(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 058 T2** 2004.06.03

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 697 886 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 058.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE94/00454**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 916 460.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/026301**
(86) PCT-Anmeldetag: **16.05.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **24.11.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.02.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.08.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.06.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 38/02**
A61K 38/04, A61K 38/09, A61K 38/17, F16H 23/08

(30) Unionspriorität:
9301667 **14.05.1993** **SE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Neuronz Ltd., Auckland, NZ

(72) Erfinder:
BOURGUIGNON, J. P., B-4000 Liège, BE

(74) Vertreter:
Meissner, Bolte & Partner, 81679 München

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE PEPTIDANTAGONISTEN DER GLUTAMINSÄURE- UND NMDA-REZEPTOREN**

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

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung eines neuen Typs von Peptidantagonisten der Glutamatrezeptoren und einen Subtyp von Glutamatrezeptoren (NMDA (N-Methyl-D-aspartat)) für die Herstellung eines Medikaments, um die glutamatrezeptor- und die NMDA-rezeptorkontrollierten Zellen, wie Neuronen oder Gliazellen, in dem zentralen Nervensystem zu beeinflussen. Das Medikament umfasst Glutaminsäureterminationspeptide, wie (1–5)GnRH, (1–3)IGF-I, (1–37)GRF und das C-Peptid von Insulin. Das Medikament könnte verwendet werden für die Behandlung von hypoxischen, ischämischen und metabolischen Anfällen des zentralen Nervensystems, wie Schlaganfall, Blutruckerverringerung (Hypoglykämie), traumatischen, strahlungsinduzierten oder entzündlichen (inflammatorischen) Verletzungen sowie chronisch degenerativen Zuständen des Gehirns in erwachsenen oder kindlichen (pädiatrischen) Patienten.

Einleitung

[0002] Es ist bekannt, dass die Rezeptoren der neuroexzitatorischen Aminosäure Glutamat, insbesondere der N-Methyl-D-aspartat (NMDA) Subtyp des Rezeptors eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Funktion und dem Tod von Neuronen spielen (Mc Donald J W et al, Brain Research Reviews 1990, 15: 41–70 und Choi W, Neuron 1988, 1: 623–34).

[0003] Es ist ebenfalls bekannt, dass die Sekretion des Neuropeptids GnRH (Gonadotropin-Freisetzungshormon) von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren abhängig ist. Deshalb kann das GnRH-neurosekretorische System eine Art Bioassay für NMDA-Rezeptoraktivierung und -inhibierung liefern. Es kann Bezug genommen werden auf frühere Arbeiten in diesem Bereich (1–3).

[0004] Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) hat beachtliches Interesse als ein möglicher Regulator von neuronaler und Gliazellentwicklung und -funktion hervorgerufen (4). Jedoch ist der Mechanismus seines parakrinen Verhaltens im Gehirn nicht vollständig aufgeklärt. Darüber hinaus sind endokrine Wirkungen auf das Gehirn, die möglicherweise von dem altersabhängigen Anstieg von IGF-I (5) in den peripheren Serumkonzentrationen herrühren, noch mutmaßlich. Im fötalen Gehirn haben Sara et al die Anwesenheit einer N-terminal verkürzten und bioaktiven Form von IGF-I gezeigt (6). Dies führte diese Autoren dazu, zu spekulieren, dass Gehirn-IGF-I zu (4–70)IGF-I, das IGF-I Bioaktivität beibehält (7) und (1–3)IGF-I, das N-terminale Tripeptid, degradiert werden könnte.

[0005] Kürzlich haben Sara et al vorgeschlagen, dass (1–3)IGF-I die Acetylcholinfreisetzung aus kortikalen Stücken durch einen unbekannten Mechanismus modulieren könnte. Darüber hinaus haben diese Autoren vorgeschlagen, dass (1–3)IGF-I als ein Agonist auf NMDA-Rezeptoren wirken könnte, die in die Dopaminfreisetzung aus Streifenhügelstücken (engl.: striatal slices) involviert sind. Sie schlugen vor, dass IGF-I ein Vorläufer eines endogenen NMDA-Rezeptoragonisten sein könnte. Da wir früher gezeigt haben, dass NMDA-Rezeptoren in den Mechanismus der GnRH-Sekrektion (1, 2) involviert sind, mit Änderungen in Abhängigkeit des Alters und der Pubertät (3, 9), zielten wir darauf ab, die möglichen Wirkungen von IGF-I und seinen Subprodukten auf die GnRH-Sekretion aus rattenhypothalamatischen Explantaten verschiedener Altersstufen zu untersuchen. Darüber hinaus verglichen wir die Wirkungen der systemischen Anwendung dieser Peptide in vivo im Vergleich zu solchen, die nach ihrer lokalen Anwendung in vitro erhalten wurden.

Erfindung

[0006] In dem ersten Aspekt liefert die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Glutaminsäureterminationspeptides, das ein Glutamatrezeptorantagonist ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Wirkung von Glutamat auf glutamatrezeptorkontrollierten Zellen, wie in den Ansprüchen beschrieben ist. In dem zweiten Aspekt liefert die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Glutaminsäureterminationspeptides, das ein NMDA-Rezeptorantagonist ist, für die Herstellung eines Medikaments zur Beeinflussung von NMDA-rezeptorkontrollierten Zellen, wie in den Ansprüchen beschrieben ist. Vorzugsweise sind die Zellen Neuronen oder Gliazellen des zentralen Nervensystems. Das Medikament kann NMDA-rezeptorvermittelte exzitatorische Wirkungen verhindern, wie die Freisetzung eines Neurotransmitters oder Peptids und toxische Wirkungsantworten, die zur Zellbeschädigung oder dem Zelltod nach massivem Calciumeinstrom führen.

[0007] Daher betrifft die Erfindung ein Verfahren zur therapeutischen Beeinflussung der Sekretion, Funktion und dem Tod von Glutamat (NMDA)-rezeptorkontrollierten Zellen.

[0008] Das Medikament umfasst Glutaminsäureterminationspeptide, vorzugsweise ausgewählt unter (1–5)GnRH, (1–3)IGF-I, (1–37)GFR und dem C-Peptid von Insulin. Vorzugsweise umfasst das Medikament (1–3)IGF-I.

[0009] Für das Medikament wurde gezeigt, dass es die GnRH-Sekretion durch NMDA-Rezeptorantagonismus beeinflusst.

[0010] Das Medikament könnte für die Behandlung von Störungen verwendet werden, die mit einer übermä-

ßigen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren einhergehen, wie akuten oder chronischen Störungen des zentralen Nervensystems, hypoxischen, ischämischen und metabolischen Gehirnstörungen einschließlich Schlaganfall und Blutruckerverringerung, traumatischen, strahlungsinduzierten oder entzündlichen Verletzungen des Gehirns und chronisch degenerativen Zustände. Der Zusammenhang zwischen NMDA-Rezeptoren und hypoxischen, ischämischen und metabolischen Störungen ist z. B. offenbart in Simon RP et al, Science 1984, 226: 850–52, Wielocht, Science 1985, 230: 681–83, Mc Donald JW et al, Brain Research Reviews 1990, 15: 41–70, Choi W, Neuron 1988, 1: 623–34.

[0011] Die Behandlung von Kindern während der perinatalen Phase und im Kindesalter ist wichtig für die neuronale Entwicklung.

[0012] Das Medikament könnte systemisch oder lokal verabreicht werden.

[0013] Das Medikament sollte in einer therapeutischen Dosis gegeben werden.

[0014] Bevorzugte Dosen könnten im Bereich von 1 µg–10 mg/kg und vorzugsweise 5– 50 µg/kg liegen, wenn (1–3)IGF-I systemisch gegeben wird. Die Dosis könnte 0,1 µg bis 1 mg/kg betragen, wenn (1–3)IGF-I lokal gegeben wird.

[0015] Die weiter unten angegebenen Daten zeigen z. B., dass:

a) (1–3)IGF-I als ein NMDA-Rezeptorantagonist wirkt.

b) Diese Wirkung kann mit dem Vorläuferpeptid IGF-I erzielt werden, was eine endogene Spaltung in das bioaktive Subprodukt anzeigt.

c) Dieser Mechanismus funktioniert nach in vivo Anwendung.

d) Die Beispiele, die sich auf (1–3)IGF-I, GnRH und (1–5)GnRH beziehen, sind Prototypen für einen allgemeineren Vorgang, der glu-terminale Subprodukte von Peptiden einschließt.

[0016] Die folgenden Figuren sind in die Beschreibung eingeschlossen:

[0017] **Fig.** 1: In-vitro-Wirkungen von IGF-I-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten nach 15, 25 und 50 Tagen.

[0018] **Fig.** 2: Ex-vivo-Wirkungen von IGF-I-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten nach 50 Tagen.

[0019] **Fig.** 3: Ex-vivo-Wirkungen von IGF-I-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten nach 15 und 50 Tagen.

[0020] **Fig.** 4: In-vitro-Wirkungen von IGF-I auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten nach 15 und 50 Tagen.

[0021] **Fig.** 5: In-vitro-Wirkungen von IGF-I und (1–3)IGF-I auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten in Gegenwart von Peptidaseinhibitoren.

[0022] **Fig.** 6: In-vitro-Wirkungen von GnRH-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten.

[0023] **Fig.** 7: In-vitro-Wirkungen von IGF-I, GRF- und Insulin-ähnlichen Peptiden auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten.

[0024] **Fig.** 8: In-vitro-Wirkungen von Glutaminsäuretermninationspeptiden auf GnRH-Sekretion, induziert durch NMA und Kainat aus hypothalamatischen Explantaten.

[0025] **Fig.** 9: Verschiebung von mit Tritium behandeltem Glutamat aus hypothalamatischer Membran durch verschiedene Verbindungen.

[0026] Wir haben die Hypothese untersucht, dass Glutaminsäureterminationsprodukte, die zu anderen als IGF-I-Peptidsystemen gehören, auch als Antagonisten der NMDA-Rezeptoren wirken können. Wir haben (1–5)GnRH untersucht, ein Peptid mit einer N-terminalen Glutaminsäure, das von der Degradation von GnRH im Hypothalamus stammt (10). Ein solches Peptid könnte in das inhibitorische Autofeedback von GnRH involviert sein, einem regulatorischen Vorgang, den wir früher beschrieben haben (11). Der Wachstumshormon-Freisetzungsfaktor (GRF) ist ein anderes hypothalamatisches Peptid, das möglicherweise unter der Kontrolle von NMDA-Rezeptoren steht, was durch die stimulatorische Wirkung von NMDA auf die GH-Sekretion nahegelegt wird (12). Wir haben hier (1–37)GRF untersucht, eine untergeordnete physiologische Form mit einer C-terminalen Glutaminsäure, die in menschlichem Plasma oder einigen Geweben identifiziert wurde (13). Um ein Peptidsystem außerhalb des Gehirns zu untersuchen, haben wir die Wirkung des C-Peptids von Insulin bewertet, einem Subprodukt von Insulin mit einer C-terminalen Glutaminsäure. Während der NMDA-Subtyp von Glutamatrezeptoren bisher nicht in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) lokalisiert worden war, ist es bemerkenswert, dass Glutaminsäuredecarboxylase kürzlich als ein Hauptantigen aus Bauchspeicheldrüseninseln charakterisiert worden war (14). Glutamatrezeptoren des AMPA-Subtyps wurden ebenfalls in der Bauchspeicheldrüse lokalisiert (Bertrand et al. Br. J. Pharmacol., 1992, 101: 354–9).

