

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/017949 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009254

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. August 2003 (21.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 39 531.4 23. August 2002 (23.08.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **GULBINS, Erich** [DE/DE]; Institut für
Molekularbiologie, Universität Essen, Hufelandstrasse 55,
45122 Essen (DE).

(74) Anwalt: **RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER &
PARTNER**; Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF INFECTIOUS DISEASES

(54) Bezeichnung: PROPHYLAXE UND THERAPIE VON INFEKTIONSERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of inhibitors of acid sphingomyelinase and/or inhibitors of products of the reaction catalysed by said enzyme, for the prophylaxis and/or treatment of infectious diseases and/or diseases which are influenced by infections during the course thereof. The cited products especially include ceramide. Preferably neutralising antibodies and/or anti-depressants, especially tricyclic and/or tetracyclic anti-depressants, are used as inhibitors.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen von Produkten der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten und/oder Krankheiten, deren Verlauf durch Infektionen beeinflusst wird. Bei den genannten Produkten handelt es sich insbesondere um Ceramid. Als Hemmstoffe sind in besonderer Weise neutralisierende Antikörper und/oder Antidepressiva bevorzugt, insbesondere trizyklische und/oder tetrazyklische Antidepressiva.



WO 2004/017949 A2

Prophylaxe und Therapie von Infektionserkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Wirkstoffen, die
5 zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten geeignet
sind.

Da Infektionskrankheiten nach wie vor weltweit ein sehr großes medizi-
nisches Problem darstellen, sind Studien zur Behandlung und zur Pro-
10 phylaxe derartiger Erkrankungen schon lange Gegenstand intensiver
Forschung. Beispielsweise werden ständig immense Kosten aufgewen-
det, um neue Antibiotika zu entwickeln. Diese Antibiotika sind notwen-
dig, um Bakterien, Pilze, Protozoen oder Parasiten als Erreger von
Infektionskrankheiten bekämpfen zu können. Insbesondere muß hierbei
15 den sich laufend neu entwickelnden Resistenzen der Erreger Rechnung
getragen werden, was zunehmend problematischer wird.

Eine besondere Schwierigkeit stellt die Behandlung von Infektionskrank-
heiten dar, die durch Viren oder Prionen verursacht sind. Aufgrund eines
20 fehlenden eigenen Stoffwechsels sind diese Erreger nicht mit Antibiotika
angreifbar, so daß im allgemeinen nur eine Behandlung der Symptome
möglich ist.

Um die Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten zu verbes-
25 sern und insbesondere den erwähnten Problemen Rechnung zu tragen,
stellt sich die Erfindung die Aufgabe, Wirkstoffe bereitzustellen, die in
besonderer Weise zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankhei-
ten geeignet sind.

30 Die Aufgabe wird gelöst durch eine Verwendung von Hemmstoffen, wie
sie in den Ansprüchen 1 und 9 beschrieben ist. Bevorzugte Ausführ-
ungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen dargestellt. Die An-

sprüche 15 bis 18 betreffen entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

- 5 Erfindungsgemäß werden zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase und/oder Hemmstoffe von Produkten, die durch die von der sauren Sphingomyelinase katalysierte Reaktion entstehen, verwendet. Zu diesen Produkten zählt insbesondere Ceramid, welches durch die Spaltung von Sphingolipiden entsteht. Versuche, die zu dieser neuen Verwendung von Hemmstoffen dieser Art geführt haben, zeigten, daß hierdurch die Infektion eukaryotischer Zellen mit verschiedenen pathogenen Organismen, beispielsweise Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, effektiv verhindert werden kann. Neben der Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten können die genannten Hemmstoffe auch mit Vorteil zur Prophylaxe und/oder Therapie von Krankheiten eingesetzt werden, deren klinischer Verlauf durch Infektionen zumindest mitbestimmt wird. Ein Beispiel für derartige Krankheiten ist die zystische Fibrose.
- 20 Diese überraschenden Ergebnisse beruhen darauf, daß ceramidreiche Membranplattformen in der Zellmembran von eukaryotischen Zellen für eine Infektion eukaryotischer Zellen mit pathogenen Erregern notwendig sind. Diese größeren Plattformen in der Zellmembran der eukaryotischen Zellen werden durch Fusion von sehr kleinen distinkten Domänen in der Zellmembran, sogenannten Rafts, gebildet. Diese Rafts bestehen aus Cholesterol und Sphingolipiden, insbesondere Sphingomyelin, die sehr fest miteinander assoziieren, wodurch sie sich von den Phospholipiden der Zellmembran trennen und diese kleinen distinkten Domänen bilden. Das in Rafts am häufigsten vorkommende Sphingolipid ist Sphingomyelin, das aus dem sehr hydrophoben Ceramidrest und der hydrophilen Phosphorylcholin-Kopfgruppe besteht. Ceramid ist ein Amidester aus der Sphingoidbase D-erythro-Sphingosin und einer Fettsäure,
- 30

normalerweise mit einer Kettenlänge von C₁₆ bis C₂₆. Wasserstoffbrücken-Bindungen und hydrophobe van der Waal-Interaktionen zwischen dem Cholesterol-Ringsystem und Sphingolipiden bzw. zwischen den Kopfgruppen der Sphingolipide führen zu einer lateralen Assoziation der Sphingolipide und des Cholesterols in der Zellmembran und einer spontanen Separation von den übrigen Phospholipiden (Brown D.A., London E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 14: 111-367; Harder T., Simons K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipidcholesterol microdomains. Curr. Opin. Cell. Biol. 9: 534-542). Dadurch entstehen die als Rafts bezeichneten sehr kleinen, distinkten Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Membrandomänen. Extrahiert man aus Rafts das Cholesterol, das wahrscheinlich als Spacer zwischen den Sphingolipiden mit ihren relativ grossen Kopfgruppen fungiert, so wird die Struktur und Funktion von Rafts zerstört

Erfindungsgemäß wurde ein Mechanismus identifiziert, der die Bildung von Membranplattformen aus Rafts, das Clustern bzw. Aggregieren von Rezeptoren in diesen Membranplattformen und die Infektion von Zellen mit pathogenen Bakterien und Viren vermittelt. Beispielsweise nach Stimulation über CD95 oder den CD40 Rezeptor, Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseriae gonorrhoeae* oder auch Infektion menschlicher Zellen mit Rhinoviren kommt es in Rafts zu einer Freisetzung von Ceramid aus Sphingomyelin. Die Bildung von Ceramid in Rafts führt auf Grund der biophysikalischen Eigenschaften von Ceramid zu einer Fusion kleiner Rafts zu grossen, ceramidreichen Plattformen in der Zellmembran.

Ergebnisse, die zur Erfindung führten, zeigten, daß diese kleinen Rafts durch das Enzym saure Sphingomyelinase und durch Ceramid, das durch die von diesem Enzym katalysierte Reaktion freigesetzt wird, zu den erwähnten größeren Plattformen fusioniert werden.

Eine physiologische Bedeutung dieser Plattformen wurde bereits kürzlich von Grassmé et al. beschrieben (J. Biol. Chem. 276, 20589-20596 (2001); J. Immunol. 168, 298-307 (2002)). Die Autoren konnten zeigen, daß die ceramidreichen Plattformen der Vermittlung von Signalen aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere dienen. Hierbei wird zunächst durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren, z. B. CD95 und CD40, eine Translokation des Enzyms saure Sphingomyelinase hin zur Außenseite der Membran induziert. Hier setzt die saure Sphingomyelinase aus Sphingomyelin Ceramid frei, das spontan in Rafts aggregiert. Dadurch kommt es zur Transformation von Rafts in sehr hydrophobe Membranbereiche. Diese Ceramidaggregate zeigen weiterhin die Tendenz, spontan zu größeren Membranplattformen zu fusionieren. In diesen ceramidreichen Membranplattformen aggregieren aktivierte Rezeptoren wie CD95 und CD40, was für die Vermittlung eines Signals über diese Rezeptoren in die Zelle notwendig ist.

