



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

643 271

⑯ Gesuchsnummer: 7764/79

⑯ Inhaber:
Richter Gedeon Vegyészeti Gyár RT, Budapest X
(HU)

⑰ Anmeldungsdatum: 27.08.1979

⑯ Erfinder:
Jozsef Knoll, Budapest (HU)
Huba Kalasz, Budapest (HU)
Berta Knoll, Budapest (HU)
Janos Nagy, Szentendre (HU)

⑲ Patent erteilt: 30.05.1984

⑯ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑳ Zur Appetitregelung durch Wirkung spezifisch auf das Ernährungszentrum geeigneter Wirkstoff,
Verfahren zu dessen Herstellung und diesen enthaltendes Arzneimittel.

㉑ Aus menschlichem oder tierischem Blutplasma isoliert man ein Glykoproteid eines Molekulargewichtes über 60'000 mit 60 bis 61 Gew.% Aminosäuren und 10 bis 11 Gew.% Zuckern.

Zur Gewinnung des Wirkstoffes filtriert man durch ein Molekulargewicht bis 50'000 durchlassendes Membranfilter, dampft das Filtrat ein, löst es in Wasser, bringt es auf ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50'000 Dalton und eluiert mit physiologischer NaCl-Lösung. Man sammelt die biologisch wirksamen Fraktionen, dampft sie ein, löst sie in der erforderlichen Menge Wasser und fraktioniert nochmals auf einem Chromatographiergel des obigen Typs. Die mit destilliertem Wasser herausgelösten, vereinigten Eluate werden lyophilisiert.

Der erhaltene, endogene Stoff hemmt spezifisch und selektiv die Nahrungsaufnahme. Gegenüber den herkömmlichen Appetithemmern ist seine Wirkung stark mit einem hohen Wirkungsgrad, dauerhaft, reversibel und kaum toxisch. Zudem fehlen die unerwünschten, depressiven oder belebenden Nebenwirkungen auf das Zentralnervensystem.

PATENTANSPRÜCHE

1. Zur Appetitregelung durch Wirkung spezifisch auf das Ernährungszentrum geeigneter Wirkstoff aus der aus dem Eindampfrückstand eines durch ein Molekulargewichte bis 50 000 durchlassendes Membranfilter filtrierten menschlichen und/oder tierischen Blutserums an einem Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton mittels Gelchromatographie abgetrennten biologisch wirksamen Fraktion, dessen hydrolytisches Abbauprodukt 60 bis 61 Gew.-% Aminosäuren und 10 bis 11 Gew.-% Zucker enthält, wobei die Aminosäuren

6,0 Gew.-% Lysin,
1,6 Gew.-% Histidin,
3,0 Gew.-% Arginin,
2,3 Gew.-% Cystein,
7,0 Gew.-% Asparaginsäure,
3,1 Gew.-% Threonin,
9,6 Gew.-% Glutaminsäure,
1,7 Gew.-% Serin,
2,2 Gew.-% Prolin,
1,2 Gew.-% Glykokoll,
3,8 Gew.-% Alanin,
3,6 Gew.-% Valin,
1,3 Gew.-% Methionin,
1,0 Gew.-% Isoleucin,
6,0 Gew.-% Leucin,
1,8 Gew.-% Tyrosin,
3,5 Gew.-% Phenylalanin und
1,9 Gew.-% Tryptophan

sind und die Zucker

2,8 Gew.-% Glucose,
2,9 Gew.-% Galaktose,
2,0 Gew.-% Mannose,
1,9 Gew.-% Rhamnose und
1,1 Gew.-% Arabinose

darstellen, und der genannte Wirkstoff ein UV-Spektrum ohne Absorptionsmaximum mit einem Plateau bei 275 bis 280 nm aufweist, wobei das reine chromatographisch homogene Material beim Ultrafiltrieren durch eine Membran und Ultrazentrifugieren ein Molekulargewicht unter 10 000 und bei der Polyacrylamidgelektrophorese und gelchromatographischen Messung ein Molekulargewicht über 60 000 zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass man menschliches und/oder tierisches Blutserum durch ein Molekulargewichte bis 50 000 durchlassendes Membranfilter filtriert, das Filtrat eindampft und in Wasser löst, die Lösung auf ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton aufbringt und durch Eluieren mit einer neutralen wässrigen Lösung fraktioniert, die biologische Wirksamkeit aufweisenden Fraktionen eindampft und in der erforderlichen

2,2 Gew.-% Prolin,
1,2 Gew.-% Glykokoll,
3,8 Gew.-% Alanin,
3,6 Gew.-% Valin,
5 1,3 Gew.-% Methionin,
1,0 Gew.-% Isoleucin,
6,0 Gew.-% Leucin,
1,8 Gew.-% Tyrosin,
3,5 Gew.-% Phenylalanin und
10 1,9 Gew.-% Tryptophan

sind und die Zucker

2,8 Gew.-% Glucose,
15 2,9 Gew.-% Galaktose,
2,0 Gew.-% Mannose,
1,9 Gew.-% Rhamnose und
1,1 Gew.-% Arabinose

20 darstellen, und der genannte Wirkstoff ein UV-Spektrum ohne Absorptionsmaximum mit einem Plateau bei 275 bis 280 nm aufweist, wobei das reine chromatographisch homogene Material beim Ultrafiltrieren durch eine Membran und Ultrazentrifugieren ein Molekulargewicht unter 10 000 und 25 bei der Polyacrylamidgelektrophorese und gelchromatographischen Messung ein Molekulargewicht über 60 000 zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass man menschliches und/oder tierisches Blutserum durch ein Molekulargewichte bis 50 000 durchlassendes Membranfilter filtriert, das Filtrat eindampft und in Wasser löst, die Lösung auf ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton aufbringt und durch Eluieren mit einer neutralen wässrigen Lösung fraktioniert, die biologische Wirksamkeit aufweisenden Fraktionen eindampft und in der erforderlichen 30 Menge Wasser löst, die Lösung erneut auf ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton aufbringt und durch Eluieren mit Wasser fraktioniert und die biologische Wirksamkeit aufweisenden Fraktionen eindampft.

