



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 26 007 T2 2005.12.29**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 119 625 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 26 007.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/23365**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 950 250.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/20592**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **13.04.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **29.06.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/16**

**C07K 14/605, C07K 16/26, A61K 38/26,  
A01K 67/027, A61P 19/10**

(30) Unionspriorität:

**103333 P 07.10.1998 US**

**103495 P 08.10.1998 US**

(73) Patentinhaber:

**Medical College of Georgia Research Institute,  
Inc., Augusta, Ga., US**

(74) Vertreter:

**HOFFMANN & EITLE, 81925 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**CH, DE, FR, GB, IT, LI**

(72) Erfinder:

**ISALES, M., Carlos, Augusta, US; BOLLAG, J.,  
Roni, Martinez, US; RASMUSSEN, Howard,  
Lawrenceville, US**

(54) Bezeichnung: **GLUKOSE-ABHÄNGIGES, INSULINOTROPISCHES PEPTID FÜR DIE VERWENDUNG ALS OSTE-  
OTROPES HORMON**

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**

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0001]** Die Regierung der Vereinigten Staaten hat Rechte an dieser Erfindung aufgrund der NIH-Grants DK-19813 und HD 34149 und des Yale Core Center vom Musculoskeletal Disorders P30 AR46032.

**[0002]** Das Glucose-abhängige insulinotrope Peptid (GIP) ist ein 42-Aminosäuren-Peptid, das aus den endokrinen Zellen Dünndarms synthetisiert und sezerniert wird. Die Rolle von GIP bei der Verbindung der Nährstoffaufnahme und der Insulinsekretion, der "Incretin"-Effekt, ist wohlbekannt. Nebenschilddrüsenhormon und Vitamin D sind dafür bekannt, dass sie die Calciumaufnahme mit der Knochenbildung verbinden, aber es ist kein Hormon identifiziert worden, dass die Nährstoffaufnahme und Knochenbildung verknüpft.

**[0003]** GIP wird aus enterischen endokrinen Zellen des oberen Dünndarms sezerniert, während Glucagon-artiges Peptid 1 (GLP-1, ein weiteres bedeutendes "Incretin"-Hormon) aus den endokrinen Zellen des Dünndarmendes sezerniert wird. Bis vor kurzem wurde das Glucose-abhängige insulinotrope Peptid (GIP) als parachiales Hormon des enterischen endokrinen Systems angesehen, wobei dessen Haupteinwirkungsstelle die P-Zellen des endokrinen Pankreas sein sollten. R. A. Pederson, et al., *Endocrinology* 99, 780-785 (1976). Die Klonierung des GIP-Rezeptors führte jedoch zu der Entdeckung, dass dieser Rezeptor in einem breiten Umfang an Geweben und Organen exprimiert ist, einschließlich des exokrinen Pankreas und der distalen kleinen Zellen in mehreren Gefäßbetten. T.B. Usdin, et al., *Endocrinology* 133, 2861-2870 (1993).

**[0004]** Die verbreitete Verteilung des Rezeptors lässt eine bis dato nicht definierte physiologische Wirkung von GIP vermuten. Die meisten Studien, die darauf ausgerichtet sind, die Wirkungen von GIP zu definieren, haben sich auf den Synergismus zwischen GIP und Glucose bei der Stimulierung der Insulinsekretion fokussiert. Ein Verfahren zur Behandlung von nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus ist in WO 98 24464 offenbart, und umfasst die Verabreichung eines Antagonisten des Glucose-abhängigen insulinotropen Polypeptids (GIP) an einen Patienten. Es stellte sich heraus, dass die Verabreichung eines Antagonisten von GIP die Glucosetoleranz in Säugern verbessert. Gleichermäßen wurde die Verwendung von GIP-Analoga, die im großen Maßstab unter Verwendung einer rekombinanten Plasmid-DNA hergestellt werden, in EP 0479210 vorgeschlagen, um Medizin herzustellen, um Diabetes zu vernünftigen Preisen zu heilen. Es wurde auch gezeigt, dass GIP-Infusionen die Wirkungen von Glucagon auf die Leber inhibieren, während sie die von In-

sulin verstärken, und dass sie duale Wirkungen auf den hepatischen Blutfluss haben, wobei der Fluss durch die Portalvene verstärkt wird und der Fluss durch die hepatische Arterie gehemmt wird. Ironischerweise scheint die Wirkung, für die GIP entdeckt wurde – die Inhibierung der Magensäuresekretion – ein untergeordneter pharmakologischer Effekt von geringer physiologischer Bedeutung zu sein.

**[0005]** Gegenwärtig denkt man, dass der Hauptmodulator des Knochenmetabolismus die PTH-Vitamin-D-Achse ist. Nebenschilddrüsenhormon ist dafür bekannt, dass es durch Nährstoffadsorption negativ reguliert wird, wobei die PTH-Sekretion nach einer calciumreichen Mahlzeit absinkt und während des Fastens ansteigt. W. Jubiz, et al., *J Clin Invest* 51, 2040-2046 (1972).

**[0006]** Rezeptoren für PTH werden auf Osteoblasten gefunden und PTH induziert die Cytokinexpression, welche wiederum die osteoklastische Wirkung moduliert. J. E. Onyia, et al., *J Cell Biochem* 67, 265-74 (1997), J. H. Pollock, et al., *Jbone Miner Res* 11, 754-9 (1996). D.h., dass der PTH-induzierte Knochenumsatz im Allgemeinen ein gekoppelter Prozess ist und im Zusammenarbeit mit Vitamin D spielt PTH eine Hauptrolle bei der Knochenmineralisierung.

**[0007]** GIP scheint direkte anabolische Wirkungen auf Osteoblastenartige Zellen zu haben, wobei die Synthese von Kollagenartigen Bindungen erhöht wird und die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch spezifische, häufig vorkommende Rezeptoren mit hoher Affinitäts gesteigert wird und eine potentielle Rolle für GIP beim Induzieren der Differenzierung von preosteoblastischen Zellen in einen reiferen Phenotyp nahe legt. R. Bolag et al., *Jbone Miner Res* 14, S345 (1999).

**[0008]** Zusätzlich zur Calciumaufnahme hängt Knochen hinsichtlich seines Wachstums und der Remodelierung von der Nährstoffaufnahme ab. Tatsächlich ist es sogar in einem Zustand hohen Knochenumsatzes möglich, wie beispielsweise in einer Ratte, der die Eierstöcke entfernt wurden, Knochenverlust durch die Veränderung der Nahrung der Ratte zu verhindern und indem sie auf eine spezifische Proteindiät gesetzt wird, B. H. Arjmandi, et al., *J Nutr* 126, 161-167 (1996), was vermuten lässt, dass ein Darm-induziertes Signal den Knochenumsatz modulieren kann. Bis heute sind die Hormone des enterischen endokrinen Systems nicht als eine Hauptrolle beim Koordinieren der Nährstoffaufnahme mit Skelettwachstum und Remodelierung spielend, angesehen worden.

**[0009]** Es ist deswegen ein Ziel der vorliegenden Erfindung ein Mittel zum Regulieren von Skelettwachstum und -remodelierung bereitzustellen.

**[0010]** Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung therapeutische Formulierungen zur Behandlung von Erkrankungen, wie beispielsweise der Osteoporose, bereitzustellen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0011]** Die Beispiele zeigen dass GIP-Rezeptor-mRNA und Protein in normalen Knochen und Osteoblasten-artigen Zelllinien vorhanden sind, und dass die Hochaffinitätsrezeptoren für GIP durch <sup>125</sup>Jod-GIP-Bindungsstudien nachgewiesen werden können. Wenn sie zu Osteoblasten-artigen Zellen (SaOS2) gegeben werden, stimuliert GIP einen Anstieg des zellulären cAMP-Gehalts und des intrazellulären Calciums, wobei beide Reaktionen dosisabhängig sind. Des Weiteren führt die Verabreichung von GIP zu einer erhöhten Expression von mRNA für Kollagen-Typ-I sowie auch einem Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Diese beiden Wirkungen spiegeln die anabolischen Wirkungen von vermutlichen Osteoblasten wieder. Diese Ergebnisse stellen den ersten Beweis bereit, dass GIP-Rezeptoren in Knochen und Osteoblasten-artigen Zellen vorhanden sind, und dass GIP die Funktion dieser Zellen moduliert.

**[0012]** GIP hat anabolische Wirkungen bei der Remodelierung von Knochen, beim Erhöhen der Wirbelsäulenknöchendichte in einem Rattenmodell für die Osteoporose. GIP inhibiert bei 10 nM die PTH-induzierte Knochenresorption in einem fötalen Langknochen-Test und stimuliert die Synthese von mRNA von Typ-I-Kollagen. Transgene Mäuse, die GIP überexprimieren, haben eine erhöhte Knöchendichte, wenn sie mit Kontrollen gleichen Alters verglichen werden.

**[0013]** GIP oder Analoga davon können deswegen als Therapeutikum verwendet werden, um die Knochenresorption zu inhibieren, und um die Knöchendichte zu bewahren oder zu steigern. GIP-Antagonisten, Verbindungen, die die Bindung an den GIP-Rezeptor blockieren, können verwendet werden, um die Knöchendichte zu senken.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0014]** [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) sind Graphen der Wirkung von GIP (0,1 nM bis 1 µM GIP) auf die cytosolische Calciumkonzentration (nM) ([Fig. 1A](#)) und des zellulären cAMP (pg/ml) ([Fig. 1B](#)). [Fig. 1A](#) zeigt, dass GIP [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und cAMP in einer dosisabhängigen Weise SaOS2-Zellen ansteigen lässt. SaOS2-Zellen wurden auf gläsernen Deckgläsern gezüchtet und mit der fluoreszierenden Calcium-empfindlichen Sonde Fura-2 beladen und mit steigenden Dosen an GIP stimuliert. Die maximalen Anstiege des intrazellulären Calciums aus vier verschiedenen Experimenten wurden berechnet. Die Daten werden ausgedrückt als Mittelwert ± Standardabweichung; \**p*<0,01;

\*\**p*<0,001). [Fig. 1B](#) zeigt die Ergebnisse, wenn SaOS2-Zellen in 6-Wellplatten gezüchtet wurden, mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (0,5 mM – 10 Minuten) präinkubiert wurden und mit steigenden Dosen an GIP (10 Minuten) stimuliert wurden. Das zelluläre cAMP wurde mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (Biomedical Technologies, Stoughton, MA) gemessen. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung; \*\**p*<0,001 ausgedrückt.

**[0015]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) sind Graphen der Wirkung von GIP (0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM) auf die Kollagen-Synthese in kultivierten Osteoblasten-artigen Zellen. SaOS2-Zellen wurden in T75-Fläschchen gezüchtet und mit der angegebenen Dosis an GIP für 24 Stunden stimuliert (Kulturmedium wurde alle 8 Stunden mit frischem GIP-haltigen Medium ausgetauscht). Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mit einer Kollagen-typ-I-spezifischen Sonde untersucht. Die Autoradiografien wurden eingescannt und die Densitometrie auf einer Sun Sparc-Station unter Verwendung der Bioimage-Software (n=4, \**p*<0,001) quantifiziert. Die Kollagen-Densitometrie wurde gegenüber GAPDH normalisiert und als Funktion der GIP-Konzentration in [Fig. 2A](#) gezeigt. [Fig. 2B](#) ist ein Graph, in dem SaOS2-Zellen wie oben in T75 gezüchtet wurden und mit 1 nM GIP zu den verschiedenen angegebenen Zeitpunkten stimuliert wurden (0, 3, 6, 9 und 12 Stunden) und einer Northern-Analyse unterworfen wurden. Die Densitometrie von vier verschiedenen Experimenten wurde zusammengefasst und wird als Balkendiagramm ausgedrückt; \**p*<0,001 gegenüber der Kontrolle, als Funktion der Zeit in [Fig. 2A](#).

**[0016]** [Fig. 3](#) ist ein Graph der Wirkung von GIP auf die Aktivität auf die alkalische Phosphatase in MG-63-Zellen, die bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten gezüchtet wurden, und mit 0,1 nM GIP über den angezeigten Zeitraum (1, 2, 3 oder 6 Tage) stimuliert wurden, und die Reaktion wurde gestoppt und die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits gemessen. Die Wirkung von GIP auf ALP war größer als die, die mit 1,25 Vitamin D (10 ng/ml)+TGB-β(10 ng/ml), welche als Positivkontrolle verwendet wurde, beobachtet wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von Triplikaten der vier verschiedenen Experimente. \**p*<0,05; +*p*<0,001.

**[0017]** [Fig. 4](#) ist ein Graph der Knochenresorption (<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, Fach gegenüber der Kontrolle) in kultivierten Knochenzellen, die gegenüber 10 nM GIP, 10 nM PTH und der Kombination aus PTH und GIP in drei Konzentrationen: 5 nM, 10 nM und 50 nM ausgesetzt waren.

**[0018]** [Fig. 5](#) ist ein Graph der prozentualen Veränderung der Wirbelsäulenknöchendichte nach sechs

Wochen GIP-Behandlung in jungfräulichen Ratten, denen die Eierstöcke entfernt wurden.

[0019] [Fig. 6](#) ist ein Schema der Struktur des GIP-Rezeptors, wobei die Region, die verwendet wurde, um Antikörper herzustellen, die die GIP-Rezeptoraktivierung blockieren, eingekreist ist.

[0020] [Fig. 7](#) ist ein Schema der GIP-Expressionskonstrukten. Beide GIP-cDNAs wurden über die Transkriptionsregulationselemente im Vektor pcDNA3 exprimiert. PreproGIP schließt die gesamte Kodierungssequenz der endogenen Maus-GIP-mRNA ein, während preMGIP so entworfen wurde, dass die N- und C-terminalen Propeptidsequenzen fehlen.

[0021] [Fig. 8](#) ist ein Graph der GIP-Sekretion (ng/well) in transfizierten Fibroblasten. NIH 3T3-Fibroblasten wurden unter Verwendung von Lipofectamin mit den Konstrukten transfiziert, die in [Fig. 7](#) dargestellt sind sowie mit pEGFP als Kontrolle. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz gezüchtet, das konditionierte Medium abgesammelt und GIP unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays gemessen. Da es möglich war, dass GIP nicht sezerniert werden könnte, wurde der zelluläre Inhalt der Zellen, die lysiert wurden, gesammelt und ebenfalls gemessen. Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung von drei verschiedenen Messungen.

[0022] [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) sind Graphen, die zeigen dass die Transfektion mit den GIP-Konstrukten zur Produktion biologisch wirksamen GIPs führt. Das Fibroblasten-konditionierte Medium erhöht sowohl intrazelluläres Calcium ([Fig. 9A](#), Veränderung des cytosolischen Calciums über den Grundwert, % Grundwert) und den zellulären cAMP-Gehalt ([Fig. 9B](#), zellulärer cAMP-Gehalt, % Anstieg/Grundwert) in SaOs2-Zellen. 100 µl Fibroblasten-konditioniertes Medium wurden zu SaOs2-Zellen gegeben, und das intrazelluläre Calcium unter Verwendung von Fura-2 gemessen. EGFP wurde als Negativkontrolle für cytosolisches Calcium verwendet. 10 µM Forskolin wurde als Positivkontrolle für cAMP verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von dreifachen Messungen bei jeder Bedingung.

[0023] [Fig. 10](#) ist ein Graph des Serum-GIP-Niveaus in transgenen gegenüber nicht-transgenen Mäusen. Ungefähr 50 µl Blut wurden durch eine Augenblutung sowohl aus Wurfmitgliedern transgener Mäusen (Tg) und nicht-transgener Mäuse (nicht TG) genommen. GIP wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Radioimmunassays (Peninsula Laboratories, San Diego CA) gemessen. Die GIP-Grundwerte der Transgenen sind ungefähr 2-mal höher als bei den Nicht-Transgenen bevor diese mit einem Schwermetall gefüttert wurden.

[0024] [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#) sind Graphen Transgener GIP-überexprimierender Mäuse. Gewicht ([Fig. 11B](#), Gramm) und Knochenmineraldichte ([Fig. 11A](#), Bereich, cm<sup>2</sup>).

