

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2903/88

(51) Int.Cl.⁵ : **A61K 31/195**

(22) Anmeldetag: 25.11.1988

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1991

(45) Ausgabetag: 12. 8.1991

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A2-0222313 DE-OS 3115322 DE-AS 1568759 FR-OS 2508797
FR-OS 2419723 FR-PS 4807 M
M.BROWNLEE ET AL SCIENCE 232 (1986), 1629 BIS 1632
CHEMICAL ABSTRACTS 100 (1984), NO.97106 H, THE MERCK
INDEX, 10. AUFLAGE, RAHWAY, USA, 1983, SEITEN 113 BIS
114, SEITE 240, SEITE 28 JAPAN ABSTRACT KOKAI
NO.56-133 213 CHEMICAL ABSTRACTS 108 (1988)48892 T

(73) Patentinhaber:

LUBEC GERT DR.
A-1220 WIEN (AT).

(54) PHARMAZEUTISCHE VERWENDUNG VON ARGININ (SALZEN)

(57) Die pathologische Quervernetzung in Collagen, die bei Diabetes-Patienten durch erhöhte Konzentration von Glucose verursacht wird, kann durch Arginin gehemmt werden.

AT 393 080 B

Die Erfindung beschäftigt sich mit der Behandlung von durch Glucose ausgelöste Quervernetzung von Collagen bei Diabetes mellitus-Patienten durch Arginin.

Die Quervernetzung von langlebigen Proteinen, wie Collagen, wird im diabetischen Zustand (Diabetes-mellitus Patienten) beschleunigt und verändert (S. L. Schnider und R. R. Kohn, *J. Clin. Invest.* **66**, 1179-1181 (1980), **67**, 1630-1635 (1981)). Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für intensive Untersuchungen nach einer nicht enzymatischen Glycosylierung dieser Proteine. Neuere Arbeiten nehmen an, daß fortgeschrittene, nicht enzymatische Glycosylierungsprodukte die von Glucose abgeleiteten Quervernetzungen des Collagens bilden (vgl. V. Monnier, Cerami, A., *Science* **211**, 491-493 (1981) und M. J. C. Kent, N. D. Light, A. J. Bailey, *Biochemical J.* **225**, 745-752 (1985)). Ein Reaktionsmechanismus für diese abnormale Quervernetzung ist in der beigefügten Zeichnung Reaktionsschema (Mitte) wiedergegeben.

Glucose reagiert mit Aminogruppen von Proteinen in einer reversiblen, nukleophilen Additionsreaktion zu einem Schiffschsen Basen-Addukt (Aldimin), das sich dann in einer Amadori-Umlagerung in das stabilere, aber dennoch reaktionsfähige Amadori-Produkt umwandelt (vgl. H. B. Mortensen und C. Christophersen, *Clin. Chim. Acta* **134**, 317-326 (1983)).

Die so erhaltenen Amadori-Produkte durchlaufen dann eine Reihe weiterer langsamer Reaktionen mit Aminogruppen anderer Proteine, um von Glucose abgeleitete, intermolekulare Quervernetzungen zu bilden, wie das unlängst beschriebene, fortgeschrittene Glycosylierungsprodukt, nämlich 2-(2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazol (S. Pongor, P. C. Ulrich, F. A. Bencsath, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2684-2688 (1984)).

Fortgeschrittene Glycosylierungsprodukte häufen sich über längere Zeiträume fortlaufend auf langlebigen Proteinen, wie Collagen, an (M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami in: *Diabetes Complications Scientifique and Clinical Aspects*. M. J. C. Grabbe, Ed. (Pitman, London 1986)).

Im Collagen von diabetischen Personen wird diese altersbedingte Anhäufung von fortgeschrittenen Glycosylierungsprodukten durch den über längere Zeit erhöhten Glucosespiegel beschleunigt (Monnier, V., Kohn, R. R. Cerami, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 583-587 (1984)).

