



Ertelt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz
der DDR vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 K 7/08
A 61 K 37/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 07 K / 328 479 1
(31) 07/192,482
07/287,462

(22) 10.05.89
(32) 11.05.88
20.12.88

(44) 24.10.90
(33) US

(71) siehe (73)
(72) Audhya, Tapan; Goldstein, Gideon; Heavner, George, US
(73) Immunobiology Research Institute Inc., New Jersey, US
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Peptids und dessen Verwendung

(55) Peptid-Herstellung; Probursin; Isolierung; Säugerknochenmark; Synthese, chemisch; Technik, rekombinant; Arzneimittel; Immunstörungen; Tumoringibierung

(57) Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung eines Peptids und dessen Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen zur Behandlung von Immunstörungen und zur Tumoringibierung. Erfindungsgemäß wird das Peptid Probursin in gereinigter Form aus Säugerknochenmark oder -leber isoliert oder nach chemischen Standardsynthesen oder durch rekombinante Techniken hergestellt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Peptids, dessen Aminosäuresequenz genau oder fast genau der Formel Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Gly-Arg-Arg entspricht, **gekennzeichnet durch**
 - (a) Festphasensynthese mit dem gleichen oder fast gleichen Peptid-Harz-Zwischenprodukt der Formel R^1 -Phe-Phe- (R^2) Trp- (R^3) -Lys- (R^4) Thr- (R^5) Lys-Pro- (R^6) Arg- (R^7) Lys- (R^8) His-Gly-Gly- (R^9) -Arg- (R^{10}) Arg-Harz, worin R^1 bis R^{10} unabhängig voneinander gewählt werden aus Aminoschutzgruppen, Hydroxy-Schutzgruppen, Indol-Schutzgruppen, Imidazol-Schutzgruppen, und das Harz ein Festphasenpolymer ist, an welches Arginin durch eine kovalente Bindung fest gebunden werden kann; oder
 - (b) Peptidsynthese in Lösung, die eine schrittweise oder Blockkupplung von Aminosäuren oder Peptidbruchstücken, die in der obigen Formel enthalten sind, und die Bindung des genannten Fragments durch Amidbindungen untereinander umfaßt, wobei das genannte Verfahren zu dem Peptid der o. g. Formel führt; oder
 - (c) Züchtung einer Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen, die mit einem DNS-Molekül transformiert ist, welches eine DNS-Sequenz enthält, die die genannte Aminosäuresequenz codiert, unter Kontrolle einer geeigneten Expressions-Kontrollsequenz, die die Expression des genannten Peptids in der genannten Wirtszelle dirigieren kann; oder
 - (d) Reinigung des genannten Peptids aus Säugetierzellen, gewählt aus menschlichen Leberzellen oder menschlichen Knochenmarkzellen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das genannte Harz ein Polymer oder Copolymer aus der Gruppe Cellulose, Polyvinylalkohol, Polymethylmethacrylat, Polystyren und Polystyren-Divinylbenzen ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannten Schutzgruppen tert-Butoxycarbonyl, Benzyl, tert-Pentyloxycarbonyl, Tosyl, 2-Brom-benzyloxycarbonyl, 2,6-Dichlor-benzyl und Benzyloxycarbonyl umfassen.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die in Beispiel 4 beschriebenen Stufen umfaßt werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannten DNS-Moleküle aus bakteriellen, Hefe-, Pilz-, Insekten- und Säugetiervektoren gewählt werden können.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannten Wirtszellen mikrobielle oder Säugetierwirtszellen umfassen.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Stufe der Ablösung oder des Austausches einer oder mehrerer der Aminosäuren in der genannten Sequenz oder Einfügung oder Anfügung zusätzlicher Aminosäuren oder chemischer Gruppen zu den Aminosäuren der genannten Sequenz umfaßt wird.
8. Verwendung eines erfindungsgemäß hergestellten Peptids, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung eingesetzt wird, die geeignet ist, (a) das Immunsystem eines Patienten zu regulieren oder (b) die Freisetzung von Wachstumshormonen in ausreichendem Maße zu inhibieren, um das Wachstum eines Tumors zu inhibieren.

Hierzu 5 Seiten Zeichnungen.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung neu isolierter Peptide, die entweder in gereinigter Form aus intrahepatitischen Gallengängen der Leber von Säugern oder aus dem Knochenmark von Säugern isoliert worden sind. Insbesondere betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung eines Säugerpeptids, Probursin, das auf chemischem Wege synthetisiert oder rekombinant reproduziert werden kann, sowie die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Peptide als Therapeutika zur Behandlung von Immunkrankheiten und zur Tumoringibierung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Dies ist eine continuation-in-part-Anmeldung der anhängigen US-Patentanmeldung 07/192482, eingereicht am 11. Mai 1986. Die B-Lymphozyten oder B-Zellen des Immunsystems von Wirbeltieren zeigen eine Antikörperreaktion auf ein in den Körper des Lebewesens eingeführtes Fremdantigen. Bei Vögeln differenzieren sich die Precursor-B-Zellen in einem Organ, das als die Bursa des Fabricius bezeichnet wird. In Säugern ist bisher kein der Bursa des Fabricius entsprechendes Organ entdeckt worden, und es wird angenommen, daß die blutbildenden Precursoren der B-Zellen vorhanden sind und sich in reife B-Zellen im Knochenmark differenzieren können.

Bis vor kurzem war der hormonale Auslöser der Differenzierung von B-Zellen-Precursoren in B-Zellen unbekannt. Allerdings wurde schon in früheren Untersuchungen von einem der jetzigen Miterfinder und seinen Mitarbeitern das Vorhandensein eines speziellen Differenzierungsauslösers von B-Zellen in Extrakten der Bursa des Fabricius von Hühnern gezeigt. Über diese frühe Arbeit wurde in den folgenden Artikeln berichtet, auf die hier Bezug genommen wird: Brand et al., Science, 193: 319-321 (23. Juli 1976); Brand et al., Nature, 269: 579-589 (13. Oktober 1977); Goldstein et al. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XLI: 5-8 (1977); und Goldstein in „Molecular Control of Proliferation and Differentiation“ S. 197-202, Academic Press (1977).

In jüngerer Zeit identifizierten die jetzigen Erfinder und andere Mitarbeiter ein Tripeptidhormon, das Bursin genannt wurde, das die Aminosäuresequenz Lys-His-Gly-NH₂ als einen speziellen Auslöser der B-Zellen-Differenzierung aufweist. Dieses Peptid, auch als Bursopoietin bekannt, ist sowohl in Vögeln als auch in Säugern aktiv und in der US-PS 4584284 beschrieben, auf die hier Bezug genommen wird.

Andere endokrine Peptide wurden in der Vergangenheit entdeckt. Somatostatin inhibiert die Freisetzung einer Vielzahl von Hormonen, wie Somatotropin, Thyrotropin, Corticotropin, Insulin, Glucagon, Gastrin, Secretin und Renin. Ein anderes in dieser Weise regulierendes Peptid ist Tuftsin, ein basisches Terapeutikum, das von dem zirkulierenden Immunglobulin produziert wird und die Phagozytose in polymorphonukleären Leukozyten und in Makrophagen stimuliert (siehe z. B. V. A. Najjar et al., Nature 228: 72 [1970]; A. Constantopoulos et al., Cytobios., 6: 97 [1972]; und Y. Stabinsky et al., Mol. Cell. Biochem., 30: 71 [1980]). Die Beziehungen dieser Hormone untereinander, einschließlich des B-Zellendifferenzierungsfaktors Bursin, sind noch nicht ergründet worden. Die Entdeckung der Assoziation einer Vielzahl von Hormonen, die bei der B-Zellen-Differenzierung wirksam sind sowie Wirkungen auf andere Gewebe ausüben, eröffnet ein Potential für neue Behandlungen von Immunkrankheiten und Leberstörungen bei Menschen und Tieren.

