

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Dezember 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/098912 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/47,
A61P 11/00, A61K 38/17, G01N 33/68, A61M 15/00

Hannover (DE). SAVAS, Yüksel [DE/DE]; Salzgitter-
strasse 23, 38268 Lengede (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02040

(74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Gramm, Lins & Partner
GbR, Freundallee 13, 30173 Hannover (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juni 2002 (05.06.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 27 119.0 5. Juni 2001 (05.06.2001) DE

(71) Anmelder und

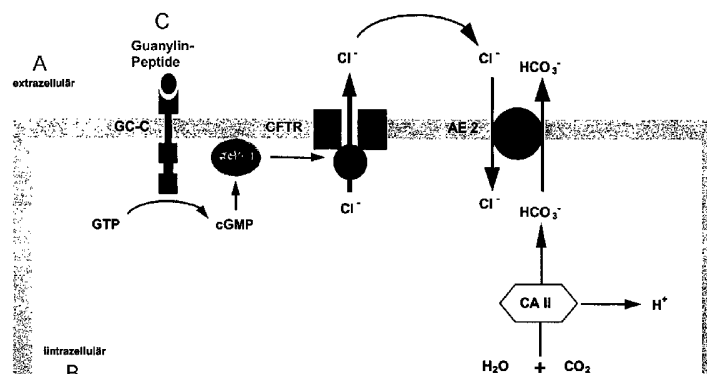
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

(72) Erfinder: CETIN, Yalcin [DE/DE]; Boschhof 2, 30655

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: USE OF A PEPTIDE WHICH ACTIVATES GUANYLATE-CYCLASE C FOR THE TREATMENT OF RESPIRATORY AIRWAY PROBLEMS VIA THE AIRWAYS, MEDICAMENT, INHALATION DEVICES AND METHOD OF DIAGNOSIS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES PEPTIDS, WELCHES GUANYLAT CYCLASE C AKTIVIERT, FÜR DIE BEHANDLUNG VON ATEMWEGSERKRANKUNGEN ÜBER DIE LUFTWEGE, ARZNEIMITTEL, INHALATIONS-VORRICHTUNG UND DIAGNOSEVERFAHREN



Signaltransduktion der Guanylin-Peptide an Epithelzellen

D

A ... EXTRACELLULAR

B ... INTRACELLULAR

C ... GUANYLIN PEPTIDES

D ... SIGNAL TRANSDUCTION OF THE GUANYLIN PEPTIDES ON THE EPITHEL CELLS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a guanylate cyclase C activated peptide for the treatment of respiratory airway problems and problems associated with ventilation disorder and/or mucous secretion disorders via the airways, in addition to a medicament which is fed via the airways. The invention also relates to an inhalation device which contains the medicament and a method for diagnosing the illnesses associated with inhalation disorders and mucous secretion disorders in the airways, by detecting a guanylate cyclase C activated peptide. The peptides which are used are guanylin, uroguanylin and lymphoguanylin or a heat resistant enterotoxin.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/098912 A2



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Es wird die Verwendung eines Guanylat Cyclase C aktivierenden Peptids für die Behandlung von Atemwegserkrankungen und Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimhautsekretion einhergehen, über die Luftwege vorgeschlagen, sowie eines Arzneimittels, das über die Luftwege zugeführt wird. Des weiteren wird eine Inhalationsvorrichtung, die das Arzneimittel enthält, angegeben und ein Verfahren zur Diagnose von Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und Störungen der Schleimhaut in den Atemwegen einhergehen, durch Nachweis eines Guanylat Cyclase C aktivierenden Peptids. Als Peptide werden Guanylin, Uroguanylin und Lymphoguanylin oder ein hitzebeständiges Enterotoxin eingesetzt.

Verwendung eines Peptids, welches Guanylat Cyclase C aktiviert, für die Behandlung von Atemwegserkrankungen über die Luftwege, Arzneimittel, Inhalationsvorrichtung und Diagnoseverfahren

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Peptids, welches Guanylat Cyclase C aktiviert, für die Behandlung von Atemwegserkrankungen und Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen, ein zugehöriges Arzneimittel, eine Inhalationsvorrichtung und ein Verfahren zur Diagnose der vorgenannten Erkrankungen.

Die obstruktiven Ventilationsstörungen sind ein ernstes klinisches Problem. Sie gehen mit einer Einengung der Atemwege und damit einer Erhöhung des Strömungswiderstands, Spasmen der Bronchialmuskulatur, ödematösen Schwellungen der Bronchialwand sowie gesteigerter Sekretion (Hyperkrinie) von Schleim zäher Konsistenz einher. Die Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen, umfassen u.a. Asthma bronchiale, chronische Bronchitis und Mukoviszidose.

Es stehen zur Zeit keine Substanzen zur Verfügung, die nachhaltig und effizient wirksam sind und zur wesentlichen Verbesserung der Symptome führen.

Als Sekretolytika oder Mukolytika - die auch unter Expektorantien zusammengefasst werden - sind u.a. Bromhexin, Ambroxol, Acetylcystein und Carbocystein im Einsatz. Der therapeutische Wert dieser Substanzen ist jedoch laut Mutschler, "Arzneimittelwirkungen", -Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996, zweifelhaft.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues effektives Mittel zur Behandlung von Atemwegserkrankungen und allgemein von Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen, bereitzustellen, wobei dieses Mittel die Verflüssigung und den besseren Abtransport insbesondere von Bronchialschleim ermöglichen soll.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung eines Peptids, welches Guanylat Cyclase C aktiviert, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Atemwegserkrankungen und Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen, über die Luftwege, wobei das Arzneimittel

so formuliert ist, dass die Zuführung des Peptids auf der Luftseite der Atemwege, nämlich zur apikalen Membran der Schleimhaut-Epithelzellen gerichtet, erfolgt.