Ausgehend von der Überlegung, daß die durch Glucose induzierte Bildung von Proteinquervernetzungen verhindert werden könnte, wenn die reaktiven Carbonyle der anfänglichen Glycosylierungsprodukte (Ketoamine) pharmakologisch blockiert werden könnten, untersuchten Brownlee und Mitarbeiter den Einfluß einer nukleophilen Hydrazinverbindung (Aminoguanidin, $H_2N-C(=NH)-NH-NH_2$) auf diesen Reaktionsablauf (Brownlee, M., H. Vlassara, A. Kooney, P. Ulrich, A. Cerami *Science* **232**, 1629-1632 (1986) und EP-A-222 313). Diese Autoren zeigten, daß Aminoguanidin in vitro die Bildung fortgeschrittener Glycosylierungsprodukte und die durch Glucose induzierte Collagenquervernetzung verhindert, wie dies in der Zeichnung im linken Reaktionsschema gezeigt ist). Ihre Ergebnisse zeigten auch, daß an Ratten verabreichtes Aminoguanidin die durch Diabetes induzierte Anhäufung von fortgeschrittenen Glycosylierungsprodukten und eine abnormale Quervernetzung von Protein im Bindegewebe von Arterienwänden verhindert. Der Einfluß von Aminoguanidin auf die Bildung fortgeschrittener Glycosylierungsprodukte wurde durch Messen der spezifischen Fluoreszenz, wie sie früher für Collagen beschrieben worden ist, beurteilt.

Betreffend die Albuminglycosylierung wurde festgestellt, daß durch Aminoguanidin die Bildung eines fortgeschrittenen Albuminglycosylierungsproduktes verhindert wurde, wogegen die Amadori-Umwandlung im wesentlichen unverändert stattfand.

Die Wirkung von Aminoguanidin auf die Collagenquervernetzung in vitro wurde durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Cyanbromidspaltprodukten nativer Collagenfibrillen bestimmt. Mit der Zeit zeigte das Gelmuster von Cyanbromidspaltprodukten aus Collagen, das mit Glucose inkubiert wurde, erhöhte Werte an quervernetzten Peptiden mit hohem Molekulargewicht. Die Anwesenheit von Aminoguanidin in der Inkubationsmischung verringerte die Menge an quervernetzten Peptiden mit hohem Molekulargewicht signifikant.

Die in vivo-Wirkung von Aminoguanidin wurde an nichtdiabetischen und alloxandiabetischen Ratten gezeigt. Es wurden täglich intraperitoneal Injektionen von Aminoguanidin verabreicht. Es wurde die Menge an entstanden, fluoreszierenden, fortgeschrittenen nicht enzymatischen Glycosylierungsprodukten, bestimmt. Der Grad der Quervernetzung des Aortenbindegewebes war in Aminoguanidin-Tieren kleiner als bei solchen, die kein Aminoguanidin erhielten.

Die Löslichkeit von Collagen, ein anderes Kennzeichen für die Quervernetzung, ging bei mit Aminoguanidin behandelten Tieren auf normale Werte zurück.

So wie die meisten Hydrazine, besitzt auch Aminoguanidin eine außerordentlich hohe Toxizität. Es ist somit in der Praxis nicht einsetzbar.

In der DE-OS 3 115 322 wird ein oral verabreichbares Mittel, das eine Kombination aus Arginin und Lysin enthält zur Stimulierung des Körperwachstums und der Gewichtszunahme vorgeschlagen. Die Wirkung dieses Mittels soll durch die kombinierte Verabreichung von Arginin und Lysin erreicht werden und in erster Linie auf einer Stimulierung der Freisetzung des Wachstumshormons beruhen. Darüber hinaus soll das aus der DE-OS 3 115 322 bekannte Mittel, wie an sich bekannt, auch die Freisetzung von Insulin stimulieren.

Aus der FR-OS 2 508 797 ist es bekannt, daß Reaktionsprodukte aus bestimmten C1 bis C6-Karbonsäuren

und basischen Aminosäure, z. B. Arginin, die antitumorale Wirkung von Interferon und die Wirkung von Immunstimulantia erhöhen bzw. stimulieren.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Substanz anzugeben, welche zur Herstellung von Arzneimitteln geeignet ist, die die Bildung von Quervernetzungen in Collagenproteinen verhindern und die nicht toxisch ist.

5 Die Erfindung schlägt die Verwendung von Arginin, insbesondere L-(+)-Arginin ($\text{HCOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-C(NH)-NH}_2$) oder von einem Salz desselben, vor. Dies ist eine Aminosäure, die nicht toxisch ist und die in allen Proteinen in der täglichen Nahrung enthalten ist.

Für die nachstehenden Untersuchungen wurde die freie Base von L-Arginin verwendet.

