



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 37 916 T2 2008.04.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 529 534 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 37 916.7

(96) Europäisches Aktenzeichen: 05 002 085.8

(96) Europäischer Anmeldetag: 07.11.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.05.2005

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 11.07.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.04.2008

(51) Int Cl.⁸: A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

127096 12.11.1996 DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

Knudsen, Liselotte Bjerre, 4400 Kalundborg, DK; Thim, Lars, 2820 Gentofte, DK; Judge, Martin Edward, 1300 Copenhagen K, DK; Holst, Jens Juul, 2900 Hellerup, DK; Astrup, Arne Vernon, 2930 Klampenborg, DK; Wulff, Brigitte Schellerup, 2830 Virum, DK

(54) Bezeichnung: Verwendung von GLP-1 Peptiden

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Proglucagon 72-117 und Fragmenten und Analoga davon bei der Unterdrückung des Appetits oder der Herbeiführung von Sättigung, derartige Verbindungen umfassende Zusammensetzungen und ein Verfahren zum Unterdrücken des Appetits oder Herbeiführen der Sättigung bei Individuen, die eine derartige Behandlung benötigen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Aminosäuresequenz von Proglucagon 72-117 wurde u.a. von Bell, G. I. et al. (Nature 304 368-371 (1983)) angegeben. Das Proglucagon-Fragment 72-108 wird allgemein als GLP-1(1-37) oder nur als GLP-1 bezeichnet. Analog dazu wird das Proglucagon-Fragment 72-117 im vorliegenden Text auch als GLP-1(1-45) bezeichnet. Proglucagon stammt von Präproglucagon, das u.a. in den L-Zellen im Distalileum, in der Bauchspeicheldrüse und im Gehirn synthetisiert wird. Die Verarbeitung von Präproglucagon unter Erhalt von GLP-1 findet hauptsächlich in den L-Zellen statt. Ein einfaches System wird zum Beschreiben von Fragmenten und Analoga des mit GLP-1 verwandten Peptids verwendet. So bezeichnet z.B. Gly⁸-GLP-1(7-37) ein Fragment von GLP-1, das von GLP-1 durch Deletieren der Aminosäurereste Nr. 1 bis 6 und Substituieren des natürlich vorkommenden Aminosäurerests in Position 8 (Ala) durch Gly formal abgeleitet wird. Im vorliegenden Text wird die Bezeichnung „ein Analogon“ dazu verwendet, ein Peptid zu bezeichnen, in welchem ein oder mehrere Aminosäurerest(e) des Ursprungspeptids durch einen anderen Aminosäurerest substituiert worden ist (sind) und/oder in welchem ein oder mehrere Aminosäurerest(e) des Ursprungspeptids deletiert worden ist (sind), und/oder in welchem ein oder mehrere Aminosäurerest(e) an das Ursprungspeptid addiert worden ist (sind). Im vorliegenden Text bezeichnet die Bezeichnung „Aminosäurerest“ den Rest einer Aminosäure, der durch den genetischen Kode kodiert werden kann, d.h. ein Triplet („Kodon“) von Nukleotiden. Im vorliegenden Text werden die Peptide, auf die sich die Erfindung bezieht, gemeinsam „GLP-1-Peptide“ genannt.

[0003] Turton, M. D. et al. (Nature 379 69-72 (1996)) untersuchten die Wirkung von GLP-1 auf die Nahrungsaufnahme bei Ratten. Sie fanden eine tiefgreifende Wirkung von GLP-1 auf die Nahrungsaufnahme, wenn die Verbindung intracerebrovetrikulär verabreicht wurde, machten jedoch geltend, dass nach einer peripheren Verabreichung GLP-1 unwirksam war. Tang-Christensen, M. et al. (Am. J. Physiol. 271 (40R) 848-856 (1996)) fanden ebenfalls, dass GLP-1 eine tiefgreifende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme bei Ratten hatte, wenn die Verbindung intracerebrovetrikulär verabreicht wurde. Sie machten geltend, dass peripher verabreichtes GLP-1 keine merkliche Wirkung hatte. Auch machten sie geltend, dass GLP-1(1-36)amid keine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme hatte. Überraschenderweise stellte sich nun heraus, dass peripher verabreichtes GLP-1 eine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme, die Sättigung und den Appetit bei Menschen und auf die Nahrungsaufnahme bei Mäusen hat. Auf der Basis dieser Beobachtungen ist es nun möglich, ein Medikament und ein Verfahren zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen oder Störungen, die mit einer beeinträchtigten Appetitregulierung verbunden sind, bereitzustellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] In ihrem breitesten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-45) oder eines Fragments oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von GLP-1(1-45) oder eines Fragments oder eines Analogons davon bei der Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder der Herbeiführung von Sättigung, ein Arzneimittel zur peripheren Verabreichung einer derartigen Verbindung und ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Störungen, die mit einer beeinträchtigten Appetitregulierung oder einem beeinträchtigten Sättigungsgefühl verbunden sind.

