



(10) **DE 10 2019 003 442 A1** 2020.11.19

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2019 003 442.2**

(22) Anmeldetag: **15.05.2019**

(43) Offenlegungstag: **19.11.2020**

(51) Int Cl.: **A61K 31/7042 (2006.01)**

**A61K 31/702 (2006.01)**

**A61K 31/7032 (2006.01)**

**A61K 31/7048 (2006.01)**

**A61K 31/736 (2006.01)**

**A61P 39/02 (2006.01)**

**A61K 31/7016 (2006.01)**

**A61P 1/12 (2006.01)**

(71) Anmelder:

**Ilma biochem GmbH, 29633 Munster, DE**

(72) Erfinder:

**Holtkamp, Katharina, 49661 Cloppenburg, DE**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **Verwendung von niedermolekularen glykosidisch gebundenen endständigen Galactosiden und Fucosiden zur Bindung von als Galectin wirkenden Toxinen im Rahmen der Behandlung von Vergiftungen, insbesondere bei Vergiftungen mit Ricin**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beinhaltet die Verwendung von niedermolekularen glykosidischen Verbindungen mit endständiger D-Galactose und L-Fucose im Rahmen der Behandlung von Vergiftungen mit Ricin.

Die gefundenen Verbindungen gehen eine Lectinbindung mit der B-Kette des Ricin ein und verhindern dadurch die weitere Endozytose der Toxine. Die Anwendung soll möglichst zeitnah nach Inkorporation des Toxins erfolgen und kann auch prophylaktisch erfolgen.

Die an die D-Galactose und L-Fucose gebundenen Reste können weitere Saccharide (z.B. Fructose), Polyalkohole (z.B. Sorbitol), Diacyl-Glyceride oder Flavonoide (z.B. Quercetin) sein. Ebenso können Hydrolysate aus Galactose-Heteroglykanen wie Guar-Mehl verwendet werden.

Die genannten Verbindungen können bei oralen, pulmonalen und systemischen Vergiftungen verwendet werden. Hierzu sind entsprechende pharmazeutische Applikationsformen zu verwenden. Die Dosierung erfolgt in molarem Überschuss.

## Beschreibung

**[0001]** Ricin ist ein äußerst giftiger Eiweißstoff (Protein) aus den Samen des Wunderbaums (*Ricinus communis*). Chemisch besteht Ricin aus einer zellbindenden B-Kette und einer giftigkeitsvermittelnden A-Kette. Bei der B-Kette handelt es sich um ein sogenanntes Lectin, d.h. um eine Struktur, die sich an Glycopeptide anlagert. Das Ricin-Lectin gehört zur Gruppe der sogenannten Galectine, da es sich speziell an Galactose-Peptide von Zellmembranen anlagert und damit die Aufnahme des A-B-Toxin-Komplexes in das Zellinnere ermöglicht. Physiologisch im Körper vorkommende Galectine haben wichtige Aufgaben bei der Signaltransduktion, Wachstumsregulation und bei der Aufnahme von Stoffen in die Zelle.

**[0002]** Die eigentliche Giftwirkung des Rizins wird durch die A-Kette bewirkt: Nach Spaltung der beiden Ketten am Golgi-Apparat wirkt diese als N-Glykosid-Hydrolase am eukaryotischen Ribosom. Hier wird am sogenannten Sarcin-Ricin-Loop ein Adenin-Molekül abgespalten, was zum Funktionsverlust des Ribosoms führt. Eine einzelne Ricin-A-Kette kann dabei bis zu 1500 Ribosomen pro Minute katalytisch zerstören. Für eine tödliche Vergiftung eines erwachsenen Menschen genügen bereits 0,25 Milligramm isoliertes Ricin.

**[0003]** Weitere bekannte Toxine mit galaktosespezifischen Lectin-Ketten, die an Zelloberflächen zur Einleitung der Endozytose binden sind unter anderem Abrin aus der Paternostererbse (*Abrus precatorius*) (UniProtKB - P11140), Modeccin aus *Adenia digitata* (UniProtKB - Q6RUL6), Shiga-Toxin subunit B (UniProtKB - Q7BQ98), Shiga-like-Toxin 1 subunit B (UniProtKB - P69179) und Diphtherie-Toxin (UniProtKB - Q6KE85).