Ziel der Erfindung

Durch die vorliegende Erfindung werden Verfahren zur Herstellung neuer Peptide bereitgestellt, die wertvolle pharmazeutische Eigenschaften aufweisen und zur Behandlung von Immunkrankheiten, Lebererkrankungen und zur Tumordinhibition geeignet sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue pharmazeutisch wirksame Peptide aufzufinden und Verfahren zu deren Herstellung bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch die Herstellung eines 14-Aminosäurepeptids gelöst, das in gereinigter Form aus Säugerknochenmark oder -leber erhalten wird. Dieses Peptid, Probursin, kann auch über chemische Standardsynthesen hergestellt werden. Alternativ dazu kann dieses Peptid durch rekombinante Techniken hergestellt werden.

Probursin ist unter anderem in der Lage, spezifisch die Differenzierung von Precursor-Knochenmarkzellen in B-Zellen auszulösen. Es ist daher im höchsten Grade nützlich bei der Behandlung von B-Zellen-Defiziten des Immunsystems von Menschen und Tieren sowie bei der Behandlung einer Vielzahl von Lebererkrankungen. Darüber hinaus dient es dazu, die Freisetzung des Wachstumshormons aus der Hypophyse zu inhibieren. Die Freisetzung von Wachstumshormon korreliert mit dem Wachstum bestimmter kanzerogener Tumore. Daher ist Probursin auch einsetzbar bei bestimmten Krebserkrankungen, speziell um die Tumordinhibition zu bewirken.

Therapeutische Zusammensetzungen, die Probursin enthalten, werden beschrieben sowie die Verwendung dieser therapeutischen Zusammensetzungen, die Probursin enthalten, zur Behandlung von Zuständen oder Krankheiten, wie unzureichende B-Zellen-Differenzierung wegen des Mangels oder des Fehlens des B-Zellen-Differenzierungsfaktors, unzureichende Steuerung solcher Hormone, die durch Somatotropin reguliert werden und/oder zur Stärkung der Fähigkeit des Immunsystems, fremde Teilchen bei der Zirkulation zu phagozytieren. Weitere Verwendungsmöglichkeiten von Probursin zur Behandlung von Krebserkrankungen wurden bereits oben angesprochen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide erfordert die Bereitstellung neuer Zwischenprodukte für die synthetische oder rekombinante Herstellung von Probursin, einschließlich neuer Peptidharz-Zwischenprodukte, neuer Vektoren und neuer transformierter Wirtszellen.

Die folgende detaillierte Beschreibung enthält die gegenwärtig bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Dabei stellen die Zeichnungen folgendes dar:

- Fig. 1: graphische Darstellung optischer Dichten von gereinigten Fraktionen von Probursin aus Rinderleber;
- Fig. 2: Darstellung eines Dünnschichtchromatografie-Gels von Probursin;
- Fig. 3A: graphische Darstellung optischer Dichten verschiedener Titer von Antibursin-Antikörpern (Punkte) und Kaninchenserum (Quadrate);
- Fig. 3B: graphische Darstellung der optischen Dichte gegen die Absorptionsmittelkonzentration von KLH-Konjugatkontrolle (Quadrate), KLH-Bursin (Dreiecke) und freiem Probursin (Kreise);

Fig. 4: graphische Abbildung der Ausbeute an PTH-Aminosäure pro Abbauzyklus;

Fig. 5 A: graphische Darstellung der intrazellulären zyklischen GMP-Spiegel in Daudizellen nach Inkubation mit Probursin, Bursin, Schweine-Insulin (A), Pferde-Myoglobin (B) und Rinderwachstumshormon (C); und

Fig. 5 B: graphische Darstellung von intrazellulären zyklischen GMP-Spiegeln in MOPC-315-Zellen nach Inkubation mit Probursin, Bursin und A, B und C wie oben als Kontrolle.

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines neu isolierten Säugerpolypeptids, das Probursin genannt wurde, gekennzeichnet durch die gleiche oder im wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz:

(1) (5) (10) (14)
Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Gly-Arg-Arg

Die ersten fünf Aminosäurereste in den vierzehn Aminosäuren der Probursinsequenz korrespondieren mit der aktiven Stelle des Hormons Somatostatin. Die Aminosäurereste 5 bis 8 des Probursins korrespondieren mit der aktiven Stelle des Humanpeptids Tuftsin. Zusätzlich korrespondieren die Aminosäurereste 9 bis 11 des Probursins mit dem oben beschriebenen Peptid Bursin. Diese in der Probursinsequenz vorhandenen überlappenden Somatostatin-, Tuftsin- und Bursinsequenzen sind mit den Humansequenzen der aktiven Stellen der Peptide Somatostatin, Tuftsin und Bursin identisch. Somit ist vermutlich, obgleich das Probursin-Polypeptid ursprünglich aus der fötalen Rinderleber isoliert worden ist, dessen Sequenz im wesentlichen identisch mit der anderer Säuger, insbesondere der von Menschen.

In ihren breitesten Aspekten betrifft diese Erfindung die Herstellung menschlichen Probursins oder ein Analoges davon in irgendeiner Form im wesentlichen frei von nativem Proteinmaterial, d. h. entweder aus Säugerleber oder Knochenmark isoliert oder synthetisiert oder rekombinant produziert. Varianten von Probursin, einschließlich natürlich vorkommender allelischer Änderungen in der Sequenz von Säugerspezies zu Spezies und zwischen den einzelnen Gliedern einer einzelnen Spezies, sowie vorsichtig eingeführter Veränderungen in der Sequenz, zum Beispiel durch mutagene oder chemische Maßnahmen, oder Veränderungen auf Grund des Einsatzes verschiedener rekombinanter Wirte, z. B. Glycosylierungsänderungen, oder durch den Angriff anderweitiger Fremdmoleküle, z. B. radioaktiver Markierungen und ähnliches werden generell in dieser Beschreibung als Probursinanaloga bezeichnet. Die Herstellung derartiger Analoga wird durch die vorliegende Erfindung mitefaßt.

Das Säugerprobursin ist vorzugsweise Human-Probursin. Probursin wurde ursprünglich aus fötaler Rinderleber isoliert unter Einsatz eines gegen Bursin gerichteten Antikörpers, um die Reinigung zu beobachten. Der Verfahrensablauf für die Reinigung von Probursin ist im Beispiel 1 beschrieben. Säugerprobursin wurde vorzugsweise aus der Leber isoliert; allerdings kann es auch aus dem Knochenmark mittels bekannter Methoden isoliert werden, die analog der Isolierung aus Rinderleber sind, wie im Beispiel 1 beschrieben. Während die Polypeptidsequenz von Probursin durch die gleiche oder im wesentlichen gleiche Sequenz wie oben genannt charakterisiert wird, ist es möglich, daß die allelischen Varianten der Sequenz ebenso wie die Varianten der Sequenz, die zusätzliche Aminosäuren enthält oder natives Material, durch Isolierung aus Säugermaterial erhalten werden kann. Darüber hinaus kann die Probursinsequenz mit 14 Aminosäuren chemisch synthetisiert werden, wobei ein neues synthetisches Peptid entsteht. Eine gegenwärtig bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein synthetisches Peptid der Formel

Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Gly-Arg-Arg

und dessen pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze.

Um ein Säureadditionssalz des Polypeptids Probursin herzustellen, kann das freie Polypeptid mit einer entsprechenden Säuremenge behandelt werden. Säuren sind in der Lage, Salze mit dem Peptid der Erfindung zu bilden, einschließlich – aber nicht darauf beschränkt – anorganische Säuren wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Perchlorsäure, Salpetersäure, Thiocyanensäure, Schwefelsäure, Kohlensäure, Phosphorsäure und ähnliche. Andere für diesen Zweck nützliche Säuren sind organische Säuren, wie Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure, Malonsäure, Succinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Anthranilsäure, Zimtsäure, Naphthalinsulfonsäure, Sulfonylsäure und ähnliche.

