



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901528373
Data Deposito	01/06/2007
Data Pubblicazione	01/12/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

NUOVI LIGANDI SINTETICI PER IMMUNOGLOBULINE E COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE
CHE LI COMPRENDONO

DESCRIZIONE

Della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal Titolo:

“Nuovi ligandi sintetici per immunoglobuline e composizioni farmaceutiche che li comprendono”

a nome: *TECNOGEN S.p.A.*

inventori: VERDOLIVA Antonio, ROSSI Maria, MANFREDI Vincenzo, RUVO Menotti, COLOMBO Maurizio

MI2007 A00 1119

Campo dell'Invenzione

La presente invenzione riguarda nuovi peptidi sintetici capaci di legarsi non covalentemente alle immunoglobuline e composizioni farmaceutiche che li comprendono.

Le immunoglobuline trovano ampio impiego nel settore terapeutico dove sono usate come agenti in grado di legarsi a molecole biologiche coinvolte in processi fisiologici d'importanza terapeutica. Data la loro importanza ne consegue che anche la loro produzione e, soprattutto, la loro purificazione, riveste una particolare rilevanza industriale.

01 GIU. 2007

Le immunoglobuline possono essere ottenute da sieri animali o dalla coltivazione di adatte linee cellulari, e la loro purificazione viene normalmente condotta mediante procedure convenzionali che coinvolgono precipitazione con sali inorganici o solventi organici, quali ammonio solfato ed etanolo, tecniche cromatografiche, come scambio ionico, gel filtrazione, e tecniche elettroforetiche.

Tuttavia questi metodi non sono, in genere, facilmente applicabili su grande scala per applicazioni industriali e comportano sempre un compro-

messo tra resa e purezza del prodotto. Attualmente la procedura industriale più diffusa per la purificazione di anticorpi da fluidi biologici è la cromatografia di affinità e, in particolare, la cromatografia su colonne preparate immobilizzando la Proteina A.

La Proteina A, estratta dallo *Staphilococcus aureus*, è capace di legarsi specificatamente e con alta affinità alla porzione costante delle immunoglobuline, permettendo una rapida e selettiva purificazione degli anticorpi (Siodahl, J., 1977. Eur. J. Biochem. 78, 471-490; Fuglistaller, P., 1989. J. Immunol. Methods 124, 171).

L'applicazione su vasta scala della Proteina A, ottenuta da microrganismi o da batteri geneticamente modificati, presenta tuttavia molte limitazioni.

La sua preparazione è, infatti, condotta mediante complesse e costose procedure che richiedono, normalmente, numerosi controlli analitici per determinare l'eventuale presenza di contaminanti capaci di pregiudicare la qualità del prodotto purificato (virus, pirogeni, DNA etc.). Inoltre, la Proteina A non è molto stabile in condizioni denaturanti od in presenza di agenti usati per la rimozione di contaminanti biologici come virus o frammenti di acidi nucleici.

Da un punto di vista terapeutico, è noto che l'inibizione dell'interazione tra le immunoglobuline e il corrispondente antigene od i recettori localizzati sulle cellule, rappresenta un importante approccio terapeutico per un elevato numero di patologie.

Per esempio, nel mieloma multiplo, i dati sperimentali hanno evidenziato che un'immunoterapia basata sulla somministrazione di recettori solubili degli Fc riduce la crescita delle cellule tumorali e la secrezione di immunoglobuline

(Hoover et al., J. Clin. Invest. 95, 241-247).

Inoltre, nei sieri di pazienti affetti da AIDS sono presenti anticorpi che aumentano la infettività virale interagendo con i rispettivi recettori cellulari (Homsy et al., 1989, Science 244, 1357-1360) e, di conseguenza, la somministrazione di molecole capaci di interferire nell'interazione Ig/recettori rappresenta un importante approccio terapeutico per l'infezione virale da HIV.

Anche in malattie di origine infiammatoria, come l'artrite reumatoide, in cui l'evento che porta alla condizione patologica è rappresentata dall'interazione Ig/recettore (Fearon and Wong, 1983, Ann. Rev. Immunol. 1, 243), un trattamento basato su composti capaci di bloccare quest'interazione può dare notevoli benefici terapeutici.

Infine, nella risposta allergica l'interazione delle IgE con i loro recettori sulla superficie di mastcellule e leucociti basofili, innesca, ad un successivo contatto delle immunoglobuline con l'antigene, una serie di processi metabolici che culminano con la degranulazione ed il rilascio dei mediatori infiammatori, responsabili dei sintomi clinici della reazione atopica (Gould, H.J. Et al., 1991, Clin. Exp. Allergy. 21 (1), 138-147; Riske, F. et al., 1991, J. Biol Chem 266 (17), 11245-11251; Kinet, J.P. et al., 1991, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 94, 51).

Considerato l'ampio spettro di applicazioni diagnostiche e terapeutiche, negli ultimi anni è enormemente cresciuto l'interesse di composti di sintesi, quindi privi di contaminanti biologici, facilmente preparabili e con una elevata stabilità chimica, capaci di legare non covalentemente le immunoglobuline e di interferire nell'interazione di queste molecole con i recettori o il corrispon-

dente antigene.

Il brevetto EP 752,425 descrive un peptide, comprendente la sequenza Arg-Thr-Tyr o Tyr-Thr-Arg, che è in grado di simulare l'affinità della proteina A, estratta dallo *Staphylococcus aureus*, per le immunoglobuline, e l'uso di tale peptide nei processi di purificazione delle immunoglobuline facenti uso della tecnica della cromatografia di affinità.

Il brevetto EP 948,345 descrive un peptide comprendente una o più sequenze Arg-Thr-Tyr o Tyr-Thr-Arg (nelle quali il gruppo idrossi della treonina e la funzione guanidinica dell'arginina possono essere protetti da gruppi protettori convenzionali) legate ad un gruppo in grado di formare un peptide dimerico, trimerico o tetramerico. Nel brevetto viene anche descritta una composizione farmaceutica comprendente tale peptide per il trattamento di patologie derivate dall'interazione tra immunoglobuline e loro recettori, quali, per esempio, l'artrite reumatoide e le reazioni allergiche.

L'attività dei suddetti peptidi di inibire l'interazione tra le immunoglobuline ed i loro recettori si è dimostrata dose dipendente, ed è stata immediata la necessità di individuare peptidi in grado di mostrare, a parità di dose, una maggiore attività.

È stato ora sorprendentemente trovato un peptide che è dotato, a parità di dose, di una attività molto superiore rispetto ai peptidi descritti nei suddetti brevetti.

Riassunto dell'Invenzione

In un suo primo aspetto, la presente invenzione riguarda un peptide comprendente la sequenza di formula:



dove:

X₁ è il residuo di un amminoacido, di un derivato di un amminoacido, di un acido carbossilico, o di un altro derivato in grado di legarsi covalentemente con il gruppo amminico dell'arginina, comprendente almeno un gruppo aromatico.

In un suo secondo aspetto, la presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente una dose biologicamente efficace del suddetto peptide.

In un suo terzo aspetto, la presente invenzione riguarda l'uso del peptide della presente invenzione nella fabbricazione di una composizione farmaceutica per il trattamento delle malattie allergiche.

Queste ed altre caratteristiche della presente invenzione risulteranno più evidenti dalla descrizione e dagli esempi che seguono.

Breve Descrizione delle Figure

La Figura 1 mostra un cromatogramma ottenuto mediante analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide di frazioni derivanti dalla purificazione di immunoglobuline di coniglio da siero grezzo mediante cromatografia di affinità su una colonna preparata immobilizzando il peptide di formula (IB), descritto più avanti.

La Figura 2 mostra gli effetti del suddetto peptide (IB) sulla reazione di rilascio dell'enzima β -esoso-aminidase nelle cellule RBL2H3. Il peptide (IB) è stato aggiunto in dosi crescenti sia all'antigene DNP sia alle IgE. Il saggio di degranolazione è stato condotto come descritto più avanti.

Definizioni

Nella presente descrizione e nelle rivendicazioni le seguenti espressioni

hanno i seguenti significati.

Il termine "amminoacido" indica entrambe le sue forme enantiomere, a meno che non sia espressamente indicata la forma levogira (L) o destrogira (D).

L'espressione "derivato di un amminoacido" indica ciascuna delle le sue forme con il gruppo carbossilico libero (-COOH), salificato (-COO⁻) o amidato (-CONH₂) e con il gruppo amminico libero (-NH₂), salificato (-NH₃⁺) o acetilato (CH₃CONH-).

La sequenza peptidica si intende indicata o descritta, secondo la convenzione nota ai tecnici esperti del ramo, nella direzione N->C, a meno che non sia esplicitamente indicato diversamente.

Descrizione Dettagliata dell'Invenzione

Costituisce quindi un primo oggetto della presente invenzione un peptide comprendente la sequenza di formula:



dove:

X₁ è il residuo di un amminoacido, di un derivato di un amminoacido, di un acido carbossilico, o di un altro derivato in grado di legarsi covalentemente con il gruppo amminico dell'arginina, detto residuo comprendente almeno un gruppo aromatico.

Secondo una prima forma di realizzazione preferita dell'invenzione, X₁ è scelto dal gruppo comprendente i seguenti residui di amminoacidi : H-L-Tyr, H-D-Tyr, H-L-Phe, H-D-Phe, H-L-Trp, H-D-Trp, H-L-Phe, H-D-Phe, Ac-L-Tyr, Ac-D-Tyr, Ac-L-Phe, Ac-D-Phe, Ac-L-Trp, Ac-D-Trp, Ac-L-Phe, Ac-D-Phe.