Interessanterweise konnte nun im Rahmen der Erfindung gezeigt werden, daß diese Plattformen zusätzlich ein Eindringen von pathogenen Organismen über diese entsprechenden Membranabschnitte ermöglichen. An der Bildung dieser „Eintrittstüren“ für pathogene Organismen in die eukaryotische Zelle ist das Enzym saure Sphingomyelinase entscheidend beteiligt, da Ceramide als Produkte der von diesem Enzym katalysierten Reaktion die Membranplattformen bilden. Ausgelöst wird dieser Vorgang dadurch, daß durch die Erreger über einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus die saure Sphingomyelinase dazu veranlaßt wird, in intrazellulären Vesikeln an die Zelloberfläche bzw. in die äußere Seite der Membran transportiert zu werden. Dort wird durch das Enzym der Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid in der Membran bewirkt. Diese Bedeutung ceramidreicher Membranplattformen für Infektionen mit pathogenen Bakterien und Viren konnte von den Erfindern insbesondere am Beispiel der Infektion mammalischer Zellen mit *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden. Die Infektion mammalischer Zellen

mit *P. aeruginosa* aktiviert die saure Sphingomyelinase und induziert damit die Freisetzung von Ceramid.

Eine weitere Aufgabe des Enzyms saure Sphingomyelinase wurde bereits im Zusammenhang mit der Invasion von Gonokokken in eukaryotischen Zellen von Grassmé et al. beschrieben (Cell, Vol. 91, 605-615, 1997). Die Autoren konnten zeigen, daß die saure Sphingomyelinase an einer Signaltransduktionskette in der Wirtszelle beteiligt ist, welche die Invasion eines bestimmten Gonokokken-Stammes vermittelt. Entscheidend sind hierbei bestimmte Oberflächenproteine auf dem bakteriellen Erreger, die sogenannten Opa-Proteine. Diese binden an einen spezifischen Rezeptor der eukaryotischen Wirtszelle, so daß eine Phospholipase C aktiviert und Diacylglycerol gebildet wird. Dieses Diacylglycerol aktiviert wiederum die saure Sphingomyelinase, so daß durch die von diesem Enzym katalysierte Reaktion Ceramid gebildet wird. Diese Signalkaskade konnte jedoch nur durch ganz bestimmte Bakterien bzw. Stämme induziert werden. Insbesondere war die Induzierbarkeit dieser Signalkaskade abhängig von den Opa-Proteinen auf dem Bakterium. Es handelt sich hierbei also um einen völlig anderen, sehr speziellen Mechanismus im Vergleich mit dem im Zusammenhang mit der Erfindung entdeckten generellen Invasions- bzw. Infektionsmechanismus über die besagten Membranplattformen.

Durch die erfindungsgemäße Verhinderung der Ausbildung der Membranplattformen und/oder der Zerstörung bereits gebildeter Membranplattformen wird ein Eindringen der Erreger in die Wirtszelle verhindert. Dies wird im Rahmen der Erfindung vorzugsweise durch die Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen der Produkte der von diesem Enzym katalysierten Reaktion erreicht. Dies hat gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden von Infektionskrankheiten den Vorteil, daß sich das Target für den Wirkstoff auf der Wirtszelle, also der zu infizierenden eukaryotischen Zelle,

befindet. Durch die Erfindung wird ein genereller Infektionshemmer zur Verfügung gestellt, der für eine Vielzahl ganz unterschiedlicher pathogener Erreger eingesetzt werden kann (z. B. Bakterien, Viren, Parasiten, Protozoen oder Pilze). Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber
5 beispielsweise dem Einsatz von Antibiotika, die jeweils ganz spezifisch gegen den zu bekämpfenden Erreger gerichtet sein müssen. Durch die erfindungsgemäße Verwendung wird es nun auch möglich, gegen virale Infektionen vorzugehen, was bisher im allgemeinen in dieser Weise nicht möglich war. Zusätzlich wird durch die erfindungsgemäße Verwen-
10 dung das Problem von sich entwickelnden Resistenzen der pathogenen Erreger umgangen, da der Wirkstoff nicht gegen den Erreger selbst, sondern gegen die von diesem Erreger in der Wirtszelle ausgelösten Reaktionen gerichtet ist.

15 Von der Erfindung werden neben den Hemmstoffen, die direkt die Aktivität der sauren Sphingomyelinase beeinflussen, auch Wirkstoffe umfaßt, die Vorstufen des Enzyms und/oder Aktivierungsmechanismen des Enzyms beeinflussen. Weiterhin können die Wirkstoffe auch auf die Bildung, Stabilisierung, Mobilisierung und/oder Translokation der intrazellu-
20 lären Vesikel wirken, in denen sich das Enzym in der Zelle befindet.

Zudem umfaßt die Erfindung die Verwendung von Hemmstoffen, die die biologische Wirkung der Produkte, die durch die enzymatische Reaktion der sauren Sphingomyelinase entstehen, beeinflussen. Bei diesen Pro-
25 dukten handelt es sich insbesondere um Ceramid, welches einen wesentlichen Bestandteil der Membranplattformen bildet. Von der Erfindung umfaßt sind daher Hemmstoffe, die das Ceramid modifizieren und insbesondere inaktivieren, neutralisieren oder zerstören. Beispielsweise können erfindungsgemäß Stoffe eingesetzt werden, die die Abbaurate
30 von Ceramid erhöhen. Hierbei ist insbesondere das Enzym Ceramid-Glukosyltransferase bevorzugt, das beispielsweise durch molekularbiologische Methoden in seiner Expression verstärkt und damit in seiner

Aktivität verstärkt werden kann und/oder welches durch weitere Regulatoren aktiviert werden kann. Weiterhin können die Hemmstoffe die Zusammenlagerung der Ceramide verhindern, so daß die Plattformbildung beeinträchtigt wird. Zusätzlich umfaßt die Erfindung die Verwendung von Hemmstoffen, die die Funktionsfähigkeit der bereits gebildeten ceramidreichen Membranplattformen beeinflussen und/oder die Bildung der Membranplattformen von vornherein verhindern.

Als erfindungsgemäß geeignete Hemmstoffe kommen eine Vielzahl verschiedener Substanzen in Frage, beispielsweise Peptide, Proteine oder auch anorganische Substanzen. Weiterhin umfaßt die Erfindung auch Nukleinsäuren als Hemmstoffe, sofern sie gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung als Hemmstoffe der Sphingomyelinase und/oder derer Reaktionsprodukte wirken. Beispielsweise sind hier Antisense-Moleküle, insbesondere Antisense-Oligonukleotide, oder siRNA der sauren Sphingomyelinase geeignet.

Vorteilhafterweise werden als Hemmstoffe pharmakologische Wirkstoffe eingesetzt, von denen bekannt ist, daß sie das Enzym saure Sphingomyelinase hemmen. Besonders bevorzugt sind hierbei Antidepressiva, insbesondere trizyklische und/oder tetrazyklische Antidepressiva. Trizyklische Antidepressiva können beispielsweise einen proteolytischen Abbau des Enzyms bewirken, so daß das Enzym nicht mehr aktiv sein kann und eine Ceramidbildung verhindert wird. Durch diese Verminderung der Ceramidfreisetzung wird die Plattformbildung innerhalb der Zellmembran verhindert, so daß es nicht zu einer Infektion der Zelle kommt.