Die synthetische Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide kann mittels Festphasensynthese erfolgen, beschrieben durch Merrifield in J.A.C.S. 85: 2149–2154 (1963). Dieses Verfahren ist geläufig und stellt eine übliche Methode zur Herstellung von Peptiden dar. Alternative Methoden zur Herstellung von Peptiden sind in „Peptidsynthesen“ von Bodansky et al., 2. Auflage, John Wiley and Sons, 1976, beschrieben. Zur Methode der Festphasensynthese von Peptiden gehört die stufenweise Zugabe der geschützten Aminosäuren zu einer wachsenden Peptidkette, die mittels kovalenter Bindungen an ein Festharzteilchen gebunden ist. Bei diesem Verfahren werden Reaktionsmittel und Nebenprodukte durch Filtration entfernt, wodurch das Erfordernis der Reinigung der Zwischenprodukte entfällt. Das Generalkonzept dieser Methode hängt von dem Angriff der ersten Aminosäure der Kette auf ein festes Polymeres durch eine kovalente Bindung ab. Nachfolgend werden geschützte Aminosäuren hinzugefügt – eine in einem Zeitabschnitt oder in Blöcken – und zwar in einem Stufenverfahren, bis die gewünschte Sequenz vervollständigt ist. Schließlich wird das geschützte Peptid vom Festharzträger abgetrennt, und die Schutzgruppen werden abgespalten. Die Erfindung betrifft auch neue Peptidharz-Zwischenprodukte zur Herstellung des erfindungsgemäßen Peptids. Die Zwischenprodukte weisen Formeln auf, die gleich oder analog der folgenden Formel sind:

R^1 -Phe-Phe-(R^2)Trp-(R^3)Lys-(R^4)Thr-(R^5)Lys-Pro-(R^6)Arg-(R^7)Lys-(R^8)His-Gly-Gly-(R^9)Arg-(R^{10})Arg-Harz,

worin R^1 bis R^{10} geeignete Schutzgruppen darstellen an den entsprechenden Orten der genannten Aminosäuren. Das Harz ist ein geeignetes Festphasenpolymeres, das als Träger für die Reaktion dient. Der Fachmann auf dem Gebiet der Peptidsynthese ist in der Lage, die entsprechenden Aminoschutzgruppen, Hydroxyschutzgruppen, Indolschutzgruppen, Imidazolschutzgruppen und

Harze auszuwählen, die beispielsweise in den oben genannten Literaturstellen ausgewiesen sind. Der Fachmann wird auch in der Lage sein, ähnliche Peptidharz-Zwischenprodukte für die Konstruktion der erfindungsgemäßen modifizierten Peptide zu gestalten.

Die Aminosäuren können an ein beliebiges Polymeres angebunden sein. Das Harz muß eine funktionelle Gruppe aufweisen, an die die erste geschützte Aminosäure über eine kovalente Bindung angefügt werden kann. Für diesen Zweck sind zahlreiche Polymere oder Copolymere geeignet, beispielsweise Zellulose, Polyvinylalkohol, Polymethylmethacrylat, Polystyren und Polystyrendivinylbenzen. Entsprechend geeignete Schutzgruppen, die bei derartigen Synthesen und ihren Verkürzungen einsetzbar sind, sind aus dem obigen Text zu entnehmen oder auch aus J. F. W. McOmie „Schutzgruppen in der organischen Chemie“, Plenum Press, New York, 1973. Auf beide Werke wird hier Bezug genommen. Die hier benutzten üblichen Schutzgruppen sind t-Butyloxycarbonyl (BOC), Benzyl (BZL), t-Amyloxycarbonyl (AOC), Tosyl (TOS), o-Bromphenylmethoxycarbonyl (BrZ), 2,6-Dichlorbenzyl (Cl₂BZL) und Phenylmethoxycarbonyl (Z oder CBZ).

Die generelle Verfahrensweise bei der Herstellung dieses Peptids besteht darin, zuerst das Arginin (das an seinen alpha-Amino- und Guanidin-Gruppen geschützt ist) an das Harz anzubinden. Nach dem Anbinden wird das Harz filtriert, gewaschen und die Schutzgruppe an der alpha-Aminogruppe des Arginins entfernt. Es ist wünschenswert, daß diese Schutzgruppe t-Butyloxycarbonyl ist. Die Entfernung dieser Schutzgruppe muß natürlich so erfolgen, daß dabei die Bindung zwischen Arginin und dem Harz nicht aufgebrochen wird. An das erhaltene Harzpeptid wird dann das an seinen alpha-Amino- und Guanidiningruppen geschützte Arginin angekoppelt. Diese Kopplung erfolgt durch die Bildung einer Amidbindung zwischen der freien Carboxygruppe des zweiten Arginins und der Aminogruppe des ersten, an das Harz gebundenen Arginins. Diese Abfolge von Vorgängen wird mit den entsprechenden Aminosäuren wiederholt, bis alle Aminosäuren an das Harz angefügt worden sind. Schließlich wird das geschützte Peptid vom Harz abgetrennt, und die Schutzgruppen werden abgespalten, wobei man das gewünschte Peptid erhält. Die Technik des Abspaltens, die zur Abtrennung des Peptids vom Harz und zur Entfernung der Schutzgruppen angewandt wird, hängt von der Auswahl des Harzes und der Schutzgruppen ab und ist dem Fachmann auf dem Gebiet der Peptidsynthese geläufig.

Das Peptid kann auch unter Verwendung von Standardverfahren der Lösungspeptidsynthese hergestellt werden, wobei entweder eine stufenweise oder eine Blockkopplung der Aminosäuren oder Peptidfragmente unter Einsatz chemischer oder enzymatischer Methoden der Amidbindungsbildung erfolgt. Diese Lösungssyntheseverfahren sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Das Polypeptid kann auch über die konventionelle Rekombinationstechnologie hergestellt werden. Übliche Techniken zur rekombinanten Herstellung von Polypeptiden sind bei Maniatis et al. in „Molekulares Klonieren – ein Laboratoriumshandbuch“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982) und in anderen Literaturstellen, die den Fachleuten bekannt sind, beschrieben worden. Somit stellen alle DNA-Sequenzen, die Probursin verschlüsseln, einen Teil dieser Erfindung dar. Diese DNA-Sequenzen können sich dadurch unterscheiden, daß sie alternative Codons enthalten, die dieselbe Aminosäure oder modifizierte oder markierte Basen verschlüsseln, oder die Sequenzen können einen Teil eines DNA-Moleküls bilden, das geeignete Expressionssteuerungssequenzen in operativer Assoziation mit den DNA-Sequenzen enthält und in der Lage ist, die Exprimierung dieser nach der Transformation in Wirtszellen zu dirigieren. Diese DNA-Moleküle oder Vektoren können bekannte Vektoren von bakteriellen Hefen, Pilzen, Insekten oder mit Herkunft von Säugern darstellen. Die Vereinigung einer Probursin-DNA-Sequenz in Verbindung mit bekannten Vektorkomponenten ist für den Fachmann kein Problem. Ebenso sind die Selektion und Transformation mikrobieller oder Säuger-Wirtszellen mit den Probursin enthaltenden Vektoren der Erfindung übliche Techniken, die von den Fachleuten auf diesem Gebiet ohne zusätzliche Versuche verwirklicht werden können.

Sowohl chemisch-synthetische als auch rekombinante Techniken zur Herstellung von Probursin können auch dazu eingesetzt werden, die aus 14 Aminosäuren bestehende Sequenz des Probursins, wie oben aufgeführt, zu modifizieren. Zu solchen Modifikationen kann das Entfernen oder Ersetzen einer oder mehrerer der 14 Aminosäuren an der obigen Sequenz gehören oder das Insertieren oder Hinzufügen weiterer Aminosäuren oder chemischer Gruppen zu der obigen Sequenz, um die biologischen oder pharmakologischen Wirkungen der erhaltenen Peptide zu verstärken oder in eine bestimmte Richtung zu lenken.

