



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.³: C 07 C 103/52
A 61 K 39/385

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



PATENTSCHRIFT A5

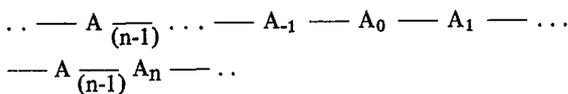
11

630 060

<p>21 Gesuchsnummer: 5398/77</p> <p>22 Anmeldungsdatum: 29.04.1977</p> <p>30 Priorität(en): 29.04.1976 SE 7604972</p> <p>24 Patent erteilt: 28.05.1982</p> <p>45 Patentschrift veröffentlicht: 28.05.1982</p>	<p>73 Inhaber: AB Bonnierföretagen, Stockholm (SE)</p> <p>72 Erfinder: Björn Erik Gustav Bertilsson Lüning, Stockholm (SE)</p> <p>74 Vertreter: Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich</p>
---	--

54 Verfahren zur Herstellung eines antigen-wirksamen Polypeptides.

57 Die Synthese führt zu einem Antigen-wirksamen Polypeptid, welches einen immunologisch inerten Teil und, als wirksame immunologisch bestimmende Gruppe, die folgende Aminosäurefolge



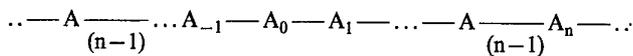
aufweist. A₀ bedeutet einen Argininrest.

Die gewünschte N-geschützte Aminosäure wird in der einen endständigen Stellung an einen Träger, beispielsweise ein Harz, durch Veresterung gekuppelt. Dann wird die N-schützende Gruppe entfernt und eine zweite gewünschte N-geschützte Aminosäure der Folge an die Aminogruppe der harzgebundenen Aminosäure gekuppelt. Die Kupplungsstufe wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Aminosäurefolge erreicht ist.

Beispielsweise wird ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge A₋₃-A₋₂-A₋₁-A₀-A₁-A₂-A₃ hergestellt, in der A₀ einen Argininrest, A₁, A₂, A₋₁ und A₋₂ gleich oder verschieden sind und aus den Resten von Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Lysin oder Isoleucin ausgewählt werden und A₃ und A₋₃ gleich oder verschieden sind und Glutaminsäure- oder Asparaginsäurereste bedeuten.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Antigenwirksamen Polypeptides, welches einen immunologisch inerten Teil und als wirksame immunologisch bestimmende Gruppe eine Aminosäurefolge



aufweist, in der A_0 einen Argininrest bedeutet, mittels stufenweisem Aufbau der Aminosäurefolge, dadurch gekennzeichnet, dass man die gewünschte N-geschützte Aminosäure in der einen endständigen Stellung an einen Träger, durch Veresterung kuppelt, dann die N-schützende Gruppe entfernt und eine zweite gewünschte N-geschützte Aminosäure der Folge an die Aminogruppe der harzgebundenen Aminosäure kuppelt, die N-schützende Gruppe abspaltet und die Kupplungsstufe so oft wiederholt, bis die gewünschte Aminosäurefolge erreicht ist, und dann das erhaltene Polypeptid von dem Harz abspaltet und die schützenden Gruppen davon entfernt.

2. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge $A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3$ herstellt, in der A_0 einen Argininrest, A_1 , A_2 , A_{-1} und A_{-2} gleich oder verschieden sind und aus den Resten von Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Lysin oder Isoleucin ausgewählt werden und A_3 und A_{-3} gleich oder verschieden sind und Glutaminsäure- oder Asparaginsäurereste bedeuten.

3. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge $A_{-4}-A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4$ herstellt, in der A_0 , A_1 , A_2 , A_3 , A_{-1} , A_{-2} und A_{-3} die im Unteranspruch 1 angeführte Bedeutung haben und A_4 und A_{-4} gleich oder verschieden sind und Reste von Glycin, Alanin, Valin, Leucin oder Isoleucin bedeuten.

4. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge $A_{-5}-A_{-4}-A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4$ herstellt, worin A_5 einen Tyrosinrest bedeutet und die anderen Symbole die vorstehend genannte Bedeutung haben.

5. Verfahren gemäss Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass A_1 und A_4 Alaninreste, A_2 , A_{-2} und A_{-4} Leucinreste, A_3 ein Glutaminsäurerest, A_{-1} ein Valinrest und A_{-3} ein Asparaginsäurerest sind.

6. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge $A_{-6}-A_{-5}-A_{-4}-A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6$ herstellt, in der A_5 einen Alaninrest bedeutet und A_6 und A_{-6} gleich oder verschieden sind und Glutamin-, Asparagin- oder Lysinreste bedeuten.

7. Verfahren gemäss Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge $A_{-6}-A_{-5}-A_{-4}-A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6$ herstellt, in der A_5 einen Alaninrest bedeutet und A_6 und A_{-6} gleich oder verschieden sind und Glutamin- oder Asparaginreste bedeuten.

8. Verfahren gemäss Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass A_6 einen Asparaginrest und A_{-6} einen Glutaminrest bedeutet.

9. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge $A_{-7}-A_{-6}-A_{-5}-A_{-4}-A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7$ herstellt, in der A_7 einen Glycinrest und A_{-7} einen Alaninrest bedeutet.

10. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge Ala Leu Leu Asn Asp Glu Leu Ala Aln Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val herstellt.

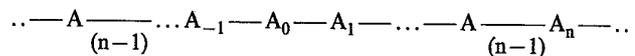
11. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge Thr Asp Leu Asp Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asp Gly Glu Leu Glu Val herstellt.

12. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polypeptid mit einer Aminosäurefolge Leu Asn Asp A_{-9} Leu Ala A_{-6} Tyr Leu Asp A_{-2} Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly A_8 Leu Glu Val herstellt, in der A_{-9} und A_8 gleich oder

2

verschieden sind und Glutaminsäurereste oder Argininreste, A_{-6} Glutamin- oder Lysinreste und A_{-2} Leucin- oder Lysinreste bedeuten.

13. Antigenwirksames Polypeptid mit einem immunologisch inerten Teil und als wirksame immunologisch bestimmende Gruppe eine Aminosäurefolge



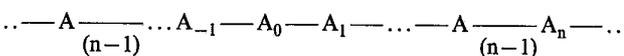
aufweist, in der A_0 einen Argininrest bedeutet, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 1.

14. Polypeptide gemäss Patentanspruch 13, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Patentansprüchen 2 bis und mit 12.

Die Erfindung bezieht sich auf eine Synthese eines antigenwirksamen Polypeptides, das einen immunologisch inerten Teil und als immunologisch bestimmende Gruppe eine bestimmte Aminosäurefolge aufweist.

In der schwedischen Patentanmeldung 73-08917-9 und der USA-Patentschrift 3960827 ist ein krebszerzeugendes Polypeptidantigen (CAPA), das Verfahren seiner Abtrennung und seine Verwendung bei der Krebsdiagnose und der Herstellung von Antikörpern beschrieben. Das CAPA wird im Handel nunmehr als TPA bezeichnet, d.h. «tissue polypeptide antigen» beziehungsweise «Gewebe-Polypeptid-Antigen». Aus der Beschreibung der vorstehend genannten Patentanmeldung und des amerikanischen Patentes lässt sich erkennen, dass die Abtrennung des natürlichen Antigens ein schwieriges Verfahren ist, sogar wenn dabei ein praktisch gebräuchliches Produkt erhalten wird, da es hohe Produktionskosten erfordert und darüberhinaus Schwierigkeiten bei der Bereitstellung des notwendigen Ausgangsmaterials wie Tumorgewebe usw. umfasst. Im Vergleich zu diesem Hintergrund würde ein synthetisch hergestelltes Antigen natürlich sehr attraktiv sein unter Berücksichtigung der Möglichkeit, dass man damit ein Produkt herstellen kann, das mit Bezug auf seine Zusammensetzung genau bekannt ist und das auch zu einem günstigeren Preis hergestellt werden kann. Mit Bezug auf die beiliegende Zeichnung zeigen die Werte beim Hämagglutinations-Hemmtest einen Vergleich zwischen natürlichem CAPA und dem vergleichbaren synthetischen Antigen gemäss der Erfindung Beispiel 1. Diese Werte werden nachstehend näher erläutert.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung eines Antigenwirksamen Polypeptides, welches einen immunologisch inerten Teil und als wirksame immunologisch bestimmende Gruppe eine Aminosäurefolge



aufweist, in der A_0 einen Argininrest bedeutet, ist im vorangehenden Patentanspruch 1 charakterisiert.