[0027] Die erfinderische Idee hinter der vorliegenden Patentanmeldung ist daher, dass es ein endogenes System von Peptidantagonisten an Glutamatrezeptoren gibt. Der NMDA-Rezeptor, der eine Subklasse von Glutamatrezeptoren vertritt, kann eine Basis liefern, um ihre therapeutische Verwendung in Betracht zu ziehen. Drei Faktoren sollten dabei in Betracht gezogen werden:

1. Verschiedene Peptide sind physiologisch im Körper als Glutaminsäureterminationssequenzen von Aminosäuren anwesend, welche die Subprodukte von anderen Peptiden sein können. Zieht man 4 Peptidsysteme in Betracht (GnRH, IGF-I, GRF, Proinsulin), gibt es physiologische Subprodukte, von denen wir zeigen, dass sie als Antagonisten an NMDA-Rezeptoren aktiv sind: (1–5)GnRH(1–5)GnRH, (1–3)IGF-I, (1–37)GRF und das C-Peptid von Insulin.
2. Der zweite Faktor, der in Betracht gezogen werden muss, ist die Herstellung von solchen Glutamatterminationspeptiden. Unter Verwendung von IGF-I und (1–3)IGF-I wird der Beweis geliefert, dass die endogenen Antagonisten nicht in jedem Alter gebildet werden können. Daher ist es entscheidend, zwischen dem Vorläuferpeptid und dem Antagonisten selbst für die therapeutische Verwendung auszuwählen, insbesondere in jüngeren Patienten wie verfrühten oder ausgereiften Neugeborenen. Basierend auf unseren experimentellen Daten ist es möglich, dass Neugeborene weniger oder keine Fähigkeit besitzen, solche Peptidantagonisten herzustellen, wenigstens für IGF-I.
3. Der dritte Faktor ist der mögliche endokrine Transport solcher Antagonisten in das bzw. zu dem Gehirn. Dies ist kritisch, weil ein physiologisches parakrines System als Basis für eine therapeutische Verwendung nach einem endokrinen Wirkmechanismus vorgeschlagen wird. Hier wird (1–3)IGF-I wieder zur Demonstration verwendet.

[0028] Die Herstellung von endogenen NMDA-Rezeptorantagonisten durch verschiedene Peptidsysteme ist neu, und die Daten, die (1–3)IGF-I verwenden, können als eine Anwendung der Entwicklungsaspekte und des endokrinen Wirkmechanismus verwendet werden.

Materialien und Methoden

[0029] Die hypothalamatischen Explantate von männlichen Wistar-Ratten wurden einzeln unter Verwendung eines statischen Inkubationssystems, das früher beschrieben wurde (1–3, 9), studiert. Das Gesamtinkubationsvolumen jeder Kammer (0,5 ml) wurde getestet und alle 7,5 min erneuert. Unter Verwendung dieser Fraktionen wurde der Radioimmunassay von GnRH durchgeführt, wie zuvor im Detail beschrieben (1, 2). Die Sekretion von GnRH wurde untersucht entweder in Abwesenheit jedes sekretionsfördernden Mittels oder während der 7,5 min Exposition gegenüber 5×10^{-5} M Veratridin, einem depolarisierenden Mittel, das den Na^+-Kanal öffnet, oder 5×10^{-2} M Kainat oder N-Methyl-D,L-aspartat (NMA), die Agonisten von verschiedenen Subtypen der Glutamatrezeptoren sind. Alle diese Produkte wurden von Sigma, St. Louis, MO, gekauft. Nach 25 und 50 Tagen wurde Veratridin wiederholt in 37,5-min-Intervallen verwendet. Nach 15 Tagen wurde Veratridin in 52,5-min-Intervallen verwendet, d. h. nach der Refraktärzeit, die durch das inhibitorische Autofeedback von GnRH hervorgerufen wird (11). Die sekretorische Antwort von GnRH wurde berechnet als die Differenz zwischen der Konzentration, die unmittelbar vor und während der Exposition gegenüber dem sekretionsfördernden Mittel gemessen wurde.

[0030] Wir haben die Wirkungen der in-vitro-Exposition gegenüber ansteigenden Konzentrationen von hIGF-I (Kabi-Pharmacia, Stockholm, Schweden) oder seinen zwei Subprodukten, (1–3)IGF-I (Peninsula, Merseyside, England) und (4–70)IGF-I (Gropep, Adelaide, Australien), untersucht. Wir haben außerdem die Wirkungen von anderen Peptiden untersucht. Die GnRH-Fragmente und -Analoge schlossen (1–5)GnRH(1–5)GnRH (UCB, Brüssel, Belgien), (2–10)GnRH (Sigma, St. Louis, MO, USA) und (1–9)GnRHa (D-TRP^6-PRO^9-N-Ethylamid GnRH), ein GnRH-Agonist, der freundlicherweise von Dr. J. Rivier (The Salk Institute, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt wurde, ein. Das Rinder-Proinsulin und seine Subprodukte schlossen das C-Peptid von Insulin und Insulin selbst (Novo-Nordisk, Kopenhagen, Dänemark) ein. Schließlich schlossen die GRF-ähnlichen Peptide (1– 43) Ratten GRF (Bachem, Bubendorf, Schweiz), (1–37) human-GRF (Peninsula, Merseyside, England) und (1–29) human-GRF (Kabi Pharmacia, Stockholm, Schweden), ein. AP-5 (DL-2-Amino-5-Phosphor-Baldriansäure, Sigma), ein selektiver Antagonist für NMDA-Rezeptoren und DNQX (6,7-Dinitro-chinoxalin-2,3-dion, Tocris Neuramin, Buckhurst Hill, Vereinigtes Königreich), ein selektiver Antagonist für Kainatrezeptoren, wurden ebenfalls verwendet. Die verschiedenen Peptide oder Antagonisten wurden für 15 min verwendet, d. h. die 7,5-min-Fraktion vor und während der Exposition gegenüber Veratridin. Wir haben ebenfalls die Wirkungen einer einzelnen s. c.-Injektion von IGF-I oder seiner Subprodukte in 15 oder 50 Tage alten Ratten untersucht. Anschließend wurden die Tiere geopfert und die hypothalamatischen Explantate 25 min nach der Injektion untersucht, dieser Zeitraum wird benötigt, um Plasmakonzentrationen von IGF-I zu erhalten, die ausreichend sind, um den Proteinmetabolismus zu beeinflussen (A. Skottner, persönliche Mitteilung). In diesem Zeitpunkt wurde das Serum für den IGF-I-Assay gesammelt unter Verwendung eines Verfahrens, das anderswo beschrieben ist (15), und Testosteron wurde ebenfalls gemessen unter Verwendung eines Standard RIA (Sorin Biomedica). Die Konzentration der untersuchten Substanzen, die zu 50 % Inhibition der GnRH-sekretorischen Antwort (IC_{50}) führten, wurde, wie früher beschrieben (3, 9), berechnet, und die Daten wurden durch Kovarianzanalyse verglichen. Das Auftreten von signifikanten GnRH-sekretorischen Pulsen wurde unter Verwendung des Pulsarprogramms (2, 3) bestimmt.

Ergebnisse

[0031] Legenden, Ergebnisse und Kommentare zu den Figuren:

Fig. 1:

In-vitro-Wirkungen von IGF-I-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten nach 15, 25 und 50 Tagen.

[0032] Die GnRH-sekretorische Antwort auf depolarisierte Episoden (Veratridin 50 µM für 7,5 min) wurde wiederholt untersucht nach Intervallen von 52,5 min nach 15 Tagen oder 37,5 min nach 25 und 50 Tagen. Solche Untersuchungen wurden in Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an IGF-I und Subprodukten, (4– 70)IGF-I und (1–3)IGF-I, sowie AP-5, einem kompetitiven Antagonisten von NMDA-Rezeptoren, durchgeführt. Jedem Experiment ging voran und wurde gefolgt von einer Veratridin-Inkubation in Kontrollbedingungen.

[0033] Bei Verwendung von hypothalamatischen Explantaten, die nach 15, 25 oder 50 Tagen erhalten wurden, ändert sich die Sekretion von GnRH, die durch wiederholte Exposition gegenüber Veratridin in Kontrollbedingungen ausgelöst wird, während des Experiments nicht (**Fig.** 1).

[0034] Wenn die Explantate in Gegenwart von IGF-I inkubiert werden, ist die Sekretion von GnRH nach 15 Tagen nicht beeinflusst, wohingegen eine dosisabhängige Inhibition nach 25 und 50 Tagen beobachet wird. Die Sensitivität gegenüber dieser inhibitorischen Wirkung ist größer nach 50 Tagen als nach 25 Tagen, wie durch die IC_{50} von IGF-I gezeigt wird, die jeweils 2×10^{-13} und 8×10^{-10} M beträgt ($p < 0{,}001$). In den 3 untersuchten Altersstufen führt (4–70)IGF-I zu keiner Wirkung auf die GnRH-Sekretion. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation des Explantats mit (1–3)IGF-I zu einer dosisabhängigen Inhibation der GnRH-Sekretion. Nach 25 und 50 Tagen ist die IC_{50} von (1–3)IGF-I (jeweils 4×10^{-9} und 3×10^{-13} M) ähnlich jener, die erhalten wird, wenn IGF-I verwendet wird. Nach 15 Tagen sind die Explantate hochsensitiv gegenüber der inhibitorischen Wirkung von (1–3)IGF-I (IC_{50}: 1×10^{-13} M), wohingegen sie durch IGF-I nicht beeinflusst werden. Nach 15, 25 und 50 Tagen führt AP-5 zu einer dosisabhängigen Unterdrückung der GnRH-Sekretion (IC_{50}: jeweils 2×10^{-13}, 1×10^{-9} und 1×10^{-11} M), was die inhibitorischen Wirkungen von (1–3)IGF-I widerspiegelt.

[0035] Wie in Tabelle 1 gezeigt, ändert (1–3)IGF-I (10^{-10} bis 10^{-6} M) bei Verwendung von 50-Tage-alten Explantaten nicht die kainatinduzierte GnRH-Sekretion, wohingegen eine dosisabhängige Inhibition der NMA-induzierten GnRH-Sekretion beobachtet wird. Bemerkenswert ist, dass, wegen der kompetitiven Natur der Antagonismen an den NMDA-Rezeptoren, 10^{-6} M von (1–3)IGF-I benötigt werden, um die NMA-induzierte Sekretion von GnRH zu unterdrücken, wohingegen 10^{-10} M des Tripeptids ausreichend ist, um die Veratridin-induzierte Sekretion von GnRH zu unterdrücken. Diese 10^{-10} M Konzentration von (1–3)IGF-I kann nur zu einer teilweisen Inhibition der GnRH-sekretorischen Antwort auf Veratridin führen, wenn sie in Anwesenheit von NMA in einer Konzentration (5×10^{-4} M), die per se keine Wirkungen besitzt (Tabelle 1), untersucht wird.

Tabelle 1. In-vitro-Wirkungen von (1–3)IGF-I und N-Methyl-D,L-aspartat (NMA) auf GnRH-Sekretion in hypothalamatischen Explantaten von 50-Tage-alten männlichen Ratten

Sekretionsförderndes Mittel	**Kontrollen**	**+ (1-3)IGF-I**				**+ NMA**	**+ NMA**
						5×10^{-4} M	**5×10^{-4} M +(1-3)IGF-I**
		10^{-10} M	**10^{-8} M**	**10^{-7} M**	**10^{-6} M**		**10^{-10} M**
Kainat 5×10^{-2} M	100 ± 6	-	114 ± 14	107 ± 10	95 ± 12	-	-
NMA 5×10^{-2} M	100 ± 7	93[b] ± 12	73 ± 3	43 ± 6	14 ± 4		
Veratridin 5×10^{-5} M	100 ± 7	11[a] ± 7	-	-	-	98 ± 4	55[c] ± 3

[0036] Die Daten sind % der Kontrollen, durchschnittlich ± SEM (n = 6)

b gegenüber a: $p < 0{,}001$, c gegenüber a: $p < 0{,}001$

Fig. 2:

Ex-vivo-Wirkungen von IGF-I-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in rattenhypothalamatischen Explantaten nach 50 Tagen.