Beispielsweise kann eine Vielzahl chemischer Gruppen an eine oder mehrere der Aminosäuren des Peptids angefügt werden, um eine Anzahl wünschenswerter Eigenschaften zu erzielen, z. B. Widerstand gegen enzymatischen Abbau, verbesserte Halbwertszeit und ähnliche. Derartige modifizierte Formen von Probursin werden von der vorliegenden Erfindung mit erfaßt. Da Probursin die überlappenden aktiven Stellen von drei bekannten Regulierungspeptiden kombiniert, ist zu vermuten, daß Probursin die gleichen oder analogen biologischen Aktivitäten wie Somatostatin, Tuftsin und Bursin hat. Probursin ist daher therapeutisch bei der Behandlung von Mensch und Tier nützlich, da es die Fähigkeit besitzt, die Differenzierung und Reifung von B-Zellen, die in die Immunreaktion des Körpers miteinbezogen sind, zu induzieren. Als Ergebnis dieser Charakteristika weist das Polypeptid mehrfache therapeutische Verwendungsmöglichkeiten auf. Dieses Polypeptid ist nicht nur in der Forschung sondern auch bei der Behandlung von Menschen und Tieren bei Krankheiten einzusetzen, die mit einem Mangel oder dem Nichtvorhandensein reifer B-Zellen einhergehen.

Von Probursin, dessen Fragmenten und dessen Analoga ist zu erwarten, daß es die Fähigkeit besitzt, bestimmte der genannten Leberfunktionen (z. B. Stimulieren der phagozytischen Aktivität von Kupferzellen und Inhibieren der pathologischen Proliferation von Hepatocyten) zu demonstrieren. Somit können Probursin, dessen Fragmente und Analoga Anwendung bei der Behandlung verschiedener Leberstörungen, wie z. B. Zirrhose, eingesetzt werden.

Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen Peptide als nützlich anzusehen, das gesamte Immunverhalten des Körpers zu stützen, indem sie zur Verbesserung der therapeutischen Stimulierung der humoralen Immunität verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Probursin-Polypeptide, Analoge und diese enthaltenden therapeutischen Zusammensetzungen sind generell überall dort als nützlich anzusehen, wo die humorale Immunität in Frage steht und insbesondere dort, wo es Immunitätsmängel gibt. Daher können bei einer unzureichenden Antikörperproduktion wegen Mangels an B-Zellen die erfindungsgemäßen Peptide durch Stimulierung der Zellproduktion diese Bedingungen verändern. Probursin kann daher bei der Behandlung von Patienten mit bekannten Immundefizienzen eingesetzt werden, z. B. bei Patienten, die auf Vakzine nicht ausreichend reagieren, wie Hämodialysepatienten, die keine Antikörper auf Hepatitisvakzine bilden und bei älteren Patienten, die nicht auf pneumokokkale Vakzine reagieren.

Beispielsweise ist ein typischer Zustand, bei dem sich eine Behandlung mit Probursin empfiehlt, die X-gebundene infantile Hypogammaglobulinämie. Diese Mangelerkrankung tritt fast ausschließlich bei Knaben auf und vermutlich aus dem Grunde, daß Kinder in dieser Entwicklungsstufe in ihrem Rückenmark und peripheren Blut Precursor-B-Zellen haben, die nicht zu Antikörper ausscheidenden B-Zellen ausreifen. Patienten in dieser Lage leiden daher an chronischen oder wiederkehrenden bakteriellen Infektionen.

Eine Behandlung mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist auch möglich bei anderen Immunmangelerkrankungen, die mit einer völligen Abwesenheit oder einer verringerten Immunglobulinproduktion einhergehen, in Abhängigkeit vom Ort des immunologischen Defektes, der dieses Problem bewirkt. Wenn der Defekt in der Reifung der Pre-B-Zellen zu reifen Antikörpern ausscheidenden B-Zellen liegt, kann das Peptid des Erfindungsgegenstandes eingesetzt werden. Von einem Fachmann auf dem Gebiet der Behandlung von Immundefekten ist zu erwarten, daß er den Defektpunkt für Krankheitserscheinungen diagnostizieren kann, bei dem die Behandlung mit Probursin zu verantworten ist. Siehe z.B. „Grundlegende und klinische Immunologie“ (Basic and clinical Immunology), Stites, Stobo, Fudenberg und Wells (Hrsg.) 4. Auflage, 1982, Lange Medical Publications, Los Altos, Kalifornien (Kapitel 25).

Es wurde weiterhin gefunden, daß Probursin die Freisetzung von Wachstumshormon inhibiert (siehe Beispiel 6). Die Inhibierung von Wachstumshormon wird als korrelierend mit der Inhibierung bestimmten kanzerogenen Tumorwachstums angesehen (siehe z.B. R. S. Hill et al., Diabetes, 34: 115 [1985] und M. J. Berridge et al., Biochem. J., 212: 473 [1983]). Somit haben Probursin und/oder dessen Analoga oder modifizierten Versionen therapeutische Verwendungsmöglichkeit bei der Behandlung bestimmter Krebserkrankungen, wo Tumorwachstum durch Regulierung des Wachstumshormons beeinflusst werden kann. Probursin und dessen Analoga können auch als diagnostische Mittel verwendet werden, z.B. wenn sie mit einem radioaktiven oder anderweitig bestimmbar Markierungsmittel gekoppelt werden.

Alternativ dazu können Probursin und dessen Analoga an antigenen Substanzen eingesetzt werden, um polyklonale oder monoklonale Antikörper nach Standardverfahren wie dem Kohler-Milstein-Hybridisierungsverfahren zu entwickeln.

Die vorliegende Erfindung beschreibt daher Verfahren zur Regulierung des Immunsystems eines Objektes, das eine solche Regulierung benötigt, durch Verabreichung einer wirksamen Menge an einer der erfindungsgemäßen Verbindungen an das Objekt.

Die Erfindung beschreibt auch ein Verfahren zur Behandlung von Zuständen, die aus relativen oder absoluten Defekten der Leberfunktionen eines Objektes herrühren, und umfaßt die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge Probursin oder eines seiner Analoga an das Objekt.

Die Erfindung beschreibt auch ein Verfahren zum Hervorrufen der Differenzierung und Reifung von B-Zellen, bestehend im Verabreichen einer therapeutisch wirksamen induzierenden Menge Probursin oder dessen Analoga an das Objekt.

Die Erfindung beschreibt auch ein Verfahren zur Behandlung von Krebs durch Inhibieren des Tumorwachstums durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen, Wachstumshormon inhibierenden Menge Probursin oder dessen Analoga an einen Patienten.

Der hier benutzte Begriff „therapeutisch wirksame Menge“ bedeutet eine Menge, die bei der Behandlung der entsprechenden Zustände oder Mangelerkrankungen des Immunsystems oder der Leber wirksam ist, wie oben beschrieben.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen für die oben genannten Behandlungsmethoden. Zum Einsatz als pharmazeutische Zusammensetzung kann das erfindungsgemäße Peptid im Bereich von etwa 1 Mikrogramm pro kg bis etwa 10 Milligramm pro kg wirksam sein. Für einen Fachmann auf dem Gebiet der Behandlung von Immundefekten ist es leicht, aus den hier genannten Ergebnissen zu extrapolieren und die entsprechende Dosierung der erfindungsgemäßen Peptide ohne unnötige Versuche für die entsprechende klinische Anwendung auszuwählen. Beispielsweise wird der behandelnde Arzt die Dosierung auf Basis traditioneller klinischer Parameter wie Alter, Körpermasse, Geschlecht und Allgemeinzustand des Patienten festlegen.

Dieses Peptid ist nicht auf eine bestimmte Verabreichungsart beschränkt. Die gegenwärtig bevorzugte Methode ist allerdings die parenterale Verabreichung wegen möglichen Abbaus des Sequenzpotentials durch gastrische Enzyme. Während die am meisten wünschenswerte parenterale Verabreichungsart die subkutane ist, kann das Peptid aber auch perkutan, intramuskulär, intranasal, intraperitoneal, intravenös, bukkal oder über Zäpfchen verabreicht werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen kann das Probursin als aktiver Bestandteil im innigen Gemisch mit pharmazeutischen Trägerstoffen und/oder Exzipienten nach üblichen pharmazeutischen Verarbeitungstechniken kombiniert werden. Der Trägerstoff kann eine Vielzahl von Formen aufweisen, abhängig von der für die Verabreichung gewünschten Präparationsform, einschließlich Mittel in Suspensionen, Elixieren und Lösungen. Für parenterale Produkte ist der Träger üblicherweise steriles Wasser oder Salzlösung. Andere Inhaltsstoffe können noch eingebracht werden, um dem pharmazeutischen Produkt zusätzliche erwünschte Merkmale zu verleihen, z.B. zur Verbesserung der Löslichkeit oder als Präserve. Injizierbare Suspensionen können ebenfalls hergestellt werden mit entsprechenden flüssigen Trägerstoffen, Suspendierungsmitteln und ähnlichem. Für den Fachmann auf dem Gebiet der parenteralen Formulierung ist es einfach, die Herstellung einer solchen Zusammensetzung zu bestimmen.

Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele erläutern die Isolierung von Rinderprobursin aus fötaler Leber, ein Verfahren zur Herstellung von synthetischem Probursin und Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Wirksamkeiten der Peptide. Die Erfindung ist nicht auf diese Beispiele beschränkt.

Beispiel 1**Rohextraktion von Bursin und Probursin**

500 g fötale Rinderleber wurden mit 25%igem (Masse/Vol.) Ammoniumbicarbonatpuffer (50 mM, pH 8,0), der 1 mM Polymethylsulfonsäure (PMSF), 1 mM Ethylendiamintriessigsäure (EDTA) und 1 mM beta-Mercaptoethanol enthält, extrahiert. Die Gewebe wurden bei 4°C drei Minuten in einem Mischer homogenisiert und bei 4°C 45 Minuten bei 9000 U/min zentrifugiert. Das Überstehende wurde durch eine Gaze filtriert. Die gereinigten Filtrate wurden bei 60°C gelagert. Ein 25-ml-Aliquot wurde lyophilisiert und in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) suspendiert.

Die Lösung wurde zentrifugiert, und 2,5-ml-Aliquote wurden einer PD-10/Pharmacia/-Säulenchromatografie unterzogen. Die zurückgehaltenen Fraktionen mit niedriger Molekularmasse wurden lyophilisiert und in 1 ml Ammoniumbicarbonatpuffer (50 mM, pH 8,0) gelöst für den im Beispiel 2 beschriebenen Enzym-gekoppelten Immunbindungstest (ELISA).

Probursin wurde weiter von fötaler Rinderleber durch (A) Gelfiltration über eine Sephadex G-75-Molekularsiebsäule (Pharmacia), gefolgt von (B) einer Ionenaustausch-CM-Sephadexsäule (Pharmacia) gereinigt. Bursin, das zur Immunreaktivität der Fraktion beitrug, wurde während der Durchführung der nächsten Reinigungsstufe (C), der Dünnschichtchromatografie, entfernt. Die erhaltene Fraktion wurde nochmals (D) über Sephadex G-75 filtriert, und das verbliebene Filtrat wurde (E) einer Anionenaustausch-Protein-Flüssig-Schnellchromatografie über eine Mono-Q-Säule (Pharmacia) unterzogen. Als letzte Reinigungsstufe folgte (F) die Umkehrphasen-FPLC. Ausbeuten und Ablauf sind in Tabelle 1 weiter unten erläutert.

Tabelle 1**Reinigung von Probursin aus fötaler Rinderleber**

Reinigungsstufe	Gesamt Probursin (mg)	Gesamt Protein (mg)	Probursin (%)	Reinigung (-fach)	Rückgewinnung (%)
Fötale Leber (Feuchtmasse 500 g)	—	73 400	—	—	—
A Gelfiltration, Sephadex G-75	92,6	7 400	1,25	1	100
B Ionenaustausch, CM Sephadex	28,7	950	3	2	31
C Dünnschichtchromatografie*	6,4	91,2	7	5	7
D Gelfiltration, Sephadex G-25	2,6	27,4	10	8	2,8
E Anionenaustausch FPLC, Mono-Q	2,1	5,3	40	32	2,3
F Umkehrphasen FPLC	1,4	1,5	93	74	1,5

* Bursin, das zur Immunreaktivität beitrug, wurde in dieser Stufe entfernt.

Es wurden optische Dichten bei 254 nm der stufenweise gereinigten Fraktionen erzielt. Graphische Darstellungen der Fraktionen A, B, E und F sind in Fig. 1 aufgeführt. Fig. 2 erläutert ein Gel, das aus der Dünnschichtchromatografie von Stufe C erhalten wurde.

Beispiel 2**ELISA****A. Kaninchen-Antiserum**

Für die Kaninchenimmunisierung wurde Probursin an das sog. keyhole-impet-Hämocyanin (KLH) über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) nach dem Verfahren von Tamura et al. Cell, 34: 587 (1983) angekoppelt. Dabei wurden 5 mg Bursin in 400 Mikroliter Wasser gelöst, mit Salzsäure auf pH 3,0 gebracht und dann auf einem Eisbad abgekühlt. Zehn Milligramm EDCI in einem 20-µl-Volumen wurden hinzugegeben und das erhaltene Gemisch 15 Minuten in einem Eisbad inkubiert. Zu dem Gemisch wurden 15 mg KLH in 0,5 ml angesäuertem (pH 3,0) Wasser gegeben. 0,5 ml gesättigte Ammoniumcarbonatlösung wurden zu der Lösung gegeben und eine geringe Menge an trockenem Ammoniumcarbonat hinzugesetzt, um die Lösung gesättigt zu halten. Das Gemisch wurde drei Stunden unter Rühren in einem Eisbad inkubiert und anschließend gegen zwei Liter Wasser dialysiert bei jeweils mit drei Wechslen über einen Zeitraum von 40–48 Stunden und anschließend PBS über Nacht. Das Konjugat wurde mit PBS verdünnt auf 1 mg/ml Bursin.

Zweihundert Mikrogramm KLH-Bursin in einem 200-µl-Volumen wurden mit 400 µl kompletten Freundschens Adjuvanz vermischt. Fünfhundert Mikroliter dieser Suspension wurden dazu eingesetzt, jedes der fünf Kaninchen subkutan an mehreren Stellen zu immunisieren. In 4–6-Wochen-Intervallen wurden die Kaninchen mit einer gleichen Suspension, die unvollständiges Freundsches Adjuvanz enthält, aufgefrischt.

B. ELISA-Protokoll

Es wurden Antiseren auf ihre Aktivität in dem folgenden ELISA-Protokoll getestet. Die Assays wurden nach der Methode von Voller et al., Bull. WHO, 53: 55 (1976) durchgeführt. Polyvinylchlorid-Mikrotiterplatten (Fisher Scientific, Springfield, NJ) wurden über Nacht mit 100 µl/Vertiefung einer Lösung von 10 µg/ml Tetrameres von Probursin in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2, überzogen. Die Platten wurden gewaschen und nachfolgend überzogen mit 150 µl/Vertiefung 0,5%igem Rinderserumalbumin in PBS, pH 7,2, über eine Stunde bei Zimmertemperatur. Die Platten wurden gewaschen, getrocknet bei 37°C 6–24 Stunden und dann in vorher sorgfältig getrocknetem Verpackungsmaterial dicht verschlossen und bei 4°C gelagert.

Die zu testenden Antiseren wurden in PBS verdünnt, das 0,05% Tween 20 enthält. Einhundert Mikroliter der verdünnten Seren wurden pro Vertiefung hinzugegeben (dreifach). Normales Kaninchen- oder Mäuseserum wurde als negative Kontrolle verwendet. Nach 60 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Platten dreimal mit PBS Tween 20 gewaschen. Einhundert Mikroliter alkalische Phosphatase, angekoppelt an Affinitäts-gereinigtes Ziegen-Anti-Kaninchen IgG (schwere und leichte Ketten), verdünnt 1:2000 in PBS Tween 20, wurden zu jeder Vertiefung gegeben. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur

60 Minuten inkubiert. Dann wurden die Platten gewaschen und zu jeder Vertiefung 100 µl 1 mg/ml para-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer gegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die Reaktion mit der Zugabe von 50 µl/Vertiefung an 5 N NaOH beendet und die optische Dichte bei 410 nm bestimmt.

