oltipraz die GSH-Spiegel in den meisten Geweben erhöht und durch Strahlung oder Fremdstoffe erzeugte freie Radikale entfernt. Es ist ebenfalls bekannt, dass Oltipraz als Strahlenschutzmittel fungiert, indem es hilft, die zelluläre Homeostase aufrechtzuerhalten.

**[0008]** Hinsichtlich der obigen Beschreibung wird nchfolgend detailliertere Information vermittelt. Krebs ist vermutlich durch DNA-Schäden in somatischen Zellen hervorgerufenes unkontrolliertes Zellwachstum und unkontrollierte Differenzierung (Cancer Biology, 3te Ausgabe, Raymond W. Ruddon, S. 61–95, 497–507, Oxford Press). Antikrebs-Wirkungen chemischer Mittel beruhen vorwiegend auf ihren Antimutagenese-Wirkungen oder ihrer Aktivität bei der Unterdrückung der Transformation zu oder der Proliferation von Krebszellen. Oltipraz wurde als chemopräventives Krebsmittel untersucht (Ansher et al., 1983, Bolton et al., 1993). Die chemopräventiven Wirkungen auf Krebs durch Oltipraz sind nicht nur mit der Hemmung von P450 3A-Cytochrom sondern auch mit der Induktion der Entgiftungsenzyme der Phase II assoziiert. Die Expression der Glutathion-S-transferase (GST) wird durch Oltipraz in Zellen und Tieren erhöht (Clapper et al., 1994, Davidson et al., 1990), was mit der Suppression der durch toxische Substanzen induzierten Gewebebeschädigungen und Carcinogenese (Kensler et al., 1987, Maxuitenko et al., 1998) assoziiert ist. Oltipraz schützt die Leber vor durch Strahlung verursachten Gewebeschäden (Kim et al., 1997) und die aus früheren Studien bekannte GST-Induktion bedeutet eine adaptive zelluläre Reaktion. Oltipraz schützt die Leber ebenfalls vor toxischen Substanzen (Ansher et al., 1983). Die Inhibition der durch Aflatoxin B1-induzierten Carcinogenese durch Oltipraz wird durch das Eingreifen bei der durch P450 3A-Cytochrom katalysierten metabolischen Aktivierung des Carcinogens vermittelt. Gemäß jüngeren klinischen Studien war Oltipraz bei der Senkung der Aflatoxin B1-Plasmaspiegel bei Personen mit einem hohen Leberkrebsrisiko wirksam. Ebenfalls wurde die durch Aflatoxin B1 induzierte Carcinogenese bei Tieren durch die Anwendung von Oltipraz reduziert.

**[0009]** Es ist berichtet worden, dass Oltipraz die Replikation des Hepatitis B-Virus (HBV) in 2.2.15-Zellen inhibiert, die mit einem HBV-DNA-enthaltenden Plasmid infiziert waren. Folglich hemmt Oltipraz die Transkription des Hepatitis B-Virus-Gens, erhöht die p53-Proteinexpression (Chi et al., 1998) und hemmt die Replikation des menschlichen Immundefizienz-Virus (HIV) (Prochaska et al., 1995).

**[0010]** Klinische Versuche hinsichtlich der chemopräventiven Wirkung von Oltipraz bei der Lebercarcinogenese sind in China durchgeführt worden. Die Ergebnisse zeigen, dass Oltipraz eine schwache Schutzwirkung bei der Lebercarcinogenese hat. Es ist ebenfalls bekannt, dass Oltipraz die Leber mindestens in mäßiger Weise vor durch toxische Substanzen induzierter Heptatotoxizität schützt. Zusätzlich ist die Sicherheit von Oltipraz in mit Ratten und Hunden durchgeführten Toxizitätsstudien bewiesen worden (Fund. Appl. Toxicol. 1997, Jan. 35(1), 9–21).

**[0011]** DDB (Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylendioxybiphenyl-2,3'-dicarboxylat), eine aus Schizandra stammende Verbindung, ist ein in Ostasien, einschließlich Korea zur Behandlung von Hepatitis klinisch verwendetes Heilmittel. DDB schützt das Lebergewebe vor Tetrachlorkohlenstoff-, Galactosamin-, Thioacetamid- oder Prednisolon-induzierten Beschädigungen und verstärkt die Antikörperproduktion.

**[0012]** DDB wird weit reichend im klinischen Milieu verwendet, da es sich in klinischen Versuchen bei Patienten mit Hepatitis als wirksam erwiesen hat. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben berichtet, dass die pharmakologische Wirkung von DDB mit der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der TNF- $\alpha$ -Produktion assoziiert ist. Weiterhin wurde gefunden, dass DDB sich nicht auf die Expression der Arzneimittel metabolisierenden Enzyme auswirkt. Da NF- $\kappa$ B als ein die Entzündungsreaktion vermittelnder Transkriptionsfaktor bekannt ist, wäre ein Inhibitor von NF- $\kappa$ B zur Hemmung einer systemischen Entzündungsreaktion im Stande.

**[0013]** Leberfibrose ist ein präpathologischer Zustand, worin geschädigtes Lebergewebe bei chronischen Lebererkrankungen wie Hepatitis nicht zu normalem Gewebe repariert, sondern als Teil einer adaptiven in vivo-Reaktion zu fibrösem Gewebe wie Kollagen umgewandelt wird.

**[0014]** Obwohl Leberfibrose das Ergebnis eines in vivo-Reparaturprozesses als Reaktion auf einen Gewebeschaden ist, wird geschädigtes Lebergewebe durch fibröses Gewebe ersetzt, das nicht mehr normal funktionieren kann (z.B. beim in vivo-Metabolismus oder bei der Herstellung von Gallensaft). Da kontinuierliche und wiederholt auftretende Leberfibrose zu -zirrhose führt und schließlich den Tod verursacht, ist es von entscheidender Bedeutung, dass neue Arzneimittel zur Behandlung der Leberfibrose entwickelt werden. Es sind jedoch bisher noch keine geeigneten Heilmittel entwickelt worden, da der genaue Entstehungsmechanismus der Leberfibrose nicht bekannt ist.

**[0015]** Jüngste Studien haben gezeigt, dass der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ein von den Kupfer- und Ito-Zellen in der Leber sezerniertes Cytokin, ein wichtiger Vermittler bei der Leberfibrose ist. Zusätzlich wurde berichtet, dass das Blockieren der TGF- $\beta$ -Aktivität durch Einsatz von TGF- $\beta$ -Antikörper, Antisense-RNA und Modifizieren von TGF- $\beta$ -Rezeptoren die Leberfibrose deutlich vermindert. Die Auswirkungen dieser Forschungsergebnisse sind jedoch bisher nur auf experimenteller Ebene bestätigt worden. Klinisch brauchbare Arzneimittel gegen Leberfibrose und -zirrhose sind bisher nicht berichtet worden.

#### ZIEL DER ERFINDUNG

**[0016]** Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitzustellen, die die Wirksamkeit bei der Behandlung von Leberfibrose und -zirrhose maximiert und das ebenfalls als präventives Mittel verwendet werden kann.

**[0017]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Anwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung bereitzustellen, die bei der Herstellung einer Arznei zur Behandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose verwendet wird.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0018]** Die vorliegende Erfindung stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose bereit, die als Hauptkomponenten 5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thion (Oltipraz) und Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylat (DDB) umfasst. Das Verhältnis von Oltipraz und DDB in der Zusammensetzung ist vorzugsweise 25:0–25, insbesondere bevorzugt 5:0, 1–5 und am meisten bevorzugt 5:1. Erfindungsgemäße Oltipraz/DDB-Formulierungen zeigen überraschend gute Wirkung bei der Behandlung und Prävention der Leberfibrose und -zirrhose und sind sichere Arzneimittel, die im menschlichen Körper eine geringe Toxizität haben.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

**[0019]** [Fig. 1a](#) ist ein Foto, das die Hemmwirkung von Oltipraz auf TGF- $\beta$  1 mRNA-Expression in Lebergewebe zeigt, wenn einer Ratte DMN verabreicht wird.

**[0020]** [Fig. 2a](#) ist ein Foto von Lebergewebe eines normalen Tiers (H&E-Färbung).

**[0021]** [Fig. 2b](#) ist ein Foto von Lebergewebe eines normalen Tiers (H&E-Färbung).

**[0022]** [Fig. 3a](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN verabreicht wurde (H&E-Färbung).

**[0023]** [Fig. 3b](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN verabreicht wurde (Trichrom-Färbung nach Masson).

**[0024]** [Fig. 4a](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN und Oltipraz (25 mg/kg)/DDB (5 mg/kg) gleichzeitig verabreicht wurde (H&E-Färbung).