[0005] In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-39) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0006] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-38) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0007] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-37) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0008] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-36) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0009] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-35) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0010] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(1-34) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0011] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-45) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0012] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-39) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0013] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-38) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0014] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-37) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0015] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-36) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0016] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-35) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0017] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von GLP-1(7-34) oder eines Analogons davon oder des C-terminalen Amids von beliebigen davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung.

[0018] Die vorstehend speziell erwähnten, von den GLP-1-Peptiden abgeleiteten Analoga enthalten maximal fünf, vorzugsweise maximal drei, stärker bevorzugt maximal zwei Veränderungen, d.h. Substitutionen und/oder Deletionen und/oder Verlängerungen, im Molekül.

[0019] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel zur

peripheren Verabreichung, umfassend eines der vorstehend erwähnten GLP-1-Peptide, zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen oder Störungen, die mit einer beeinträchtigten Appetitregulierung oder einem beeinträchtigten Hungergefühl verbunden sind.

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel zur peripheren Verabreichung, umfassend eines der vorstehend erwähnten GLP-1-Peptide, zur Prophylaxe oder Behandlung von Fettsucht.

[0021] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Erkrankungen oder Störungen, die mit einer beeinträchtigten Appetitregulierung oder einem beeinträchtigten Sättigungsgefühl verbunden sind, wobei das Verfahren das Verabreichen einer Menge eines wie vorstehend erwähnten GLP-1-Peptids, die zum Unterdrücken des Appetits oder zur Herbeiführung der Sättigung bei einem Individuum ausreichend ist, an ein Individuum, das eine derartige Behandlung benötigt, umfasst.

[0022] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Fettsucht, wobei das Verfahren das Verabreichen einer ausreichenden Menge eines wie vorstehend erwähnten GLP-1-Peptids an ein Individuum, das eine derartige Behandlung benötigt, umfasst.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0023] Die vorliegende Erfindung wird weiter mit Bezug auf die beiliegende Zeichnung veranschaulicht, wobei

[0024] [Fig. 1](#) das im ersten Reinigungsschritt in Beispiel 3 erhaltene Gelfiltrationschromatogramm zeigt;

[0025] [Fig. 2](#) das im zweiten Reinigungsschritt in Beispiel 3 erhaltene HPLC-Chromatogramm zeigt und

[0026] [Fig. 3](#) einen vergrößerten Abschnitt des in [Fig. 2](#) dargestellten Chromatogramms zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die erfindungsgemäß verwendeten GLP-1-Peptide können durch chemische Synthese oder – günstiger – durch ein Verfahren hergestellt werden, das das Kultivieren einer Wirtszelle, enthaltend eine DNA-Sequenz, die das Peptid kodiert und in der Lage ist, das Peptid zu exprimieren, in einem geeigneten Nährmedium unter die Expression des Peptids erlaubenden Bedingungen, worauf das erhaltene Peptid aus der Kultur gewonnen wird, umfasst.

[0028] Das zum Kultivieren der Zellen verwendete Medium kann jedes beliebige herkömmliche Medium, das für das Wachstum der Wirtszellen geeignet ist, wie Minimal- oder Komplexmedien, die geeignete Ergänzungsstoffe enthalten, sein.

[0029] Geeignete Medien sind von kommerziellen Lieferanten erhältlich oder können gemäß veröffentlichten Rezepturen (z.B. in Katalogen der American Type Culture Collection) hergestellt werden. Das durch die Zellen hergestellte Polypeptid kann dann aus dem Kulturmedium je nach fraglichem Polypeptidtyp durch herkömmliche Vorgehensweisen, einschließlich Abtrennen der Wirtszellen vom Medium durch Zentrifugation oder Filtration, Ausfällen der proteinhaltigen Bestandteile des Überstands oder Filtrats mithilfe eines Salzes, z.B. Ammoniumsulfat, Reinigung durch eine Vielfalt von chromatographischen Vorgehensweisen, z.B. Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Affinitätschromatographie oder dergleichen gewonnen werden.

[0030] Die das Ursprungspolypeptid kodierende DNA-Sequenz kann geeigneterweise genomischen oder cDNA-Ursprungs sein, der z.B. durch Herstellen einer genomischen oder cDNA-Bibliothek und Durchmustern auf DNA-Sequenzen, die das gesamte oder einen Teil des Polypeptids kodieren, durch Hybridisierung unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotidsonden gemäß Standardtechniken erhalten wird (siehe z.B. Sambrook., J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). Die das Polypeptid kodierende DNA-Sequenz kann auch durch etablierte Standardverfahren, z.B. das von Beaucage und Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, beschriebene Phosphoamiditverfahren oder das von Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801-805, beschriebene Verfahren, synthetisch hergestellt werden. Die DNA-Sequenz kann auch durch Polymerasekettenreaktion unter

Verwendung von spezifischen Primern, z.B. wie in US 4,683,202 oder Saiki et al., Science 239 (1988) 487-491, beschrieben, hergestellt werden.