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Auf Grundlage der Daten in den folgenden Beispielen, die die Rolle von GIP bei der Knochenremodellierung betreffen, wird davon ausgegangen, dass PTH und GIP komplementäre Rollen bei der Regulierung von Vorgängen im Skelett haben. PTH spielt eine bedeutende Rolle beim Stimulieren der Rekrutierung mononukleärer Zellen, die Osteoclasten werden; und, sobald sie gebildet wurden, diese Osteoclasten zu stimulieren, Knochen zu resorbieren. PTH kann auch die Lebensdauer von Osteoclasten steigern. Im Gegensatz dazu wirkt GIP dahingehend, die Remodellierungseinheiten von ihrer osteoclastischen in ihre osteoblastische Aktivitätsphase zu ändern, indem direkt auf Osteoclasten eingewirkt wird. Sobald die Zellen einer Remodellierungseinheit in der osteoblastischen Aktivitätsphase sind, spielen sowohl PTH und GIP einzigartige Rollen beim Vermitteln dieser Phase der Knochenbildung: PTH beim Stimulieren der Osteoblastenproliferation, und GIP durch die Stimulierung der Knochenbildungsaktivitäten dieser Osteoblasten. Eine ähnliche Beziehung zwischen den Wirkungen dieser zwei Hormone bestimmt auch ihre Rollen bei der Regulierung des Knochenwachstums der Epiphysenplatten: PTH durch die Stimulierung der Proliferation von Chondrocyten, und GIP durch die Stimulierung dieser Chondrocyten, die Kollagenmatrix zu produzieren.

[0026] Trotz ihrer Ähnlichkeiten zeigen die GIP- und PTH-Rezeptoren ferne Unterschiede. Zum Ersten wirkt PTH, aber nicht GIP, auf Osteoblasten, um die Knochenresorption zu stimulieren. Zum Zweiten sind Rezeptoren für beide Hormone auf Zellen in den Epiphysenwachstumsplatten vorhanden, aber diese Rezeptoren werden auf verschiedenen Zelltypen exprimiert: PTH-Rezeptoren auf den Chondrocyten zwischen der Proliferationszone und der hypertrophen Zone, K. Lee, et al., *Endocrinology* 137, 5109-5118 (1996), N. Amizuka, et al., *Endocrinology* 137, 5055-67 (1996), und die GIP-Rezeptoren auf Chondrocyten der hypertrophen Zone. Dieser letztgenannte Unterschied betrifft einen weiteren Aspekt der Knochenphysiologie. Unter normalen Umständen ist die PTH-Sekretion während des Tages niedrig und steigt während der Nacht, da der Ca<sup>2+</sup>-Plasmawert fällt. W. Jubiz, et al., *J Clin Invest* 51, 2040-2046 (1972). Die GIP-Sekretion ist während des Tages in Folge der Nahrungsmittelaufnahme am höchsten und fällt während des Fastens über Nacht. J.M. Knapper, et al., *Proc Nutr Soc* 55, 291-305 (1996).

[0027] Daraus folgt, dass GIP eine wichtige Rolle

bei der Regulierung von sowohl dem Skelettwachstum des Kindes und der Skelettremodellierung des Erwachsenen spielt. GIP-Rezeptoren sind auf den aus Knochen stammenden Zellen vorhanden und die Stimulierung dieser Zellen mit GIP führt zur Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration und des zellulären cAMP-Gehalts, was zur gesteigerten Synthese von Typ-I-Kollagen und der Inhibierung der PTH-stimulierten Knochenresorption führt. Die in den Beispielen vorgestellten Daten unterstützen die Rolle von GIP als ein "Incretin"-Hormon, das den Knochen an einer "entero-ossösen Achse" beteiligt. Im Ergebnis können GIP oder seine Analoga oder Antagonisten, die an den Rezeptor binden, verwendet werden, um die Knochenablagerung zu modulieren.

## GIP-FORMULIERUNGEN

### GIP

**[0028]** GIP kann isoliert oder bevorzugterweise synthetisch hergestellt werden, indem entweder die chemische Synthese durchgeführt wird oder durch die Expression von rekombinantem GIP. Die Aminosäure- und die Nucleotidsequenzen werden von Higashimoto und Liddle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193(1), 182-190 (1993) publiziert. So wie er hier verwendet wird, sofern nichts anderes angegeben wurde, bedeutet der Begriff "GIP" die menschliche Sequenz und degenerierte Varianten hiervon und ihre Äquivalente mit Ursprung in anderen Spezies, sowie funktionale äquivalente Varianten, die Additionen, Deletionen und Substitutionen entweder von Nucleotiden oder Aminosäuren haben, welche die funktionale Aktivität des Peptids nicht signifikant ändern.

**[0029]** In einer weiteren Ausführungsform können Verbindungen verwendet werden, die die Wirkung von GIP oder dessen Rezeptor mimieren oder antagonisieren. So wie sie hier verwendet wird, sind Analoga GIP, Fragmente oder Fusionen von GIP, antiidiotypische Antikörper gegen GIP oder Fragmente davon, die an den GIP-Rezeptor binden, oder synthetische strukturelle Mimetika, die eine äquivalente Wirkung wie GIP haben. Diese werden hier zusammengefasst als GIP bezeichnet, sofern es nicht anders angegeben wurde. Antagonisten sind typischerweise ähnliche Arten von Verbindungen, die die Bindung an den GIP-Rezeptor blockieren oder hiermit konkurrieren. Diese können unter Verwendung von Verfahren erhalten werden, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, wobei einige unten beschrieben werden, und indem sie durch Screeningverfahren, wie solchen in den Beispielen, identifiziert werden.

**[0030]** Die Rezeptorproteine sind als Ziele für Verbindungen nützlich, die den GIP-Rezeptor anschalten oder abschalten oder in sonstiger Weise dergestalt die Bindung regulieren, dass sie die GIP-Funkti-

on mimieren oder die GIP-Funktion antagonisieren. Die unten beschriebenen Tests stellen klare Routine-Methoden dar, durch die eine Verbindung auf eine inhibitorische Wirkung oder einen stimulierenden Effekt hinsichtlich der Bindung einer spezifischen Verbindung an GIP oder dessen Rezeptor getestet werden kann. Die Untersuchung von Verbindungen in vitro, die die Bindung selektiv zu modifizieren scheinen, werden dann durch Tierversuche bestätigt. Studien, die auf der Inhibierung der Bindung beruhen, weisen auf indirekte Wirkungen, beispielsweise auf die Veränderung der Rezeptorbindung hin.

**[0031]** Untersuchungsverfahren zum Testen von Verbindungen für eine nützliche Aktivität können ausschließlich auf der Interaktion mit dem Rezeptor oder GIP, auf Zellen oder in Lösung oder auf inerten Substraten immobilisiert, beruhen.

**[0032]** Alternativ dazu können die Tests auf einer Interaktion mit der Gensequenz, die GIP oder das Rezeptorprotein kodiert, beruhen, bevorzugt auf den regulatorischen Sequenzen, die die Expression von GIP oder des Rezeptorproteins steuern.

**[0033]** Beispielsweise kann eine Antisense, die an die regulatorischen Sequenzen bindet, und/oder die Protein-kodierenden Sequenzen unter Verwendung von Standard-Oligonucleotidsynthese-Chemie synthetisiert werden. Die Antisense kann zur pharmazeutischen Verwendung unter Verwendung von Standardmethoden stabilisiert werden (Verkapselung in einem Liposom oder einer Mikrosphäre; Einschleusung modifizierter Nucleotide, die gegenüber einem Abbau resistent sind, oder von Gruppen, die die Resistenz gegenüber Endonucleasen erhöhen, wie beispielsweise Phosphorthiodate und Methylierungen), dann zu Beginn auf eine Veränderung einer Rezeptorbindung oder die Wirkung von GIP durchmustert werden.

## ZUFALLSGENERIERUNG VON MOLEKÜLEN, DIE DEN REZEPTOR ODER DIE REZEPTOR KODIERENDE SEQUENZ BINDEN

**[0034]** Moleküle mit einer bestimmten Funktion, z.B. einer katalytischen oder Ligandenbindung, können aus einem komplexen Gemisch von Zufallsmolekülen, in einem Prozess, der als "in vitro Genetik" (Szostak, *TIBS* 19:89, 1992) bezeichnet worden ist, herausgesucht werden. Man synthetisiert einen großen Pool an Molekülen, die zufällige und bestimmte Sequenzen tragen und unterwirft diese komplexe Mischung beispielsweise ungefähr 1015 einzelner Sequenzen in 100 µg von RNA mit 100-Nucleotiden einem bestimmten Selektions- und Anreicherungsprozess. Beispielsweise kann durch wiederholte Zyklen der Affinitätschromatographie und PCR-Amplifizierung von Moleküle, die an den Liganden an der Säule gebunden haben, Ellington und Szostak (1990), ab-

geschätzt werden, dass eines aus  $10^{10}$  RNA-Molekülen in einer solchen Weise gestaltet ist, dass es an einen gegebenen Liganden bindet. DNA-Moleküle mit solchem Liganden-bindenden Verhalten sind isoliert worden (Ellington und Szostak, 1990; Bock et al., 1992).

#### MEDIKAMENTENDESIGN MIT HILFE DES COMPUTERS

**[0035]** Die Computer-Modulierungstechnologie erlaubt die Visualisierung der dreidimensionalen atomaren Struktur eines ausgewählten Moleküls und das rationale Design von neuen Verbindungen, die mit dem Molekül interagieren werden. Das dreidimensionale Konstrukt hängt typischerweise von Daten aus Röntgenkristallografieanalysen oder NMR-Bildgebungsverfahren des ausgewählten Moleküls ab. Die molekulare Dynamik benötigt Kraftfeld-daten. Die grafischen Systeme des Computers ermöglichen eine Vorhersage, wie sich eine neue Verbindung mit einem Zielmolekül verbinden wird, und ermöglichen eine experimentelle Manipulierung der Strukturen der Verbindung und des Zielmoleküls, um die Bindungsspezifität zu perfektionieren. Die Vorhersage darüber, wie die Molekül-Verbindungsinteraktion sein wird, wenn geringfügige Änderungen in einem oder beiden durchgeführt werden, benötigt Molekular-Mechanik-Software und Computer mit intensiver Rechenkapazität, die für gewöhnlich mit anwenderfreundlicher, Menü-bedienten Schnittstellen zwischen dem molekularen Designprogramm und dem Verwender gekoppelt sind.

**[0036]** Beispiele molekulare Modellierungssysteme sind die CHARMM und QUANTA-Programme, Polygen Corporation, Waltham, MA. CHARMM führt eine Energieminimierung und Molekulardynamik-Funktion durch. QUANTA leistet die Konstruktion, die grafische Modellierung und Analyse der molekularen Struktur. QUANTA erlaubt die interaktive Konstruktion, Modifizierung, Visualisierung und Analyse des Verhaltens von Molekülen untereinander.

**[0037]** Eine Anzahl an Artikeln gibt einen Überblick über die Computermodellierung von Medikamenten, die mit spezifischen Proteinen interagieren, wie beispielsweise Rotivinen, et al., 1988 *Acta Pharmaceutica Fennica* 97, 159-166; Ripka, *New Scientist* 54-57 (16. Juni 1988); McKinaly und Rossmann, 1989 *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 11-122; Perry und Davies, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design S. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis und Dean, 1989 *Proc. R. Soc. Lond.* 236, 125-140 und 141-162; und im Hinblick auf einen Modellrezeptor für Nucleinsäurebestandteile, Askew, et al., 1989 *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1082-1090. Weitere Computerprogramme, die Chemikalien durchmustern und grafisch darstellen sind von Unternehmen wie z.B. BioDesign, Inc., Pasade-

na, CA., Allelix, Inc., Mississauga, Ontario, Kanada und Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario, zu beziehen. Obwohl diese primär für die Anwendung von Medikamenten entworfen sind, die für bestimmte Proteine spezifisch sind, können sie angepasst werden, um Medikamente zu entwerfen, die spezifisch für Regionen der DNA oder RNA sind, sobald diese Region identifiziert ist. Obwohl sie oben mit Bezugnahme auf den Entwurf und die Erzeugung von Verbindungen beschrieben wurden, die die Bindung verändern, könnte man ebenfalls Bibliotheken bekannter Verbindungen auf Verbindungen, die Inhibitoren oder Aktivatoren sind durchmustern, einschließlich natürlicher Produkte oder synthetischer Chemikalien, und biologisch aktiver Materialien, einschließlich Proteine.

#### ERZEUGUNG VON NUCLEINSÄUREREGULATOREN

**[0038]** Nucleinsäuremoleküle, die die 5'-regulatorischen Sequenzen der Rezeptorgene enthalten, können verwendet werden, um die Genexpression in vivo zu regulieren oder inhibieren.

**[0039]** Vektoren, einschließlich sowohl Plasmide und eukaryontischer viraler Vektoren können verwendet werden, um ein bestimmtes rekombinantes Genkonstrukt der 5'-flankierenden Region abhängig von der Präferenz und der Beurteilung des Fachmanns (siehe z.B. Sambrook et al., Kapitel 16) in Zellen zu exprimieren. Des weiteren ermöglichen eine Anzahl viraler und nicht-viraler Vektoren die Einschleusung von Nucleinsäuresequenzen in vivo (siehe z.B. Mulligan, 1993 *Science*, 260, 926-932; US-Patent Nr. 4,980,286; US-Patent Nr. 4,868,116; durch Bezugnahme hierin eingeschlossen). Eine Anzahl an Liefersystemen sind entwickelt worden, in denen Nucleinsäure in kationische Liposomen verkapselt wird, die einem Säuger intravenös injiziert werden können. Dieses System ist verwendet worden, um DNA in die Zellen vieler Gewebe adulter Mäuse einzuschleusen, einschließlich des Endothels und Knochenmarks (siehe z.B. Zhu et al., 1993 *Science* 261, 209-211; durch Bezugnahme hierin eingeschlossen). Die 5'-flankierenden Sequenzen des Rezeptorgens können ebenfalls verwendet werden, um die Expression des Rezeptors oder von GIP zu verändern. Eine Sequenz, die komplementär zum mRNA-Transkript des Rezeptorproteins ist, welches normalerweise in der Zelle gefunden wird, wird hergestellt. Dieses AntiSense-RNA-Transkript der inserierten DNA kann sich dann mit dem normalen mRNA-Transkript basenpaaren, das in der Zelle gefunden wird, und dadurch Verhindern, dass die mRNA translatiert wird. Es ist natürlich notwendig, Sequenzen der 5'-flankierenden Region auszuwählen, die stromabwärts der Transkriptionsstellen des Rezeptorproteingens liegen, um sicherzugehen, dass die Antisense-RNA komplementäre Sequenzen

enthält, die auf der mRNA vorhanden sind.

**[0040]** Antisense-RNA kann ebenfalls *in vitro* erzeugt werden, und dann in Zellen inseriert werden. Oligonucleotide können mit einem automatischen Synthesegerät synthetisiert werden (z.B. Modell 8700 des automatisches Synthesegeräts von Milligen-Bioscience, Burlington, MA oder ABI Modell 380B). Zusätzlich wurde bei Antisense-Deoxyoligonucleotiden gezeigt, dass sie wirksam zur Inhibition der Gentranskription und viralen Replikation sind (siehe z.B. Zamecnik et al., 1978 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 280-284; Zamecnik et al., 1986 Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 4143-4146; Wickstrom et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1028-1032; Crooke, 1993 FASEB J. 7, 533-539. Die Inhibition der Expression eines Gens durch Antisense-Oligonucleotide ist möglich, wenn die Antisense-Oligonucleotide modifizierte Nucleotide enthalten (siehe z.B. Offensperger et al., 1993 EMBO J. 12, 1257-1262 (in vivo Inhibition der viralen Replikation von Enten-Hepatitis B und der Genexpression durch Antisense-Phosphorothioat-Oligodeoxynucleotide); Rosenberg et al., PCT WO 93/01286 (Synthese von Schwefelthioat-Oligonucleotiden); Agrawal et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7079-7083 (Synthese von Antisense-Oligonucleotid-Phosphoramidaten und -Phosphorothioaten, um die Replikation des menschlichen Immundefizienzvirus-1 zu inhibieren; Sarin et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7448-7794 (Synthese von Antisense-Methylphosphonat-Oligonucleotiden); Shaw et al., 1991 Nucleic Acids Res 19, 747-750 (Synthese von 3'-Exonuclease-resistenten Oligonucleotiden, die 3'-terminale Phosphoramidat-Modifizierungen enthalten); durch Bezugnahme hierin eingeschlossen).

