



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 07 C 103/52

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(11)

624 093

(21) Gesuchsnummer:	4092/76	(73) Inhaber:	The Regents of the University of California, Berkeley/CA (US)
(22) Anmeldungsdatum:	01.04.1976		
(30) Priorität(en):	04.04.1975 US 565425 23.01.1976 DE 2602443	(72) Erfinder:	Robert Newfield Hamburger, La Jolla/CA (US)
(24) Patent erteilt:	15.07.1981		
(45) Patentschrift veröffentlicht:	15.07.1981	(74) Vertreter:	A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

(54) Verfahren zur Herstellung biologisch aktiver Polypeptide.

(57) Die neuen Polypeptide bestehen aus einer Sequenz von 3 bis 10 Aminosäuren, welche einem Teil der Aminosäuresequenz 265 - 537 der Fc Region von Immunoglobulin E (IgE) entspricht. Es wird eine erste Aminosäure oder ein Peptid, welches an einen festen Träger kovalent gebunden sein kann, mit einer zweiten Aminosäure oder einem Peptid kondensiert, so dass die Gesamtzahl der Aminosäurereste jener des herzustellenden Polypeptides gleich ist. Carboxyl- und Aminogruppen, ausser jene, die reagieren sollen, liegen in geschützter Form vor; Schutzgruppen und fester Träger werden anschliessend abgespaltet. Die Polypeptide werden auch in Salze, Ester, Amide, N-Acyl- und O-Acylderivate umgewandelt. Die Verbindungen blockieren die Bindestellen von IgE; sie können zur Prophylaxe oder Behandlung der Symptome von allergischen Reaktionen verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides aus 3 bis 10 Aminosäuren in einer Sequenz, die aus einem Teil der Aminosäuresequenz 265-537 der Fc Region von Immunglobulin E ausgewählt ist, oder eines pharmazeutisch annehmbaren, nicht-toxischen Salzes desselben, dadurch gekennzeichnet, dass man (a) eine erste Aminosäure oder ein Peptid, das kovalent an einen festen Träger gebunden sein kann, mit einer zweiten Aminosäure oder einem Peptid kondensiert, wobei die zur Kondensationsreaktion nicht vorgesehenen Carboxyl- oder Aminogruppen durch Schutzgruppen blockiert sind und die Gesamtzahl der Aminosäurereste in der ersten und zweiten Aminosäure und/oder Peptiden gleich derjenigen des endgültigen Polypeptids ist und (b) nacheinander oder gleichzeitig die Schutzgruppen und/oder den festen Träger vom Produkt aus Stufe (a) abspaltet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das erhaltene Polypeptid in ein Salz umwandelt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das Polypeptid Asp-Ser-Asp-Pro-Arg oder ein pharmazeutisch annehmbares, nicht-toxisches Salz desselben herstellt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die schützende Gruppe eine Aminoschutzgruppe aus Acyl-, aromatischen Urethan-, aliphatischen Urethan-, Cycloalkylurethan-, Thiourethan-, Aralkyl- oder Trialkylsilylgruppen oder eine Carboxylschutzgruppe aus substituierten oder unsubstituierten aliphatischen Estern, Aralkylestern, N-substituierten Hydraziden und Amidinen ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der kovalent gebundene feste Träger ein vernetztes Polystyrol-Divinyl-Harz, vernetztes Polyamidharz, Polyäthylenglykolharz oder funktionalisierte Glasperlen ist.

6. Verfahren zur Herstellung von Estern eines Polypeptides aus 3 bis 10 Aminosäuren in einer Sequenz, die aus einem Teil der Aminosäuresequenz 265-537 der Fc Region von Immunglobulin E ausgewählt ist, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 besagtes Polypeptid herstellt und sodann einer Veresterung unterwirft.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man Ester des Polypeptides Asp-Ser-Asp-Pro-Arg herstellt.

8. Verfahren zur Herstellung von Amidinen eines Polypeptides aus 3 bis 10 Aminosäuren in einer Sequenz, die aus einem Teil der Aminosäuresequenz 265-537 der Fc Region von Immunglobulin E ausgewählt ist, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 besagtes Polypeptid herstellt und sodann in ein Amid umwandelt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Amide des Polypeptides Asp-Ser-Asp-Pro-Arg herstellt.

10. Verfahren zur Herstellung von N-Acylderivaten eines Polypeptides aus 3 bis 10 Aminosäuren in einer Sequenz, die aus einem Teil der Aminosäuresequenz 265-537 der Fc Region von Immunglobulin E ausgewählt ist, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 besagtes Polypeptid herstellt und sodann einer N-Acylierung unterwirft.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man N-Acylderivate des Polypeptides Asp-Ser-Asp-Pro-Arg herstellt.

12. Verfahren zur Herstellung von O-Acylderivaten eines Polypeptides aus 3 bis 10 Aminosäuren in einer Sequenz, die aus einem Teil der Aminosäuresequenz 265-537

der Fc Region von Immunglobulin E ausgewählt ist, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 besagtes Polypeptid herstellt und sodann einer O-Acylierung unterwirft.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man O-Acylderivate des Polypeptides Asp-Ser-Asp-Pro-Arg herstellt.

10

Die Symptome allergischer Erkrankungen beim Menschen, insbesondere das allergische Syndrom, werden durch die Freisetzung vasoaktiver Amine, insbesondere Histamin, in den Organismus hervorgerufen. Das Histamin wird normalerweise in besonderen, als Mastzellen bekannten Zellen und Basophileucocyten gelagert, die über den gesamten Organismus verteilt sind. Die Mastzellen sind über die gesamte Gewebestruktur beim Menschen verteilt, während die Basophilen mit dem Blut im Körper, d.h. innerhalb des vaskulären Systems, zirkulieren.

Die oben genannten Zellen produzieren und lagern Histamin innerhalb ihrer inneren Strukturen, in welchen das Histamin verbleibt, wenn nicht eine besondere Folge von Ereignissen eintritt, um die Freisetzung des Histamins aus innerhalb der Zellstrukturen in das umgebende Gewebe und Vaskulärsystem auszulösen.

Das Histamin wird insbesondere im Ansprechen auf die Anwesenheit spezifischer Antigene (Allergene) freigesetzt, die sich in den Organismus Eingang verschaffen oder durch den Organismus im Ansprechen auf ein traumatisches Geschehen freigesetzt werden können. Die übliche Histaminfreisetzung aus den Mastzellen oder Basophilen wird jedoch durch eine notwendige Folge chemischer und immunologischer Ereignisse ausgelöst, die auf und in den Mastzell- und Basophilstrukturen stattfinden.

Die Allergen-Mastzellen(Basophil)-Reaktion wird insbesondere durch eine als Immunglobulin E (IgE) bekannte Gruppe von Proteinen begünstigt, die innerhalb des Körpers produziert werden. Das durch den menschlichen Organismus gebildete IgE ist ein komplexes Gebilde von Polypeptidketten, deren Moleküle jeweils bestimmte Variationen in der Folge der Aminosäuren in der Polypeptidkette aufweisen können, von denen jedoch alle im wesentlichen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine «Y» förmige Struktur haben, wobei der «Fuss» (d.h. der untere Teil des «Y») in Form des (Fc) Polypeptidanteil oder -fragmentes eine fixierte Folge (Sequenz) oder «konstante Region» von Peptiden entlang der Kette enthält. Der «Kopf» (entsprechend den nach oben weisenden Armen der «Y» Struktur) kann Regionen aufweisen, in welchen die Polypeptidkette variiert (die variable Region des Fab), und zwar von Molekül zu Molekül. So haben die IgE Moleküle gewöhnlich identische «Fuss»-Peptidfolgen, können jedoch eine grosse Anzahl unterschiedlicher «Kopf»-Peptidfolgen haben.

Die allergische oder immunologische Histaminfreisetzung innerhalb des Organismus aus den spezialisierten Mastzellen und Basophilen kann unter den folgenden Umständen auftreten:

Alle Mastzellen oder Basophilen besitzen eine Anzahl von Rezeptorstellen, die zum «Ankoppeln» der konstanten Region oder des Fc Anteils der IgE Moleküle verfügbar sind. Diese «Bindestellen» sind spezialisierte Gebiete auf der Zellmembran, in welchen ein besonderes geometrisches oder räumliches Molekulararrangement erfolgt, wodurch diese «Binde- oder Rezeptorstelle» an das Fc Fragment oder eine Stelle in der konstanten Region des IgE Moleküls «ankoppeln» kann.

Sollte ein wanderndes IgE Molekül eine freie «Binderezeptorstelle» auf einer Mastzelle oder einem Basophilen finden, koppelt es mit seinem Fc Teil an die Binde(Rezeptor)-Stelle der Zelle, um das IgE Molekül an der Mastzelle oder dem Basophil festzumachen.

Wenn der Fc Teil des IgE Moleküls an die bindende «Rezeptorstelle» festgemacht ist, sind die nach oben weisenden Arme des «Y» förmigen Moleküls (der F(ab) Anteil) frei, sich oberhalb der Zelloberfläche auszudehnen. Diese verlängerten, bzw. hinausweisenden oberen Peptidketten wirken ihrerseits als Rezeptoren für Allergene, die in der Umgebung des Organismus anwesend sein können. Wenn die Polypeptidstruktur der Fab Anteile mit einem besonderen Allergen verträglich sind, kann sich das Allergen an das sich nach aussen erstreckende Fab der IgE Polypeptidkette binden. Im Fall einer Bindung wird die Mastzelle oder das Basophil automatisch stimuliert, um das Histamin aus der inneren Zellstruktur in die örtliche Umgebung der Mastzelle oder des Basophils freizusetzen. Ist das Histamin erst einmal freigesetzt, dann treten die bekannten «allergischen Symptome» auf.