30 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Eluieren eingesetzte neutrale wässrige, ein Salz enthaltende Lösung mindestens 0,1 Gew.-% des Salzes enthält.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Eluiermittel zur ersten gelchromatographischen Fraktionierung eine wässrige Natriumchloridlösung, zweckmässig eine physiologische Natriumchloridlösung, verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2, 3 oder 4, 50 dadurch gekennzeichnet, dass man die biologisch wirksamen Fraktionen des bei der zweiten gelchromatographischen Fraktionierung erhaltenen Eluates nach ihrer Vereinigung und gegebenenfalls nochmaligen chromatographischen Reinigung lyophilisiert.

55 6. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoffkomponente mindestens einen zur Appetitregelung durch Wirkung spezifisch auf das Ernährungszentrum geeigneten Wirkstoff aus der aus dem Eindampfrückstand eines durch ein Molekulargewichte bis 50 000 durchlassendes

60 Membranfilter filtrierten menschlichen und/oder tierischen Blutserums an einem Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton mittels Gelchromatographie abgetrennten biologisch wirksamen Fraktion, dessen hydrolytisches Abbauprodukt 60 bis 61 Gew.-% Aminosäuren und 10 bis 11 Gew.-% Zucker enthält, wobei die Aminosäuren

6,0 Gew.-% lysin,

6,0 Gew.-% Lysin,
1,6 Gew.-% Histidin,
3,0 Gew.-% Arginin,
2,3 Gew.-% Cystein,
7,0 Gew.-% Asparaginsäure,
3,1 Gew.-% Threonin,
9,6 Gew.-% Glutaminsäure,
1,7 Gew.-% Serin,

1,6 Gew.-% Histidin,
 3,0 Gew.-% Arginin,
 2,3 Gew.-% Cystein,
 7,0 Gew.-% Asparaginsäure,
 3,1 Gew.-% Threonin,
 9,6 Gew.-% Glutaminsäure,
 1,7 Gew.-% Serin,
 2,2 Gew.-% Prolin,
 1,2 Gew.-% Glykokoll,
 3,8 Gew.-% Alanin,
 3,6 Gew.-% Valin,
 1,3 Gew.-% Methionin,
 1,0 Gew.-% Isoleucin,
 6,0 Gew.-% Leucin,
 1,8 Gew.-% Tyrosin,
 3,5 Gew.-% Phenylalanin und
 1,9 Gew.-% Tryptophan

sind und die Zucker

2,8 Gew.-% Glucose,
 2,9 Gew.-% Galaktose,
 2,0 Gew.-% Mannose,
 1,9 Gew.-% Rhamnose und
 1,1 Gew.-% Arabinose

darstellen, und der genannte Wirkstoff ein UV-Spektrum ohne Absorptionsmaximum mit einem Plateau bei 275 bis 280 nm aufweist, wobei das reine chromatographisch homogene Material beim Ultrafiltrieren durch eine Membrane und Ultrazentrifugieren ein Molekulargewicht unter 10 000 und bei der Polyacrylamidgelektrophorese und gelchromatographischen Messung ein Molekulargewicht über 60 000 zeigt, enthält.

Die Erfindung betrifft einen zur Appetitregelung durch Wirkung spezifisch auf das Ernährungszentrum geeigneten Wirkstoff, ein Verfahren zu dessen Herstellung und ein diesen enthaltendes Arzneimittel.

Unter den zur Verminderung des Appetites, insbesondere des krankhaft übermässigen Appetites, und des Nahrungsaufnahmedranges zur Zeit angewandten Arzneimitteln ist die Wirkung der Substanzen vom Amphetamintyp überhaupt nicht spezifisch, indem diese Arzneimittel auch verschiedene unerwünschte sonstige zentrale und periphere sympathomimetische Wirkungen zeigen, wobei sie auch den Nachteil haben, dass der Organismus sich schnell an sie anpasst beziehungsweise gewöhnt und sich eine Toleranz, welche die Wirksamkeit einer solchen Arzneimittelbehandlung aufhebt, ausbildet. Das Cholezystochinin wirkt auf den die Nahrungsaufnahme regelnden Mechanismus selektiver, seine Wirkungsintensität reicht jedoch nicht aus, um mit Erfolg zur therapeutischen Behandlung der krankhaften Fettsucht angewandt werden zu können. Daher steht bisher noch kein Appetitregler, welcher seine Wirkung auf das Ernährungszentrum, das den Nahrungsaufnahmemechanismus regelt, ohne unerwünschte Nebenwirkungen selektiv ausüben würde und bei dem die Wirkungsintensität das zur therapeutischen Anwendung unbedingt erwünschte Niveau erreichen würde, zur Verfügung.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, unter Behebung der Nachteile des Standes der Technik einen neuen Wirkstoff, welcher zur Appetitregelung durch Wirkung spezifisch auf das Ernährungszentrum geeignet ist, ohne unerwartete Nebenwirkungen zu haben, wobei seine Wirkungsinten-

sität das zur therapeutischen Anwendung erwünschte Niveau hat, ein Verfahren zu dessen Herstellung und Arzneimittel mit einem Gehalt an ihm zu schaffen.

Das Obige wurde überraschenderweise durch die Erfindung erreicht.