**[0041]** Die Sequenzen der 5'-flankierenden Region des Rezeptorproteingens kann ebenfalls in der Triple-Helix (Triplex)-Gentherapie verwendet werden. Oligonucleotide, die komplementär mit den Genpromotorsequenzen auf einem der Stränge der DNA sind, haben sich als an den Promotor und den regulatorischen Sequenzen bindend herausgestellt, um so örtlich Dreifach-Nucleinsäurehelices zu bilden, die die Transkription des Gens blockieren (siehe z.B. 1989 Maher et al., Science 245, 725-730; Orson et al., 1991 Nucl. Acids Res. 19, 3435-3441; Postal et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8227-8231; Cooney et al., 1988 Science 241, 456-459; Young et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10023-10026; Duval-Valentin et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504-508; 1992 Blume et al., Nucl. Acids Res. 20, 1777-1784; 1992 Grigoriev et al., J. Biol. Chem. 267, 3389-3395).

**[0042]** Verfahren zum Herstellen oder Synthetisieren von Oligonucleotiden sind im Fachgebiet gut bekannt. Solche Verfahren reichen von standardisieren enzymatischen Verdau, gefolgt von einer Nucleotid-

fragmentisolierung (siehe z.B. Sambrook et al., Kapitel 5, 6) bis zu rein synthetischen Verfahren, z.B. durch das Cyanoethylphosphoramidit-Verfahren unter Verwendung eines Milligen oder Beckman Systems 1Plus DNA-Synthetisierer (siehe ebenfalls Ikuta et al., in Ann. Rev. Biochem. 1984 53, 323-356 (Phosphotriester- und Phosphitriesterverfahren); Narang et al., in Methods Enzymol., 65, 610-620 (1980) (Phosphotriesterverfahren).

#### Herstellung VON GIP ODER GIP-REZEPTORPROTEINFRAGMENTEN

**[0043]** Verbindungen, die wirksam sind die Bindung zu verändern oder die Bindung von GIP an den Rezeptor nachahmen, können ebenfalls aus Fragmenten des Rezeptorproteins oder von GIP bestehen, welche rekombinant exprimiert werden und durch einen enzymatischen Verdau gespalten werden oder von einer Sequenz exprimiert werden, die ein Peptid von weniger als der vollständigen Länge des Rezeptorproteins oder GIPs kodiert. Es ist eine Routineangelegenheit, geeignete Rezeptorproteinfragmente herzustellen, Tests für die Bindung zu machen und diese zu verwenden. Die bevorzugten Fragmente sind menschlichen Ursprungs, um die potentiellen immunologischen Reaktionen zu minimieren. Die Peptide können fünf bis acht Aminosäuren kurz sein und durch Standardtechniken leicht hergestellt werden. Sie können modifiziert sein, um die Halbwertszeit *in vivo* zu verlängern, indem eine chemische Modifizierung der Aminosäuren durchgeführt wird, oder durch die Anhängung an ein Trägermolekül oder eine träge Substanz. Synthetische Aminosäurepeptide können durch Phasenseynthese hergestellt werden, beschrieben in J. Merrifield, 1964 J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 und verwendet in dem US-Patent Nr. 4,792,525, und beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,244,946, wobei eine geschützte alpha-Aminosäure an ein geeignetes Harz gekoppelt wird, um die Synthese eines Peptids zu initiieren, das am C-Terminus des Peptids beginnt. Weitere Verfahren zur Synthese sind beschrieben in den US-Patenten Nr. 4,305,872 und 4,316,891. Das Peptid kann auch als pharmazeutisch annehmbares Säure- oder Basen-Additionssalz verabreicht werden, welches durch die Umsetzung mit anorganischen Säuren, wie beispielsweise Salzsäure, Hydrobromsäure, Perchlorsäure, Salpetersäure, Thiocyanosäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure, und organische Säuren, wie beispielsweise Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glycolsäure, Milchsäure, Propanonsäure, Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure und Fumarsäure, oder durch die Umsetzung mit einer anorganischen Base, wie beispielsweise Natriumhydroxid, Ammoniumhydroxid, Kaliumhydroxid, und organischen Basen, wie beispielsweise Mono-, Di-, Trialkyl- und Arylamine und substituierten Ethanolaminen.

**[0044]** Peptide, die Cyclopropylaminosäuren enthalten, oder Aminosäuren, die auf ähnliche Weise derivatisiert wurden, können ebenfalls verwendet werden. Diese Peptide behalten ihre ursprüngliche Aktivität haben in vivo aber eine gesteigerte Halbwertszeit. Methoden, die zum Modifizieren von Aminosäuren bekannt sind und ihre Verwendung, sind den Fachleuten im Gebiet bekannt, z.B. beschrieben in US-Patent Nr. 4,629,784 an Stammer.

#### HERSTELLUNG BLOCKIERENDER ANTIKÖRPER

**[0045]** Antikörper gegen den GIP-Rezeptor können ebenfalls verwendet werden, um die Bindung von GIP an seinen Rezeptor zu ändern oder zu regulieren; anti-idiotypische Antikörper können verwendet werden, um das Peptid zu mimieren. Blockierende Antikörper, die gegen den N-terminalen Bereich des GIP-Rezeptors hergestellt wurden, welcher in [Fig. 6](#) eingekreist ist, sind als Inhibitoren der GIP-Rezeptoraktivierung nützlich. Antikörper können polyklonal, monoklonal oder Fragmente sein, die ihre Bindungsspezifität bewahrt haben sowie rekombinante Fragmente. Humanisierte Antikörper können gemäß Standardverfahren, die den Fachleuten bekannt sind, hergestellt werden.

**[0046]** Antikörper werden durch Standardtechniken, unter Verwendung von humanen oder tierischen Rezeptorproteinen hergestellt. Antikörper werden typischerweise durch die Immunisierung eines Tieres unter Verwendung eines Adjuvans, wie beispielsweise Freund-Adjuvans, in Kombination mit einer immunogenen Menge des verabreichten Proteins über einen Zeitraum von Wochen in zwei- bis dreiwöchigen Intervallen hergestellt, dann aus dem Serum isoliert, oder verwendet, um Hybridome herzustellen, die die Antikörper in Kultur exprimieren. Da die Methoden zum Immunisieren von Tieren Antikörper hervorbringen, die nicht humanen Ursprungs sind, könnten die Antikörper eine Nebenwirkung hervorrufen, wenn sie an Menschen verabreicht werden. Verfahren zum "Humanisieren" von Antikörpern oder dem Erzeugen weniger immunogener Fragmente nicht-humaner Antikörper sind gut bekannt. Ein humanisierter Antikörper ist einer, bei dem nur die Antigen-Erkennungsstellen, oder die Komplementaritäts-bestimmenden, hypervariablen Regionen (CDRs) nicht-menschlichen Ursprungs sind, während alle Rahmenbereiche (FR) der variablen Domänen die Produkte menschlicher Gene sind. Diese "humanisierten" Antikörper stellen einen geringeren xenografischen Abstoßungsstimulus dar, wenn sie in einen menschlichen Empfänger eingeschleust werden.

**[0047]** Das CDR-Grafting-Verfahren das von Daugherty, et al., (1991) Nucl. Acids Res., 19:2471-2476 beschrieben wurde, wird durch die Bezugnahme hiermit eingefügt und kann verwendet werden, um einen ausgewählten monoklonalen Antikörper aus der

Maus zu humanisieren. Kurz gefasst, wird die variable Region der DANN eines ausgewählten tierischen rekombinanten anti-idiotypischen ScFv durch das Verfahren von Clackson, T., et al (1991) Nature, 352:624-688 durch die Bezugnahme hiermit eingefügt, sequenziert werden. Unter Verwendung dieser Sequenz werden tierische CDRs von tierischen Rahmenbereichen (FR) aufgrund der Lokalisierungen der CDRs in bekannten Sequenzen tierischer variabler Gene unterschieden. Kabat, H.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. Band (U.S. Dept. Health and Human Services, Bethesda, MD, 1987). Sobald die tierischen CDRs und FR identifiziert sind, werden die CDRs auf den Rahmen der variablen Region einer menschlichen schweren Kette unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide und der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Rekombination aufgepfropft. Die Kodons für die tierischen CDRs der schweren Kette, wie auch die Rahmen für die variable Region der menschlichen schweren Kette, werden durch vier (jeweils 100 Basen lange) Oligonucleotide gebaut. Unter Verwendung der PCR, wird eine aufgepfropfte DNA-Sequenz von 400 Basen gebildet, die das rekombinante tierische CDR und die schützende menschliche schwere Kette FR kodiert.

**[0048]** Der immunogene Stimulus, der durch die monoklonalen Antikörper bewirkt wird, die auf diese Weise produziert wurden, kann weiter durch die Verwendung von Pharmacia's (Pharmacia LKB Biotechnology, Schweden) "rekombinantes Phagen-Antikörper-System" (RPAS) gesenkt werden, welches einzelkettige Fv-Fragmente (ScFv) erzeugt, die die vollständige Antigenbindende Domäne des Antikörpers einbinden. In den RPAS werden die Gene der variablen schweren und leichten Kette des Antikörpers getrennt voneinander aus Hybridom-mRNA amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert. Die Domänen der schweren und leichten Kette werden auf dem gleichen Polypeptid auf der gleichen Polypeptidkette coexprimiert, nachdem diese mit einer kurzen Linker-DNA verbunden werden, die ein flexibles Peptid kodiert. Dieser Zusammenbau erzeugt ein einzelkettiges Fv-Fragment (ScFv), das die vollständige Antigenbindende Domäne des Antikörpers einschließt. Verglichen mit dem intakten monoklonalen Antikörper schließt der rekombinante ScFv eine beträchtlich geringere Anzahl an Epitopen ein, und stellt dadurch einen viel schwächeren immunogenen Stimulus dar, wenn er dem Menschen injiziert wird.

#### FORMULIERUNGEN

**[0049]** Therapeutische Zusammensetzungen können durch die Formulierung des GIPs zur Verabreichung mittels Injektion, entweder intravenös, intramuskulär oder subkutan, in einen geeigneten Träger, wie beispielsweise einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung oder einer Formulierung für die kontrollierte Freisetzung, z.B. Mikropartikel oder Gele, her-

gestellt werden, welche GIP über einen Zeitraum freisetzen. In einer bevorzugten Formulierung zur oralen Verabreichung wird das Peptid oder Peptidanalogen in einer Kapsel, Tablette oder einer enterisch beschichteten Formulierung zur Verabreichung in den Darm verabreicht, wo es freigesetzt wird. Es gibt viele bekannte Formulierungen zur kontrollierten Freisetzung, z.B., in denen ein Medikament unter Verwendung bekannter Techniken, wie beispielsweise Sprühtrocknen, Lösungsmittelverdampfen oder Emulgierung in einem polymeren Material, beispielsweise Cellulose, Polyhydroxysäuren, beispielsweise Poly(milchsäure)-Poly(glycolsäure) oder nicht-biodegradierbaren Materialien, wie beispielsweise Ethylenvinylacetat oder Silicon verkapselt werden. Ein Übersichtsartikel über Methoden Liposomen herzustellen, stammt von G. Gregoriadis, Kapitel 14. "Liposomen", Drug Carriers in Biology and Medicine, S. 287-341 (Academic Press, 1979). Mikrosphären, die aus Polymeren oder Proteinen gebildet werden, sind den Fachleuten in dem Gebiet bekannt und können zur Passage durch den Gastrointestinaltrakt direkt in den Blutfluss maßgeschneidert werden. Alternativ dazu kann die Verbindung eingeschlossen werden, und die Mikrosphären, oder eine Zusammensetzung aus Mikrosphären für eine langsame Freisetzung über einen Zeitraum implantiert werden, der von Tagen bis zu Monaten reicht. Siehe z.B. US-Patente Nr. 4,906,474, 4,925,673 und 3,625,214. GIP kann auch topisch durch Inhalieren, oder durch die Verabreichung über eine Schleimhaut (nasal, rektal oder vaginal) oder mit Hilfe eines transdermalen Pflasters verabreicht werden.

#### THERAPEUTISCHE ANWENDUNGEN

**[0050]** Die Beispiele zeigen, dass GIP-Rezeptoren in Knochenzellen, einschließlich Osteoblasten und Osteocyten im Knochen selbst, sowie auch in Osteoblasten-artigen Osteosarcoma-Zelllinien vorhanden sind. Diese Zelllinien reagieren auf GIP auf physiologischen Niveaus mit metabolischen Reaktionen, die von differenzierten Knochenzellen aufgewiesen werden – nämlich Kollagensynthese und alkalische Phosphataseaktivität. Die Ergebnisse zeigen an, dass GIP verwendet werden kann, um die Nährstoffaufnahme in den Darm mit der Nährstoffablagerung in einer Vielzahl peripherer Gewebe einschließlich des Knochens koordinieren kann. Die einfachste Erklärung für die anabole Wirkung von GIP auf Knochenzellen in vitro wäre, dass GIP cAMP erhöht (wie PTH und PGE<sub>2</sub>) und dieses die IGF-1-Freisetzung stimuliert, welches dann wiederum die Knochenbildung stimuliert. Die Wirkungen in vivo könnten mit der GIP-stimulierten Insulin- und Amylinsekretion zusammenhängen, welche wiederum die Knochenbildung stimulieren. Die einfachste Erklärung für die antiresorptiven Wirkungen liegt darin, dass GIP die IL-6-Sekretion inhibiert, die entweder durch PTH oder den hypogonaden Zustand erhöht wird.

**[0051]** Zweifellos haben Insulin und Amylin an der Wirkung GIP auf den Knochen teil, jedoch lässt diese Tatsache vermuten, dass GIP-Rezeptoren in Knochenzellen von höherer Affinität und größerer Anzahl sind als solche die in anderen Geweben vorhanden sind, wie beispielsweise in Pankreas, so dass der Knochen ein hoch spezifisches Ziel der Wirkung von GIP ist. Die Tatsache, dass GIP die Aktivität der alkalischen Phosphatase erhöht (siehe den Abschnitt mit den präliminären Ergebnissen) in einer preosteoblasten Zelllinie, legt nahe, dass GIP eine Rolle bei der Differenzierung der Osteoblastenvorläufer spielt. Wie oben erwähnt wurde, können sich Osteoblastenvorläuferzellen (Fibroblasten CFU) in Muskelzellen, Osteoblasten, Chondrocyten oder Adipocyten entwickeln. Die letztgenannten drei Zelltypen exprimieren GIP-Rezeptoren. Daher wird hypothetisch angenommen, dass GIP bei der Differenzierung von Osteoblasten, deren Reifung und Funktion eine Rolle spielt, und dass GIP gemeinsam mit PTH beim Regulieren der Knochenmatrixsynthese mitwirkt.

