



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 777 T2** 2007.06.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 675 732 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/22** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 777.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IT94/00124**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 923 052.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/003822**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.07.1994**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.02.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.10.1995**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2007**

(30) Unionspriorität:

F1930143 **27.07.1993** **IT**

F1940036 **18.02.1994** **IT**

F1940039 **25.02.1994** **IT**

(74) Vertreter:

Glawe, Delfs, Moll, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:

Bigazzi, Mario, Florenz/Firenze, IT

(72) Erfinder:

Bigazzi, Mario, I-50137 Firenze, IT

(54) Bezeichnung: **Verwendung von Relaxin zur Herstellung von therapeutischer Mittel**

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 Erfindung betrifft neuartige Verwendungen von Relaxin (RLX) als pharmazeutisches Mittel für die Herstellung von Medikamenten.

[0002] Relaxin ist ein Hormon, das von den Ovarien besonders während der Schwangerschaft sezerniert wird. Seine Struktur ist der von Insulin sehr ähnlich und es ist bei jeder Tierart unterschiedlich. Seine bekannten Aktivitäten sind mit der Fortpflanzung und insbesondere mit der Schwangerschaft und Entbindung verbunden. Es ist anerkannt, dass dieses Hormon spontane Kontraktionen des Uterus während der Schwangerschaft verhindern kann und die Vergrößerung der Schambeinfuge und der Cervix zum Zeitpunkt der Entbindung hervormifen kann.

Stand der Technik

[0003] Die Verfügbarkeit reiner Präparate von Relaxin ist wegen der Schwierigkeit seiner Isolierung und Reinigung sowie der Knappheit von Organen, aus denen es extrahiert werden kann, immer recht eingeschränkt gewesen (Bryant Greenwood G.D., *Endocrine Review*, 3-62-1982). Diese Einschränkungen und die Schwierigkeiten bei der Bewahrung der biologischen Aktivität des Hormons erzeugten einen zunehmenden Mangel an Interesse bis zu einem beinahe vollständigen Vergessen von Relaxin und schließlich sogar dem Bezweifeln der Existenz von Relaxin.

[0004] Die Reinigung und Sequenzierung von Relaxin und dessen Herstellung durch Gentechnik, erhalten 1974 bis 1983, eröffneten neue Möglichkeiten, schließlich die Biologie und die Rolle dieses Hormons zu untersuchen und zu verstehen. Siehe in dieser Hinsicht Sherwood et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 160-185-1974; James et al., *Nature* 267, 554, 1974; Hudson et al., *Nature*, 301, 628, 1983; Bigazzi M. et al., *Biology of Relaxin and its role in the human*, International Congress Series 610, Excerpta Medica – Amsterdam – 1993.

[0005] Tatsächlich gibt es eine Menge an Beweisen, dass RLX ein multifunktionales Hormon ist, das gegenüber den Fortpflanzungsorganen, den Brustdrüsen und den Bindegeweben wirksam ist, aber bisher ist keine klinische Verwendung verwirklicht worden.

[0006] Ein neues mögliches Ziel für RLX könnte das kardiovaskuläre System sein. Das kardiovaskuläre System kann in drei unterschiedliche Hauptabschnitte unterteilt werden:

- das Herz stellt die Pumpe des Systems dar,
- die Blutgefäße stellen die Umlaufleitungen dar,
- das Blut zirkuliert in den Gefäßen und trägt auf eine positive oder negative Weise zur Zirkulation

durch das hämostatische System und durch die Konzentration unterschiedlicher Substanzen, wie etwa Lipide, Elektrolyte, Wasser und dergleichen, bei.

[0007] Einige Erkrankungen oder Fehlfunktionen des kardiovaskulären Systems können für sich nur in einem dieser Hauptabschnitte auftreten, ohne direkt die anderen zu beeinträchtigen (wie etwa das Kontraktionsversagen und Rhythmusstörungen des Herzens, einige kongenitale Abnormitäten der Gefäße oder Veränderungen in der hämostatischen Kette wie thrombophile oder hämophile Erkrankungen usw.).

[0008] Einige der häufigeren Kreislauferkrankungen können in einem Abschnitt beginnen, betreffen bald jedoch auch andere Teile des Systems. Dies ist bei Arteriosklerose der Fall, bei welcher sowohl die Veränderungen der Blutzusammensetzung als auch der Arterienwände für die Pathogenese und die klinischen Merkmale der Erkrankung verantwortlich sind.

[0009] Die Kreislauferkrankung, die von arteriosklerotischen Prozessen herrührt, stellt eines der größten Probleme der Menschheit dar. Tatsächlich ist es die häufigste Todesursache, bei mindestens 4 % der Bevölkerung (besonders durch Myokard- oder Zerebralinfarkte). Dies erklärt das große Interesse von Forschern an diesem Gebiet.

[0010] Gegenwärtig sind viele unterschiedliche pharmakologische Hilfsmittel bekannt und werden verwendet, um die thromboischämischen Erkrankungen des Kreislaufs zu behandeln, getrennt gerichtet auf Gefäßerweiterung oder Blutgerinnungskorrektur, Auflösung von Blutgerinnseln, Blutfettverringern und so weiter.

[0011] Die Wirkungen von RLX auf das Herz wurden 1990 von Osheroff et al. entdeckt, siehe Osheroff PL et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1992.89: 2384-2388 und US-Patent Nr. 5,166,191.

[0012] Sie beschrieben die Bindung von RLX an die Herzvorhöfe und eine Steigerung des Rhythmus und der Konzentrationen der in vitro isolierten Vorhöfe. Ausgehend von diesen Experimenten stellten sie die Hypothese einer möglichen Rolle von RLX bei Störungen des Herzrhythmus und bei Erkrankungen, welche die Herzkontraktion betreffen, wie etwa kongestives Herzversagen, auf.

[0013] Einige Beobachtungen hinsichtlich der Zirkulation sind erfolgt. Es wurde festgestellt, dass die Raynaud-Schädigungen während der Frühschwangerschaft vollständig verschwinden. Frühe klinische Studien, die von Casten und Allon 1958 und 1960 mit ovinen Präparaten von RLX geringer Reinheit und unbestimmter biologischer Aktivität durchgeführt worden sind, haben gezeigt, dass es beim Heilen von

Raynaud-Schädigungen nützlich war, die von obliterierenden peripheren Arterienerkrankungen stammten (siehe Casten G.C. et al., *Angiology* 11, 404, 1960).

[0014] 1986 wurde berichtet, dass die lokale Anwendung von RLX aus dem Schwein auf das Mesozökum männlicher Ratten eine Erweiterung der kleinen Venen erzeugt und die vasokonstriktiven Effekte von Norepinephrin und Promethazin antagonisiert (siehe: Bigazzi M. et al., *Acta Endocrinol.* 112-296, 1986).