In Anbetracht des Obigen ist vom Gesichtspunkt der therapeutischen Behandlung der krankhaften Fettsucht die neue Feststellung, dass aus dem menschlichen und/oder tierischen Blutplasma ein solcher bisher unbekannter Wirkstoff, welcher in der Tat selektiv und ausserordentlich stark auf das den Nahrungsaufnahmemechanismus regelnde Ernährungszentrum wirkt, abgetrennt werden kann, überraschend und von grosser Bedeutung. Dieser neue erfindungsgemäße Wirkstoff, welcher aus dem menschlichen und/oder tierischen Blutplasma durch Membranfiltrations- und Gelchromatographierfraktionierarbeitsgänge abgetrennt werden kann, zeigt bei der Gelelektrophorese ein Molekulargewicht über 60 000. In seinem Hydrolyseprodukt sind Aminosäuren und Zucker nachweisbar. In diesem sind unter den Aminosäuren in der grössten Menge Asparaginsäure, Leucin, Glutaminsäure und Lysin und in geringerer Menge Threonin, Glykokoll, Cystein, Tyrosin, Phenylalanin, Arginin, Histidin, Prolin, Serin, Alanin, Valin, Methionin, Isoleucin und Tryptophan und unter den Zuckern Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose und Arabinose neben sonstigen reduzierenden Materialien in geringerer Menge nachweisbar. Der erfindungsgemäße Wirkstoff hat also Glykoproteidcharakter und somit Eiweisscharakter.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein zur Appetitregelung durch Wirkung spezifisch auf das Ernährungszentrum geeigneter Wirkstoff aus der aus dem Eindampfrückstand eines durch ein Molekulargewichte bis 50 000 durchlassendes Membranfilter filtrierten menschlichen und/oder tierischen Blutserums an einem Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen (Ausschliessungsvolumen) unter 50 000 Dalton mittels Gelchromatographie abgetrennten biologisch wirksamen Fraktion, dessen hydrolytisches Abbauprodukt 60 bis 61 Gew.-% Aminosäuren und 10 bis 11 Gew.-% Zucker mit den folgenden Aminosäure- und Zuckerzusammensetzungen.

Aminosäuren:

6,0 Gew.-% Lysin,
 1,6 Gew.-% Histidin,
 45 3,0 Gew.-% Arginin,
 2,3 Gew.-% Cystein,
 7,0 Gew.-% Asparaginsäure,
 3,1 Gew.-% Threonin,
 9,6 Gew.-% Glutaminsäure,
 50 1,7 Gew.-% Serin,
 2,2 Gew.-% Prolin,
 1,2 Gew.-% Glykokoll,
 3,8 Gew.-% Alanin,
 3,6 Gew.-% Valin,
 55 1,3 Gew.-% Methionin,
 1,0 Gew.-% Isoleucin,
 6,0 Gew.-% Leucin,
 1,8 Gew.-% Tyrosin,
 3,5 Gew.-% Phenylalanin und
 60 1,9 Gew.-% Tryptophan,

Zucker:

2,8 Gew.-% Glucose,
 2,9 Gew.-% Galaktose,
 2,0 Gew.-% Mannose,
 1,9 Gew.-% Rhamnose und
 1,1 Gew.-% Arabinose

enthält und welcher ein UV-Spektrum ohne Absorptionsmaximum mit einem Plateau bei 275 bis 280 nm aufweist, wobei das reine chromatographisch homogene Material beim Ultrafiltrieren durch eine Membran und Ultrazentrifugieren ein Molekulargewicht unter 10 000 und bei der Polyacrylamidgelektrophorese und gelchromatographischen Messung ein Molekulargewicht über 60 000 zeigt. Dieser Wirkstoff wurde als «Szatietin» bezeichnet.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemässen Wirkstoffes, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass menschliches und/oder tierisches Blutserum durch ein Molekulargewicht bis 50 000 durchlassendes Membranfilter filtriert wird, das Filtrat eingedampft und in Wasser gelöst wird, die Lösung auf ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton aufgebracht und durch Eluieren mit einer, vorzugsweise mindestens 0,1 Gew.-%, eines Salzes enthaltenden etwa neutralen wässrigen Lösung fraktioniert wird, die biologische Wirksamkeit aufweisenden Fraktionen, zweckmässig nach ihrer Vereinigung, eingedampft und in der erforderlichen Menge Wasser gelöst werden, die Lösung erneut auf ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton aufgebracht und durch Eluieren mit Wasser fraktioniert wird und die biologische Wirksamkeit aufweisenden Fraktionen, zweckmässig nach ihrer Vereinigung, eingedampft werden.

Vorzugsweise wird als Eluiermittel zur ersten gelchromatographischen Fraktionierung eine wässrige Natriumchloridlösung, zweckmässig eine physiologische Natriumchloridlösung verwendet.

Es ist auch bevorzugt, die biologisch wirksamen Fraktionen des bei der zweiten gelchromatographischen Fraktionierung erhaltenen Eluates nach ihrer Vereinigung und gegebenenfalls nochmaligen chromatographischen Reinigung zu lyophilisieren.

Die erste Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens ist also die Ultrafiltration (Membranfiltration) des menschlichen und/oder tierischen Blutserums durch ein Molekulargewicht bis 50 000 durchlassendes Membranfilter. Als solche Membranfilter können zum Beispiel die Membran «Amicon UM 10» und andere Membranen vom Typ «Amicon» sowie Membranen von anderem Typ, wie eine Sartorius-Membran von ähnlicher Porengröße, verwendet werden. Besonders gut eignen sich die Membranen «Amicon UM 05», «Amicon UM 2», «Amicon DM 5», «Amicon UM 10», «Amicon PM 10», «Amicon UM 20», «Amicon PM 30» und «Amicon XM 30» sowie «Sartorius 121 33», «Sartorius 121 34» und «Sartorius 121 36». Das Membranfiltrieren (Filtrieren durch ein Membranfilter) wird zweckmässig wie folgt durchgeführt.