Als besonders vorteilhaft haben sich die Antidepressiva Amitryptilin und Imipramin erwiesen. Diese Antidepressiva sind daher für die erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt. Hierbei handelt es sich um bekannte pharmakologische Wirkstoffe (Generika), die im wesentlichen

keine Nebenwirkungen entfalten. Für die erfindungsgemäße Verwendung können diese Wirkstoffe in üblichen Darreichungsformen eingesetzt werden, insbesondere oral, intravenös, intramuskulär, topisch oder auch durch Inhalation. Weiterhin sind übliche Dosierungen für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet. Allerdings kann der erfindungsgemäße Effekt auch mit reduzierten Dosierungen erreicht werden.

Desweiteren umfaßt die Erfindung die Verwendung von Hemmstoffen, die von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleitet sind. Diese abgeleiteten Wirkstoffe weisen im wesentlichen die gleichen Effekte wie die Antidepressiva auf, können jedoch weitere vorteilhafte Eigenschaften besitzen. Vorteilhafterweise können diese Substanzen derart modifiziert sein, daß sie hydrophiler als die Ausgangssubstanzen sind. Dies bewirkt, daß die modifizierten Substanzen in geringerem Umfang im Gehirn angereichert werden, als es beispielsweise die Substanzen Amitryptilin und Imipramin tun. Bei diesen beiden genannten Substanzen kann eine Anreicherung im Gehirn nach einigen Wochen nachgewiesen werden. Weitere vorteilhafte Eigenschaften von abgeleiteten Stoffen können eine bessere Stabilität und/oder Bioverfügbarkeit sein.

Neben den genannten Hemmstoffen können beispielsweise auch Desipramin und/oder FGF (Fibroblast growth factor) oder hiervon abgeleitete Substanzen als Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase mit Vorteil verwendet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den Hemmstoffen um Antikörper, insbesondere um neutralisierende Antikörper. Diese Antikörper können sehr spezifisch mit dem Enzym saure Sphingomyelinase oder dessen Reaktionsprodukten, also insbesondere mit Ceramid, wechselwirken. Hierdurch wird die Aktivität des Enzyms bzw. die biologische Wirkung des Reaktionsproduktes be-

einträchtig und vorzugsweise gehemmt. Für die erfindungsgemäße Verwendung ist der Einsatz von Antikörpern als Hemmstoff sehr geeignet, da die Antikörper zum einen sehr spezifisch sind und Nebenwirkungen im allgemeinen vermieden werden. Als Antikörper für diese erfindungsgemäße Verwendung sind polyklonale und wegen ihrer besonderen Spezifität in bevorzugter Weise monoklonale Antikörper geeignet. Diese Antikörper können unterschiedlichen Ursprungs sein, besonders bevorzugt sind humanisierte Antikörper. Unter humanisierten Antikörpern sind Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu verstehen, die beispielsweise in Mäusen generiert werden. Durch Umklonierung muriner Sequenzen in humane Sequenzen wird ein Hybrid-Molekül erhalten, bei welchem alle murinen Teile (außer der variablen Domäne) durch humane Sequenzen ersetzt sind. Damit ist der resultierende Antikörper mit großer Sicherheit beim Menschen einsetzbar.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Stoffe eingesetzt, die die Bildung ceramidreicher Membranplattformen beeinflussen und insbesondere stören bzw. hemmen. Hierdurch wird die Bildung von Rafts, die eine Infektion vermitteln, behindert oder es werden bereits bestehende Rafts zerstört. In dieser Ausführungsform der Erfindung sind insbesondere β -Cyclodextrin, Nystatin und/oder Filipin bzw. davon abgeleitete Substanzen bevorzugt.

20

Bei der Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten bzw. von Krankheiten, deren Verlauf durch Infektionen beeinflusst wird, kann es unter Umständen vorteilhaft sein, verschiedene der erfindungsgemäßen Wirkstoffe miteinander zu kombinieren.

25

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist, daß sich die Angriffspunkte der Wirkstoffe (Hemmstoffe), also insbesondere die saure Sphingomyelinase bzw. Ceramid, an der Zelloberfläche befinden. Diese Targets sind daher für die Wirkstoffe gut erreichbar, ohne daß es notwendig wäre,

30

daß die Wirkstoffe in die Zellen hineintransportiert werden müßten. Dies könnte insbesondere bei größeren Wirkstoffen wie beispielsweise Antikörpern ein Problem darstellen, welches sich vorteilhafterweise bei der erfindungsgemäßen Verwendung nicht stellt.

5

Bei den Infektionskrankheiten, die mit der erfindungsgemäßen Verwendung vorbeugend oder therapeutisch behandelt werden können, handelt es sich u. a. um virale, parasitäre und/oder mykologische Infektionskrankheiten. Weiterhin können auch Infektionskrankheiten behandelt
10 werden, die durch Protozoen verursacht werden. Beispiele für derartige Infektionskrankheiten sind Aids, Hepatitis A, rhinovirale Erkrankungen, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Röteln, Influenza und/oder Malaria. Weiterhin können auch bakterielle Infektionserkrankungen mit der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgreich prophylaktisch und/
15 oder therapeutisch behandelt werden. Beispiele für derartige Erkrankungen sind Tuberkulose, Meningokokken-Infektionen oder *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen, insbesondere bei zystischer Fibrose. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Verwendung auch mit Vorteil im veterinärmedizinischen Bereich eingesetzt werden. Bei den hier zu behandelnden Infektionskrankheiten handelt es sich beispielsweise um Rinder-
20 und/oder Schweinepest.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen von Produkten
25 der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion, insbesondere von Ceramid, zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten bzw. von Krankheiten, deren Verlauf durch Infektionen beeinflusst wird. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Verwendung wird auf die obige Beschreibung
30 verwiesen.

Die Erfindung umfaßt ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Wirkstoff gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung enthält, der ein von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere ein von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleiteter Stoff ist. Außerdem umfasst die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens eine wirksame Menge von Desipramin, FGF, β -Cyclodextrin, Nystatin und/oder Filipin und/oder mindestens einen davon abgeleiteten Stoff enthält. Weiterhin umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Antikörper, insbesondere einen neutralisierenden Antikörper enthält, der gegen saure Sphingomyelinase gerichtet ist. Darüber hinaus umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen gegen Ceramid gerichteten Antikörper, insbesondere einen neutralisierenden Antikörper, enthält. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen außerdem jeweils mindestens einen pharmazeutischen Träger. Für die Herstellung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen bzw. entsprechende Medikamente können übliche Methoden eingesetzt werden. Als Darreichungsformen sind beispielsweise Tabletten, Zäpfchen, Injektionslösungen oder Infusionslösungen geeignet.

Die Erfindung umfaßt darüber hinaus ein Verfahren zur Hemmung von Infektionen eukaryotischer Zellen, insbesondere von Säugerzellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die saure Sphingomyelinase und/oder Produkte der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion in ihrer Aktivität beeinflusst, insbesondere gehemmt, werden. Dieses Verfahren kann in vivo im intakten Organismus oder auch in kultivierten Systemen, beispielsweise in Zellkulturen oder Gewebekulturen, durchgeführt werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieses Verfahrens wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

Schließlich umfaßt die Erfindung die Behandlung von Infektionskrankheiten und/oder von Krankheiten, deren Verlauf von Infektionen beeinflusst wird, wobei Hemmstoffe verabreicht werden, die das Enzym saure Sphingomyelinase und/oder Produkte der von diesem Enzym katalysierten Reaktion, insbesondere Ceramid, beeinflussen, vorzugsweise hemmen. Diese Behandlung erfolgt prophylaktisch und/oder während oder nach einer erfolgten Infektion. Eine vorbeugende Behandlung kann bei allgemeiner Infektionsgefahr oder bevorzugterweise bei einer akuten Infektionsgefahr durchgeführt werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Behandlung wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

Die genannten Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Beispielen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

In den Abbildungen zeigen:

- 20 Fig. 1: Die saure Sphingomyelinase (ASM) wird durch Infektion mit Rhinoviren aktiviert.
- Fig. 2: Rhinoviren induzieren Ceramidfreisetzung.
- Fig. 3: Amitryptilin und Imipramin hemmen dosisabhängig die
25 Infektion menschlicher Zellen mit Rhinoviren.
- Fig. 4: Die zytotoxische Wirkung von Rhinoviren wird durch Amitryptilin bzw. Imipramin gehemmt.
- 30 Fig. 5: HIV gp120 induziert die Freisetzung von Ceramid in humanen T-Lymphozyten.