[0015] 1989 berichteten Massicotte et al., dass eine zweitägige Infusion von RLX aus Ratten die vasokonstriktiven Effekte von Norepinephrin und Vasopressin auf die mesenteriale Arterie von spontan hypertonen Ratten abstumpfte (siehe: Massicotte et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 190, 254, 1989).

[0016] Die physiologische Signifikanz dieser Beobachtungen blieb jedoch unbekannt, und bisher war es nicht bekannt, ob RLX das Kreislaufsystem beeinflusst oder nicht.

[0017] Bisher sind keine Wirkungen von RLX auf die Hämostase und die Blutzusammensetzung berichtet worden.

Offenbarung der Erfindung

[0018] Es ist nun der Beweis gelungen, dass RLX in den Blutgefäßen, in den hämostatischen Vorgängen und in der Blutzusammensetzung ein vollaktives Hormon ist und daher bei der Herstellung von Medikamenten für die Behandlung von thromboischämischen oder bestimmten Kreislauferkrankungen verwendet werden kann. Die Erfindung betrifft neuartige Verwendungen von RLX, wie sie in den Ansprüchen definiert sind.

[0019] Tatsächlich ist nun überraschend entdeckt und experimentell bestätigt worden, dass dieses Hormon als ein Faktor von vollem Schutz gegen thrombotische Krankheitserscheinungen wirken kann. Tatsächlich erzeugt RLX eine Dilatation der Zellen der glatten Muskulatur der Blutgefäße, die zu einer Zunahme des Blutflusses führt; es hemmt Koagulationsvorgänge, verstärkt die Fibrinolyse und verringert die Blutkonzentration von Lipiden und Natrium. Es ist erkannt worden, dass RLX dieses breite Spektrum an Wirkungen direkt und durch die Freisetzung zweier wichtiger Substanzen, Stickstoffmonoxid (NO) und atriales natriuretisches Peptid (ANP), die im Wesentlichen zu den oben erwähnten Ergebnissen auf Gefäßwände und Blutkomponenten beitragen, auslöst.

[0020] Schließlich erlaubt die Stimulation von NO- und ANP-Freisetzung, dass RLX Funktionen in anderen Organen als dem Kreislaufsystem, wie etwa die

Freisetzung von Histamin aus Mastzellen, beeinflusst.

[0021] Daher betrifft diese Erfindung die Verwendung von RLX für die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung und Prävention von wichtigen Kreislauferkrankungen.

[0022] Außerdem können ebenfalls Krankheiten, die durch Histaminfreisetzung und ANP-Sekretion beeinflusst werden, mit Hilfe von RLX hinsichtlich seiner Effekte auf die Stimulation von NO- und ANP-Freisetzung behandelt oder verhindert werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] Die Ergebnisse von Experimenten mit der Verwendung von RLX bei der Behandlung dieser Erkrankungen werden im Folgenden ausführlich diskutiert, wobei auch Bezug auf die beigefügten Zeichnungen genommen wird, die experimentelle Ergebnisse berichten. Im Einzelnen:

[0024] [Fig. 1](#) zeigt den Effekt von RLX auf den Koronarfluss, welcher durch Experimente an Ratten (Diagramm A) und Meerschweinchen (Diagramm B) ermittelt wurde;

[0025] [Fig. 2](#) zeigt den Effekt von RLX auf den Koronarfluss (Diagramm A) bzw. die NO-Freisetzung (Diagramm B) in Gegenwart von NO-Synthaseinhibitoren und einem NO-Synthaseinduktor;

[0026] [Fig. 3](#) zeigt den Effekt von RLX auf cGMP-Pegel bei glatten Muskelzellen der Gefäßwand, die von in vitro kultivierter Rinderaorta erhalten wurden;

[0027] [Fig. 4](#) zeigt den Effekt von RLX auf Histaminfreisetzung (Diagramm A) und zytosolische Ca^{2+} -Freisetzung (Diagramm B) bei Mastzellen in vitro;

[0028] [Fig. 5](#) zeigt den Effekt von RLX auf den Blutfluss im menschlichen Penis;

[0029] [Fig. 6](#) ist ein Diagramm, das den Effekt von RLX auf Thrombozytenaggregationshemmung zeigt;

[0030] [Fig. 7](#) zeigt den Effekt von RLX auf die Hemmung der Thromboxanproduktion;

[0031] [Fig. 8](#) zeigt den Effekt von RLX auf die NO-Produktion;

[0032] [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) zeigen die Korrelation zwischen der Thrombozytenaggregationshemmung von RLX und seinem Effekt auf cGMP- bzw. zytosolische Ca^{2+} -Produktion.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

A. Vaskuläre Erkrankungen und thrombotische Krankheitserscheinungen

[0033] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung von RLX für pharmazeutische Formulierungen vorhergesehen, die:

- auf das Korrigieren von Veränderungen von vaskulären Funktionen in menschlichen Organen, wie Schwellkörpern des Penis, gerichtet sind,
- auf die Kontrolle thrombotischer Erkrankungen gerichtet sind,
- auf die Hemmung der Bildung von Gerinnseln und/oder das Hervorrufen von deren Auflösung gerichtet sind,
- auf die Verringerung der Zahl und der Aggregation von zirkulierenden Thrombozyten gerichtet sind,
- auf die Hemmung der Bildung von Thrombozyten aus Megakaryozyten gerichtet sind,
- für die Verringerung von zirkulierendem Fibrinogen bestimmt sind,
- für die Zunahme von Fibrinolyse bestimmt sind.

[0034] Um die beschriebenen Konzepte zu entwickeln, sind die folgenden experimentellen Modelle durchgeführt worden:

1. Studien an Blutgefäßen:

- a. am Koronarsystem,
- b. an glatten Muskelzellen von Rinderaorta in vitro,
- c. an der Zirkulation des Penis.

2. Studien zur Hämostase:

- a. Thrombozyten,
- b. humorale Faktoren.

3. Studien an ANP:

- a. elektronenmikroskopische Studien und Bestimmung von ANP in atrialen Myozyten,
- b. an der Blutosmolarität und Na-Konzentration.

[0035] Die Ergebnisse der Experimente werden im Folgenden ausgeführt.

1-Studien an Blutgefäßen

[0036] Die Ergebnisse der Studien zu dem Effekt von RLX an Blutgefäßen zeigen, dass das Peptid auf unterschiedlichen Stufen auf das Kreislaufsystem wirkt.