Secondo una seconda forma di realizzazione preferita dell'invenzione, X_1 è scelto dal gruppo comprendente i seguenti residui di derivati di amminoacidi : H-L-Cys(p-MeOBzl), H-L-Cys(p-MeBzl), H-L-Cys(Bzl), H-D-Cys(p-MeOBzl), H-D-Cys(p-Me-Bzl), H-D-Cys(Bzl), Ac-L-Cys(p-MeOBzl), Ac-L-Cys(p-Me-Bzl), Ac-L-Cys(Bzl), Ac-D-Cys(p-MeOBzl), Ac-D-Cys(p-Me-Bzl), Ac-D-Cys(Bzl), H-L-Arg(Mts), H-L-Arg(Tos), H-D-Arg(Mts), H-D-Arg(Tos), Ac-L-Arg(Mts), Ac-L-Arg(Tos), Ac-D-Arg(Mts), Ac-D-Arg(Tos), H-L-Trp(CHO), H-D-Trp(CHO), Ac-L-Trp(CHO), Ac-D-Trp(CHO), H-L-Tyr(Bzl), H-L-Tyr(2Cl-Bzl), H-D-Tyr(Bzl), H-D-Tyr(2Cl-Bzl), Ac-L-Tyr(Bzl), Ac-L-Tyr(2Cl-Bzl), Ac-D-Tyr(Bzl), Ac-D-Tyr(2Cl-Bzl), L-Ser(Bzl), D-Ser(Bzl), L-Thr(Bzl), D-Thr(Bzl), L-Asp(Bzl), D-Asp(Bzl), L-Glu(Bzl), D-Glu(Bzl), Ac-L-Ser(Bzl), Ac-D-Ser(Bzl), Ac-L-Thr(Bzl), Ac-D-Thr(Bzl), Ac-L-Asp(Bzl), Ac-D-Asp(Bzl), Ac-L-Glu(Bzl), e Ac-D-Glu(Bzl) dove Bzl rappresenta un gruppo benzile, Mts un gruppo metossile, Tos un gruppo tosile, 2ClBzl un gruppo 2-Cl-benzile. CHO rappresenta un gruppo formile.

Secondo una terza forma di realizzazione preferita dell'invenzione, X_1 è scelto dal gruppo comprendente i gruppi acilici derivanti dai seguenti acidi carbossilici : naftilacetico, benzoico, 4-metossibenzoico, 2,4-diclorobenzoico, 2-nitrobenzoico, 4-clorobenzoico, fenilacetico, difenilacetico, (R)-2-fenilpropanoico, (S)-2-fenilpropanoico, (S)-3-fenilpropanoico, (R)-3-fenilpropanoico, (R,S)-2-metil,3-fenilbutanoico, (S,R)-2-metil,3-fenilbutanoico, (R,R)-2-metil,3-fenilbutanoico, (S,S)-2-metil,3-fenilbutanoico, (R,S)-2,3-difenilpentanoico, (R,R)-2,3-difenilpentanoico, (S,S)-2,3-difenilpentanoico, (S,R)-2,3-difenilpentanoico, acido mono-(9H-fluoren-9-il-metil)carbonico, acido monobenzilcarbonico, acido mono-(2-cloro-benzil)carbonico.

Secondo un aspetto preferito il peptide della presente invenzione è rappresentato dalla seguente formula:



dove:

X_1 è il residuo di un amminoacido, di un derivato di un amminoacido, di un acido carbossilico, o di un altro derivato in grado di legarsi covalentemente con il gruppo amminico dell'arginina, detto residuo comprendente almeno un gruppo aromatico,

X_2 è un amminoacido, od una sequenza polipeptidica comprendente da 2 a 8 amminoacidi,

R è un residuo n-valente comprendente uno, due o tre amminoacidi,

m è 0 o 1, n è un numero intero da 1 a 4, e p è 0 o 1.

In una forma preferita di realizzazione, nella suddetta formula (I) X_1 ha gli stessi significati descritti in precedenza per la sequenza (S).

In una forma preferita di realizzazione, X_2 è un amminoacido scelto nel gruppo che comprende Lys, Orn, e Dap, o una sequenza polipeptidica comprendente da 2 a 8 amminoacidi rappresentata dalla formula:



dove

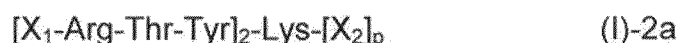
q è un numero intero da 1 a 7, A è Gly o Ala, o, quando q è almeno 2, una sequenza polipeptidica comprendente Gly o Ala, e B è Lys, Orn, o Dap.

In una forma ulteriormente preferita di realizzazione, X_2 è una sequenza peptidica scelta dal gruppo comprendente: Gly-Lys, Gly-Orn, Gly-Dap, Ala-Lys, Ala-Orn, Ala-Dap, Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Dap, Gly-Ala-Lys, Gly-Ala-Orn, Gly-Ala-Dap, Ala-Gly-Lys, Ala-Gly-Orn, Ala-Gly-Dap, Ala-Ala-

Lys, Ala-Ala-Orn, Ala-Ala-Dap, Gly-Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Gly-Dap, Ala-Ala-Ala-Lys, Ala-Ala-Ala-Orn, Ala-Ala-Ala-Dap, Gly-Gly-Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Gly-Gly-Dap, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Dap, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Lys, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Orn, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Dap, Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Lys, Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Orn, Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Dap.

Nella suddetta formula (I), quando n è uguale a 2 ed R rappresenta un gruppo bivalente (dimero), il gruppo R è preferibilmente scelto dal gruppo che comprende lisina (Lys), ornitina (Orn), acido diamminopropionico (Dap) ed acido diamminobutirrico (Dab).

Il peptide può essere quindi rappresentato dalle seguenti formule:



dove X_1 e X_2 e p hanno i significati indicati precedentemente.

Nella suddetta formula (I), quando n è uguale a tre ed R rappresenta un gruppo trivalente (trimero), il gruppo R è preferibilmente scelto nel gruppo che comprende un dipeptide del tipo (Lys-Lys), (Orn-Orn) o (Dap-Dap) o (Dab-Dab).

Il peptide può essere quindi rappresentato dalle seguenti formule:



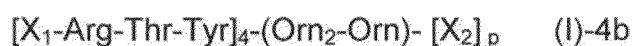
dove X_1 , X_2 , e p hanno i significati indicati precedentemente.

Nella suddetta formula (I), quando n è uguale a quattro ed R rappresenta un gruppo tetravalente (tetramero), il gruppo R è preferibilmente scelto nel gruppo che comprende un tripeptide ramificato di formula $Lys(\epsilon Lys)-Lys$, $Orn(\delta Orn)-Orn$, $Dap(\beta Dap)-Dap$, e $Dab(\gamma Dab)-Dab$, stando ad indicare che il residuo in parentesi è legato alla funzione amminica in posizione ϵ , δ , β o γ , rispettivamente, del residuo che lo precede.

Tale notazione può essere anche indicata come:



Il peptide può essere quindi rappresentato dalle seguenti formule:



dove X_1 , X_2 , e p hanno i significati indicati precedentemente.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, il gruppo R è costituito dal tripeptide $Lys(\epsilon Lys)-Lys$, il gruppo X_1 è scelto tra quelli indicati, preferibilmente tra acidi carbossilici ed amminoacidi acetilati, il gruppo X_2 è scelto tra il gruppo $L-Lys-OH$ e il tripeptide $Arg-Thr-Tyr$ in cui tutti gli amminoacidi hanno configurazione D .

La molecola risultante possiede una struttura tetramerica con 4 gruppi NH_2 terminali liberi o acetilati ed un residuo di lisina al C terminale che, quando i

gruppi terminali siano acetitati, può essere utilmente impiegato per l'immobilizzazione della molecola stessa su fasi solide pre-attivate.

Esempi specifici di peptidi della presente invenzione sono elencati qui di seguito.

- IA (H-D-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
- IB (H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
- IC (H-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
- ID (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Gly-Lys-OH
- IE H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-L-Orn-OH
- IF (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
- IG H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-L-Lys-OH
- IH (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Lys*(CO-L-Tyr-L-Thr-L-Arg-L-Cys(p-MeOBzl))-OH
- IL (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Orn₂-L-Orn-L-Orn-OH
- IM (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Orn-Gly-OH
- IN (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Orn₂-L-Orn-L-Orn-OH
- IO (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-L-Orn-L-Orn*(CO-L-Tyr-L-Thr-L-Arg-L-Cys(p-MeOBzl))-OH
- IP (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
- IQ (Ac-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
- IR (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-NH₂
- IS (Ac-D-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-L-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-NH₂
- IT (Ac-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-D-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

IU (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

I peptidi di formula (I) possono essere preparati secondo le tecniche usuali di preparazione dei peptici, sia in fase liquida che in fase solida, che comprendono la protezione, l'accoppiamento e la deprotezione di amminoacidi.

La preparazione secondo la tecnica della sintesi in fase solida è preferibilmente eseguita a mano adoperando semplici attrezzature, quali tubi di plastica dotati di setti filtranti ed agitatori, oppure mediante sintetizzatori automatici, di cui un esempio è il modello 433A prodotto dall'Applied Biosystems (Foster City, Ca, USA).

Vantaggiosamente la preparazione viene eseguita in accordo alle procedure usuali note al tecnico del ramo come, ad esempio, le procedure descritte da Atherton, E. & Sheppard, R.C. (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A. Practical Approach*. IRL Press, Oxford, England e da Bodansky, M. & Bodansky, A. (1994) *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd edn. Springer, Berlin. A titolo di esempio possono essere impiegate le tecniche di preparazione descritte nel brevetto EP 752,425.

Preferibilmente, il gruppo funzionale del primo amminoacido utilizzato per l'ancoraggio alla resina è tale da poter essere idrolizzato mediante trattamento con acidi forti quali l'acido trifluoroacetico (TFA), mentre il secondo gruppo funzionale è dotato di opportuna protezione rimovibile dopo l'ancoraggio alla resina. Se il primo amminoacido è trifunzionale, ad esempio Lys o Orn o Dap o Dab, le funzioni protette durante l'ancoraggio alla resina saranno due.