Es wurden folgende in vitro Untersuchungen ausgeführt:

10

1. Fluoreszenztest nach dem Verfahren von Monnier V. et. al. (s. oben)
2. SDS-PAGE von mit Glucose inkubierten, isolierten Collagenen mit und ohne L-Arginin, wobei Aminoguanidin als Vergleichssubstanz herangezogen wurde.
3. Inkubationsversuche mit verschiedenen Collagenpräparaten, interstitiellen Collagenen und Basalmembran-

15

collagen.

Es wurden folgende in vivo-Experimente ausgeführt, wobei sowohl Schweizer Mäuse als auch spontan diabetische KK-Mäuse verwendet wurden:

20

4. Löslichkeitsversuche
5. SDS-PAGE von isolierten Collagenen
6. Bestimmung des Nierengewichtes durch Autopsie (Serumparameter: Fructosamin)
7. Nichtenzymatische Glycosylierungstestreihen und
8. Fluoreszenztestreihen.

25

Für die in vivo-Versuche wurden zwei verschiedene Versuchstierarten, nämlich Schweizer Mäuse und spontan diabetische KK-Mäuse verwendet.

Die täglich oral verabreichte Dosis betrug 50 mg/kg Körpermasse über einen Zeitraum von 5 Wochen.

Es wurde weder klinisch noch bei einer durchgeführten Autopsie Nebenwirkungen festgestellt.

30

Dies stimmt mit klinischen Berichten von Wissenschaftlern überein, die Arginin für andere Zwecke, z. B. für Diätergänzung im gesunden Zustand und für Krankheiten, wie Argininosuccinase-mangel, Asthenospermie und Immunomodulation untersucht hatten.

Überdies ist Arginin im Handel, z. B. in Apotheken, rezeptfrei erhältlich und wurde in den USA durch die FDA bereits als Diätzusatzmittel zugelassen.

35

Die in vitro Versuche zeigten folgende Ergebnisse:

1. Fluoreszenzversuchsreihe von in vitro nicht enzymatisch glycosyliertem Collagen Type I (interstitielles Collagen) und Type III.

40

Collagen in seinem nativen Zustand wurde in 200 mM Glucose sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Arginin bzw. Aminoguanidin in equimolaren Verhältnissen nach dem Verfahren von Brownlee (Brownlee, M., H. Vlassara, A. Kooney, P. Ulrich, A. Cerami Science **232**, 1629-1632 (1986)) inkubiert. Collagene ohne Glucose im Inkubationsmedium wurden als Vergleichsproben verwendet. Eine signifikante Hemmung der Fluoreszenz gemäß der Methodik von Monnier und Mitarbeitern (Monnier, V., Kohn, R. R., Cerami, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 583 (1984)) wurde für Aminoguanidin und Arginin bei allen

45

Collagenarten beobachtet.

2. Eine SDS-PAGE gemäß dem Verfahren von Brownlee mit der Abänderung, daß die Collagenspaltprodukte durch Collagenasedigestion statt durch Bromcyan-spaltung erhalten wurden, zeigte höhermolekulargewichtige Collagenspaltprodukte in den Proben ohne Aminoguanidin bzw. Arginin. Bei den Proben, die Arginin bzw. Aminoguanidin enthielten, wurde ein Molekulargewichts-Muster ähnlich dem von nichtglycosyliertem Collagen beobachtet.

50

3. Ein analoger Versuch mit Basalmembran-collagen der Type IV zeigte die Aktivität von Arginin gegenüber diesem vaskulären Collagensystem auf.

55

Die in vivo Versuche zeigten folgende Ergebnisse:

Bei diesen Versuchen wurden normale Schweizer Mäuse, 10 Stück je Gruppe, weiß, weiblich, 1 Jahr alt, 6 Wochen lang mit Arginin behandelt, wobei je Tag 50 mg/kg Körpermasse Arginin oral in Leitungswasser verabreicht wurden. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu fester Nahrung, nämlich Standard-Mäusenahrung. Zehn entsprechende Tiere dienten als Vergleichstiere.

60

4. Löslichkeitsversuch:

Collagen wurde aus der Haut, der Leber und der Niere der Versuchstiere extrahiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Extrahierbarkeit von Collagen bei behandelten und unbehandelten Gruppen von Versuchstieren.

5

5. Bei SDS-PAGE wurden keine Unterschiede zwischen den extrahierten Collagenen beider Gruppen von Versuchstieren aufgezeigt, was zeigt, daß keine Beeinflussung der normalen Quervernetzung vorliegt.