[0037] 1-a Das Koronarsystem wurde als brauchbares Modell zum Untersuchen des Einflusses von RLX

auf die Erweiterung von Blutgefäßen betrachtet. Ratten- und Meerschweinchenherzen, isoliert und in vitro in einem Langendorff-Gerät perfundiert, wurden verwendet, um zu beurteilen, ob RLX Veränderungen im Koronarfluss verursacht. Nach 30 Minuten Stabilisierung wurde in einigen Experimenten RLX (30 ng/ml) zu der Perfusionsflüssigkeit gegeben, und die Perfusion dauerte 20 Minuten an. In weiteren Experimenten wurde RLX (30 ng/ml) als Bolus in die Aortakanüle injiziert. Die Perfusate wurden gesammelt und der Koronarfluss bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass RLX signifikant den Koronarfluss erhöht. **Fig. 1** zeigt zwei Diagramme (A und B), die Experimente an Ratten bzw. Meerschweinchen betreffen. Der Prozentsatz der Basalflussvariation ist als Funktion der Zeit abgebildet. In diesen Diagrammen (sowie in den nächsten) sind Werte als Mittelwert \pm SE (Standardfehler) ausgedrückt. Statistische Analysen erfolgten unter Berechnung des Student-Tests (P), dessen Wert in den Diagrammen gezeigt ist.

[0038] Um die Mechanismen der Wirkung von RLX auf die Erweiterung von Koronargefäßen zu klären, wurden die Stickstoffmonoxid-(NO)-Produktion und Histaminfreisetzung in den perfundierten Meerschweinchenherzen untersucht. NO, das als starkes gefäßerweiterndes Mittel bekannt ist, wurde durch Bestimmung von Nitriten (stabile Endprodukte des NO-Metabolismus) in den Perfusaten gemessen. In einigen Experimenten wurde N^w-Monomethyl-L-arginin (MeArg), ein NO-Synthasehemmer, der Perfusionsflüssigkeit zugesetzt, bevor RLX als Bolus gegeben wurde; in anderen Experimenten wurden Meerschweinchen mit E. Coli Lipopolysaccharid (LPS), einem Induktor der NO-Synthaseaktivität, vor der Herzisolation und Perfusion vorbehandelt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen dass RLX eine signifikante Zunahme der Nitritmengen in den Perfusaten verursacht (zweifache Steigerung über den Basalwert), was eine erhöhte NO-Produktion anzeigt. Dies wurde durch die Experimente mit MeArg und LPS, Wirkstoffe, welche die RLX-induzierte Zunahme des Koronarflusses abstumpften bzw. steigerten, bestätigt (**Fig. 2**). Koinzident mit der Nitritzunahme wurde die Menge an Histamin in den Perfusaten durch RLX signifikant verringert.

[0039] Als Ergebnis kann RLX als ein Mittel betrachtet werden, das die myokardiale Perfusion durch Aktivierung des L-Arginin-Weges steigern kann.

[0040] NO wird durch unterschiedliche Bestandteile der vaskulären Wand, d.h., Endothelzellen und glatte Muskelzellen, sowie durch perivaskuläre Mastzellen erzeugt (siehe Iadecola C., TINS, 16:206, 1993; Mellion BT et al., Blood, 57:946, 1981; Radomski M.V. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 148:1482, 1987). Es ist ebenfalls bekannt, dass NO eine größere Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus spielt, was

zu einer Verringerung des zytosolischen Ca^{2+} , Myosinphosphorylierung und schließlich Relaxation der glatten Muskelzellen führt (siehe Noriyuki H. et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 159: 27-31, 1988).

[0041] 1-b Glatte Muskelzellen der Gefäßwand, erhalten aus Rinderaorta (BASM) und in vitro kultiviert, sind ein geeignetes in vitro-Modell zum Verstehen der Wirkungsweise von RLX auf Blutgefäße. Die Ergebnisse der immunocytochemischen Untersuchungen, die mit Anti-Actinantikörpern an BASM-Zellen durchgeführt wurden, die für 4 Stunden mit 100 ng/ml RLX inkubiert wurden, zeigten, dass das Peptid Veränderungen im Actinzytoskelett hervorruft, was mit einer Zellabflachung übereinstimmt, wie sie während Relaxation in vivo auftritt.

[0042] Um den Mechanismus der Wirkung von RLX auf BASM-Zellen zu klären, wurde das Peptid in Konzentration von 10 und 100 ng/ml für 1 Stunde zu den Kulturmedien gegeben, und die intrazellulären cGMP-Pegel wurden ausgewertet. RLX verursachte eine auffallende konzentrationsbezogene Zunahme der intrazellulären cGMP-Pegel (400 und 900 % über den Werten der unbehandelten Kulturen). Darüber hinaus führte eine Vorbehandlung der Zellen mit MeArg, das NO-Synthase hemmt, und Superoxiddismutase (SOD), die NO-Aktivität potenziert, zu einer Abschwächung bzw. Steigerung der RLX-induzierten Zunahme an cGMP, was zeigt, dass der Anstieg an cGMP mindestens teilweise auf einer Steigerung der NO-Produktion beruht. Diese Ergebnisse sind in den Diagrammen von [Fig. 3](#) zusammengefasst.

[0043] 1-c Mastzellen (MC) sind bekannt für die Produktion und Freisetzung vasoaktiver Substanzen. Es ist daher untersucht worden, ob RLX seine gefäßerweiternde Wirkung auch durch Beeinflussung der MC-Funktion ausübt. Die Ergebnisse der Experimente an isolierten serosalen Ratten- und Meerschweinchen-MC an mesenterialen Ratten-MC in vivo zeigten, dass RLX Kalziumionophor-induzierte und anaphylaktische Histaminfreisetzung sowie den Ausstoß von Granula von MC hemmt. Diese Wirkung wird durch eine Stimulierung der NO-Produktion vermittelt. Tatsächlich wurde die RLX-induzierte Abschwächung der Histaminfreisetzung, die durch Kalziumionophor hervorgerufen wurde, durch MeAgr verhindert und durch SOD potenziert. Darüber hinaus stumpfte RLX den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Pegel, der durch Kalziumionophor auf eine konzentrationsabhängige Art hervorgerufen wurde (41 % Abnahme mit 10 ng/ml RLX und 97 % Abnahme mit 100 ng/ml RLX), ab. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die gefäßerweiternde Wirkung von RLX nicht auf der Histaminfreisetzung durch MC beruht, sondern eher auf der Herstellung des gefäßerweiternden Mittels NO, in Übereinstimmung mit seiner Wirkung im Koronarsystem. Diese Ergebnisse sind in den Diagrammen A und B in [Fig. 4](#) zusammenge-

fasst.