Die beschriebene Aminosäurefolge zeigt, dass die beiden Teilstücke, die den zentral angeordneten Argininrest flankieren, der mit A_0 bezeichnet wird, gegenseitige Spiegelbilder sind, da die beiden an A_0 angelagerten Aminosäurereste von neutralen Aminosäuren stammen, nämlich von Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin. Darüberhinaus sind die mit A_3 und A_{-3} jeweils bezeichneten Aminosäurereste von negativen oder sauren Aminosäuren abgeleitet, nämlich von Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure. Der immer vorliegende Argininrest ist darüberhinaus von einer positiven oder basischen Aminosäure, nämlich von Arginin, abgeleitet, dessen Basizität jedoch durch die vereinten Aciditäten der mit A_3 und A_{-3} bezeichneten Aminosäurereste überlagert wird. Der Aminosäureanteil, der dem Polypeptid die gewünschte Antigenwirksamkeit verleiht, hat daher als ganzes einen negativen oder sauren Charakter.

Bevorzugterweise enthält das Polypeptid die Aminosäurefolge: (II)

$A_{-4}-A_{-3}-A_{-2}-A_{-1}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4$, in der A_4 und A_{-4} gleich oder verschieden sind und von Resten von Glycin, Alanin, Valin, Leucin oder Isoleucin stammen, die vorstehend als neutrale Aminosäuren bezeichnet wurden. Mit Bezug auf die Art der Aminosäuren sind die Teilstücke der Aminosäurefolge, die den zentral angeordneten Argininrest flankieren, der mit A_0 bezeichnet wird, noch immer Spiegelbilder voneinander. Andere Symbole in dieser bevorzugten Aminosäurefolge haben die vorstehend angegebene Bedeutung.

(III) Gemäss einem besonders bevorzugten Merkmal ist ein Tyrosinrest an den Aminosäurerest A_{-4} angelagert, wobei dieser Tyrosinrest, wie aus der folgenden Beschreibung hervorgeht, eine relativ wesentliche Rolle für die Wirksamkeit des Produktes spielt. Die Folge A_{-4} über A_0 ist äusserst bedeutend für dieses Merkmal.

(IV) Bei der zuletzt erwähnten besonderen Ausführungsform mit dem Tyrosinrest, sind A_1 und A_4 vorzugsweise Alaninreste, A_2 , A_{-2} und A_{-4} Leucinreste und A_3 ist ein Glutaminsäurerest, A_{-1} ist ein Valinrest und A_{-3} ein Asparaginsäurerest.

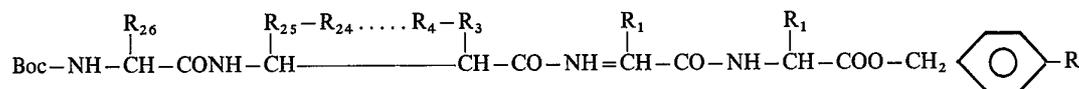
Nachstehend werden folgende Abkürzungen für die fraglichen Aminosäuren verwendet:

Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Glutamin	Gln
Glutaminsäure	Glu
Glycin	Gly
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Tyrosin	Tyr
Valin	Val
Threonin	Thr
Phenylalanin	Phe
Lysin	Lys

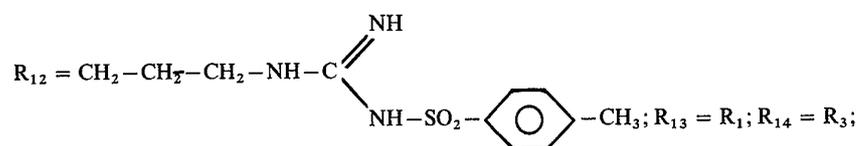
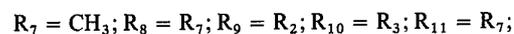
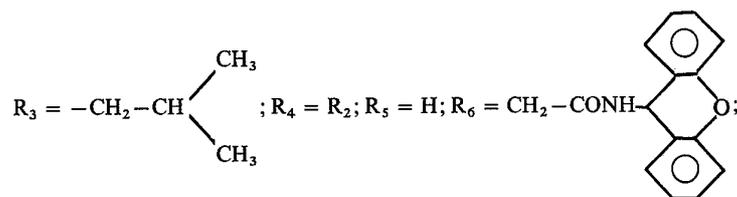
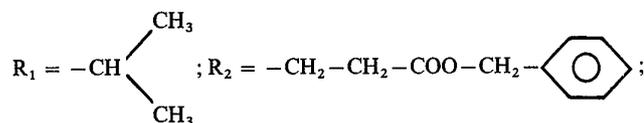
Unter Verwendung der vorstehend genannten Abkürzungen ist bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform A_5 ein Alaninrest, A_6 und A_{-6} sind gleich oder verschieden und entweder Glutamin- oder Asparaginreste. Bei dieser Aminosäurefolge ist folgende besondere Folge besonders bevorzugt: (V)