Mehrere dieser Peptide können auch gemeinsam oder in Folge verabreicht werden. Äquivalent zur Verwendung dieser Peptide selbst ist die Verwendung homologer, im wesentlichen funktionsgleicher Peptide, insbesondere solcher Peptidvarianten mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder mehreren Aminosäuren und/oder chemischer Derivatisierung (insbesondere der terminalen Aminosäuren) verbundener Sequenz-Modifikation.

Pharmakologisch verträgliche Derivate sind vorzugsweise amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte Formen der Peptide und andere posttranslationale Derivatisierungen, einschließlich Salze dieser Peptide und Peptidderivate.

Es können natürliche, beispielsweise aus Blut, Lymphe, Urin oder humanen oder tierischen Geweben isolierte Peptide oder Peptidgemische, die aufgereinigt seien sollten, oder synthetische oder gentechnisch gewonnene (rekombinante) Peptide eingesetzt werden.

Bei dem Peptid handelt es sich insbesondere um wenigstens eines der als Guanylin, Uroguanylin und Lymphoguanylin bezeichneten Peptide oder um ein hitzebeständiges Enterotoxin. Diese Peptide sind als solche bekannt. Es kann auch ein zu den genannten Peptiden homologes Peptid mit im wesentlichen gleicher Funktion verwendet werden. Unter den Homologen werden hier solche Peptide verstanden, die weitgehend mit den nachfolgend noch beschriebenen Sequenzen übereinstimmen und vom Fachmann aufgrund ihrer Funktion und Sequenzhomologie noch den Guanylin-Peptiden zugerechnet werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass z.B. Punktmutationen, Deletionen und Insertionen die Funktion eines Peptids nicht beeinträchtigen müssen. Derartig veränderte Peptide würden daher zu den Homologen gerechnet.

Bevorzugt wird derzeit ein Guanylin-Peptid mit 15 Aminosäuren in folgender Sequenz:

Seq. ID 1 (Guanylin, 15 AS): PGTCEICAYAACTGC
 Pro-Gly-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Thr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

Ein 115 Aminosäuren langes Vorläufermolekül, das die vorstehende Sequenz enthält, wird häufig ebenfalls als "Guanylin" bezeichnet. Beide Peptide sind im Sinne der Erfindung geeignet, bevorzugt ist das Peptid mit Seq. ID 1, das sich als relativ kleines Peptid gut über die Inhalation zuführen lässt.

Ein 15-AS-Peptid mit der Sequenz **PGTCEICAYAACTGC** wurde zunächst aus Darmextrakten der Ratte isoliert und als "Guanylin" bezeichnet. Nach der Klonierung und Charakterisierung der cDNA für das menschliche Guanylin war es offensichtlich, dass das Guanylin als Vorläufer-Molekül mit 115 AS (Seq. ID 4: MNAFLLFALC LLGAWAALAG GVTVQDGNFS FSLESVKKLK DLQEPQEPRV GKLRNFAPIP GEPVVPILCS NPNFPEELKP LCKEPNAQEI LQRLEEIAED PGTCEICAYAACTGC) synthetisiert wird. Inzwischen ist bekannt, dass nicht das Vorläufer-Molekül als bioaktives Protein im Blut zirkuliert, sondern das Guanylin mit 94 AS (Proguanylin 22-115: VTVQDGNFS.....PGTCEICAYA ACTGC). Der in der Literatur etablierte Begriff "Guanylin" umschreibt sowohl das 15-AS-Peptid als auch das längere 94-AS-Peptid.

Humanes Uroguanylin ist ein Peptid, dem folgende Aminosäuresequenzen zugeordnet wurde:

Seq. ID 2 (Uroguanylin, 16 AS): NDDCELCVNVACTGCL
 Asn-Asp-Asp-Cys-Glu-Leu-Cys-Val-Asn-Val-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Leu

und wurde ursprünglich aus menschlichem Urin isoliert, worauf die Namensgebung beruht. Die US 5 489 670 beschreibt die Isolierung und Synthese von humanem Uroguanylin und sieht eine Verwendung als Laxans gegen Obstipationen vor.

Das Uroguanylin wurde zunächst als ein 16-AS-Peptid (**NDDC ELCVNVACTG CL**) aus dem Harn isoliert. Die Klonierung und Charakterisierung der cDNA für menschliches Uroguanylin ergab ein Uroguanylin Vorläufer-Molekül mit 112 AS (Seq. ID 5: MGCRAASGLL PGVAVVLLLL LQSTQSVYIQ YQGFVRVQLES MKKLSGLEAQ WAPSPRLQAQSLLPVCHHP ALPQDLQPVC ASQEASSI FKTLRTIA NDDC ELCVNVACTG CL). Nach Abspaltung des Signalpeptids entsteht ein 86 AS-Uroguanylin (unterstrichene Sequenz). Das 16-AS- und das 86-AS-Peptid werden als Uroguanylin bezeichnet.