**[0004]** Erfolgversprechende Therapieoptionen bei einer Vergiftung mit Ricin bestehen nur vor der Inaktivierung von Ribosomen. Diese beginnt erst mit einer deutlichen Verzögerung gegenüber dem Zeitpunkt der Giftaufnahme, so dass hierfür ein ausreichendes Therapiefenster besteht. Allerdings treten die ersten Symptome bei Patienten auch erst nach Inaktivierung der Ribosomen auf, d. h. dass Patienten während dieses therapeutischen Fensters zunächst noch symptomfrei erscheinen und daher schwerer zu erkennen sind. Eine mögliche Therapie müsste weiterhin berücksichtigen, ob eine orale oder inhalative bzw. parenterale Giftaufnahme stattgefunden hat.

**[0005]** Es bestehen nur wenige spezifischen Therapieoptionen bei Vergiftungen mit Ricin. Zum Schutz vor einer Ricin-Vergiftung wurde eine aus einem modifizierten Antikörper gegen die A-Kette bestehende Vaccine entwickelt (Patent US9133253B2). Die Vaccine kann nur prophylaktisch für gefährdete Personen verwendet werden. Zur Behandlung einer akuten Vergiftung wurde weiterhin ein monoklonaler Antikörper gegen die A-Kette entwickelt (Patent US5626844A), welche aber nur im therapeutischen Fenster zwischen Aufnahme des Toxins und Endozytose wirksam ist. Das in Milch und Milchprodukten vorhandene Disaccharid Lactose kann ebenfalls eine Ricin-Vergiftung abmildern(1). Auch Epigallocatechin-Gallat hemmt *in vitro* die toxische Wirkung bei humanen Macrophagen-Zellen(2).

**[0006]** Bislang wurden nur wenige Forschungsarbeiten zur Affinitäts-Hemmung der Bindung der Ricin B-Kette an die Zellwand veröffentlicht(3). Einige der dabei eingesetzten Methoden sind mittlerweile als veraltet anzusehen(4). Umfangreiche wissenschaftliche Untersuchungen gibt es jedoch zur Hemmung von physiologisch im Menschen vorkommenden Galectinen: So wird die Wirkung eines von der Firma Galectin Therapeutics patentierten 1,4  $\beta$ -D-Galactomannan-Hydrolysats bei Darmkrebs beschrieben(5). Die untersuchte Substanz steht allerdings noch nicht als zugelassenes Arzneimittel zur Verfügung. Weiterhin wurde der Galectin-Hemmstoff N-(1-deoxy-D-lactulos-1-yl)-L-Leucin erfolgreich bei Brustkrebs-Metastasenbildung getestet(6), sowie modifiziertes Zitrus-Pectin (GCS-100) als Hemmstoff von Galectin-3 beschrieben(7,8). Eine Zusammenfassung des Forschungsstandes erfolgte 2013 durch Tellez-Sanz et al. Dabei werden insgesamt 36 Substanzen vorgestellt, zumeist Galactose- und Lactose-Derivate mit Aromaten(9).

**[0007]** Ebenso können Galectin 3-Inhibitoren bei der Nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH), bei Entzündungsreaktionen und bei Fibrosen eingesetzt werden. Hierfür wurden unterschiedliche Galactoside (Patente US20080089959A1 und SE0100172D0) und Hydrolysate aus Galactose-Heteroglykanen (Patent US9974802B2) entwickelt. Das Disaccharid Lactulose (4-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-fructofuranose) kann auch zur Verhinderung der Anlagerung von Rota-Viren an Zelloberflächen eingesetzt werden (Patent CA2520647A1).

**[0008]** Da bisher nicht bekannt ist, welches der bislang bekannten 14 physiologischen Galectine durch die B-Kette des Ricin imitiert wird, können diese Forschungsarbeiten zurzeit noch nicht abschließend bezüglich ihrer Bedeutung für die mögliche Behandlung von Ricin-Vergiftungen beurteilt werden. Aufgrund der beiden Galactose-Erkennungsregionen der B-Kette des Ricin könnte es sich aber um Galectin 4 handeln. Die überwiegend

als Galectin 3-Inhibitoren bisher identifizierten Verbindungen wurden in die Untersuchungen mit einbezogen. Zusätzlich wurden weitere Glucoside, Galactoside und Fucoside in die Untersuchungen aufgenommen.