Die derzeitige Therapie allergischer Erkrankungen umfasst die Hyposensibilisierung (wiederholte Injektionen schädlicher Allergene zur Bildung von «Blockierungsantikörpern»), die systemische Therapie mit Antihistaminen (die mit den während der allergischen Reaktion freigesetzten Histaminen konkurrieren) und Dinatriumcromoglykat (das die durch allergische Reaktionen freigesetzte Histaminmenge verringern kann). Auch Corticosteroide, Isoprenalin und Theophyllin sowie andere Arzneimittel sind bei der Allergietherapie verwendet worden. Keines der oben genannten Arzneimittel oder Verfahren stört jedoch die grundsätzliche Reaktion der IgE Mastzelle (Basophil), und alle haben wesentliche Einschränkungen bezüglich ihrer Eignung.

Ein anderer Therapieweg, der durch die obige Analyse der Allergen-IgE-Mastzell(Basophil)-Reaktion vorgeschlagen wird, wäre die Einführung eines Arzneimittels in den Organismus, das die Rezeptor- oder Bindestellen von Mastzellen (Basophilen) gegen die Bindung des IgE Moleküls «blockieren» würde. Von gleicher Wichtigkeit wäre ein Arzneimittel, das nicht nur die Bindestellen «blockieren» sondern weiterhin das IgE von den Bindestellen, an welches es sich bereits angelagert hat, entfernen würde. Jedes Auffüllen oder Vermindern der zur IgE Anlagerung verfügbaren Bindestellen würde selbstverständlich die Anzahl der Allergen-IgE-Mastzellen(Basophil)-Reaktionen verringern, wodurch die Histaminfreisetzung in den Organismus vermindert und so allergische Reaktionen herabgesetzt oder verhindert würden.

Es gibt bereits einige Versuche, diesen therapeutischen Weg zu begehen. So wurde z.B. in «Lancet» vom 6. Juli 1968 eine Untersuchung veröffentlicht, in welcher der gesamte Fc Anteil des IgE sowie kleine proteolytische Verdauungsfragmente desselben auf ihre Fähigkeit zum Unterdrücken allergischer Reaktionen getestet wurden. Diese Untersuchung legte nahe, dass nur das gesamte Fc Fragment von IgE ebenso wirksam wie das intakte IgE Molekül bei der Inhibierung allergischer Reaktionen war, während die Verdauungsfragmente («digestion fragments») unwirksam waren. Das heisst, alle Bruchteile der FC Peptidkette kleiner als das gesamte Polypeptid waren bei der Verhütung induzierter allergischer Reaktionen ungeeignet. Das Fc Fragment selbst kann als therapeutisches oder Arzneimittel nicht verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung neuer, niedrig molekularer Polypeptide, die als therapeutische Mittel bei der Behandlung allergischer Erkrankungen oder des allergischen Syndroms geeignet sind.

Das vorliegende Verfahren ermöglicht die Herstellung von Polypeptiden mit 3-10 Aminosäureresten, die ein allergisches Ansprechen beim Menschen blockieren können. Diese relativ kurzkettigen Polypeptide entsprechen Folgen (Sequenzen), die in der zweiten (C-2), dritten (C-3) und vierten (C-4) Domäne der konstanten (Fc) Region der (ε)-Peptidkette des IgE Moleküls vorkommen.

Die Aminosäurefolge der gesamten ε-Kette wurde neuerdings von Bennich et al bestimmt und in «Progress in Immunology II-Bd. 1: Immunochemical Aspects», Juli 1974, Seite 49-58, North Holland Publishing Company, Amsterdam, (1974) veröffentlicht. Die Folge der Fc Region, in welcher die erfindungsgemäss erhältlichen Aminosäurefolgen vorkommen, ist wie folgt, wobei die Zahlen am Rand die numerische Stellung in der Folge der Aminosäure rechts von derselben anzeigt:

265 - (Met)-Asp-Val-Asp-Leu-Ser-Thr-Ala-Ser-Thr-Glu-Ser-Glu-Gly-Glu-Leu-Ala-Ser-Thr-Glu-Ser-Glu-Leu-Thr-
289 - Leu-Ser-Gln-Lys-His-Trp-Leu-Ser-Asp-Arg-Thr-Tyr-Thr-Cys-Glu-Val-Thr-Tyr-Glx-Gly-His-Thr-Phen-Glx-
313 - Asx-Ser-Thr-Lys-Lys-Cys-Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg-Gly-Val-Ser-Ala-Tyr-Leu-Ser-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-
337 - Asp-Leu-Phe-Ile-Arg-Lys-Ser-Pro-Thr-Ile-Thr-Cys-Leu-Val-Val-Asx-Leu-Ala-Pro-Ser-Lys-Gly-Thr-Val-
361 - Asn-Leu-Thr-Trp-Ser-Arg-Ala-Ser-Gly-Lys-Pro-Val-Asx-His-Ser-Thr-Arg-Lys-Glu-Glu-Lys-Gln-Arg-Asn-
385 - Gly-Thr-Leu-Thr-Val-Thr-Ser-Thr-Leu-Pro-Val-Gly-Thr-Arg-Asx-Trp-Ile-Glu-Gly-Glu-Thr-Tyr-Glx-Cys-
409 - Arg-Val-Thr-His-Pro-His-Leu-Pro-Arg-Ala-Leu-Met-Arg-Ser-Thr-Thr-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Arg-Ala-Ala-
433 - Pro-Glu-Val-Tyr-Ala-Phe-Ala-Thr-Pro-Glu-Trp-Pro-Gly-Ser-Arg-Asp-Lys-Arg-Thr-Leu-Ala-Cys-Leu-Ile-
457 - Gln-Asn-Phe-Met-Pro-Glu-Asp-Ile-Ser-Val-Gln-Trp-Leu-His-Asn-Glu-Val-Gln-Leu-Pro-Asp-Ala-Arg-His-
481 - Ser-Thr-Thr-Glu-Pro-Arg-Lys-Thr-Lys-Gly-Ser-Gly-Phe-Phe-Val-Phe-Ser-Arg-Leu-Glu-Val-Thr-Arg-Ala-
505 - Glu-Trp-Gln-Glu-Lys-Asp-Glu-Phe-Ile-Cys-Arg-Ala-Val-His-Glu-Ala-Ala-Ser-Pro-Ser-Gln-Thr-Val-Gln-
529 - Arg-Ala-Val-Ser-Val-Asn-Pro-Gly-Lys.

Die erfindungsgemäss erhältlichen neuen Verbindungen sind Polypeptide aus 3-10 Aminosäuren in einer Folge, die aus einem Teil der obigen Aminosäurefolge ausgewählt ist, sowie deren Salze, Ester, Amide, N-Acyl- und O-Acylderivate.

Wie bereits geschehen, werden zur einfacheren Beschreibung der vorliegenden Erfindung die üblichen Abkürzungen für die verschiedenen Aminosäuren verwendet, die dem Fachmann geläufig sind. Zur besseren Klarheit werden jedoch die in Frage kommenden Verbindungen im folgenden noch aufgeführt. Alle hier erwähnten, chiralen Aminosäurereste haben, falls nicht anders angegeben, die natürliche oder L-Konfiguration. Alle hier aufgeführten Peptidfolgen sind in üblicher Weise geschrieben, wodurch die N-endständige Aminosäure links und die C-endständige Aminosäure rechts steht.

Asp — Asparginsäure
Ala — Alanin
Arg — Arginin

Asn	— Asparagin
Asx	— Asparginsäure oder Asparagin (zeigt Unsicherheit in der Zersetzungsanalyse)
Cys	— Cystein
Gly	— Glycin
Gln	— Glutamin
Glx	— Glutaminsäure oder Glutamin (zeigt Unsicherheit in der Zersetzungsanalyse)
His	— Histidin
Ile	— Isoleucin
Leu	— Leucin
Lys	— Lysin
Met	— Methionin
Phe	— Phenylalanin
Pro	— Prolin
Ser	— Serin
Thr	— Threonin
Trp	— Tryptophan
Tyr	— Tyrosin
Val	— Valin

Die hier verwendete Bezeichnung «Salze» bezieht sich sowohl auf Salze einer Carboxylgruppe der Polypeptidkette als auch auf Säureadditionssalze einer Aminogruppe der Polypeptidkette. Salze einer Carboxylgruppe können mit anorganischen oder organischen Basen gebildet werden. Anorganische Salze umfassen z.B. die Alkalimetallsalze, wie das Natrium-, Kalium- und Lithiumsalz; Erdalkalisalze, wie das Calcium-, Barium- und Magnesiumsalz; und das Ammonium-, Ferro-, Ferri-, Zink, Mangan-, Aluminium-, Mangansalz usw. Salze mit organischen Aminen umfassen solche, die z.B. mit Trimethylamin, Triäthylamin, Tri-(n-propyl)-amin, Dicyclohexylamin, β -(Dimethylamino)-äthanol, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Triäthanolamin, β -(Diäthylamino)-äthanol, Arginin, Lysin, Histidin, N-Äthylpiperidin, Hydrabamin, Cholin, Betain, Äthylendiamin, Glucosamin, Methylglucamin, Theobromin, Purinen, Piperazinen, Piperidinen, Coffein, Procain usw. gebildet werden.

