



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 20 775 T2 2008.03.06

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 379 254 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 20 775.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IL02/00303

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 761 957.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/083147

(86) PCT-Anmeldetag: 15.04.2002

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 24.10.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 14.01.2004

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 20.06.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.03.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 31/575 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

14265001 17.04.2001 IL

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Galmed International Ltd., B'Kara, MT

(72) Erfinder:

GILAT, Tuvia, 64235 Tel-Aviv, IL

(74) Vertreter:

Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES GALLENSAEURE-FETTSAEURE-KONJUGATS ODER EINES GALLENSAEURE-SALZ-FETTSAEURE-KONJUGATS

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 eingelebt, 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 vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine neue Verwendung bestimmter Gallensäure- oder Gallensalz-Fettsäure-Konjugate.

**[0002]** Aus dem israelischen Patent IL-A-123.998 sind Gallensäure- oder Gallensalz-Fettsäure-Konjugate [BAFAC I] der allgemeinen Formel I bekannt: W-X-G wobei G ein Gallensäure- oder Gallensalzrest ist, der gegebenenfalls in Position 24 mit einer geeigneten Aminosäure konjugiert ist, W für eine oder zwei Fettsäurereste mit 18–22 Kohlenstoffatomen steht und X für eine NH-Bindung zwischen dem Gallensäure- oder Gallensalzrest und der bzw. den Fettsäuren steht.

**[0003]** Aus der Beschreibung ist die Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel I und von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die dieselben umfassen, zum Auflösen von Cholesterin-Gallensteinen in Galle unter Verhinderung des Auftretens oder Wiederauftretens der Gallensteine sowie zum Reduzieren oder Verhindern von Arteriosklerose bekannt. Es sind auch Verfahren zur Behandlung dieser Krankheiten bekannt.

**[0004]** US-A-3.856.953 offenbart ein Verfahren zur Behandlung von Fettleber, das das Verabreichen von 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-12 $\alpha$ -acyloxy-5 $\beta$ -cholansäure oder 3 $\alpha$ -Hydroxy-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacyloxy-5 $\beta$ -cholansäure an einen Patienten umfasst, wobei die Acyloxy-Struktureinheit aus einer Kohlenwasserstoffcarbonsäure mit weniger als 12 Kohlenstoffatomen stammt. Verbindungen, bei denen der Acyloxy-Substituent durch einen Alkoxysubstituenten ersetzt ist, gelten ebenfalls als wirksam bei der Behandlung von Fettleber.

**[0005]** Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, dass BAFACS und pharmazeutische Zusammensetzungen, die dasselbe umfassen, für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Fettleber verwendet werden können.

**[0006]** Somit bezieht sich die vorliegende Erfindung insbesondere auf die Verwendung eines Gallensäure- oder Gallensalz-Fettsäure-Konjugats der allgemeinen Formel II W-X-G wobei G ein Gallensäure- oder Gallensalzrest ist, der gegebenenfalls in Position 24 mit einer Aminosäure konjugiert ist, W für einen oder zwei Fettsäurereste mit 14–22 Kohlenstoffatomen steht und X für ein geeignetes Bindungselement oder für eine direkte C=C-Bindung zwischen dem Gallensäure- oder Gallensalzrest und der oder den Fettsäuren steht, oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die dasselbe umfasst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Fettleber, wobei das geeignete Bindungselement X für eine feste Bindung sorgt, die während des Resorptionsvorgangs des Konjugats nicht wesentlich dekonjugiert wird, mit der Maßgabe, dass das Bindungselement X keine Esterbindung ist.

**[0007]** Die Bindung muss eine feste Bindung sein, die während des Vorgangs der Resorption nicht wesentlich durch Darm- und/oder bakterielle Enzyme dekonjugiert wird. Eine Esterbindung ist also nicht geeignet, da sie leicht dekonjugiert wird. Die Bindung steht insbesondere für NH, aber kann auch für andere geeignete Bindungselemente stehen, z.B. S, P, O (Ether) usw.

**[0008]** Die Bindung kann in der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Konfiguration vorliegen und kann an verschiedenen Positionen des Gallensäuremoleküls angreifen, wobei die Positionen 3, 6, 7, 12 und 24 bevorzugt sind.

