



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3582/79

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 15/06

(22) Indleveringsdag: 28 aug 1979

(41) Alm. tilgængelig: 01 mar 1980

(44) Fremlagt: 10 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 aug 1978 HU RI 683 23 aug 1979 HU RI-683

(71) Ansøger: *Richter Gedeon Vegyeszeti Gyar RT; 21 Gyoemroei ut; 1103 Budapest, HU

(72) Opfinder: Jozsef *Knoll; HU, Huba *Kalasz; HU, Berta *Knoll; HU, Janos *Nagy; HU

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Analogifremgangsmåde til isolering af en endogen, anorexogen substans, kaldet satietin.

(56) Fremdragne publikationer

neutral vandig opløsning indeholdende mindst 0,1% salt, fortrinsvis NaCl, inddampning af de biologisk aktive fraktioner, opløsning af remanensen i vand, yderligere adskillelse på en gel med ovennævnte hulrumsvolumen, fraktioneret eluering med destilleret vand og, om ønsket efter yderligere chromatografisk rensning, frysetørring.

(57) Sammendrag:

Satietin udmærker sig ved en stor evne til at inhibere fødeindtagelse, f.eks. inhiberes optagelsen på rotter, der ikke har fået føde i 96 timer, uden at denne virkning er ledsaget af depressive eller stimulerende virkninger.

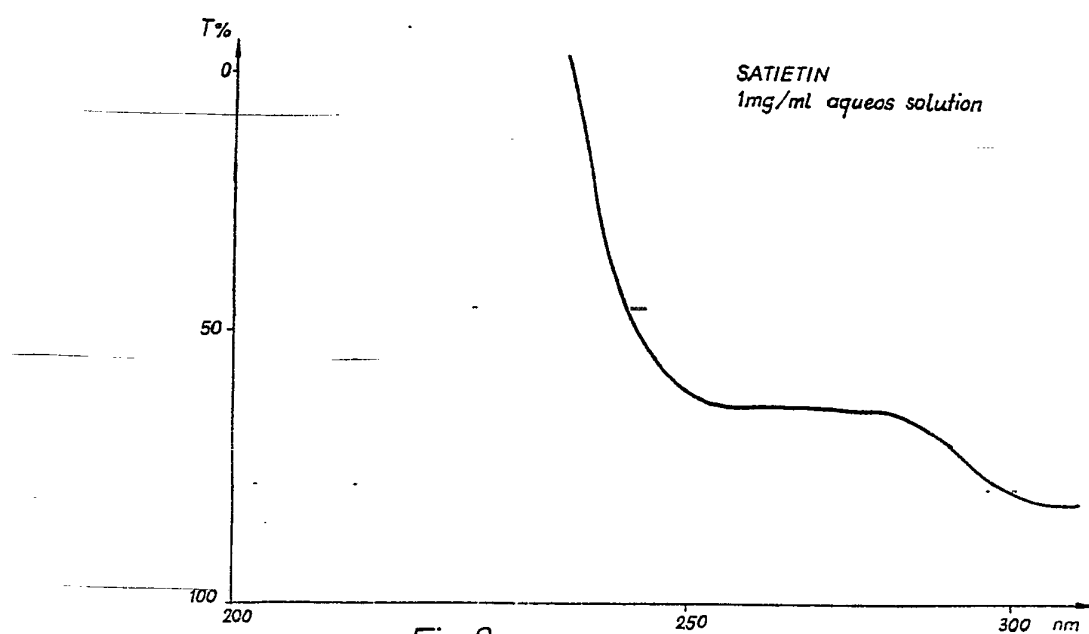
3582-79

Anorexogen substans, kaldet satietin, med selektiv inhiberende virkning på fødeindtagelsens centralregulering.

Satietin er et hvidt glycopeptid, hvis hydrolysat indeholder 60-61% aminosyrer, hvoraf glutaminsyre, asparaginsyre, lysin og leucin forekommer i de største mængder, og 10-11% carbonhydrater, nemlig galactose, glucose, mannose, rhamnose og arabinose, samt mindre mængder af andre reducerende substanser. Dets ultraviolette spektrum udviser ingen karakteristiske absorptionsmaksima, men derimod et plateau ved 275-280 nm. Forbindelserne ser ud til at have en molekylvægt på under 10.000 ved membranultrafiltrering og ultracentrifugering, men på over 60.000 ved polyacrylamid-gelelektroforese og gelchromatografi.