La protezione può essere effettuata con metodi noti nell'arte, come, per esempio, utilizzando il gruppo Fmoc (Atherton, E. & Sheppard e da Bo-

dansky, M. & Bodansky, A).

Durante la fase di accoppiamento e deprotezione sequenziale di Tyr, Thr, Arg, la tirosina è preferibilmente protetta al gruppo ossidrilico fenolico con un gruppo tert-butile (tBu, Field, 1997; Bodansky, 1995), la treonina è preferibilmente protetta al gruppo idrossilico con un analogo gruppo tert-butile (tBu, Field, 1997; Bodansky, 1995), e l'arginina è preferibilmente protetta con una protezione acido labile come ad esempio, pentametilcromano (Pmc, Field, 1997; Bodansky, 1995) oppure pentametildiidrobenzofurano (Pbf, Field, 1997; Bodansky, 1995).

I gruppi amminici terminali del peptide risultante possono essere acetilati successivamente alla preparazione del peptide oppure si può procedere alla introduzione diretta dell'opportuno residuo di amminoacido previamente acetilato.

Il distacco dei vari gruppi protettori acido-labili del peptide avviene preferibilmente in modo contestuale al distacco del peptide stesso dalla resina di supporto.

I peptidi della presente invenzione sono capaci di legarsi non covalentemente ad almeno una immunoglobulina. I peptidi della presente invenzione sono utili nel trattamento di malattie che coinvolgono le immunoglobuline.

Costituisce un ulteriore aspetto della presente invenzione una composizione farmaceutica comprendente una dose biologicamente efficace dei peptidi precedentemente descritti e l'uso di tali peptidi per la produzione di una composizione farmaceutica per applicazioni terapeutiche ed in particolare per il trattamento di malattie allergiche.

Preferibilmente, le composizioni farmaceutiche della presente invenzione

vengono preparate sotto forma di adatte forme di dosaggio comprendenti una dose biologicamente efficace di almeno uno dei suddetti peptidi ed almeno un ingrediente inerte farmaceuticamente accettabile.

Esempi di adatte forme di dosaggio sono le compresse, le capsule, le compresse rivestite, i granuli, le soluzioni e gli sciroppi per la somministrazione orale; le creme, gli unguenti e i cerotti medicali per somministrazione topica; le supposte per la somministrazione rettale e le soluzioni sterili per somministrazione per via iniettabile, aerosolica od oftalmica.

Le forme di dosaggio possono anche contenere altri ingredienti tradizionali come conservanti, stabilizzanti, tensioattivi, tamponi, sali per regolare la pressione osmotica, emulsionanti, dolcificanti, coloranti, aromi e simili.

Se richiesto da particolari terapie, la composizione farmaceutica della presente invenzione può contenere altri ingredienti farmacologicamente attivi la cui somministrazione contemporanea sia terapeuticamente utile.

La quantità dei suddetti peptidi nella composizione farmaceutica della presente invenzione può variare entro un ampio intervallo in funzione di fattori noti come, per esempio, la severità della malattia, il peso corporeo del paziente, la forma di dosaggio, la via di somministrazione prescelta, il numero di somministrazioni giornaliere e l'efficacia del peptide prescelto. Tuttavia, la quantità ottimale può essere facilmente determinata dal tecnico del ramo.

Le forme di dosaggio della composizione farmaceutica della presente invenzione possono essere preparate secondo tecniche ben note al tecnico del ramo e che comprendono la miscelazione, la granulazione, la compressione, la dissoluzione, la sterilizzazione e simili.

La sintesi in fase solida dei peptidi della presente invenzione è stata ese-

guita sia utilizzando una procedura manuale, sia utilizzando il sintetizzatore automatico modello 433 A, software versione 1.2, prodotto dall'Applied Biosystems (Foster City, Ca, USA), in accordo alle procedure di sintesi raccomandate dal fornitore, basate su metodi ben descritti in letteratura (Field *l.c.*, Bodansky, *l.c.*).

Negli esempi che seguono l'abbreviazione "Cat. No." sta ad indicare "numero di catalogo".

Gli esempi che seguono sono forniti per meglio descrivere questa invenzione ma non la limitano in alcun modo.

ESEMPIO 1

Preparazione in fase solida di un peptide di formula (I) in cui X₁ è un residuo di L-cisteina protetto sul gruppo tiolico con para-metossibenzile (pMeOBzl), gli aminoacidi Arg, Thr e Tyr sono in configurazione D, il gruppo R è il tripeptide ramificato L-Lys₂-L-Lys, X₂ è l'amminoacido L-Lys-OH.

La molecola può essere schematizzata mediante la seguente formula:



La preparazione del peptide è stata condotta manualmente mediante sintesi in fase solida secondo la metodologia Fmoc/HOBt/HBTU descritta qui di seguito.

1,78 g di resina per sintesi in fase solida di tipo polistirenico (polistirene, 1% divinilbenzene, 100-200 mesh), derivatizzata con il gruppo idrossimetilfenossile, sostituzione 0,84 meq/g (Novabiochem, Laufelfingen, Svizzera, Cat. No. 01-64-0014) è stata impaccata in un reattore di vetro di 300 ml dotato di un filtro di vetro sinterizzato di tipo R3. La resina è stata lavata 3 volte per 5 minuti con 50 ml di una miscela 3:2 (v/v) di DCM/DMF (DCM, DiCloroMe-

tano, LabScan, Dublino, Irlanda Cat. N° H6508L; DMF, DiMetilFormammide, LabScan, Dublino, Irlanda, Cat. N° H33H11X).

7,02 g (15 mmoli) di Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem, Laufelfingen, Svizzera, Cat. N° 04-12-1026) sono stati sciolti in 30 ml di una miscela 3:2 (v/v) di DCM/DMF, quindi sono stati aggiunti 7,5 ml di una soluzione 1M di DCC in NMP (DCC/NMP, (DiCicloesil-Carbodiimide/N-Metil-Pirrolidone, Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat N° 36651). La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione per 20 minuti a temperatura ambiente ed infine filtrata per rimuovere il precipitato bianco di dicicloesilurea (DCU). Dopo addizione di 5,4 ml di una soluzione 0,1 M di dimetilamminopiridina (DMAP, Sigma-Aldrich, Milano, Italia, Cat. N° 39408) in DMF, la soluzione è stata versata nel reattore contenente la resina agitando per un'ora a temperatura ambiente. La soluzione di amminoacido è stata drenata e la resina lavata 3 volte con 50 ml di DMF. La resina è stata successivamente trattata con 50 ml di soluzione 0,5 M di anidride acetica in DMF (Ac₂O, Sigma-Aldrich, Milano, Italia, Cat. N° 45830) contenente 2,5 mmoli di DMAP per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo aver drenato la soluzione, la resina è stata lavata 3 volte con 50 ml di DMF.

Il gruppo Fmoc è stato rimosso dal gruppo ammino della lisina mediante trattamento con 50 ml di soluzione di piperidina/DBU/DMF 2:2:96 v/v/v (DBU, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, Sigma-Aldrich, Milano Italia, Cat. N° 33482; Piperidina: Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat. N° 80641) per 30 minuti a temperatura ambiente. La soluzione di deprotezione contenente l'addotto Fmoc-piperidina è stata filtrata e la resina lavata per 3 volte con 50 ml di DMF. La soluzione di deprotezione ed i tre lavaggi con DMF sono stati rac-

colti insieme ed utilizzati per ottenere una stima della resa di reazione. Una piccola aliquota di 100 μL della soluzione (volume totale 200 ml) è stata diluita 100 volte con DMF e dopo azzeramento con DMF ne è stata determinata l'assorbanza a 301 nm (cuvetta da 1 cm) utilizzando uno spettrofotometro. La concentrazione dell'addotto è stata calcolata utilizzando un $\epsilon_{301 \text{ nm}} = 7,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Dal valore di assorbanza di 0,563 è stato calcolato che $(0,563/7,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 0,200\text{L} \times 100 \times 1 \text{ cm} = 1,44 \text{ mmoli}$ di Fmoc-L-Lys(Boc)-OH si sono legati alla resina.

4,43 g di Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH (7,5 mmoli, Novabiochem, Laufelfingen, Svizzera, Cat. N° 04-12-1085) sono stati sciolti in 15 ml di DMF. Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 16,7 ml di una soluzione 0,45 M di HBTU/HOBt in DMF, corrispondenti a 7,5 mmoli di HBTU e 7,5 mmoli di HOBt (HBTU, O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato, Sigma-Aldrich, Milano Italia, Cat. N° B2778; HOBt, N-idrossibenzotriazolo, Sigma-Aldrich, Milano Italia, Cat. N° 157260). Dopo addizione di 2,62 ml (15 mmoli) di di-isopropil-etilammina (DIEA, Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat. N° 03440), la soluzione è stata lasciata in agitazione per 3 minuti e successivamente versata nel reattore contenente la resina, lasciando la sospensione in agitazione per un'ora a temperatura ambiente. La resina è stata drenata sotto vuoto e lavata 3 volte con 50 ml di DMF.

La rimozione del gruppo Fmoc è stata condotta con 50 ml di piperidina/DBU/DMF 2:2:96 v/v/v per 30 minuti a temperatura ambiente lavando ancora 3 volte con 50 ml di DMF. La quantità di Fmoc-piperidina rilasciata nella soluzione di deprotezione è stata determinata come riportato in precedenza ottenendo un valore di 2,82 mmoli (teorico 2,88 mmoli) per una resa

del 98,0%.