Säureadditionssalze umfassen z.B. Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salpetersäure usw.; und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Glucosäure, Zitronensäure, Apfelsäure, Ascorbinsäure, Benzoesäure usw.

Die hier verwendete Bezeichnung «Ester» bezieht sich auf Ester einer Carboxylgruppe des Polypeptids, gebildet mit geraden oder verzweigten gesättigten aliphatischen Alkoholen mit 1-12 C-Atomen, wie der Methyl-, Äthyl-, n-Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl-, tert.-Butyl-, n-Amyl-, n-Hexyl-, Octyl-, Decyl- und Dodecylester.

Die hier verwendete Bezeichnung «Amide» bezieht sich auf Amide einer Carboxylgruppe des Polypeptids, gebildet mit Ammoniak oder mit primären oder sekundären Aminen mit bis zu 12 C-Atomen, wie Dimethylamin, Diäthylamin, Di-(n-butyl)-amin, n-Hexylamin, Piperidin, Pyrrolidin, Morphinol, Di-(n-hexyl)-amin, N-Methylpiperazin usw.

Die «N-Acylderivate» beziehen sich auf Derivate einer Aminogruppe des Polypeptids, gebildet mit Acylteilen (z.B. einer Alkanoyl- oder carbocyclischen Aroylgruppe) mit bis zu 12 C-Atomen, wie Formamide, Acetamide, Benzamide

5 usw.

Die «O-Acylderivate» beziehen sich auf Derivate einer Hydroxylgruppe der Polypeptidkette, gebildet mit Acylteilen (z.B. Alkanoyl- oder carboxycyclischen Aroylgruppen) mit bis zu 12 C-Atomen, wie Formiate, Acetate, Propionate,

10 Benzoate usw.

Erfindungsgemäss erhältliche, bevorzugte Polypeptide haben Aminosäurefolgen, die nicht-analog mit vergleichbaren Regionen in anderen Immunoglobulinen sind. In dieser Hinsicht können die folgenden Peptide besonders erwähnt

15 werden:

266 - Asp-Val-Asp-Leu-Ser

271 - Thr-Ala-Ser-Thr-Glu

20 266 - Asp-Val-Asp-Leu-Ser-Thr-Ala-Ser-Thr-Glu

289 - Leu-Ser-Gln-Lys-His

319 - Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

25 320 - Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

321 - Ser-Asp-Pro-Arg

322 - Asp-Pro-Arg

354 - Ala-Pro-Ser-Lys-Gly-Thr

30 367 - Ala-Ser-Gly-Lys-Pro

437 - Ala-Phe-Ala-Thr-Pro-Glu-Trp-Pro-Gly-Ser

437 - Ala-Phe-Ala-Thr-Pro

35 442 - Glu-Trp-Pro-Gly-Ser

476 - Pro-Asp-Ala-Arg-His-Ser

521 - Ala-Ser-Pro-Ser-Gln

40 sowie deren Salze, Ester, Amide, N-Acyl- und O-Acylderivate.

Ein besonders bevorzugtes Polypeptid ist Asp-Ser-Asp-Pro-Arg.

45 Die obige Liste soll nicht als vollständig gelten, und es sind weitere Peptide mit kürzerer Folge als oben oder mit Folgen, die zusätzliche Aminosäuren aufweisen, oder Folgen aus anderen Regionen der C-2, C-3 oder C-4 ϵ -Domäne wichtig.

50 Ein solches Polypeptid kann also zur Verhütung oder Erleichterung von Symptomen in Verbindung mit allergischen Manifestationen, wie sie z.B. durch Antigen-Antikörper (allergische) Reaktionen verursacht werden, verwendet werden. Es blockiert (d.h. inhibiert oder verhindert) die Wirkungen der allergischen Reaktion, wenn es in wirksamer

55 Menge verabreicht wird.

Die Verbindungen wirken vermutlich, wie oben beschrieben, durch «Blockieren» der IgE Bindestellen.

Die Polypeptide werden mit Vorteil in Form pharmazeutischer Präparate zum Blockieren (d.h. Verhindern oder Inhibieren) der Wirkungen allergischer Reaktionen verwendet; die Präparate enthalten eine wirksame Menge eines oben beschriebenen Polypeptids oder eines Derivates desselben in Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren, nicht-toxischen Träger.

65 Zur Prophylaxe oder Behandlung soll eine wirksame Menge eines Polypeptids oder eines Derivates desselben oder eines diese enthaltenden pharmazeutischen Präparates in

üblicher, anerkannter Weise einzeln oder in Kombination mit anderen pharmazeutischen Mitteln, wie Antihistamine, Corticosteroide usw., verabreicht werden. Somit können die Verbindungen oder Präparate oral, sublingual, örtlich, (d.h. auf die Haut oder in die Augen), parenteral (z.B. intramuskulär, intravenös, subkutan oder intradermal) oder durch Inhalation und in Form fester, flüssiger oder gasförmiger Dosen einschliesslich Tabletten, Suspensionen und Aerosolen verabreicht werden. Die Verabreichung kann in kontinuierlicher Therapie mit Einzeldosierungsformen oder ad libitum in Einzeldosistherapie erfolgen.

Aufgrund der obigen Angaben sowie unter Berücksichtigung von Ausmass oder Schwere der zu behandelnden Erkrankung, dem Alter des Patienten usw. — Faktoren, die vom Fachmann durch Routineversuche bestimmbar sind — kann die wirksame Dosis über einen weiten Bereich variieren. Da einzelne Patienten in ihrem IgE Gehalt variieren, wird eine wirksame systemische Dosis als zwischen dem 2×10^3 bis 2×10^6 fachen des IgE Gehaltes, auf molarer Basis, angegeben. Für einen Durchschnittspatienten würde dies zwischen etwa 0,5-500 mg/kg/Tag in Abhängigkeit von der Stärke der Verbindung liegen. Selbstverständlich wird für eine lokalisierte Behandlung, z.B. des Atmungssystems, proportional weniger Material benötigt.

Geeignete pharmazeutische Träger zur Herstellung der Präparate können Feststoffe, Flüssigkeiten oder Gase sein; so können die Präparate die Form von Tabletten, Pillen, Kapseln, Pulvern, enteral überzogenen oder anders geschützten Formulierungen (z.B. durch Binden auf Ionenaustauscherharze oder andere Träger, durch Verpacken in Lipid-Protein-Vesikel oder durch Addition zusätzlicher endständiger Aminosäuren oder Ersetzen einer endständigen Aminosäure in der L-Form durch eine in der D-Form), Depotformulierungen, Lösungen (z.B. Augentropfen), Suspensionen, Elixieren, Aerosolen usw. annehmen. Der Träger kann aus verschiedenen Ölen einschliesslich solchen von Erdöl, sowie tierischem, pflanzlichem oder synthetischem Ursprung, wie z.B. Erdnussöl, Sojabohnenöl, Mineralöl, Sesamöl usw., ausgewählt werden. Wasser, Kochsalzlösung, wässrige Dextrose und Glykole werden als flüssige Träger, insbesondere (wenn isotonisch) für injizierbare Lösungen, bevorzugt. Geeignete pharmazeutische Streckmittel umfassen Stärke, Cellulose, Talkum, Glucose, Lactose, Sucrose, Gelatine, Malz, Reis, Mehl, Kreide, Kieselsäuregel, Magnesiumstearat, Natriumstearat, Glycerinmonostearat, Natriumchlorid, Trockenmagermilch, Glycerin, Propylenglykol, Wasser, Äthanol usw. Die Präparate können den üblichen pharmazeutischen Massnahmen, wie Sterilisation, unterworfen werden und die üblichen pharmazeutischen Zusätze, wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Netzmittel oder Emulgatoren, Salze zur Einstellung des osmotischen Druckes, Puffermittel usw., enthalten. Geeignete pharmazeutische Träger und ihre Formulierung werden in «Remington's Pharmaceutical Sciences» von E.W. Martin beschrieben. Die Präparate enthalten in jedem Fall eine wirksame Menge der aktiven Verbindung zusammen mit einer geeigneten Trägermenge zur Herstellung der richtigen Dosierungsform für die entsprechende Verabreichung an den Patienten.

Um zur Verhütung oder Behandlung allergischer Reaktionen wirksam zu sein, ist es wichtig, dass die therapeutischen Mittel relativ nicht-toxisch, nicht-antigenisch und nicht-irritierend sind bei den Konzentrationen ihrer tatsächlichen Verwendung. Dies ist, wie festgestellt wurde, bei allen Verbindungen der Fall, deren Herstellung im folgenden beschrieben wird.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist in Anspruch 1 definiert.

Eine ausgezeichnete Zusammenfassung der vielen für die Kondensation verfügbaren Methoden findet sich bei J. Meienhofer «Hormonal Proteins and Peptides», Bd. 2, Seite 46, Academic Press, New York (1973) für die Peptidsynthese in fester Phase, und bei E. Schröder und K. Lübke «The Peptides», Bd. 1, Academic Press, New York (1965) für die klassische Synthese in Lösung.