Es wird gewöhnlich Druck, vorzugsweise ein Druck von 3 atm, angewandt und ständig gerührt. Durch das Membranfiltrieren wird das Serum in 2 Fraktionen zerlegt: Die grösseren Moleküle als die Porengröße der Membran werden von den kleineren getrennt. Bei dieser Trennung erscheint der erfindungsgemäss Wirkstoff trotz der Tatsache, dass das Filtrieren durch ein als Molekulargewicht bis 50 000 durchlassend festgelegtes Membranfilter durchgeführt wird und der erfindungsgemäss Wirkstoff, wie bereits erwähnt, als ein Molekulargewicht über 60 000, insbesondere 60 000 bis 100 000, aufweisend sich zeigte, überraschenderweise in seiner ganzen Menge in der die Materialien mit kleinen Molekülen mit Molekulargewichten in der Grössenordnung um 10 000 enthaltenden Fraktion. Dieses atypische Verhalten des erfindungsgemässen Wirkstoffes, welches wahrscheinlich infolge des beim Membranfiltrieren bevorzugt angewandten Druckes und Röhrens zustande kommt, ist für das erfin-

dungsgemäss Verfahren vorteilhaft, weil es die Trennung des erfindungsgemässen Wirkstoffes von sonstigen Materialien mit grossen Molekülen erleichtert. So ist der gewünschte erfindungsgemäss Wirkstoff im Filtrat der Membranfiltration etwa 10- bis 20fach konzentriert, bezogen auf den ursprünglichen Trockensubstanzgehalt des Blutserums, in Begleitung von Begleitstoffen mit viel kleinerem Molekulargewicht zu finden.

Die zweite Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens ist 10 das Lösen des durch das Eindampfen des durch das Membranfiltrieren erhaltenen Filtrats gewonnenen Trockenrückstandes in destilliertem Wasser und Aufbringen dieser Lösung auf eine ein Chromatographiergel mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton enthaltende Säule. Diese 15 Stufe wird zweckmässig wie folgt durchgeführt:

Als Chromatographiergele können in erster Linie Sephadex G-15 sowie ferner beispielsweise «Sephadex G-10», «Sephadex G-25», «Sephadex G-50», «Sephadex G-75» und «Sephadex G-100» und weiterhin «BioGel P-2», 20 «BioGel P-4», «BioGel P-6», «BioGel P-10», «BioGel P-30», «BioGel P-60» und «BioGel P-100» mit gutem Erfolg verwendet werden. Die Chromatographiersäule wird bevorzugt mit einer physiologischen Natriumchloridlösung oder mit einer mindestens 0,1 Gew.-% Natriumchlorid oder eines 25 anderen einen nahezu neutralen pH-Wert sicherstellenden Salzes enthaltenden Lösung eluiert. Beim Eluieren erscheint der erfindungsgemäss Wirkstoff beim äusseren Volumen (bekanntlich ist bei den gelchromatographischen Trennungen das «äussere Volumen» des Geles ein wichtiges 30 Merkmal: alle Moleküle, welche in die Nähe der oberen Grenze des selektiven Trennungsbereiches des Geles oder oberhalb dieser Grenze fallen [beispielsweise ist die obere Grenze des selektiven Trennungsbereiches im Falle von Sephadex G-15 1500 Dalton], werden beim äusseren 35 Volumen, beim 25 bis 35% des Volumens der Gelsäule darstellenden Eluiermittelvolumen, eluiert), während die nach dem Membranfiltrieren noch vorhandenen Begleitstoffe mit geringerem Molekulargewicht sich zum grössten Teil später, das heiss bei grösserem Eluervolumen in mehreren Spitzen 40 getrennt zeigen. Die bei der biologischen Wertbestimmung sich als wirksam erweisenden (gegenüber dem Blindversuchsmaterial signifikant wirksameren) Fraktionen werden vereinigt und zur Trockne eingedampft.

Die dritte Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens ist die 45 erneute gelchromatographische Fraktionierung des so erhaltenen am Wirkstoff um ein Vielfaches konzentrierteren Trockenrückstandes, bei welcher schon durch mit Wasser erfolgendes Eluieren das wirksame Produkt in für die therapeutische Anwendung geeigneter Reinheit erhalten wird. Diese 50 zweite gelchromatographische Reinigung wird, wie bereits erwähnt, ebenfalls an einer Gelchromatographiersäule mit einem äusseren Volumen unter 50 000 Dalton durchgeführt. Im einzelnen wird zweckmässig wie folgt vorgegangen:

Der vom vorhergehenden Fraktionierarbeitsgang erhaltenen trockene Eindampfrückstand wird in der notwendigen Mindestmenge von destilliertem Wasser gelöst und auf ein entsprechendes Chromatographiergel, beispielsweise «BioGel P-30», in einer Säule aufgebracht, worauf die Säule mit destilliertem Wasser eluiert wird. Die bei der biologischen 60 Wertbestimmung sich als aktiv erweisenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

So wird im allgemeinen der erfindungsgemäss Wirkstoff bereits in Form eines reinen einheitlichen Produktes erhalten. 65 Wenn jedoch die elektrophoretische Untersuchung des Produktes die Gegenwart irgend eines Begleitstoffes anzeigen würde, kann der erfindungsgemäss Wirkstoff von diesem durch Chromatographieren an einer Diäthylaminoäthylcel-

lulosesäule befreit werden. Zu diesem Zweck kann das Material in Lösung in destilliertem Wasser auf die Diäthylamino-äthylcellulosesäule aufgebracht werden, woran sich ein Waschen der Säule mit destilliertem Wasser und danach ein Eluieren mit einer 0,1 n Phosphatpufferlösung (pH-Wert: 6,5) {0,1 n Phosphatpufferlösung [pH-Wert = 6,5] + bis zu 5%iger Natriumchloridlösung aufwärts gradientenmässig} anschliessen. Der reine Wirkstoff wird gewöhnlich mit der 0,1 n Phosphatpufferlösung (pH-Wert: 6,5) + 0,5%igen Natriumchloridlösung von der Säule eluiert. Die den reinen Wirkstoff enthaltende Eluatfraktion wird vorzugsweise lyophilisiert und danach kann der Wirkstoff am Gel «BioGel P-30» mittels Eluierens mit destilliertem Wasser von den anorganischen Salzen befreit werden.