Per ottenere il secondo livello di ramificazione è stata condotta una seconda reazione con Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH. 8,86 g (15 mmoli) di amminoacido sono stati sciolti in 30 ml di DMF. L'attivazione è stata compiuta aggiungendo 33,4 ml di soluzione 0,45 M HBTU/HOBt in DMF (15 mmoli di HBTU e 15 mmoli di HOBt) e 5,24 ml di DIEA (30 mmoli). Dopo 3 minuti, la soluzione è stata versata nel reattore contenente la resina agitando per un'ora a temperatura ambiente. La resina è stata drenata sotto vuoto e lavata 3 volte con 50 ml di DMF.

La rimozione del gruppo Fmoc è stata nuovamente condotta trattando la resina con 100 ml di Piperidina/DBU/DMF 2:2:96 v/v/v per 30 minuti a temperatura ambiente. La resa di reazione è stata determinata come descritto in precedenza, ottenendo un valore del 97,5% (5,50/5,64 mmoli di Fmoc-piperidina).

Per l'attacco della D-Tirosina ai quattro gruppi amminici liberi del tetrapeptide L-Lys₂-L-Lys-L-Lys(Boc)-OH legato alla resina, 13,77 g (30 mmoli) di Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH (Novabiochem, Laufelfingen, Svizzera, Cat. N°04-12-1037) sono stati sciolti in 60 ml di DMF e attivati come descritto in precedenza per tre minuti con 66,8 ml di soluzione 0,45 M di HBTU/HOBt in DMF e 10,48 ml (60 mmoli) di DIEA. La soluzione è stata versata nel reattore contenente la resina agitando per un'ora a temperatura ambiente ed infine la soluzione di amminoacido è stata drenata sotto vuoto. La resina è stata lavata 3 volte con 100 ml di DMF. Per rimuovere il gruppo Fmoc, la resina è stata nuovamente trattata con 100 ml di Piperidina/DBU/DMF 2:2:96 v/v/v per 30 minuti a temperatura ambiente. La resa di reazione stimata è stata del 97,0%.

(5,33/5,50 mmoli).

Per l'attacco della D-Treonina al gruppo amminico della D-Tirosina, 11,91 g (30 mmoli) di Fmoc-D-Thr(tBu)-OH (Novabiochem, Laufelfingen, Svizzera, Cat. N°04-12-1000) sono stati sciolti in 60 ml di DMF ed attivati con 66,8 ml di soluzione 0,45 M di HBTU/HOBt in DMF e 10,48 ml (60 mmoli) di DIEA. Dopo tre minuti, la soluzione è stata versata nel reattore contenente la resina agitando per un'ora a temperatura ambiente, poi la resina è stata drenata e lavata 3 volte con 100 ml di DMF. La rimozione del gruppo Fmoc è stata eseguita trattando la resina con 100 ml di Piperidina/DBU/DMF 2:2:96 v/v/v per 30 minuti a temperatura ambiente. La resa di reazione determinata è stata del 97,4% (5,19/5,33 mmoli).

Per l'attacco della D-Arginina, 19,44 g (30 mmoli) di Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH (Novabiochem, Laufelfingen, Svizzera, Cat. N° 04-12-1145) sono stati sciolti in 60 ml di DMF ed attivati per tre minuti con 66,8 ml di soluzione 0,45 M di HBTU/HOBt in DMF e 10,48 ml (60 mmoli) di DIEA. La soluzione è stata versata nel reattore contenente la resina agitando per un'ora a temperatura ambiente, poi la resina è stata drenata e lavata 3 volte con 100 ml di DMF. La rimozione del gruppo Fmoc è stata eseguita trattando la resina con 100 ml di Piperidina/DBU/DMF 2:2:96 v/v/v per 30 minuti a temperatura ambiente. La resa di reazione determinata è stata del 98,1% (5,09 mmoli/5,33 mmoli).

Per l'attacco della L-Cisteina protetta, 10,23 g (30 mmoli) di Boc-L-Cys(p-MeOBzl)-OH (Chem-Impex, Wood Dale, IL, USA Cat. N° 01342) sono stati sciolti in 60 ml di DMF ed attivati con 66,8 ml di soluzione 0,45 M HBTU/HOBt in DMF e 10,48 ml (60 mmoli) di DIEA. La soluzione è stata versata nel reattore contenente la resina agitando per 90 minuti a temperatura ambiente,

e quindi la resina è stata lavata con 100 ml di DMF, 100 ml di DCM, 100 ml di CH₃OH (MeOH, LabScan, Dublino, Irlanda Cat. N° C2517) e 100 ml di Etere Etilico (Et₂O, LabScan, Dublino, Irlanda Cat. N° A3509E). La resina è stata asciugata sotto vuoto e pesata. Sono stati ottenuti 8,52 g di resina secca.

La reazione di distacco del peptide dalla resina e rimozione dei gruppi protettori è stata eseguita trattando la resina per 3 ore con la seguente miscela: 100 ml Acido Trifluoroacetico (Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat N° 91700); 5,0 ml di H₂O, 5,0 ml di Tioanisolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat N° 88470), 7,5 g di Fenolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat N° 77612) e 2,5 ml di Tri-isopropil-silano (TIS, Sigma-Aldrich, Milano, Italia Cat N° 92095) (83:4:5:6:2, p/p/p/p/p).

Al termine della reazione la resina è stata eliminata mediante filtrazione e la soluzione risultante è stata concentrata fino a circa 40 ml impiegando un evaporatore rotante.

Il peptide di formula (IB) è stato precipitato versando la soluzione acida goccia a goccia in 200 ml etere etilico freddo. Il precipitato è stato separato mediante centrifugazione a 3500 rpm per 15 minuti ed il solvente è stato scartato. Il precipitato è stato ancora lavato con 200 ml di etere etilico freddo ed infine è stato sciolto in 50 ml di H₂O/CH₃CN/TFA (50:50:0,1) e liofilizzato. Dopo liofilizzazione sono stati recuperati 4,26 g di prodotto grezzo sotto forma di sale trifluoroacetato. Considerando che la molecola può ritenere 8 molecole di TFA, la resa sul grezzo calcolata a partire dalle 1,44 mmoli iniziali è stata del 73,4%.

Il peptide di formula (IB) è stato caratterizzato mediante RP-HPLC analitico e spettrometria di massa MALDI-TOF. Per l'analisi HPLC 10 µg di prodot-

to sono stati iniettati su una colonna C18 Jupiter 250x4,6 mm ID, 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) equilibrata ad un flusso di 1 ml/min con 5% CH_3CN in H_2O , 0,1% TFA (CH_3CN , acetonitrile, LabScan, Dublino, Irlanda Cat. N° C2503). Per l'eluizione è stato applicato un gradiente dal 5% al 65% di CH_3CN , 0,1% TFA in 35 minuti. Il sistema HPLC utilizzato era un sistema costituito da una pompa con gradientatore a bassa pressione Merck, un rivelatore a sistema di fotodiodi della Shimadzu che acquisisce su tutte le lunghezze d'onda da 190 nm a 800 nm ed una valvola Rheodyne dotata di un loop da 20 μL . All'analisi HPLC (225 nm) il prodotto aveva una purezza stimata del 75% ed un Rt: 29,7 min.

1 μg circa di peptide di formula (IB) è stato analizzato mediante spettrometria di massa per la determinazione del peso molecolare. Per questa determinazione è stato impiegato uno spettrometro MALDI-TOF Kratos del tipo MALDI III operante in modalità "reflectron". Per l'analisi è stata utilizzata come matrice l'Acido Caffeico (Sigma-Aldrich, Milano, Italia, Cat. N° C0625; 20 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$, 50:50:0,1, 1 μL) mescolato con la soluzione di campione e lasciata asciugare. Sono stati acquisiti 200 spettri con una potenza del laser del 60% di quella massima e mediati. La calibrazione è stata effettuata impiegando una soluzione di Insulina Porcina (MW: 5777,0 amu; Sigma-Aldrich, Milano, Italia, Cat. N° I6279) alla concentrazione di 0,57 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} / \text{TFA}$, 50:50:0,1. Il valore sperimentale di peso molecolare ottenuto era in ottimo accordo con quello calcolato ($\text{MW}_{\text{sper/calc}}$: 3106,8/3106,2 amu).

Una aliquota del peptide grezzo di 0,6 g è stata purificata mediante RP-HPLC preparativo utilizzando una colonna RP-18 25x2,2 cm ID, 10 μm

(Phenomenex, Torrance, CA, USA). La colonna è stata montata su un sistema HPLC ad alta pressione di tipo LC8 dotato di doppia pompa reciprocante, gradientatore ad alta pressione, rivelatore a lunghezza d'onda variabile tra 190-800 nm, un loop da 10 ml ed un controller (Shimadzu, Milano, Italia) ed equilibrata ad un flusso di 20 ml/min con 100% di tampone A. Il Tampone A è costituito da 15% CH₃CN/H₂O, 0,1% TFA; il tampone B è costituito da 80% CH₃CN/H₂O, 0,1% TFA. I 0,6 g di prodotto sono stati sciolti in 10 ml di 20% CH₃CN/H₂O 0,1% TFA e purificati in 10 corse iniettando in ogni corsa 1,0 ml di soluzione. Il gradiente applicato è il seguente:

Tempo	0	10	65	75	80
%B	0	0	100	100	0

L'eluato è stato monitorato alla lunghezza d'onda di 280 nm e frazionato in 30 tubi tra 30 e 60 minuti. Le frazioni contenenti il prodotto purificato sono state unite, liofilizzate e analizzate mediante RP-HPLC nelle condizioni riportate. Il prodotto purificato aveva una purezza stimata del 99% ed un Rt di 29,6 min. Dopo liofilizzazione sono stati recuperati 148,8 mg di prodotto puro per una resa del 24,8% di resa di purificazione.