**[0025]** [Fig. 4b](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN und Oltipraz (25 mg/kg)/DDB (5 mg/kg) gleichzeitig verabreicht wurde (Trichrom-Färbung nach Masson).

**[0026]** [Fig. 5a](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN und Oltipraz (15 mg/kg)/DDB (15 mg/kg) gleichzeitig verabreicht wurde (H&E-Färbung).

**[0027]** [Fig. 5b](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN und Oltipraz (15 mg/kg)/DDB (15 mg/kg) gleichzeitig verabreicht wurde (Trichrom-Färbung nach Masson).

**[0028]** [Fig. 6a](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN und Oltipraz (5 mg/kg)/DDB (25 mg/kg) gleichzeitig verabreicht wurde (H&E-Färbung).

**[0029]** [Fig. 6b](#) ist ein Foto von Lebergewebe aus der Gruppe, der DMN und Oltipraz (5 mg/kg)/DDB (25 mg/kg) gleichzeitig verabreicht wurde (Trichrom-Färbung nach Masson).

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER VORLIEGENDEN ERFINDUNG

**[0030]** Die Erfinder haben die bisher noch nicht da gewesene Entdeckung gemacht, dass Oltipraz eine unerwartete, überraschende Wirkung bei der Behandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose hat. Weiterhin haben sie entdeckt, dass die Wirksamkeit von Oltipraz bei der Behandlung und Prävention in Kombination mit DDB erheblich gesteigert wird.

**[0031]** Fibrose, eine Vorstufe der Zirrhose, tritt auf, wenn die Leber durch eine Vielzahl von Faktoren schwer geschädigt wurde. Die Zirrhose ist teilweise mit der Carcinogenese verwandt und erhöht bei davon betroffenen Opfern in besonderem Maße das Leberkrebsrisiko. Der pathologische Mechanismus der Leberzirrhose ist jedoch vom Leberkrebs klar zu unterscheiden. Das heißt, dass die Leberfibrose auftritt, wenn eine chronische und schwere Schädigung des Lebergewebes vorliegt. Die einen Leberschaden verursachenden Faktoren beinhalten Viren, Parasiten, Alkoholkonsum, Chemikalien und Arzneien. Leberfibrose tritt durch eine Überproduktion extrazellulärer Matrix (z.B. Typ I-, III- und IV-Kollagen) auf, die durch Aktivierung nicht zum Parenchym gehörender Zellen im Lebergewebe, z.B. der Kupffer- oder Sternzellen etc. verursacht wird. Speziell erfolgt die Fibrose durch die Aktivierung und den anschließenden Umbau von Sternzellen zu Myofibroblasten. Die aktivierten Sternzellen produzieren dann überschüssige extrazelluläre Matrices. Darüber hinaus sind Leberfibrose und -zirrhose als pathologische Phänomene von viraler Hepatitis und Leberkrebs klar zu unterscheiden. Damit sind ihre entsprechenden Behandlungs- und Präventionsmaßnahmen ebenfalls unterscheidbar. Es gibt jedoch derzeit kein klinisch brauchbares Arzneimittel gegen Leberzirrhose.

**[0032]** Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass das als wirksam bei der Prävention von Leberkrebs bekannte Oltipraz ebenfalls gegen Leberfibrose und -zirrhose wirksam ist, die sich in ihrem pathologischen Mechanismus völlig vom Leberkrebs unterscheiden und dass die Verwendung von Oltipraz mit dem zuvor nur als wirksam gegen Hepatitis bekannten DDB eine über die Erwartungen hinausgehende Wirksamkeit bei der Behandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose bereitstellt. Die Tatsachen sind durch die unten beschriebenen Experimente bewiesen.

**[0033]** Oltipraz oder Oltipraz/DDB senken die Werte auf der Fibrose- und der Knodell-Bewertungsskala (Score) als Indikatoren der durch Dimethylnitrosamin (DMN) beschleunigten Fibrose. Dies ist in Übereinstimmung mit beispielhaften mikroskopischen Gewebeuntersuchungen. Zusätzlich sind als Folge der Verabreichung von Oltipraz oder Oltipraz/DDB die Indikatoren der Lebertoxizität wie ALT, AST, Bilirubin und  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) deutlich gehemmt. Dies zeigt, dass Oltipraz oder Oltipraz/DDB die Fibrose durch Verzögern ihrer jeweiligen Verläufe verbessern kann. Der Hemm-Mechanismus durch Oltipraz oder Oltipraz/DDB dreht sich um die Hemmung der TGF- $\beta$ -Expression. Gemäß quantitativer RT-PCR-Ergebnisse hemmen Oltipraz oder Oltipraz/DDB die durch Dimethylnitrosamin beschleunigte m-RNA-Expression von TGF- $\beta$  vollständig. Dies dient als Beweis, dass Oltipraz ein zur Hemmung der Entstehung und der Progression von Leberfibrose und -zirrhose befähigtes Arzneimittel ist. Oltipraz induziert die Leberentgiftungsenzyme GST und mEH, erhöht GSH und hemmt die Paarbildungsaktivität mit freien Radikalen; im Gegensatz dazu induziert DDB die Entgiftungsenzyme nicht. Angesichts der obigen Ausführungen wird angenommen, dass Oltipraz und DDB völlig verschiedene pharmakologische Wirkungsweisen haben. Speziell ausgeführt kann, da von der Hemmung der metabolischen CYP3A-Aktivität in den Mikrosomen der menschlichen Leber durch DDB angenommen wird, dass diese anschließend den Oltipraz-Metabolismus hemmt, sogar eine niedrige Dosis von Oltipraz einen potenten Leberschutz bereitstellen und die Wirkungsdauer des Arzneimittels verlängert werden.

**[0034]** Bei der vorliegenden Erfindung wurden die Heilwirkungen von Oltipraz/DDB-Kombinationen in verschiedenen Verhältnissen an Ratten beobachtet, denen DMN verabreicht worden war. Die Tests wurden mit Gew.-Verhältnissen von 25:5, 15:15 und 5:25 (mg/kg) von Oltipraz zu DDB durchgeführt. Bei den Ergebnissen waren, wenn DMN verabreicht worden war (die Beobachtungen wurden 1 Woche nach 3wöchiger Verabreichung durchgeführt), ALT, AST, Bilirubin,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) und der Fibrose- und Knodell-Score im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu nahmen diese Werte ab, wenn Oltipraz/DDB verabreicht wurden. Oltipraz (25 mg/kg)/DDB (5mg/kg) zeigte die höchste Leberfibrosehemmende Wirkung. Dies beweist, dass Oltipraz und DDB einen Synergismus bei der Unterdrückung von Leberschaden und -fibrose zeigen und dies lehrt, dass das optimale Verhältnis dieser Verbindungen zwischen 5:1 liegt.

Weiterhin reduzierte die Verabreichung der Oltipraz/DDB-Kombination die biochemischen Blutindices, d.h. die Leberfibrose- und Knodell-Scores, stärker als Oltipraz (50 mg/kg) allein. Entsprechend wird angenommen, dass die Verwendung von Oltipraz mit DDB Nebenwirkungen wie zum Beispiel Störungen des Gastrointestinaltrakts, Parästhesien der Hände und Füße, etc. reduzieren kann, die aus hohen Oltipraz-Dosen resultieren können. DDB hemmt die durch DMN induzierte Entzündungsreaktion, während Oltipraz die TGF- $\beta$ -Expression verhindert, die Expression antioxidativer Enzyme erhöht und eine Erhöhung von GSH induziert. Durch diesen Mechanismus maximieren Oltipraz/DDB die Wirkung bei der Behandlung und Prävention der Leberfibrose. Somit machen sich Oltipraz/DDB zum Schutz der Leber komplementäre Effekte zu Nutze. Weiterhin kann Oltipraz/DDB klinisch eingesetzt werden, da es fast keine Nebenwirkungen zeigt.

**[0035]** Es ist vorzuziehen, dass die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung durch Kombinieren unabhängig von einander formulierter Arzneimittel oder durch Herstellung einer aus einer Mischung der Arzneimittel bestehenden Kombinationsformulierung angewendet wird. Wenn die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung in der Realität eingesetzt wird, sind für die orale Verabreichung geeignete Einheitsdosisformen gemäß den auf pharmazeutischem Gebiet üblichen Gepflogenheiten herzustellen und zu verabreichen. Um dies zu erzielen, umfasst die orale Formulierung Weich- und Hartkapseln, Tabletten, Pulver etc. Die orale Formulierung kann zusätzlich zu Oltipraz/DDB als pharmakologischem Wirkstoff einen oder mehrere pharmakologisch nicht-aktive herkömmliche Trägermedien enthalten. Zum Beispiel kann die orale Zubereitung als Zusatzstoffe Stärke, Laktose, Carboxymethylcellulose, Kaolin und dergleichen, als Hilfsstoffe, Wasser, Gelatine, Alkohol, Glucose, Gummi arabicum, Tragantgummi und dergleichen, als Bindemittel, Stärke, Dextrin, Natriumalginat und dergleichen, als Zerfallsstoffe, Talkum, Stearinsäure, Magnesiumstearat, flüssiges Paraffin und dergleichen, als Gleitmittel enthalten. Weiterhin können die Auflösung erleichternde Hilfsstoffe zugegeben werden.