Fig. 6: Zelluläre Stimulation mit gp120 induziert ceramidreiche Membranplattformen.

Beispiele

5

1. Infektion mit Rhinoviren

Die Ergebnisse der Versuche mit Rhinoviren zeigen, dass die Infektion humaner Epithelzellen mit verschiedenen Rhinoviren (HRV Stamm 14 und 16) zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (Fig. 1) und zu einer Freisetzung von Ceramid (Fig. 2) führt.

- a) Eine Infektion menschlicher Epithelzellen (Hela oder humane ex vivo Epithelzellen) aktiviert innerhalb von 10 bis 15 min. die saure Sphingomyelinase (ASM) um das Drei- bis Vierfache. Dies wurde am Beispiel von Hela-Zellen gezeigt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 zusammengefaßt. Die Zellen wurden mit Rhinoviren (Stamm 14, MOI von 25) infiziert und die Aktivität der Sphingomyelinase in Zel-
- 15 lysaten gemessen. Dazu wurden die Zellen nach der Infektion gewaschen, in 250 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1,3 mM EDTA und 0,05 % NP40 aufgenommen, durch Ultraschallbehandlung mit einem Stabsonicator bei niedriger Energie aufgebrochen und mit [¹⁴C]Sphingomyelin (0,5 µCi/Probe, 54,5 mCi/mmol; NEN) für 30 min. inkubiert. Der in vitro Enzymassay wurde durch Zugabe von
- 20 800 µl einer 2:1-Mischung aus CHCl₃ und CH₃OH (v/v) sowie 200 µl H₂O abgebrochen und die Freisetzung von [¹⁴C]Phosphorylcholin in den wäßrigen Überstand durch organische Extraktion szintigraphisch gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei Experimenten. Eine Vorinkubation der
- 25 Zellen mit einem Hemmstoff der sauren Sphingomyelinase, i.e. Amitryptilin, blockiert die Aktivität der sauren Sphingomyelinase.
- 30

- b) Die Stimulierung der sauren Sphingomyelinase korreliert mit einer Freisetzung von Ceramid aus den infizierten Zellen. Dies ist in Fig. 2 dargestellt. Eine Infektion humaner Epithelzellen (Hela) führt innerhalb weniger Minuten nach Infektion zu einer Freisetzung von Ceramid. Hierfür wurden wiederum Hela-Zellen mit Rhinoviren (Stamm 14) infiziert. Die Messung von Ceramid erfolgte durch einen Diacylglycerol (DAG)-Kinase Assay (Grassmé et al., Cell 91, 605-615, 1997). Ceramid wurde durch Zugabe von DAG-Kinase und [^{32} P]γATP zu [^{32} P]-Ceramid umgebaut. Das phosphorylierte Ceramid wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und szintigraphisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei Experimenten. Eine Vorinkubation der Zellen mit Amitryptilin hebt die Freisetzung von Ceramid auf.
- c) Die Infektion menschlicher Epithelzellen mit Rhinoviren induziert die Bildung ceramidreicher Membranplattformen. Sowohl die saure Sphingomyelinase als auch Ceramid sind auf der Oberfläche in Membranplattformen, an die auch die Rhinoviren binden, nach einer Infektion zu finden. Als experimenteller Nachweis hierfür wurden humane nasale Epithelzellen mit Rhinovirusstamm 14 über 20 min. infiziert, fixiert und mit Cy3-markierten monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörpern (Alexis) gefärbt. Im Konfokalmikroskop zeigte sich kurze Zeit nach der Infektion die Bildung einer ceramidreichen Membranplattform. Nicht infizierte Zellen zeigten kein Ceramid auf der Zelloberfläche.
- d) Eine pharmakologische Hemmung der sauren Sphingomyelinase blockiert die Infektion menschlicher Epithelzellen durch Rhinoviren dosisabhängig bis zu einer fast vollständigen Hemmung der Infektion. Als Pharmaka wurden die Pharmaka (Antidepressiva) Imipramin und Amitryptilin, die in Kontrollexperimenten innerhalb von 20 min. bis zu 98 % der Aktivität der sauren Sphingomyelina-

se blockieren, verwendet. Die Infektion menschlicher Epithelzellen durch Rhinoviren wurde in durchflußzytometrischen Analysen des zytopathischen Effektes der Viren gemessen. Da Rhinoviren in diesen Zellen Zelltod induzieren, kann der Zelltod als Maß für eine Infektion der Zellen verwendet werden. Die Dosiswirkungskurve der Hemmung der Infektion menschlicher Epithelzellen durch Imipramin und Amitryptilin ist in Fig. 3 dargestellt. Hierfür wurden humane Hela-Epithelzellen mit dem Rhinovirus-Stamm 14 für 24 h infiziert und die zytotoxische Wirkung der Viren durchflußzytometrisch nach Färbung mit FITC-Annexin gemessen. Amitryptilin bzw. Imipramin, die die saure Sphingomyelinase hemmen, wurden 30 min. vor Infektion der Rhinoviren in einem serumfreien Medium zu den Zellen gegeben. Die Daten zeigen, daß die Pharmaka die virale Infektion fast vollständig hemmen. Amitryptilin und Imipramin hatten selbst keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei Experimenten.

- e) Die zytotoxische Wirkung von Rhinoviren wird durch Amitryptilin bzw. Imipramin gehemmt. Fig. 4 zeigt die repräsentative durchflußzytometrische Analyse der Hemmung der Infektion von Hela-Zellen durch Rhinoviren nach Behandlung mit Amitryptilin. Hierfür wurden humane Hela-Epithelzellen mit verschiedenen Rhinovirus-Stämmen (RV14, RV16) 24 h infiziert. Die Infektion wurde anhand der zytotoxischen Wirkung der Viren gemessen und durch Färbung der Zellen mit FITC-Annexin in einem Durchflußzytometer bestimmt. Eine Rechtsverschiebung der Kurve bedeutet einen Anstieg der FITC-Annexinbindung und ist damit ein Maß für Zelltod. Amitryptilin bzw. Imipramin als Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase wurden 30 min. vor Infektion mit den Rhinoviren zu den Zellen in einem serumfreien Medium zugegeben. Die Daten zeigen, daß die Pharmaka die virale Infektion fast vollständig hem-

men. Gezeigt ist die Wirkung von Amitryptilin, analoge Daten wurden für Imipramin erhoben. Die linke Darstellung in Fig. 4 zeigt den Effekt ohne Wirkstoffzugabe, die rechte Darstellung den Effekt mit Wirkstoffzugabe.