Gly Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn.

Bei dieser Folge ist darüberhinaus bevorzugt, dass an beiden Enden der Folge als A_7 ein Glycinrest und als A_{-7} ein Alaninrest angelagert ist, d.h. dass unter Verwendung der vorstehend genannten Abkürzungen folgende Folge vorliegt: (VI)



worin R den Harzanteil, Boc einen t-Butyloxycarbonylrest und



Ala Gly Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly. In den vorstehenden Formeln V und VI kann Gln in gleicher Weise durch Lysin oder Asparagin ersetzt werden oder umgekehrt.

Das bei der erfindungsgemässen Synthese verwendete Harz kann aus einem Mischpolymeren von Styrol und Divinylbenzol bestehen, wobei das Styrol den grösseren Teil des Mischpolymeren darstellt, das beispielsweise aus etwa 98% Styrol und etwa 2% Divinylbenzol besteht.

Um eine reaktionsfähige Gruppe zum Ankuppeln der ersten Aminosäure zu erhalten, werden die Benzolringe in geeigneter Weise teilweise chlormethyliert. Wenn dieses chlormethylierte Harz mit dem Triäthylaminsalz einer stickstoffgeschützten Aminosäure behandelt wird, bildet sich eine Bindung vom Benzylestertyp.

Eine derartige Bindung ist bei den Bedingungen der Synthese stabil, kann jedoch mit HBr in Essigsäure oder Trifluoressigsäure gespalten werden, wobei die N-schützende Gruppe gleichzeitig entfernt und das Peptid von dem Harz abgetrennt wird.

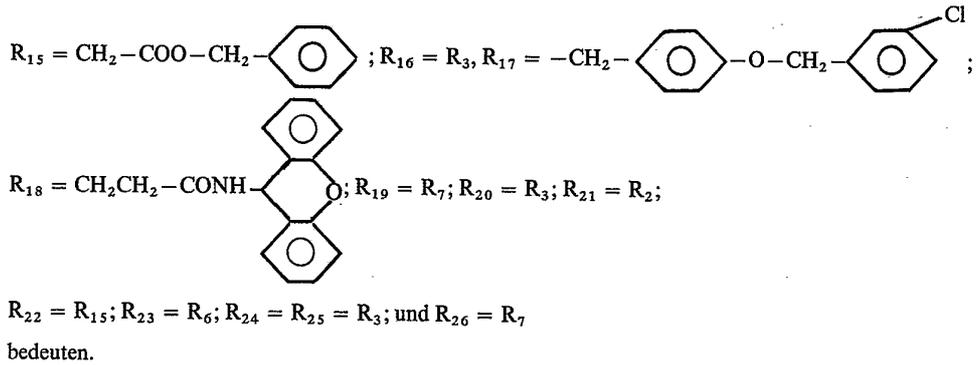
Um die Aminosäure zu schützen, kann eine t-Butyloxycarbonylgruppe in geeigneter Weise verwendet werden, da sie durch HCl in Essigsäure gut abgespalten werden kann. Man kann zu diesem Zweck auch die Carbobenzyloxygruppe verwenden, wobei jedoch zur Entfernung der Schutzgruppe dann HBr in Essigsäure verwendet werden muss. Als Schutzgruppe kann man auch die o-Nitrophenylsulfenylgruppe verwenden. Andere Schutzgruppen können ebenfalls verwendet werden und sind dem Fachmann bekannt.