10

6. Bei einer Autopsie wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von Versuchstieren festgestellt. Es wurden weder Unterschiede in den Gewichten von Organen noch pathologische Feststellungen ermittelt.

15

7. Es bestand ein signifikanter Unterschied bei der nicht enzymatischen Glycosylierung von Serumprotein, wie sich durch einen Fructosamin-Versuch ausdrücken ließ. Die mit Arginin behandelte Gruppe zeigte niedrige Gehalte an nicht enzymatischen Glycosylierungen des Serumproteins. Dies zeigt eine Wirkung auf die nichtenzymatische Glycosylierung, die bis zu einem gewissen Ausmaß auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet.

20

8. Fluoreszenztestreihen nach der oben beschriebenen Methode von aus der Haut, der Leber und der Niere extrahiertem Collagen zeigten signifikante Unterschiede, die den positiven Einfluß auf die nichtenzymatische Glycosylierung, nämlich eine Verminderung dieses Prozesses, aufzeigte.

25

10 Monate alte KK-Mäuse, weiß, weiblich, fettleibig und diabetisch wurden 5 Wochen lang mit Arginin behandelt. Es wurde die gleiche Dosierung wie oben angegeben verwendet. Zehn KK-Mäuse dienten als Vergleichstiere, wobei das Protokoll wie für die Schweizer Mäuse erstellt wurde.

9. Löslichkeitsversuch:

30

Collagen wurde aus der Haut, der Leber und der Niere der Versuchstiere extrahiert. Es gab einen signifikanten Unterschied, da die Löslichkeit bei den behandelten Tieren erheblich höher war als bei den nichtbehandelten Vergleichstieren, was einen positiven pharmakologischen Effekt von Arginin anzeigt, da die geringe Löslichkeit im diabetischen Zustand einer der pathogenen Faktoren für Langzeitkomplikationen bei dieser Krankheit ist.

35

10. Bei SDS-PAGE wurden signifikante Unterschiede aufgezeigt. Nichtbehandelte KK-Mäuse zeigten Collagenspaltprodukte mit höherem Molekulargewicht als behandelte KK-Mäuse. Dies zeigt die positive Wirkung von Arginin auf die Quervernetzung von Collagen und die nichtenzymatische Glycosylierung auf.

40

11. Bei einer Autopsie wurden keine Unterschiede im allgemeinen Erscheinungsbild festgestellt. Es wurden in beiden Gruppen keine makroskopischen pathologischen Feststellungen ermittelt, jedoch wurde bei der Autopsie von diabetischen Mäusen (analog dem Menschen) festgestellt, daß nichtbehandelte Mäuse ein signifikant höheres Nierengewicht besitzen als mit Arginin behandelte Mäuse.

45

12. Die Serumfructosaminkonzentrationen ausgedrückt als Morpholinfructose waren bei den mit Arginin behandelten Tieren statistisch signifikant kleiner, was einen positiven pharmakologischen Effekt auf die nicht enzymatische Glycosylierung aufzeigt.

50

13. Fluoreszenzversuche von aus den Mäusen isolierten Collagenen zeigten signifikant geringere Werte bei den behandelten Tieren, was eine positive Wirkung auf die nicht enzymatische Glycosylierung aufzeigt.

Die oben wiedergegebenen Daten zeigten die positive, der Wirkung von Aminoguanidin ähnliche Aktivität von Arginin in vitro und in vivo, nämlich die Hemmung von fataler, glucose-induzierter Quervernetzung von Collagen im diabetischen Zustand.

55

Der Reaktionsmechanismus für Collagen-Protein in seiner glycosylierten Form mit Arginin ist in dem in der Zeichnung (Fig. 1) dargestellten Reaktionsschema rechts wiedergegeben, wobei Arginin mit einer seiner reaktionsfähigen, durch ein Sternchen hervorgehobenen Stellen mit der aktiven Karbonylgruppe des Ketoamins reagieren kann.

60

An Stelle von Arginin kann ein pharmazeutisch annehmbares Salz desselben (z. B. das Glutamat) verwendet werden.

5

PATENTANSPRÜCHE

- 10
1. Verwendung von Arginin oder einem Salz desselben, z. B. dem Glutamat, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung pathologischer Quervernetzung in Collagen bei Diabetes-Patienten.
 2. Verwendung von L(+)-Arginin oder einem Salz desselben, z. B. dem Glutamat nach Anspruch 1.

15

Hiezu 1 Blatt Zeichnung