Satietin fremstilles ved filtrering af human- eller dyreserum gennem et membranfilter, der lader substansen på under 50.000 daltons passere, inddampning af filtratet, opløsning af remanensen i vand, adskillelse på en gel med et hulrumsvolumen på under 50.000, fraktioneret eluering med en

3582-79



Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til isolering af en endogen, anorexogen substans, kaldet satietin, med mæthedsvirkning på fødeindtagelsens centralregulering. Substansens specifikke virkning skyldes
5 den selektive inhibering af fødeindtagelsen, og samtidig har substansen ingen anden virkning på centralnervesystemet, der kan hverken iagttages depressiv virkning eller nogen anden virkning, der inhiberer motorisk aktivitet.

Blandt lægemidlerne og medicinerne anvendes først og
10 fremmest amfetamin-lignende substanser for tiden til reducere af appetit, den anorexogene virkning er slet ikke specifik, disse forbindelser har også andre uønskede central- og perifer-sympathomimetiske eller -serotonergiske virkninger. En yderligere ulempe ved dem er udviklingen af tolerance
15 over for den anorexogene virkning, hvilket interfererer med deres effektivitet i betydelig grad. Cholecystokinin, et formodet mæthedssignal ved modulerende fødeindtagelse, er kun af teoretisk interesse, eftersom det har direkte virkninger på mave- og tarmområdet, og det er et anorexogen af
20 lav styrke.

Der er således ingen exogen eller endogen, anorexogen substans til rådighed, der selektivt påvirker centralreguleringen af fødeindtagelse uden uønskelige bivirkninger, og som har en ønsket styrke til terapi.

25 Det er derfor, at den her omhandlede erkendelse, at der fra human- og dyreplasma kan isoleres en hidtil ukendt forbindelse, kaldet satietin, der har en selektiv og yderst stærk virkning som mæthedssignal, idet den inhiberer fødeindtagelse hos rotter, der ikke har fået føde i 96 timer, har
30 stor betydning også med henblik på medicinsk behandling af en hvilken som helst type hyperphagia og ledsagende obesitas. Opfindelsen har i overensstemmelse hermed til formål at tilvejebringe en metode til isolering af satietin fra human- og dyreplasma. Satietinet synes at have en molekylvægt på
35 over 60.000. I dets hydrolysat kan findes aminosyrer og carbonhydrater, og blandt aminosyrer foreligger asparagin,

leucin, glutaminsyre og lysin i den største mængde, threonin, glycin, cystein, tyrosin, phenylalanin, arginin, histidin, prolin, serin, alanin, valin, methionin, isoleucin og tryptophan kan findes i mindre mængde, og hvad angår carbon-

5 hydrater, kan glucose, galactose, mannose, rhamnose og arabinose findes foruden andre reducerende substanser i mindre mængde. Identifikationen af dens kemiske struktur er beskrevet i detaljer nedenfor. Undersøgelserne af dens molekylstruktur er under udførelse.

10 Opfindelsens formål opnås ved den her omhandlede analogifremgangsmåde, som er karakteriseret ved, at human- eller dyreserum filtreres gennem et membranfilter, der lader substansen med en molekylvægt på under 50.000 dalton passere, filtratet inddampes til tørhed og opløses i vand, der gen-
15 nemføres en adskillelse ved gelchromatografi på en gel med et hulrumsvolumen på under 50.000, elueres fraktioneret med en neutral, vandig opløsning indeholdende mindst 0,1% salt, de biologisk aktive fraktioner opsamles og inddampes til tørhed, opløses i vand, adskilles yderligere ved gentagen
20 chromatografi på en gel med et hulrumsvolumen på under 50.000 og elueres fraktioneret med destilleret vand, og de biologisk aktive fraktioner frysetørres.