Gewöhnlich umfassen diese Methoden die aufeinanderfolgende Addition einer oder mehrerer Aminosäuren oder entsprechend geschützter Aminosäuren an die wachsende Kette. Es wird entweder die Amino- oder Carboxylgruppe der ersten Aminosäure geschützt, und zwar durch eine geeignete Schutzgruppe. Die geschützte oder in ein Derivat umgewandelte Aminosäure kann dann entweder an einen inerten festen Träger gebunden oder in Lösung durch Zugabe der nächsten Aminosäure in der Reihenfolge mit einer zweckmässig geschützten, komplementären (Amino- oder Carboxyl)-Gruppe unter geeigneten Bedingungen zur Bildung der Amidbindung verwendet werden. Dann wird die Schutzgruppe von diesem neu addierten Aminosäurerest entfernt, worauf die nächste (zweckmässig geschützte) Aminosäure addiert wird usw. Nachdem alle gewünschten Aminosäuren in der richtigen Reihenfolge gebunden sind, werden irgendwelche verbliebenen Schutzgruppen (und alle festen Träger) nacheinander oder gleichzeitig zur Bildung des endgültigen Polypeptids entfernt. Durch einfache Modifikation dieses allgemeinen Verfahrens kann man mehr als eine Aminosäure gleichzeitig an eine wachsende Kette addieren, z.B. durch Kuppeln (unter Bedingungen, die chirale Zentren nicht racemisieren) eines geschützten Tripeptids mit einem entsprechend geschützten Dipeptid, um nach Entfernung der schützenden Gruppen ein Pentapeptid zu erhalten.

Die Schutzgruppen sollten gegen die Bedingungen der Bildung der Peptidbindung stabil sein und gleichzeitig ohne Zerstörung der wachsenden Peptidkette oder Racemisierung einer der darin enthaltenen chiralen Zentren leicht entfernbar sein.

Zu den Klassen von Schutzgruppen für Aminogruppen bei der stufenweisen Synthese von Polypeptiden gehören (1) acylartige schützende Gruppen, wie Formyl, Trifluoracetyl, Phthalyl, Toluolsulfonyl (Tosyl), Benzolsulfonyl, o-Nitrophenylsulfonyl, Tritylsulfonyl, o-Nitrophenoxycarbonyl, Chloracetyl, Acetyl, γ -Chlorbutyryl usw.; (2) aromatische urethanartige schützende Gruppen, wie Benzyloxycarbonyl und substituiertes Benzyloxycarbonyl, z.B. p-Chlorbenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Brombenzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, 2-(p-Biphenyl)-isopropoxy-carbonyl, 2-Benzoyl-1-methylvinyl; (3) aliphatische urethanartige schützende Gruppen, wie tert.-Butyloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl, Diisopropylmethoxycarbonyl, Isopropyl-oxycarbonyl, Äthoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl; (4) cycloalkylurethanartige schützende Gruppen, wie Cyclopentyl-oxycarbonyl, Adamantyl-oxycarbonyl, Cyclohexyl-oxycarbonyl; (5) thiourethanartige schützende Gruppen, wie Phenylthio-carbonyl; (6) alkylartige schützende Gruppen, wie Triphenylmethyl (Trityl) und Benzyl; und (7) Trialkylsilylgruppen, wie Trimethylsilyl.

Bevorzugte Schutzgruppen sind tert.-Butyloxycarbonyl (t-BOC) und tert.-Amyloxycarbonyl (AOC).

Zu den Klassen der für die stufenweise Synthese von Polypeptiden geeigneten Carboxyschutzgruppen gehören (1) substituierte und unsubstituierte aliphatische Estergruppen, wie Methyl-, Äthyl-, tert.-Butyl-, 2,2,2-Trichloräthyl- und tert.-Butylester; (2) Alkylestergruppen, wie Benzyl-, p-Nitrobenzyl-, p-Methoxybenzyl-, Diphenylmethyl- oder Triphenylmethyl-(Trityl)ester; (3) N-substituierte Hydrazide, wie tert.-Butyloxycarbonylhydrazide und Carbobenzyloxycarbonylhydrazide; (4) amidschützende Gruppen, gebildet durch

Kondensation eines Carboxylteils mit z.B. Ammoniak, Methylamin, Äthylamin, Diphenylmethylamin usw.

Hydroxylgruppen in Aminosäuren, wie in Serin, Threonin und Hydroxyprolin, können als Aralkyläther, z.B. Benzyläther, geschützt werden.

Geeignet als feste Träger für die obige Synthese sind Materialien, die gegenüber den Reaktionsteilnehmern und Reaktionsbedingungen der stufenweisen Kondensations- und Schutzgruppenentfernungs-Reaktionen inert und in den verwendeten Medien unlöslich sind. Verwendbare Materialien umfassen z.B. vernetzte Polystyroldivinylbenzollarze, vernetzte Polyamidharze, Polyäthylenglykollarze, entsprechend funktionalisierte Glasperlen usw.

Der erste Aminosäurerest wird durch Bildung einer kovalenten Bindung mit einer aktiven Gruppe auf dem Harz an den festen Träger gebunden. Zu diesem Zweck geeignete aktive Gruppen umfassen z.B. Chlormethyl, Benzhydrylamino, Hydroxymethyl, Phenacylhalogenid, Dehydroalanin usw., wobei Chlormethyl als aktive Gruppe bevorzugt wird. Die erste Aminosäure wird an das bevorzugte Chlormethylharz nach einem basisch katalysierten Verfahren gebunden, in welchem das Triäthylamin-, Tetramethylammonium- oder Cäsiumsalz (oder ein ähnliches Salz) der Carbonsäure mit dem Harz in einem Lösungsmittel, wie Äthanol, Dioxan, Dimethylformamid usw., erhitzt wird.

Geeignete Reaktionsteilnehmer zur Amidbildung zwischen Carboxyl- und Aminogruppen sind bekannt und umfassen z.B. (1) Carbodiimide, wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC); (2) ein Carbodiimid plus einem Zusatz, wie 1-Hydroxybenzotriazol oder Äthyl-2-hydroximino-2-cyanacetat; (3) Alkylchlorformiate, wie Isobutylchlorformiat oder Äthylchlorformiat; (4) N-geschützte Aminosäuren, die durch Bildung eines geeigneten Esters aktiviert sind, z.B. substituierte Phenylester, Aryl- oder Alkylthioester, substituierte 8-Hydroxyisochinolinester, 2-Thiopyridylester und ähnliche bekannte Ester.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der Peptide ist das sog. «Merrifield»-Verfahren, das bekannt ist und im einzelnen von R.B. Merrifield in «Synthesis of a Tetrapeptide», J. Am. Chem. Soc., Bd. 85, Seite 2149-2154 (1963), sowie durch die oben genannte Meienhofer-Veröffentlichung beschrieben wurde.

Bei diesem bevorzugten Verfahren wird ein Peptid jeder gewünschten Länge und Folge durch stufenweise Addition von Aminosäuren an eine wachsende Peptidkette hergestellt, die durch eine kovalente Bindung an ein festes Harzteichen gebunden ist.

In der bevorzugten Anwendung dieses Verfahrens wird das C-endständige Ende der wachsenden Peptidkette kovalent an ein Harzteichen gebunden, und Aminosäuren mit geschützten Aminogruppen werden in oben dargestellter Weise stufenweise addiert. Eine bevorzugte, die Aminogruppe schützende Gruppe ist die t-BOC Gruppe, die bei den Kondensationsbedingungen stabil und dennoch leicht ohne Zerstörung der Peptidbindungen oder Racemisierung der chiralen Zentren in der Peptidkette entfernbar ist. Am Ende des Verfahrens wird das endgültige Peptid vom Harz abgespalten, und irgendwelche verbliebenen schützenden Gruppen werden durch Behandlung unter sauren Bedingungen z.B. mit einer Mischung aus Bromwasserstoffsäure und Trifluoressigsäure oder mit Fluorwasserstoffsäure entfernt; oder die Abspaltung vom Harz kann unter basischen Bedingungen, z.B. mit Triäthylamin, erfolgen, wobei die Schutzgruppen dann unter sauren Bedingungen entfernt werden.

Die abgespaltenen Peptide können in bekannter Weise isoliert und gereinigt werden, z.B. durch Lyophilisierung und anschließende Ausschluss- oder Teilungschromatographie auf Polysaccharidgelmedien, wie «Sephadex G-25», oder Ge-

genstromverteilung. Die Zusammensetzung des endgültigen Peptids kann durch Aminosäureanalyse nach Abbau des Peptids durch Standardmassnahmen bestätigt werden.

Salze der Carboxylgruppen des Peptids können in üblicher Weise durch Berührung des Peptids mit einem oder mehreren Äquivalenten einer gewünschten Base, wie ein basisches Metallhydroxid, z.B. Natriumhydroxid, ein Metallcarbonat oder -bicarbonat, wie Natriumcarbonat oder Natriumbicarbonat, oder eine Aminbase, wie Triäthylamin, Triäthanolamin usw., hergestellt werden.

Säureadditionssalze der Polypeptide kann man durch Berührung des Polypeptids mit einem oder mehreren Äquivalenten der gewünschten anorganischen oder organischen Säure, z.B. Salzsäure, herstellen.