[0044] 1-d Der Blutfluss im Penis wird durch lokale NO-Produktion beeinflusst. Basierend auf der Fähigkeit von RLX, die NO-Synthese zu stimulieren, wurde der Effekt des Peptids auf den Blutfluss in der tiefen Arterie des Penis untersucht. RLX (durch Mikrofiltration sterilisiert) wurde in die Schwellkörper von 4 normalen menschlichen Freiwilligen mit einer Dosis von 10 ng injiziert, und der Blutfluss wurde durch ein Echo-Doppler Acuson 128 1–6 Minuten nach der Injektion gemessen. Bei allen Versuchspersonen verursachte RLX eine auffallende Zunahme des Blutflusses verglichen mit dem Basalfluss, der vor der Injektion ausgewertet wurde. Bei zwei Versuchspersonen wurde außerdem 5–10 Minuten nach der RLX-Injektion eine Erektion beobachtet. In [Fig. 5](#) sind die Echo-Dopplerbilder dargestellt, die den Fluss unter Normalbedingungen zeigen (Diagramm A), eine Minute nach RLX-Injektion (Diagramm B) und 5 Minuten nach RLX-Injektion (Diagramm C).

2-Studien zur Hämostase

[0045] Beginnend mit der Erkenntnis, dass RLX die NO-Produktion in mehreren Bestandteilen des kardiovaskulären Systems erhöht und basierend auf der wohlbekannten Fähigkeit von NO zur Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation ist nach einer möglichen Rolle von RLX in der Hämostase durch Untersuchen von Thrombozyten und Plasmafaktoren der Hämostase gesucht worden.

[0046] Eine erste Reihe von Experimenten wurde an isolierten Thrombozyten von menschlichen Freiwilligen und Kaninchen durchgeführt, die mit RLX inkubiert wurden und dann mit Proaggregantien stimuliert wurden.

[0047] Eine zweite Reihe von Experimenten wurde an männlichen Ratten durchgeführt, denen intraperitoneal RLX injiziert wurde und die 20 Minuten später geopfert wurden. Vor der Opferung wurden Blut- und Plasmaproben gesammelt, um Plasmahämostasefaktoren und die Zahl der zirkulierenden Thrombozyten zu untersuchen; beim Opfern wurden Milzproben zum Untersuchen der Morphologie der Megakaryozyten entnommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass RLX die Hämostase durch Wirkung auf sowohl die Thrombozyten als auch auf plasmalösliche Faktoren beeinflussen kann.

2-a Thrombozyten

[0048] Es ist gezeigt worden, dass das Peptid durch unterschiedliche Proaggregantien hervorgerufene Thrombozytenaggregation merklich unterdrückt ([Fig. 6](#)). Dieser Effekt war konzentrationsbezogen und erreichte ein Maximum von 80 % Hemmung mit 100 ng/ml RLX. Die Hemmungswirkung von RLX auf

Thrombozytenaggregation wird sowohl durch eine Hemmung der Thromboxanproduktion als auch einer Stimulation der endogenen NO-Synthese ausgeübt. Dies ist aus den Diagrammen der [Fig. 7](#) bzw. [Fig. 8](#) ersichtlich und bringt nachfolgend eine Erhöhung an intrazellulärem cGMP (wie in [Fig. 9](#) gezeigt) und eine Abnahme an zytosolischen Ca^{2+} (wie in [Fig. 10](#) gezeigt) mit sich, was letztlich zu einer wirkungsvollen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt.

[0049] Eine Ultrastrukturuntersuchung der Thrombozyten zeigt, dass RLX Konformationsveränderungen und Granula-Exozytose, die während der Aggregation auftritt, hemmt, so dass dies gut mit den funktionalen Daten übereinstimmt. Die aus den in-vivo-Experimenten an Ratten erhaltenen Erkenntnisse zeigen, dass RLX eine Verringerung der Anzahl zirkulierender Thrombozyten verursacht. Dies kann eine Konsequenz einer Verringerung der Thrombozytenfreisetzung durch Megakaryozyten sein. Tatsächlich legen die Ultrastrukturkenntnisse nahe, dass RLX Vereinigen und Verschmelzen von Prothrombozyten und Demarkationsmembranvesikeln mit der Plasmamembran hemmt, so dass Thrombozyten nicht von der Zelloberfläche freigesetzt werden können.

2-b Humorale Faktoren

[0050] Neben seinen Wirkungen auf Thrombozyten verursacht RLX ebenfalls eine signifikante konzentrationsabhängige Steigerung der Plasmaspiegel von tPA und PAI-1, die als Faktoren endothelialen Ursprungs, die an der Fibrinolyse beteiligt sind, bekannt sind, und eine leichte Abnahme einiger Koagulationsfaktoren, wie etwa Fibrinogen und Prothrombinfragmente F1 + 2. Daher fördert das Peptid ebenfalls die Fibrinolyse, wahrscheinlich durch Wirkung auf das Endothel. Der Effekt von RLX auf diese Plasmafaktoren ist in Tabelle 1 gezeigt, die Daten betreffen Experimente an Ratten.

3-c Lipidblutkonzentration

[0051] Die Untersuchungen von Cholesterol und Triglyceriden an dem peripheren Blutserum zeigen, dass RLX-Verabreichung eine auffallende Verringerung derer Konzentration bis zu einer 38 bzw. 55 %-Verringerung erzeugt.

3-Studien zur ANP-Sekretion

[0052] 3-a ANP-Sekretion wurde an Ratten nach intraperitonealer Verabreichung von 10 µg RLX untersucht. Es ist bekannt, dass atriale Myokardiozyten eine endokrine Funktion aufweisen, dass sie ein Peptid synthetisieren und freisetzen können, atriales natriuretisches Peptid (ANP) genannt, das neben seinem zunächst erkannten Effekt beim Stimulieren von Natriuresis weitere Eigenschaften, wie eine negative

Wirkung auf den Blutdruck durch eine Abnahme des Gefäßtonus und eine Verschiebung der Plasmaflüssigkeit in dem Zwischengewebekompartiment, aufweist.

[0053] Es wurde daher nach einer möglichen Beziehung zwischen RLX und ANP gesucht, indem die Menge an immunreaktivem ANP und die Ultrastrukturmerkmale atrialer Myokardiozyten von Ratten bei RLX-Behandlung bewertet wurden. 20 Minuten nach Verabreichung des Peptids war die Menge an immunreaktivem ANP stark verringert sowie die Zahl ANP-speichernder Granula. Keine nennenswerten Änderungen wurden bei der Ausdehnung des Ergastoplasmas und des Golgiapparats gefunden. Dies deutet darauf hin, dass RLX eher die Freisetzung von ANP fördert als dessen Synthese hemmt. Bestimmungen des ANP-Gehalts in Rattenatriahomogenaten durch RIA vor und nach in-vivo-Verabreichung von RLX sind in Übereinstimmung mit den EM-Erkenntnissen.