Die Homogenität des erhaltenen reinen Wirkstoffes kann durch Elektrophorese an einem anfänglich (bei seinem Ansetzen) 15% Acrylamid enthaltenden Polyacrylamidgel mit einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4,5 bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 4 A je Rohr untersucht werden.

Der erfindungsgemäße Wirkstoff ist im lyophilisierten Zustand ein schneeweisses watteartiges leichtes Material, dessen chemische Untersuchung wie bereits erwähnt ergab, dass es ein Glykoproteid ist, welches durch saure Hydrolyse in seine Aminosäure- und Zuckerbestandteile gespalten werden kann. Beispielsweise wurden bei den Untersuchungen zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung und Struktur des aus einem menschlichen Blutserum hergestellten erfindungsgemäßen Wirkstoffes die folgenden Ergebnisse erhalten.

Amino- und Zuckerzusammensetzung des Hydrolyseproduktes

Die im durch Hydrolyse erhaltenen Abbauprodukt nachweisbaren Aminosäuren

6,0 Gew.-% Lysin
1,6 Gew.-% Histidin
3,0 Gew.-% Arginin
2,3 Gew.-% Cystein
7,0 Gew.-% Asparaginsäure
3,1 Gew.-% Threonin
9,6 Gew.-% Glutaminsäure
1,7 Gew.-% Serin
2,2 Gew.-% Prolin
1,2 Gew.-% Glykokoll
3,8 Gew.-% Alanin
3,6 Gew.-% Valin
1,3 Gew.-% Methionin
1,0 Gew.-% Isoleucin
6,0 Gew.-% Leucin
1,8 Gew.-% Tyrosin
3,5 Gew.-% Phenylalanin
1,9 Gew.-% Tryptophan
60,6 Gew.-% gesamte Aminosäuren.

Ferner waren im Abbauprodukt 13 Gew.-% reduzierendes Material, welches hauptsächlich aus Zuckern in den folgenden prozentualen Anteilen bestand, nachweisbar.

2,8 Gew.-% Glucose
2,9 Gew.-% Galaktose
2,0 Gew.-% Mannose
1,9 Gew.-% Rhamnose
1,1 Gew.-% Arabinose
10,7 Gew.-% Gesamtzuckergehalt.

Wassergehalt

Der erfindungsgemäße Wirkstoff enthielt auch physikalisch gebundenes Wasser in einer Menge um 10 Gew.-%.

5 Endgruppenanalyse

Bei den weiteren Untersuchungen zur Aufklärung der chemischen Struktur des erfindungsgemäßen Wirkstoffes war mit den üblichen Verfahrensweisen der Endgruppenanalyse (mit Dimethylaminonaphthylsulfonsäurechlorid und dem Enzym Aminopeptidase M erfolgendem Abbau) keine Endgruppe nachweisbar, was auf die Gegenwart einer maskierten Endgruppe hinweist.

Abbau mit Trypsin

15 Der erfindungsgemäße Wirkstoff war mit Trypsin in einem Ammoniumbicarbonatpuffer mit einem pH-Wert von 8,3 während 2 Stunden praktisch nicht verdaubar und die Farbintensität der sich zeigenden Peptidzonen war schwach.

20 Wirkung der Carboxymethylierung auf die Struktur

Der bei der Gelelektrophorese mit einem Molekulargewicht um 68 000 sich als einheitlich zeigende erfindungsgemäße Wirkstoff ergab bei der nach dem Binden der SH-Gruppe mit Bromessigsäure in einem dodecylsulfathaltigen

25 Medium durchgeföhrten Elektrophorese ein auf die Gegenwart von 4 Bestandteilen hinweisendes Elektrophoresebild: Nach wie vor war der ein Molekulargewicht von etwa 68 000 aufweisende Bestandteil zugegen, neben ihm zeigten sich aber auch ein ein Molekulargewicht um 18 000 aufweisender 30 Bestandteil und 2 ein Molekulargewicht um 28 000 aufweisende Bestandteile mit nahezu identischer Beweglichkeit, die sich aber gut trennten.

Wirkung der Carboxymethylierung auf die Wirksamkeit

35 Auf die Wirkung der mit Bromessigsäure erfolgenden Carboxymethylierung hin ging die biologische Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Wirkstoffes verloren.

UV-Spektrum

40 Das UV-Absorptionsspektrum des erfindungsgemäßen Wirkstoffes zeigte kein Absorptionsmaximum; um 275 bis 280 nm zeigte sich ein für Eiweißpeptide charakteristisches «Plateau». Das UV-Absorptionsspektrum ist in der beiliegenden Figur 1 dargestellt.