[0037] Die durchschnittliche ± SEM Zunahme an GnRH-Sekretion, die durch Veratridin (5×10^{-5} M für 7,5 min) induziert wurde, wurde wiederholt nach 30-min-Intervallen untersucht. Die Untersuchung der hypothalamatischen Explantate von 50-Tage-alten männlichen Ratten (n = 6 in jeder Gruppe) begann 25 min nach der in vivo s. c.-Injektion von physiologischer Salzlösung (Träger) oder verschiedenen Dosierungen von IGF-I oder 0,1 mg/kg (4–70)IGF-I oder 0,004 mg/kg (1–3)IGF-I, das äquimolar zu 0,1 mg/kg IGF-I ist.
[0038] Nach einer einzigen s. c.-Injektion von 0,5 mg/kg IGF-I in 50-Tage-alte Tiere wird die in vitro Sekretion von GnRH als Antwort auf Veratridin für bis zu 167,5 min (**Fig.** 2) merklich inhibiert. IGF-I-Konzentrationen von 0,05–0,2 mg/kg führen zu einer Unterdrückung der GnRH-sekretorischen Antwort gegenüber Veratridin für einen Zeitraum von 47,5– 107,5 min, was direkt mit der Dosis des verwendeten IGF-I in Verbindung steht. Danach wird die sekretorische Antwort von GnRH progressiv zurückgewonnen. Die durchschnittliche (± SEM) Serumkonzentration von IGF-I, die nach 25 min nach der Injektion von 0, 0,05, 0,1, 0,2 und 0,5 mg/kg IGF-I erhalten wird, beträgt jeweils 799 ± 87, 948 ± 76, 1054 ± 115, 1215 ± 50 und 1740 ± 28 ng/ml. Daher bewirkt die IGF-I-Injektion jeweils einen Anstieg von 19, 32, 52 und 118 % der Serum-IGF-I-Konzentration. Die durchschnittliche Serumtestosteronkonzentration ist nicht signifikant unterschiedlich in den Ratten, die mit dem Träger (2,5 ± 1,5 ng/ml) oder mit 0,1 mg/kg IGF-I (2,6 ± 1,7 ng/ml) injiziert wurden. Es wurde keine Wirkung beobachtet nach der Injektion von 0,1 mg/kg (4–70)IGF-I, wohingegen 0,004 mg/kg (1–3)IGF-I zur Inhibierung der GnRH-Antwort gegenüber Veratridin (**Fig.** 2) führt. Diese Inhibition ist ähnlich jener, die beobachtet wird, wenn 0,1 mg/kg IGF-I, einer äquivalenten Dosis auf einer molaren Basis, verwendet werden. Darüber hinaus wird die spontane pulsative Sekretion von GnRH aus hypothalamatischen Explantaten von 50-Tage-alten Ratten für nahezu zwei Stunden nach der s. c.-Injektion von 0,1 mg/kg IGF-I (Daten nicht gezeigt) aufgehoben. Dieser Zeitraum der Inhibition stimmt überein mit den Wirkungen derselben Dosis auf die Sekretion, die durch Veratridin induziert wird.

Fig. 3:

Ex-vivo-Wirkungen von IGF-I-ähnlichen Peptiden auf GnRH-Sekretion in rattenhypothalamatischen Explantaten nach 15 und 50 Tagen.

[0039] Die durchschnittliche ± SEM Zunahme an GnRH-Sekretion, induziert durch Veratridin (5×10^{-5} M für 7,5 min) wurde wiederholt untersucht unter Verwendung von Explantaten, die nach 15 und 50 Tagen erhalten wurden. Das experimentelle Protokoll ist dasselbe wie in **Fig.** 2 gezeigt. Die Untersuchung der hypothalamatischen Explantate von 50-Tagealten männlichen Ratten (n = 6 in jeder Gruppe) begann 25 min nach der in vivo s. c.-Injektion von physiologischer Salzlösung (Träger) oder verschiedenen Dosen von IGF-I oder (1–3)IGF-I. Die Daten, die nach 15 Tagen erhalten wurden, stehen in Gegensatz zu jenen, die nach 50 Tagen erhalten wurden, und zeigen, dass IGF-I nur wirksam nach 50 Tagen ist, trotz der Verwendung von höheren Dosen nach 15 Tagen. Im Gegensatz dazu ist (1–3)IGF-I in beiden Altersgruppen wirksam. Die 50-Tage-Daten sind in **Fig.** 2 gezeigt, aber hier sind sie vergleichend mit jenen, die nach 15 Tagen erhalten wurden, gezeigt.

Fig. 4:

In-vitro-Wirkungen von IGF-I auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten nach 15 und 50 Tagen.

[0040] Das experimentelle Verfahren ist dasselbe wie in **Fig.** 1. Es wurden Explantate von 15- und 50-Tage-alten Ratten verwendet. Die Figur zeigt, dass bei Verwendung von sehr hohen Konzentrationen von IGF-I, die 10^{-4} und 10^{-3} M erreichen, es am Ende möglich ist, eine Inhibition der GnRH-Sekretion nach 15 Tagen zu erreichen. Dies legt nahe, dass es einen Mechanismus gibt, der die IGF-I-Degradation zu (1–3)IGF-I nach 15 Tagen limitiert. Die Figur stellt die Tatsache dar, dass IGF-I nicht zu einem NMDA-Rezeptorantagonismus der unreifen Ratte nach 15 Tagen führt, solange keine ausreichend hohen Konzentrationen verwendet werden. Die Daten bestätigen die Notwendigkeit, (1–3)IGF-I als NMDA-Antagonist in den unreifen Tieren zu verwenden.

Fig. 5:

In-vitro-Wirkungen von IGF-I und (1–3)IGF-I auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten in Gegenwart von Peptidaseinhibitoren.

[0041] Das experimentelle Verfahren ist dasselbe wie in **Fig.** 1. Drei verschiedene Inhibitoren wurden verwendet. Wenn sie einzeln verwendet werden, beeinflussen sie nicht die GnRH-sekretorische Antwort auf Veratridin. Während (1–3)IGF-I (10^{-10} M) zur Unterdrückung der GnRH-Sekretion führt, wird die Wirkung durch die Peptidaseinhibitoren verhindert, was zeigt, dass IGF-I degradiert werden muss, um die inhibitorische Wirkung zu verursachen.
[0042] Die unterdrückende Wirkung von (1–3)IGF-I auf die GnRH-Sekretion wird durch den Peptidaseinhibitor nicht verhindert.
[0043] Daher kann die inhibitorische Wirkung von IGF-I durch drei verschiedene Peptidaseinhibitoren verhindert werden, welche die Inhibition der GnRH-Sekretion durch (1–3)IGF-I nicht beeinflussen. Somit wird die Notwendigkeit von IGF-I, in (1–3)IGF-I degradiert zu werden, um die Inhibition der GnRH-Sekretion zu bewirken, gezeigt.

Fig. 6:

In-vitro-Wirkungen von GnRH-ähnlichen Peptiden auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten nach 15 und 50 Tagen.

[0044] Die linke Darstellung zeigt representative Profile der GnRH-Sekretion in einzelnen Explantaten von 50-Tage-alten männlichen Ratten. In Kontrollbedingungen wird eine Depolarisation unter Verwendung von Veratridin alle 37,5 min durchgeführt. In den experimentellen Bedingungen wird dies in Gegenwart von verschiedenen Substanzen einschließlich des kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten AP-5, den Subprodukten (1–5) und (2–10)GnRH und dem Superagonist (1–9)GnRHa wiederholt. Es ist zu beachten, dass die verwendeten Konzentrationen für den (1–9)GnRHa-Agonist größer sind.
[0045] Die rechte Darstellung zeigt die GnRH-sekretorische Antwort auf Veratridin (Durchschnittsdaten von 6 einzelnen Explantaten) gegenüber verschiedenen Konzentrationen der GnRH-ähnlichen Peptide oder dem Antagonisten AP-5. Hier sind die Daten als Prozentsatz der anfänglichen GnRH-sekretorischen Antwort, die in Kontrollbedingungen erhalten wurde, ausgedrückt. Wie in **Fig.** 6 gezeigt, wird die Veratridin-induzierte Sekretion von GnRH durch (1–5)GnRH(1–5)GnRH in einer dosisabhängigen Weise inhibiert, die der Wirkung von AP-5 gleicht. Bei Verwendung anderer Glutaminsäureterminationsfragmente von GnRH, wie (1–2)GnRH und (1–6)GnRH, wird eine ähnliche inhibitorische Wirkung erhalten (Daten nicht gezeigt). Bei Verwendung des Superagonisten von GnRH, (1–9)GnRHa, kann die GnRH-Sekretion ebenfalls inhibiert werden, obwohl die IC_{50} (2×10^{-10} M) signifikant höher ist als jene, die beobachtet wird, wenn (1–5)GnRH(1–5)GnRH (5×10^{-13} M) verwendet wird. Dieser Unterschied könnte mit der relativ reduzierten Degradationsrate des Superagonisten gegenüber dem nativen Decapeptid GnRH in Verbindung stehen.

Fig. 7:

In-vitro-Wirkungen von IGF-I, GRF und Insulin-ähnlichen Peptiden auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten.

[0046] Das experimentelle Verfahren ist dasselbe wie in **Fig.** 6. Explantate von 50-Tage-alten Ratten wurden verwendet. Verschiedene Peptide und ihre Subprodukte wurden verwendet. Die (1–37)- und (1–29)-Subprodukte von GRF, die wir verwendet haben, waren die humane Sequenz, die nicht merklich verschieden ist von der Rattensequenz. Im Gegensatz dazu war die Gesamt-(1–43)-Sequenz das Ratten-GRF, weil humanes GRF am C-Terminus sehr verschieden ist. Rinder-Proinsulin, Insulin und das C-Peptid von Insulin wurden ebenfalls untersucht.
[0047] (1–43)GRF und das Glutaminsäureterminationssubprodukt (1–37)GRF führen zu einer dosisabhängigen Inhibierung der Sekretion von GnRH (**Fig.** 7). Diese Wirkung scheint nicht abhängig zu sein von der GH-Freisetrungsaktivität dieser Peptide, weil (1–29)GRF die GnRH-Sekretion nicht beeinflusst, wohingegen dieses Peptid die GH-Freisetrungsaktivität behalten hat. Proinsulin und das C-Peptid von Insulin, das eine terminale Glutaminsäure besitzt, sind ebenfalls zu einer dosisabhängigen Unterdrückung der GnRH-Sekretion in der Lage. Im Gegensatz dazu besitzt das hoch bioaktive Peptid Insulin keine Wirkungen. Wie bereits für IGF-I diskutiert wurde, ist es möglich, dass die inhibitorischen Wirkungen von (1–43)GRF und Proinsulin von der endogenen Degradation dieser Peptide in ihre Glutaminsäureterminationssubprodukte abhängt.

Fig. 8:

In-vitro-Wirkungen von Glutaminsäureterminationspeptiden auf die Sekretion von GnRH, induziert durch NMA und Kainat aus hypothalamatischen Explantaten.

[0048] Die GnRH-sekretorische Antwort, induziert durch die 7,5 min Exposition gegenüber NMA (obere Darstellung) oder Kainat (untere Darstellung) wurde unter Verwendung von Explantaten von 50-Tage-alten männlichen Ratten untersucht. Diese Untersuchung wurde in Gegenwart von Glutaminsäureterminationssubprodukten von verschiedenen Peptiden und in Gegenwart von AP-5 und DNQX, die jeweils selektive Antagonisten für NMDA- und Kainat-Rezeptoren sind, durchgeführt. Alle diese Substanzen wurden in einer 10^{-6} M Konzentration verwendet.
[0049] Wie in **Fig.** 8 gezeigt, führen die Glutaminsäureterminationspeptide, die zu den verschiedenen untersuchten Systemen gehören, zu einer merklichen Inhibierung der NMA-induzierten Sekretion von GnRH, wohingegen die kainatinduzierte Sekretion von GnRH nicht beeinflusst wird. Die Beteiligung der NMDA-Rezeptoren, aber nicht der Kainat-Rezeptoren, wird weiterhin gezeigt durch die inhibitorischen Wirkungen, die erhalten werden, wenn selektive Antagonisten, jeweils AP-5 und DNQX, verwendet werden (**Fig.** 8).

Fig. 9:

Verschiebung von mit Tritium behandeltem Glutamat von der hypothalamatischen Membran durch verschiedene Verbindungen.