In modo analogo sono stati preparati i seguenti peptidi:

IC (H-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

ID (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Gly-Lys-OH

IE H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-L-Orn-OH

IF (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

IG H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-L-Lys-OH

IH (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Lys*(CO-L-Tyr-LThr-L-Arg-L-Cys(p-MeOBzl))-OH

IL (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Orn₂-L-Orn-L-Orn-OH

IM (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Orn-Gly-OH

IN (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Orn₂-L-Orn-L-Orn-OH

IO (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-L-Orn-L-Orn*(CO-L-Tyr-LThr-L-Arg-L-Cys(p-MeOBzl))-OH

ESEMPIO 2

Immobilizzazione del peptide di formula (IB) sulla resina preattivata CH-Sepharose-4B e purificazione di immunoglobuline da siero di coniglio mediante cromatografia di affinità.

Il peptide di formula (IB) preparato nell'Esempio 1 (10 mg) è stato sciolto in 5 ml di soluzione acquosa di sodio bicarbonato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5 e quindi aggiunto a 0,5 g di resina Activated CH-Sepharose-4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden, Cat. No. 17-0490-01), un supporto per cromatografia di affinità preattivato per l'accoppiamento diretto di peptidi e proteine. La sospensione è stata posta in agitazione per 24 ore e l'entità dell'accoppiamento è stata monitorata mediante prelievi della miscela di reazione, a tempi diversi e successiva analisi mediante RP-HPLC.

Circa il 90 – 95% del peptide iniziale risulta covalente-mente legato alla resina dopo 24 ore. La resina derivatizzata viene incubata con 0,1 M Tris, pH 8,5 per bloccare i siti eventualmente ancora reattivi della resina, e quindi impaccata in una colonna di vetro 100 x 0,6 cm I.D. a pistone variabile (OMNIFIT, Cat. N°. 006CC-06-10-FF).

Per la purificazione di immunoglobuline da siero, la colonna è stata equili-

brata con un tampone 50 mM Bis-Tris (Sigma, Cat. No. B9754), pH 6,5, ad un flusso di 1 ml/min, monitorando l'eluente a 280 nm. Siero grezzo di coniglio (Sigma, Cat. No. R9133) è stato caricato in colonna e dopo l'eluizione del materiale non legato, l'eluente è stato cambiato in acido acetico 0,1 M, pH 3,0, per l'eluizione del materiale adsorbito.

Il materiale eluito dalla colonna è stato raccolto, neutralizzato con Tris 1M, e caratterizzato mediante analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide.

Come chiaramente mostrato dall'analisi elettroforetica di Figura 1, la colonna è stata in grado di trattenere la frazione immunoglobulinica del siero grezzo, come dimostrato da analisi Western-Blot, mentre l'albumina è stata eluita al volume morto della colonna.

Risultati analoghi sono stati ottenuti con il siero grezzo umano (Sigma-Aldrich, Cat. N°.H1388) e siero grezzo murino (Sigma-Aldrich, Cat. N°. M5905). Anche in questo caso la colonna è stata in grado di trattenere le immunoglobulina (IgG, IgM, IgA e IgE), come evidenziato da analisi Western-Blot, mentre l'albumina è stata recuperata nel materiale non trattenuto.

Risultati analoghi, in termini di immobilizzazione e purificazione, sono stati ottenuti con i seguenti peptidi:

ID (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr-CO)₂-Lys-Gly-Lys-OH

IE H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-Orn-OH

ESEMPIO 3

Determinazione "in vitro" dell'attività anti-allergica del peptide di formula (IB) e del peptide di formula (H-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-Gly-OH (peptide di confronto) nel saggio di degranolazione delle cellule RBL 2H3.

La linea cellulare RBL 2H3, basofili di ratto che esprimono il recettore ad alta affinità per le immunoglobuline di classe E (Fc ϵ RI), è ampiamente utilizzata per lo studio delle reazioni allergiche poiché in tale linea di cellule i mediatori chimici dell'infiammazione sono rilasciati in conseguenza del legame allergene specifico-IgE-Fc ϵ RI.

Il rilascio dell'enzima β -esoso-aminidase, che è presente insieme all'istamina nei granuli di mastcellule e basofili, può essere utilizzato come indice della degranolazione cellulare (Tanaka et al., 1991, Chem. Pharm. Bull. 39, 2072-2076; McCloskey et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85, 7260.7264).

L'attività dell'enzima β -esoso-aminidase, rilasciato dalle cellule RBL 2H3 stimulate, è stato determinato con il metodo descritto da Yamanishi et al., 1995, Jour. Biotech. Biochem., 59 (7), 1272-1275, che prevede la misurazione dell'attività enzimatica mediante misurazione dell'assorbanza del prodotto p-nitrofenolo generato dal substrato sintetico p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosammide. 1×10^5 cellule RBL 2H3, tripsinizzate da piastre a confluenza, sono state risospese in un volume di 80 μ l del terreno di coltura (MEM + 10% siero fetale bovino inattivato) e distribuite in ciascun pozzetto delle piastre da 96 pozzetti (Costar). A distanza di 24 ore, 20 μ l di terreno contenente IgE monoclonali anti-2,4 dinitrofenolo (DNP, Sigma, Cat. No D-8406) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto.

Le micropiastre sono state incubate a 37°C per un'ora e quindi lavate tre volte con 100 μ l di soluzione tampone HBS (10 nM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM CaCl $_2$, 0.5 mM MgCl $_2$, 5,6 mM glucosio, 0,1% BSA, pH 7.4). Dopo i lavaggi sono stati aggiunti 100 μ l di HBS contenenti l'antigene 2,4 di-

nitrofenolo coniugato a BSA (Sigma, Cat. No A-6661). Come controllo, in alcuni pozzetti sono stati aggiunti 100 μ l di HBS contenente 1% Triton X-100 per determinare la quantità totale di enzima contenuto nei granuli cellulari.

Dopo un'ulteriore incubazione a 37°C per due ore, 30 μ l di surnatante cellulare o di lisato cellulare sono stati trasferiti in una nuova micropietra dove erano stati precedentemente aggiunti 50 μ l di tampone sodio citrato a pH 4,5, contenente 4 mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma, Cat. No N9376), un substrato specifico per l'enzima β -esoso-aminidase. Dopo due ore di incubazione a 37°C la reazione è stata interrotta aggiungendo 100 μ l di una soluzione di glicina 0.2 M, pH 10.7. L'attività enzimatica è stata determinata misurando l'assorbanza a 405 nm con un lettore Microplate Reader Model 3550 EIA (Bio-Rad).

In esperimenti preliminari le immunoglobuline E e l'antigene sono stati aggiunti a differenti concentrazioni allo scopo di determinare le concentrazioni ottimali per indurre la reazione di rilascio enzimatico. Le condizioni individuate sperimentalmente corrispondono a 0,5 μ g/ml di IgE e 0,05 μ g/ml di antigene DNP coniugato a BSA.

Per verificare la capacità dei peptidi di formula IB e di confronto di inibire la degranulazione delle cellule RBL 2H3, i peptidi sono stati aggiunti nel saggio insieme all'antigene in concentrazioni tra 0,1 e 500 μ g/ml.

Il peptide di confronto è risultato in grado di ridurre il 50% della degranulazione cellulare alla concentrazione di 10 μ g/ml (4,6 μ M). Il peptide di formula IB è risultato in grado di ridurre il 50% della degranulazione cellulare già alla concentrazione di 1 μ g/ml (circa 0,3 μ M), mostrando un'attività circa 15 volte maggiore dell'attività del peptide di confronto. I risultati completi, espressi

come percentuale di inibizione della reazione di degranulazione, sono mostrati nella seguente Tabella 1.

TABELLA 1

Concentrazione del Peptide ($\mu\text{g/ml}$)	Peptide IB	Peptide di Confronto
0,1	20	0
1	76	40
10	80	49
50	82	59
100	85	62
500	90	70

Risultati analoghi ai risultati ottenuti con il peptide IB sono stati ottenuti con i seguenti peptidi:

ID (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Gly-Lys-OH

IF (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

ESEMPIO 4

Determinazione "in vivo" dell'attività anti-allergica del peptide di formula (IB) e del peptide di formula (H-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-Gly-OH (peptide di confronto) utilizzando come modello sperimentale animale l'anafilassi cutanea passiva in ratto.

L'anafilassi cutanea passiva nel ratto è stata indotta seguendo la procedura descritta da Ovary et al., 1952, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 3:293-301.

Fluido ascitico di ratto contenente IgE specifiche contro l'antigene ovalbumina è stato iniettato nel dorso rasato di ratti maschi della specie CD1 (Charles River, Italia). Sono state effettuate iniezioni intradermiche, del vo-

lume di 50 μ l, di fluido ascitico a diverse diluizioni (da 20 a 20.000 volte in PBS) permettendo alle IgE presenti nel fluido ascitico di legarsi agli Fc ϵ R delle mastcellule locali sensibilizzandole.

Il giorno successivo sono stati iniettati per via endovenosa 1 mg di ovalbumina ed il colorante Blu di Evans in concentrazione 2.0%, sciolti in 1 ml di PBS.

Dopo 30 minuti è stata osservata la comparsa, sul dorso dei ratti, di aree colorate nel derma (pomfi) la cui estensione e intensità di colorazione sono proporzionali alla quantità di IgE antigene-specifiche iniettate con il fluido ascitico. Nell'esperimento è stato introdotto un controllo negativo rappresentato dall'iniezione intradermica di 50 μ l di PBS senza fluido ascitico in corrispondenza della quale non è stata osservata la comparsa di colore. I ratti sono stati sacrificati ed è stata effettuata la valutazione comparativa delle dimensioni e dell'intensità di colorazione dei pomfi comparsi mediante un'analisi densitometrica di foto a colori acquisite sugli animali con un unico apparato fotografico, una unica pellicola e nelle stesse condizioni di tempi di esposizione, di luce e di orientazione. Le analisi densitometriche sono state condotte con l'ausilio del programma IMAGE PRO-PLUS (Media Cybernetics, Inc.).