Ester von Carboxylgruppen der Polypeptide werden in üblicher Weise durch Umwandlung einer Carbonsäure oder eines Vorläufers in einen Ester hergestellt. Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von Estern der Polypeptide unter Verwendung des oben beschriebenen Merrifield-Syntheseverfahrens besteht im Abspalten des vollständigen Polypeptids vom Harz in Anwesenheit des gewünschten Alkohols unter basischen oder sauren Bedingungen, was vom Harz abhängt. So wird das C-endständige Ende des Peptids nach Befreiung vom Harz direkt, ohne Isolierung der freien Säure, verestert.

Amide der Polypeptide werden ebenfalls nach den zur Umwandlung einer Carbonsäuregruppe oder eines Vorläufers in ein Amin üblichen Weise hergestellt. Ein bevorzugtes Verfahren zur Amidbildung an der C-endständigen Carboxylgruppe ist die Abspaltung des Polypeptids von einem festen Träger mit einem entsprechenden Amin oder die Abspaltung in Anwesenheit eines Alkohols, die zu einem Ester führt, sowie die anschließende Aminolyse mit dem gewünschten Amin.

Die N-Acylderivate einer Aminogruppe der Polypeptide werden unter Verwendung einer N-Acyl-geschützten Aminosäure für die endgültige Kondensation oder durch Acylierung eines geschützten oder ungeschützten Peptids hergestellt. Die O-Acylderivate werden durch O-Acylierung eines freien Hydroxypeptids oder Peptidharzes hergestellt. Jede Acylierung kann mit üblichen Acylierungsmitteln, wie Acylhalogenide, Anhydride, Acylimidazole usw., durchgeführt werden. Gegebenenfalls können N- und O-Acylierung zusammen durchgeführt werden.

Die Kupplung, Schutzgruppenentfernungs-/Spaltungsreaktionen und die Herstellung von Derivaten der Polypeptide erfolgen zweckmässig bei Temperaturen zwischen etwa -10°C und $+50^{\circ}\text{C}$, vorzugsweise etwa $20-25^{\circ}\text{C}$. Selbstverständlich hängt die genaue Temperatur für jede besondere Reaktion von den Substraten, Reaktionsteilnehmern, Lösungsmitteln usw. ab, wie dies dem Fachmann geläufig ist. Beispiele für Reaktionsbedingungen zu diesen Verfahren können den Beispielen entnommen werden.

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die vorliegende Erfindung.

Beispiel 1

Herstellung des Tripeptids Asp-Pro-Arg

1,6 g (5 Millimol) t-BOC-Nitroarginin wurde mit 10 g Chlormethylharz (Perlen aus Kopolystyrol - 2% Divinylbenzol mit 0,5-1 meq Chlormethylgruppen pro g Harz) in einer Mischung aus 1,4 ccm (10 Millimol) Triäthylamin und 100 ccm Äthanol 24 Stunden bei 22°C unter ständigem Rühren umgesetzt. Das argininierte Harz wurde anschliessend nacheinander gründlich mit Essigsäure, abs. Äthanol, Wasser mit sich erhöhenden Äthanolmengen, Methanol und schliesslich mit Methylenchlorid gewaschen. Dann wurde das

Harz gründlich unter Vakuum getrocknet. Die Analyse ergab 0,05 Millimol Arg/g Harz. 2,5 g des so hergestellten Harzes wurden in ein Merrifield-Gefäß für die Reaktion in fester Phase gegeben, das mit Rührmitteln versehen war und dem folgenden Schutzgruppenentfernungszyklus unterworfen:

- (a) unter Rühren wurde bei 22°C die t-BOC Gruppe mit 10 ccm 4N HCl in Dioxan während 30 Minuten abgespalten
 - (b) es wurde 2 Mal mit 10 ccm Dioxan gewaschen
 - (c) es wurde zweimal mit 10 ccm Methylenchlorid gewaschen
 - (d) es wurde zweimal mit 10 ccm Chloroform gewaschen
 - (e) das Hydrochlorid wurde mit 10 ccm 5:95 Triäthylamin/Chloroform neutralisiert
 - (f) es wurde zweimal mit 10 ccm Methylenchlorid gewaschen
 - (g) es wurde zweimal mit 10 ccm Chloroform gewaschen.
- Dann wurde das Harz dem folgenden Syntheszyklus unterworfen: ein 10facher Überschuss aus t-BOC-Prolin (1,25 Millimol) in Methylenchloridlösung wurde zugefügt, dann wurden 258 mg (1,25 Millimol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugegeben und die Mischung 2 Stunden bei 22°C geschüttelt. Anschliessend wurde das Harz dreimal mit je 10 ccm Dioxan, Chloroform bzw. Methylenchlorid gewaschen.

Das Dipeptidharz wurde dann dem Schutzgruppenentfernungszyklus unterworfen und mit einem 4fachen Überschuss an t-BOC- β -Benzylaspartat (0,5 Millimol) wie im oben beschriebenen Syntheszyklus umgesetzt. Dann wurde ein 0,5 g Anteil des Harzes aus dem Reaktionsgefäß entfernt und wie folgt einem Abspaltungsverfahren unterworfen:

0,5 g des Tripeptidharzes wurden in 5 ccm trockener Trifluoressigsäure suspendiert, dann wurde 90 Minuten ein langsamer Strom aus wasserfreiem HBr durch die Lösung geleitet. Das Harz wurde abfiltriert und zweimal mit 5 ccm Trifluoressigsäure gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden unter Vakuum konzentriert und der überschüssige HBr vom Peptid durch wiederholtes Abdampfen von 1:1 Methanol/Wasser-Lösungen entfernt. Das Peptid wurde schliesslich in Wasser gelöst und lieferte nach Lyophilisieren Aspartyl-Prolyl- ϵ -Nitroarginin. Dann wurde die Nitrogruppe durch Hydrieren in einer Parr-Niederdruck-Schüttelhydrierungsvorrichtung wie folgt entfernt: Das nitrogeschützte Tripeptid wurde in einer 10:1:1 Methanol/Essigsäure/Wasser-Mischung gelöst (etwa 10-20 mg/ccm) und ein gleiches Gewicht eines 5%igen Palladium-auf-BaSO₄ Katalysators zugefügt und die Mischung über Nacht bei einem Wasserstoffdruck von etwa 3,5 at geschüttelt. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Filtrate unter Vakuum konzentriert. Der Peptidrest wurde auf einer Sephadex G-25 Kolonne chromatographiert. Die durch übliche Aminosäureanalyse festgestellte Ausbeute an gereinigtem Tripeptid betrug etwa 24%, bezogen auf das in das Harz einverleibte Arginin. Ein Teil des Produktes wurde mit 5,7N HCl in Wasser hydrolysiert und in einer Aminosäureanalysevorrichtung untersucht; es zeigte sich ein Verhältnis von Asp 1,05, Pro 0,95, Arg 1,00.

Die Reinheit wurde in üblicher Weise durch Papierelektrophorese bei einer Anzahl von pH-Werten bestimmt.

Beispiel 2

Herstellung des Tetrapeptids Ser-Asp-Pro-Arg

Das nicht zur Synthese des Tripeptids verwendete Tripeptidharz von Beispiel 1 wurde dem Schutzgruppenentfernungszyklus (vgl. Beispiel 1) unterworfen und dann mit 0,111 g t-BOC-O-Benzylserin und 0,13 g Dicyclohexylcarbo-

diimid in 20 ccm Methylenchlorid wie im Syntheszyklus von Beispiel 1 reagieren gelassen.

Dann wurde ein Teil des Harzes den in Beispiel 1 beschriebenen Abspaltungs- und Hydrierungsverfahren unterworfen und wie in Beispiel 1 gewonnen, wodurch man Ser-Asp-Pro-Arg in 20%iger Ausbeute, bezogen auf das an das Harz veresterte Arginin, gewann. Nach Hydrolyse mit HCl wurde eine Probe des gewonnenen Tetrapeptids in einer Aminosäureanalysevorrichtung untersucht und zeigte ein Verhältnis von Ser 0,79, Asp 1,18, Pro 1,02 und Arg 1,01 (Serin wurde teilweise während der Säurehydrolyse zerstört).

Die Reinheit wurde in üblicher Weise bei einer Anzahl von pH-Werten durch Papierelektrophorese bestimmt.

Beispiel 3

Herstellung des Pentapeptids Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

A.) Das nicht abgespaltene Tetrapeptidharz von Beispiel 2 wurde dem Schutzgruppenentfernungszyklus von Beispiel 1 unterworfen und unter Verwendung von 0,152 g t-BOC- β -Benzylaspartat im Syntheszyklus behandelt.

Das Pentapeptid wurde vom Harzteil mit HBr in Trifluoressigsäure wie oben abgespalten. Das gewonnene Polypeptid wurde unter Vakuum getrocknet, gründlich mit Wasser gewaschen und dann lyophilisiert. Die Analyse zeigte eine Ausbeute von 16%, bezogen auf das Arginin.

Das Pentapeptidprodukt wurde mit HCl hydrolysiert und in der Aminosäureanalysevorrichtung untersucht; es zeigte sich ein Verhältnis von Asp 2,12, Ser 0,74, Pro 1,12 und Arg 1,01.