**[0052]** Die hier beschriebenen Zusammensetzungen können verwendet werden, um Osteoporose zu behandeln oder zu verhindern. Osteoporose ist eine Erkrankung, die durch ein Ungleichgewicht zwischen der Knochenbildung und dem Abbau besteht, was zu einer Abnahme der Knochenmasse führt. Das Altern ist vorherrschend mit einer Abnahme der Knochenbildung assoziiert, statt mit einem Knochenverlust, und der daraus resultierende Netto-Knochenverlust ist mit einem erhöhten Risiko für Frakturen assoziiert. Die Patientenpopulation im Veterans Medical Center ist dem Osteoporoserisiko besonders ausgesetzt. Da Osteoporose bei Frauen nach der Menopause häufiger ist, hat diese Erkrankung bei Männern weniger Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Ältere Männer mit Risikofaktoren aufgrund ihrer Lebensweise, wie beispielsweise Rauchen und Alkoholgenuß bei Männern mit den damit verbundenen Erkrankungen, wie beispielsweise chronisch obstruktiver Pulmonarerkrankungen, rheumatoider und nach einer Nierentransplantation auftretende Arthritis (durch Corticosteroide) haben jedoch ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung von Osteoporose. Die daraus hervorgehenden Faktoren, die mit der Osteoporose assoziiert sind, sind ein Hauptgrund für Morbidität, was zu einer geringeren Lebensqualität und einer Hauptausgabenquelle für das Medical Center führt. Die gegenwärtige Therapie bei Osteoporose ist vorzugsweise die antiresorptive Therapie, d.h. weiteren Knochenabbau zu verhindern und wenige Medikamente (ausgenommen die bald freigegebenen Nebenschilddrüsenhormon-Injektionen, vielleicht auch Östrogen bei Frauen, und Fluorid) sind in der Lage, die Bildung neuer Knochen zu erhöhen.

**[0053]** Knochenbildung und -wachstum ist ein komplizierter Prozess, der aus Veränderungen des Knochendurchmessers und der Form besteht. Dieser

Prozess tritt durch die sequentielle Aktivierung von zwei Zelltypen auf: Osteoclasten und Osteoblasten. Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs, welche aus Fibroblasten-Kolonien bildenden Einheiten stammen, wie auch Chondrocyten, Muskelzellen und Adipocyten. Osteoblasten sind in der Lage, eine Vielzahl von Faktoren zu sezernieren (beispielsweise Interleukin-6 und 11; MCS-F und GM-CSF), welche die Entwicklung von Osteoblasten beeinflussen. Osteoclasten entwickeln sich aus Granulocyten-Macrophagen-Kolonie-bildenden Einheiten und diese Entwicklung wird durch eine Vielzahl an Faktoren moduliert, einschließlich der Interleukine 1, 3, 6 und 11. Vor kurzem hat sich beträchtliches Interesse auf Interleukin-6 fokussiert, das dessen Produktion durch Osteoblasten durch PTH und Vitamin D stimuliert wird, und aufgrund dessen möglicher Beteiligung bei verschiedenen Erkrankungen, einschließlich primärem Hyperparathyroidismus, multiplen Myelomen, rheumatoider Arthritis, Paget's Erkrankung und hypogonadischer Osteoporose. Die Interleukin-6-Produktion durch Osteoblasten wird durch Sexualhormone (Androgene und Östrogene) reguliert, die auf den Il-6-Promotor einwirken. Die Rolle von Il-6 (im Gegensatz zu Il-11) in der normalen osteoclastischen Funktion ist unklar, aber bei einigen pathologischen Zuständen ist der Il-6-Rezeptor hochreguliert und Il-6 kann dann seine Wirkung entfalten. In Knochenzellen, die aus hypogonadischen Mäusen stammen, sind gp80, gp130 und Il-6-mRNA im Vergleich mit normalen Zellen alle erhöht. Daher ist es möglich, dass Il-6 eine wichtige Rolle beim beschleunigten Knochenverlust spielt, der mit der Osteoporose nach der Menopause zusammenhängt.

**[0054]** GIP ist ein einzigartiges Peptidhormon, das Rezeptoren sowohl auf Osteoblasten und Osteoclasten hat (im Gegensatz zu PTH, welches nur Rezeptor auf Osteoblasten hat). Daher bietet GIP eine alternative Therapie zur Behandlung der Osteoporose.

**[0055]** Die GIP-Formulierungen werden in einer Menge verabreicht, die eine therapeutische Reaktion hervorrufen, welche unter Verwendung von Tests, die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, gemessen werden kann, wie in den Beispielen gezeigt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform werden GIP oder Analoga davon, oder Verbindungen, die die Menge an endogenem GIP erhöhen, an Frauen oder Männer mit dem Risiko für, oder charakterisiert durch die Symptome von Osteoporose, in einer wirksamen Menge verabreicht, um die Synthese von Typ-I-Kollagen und/oder die Knochendichte zu erhöhen. Alternativ dazu können GIP-Inhibitoren verwendet werden, um die Knochenabsorption zu fördern.

#### BEISPIELE

**[0056]** Die vorliegende Erfindung wird weiter durch Bezugnahme auf die folgenden nicht-limitierenden

Beispiele verstanden. Um die physiologische Rolle von GIP beim normalen Knochenmetabolismus zu definieren, wurden vier Arten von Experimenten durchgeführt: 1) STUDIEN AM GIP-REZEPTOR. Eine Vielzahl primärer und transformierter Osteoblasten-artiger Zellen wurden auf das Vorhandensein von GIP-Rezeptoren untersucht, wobei ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die extrazelluläre Domäne des GIP-Rezeptors hergestellt wurde, und in anfänglichen Studien wurde sowohl der Antikörper und die Expression und Lokalisierung von GIPR in Rattenknochen und Osteoblasten-artigen Zellen charakterisiert. 2) IN VIVO STUDIEN DER GIP-SIGNAL-WEGE. Die Wirkung von GIP auf das cytosolische Calcium und cAMP in Zellen wurde bestimmt.

**[0057]** 3) STUDIEN DER GIP-WIRKUNG. Die Wirkungen von GIP auf die Kollagen-Typ-I-Synthese durch Osteoblasten- und die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden untersucht.

**[0058]** 4) CHARAKTERISIERUNG DER WIRKUNG VON GIP IN TIERMODELLEN IN VIVO: Es wurden Experimente durchgeführt, um die Frage zu untersuchen, was die physiologische Rolle von GIP in vivo ist. Zwei Modelle wurden verwendet: Eine Maus, der die Eierstöcke entfernt wurden und die Osteoporose entwickelt, und eine transgene Maus, die GIP überexprimiert. In beiden Modellen erhöhte oder bewahrte GIP die Knochendichte.

**[0059]** Die Daten zeigen, dass GIP-Rezeptoren umfangreich in Knochen und in Zellen, die aus Knochen stammen, exprimiert werden, und dass GIP die Signaltransduktionsvorgänge in diesen Zellen moduliert. Die Beispiele zeigen, dass GIP-Rezeptoren in normalem Rattenknochen, in Osteoblasten und Osteocysten, und in etablierten Osteoblasten-artigen Zelllinien vorkommen. Das Vorkommen dieser Rezeptoren in Knochen und in Osteoblasten-artigen Zellen wurde auf zwei Arten gezeigt: (1) mRNA für den GIP-Rezeptor wurde in Zelllinien nachgewiesen und durch in situ Hybridisierung in Osteoblasten und Osteocysten im Knochen (Daten werden nicht gezeigt) und (2) das Protein wurde sowohl durch Western-Blot-Analyse und durch indirekte Immunfluoreszenz im Knochen und in Zelllinien beobachtet. Des Weiteren ist das Vorkommen von GIP-Rezeptoren in Knochenzellen spezifisch, da ein verwandter Rezeptor für ein weiteres Incretinhormon, Glucagon-artiges Peptid-1 (GLP-1), nicht gefunden wurde. Zusätzlich scheinen die Rezeptoren für GIP funktional zu sein, da sie das Hormon mit einer Affinität von ungefähr 0,5 nM binden – einem Wert, der vergleichbar ist mit dem der zuvor bei Pankreas- $\beta$ -Zellen beobachtet wurde (0,3 bis 30 nM, abhängig vom Zellsystem und der Quelle von GIP (Mensch gegenüber Schwein). Zusätzlich liegt diese Bindungsaffinität im physiologischen Bereich der Konzentration von GIP, die postprandial im Serum erreicht werden.

**[0060]** Die Funktionalität der GIP-Rezeptoren bei aus Osteoblasten stammenden Zellen wurde ebenfalls durch ihre Fähigkeit bewiesen, die Signalleitungswege zu verbinden. Wie andere verwandte Sieben-Transmembran-Rezeptoren scheint der GIP-Rezeptor in Osteoblasten-artigen Zellen mit dem cAMP und dem Phosphoinositid-Signalweg verbunden zu sein. Tatsächlich zeigte die Phosphoinositid-Reaktion eine stärkere Leistung auf, da eine signifikante Wirkung bei 0,1 nM GIP gegenüber 1 nM bei Änderungen des cAMP-Gehalts beobachtet wurde. Die starken Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentrationen, die mit den geringeren Dosen an GIP in Osteoblasten-artigen Zellen gesehen wurden, waren aufgrund vorheriger Studien unerwartet, die mit Pankreas- $\beta$ -Zelllinien durchgeführt wurden. Obwohl von GIP berichtet wurde, dass es den extrazellulären Calciumeinfluss erhöht, und die Calciummobilisierung aus intrazellulären Speichern Pankreasinseln und -Zelllinien induziert, sind Erhöhungen des cAMP-Gehalts als Hauptzwischenprodukt der Incretinwirkung von GIP auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion angesehen worden.

**[0061]** Die GIP-Rezeptoren waren ebenfalls in der Hinsicht funktional, dass ihre Besetzung zelluläre Reaktionen hervorrief. Das bedeutet, dass eine Behandlung mit GIP mit GIP-Konzentrationen, die nur 0,1 nM betragen, was klar im physiologischen Bereich liegt, zu einer erhöhten Kollagen-Typ-1-mRNA-Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase führte. Veränderungen der Kollagen-Typ-1-Expression benötigten höhere Konzentrationen an GIP (höher als oder gleich 1 nM), die leicht über dem normalen physiologischen Bereich liegen.

**[0062]** Zusammengefasst beweisen die in vitro Studien, dass die GIP-Rezeptoren im Knochen und in aus Knochen stammenden Zellen vorhanden sind und sowohl in vitro und in vivo Studien beweisen, dass die Stimulierung dieser Zellen mit GIP zu Erhöhungen der intrazellulären Calciumgehalts, des zellulären cAMP-Gehalts, der Typ-1-Kollagen-Expression und der Aktivität der alkalischen Phosphatase führt.

#### (1) STUDIEN DER WIRKUNG VON GIP UND SEINER REZEPTORS

**[0063]** Diese Studien beweisen, dass der GIP-Rezeptor auf einer Vielzahl Osteoblasten-artiger Zellen vorhanden ist.

#### BEISPIEL 1: EXPRESSION VON GIP-REZEPTOREN IN KNOCHENZELLEN

**[0064]** Die Expression von GIP-Rezeptor-mRNA in Sektionen von Ratten-Cuboideum und Ratten-Pankreas wurde zur Verwendung in einer in situ Hybridisierung mit einer Antisense-Digoxigenin-markierten GIP-Rezeptor-Sonde auf Sektionen des Cuboideums

adulter Sprague-Dawley-Ratten durchsucht. Die Hintergrundniveaus wurden als Hybridisierung mit einem Digoxigenin-markierten GIP-Rezeptor-Sense-Transkript in kuboidalen Osteocyten und der Wachstumszone gemessen. Eine 400 Nucleotide lange Digoxigenin-markierte RNA-Probe, die von Maus-GIP-Rezeptor-cDNA transkribiert wurde, wurde in der Hybridisierung verwendet.

#### METHODEN UND MATERIALIEN

**[0065]** Kurz gefasst, wurden die Ratten anästhesiert und mit 4 Paraformaldehyd und mit 0,2 % Glutaraldehyd transkardial perfundiert. Das Cuboideum wurde entnommen und in 4 Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Die Knochen wurden in 10 EDTA für 4 bis 6 Tage dekalzifiziert, in Ethanol und Xylen dehydriert und in Paraffin eingebettet. 7  $\mu$ m dicke Schnitte wurden abgeschnitten, deparaffiniert und rehydriert. Die Schnitte wurden mit Proteinase K behandelt und in 4 Paraformaldehyd post-fixiert. Die Hybridisierung wurde bei 70°C über Nacht in einer Lösung durchgeführt, die 50 Formamid, 5 $\times$ SSC, 1 % SDS, 5 mg/ml Heparin und 50 mg/ml Hefe-tRNA enthält. Die Waschschriffe nach der Hybridisierung waren bei 70°C in 2 $\times$ SSC, 1 % SDS für 1 Stunde, dann 1 $\times$ SSC, 1 % SDS für 1 Stunde und 0,5 $\times$ SSC, 1 % SDS für 1 Stunde. Die Schnitte wurden mit einem mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Antidigoxigenin-Antikörper für 2 Stunden inkubiert und über Nacht in PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde in NBT und X-Phosphat durchgeführt (Boehringer Mannheim). Eine positive Anfärbung führt zu blauer Farbe.

#### ERGEBNISSE

**[0066]** GIP-Rezeptor-Message und -Protein werden von Osteoblasten exprimiert.

**[0067]** Rezeptor-mRNA wurde in zwei kultivierten humanen Osteoblasten-Zelllinien, SaOS2 und MG63 nachgewiesen. Da die mRNA-Expression nicht immer mit der Proteinexpression korreliert, wurde die Verteilung des GIP-Rezeptorproteins untersucht. Ein Affinitäts-gereinigter polyklonaler Antikörper gegen ein Peptid, das einen Teil der N-terminalen extrazellulären Domäne des menschlichen GIP-Rezeptors umfasst, wurde hergestellt und diente dazu, die Proteinexpression in einer Vielzahl von Zellen und Geweben mittels Western-Blot-Analyse zu beobachten. Als positive Kontrolle wurde ein rekombinantes bakteriell exprimiertes Protein, das dem Aminoterminus des GIP-Rezeptors entspricht, welcher an GST fusioniert wurde, exprimiert.

**[0068]** Drei Osteoblasten-artige Zelllinien (SaOS2, ROS 17/2.8 und MG63) enthalten eine einzelne immunreaktive Bande, die der vorhergesagten Größe des GIP-Rezeptors entspricht. Im Gegensatz dazu enthalten zwei Zelllinien, die dafür bekannt sind, das

sie den GIP-Rezeptor nicht enthalten (Hela und NIH 3T3-Fibroblasten) diese immunreaktive Bande nicht. Proteinextrakte aus mehreren Geweben normaler Sprague-Dawley-Ratten wurden hergestellt und mit dem GIP-Rezeptor-Antikörper mittels Western-Blot untersucht. Die gleiche immunreaktive 50 kD- Bande wurde in normalen Knochen der Ratte beobachtet. Zusätzlich waren auch der Pankreas, das Hirn und Herz positiv, welches Gewebe sind von denen zuvor beschrieben wurde, dass sie den GIP-Rezeptor enthalten, während die Milz, von der beschrieben wurde, dass sie den GIP-Rezeptor nicht enthält, keine immunreaktive Bande enthielt, was die Antikörperspezifität vermuten ließ.

**[0069]** Vier Arten an Knochenzellen – Osteoblasten, Osteoclasten, Osteocyten und Chondrocyten in der hypertrophischen Zone der Epiphysenwachstumsplatte wurden dahingehend gefunden, dass sie GIP-Rezeptortranskripte mittels in situ Hybridisierung exprimieren. Die Rezeptor-mRNA wird in zwei kultivierten Osteoblasten-Zelllinien, eine menschlichen Ursprungs (SaOS2) und die andere von der Ratte (ROS 17/2), sowie in isolierten Ratten-Osteoclasten exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde eine Message für Rezeptoren des Glucagon-artigen Peptids-1 (GLP-1), des anderen Haupt-"Incretin"-Hormons in dieser Zelllinie weder beobachtet, noch wurde dessen Expression von anderen beschrieben. R. V. Campos, et al., *Endocrinology* 134, 2156-2164 (1994). Dieses Hormon wird, wie GIP, von endokrinen Zellen des Dünndarms sezerniert, wirkt auf die  $\beta$ -Zellen ein und dessen Rezeptor ist ein Mitglied einer Unterklasse der Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren, der ebenfalls Nebenschilddrüsenhormon, Calcitonin, Corticotrophin-Freisetzungsfaktor, Glucagon, Bauchspeichel-Adenylate cyclase-aktivierendes Polypeptid, Vasoactives intestinales Peptid, Secretin und Wachstumshormon Freisetzungshormon einschließt.

**[0070]** Die Mengen an Message für GIPR waren in MG63-Zellen gegenüber SaOS2-Zellen 4,8-fach höher, was mit den Bindungsdaten übereinstimmt.