[0054] 3-b Blutosmolalität und Natriumkonzentrationen wurden gemessen, um den Effekt der ANP-Sekretion durch ihre Effekte auf Nieren und auf peripheres Blut zu zeigen. Bei den Ratten der oben erwähnten Experimente wurde gezeigt, dass RLX die Plasmaosmolalität von 8,5 milliosmol pro kg Körpergewicht und die Natriumkonzentration von 142 ± 4 auf 136 ± 2 mEq/l senkt.

Abschließende Bemerkungen

[0055] Aus dem Obengenannten geht hervor, dass RLX auf unterschiedlichen Stufen auf das kardiozirkulatorische System wirksam ist, und dass ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus, an dem der L-Arginin-NO-Weg und intrazelluläres cGMP und Ca^{2+} beteiligt sind, den meisten beobachteten Reaktionen zugrunde liegt. Dies erlaubt es, RLX als Mittel zu betrachten, dass myokardiale Perfusion, Blutversorgung für Organe und Fibrinolyse begünstigen kann und Thrombozytenaktivität und -koagulation sowie Lipidblutkonzentrationen senken kann, die alle an der Pathogenese arteriosklerotischer Schädigungen beteiligt sind. Daher kann RLX bei der Prävention und/oder Therapie von Ischämie-abgeleiteten, allergischen, hypertonen und thromboembolischen Störungen und Arteriosklerose verwendet werden.

[0056] Die oben erwähnten Erkenntnisse zeigen, dass RLX ebenfalls an der Steuerung und Therapie von Krankheiten anderer Systeme als dem zirkulatorischen Apparat durch die Stimulation der Produktion von NO und der Sekretion von ANP beteiligt sein kann.

B-Präeklampsie, Eklampsie und Gestose in der Schwangerschaft

[0057] Der normale Verlauf einer Schwangerschaft hängt von den tiefgehenden organischen Veränderungen ab, die in der schwangeren Frau selbst hervorgerufen werden. Kurz nach der Entbindung wird der Normalzustand wiederhergestellt.

[0058] Eines der überraschendsten Phänomene betrifft das hydrosaline Gleichgewicht und tritt typischerweise in den ersten Schwangerschaftswochen auf die Nierenfunktion, das Gefäßsystem und die Hämostase sind alle einer Neuordnung unterworfen.

1) Nierenfunktion und Wassergleichgewicht:

[0059] Der arterielle Fluss der Niere und die Glomerulumfiltration sind erhöht. Die Natriumausscheidung ist erhöht, während seine Reabsorption verringert ist. Das Ergebnis dessen ist eine verringerte Plasmakonzentration an Natriumionen und eine erhöhte Konzentration an Kaliumionen. Dies bedeutet einen wichtigen Abfall des osmolaren Drucks des Plasmas, dessen Werte weniger als 10 milliosmol pro kg Körpergewicht als Normalwerte bei Männern und nichtschwangeren Frauen erreichen.

2) Gefäßsystem:

[0060] Vieles weist auf niedrigeren Peripherwiderstand durch eine Erweiterung der Arteriolen und die Zunahme der Zwischengewebsflüssigkeit als Folge der Erweiterung und der erhöhten Durchlässigkeit des Kapillarbett hin.

3) Hämostase:

[0061] Koagulationsfaktoren sind in peripher zirkulierendem und Plazentablut erhöht; dennoch gibt es kein Auftreten intravaskulärer Koagulation während der Schwangerschaft.

[0062] Die Physiologie der besonderen kardiovaskulären und hydro-elektrolytischen Situation, die für die Schwangerschaft charakteristisch ist, bleibt unbekannt. Ihre Identifizierung wäre von größter theoretischer und praktischer Bedeutung, da sie zeigen würde, wie man mit korrigierenden Maßnahmen in die schwerwiegenden pathologischen Situationen eingreifen könnte, die beobachtet werden, wenn während der Schwangerschaft dieses Gleichgewicht gestört ist.

[0063] Gestose, Präeklampsie und Eklampsie gefährden alle den Verlauf der Schwangerschaft und können irreversible Gefäßschäden am Fötus und der Mutter verursachen. Verschiedene hormonelle Hypothesen sind vorgeschlagen worden, aber das Hormon oder die Kombination von Hormonen, die für

eine solche besondere Situation verantwortlich sind, wurden nie identifiziert.

[0064] Die oben ausgeführten Effekte von RLX auf das Kreislaufsystem und auf die ANP-Sekretion haben zur der Schlussfolgerung geführt, dass eben dieses Hormon für die gesamten während der Schwangerschaft beobachteten Phänomene verantwortlich sein kann.

[0065] Tatsächlich wurde gezeigt, dass Relaxin wirksam ist:

- auf das Gefäßsystem; dass es Hypotonie durch Vasodilatation der Arteriolen und Kapillaren hervorruft und Gewebeimbitition sowohl durch seinen eigenen direkten Effekt als auch indirekt durch Induktion von ANP-Sekretion steigert.
- bei dem hydrosalinen Gleichgewicht und bei der Nierenfunktion, wobei es wiederum ANP-Freisetzung induziert und daher einen Verlust an Na und eine Abnahme der Plasmaosmolarität fördert.
- bei der Hämostase; durch Verringerung der Thrombozytenaggregation, durch Verringerung der Fibrinogenkonzentration und durch Erhöhung der Fibrinolyse.

[0066] Es wird daher postuliert, dass das Fehlen von oder ein Mangel an Relaxin der Grund der Hypertonie, des elektrolytischen Ungleichgewichts mit erhöhter Na-Retention, von Ödemen und intravaskulärer Thrombose ist, was die drei pathogenen Erscheinungen des gestotischen Syndroms sind.

C) Durch Histaminfreisetzung (allergische und flogistische Erkrankungen) und ANP-Sekretion beeinflusste Erkrankungen.

[0067] Während der Studien am Kreislaufsystem wurde eine neue, noch nicht berichtete biologische Aktivität von Relaxin entdeckt: das Hormon zeigt die Fähigkeit, die Sekretion von Histamin durch die Mastzellen und die Sekretion von ANP aus den Atriozyten zu hemmen oder, abhängig von der Dosis, völlig zu unterdrücken.

[0068] Die Erfindung betrifft daher ebenfalls die Verwendung von Relaxin für die Behandlung pathologischer Situationen infolge von Histaminfreisetzung, wie allergische und entzündliche Erkrankungen und Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichts.