B.) Das Pentapeptid kann auch durch Modifikation der Verfahren von Beispiel 1-3A hergestellt werden:

Zu einer Lösung aus 3,02 g (6,82 Millimol) α -t-Amyloxy-carbonyl-N ϵ -tosyl-L-arginin (t-Aoc-Tosyl-Arg) in 15 ccm Äthanol und 6 ccm Wasser wurde eine Lösung aus Cäsiumbicarbonat (1,4 g in 3 ccm H₂O) eingetropft, bis der pH-Wert der Lösung 7,0 betrug. Die Lösung wurde unter Vakuum zu einem Schaum konzentriert, der unter Hochvakuum über P₂O₅ gründlich getrocknet wurde. Zu diesem Rückstand wurden 25 ccm trockenes Dimethylformamid (DMF) und 4,5 g chlormethyliertes Harz (Perlen aus Kopolystyrol-1% Divinylbenzol mit 1,10 meq Chlormethylgruppen/g Harz) zugefügt und die Mischung 3 Tage bei 50°C geschüttelt. Das Harz wurde filtriert und 5 Mal mit je 20 ccm Dimethylformamid, 3 Mal mit je 20 ccm 90%igem Dimethylformamid/Wasser, 2 Mal mit je 20 ccm Dimethylformamid und 2 Mal mit je 20 ccm Äthanol gewaschen und dann unter Vakuum über P₂O₅ getrocknet; so erhielt man 5,54 g argininiertes Harz (Einverleibung von etwa 50%).

Dann wurde das Harz 4 Schutzgruppenentfernungs- und Syntheszyklen unter Verwendung von 4 Äquivalenten der entsprechenden t-BOC-Aminosäure in jeder Kettenverlängerungsstufe unterworfen, wodurch man ein geschütztes Pentapeptidharzmaterial erhielt.

Dieses Harzmaterial wurde dann in ein HF beständiges Reaktionsgefäß gegeben, es wurden 8 ccm Anisol zugefügt und das Gefäß an eine HF Leitung angeschlossen. Es wurden etwa 70 ccm HF bei 0°C in das Reaktionsgefäß hineindestilliert, und die Mischung wurde weitere 30 Minuten bei 0°C gerührt. Das HF wurde abgepumpt und das Harz 5 Mal mit je 30 ccm Äther gewaschen und dann 5 Mal mit je 30 ccm Wasser extrahiert. Die wässrige Schicht wurde zu einem gelben glasigen Pulver lyophilisiert, das nach Reinigung gemäss Beispiel 1 das Pentapeptid Asp-Ser-Asp-Pro-Arg lieferte.

Das oben hergestellte Pentapeptid zeigt ein $[\alpha]_D^{20} = -78,6^\circ$ (c = 1, H₂O). Die Reinheit wurde in üblicher Weise

bei einer Anzahl von pH-Werten durch Papierelektrophorese bestimmt.

Beispiel 4

Herstellung des Hexapeptids Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

Ein weiterer Ansatz des argininierten Harzes (0,20 Millimol) wurde den Verfahren von Beispiel 1-3A unterworfen, wobei jedoch nach Bindung des zweiten Aspartinsäurerestes und Schutzgruppenentfernung eine äquivalente Menge t-BOC-Alanin in üblicher Weise mit Dicyclohexylcarbodiimid gekoppelt wurde.

Dann wurde das Harz wie in Beispiel 1 den Abspaltungs- und Hydrierungsverfahren unterworfen und wie dort gewonnen. So erhielt man 0,026 Millimol Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg in 13% iger Ausbeute.

Das gewonnene Polypeptid wurde in einer Aminosäureanalysevorrichtung untersucht und zeigte ein Aminosäureverhältnis von Ala 0,95, Asp 2,05, Ser 0,80, Pro 0,98 und Arg 1,00.

Die Reinheit wurde in üblicher Weise bei einer Anzahl von pH-Werten durch Papierelektrophorese bestimmt.

Beispiel 5

Nach den Syntheseverfahren von Beispiel 1-4 können die folgenden Polypeptide hergestellt werden:

Asp-Val-Asp-Leu-Ser

Thr-Ala-Ser-Thr-Glu

Asp-Val-Asp-Leu-Ser-Thr-Ala-Ser-Thr-Glu

Leu-Ser-Glu-Lys-His

Ala-Pro-Ser-Lys-Gly-Thr

Ala-Ser-Gly-Lys-Pro

Ala-Phe-Ala-Thr-Pro-Glu-Trp-Pro-Gly-Ser

Ala-Phe-Ala-Thr-Pro

Glu-Trp-Pro-Gly-Ser

Pro-Asp-Ala-Arg-His-Ser

Ala-Ser-Pro-Ser-Glu

Beispiel 6

Herstellung von Metall- und Aminsalzen

A.) Das Pentapeptid Asp-Ser-Asp-Pro-Arg wurde wie folgt in sein Natriumsalz umgewandelt:

Eine Lösung aus 0,05 Millimol des Pentapeptids in Wasser wurde vorsichtig mit genau 1 Äquivalent 0,1N NaOH behandelt und das Mononatriumsalz des Peptids durch Lyophilisierung isoliert. Durch Verwendung von genau 2 oder 3 Äquivalenten 0,1N NaOH wurden die entsprechenden Di- bzw. Trinatriumsalze erhalten.

In ähnlicher Weise konnte dieses Peptid durch Verwendung der entsprechenden Base in andere Metallsalze, z.B. das Kalium-, Lithium-, Calcium-, Barium-, Magnesium-, Ammonium-, Ferro-, Ferri-, Zink-, Mangan-, Mangan- und Aluminiumsalz, umgewandelt werden.

B.) Das Pentapeptid Asp-Ser-Asp-Pro-Arg wurde wie folgt in sein Triäthylaminsalz umgewandelt:

Die vorsichtige Zugabe von 1, 2 oder 3-Äquivalenten Triäthylamin zur Lösung des Peptids in Methanol und anschließende vorsichtige Abdampfung des Lösungsmittels lieferte das Mono-, Bis- bzw. Tristriäthylammoniumsalz. In ähnlicher Weise kann dieses Pentapeptid durch Verwendung

des entsprechenden Amins in andere Aminsalze umgewandelt werden, z.B. dasjenige von Trimethylamin, Tri-(n-propyl)-amin, Dicyclohexylamin, β -(Dimethylamino)-äthanol, β -(Diäthylamino)-äthanol, Triäthanolamin, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Arginin, Lysin, Histidin, N-Äthylpiperidin, Hydrabamin, Cholin, Betain, Äthylendiamin, Glucosamin, Methylglucamin, Theobromin, Purin, Piperazin, Piperidin, Coffein und Procein.

C.) In ähnlicher Weise können die anderen Peptide von Beispiel 1, 2, 4 und 5 in ihre entsprechenden Metall- und Aminsalze umgewandelt werden.

Beispiel 7

Das Pentapeptid Asp-Ser-Asp-Pro-Arg kann wie folgt in sein Salzsäure-Additionssalz umgewandelt werden:

Die vorsichtige Neutralisation einer Lösung des Peptids in Wasser oder Methanol mit genau 1 oder 2 Äquivalenten Salzsäure lieferte das Mono- bzw. Dihydrochloridsalz. Die Salze wurden durch Lyophilisierung einer wässrigen Lösung oder durch Ausfällung mit Äther aus einer methanolischen Lösung isoliert.

In ähnlicher Weise kann das Peptid durch Verwendung der entsprechenden Säure anstelle von Salzsäure in andere Säure-Additionssalze umgewandelt werden, z.B. in das Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Nitrat, Acetat, Oxalat, Tartrat, Succinat, Maleat, Fumarat, Gluconat, Citrat, Malat, Ascorbat und Benzoat.

In ähnlicher Weise können die anderen Peptide von Beispiel 1, 2, 4 und 5 in ihre entsprechenden Säure-Additionssalze umgewandelt werden.

Beispiel 8

Herstellung von Estern

A.) 1,0 g des entsprechenden Peptidharzes von Beispiel 5 wurde in 40 ccm wasserfreiem Methanol pro g Harz suspendiert, es wurden 50 Millimol Triäthylamin zugefügt und die Mischung 20 Stunden bei 22°C gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und die vereinigten Filtrate unter Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in Äthylacetat gelöst, mit 5 ccm Chlorwasserstoff gesättigt und die Lösung 30 Minuten bei 22°C gerührt. Das Produkt wurde durch Zugabe von Äther ausgefällt und lieferte ein Hydrochloridsalz des Peptids. Die schützenden O-Benzyläthergruppen von Ser oder Thr wurden durch Hydrogenolyse unter Verwendung von Pd/BaSO₄ in der in Beispiel 1 zur Entfernung der Nitrogruppe in Nitroargininderivaten beschriebenen Weise entfernt; so erhielt man

Ala-Pro-Ser-Lys-Gly-Thr-OMe

Ala-Ser-Gly-Lys-Pro-OMe bzw.

Ala-Phe-Ala-Thr-Pro-OMe.

Durch Verwendung anderer Alkohole anstelle von Methanol und Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 45-80°C sowie der Reaktionszeit auf 45-90 Stunden erhielt man die entsprechenden Äthyl-, Propyl-, Butyl-, Hexyl-, Octyl-, Decyl- oder Dodecylester.