#### BEISPIEL 2: IMMUNFLUORESCENZSTUDIEN DER GIP-REZEPTOREXPRESSION IN KNOCHEN UND KNOCHENARTIGEN ZELLEN

**[0071]** Da die mRNA-Expression, die mittels in situ Hybridisierung identifiziert wird, nicht immer mit der Proteinexpression übereinstimmt, wurden weitere Studien unter Verwendung indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt, wobei ein Antikörper verwendet wurde, der gegen eine extrazelluläre Domäne des GIP-Rezeptors gerichtet ist.

**[0072]** Die Verteilung der GIP-Rezeptor-Immunfluoreszenz in Sektionen normaler Rattenknochen-Tibiae und in SaOs2-Zellen wurde unter Verwendung eines

polyklonalen Antikörpers gemessen, der in Kaninchen gegen ein synthetisches Oligopeptid erzeugt wurde, das einer extrazellulären Region der GIP-Rezeptorsequenz entspricht (Animal Pharm Services, Inc., Healdsburg, CA). Der Antikörper wurde affinitätsgereinigt und die Spezifität des Antikörpers durch Reagieren mit dem exprimierten GIP-Rezeptorprotein untersucht. Die Hintergrundmengen wurden als Immunfluoreszenz in Rattenknochen-Tibiae gemessen, wobei nur der CY3-markierte Sekundär-Antikörper verwendet wurde. Die Spezifität des Primär-Antikörpers wurde ebenfalls durch das kompetitive Ersetzen der GIP-Rezeptor-Primär-Antikörperbindung in SaOs2-Zellen mit einem Primär-Antikörper in Gegenwart eines Überschusses (140  $\mu$ g) des GIPR-Peptidantigens durchgeführt, welches als Antigen verwendet wurde, um den Primär-Antikörper herzustellen. Sektionen von Ratten-Vertebrae wurden geschnitten, fixiert und mit dem GIPR-Antikörper, wie dem Primär-Antikörper, untersucht, und dann mit der Peroxidase markiert. Gleiche Expressionsmuster wurden in Ratten-Tibiae gefunden. SaOS2-Zellen, die in Kultur gezüchtet wurden, wurden ebenfalls mit dem GIPR-Antikörper markiert (SaOs2-Zellen wurden mit dem Primär-Antikörper in Gegenwart eines Überschusses (140  $\mu$ g) des GIPR-Peptidantigens inkubiert, welches als Antigen verwendet wurde, um den Antikörper zu erzeugen. MG63-Zellen waren mit einem Markierungsmuster, das dem von SaOS2-Zellen ähnelt, ebenfalls stark positiv. Normale primäre menschliche Osteoblasten wurden ebenfalls auf GIPR untersucht.

#### MATERIALIEN UND METHODEN

##### Zellkultur

**[0073]** Die in diesem Bericht untersuchten Zelllinien schließen SaOS2, MG63, ROS 17/2.8, Hela und NIH 3T3-Fibroblasten ein. Normale primäre humane Osteoblasten wurden ebenfalls verwendet (Clonetics, San Diego, CA). Die Zellen wurden nach Eignung bis zur Konfluenz in MEM, RPMI oder DMEM gezüchtet (Bio Whittaker Inc., Walkersville, MD), welche mit 10%igem fötalen Kälberserum (v:v) (HyClone Laboratories, Inc.; Logan, UT), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 mg/ml) und Amphotericin B (3 mg/ml) ergänzt wurden und für 3 bis 7 Tage nach der Konfluenz verwendet. Für die Studien der Kollagen-Typ-I-Expression wurden SaOS2-Zellen in einem Glutamin-freien Medium gezüchtet, da wir gefunden haben, dass Glutamin die konstitutiven Kollagenexpressionsmengen erhöhte.

##### Immunoblot-Analysen:

**[0074]** Es wurde ein polyklonaler Antikörper in einem Kaninchen gegen das synthetische Oligopeptid, SKGQTAGELYQRWERYRREC, welche der extrazellulären Region der menschlichen GIP-Rezep-

tor-Proteinsequenz entspricht, die in [Fig. 6](#) gezeigt ist. Das Oligopeptid wurde mit KLH konjugiert, indem der Imject maleimid activated immunogen conjugation kit (Pierce, Rockford, IL) verwendet wurde, und die Kaninchen inokuliert (Animal Pharm Services, Inc., Heraldsburg, CA). Das Serum wurde mittels einer Oligopeptid-BSA vernetzten CNBr-Sepharose affinitätsgereinigt, und der Antikörper wurde mittels Western-Blot-Analyse an bakteriell exprimiertem GIP-Rezeptor-Protein untersucht. Die Spezifität des Primär-Antikörpers wurde durch das kompetitive Ersetzen der GIP-Rezeptor-Primär-Antikörperbindung in SaOS2-Zellen durch einen Primär-Antikörper in Gegenwart eines Überschusses (140 µg) des GIP-PR-Peptidantigens getestet, das verwendet wurde, um den Primär-Antikörper zu erzeugen.

#### Indirekte Immunfluoreszenz:

**[0075]** Für die Tierstudien wurden drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) geopfert und die Gewebe entfernt. Dieses Protokoll wurde vom Medical College of Georgia animal care committee (CAURE) gebilligt. Die Ratten wurden anästhesiert, transkardial mit 4 Paraformaldehyd und 0,2 % Glutaraldehyd perfundiert. Tibiae und Vertebrae wurden entnommen und über Nacht bei 4°C in 4 Paraformaldehyd fixiert. Die Knochen wurden in 10 % EDTA für 4 bis 6 Tage dekalzifiziert, in Ethanol und Xylen dehydriert und in Paraffin eingebettet. 7 µm dicke Schnitte wurden erstellt, deparaffiniert und rehydriert.

**[0076]** SaOS2- und MG63-Zellen wurden aus Glasdeckgläschen ausplattiert, für 48 Stunden in DMEM gezüchtet, welches mit 10 % fötalem Kälberserum ergänzt war, und mit eiskaltem 4%igen Paraformaldehyd-PBS (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,4) für 30 Minuten fixiert. Die Zellen wurden dann 3-mal für 5 Minuten in PBS gespült und in PBS + NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) für 15 Minuten überführt. Nach dem Spülen wurden die Zellen dann für 15 Minuten bedeckt mit PBS+BSA (100 mg/10 ml) (= "Blockierungspuffer"). Die Zellen wurden dann für 45 Minuten mit dem GIP-Antikörper in 500 µl PBS+BSA inkubiert. Die Zellen wurden gespült und dann mit dem Sekundär-Antikörper, Cy3-Ziege-anti-Maus-IgG (5 µl, Molecular Probes) und mittels Epifluoreszenz sichtbar gemacht (Zeiss Axiophot Mikroskop, Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY).

**[0077]** Für die immunohistochemische Lokalisierung wurden Analysen unter Verwendung des Vectastain-ABC-Peroxidasesystems mit 3,3'-Diaminobenzidin als Peroxidasesubstrat (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durchgeführt. Die entwickelten Deckgläser wurden in Ethanol dehydriert, in Xylen gespült und mit Vector-Hematoxylin gefärbt.

**[0078]** Konfluente Knochenzellen (500.000/Paar aus Spuren) wurden in eiskalte Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4) gegeben, und dann mittels Beschallung für 60 Sekunden in eiskaltem Homogenisierungspuffer (60 mM Trispuffer, pH 7,4, 0,25 M Sucrose, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol und Proteaseinhibitoren) aufgeschlossen. Die Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen (0,5 M Tris, pH 6,8, 4 % SDS, 20 Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau) und gekocht.

**[0079]** Die denaturierten Proteine wurden durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und mit affinitätsgereinigtem GIP-Rezeptor-Antikörper bei 1:250-Verdünnung inkubiert. Immunreaktive Banden wurden mit einem mit Meerrettichperoxidase konjugiertem sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Serum visualisiert und mit ECL entwickelt (Pierce, Rockford, IL).

#### Ergebnisse

**[0080]** In den Knochen normaler Ratten zeigten sowohl Osteocyten wie Osteoblasten eine intensive Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu zeigten Rattenknochen keine Zellmarkierung, wenn sie nur dem CY-3-markierten Antikörper inkubiert wurden. SaOS2-Zellen zeigten ebenfalls eine intensive nicht-nukleare Fluoreszenz, welche durch das Vorhandensein eines Überschusses an Antigen blockiert werden konnte, das zur Erzeugung des Antikörpers verwendet wurde. Dieses Ergebnis zeigt die spezifische Bindung des Antikörpers an den GIP-Rezeptor. MG63-Zellen zeigten ebenfalls eine intensive Fluoreszenz mit einem ähnlichen Muster wie bei SaOS2-Zellen. Als zusätzliche Kontrolle wurden MG63-Zellen nur mit dem Sekundär-Antikörper markiert, was die Spezifität des Primär-Antikörpers bewies.

**[0081]** Die Rezeptorproteinexpression wurde in allen der gleichen Knochenzelltypen beobachtet, die die Rezeptor-mRNA exprimieren. Diese Studien zeigen, dass die Verteilung der GIP-Rezeptoren im Knochen einzigartig, in der Hinsicht, dass Rezeptoren sowohl auf Knochen-resorbierenden Osteoblasten und Knochen-bildenden Osteoblasten sind. Im Gegensatz dazu sind Rezeptoren für die zwei gut charakterisierten Peptidhormone, die dafür bekannt sind, dass sie auf Knochen einwirken, nur auf einem dieser Zelltypen des Knochens vorhanden: der Nebenschilddrüsenhormon (PTH/PTHrP)-Rezeptor nur auf Osteoblasten, A. Abou-Samra, et al., Proc Natl Acad Sci USA 89, 2732-6 (1992), und der Calcitonin (CT)-Rezeptor nur auf Osteoclasten. S.R. Goldring, et al., Horm Metab Res 25, 477-80 (1993). So konnte man vorhersagen, dass GIP simultan wirkt, um die Knochenbildung zu stimulieren und die Knochenresorption zu inhibieren.

## 2) IN VITRO STUDIEN DER GIP-SIGNALWEGE:

## BEISPIEL 3: WIRKUNG VON GIP AUF CYTOSOLISCHES CALCIUM UND cAMP

**[0082]** Von Pankreas-Beta-Zellen, von denen bekannt ist, dass GIP-Rezeptoren vorhanden sind, wurde berichtet, dass GIP intrazelluläres Calcium sowohl durch den Anstieg des Calciumeinflusses durch Spannungs-empfindliche Calciumkanäle als auch durch die Mobilisierung aus internen Speichern steigert. Zusätzlich erhöht GIP zelluläres cAMP. D.h., dass sowohl PTH und GIP als ähnliche Signalwege aktivierend beschrieben wurden, obwohl PTH anti-anabolisch ist, während GIP in vitro anabolisch zu sein scheint. Um zu bestimmen, ob die Signalwege, die durch GIP aktiviert werden, zwischen Pankreas-Inselzellen und Knochenzellen verschieden sind, wurden sowohl Calcium- und cAMP-Reaktionen gemessen.

## MATERIALIEN UND METHODEN

## Intrazelluläre Calciummessungen mit Fura-2:

**[0083]** Die intrazellulären Calciummessungen wurden durchgeführt, wie von Gasalla Herraiz et al. beschrieben, Gasalla Herraiz et al. *Biophys Res Commun* 214:373-88 (1995). Kurz gefasst, wurden SaOS2-Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen gezüchtet und durch Inkubieren in PBS/EGTA abgelöst. Die Zellen wurden mit dem Calciumempfindlichen Farbstoff Fura-2AM in KRB für 45 Minuten bei Raumtemperatur beladen. Dann wurden die Zellen zentrifugiert und in KRB resuspendiert. Nach ungefähr 30 Minuten bei Raumtemperatur, um die Esterspaltung von Fura-2AM in Fura-2 zu ermöglichen, wurden die Zellen wieder zentrifugiert und in eine Küvette mit einem Doppelwellenlängen-Spektrophotometer (Photon Technologies International, South Brunswick, New Jersey) gegeben. Die Fluoreszenz wurde dann unter Verwendung der Anregungswellenlängen 340 und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen. Die Autofluoreszenz wurde in nicht-beladenen Zellen gemessen und dieser Wert wurde von allen Messungen abgezogen.

## Cyclische AMP-Mischungen:

**[0084]** Die cAMP-Messungen wurden durchgeführt, wie von Isales et al., *Endocrinology* 129:489-95 (1991) beschrieben. Kurz gesagt, wurden SaOS2-Zellen in 60 mm<sup>2</sup>-Schälchen bis zur Konfluenz gezüchtet und für 24 Stunden vor der Verwendung in KRB platziert. Um die Messung der cAMP-Produktion zu erleichtern, wurde 1mM Isomethylbutylxanthin (IBMX) vor der Zugabe des Agonisten für 10 Minuten hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation mit dem Agonisten über 10 Minuten. Die Inkubationen wurden durch die Zugabe von 5 % TCA

gestoppt, für 15 Minuten auf Eis stehengelassen, und der Zellextrakt wurde gesammelt. Die Extrakte wurden durch die Zugabe einer 1:1-Lösung eiskalter Freon/Tri-N-octylamin (4:1, v/v) neutralisiert. Jede Probe wurde für mindestens 30 Sekunden gevortext, um eine gleichmäßige Mischung zu sichern. Die Mischung wurde dann bei 2.500 UPM für 20 Minuten (4°C) zentrifugiert. Die oben liegende wässrige Phase, die das cAMP enthält, wurde abgenommen. Der pH-Wert der oberen Phase wurde überprüft, um eine adäquate Neutralisierung zu sichern. Die Proben wurden bei -70°C bis zur Analyse aufbewahrt. cAMP wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays gemessen (Biomedical Technologies, Stoughton, MA). Alle Inkubationen wurden in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde dreimal mit verschiedenen Zellpräparationen wiederholt.

## ERGEBNISSE

GIP aktiviert sowohl cAMP- und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signaltransduktionswege

**[0085]** Um die Funktion der GIP-Rezeptoren in der Signaltransduktion anzugehen, wurden Signalwege, die normalerweise durch den GIP-Rezeptor in Anspruch genommen werden, anfangs untersucht. Rezeptoren für GIP, wie solche für PTH, sind Mitglieder einer Unterklasse der Sieben-Domänen-Transmembran-spannenden Rezeptoren, die gleichzeitig sowohl die Adenylylcyclase und Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) Signaltransduktionswege verbinden.

**[0086]** GIP erhöht sowohl die cytosolische Calciumkonzentration als auch den zellulären cAMP-Gehalt in SaOS2-Zellen, da die Calciumreaktion einen Dosis-abhängigen Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mit einem signifikanten Anstieg zeigt, der bei 0,1 nM GIP auftritt ([Fig. 1A](#)). GIP bei einer Konzentration von 1 nM und darüber war in der Lage die Erhöhungen des zellulären cAMP-Gehalts ([Fig. 1B](#)) signifikant zu stimulieren. Diese Erhöhungen erreichen 710 % über den Kontrollwert bei einer GIP-Konzentration von 1 µM.

**[0087]** Die Wirkung von GIP auf die cytosolische Calciumkonzentration wurde zuerst bestimmt. GIP erhöht [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in einer Dosisabhängigen Weise mit einem signifikanten Anstieg, der bei 1 pM GIP auftritt, wie in [Fig. 1A](#) gezeigt wird. GIP war bei Konzentrationen von 1 nM und darüber in der Lage, die Erhöhungen des zellulären cAMP-Gehalts signifikant zu stimulieren, wie in [Fig. 1B](#) gezeigt. Diese Erhöhungen erreichten 710 % über der Kontrolle bei einer GIP-Konzentration von 1 µM. Diese höheren Konzentrationen an GIP sind klar pharmakologisch und von unklarer physiologischer Bedeutung. Jedoch dienen die als Reaktion auf GIP beobachteten zellulären Antworten dazu, die Tatsache hervorzuheben, dass

die Rezeptoren funktional und an spezifische Signaltransduktionswege gebunden sind, und dass sie in der Lage sind bei diesen Osteoblasten-artigen Zellen spezifische Antworten auszulösen.