Lymphoguanylin ist ein in Lymphgeweben exprimiertes Guanylin-Peptid, das von Forte et al. gefunden wurde (Forte et al. Endocrinology 1999, 140, 1800-1806). Es handelt sich um ein 15 Aminosäuren langes Peptid mit folgender Aminosäuresequenz:

Seq. ID 3 (Lymphoguanylin, 15 AS): QEECELCINMACTGY
Gln-Glu-Glu-Cys-Glu-Leu-Cys-Ile-Asn-Met-Ala-Cys-Thr-Gly-Tyr

Das Vorläufer-Molekül für Lymphoguanylin umfasst 109 Aminosäuren (Seq. ID 6: MKVLALPMAV TAMLLIL AQN TQSVYIQYEG FQVNLDSVKK LDKLLEQLRG FHHQMGDQRD PSILCSDPALPSDLQPVCEN SQAVNIFRAL RYIN **QEECELCINMACTGY**).

Die für Lymphoguanylin angegebenen Sequenzen stammen aus dem Opossum. Die menschliche Sequenz ist bisher nicht bekannt. Das 15-Aminosäuren-Lymphoguanylin aktiviert ebenso die menschliche Guanylat Cyclase C.

Von den vorgenannten Peptiden ist seit längerer Zeit bekannt, dass sie Guanylat-Cyclase stimulieren oder aktivieren, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert. Es wurden nacheinander mehrere Guanylat-Cyclase aktivierende Peptide entdeckt, die als endogene Liganden für die Guanylat Cyclase C betrachtet werden. Das erste dieser Peptide wurde Guanylin genannt (Currie, H.G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 947-951).

Im Darm rufen hitzstabile Enterotoxine - kleine Peptide, die u.a. von pathogenen Escherichia coli Stämmen produziert werden - sekretorische Diarrhöen hervor. Auch diese Toxine entfalten ihre Wirkung durch Stimulation der Guanylat Cyclase C, die von Darmepithelzellen exprimiert wird. Wie die hitzestabilen Enterotoxine führen die Guanylin-Peptide zu einer erhöhten Elektrolyt/Wasser-Sekretion an der Darmschleimhaut. Damit fungiert die Guanylat Cyclase C nicht nur als Rezeptor für die hitzestabilen Enterotoxine, sondern sie stellt den genuinen Rezeptor der endogenen Guanylin-Peptide dar.

Eine im Rahmen der Erfindung geeignete Sequenz eines hitzestabilen Enterotoxins ist:

Seq. ID 7 (hitzestabiles Enterotoxin): N S S N Y C C E L C C N P A C T G C Y (19 AS) aus enteropathogenen E. coli.

Gemeinsamer Wirkmechanismus der hitzestabilen Enterotoxine, Guanylin, Uroguanylin und Lymphoguanylin an der Darmschleimhaut.

In der Darmschleimhaut führen diese oben aufgelisteten Guanylin-Peptide und die hitzestabilen Enterotoxine über die Aktivierung des gemeinsamen Rezeptors zu einem Anstieg von cGMP in den Enterozyten. Durch den erhöhten cGMP-Spiegel wird in den Enterozyten die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII) aktiviert. Diese aktivierte Proteinkinase phosphoryliert und öffnet dadurch den CFTR-Chloridkanal in der apikalen Membran der Enterozyten. Dadurch kommt es zu einer Sekretion von Chlorid-Ionen und Wasser in das Lumen des Darms. Der CFTR-Chloridkanal gilt heute als der finale Effektor der Signaltransduktionskette der Guanylin-Peptide. Damit stellen diese Peptide einen direkten Regulator des CFTR-Chlorid-Kanals dar.

Besonderes Augenmerk gilt der Sekretion von Bikarbonat, die auch durch die Guanylin-Peptide vermittelt wird. Nach den bisherigen Erkenntnissen erfolgt die Bikarbonat-Sekretion über einen spezifischen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauscher (AE-2). Aufgrund bisheriger Befunde kann gefolgert werden, dass das über CFTR luminal sezernierte Cl^- wieder in die jeweiligen Zellen aufgenommen und durch HCO_3^- ausgetauscht wird. Damit kann festgehalten werden, dass die Guanylin-Peptide in den genannten Enterozyten eine zentrale Rolle in der Regulation von Cl^- und HCO_3^- spielen. Der Wirkmechanismus der Guanylin-Peptide ist in Abbildung 1 dargestellt.

Die genannten Peptide zirkulieren als endogene Aktivatoren im Blut. Sie können auch aus Blut bzw. Haemofiltrat gewonnen werden. So wird in der DE 195 28 544 ein Guanylin-Peptid beschrieben, das aus menschlichem Blut gewonnen wurde und für die diagnostische, medizinische und gewerbliche Verwendung als Arzneimittel vorgesehen ist. Dieses Peptid wurde als GCAP-II bezeichnet. Auf Grund der bekannten Wirkung der Guanylin-Peptide auf Guanylat Cylase C (s.o.) wurde GCAP-II speziell für die Behandlung von Erkrankungen, die mit Störungen des Elektrolyttransportes in den Zellen einhergehen vorgesehen. Die Anwendung soll vorzugsweise per Injektion erfolgen.