[0031] Die DNA-Sequenz kann in einen beliebigen Vektor eingefügt werden, der günstigerweise rekombinannten DNA-Vorgehensweisen unterzogen werden kann, und die Wahl des Vektors hängt häufig von der Wirtszelle, in welche er einzubringen ist, ab. So kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor, d.h. ein Vektor, der als extrachromosomal Einheit vorliegt, wobei deren Replikation von der chromosomal Replikation unabhängig ist, z.B. ein Plasmid, sein. Alternativ dazu kann der Vektor einer sein, der nach dem Einbringen in eine Wirtszelle in das Wirtszellengenom integriert und zusammen mit dem (den) Chromosom(en), in welche(s) er integriert worden ist, repliziert wird.

[0032] Der Vektor ist vorzugsweise ein Expressionsvektor, in welchem die das Polypeptid kodierende DNA-Sequenz an zusätzliche Segmente, die zur Transkription der DNA erforderlich sind, wie einen Promotor, funktionsfähig gebunden ist. Der Promotor kann eine beliebige DNA-Sequenz sein, die in der Wirtszelle der Wahl transkriptionelle Aktivität zeigt, und kann von Genen abgeleitet sein, die Proteine entweder homolog oder heterolog zur Wirtszelle kodieren. Beispiele für geeignete Promotoren zum Steuern der Transkription der das Polypeptid der Erfindung kodierenden DNA in einer Vielzahl von Wirtszellen sind auf dem Fachgebiet bekannt, vgl. z.B. Sambrook et al., vorstehend.

[0033] Die das Polypeptid kodierende DNA-Sequenz kann gegebenenfalls auch mit einem geeigneten Terminator, mit Polyadenylierungssignalen, transkriptionellen Verstärkersequenzen und Translationsverstärkersequenzen funktionsfähig verbunden sein. Der rekombinante Vektor der Erfindung kann ferner eine DNA-Sequenz umfassen, die es dem Vektor ermöglicht, in der fraglichen Wirtszelle zu replizieren.

[0034] Der Vektor kann auch einen selektierbaren Marker, z.B. ein Gen, dessen Produkt einen Defekt in der Wirtszelle ausgleicht, oder einen, der gegen ein Arzneimittel, z.B. Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Neomycin, Hygromycin oder Methotrexat, Resistenz verleiht, umfassen.

[0035] Zum Steuern eines ursprünglichen Polypeptids der vorliegenden Erfindung in den sekretorischen Weg der Wirtszellen kann eine sekretorische Signalsequenz (auch bekannt als Leader-Sequenz, Präprosequenz oder Präsequenz) im rekombinanten Vektor bereitgestellt werden. Die sekretorische Signalsequenz ist mit der DNA-Sequenz verbunden, die das Polypeptid im korrekten Ableserahmen kodiert. Sekretorische Signalsequenzen befinden sich üblicherweise an der 5'-Position der das Polypeptid kodierenden DNA-Sequenz. Die sekretorische Signalsequenz kann diejenige sein, die normalerweise mit dem Polypeptid verbunden ist oder kann von einem Gen stammen, das ein anderes sekretiertes Protein kodiert.

[0036] Die Vorgehensweisen, die zum Ligieren der das vorliegende Polypeptid kodierenden DNA-Sequenzen, des Promoters und wahlweise des Terminators bzw. der sekretorischen Signalsequenz und zu deren Einfügen in geeignete Vektoren, die die zur Replikation nötige Information enthalten, verwendet werden, sind dem Fachmann bekannt (vgl. z.B. Sambrook et al., vorstehend).

[0037] Die Wirtszelle, in welche die DNA-Sequenz oder der rekombinante Vektor eingebracht wird, kann eine beliebige Zelle sein, die in der Lage ist, das vorliegende Polypeptid herzustellen, und schließt Bakterien-, Hefe-, Pilz- und höhere eukaryotische Zellen ein. Beispiele für geeignete Wirtszellen, die bekannt sind und auf dem Fachgebiet verwendet werden, schließen ohne Einschränkung Zelllinien von *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder Säuger-BHK oder CHO ein.

[0038] Verbindungen, die als erfindungsgemäße GLP-1-Peptide nützlich sein können, sind in der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 87/06941 (The General Hospital Corporation) beschrieben, die ein Peptidfragment, das GLP-1(7-37), und funktionelle Derivate davon umfasst und deren Verwendung als insulinotrope Mittel betrifft.