#### BEISPIEL 4: REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN

**[0088]** Um die GIP-Rezeptoren weiter zu charakterisieren, wurde die Bindung von radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -GIP an einer Vielzahl osteoblastischer Zelllinien untersucht. Die Rezeptorbindungsstudien wurden, wie von Orloff, et al., *Endocrinology* 137:5376-85 (1996) beschrieben, durchgeführt. Kurz gesagt wurden SaOS2-, MG63- oder NIH 3T3-Fibroblasten in 6-Well-Platten gezüchtet und mit steigenden Konzentrationen an [ $^{125}\text{I}$ ]-GIP (Amersham Pharmacia Ciotech, Arlington Heights, IL) in Gegenwart oder Abwesenheit eines Überschusses nicht-markierter GIPs (1  $\mu\text{M}$ ) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann 3-mal mit 1 ml kaltem PBS (+0,05 % BSA) gewaschen und mit 0,3 M NaOH abgelöst. Der Extrakt wurde in einem Gammastrahlen-Messgerät gemessen und der Hintergrundwert wurde abgezogen. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt.

**[0089]** Die Osteoblasten-artigen Zelllinien SaOS2 und MG63 wiesen hoch affine Bindungsstellen auf, während die 3T3-Fibroblasten minimale Hintergrund-Bindungswirkungen zeigten. Sowohl MG63- als auch SaOS2-Zellen hatten ähnliche  $K_d$ -Werte von ungefähr 0,3 nM, obwohl  $B_{\text{max}}$  in MG63-Zellen höher war als bei SaOS2.

#### 3) STUDIEN ZUR GIP-WIRKUNG

**[0090]** Wenn GIP eine anabolische Wirkung auf die Knochenmasse hat, muss es die Knochenmatrixsynthese steigern. Der Protein-Hauptbestandteil der Knochenmatrix ist Kollagen vom Typ-I.

**[0091]** Daher wurden Experimente mit SaOs2 in vitro durchgeführt, um zu bestimmen, ob GIP die Kollagen-Typ-I-Synthese erhöhte.

#### BEISPIEL 5: STUDIEN DER WIRKUNGEN VON GIP AUF DIE SYNTHESE VON KOLLAGEN

##### MATERIALIEN UND METHODEN

**[0092]** SaOs2 Zellen wurden in 75  $\text{cm}^2$ -Flaschen gezüchtet und mit GIP in einer Dosis von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM oder 100 nM für 24 Stunden stimuliert (Kulturmedium wurde alle acht Stunden durch frisches GIP-haltiges Medium ersetzt). Nach 24 Stunden wurde die gesamte RNA unter Verwendung von Trizol aus den Zellen extrahiert. Die RNA (20  $\mu\text{m}$ ) wurde auf einem 1,2 % Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter übertragen. Die Blots wurden über Nacht bei 65°C

mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde (106 cpm/ml) hybridisiert, die durch das Random-Priming-Verfahren markiert wurde und bei maximaler Stringenz gewaschen. Die Blots wurden einem Kodak XAR 5-Film ausgesetzt und durch Densitometrie analysiert, welche auf einer Sun-Sparc-Station unter Verwendung der Bioimage-Software (n=4, \*p<0,001) quantifiziert wurde. Die Kollagen-Densitometrie wurde gegenüber GAPDH, einem Haushaltsgen, normalisiert, was die Reaktion auf GIP nicht änderte.

#### ERGEBNISSE

**[0093]** Sie Studien der Wirkungen von GIP auf kultivierte Osteoblasten zeigen, dass GIP in einer Konzentration von 10 nM oder darüber die Synthese von Typ-I-Kollagen, einem Marker für die Knochenbildung, stimuliert. Die Wirkung von GIP auf Kollagen-Typ-I war nicht dosisabhängig. Viel mehr hatten die niedrigeren GIP-Dosen (0,1 und 1 nM) keine Wirkung auf die Kollagensynthese, während die höheren Dosierungen (10 und 100 nM) eine maximale Wirkung haben. Da Kollagen der primäre Bestandteil der Knochenmatrix ist, stimmt die Wirkung auf die Kollagensynthese mit einer anabolischen Wirkung auf den Knochen überein.

#### GIP-STIMULIERT DIE KOLLAGEN(I)-GENEXPRESSSION UND AKTIVIERT DIE AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IN OSTEOLASTEN-ARTIGEN ZELLINIEN

**[0094]** Nachdem gezeigt wurde, dass der GIP-Rezeptor an die Signalvorgänge in Knochenzellen gebunden ist, bleibt die Frage der möglichen Rolle von GIP in der normalen Knochenzell-Biologie immer noch nicht beantwortet, und auch dessen Fähigkeit, in vivo eine zelluläre Reaktion zu induzieren, war unklar. Um diese Frage anzugehen, wurde die Wirkung von GIP auf zwei anabolische Indizes der Knochenbildung: neue Matrixsynthese und Aktivität der alkalischen Phosphatase in Osteoblasten-artigen Zellen untersucht.

**[0095]** Es wurde anfänglich bestimmt, ob GIP die Kollagen-Typ-I-Expression in SaOS2-Zellen stimulieren könne. SaOS2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an GIP stimuliert und die Kollagen-Typ-I-Expression wurde mittels Northern-Blot untersucht und mittels Densitometrie quantifiziert. GIP, bei einer Konzentration von 1 nM oder darüber, stimulierte die Expression von Typ-I-Kollagen, einem Marker für die Knochenbildung, wie in [Fig. 2A](#) gezeigt wird. Dieser GIP-Effekt scheint einen Schwellenwerteffekt zu zeigen, da bei höheren GIP-Konzentrationen keine weiteren Anstiege der Typ-I-Kollagen-Expression beobachtet wurden. Da Kollagen der Primärbestandteil der Knochenmatrix ist, stimmt die Fähigkeit die Kollagensynthese zu bewirken mit einer anabolen Wirkung von GIP auf Knochen überein. Um

diese Frage weiter zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf des GIP-Effekts auf die Kollagensynthese unter Verwendung der Dosis (1 nM) untersucht, welche sich in den vorhergehenden Experimenten als maximal wirksam herausgestellt hatte. Die Ergebnisse werden in [Fig. 2B](#) gezeigt. Die GIP-Wirkung auf die Kollagen-mRNA konnte nach 6 Stunden Stimulierung beobachtet werden, wobei zu späteren Zeitpunkten keine weiteren Anstiege beobachtet wurden.

#### BEISPIEL 6: BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

**[0096]** Osteoblasten folgen einem geordneten Entwicklungsmuster, das durch eine anfängliche proliferative Phase gekennzeichnet ist (mit erhöhter Expression von c-myc, c-fos, c-jun, Histon und Colloga-getyp-I), gefolgt von einer Differenzierungsphase (mit einer erhöhten Expression der alkalischen Phosphatase) und schließlich einer Mineralisierungsphase (mit einer erhöhten Expression an Knochen-Sialoprotein, Osteopontin und Osteocalcin). Demnach ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Zeichen der Osteoblasten-Differenzierung anzusehen.

#### METHODEN UND MATERIALIEN

Herstellung der RNA und Northern-Blot-Analyse:

**[0097]** Die gesamte RNA wurde unter Verwendung von Trizol aus Zellen extrahiert (Gaithersburg, MD). Die RNA wurde bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung aufbewahrt. RNA (20  $\mu\text{g}$ ) wurde auf einem 1,2%igen Agarose-Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nylonfilter übertragen. Die Blots wurden über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde (106 cpm/ml) hybridisiert, welche durch das Zufalls-Priming-Verfahren markiert wurde und mit einer maximalen Stringenz gewaschen. Die Hybridisierung wurde in einer Lösung aus 7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA, 250 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  durchgeführt. Die hybridisierten Filter wurden mit vier 5-minütigen Wäsungen in  $2\times\text{SSC}$ , 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal in  $0,1\times\text{SSC}$ , 0,1 % SDS vor 30 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$ . Die Blots wurden dann gegenüber einem Kodak XAR 5-Film exponiert. Die verwendeten Sonden waren GAPDH (ATCC-Klon 57090), Kollagen 1 (i.m.a.g.e. Klon #308919) und ein humanes GIPR-Fragment, das aus der PCR stammt, die den Transmembrandomänen 2 bis 7 entspricht.

Aktivität der Alkalischen Phosphatase:

**[0098]** Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Assaykits (ALP EC 3.1.1.1 Colorimetric-Test; Sigma Diagnostic, St. Louis, MO) gemessen. Dieser Kit misst die Umwandlung von p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol und anorganisches

Phosphat. Die Änderung der Absorption bei 405 nm ist direkt proportional zu ALP-Aktivität. MG63-Zellen wurden in 6-Well-Platten gezüchtet, die mit dem angegebenen Agonisten für die angegebenen Zeiträume inkubiert wurden (das Medium wurde täglich unter Zugabe eines frischen Agonisten gewechselt) und die Proben eingesammelt. Die Reagenzien des Kits wurden zur Probenkuvette im Spektrophotometer bei  $30^{\circ}\text{C}$  hinzugegeben, und die Absorption bei 405 nm, die nach 1, 2 und 3 Minuten erhalten wurden, wurde gemessen. Die ALP-Aktivität (U/L) wurde unter Verwendung der Änderung der Absorption mit der Zeit bestimmt und die millimolare Absorptionsfähigkeit von p-Nitrophenol bei 405 nm betrug 18,45.

Statistik:

**[0099]** Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ausgedrückt. Die Daten wurden entweder unter Verwendung von ANOVA oder eines unpaarigen T-Tests analysiert, und falls angegeben mit einem kommerziellen statistischen Programm (Instat, Graphpad Software Inc.; San Diego, CA.)

#### ERGEBNISSE

**[0100]** Zusätzlich zur Kollagen-Typ-I-Synthese ist ein weitere Index der anabolischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Knochen (ALP). Diese Möglichkeit wurde untersucht, indem die Wirkung von GIP auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der MG63-Zelllinie bestimmt wurde. Diese Zelllinie weist in Rezeptorbindungsstudien eine Vielzahl von GIP-Rezeptoren auf. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt wird, erhöht die GIP bei einer Konzentration von 0,1 nM signifikant die ALP-Aktivität bereits 2 Tage nach der Stimulierung und erhöhte die ALP-Aktivität kontinuierlich nach 6 Tagen der GIP-Exposition. Höhere Dosen an GIP (1 bis 10 nM) erhöhten die ALP-Aktivität überhaupt nicht weiter als die, die bei 0,1 nM GIP gefunden wurden. Die GIP-Wirkung von ALP war größer als die mit 1,25 Vitamin D (10 ng/ml) + TGF- $\beta$  (10 ng/ml) beobachtet wurde, welcher als positive Kontrolle verwendet wurden. D.h., dass GIP ein potenter Induktor der Aktivität der Alkalischen Phosphatase ist.

#### BEISPIEL 7: WIRKUNG VON GIP AUF DIE KNOCHENRESORPTION

#### METHODEN UND MATERIALIEN

**[0101]** Trächtige Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Kingston, NY) wurde  $200 \mu\text{Ci}^{45}\text{Ca}$  am Tag 18 nach der Gestation injiziert und diese wurden einen Tag später getötet, um die markierten fötalen Speichen und Ellen zu entfernen. Die Knochenexplantate wurden 24 Stunden im BGJb-Medium präkultiviert, gefolgt von 6 Tagen Kultur im BGJb mit oder ohne die Substanzen, die getestet werden sollten (10

nM GIP; 10 nM PTH; und PTH mit entweder 5, 10 oder 50 nM GIP). Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt und  $^{45}\text{Ca}$  wurde nach jeder Kulturperiode gemessen. Die Resorption wird als Verhältnis von  $^{45}\text{Ca}$  ausgedrückt, das aus den behandelten gegenüber den Kontrollknochen freigesetzt wird.

## ERGEBNISSE

**[0102]** Die Ergebnisse werden in [Fig. 4](#) gezeigt. GIP inhibierte die PTH-induzierte Knochenresorption, wie in einem fötalen Langknochen-Testsystem gemessen wurde. Obwohl der präzise Mechanismus für die PTH-induzierte Knochenresorption unklar ist, ist die katabolische Wirkung zumindestens teilweise funktional.

### 4) CHARAKTERISIERUNG DER GIP-WIRKUNG AUF TIERMODELLE IN VIVO:

**[0103]** Die oben dargestellten Daten legen nahe, dass GIP die zelluläre Funktion in vitro moduliert, aber sie zeigen keine physiologische Rolle für GIP in vivo. Um diese Frage zu untersuchen, wurden zwei Tiermodelle verwendet: Sprague-Dawley-Ratten, die eine tägliche GIP-Injektion in die Schwanzvene erhielten und transgene Mäuse, die GIP überexprimieren.

### BEISPIEL 8: WIRKUNG VON GIP AUF DEN VERTEBRALEN KNOCHENVERLUST IN JUNGEN RATTEN DENEN DIE EIERSTÖCKE ENTFERNT WURDEN

**[0104]** Da die Ratten, denen die Eierstöcke entfernt wurden (OVX) umfänglich als Tiermodell für die Osteoporose nach der Menopause verwendet worden sind, wurde dieses Modell verwendet, um die Wirkungen von GIP in vivo auf die Knochenbildung zu untersuchen.

### METHODEN UND MATERIALIEN

**[0105]** Dreizehn jungfräuliche weibliche OVX und elf jungfräuliche nicht-OVX Sprague-Dawley-Ratten (150 bis 174 g), Alter 8 Wochen, wurden von Harlan-Strague-Dawley, Inc. (Indianapolis, IN) erworben, und in dem Tierversuchslabor des Medical College of Georgia gehalten. Das Protokoll wurde von CURE Committee at the Medical College of Georgia gebilligt. Sie wurden in getrennten Käfigen in einem Raum, der bei 21°C gehalten wurde, mit 12-stündigem Licht-/Dunkelheits-Zyklen bei 0600/1800 E.S.T. gehalten. Sie wurden ad libitum mit einer normalen kommerziellen Pelletdiät gefüttert, Teklab Rodet diet (1,46 % Calcium) und hatten freien Zugang zu Wasser.

**[0106]** Die Ratten wurden dem Zufall nach in vier nach dem Gewicht abgestimmte experimentelle

Gruppen aufgeteilt und ausgewählt, um entweder an jeden Morgen Kochsalz oder menschliche GIP (Bachem Inc., Torrance, CA) -Injektionen in die Schwanzvene zu erhalten. Die Ratten wurden in die vier folgenden Studiengruppen unterteilt:

1. Kontrolle. Fünf Nicht-OVX-Ratten, die tägliche Injektionen zum gleichen Zeitpunkt und jeden Tag (09:00) des Kochsalzträgers über sechs Wochen in die Schwanzvene erhielten.
2. Kontrolle + GIP. Sechs Nicht-OVX-Ratten, die wie oben tägliche Injektionen von GIP (0,05 mg/kg) über sechs Wochen in die Schwanzvene, erhielten.
3. OVX. Sechs OVX-Ratten, die das Kochsalzvehikel täglich über sechs Wochen in die Schwanzvene injiziert bekamen.
4. OVX + GIP. Sieben OVX-Ratten, die über sechs Wochen tägliche Injektionen von GIP (0,05 mg/kg) in die Schwanzvene erhielten.

**[0107]** Die Dosis an GIP, die gewählt wurde, ist ungefähr entsprechend 10 nM einer Dosis, die nahezu maximale Wirkungen bei der Stimulierung der Kollagensynthese in vitro ergab. Die Ratten wurden täglich gemessen, wobei die Länge beim Ausgangspunkt und wieder nach 6 Wochen gemessen wurde. Dual-Energy-Röntgenabsorptiometrie (DXA) unter Verwendung eines Hologic QDR 1000/W (Waltham, MA) wurde an allen Tieren vor der Initiierung der Behandlung nach 6 Wochen durchgeführt, und die Daten wurden analysiert, indem die Software Rat Whole Body-Version 5.53 verwendet wurde. Am Ende der Studie wurden die Subjekte geopfert, und die Knochenproben wurden für die histomorphometrischen Analysen und die Immunocytochemie entnommen.