B.) Bei diesem Verfahren wurde eine andere Art von verankernder Bindung zum Binden des Argininrestes verwendet, nämlich die von S. Wang und R.B. Merrifield in J. Am. Chem. Soc., 91 6488 (1969) beschriebene Harz- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{OCONHNH}_2$ Bindung. Weiter wurden bei dem Verfahren N^α-2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl-Schutzgruppen (Bpoc) anstelle von t-BOC für den Schutz der α -Aminogruppe verwendet, da die Bpoc Gruppe bei jedem Zyklus der Synthese mit einer sehr milden Säure un-

ter Bedingungen entfernt werden kann, bei welchen die verankernde Bindung stabil ist. Das Bpoc-N^ε-Nitro-Arg wird an das Harz nach dem DCC Verfahren gebunden, und die Synthese erfolgt im wesentlichen gemäss Beispiel 1-3, wobei jedoch 1% Trifluoressigsäure(TFA)/CH₂Cl₂ für den Schutzgruppenentfernungszyklus zwecks Abspaltung der Bpoc Gruppe verwendet wird. Die endgültige einverleibte Aminosäure wird als N^α-Benzoyloxycarbonylderivat (Z) geschützt, so dass die N-endständige Gruppe während der Abspaltung des geschützten Peptids vom Harz geschützt bleibt. Die Abspaltung erfolgt wie folgt: 500 mg des Peptidharzes wurden in 12 ccm 50%iger Trifluoressigsäure in CH₂Cl₂ suspendiert und die Mischung 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Harz wurde abfiltriert, 2 Mal mit je 10 ccm CH₂Cl₂ gewaschen und die kombinierten Filtrate unter Vakuum konzentriert; so erhielt man Z-β-Benzyl-Asp-O-Benzyl-Ser-β-Benzyl-Asp-Pro-N^ε-Nitro-Arg-NHNH₂ als weisses Pulver.

Eine Lösung aus 0,2 Millimol des geschützten Peptidhydrazids in 1 ccm Dimethylformamid wurde auf -20°C abgekühlt, dann wurde 3,35N HCl in Dioxan (0,5 Millimol) zugefügt. Das Bad wurde auf -15°C erwärmt, es wurden 0,03 ccm tert.-Butylnitrit zugefügt und die Mischung 10 Minuten bei -10°C stehen gelassen, wodurch man das Peptidazidderivat erhielt. Dann wurde überschüssiges Methanol bei -10°C sowie 0,5 Millimol Äthyl-diisopropylamin zugefügt und die Mischung 24 Stunden bei 0°C gehalten. Während der ersten 6 Stunden wurden jede Stunde 5 µl der Base zugefügt. Dann wurde das geschützte Peptid durch Eingies- sen der Mischung in 15 ccm kalte, 1%ige Essigsäure ausgefällt und der gesammelte Niederschlag durch Filtrieren gewonnen und gewaschen. Dann wurden die Schutzgruppen auf Benzylbasis durch Hydrogenolyse gemäss Beispiel 1 entfernt und das Produkt durch Teilungschromatographie auf «Sephadex G-25» oder durch Gegenstromverteilung gereinigt, wodurch man Asp-Ser-Asp-Pro-Arg-OMe erhielt.

Wurde das Methanol in diesem Verfahren durch andere Alkohole ersetzt, dann erhielt man die entsprechenden Äthyl-, Propyl-, Butyl-, Hexyl-, Octyl-, Decyl- und Dodecylester.

C.) Durch Anwendung der in A.) und B.) beschriebenen Verfahren können die entsprechenden Ester der Polypeptide von Beispiel 1, 2, 4 und 5 hergestellt werden.

Beispiel 9

Herstellung von Amidin

A.) Die Produkte von Beispiel 8A und 8B wurden mit einer gesättigten Lösung aus Ammoniak in Methanol 2 Tage bei Zimmertemperatur behandelt; nach Entfernung des Lösungsmittels unter Vakuum erhielt man:

Ala-Pro-Ser-Lys-Gly-Thr-NH₂

Ala-Ser-Gly-Lys-Pro-NH₂

Ala-Phe-Ala-Thr-Pro-NH₂ und

Asp-Ser-Asp-Pro-Arg-NH₂

B.) Das Peptidazid von Beispiel 8B wurde mit Ammoniak in Dimethylformamidlösung unter den in Beispiel 8B zur Reaktion mit Methanol beschriebenen Bedingungen umgesetzt. Das geschützte Peptidamid wurde isoliert und die Schutzgruppen in beschriebener Weise entfernt, wodurch man Asp-Ser-Asp-Pro-Arg-NH₂ erhielt.

C.) Das geschützte Peptidharzprodukt von Beispiel 3A wurde in einer gesättigten Lösung aus Ammoniak in Methanol suspendiert und die Mischung 2 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Das Harz wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate unter Vakuum kon-

zentriert; so erhielt man t-BOC-Asn-O-Benzyl-Ser-Asn-Pro-N^ε-Nitro-Arg-NH₂. Die t-BOC Gruppe und die N^ε-Nitrogruppe wurden anschliessend durch saure Hydrolyse bzw. Hydrogenolyse wie oben entfernt und lieferten Asn-Ser-Asn-5-Pro-Arg-NH₂.

Durch Verwendung anderer Amine anstelle von Ammoniak sowie Dimethylformamid als Lösungsmittel (wenn angebracht) sowie durch Erhöhung von Reaktionstemperatur und -zeit (falls notwendig), erhielt man z.B. das entsprechende Dimethyl-, Diäthyl-, Di-(n-butyl)-, n-Hexyl-, Piperidyl-, Pyrrolidinyl-, Morpholinyl-, Di-(n-hexyl)- und N-Methylpiperazinylamin.

D.) Nach Verfahren gemäss A.) B.) und C.) können die entsprechenden Amide der anderen Polypeptide von Beispiel 1, 2, 4 und 5 hergestellt werden.

Beispiel 10

Herstellung von N-Acylderivaten

N^α-Acyl-derivate von Asp-Ser-Asp-Pro-Arg wurden hergestellt, indem man die endständige t-BOC-Aminosäure (t-BOC-β-Benzylaspartat) durch die entsprechende N^α-Acyl-aminosäure (z.B. N^α-Acetyl-β-benzylaspartat) ersetzte, wobei alle anderen Stufen von Schutzgruppenentfernungs-, Synthese- und Abspaltungszyklen gleich blieben.

So können hergestellt werden:

N^α-Acetyl-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

N^α-Butyryl-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

N^α-Hexanoyl-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

N^α-Octanoyl-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

N^α-Decanoyl-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg

N^α-Dodecanoyl-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg.

In ähnlicher Weise können die entsprechenden N^α-Acyl-derivate der anderen, in Beispiel 1, 2, 4 und 5 genannten Peptide hergestellt werden.

Beispiel 11

Herstellung von O-Acylderivaten

Zur Herstellung des geschützten Pentapeptidharzmaterials, in welchem die Hydroxylgruppe von Serin ungeschützt ist, wurde die folgende Modifikation des Syntheseverfahrens in fester Phase angewendet:

Das Tripeptidharzmaterial von Beispiel 1 wurde dem Schutzgruppenentfernungszyklus unterworfen und dann mit dem t-BOC-Serin-N-Hydrosuccinimidester reagieren gelassen, wodurch man ein t-BOC-Ser-β-Benzyl-Asp-Pro-N^ε-Nitro-Arg-Harz erhielt, das nach Schutzgruppenentfernung unter üblichen Bedingungen mit p-Nitrophenyl-t-BOC-β-benzylaspartat gekoppelt wurde, wodurch man ein t-BOC-β-Benzyl-Asp-Ser-β-Benzyl-Asp-Pro-N^ε-Nitro-Arg-Harz erhielt.

0,5 Millimol dieses geschützten Peptidharzmaterials wurde Octansäure, Decansäure und Dodecansäure ersetzt, dann wurden 1,5 Millimol Hexansäure, in 1:1 Dimethylformamid/CHCl₃ gelöst, sowie 1,5 Millimol Carbonyldiimidazol, in denselben Lösungsmitteln gelöst, zugefügt. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 2 Stunden in einem Merrifield Reaktionsgefäss geschüttelt und das Peptid dann in oben beschriebener Weise vom Harz abgespalten. Die N^ε-Nitro-Gruppe wurde hydrogenolytisch entfernt und das Peptid wie oben gereinigt, wodurch man Asp-O-Hexanoyl-Ser-Asp-Pro-Arg erhielt.

Wurde die Hexansäure durch Essigsäure, Buttersäure, Octansäure, Decansäure und Dodecansäure ersetzt, dann konnten die entsprechenden O-Acetyl-, Butyryl-, Octanoyl-, Decanoyl- und Dodecanoylverbindungen hergestellt werden.

In ähnlicher Weise können die entsprechenden O-Acyl-derivate der anderen Peptide mit Seitenkettenhydroxylgruppen von Beispiel 2, 4 und 5 hergestellt werden.

Die «Blockierungs»-Aktivität der erfindungsgemäss erhältlichen Polypeptide kann an der klassischen Prausnitz-Kuster (P-K) Reaktion untersucht werden. Dabei wird einem Menschen ein bekanntes allergisches Serum, d.h. ein solches, das ein für ein bekanntes Antigen oder Allergen spezifisches IgE enthält, intradermal injiziert. Nach einer gewissen Zeit, z.B. 20 Stunden oder mehr, werden die Injektionsstellen durch einen Stich oder die Injektion einer Lösung des für das IgE im injizierten Serum spezifischen Antigens gereizt. Innerhalb der nächsten 10-30 Minuten zeigt sich eine positive Reaktion durch Bildung einer Schwellung (und Rötung) an der Injektionsstelle. Je grösser der Schwellungsdurchmesser, umso intensiver ist die allergische Reaktion. Das heisst, eine stärkere Schwellung bedeutet eine grössere Histaminfreisetzung in das Gewebe an der Injektionsstelle. Umgekehrt zeigt die Bildung einer Schwellung mit geringerem Durchmesser oder das Fehlen jeglicher Schwellung eine verminderte und/oder überhaupt keine allergische Reaktion. Diese dargestellte P-K Reaktion ist ein klassischer, allgemein bekannter und von Allergieforschern angewendeter Test.