**[0036]** Die erfindungsgemäße tägliche Dosis hängt von verschiedenen Faktoren ab wie zum Beispiel dem Grad des Leberschadens beim Patienten, dem Zeitpunkt des Beginns der Hepatitis, dem Alter, dem Gesundheitszustand, den Komplikationen etc. Jedoch wird einem durchschnittlichen Erwachsenen ein- oder zweimal täglich als tägliche Gesamtdosis von 5 bis 200 mg, insbesondere bevorzugt 25 bis 50 mg verabreicht. Jedoch kann die vorliegende Erfindung bei Patienten mit schwerem Leberschaden oder beim Einsatz zur Rezidivprophylaxe nach einer Resektion bei Leberkrebs von dem Dosisbereich der obigen pharmazeutischen Zusammensetzung abweichen und es können sogar höhere Dosierungen eingesetzt werden. Am meisten bevorzugt ist, dass ein oder zwei 25 mg Oltipraz und 5 mg DDB enthaltende Einheitsdosierungen zweimal täglich oral verabreicht werden.

**[0037]** Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ergänzt das beachtliche Fibrosehemm- und Leberschutz-Eigenschaften aufweisende Oltipraz in optimaler Weise mit DDB, das eine ausgezeichnete Wirkung bei der Unterdrückung der Entzündungsreaktion hat. Durch das oben ausgeführte wird eine Hemmung der Leberfibrose und -zirrhose mit geringer Toxizität und nahezu ohne Nebenwirkungen bereitgestellt. Damit kann die vorliegende Erfindung zur sicheren Langzeitbehandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose eingesetzt werden.

**[0038]** Die vorliegende Erfindung wird durch die unten angeführten Arbeitsbeispiele in weiteren Einzelheiten erklärt. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf diese Arbeitsbeispiele beschränkt.

## TESTBEISPIELE

### TESTBEISPIEL 1

#### Antifibrotische Wirkung von Oltipraz (1)

**[0039]** Ratten, denen über einen Zeitraum von 4 Wochen konstant Dimethylnitrosamin (DMN) verabreicht worden war, zeigten einen vierfachen Anstieg der Alanin- und Aspartat-Aminotransferase im Plasma. Als Folge der Vorbehandlung mit 50 mg/kg Oltipraz waren der Anstieg von ALT im Blutplasma und die AST-Aktivierung um 50% gesenkt (Tabelle 1).

**[0040]** Die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) im Plasma und der Bilirubin-Gehalt werden als Indikatoren der Leberfunktionalität verwendet. Oltipraz inhibiert den Anstieg der  $\gamma$ -GT um 70% bis 80% bei Ratten, denen DMN verabreicht wurde. Auf der anderen Seite steigt der Bilirubin-Gehalt nach Verabreichung von DMN im Vergleich zur Kontrollgruppe auf das 8fache. Bei gleichzeitiger Verabreichung von 50 mg/kg Oltipraz und DMN wird der Bilirubin-Anstieg im Plasma um 65% inhibiert.

TABELLE 1

ALT-, AST-,  $\gamma$ -GT-, BILIRUBIN-WERTE

Gruppe	ALT	AST	$\gamma$ -GT	Bilirubin
Kontrolle	49 $\pm$ 2	113 $\pm$ 6	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,01
DMN	190 $\pm$ 12 <sup>*</sup>	412 $\pm$ 39 <sup>*</sup>	12,1 $\pm$ 4,1 <sup>*</sup>	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>*</sup>
DMN + Oltipraz 50 mg/kg	116 $\pm$ 4 <sup>#</sup>	246 $\pm$ 32 <sup>#</sup>	2,6 $\pm$ 0,5 <sup>#</sup>	0,3 $\pm$ 0,03 <sup>#</sup>

**[0041]** Jeder Wert ist mit der  $\pm$ -Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl der eingesetzten Tiere liegt im Bereich von 8 bis 16. Die Signifikanz jeder Gruppe wurde durch den Newman-Keuls-Test für multiple Analyse gezeigt. Die Signifikanz-Marker sind <sup>\*</sup> = p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle, <sup>#</sup> = p < 0,05 im Vergleich zur mit DMN behandelten Gruppe.

TESTBEISPIEL 2

Antifibrotische Wirkung von Oltipraz (2)

**[0042]** Die Wirkung von Oltipraz auf pathologisches Gewebe bei durch DMN induzierter Leberfibrose wurde im Tierversuchs-Modell beobachtet. Klare Fibrose wurde bei Ratten beobachtet, denen über einen Zeitraum von 4 Wochen 3mal wöchentlich DMN verabreicht worden war. Wenn Oltipraz (oral in Dosen von 5 bis 50 mg/kg 3mal wöchentlich über 4 Wochen verabreicht) und DMN gleichzeitig verabreicht wurden, war die Fibrose im Lebergewebe im Vergleich zur Verabreichung von DMN allein reduziert. Nekrose und Fibrose in pathologischem Lebergewebe wurden durch die Verwendung von Indikatoren für pathologisches Lebergewebe, nämlich durch Färbung nach van Gieson und durch die Trichrom-Färbung nach Masson (Tabelle 2) bestimmt.

**[0043]** Eine Dosis von 50 mg/kg Oltipraz verbesserte wirksam die durch DMN induzierte Fibrose (Tabelle 2). Das Ausmaß der Fibrose wurde durch Beurteilung nach den Fibrose- und Knodell-Scores vorgenommen, was die Ausmaße des Leberschadens und der Leberfibrose zeigt. Im Vergleich zu der Gruppe, der nur DMN verabreicht wurde, zeigte die DMN- plus Oltipraz-Gruppe geringere Werte für die Fibrose- und Knodell-Scores (Werte), womit sich Oltipraz als Heilmittel gegen Leberschaden und -fibrose erwies.

TABELLE 2

Hemmwirkung von Oltipraz auf die Fibrose des Lebergewebes

Gruppe	Fibrose-Werte	Knodell-Werte
Kontrolle	0	0
DMN	3,7 $\pm$ 0,5	16,1 $\pm$ 2,9
DMN+Oltipraz 5 mg/kg	3,1 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>	11,1 $\pm$ 1,7 <sup>*</sup>
DMN+Oltipraz 15 mg/kg	2,9 $\pm$ 0,8 <sup>*</sup>	12,1 $\pm$ 1,9 <sup>*</sup>
DMN+Oltipraz 50 mg/kg	2,5 $\pm$ 0,9 <sup>**</sup>	8,0 $\pm$ 1,6 <sup>**</sup>

**[0044]** Jeder Wert wird durch die durchschnittliche  $\pm$ -Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl der eingesetzten Tiere war 8 bis 16. Die Signifikanz jeder Gruppe wurde durch den Newman-Keuls-Test bei multipler Analyse bestimmt. <sup>\*</sup>p < 0,05, <sup>\*\*</sup>p < 0,01. Grad der Fibrose 0 = normal, 1 = Vorliegen schwacher Fibrose, 2 = mäßiges Vorliegen fibrotischen Gewebes, 3 = offensichtliches Vorliegen fibrotischen Gewebes, 4 = Nachweis schwerer Fibrose. Die Summe der Werte aus periportal Brückenbildung (am höchsten = 10), Zellverlust in den Leberläppchen (am höchsten = 4), Portalentzündung (am höchsten = 4) und Fibrose (am höchsten = 4) ergibt den Knodell-Score (Wert).