[0069] Genauer gesagt ist erfindungsgemäß die Verwendung pharmazeutischer Zubereitungen, die Relaxin enthalten, indiziert für:

- die Behandlung allergischer Erkrankungen, wie Heuschnupfen, Bronchialasthma usw.
- die Behandlung anaphylaktischer Ereignisse, Arzneimittelüberempfindlichkeit usw.
- die Kontrolle von Gewebsreaktionen, Schwel-

lungen, Nesselsucht usw.

– die Linderung oder Verhinderung von Entzündungen, die durch Histaminfreisetzung aufrechterhalten werden.

[0070] Die experimentellen Modelle, die zur Entwicklung der oben beschriebenen Konzepte verwendet wurden, und die Ergebnisse, die erhalten wurden, wurden bei den zuvor diskutierten Studien zu Blutgefäßen und ANP-Sekretion offengelegt.

[0071] In allen durchgeführten Experimenten hat Relaxin keinerlei Effekt auf die basale Freisetzung von Histamin durch die Mastzellen gezeigt. Es hat im Gegenteil gezeigt, dass es die Histaminsekretion in Zellen, die chemisch durch den Ionophoren stimuliert wurden oder durch das Allergen sensitiviert wurden, unter beiden experimentellen Bedingungen stark hemmen konnte. Der Grad der Hemmung war eine Funktion der verwendeten Dosis an Relaxin.

[0072] Die mikroskopische Beobachtung der Zellen bestätigte, dass in Gegenwart von Relaxin die Mastzellen keine Freisetzung von Histamingranula zeigten, die üblicherweise durch den Ionophoren und das Allergen induziert wird.

[0073] Die erhaltenen Ergebnisse sind mit der Beobachtung konsistent, dass allergische Erkrankungen (die durch Histaminfreisetzung aufrechterhalten werden) sich üblicherweise während der Schwangerschaft bessern, wenn Relaxin im zirkulierenden Blut vorhanden ist.

[0074] Sie rechtfertigen außerdem die Hypothese, dass Relaxin als neuer Wirkstoff, oder als der erste einer neuen Linie von Wirkstoffen, zur Behandlung von allergischen, anaphylaktischen, inflammatorischen Erkrankungen oder durch Histaminfreisetzung aufrechterhaltenen Erkrankungen nützlich sein kann.

[0075] Wegen der Eigenschaft der Stimulation der ANP-Sekretion kann Relaxin beeinflussen:

- die Störungen der Wasser- und Natriumexkretion aus den Nieren.
- die Erhöhung der Wasser- und Natriumretention in Geweben.

[0076] Dies ermöglicht es im Prinzip, Relaxin für die Behandlung lokaler oder diffuser Ödeme, bei Hydrops, bei Lymphödemen usw. vorherzusehen.

Patentansprüche

1. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von vaskulären Funktionsstörungen der Schwellkörper des menschlichen Penis.

2. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat

davon zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von thrombotischen Kreislauferkrankungen.

3. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Medikaments für die Steuerung der Blutkoagulation und Plättchenaggregation.

4. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Verringerung und/oder Steuerung der Plättchenbildung aus Megakaryozyten und zur Verhinderung von deren Aggregation.

5. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung der Bildung von Gerinnseln.

6. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Verringerung der Blutkonzentration von zirkulierendem Fibrinogen.

7. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung der Fibrinolyse und Gerinnselauflösung.

8. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon zur Herstellung eines Antihistaminmittels zur Verhinderung der Freisetzung von Histamin in allergischen und entzündlichen Erkrankungen und in Störungen, die aus der Freisetzung von Histamin aus Mastzellen herrühren.

9. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung allergischer Rhinitis, Bronchialasthma, anaphylaktischen Erkrankungen, pharmakologischen Allergien, Hautausschlag, Schwellung, Urticaria.

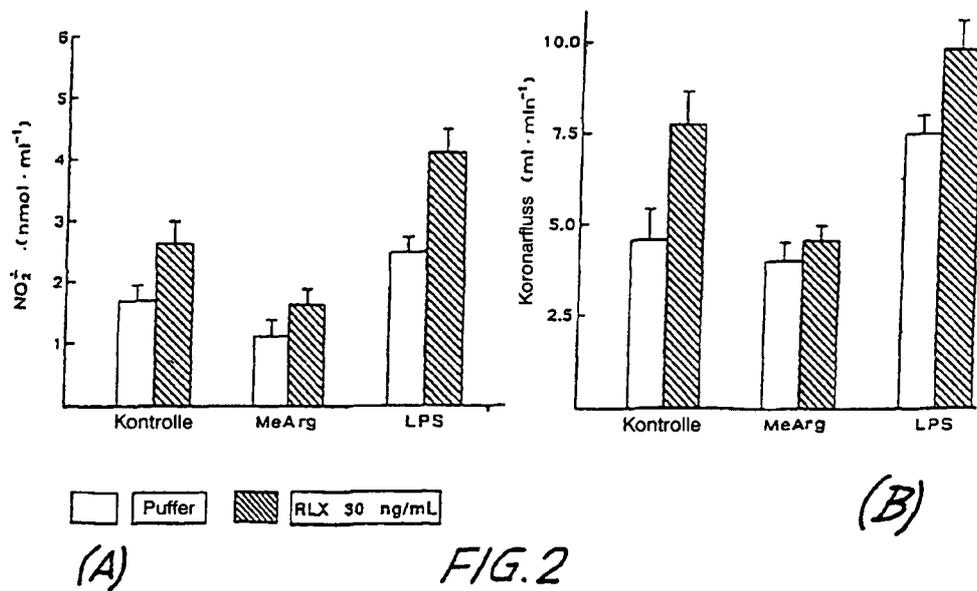
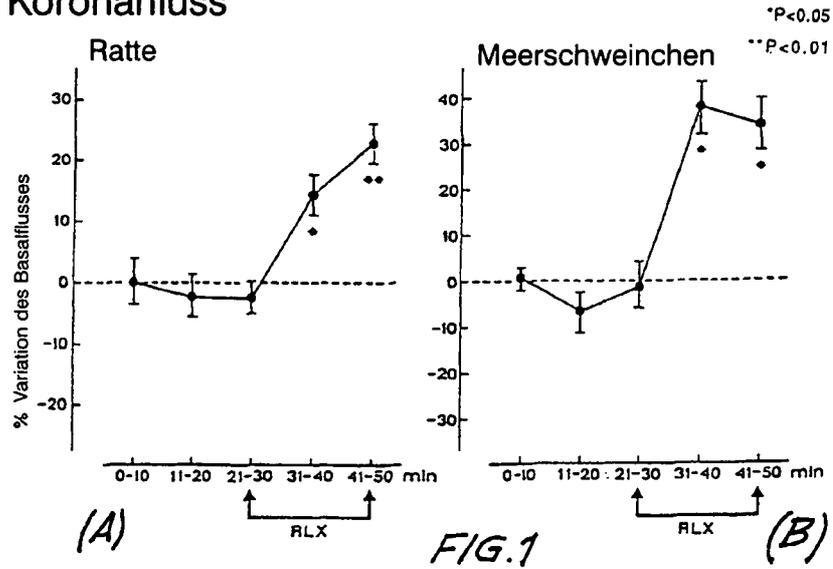
10. Verwendung von Relaxin oder einem Derivat davon zur Herstellung eines Medikaments zur Verringerung oder Hemmung von Entzündungen, die durch die Freisetzung von Histamin aufrechterhalten werden.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