Der endogene Aktivator Guanylin wird an verschiedenen Orten im Körper gefunden. Nachgewiesen wurde Guanylin z. B. in der menschlichen Bauchspeicheldrüse (Kulaksiz et al, Histochem Cell Biol. (2001) 115, 131-145), in der Niere (Forte et al, Annu Rev. Physiol 2000, 62, 673-695), im Intestinaltrakt (Quian et al, Endocrinology 2000, 141, 3210-24) und in der Lunge (Cetin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5925 - 5929, 1995).

Durch die Anmelder konnte nun gefunden werden, dass der gemeinsame Rezeptor für hitzestabile Enterotoxine und Guanylin-Peptide, die Guanylat Cyclase C, in der Schleimhaut der Luftwege lokalisiert ist und dort in hohem Maße auf der apikalen Membran (Luftseite) der jeweiligen Epithelzellen exprimiert wird, nicht jedoch auf der basolateralen Membran (Blutseite). Der in der Lunge lokalisierte Rezeptor kann daher nicht über die Blutbahn, sondern ausschließlich über die Luftwege stimuliert werden.

Der Wirkungsmechanismus auf zellulärer und molekularer Ebene wird in der Figur 1 dargestellt, die schematisch die Signaltransduktion der Guanylin-Peptide an Epithelzellen zeigt.

Guanylat Cyclase (GC-C) ist ein Enzym-Rezeptor-Komplex, der als Membranprotein ausschließlich in der apikalen, zur Atemwege-Lichtung hin gerichteten Zelldomäne lokalisiert ist. Er fehlt an der basolateralen Membran der Zellen (Blutseite), die bekanntlich in Kontakt mit dem zirkulierenden Blut steht.

Guanylin-Peptide, die über die Lichtung der Atemwege an den Rezeptor (GC-C) binden, setzen einen spezifischen intrazellulären Mechanismus in Gang, der verschiedene Proteinmodule enthält. Die durch die Guanylin-Peptide von außen aktivierte GC-C bildet intrazellulär in hohen Mengen cGMP aus GTP. Dieser second messenger (cGMP) aktiviert eine membranassoziierte cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II (cKGII), die die Phosphorylierung und damit Aktivierung des CFTR-Proteins an seiner regulatorischen (R-) Domäne vornimmt. CFTR ist ein Membranprotein in der apikalen Membran der Epithelzellen und ist ein wichtiger Chlorid-Kanal, der nach Aktivierung Chlorid-Ionen aus der Zelle in Richtung Lichtung der Atemwege sezerniert. Aufgrund des so entstandenen ionischen Gradienten folgt das Wasser den sezernierten Chlorid-Ionen und fließt in die Lichtung der Atemwege. Das Wasser stammt aus den Epithelzellen und aus den Zwischenräumen zwischen den Zellen (parazellulär). Ein Teil der in die Lichtung sezernierten Chlorid-Ionen wird erneut in die Zellen aufgenommen; dafür werden Bikarbonat-Ionen aus den Zellen sezerniert. Dieser Austausch von Ionen wird durch den Anionen-Austauscher Typ II (AE2) bewerkstelligt. Auch das AE2-Protein ist in der apikalen Membran der Epithelzellen lokalisiert. Intrazellulär werden die Bikarbonat-Ionen durch das Enzym Carboanhydrase Typ II (CAII) aus Wasser und Kohlendioxid hergestellt.

Damit ist die luftseitige Membran der Epithelzellen der Schleimhaut die entscheidende Stelle der Signal-Rezeption, regulatorischen Aktivität und Elektrolyt/Wassersezernierenden Kapazität in den Atemwegen.

Insgesamt werden aufgrund dieses Wirkmechanismus der Guanylin-Peptide Ionen und Flüssigkeit in die Lichtung der Atemwege sezerniert, die die Qualität und Fließigenschaften des Bronchialschleims maßgeblich beeinflussen und bestimmen.

In der Figur werden folgende Abkürzungen verwendet: GC-C = Guanylat Cyclase C; cGKII = cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II; CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; AE-2 = Anionenaustauscher Typ 2; CAII = Carboanhydrase Typ II.

Die Aufklärung des der Erfindung zugrundeliegenden Wirkmechanismus wurde veröffentlicht in "Kulaksiz, H., Schmid, A., Hönscheid, M., Ramaswamy, A., Cetin, Y., PNAS, May 2002, Vol. 99, Seiten 6796-6801", "Kulaksiz et al., Histochem Cell Biol. (2001 115,131-145",

Eine zentrale Erkenntnis des erfindungsgemäßen Konzepts ist, dass die Aktivierung des Rezeptors durch Applikation der endogenen Liganden gezielt über die Luftwege zu erfolgen hat. Der Fachmann muss daher die Zuführung des Peptids oder des Arzneimittels, das das Peptid enthält, so einstellen, dass das Peptid - möglichst ausschließlich - auf der Luftseite zur apikalen Membran der Atemwege zugeführt wird und nicht etwa in größerem Ausmaß in die Blutbahn gelangt. Gerade hierdurch wird die gezielte lokale therapeutische Anwendung im Atemtrakt ermöglicht, zumal der Rezeptor in den Atemwegen ausschließlich luftseitig lokalisiert ist.

Bei der Zuführung der erfindungsgemäßen Peptide, nämlich der Guanylat Cyclase C-Liganden über die Luftwege handelt es sich um eine gerichtete und unmittelbare Zuführung zu dem luftseitig gelegenen Rezeptor. Eine Erhöhung der Blutkonzentration des Peptids durch Aufnahme über die Lunge, wie bei der Inhalation andere Peptide (die systemisch werden, z.B. Insulin) angestrebt, soll hier gerade strikt vermieden werden.