5

- f) Durch eine Behandlung von Hela-Zellen mit anti-Ceramid-Antikörpern wird eine Infektion der Zellen mit Rhinoviren nahezu vollständig gehemmt. Für entsprechende Versuche wurden anti-Ceramid-Antikörper (Fa. Alexis) in einer Konzentration von 5 ng/ml mit den Viren (Rhinovirus-Stämme 2, 14 und 16) zu den Zellen gegeben. Die Infektion der Zellen mit den Rhinoviren wurde um etwa 95% gehemmt.

10

2. Infektion mit HIV

15

HIV infiziert humane Zellen im wesentlichen durch die Bindung des gp120 Moleküles des Virus an den CD4-Rezeptor. Ohne die Bindung von gp120 an CD4 kommt es nur zu einer ineffizienten Infektion von Zellen mit HIV. Das gp120 Molekül bildet mit dem gp41 Molekül einen oligomeren Komplex, in dem gp120 als Trimer vorliegt. Die Bindung von gp120 an das CD4-Molekül auf T-Lymphozyten verändert die Konformation von gp120, insbesondere kommt es zu einer Veränderung der Konformation des variablen Loops, wodurch die sog. Co-Rezeptor-Bindungsstelle freigelegt wird. Über diese Bindungsstelle bindet gp120 an einen Co-Rezeptor, meist die Zytokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4. Insgesamt wurden mehr als 14 verschiedene Co-Rezeptoren identifiziert, von grosser in vivo Bedeutung scheinen aber nur CCR5 oder CXCR4 zu sein. Durch die Bindung von HIV an CD4 und weitere Co-Rezeptoren wird die Aufnahme des Virus in die Zelle initiiert (Clapham P.R., McKnight A. (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. British Medical Bulletin 58: 43-59).

20

25

30

Das CD4-Molekül befindet sich bereits konstitutiv, d.h. auch in nicht infizierten Zellen, in Rafts. Nach der Infektion mit HIV kommt es zu einer Umverteilung von CD4 und zu einer Konzentration von CD4 in einem relativ kleinen Bereich der Zellmembran (Popik W., Alce T.M., Au W.C. (2002). Human Immunodeficiency Virus Type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4+T cells. J. of Virology 76: 4709-4722). Dieses Phänomen einer lokalen, sehr hohen Anreicherung eines Moleküles bezeichnet man als Clustering bzw. Aggregation. CD4 ko-lokalisiert nach Infektion in diesen Clustern mit GM1, einem typische Marker für Rafts, und auch CCR5 und CXCR4, die nach Stimulation in die neu gebildeten Membranplattformen rekrutiert werden. Werden Rafts durch Vorinkubation der Zellen mit Reagenzien, die Colesterol extrahieren, zerstört, wurde in diesen Studien sowohl das Aggregieren von CD4 nach Infektion als auch die Infektion der T-Zellen selbst verhindert. Die Bindung des Virus an CD4 war dagegen nicht verändert. Dies zeigt bereits, dass Membranrafts eine herausragende Rolle bei der Infektion humaner Zellen mit HIV spielen. Die Mechanismen, die die Fusion vieler kleiner Rafts zu grossen Membranplattformen, die dem Aggregieren von CD4 sowie der Rekrutierung von Co-Rezeptoren dienen, und letztlich die Infektion zu vermitteln scheinen, waren jedoch bislang unbekannt.

Die folgenden Ergebnisse zeigen anhand einer Stimulation humaner T-Lymphozyten mit rekombinantem gp120, das HIV ceramidreiche Membranplattformen benutzt, um humane Zellen zu infizieren.

- a) Innerhalb weniger Minuten induziert gp 120 die Freisetzung von Ceramid in humanen T-Lymphozyten. Fig. 5 zeigt die Behandlung humaner CD4-positiver Lymphozyten mit 10 µg/ml rekombinantem gp120. Innerhalb von 1 Minute wird Ceramid freigesetzt. Ceramid wurde mit einem DAG-Kinase Assay bestimmt.

- b) Die Freisetzung von Ceramid aus humanen T-Lymphozyten nach Stimulation mit gp120 korreliert mit der Bildung ceramidreicher Membranplattformen in der Zellmembran stimulierter Zellen, in denen das CD4-Molekül ko-lokalisiert und Cluster bildet. Fig. 6 zeigt, dass die zelluläre Stimulation mit gp 120 ceramidreiche Membranplattformen induziert. Die Stimulation humaner CD4-positiver T-Zellen mit gp120 (10 µg/ml) führt innerhalb von 2 Minuten zur Bildung ceramidreicher Membranplattformen. Die Bildung ceramidreicher Membrandomänen wurde nach Markierung der Zellen mit einem Cy3-markierten anti-Ceramid-Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. In diesen ceramidreichen Membranplattformen aggregiert CD4, das mit einem FITC-markierten Antikörper dargestellt wurde. Quantitative Analysen der Bildung ceramidreicher Membranplattformen zeigen, dass $50 \pm 7\%$ aller CD4-positiven T-Lymphozyten 5 Min nach Stimulation mit gp120 eine ceramidreiche Membranplattform aufweisen.

3. Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*

20

Die Bedeutung ceramidreicher Membranplattformen für Infektionen mit pathogenen Bakterien und Viren wurde am Beispiel der Infektion mammalischer Zellen mit *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt. Die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und die Freisetzung von Ceramid wurden sowohl in vitro nach Infektion von Chang-Epithelzellen, WI-38 Fibroblasten, ex-vivo Lungenfibroblasten, ex-vivo kultivierten Tracheal-Epithelzellen als auch in vivo in Epithelzellen der Trachea nach Infektion mit *P. aeruginosa* beobachtet. Die Freisetzung von Ceramid nach Infektion erfolgt in Rafts, die durch das freigesetzte Ceramid zu grossen Membranplattformen umorganisiert werden. Das freigesetzte Ceramid und die saure Sphingomyelinase lokalisieren in den neu gebildeten Membranplattformen nach Infektion mit *P. aeruginosa*.

Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die Bildung von Membranplattformen nach *P. aeruginosa* Infektion zeigt sich an dem völligen Fehlen ceramidreicher Membranplattformen nach Infektion von saure Sphingomyelinase-defizienten Zellen. Die Rolle ceramidreicher Membranplattformen für die Infektion mit *P. aeruginosa* wurde in saure Sphingomyelinase-defizienten Zellen bzw. durch Zerstörung von Rafts mit Pharmaka, die mit dem Cholesterol-Stoffwechsel interferieren, untersucht. Bei diesen Pharmaka handelt es sich um β -Cyclodextrin, Nystatin und Filipin. Der Entzug von Cholesterol aus Membranrafts führt zu einem Kollaps von Rafts. In vivo wurden Rafts in der Lunge durch pulmonale Lavage mit β -Cyclodextrin, Nystatin und Filipin zerstört bzw. normale und saure Sphingomyelinase-defiziente Mäuse verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass ceramidreiche Membranplattformen die Internalisierung der Bakterien in Epithelzellen, den Tod infizierter Zellen und die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine regulieren.

Die in vivo Bedeutung dieser Befunde wurde in Infektionsversuchen mit normalen und saure Sphingomyelinase-defizienten Mäusen gezeigt. Während normale Mäuse eine pulmonale Infektion mit *P. aeruginosa* innerhalb weniger Tage ausheilen, waren die saure Sphingomyelinase-defizienten Mäuse sehr empfindlich gegenüber einer pulmonalen *P. aeruginosa* Infektion und verstarben innerhalb weniger Tage nach Infektionsbeginn an einer Sepsis.