[0050] Hypothalamatische Membranpräparationen wurden verwendet, um die Verschiebung der Bindung von mit Tritium behandeltem Glutamat in Gegenwart von verschiedenen Verbindungen zu untersuchen. Glutamat besitzt die Fähigkeit, die Bindung des Tracers in relativ niedrigen 10^{-6} bis 10^{-8} Konzentrationen zu verschieben. IGF-I, (1–3)IGF-I und (1– 5)GnRH wirken als Kompetitoren der Glutamatbindung an hypothalamatischen Membranen. Während hohe Konzentrationen dieser Verbindungen benötigt werden, ist es bemerkenswert, dass noch höhere Konzentrationen von NMA oder AP-5 benötigt werden, um eine Verschiebung der Bindung von mit Tritium behandeltem Glutamat zu erreichen. Dies liegt daran, dass die Affinität von mit Tritium behandeltem Glutamat zu den NMDA-Rezeptoren geringer ist als für andere Subtypen der Glutamatrezeptoren.
[0051] Wir haben außerdem die Wirkungen von 10^{-12} M bis 10^{-9} M β-Endorphin und TRH, die kein Terminationsglutamat zeigen, untersucht. Beide Peptide führen zu einer 40 bis 60 % Inhibierung der Veratridin-induzierten Sekretion von GnRH, wobei in einem vorläufigen Experiment nicht gefunden wurde, dass diese Wirkung dosisabhängig ist. Deshalb könnte das hier entwickelte Konzept auf andere Glutaminsäureterminationspeptide ausgedehnt werden.
[0052] Vorläufige Daten, die erhalten wurden unter Verwendung von Patch-clamp-Untersuchungen von Hippocampusneuronen, zeigen, dass verschiedene Subtypen von Glutamatrezeptoren einschließlich NMDA- und Kainat-Rezeptoren durch (1–3)IGF-I antagonisiert werden könnten.

Diskussion

[0053] Wir haben somit gezeigt, dass IGF-I eine inhibitorische Wirkung auf die Sekretion von GnRH bedingt. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Wirkung durch die klassischen IGF-I-Rezeptoren vermittelt wird, weil die Sekretion von GnRH durch (4–70)IGF-I, einem hoch bioaktiven Agonisten an IGF-I-Rezeptoren, nicht beeinflusst wird (7). Deshalb wird angenommen, dass das N-terminate Tripeptid, (1–3)IGF-I, die inhibitorischen Wirkungen von IGF-I auf die Sekretion von GnRH vermitteln könnte. Diese Hypothese wird gestützt durch die gleiche Stärke der inhibitorischen Wirkungen von IGF-I und (1–3)IGF-I nach 25 und 50 Tagen. Darüber hinaus zeigen die Notwendigkeit von sehr hohen Konzentrationen von IGF-I nach 15 Tagen während sein (1–3)-Subprodukt merklich inhibitorisch in dieser Altersstufe ist, und die Wirkung von Peptidaseinhibitoren, dass die inhibitorischen Wirkungen von IGF-I seine Degradation zu (1–3)IGF-I benötigen, ein Mechanismus, der nach 15 Tagen noch nicht funktionieren könnte. Es ist wahrscheinlicher, dass (1–3)IGF-I aus enzymatischer Degradation von IGF-I stammt, als aus einem getrennten Biosynthesevorgang. Untersuchungen an cDNA von IGF-I aus humanem fötalen Gehirn haben gezeigt, dass die aminoterminale Verkürzung von einer posttranskriptionalen Modifikation des Peptids (16) stammen sollte.
[0054] Für (1–3)IGF-I wurde früher vorgeschlagen, dass es als ein Agonist an den NMDA-Rezeptoren wirkt (8). Im Gegensatz dazu belegen unsere Daten die Aktivität von (1–3)IGF-I als Antagonist an NMDA-Rezeptoren. In unseren vorhergehenden Untersuchungen, in denen wir verschiedene Agonisten und Antagonisten von NMDA- und Kainat-Rezeptoren verwendet haben, haben wir gezeigt, dass korrekte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren eine Voraussetzung für die GnRH-sekretorischen Pulse ist, die entweder spontan oder als Antwort auf Veratridin auftritt (2, 3, 9). Hier zeigen wir, dass die durch NMA hervorgerufene Sekretion von GnRH durch

IGF-I beeinflusst wird, während die durch Kainat hervorgerufene Sekretion dies nicht wird. Die kompetitive Natur des Antagonismus von IGF-I an NMDA-Rezeptoren wird durch die relativ niedrige Sensitivität gegenüber IGF-I nach 25 Tagen nahegelegt, einer Zeit, die durch eine Spitzenaktivierung der NMDA-Rezeptoren, die an der Sekretion von GnRH beteiligt sind, charakterisiert ist (3, 9). Darüber hinaus ist IGF-I als ein Inhibitor weniger aktiv, wenn das Inkubationsmedium mit dem Agonist NMA angereichert ist. Darüber hinaus scheinen IGF-I und sein (1–3)Subprodukt Inhibitoren der GnRH-Sekretion, die ähnlich wirksam sind wie AP-5, einem spezifischen kompetitiven Antagonisten an NMDA-Rezeptoren. Schließlich wird die Glutamatbindung an hypathalamatische Membranpreparation durch verschiedene Peptidantagonisten verschoben.

[0055] Unsere Beobachtungen unterscheiden sich von jenen von Hiney et al, die berichteten, dass IGF-I die Sekretion von GnRH aus Handballen- bzw. Daumenballenexplantaten von weiblichen Ratten stimulierte (17). Ein solcher Unterschied kann nicht durch das Geschlecht erklärt werden, weil wir gefunden haben, dass die GnRH-Sekretion aus Explantaten von 30-Tage-alten weiblichen Ratten durch IGF-I inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung ist, dass Hiney et al die Handballen- bzw. Daumenballenenden von GnRH-Neuronen verwendet haben, in denen gezeigt wurde, dass die Kainat-Rezeptoren eine Hauptrolle spielen (18). Im Gegensatz dazu haben wir bei Verwendung eines größeren Stücks des Hypothalamus einschließlich des gebogenen Kerns (engl.: arcuate nucleus) gefunden, dass die NMDA-Rezeptoren kritisch sind für die GnRH-Sekretion (1–3, 9). Daher könnte die physiologische Signifikanz dieser Beobachtungen von der anatomischen Seite abhängen, an der IGF-I wirkt. Der parakrine Transport von IGF-I durch das Gehirn zu diesen Rezeptoren, die mit der GnRH-Neurosekretion verbunden sind, ist immer noch spekulativ. Alternativ dazu ist es vorstellbar, dass der Hypothalamus durch Veränderungen in der Plasmakonzentration von IGF-I durch einen endokrinen Mechanismus beeinflusst wird. Aus unseren Daten zu den akuten endokrinen Wirkungen zu IGF-I können wir nicht ableiten, dass die chronischen Variationen der Plasma-IGF-I-Konzentrationen ZNS-Funktionen modulieren. Eine chronische inhibitorische Wirkung von IGF-I auf die GnRH-Sekretion wird nicht erwartet, weil die männliche Pubertätsentwicklung zwischen 25 und 50 Tagen des Alters auftreten, während zirkulierendes IGF-I einen wichtigen Anstieg in demselben Zeitraum zeigt (5). Jedoch ist es auffallend, dass ein akuter Anstieg von nur 19 % der Serum-IGF-I-Konzentrationen zu einer zeitweiligen Unterdrückung der GnRH-Sekretion führen kann. Eine solche Wirkung kann nicht durch eine negative Feedbackwirkung einer ansteigenden Sekretion von Gonadensteroiden durch IGF-I erklärt werden, weil die Serumtestosteronmengen unverändert bleiben. Weil die spontane pulsative Sekretion von GnRH in vitro aktut durch IGF-I unterdrückt wird, ist es möglich, dass die pulsative Sekretion von LH (luteinisierendes Hormon) in vivo ebenfalls unterdrückt werden kann. Dies verdient weitere Untersuchungen, die für die therapeutische Verwendung von IGF-I von Bedeutung sein können.

[0056] Es ist bemerkenswert, dass IGF-I keinen Antagonismus von NMDA-Rezeptoren nach 15 Tagen des Alters bilden kann, einem Zeitraum, der durch eine große Menge von Rezeptoren exzitatorischer Aminosäure gekennzeichnet ist (19, 20). Darüber hinaus ist das Auftreten der IGF-I-inhibitorischen Wirkungen zwischen 15 und 25 Tagen gleichlaufend mit einer Verminderung in Zahl und Aktivität dieser Rezeptoren (19, 20). Es ist möglich, das GnRH-neurosekretorisches System und die assoziierten NMDA-Rezeptoren als ein Modell für die Interaktionen zwischen diesen Rezeptoren und IGF-I in dem gesamten ZNS zu betrachten. In diesem Umfeld ist von den NMDA-Rezeptoren bekannt, dass sie eine kritische Rolle in der Neurotoxizität spielen, einem Vorgang, der während des frühen postnatalen Lebens schwerer verläuft als in erwachsenen Tieren (21). In Übereinstimmung mit dem Konzept, das in diesem Beitrag vorgeschlagen wird, wurde kürzlich berichtet, dass IGF-I vor Gehirn-hypotoxischen-ischämischen Verletzungen schützen kann (22), wohingegen (4–70)IGF-I nicht zu einer solchen Wirkung führt (23). Deshalb kann vorgeschlagen werden, dass IGF-I eine kritische Rolle im ZNS als ein Vorläufer von (1–3)IGF-I, einem möglichen endogenen Antagonisten an den NMDA-Rezeptoren, spielt.

[0057] Das Konzept des NMDA-Rezeptorantagonismus durch Glutaminsäureterminationspeptide kann auf von IGF-I verschiedene Peptidsysteme ausgedehnt werden, weil die Subprodukte von GnRH, GRF und Proinsulin ähnliche Wirkungen bedingen. Dies legt nahe, dass jedes Peptid mit einer terminalen Glutaminsäure, die direkt aus der Biosynthese oder aus der Degradation von Vorläuferpeptiden entsteht, als ein Antagonist von Glutamatrezeptoren (NMDA-Subtyp) wirken könnte. In physiologischen Bedingungen sind diese Peptide wahrscheinlich an einer parakrinen oder autokrinen Wirkung an ihrer Stelle in der Biosynthese beteiligt. Sie können als inhibitorische Autoregulatoren ihrer Sekretion wirken, wenn dieser Vorgang von der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren abhängt. Ein solcher Mechanismus kann an dem Autofeedback von GnRH beteiligt sein, den wir früher beschrieben haben (11). Ein ähnlicher Mechanismus kann in der Kontrolle der GRF-Sekretion eine Rolle spielen. Wie bereits diskutiert, ist die mögliche physiologische Bedeutung von IGF-I-ähnlichen Peptiden unterschiedlich wegen der weit gestreuten Verteilung dieses Peptids und seiner relativ hohen Konzentrationen im peripheren Blut. Deshalb kann (1–3)IGF-I als ein ubiquitärer endogener Antagonist für Glutamatrezeptoren betrachtet werden, der aus parakriner oder endokriner Herstellung stammt. Schließlich ist es möglich, dass die Glutamatrezeptoren, denen eine gut bekannte Rolle im ZNS zukommt, eine Rolle in anderen Körperorganen, wie der Bauchspeicheldrüse, spielen, wo das C-Peptid von Insulin einen endogenen Antagonisten dieser Rezeptoren liefern kann.