## TESTBEISPIEL 3

## Pharmakologischer, antifibrotischer Mechanismus von Oltipraz

**[0045]** TGF- $\beta$  ist ein hauptsächliches Cytokin, dessen Expression während der Fibrose als Folge eines Gewebeschaden ansteigt. Die Expression der mRNA von tierischem TGF- $\beta$  wurde mit RT-PCR als analytischem Verfahren während der DMN-Verabreichung allein und bei gleichzeitiger Verabreichung von DMN und Oltipraz beobachtet. Bei Tieren, denen während 4 Wochen DMN verabreicht wurde, verhinderte ein irreversibles Übermaß an Fibrogenese die Beobachtung der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression. TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression wurde bei Tieren beobachtet, denen DMN nur einmal verabreicht wurde. 18 h nach DMN Verabreichung wurde Oltipraz verabreicht. TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression wurde dann 24 h später beobachtet. Die TGF- $\beta$ 1 mRNA war in besonderem Maße im Lebergewebe von Ratten nach DMN-Verabreichung erhöht. DMN induzierte Expression von TGF- $\beta$ 1 mRNA wurde durch die Verabreichung von 100 mg/kg Oltipraz vollständig inhibiert. Die GAPDH-mRNA-Expression änderte sich weder durch DMN-Verabreichung allein noch durch gleichzeitige Verabreichung von DMN und Oltipraz. Folglich ist gezeigt, dass Oltipraz die Leberfibrose durch einen pharmakologischen Mechanismus inhibiert, der die TGF- $\beta$ 1 Expression reduziert ([Fig. 1](#)).

## TESTBEISPIEL 4

Bewertung von Oltipraz bei der Hemmung der TGF- $\beta$ 1 Produktion

**[0046]** Unter Verwendung von RAW264.7-Makrophagenzellen wurde ein Test zur Feststellung durchgeführt, ob Oltipraz direkt die Produktion von in Makrophagen überexprimiertem TGF- $\beta$  inhibiert und zur Beurteilung verwandter molekularer pharmakologischer Mechanismen. Wenn Oltipraz direkt zu RAW 264.7-Zellen mit erhöhter TGF- $\beta$ -Expression gegeben wurde, wurde für Oltipraz eine dosisabhängige Inhibition der TGF- $\beta$ -Expression entdeckt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Oltipraz durch Hemmung der TGF- $\beta$ -Produktion in den Kupffer-Zellen der Leber als ein anti-fibrotisches Mittel fungieren kann. Darüber hinaus wird der Anstieg der TGF- $\beta$ -Expression durch EGTA oder durch Genistein inhibiert, das ein Inhibitor der Tyrosinkinase ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Hemmung der TGF- $\beta$ -Produktion durch Oltipraz das Ergebnis einer intrazellulären Calcium-Regulierung und Veränderungen der Proteinkinase-Aktivität sein können (Tabelle 3).

## TABELLE 3

Hemmung der TGF- $\beta$ -Expression durch Oltipraz in Makrophagen

	Kontrolle	Oltipraz 30 $\mu$ M	Oltipraz 100 $\mu$ M	EGTA 1 mM	Genistein 100 $\mu$ M
TGF- $\beta$ -Hemmung (%)	0	30	60	80	80

## TESTBEISPIEL 5

## Antientzündlicher Mechanismus von DDB

(Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung)

**[0047]** Es ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit entzündlichen Reaktionen assoziiert ist. Zum Vergleich der NF- $\kappa$ B-Aktivität in Lebergewebe mit und ohne Verabreichung von DDB wurden die folgenden Tests durchgeführt. Männliche SD-Ratten mit einem Gewicht von etwa 150 g wurden eingesetzt. Für eine Gruppe wurden 7 Ratten eingesetzt. Bei der Kontrollgruppe (der nur das Transportmittel des Medikaments verabreicht wurde) und der Testgruppe (der 20 bis 100 mg/kg/Tag an DDB verabreicht wurde) wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität als Folge der Behandlung mit einem Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) unter Verwendung eines Assays zur Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität (EMSA) gemessen.

**[0048]** LPS-Behandlung (1  $\mu$ g/kg) führte zu einem Anstieg des Transkriptionsniveaus von nuklearen NF- $\kappa$ B-p50- und -p65-Komplexen. Die DDB-Behandlung (20 bis 100 mg/kg) 2 h vor der LPS-Behandlung blockierte jedoch die Translokation des NF- $\kappa$ B-Komplexes in den Zellkern und dessen Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass DDB zur Hemmung der durch LPS-induzierbaren NF- $\kappa$ B-Aktivität in der Rattenleber in der Lage ist.



**[0049]** Die Stimulierung von Raw264.7-Zellen mit 1 µg/kg LPS bewirkte einen Anstieg der DNA-Bindungsaktivität von NF-κB nach 30 min bis 1 h. DDB in Konzentrationen von 0,1, 0,3 und 1 mM hemmte die NF-κB-Aktivität in einer konzentrationsabhängigen Weise. Diese Ergebnisse waren mit den in den Lebern von mit DDB behandelten Ratten erhaltenen konsistent (Tabelle 4).

TABELLE 4

Wirkung von DDB auf die NF-κB-Aktivierung

Gruppe	LPS 1 µg/kg oder 1 µg/ml	LPS + DDB 20 mg/kg	LPS + DDB 50 mg/kg	LPS + DDB 100 mg/kg	LPS + DDB 0,1 mM	LPS + DDB 0,3 mM	LPS + DDB 1,0 mM
%-Hemmung der NF-κB- Aktivierung	0	42	63	73	33	35	65

Hemmung des I-κBα-Abbau

**[0050]** Der Translokation von NF-κB in den Zellkern ging die Phosphorylierung und der proteolytische Abbau der 1-κBa-Untereinheit voraus. Dieser Test wurde durchgeführt, um nachzuprüfen, ob die Wirkung von DDB auf die NF-κB-Aktivierung mit der Hemmung des I-κBα-Abbaus assoziiert ist. Der Spiegel des 1-κBa-Proteins war 30 min nach Behandlung von Ratten mit LPS (1 µg/kg) reduziert. Im Gegensatz dazu milderte eine Behandlung mit DDB 2 h vor der LPS-Behandlung die Abnahme des I-κBα-Proteins durch LPS. DDB inhibierte ebenfalls bei RAW264.7-Zellen den Abbau des I-κBα-Proteins in konzentrationsabhängiger Weise bei Konzentration von 0,3 bis 1 mM. Die Ergebnisse zeigen, dass DDB den Abbau des 1-κBa-Proteins und die resultierende NF-κB-Aktivierung inhibiert.

TABELLE 5

Wirkung von DDB auf den Abbau von I-κBα

	LPS 1 µg/kg oder 1 µg/ml	LPS + DDB 100 mg/kg	LPS + DDB 0,1 mM	LPS + DDB 0,3 mM	LPS + DDB 1,0 mM
%-Hemmung des I-κBα- Abbaus	0	67	22	34	65

TESTBEISPIEL 6

Antientzündlicher Mechanismus von DDB

(Hemmung der TNF-α-Produktion und -mRNA-Expression)

**[0051]** TNF-α ist ein hauptsächlicher Vermittler der Reaktionen auf LPS und ist bei entzündlichen Prozessen beteiligt. Es wurde durch ELISA festgestellt, ob die Menge an ins Blut freigesetztem TNF-α abnimmt, wenn die NF-κB-Aktivität durch DDB inhibiert war. Eine einzige Dosis der LPS-Behandlung (1 µg/kg, i.v.) erhöhte den TNF-α-Spiegel von 35 auf 5160 pg pro ml Plasma 2 h nach Verabreichung. DDB-Behandlung mit einer Dosis von 20, 50 oder 100 mg/kg verhinderte den Anstieg des Plasma-TNF-α-Spiegels durch LPS, was zu 1350, 1230 bzw. 690 pg pro ml Plasma führte. Bei den RAW264.7-Zellen senkte DDB die Produktion von TNF-α nach LPS-Gabe. Diese Ergebnisse zeigen, dass DDB die TNF-α-Expression in Makrophagen und in der Leber inhibiert (Tabelle 6).

TABELLE 6

Wirkung von DDB auf die TNF- $\alpha$ -Produktion im Plasma

	LPS 1 $\mu$ g/kg oder $\mu$ g/ml	LPS + DDB 20 mg/kg	LPS + DDB 50 mg/kg	LPS + DDB 100 mg/kg	LPS + DDB 1,0 mg/kg
%-Hemmung der NF- $\kappa$ B- Aktivierung	0	74	76	87	65

TESTBEISPIEL 7

Antifibrotische Wirkung der Oltipraz/DDB-Kombination (1)

**[0052]** Die antifibrotische Aktivität der Oltipraz/DDB-Kombination wurde durch Änderung des Verhältnisses der Komponenten in der Kombination bewertet. Zur Bewertung der Wirkung der Kombination entsprechend dem Komponentenverhältnis wurde das Dosierungsschema für DMN teilweise modifiziert. Das heißt, während DMN in den Testbeispielen 1 und 2 den Ratten insgesamt 12mal in Dosierungen von 10  $\mu$ l/kg pro Verabreichung über einen Zeitraum von 4 Wochen 3mal wöchentlich verabreicht wurde, wurde zur Bewertung der Kombinationswirkung hinsichtlich der Verhältnisse der Komponenten ein Tiermodell mit vermindertem Leberschaden verwendet, worin das DMN einer Ratte insgesamt 9mal in Dosierungen von 10  $\mu$ l/kg pro Verabreichung 3mal wöchentlich über einen Zeitraum von 3 Wochen verabreicht wurde und dann in der für das Testbeispiel verbleibenden Woche nicht verabreicht wurde.