**[0009]** In der Verbindung der allgemeinen Formel II ist die Fettsäure aus Behenylsäure, Arachidylsäure und Stearinsäure ausgewählt.

**[0010]** In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Verbindung der allgemeinen Formel II um 3 $\beta$ -Arachidylamido-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure.

**[0011]** Fettleber ist heute einer der häufigsten Leberkrankheiten. Sie ist auf eine übermäßige Anhäufung von Fett in der Leber zurückzuführen. Sie wird histologisch durch die Anwesenheit unterschiedlicher Mengen von mikro- und/oder makrovesikulären Fetttröpfchen im Lebergewebe nachgewiesen. Fettleber kann durch Medikamente, Chemikalien, Krankheiten, Bakterien usw. verursacht sein, aber die Hauptursache ist übermäßige Nahrungsaufnahme, die zu (hauptsächlich trunkulärer) Fettleibigkeit führt.

**[0012]** Aufgrund des zunehmenden Grassierens von Übergewicht in Überflussgesellschaften ist das Vorkommen von Fettleber im Steigen begriffen. Fettleber kann zu Steatohepatitis und Zirrhose mit der damit einhergehenden Morbidität und Mortalität voranschreiten.

**[0013]** Die beste Behandlung für nahrungsinduzierte Fettleber ist nachhaltiger Gewichtsverlust. Wie jedoch wohlbekannt ist, wird dies selten erreicht.

**[0014]** Es hat sich jetzt gezeigt, dass BAFACS II Fettleber reduzieren und verhindern können. Dies wurde auch während der Fortsetzung der übermäßigen Nahrungsaufnahme bei mehreren Tierspezies nachgewiesen.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele und Figuren beschrieben, ohne auf diese beschränkt zu sein.

**[0016]** In den Beispielen hat die verwendete "reguläre Nahrung" die folgende Zusammensetzung: Kohlenhydrate 50%, Protein 21%, Fett 4% mit Mineral-, Ballaststoff- und Vitaminzusätzen (hergestellt von Kof-folk, Petah Tikva, Israel).

**[0017]** [Fig. 1](#) zeigt das Lipid/Protein-Verhältnis in der Leber von in gezüchteten C57J/L-Mäusen, die fünf Wochen lang mit einer fettreichen Nahrung +/- BAFAC (150 mg/kg/Tag) gefüttert wurden.

#### Beispiel 1

##### Histologisches Untersuchungsverfahren

**[0018]** Das Vorliegen von Fettleber wurde von einem Pathologen bewertet, der von den Behandlungen nichts wusste und in einem Blindverfahren codierte Objektträger einstuftete.

**[0019]** Das Einstufungssystem war wie folgt:

0 – keine Fettleber	< 5% der Leberoberfläche betroffen
1 – minimale Fettleber	5 bis < 25% der Leberoberfläche betroffen
2 – geringfügige Fettleber	25–50% der Leberoberfläche betroffen
3 – ausgeprägte Fettleber	> 50% der Leberoberfläche betroffen
4 – schwere Fettleber	

##### 1. Hamster

**[0020]** Männliche Syrische Goldhamster (Anilab, Rehovot, Israel) im Alter von 4–6 Wochen und mit einem Gewicht von 90–110 g wurden verwendet. Sie wurden 10 Wochen lang mit einer lithogenen Nahrung (Nr. 1) gefüttert, die aus ihrer normalen Nahrung bestand, die mit 1 Gew.-% Cholesterin, 1,2 Gew.-% Palmitinsäure und 2 Gew.-% Maisöl (modifiziert gemäß Ayyad et al., Lipids ...) ergänzt wurde. Die Hälfte der Tiere erhielt außerdem 150 mg/kg/Tag an 3 $\beta$ -Arachidylamido-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure. Die Verbindung wurde suspendiert in Kochsalzlösung über eine Magensonde verabreicht. Kontrolltieren wurde in ähnlicher Weise nur Kochsalzlösung verabreicht. Nach 10 Wochen wurden die Tiere anästhetisiert und getötet. Die Leber und andere Organe wurden entnommen und für die histologische Untersuchung in Formalin gelegt.