C. Ergebnisse

Zwei von fünf Kaninchen entwickelten nach fünf Monaten Antikörper gegen Probursin, deren Titer annähernd bei 1:800 lagen (Fig. 3A). Die Anti-Bursin-Antiserumkopplung wurde durch KLH-Bursin blockiert und auch durch freies Probursin, nicht jedoch durch KLH-Kontrollkonjugat (Fig. 3B).

Beispiel 3

Automatisches N-Terminale-Proteinsequenzieren

Es wurden automatische Sequenzanalysen an intaktem Probursin sowie tryptischen und cyanogenen Bromidfragmenten von Probursin durchgeführt durch Gasphasensequenzieren unter Verwendung eines Gasphasensequenzers Modell 470 A von Applied Biosystems mit Polybren als Träger und einem Einzelkopplung-Einzelspaltung-Standardprogramm. Die erhaltenen Phenylthiohydantoin-derivatisierten Aminosäuren wurden über HPLC mit einem Hewlett Packard Hochdruck-Flüssigchromatographen Modell 1084 B identifiziert. Fig. 4 erläutert die Ausbeuten.

Beispiel 4

Herstellung eines erfindungsgemäßen synthetischen Peptids

Das Peptid wurde nach der Festphasenmethode auf einem ABI 430 Peptidsynthetisator nach Standardvorschriften für BOC-Aminosäurederivate synthetisiert. Die Synthese wurde mit 0,050 mmol BOC-(Tos)Arg-PAM-Harz begonnen. Das vollständige Peptidharz wog 1,87 g. Das Harz wurde mit 20 ml HF und 2 g p-Kresol bei 0°C eine Stunde behandelt. Die HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und zu dem Rückstand Ethylacetat gegeben. Das Gemisch wurde filtriert und mit Ethylacetat gewaschen. Dann wurde Trifluoressigsäure zu den Feststoffen gegeben und das Gemisch filtriert. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Ether versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Ether gewaschen, wobei man 1,04 g eines weißen Feststoffes erhielt. Eine 400-mg-Portion dieses Produktes wurde zu 50 ml 1 M Ammoniumbicarbonat von pH 9,0 gegeben, um den Formylrest von Trp abzutrennen. Die Lösung wurde durch Stickstoffspülung sauerstofffrei gemacht und 16 Stunden in einem verschlossenen Kolben stehengelassen. Dann wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und lyophilisiert. Das Peptid wurde durch präparative HPLC auf einer Partisil-ODS-M-20-Säule gereinigt unter Eluierung mit 20 % Acetonitril/0,1 % TFA. Das Peptid wurde durch Zusatz von verdünntem TFA auf etwa pH 3 verdünnt und in 5 Portionen injiziert. Die Mittelfractionen des Hauptpeaks wurden kombiniert, das organische Lösungsmittel durch Rotationsverdampfung entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Produkt wurde in das Acetatsalz durch Passage durch eine Säule mit Amberlit IR-68-Anionenaustauscherharz umgewandelt. Das lyophilisierte Produkt mit der folgenden Sequenz wog 112 g:

Phenylalanyl-Phenylalanyl-Tryptophyl-Lysyl-Threonyl-Lysyl-Prolyl-Arginyl-Lysyl-Histidyl-Glycyl-Glycyl-Arginyl-Arginin.

TLC (Silicagel 60):

R _f 0,10	n-BuOH:HOAc:H ₂ O:pyr	4:2:3:1
R _f 0,04	EtOAc:pyr:HOAc:H ₂ O	5:5:1:3

Aminosäureanalyse:

Thr - 0,88; Pro - 1,04; Gly - 2,01; Phe - 2,00; His - 1,02; Lys - 2,91; Trp - 0,81; Arg - 3,14; 73 % Peptid.

Beispiel 5

Biologische Aktivität - Cyclische GMP-Assay

Daudi-Zellen wurden frisch angesetzt und 2 Tage wachsen gelassen und dann gemäß T. Audhya et al., Arch. Biochem. Biophys., 234: 167-177 (1984) geerntet. Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen und in RPMI 1640 zu einer Konzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert. Man ließ sie 30 Minuten bei 37°C ins Gleichgewicht kommen und gab dann die Testverbindungen (25 µl) Bursin und Probursin und die Kontrollpeptide Schweineinsulin (A), Pferde-Myoglobin (B) und Rinderwachstumshormon (C) hinzu. Die Inkubation erfolgte in einem geschüttelten Wasserbad über 4 bis 5 Minuten und wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem TCA (10%) beendet.

Die Zellen im TCA wurden homogenisiert und beschallt, um cyclisches Nucleotid freizusetzen. Die Suspension wurde mit $3000 \times g$ 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde in 0,1 N NaOH gelöst, um den Proteingehalt zu bestimmen. TCA wurde aus der Fraktion des Überstehenden durch viermaliges Extrahieren mit 5 ml wassergesättigtem Diethylether entfernt. Nach der letzten Extraktion wurden die restlichen Etherspuren durch Erhitzen über 10 Minuten in einem 50°C Wasserbad entfernt. Nach dem Lyophilisieren wurde die Probe in 50 mM Acetatpuffer (pH 6,2) für die Radioimmunoassay von cyclischem GMP zur ursprünglichen Konzentration gelöst.

Dosisabhängige Kurven von 0 bis 1000 Mikrogramm/ml wurden für Bursin, Probursin und die Kontrolldurchläufe aufgestellt. Fig. 5 zeigt typische dosisabhängige Kurven für aktives Bursin und Probursin sowie für inaktive Verbindungen in Daudi-Zellen (Fig. 5A) und in MOPC-315 Zellen (Fig. 5B). Eine Schwellenaktivität wurde für jedes getestete Peptid bestimmt. Diese ist definiert als niedrigste Konzentration des Testpeptids (1 µg/ml), die einen intrazellulären Spiegel an cyclischem GMP größer als zwei Standardabweichungen über der Kontrolle induziert. Die Kontrollen wiesen intrazelluläre cyclische GMP-Werte von weniger als 0,1 Picomol/ml (mittlere $\pm$ Standardabweichung) auf. Die Testergebnisse wurden als positiv angesehen, wenn der Spiegel an cyclischem GMP größer als das 1,52fache (2 Standardabweichungen) war, der für die parallele negative Kontrolle bestimmt worden war.

Beispiel 6

Biologische Aktivität – Wachstumshormoninhibierung

Es wurde eine Assay durchgeführt, um die Wirkung von Probursin in Kombination mit Wachstumshormon-freisetzenden Faktor (GRF) zu untersuchen, da diese Kombination die Freisetzung von ^3H -Inositolphosphat (IP) und Wachstumshormon(GH)-Akkumulation in SV40-transformierten Hamster-beta-Zellen (HIT) bewirkt. Das Experiment wurde nach der von M.J. Berridge et al., der bereits oben zitiert worden war, beschriebenen Verfahrensweise durchgeführt.

Es wurden kommerziell erhältliche HIT-Zellen bei 37°C für 1 Stunde in metabolischem RPMI-Medium mit 5%igem fötalen Kälberserum (FCS) inkubiert. Dann wurde GRF in unterschiedlichen Konzentrationen, die in der unten folgenden Tabelle aufgeführt sind, zu der Zellkultur hinzugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 800 U/min zentrifugiert und das Überstehende gesammelt. Die GH- und IP-Spiegel im Überstehenden wurden durch Radioimmunoassay (RIA) ebenfalls gemäß Berridge et al. gemessen. Diese Messungen bildeten die GRF-Kontrolle.

Dieselbe Prozedur wurde ohne den GRF-Zusatz durchgeführt und wurde unten als Kontrolle angeführt.

Um die Wirkung von Probursin auf GRF auszuweisen, wurde ähnlich wie oben verfahren, mit der Ausnahme, daß GRF und Probursin mit den entsprechenden in der folgenden Tabelle angegebenen Konzentrationen zu den Zellen zusammen zugegeben wurden, gefolgt von einer 15minütigen Inkubation und einer Zentrifugierung. Während das Überstehende durch RIA, wie oben beschrieben, gemessen wurde, wurden die erhaltenen Konzentrationen von IP und GH, wie in der Tabelle unten erläutert, bestimmt.