**[0009]** Für die Quantifizierung der Inhibierung der Lectin-Bindung der B-Kette auf der Zelloberfläche wurde ein kommerziell verfügbarer Lateral Flow Assay verwendet. Der die Zelloberfläche imitierende Bindungspartner hierbei ist das spezifische Glycopeptid Asialofetuin. Dieses Modell in einer Mikrotiterplatten-Variante wurde bereits von Dawson et.al.(10) als hierfür geeignetes in-vitro-Testsystem bewertet.

**[0010]** Weiterhin wurden Cytotoxizitätstests mit Vero-Zelllinien durchgeführt. Die Zellen waren vergleichbar mit (11) empfindlich gegen Ricin und wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen von Ricin mit den zu untersuchenden Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Hierbei konnten die spezifischen Inhibitionskoeffizienten der einzelnen Verbindungen ermittelt werden.

**[0011]** Im Ergebnis der in-vitro-Untersuchungen ergaben sich die höchsten Inhibitionskoeffizienten für niedermolekulare Verbindungen mit in Position 1  $\beta$ -glykosidisch gebundener endständiger Pyrano-D-Galactose (CAS-Nr. 59-23-4) oder in Position 1  $\alpha$ -glykosidisch gebundener endständiger Pyrano-L-Fucose (CAS-Nr. 2438-80-4). Andere Zucker, Glucosamine, Sialinsäuren und Glucuronsäuren zeigten keine oder keine ausreichende Hemmwirkung. Ebenso zeigten die nicht in Position 1 gebundenen Varianten und die nicht endständigen Verbindungen der Galactose und Fucose keine ausreichende Hemmwirkung.

**[0012]** Die an D-Galactose oder L-Fucose unter der in [0011] beschriebenen Weise glykosidisch gebundenen Reste können sein:

- a. Monosaccharide, insbesondere mit dem jeweiligen Kohlenstoff 4 verbundene D-Fructose (Lactulose) und D-Mannose
- b. Disaccharide und Oligosaccharide, insbesondere mit Kohlenstoff 2' (2' Fucosyl-Lactose) oder 3 (3 Fucosyl-Lactose) verbundene Lactose
- c. Zuckeralkohole, insbesondere D(-)Sorbitol (Lactit)
- d. Diacylglyceride, insbesondere mit Position 3 verbundenes 1,2-diacyl-sn-Glycerol
- e. Flavonole, insbesondere Quercetin, verbunden mit Kohlenstoff 3 (Quercetingalactosid)
- f. Anthocyanen, insbesondere Cyanidin, verbunden mit Kohlenstoff 3 (Cyanidingalactosid)
- g. Flavanole, insbesondere (-)Epicatechin, verbunden mit Kohlenstoff 3 (Epicatechingalactosid).

Weiterhin zeigen durch saure Hydrolyse gewonnene Hydrolysate von Polysacchariden aus Galactose-Heteroglykanen (Arabinogalactane, Guarane, Carubin und Karaya) eine ausreichende Hemmwirkung.

**[0013]** Die Hemmwirkung der Verbindungen mit ausreichender Hemmwirkung folgt einer zehnerlogarithmischen Korrelation zwischen Hemmwirkung und eingesetzter Menge an hemmender Verbindung d.h. es sind große Überschüsse an hemmender Verbindung (bis zu zweimolare Lösungen) einzusetzen. Da es sich bei den unter [0012] genannten Verbindungen um Inhaltsstoffe von Lebensmitteln (z.B. Guarane), zugelassene Nahrungsergänzungsmittel (z.B. Quercetingalactosid) oder Lebensmittel-Zusatzstoffe (z.B. 2' Fucosyl-Lactose, Lactit) oder auch bereits etablierte Arzneistoffe (Lactulose) handelt ist eine Verwendung in höherer Konzentration möglich.

**[0014]** Das erfindungsgemäße Lösungsprinzip beinhaltet die Verwendung der unter [0012] genannten Verbindungen bei Vergiftungen mit Ricin oder den unter [0003] genannten weiteren Toxinen als Prophylaxe vor einer möglichen Inkorporation und möglichst rasch nach Erkennen einer Inkorporation. Eine ausreichende Hemmung des Galectins kann in den ersten 30 Minuten nach Inkorporation erreicht werden. Auch eine Anwendung beginnende erst bis zu 12 Stunden nach Inkorporation kann noch sinnvoll sein.