Dem Fachmann stehen hierfür die geeigneten Mittel zur Verfügung. Er kann die gerichtete Zuführung zur Luftseite über die Einstellung der Peptidkonzentration in der Arzneimittelformulierung, die Dosierung und die Einstellung der Partikel/Tröpfchengröße innerhalb der Formulierung oder des Inhalationsmittels so beeinflussen, dass praktisch kein Peptid zur Blutseite der Atemwege (zur basolateralen Membran) und damit in die Blutbahn durchtritt. Die optimalen Bedingungen können für jedes gewählte Peptid in gezielten Vorversuchen ermittelt werden.

Die Erfindung ermöglicht eine Therapie mit Dosen, die sehr viel geringer sind als solche, die für die Erhöhung der Blutkonzentration erforderlich wären, unter Minimierung bis Ausschaltung der systemischen Nebenwirkungen der jeweiligen Peptide.

Nur bei einer Applikation über die Luft führen die hitzestabilen Enterotoxine und die genannten Guanylin-Peptide zu einer ausreichenden Aktivierung des Rezeptors Guanylat Cyclase C und dadurch zu einer erhöhten Flüssigkeitssekretion in den Atemwegen. Bei einer systemischen Applikation wäre außerdem mit unerwünschten Nebenreaktionen zu rechnen, beispielsweise führt das Enterotoxin zu sehr unangenehmen sekretorischen Durchfallerkrankungen.

Weiterhin wirken die erfindungsgemäßen Peptide als Stimulantien im Sinne einer Sekretolyse durch Auflösen des in den Luftwegen vorliegenden zähen Schleims, wobei die Ionen-Zusammensetzung und der pH-Wert der Flüssigkeit unmittelbar auf den Epithelzellen ("Mikroklima") so eingestellt werden, dass der zähe Schleim sich zunehmend "verflüssigt".

Der Abtransport von Schleim und Mikropartikeln aus den Atemwegen wird durch Epithelzellen ermöglicht, die auf ihrer apikalen Seite (Luftseite) Flimmerhärchen (Zilien) tragen. Die "reinigende" Funktion wird durch Schlagen (rachenwärts) der Zilien erreicht.

Da die Guanylin-Peptide nebst ihrer Funktion, die Elektrolyt- und Wasser-Sekretion zu erhöhen, insbesondere auch die Zilien-tragenden Epithelzellen aktivieren, kommt es an diesen Zellen zu einer erhöhten Schlagfrequenz der Zilien. Damit wird im Sinne einer konzertierten Aktion das Sekret und kleinste Partikel auf der Schleimhaut der Atemwege wesentlich effizienter abtransportiert, was die physiologische und therapeutische Bedeutung der Guanylin-Peptide unterstreicht.

Weiterhin ist anzuführen, dass die genannten Substanzen relaxierend auf die glatte Muskulatur in der Wand der Bronchien und Bronchioli wirken. Dies führt insgesamt zu einer wesentlich verbesserten Atmung.

Die vorgenannten neugefundenen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Peptide wirken synergistisch im Sinne der Erfindung zusammen und führen zu der sehr guten Wirkung der durch die Luftwegen zugeführten Peptide zur Behandlung der eingangs genannten Störung und Erkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auf Basis dieser Erkenntnisse zusätzlich für die Herstellung von Diagnostika für Atemwegserkrankungen und Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen, verwendet werden.

Zunächst sind hierfür die Peptide selbst als Referenzsubstanzen für die Diagnostik geeignet. Ein Fehlen/Mangel oder ein Überschuss dieser Peptide beispielsweise in Bronchialschleim, Exsudat oder Lavage kann das Vorhandensein behandlungsbedürftiger Störungen anzeigen. Der Nachweis der Peptide kann mit den üblichen und bekannten Mitteln, wie spektroskopisch, chromatographisch oder chemisch geschehen.

Weiterhin können für diesen Nachweis vom Fachmann mit Hilfe dafür üblicher Verfahren und Mittel Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Peptide hergestellt werden, die dann innerhalb molekularbiologischer bzw. enzymatischer Assays eingesetzt werden können.

Zur Lösung der Aufgabe der Erfindung trägt daher auch ein Verfahren zur Diagnose der genannten Erkrankungen bei, bei welchem wenigstens eines der Peptide, das Guanylat Cyclase C aktiviert, nachgewiesen wird, und zwar vorzugsweise im Bronchialschleim, Exsudat, Lavage, Nasensekret oder Speichel.