25

30

Patentansprüche

1. Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/
oder von Hemmstoffen von Produkten der durch dieses Enzym
5 katalysierten Reaktion, insbesondere von Ceramid, zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten und/oder Krankheiten, deren Verlauf durch Infektionen beeinflusst wird.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
10 Hemmstoffe Antidepressiva, insbesondere trizyklische und/oder tetrazyklische Antidepressiva sind.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die
Antidepressiva Amitryptilin und/oder Imipramin sind.
- 15 4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hemmstoffe von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleitete Stoffe sind.
- 20 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Hemmstoffe Desipramin und/oder FGF (Fibroblast growth factor) und/oder hiervon abgeleitete Stoffe sind.
- 25 6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hemmstoffe Antikörper, insbesondere neutralisierende Antikörper, sind.
- 30 7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen die saure Sphingomyelinase gerichtet sind.

8. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen Ceramid gerichtet sind.
- 5 9. Verwendung von Stoffen, die die Bildung ceramidreicher Membranplattformen hemmen, zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten und/oder Krankheiten, deren Verlauf durch Infektionen beeinflusst wird.
- 10 10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Stoffe β -Cyclodextrin, Nystatin und/oder Filipin und/oder hiervon abgeleitete Stoffe sind.
- 15 11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Infektionskrankheiten virale, bakterielle, parasitäre und/oder mykologische Infektionskrankheiten sind.
- 20 12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Infektionskrankheiten Aids, Hepatitis A, rhinovirale Erkrankungen, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Röteln, Influenza, Tuberkulose, Meningokokken-Infektionen und/oder Malaria sind.
- 25 13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit, deren Verlauf durch Infektionen beeinflusst wird, zystische Fibrose ist.
- 30 14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Infektionskrankheiten Rinder- und/oder Schweinepest sind.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleiteten Stoffes sowie einen pharmazeutischen Träger.
- 5
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge von Desipramin, FGF, β -Cyclodextrin, Nystatin und/oder Filipin und/oder mindestens eines davon abgeleiteten Stoffes sowie einen pharmazeutischen Träger.
- 10
17. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines gegen saure Sphingomyelinase gerichteten Antikörpers, insbesondere neutralisierenden Antikörpers, sowie einen pharmazeutischen Träger.
- 15
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines gegen Ceramid gerichteten Antikörpers, insbesondere neutralisierenden Antikörpers, sowie einen pharmazeutischen Träger.
- 20