Wie erwähnt, wird die klassische P-K Reaktion zur Untersuchung der «Blockierungs»-Fähigkeiten der Polypeptide verwendet.

Die folgenden Untersuchungen verschiedener geeigneter Polypeptide, deren Synthese beschrieben worden ist, erfolgten unter Verwendung eines einzigen, als sicher erkannten P-K Spenderserums, das ein für Meerschweinchenallergene spezifisches IgE enthielt.

Die Peptidlösungen wurden entweder intradermal 1-24 Stunden vor dem P-K Serum injiziert oder zur gleichzeitigen Injektion mit Verdünnungen des P-K Serums gemischt. Die anfänglichen Tests erfolgten mit einem P-K Serum bei Verdünnungen von 1:4 bis 1:200. Weitere Versuche erfolgten bei einer fixierten P-K Verdünnung von 1:32, wobei die Peptidlösungen variiert wurden, so dass sie etwa 1 Millimol bis 2 Mol des zu testenden Peptids enthielten. Die Injektionsstellen der Versuchspersonen wurden durch Stichpunktur von Meerschweinchen BCA 1:40 Gew./Vol. (eingekauft von der Firma Berkeley Biologicals, Inc.) gereizt.

Es wurden Versuchspersonen mit Serum IgE Werten unter 100 U/ccm 242 ng/ccm hatten; von diesen Werten ist bekannt, dass sie eine erfolgreiche P-K Reaktionsfähigkeit sicherstellen. Weiter wurden für diese Tests Personen mit einem negativen direkten Hauttest auf Meerschweinchenantigen ausgewählt. Die P-K und Hauttests erfolgten am Rücken und/oder am Unterarm. Mehrfachteststellen von etwa 25 mm Durchmesser wurden durch eine Markierung bezeichnet, und alle Injektionen erfolgten innerhalb der umrahmten Hautflächen.

Eine typische Folge bestand in der intradermalen Injektion von 0,1 ccm der Peptidlösung oder einer gepufferten Kontrollösung mit Kochsalzlösungsverdünnung; in 1-24 Stunden schloss sich daran die intradermale Injektion von 0,05 ccm P-K Serum in jede vorherige Injektionsstelle an. Nach Verstreichen von 20-24 Stunden wurde jede Stelle mit der Antigenlösung stichpunktiert, in 5 Minuten trockengetupft, und dann erfolgten, gewöhnlich 15, 20 und 25 Minuten nach der Stichpunktur, die dreimaligen Messungen auf Schwellung und Rötung in ihrem engsten und weitesten Durchmesser.

Die Untersuchungen auf Blockierungs-Aktivität erfolgten mit folgenden Polypeptiden: Asp-Pro-Arg; Ser-Asp-Pro-Arg; Asp-Ser-Asp-Pro-Arg; und Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg. Zum Vergleichstesten wurden auch Asp-Thr-Glu-Ala-Arg und Tosyl-L-Argininsarcosinmethylester (TASME) synthetisiert und untersucht.

Die genannten Polypeptide wurden wie oben an sechs verschiedenen Personen mit den folgenden Ergebnissen untersucht:

Für Asp-Pro-Arg lag die durchschnittliche Hemmwirkung bei 15% mit einem individuellen Bereich von nur 0% bis zu 38%.

Für Ser-Asp-Pro-Arg lag die durchschnittliche Hemmwirkung bei 18% mit einem individuellen Bereich von nur 0% bis 50%.

Für Asp-Ser-Asp-Pro-Arg lag die durchschnittliche Hemmwirkung bei 72% mit einem individuellen Bereich von 60 bis 89%.

Für Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg lag die durchschnittliche Hemmwirkung bei 46% mit einem individuellen Bereich zwischen 10 bis 61%.

Für Asp-Thr-Glu-Ala-Arg lag die durchschnittliche Hemmwirkung bei 58% mit einem individuellen Bereich zwischen 30 bis 80%.

Für TASME lag die durchschnittliche Hemmwirkung bei 24% mit einem individuellen Bereich zwischen 0 bis 40%.

Die obigen Ergebnisse sind der Durchschnitt doppelter Messungen bei drei Zeitabständen für jede Reaktion jeder Person, subtrahiert von den durchschnittlichen Kontrollschwellungsmessungen und dividiert durch die durchschnittliche Messung der Kontrollschwellung bei jeder Versuchsperson. Die Kontrollschwellungen bei den verschiedenen Versuchspersonen variierten von 8-40 mm² mit einem Durchschnittswert von 17 mm². Jedes Peptid wurde in etwa 6 µg/ccm Verdünnung verwendet, und an jede Stelle wurde 0,1 ccm und anschliessend 0,05 ccm verdünntes P-K Serum mit einem IgE Gehalt von 0,2 ng injiziert. Somit konkurrieren 10⁻⁹M des Peptids mit 10⁻¹⁵M IgE bzgl. der Bindestellen der Mastzellen; oder das Verhältnis betrug 1 IgE Molekül pro 10⁶ Peptidmoleküle. Aus den obigen Untersuchungen geht hervor, dass das Pentapeptid, d.h. Asp-Ser-Asp-Pro-Arg, die stärkste «Blockierungs»-Aktivität zeigt, wobei das Hexapeptid, d.h. Ala-Asp-Ser-Asp-Prop-Arg, eine etwas geringere Aktivität zeigt. Das Tetrapeptid Ser-Asp-Pro-Arg und das Tripeptid Asp-Pro-Arg zeigten die geringste Wirksamkeit.

Es wird darauf hingewiesen, dass das Pentapeptid Asp-Thr-Glu-Ala-Arg zusammen mit den anderen obigen Peptiden hergestellt und untersucht wurde. Dieses Polypeptid hat nicht die analoge Folge der in den C 2, C 3 oder C 4 Domänen des IgE Moleküls erscheinenden Aminosäuren, zeigt jedoch im obigen Test eine hohe Wirksamkeit.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die aktiven Polypeptide offenbar die Fähigkeit zum «Entfernen» des IgE aus den Mastzellenstellen sowie zum Verhindern einer Bindung des IgE an diese Stellen haben. Bei einem Einzeltest an einer Versuchsperson mit bekannter, extremer Sensibilität auf Meerschweinchenantigene, d.h. eine Person mit hoher natürlicher Konzentration an gegen Meerschweinchenantigen sensitivem IgE, wurden die Polypeptide injiziert, und es wurde die Reaktion der Versuchsperson auf Meerschweinchenantigen festgestellt.

Im einzelnen wurden jeweils etwa 2 nM Asp-Ser-Asp-Pro-Arg und Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg intradermal in 3 markierte Stellen injiziert. Vergleichsweise wurde TASME sowie eine Kontrolle des Pufferverdünnungsmittels allein in 3 markierte Stellen injiziert. 1, 5 und 24 Stunden nach der Polypeptid- und Kontrollinjektion wurde jeweils eine Peptid-

und Verdünnungsmittelstelle durch Stichpunktur mit Meer-schweinchenantigen gereizt. Zu den Zeitabständen von 1 und 5 Stunden wurde keine Inhibierung der Schwellungs- und Rötungsreaktion an irgendeiner der Stellen festgestellt. Bei der Reizung nach 24 Stunden war jedoch die Schwellung an der Asp-Ser-Asp-Pro-Arg Stelle etwa 45% kleiner, während an der Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg Stelle die Schwellung etwa 23% kleiner war. An der TASME Stelle wurde keine Verringerung der Schwellungsgrösse im Vergleich zur Stelle der Injektion mit gepuffertem Kochsalzlösungsverdünnungsmittel festgestellt.

Somit «entfernen» mindestens die aktivsten Peptide offenbar ein bereits an Mastzellenstellen gebundenes IgE und unterdrücken somit eine natürliche allergische Reaktion. Wie oben bereits gezeigt, ist dasselbe Pentapeptid bei der Hemmung einer passiv übertragenen (P-K) allergischen Reaktion äusserst wirksam.

Die akute Toxizität wurde wie folgt bestimmt:

Weisse BBA Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 15 g wurden jeweils mit 1,4 ccm einer Lösung des Peptids in phosphatgepufferter Kochsalzlösung bei einem pH-Wert von 7,4 wie folgt injiziert:

	0,1 ccm × 3	intradermal
	0,1 ccm × 3	subkutan
	0,2 ccm	intravenös
5	0,6 ccm	intraperitoneal

24-72 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse, die alle noch lebten, getötet und untersucht.

Die verwendeten Peptide und ihre Konzentrationen waren wie folgt:

	Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg (Beispiel 4)	5 µg/ccm (375 mg/kg)-6 Mäuse
15	Asp-Ser-Asp-Pro-Arg (Beispiel 3)	10 µg/ccm (1 mg/kg) -8 Mäuse
	Asp-Ser-Asp-Pro-Arg (Beispiel 3)	13 µ/ccm (1,3 mg/kg) -8 Mäuse

20 Die visuelle und mikroskopische Untersuchung von Gewebe und Organen zeigte keine örtlichen oder systemischen toxikologischen Abnormalitäten.