45 Molekulargewicht

Die interessante charakteristische Eigenschaft des erfindungsgemäßen Wirkstoffes ist das bereits erwähnte bei den Molekulargewichtsbestimmungen sich zeigende anomale 50 Verhalten:

- a) Beim Ultrafiltrieren durch eine Membran zeigt er sich als ein Molekulargewicht unter 10 000 aufweisend.
- b) Bei der gelchromatographischen Untersuchung zeigt er 55 ein Molekulargewicht über 40 000, insbesondere von 60 000 bis 100 000.
- c) Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese läuft er mit den Molekülen mit Molekulargewichten von 65 000 bis 68 000 parallel.
- d) Beim Ultrazentrifugieren zeigt er sich als Moleküle mit Molekulargewichten unter 10 000 aufweisend.

Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann nicht nur aus menschlichem Blutserum, sondern auch aus den Blutseren 65 von verschiedenen Tieren gewonnen werden. Die aus den Blutseren von verschiedenen Säugetieren, wie Rindern, Hunden, Katzen, Pferden, Meerschweinchen, Hasen und verschiedenen Arten von Ratten (Wistar-, CFY-, SHR- und

L.E.-Ratten) nach demselben erfundungsgemäßen Verfahren erhaltenen Produkte zeigten zwar hinsichtlich der Wirkungsintensität Abweichungen, der spezifische und selektiv auf den Ernährungsmechanismus gerichtete Charakter zeigte sich jedoch bei den Produkten jedweden Ursprungs in gleicher Weise.

Gegenstand der Erfindung sind auch Arzneimittel, welche den erfundungsgemäßen Wirkstoff enthält, in der Regel zusammen mit üblichen pharmazeutischen Konfektionsmitteln.

Kurz ausgedrückt, äussert sich die spezifische Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes und der erfundungsgemäßen Arzneimittel in der selektiven Hemmung der Nahrungsaufnahme, wobei er beziehungsweise sie aber keine sonstige Wirkung auf das Zentralnervensystem, und zwar weder eine Depressionen herbeiführende noch eine die motorische Aktivität hemmende Wirkung hat beziehungsweise haben.

Die auf die Nahrungsaufnahme von Tieren ausgeübte Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes wurde an weiblichen CFY-Ratten mit Gewichten von 200 bis 240 g untersucht. Die Tiere wurden vor dem Versuch 96 Stunden lang hungrigen gelassen; Wasser konnten die Tiere nach Belieben verbrauchen. Mit Rücksicht auf die infolge des Hungerns auftretende Aggressivität wurden die Tiere einzeln in getrennten Käfigen gehalten. Jedes Tier erhielt eine intravenöse Dosis von 10 mg/kg des nach dem weiter unten folgenden Beispiel hergestellten erfundungsgemäßen Wirkstoffes in Form einer Lösung in 0,5 cm³ physiologischer Natriumchloridlösung. Die Tiere der Blindversuchsgruppe erhielten nur 0,5 cm³ physiologische Natriumchloridlösung intravenös ohne Wirkstoff. 1 Stunde nach der Behandlung wurde den Tieren Nahrung (genormtes Eiweiss, Fette, Kohlehydrate und Vitamine enthaltende Nahrungspfropfen) in unbegrenzter Menge gegeben. 1, 5 und 24 Stunden nach der Verabreichung der Nahrung (das heisst 2, 6 beziehungsweise 25 Stunden nach der Behandlung) wurde der Nahrungsverbrauch der Tiere bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der beiliegenden Figur 2 zusammengestellt. Die leeren Säulen zeigen die während 1 Stunde, die gestreiften Säulen die während 5 Stunden und die gleichförmig schattierten Säulen die während 24 Stunden verbrauchte Nahrungsmenge (die am oberen Teil der einzelnen Säulen dargestellten senkrechten Geraden veranschaulichen die Streuung der Versuchsergebnisse); die Aufschriften unter den Säulen geben die Tiere, aus deren Blutserum hergestellter erfundungsgemässer Wirkstoff zur Behandlung der Tiere verwendet wurde, an. Die in der Figur 2 dargestellten Versuchsergebnisse beweisen, dass der erfundungsgemäße Wirkstoff ausserordentlich wirksam ist. Seine Wirkung übertrifft die der bekannten Materialien ähnlicher Wirkungsrichtung bei weitem. So wirken das Cholezystochinin und das von Ugolev und Mitarbeiter beschriebene aus einem Zwölffingerdarmauszug hergestellte Areterin bei 96 Stunden lang hungrigen gelassenen Tieren überhaupt nicht mehr. Die Tatsache, das demgegenüber der erfundungsgemäße Wirkstoff auch in solchen Fällen seine Wirkung in vollem Umfang ausübt, zeigt ebenfalls dessen unvergleichlich hochgradige Wirksamkeit.

Zum Nachweis der spezifischen selektiven Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes wurde dieser vom Gesichtspunkt der bekannten Nebenwirkungen der bekannten Materialien (Mittel vom Amphetamintyp) ähnlicher Wirkungsrichtung untersucht. Im zur Untersuchung der zentralen depressiven Wirkung geeigneten abgewandelten Sprungversuch (Knoll J., Knoll B., Arch. int. Pharmacodyn. 148 [1964], Seiten 200 bis 217) beeinflusste der erfundungsgemäße Wirkstoff selbst bei Anwendung des 2fachen der die Ernährungsaktivität beeinflussenden Dosis die Abwehrreflexaktivität der Tiere nicht. In mit einem Motimeter (Knoll J., Arch.