Das am häufigsten verwendete Kupplungsmittel bei dieser Synthese ist Dicyclohexylcarbodiimid. Bei Verwendung von Methylenechlorid als Lösungsmittel und etwa 50% Überschuss an t-Butyloxycarbonylamino-säure und Dicyclohexylcarbodiimid, wird eine quantitative Umsetzung innerhalb weniger Minuten sogar bei Verwendung von Dimethylformamid als Lösungsmittel erreicht. Mit Bezug auf weitere Einzelheiten der Synthese wird auf das Buch «Protein Sequence Determination», zusammengefasst von Saul B. Needleman, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970, insbesondere Seiten 308-310, verwiesen. Es sind auch andere Kupplungsmittel geeignet, die dem Fachmann bekannt sind.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1:

Nach dem in fester Phase durchgeführten Verfahren von Merrifield (vgl. die vorstehend genannte Literaturstelle) wird folgendes Produkt hergestellt:



Die Aminosäurefolge zwischen dem t-Butyloxycarbonylrest und dem Harzanteil kann in folgender Weise unter Verwendung der vorstehend aufgeführten Abkürzungen für die Aminosäuren ausgedrückt werden: (VII)

Ala Leu Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu
Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Gln Leu Glu Val

0,4 mmol Boc-Valin (Harzbenzylester) wurden in eine Cuvette einer Beckman-peptidsynthesevorrichtung eingebracht und in Methylenechlorid (CH_2Cl_2) aufgequollen. Die schützende Boc-Gruppe wurde durch Behandlung mit überschüssiger Trifluoressigsäure in Methylenechlorid entfernt. Nach dem Waschen mit Methylenechlorid wurde das Harz mit Triäthylamin neutralisiert und erneut mit Methylenechlorid gewaschen. Es wurde N-Boc-Glutaminsäurebenzylester (Kupplungsstufe 1) und Cyclohexylcarbodiimid, gelöst in CH_2Cl_2 , zugegeben und die Mischung 30 min gerührt. Das Harz wurde gewaschen und die Kupplungsstufe wiederholt. Damit wurde die Einführung von R_2 in Stufe 1 abgeschlossen.

Stufe 2 der Synthese beginnt mit der Entfernung eines N-Boc von der N-endständigen Aminosäure und Wiederholung der Kupplungsstufe unter Verwendung einer anderen N-Boc-Aminosäure. Zum Aufbau der vorstehend genannten Aminosäurefolge wurden folgenden Reagenzien in den aufeinanderfolgenden Stufen verwendet:

- In Stufe 2: N-Boc-leucin
- In Stufe 3: D:o wie in Stufe
- In Stufe 4: N-Boc-glycin
- In Stufe 5: N-Boc-asparaginoxanthrydrylderivat
- In Stufe 6: N-Boc-alanin
- In Stufe 7: D:o wie in Stufe 6
- In Stufe 8: D:o wie in Stufe 1
- In Stufe 9: D:o wie in Stufe 2
- In Stufe 10: D:o wie in Stufe 6
- In Stufe 11: N-Boc-G-tosylarginin
- In Stufe 12: N-Boc-valin
- In Stufe 13: D:o wie in Stufe 2
- In Stufe 14: N-Boc-asparaginsäurebenzylester
- In Stufe 15: D:o wie in Stufe 2
- In Stufe 16: N-Boc-tyrosin-3-chlorbenzyläther
- In Stufe 17: N-Boc-glutaminxanthrydrylderivat
- In Stufe 18: D:o wie in Stufe 6
- In Stufe 19: D:o wie in Stufe 2
- In Stufe 20: D:o wie in Stufe 1
- In Stufe 21: D:o wie in Stufe 14
- In Stufe 22: D:o wie in Stufe 5
- In Stufe 23: D:o wie in Stufe 2
- In Stufe 24: D:o wie in Stufe 2
- In Stufe 25: D:o wie in Stufe 6

Die schützenden Gruppen werden von dem geschützten, harzgebundenen Peptid entfernt und das Harz unter Verwendung von wasserfreiem Fluorwasserstoff bei 0°C für 30 min abgespalten und das Peptid vom Harz mit Hilfe einer 10%igen wässrigen Essigsäurelösung extrahiert. Nach Eindampfen wird der Rückstand durch Gel-filtration über Sephadex G 25 Fine in 0,1 M NH_4HCO_3 gereinigt. Nach der Lyophilisierung des Peptids wird eine befriedigende Aminosäureanalyse erreicht zusammen mit einem Molekulargewicht von

etwa 3000, wie durch Gefiltration bestimmt. Der theoretische Wert des Molekulargewichtes beträgt 2959,71.