[0039] Weitere GLP-1-Analoga sind in der internationalen Patentanmeldung Nr. 90/11296 (The General Hospital Corporation) beschrieben, die Peptidfragmente, die GLP-1(7-36) und funktionelle Derivate davon umfassen und eine insulinotrope Aktivität aufweisen, die die insulinotrope Aktivität von GLP-1(1-36) oder GLP-1(1-37) übertrifft, und deren Verwendung als insulinotrope Mittel betrifft.

[0040] Die internationale Patentanmeldung Nr. 91/11457 (Buckley et al.) offenbart Analoga der aktiven GLP-1-Peptide 7-34, 7-35, 7-36 und 7-37, die auch als erfindungsgemäße GLP-1-Peptide nützlich sein können.

[0041] Arzneimittel, die ein erfindungsgemäßes GLP-1-Peptid enthalten, können Patienten, die eine derartige Behandlung benötigen, parenteral verabreicht werden. Die parenterale Verabreichung kann durch subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale oder intravenöse Injektion mithilfe einer Spritze, wahlweise einer Pen-artigen Spritze, durchgeführt werden. Alternativ dazu kann die parenterale Verabreichung mithilfe einer Infusionspumpe durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine Zusammensetzung, die ein Pulver oder eine Flüssigkeit zur Verabreichung des Peptids in Form eines Nasen- oder Pulmonalsprays sein kann. Als noch eine weitere Möglichkeit kann das Peptid der Erfindung auch transdermal, z.B. von einem Pflaster, wahlweise einem iontophoretischen Pflaster, verabreicht werden. Zusammensetzungen, die zur bukkalen, rektalen und vaginalen Verabreichung geeignet sind, können ebenfalls bereitgestellt werden.

[0042] Arzneimittel, die ein GLP-1-Peptid der vorliegenden Erfindung enthalten, können durch herkömmliche Techniken, z.B. wie beschrieben in Gennaro, Alfonso R. (Herausgeber) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Bd. 1-2, 19. Aufl., Mack Publishing Company (1995), hergestellt werden.

[0043] So können die injizierbaren Zusammensetzungen des GLP-1-Peptids der Erfindung unter Verwendung von herkömmlichen Techniken der pharmazeutischen Industrie hergestellt werden, was das Lösen und Mischen der Inhaltsstoffe, wie sie zum Erhalt des gewünschten Endprodukts geeignet sind, beinhaltet.

[0044] So wird gemäß einer Vorgehensweise das GLP-1-Peptid in einer Wassermenge, die etwas geringer als das Endvolumen der herzustellenden Zusammensetzung ist, gelöst. Ein isotonisches Mittel, ein Konservierungsmittel und ein Puffer werden nach Bedarf zugesetzt, und der pH-Wert der Lösung wird gegebenenfalls, ne nach Notwendigkeit unter Verwendung einer Säure, z.B. Salzsäure, oder einer Base, z.B. wässrigem Natriumhydroxid, eingestellt. Schließlich wird das Volumen der Lösung mit Wasser derart eingestellt, dass die gewünschte Konzentration der Inhaltsstoffe erhalten wird.

[0045] Beispiele für isotonische Mittel sind Natriumchlorid, Mannit und Glycerin.

[0046] Beispiele für Konservierungsmittel sind Phenol, m-Cresol, Methyl-p-hydroxybenzoat und Benzylalkohol.

[0047] Beispiele für geeignete Puffer sind Natriumacetat und Natriumphosphat.

[0048] Eine Zusammensetzung zur nasalen Verabreichung von Peptiden kann z.B. wie im Europäischen Patent Nr. 272097 (an Novo Nordisk A/S) oder in WO 93/18785 beschrieben hergestellt werden.

[0049] Gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das GLP-1-Peptid in Form einer injizierbaren Lösung bereitgestellt. In derartigen Ausführungsformen enthalten die Lösungen vorzugsweise nicht weniger als etwa 2 mg/ml, vorzugsweise nicht weniger als etwa 5 mg/ml, stärker bevorzugt nicht weniger als etwa 10 mg/ml des GLP-1-Peptids und vorzugsweise nicht mehr als etwa 100 mg/ml des GLP-1-Peptids.