In base ai risultati ottenuti nel saggio di legame lineare IgE-Fc ϵ R (assenza di inibitori), scegliendo come riferimento il valore di diluizione del fluido ascitico in corrispondenza del quale è stata osservata la reazione infiammatoria più intensa (il pomfo più intensamente colorato e di conseguenza il segnale massimo al densitometro) è stato effettuato un saggio d'inibizione della reazione allergica con l'utilizzo del peptide IB e del peptide di confronto.

Allo scopo, 25 μ l di fluido ascitico contenente IgE opportunamente diluito è stato incubato con 25 μ l di PBS contenente differenti dosi dei composti in esame (0,025, 0,25, 2,5, 25, 250 e 2500 μ g). Per ogni composto è stato impiegato un singolo ratto. Il dorso di ogni ratto è stato rasato e successivamente suddiviso in 8 sezioni tracciando dei segni per delimitare le zone in cui sono state effettuate le iniezioni. In ogni punto prescelto è stata somministrata intraderma la miscela (50 μ l) contenente il fluido ascitico e i composti alle varie dosi. È stato utilizzato come controllo positivo una iniezione di 25 μ l di fluido ascitico opportunamente diluito incubato con 25 μ l di PBS, e come controllo negativo, 50 μ l di PBS.

Dopo 24 ore, l'antigene è stato iniettato insieme al colorante Blu di Evans come precedentemente descritto e dopo trenta minuti, in corrispondenza dei punti di iniezione sul dorso dei ratti, è stata osservata la comparsa di pomfi colorati le cui intensità ed estensioni si presentavano decisamente inferiori in corrispondenza delle zone in cui erano state applicate concentrazioni più elevate di composti. Alle dosi più elevate (2500 μ g) non è stata osservata nessuna colorazione visibile ad occhio nudo.

Entrambi i peptidi hanno quindi mostrato un'attività anti-allergica dipendente dalle dosi somministrate. Il peptide di confronto è risultato in grado di inibire completamente la reazione infiammatoria alla dose di 25 μ g (corrispondente a 11,6 nM). Il peptide di formula IB è risultato in grado di inibire completamente la reazione infiammatoria alla dose di 2,5 μ g (circa 0,8 nM), mostrando un'attività circa 15 volte maggiore dell'attività del peptide di confronto. I risultati completi, espressi come percentuale di inibizione della reazione allergica cutanea (pomfo), sono mostrati nella seguente Tabella 2.

TABELLA 2

Dose del Peptide (µg/ml)	Peptide IB	Peptide di Confronto
	Inibizione Reazione Cutanea (%)	Inibizione Reazione Cutanea (%)
0,025	35	35
0,25	60	50
2,5	100	65
25	100	100
250	100	100
2500	100	100

Risultati analoghi ai risultati ottenuti con il peptide IB sono stati ottenuti con il seguente peptide:



ESEMPIO 5

Determinazione "in vivo" dell'attività anti-allergica del peptide di formula (IB) e del peptide di formula (H-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-Gly-OH (peptide di confronto) utilizzando come modello sperimentale animale l'anafilassi cutanea passiva sull'orecchio di topo.

L'anafilassi cutanea passiva sull'orecchio di topo è stata indotta seguendo la procedura descritta da Inagaki et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1985, 78:113-117.

Fluido ascitico di ratto contenente IgE specifiche contro l'antigene ovalbumina è stato iniettato nell'orecchio di topi femmine del ceppo Balb/c.. Sono state effettuate iniezioni intradermiche, del volume di 10 µl, di fluido ascitico a

diverse diluizioni (5-10-20 volte in PBS) permettendo alle IgE presenti nel fluido ascitico di legarsi agli Fc ϵ R delle mastcellule locali sensibilizzandole.

Dopo 48 ore, 0,25 mg di ovalbumina ed il colorante Blu di Evans in concentrazione 1.8%, sciolti in 70 μ l di PBS sono stati iniettati per via endovenosa.

Dopo 30 minuti è stata osservata la comparsa, sull'orecchio di topo, di aree colorate nel derma la cui estensione ed intensità di colorazione erano proporzionali alla quantità di IgE antigene-specifiche iniettate con il fluido ascitico. Nell'esperimento è stato introdotto un controllo negativo rappresentato dall'iniezione intradermica di 10 μ l di PBS senza fluido ascitico in corrispondenza della quale non è stata osservata la comparsa di colore. I topi sono stati sacrificati e le orecchie prelevate per effettuare l'estrazione e la misurazione del colorante fuoriuscito a livello della reazione cutanea. Ogni orecchio è stato disciolto in 0,5 ml di KOH 1M con una incubazione a 37°C prolungata per 16 ore. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 2 ml di una miscela composta da acido fosforico 0,6 M e acetone nel rapporto 5:13 (v:v). Il campione è stato quindi agitato e filtrato, ed infine la quantità di colorante è stata determinata con uno spettrofotometro mediante lettura a 620 nm.

In base ai risultati ottenuti nel saggio di legame lineare IgE-Fc ϵ R, scegliendo come riferimento il valore di diluizione del fluido ascitico in corrispondenza del quale è stata osservata la reazione infiammatoria più intensa, è stato effettuato un saggio d'inibizione della reazione allergica con l'utilizzo del peptide IB e del peptide di confronto.

Come precedentemente descritto, un gruppo di topi Balb/c è stato sotto-

posto ad una iniezione intraderma nel lobo dell'orecchio di 10 μ l di fluido ascitico, diluito 20 volte in PBS, per permettere alle IgE presenti nel fluido ascitico di legarsi agli Fc ϵ R delle mastcellule locali sensibilizzandole.

A distanza di due giorni, differenti quantità dei peptidi in esame sono state sciolte in 100 μ l di PBS e somministrate via intraperitoneo nei topi sensibilizzati. In particolare sono state utilizzate dosi corrispondenti a 0,5 – 1 – 5 – 10 – 50 mg di peptide per Kg di peso corporeo del topo. Come controllo negativo sono stati iniettati 100 μ l di PBS. Dopo 30 minuti i topi hanno ricevuto l'iniezione intravena della soluzione di ovalbumina e colorante Blu di Evans.

I risultati riportati in Tabella 3 ed espressi come percentuale di inibizione della reazione allergica cutanea, hanno mostrato che entrambi i peptidi hanno mostrato un'attività dose-dipendente.

Il peptide di confronto ha provocato un'inibizione del 50% della reazione allergica locale ad una dose pari a circa 7 mg/kg, mentre il peptide di formula IB ha indotto un'inibizione paragonabile alla dose di 1 mg/kg, mostrando quindi un'attività circa 7 volte maggiore dell'attività del peptide di confronto. I risultati completi, espressi come percentuale di inibizione della reazione allergica cutanea, sono mostrati nella seguente Tabella 3.

TABELLA 3

Dose del Peptide (mg/kg)	Peptide IB	Peptide di Confronto
	Inibizione Reazione Cutanea (%)	Inibizione Reazione Cutanea (%)
0,5	10	0
1,0	50	20

5,0	65	45
10,0	71	55
50,0	85	75

Risultati analoghi ai risultati ottenuti con il peptide IB sono stati ottenuti con il seguente peptide:

IF (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

ESEMPIO 6

Determinazione "in vivo" dell'attività anti-allergica del peptide di formula (IB) e del peptide di formula (H-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-)₄-L-Lys₂-L-Lys-Gly-OH (peptide di confronto) utilizzando come modello sperimentale animale l'anafilassi cutanea attiva sull'orecchio di topo.

L'anafilassi cutanea attiva sull'orecchio di topo è stata indotta seguendo la procedura descritta da Inagaki et al., Japan.J.Pharmacol. 1992, 59:201-208.

Topi femmine del ceppo Balb/c sono state immunizzate con l'antigene ovalbumina in presenza dell'adiuvante idrossido di alluminio in gel (alum). Le immunizzazioni sono state effettuate somministrando intraperitoneo 25 µg di ovalbumina e 1 mg di alum sciolti in 200 µl di PBS. Un gruppo di controllo ha ricevuto iniezioni intraperitoneo contenenti solo 1 mg di alum sciolti in 200 µl di PBS.

A distanza di due settimane, l'anafilassi cutanea attiva è stata provocata negli animali immunizzati iniettando nel derma dell'orecchio differenti dosi di ovalbumina (0,01 – 0,1 – 1 µg in 10 µl di PBS) e subito dopo iniettando endovena il colorante Blu di Evans (1,8% p/v in un volume di 70 µl) permettendo all'antigene di legarsi alle IgE specifiche già presenti sulle mastcellule locali, ed inducendo così la reazione infiammatoria locale.

Dopo 30 minuti è stata osservata la comparsa sull'orecchio del topo di aree colorate nel derma, la cui estensione ed intensità di colorazione erano proporzionali alla quantità di allergene iniettate. Nell'esperimento è stato introdotto un controllo negativo rappresentato dall'iniezione intradermica di 10 μ l di PBS senza ovalbumina, in corrispondenza della quale non è stata osservata la comparsa di colore. I topi sono stati sacrificati e le orecchie prelevate per effettuare l'estrazione e la misurazione del colorante fuoriuscito a livello della reazione cutanea. Ogni orecchio è stato disciolto in 0,5 ml di KOH 1M con una incubazione a 37°C prolungata per 16 ore. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 2 ml di una miscela composta da acido fosforico 0,6 M e acetone nel rapporto 5:13 (v:v). Il campione è stato quindi agitato e filtrato, ed infine la quantità di colorante è stata determinata con uno spettrofotometro mediante lettura a 620 nm.

In base ai risultati ottenuti nel saggio di legame lineare IgE-Fc ϵ R, scegliendo come riferimento il valore di concentrazione di allergene in corrispondenza del quale è stata osservata la reazione allergica più elevata, è stato effettuato un saggio d'inibizione della reazione allergica con l'utilizzo del peptide IB, con dosi di 10 e 100 mg/kg, e del peptide di confronto, con dosi di 5, 10, 50 e 100 mg/kg.