Schlussfolgerung

[0058] Hier wurden die Wirkungen von IGF-I und seinen Subprodukten, (1–3)IGF-I und (4–70)IGF-I untersucht, entweder indem sie in vivo als eine einzelne s. c.-Injection gegeben oder in vitro auf die Sekretion von GnRH in hypothalamatischen Explantaten verwendet wurden. In den drei untersuchten Altersstufen (15, 25 und 50 Tage) zeigt (4– 70)IGF-I keine Wirkung. Nach 50 Tagen führte die in-vivo-Anwendung oder die in-vitro-Verwendung von IGF-I zu einer dosisabhängigen Inhibition der GnRH-Sekretion, die durch Veratridin, einem depolarisierenden Mittel, induziert wurde. Darüber hinaus wird die spontane pulsative Sekretion von GnRH in vitro transient nach der in-vivo-Anwendung von IGF-I unterdrückt. (1–3)IGF-I führt zu einer inhibitorischen Wirkung ähnlich jener von IGF-I. Nach 25 Tagen zeigen IGF-I und (1–3)IGF-I dieselben Wirkungen wie bei 50 Tagen, obwohl höhere Konzentrationen benötigt werden. Nach 15 Tagen zeigt IGF-I keine Wirkung, wohingegen eine starke Inhibierung der GnRH-Sekretion unter Verwendung von (1–3)IGF-I entweder in vivo oder in vitro beobachtet wird. Die Glutamatterminationssubprodukte von anderen Peptidsystemen wie (1–5)GnRH(1–5)GnRH, (1–37)GRF und das C-Peptid von Insulin führen zu inhibitorischen Wirkungen ähnlich jenen von (1–3)IGF-I. Diese Wirkungen laufen parallel zu jenen von AP-5, einem kompetitiven Antagonisten an NMDA-Rezeptoren. Darüber hinaus unterdrücken die untersuchten Peptide die GnRH-Sekretion, die durch NMA, aber nicht durch Kainat, induziert wird, und sie bewirken eine Verschiebung von mit Tritium behandeltem Glutamat aus hypothalamatischen Membranpräparationen. Diese Daten zeigen, dass Glutamatterminationssubprodukte aus verschiedenen Peptidsystemen eine Rolle als Antagonisten an NMDA-Rezeptoren spielen. Dies kann von einer lokalen parakrinen Wirkung herrühren. Eine endokrine Wirkung ist ebenfalls möglich, weil die akute systemische Anwendung von IGF-I zu einer Unterdrückung der GnRH-Sekretion führt, vermutlich durch einen kompetitiven Antagonismus an NMDA-Rezeptoren durch (1–3)IGF-I, das aus der IGF-I-Degradation stammt. Dieser Vorgang scheint sich zwischen 15 und 25 Tage des Alters zu entwickeln, was die Bedeutung von Entwicklungsaspekten zeigt.

Literaturhinweise

Bourguignon J P, Gerard A, Franchimont P: Direct activation of GnRH secretion through different receptors to neuroexzitatory amino acids. Neuroendocrinology 1989; 49: 402–408.

Bourguignon J P, Gerard A, Mathieu J, Simons J, Franchimont P: Pulsatile release of gonadotropin releasing hormone from hypothalamic explants is restrained by blockade of N-methyl-D,L-aspartate receptors. Endocrinology 1989; 125: 1090– 1096.

Bourguignon J P, Gerard A, Alvarez Gonzalez M L, Franchimont P: Neuroendocrine mechanism of onset of puberty: sequential reduction in activity of inhibitory and facilitatory N-Methyl-D-Aspartate receptors. J Clin Invest 1992; 90: 1736–1744.

Baskin D G, Wilcox B J, Figlewicz D P, Dorsa D M: Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. TINS 1988; 11: 107–111.

Handelsman D J, Spaliviero J A, Scott C D, Baxter R C: Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. Endocrinology 1987; 120: 491–496.

Sara V R, Carlsson-Skwirut C, Andersson C, Hall E, Sjögren B, Holmgren A, Jörnval N: Characterization of somatomedins from human fetal brain: identification of a variant form of insulin-like growth factor I. Proc. Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4904– 4907.

Szabo L, Mottershead D G, Balland F J, Wallace J C: The bovine insulin-like growth factor (IGF) binding protein purified from conditioned medium requires the N-terminal tripeptide in IGF-1 for binding. Biochem Biophys Res Commun 1988; 151: 207–214.

Sara V R, Carlsson-Skwirut C, Bergman T, Jörnvall H, Roberts P J, Crawford M, Hákansson L N, Civalero I, Nordberg A: Identification of gly-pro-glu (GPE), the aminoterminal tripeptide of insulin-like growth factor I which is truncated in brain, as a novel neuroactive peptide. Biochem Biophys Res Commun 1989; 165: 766–771.

Bourguignon J P, Gerard A, Alvarez Gonzalez M L, Fawe L, Franchimont P: Gonadal independent developmental changes in activation of N-methyl-D-aspartate receptors involved in gonadotropin-releasing hormone secretion. Neuroendocrinology 1992; 55: 634–641.

Carone F A, Stetler-Stevenson M A, May V, LaBarbera A, Flouret G: Differences between in vitro and in vivo degradation of LHRH by rat brain and other organs. Am J Physiol 1987; 253: E317–E321.

Bourguignon J P, Gerard A, Franchimont P: Maturation of the hypothalamic control of pulsatile gonadotropin-releasing hormone at onset of puberty. II. Reduced potency of an inhibitory autofeedback. Endocrinology 1990; 127: 2884–2890.

Mason G A, Bissette G, Nemeroff C B: Effects of excitotoxic amino acids on pituitary hormone secretion in the rat. Brain Res 1983; 289: 366–369.

Sasaki A, Sato S, Yumita S, Hanew K, Miura Y, Yoshinaga K: Multiple forms of immunoreactive Growth Hormone-Releasing Hormone in human plasma, hypothalamus and tumor tissues. J Clin Endocrinol Metab 1989;

68: 180–185.
Baekkeshov S, Aanstoot H J, Christgau S, Reetr A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen N, De-Camilli P, Camilli P D: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GAGA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. Nature 1990; 347: 151–156.
Bourguignon J P, Gerard A, Deby-Dupont G, Franchimont P: Effects of growth hormone therapy on the developmental changes of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I serum concentrations in Turner syndrome. Clin Endocrinol 1993, 39: 85–89.
Sandberg A C, Engberg C, Lake M, Van Holst N, Sara V R: The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. Neurosci Lett 1988; 93: 114–119.
Hiney J K, Ojeda S R, Lees Dees W: Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. Neuroendocrinology 1991; 54: 420–423.
Donoso A O, Lopez F J, Negro Vilar A: Glutamate receptors of the non N-methyl-D-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone-releasing hormone release by excitatory amino acids in vitro. Endocrinology 1990; 126: 414–420.
Nicoletti F, Iadarola M J, Wuroblewski J T, Costa E: Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with alpha-1-adrenoreceptors. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 1931–1935.
Hestrin S: Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. Nature (Lond.) 1992; 357: 686–689.
McDonald J W, Silverstein F S, Johnston M V: Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. Brain Res 1988; 459: 200–203.
Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragernow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K: A role for IGF-I in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. Biochem Biophys Res Commun 1992; 182: 593– 599.
Gluckman P D, Guan), Williams C, Bielharz E, Sirimanne E, Klempt N: The role of insulin-like growth factor-I (IGF-1) incentral neuronal rescue in "The role of insulin-like growth factors in the nervous system". Arlington, Virginia, November 1992, p18 (abstr.).

Patentansprüche

1. Verwendung eines Glutaminsäureterminationspeptides, das ein Glutamatrezeptorantagonist ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Wirkung von Glutamat auf glutamatrezeptorkontrollierten Zellen, wobei das Medikament zur Behandlung einer akuten oder chronischen Störung des zentralen Nervensystems, einer hypoxischen, ischämischen oder metabolischen Störung des Gehirns, eines Schlaganfalls, einer Hypoglycämie, einer traumatischen, strahlungsinduzierten oder entzündlichen Verletzung des Gehirns, eines chronisch degenerativen Zustandes oder zur Behandlung eines Kindes während der perinatalen Phase und dem Kindesalter dient.

2. Verwendung eines Glutaminsäureterminationspeptides, das ein NMDA-Rezeptorantagonist ist, zur Herstellung eines Medikamentes zur Beeinflussung von NMDA-Rezeptor kontrollierten Zellen, wobei das Medikament zur Behandlung einer akuten oder chronischen Störung des zentralen Nervensystems, einer hypoxischen, ischämischen oder metabolischen Störung des Gehirns, eines Schlaganfalls, einer Hypoglycämie, einer traumatischen, strahlungsinduzierten oder inflammatorischen Verletzung des Gehirns, eines chronischen degenerativen Zustandes oder zur Behandlung von Kindern während der perinatalen Phase und im Kindesalter dient.

3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Medikament zur Prävention von exzitatorischen Wirkungen dient, die durch den NMDA-Rezeptor vermittelt werden.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die exzitatorischen Wirkungen, die durch den NMDA-Rezeptor vermittelt werden, in einem Freisetzen von Neurotransmittern oder Peptid bestehen, oder in toxischen Wirkungen, die zur Beschädigung oder zum Tod von Zellen führen.

5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zellen Neuronen oder Glialzellen im zentralen Nervensystem sind.

6. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Antagonist aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus (1–5)GnRH(1–5)GnRH, (1–37)GRF und dem C-Peptid von Insulin besteht.

7. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Medikament zur Beeinflussung der Sekretion von GnRH dient.

8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Medikament (1–3)IGF-I umfasst.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur Behandlung von akuten oder chronischen Störungen des zentralen Nervensystems dient.

10. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur Behandlung von hypoxischen, ischämischen oder metabolischen Gehirnstörungen dient.

11. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur Behandlung eines Schlaganfalls oder einer Hypoglycämie dient.

12. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur Behandlung von traumatischen, strahlungsinduzierten oder inflammatorischen Verletzungen des Gehirns dient.

13. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur Behandlung eines chronischen degenerativen Zustandes dient.

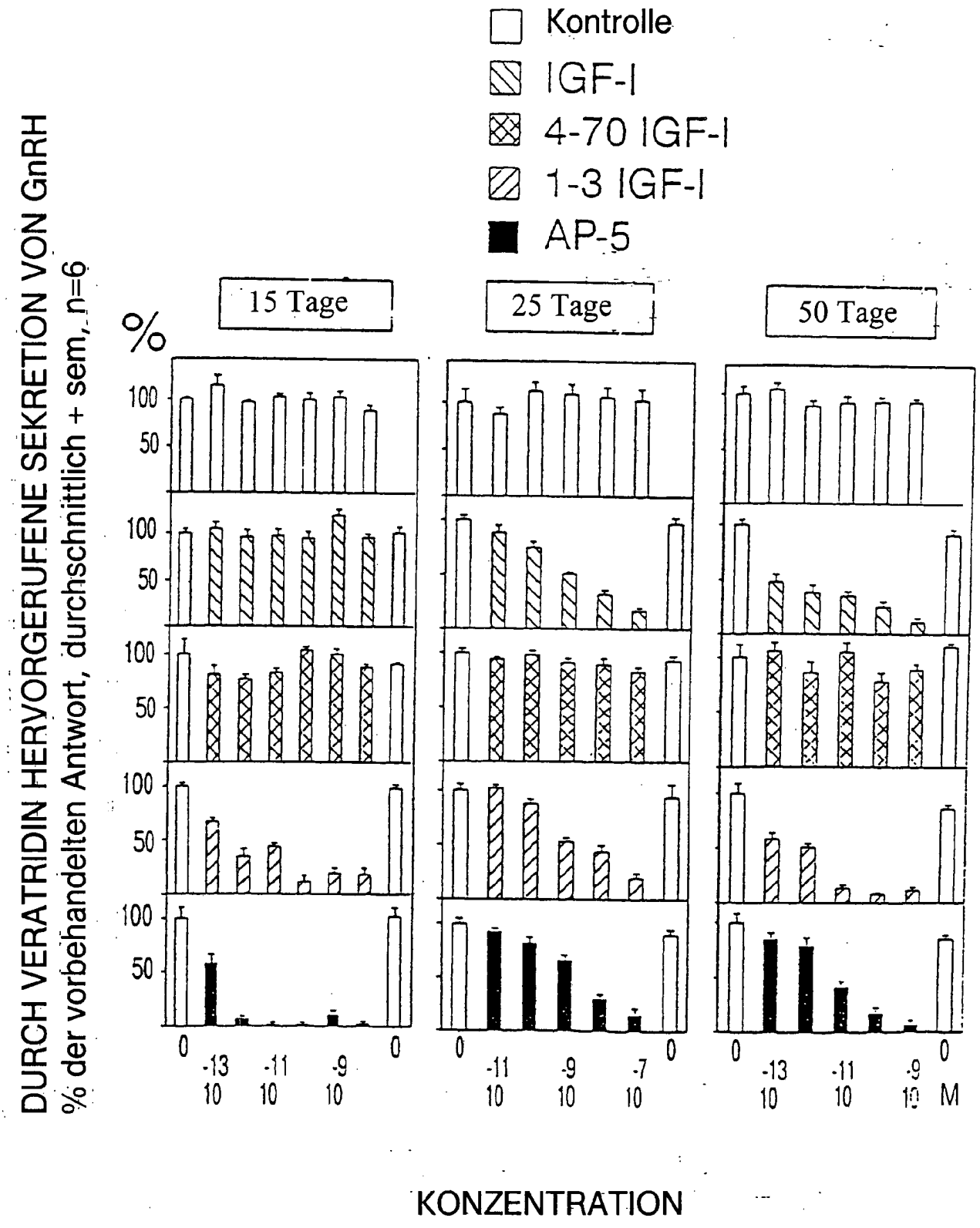
14. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 8 bis 13, wobei das Medikament zur Behandlung eines Kindes währen der perinatalen Phase und im Kindesalter dient.