[0050] Die GLP-1-Peptide dieser Erfindung können bei der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen verwendet werden. Insbesondere wird ins Auge gefasst, dass die GLP-1-Peptide zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung bei der Behandlung von Fettsucht nützlich sein werden. Das zu verwendende spezielle GLP-1-Peptid und der optimale Dosisgehalt für den jeweiligen Patienten hängt von der zu behandelnden Erkrankung und einer Vielfalt von Faktoren, einschließlich der Wirksamkeit des eingesetzten spezifischen GLP-1-Peptids, des Alters, des Körpergewichts, der Körperaktivität und der Ernährung des Patienten, von einer möglichen Kombination mit anderen Arzneimitteln und von der Schwere des Falls ab. Es wird empfohlen, dass die Dosierung des GLP-1-Peptids der Erfindung für jeden einzelnen Patienten durch den Fachmann bestimmt wird. Im Allgemeinen liegt jedoch die Dosierung im Bereich von etwa 10 µg pro kg Körpergewicht pro Tag bis etwa 5 mg pro kg Körpergewicht pro Tag. Die tägliche Gesamtdosis kann in Form von zwei oder mehreren Teilmengen davon verabreicht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das GLP-1-Peptid in Form eines Arzneimittels verabreicht, das ein verlängertes Wirkungsprofil aufweist. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das GLP-1-Peptid über eine längere Dauer verabreicht. Eine derartige Verabreichung kann z.B. durch Infusion, durch Iontophorese oder von einem transdermalen Pflaster bewirkt werden.

[0051] Die vorliegende Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, die jedoch nicht als Einschränkung des Schutzmfangs ausgelegt werden sollen. Die in der vorstehenden Beschreibung und

in den folgenden Beispielen offenbarten Merkmale können sowohl getrennt als auch in beliebiger Kombination davon Gegenstand zur Verwirklichung der Erfindung in diversen Formen davon sein.

BEISPIELE

Beispiel 1

Die Wirkung von GLP-1(7-36)amid auf die Nahrungsaufnahme bei normalen menschlichen Probanden.

[0052] Gesunden menschlichen freiwilligen Versuchspersonen (20 Probanden) wurde in einem Doppelblind-kreuzversuch eine i.v.-Infusion von 50 ml/(kg·h) GLP-1(7-36)amid oder Kochsalzlösung an getrennten, aber sonst identischen Versuchstagen verabreicht. Die Infusion wurde um 9 Uhr begonnen und dauerte bis 15 Uhr. Um 9 Uhr 45 erhielten die Probanden eine festgelegte Menge Frühstück, und um 14 Uhr 15 erhielten sie Mittagessen mit identischer Zusammensetzung, jedoch nach Belieben. Die Probanden beurteilten jede halbe Stunde ihr Gefühl von Sättigung, Hunger, Völlegefühl und Appetit auf einer visuell analogen Skala. Die Ergebnisse sind nachstehend angegeben:

Sättigung:	GLP-1 > Kochsalzlösung, p = 0,006
Hunger:	GLP-1 < Kochsalzlösung, p = 0,007
Völlegefühl:	GLP-1 > Kochsalzlösung, p = 0,010
Appetit:	GLP-1 < Kochsalzlösung, p = 0,007

[0053] Die Energieaufnahme von jedem Probanden wurde gemessen. Die Aufnahmen betrugen 3,9 MJ mit GLP-1 und 4,3 MJ mit Kochsalzlösung, was zu einem p-Wert von 0,009 führte.

Beispiel 2

Testverfahren zum Messen der Appetitunterdrückung bei Mäusen.

[0054] Mäusen wurde ihr normales Futter für eine Dauer von zwei Tagen entzogen, und sie erhielten am ersten Tag des Futterentzugs freien Zugang zu einer 20%igen Saccharoselösung. Nach der zweitägigen Futterentzugsdauer wurden den Mäusen intraperitoneal 0,5 ml einer die Testsubstanz enthaltenden Lösung injiziert. Direkt nach der Injektion wurden die einzelnen Mäuse in eine von acht quadratischen Testboxen von 15 cm mit einem Edelstahlgitterboden und einem in die Box hineinragenden Glastrinkrohr gegeben. Das Trinkrohr war mit einem 20%igen Saccharoselösung enthaltenden Behälter verbunden, und das Innere des Trinkrohrs enthielt eine Elektrode, die den Nachweis der Trinkkontakte mit der Lösung durch Messen des Flusses eines schwachen (nicht wahrnehmbaren) elektrischen Stroms durch die Mäuse mithilfe eines elektronischen Geräts, das mit der Trinkrohrelektrode und dem Edelstahlgitterboden verbunden war, ermöglichte. Der Verbrauch der Saccharoselösung wurde über eine Dauer von 10 Minuten durch elektronisches Aufzeichnen der Gesamtkontaktmenge mit der Saccharoselösung während der Testsitzung gemessen. Der Grad der Appetitunterdrückung, der durch eine vorgegebene Testsubstanz erzeugt wurde, wurde durch statistischen Vergleich der mittleren Dauer des Saccharoseverbrauchs durch Kontroll-(mit Vehikulum behandelten)-mäuse mit derjenigen von mit einer Testsubstanz behandelten Mäusen bestimmt. Der Grad der Appetitunterdrückung in einer behandelten Mäusegruppe wurde als prozentualer Unterschied zwischen den Ansprechdauermittelwerten der Test- und der Kontrollgruppe ausgedrückt.