Det første trin af den her omhandlede fremgangsmåde er ultrafiltreringen af human- og dyreserum gennem et filter,
25 der lader substansen op til en molekylvægt på 50.000 passere. "Amicon UM 10" eller andre membraner af "Amicon"-typen eller en "Sartorius"-membran med en lignende porestørrelse kan anvendes. Erfaringsmæssigt har membraner af typen "Amicon UM 05", "UM 2", "DM 5", "UM 10", "PM 10", "UM 20", "PM 30"
30 og "XM 30" eller "Sartorius 121 33", "121 34" og "121 36" vist sig at være egnede til dette formål.

Membranfiltrering gennemføres under tryk, fortrinsvis på 3 atm, under konstant omrøring. Serummet opdeles i to fraktioner ved membranfiltreringen. De molekyler, der er
35 større end membranens porestørrelse, skilles fra de mindre. Ved denne fremgangsmåde fremkommer den her omhandlede sub-

0

3

stans, satietinet, overraskende i total mængde i den fraktion, der indeholder substanser med ringe molekyelvægt (under 10.000 daltons), til trods for, at filtreringen gennemføres med et membranfilter, der lader substanser med en molekyelvægt på under 50.000 passere, samt at satietin som omtalt ovenfor antages at have en molekyelvægt på mellem 60.000 og 100.000 dalton. Denne atypiske adfærd af den hidtil ukendte substans er fordelagtig set ud fra den foreliggende opfindelse, fordi den i væsentlig grad letter fraskillelsen af den hidtil ukendte substans fra andre substanser, der er tilsvarende store molekyler. Den hidtil ukendte substans kan således findes i filtratet fra membranfiltreringen i en 10 - 20 gange så stor koncentration i sammenligning med det oprindelige tørsubstansindhold i serummet sammen med andre substanser med meget mindre molekyelvægt.

Den andet trin af fremgangsmåden er opløsningen i destilleret vand af den tørre remanens, der er fremkommet ved inddampning af filtratet, hvorpå den chromatograferes på en gel med et hulrumsvolumen på ca. 50.000. Med gode resultater kan der først og fremmest anvendes "Sephadex G-15"-gel og dernæst geler af typen "Bio-Gel G-10", "G-25", "G-50", "G-75" og "Bio-Gel P-2", "P-4", "P-6", "P-10", "P-30" og "P-60". Søjlen elueres med fysiologisk natriumchloridopløsning eller med andre opløsninger indeholdende mindst 0,1% natriumchlorid eller et andet salt, der sikrer en neutral pH-værdi. Under elueringen fremkommer den hidtil ukendte substans i eller nær hulrumsvoluminet [det er kendt, at ved gelchromatografiske adskillelser er "hulrumsvoluminet" af gelen et betydningsfuldt, karakteristisk træk: alle de molekyler, der ligger nær ved eller over den øvre grænse for gelens selektive fraskillelsesvolumen (ved en "Sephadex G-15"-gel er det 1500) eluerer nær ved hulrumsvoluminet ved elueringsvoluminet, hvilket betyder 25 - 35% af søjlens volumen], medens de ledsagende substanser med mindre molekyelvægt, der er til stede selv efter membranfiltrering, fremkommer senere ved større elueringsvolumen, adskilt i flere spidser. Biologisk aktive fraktioner opsamles og frysetørres.

0

På tredje trin af isoleringen fraktioneres denne tørre remanens indeholdende den multikoncentrerede, aktive substans igen ved gelchromatografi. Som resultat af dette trin kan der opnås et rent, effektivt produkt, der er egnet til terapeutiske formål, ved eluering med destilleret vand. Denne anden chromatografiske rensning gennemføres ligeledes på en søjle med et hulrumsvolumen under 50.000. Den tørre remanens, der er fremkommet ved den første fraktionering, opløses i destilleret vand i den minimale, nødvendige mængde og adskilles på en søjle af "Bio-Gel P-30"-gel samt elueres med destilleret vand. De biologisk aktive fraktioner opsamles og lyofiliseres.