Das wie vorstehend hergestellte Polypeptid wurde mit Bezug auf seine Fähigkeit untersucht, die Hämagglutinationsreaktion zwischen mit Tannin getränkten roten Schafsblutzellen, die mit natürlichem Krebsantigen versetzt sind, und Antikörpern zu verhindern, die unter Verwendung von natürlichem Krebsantigen (CAPA oder TPA) hergestellt wurden. Mit Bezug auf Einzelheiten dieses Verfahrens wird auf die vorstehend genannte schwedische Patentanmeldung 73-08917-9 und die amerikanische Patentschrift 3960827 hingewiesen. Die spezifische Wirksamkeit des Polypeptids wurde mit 0,024 Einheiten je Milligramm (U/mg) bestimmt. Diese Einheit für die spezifische Wirksamkeit wird definiert als 1/6 der Menge des wirksamen Polypeptids, die benötigt wird, um 10^9 Schafsblutzellen so zu markieren, dass es vollständig durch eine minimale Anzahl oder Menge von Antikörpern agglutiniert wird (maximale Verdünnung von Antikörpern).

Um zu untersuchen, welche Funktionen kritisch sind für die Wirksamkeit des Polypeptids, dessen basische Struktur vorstehend beschrieben wurde, wurden bestimmte Versuche durchgeführt. Das zentral angeordnete Arginin, das mit A_0 bezeichnet wird, wurde dabei mit Cyclohexandion bei einem pH-Wert von 13 blockiert, wobei ein Verlust der Wirksamkeit von 99,5% erfolgte. Wenn jedoch das Polypeptid lediglich in eine basische Umgebung gebracht wird, deren pH-Wert 13 während der gleichen Zeit beträgt, wird die Wirksamkeit lediglich um etwa 20% verringert. Das zeigt an, dass das Vorliegen des Arginins im Polypeptid gemäss der vorliegenden Erfindung eine entscheidende Bedeutung für die Antigenwirksamkeit hat.

Um die Wirkung des Tyrosins, das mit A_{-5} bezeichnet wird, zu bestimmen, wurde das Polypeptid bei einem pH-Wert von 9,5 mit Jod behandelt. Bei Verwendung von Jod in einem Überschuss von etwa 10 000 mit Bezug auf den Tyrosingehalt des Polypeptids gehen etwa 85% der Wirksamkeit verloren, bei 1000fachem Überschuss etwa 75%, während bei einem 100fachen Überschuss 40 bis 50% der Wirksamkeit verschwinden. Bei einem Überschuss von nur etwa der 10fachen Menge wird jedoch die Wirksamkeit des Polypeptids nicht beeinflusst.

Aus der basischen Struktur ergibt sich eindeutig, dass das Polypeptid einen sauren Charakter aufweist und in einer neutralen Lösung negativ geladen ist, während die positive Ladung vom Arginin teil gehalten wird.

Die chemische Basis für den Antigencharakter des Polypeptids lässt sich mit den vorstehenden Ausführungen erklären. Die bemerkenswerte spezifische Wirksamkeit, die bei einem synthetisch hergestellten Produkt erreicht wird und von der angenommen wird, dass sie von Hapten-Natur ist, wegen der kleinen bestimmenden Gruppe, stellt einen erheblichen Vorteil mit Bezug auf die Anwendung in der Immunologie und bei Untersuchungen dar, d.h. bei der Diagnose innerhalb des Krebsbereiches.

Eindeutig und in Übereinstimmung mit den Kenntnissen der Immunologie steht fest, dass die Antigenwirksamkeit eine Funktion nicht nur der Struktur der haptenischen bestimmenden Gruppe ist, sondern auch der Grösse des Polypeptids. Diese Grösse beeinflusst jedoch die Spezifität des Peptids nicht, sondern nur den Grad der