[0055] Die Testsubstanz war in steriler Kochsalzlösung gelöstes GLP-1(7-36)amid. Die 85 Mikrogramm GLP-1(7-36)amid (äquivalent mit 3,4 mg/kg) enthaltende Testlösung unterdrückte den Saccharoseverbrauch um 60% mit einem p-Wert von 0,002.

Beispiel 3

Unterdrückung der Nahrungsaufnahme durch aus Tumoren isolierte GLP-1-Peptide bei anorektischen Ratten

Säureethanolextraktion von Tumorgewebe

[0056] Anorektische Tumore wurden in Ratten, wie früher beschrieben (Madsen, O.D. et al. (1993) Endocrinology 133 2022-2030), erzeugt. Fünfzig anorektische 12C3AN-(MSL-G-AN)-Tumore (bei -80°C), entsprechend 50,07 g nassem Gewebe, wurden bei 4°C mit 700 ml Säureethanol (96%iges Ethanol/0,7 M HCl, 3/1, Vol/Vol) homogenisiert. Die Homogenisierung wurde für eine Dauer von 5 Minuten in einem vorgekühlten

(4°C), im Handel erhältlichen Waring-Mischer mit einem Volumen von 2 Liter bei maximaler Geschwindigkeit durchgeführt. Nach der Homogenisierung wurde das Gemisch bei 4°C für eine Dauer von 16 Stunden gerührt. Das Gemisch wurde mit 9000 UpM bei 4°C für eine Dauer von 1 Stunde zentrifugiert. Das Volumen des Überstands wurde auf 20% durch Vakuumverdampfung reduziert. Während dieses Verfahrens, in welchem der Hauptteil des Ethanols entfernt wird, wird etwas Niederschlag gebildet. Dieser Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 4°C für eine Dauer von einer Stunde bei 20 000 UpM entfernt. Der Überstand, der immer noch ein wenig lipidartiges Material enthielt, wurde filtriert und auf eine Säule des Typs LiChroprep RP-18 (Merck) (2,5 × 10 cm), äquilibriert mit 0,1%igem TFA, mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/Min. aufgebracht. Die Säule wurde mit 100 ml 0,1 %igem TFA mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 ml/Min. gewaschen. Gebundenes Material wurde mit 400 ml 0,1 %igem TFA, enthaltend 70% (Vol/Vol) Acetonitril, eluiert. Das Acetonitril wurde durch Vakuumverdampfung entfernt, und das erhaltene Gemisch wurde lyophilisiert. Nach der Lyophilisierung wurde das Material in 50 ml Wasser gelöst, und der pH-Wert wurde mit 425 µl 1N NaOH auf 5,3 eingestellt. Eine weitere Titration des Gemisches auf pH 6,0 führte zur Bildung eines Niederschlags. Nach Rücktitration auf pH 5,3 wurde dieser Niederschlag wieder gelöst. Deshalb wurde der pH bei 5,3 belassen, und das Gemisch wurde lyophilisiert. Die Gesamtausbeute an lyophilisiertem Material von 50 Tumoren betrug 359 mg trockenes Pulver.

Erster Reinigungsschritt: Gelfiltration auf Sephadex G-75

[0057] Lyophilisiertes Material (278 mg) aus dem Säureethanolextrakt, entsprechend 38 einzelnen Tumoren, wurde erneut in 20 ml 1 M Essigsäure gelöst und auf eine Säule des Typs Sephadex G75 (5 × 50 cm) aufgebracht. Die Säule wurde äquilibriert und mit 1 M Essigsäure mit einer Fließgeschwindigkeit von 55 ml/Std. eluiert, und Fraktionen, entsprechend 10 ml, wurden gesammelt. Die Absorption bei 280 nm wurde für jede Fraktion aufgezeichnet. Das Gelfiltrationschromatogramm ist in [Fig. 1](#) dargestellt. Einzelne Fraktionen wurden in den folgenden 5 Hauptfraktionen gepoolt: G1 (Fr. 30-39), G2 (Fr. 40-45), G3 (Fr. 46-66), G4 (Fr. 67-91) und G5 (Fr. 92-118) und nach der Lyophilisierung einem Bioassay unterzogen.