Der Nachweis kann durch Nachweis einer der Sequenzen zu Seq. ID 1 bis ID 6

Seq. ID 1 (Guanylin): **PGTCEICAYA ACTGC**

Seq. ID 4 (Guanylin-Vorläufer-Molekül): MNAFLLFALC LLGAWAALAG
GVTVQDGNFS FSLESVKKLK DLQEPQEPRV GKLRNFAPIP GEPVVPILCS
NPNFPEELKPLCKEPNAQEI LQRLEEIAED **PGTCEICAYA ACTGC**

Seq. ID 2 (Uroguanylin): **NDDC ELCVNVACTGCL**

Seq. ID 5 (Uroguanylin-Vorläufer-Molekül): MGCRAASGLLPGVAVVLLLL
LQSTQSVYIQ YQGFRVQLES MKKLSDLEAQ WAPSPRLQAQ
SLLPAVCHHPALPQDLQPVC ASQEASSIFK TLRTIAN **DDC ELCVNVACTG CL**

Seq. ID 3 (Lymphoguanylin): **QEECELCINMACTGY**

Seq. ID 6 (Lymphoguanylin-Vorläufer-Molekül): MKVLALPMAVTAMLLILAQN
TQSVYIQYEG FQVNLDVKK LDKLLEQLRG FHHQMGDQRD
PSILCSDPALPSDLQPVCEN SQAVNIFRAL RYIN **QEECELCINMACTGY**

Seq. ID 7 (hitzestabiles Enterotoxin): N S S N Y C C E L C C N P A C T G C Y (19 AS) aus enteropathogenen E. coli.

erfolgen. Als positives Testergebnis für den Nachweis einer Störung wird gewertet, wenn eine von Vergleichsproben gesunder Probanden abweichende Konzentration wenigstens eines der Peptide, die Guanylat Cyclase C aktivieren, gefunden wird.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Peptide besteht weiter darin, dass ein Arzneimittel formuliert wird, welches über die Luftwege zugeführt wird und wenigstens ein Peptid enthält, das Guanylat Cyclase C aktiviert. Diese Peptide wurden oben bereits ausführlich beschrieben.

Neben dem Peptid oder dem Peptidgemisch kann wenigstens ein weiterer Wirkstoff sowie gegebenenfalls Hilfs- und Zusatzstoffe in dem Arzneimittel enthalten sein. Als weitere Wirkstoffe kommen hier beispielsweise muskelrelaxierende Mitteln, Lokalanthibiotika, vorwiegend für die Behandlung gleichzeitig aufgepfropfter bakterieller Infektionen, oder auch zusätzliche Mukolytika, Sekretolytike, Antitussiva oder bronchodilatierende Substanzen in Betracht. Die Auswahl wird der Fachmann auf Basis der jeweiligen Bedürfnisse bei der Behandlung der eingangs genannten Erkrankungen treffen.

Das Arzneimittel kann in fester oder flüssiger Form zubereitet werden und wird vom Benutzer in geeigneter Weise über die Luftwege zugeführt. Hierfür kann es mit einem handelsüblichen Zerstäuber oder Inhalationsgerät verabreicht werden.

In bevorzugter Ausführungsform liegt das Arzneimittel als Inhalationsmittel vor und enthält wenigstens ein Treibmittel. Als Treibmittel eignen sich besonders Fluorchlorkohlenwasserstoffe. Geeignete Treibmittel sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt. Allgemein können alle geeigneten Aerosolbildner oder auch Rauchbildner verwendet werden. Je nach Hilfsstoff wird ein Aerosol oder ein Rauch inhaliert, wobei ein Aerosol bevorzugt ist.

Zur Lösung der Aufgabe ist schließlich eine Inhalationsvorrichtung vorgesehen, die das Arzneimittel enthält, d.h. dass das Arzneimittel in der Inhalationsvorrichtung fertig konfektioniert vorliegt. Eine solche Inhalationsvorrichtung kann aus einer Sprühhvorrichtung, insbesondere einer Dosier-Sprühhvorrichtung oder einem Dosier-Inhalator (englisch: MDI, metered dose inhaler) bestehen. Geeignete Inhalatoren sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in US 3 915 165, EP 166476 und US 6 099 517. Geeignet sind auch Ultraschallvernebler.

Die erfindungsgemäßen Peptide sollten für die Verabreichung zunächst in eine feindisperse Form überführt werden. Hierfür können sie zunächst in Lösung oder Suspension gebracht und gegebenenfalls mit pharmazeutischen verträglichen Zusätzen in dieser Form stabilisiert werden. Zur Stabilisierung können verträgliche Tenside, z.B. Tween ®. verwendet werden. Geeignet sind je nach Inhalationsverfahren auch handelsübliche als Lebensmittel zugelassene Emulgatoren, z.B. Lecithin. Als weitere Zusatzstoffe können Salze, Puffer, Zucker, Sorbitol, Aminosäuren u.a.m. vorhanden sein. Die Gesamtzubereitung sollte isotonisch sein. Zur Stabilisierung der Feinverteilung kann ebenfalls eine Mikroverkapselung der betreffenden Peptide oder eine Verkapselung in Liposome vorgesehen sein.

Die zu verabreichenden Peptide können auch im festen Zustand pulverisiert, beispielsweise aus Lösung gefriergetrocknet, sprühgetrocknet oder kristallisiert, vorliegen und werden dann bevorzugt mit trockenen Fluorchlorkohlenwasserstoffen als Treibmittel und Aerosolbildner gemischt. Bei pulverförmiger Verabreichung können feste Zusätze, insbesondere Stabilisatoren, beispielsweise Zucker oder zuckerartige Stoffe, Lactose und dergleichen, zugesetzt sein.

Es sind auch Inhalationsvorrichtungen bekannt, in denen die Aerosolbildner oder Treibmittel einerseits und die eigentliche Arzneimittelzubereitung andererseits in verschiedenen Kammern aufbewahrt und gemeinsam in vorgegebener Dosierung abgegeben werden. Dies vermeidet ungenaue Dosierung durch Entmischung bei Lagerung.