På denne måde fås et rent, homogent produkt, men hvis den elektroforetiske undersøgelse af produktet viser tilstedeværelsen af nogle forureninger, kan den aktive substans renses yderligere ved chromatografi på en diethylaminoethyl-cellulose-søjle. Substansen ledes til diethylaminoethyl-cellulose-søjlen i destilleret vandopløsning, søjlen vaskes med destilleret vand, hvorpå den elueres med 0,1 N phosphat-puffer-opløsning (pH-værdi 6,5) - 0,1 N phosphat-puffer-opløsning (pH-værdi 6,5) indeholdende 5% NaCl-opløsningsgradient. Den rene og biologisk aktive substans elueres fra søjlen med 0,1 N phosphat-puffer-opløsning (pH-værdi 6,5) + 0,5 - 0,7% NaCl, den eluatfraktion, der indeholder den rene substans, lyofiliseres, hvorefter substansen afsaltes fra de uorganiske syrer på "Bio-Gel P-30"-gel og elueres med destilleret vand.

Homogeniteten af den rene substans kan undersøges ved elektroforese på en polyacrylamidgeľ indeholdende 15% acrylamid med en pufferopløsning med en pH-værdi på 4,5 ved 100 V og en strøm på 4 A pr. rør.

Den hidtil ukendte substans, satietinet, er en hvid, bomuldsagtig substans, dens kemiske analyse viser, at det er et glycopeptid, og efter dets sure hydrolyse kan aminosyrer og carbonhydrater påvises. Resultaterne af de undersøgelser, der sigter mod en definition af den kemiske sammensætning og struktur af satietin, der er udvundet fra humanserum, er angivet nedenfor:

0

Aminosyre- og saccharid-sammensætningen af produktet
fremkommet ved hydrolyse

	Aminosyrer:	lysin	6,0%
5		histidin	1,6%
		arginin	3,0%
		cystein	2,3%
		asparaginsyre	7,0%
		threonin	3,1%
10		glutaminsyre	9,6%
		serin	1,7%
		prolin	2,2%
		glycin	1,2%
		alanin	3,8%
15		valin	3,6%
		methionin	1,3%
		isoleucin	1,0%
		leucin	6,0%
		tyrosin	1,8%
20		phenyl-alanin	3,5%
		tryptophan	<u>1,9%</u>
	totalt aminosyreindhold		60,6% (vægt/vægt)

I produktet er der 13% reducerende substanser, først og fremmest carbonhydrater

25	glucose	2,8%
	galactose	2,9%
	mannose	2,0%
	rhamnose	1,9%
	arabinose	<u>1,1%</u>

30 totalt carbonhydratindhold 10,7% (vægt/vægt)

Vandindhold: Produktet indeholder også fysisk bundet vand i en mængde på 10%.

Analyse af N-afsluttet sekvens:

35 Under yderligere undersøgelse af produktet anvendes de gængse metoder til analyse af N-afsluttet remanens, dvs. med dansylderivater og spaltning med aminopeptidase M-enzym, og der kan ikke påvises nogen remanens, hvilket betyder til-

0

stedeværelsen af en maskeret N-afsluttet remanens.

Enzymatisk hydrolyse med trypsin

Satietin kan praktisk talt ikke digerereres med trypsin i løbet af 2 timer i en ammonium-hydrogencarbonat-
5 -puffer med en pH-værdi på 8,3. Farveintensiteten af de fremkommende peptid-zoner er svag.

Virkning af carboxymethylering på strukturen

Satietin, der synes at være en homogen substans med en molekylvægt på ca. 68.000 under polyacrylamidgel-elektro-
10 forese efter binding af SH-grupperne med bromeddikesyre, synes at have 4 komponenter i det elektroforetiske billede, der fås ved elektroforese med natrium-dodecyl-sulfat: komponenten med en molekylvægt på ca. 68.000 er til stede, men der er en anden med en molekylvægt på 18.000 og to, lige mo-
15 bile, men godt adskilte komponenter med en molekylvægt på ca. 28.000.

Virkning af carboxymethylering på aktiviteten

Satietin mister sin biologiske aktivitet, hvis det carboxymethyleres med bromeddikesyre.