I peptidi sono stati somministrati via intraperitoneo in un gruppo di topi Balb/c e, dopo trenta minuti, è stata effettuata una iniezione intraderma nel lobo dell'orecchio di 0,1 μ g di ovalbumina in PBS, seguita dall'iniezione intravena della soluzione di colorante. L'estrazione e la quantizzazione del colorante Blu di Evans, fuoriuscito a livello della reazione infiammatoria locale, è stata effettuata come descritto precedentemente.

I risultati riportati in Tabella 4 ed espressi come percentuale di inibizione della reazione allergica cutanea, hanno mostrato che entrambi i peptidi, somministrati intraperitoneo 30 minuti prima di indurre le reazioni infiammatorie, hanno mostrato un'attività di riduzione delle reazioni allergiche locali in modo dose-dipendente.

In particolare, il peptide di confronto ha provocato un'inibizione superiore all'85% della reazione allergica locale ad una dose pari a 100 mg/kg, mentre il peptide di formula IB ha indotto un'inibizione paragonabile alla dose di 10 mg/kg, mostrando quindi un'attività circa 15 volte maggiore dell'attività del peptide di confronto. I risultati completi, espressi come percentuale di inibizione della reazione allergica cutanea, sono mostrati nella seguente Tabella 4.

TABELLA 4

Dose del Peptide (mg/kg)	Peptide IB Inibizione Reazione Cutanea (%)	Peptide di Confronto Inibizione Reazione Cutanea (%)
5	ND	14
10	86	30
50	ND	75
100	100	87

Risultati analoghi ai risultati ottenuti con il peptide IB sono stati ottenuti con il seguente peptide:



RIVENDICAZIONI

1. Un peptide comprendente la sequenza di formula:



dove:

X_1 è il residuo di un amminoacido, di un derivato di un amminoacido, di un acido carbossilico, o di un altro derivato in grado di legarsi covalentemente con il gruppo amminico dell'arginina, comprendente almeno un gruppo aromatico.

2. Un peptide di formula:



dove:

X_1 è il residuo di un amminoacido, di un derivato di un amminoacido, di un acido carbossilico, o di un altro derivato in grado di legarsi covalentemente con il gruppo amminico dell'arginina, detto residuo comprendente almeno un gruppo aromatico,

X_2 è un amminoacido, o una sequenza polipeptidica comprendente da 2 a 8 amminoacidi,

R è un residuo n-valente comprendente uno, due o tre amminoacidi,

m è 0 o 1,

n è un numero intero da 1 a 4, e

p è 0 o 1.

3. Il peptide della rivendicazione 1 o 2 caratterizzato dal fatto che X_1 è scelto nel gruppo che comprende i seguenti residui di un amminoacido: H-L-Tyr, H-D-Tyr, H-L-Phe, H-D-Phe, H-L-Trp, H-D-Trp, H-L-Phe, H-D-Phe, Ac-L-Tyr, Ac-D-Tyr, Ac-L-Phe, Ac-D-Phe, Ac-L-Trp, Ac-D-Trp, Ac-L-

Phe, Ac-D-Phe.

4. Il peptide della rivendicazione 1 o 2 caratterizzato dal fatto che X_1 è scelto nel gruppo che comprende i seguenti residui di derivati di amminoacidi : H-L-Cys(p-MeOBzl), H-L-Cys(p-MeBzl), H-L-Cys(Bzl), H-D-Cys(p-MeOBzl), H-D-Cys(p-Me-Bzl), H-D-Cys(Bzl), Ac-L-Cys(p-MeOBzl), Ac-L-Cys(p-Me-Bzl), Ac-L-Cys(Bzl), Ac-D-Cys(p-MeOBzl), Ac-D-Cys(p-Me-Bzl), Ac-D-Cys(Bzl), H-L-Arg(Mts), H-L-Arg(Tos), H-D-Arg(Mts), H-D-Arg(Tos), Ac-L-Arg(Mts), Ac-L-Arg(Tos), Ac-D-Arg(Mts), Ac-D-Arg(Tos), H-L-Trp(CHO), H-D-Trp(CHO), Ac-L-Trp(CHO), Ac-D-Trp(CHO), H-L-Tyr(Bzl), H-L-Tyr(2Cl-Bzl), H-D-Tyr(Bzl), H-D-Tyr(2Cl-Bzl), Ac-L-Tyr(Bzl), Ac-L-Tyr(2Cl-Bzl), Ac-D-Tyr(Bzl), Ac-D-Tyr(2Cl-Bzl), L-Ser(Bzl), D-Ser(Bzl), L-Thr(Bzl), D-Thr(Bzl), L-Asp(Bzl), D-Asp(Bzl), L-Glu(Bzl), D-Glu(Bzl), Ac-L-Ser(Bzl), Ac-D-Ser(Bzl), Ac-L-Thr(Bzl), Ac-D-Thr(Bzl), Ac-L-Asp(Bzl), Ac-D-Asp(Bzl), Ac-L-Glu(Bzl), Ac-D-Glu(Bzl).
5. Il peptide della rivendicazione 1 o 2 caratterizzato dal fatto che X_1 è scelto nel gruppo che comprende i seguenti residui di un acido carbossilico: naftilacetico, benzoico, 4-metossibenzoico, 2,4-diclorobenzoico, 2-nitrobenzoico, 4-clorobenzoico, fenilacetico, difenilacetico, (R)-2-fenilpropanoico, (S)-2-fenilpropanoico, (S)-3-fenilpropanoico, (R)-3-fenilpropanoico, (R,S)-2-metil,3-fenilbutanoico, (S,R)-2-metil,3-fenilbutanoico, (R,R)-2-metil,3-fenilbutanoico, (S,S)-2-metil-3-fenilbutanoico, (R,S)-2,3-difenilpentanoico, (R,R)-2,3-difenilpentanoico, (S,S)-2,3-difenilpentanoico, (S,R)-2,3-difenilpentanoico, acido mono-(9H-fluoren-9-il-metil)carbonico, acido monobenzilcarbonico, acido mono-(2-cloro-benzil)carbonico.
6. Il peptide della rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che X_2 è un

amminoacido scelto nel gruppo che comprende Lys, Orn, e Dap, o una sequenza polipeptidica comprendente da 2 a 8 amminoacidi rappresentata dalla formula:



dove q è un numero intero da 1 a 7,

A è Gly, Ala o, quando q è almeno 2, una sequenza polipeptidica comprendente Gly e Ala, e

B è Lys, Orn, o Dap,

7. Il peptide della rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che X₂ è una sequenza polipeptidica scelta nel gruppo comprendente: Gly-Lys, Gly-Orn, Gly-Dap, Ala-Lys, Ala-Orn, Ala-Dap, Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Dap, Gly-Ala-Lys, Gly-Ala-Orn, Gly-Ala-Dap, Ala-Gly-Lys, Ala-Gly-Orn, Ala-Gly-Dap, Ala-Ala-Lys, Ala-Ala-Orn, Ala-Ala-Dap, Gly-Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Gly-Dap, Ala-Ala-Ala-Lys, Ala-Ala-Ala-Orn, Ala-Ala-Ala-Dap, Gly-Gly-Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Gly-Gly-Dap, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Orn, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Dap, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Lys, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Orn, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Dap, Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Lys, Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Orn, Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Dap.
8. Il peptide della rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che n è uguale a due.
9. Il peptide della rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto che R è scelto nel gruppo che comprende lisina (Lys), ornitina (Orn), acido diamminopropionico (Dap) ed acido diamminobutirrico (Dab).
10. Il peptide della rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che n è uguale a

tre.

11. Il peptide della rivendicazione 10 caratterizzato dal fatto che R è scelto nel gruppo che comprende un dipeptide di formula (Lys-Lys), (Orn-Orn), (Dap-Dap) e (Dab-Dab).
12. Il peptide della rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che n è uguale a quattro.
13. Il peptide della rivendicazione 12 caratterizzato dal fatto che R è scelto nel gruppo che comprende un tripeptide ramificato di formula Lys(ϵ Lys)-Lys, Orn(δ Orn)-Orn, Dap(β Dap)-Dap, e Dab(γ Dab)-Dab, dove il residuo in parentesi è legato alla funzione amminica in posizione ϵ , δ , β o, rispettivamente, γ del residuo che lo precede.
14. Il peptide della rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che R è costituito dal tripeptide Lys(ϵ Lys)-Lys, X_1 è scelto nel gruppo che comprende un amminoacido acetilato ed un acido carbossilico, X_2 è costituito da L-Lys, e gli amminoacidi del tripeptide Arg-Thr-Tyr sono in configurazione D.
15. Il peptide della rivendicazione 1 o 2 caratterizzato dal fatto di essere scelto dal gruppo comprendente:
 - IA (H-D-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
 - IB (H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
 - IC (H-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
 - ID (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Gly-Lys-OH
 - IE H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-L-Orn-OH
 - IF (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH
 - IG H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-Gly-L-Ala-Gly-L-Ala-Gly-L-

Lys-OH

IH (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Lys-Lys*(CO-L-Tyr-L-Thr-L-Arg-L-Cys(p-MeOBzl))-OH

IL (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Orn₂-L-Orn-L-Orn-OH

IM (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-Orn-Gly-OH

IN (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Orn₂-L-Orn-L-Orn-OH

IO (H-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₂-L-Orn-L-Orn*(CO-L-Tyr-L-Thr-L-Arg-L-Cys(p-MeOBzl))-OH

IP (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

IQ (Ac-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

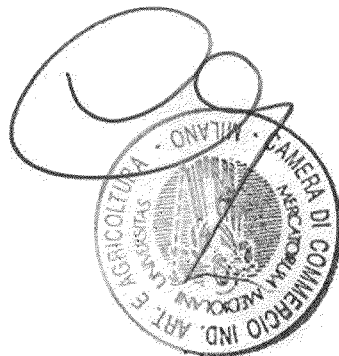
IR (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-L-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-NH₂

IS (Ac-D-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-L-Thr-D-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-NH₂

IT (Ac-D-Cys(p-MeOBzl)-L-Arg-D-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

IU (Ac-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-L-Tyr)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH

16. Una composizione farmaceutica comprendente una dose biologicamente efficace di un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15 ed almeno un ingrediente inerte farmaceuticamente accettabile.
17. Uso di un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15 per la fabbricazione di una composizione farmaceutica per il trattamento di malattie allergiche.