**[0015]** Das erfindungsgemäße Lösungsprinzip beinhaltet die Verwendung von oralen pharmazeutischen Zubereitungen (wässrige Lösungen, Kautabletten) der unter [0012] genannten Verbindungen zusammen mit erforderlichen Hilfsstoffen bei oralen Vergiftungen.

**[0016]** Das erfindungsgemäße Lösungsprinzip beinhaltet die Verwendung von pulmonalen pharmazeutischen Zubereitungen (Lungen-Sprays) der unter [0012] genannten Verbindungen zusammen mit erforderlichen Hilfsstoffen bei pulmonalen Vergiftungen. Hier eignet sich insbesondere das Disaccharid Lactulose, das bereits jetzt als Hilfsstoff (Feuchthaltemittel) in Asthma-Sprays zugelassen ist.

**[0017]** Das erfindungsgemäße Lösungsprinzip beinhaltet die Verwendung der unter [0012] genannten Verbindungen, die nach oraler Applikation enteral aufgenommen, aber nicht oder nur teilweise metabolisiert werden in oral applizierbaren pharmazeutischen Zubereitungen und in parenteral applizierbaren pharmazeutischen Zubereitungen bei Vergiftungen, bei denen die Toxine bereits das Blutgefäßsystem erreicht haben.

**[0018]** Ausführungsbeispiel für eine orale pharmazeutische Zubereitung nach [0015]:

100 g Guarmehl werden mit 900 ml 5%-iger Phosphorsäure 30 Minuten bei 80°C erhitzt und anschließend mit Natronlauge neutralisiert (pH 7,2).

Dosierung: Nach oraler Aufnahme des Toxins 200 ml einnehmen. Zur Prophylaxe vor oralen Vergiftungen 3 x täglich 50 ml einnehmen.

**[0019]** Ausführungsbeispiel für eine pulmonal zu applizierende pharmazeutische Zubereitung nach [0016]:

5%-ige Lösung von Lactulose in Aqua purificata, sterilfiltriert, abgefüllt in einer pulmonalen Applikationsform (Druckspray-Behälter).

Dosierung: Nach pulmonaler Aufnahme des Toxins 10 bis 20 Sprühstöße applizieren. Zur Prophylaxe stündlich 2 Sprühstöße applizieren.

**[0020]** Ausführungsbeispiel für eine orale pharmazeutische Zubereitung nach [0017]:

Tabletten mit 500 mg Quercetin-Galactosid/ Tablette

Dosierung: Bis zu 10 Tabletten einnehmen. Zur Prophylaxe 3 mal täglich 2 Tabletten einnehmen.

**[0021]** Ausführungsbeispiel für eine parenterale pharmazeutische Zubereitung nach [0017]:

5 %-ige Lösung von Lactulose in Aqua purificata wird sterilisiert und als Infusion abgefüllt.

Dosierung: 500 ml Infusionslösung innerhalb von 30 Minuten infundieren. Zur Prophylaxe mehrmals täglich 100 ml infundieren.

#### Patentzitate

Publication number	Priority date	Publication date	Assignee	Title
US9133253B2	2010-04-22	2013-11-07	US Secretary of Army	Ricin vaccine and methods of making thereof
US5626844A	1991-11-04	1997-05-06	US Secretary of Army	Monoclonal antibody against ricin A chain
US20080089959A1	2003-04-07	2008-04-17	La Jolla Pharmaceutical Co GlycoGenesys Inc •	Composition and uses of galectin antagonists
SE0100172D0	2001-01-22	2001-01-22	Worldwide applications	New inhibitors against galectins
CA2520647A1	2003-03-28	2004-11-04	Bristol Myers Squibb Co	Compositions containing lactulose for treating rotavirus infections
US9974802B2	2011-12-28	2017-07-20	Galectin Therapeutics Inc	Composition of novel carbohydrate drug for treatment of human diseases

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- US 9133253 B2 [0005, 0021]
- US 5626844 A [0005, 0021]
- US 20080089959 A1 [0007, 0021]
- US 9974802 B2 [0007, 0021]
- CA 2520647 A1 [0007, 0021]

**Patentansprüche**

1. Verwendung von chemischen Verbindungen mit
  - a. an Position 1  $\beta$ -glykosidisch gebundener endständiger Pyrano-D-Galactose (CAS-Nr. 59-23-4) oder
  - b. an Position 1  $\alpha$ -glykosidisch gebundener endständiger Pyrano-L-Fucose (CAS-Nr. 2438-80-4) zur Bindung an Galactosid-Erkennungsregionen von als Galectin wirkenden Toxinen im Rahmen der Behandlung von Vergiftungen.
  