Wirksamkeit insofern, als ein grösseres Molekül dazu neigt, wirksamer zu sein als ein kleineres. Es wird daher eine verbesserte Wirksamkeit erreicht, wenn das Polypeptid auf einem geeigneten immunogen wirksamen Träger angeordnet ist, beispielsweise auf einem Protein wie einem Albumin, zum Beispiel Eiweiss. Es hat jedoch bereits das Polypeptid in seiner Grundstrukturform, d.h. mit mindestens 7 Aminosäureeinheiten, eine Antigenwirksamkeit, die ausreichend ist, das Polypeptid in die Lage zu versetzen, mit den entsprechenden Antikörpern zu reagieren. Darüberhinaus kann das Polypeptid zur Erzeugung von Antikörpern verwendet werden. Dazu ist es jedoch erforderlich, das Polypeptid an ein geeignetes Protein zu kuppeln, das als Träger oder sogenanntes Schlepperantigen wirkt, beispielsweise Schweineserum. Die Wirksamkeit liegt also bereits bei Polypeptidketten mit wenigstens 7 und insbesondere 9 Aminosäureeinheiten vor, scheint sich bei etwa 26 Aminosäureeinheiten auf einen Maximalwert zu verstärken und liegt noch bei einem Überschuss von 30 Aminosäureeinheiten vor, die als Anteil der Polypeptidkette keine immunologisch bestimmende Gruppe im Sinne der vorstehenden Ausführungen sind, sondern sich immunologisch inert verhalten und als Träger für die immunologisch bestimmenden Gruppen dienen.

Die Erfindung ist nicht auf die vorstehenden beispielhaften Ausführungen beschränkt. Bei der Herstellung des Polypeptids kann als Harz jedes Material verwendet werden, das Benzolringe enthält und darüberhinaus mindestens die Fähigkeit hat, N-geschützte Aminosäure durch Veresterung zu binden. Die Esterbindung muss relativ leicht hydrolysierbar und natürlich leichter aufspaltbar sein als die Peptidbindungen im Polypeptid. Die Esterbindung muss darüberhinaus ausreichend stabil sein, um den Reaktionsbedingungen bei der Synthese zu widerstehen.

Wahlweise zu dem vorstehend beschriebenen Kupplungsmittel Dicyclohexylcarbodiimid kann bei der Anlagerung von Glutamin- und Asparagineinheiten als Kupplungsmittel auch ein sogenanntes wirksamer Ester, beispielsweise Cyanmethyl-, Thiophenyl- oder Nitrophenylester verwendet werden. Als Lösungsmittel bei der Synthese können sogenannte aprotische Lösungsmittel verwendet werden, insbesondere Lösungsmittel mit etwas hydrophilem oder semipolarem Charakter.

Mit Bezug auf geeignete Gruppen zum Schutz der N-Aminosäuren sei darauf hingewiesen, dass auch t-Butyloxycarbonylgruppen, in denen eine oder beide Methylgruppen durch Phenylreste ersetzt sind, vorteilhaft verwendet werden können. In Verbindung damit sei erwähnt, dass das bei der Synthese erhaltene Produkt mit N-schützenden Gruppen versehen und durch Veresterung an ein Harz gebunden ist und vorteilhaft lange Zeit ohne Zersetzung gelagert werden kann. Wenn das Polypeptid zur Anwendung gelangt, können die schützenden Gruppen und der Harzteil entfernt werden.

Bei der erfindungsgemässen Aminosäurefolge sind die endständigen Gruppen (nach Entfernung der schützenden Gruppen und des Harzanteils) immer Aminogruppen bzw. Carbonsäurereste. Die Aminogruppe liegt am Ende der Kette vor, deren Symbole A mit Minus bezeichnet sind, während die Carbonsäurereste am entgegengesetzten Ende der Aminosäurefolge vorliegen.

In dem vorstehend beschriebenen Beispiel 1 wurde die Antigenwirksamkeit des synthetisierten Polypeptids auf folgende Weise bestimmt:

Zur quantitativen Bestimmung der Polypeptidmenge wurden 7 mg des Peptids in 1,4 ml Puffergradserum gelöst, das ist eine physiologische Salzlösung mit einem Gehalt von 2% inertem menschlichen Serum, die auf einen pH-Wert von etwa 7,5 mit einem Phosphatpuffer abgepuffert worden ist. Durch Reihenverdünnung wurde eine Reihe von Proben dieser Lösung mit verringertem Polypeptidgehalt hergestellt und zu jeder dieser Proben eine vorbestimmte Menge Antiserum mit Antikörpern gegeben, die spezifisch für TPA sind. Zu jeder der erhaltenen Proben wurde dann nach Inkubieren eine bestimmte Menge des auf einem besonderen Träger vorliegenden Poly-