Zweiter Reinigungsschritt: Präparative HPLC des G4-Pools

[0058] Es zeigte sich, dass ein wenig von der Appetitunterdrückungsaktivität der Gelfiltrationspools im G4-Pool vorlag, und dieser Pool wurde weiter durch präparative HPLC fraktioniert. Lyophilisiertes G4-Material (entsprechend 80 Tumoren) wurde in 15 ml 0,1 %igem TFA erneut gelöst und auf eine C4-Säule des Typs Vydac 214TP1022 (2,2 × 25 cm), äquilibriert in 0,1%igem TFA, gepumpt. Die Säule wurde mit 20 ml 0,1 %igem TFA, gefolgt von 100 ml MeCN/H₂O/TFA (10,0:89,9:0,1, V/V/V), gewaschen. Das Material wurde bei 25°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 ml/Min. mit einem linearen Gradienten, gebildet aus MeCN/H₂O/TFA (10:79,9:0,1, V/V/V) und MeCN/H₂O/TFA (65,0:34,9:0,1, v/v/v), über eine Dauer von 110 Minuten eluiert. Die UV-Absorption wurde bei 214 nm und 280 nm überwacht. Das HPLC-Chromatogramm (überwacht bei 280 nm) ist in [Fig. 2](#) und in einer größeren Vergrößerung in [Fig. 3](#) dargestellt. Fraktionen, entsprechend 61 Pools, wurden, wie in [Fig. 3](#) angegeben, gebildet. Das Volumen wurde auf etwa 25% durch Vakuumverdampfung reduziert, und die Fraktionen wurden lyophilisiert und im Bioassay getestet.

[0059] Die Appetitunterdrückungsaktivität wurde in Fraktion 53, 57 und 60 gefunden, und die Peptide dieser Fraktionen wurden durch Aminosäuresequenzanalyse und Massenspektrometrieanalyse analysiert.

Chemische Charakterisierung der Peptide in den Fraktionen 53, 57 und 60

[0060] Die Aminosäuresequenzanalyse wurde durch automatisierten Edman-Abbau unter Verwendung des Gasphasensequenzierers des Typs Applied Biosystems Modell 477, im Wesentlichen wie durch den Hersteller beschrieben, durchgeführt. Die Massenspektrometrieanalyse wurde unter Verwendung eines LC/MS/MS-Systems des Typs API III (Sciex, Thornhill, Ontario, Kanada) durchgeführt. Das Triple-Quadrupol-Instrument wies einen Masse-zu-Ladungs(m/z)-Bereich von 2400 auf und war mit einem pneumatisch unterstützten Electrospray- (auch als Innenspray bezeichnet) Interface (Bruins, A.P., Covey, T.R., & Henion, J.D. (1987) Anal. Chem. 59, 2642-2646, und Covey, T.R., Bonner, R.F., Shushan, B.I., & Henion, J.D. (1988) Rapid Commun. Mass. Spectrom. 2, 249-256) ausgestattet. Die Probeneinbringung wurde durch eine Spritzeninfusionspumpe (Sage Instruments, Cambridge, MA) durch eine geschweißte Kapillare (75 mm i.D.) mit einer Flüssigfließgeschwindigkeitseinstellung bei 0,5-1 ml/Min. durchgeführt. Die Instrument-m/z-Skala wurde mit den einfach geladenen Ammoniumadduktionen von Poly(propylenglykolen) (PPGs) unter Einheitsauflösung kalibriert. Die Genauigkeit der Massenmessungen ist im Allgemeinen besser als 0,02%.

Fraktion 53

[0061] Durch Massenspektrometrie wurde gefunden, dass das Molekulargewicht des Peptids in dieser Fraktion 3298 betrug. Die Aminosäuresequenz zeigte, dass das Peptid Ratten-GLP-1(7-36)amid war.

Fraktion 57

[0062] Durch Massenspektrometrie wurde gefunden, dass das Molekulargewicht des Peptids in dieser Fraktion 3796 betrug. Die Aminosäuresequenz zeigte, dass das Peptid Ratten-GLP-2(1-33)amid war.

Fraktion 60

[0063] Es wurde gefunden, dass das Peptid in dieser Fraktion ein Gemisch von Ratten-GLP-1(1-36)amid bzw. Ratten-GLP-1(1-37) war.