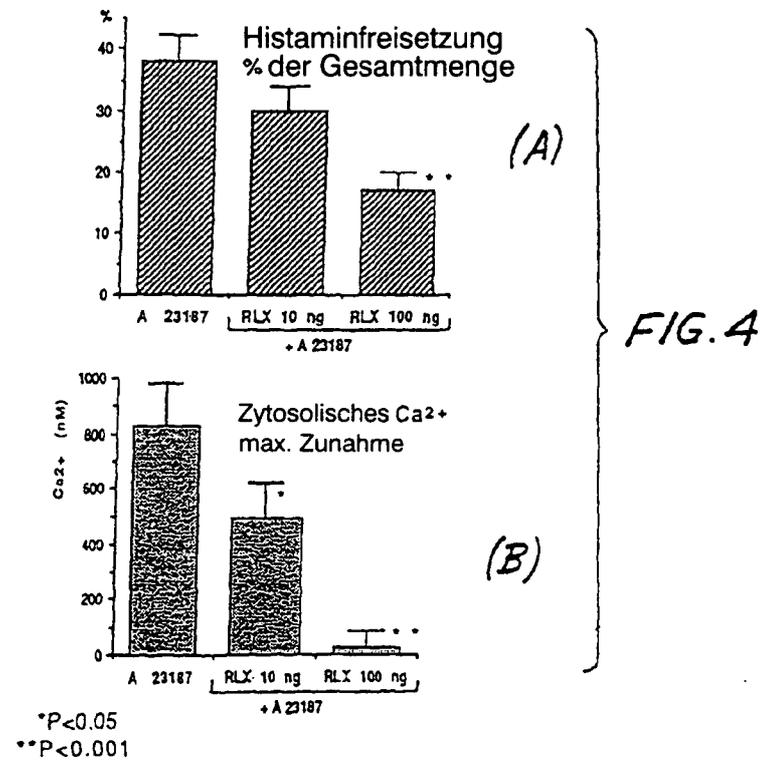
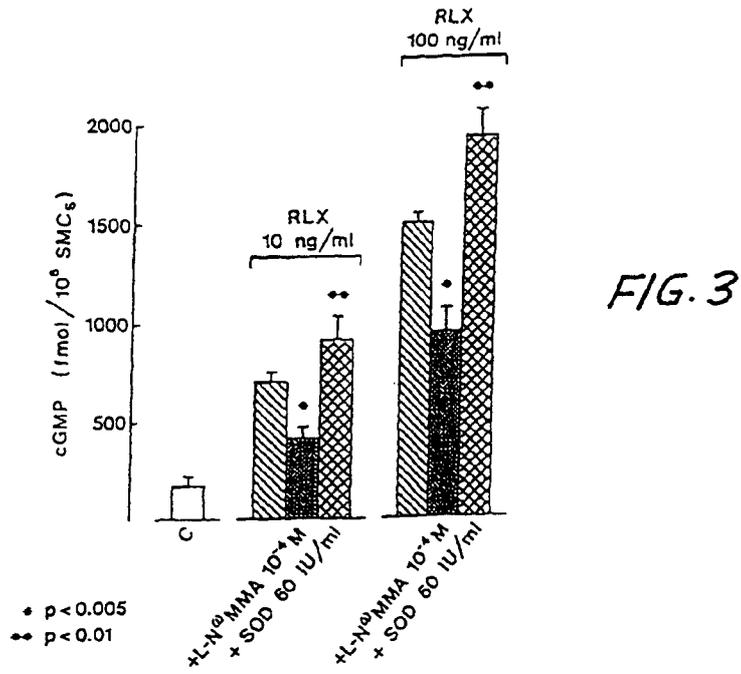
Anhängende Zeichnungen