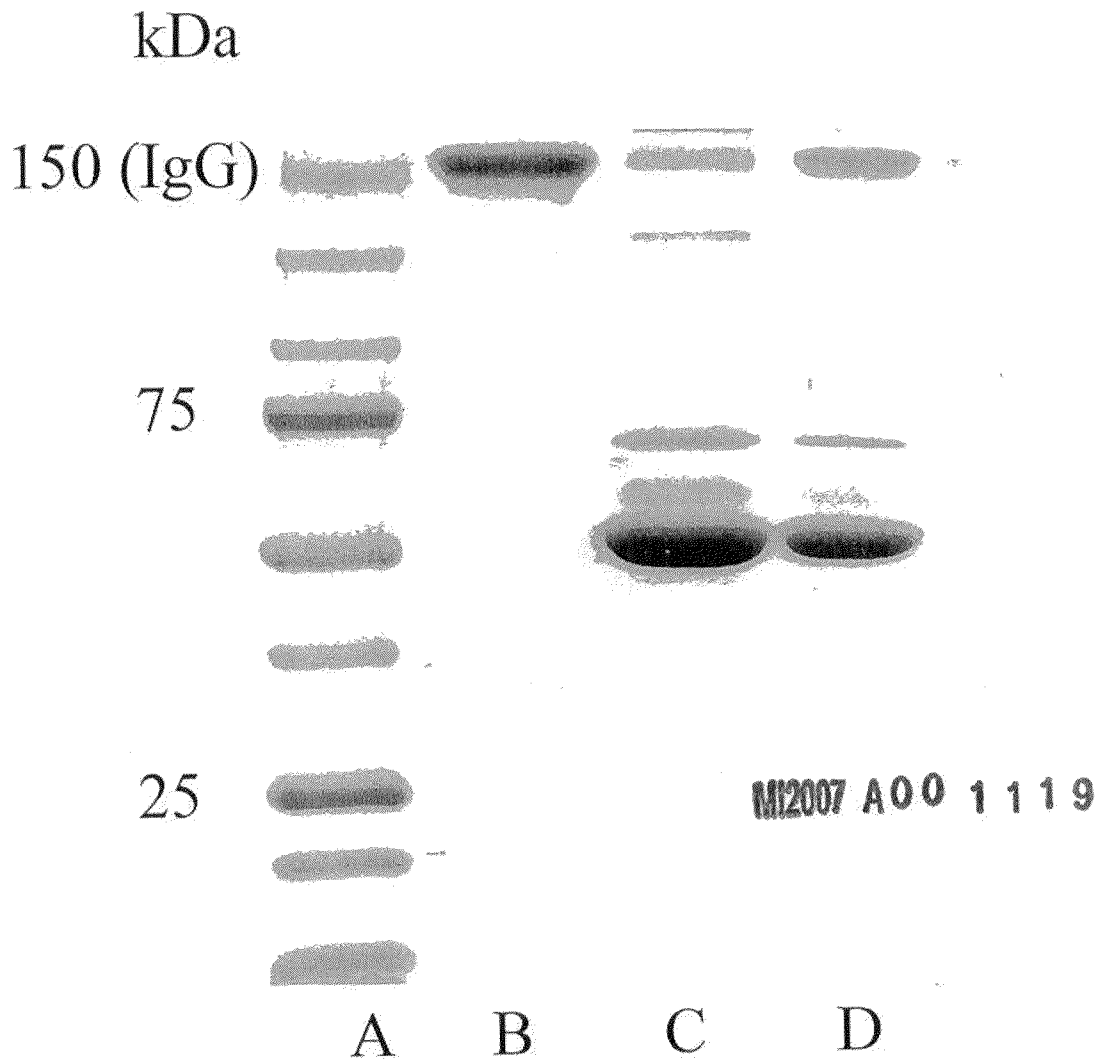


Massimo Marchi

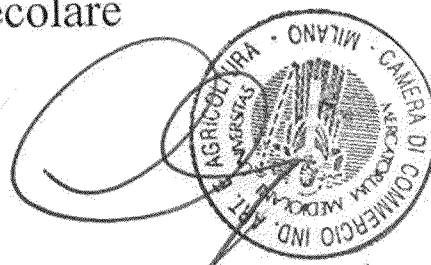
Dr. Massimo MARCHI

Fig. 1:

Analisi mediante SDS-PAGE delle frazioni ottenute dalla purificazione di Siero di coniglio sulla resina descritta nell'esempio 2



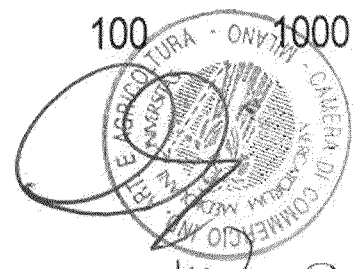
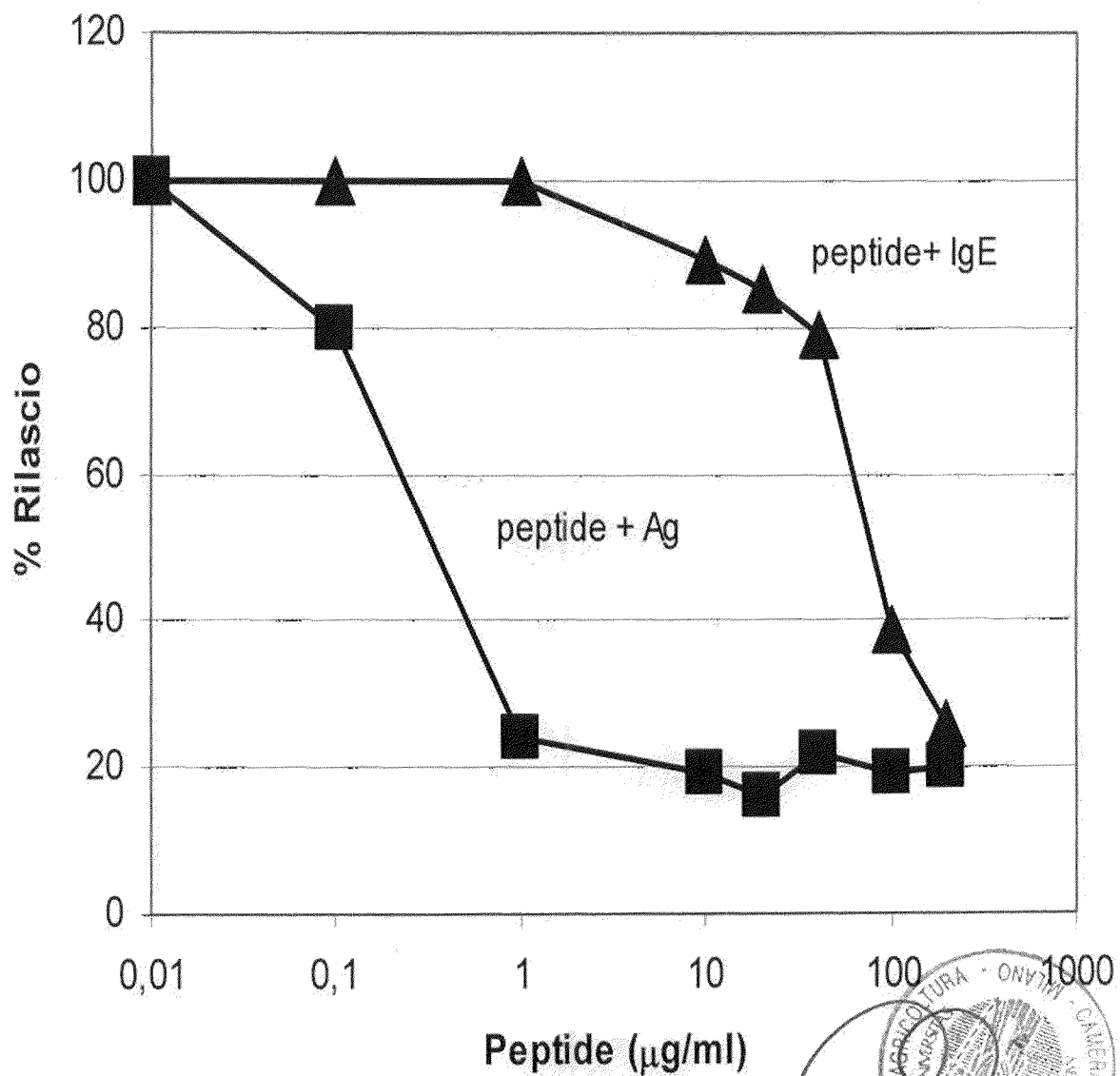
- A: Standard di peso molecolare
 B: Materiale legato
 C: Materiale non legato
 D: Siero di Coniglio



Dr. Massimo MARCHI

Fig. 2:

Inibizione del rilascio dell' enzima β -esossaminidase nelle cellule RBL2H3 ad opera del peptide (H-L-Cys(p-MeOBzl)-D-Arg-D-Thr-D-Tyr-CO)₄-L-Lys₂-L-Lys-L-Lys-OH



Dr. Massimo MARCHI