15. Verwendung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Medikament für die systemische Anwendung formuliert ist.

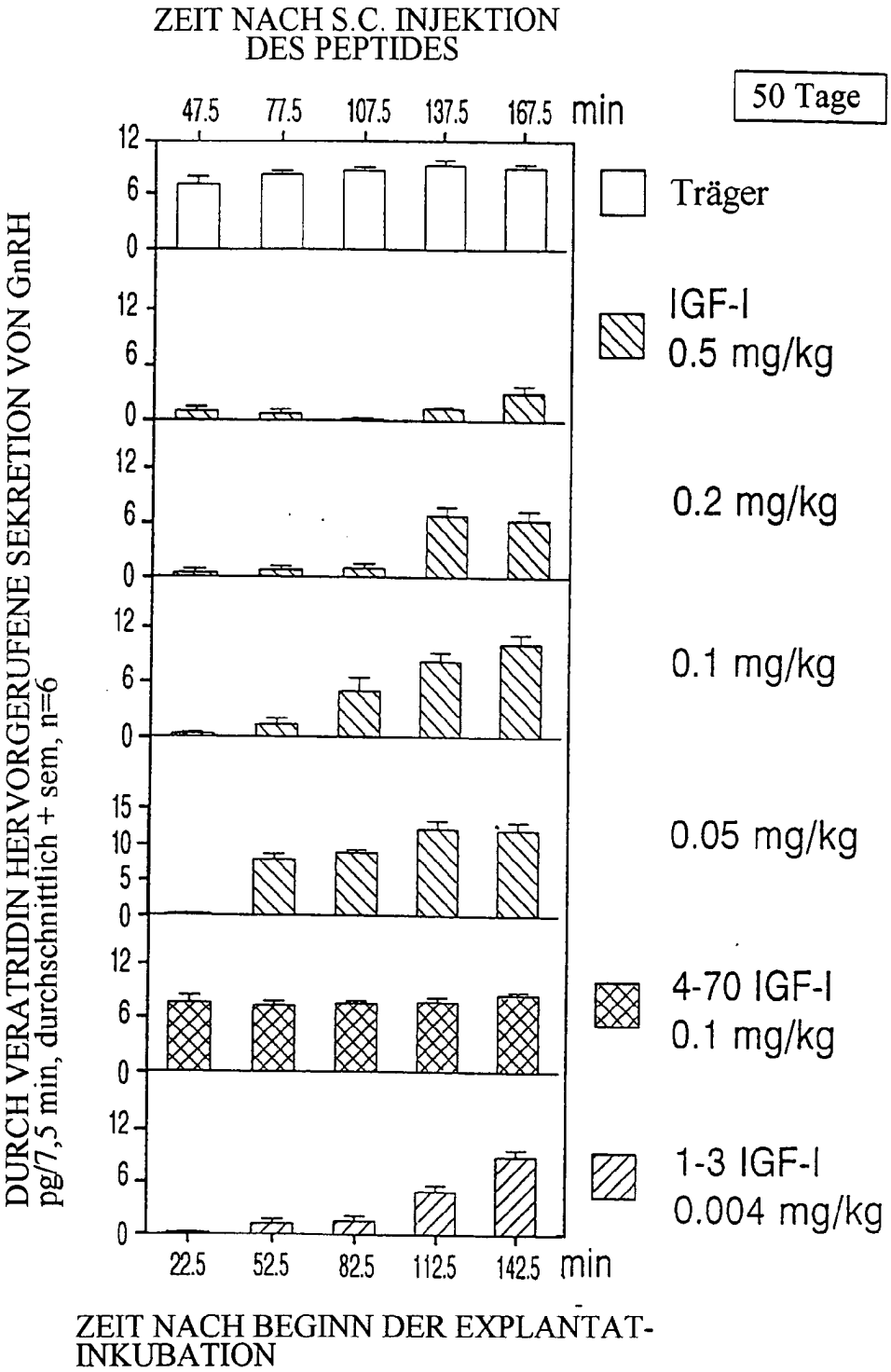
16. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Medikament zur lokalen Verabreichung in oder an das Gehirn formuliert ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

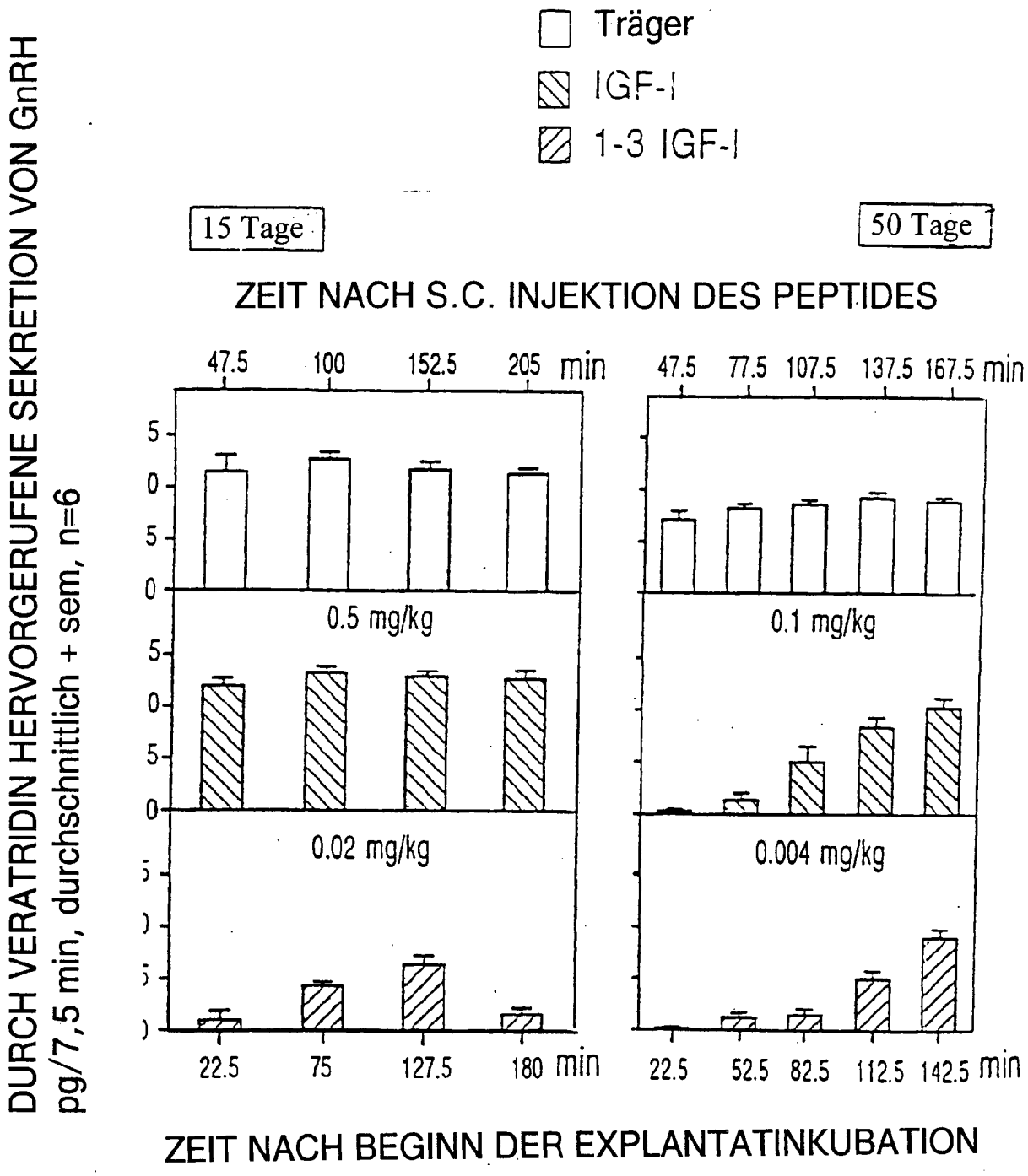
Anhängende Zeichnungen



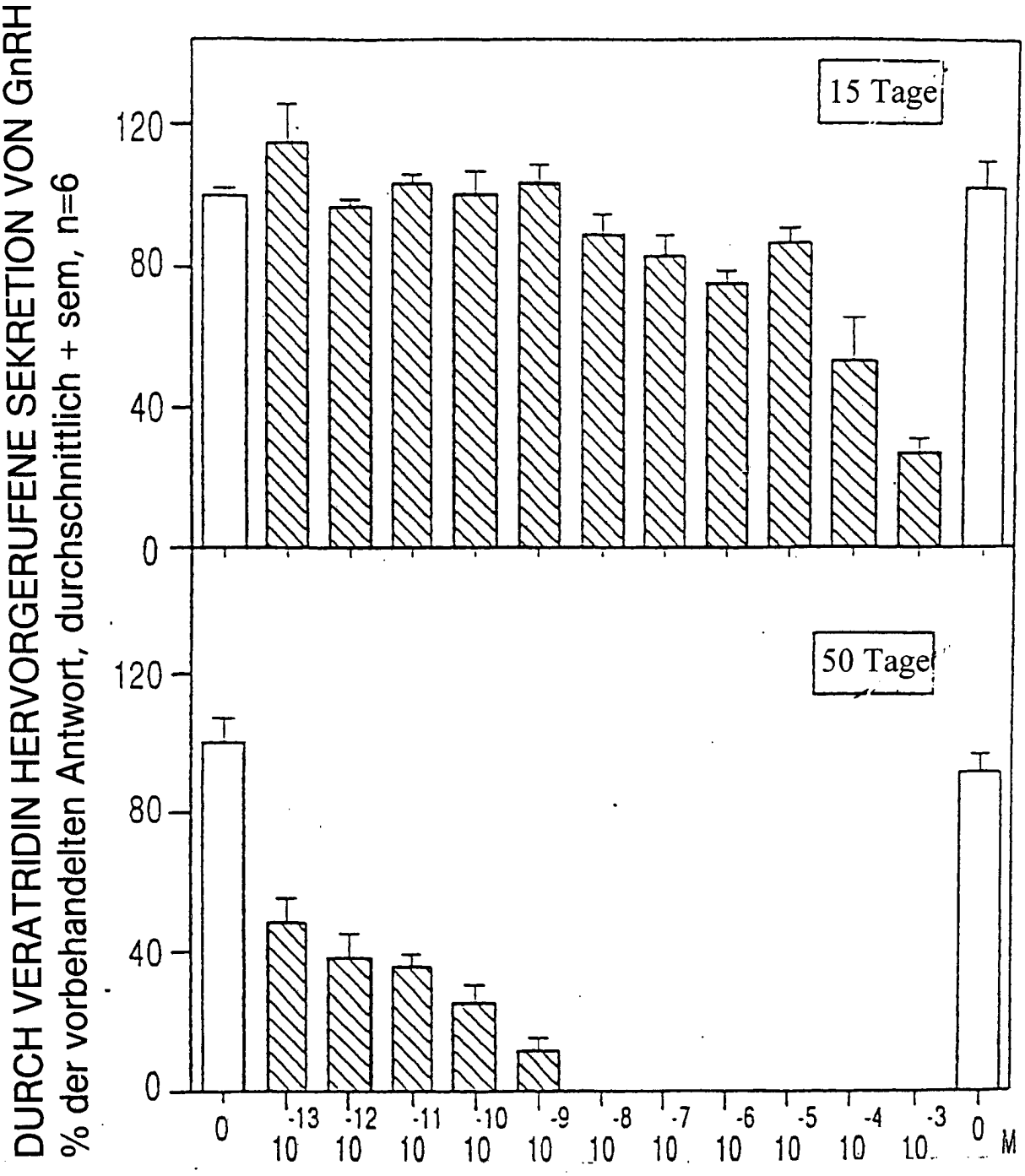
Figur 1


ZEIT NACH S.C. INJEKTION
DES PEPTIDES
50 Tage
47.5
77.5
107.5
137.5
167.5
min
Träger
IGF-I
0.5 mg/kg
0.2 mg/kg
0.1 mg/kg
0.05 mg/kg
4-70 IGF-I
0.1 mg/kg
1-3 IGF-I
0.004 mg/kg
22.5
52.5
82.5
112.5
142.5
min
DURCH VERATRIDIN HERVORGERUFENE SEKRETION VON GnRH
pg/7,5 min, durchschnittlich + sem, n=6
ZEIT NACH BEGINN DER EXPLANTAT-
INKUBATION