Die in der Tabelle unten aufgeführten Daten zeigen, daß Probursin erkennbar die Unterdrückung der Wirkung des Wachstumshormon freisetzenden Faktors anzeigt, ähnlich wie die von Somatostatin, wie von Hill et al. (oben zitiert) beschrieben.

Tabelle

	[IP] (cpm)	[GH] (ng/ml)
Kontrolle	15 ± 4	14 ± 2
GRF (0,1 nM)	489 ± 19	162 ± 4
GRF (0,1 nM) + Probursin (0,1 µM)	239 ± 13	35 ± 4
GRF (1 nM)	2810 ± 290	648 ± 26
GRF (1 nM) + Probursin (0,1 µM)	1911 ± 310	480 ± 31
GRF (1 nM) + Probursin (1,0 µM)	444 ± 22	77 ± 6
GRF (10 nM)	8962 ± 821	1162 ± 84
GRF (10 nM) + Probursin (10,0 µM)	382 ± 16	29 ± 3

Die Erfindung wurde hier unter Bezugnahme auf bestimmte bevorzugte Ausführungsformen beschrieben, wobei jedoch zahlreiche Abweichungen und Modifikationen der Erfindung für den Fachmann auf diesem Gebiet offensichtlich sind. Diese Abweichungen werden von den Patentansprüchen miterfaßt.

Zeichnungen

Fig. 1 Abszisse: Fraktionszahl

Ordinate: Optische Dichte (254 nm)

Fig. 3 A Abszisse: Titer ($\times 10^2$)

Ordinate: Optische Dichte (410 nm)

Fig. 3 B Abszisse: Absorptionsmittel (µg/ml)

Ordinate: Kaninchen-Antiserum

Fig. 4 Abszisse: Abbauzyklen

Ordinate: Ausbeute an PTH-Aminosäuren (pMol)

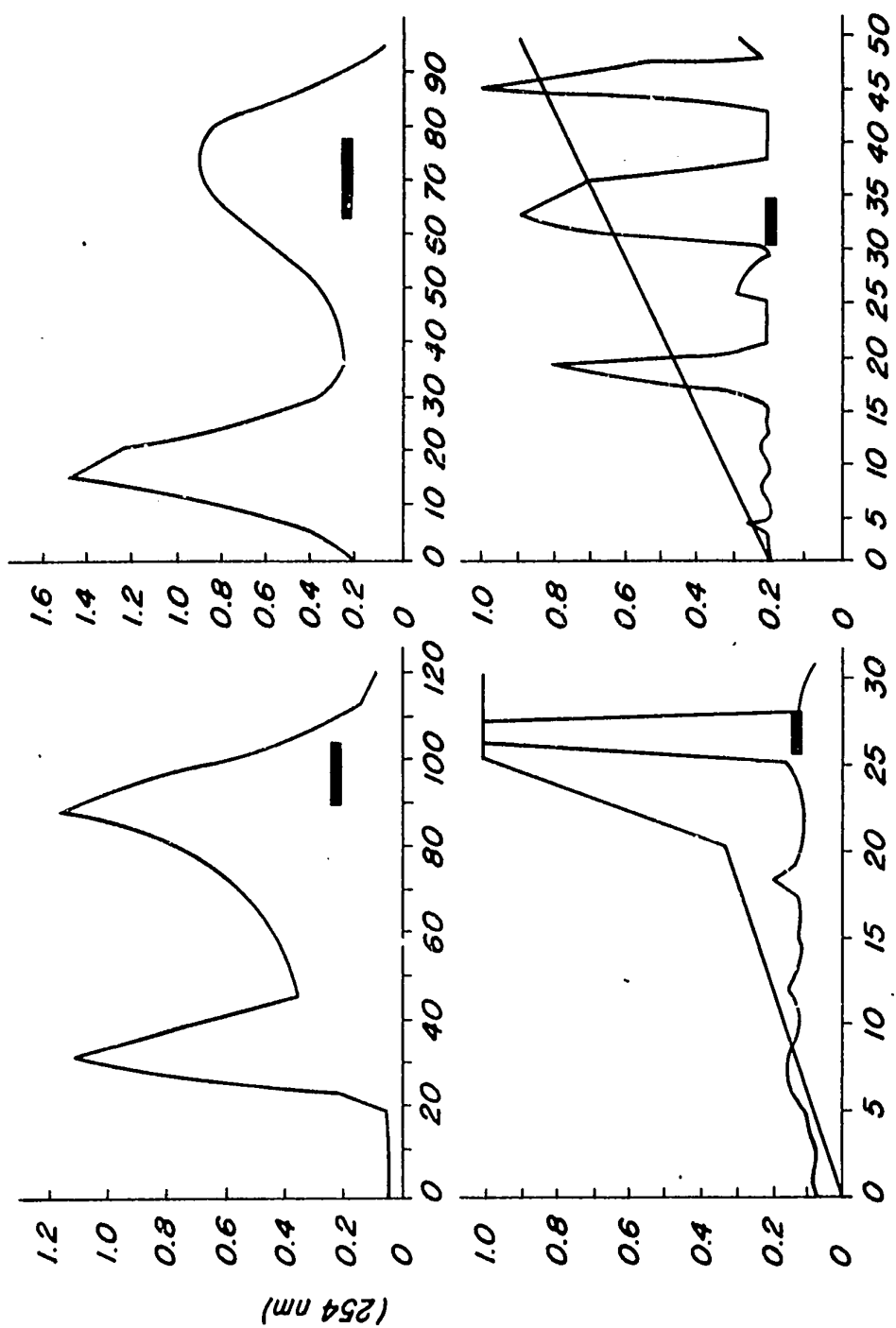
Fig. 5 A Abszisse: Peptidkonzentration (Mikrogramm/ml)

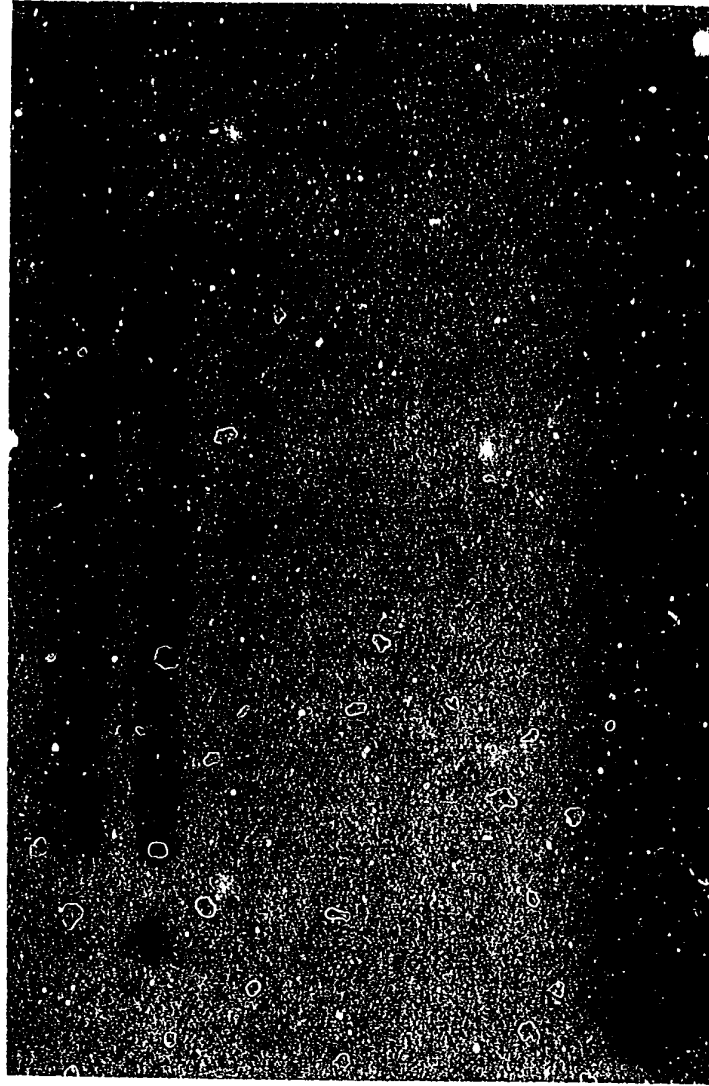
Ordinate: c-GMP-Spiegel (Picomol/ml)