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die an D-Galactose oder L-Fucose in der beschriebenen Weise glykosidisch gebundenen Reste ausgewählt sind aus der Gruppe der Saccharide, Zuckeralkohole und Diacyl-Glyceride die aus
  - a. Monosacchariden, insbesondere mit dem jeweiligen Kohlenstoff 4 verbundene D-Fructose und D-Mannose
  - b. Disacchariden und Oligosaccharide, insbesondere mit Kohlenstoff 2' oder 3 verbundene Lactose
  - c. Zuckeralkoholen, insbesondere D(-)Sorbitol
  - d. Diacylglyceriden, insbesondere mit Position 3 verbundenem 1,2-diacyl-sn-Glycerol gebildet wird.
  
3. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die an D-Galactose oder L-Fucose in der beschriebenen Weise glykosidisch gebundenen Reste ausgewählt sind aus der Gruppe der Flavonoide, die aus
  - a. Flavonolen, insbesondere Quercetin, verbunden mit Kohlenstoff 3
  - b. Anthocyanen, insbesondere Cyanidin, verbunden mit Kohlenstoff 3
  - c. Flavanolen, insbesondere (-)Epicatechin, verbunden mit Kohlenstoff 3 gebildet wird.
  
4. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass durch saure Hydrolyse gewonnene Hydrolysate von Polysacchariden ausgewählt sind aus der Gruppe der Galactose-Heteroglykane die aus Arabinogalactanen, Guaran, Carubin und Karaya gebildet wird.
  
5. Verwendung nach Anspruch 1 zur inhibierenden Bindung an Galactosid-Erkennungsregionen von als Galectin wirkenden Gruppe von Toxinen, die insbesondere aus den Toxinen Ricin (UniProt: P02879; CAS Nr. 9009-86-3), Abrin (UniProtKB - P11140), Modeccin (UniProtKB - Q6RUL6), Shiga-Toxin subunit B (UniProtKB - Q7BQ98), Shiga-like-Toxin 1 subunit B (UniProtKB - P69179) und Diphtherie-Toxin (UniProtKB - Q6KE85) gebildet wird.
  
6. Verwendung nach Anspruch 1 zur Verhinderung der galactosespezifischen Lectin-Bindung der in Anspruch 5 genannten Toxine an endständige N-Acetylgalactosaminreste oder 1,4-verknüpfte Galactoseeinheiten von Glycoproteinen und Glycolipiden der Zelloberfläche und der hierdurch ausgelösten Endozytose in die Zelle. Diese Endozytose ist Voraussetzung für die weitere toxische Wirkung der Toxine als Inhibitoren der ribosomalen Peptid-Biosynthese.
  
7. Verwendung nach Anspruch 1 zur Inhibierung der spezifischen Erkennungsregionen der Toxine bis zu 12 Stunden, vorzugsweise bis zu 30 Minuten nach Aufnahme der unter Anspruch 5 genannten Toxine zur Verhinderung der Endozytose sowie die prophylaktische Verwendung bei gefährdeten Personen.
  
8. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 2, 3 und 4 in oral applizierbaren pharmazeutischen Zubereitungen zur Bindung der Toxine im Gastrointestinaltrakt nach oraler Aufnahme der unter Anspruch 5 genannten Toxine.
  
9. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 2, 3 und 4 in pharmazeutischen Zubereitungen zur pulmonalen Applikation zur Bindung der unter Anspruch 5 genannten Toxine nach pulmonaler Aufnahme der unter Anspruch 5 genannten Toxine.
  
10. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 2, 3 und 4, die nach oraler Applikation enteral aufgenommen, aber nicht oder nur in Teilen metabolisiert werden in oral applizierbaren pharmazeutischen Zubereitungen und von Verbindungen nach Anspruch 2, 3 und 4 in parenteral applizierbaren pharmazeutischen Zubereitungen zur Bindung der unter Anspruch 5 genannten Toxine im Blutgefäßsystem.

Es folgen keine Zeichnungen