RLX - Blutgefäße

Koronarfluss



RLX - Blutgefäße
Glatte Muskelzellen



RLX - Blutgefäße
Penisarterie (Mensch)
RLX 10 ng in 0.1 mL PBS

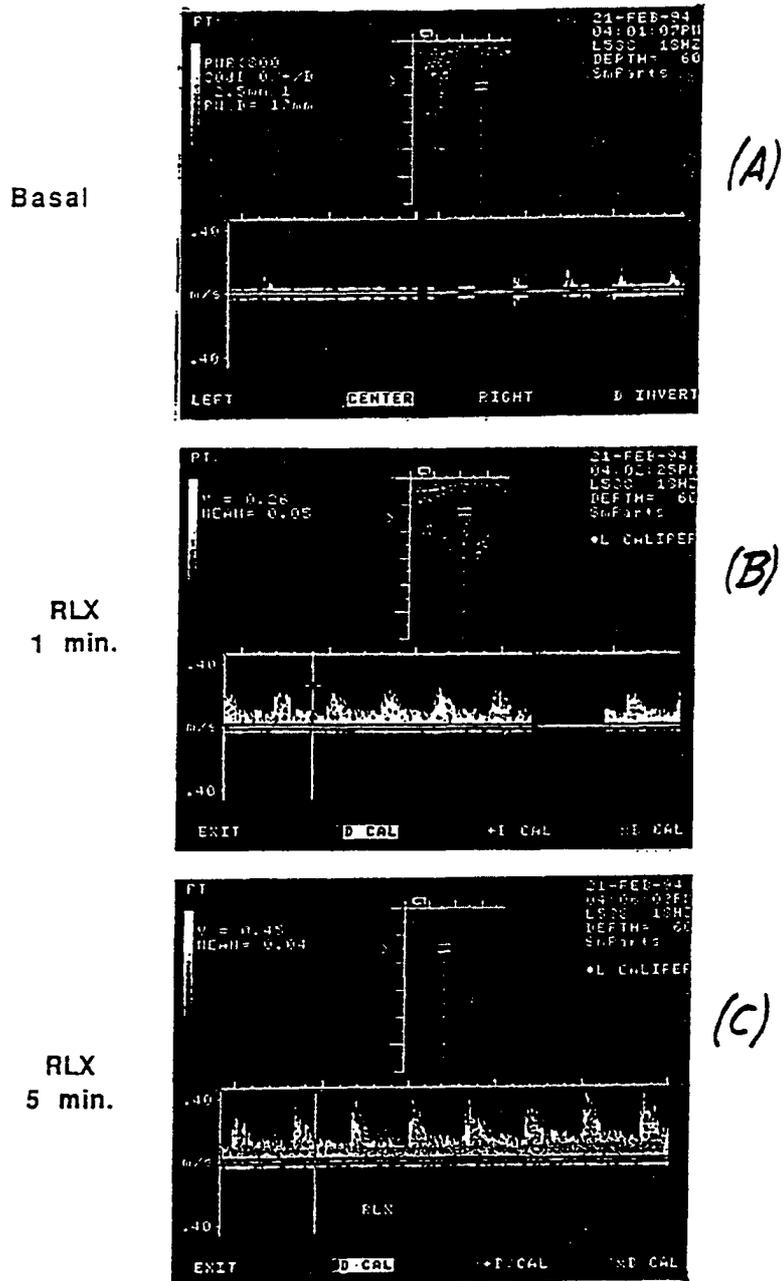


FIG. 5

RLX - Hämostase
Thrombozytenaggregation
(Mensch)

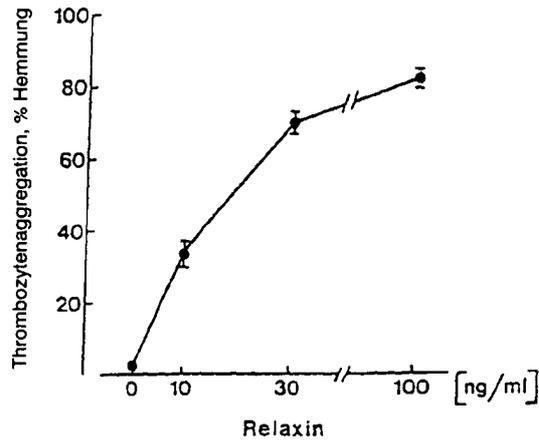


FIG. 6

Thrombin 50 mU/mL

RLX - Hämostase
Thromboxanproduktion
(Mensch)

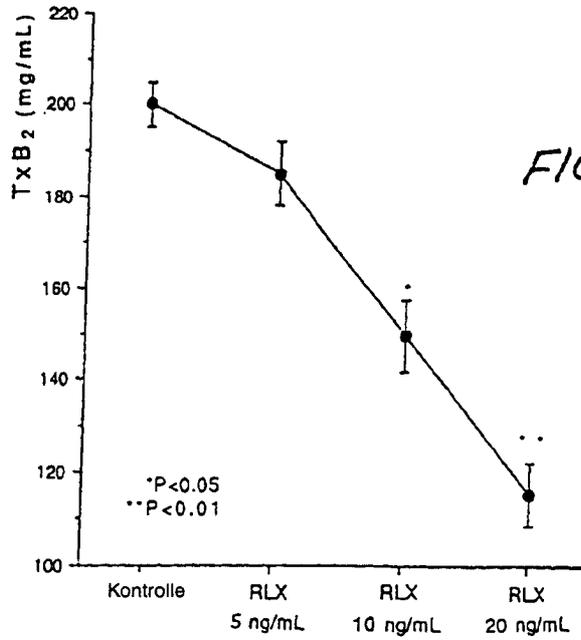


FIG. 7

Thrombin 5 u/mL

RLX - Hämostase
NO-Produktion (Kaninchen)

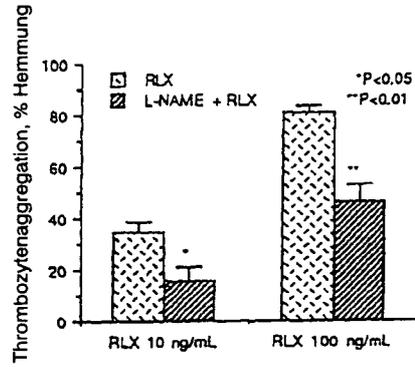


FIG. 8

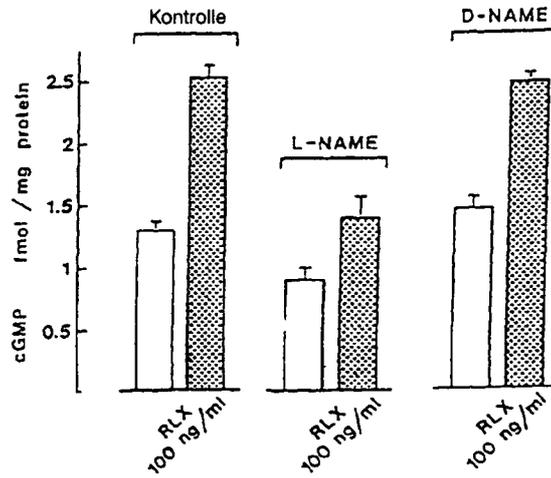


FIG. 9

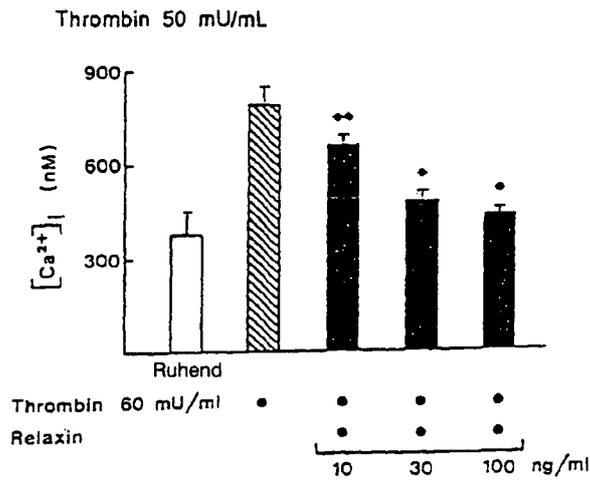


FIG. 10

* p<0.001, ** p<0.05

RLX - Hämostase
Plasmafaktoren (Ratte)

	<u>Kontrollen</u>	<u>RLX-behandelt</u>
Fibrinogen (mg/dl)	212±16	185±26
tPA Ag (ng/mL)	0.31±0.1	0.52±0.1
tPA Aktivität (U/mL)	0.12±0.01	0.37±0.03 * * *
PAI-1 Ag (mg/mL)	8.9±1	12.8±0.9 * *
PAI-1 Aktivität (U/mL)	8.16±1.3	11.7±0.7 *
PT (sec.)	14.4±0.5	15.1±0.5
aPTT(sec.)	19±0.8	19±2.5
F 1+2 (nM/mL)	0.034±0.01	0.028±0.01

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

Tabelle I