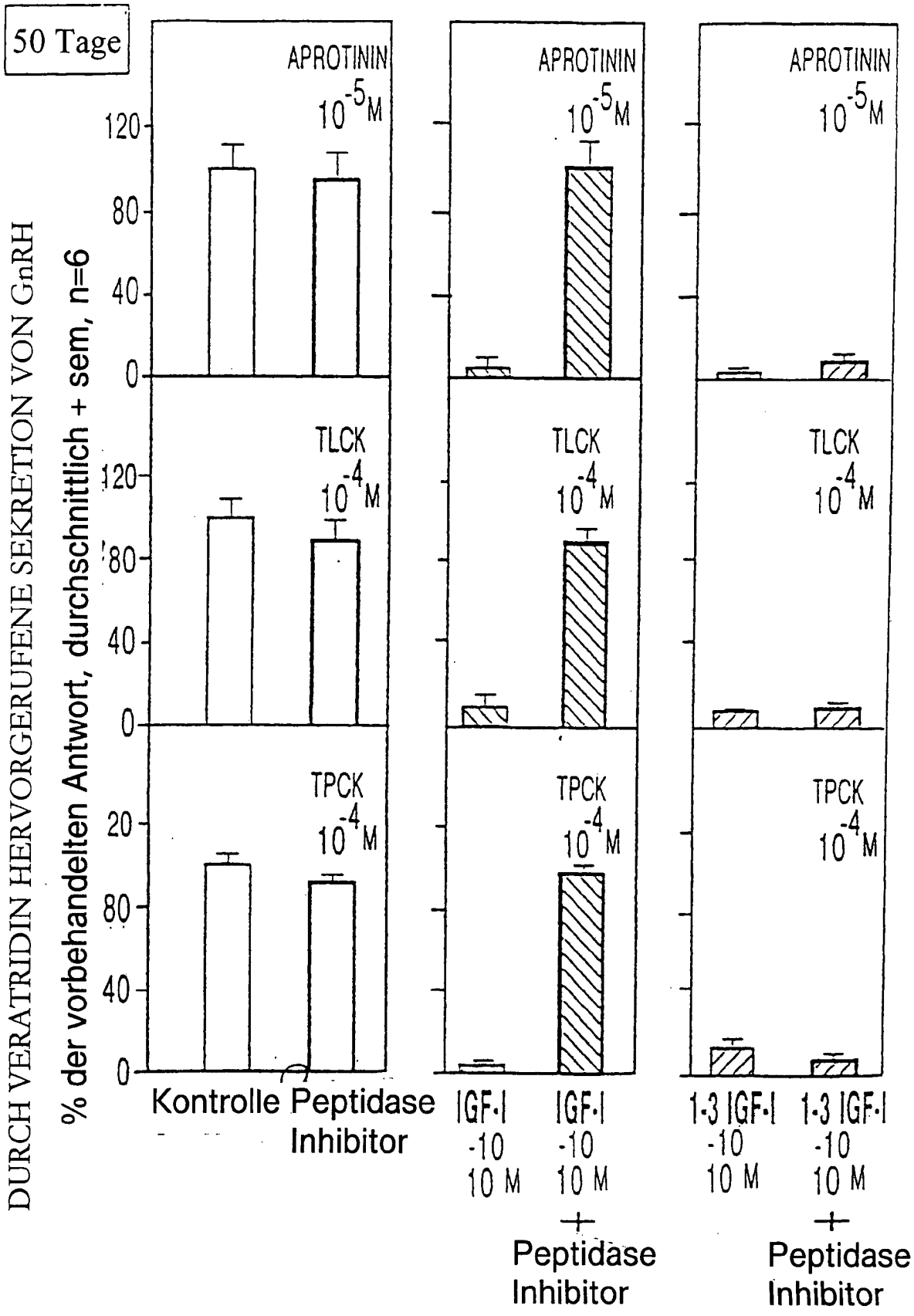
Figur 2


Träger
IGF-I
1-3 IGF-I
15 Tage
50 Tage
ZEIT NACH S.C. INJEKTION DES PEPTIDES
DURCH VERATRIDIN HERVORGERUFENE SEKRETION VON GnRH
pg/7,5 min, durchschnittlich + sem, n=6
47.5 100 152.5 205 min
47.5 77.5 107.5 137.5 167.5 min
0.5 mg/kg
0.1 mg/kg
0.02 mg/kg
0.004 mg/kg
22.5 75 127.5 180 min
22.5 52.5 82.5 112.5 142.5 min
ZEIT NACH BEGINN DER EXPLANTATINKUBATION

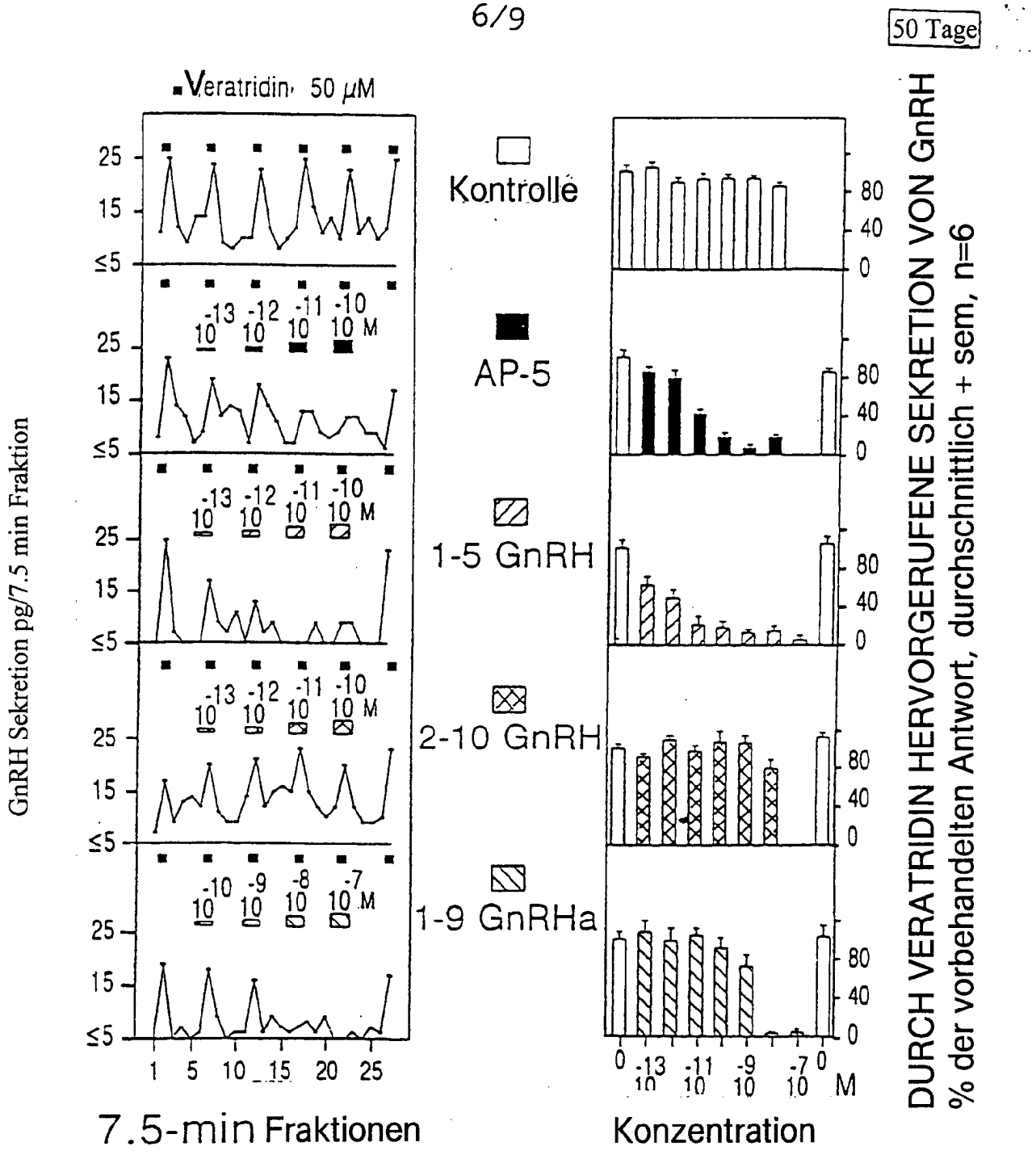
Figur 3


DURCH VERATRIDIN HERVORGERUFENE SEKRETION VON GnRH
% der vorbehandelten Antwort, durchschnittlich + sem, n=6
15 Tage
50 Tage
120
80
40
0
0
-13
10
-12
10
-11
10
-10
10
-9
10
-8
10
-7
10
-6
10
-5
10
-4
10
-3
10
0
M
IGF-I KONZENTRATION