Die Größe der zu inhalierenden Partikel ist weniger kritisch als bei vielen anderen Anwendungen, da die erfindungsgemäßen Peptide nicht transmembran ins Blut transportiert werden sollen, sondern lediglich den in der Lunge apikal lokalisierten Rezeptor Guanylat Cyclase C erreichen müssen. Teilchengrößen zwischen 0,5 und 10 µm erscheinen geeignet.

Im folgenden wird die Erfindung anhand eines Beispiels erläutert:

Die Anwendung der Peptide soll am Beispiel der "obstruktiven und restriktiven Ventilationsstörungen" erläutert werden. Diese Atemwegserkrankungen sind gekennzeichnet durch eine endobronchiale Obstruktion mit Bronchospasmus, Schleimhautödem und durch eine Hypersekretion eines zähen Schleims (Dyskrie). Diese Erscheinungen führen dazu, dass der betroffene Patient durch vermehrte und insuffiziente Atemarbeit regelrecht erschöpft. Als restriktive Komponente wird der Gasaus-

tausch durch das Schleimhautödem wesentlich verschlechtert, die Sauerstoffaufnahme der Lungen deutlich vermindert.

Die Anwendung der Peptide zielt auf eine diesen Pathomechanismen entgegenstehende Wirkung ab. Die inhalative Applikation führt zu einer Relaxierung der glatten Atemwegs-Muskulatur, so dass der bronchiale Widerstand und damit die Atemarbeit des Patienten abnimmt. Mit der Erleichterung der Atemarbeit wird eine Erschöpfung des Patienten gemindert bzw. verhindert.

Aufgrund von Elektrolyt/Wasser-sezernierenden Wirkungen dieser Peptide wird eine vermehrte Wasserausschwemmung aus der Schleimhaut der Atemwege induziert, die im Sinne einer Abnahme des Schleimhautödems (Abschwellung) wirkt und damit zu einer verbesserten Atmung führt. Durch den vermehrten Wasseraustritt aus der Schleimhaut wird die Dyskrie vermindert, der zähe Schleim verflüssigt und der Abtransport des Sekretes durch erhöhten Zilienschlag verbessert.

Somit üben die Peptide unterschiedliche Funktionen aus, die in ihrer Kombination und Synergie zu einer deutlichen Verbesserung der Atmung führen.

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Peptids, welches Guanylat Cyclase C aktiviert, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Atemwegserkrankungen und Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen, über die Luftwege, wobei das Arzneimittel so formuliert ist, dass die Zuführung des Peptids auf der Luftseite der Atemwege, nämlich zur apikalen Membran der Schleimhaut-Epithelzellen gerichtet, erfolgt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid ein natürliches oder rekombinantes Guanylin, Uroguanylin, Lymphoguanylin oder hitzebeständiges Enterotoxin ist, oder ein zu diesen homologes, im wesentlichen funktionsgleiches Peptid, insbesondere eine solche Peptidvariante mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder mehreren Aminosäuren und/oder chemischer Derivatisierung insbesondere der terminalen Aminosäuren verbundener Sequenz-Modifikation.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid eine der Sequenzen zu Seq. ID 1 bis Seq. ID 7 umfasst.
4. Verwendung eines Peptids, wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 angegeben, für die Herstellung eines Diagnostikums für Atemwegserkrankungen und Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und/oder Störungen der Schleimsekretion einhergehen.
5. Arzneimittel in einer Zubereitung, welche über die Luftwege an der apikalen Membran zugeführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass es wenigstens ein Peptid enthält, das Guanylat Cyclase C aktiviert.
6. Arzneimittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid Guanylin, Uroguanylin, Lymphoguanylin oder ein hitzebeständiges Enterotoxin ist, oder ein zu diesen homologes, im wesentlichen funktionsgleiches Peptid, insbesondere ein solcher Peptidvarianten mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder

mehreren Aminosäuren und/oder chemischer Derivatisierung insbesondere der terminalen Aminosäuren verbundener Sequenz-Modifikation, oder ein wenigstens eines dieser Peptide enthaltendes Peptidgemisch.

7. Arzneimittel nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eines der Peptide eine der Sequenzen zu Seq. ID 1 bis Seq. ID 7 umfasst.

8. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel neben dem wenigstens einen Peptid als Wirkstoff wenigstens einen weiteren Wirkstoff enthält, sowie gegebenenfalls Hilfs- und Zusatzstoffe.

9. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel in Form eines Inhalationsmittels vorliegt und wenigstens ein Treibmittel, wenigstens einen Aerosolbildner oder wenigstens einen Rauchbildner enthält.

10. Inhalationsvorrichtung, enthaltend das Arzneimittel nach einem der Ansprüche 5 bis 9.

11. Inhalationsvorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Sprühvorrichtung, insbesondere eine Dosier-Sprühvorrichtung oder einen Dosier-Inhalator umfasst.

12. Verfahren zur Diagnose von Erkrankungen, die mit Ventilationsstörungen und Störungen der Schleimsekretion in den Atemwegen einhergehen, durch Nachweis wenigstens eines Peptids, das Guanylat Cyclase C aktiviert.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis auf wenigstens eine der Sequenzen zu Seq. ID 1 bis Seq. ID 7 gerichtet ist.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid in Exsudat, Bronchialschleim oder Lavage nachgewiesen wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine von Vergleichsproben gesunder Probanden abweichende Konzentration wenig-

stens eines der Peptide, die Guanylat Cyclase C aktivieren, als positives Testergebnis für den Nachweis einer Störung gewertet wird.