- - - - -

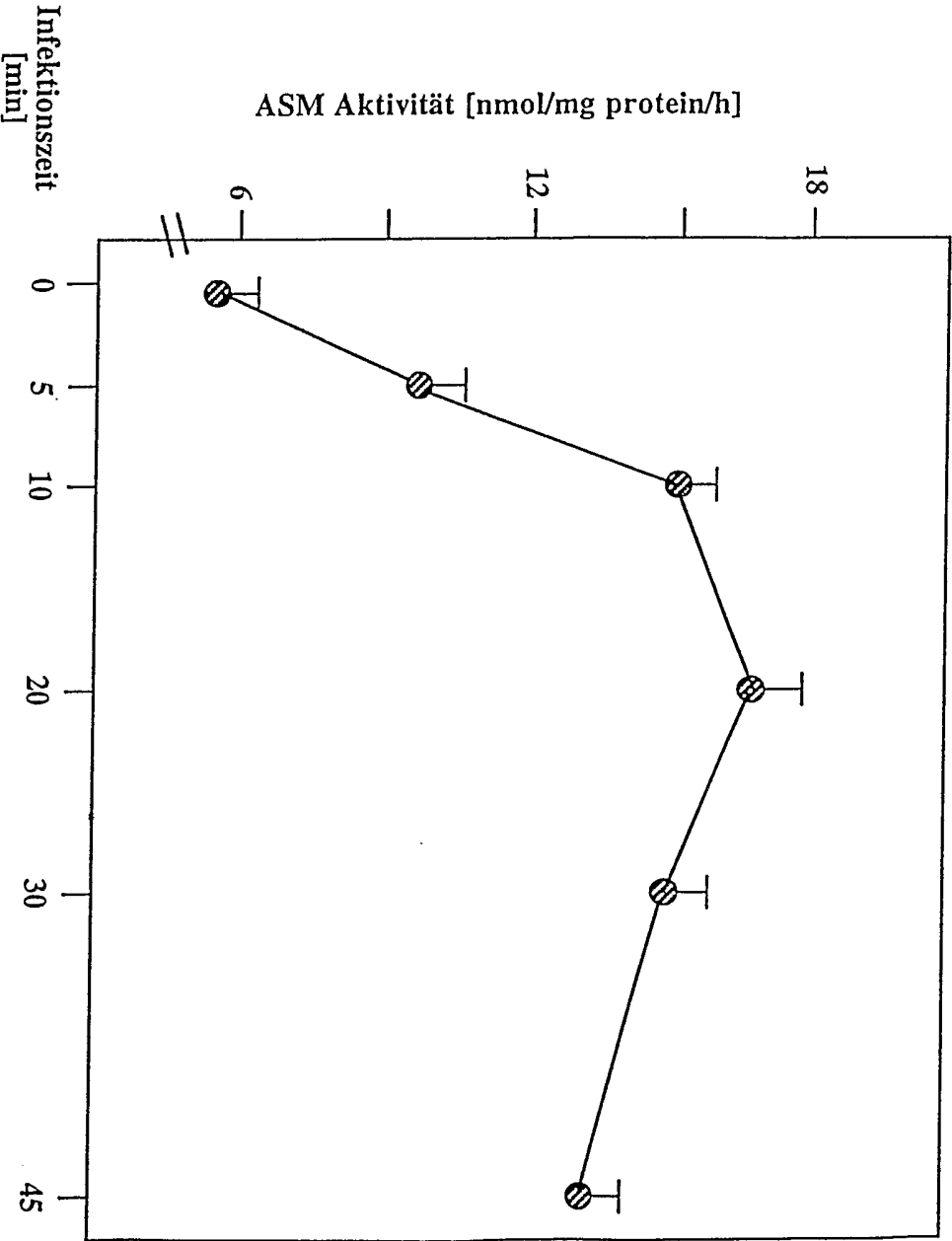


Fig. 1

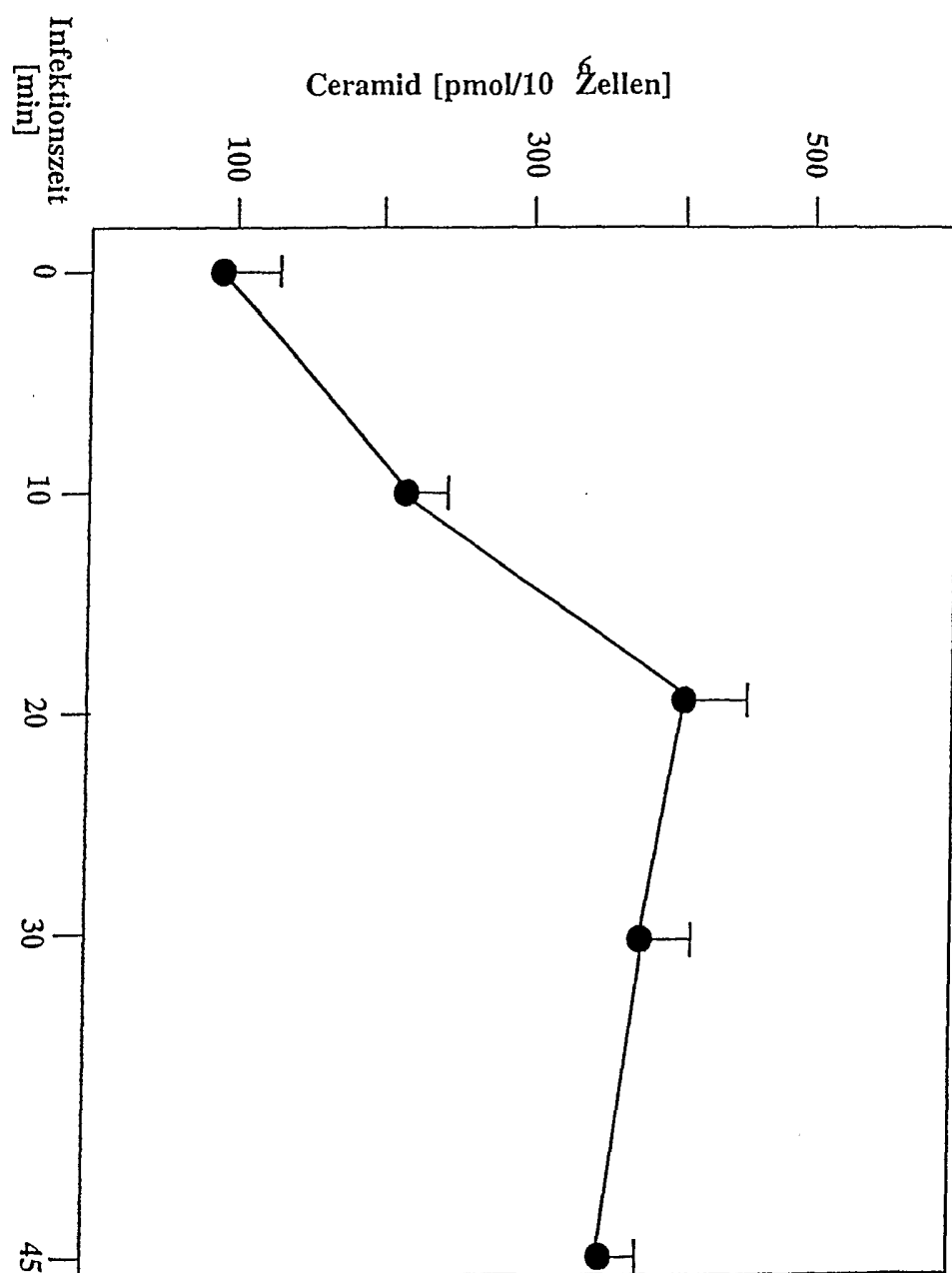


Fig. 2

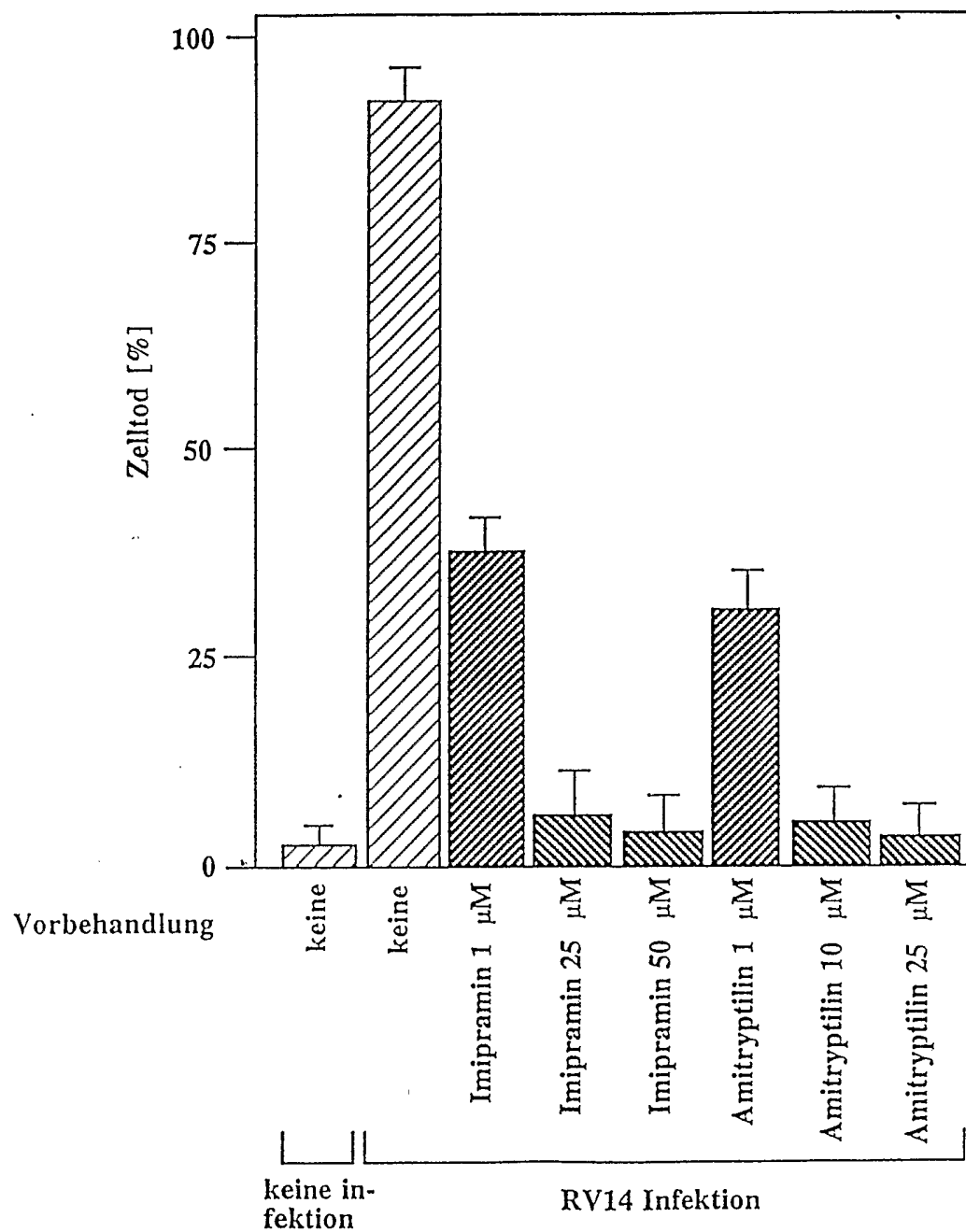


Fig. 3

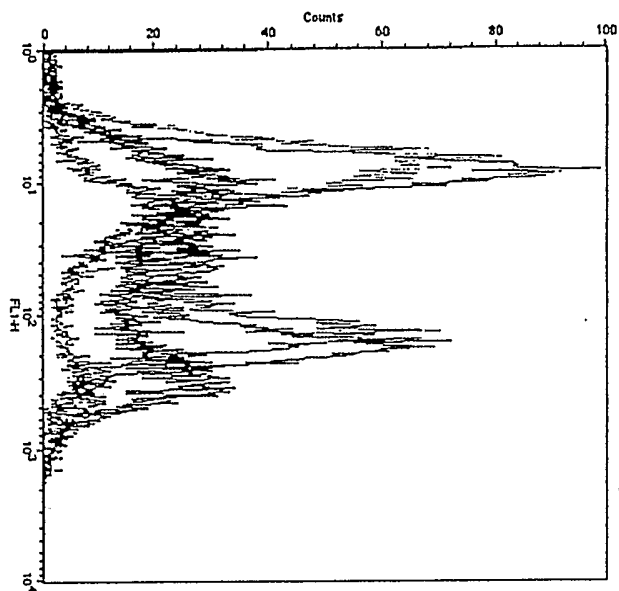
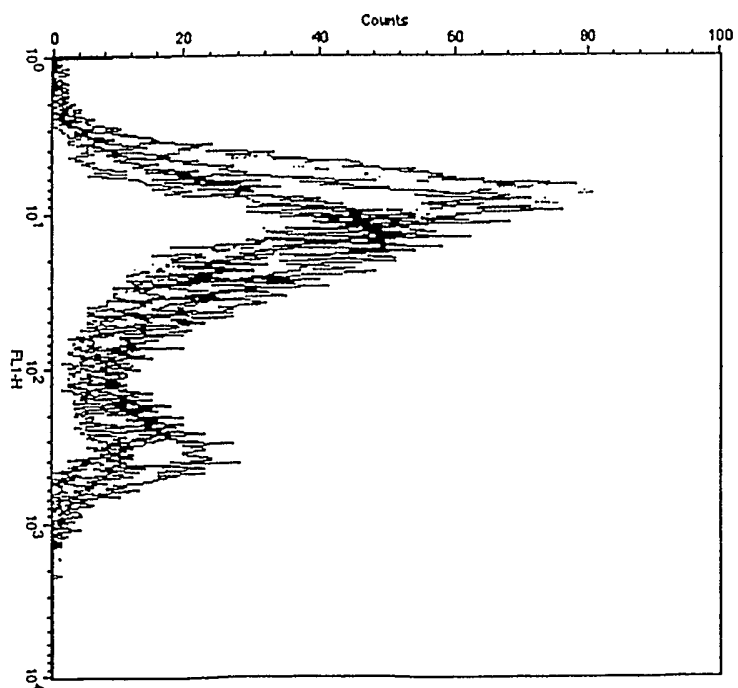