## ERGEBNISSE

**[0108]** Die Knochendensitometrie, gezeigt in [Fig. 5](#), wies eine signifikante Differenz zwischen den Veränderungen der Knochen-Mineraldichte (BMD) in der Wirbelsäule in der OVX-Gruppe gegenüber der Kontrolle und der Kontrolle + GIP-Gruppen auf.

**[0109]** Die OVX-Gruppe hatte die niedrigste Dichte aller Gruppen. GIP verzögerte die negativen Wirkungen der Ovariectomie auf die Wirbelsäulenknochendichte. Die OVX + GIP-Ratten hatten mittlere sechswöchige vertebrale BMDs, die höher waren als bei den OVX-Ratten (0,1434  $\pm$  0,001 gms/cm<sup>2</sup> gegenüber 0,1388  $\pm$  0,0045 gms/cm<sup>2</sup> P=0,385). Obwohl die GIP-behandelten Kontrolltiere eine niedrigere Knochendichte hatten als die unbehandelten Tiere, war diese Differenz statistisch signifikant. Der Grund, warum kein Anstieg der Knochenmineraldichte in der GIP-behandelten Kontrollgruppe beobachtet wurde, ist nicht klar. Es kann mit einer nicht-adäquaten GIP-Dosis, dem Zeitpunkt der Injektion (einzelne gegenüber multiplen), dem Alter der Ratten (Junge gegenüber Alten), der Dauer der Experimente (6 Wo-

chen gegenüber 8 bis 12 Wochen) oder Unterschieden der hormonalen Umgebung (d.h., der erhöhten PTH-Sensitivität) zusammenhängen.

**[0110]** Da GIP ein "Incretin"-Hormon ist, gab es Bedenken, ob die Möglichkeit bestand, die Tiere hypoglykämisch zu machen. Die Blutzuckerwerte wurden während der ganzen Studie überprüft, und es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ratten gefunden, die GIP erhielten und solchen, die Kochsalz erhielten.

**[0111]** Zusätzlich gab es Bedenken darüber, dass im Fall in dem diese Tiere durch die GIP-Behandlung hyperinsulinämisch gemacht werden würden, dieses zu ungeeigneten Gewichtszunahmen führen würde, und dass die Gewichtszunahme für den Anstieg der Knochendichte verantwortlich sein könnte. Wie von anderen Forschern berichtet worden ist, die das Ratten-OVX-Modell verwendeten, neigen diese Tiere dazu Gewicht zuzunehmen; GIP hatte jedoch selbst keine Wirkung auf das Gewicht. Die Ausgangsgewichte betragen: Kontrolle:  $177,8 \pm 3,3$ ; Kontrolle+GIP:  $180,8 \pm 2,5$ ; OVX:  $178,7 \pm 4$ ; OVX+GIP:  $186,0 \pm 2,7$  (alle als mittlere Gewichtswerte in Gramm  $\pm$  Standardabweichung ausgedrückt). Die Gewichte nach sechs Wochen des Experiments waren: Kontrolle:  $237,8 \pm 4,4$ ; Kontrolle+GIP:  $234,5 \pm 5,5$ ; OVX:  $294,7 \pm 6,2$ ; OVX+GIP:  $305,1 \pm 5,2$  (alle als mittlere Gewichtswerte in Gramm  $\pm$  Standardabweichung ausgedrückt).

**[0112]** Die Densitometrie-Ergebnisse, die in der Figur gezeigt werden, betreffen den trabekulären Knochen. Das in der Studie benutzte Software-Package erlaubte die Analyse der spezifischen Sektionen der Extremitäten (d.h. der oberer Oberschenkelknochen gegenüber mittleren Oberschenkelknochen (midschaft)) nicht. Die Densitometrie der Gesamtextremität war bei den diversen experimentellen Gruppen nicht verschieden.

**[0113]** GIP, wie PTH, ist ein Mitglied einer Subklasse der Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren, die gleichzeitig sowohl mit den Adenylylcyclase- und der Phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC)-Signaltransduktionswegen verbunden sind. Wie in den vorherigen Beispielen gezeigt wurde, erhöht GIP sowohl die cytosolische Calciumkonzentration und den zellulären cAMP-Gehalt in SaOS2-Zellen. Die GIP-Dosis stimulierte abhängig die Zunahmen in  $[Ca^{2+}]_i$  mit einem signifikanten Anstieg, der bei 0,1 nM GIP auftrat, und bei GIP bei Konzentrationen von 1 nM und darüber war er in der Lage die Erhöhung der zellulären cAMP-Gehalte signifikant zu stimulieren. Diese Bemühungen erreichten 710 % über dem Kontrollniveau bei einer GIP-Konzentration von 1  $\mu$ M. Aufgrund dieser Befunde in vitro könnte die Vorhersage zutreffen, dass GIP auch in vivo anabolisch auf den Knochen wirken könnte. Tat-

sächlich zeigen die Studien an Ratten, denen die Eierstöcke entfernt wurden, dass die GIP-Verabreichung den Verlust der Knochenmasse verhindert, der normalerweise bei diesen Tieren gesehen wird. Die Knochendichte aller Ratten erhöhte sich, wie bei jungen Ratten erwartet wurde, die noch wuchsen. Die OVX-Gruppe gewann jedoch weniger Knochen als die Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz dazu bewahrten OVX-Tiere, die mit GIP behandelt wurden, ihre Knochenmasse, und ihre Knochendichte war statistisch nicht verschieden von denen der Kontrollen. Dies ist ein Beweis, dass GIP verwendet werden kann, um Osteoporose zu behandeln oder zu verhindern.

## BEISPIEL 8: TRANSGENE MÄUSE

### GIP-EXPRESSIONSKONSTRUKTE

**[0114]** Im Hinblick auf Daten, nach denen der GIP-Rezeptor durch hohe Dosen an Peptidhormone herunterreguliert werden kann, wurde ein Konstrukt, das einen regulierbaren Promotor enthielt, entworfen. Die regulatorischen Elemente, die mit dem Maus-Metallothionin-Promotor assoziiert sind, sind ausgiebig im Labor von Dr. Richard Palmiter charakterisiert worden sind. Da das GIP-Peptid selbst unter strikter Regulierung ist, mit einer Sekretion, die nach Berichten nur aus duodenalen K-Zellen und aus der Speicheldrüse erfolgt, und da richtig prozessierte Propeptide zirkulierende Peptide, die die normale Funktion des endogenen GIP antagonisieren können, wurden zwei Expressionskonstrukte entworfen. Das erste schließt Präpropeptide vollständiger Länge ein und das zweite sezerniert das reife Peptid, das keine Prozessierung benötigt. D.h., das das zuerst genannte Konstrukt entworfen wurde, um die GIP-cDNA (preproGIP) vollständiger Länge zu bilden, und das zuletzt genannte konstruiert wurde, um die GIP-Signalsequenz zu kodieren, die an das reife GIP-Peptid (preMGIP) angehängt war. Um das Potential dieser Konstrukte zu testen, biologisch aktives GIP in etablierten Zelllinien zu erzeugen, wurden die cDNAs in die Expressionsvektoren pcDNA2 eingeschleust, welches den Cytomegalie-Virus-Promotor und die Polyadenylierungsstellen des Rinderwachstumshormon einschließt.

**[0115]** Diese Konstrukte werden schematisch in [Fig. 7](#) dargestellt. Wie in der Figur gezeigt, werden beide GIP-cDNAs über transkriptionale regulatorische Elemente in der pcDNA3 exprimiert. PeptoGIP schießt die gesamte Kodierungssequenz der endogenen Maus-GIP-mRNA ein, während preMGIP so konstruiert ist, dass die N- und die C-terminalen Propeptidsequenzen fehlen.

## TRANSFEKTION VON ZELLEN IN KULTUR MIT DEM GIP-KONSTRUKT

**[0116]** Um die Wirksamkeit dieser zwei Konstrukte zu untersuchen, wurden NIH-3T3-Fibroblasten mittels der Liposomen-medierten Transfektion transfiziert (Lipofectamin, GibcoBRL). Immunreaktives GIP, das in das das Medium sezerniert wurde, wurde an den Tagen 1 und 2 Post-Transfektion mittels Radioimmunassay gemessen. Um die Effizienz der Sekretion zu untersuchen, wurden die zellulären Gehalte durch Lysierung mittels Einfrieren und Auftauen nach der Entfernung des Überstands am Tag 2 freigesetzt, und auf die GIP-Immunreaktivität untersucht. Die GIP-Niveaus je Well werden in [Fig. 8](#) dargestellt.

**[0117]** Die Konstrukte erzeugten klar immunologisch nachzuweisendes GIP. Um die biologische Aktivität zu untersuchen, wurde das konditionierte Medium zu SaOs2-Zellen gegeben, und dessen Wirksamkeit beim Erhöhen der zwei sekundären Botenstoffe, die durch GIP stimuliert werden – Calcium und cAMP – wurden bestimmt. Die Ergebnisse werden in [Fig. 9A](#) bzw. [Fig. 9B](#) gezeigt.

## PRODUKTION TRANSGENER MÄUSE, DIE GIP ÜBEREXPRIMIEREN

**[0118]** Auf Grundlage der Transfektionsexperimente, die oben beschrieben wurden, wurde die cDNA vollständiger Länge (preproGIP) verwendet, um einen Vektor zu entwerfen, um GIP-exprimierende transgene Mäuse zu erzeugen. Eine 500 bp-GIP-cDNA der Maus wurde in die einzige Nrul-Schnittstelle des Vektors 2999 inseriert. Der Vektor 2999 schließt den proximalen Maus-Metallothionin-I-Promotor stromaufwärts und menschliche Wachstumshormon-Polyadenylierungssignale stromabwärts der eingeschleusten cDNA ein. Dieses Minigen wird von 17 kb der 5'- und 3'-regulatorischen Sequenzen eingeschlossen, die aus dem genomischen Metallothionin-Lokus stammen, um eine genauere transkriptionale Regulierung zu sichern. Das transgene Konstrukt kann aus dem Plasmidvektor durch die flankierenden Sall-Schnittstellen herausgeschnitten werden. Die Mäuse wurden unter Verwendung von Standard-Verfahren für die Mikroinjektion von DNA in den Proneclues der Embryonen hergestellt, gefolgt von einer Implantation in pseudoschwangere Weibchen.

**[0119]** Kolonien der transgenen Mäuse wurden etabliert. Transgene Mäuse mit einem 10-fachen Anstieg der Kopienzahl sind selektiert worden und die GIP-Niveaus wurden gemessen ([Fig. 10](#)). Eine größere Besorgnis bei den transgenen Mäusen war, ob die höheren GIP-Niveaus die Insulinfreisetzung stimulieren und zu einer Hyperglykämie und Gewichtszunahme der Tiere führen würden. Die Tiere sind jedoch hinsichtlich ihres Gewichts nicht verschieden ([Fig. 11B](#)). Nichtsdestotrotz weisen die transgenen

Mäuse selbst vor der Stimulierung mit einem Schwermetall einen signifikanten Anstieg des Spinal-Knochen-Mineralgehalts ([Fig. 11A](#)) auf. Diese Ergebnisse beweisen eindeutig, dass GIP verwendet werden kann, um die Knochendichte zu erhöhen oder zu bewahren.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer wirksamen Menge des Glucose-abhängigen insulinotropen Peptids (GIP) oder eines funktionalen äquivalenten Analogons davon zur Herstellung eines Medikaments zum Erhalten oder Verbessern der Knochendichte oder -bildung.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Verabreichung an ein Individuum mit Osteoporose oder einem Risiko dafür.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das verabreichte GIP-Analogon ein Fragment von GIP ist.

4. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei das GIP-Fragment modifiziert worden ist, um die Halbwertszeit nach der Verabreichung zu verlängern.

5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das GIP-Analogon ein Antikörper oder eine Fragment davon ist, das an einen GIP-Rezeptor des Körpers bindet, um Zell-Signalwege zu aktivieren.

6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das GIP-Analogon ein anti-idiotypischer Antikörper gegen GIP ist, welcher an einen GIP-Rezeptor des Körpers bindet, oder ein Fragment davon.

7. Verwendung wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, wobei das GIP-Analogon die GIP-Expression verstärkt.

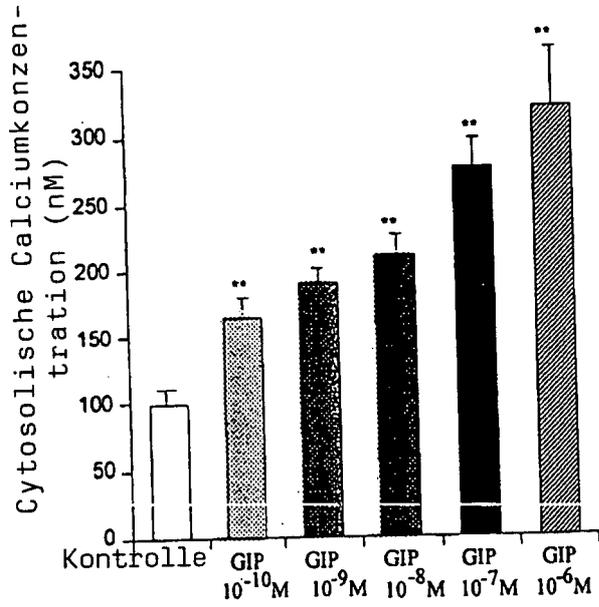
8. Verwendung wie einem der vorhergehenden Ansprüche beansprucht, wobei GIP oder das Analogon hiervon in einen pharmazeutisch annehmbaren Träger für die orale Verabreichung eingeschlossen ist.

9. Verwendung wie einem der vorhergehenden Ansprüche beansprucht, wobei GIP oder das Analogon hiervon in eine Formulierung zur kontrollierten oder Depot-artigen Freisetzung eingeschlossen ist.