int. Pharmacodyn. 130 [1961], Seiten 141 bis 154) durchgeföhrten Versuchen zeigten selbst hohe intravenöse Dosen des erfundungsgemäßen Wirkstoffes keinerlei motilitätshemmende oder motilitätsbelebende Wirkung. Es ist bekannt, dass die depressiv wirkenden Materialien auf die bedingten Reflexe stark wirken. Daher wurden auch ähnliche Untersuchungen mit dem erfundungsgemäßen Wirkstoff an Ratten mittels eines zur Untersuchung von bedingten Reflexen geeigneten Sprungversuches (Knoll J., Knoll B., Arzneimittel-Forsch. 8 [1958], Seiten 330 bis 333) durchgeführt. Der erfundungsgemäße Wirkstoff erwies sich auch in dieser Hinsicht als wirkungslos. In Anbetracht der Tatsache, dass das Cholezystochinin eine sehr charakteristische muskelzusammenziehende Wirkung an der Darmmuskulatur zeigt (Knoll J. und Mitarbeiter, Pharmacology 12 [1974], Seiten 283 bis 289), wurde der erfundungsgemäße Wirkstoff auch auf seine Wirkung auf den isolierten Darm hin im Vergleich zu Cholezystochinin untersucht. Der erstere erwies sich im Gegensatz zum letzteren als völlig wirkungslos. Durch all diese Versuche sind die überlegenen vorteilhaften Eigenschaften des erfundungsgemäßen Wirkstoffes, welche im folgenden zusammengefasst sind, nachgewiesen.

- A) Der erfundungsgemäße Wirkstoff ist ein endogenes Material natürlichen Ursprungs.
- B) Der erfundungsgemäße Wirkstoff zeigt keine nennenswerte Toxizität.
- C) Die Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes ist selektiv und spezifisch, er wirkt nur auf das Ernährungszenrum.
- D) Die Wirkungsweise des erfundungsgemäßen Wirkstoffes weicht von der der bekannten Appetitregler ab, er wirkt nicht auf das Zentralnervensystem, er hat weder depressive noch belebende Wirkungen.
- E) Der erfundungsgemäße Wirkstoff hat eine starke Wirkung, er hemmt die Nahrungsaufnahme auch der 96 Stunden lang hungrigen gelassenen Tiere signifikant.
- F) Der Grad der Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes hängt von der Höhe der Dosis ab; an Ratten konnte mit Dosen von 200 bis 300 mg/Tier eine praktisch vollständige Hemmung der Nahrungsaufnahme erreicht werden.
- G) Die Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes ist dauerhaft, sie besteht auch 24 Stunden hindurch und länger fort.
- H) Die Wirkung des erfundungsgemäßen Wirkstoffes ist reversibel, mit dem Aufhören der Wirkung wird der Zustand vor der Behandlung völlig wiederhergestellt.

Die Erfindung wird an Hand des folgenden Beispieles näher erläutert.

Beispiel

Es wurden 1001 menschliches Blutserum durch eine Membran Amicon UM 10 ultrafiltriert. Es wurden 700 cm³ Filtrat erhalten. Dieses wurde zur Trockne eingedampft und der erhaltene Rückstand wurde in 30 cm³ destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf eine Säule von Sephadex G-15 mit Abmessungen von 5 cm × 90 cm aufgebracht. Die Säule wurde mit einer 0,9 gew.-%igen wässrigen Natriumchloridlösung eluiert. Es wurden Eluatfraktionen von 10 cm³ aufgefangen. Auf Grund der Untersuchung der Fraktionen mittels der oben beschriebenen biologischen Wertbestimmung wurden die 50- bis 60sten Fraktionen, das heisst das Eluat zwischen 500 cm³ und 600 cm³ als biologisch wirksam festgestellt. Diese Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft und daraufhin in 10 cm³ destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf eine Säule von BioGel P-30 mit Abmessungen von 2,5 cm × 90 cm, welche mit destilliertem

Wasser ins Gleichgewicht gebracht worden ist, aufgebracht und es wurde mit destilliertem Wasser eluiert. Es wurden Fraktionen von 10 cm³ aufgefangen. Die 11- bis 15ten Fraktionen erwiesen sich als biologisch wirksam. Diese Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Je nach der Qua-

lität des als Ausgangsstoff verwendeten Blutserums wurden 200 bis 240 mg trockenes Produkt, welches ein schneeweisser und eine watteartige Konsistenz aufweisender homogener Wirkstoff von zur therapeutischen Anwendung geeigneter Reinheit war, erhalten.