20

UV-spektrum

Det ultraviolette absorptionsspektrum af satietin viser ikke absorptionsmaksimum, der viser sig et "plateau" ved ca. 275 - 280, der kan være et karakteristisk træk for protein-peptid. Absorptionsspektret er illustreret i fig. 2.

25

Molekylvægt

Det interessante, karakteristiske træk ved satietin er dets ovenfor omtalte, særlige adfærd under de forskellige målinger af molekylvægten:

- 1) Under ultrafiltrering på membran ser det ud til at have
30 en molekylvægt på under 10.000.
- 2) Ved gelchromatografisk undersøgelse ser det ud til at have en molekylvægt på over 40.000, mellem 60.000 og 100.000.
- 3) Ved polyacrylamid-gel-elektroforese går det parallelt
35 sammen med molekyler med en molekylvægt mellem 65.000 og 68.000.

0

4) Ved ultracentrifugering ser det ud til at have en mole-
kylvægt på under 10.000.

Den hidtil ukendte substans, der kan fremstilles ved den her omhandlede fremgangsmåde, kan ikke alene udvin-
des fra humanserum, men serummet fra forskellige dyr kan
5 også anvendes. Selv om de substanser, der er opnået fra se-
rummet fra forskellige pattedyr, såsom kvæg, hunde, katte,
heste, marsvin, kaniner og forskellige rotte-stammer (Wistar,
CFY, SHR og Long Evans), ved samme metode, frembyder forskel
10 i styrke, er virkningens specifikke egenskaber, dvs. den
selektive inhibering af fødeindtagelse, den samme ved hvert
produkt.

Produktets virkning på fødeindtagelsen undersøges på CFY-hunrotter, der vejer 200 - 240 g. Dyrene har ikke
15 fået føde i 96 timer før forsøgene, vand er givet ad libitum.
Under hensyntagen til den aggressivitet, der følger af ud-
hungring, anbringes dyrene hver for sig i enkeltbure. Hvert
dyr indgives intravenøst en dosis på 10 mg/kg satietin opløst
i 0,5 ml fysiologisk saltopopløsning. Dyrene i kontrolgruppen
20 får kun injiceret 0,5 ml fysiologisk saltopopløsning uden sub-
stans intravenøst. 1 time efter behandlingen tilbydes dyrene
føde, de gængse fødepellets indeholdende albumin, fedt, carbon-
hydrat og vitaminer, i ubegrænset mængde. Fødekonsumeringen
måles 1, 5 og 24 timer efter, at foderet er givet (eller 2, 6
25 og 25 timer efter behandlingen). Resultaterne er angivet i
fig. 1. Den første kolonne repræsenterer den mængde af føden,
der ædes på 1 time, den skraverede fødemængden på 5 timer,
og den tredje fødemængden på 24 timer, og under kolonnerne
er de dyr angivet, ud fra hvis serum satietinprøven er eks-
30 traheret. De fremkomne resultater godtgør den ekstreme effek-
tivitet af det her omhandlede produkt. Dets virkning overgår
virkningen af de hidtil kendte substanser med samme virkning,
og samtidig har cholecystokinin og arentenin, som produceres
fra ekstrakt fra tolvfingertarmen som beskrevet af Ugolev et
35 al. overhovedet ingen virkning på dyr, der ikke har fået
føde i 96 timer. Det forhold, at den hidtil ukendte substans
har totalvirkning selv i dette tilfælde, beviser dens ene-
stående, høje aktivitet.

0

Til påvisning af den specifikke og selektive virkning af den hidtil ukendte substans undersøges denne med henblik på de bevirkninger, der iagttages ved substanser med lignende virkning (amphetamin-lignende substanser). Ved det

5 modificerede springforsøg, der er metoden til undersøgelse af den centraldepressive virkning [J. Knoll og B. Knoll, Arch. int.Pharmacodyn. 148, 200 - 217 (1964)] påvirker den hidtil ukendte substans ikke undvigelsesadfærden selv i en dosis, der er den dobbelte af den, der inhiberer fødeindtagelse. Ved