Fig. 5 B Abszisse: Peptidkonzentration (Mikrogramm/ml)

Ordinate: c-GMP-Spiegel (Picomol/ml)

FIG. 1





III

II

I

FIG. 2 c

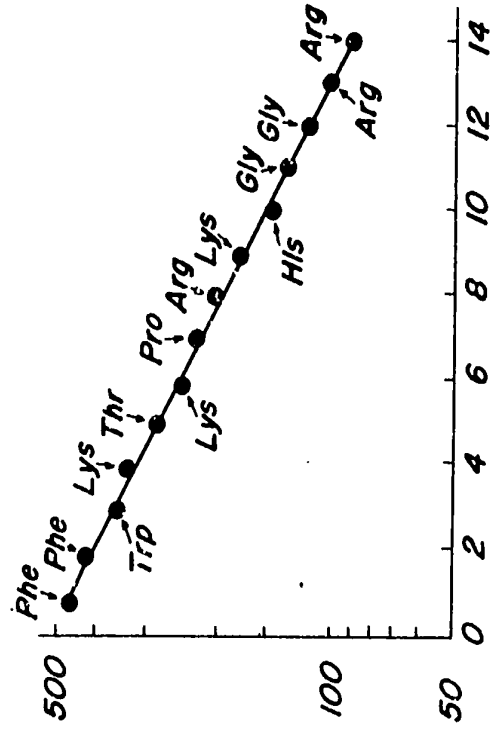
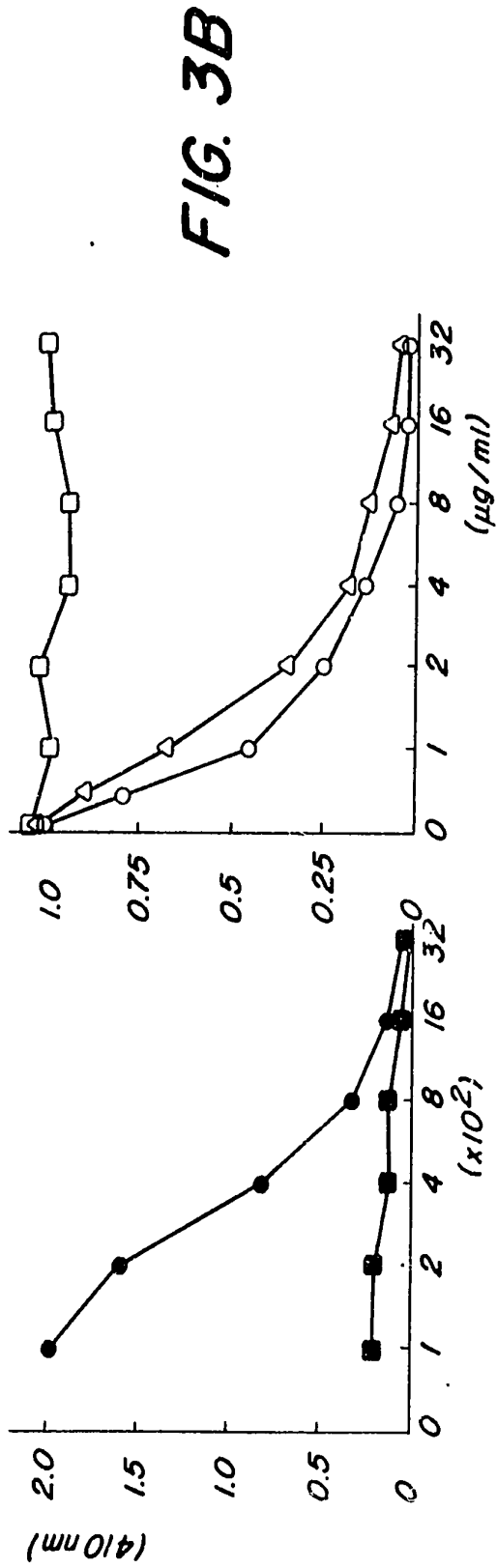


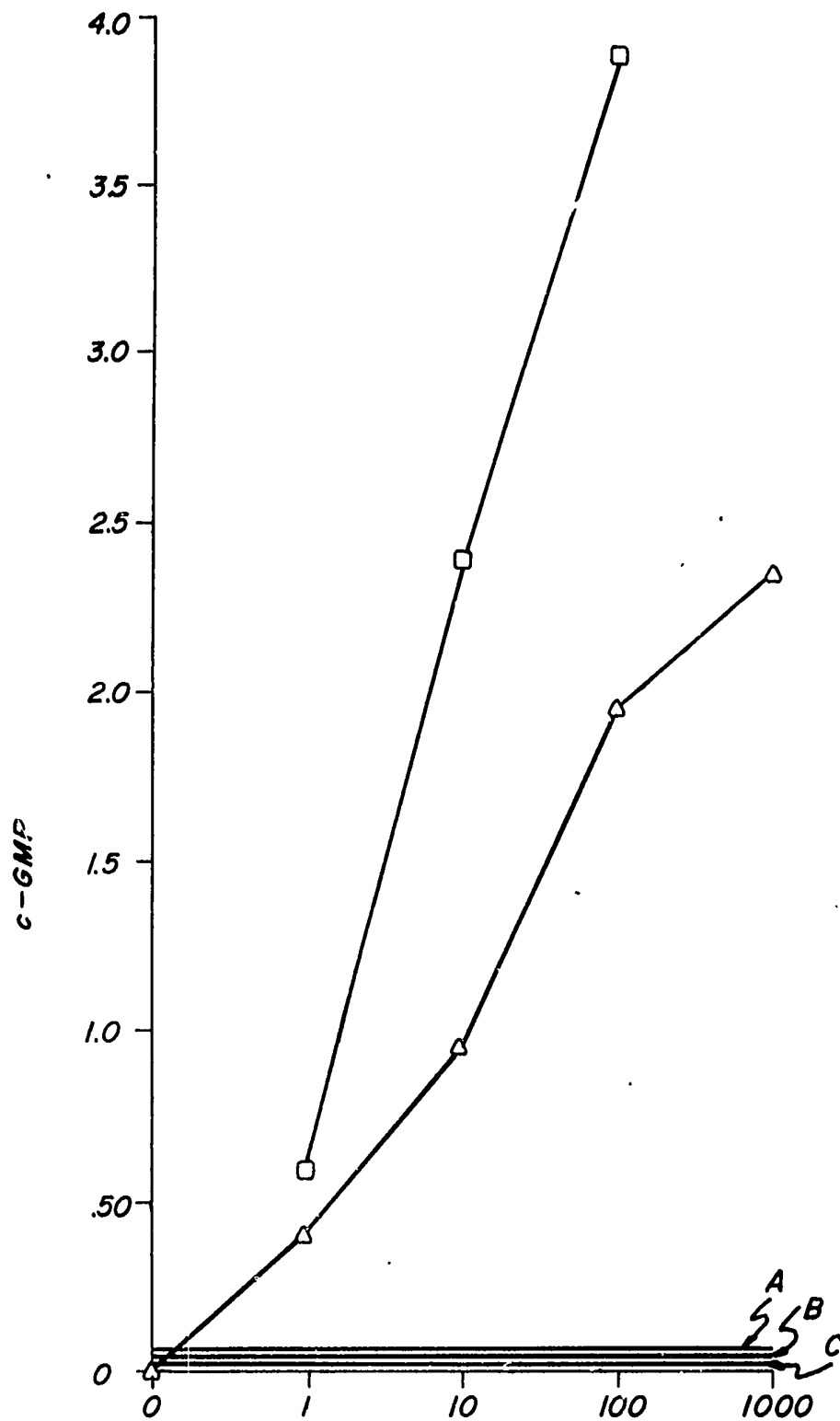
FIG. 5A

FIG.5B