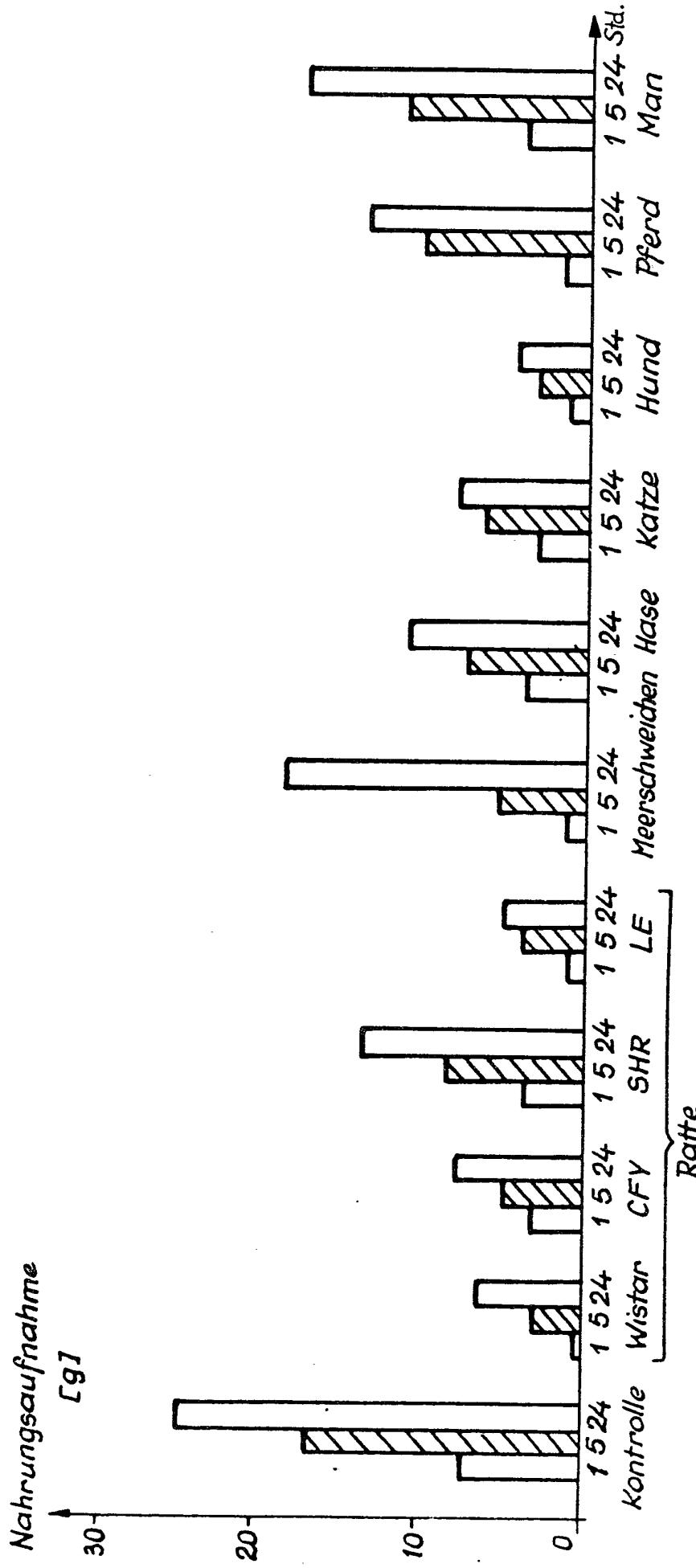


Fig. 1

643 271

2 Blätter Nr. 2

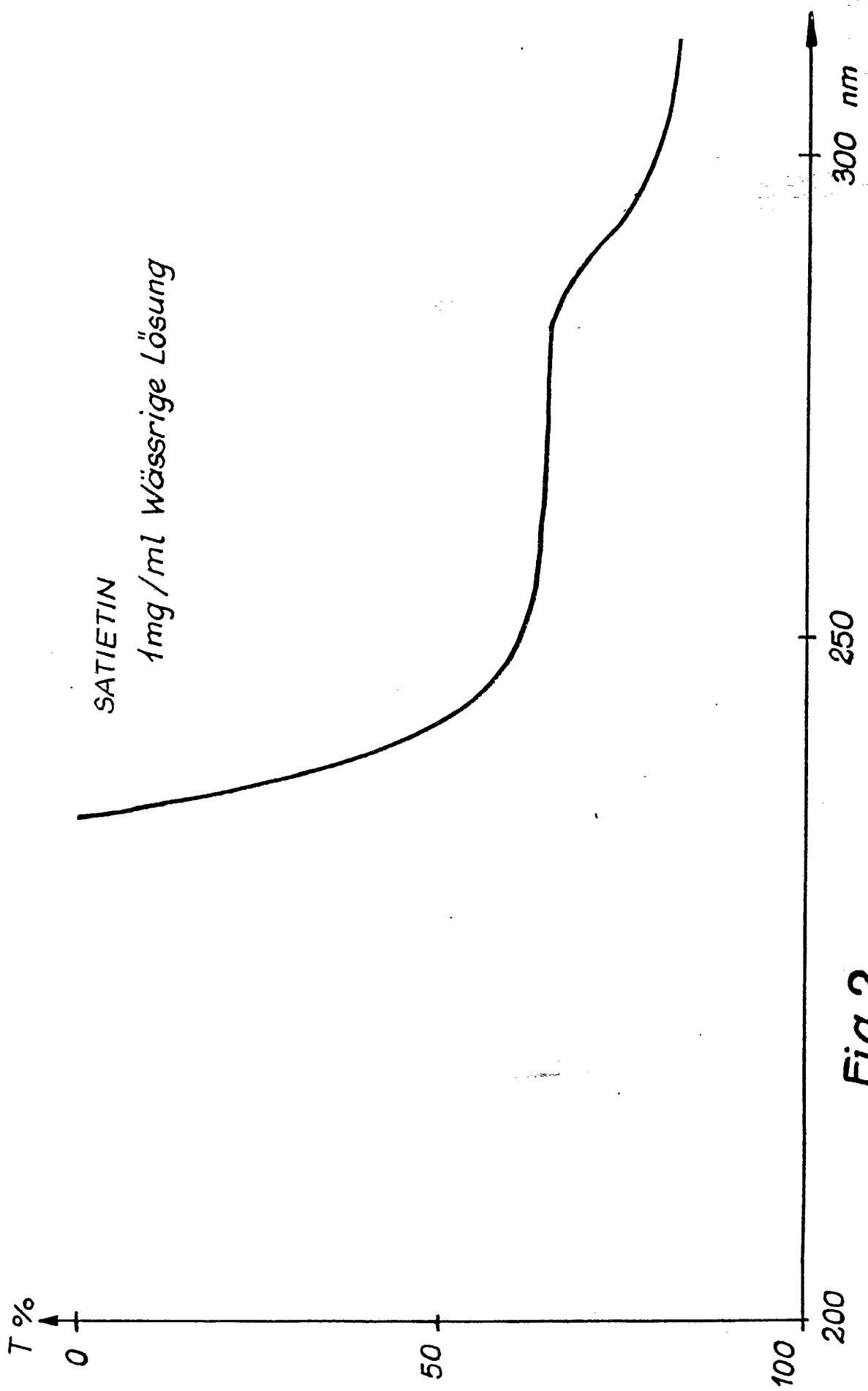


Fig. 2