##### 2. Mäuse

**[0021]** Männliche in gezüchtete C57-Mäuse (Jackson Lab., Maine, USA) im Alter von 4–6 Wochen und mit einem Gewicht von 20–25 g wurden verwendet. Sie wurden mit einer "westlichen" Nahrung gefüttert (George et al., Circulation 2000, 102: 1822–27), die 1,5 g/kg Cholesterin und 42% Fett, 43% Kohlehydrate und 15% Protein (als % der Kalorien) enthielt. Die Hälfte erhielt außerdem 150 mg/kg/Tag an 3 $\beta$ -Arachidylamido-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure suspendiert in Kochsalzlösung über eine Magensonde. Die andere Hälfte erhielt in ähnlicher Weise nur Kochsalzlösung. Nach 4 Wochen wurden die Tiere anästhetisiert und getötet. Die Leber und andere Organe wurden entnommen und vor der histologischen Untersuchung in Formalin gelegt.

**[0022]** Die Zahl der Tiere in jeder Gruppe und die histologischen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Fettlebeneinstufungen von Versuchstieren

Tiere	Nahrung	Dauer (W)	n	Kontrolle (Stufen)				n	+BAFAC (Stufen)				
				0	1	2	3		4	Mittelwert	0	1	2
Syrische Goldhamster	lithogen 1	10	7				7	4 <sup>a</sup>	7	6	1		0,28
C57-Mäuse J/L ingezüchtet	westlich	4	10	1	3	6		1,5 <sup>b</sup>	14	12	1		1 0,35

<sup>a</sup> - mikrovesikuläres Fett<sup>b</sup> - gemischtes (mikro- und makrovesikuläres) Fett

Die Daten in der Tabelle 1 zeigen, dass BAFACS Fettleber reduzieren und/oder verhindern.

## Beispiel 2

**[0023]** Ingezüchtete C57J/L-Mäuse im Alter von 4 Wochen, die ungefähr 20 g wogen (Jackson Lab. Maine, USA) wurden verwendet. Sie wurden 5 Wochen lang mit einer fettreichen lithogenen Nahrung gefüttert, die aus

1 Gew.-% Cholesterin, 0,5 Gew.-% Cholsäure, 10 Gew.-% Schmalz, 6 Gew.-% Butter, 1,2 Gew.-% Palmitinsäure und 2 Gew.-% Mais bestand, die zu ihrer normalen Nahrung gegeben wurden. Außer der Nahrung erhielten die Tiere täglich über Magensonde entweder BAFAC (150 mg/kg) in Kochsalzlösung suspendiert oder ein gleiches Volumen nur Kochsalzlösung. Die BAFACs waren Konjugate von Cholsäure (auf Position 3) mit entweder Palmitinsäure (C-16) oder Arachidinsäure (C-20) oder Behensäure (C-22) unter Verwendung einer Amidbindung. Die Kontrollen (n = 5) erhielten Kochsalzlösung, die Versuchstiere erhielten entweder das C-16-Konjugat (n = 5), das C-20-Konjugat (n = 5) oder das C-22-Konjugat (n = 3). Nach 5 Wochen wurden die Tiere, nachdem sie über Nacht hungrten, mit Hilfe von Ketamin anästhetisiert, die Leber wurde entnommen, und die Tiere wurden mit einer Überdosis Ketamin getötet. Eine 0,5-g-Probe der Leber wurde in 5 ml gepufferter Kochsalzlösung homogenisiert. Leberlipide wurden mit Hilfe von Chloroform/Methanol (2:1, v/v) nach dem Folch-Verfahren aus dem Homogenisat extrahiert. Ein halber ml des Homogenisats wurde in 5 ml der Folch-Lösung extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurden die Lipide gewogen und mehrmals erneut einer Verdampfung unterzogen, bis Gewichtskonstant erreicht wurde. Die Proteine wurden in einem weiteren Aliquot des Homogenisats gemäß dem Verfahren von Bradford quantifiziert (Bradford M.M., Annal. Biochem. 1976, 72: 248).