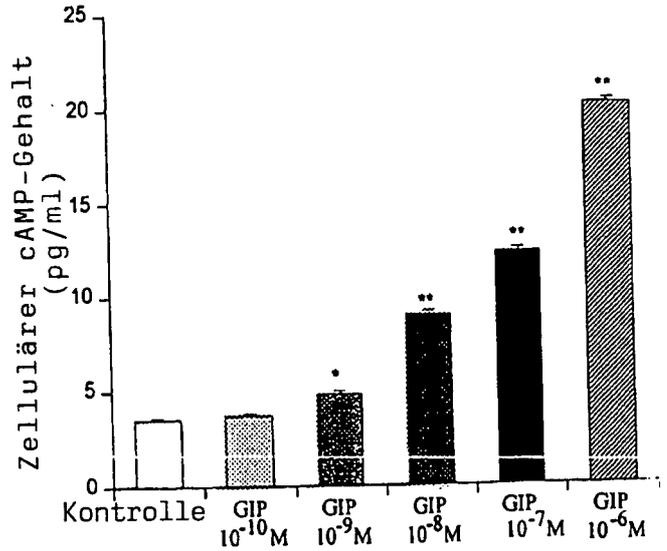
10. Verwendung einer wirksamen Menge eines Inhibitors des GIP-Rezeptors zur Herstellung eines Medikaments zur Verringerung der Knochendichte.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

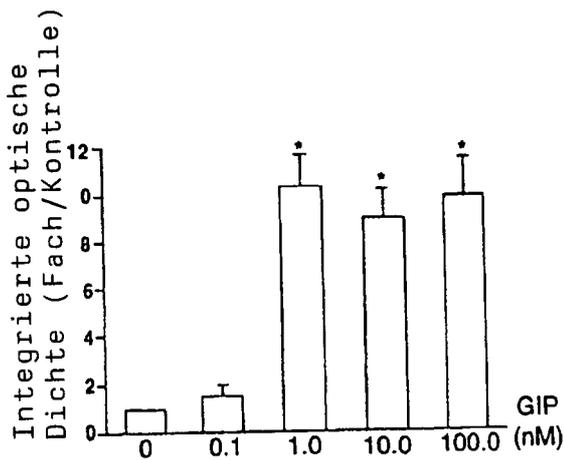
Anhängende Zeichnungen



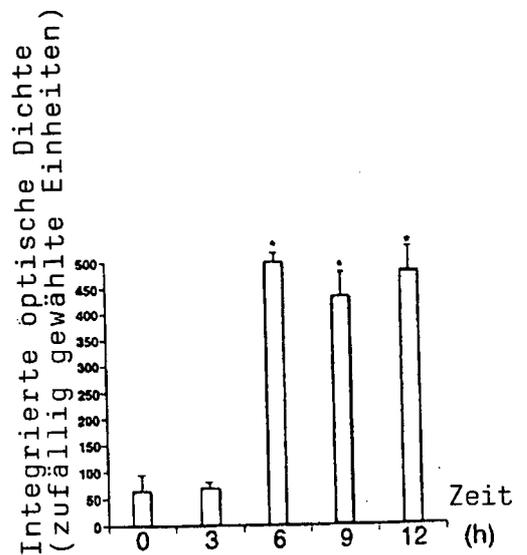
Figur 1A



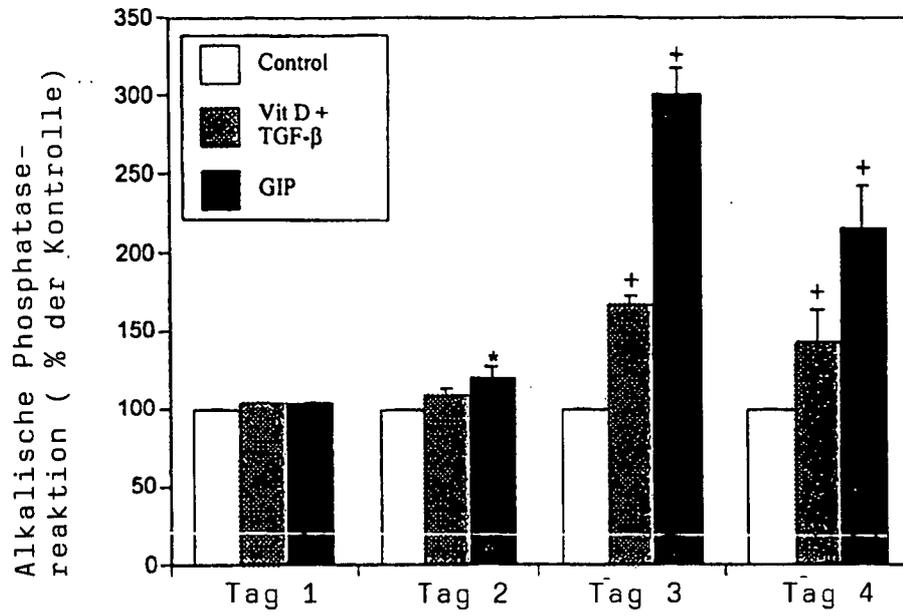
Figur 1B



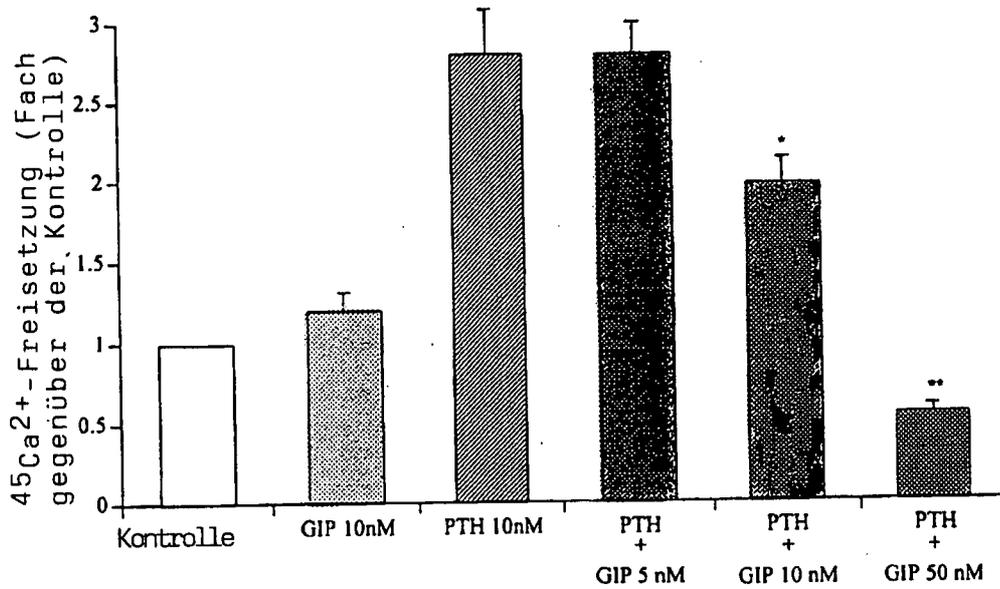
Figur 2A



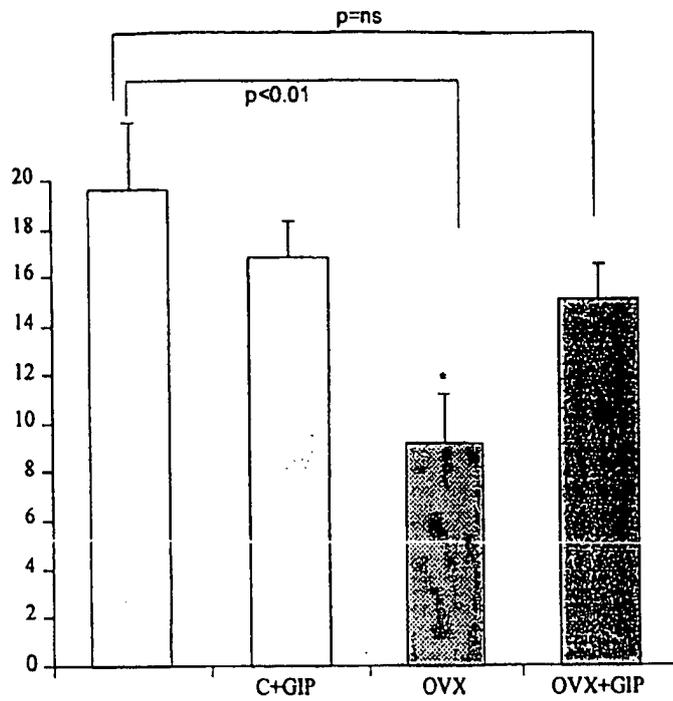
Figur 2B



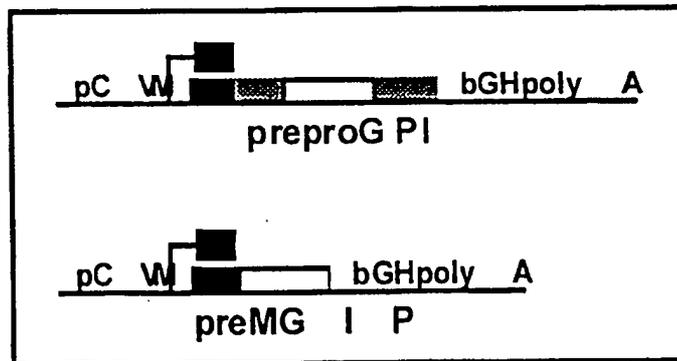
Figur 3



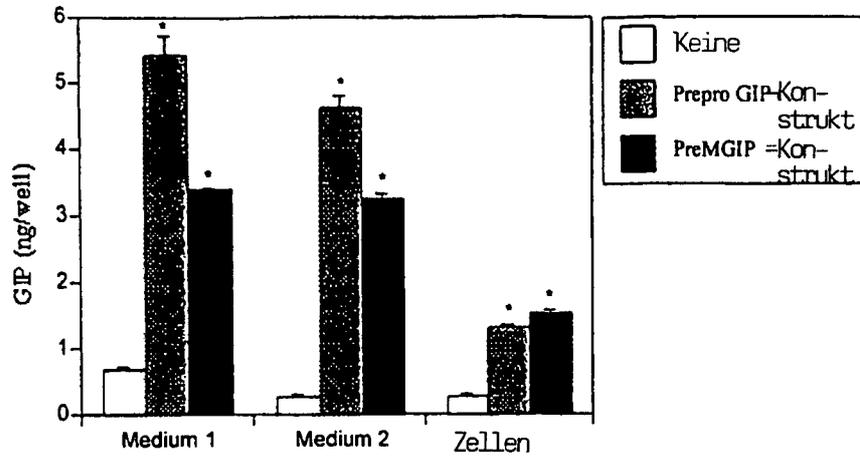
Figur 4



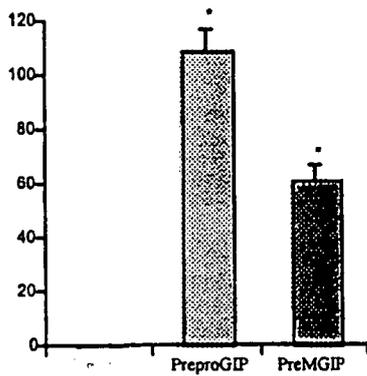
Figur 5



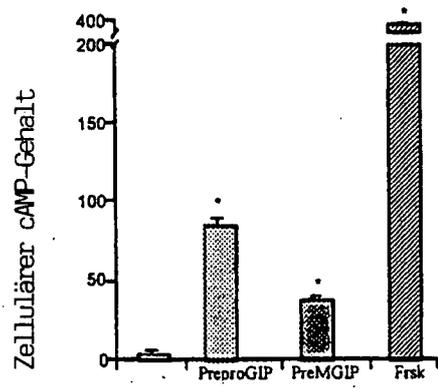
Figur 7



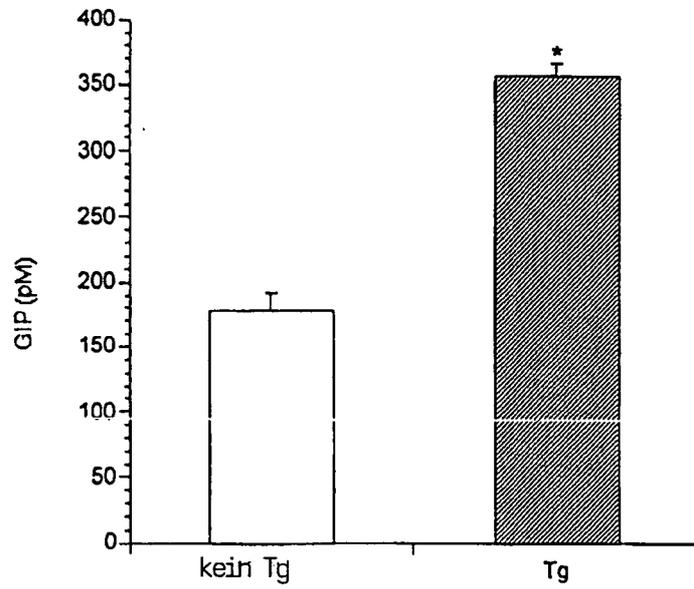
Figur 8



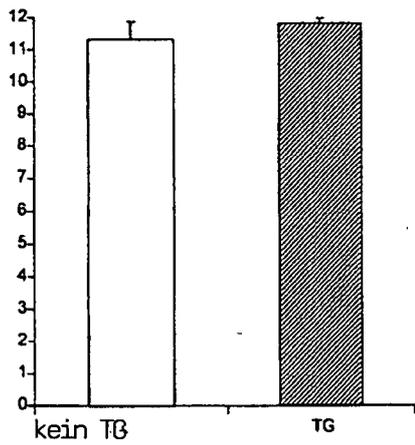
Figur 9A



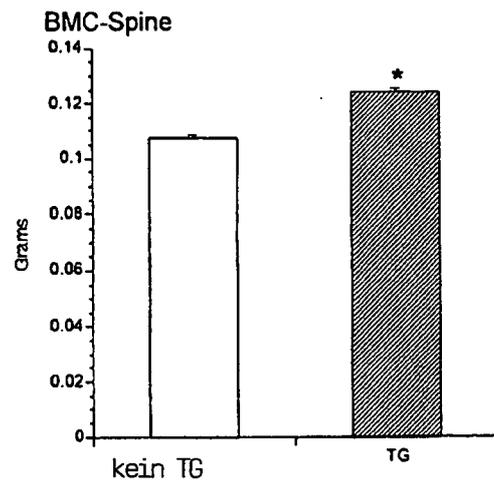
Figur 9B



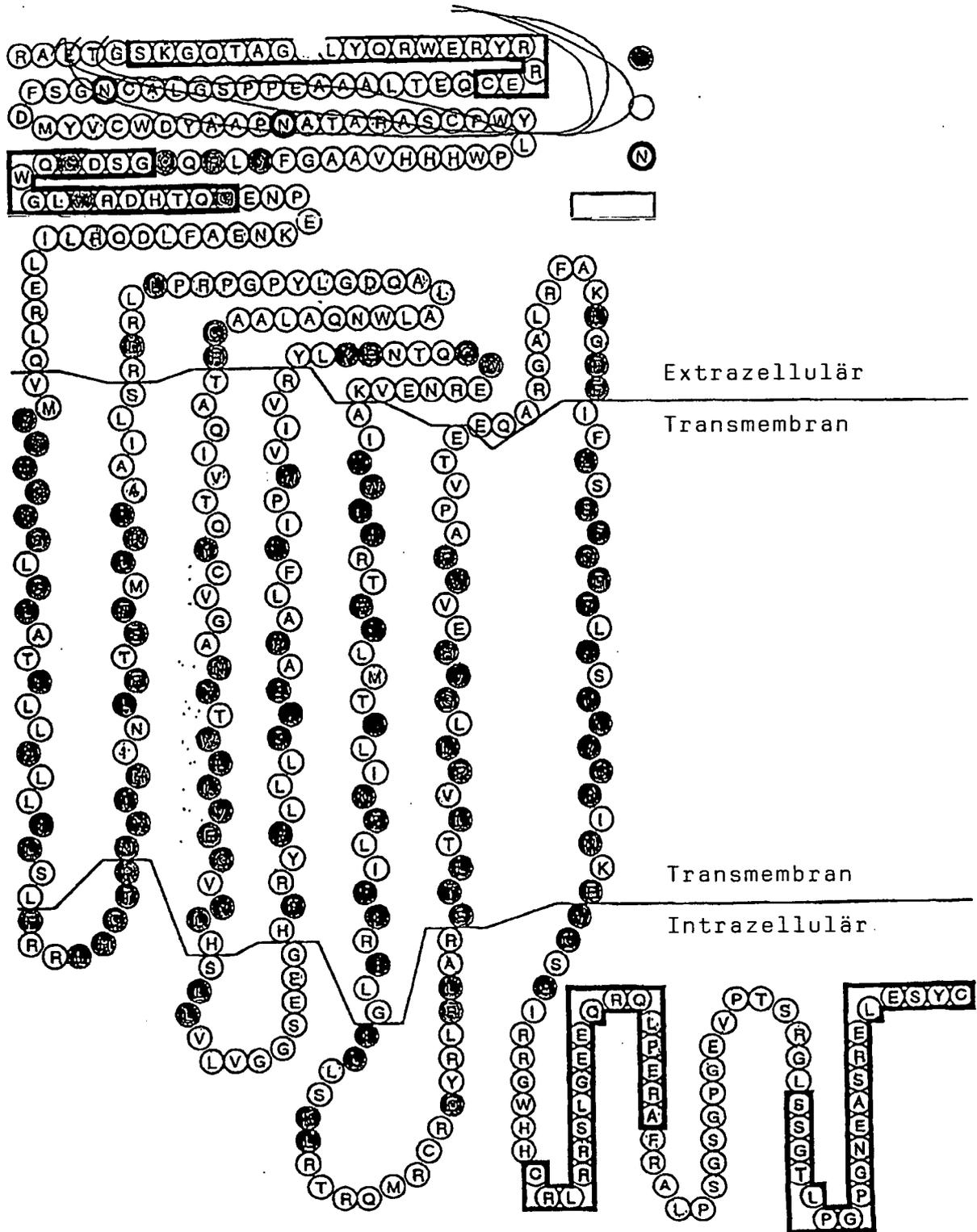
**Figur 10**



**Figur 11A**



**Figur 11B**



Figur 6