Testverfahren zum Messen der Appetitunterdrückung bei Mäusen

[0064] Mäusen wurde ihr normales Futter für eine Dauer von zwei Tagen entzogen, und sie erhielten am ersten Tag des Futterentzugs freien Zugang zu einer 20%igen Saccharoselösung. Nach der zweitägigen Futterentzugsdauer wurden den Mäusen intraperitoneal 0,5 ml einer die Testsubstanz enthaltenden Lösung injiziert. Dreizig Minuten nach der Injektion wurden die einzelnen Mäuse in eine von acht quadratischen Testboxen von 15 cm mit einem Edelstahlgitterboden und einem in die Box hineinragenden Trinktrinkrohr gegeben. Das Trinkrohr war mit einem 20%ige Saccharoselösung enthaltenden Behälter verbunden, und das Innere des Trinkrohrs enthielt eine Elektrode, die den Nachweis der Trinkkontakte mit der Lösung durch Messen des Flusses eines schwachen (nicht wahrnehmbaren) elektrischen Stroms durch die Mäuse mithilfe eines elektronischen Geräts, das mit der Trinkrohrelektrode und dem Edelstahlgitterboden verbunden war, ermöglichte. Der Verbrauch der Saccharoselösung wurde über eine Dauer von 10 Minuten durch elektronisches Aufzeichnen der Gesamtkontaktmenge mit der Saccharoselösung während der Testsitzung gemessen. Der Grad der Appetitunterdrückung, der durch eine vorgegebene Testsubstanz erzeugt wurde, wurde durch statistischen Vergleich der Dauer des Saccharoseverbrauchs durch Kontroll-(mit Vehikulum behandelte)-mäuse mit derjenigen von mit einer Testsubstanz behandelten Mäusen bestimmt. Der Grad der Appetitunterdrückung in einer behandelten Mäusegruppe wurde als Prozentsatz des Kontrollgruppenansprechverhaltens ausgedrückt.

Test auf Appetitunterdrückung bei Mäusen durch Fraktionen, enthaltend GLP-1(7-36)amid, GLP-1(1-36)amid und GLP-1(1-37)

[0065] Mäuse wurden auf Appetitunterdrückung nach Behandlung mit einer Testsubstanz getestet. Die Testsubstanz bestand aus Extrakten des anorektischen Glucagonomatumors, hergestellt durch Gelfiltration (Fraktion G4) oder durch HPLC (Fraktion 53, 57 und 60), gelöst in phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Die Testlösung, die lyophilisiertes Material von der Gelfiltrationsfraktion G4, entsprechend 3,3 Tumoren, enthielt, unterdrückte den Saccharoseverbrauch um 72%. Unter den 61 HPLC-Fraktionen der G4-Gelfiltrationsfraktion ([Fig. 2](#) und [Fig. 3](#)) ergaben nur die folgenden 3 Fraktionen eine statistisch deutliche Unterdrückung des Appetits, als lyophilisiertes Material, entsprechend 10 Tumoren, verabreicht wurde: Fraktion 53, enthaltend GLP-1(7-36)amid, ergab eine Unterdrückung der Nahrungsaufnahme, entsprechend 43%; Fraktion 57, enthaltend GLP-2, ergab eine Unterdrückung der Nahrungsaufnahme, entsprechend 41%; Fraktion 60, enthaltend ein Gemisch aus GLP-1(1-36)amid und GLP-1(1-37), ergab eine Unterdrückung der Nahrungsaufnahme, entsprechend 41%.

Beispiel 4

Unterdrückung des Appetits bei Mäusen durch systemisch injiziertes synthetisches GLP-1(7-36)amid.

[0066] Das Testverfahren war wie in Beispiel 3 beschrieben, außer dass die Mäuse vorher einer Formelmilch (Complan® – ein Vollnahrung-Babymilchersatz) für eine Dauer von einem Tag ausgesetzt waren, dann einen Tag ohne Nahrung blieben. Am Testtag wurde der Verbrauch von Complan® für jede Maus innerhalb einer 10-minütigen Dauer gemessen.

[0067] Die Mäuse wurden auf Appetitunterdrückung durch subkutane Injektion von GLP-1(7-36)amid, gelöst in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, getestet. GLP-1(7-36)amid erzeugte kräftige hemmende Wirkungen auf die Fütterung 30 Minuten nach der Injektion einer so geringen Menge wie 1 mg/kg (45%ige Unterdrückung,

$p < 0,001$), und eine maximale Wirkung einer 60%igen Unterdrückung ($p < 0,001$) wurde mit der höchsten getesteten Dosis, 20 mg/kg, erzielt.

Patentansprüche

1. Verwendung von GLP-1(7-38) oder GLP-1(7-39) oder eines Analogons davon zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung in einem menschlichen Patienten, wobei sich das Analogon von GLP-1(7-38) oder GLP-1(7-39) durch maximal fünf Aminosäureveränderungen durch Substitution und/oder Addition unterscheidet.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sich das Analogon von GLP-1(7-38) oder GLP-1(7-39) durch maximal drei Aminosäureveränderungen durch Substitution und/oder Addition unterscheidet.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei sich das Analogon von GLP-1(7-38) oder GLP-1(7-39) durch maximal zwei Aminosäureveränderungen durch Substitution und/oder Addition unterscheidet.
4. Verwendung des C-terminalen Amids von beliebigen der in einem der Ansprüche 1 bis 3 erwähnten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur peripheren Verabreichung zur Verwendung bei der Unterdrückung des Appetits oder Herbeiführung von Sättigung in einem menschlichen Patienten.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