**[0024]** Das Lipid-Protein-Verhältnis (mg/mg) wurde berechnet. Die Ergebnisse für jede Gruppe werden als Mittelwerte (+ Standardabweichung) angegeben. Die Gruppenwerte betragen: Kontrollen  $7,9 \pm 2,32$ ; C-16-BAFAC  $2,25 \pm 1,20$ ; C-20-BAFAC  $1,44 \pm 1,18$ ; und C-22-BAFAC  $3,00 \pm 1,08$ . Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

**[0025]** Die Daten zeigen, dass die behaupteten Wirkungen von mehreren Konjugaten ausgeübt werden, von denen einige fast so wirksam sind wie das in Beispiel 1 verwendete C-20-Konjugat.

### Patentansprüche

1. Verwendung eines Gallensäure-Fettsäure-Konjugats oder eines Gallensalz-Fettsäure-Konjugats der allgemeinen Formel II W-X-G wobei G ein Gallensäure- oder Gallensalzrest ist, der gegebenenfalls in Position 24 mit einer Aminosäure konjugiert ist, W für einen oder zwei Fettsäurereste mit 14–22 Kohlenstoffatomen steht und X für ein geeignetes Bindungselement oder für eine direkte C=C-Bindung zwischen dem Gallensäure- oder Gallensalzrest und der oder den Fettsäuren steht, oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die dasselbe enthält, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Fettleber, wobei das geeignete Bindungselement X für eine feste Bindung sorgt, die während des Resorptionsvorgangs des Konjugats nicht wesentlich dekonjugiert wird, mit der Maßgabe, dass das Bindungselement X keine Esterbindung ist.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem Bindungselement in der Verbindung der allgemeinen Formel II um NH handelt.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Fettsäure in der Verbindung der allgemeinen Formel II aus Behenylsäure, Arachidylsäure und Stearinsäure ausgewählt ist.
4. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei der Verbindung der allgemeinen Formel II um  $3\beta$ -Arachidylamido- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- $5\beta$ -cholan-24-säure handelt.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

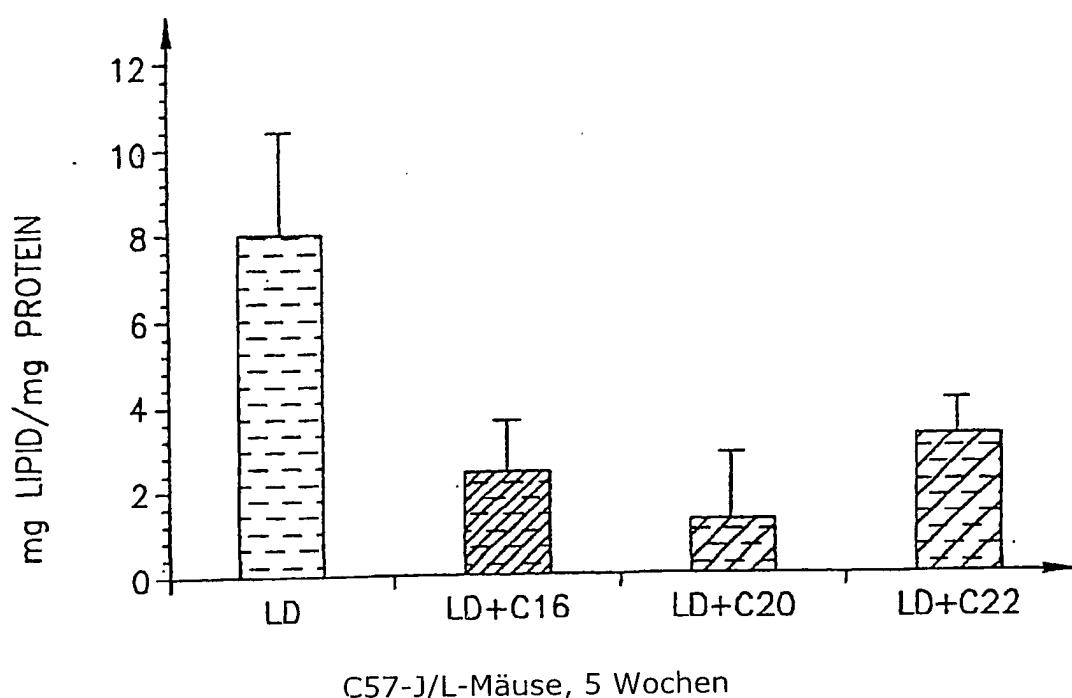


FIG. 1