**[0053]** Eine Woche nach der dreiwöchigen Verabreichung wiesen die Versuchstiere beim Fibrose-Score einen Wert von 2,9 und beim Knodell-Score einen Wert von 11,7 auf. Damit wurde eine Reduktion der Leberfibrose bei den Tieren im Vergleich zu den Versuchstieren gezeigt, denen DMN während eines vierwöchigen Zeitraums verabreicht worden war und die beim Fibrose-Score einen Wert von 3,7 und beim Knodell-Score einen Wert von 16,1 aufwiesen.

**[0054]** Eine Woche nach Verabreichung von DMN über einen Zeitraum von 3 Wochen stieg die ALT- und AST-Aktivität im Plasma der Versuchstiere auf das 4fache im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

**[0055]** Bei den Versuchstieren, denen Oltipraz und DDB in einem Dosis-Verhältnis von 25:5, 15:15 und 5:25 mg/kg während eines dreiwöchigen Zeitraums (3mal pro Woche) jeweils einen Tag nach der Verabreichung von DMN gegeben wurde, waren die Erhöhung der Aktivitäten von ALT und AST im Plasma der Versuchstiere im Vergleich zu den nur mit DMN behandelten Tieren signifikant inhibiert. Beim Vergleich der Wirksamkeiten der Komponentenverhältnisse in der Kombination zeigte sich, dass obwohl die Versuchstiergruppe, der Oltipraz und DDB in einem Dosisverhältnis von 15:15 mg/kg verabreicht worden war, ebenfalls eine deutliche Hemmung der ALT- und AST-Aktivitäten im Plasma zeigte, das Ausmaß der Hemmung kleiner war, als bei den mit Oltipraz und DDB in einem Dosisverhältnis von 25:5 mg/kg behandelten Versuchstieren (Tabelle 7).

**[0056]** Die Aktivität der  $\gamma$ -GT und der Bilirubin-Gehalt im Plasma werden als repräsentative Indikatoren der Leberfunktionalität verwendet. Bei Ratten, denen Oltipraz und DDB in einem Dosisverhältnis von 25:5, 15:5 und 5:25 mg/kg während eines dreiwöchigen Zeitraums verabreicht wurden, war der DMN induzierte Anstieg des Bilirubin-Gehalts in einem statistisch signifikanten Ausmaß gehemmt. In ähnlicher Weise wie bei den Ergebnissen für die ALT- und AST-Werte waren die Bilirubin-Erhöhrungen am stärksten bei den Tieren innerhalb der mit Oltipraz und DDB behandelten Versuchstiergruppen inhibiert, denen Oltipraz und DDB in einem Dosisverhältnis von 25:5 mg/kg verabreicht wurde.

**[0057]** Der Gesamtproteingehalt und der Albuminspiegel im Blut sind Indikatoren der Proteinsynthese im Lebergewebe. Wenn sich die Leberzirrhose entwickelt, nimmt der Gesamtproteingehalt im Blut im Allgemeinen ab. Eine Woche nach Verabreichung von DMN über einen dreiwöchigen Zeitraum sank bei den behandelten Tieren der Gesamtproteingehalt signifikant, aber der Gesamtproteingehalt erholte sich auf das Niveau der normalen Kontrollgruppe bei den Versuchstiergruppen, denen Oltipraz und DDB in einem Dosis-Verhältnis von 25:5 und 15:5 mg/kg (Tabelle 7) verabreicht wurde.

**[0058]** Diese Ergebnisse legen nahe, dass unter den in dem Testbeispiel verwendeten Komponentenverhält-

nissen an Oltipraz und DDB die Tiergruppe, der 25:5 mg/kg an Oltipraz und DDB verabreicht worden war, die größte Hemmwirkung der durch DMN induzierten Leberfibrose aufwiesen. Ebenfalls kann festgestellt werden, dass eine solche Wirkung bei der mit Oltipraz (25 mg/kg)/DDB (5mg/kg)-behandelten Versuchstiergruppe gleich oder überlegen ist zu der bei einem mit 50 mg/kg Oltipraz in Testbeispiel 1 behandelten Versuchstier. Tatsächlich betrug der Prozentsatz der Hemmung des ALT-Anstiegs durch DMN 40% bei der mit 50 mg/kg Oltipraz allein behandelten Versuchstiergruppe während der Prozentsatz der Leberfibrose-Hemmung 43% betrug, wenn 25:5 mg/kg Oltipraz und DDB verabreicht wurden. Für weitere Indikatoren wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

TABELLE 7

Werte für ALT, AST, Bilirubin, Albumin und Gesamtproteingehalt

Gruppe	ALT	AST	Gesamtproteingehalt	Albumin	Bilirubin
Kontrollgruppe	44 ± 3	114 ± 6	6,2 ± 0,1	5,1 ± 0,1	0,25 ± 0,02
DMN	169 ± 7*	222 ± 14*	5,0 ± 0,2*	4,0 ± 0,2*	1,1 ± 0,3*
DMN + Oltipraz 25/DDB 5 mg/kg	98 ± 9 <sup>#</sup>	156 ± 8 <sup>#</sup>	5,9 ± 0,2 <sup>#</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,3 ± 0,04 <sup>#</sup>
DMN + Oltipraz 15/DDB 15 mg/kg	108 ± 10 <sup>#</sup>	194 ± 19	5,7 ± 0,2 <sup>#</sup>	4,7 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,4 ± 0,08 <sup>#</sup>
DMN + Oltipraz 5/DDB 25 mg/kg	127 ± 8 <sup>#</sup>	206 ± 14	5,3 ± 0,1 <sup>#</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,4 ± 0,09 <sup>#</sup>

**[0059]** Jeder Wert ist durch die durchschnittliche ±-Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl der eingesetzten Tiere war 8 bis 10. Die Signifikanz jeder Gruppe wird durch den Newman-Keuls-Test für die multiple Analyse bestimmt. Die Signifikanz-Marker waren: \* = p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle, <sup>#</sup> = p < 0,05 im Vergleich zur mit DMN behandelten Gruppe.

TESTBEISPIEL 8

Antifibrotische Wirkung von Oltipraz/DDB (2)

**[0060]** Die Wirkung auf pathologisches Gewebe verschiedener Oltipraz/DDB-Kombinationen auf durch DMN induzierte Leberfibrose wurde im Versuchstiermodell beobachtet. Bei normalen Ratten wurde keine Leberfibrose beobachtet ([Fig. 2a](#) und [Fig. 2b](#)). Klare Fibrose im Lebergewebe wurde bei Ratten eine Woche nach Verabreichung von DMN 3mal wöchentlich über einen dreiwöchigen Zeitraum beobachtet ([Fig. 3a](#) und [Fig. 3b](#)). Wenn Oltipraz und DDB in einem Dosisverhältnis von 25:5 und 15:15 mg/kg über einen dreiwöchigen Zeitraum (3mal pro Woche) jeweils einen Tag nach Verabreichung von DMN gegeben wurde, war die Fibrose im Lebergewebe im Vergleich zur DMN-Verabreichung allein signifikant reduziert. Insbesondere zeigte die mit Oltipraz und DDB in einem Dosisverhältnis von 25:5 mg/kg behandelte Versuchstiergruppe ([Fig. 4a](#) und [Fig. 4b](#)) eine im Verhältnis zu den mit Oltipraz und DDB im einem Dosisverhältnis von 15:15 mg/kg ([Fig. 5a](#) und [Fig. 5b](#)) und 5:25 mg/kg behandelten Versuchstiergruppen bessere Wirksamkeit des Arzneimittels und eine starke Hemmung der Progression der Leberfibrose.

**[0061]** Nekrose des Lebergewebes und Leberfibrose werden in ihrer Pathologie durch die Verwendung pathologischer Indikatoren für Kollagenakkumulation charakterisiert, nämlich durch die Trichrom-Färbung nach Masson. Das Ausmaß der Leberfibrose wird durch Bewertung nach der Fibrosewerten und nach dem Knodell-Score bestimmt, die die Ausmaße des Leberschadens und der Leberfibrose zeigen.