Fig. 4



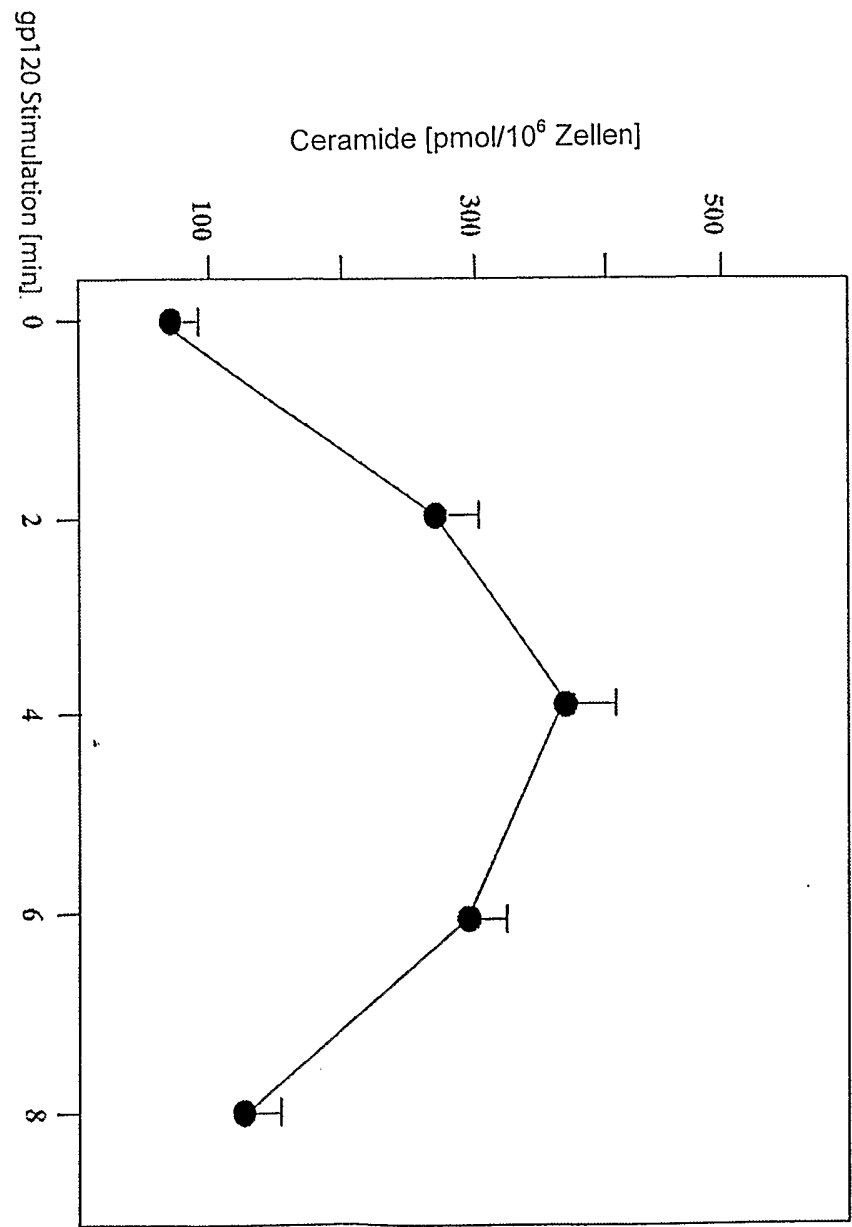


Fig. 5

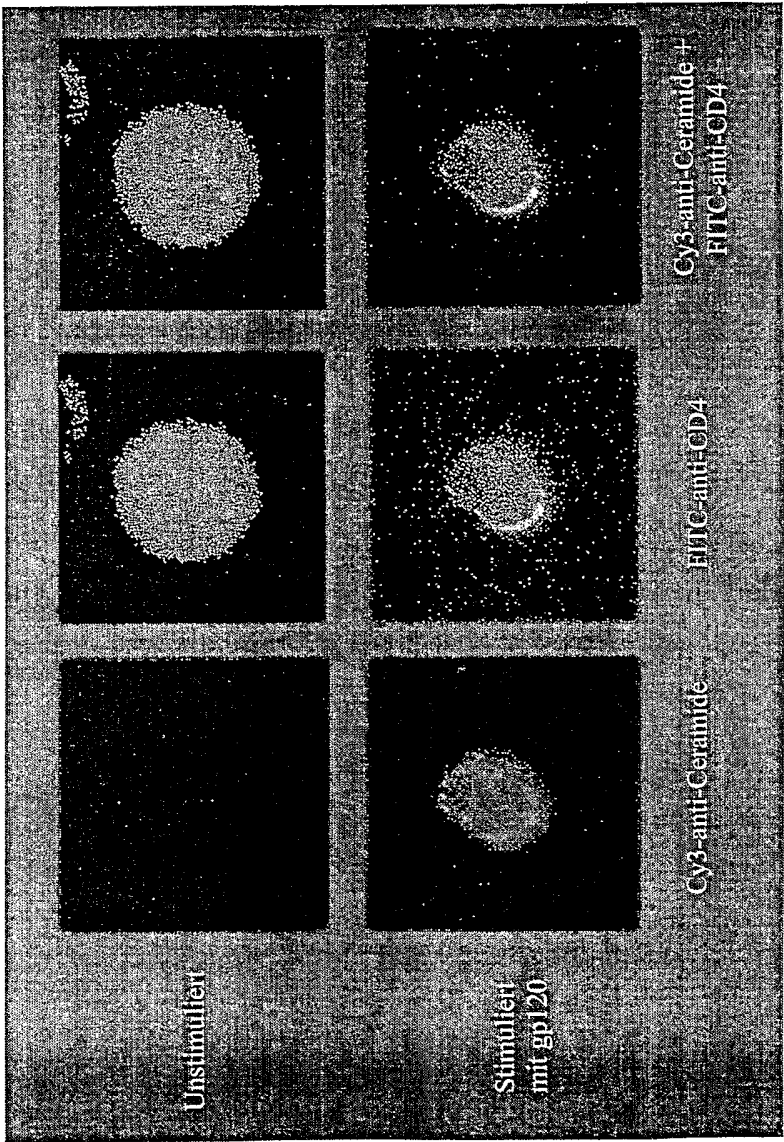


Fig. 6