peptids gegeben, wobei eine Hämagglutination in einem Ausmass erfolgte, das der Menge der verfügbaren Antikörper entsprach. Parallel dazu wurde eine entsprechende Reihe von Kontrollproben hergestellt, die bekannte abfallende Mengen von TPA enthielten. Die Durchmesser der Hämagglutinationsniederschläge der Kontrollproben wurden dann in ihren jeweiligen Vertiefungen in einer Reihe Verdünnungstestblättchen gemessen und die Werte der erhaltenen Durchmesser gegen die TPA-Konzentrationen aufgetragen, wobei eine S-förmige Kurve erhalten wurde, deren Zwischenteil einen Knickpunkt als steile Neigung aufwies. Die entsprechende Kurve des Durchmessers der Niederschläge aus der Hämagglutination als Funktion der TPA-Konzentrationen wird im Diagramm der beigefügten Zeichnung als Kurve B gezeigt.

Im gleichen Diagramm ist die entsprechende Kurve für das synthetisierte Polypeptid mit A bezeichnet. Bei Kenntnis der spezifischen Wirksamkeit des TPA lässt sich die spezifische Wirksamkeit des synthetisch hergestellten Polypeptids mit 0,024 Einheiten je mg Peptid bestimmen.

Beispiel 2:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das nachstehend beschriebene Polypeptid hergestellt. Es hatte etwa die gleiche immunologische Wirksamkeit wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Thr Asp Leu Asp Asp Arg Leu
Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val
Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asp
Gly Glu Leu Glu Val

Beispiel 3:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das nachstehend beschriebene Polypeptid hergestellt. Es war etwa gleich immunologisch wirksam wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu
Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val

Wenn die bestimmende Gruppe an ein inertes Rinderalbumin in einem Molverhältnis von etwa 1:1 unter Verwendung eines wasserlöslichen Carbodiimids (EDC) gekuppelt wird, bleibt die immunologische Wirksamkeit des Peptids erhalten.

Beispiel 4:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das nachstehend beschriebene Polypeptid hergestellt. Es wurde etwa immunologisch gleich wirksam wie das Polypeptid von Beispiel 1 gefunden.

Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val
Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val

Beim Kuppeln an ein inertes Albumin in gleicher Weise wie in Beispiel 3 blieb die Wirksamkeit erhalten.

Beispiel 5:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das nachstehend beschriebene Polypeptid hergestellt. Es hatte etwa eine gleiche immunologische Wirksamkeit wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Asn Asp Ile Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val
Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly

Beispiel 6:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das nachstehend angeführte Polypeptid hergestellt. Es hatte etwa eine gleiche immunologische Wirksamkeit wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Asp Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val
Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asp Gly

Beispiele 7-22:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurden folgende Polypeptide hergestellt und gleich immunologisch wirksam wie das Polypeptid von Beispiel 1 gefunden.

Beispiel 7	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 8	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 9	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 10	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 11	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 12	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 13	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 14	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val
Beispiel 15	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 16	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 17	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 18	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 19	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 20	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 21	Leu Asn Asp Arg Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val
Beispiel 22	Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val

Beispiel 23:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das nachstehend angeführte Polypeptid hergestellt. Es hatte etwa die gleiche immunologische Wirksamkeit wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Thr Asp Leu Asp Asp Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Asp Lys
Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asp Gly Glu Leu Glu Val
Phe Asp Glu Leu Asn Leu Gln

40 Ala Leu Leu Asn Asp Glu Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val
Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val Phe Asp
Glu Leu Asn Leu Gln

Beispiel 24:

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das folgende Polypeptid hergestellt. Es hatte etwa die gleiche immunologische Wirksamkeit wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Beispiel 25:

45 In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde das folgende Polypeptid hergestellt. Es hatte etwa die gleiche immunologische Wirksamkeit wie das Polypeptid von Beispiel 1:

Ala Leu Leu Asn Asp Ile Leu Ala Gln Tyr Leu Asp Leu Val
Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Arg Leu Glu Val

50 Verschiedene Modifizierungen und Änderungen mit Bezug auf die Produkte, das Verfahren, die Verfahrensbedingungen und Verfahrensmaßnahmen können bei dem erfindungsgemässen Verfahren im Rahmen der Kenntnisse des Fachmanns angewendet werden.