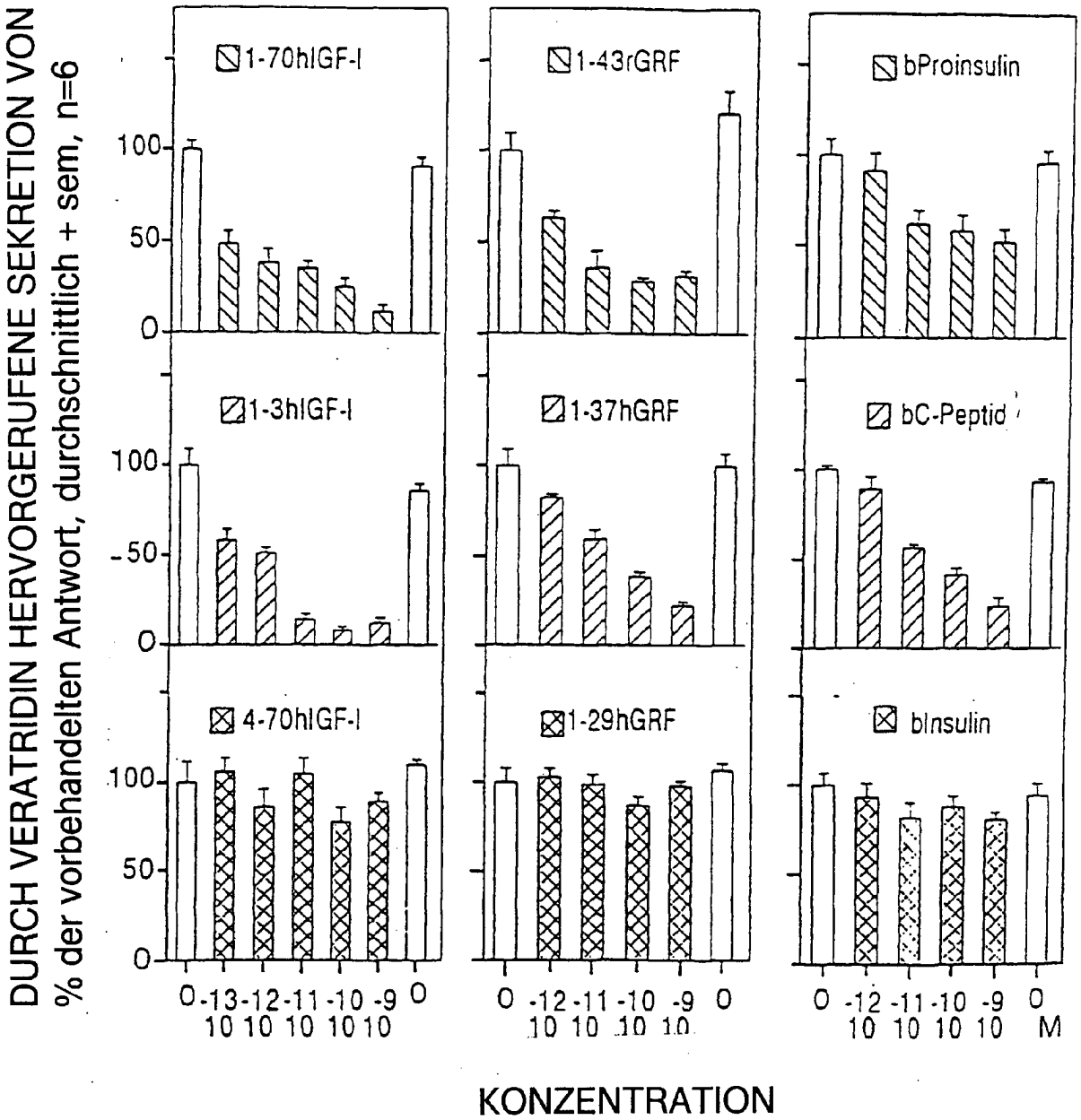
Figur 4


50 Tage
APROTININ
10^{-5}M
TLCK
10^{-4}M
TPCK
10^{-4}M
120
80
40
0
20
DURCH VERATRIDIN HERVORGERUFENE SEKRETION VON GnRH
% der vorbehandelten Antwort, durchschnittlich + sem, n=6
Kontrolle
Peptidase Inhibitor
IGF-I -10 10 M
IGF-I -10 10 M + Peptidase Inhibitor
1-3 IGF-I -10 10 M
1-3 IGF-I -10 10 M + Peptidase Inhibitor

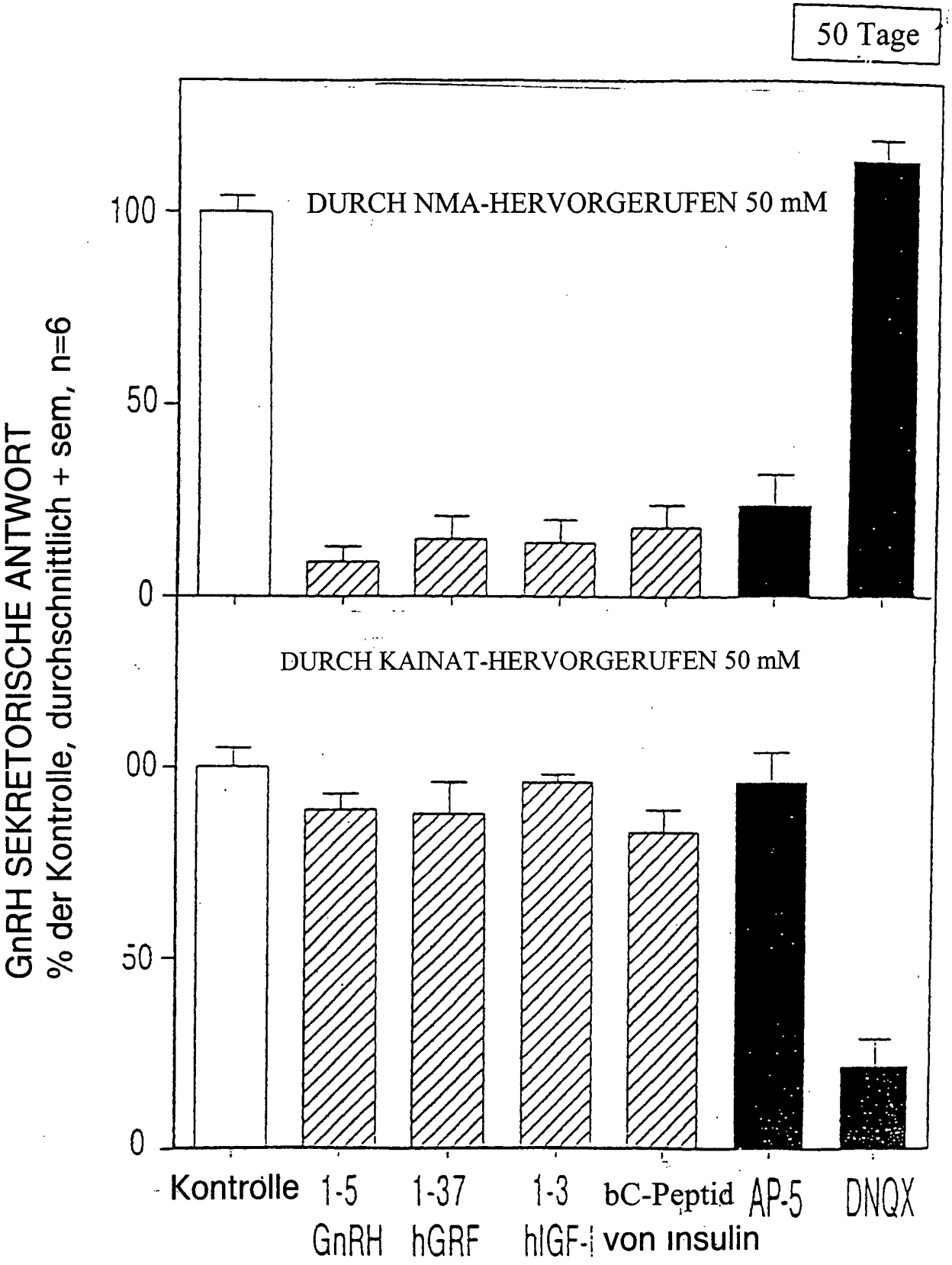
Figur 5


50 Tage
Veratridin 50 µM
Kontrolle
AP-5
1-5 GnRH
2-10 GnRH
1-9 GnRHa
GnRH Sekretion pg/7.5 min Fraktion
7.5-min Fraktionen
Konzentration
M
DURCH VERATRIDIN HERVORGERUFENE SEKRETION VON GnRH
% der vorbehandelten Antwort, durchschnittlich + sem, n=6

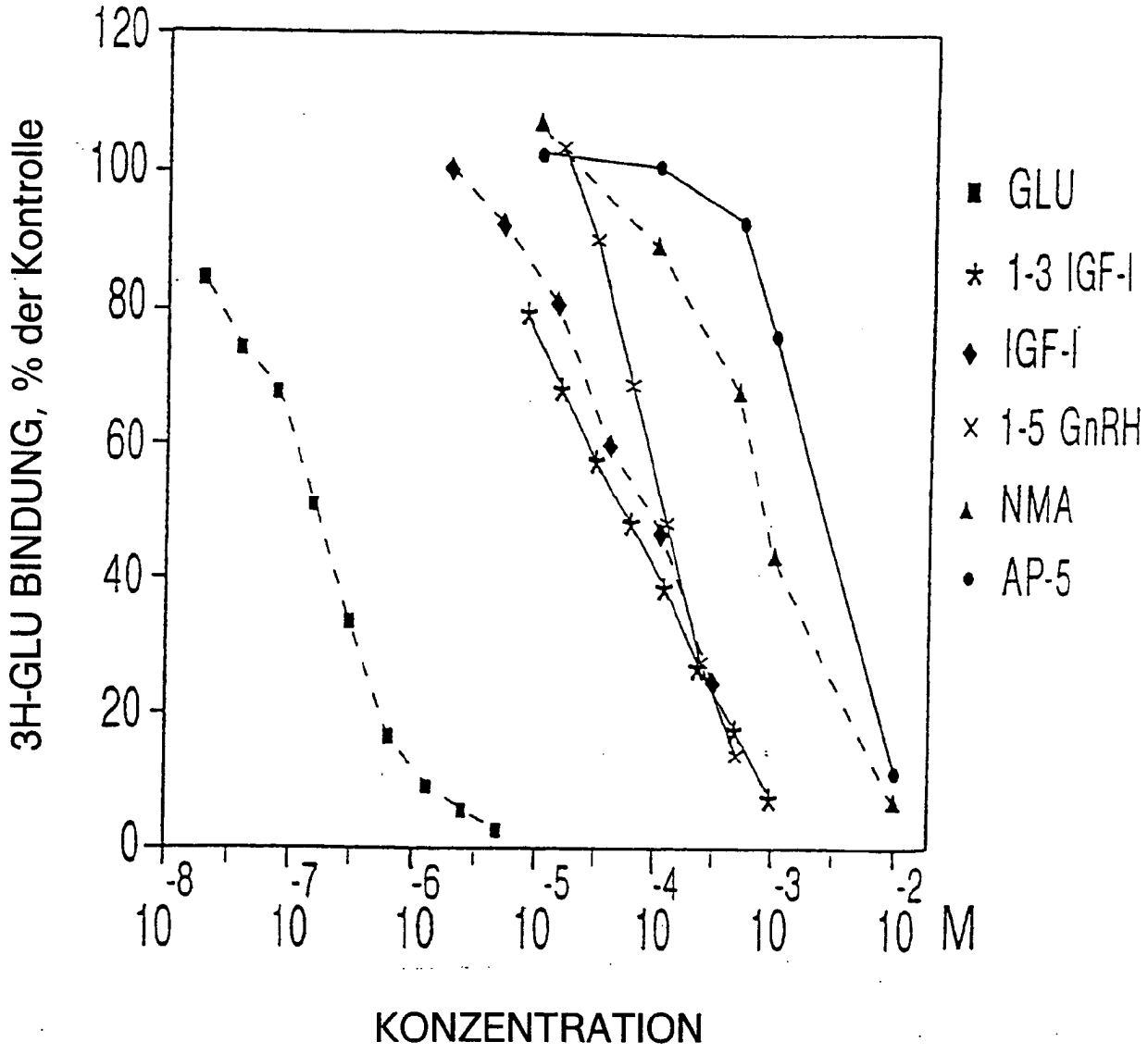
Figur 6


DURCH VERATRIDIN HERVORGERUFENE SEKRETION VON GnRH
% der vorbehandelten Antwort, durchschnittlich + sem, n=6
1-70hIGF-I
1-43rGRF
bProinsulin
1-3hIGF-I
1-37hGRF
bC-Peptid
4-70hIGF-I
1-29hGRF
bInsulin
100
50
0
-50
0 -13 -12 -11 -10 -9 0
10 10 10 10 10
0 -12 -11 -10 -9 0
10 10 10 10
0 -12 -11 -10 -9 0
10 10 10 10 M
KONZENTRATION

Figur 7


50 Tage
DURCH NMA-HERVORGERUFEN 50 mM
DURCH KAINAT-HERVORGERUFEN 50 mM
GnRH SEKRETORISCHE ANTWORT
% der Kontrolle, durchschnittlich + sem, n=6
100
50
0
00
50
0
Kontrolle
1-5 GnRH
1-37 hGRF
1-3 hIGF-I
bC-Peptid
von Insulin
AP-5
DNQX

Figur 8


120
100
80
60
40
20
0
3H-GLU BINDUNG, % der Kontrolle
10 -8
10 -7
10 -6
10 -5
10 -4
10 -3
10 -2
M
KONZENTRATION
GLU
1-3 IGF-I
IGF-I
1-5 GnRH
NMA
AP-5

Figur 9