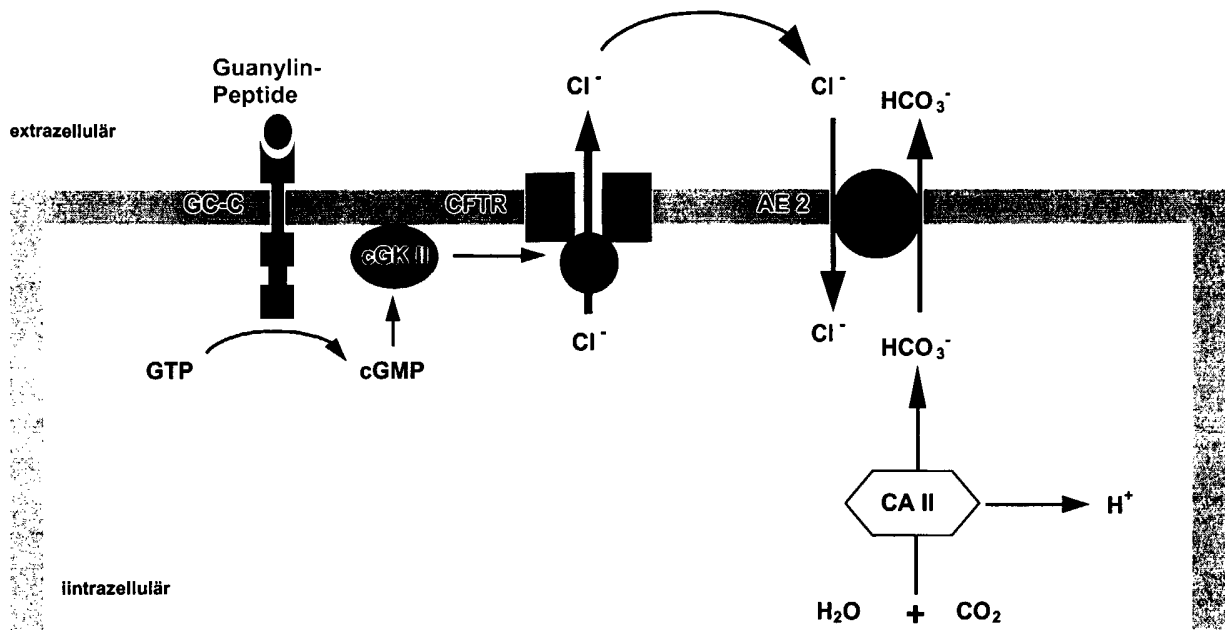


Fig. 1 Signaltransduktion der Guanylin-Peptide an Epithelzellen

Abb. 1

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn	Asp	Asp	Cys	Glu	Leu	Cys	Val	Asn	Val	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Leu
1			5					10					15		

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Opossum (Lymphgewebe)

<400> 3

Gln	Glu	Glu	Cys	Glu	Leu	Cys	Ile	Asn	Met	Ala	Cys	Thr	Gly	Tyr
1			5					10					15	

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Ratte oder Homo sapiens (Guanylin)

<400> 4

Met	Asn	Ala	Phe	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala	Trp	Ala
1			5					10					15		

Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Val	Thr	Val	Gln	Asp	Gly	Asn	Phe	Ser	Phe	Ser
			20					25					30		

Leu Glu Ser-Val Lys Lys Leu Lys Asp Leu Gln Glu Pro Gln Glu Pro
35 40 45

Arg Val Gly Lys Leu Arg Asn Phe Ala Pro Ile Pro Gly Glu Pro Val
50 55 60

Val Pro Ile Leu Cys Ser Asn Pro Asn Phe Pro Glu Glu Leu Lys Pro
65 70 75 80

Leu Cys Lys Glu Pro Asn Ala Gln Glu Ile Leu Gln Arg Leu Glu Glu
85 90 95

Ile Ala Glu Asp Pro Gly Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys
100 105 110

Thr Gly Cys
115

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Cys Arg Ala Ala Ser Gly Leu Leu Pro Gly Val Ala Val Val
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gln Ser Thr Gln Ser Val Tyr Ile Gln Tyr Gln
 20 25 30

Gly Phe Arg Val Gln Leu Glu Ser Met Lys Lys Leu Ser Asp Leu Glu
 35 40 45

Ala Gln Trp Ala Pro Ser Pro Arg Leu Gln Ala Gln Ser Leu Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Cys His His Pro Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Pro Val Cys
 65 70 75 80

Ala Ser Gln Glu Ala Ser Ser Ile Phe Lys Thr Leu Arg Thr Ile Ala
 85 90 95

Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
 100 105 110

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> Opossum

<400> 6

Met Lys Val Leu Ala Leu Pro Met Ala Val Thr Ala Met Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Asn Thr Gln Ser Val Tyr Ile Gln Tyr Glu Gly Phe Gln
 20 25 30

Val Asn Leu Asp Ser Val Lys Lys Leu Asp Lys Leu Leu Glu Gln Leu
 35 40 45

Arg Gly Phe His His Gln Met Gly Asp Gln Arg Asp Pro Ser Ile Leu
 50 55 60