10 det forsøg, der gennemføres med et motimeter [J. Knoll, Arch. int.Pharmacodyn., 130, 141 - 154 (1961)] har end ikke de store intravenøse doser af den hidtil ukendte substans nogen som helst virkning med hensyn til inhibering eller forøgelse af motiliteten. Det er kendt, at substanser med depressiv virkning påvirker de betingede reflekser stærkt, og det er grunden

15 til, at lignende forsøg gennemføres med den hidtil ukendte substans på rotter ved springforsøget [J. Knoll og B. Knoll, B. Arzneimittel-Forsch. 8, 330 - 333 (1958)], der er egnet til undersøgelse af betinget undvigelsesadfærd. Satietin har

20 også vist sig at være ineffektivt i denne henseende. I betragtning af det forhold, at cholecystokinin har en karakteristisk kontraherende virkning på længdemusklen i ileum hos marsvin [Knoll et al., Pharmacology, 12, 283-289 (1974)], undersøges den hidtil ukendte substans også i denne henseende på dette

25 isolerede organ, og den viser sig at være ineffektiv sammenlignet med cholecystokinin. Alle disse forsøg godtgør de fordelagtige, karakteristiske træk ved satietin, som kan opsummeres som følger:

- a) Satietin er en endogen substans af naturlig oprindelse,
- 30 b) det har ingen væsentlig toksicitet,
- c) dets virkning er selektiv, idet det inhiberer centret for fødeindtagelse ved indvirkning på fødeindtagelsens centralregulering,
- d) dets aktivitet er forskellig fra aktiviteten af andre anorexogene substanser, idet det er fri for depressive eller
- 35 stimulerende virkninger,

0

e) det er meget kraftigt, eftersom det er i stand til at inhibere fødeindtagelse hos rotter, der ikke har fået føde i 96 timer,

5

f) dets virkning er dosisafhængig, en maksimal inhibering af fødeindtagelse nås med 200 - 300 µg/rotte ved intracerebroventricular indgift,

g) spidsvirkningen nås på 5 timer efter den intracerebroventricular indgift af satietin, og virkningen er langvarig, den fortsætter i 24 timer,

10

h) virkningen er reversibel.

Den praktiske gennemførelse af den her omhandlede fremgangsmåde illustreres ved nedenstående eksempel.

15

100 liter humanserum ultrafiltreres gennem en "Amicon UM 10"-membran. Der opnås 700 ml filtrat, der frysetørres, og remanensen opløses i 30 ml destilleret vand. Opløsningen adskilles på en "Sephadex G-15"-søjle (diameter 5 cm, længde 90 cm), der elueres med 0,9% vandig NaCl-opløsning. Der opsamles fraktioner på 10 ml hver. Fraktionerne mellem 50 og 60 (mellem 500 og 600 ml) viser sig at være biologisk aktive. Disse fraktioner opsamles, frysetørres og opløses i 10 ml destilleret vand. Opløsningen adskilles på en "Bio-gel P-30"-gelsøjle med dimensionerne 2,5 x 90 cm, der elueres med destilleret vand. Der opsamles fraktioner på 10 ml. Fraktionerne mellem 11 og 15 viser sig at være biologisk aktive. Disse fraktioner opsamles og lyofiliseres. Afhængigt af kvaliteten af det oprindelige serum opnås 200 - 240 mg tørt produkt, der er en snehvid, bomuldsagtig, homogen og ren substans, der er egnet til terapeutisk anvendelse.

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Analogifremgangsmåde til isolering af en endogen, anorexogen substans, kaldet satietin, med mæthedsvirkning på fødeindtagelsens centralregulering, k e n d e t e g -
5 n e t ved, at human- eller dyreserum filtreres gennem et membranfilter, der lader substansen med en molekylvægt på under 50.000 dalton passere, filtratet inddampes til tørhed og opløses i vand, der gennemføres en adskillelse ved gel-chromatografi på en gel med et hulrumsvolumen på under
10 50.000, der elueres fraktioneret med en neutral, vandig opløsning indeholdende mindst 0,1% salt, de biologisk aktive fraktioner opsamles og inddampes til tørhed, opløses i vand, adskilles yderligere ved gentagen chromatografi på en gel med et hulrumsvolumen på under 50.000 og elueres fraktioneret
15 med destilleret vand, og de biologisk aktive fraktioner frysetørres.

2. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e -
t e g n e t ved, at der anvendes en vandig NaCl-opløsning som elueringsmiddel ved den første gelchromatografiske frak-
20 tionering.

3. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e -
t e g n e t ved, at de biologisk aktive fraktioner af eluatet opsamles under den anden gelchromatografiske fraktionering og, om ønsket, lyofiliseres efter en yderligere chroma-
25 tografisk rensning.

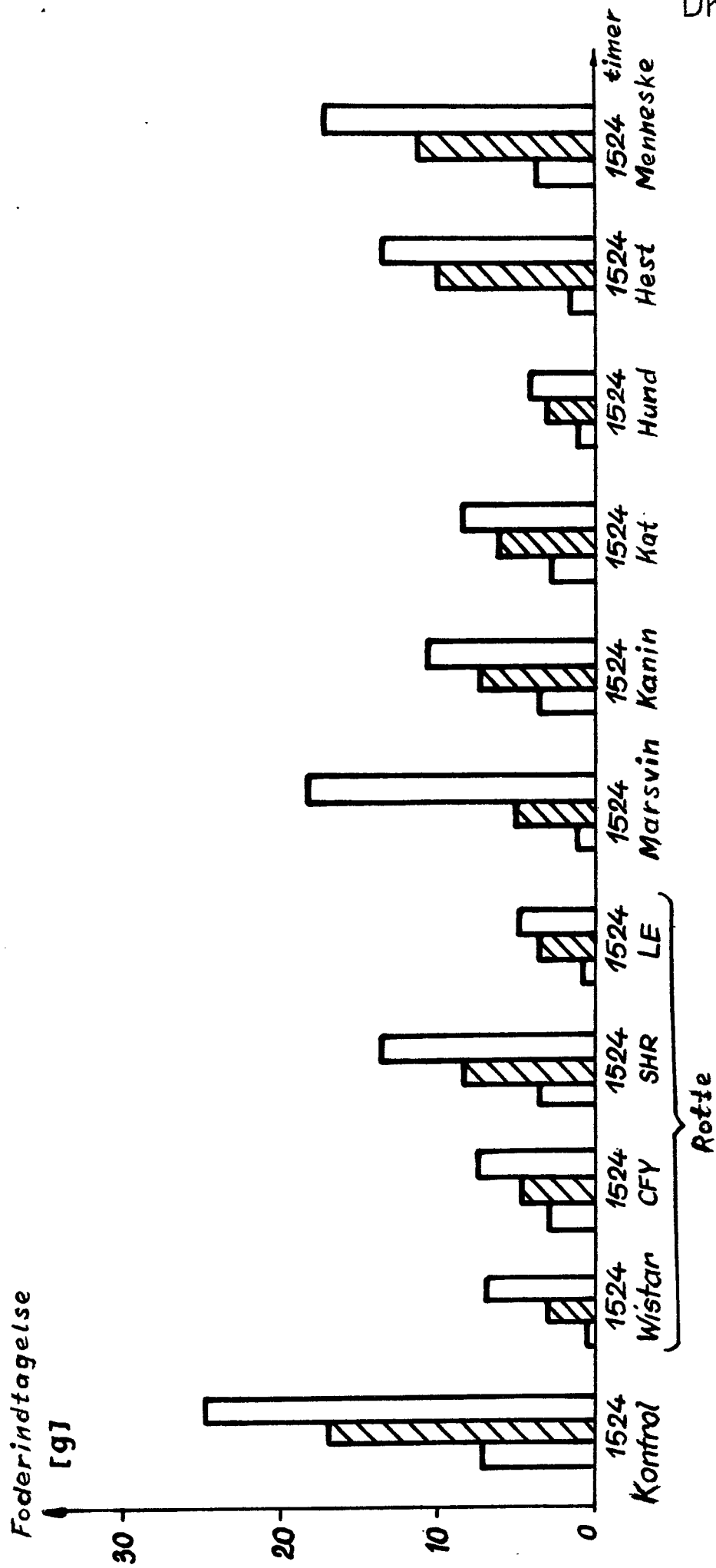


Fig. 1

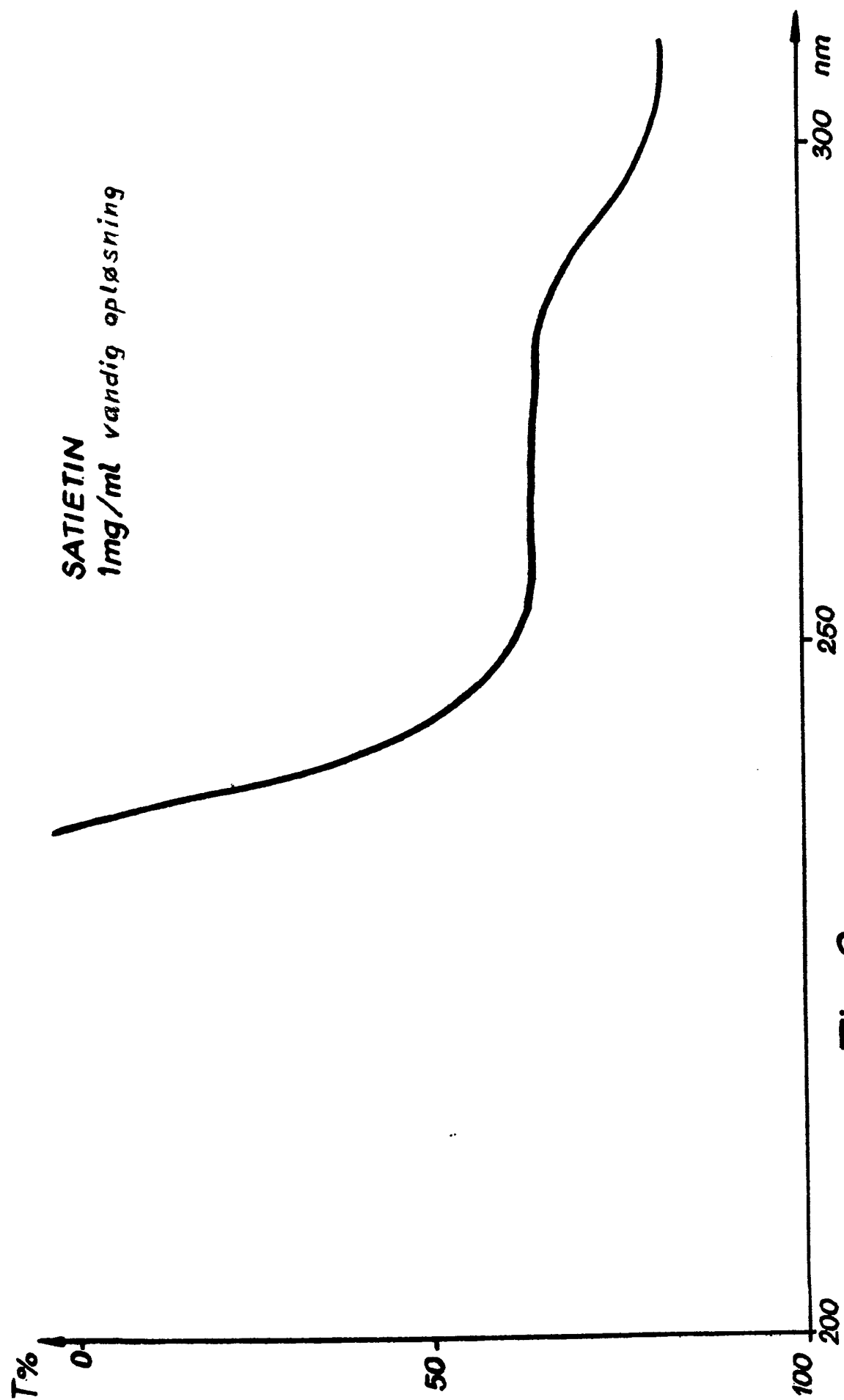


Fig. 2