TABELLE 8

Hemmwirkung der Oltipraz/DDB-Kombination auf die Fibrose des Lebergewebes

Gruppe	Fibrose-Werte	Knodell-Werte
Kontrolle	0	0
DMN	$2,9 \pm 0,9$	$11,7 \pm 1,8$
DMN + Oltipraz 25 : DDB 5 mg/kg	$0,3 \pm 0,5^{**}$	$2,0 \pm 1,5^{**}$
DMN + Oltipraz 15 : DDB 15 mg/kg	$0,3 \pm 0,5^{**}$	$4,0 \pm 1,2^{**}$
DMN + Oltipraz 5 : DDB 25 mg/kg	$1,2 \pm 0,6^{**}$	$6,0 \pm 1,3^{**}$

**[0062]** Jeder Wert ist durch die durchschnittliche  $\pm$ -Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl der eingesetzten Tiere war 8 bis 10. Die Signifikanz jeder Gruppe wird durch den Newman-Keuls-Test für die multiple Analyse bestimmt. Die Signifikanz-Marker waren:  $^{**} = p < 0,01$  im Vergleich zur mit DMN behandelten Gruppe. Das Fibroseausmaß wurde eingestuft als: 0 = normal, 1 = Vorliegen von schwach fibrösem Gewebe, 2 = mäßiges Vorliegen fibrösen Gewebes, 3 = offensichtliches Vorliegen von fibrösem Gewebe, 4 = Hinweise auf schwere Fibrose. Die Summe der Werte aus periportal Brückenbildung (am höchsten = 10), Zellverlust in den Leberläppchen (am höchsten = 4), Portalentzündung (am höchsten = 4) und Fibrose (am höchsten = 4) ergibt den Knodell-Score.

TESTBEISPIEL 9

Wirkung von Oltipraz/DDB-Kombinationen auf die TGF- $\beta$ -Expression

**[0063]** Wie oben angesprochen ist TGF- $\beta$  ein Leberfibrose verursachendes Cytokin und es ist bekannt, dass es mit dem Verlauf der Leberfibrose assoziiert ist. Tabelle 9 zeigt Veränderungen in Gegenwart von TGF- $\beta$  durch RT-PCR-Verfahren.

**[0064]** Die mit DMN behandelte Gruppe zeigte einen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Anstieg bei der Herstellung von TGF- $\beta$ . Bei mit veränderten Oltipraz/DDB-Kombinationsverhältnissen behandelten Tieren zeigten quantitative RT-PCR-Ergebnisse hinsichtlich der TGF- $\beta$ -Expression, dass die Verabreichung von 30 mg/kg Oltipraz bei gleichzeitiger Verabreichung von 25:5 mg/kg Oltipraz und DDB die TGF- $\beta$ -Expression vollständig inhibierte. Wenn jedoch das DDB zu Oltipraz-Verhältnis zunimmt, geht die Inhibition der TGF- $\beta$ -Expression zunehmend verloren. Bei der mit DDB allein behandelten Versuchstiergruppe wurde die TGF- $\beta$ -Expression nicht inhibiert. Folglich kommt für die Inhibition der TGF- $\beta$ -Expression Oltipraz in Betracht. Aufgrund dessen ist das beste Kombinationsverhältnis Oltipraz zu DDB 5:1 (Tabelle 9).

TABELLE 9

Relative Hemmung der TGF- $\beta$ -Expression durch die Kombination von Oltipraz/DDB

	DMN 10 $\mu$ l/kg	DMN + Oltipraz 30 mg/kg	DMN + DDB 30 mg/kg	DMN + Oltipraz 25 + DDB 5 mg/kg	DMN + Oltipraz 15 + DDB 15 mg/kg	DMN + Oltipraz 5 + DDB 25 mg/kg
%-Hemmung von TGF- $\beta$ - mRNA- Expression	0	65	0	65	30	0

## ARBEITSBEISPIELE

## &lt;Arbeitsbeispiel 1 &gt;

Oltipraz	25 mg
DDB	1 mg
Laktose	50 mg
Stärke	10 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0065]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch ein herkömmliches Tablettenherstellungsverfahren eine Tablette hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 2&gt;

Oltipraz	50 mg
DDB	1 mg
Laktose	50 mg
Stärke	10 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0066]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch ein herkömmliches Tablettenherstellungsverfahren eine Tablette hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 3&gt;

Oltipraz	5 mg
DDB	10 mg
Laktose	50 mg
Stärke	10 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0067]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch ein herkömmliches Tablettenherstellungsverfahren eine Tablette hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 4&gt;

Oltipraz	25 mg
DDB	5 mg
Laktose	30 mg
Stärke	28 mg
Talkum	2 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0068]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch Befüllen einer Hartgelatine-Kapsel mit der Mischung durch ein herkömmliches Kapselherstellungsverfahren eine Kapsel hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 5&gt;

Oltipraz	25 mg
DDB	5 mg
Laktose	30 mg
Stärke	28 mg
Talkum	2 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0069]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch Befüllen einer Hartgelatine-Kapsel mit der Mischung durch ein herkömmliches Kapselherstellungsverfahren eine Kapsel hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 6&gt;

Oltipraz	1 mg
DDB	50 mg
Laktose	30 mg
Stärke	28 mg
Talkum	2 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0070]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch Befüllen einer Hartgelatine-Kapsel mit der Mischung durch ein herkömmliches Kapselherstellungsverfahren eine Kapsel hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 7&gt;

Oltipraz	5 mg
DDB	25 mg
Laktose	30 mg
Stärke	28 mg
Talkum	2 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0071]** Die obigen Komponenten werden gemischt und es wird durch Befüllen einer Hartgelatine-Kapsel mit der Mischung durch ein herkömmliches Kapselherstellungsverfahren eine Kapsel hergestellt.

## &lt;Arbeitsbeispiel 8&gt;

Oltipraz	250 mg
DDB	50 mg
Isomerisierter Zucker	10 g
Zucker	30 mg
Natriumcarboxylmethylcellulose	100 mg
Zitronenaroma	in geeigneter Menge

(Zugabe von gereinigtem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml)

**[0072]** Es wird mit den obigen Komponenten gemäß herkömmlichen Verfahren zur Suspensionsherstellung eine Suspension hergestellt. Eine braune 100 ml-Flasche wird mit der Suspension befüllt und sterilisiert.

## &lt;Arbeitsbeispiel 9&gt;

Oltipraz	50 mg
DDB	250 mg
Isomerisierter Zucker	20 g
Zucker	20 g
Natriumalginat	100 mg
Orangenaroma	in geeigneter Menge

(Zugabe von gereinigtem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml)

**[0073]** Es wird mit den obigen Komponenten gemäß herkömmlichen Verfahren zur Suspensionsherstellung eine Suspension hergestellt. Eine braune 100 ml-Flasche wird mit der Suspension befüllt und sterilisiert.

## &lt;Arbeitsbeispiel 10&gt;

Oltipraz	25 mg
DDB	5 mg
Laktose	30 mg
Stärke	20 mg
Magnesiumstearat	in geeigneter Menge

**[0074]** Die obigen Komponenten werden gemischt und zur Bereitstellung eines Pulvers in eine mit Polyethy-

len beschichte Umhüllung eingefüllt und versiegelt.

#### <Arbeitsbeispiel 11 >

1 Weichkapsel enthaltend

Oltipraz	25 mg
DDB	5 mg
Polyethylenglycol 400	400 mg
konzentriertes Glycerin	55 mg
gereinigtes Wasser	35 mg

**[0075]** Das Polyethylenglycol wird mit dem konzentrierten Glycerin gemischt und dann gereinigtes Wasser hinzugefügt. Das Oltipraz wird unter Aufrechterhaltung einer Temperatur von 60°C zu der Mischung gegeben. Die Mischung wird bei etwa 1500 rpm gerührt. Nachdem sich die Mischung einheitlich verbunden hat, wird sie unter langsamem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Luftblasen werden durch eine Vakuumpumpe entfernt, wodurch die Inhaltsstoffe der Weichkapsel zurückblieben.

**[0076]** Die Weichkapselmembran wird unter Verwendung einer 132 mg Gelatine, 52 mg konzentrierten Glycerins, 6 mg einer 70%igen Disorbitlösung pro Kapsel und einer geeigneten Menge an Ethylvanillin als Geschmacksstoff gemäß einem in weiten Kreisen bekannten herkömmlichen Weichgelatine-Plastifizierungsverfahren und mit Carnaubawachs als Versiegelungsmittel hergestellt.

#### INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

**[0077]** Erfindungsgemäße Oltipraz/DDB-Formulierungen zeigen überraschend gute Wirkungen bei der Behandlung und Prävention von Leberfibrose und -zirrhose. Somit können sie zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und Prävention der Leberfibrose und der -zirrhose klinisch eingesetzt werden.

#### Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Prävention und Behandlung der Progression der Leberfibrose und -zirrhose, umfassend 5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thion (Oltipraz) und Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethyldioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylat (DDB).

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung in einer Form zubereitet ist, die aus der Gruppe bestehend aus einer Kapsel, einer Tablette, einer Weichkapsel, einer Suspension, einem Sirup, einer Injektion und einem Pulver ausgewählt ist.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung zur oralen Verabreichung bestimmt ist.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Zusammensetzung Oltipraz und DDB in einem Gew.-Verhältnis von 50-1 bis 1-50 umfasst.

5. Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und Behandlung der Progression der Leberfibrose und -zirrhose.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

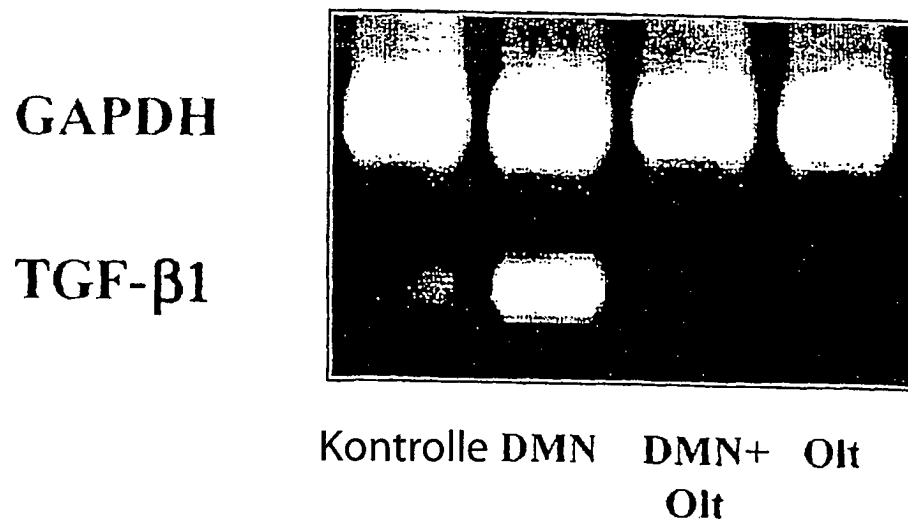




Fig. 2a

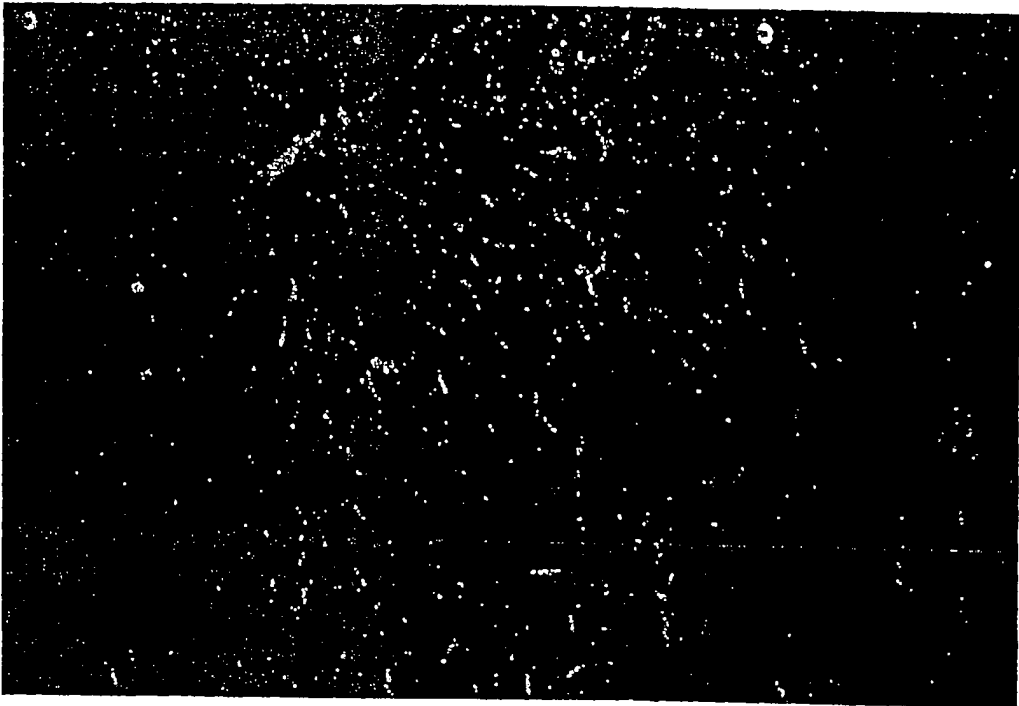


Fig. 2b

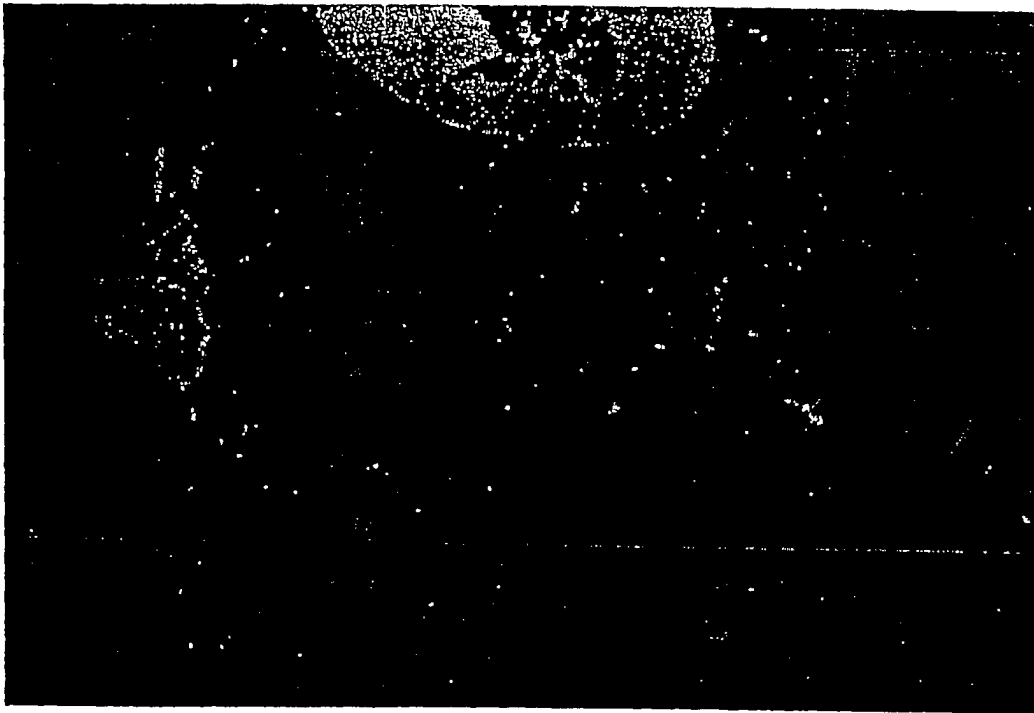


Fig. 3a

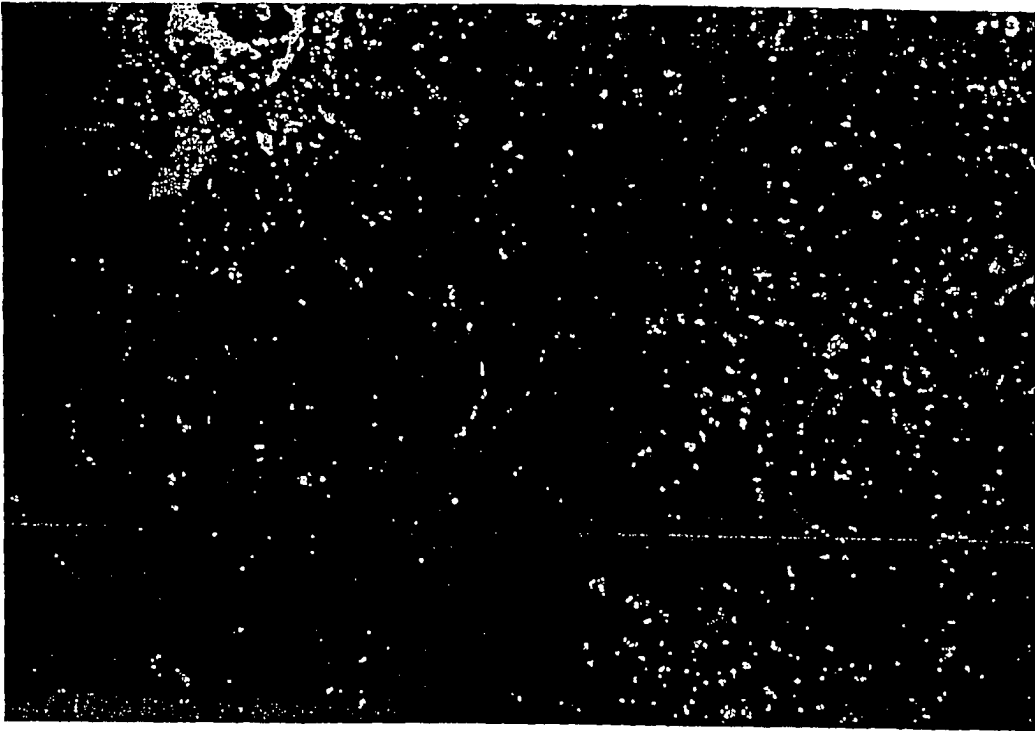


Fig. 3b

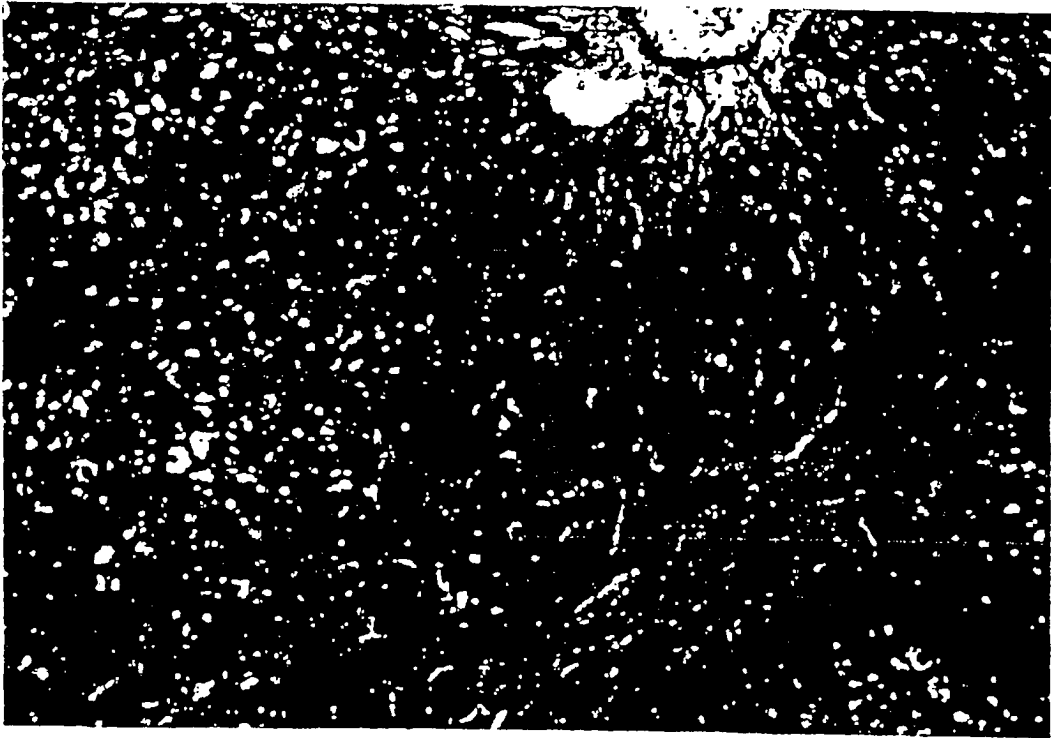


Fig. 4a

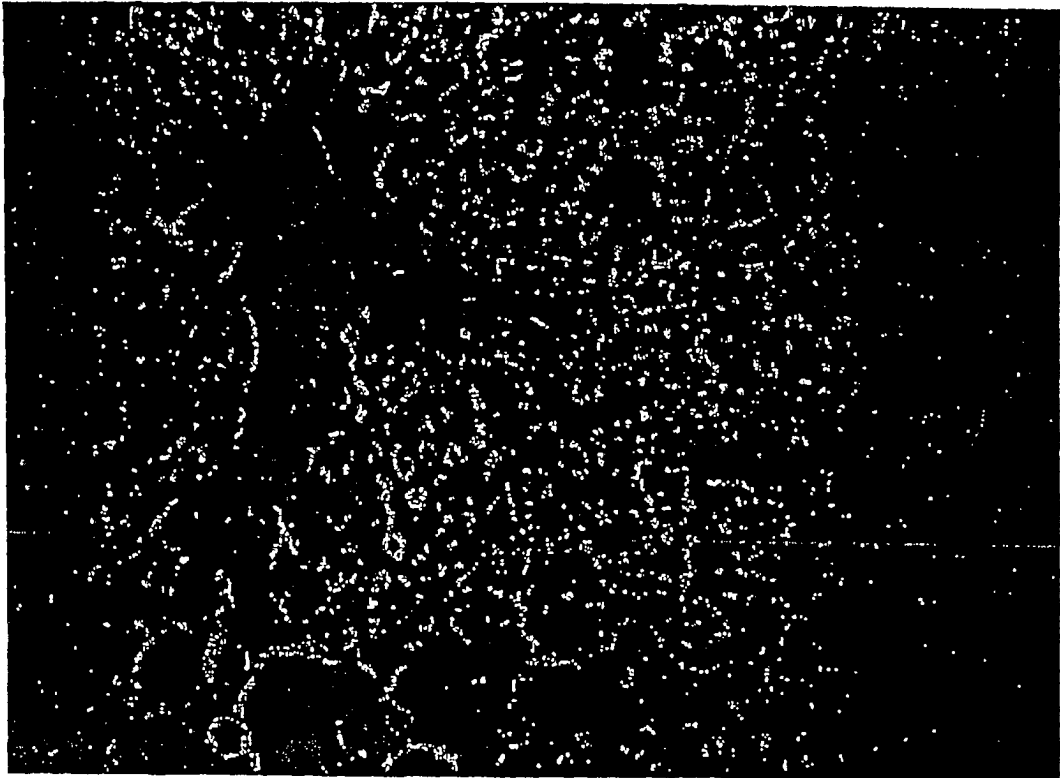


Fig. 4b

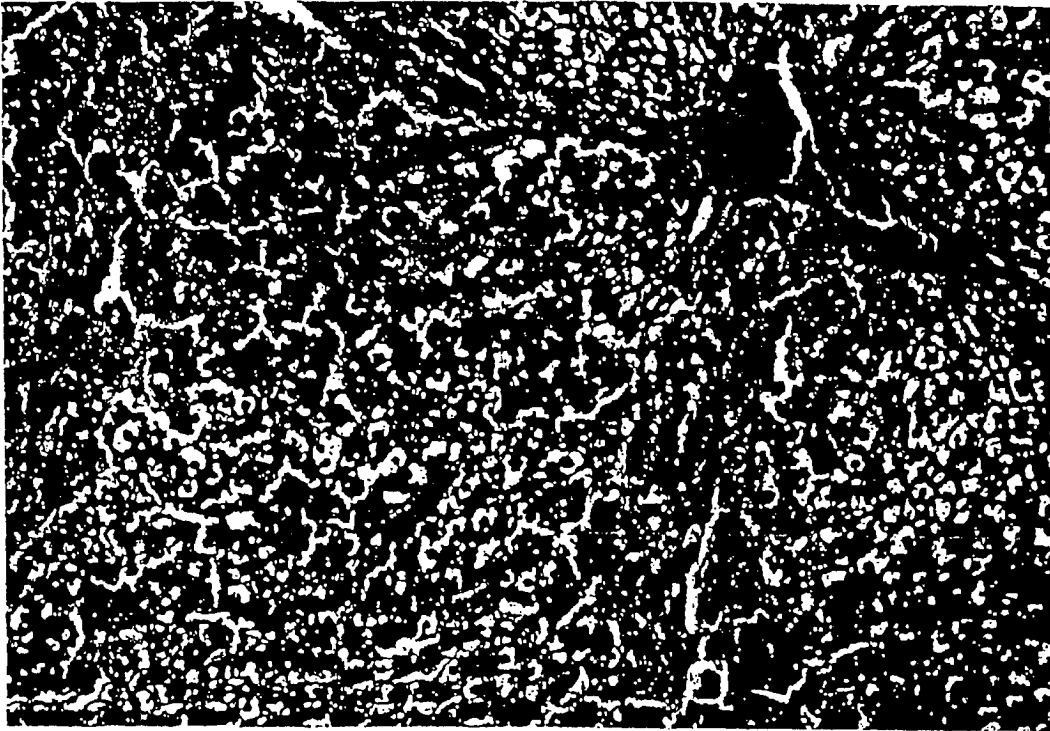


Fig. 5a



Fig. 5b





Fig. 6a



Fig. 6b

