



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: A 61 K 37/64

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(11)

635 514

<p>(21) Gesuchsnummer: 5179/77</p> <p>(22) Anmeldungsdatum: 26.04.1977</p> <p>(30) Priorität(en): 30.04.1976 DE 2619246</p> <p>(24) Patent erteilt: 15.04.1983</p> <p>(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.04.1983</p>	<p>(73) Inhaber: Bayer Aktiengesellschaft, Leverkusen (DE)</p> <p>(72) Erfinder: Dr. Eugen Schnabel, Wuppertal 1 (DE) Prof. Dr. Horst Dieter Schlumberger, Wuppertal 2 (DE) Dr. Gerd Reinhardt, Wuppertal 1 (DE) Dr. Ernst Truscheit, Wuppertal 1 (DE) Dr. Harald Tschesche, Gröbenzell (DE)</p> <p>(74) Vertreter: E. Blum & Co., Zürich</p>
---	---

(54) Verfahren zur Herstellung neuer Desamino-Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors.

(57) Es werden neue Desaminoderivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) aus Rinderorganen, deren Tyrosinreste 10 und/oder 21 in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe gegebenenfalls Nitro- und/oder Nitrosogruppen tragen oder Desamidoderivaten des BPTI und welche neben den inhibitorischen Wirkungen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) zusätzlich eine Elastasehemmung aufweisen und welche im Molekül 0 bis 3 Lysinreste und/oder 3 bis 6 Argininreste und/oder 2 bis 4 Tyrosinreste enthalten, hergestellt. Diese Derivate werden erhalten, indem man den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI), ein Nitroderivat des BPTI oder ein Desamidoderivat des BPTI in saurer Lösung bei pH 2 bis 7 mit einer salpetrigen Säure bzw. Nitrosylionen liefernden Verbindung in wässriger Lösung bei Temperaturen zwischen -20°C und +30°C umsetzt und die bei der Umsetzung in saurer Lösung erhaltenen Reaktionsprodukte fraktioniert. Bei einem weiteren Verfahren zur Herstellung dieser Desaminoderivate setzt man den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI) ein Nitroderivat des BPTI oder ein Desaminoderivat des BPTI bei pH 1 bis 12 mit Diazonium-Verbindungen bei Temperaturen zwischen -20°C und +30°C um und bei der Umsetzung in alkalischer Lösung erhaltenen Reaktionsprodukte werden fraktioniert.

Die erhaltenen Verbindungen können zur Behandlung von Krankheiten, die durch eine Überproduktion von Proteasen ausgelöst werden, verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von neuen Desamino-Derivaten des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) aus Rinderorganen, deren Tyrosinreste 10 und/oder 21 in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe gegebenenfalls Nitro- und/oder Nitrosogruppen tragen oder Desamidoderivaten des BPTI und welche neben den inhibitorischen Wirkungen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) zusätzlich noch eine Elastasehemmung aufweisen und welche im Molekül 0 bis 3 Lysinreste und/oder 3 bis 6 Argininreste und/oder 2 bis 4 Tyrosinreste enthalten, dadurch gekennzeichnet, dass man den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI), ein Nitroderivat des BPTI oder ein Desamidoderivat des BPTI in saurer Lösung bei pH 2 bis 7 mit einer salpetrigen Säure bzw. Nitrosylionen liefernden Verbindung in wässriger Lösung bei Temperaturen zwischen -20 und $+30^{\circ}\text{C}$ umsetzt und die bei der Umsetzung in saurer Lösung erhaltenen Reaktionsprodukte fraktioniert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in Gegenwart nucleophiler Reagenzien umsetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung unter Schutzgas-Atmosphäre durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung unter Evakuierung durchführt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in wässriger Lösung im Gemisch mit organischen Lösungsmitteln durchführt.

6. Verfahren zur Herstellung von neuen Desamino-Derivaten des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen, deren Tyrosinreste 10 und/oder 21 in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe gegebenenfalls Nitrogruppen tragen oder Desamidoderivate des BPTI und welche neben den inhibitorischen Wirkungen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) zusätzlich noch eine Elastasehemmung aufweisen und welche im Molekül 0 bis 3 Lysinreste und/oder 3 bis 6 Argininreste und/oder 2 bis 4 Tyrosinreste enthalten, dadurch gekennzeichnet, dass man den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI), ein Nitroderivat des BPTI oder ein Desamidoderivat des BPTI bei pH 1 bis 12 mit Diazonium-Verbindungen bei Temperaturen zwischen -20 und $+30^{\circ}\text{C}$ umsetzt und die bei der Umsetzung in alkalischer Lösung erhaltenen Reaktionsprodukte fraktioniert.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung neuer Desamino-Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) aus Rinderorganen, welcher im folgenden BPTI genannt wird (Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor [Kunitz]), deren Tyrosinreste 10 und/oder 21 in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe gegebenenfalls Nitro- und/oder Nitrosogruppen tragen oder Desamidoderivaten des BPTI und welche neben den inhibitorischen Wirkungen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) zusätzlich noch eine Elastasehemmung aufweisen und welche im Molekül 0 bis 3 Lysinreste und/oder 3 bis 6 Argininreste und/oder 2 bis 4 Tyrosinreste enthalten. Die Derivate sind ganz oder teilweise desamidiert.

Das erste erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung dieser Derivate ist dadurch gekennzeichnet, dass man den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI), ein Nitroderivat des BPTI oder ein Desamidoderivat des BPTI in saurer Lösung bei pH 2 bis 7 mit einer salpetrigen Säure

bzw. Nitrolyonen liefernden Verbindung in wässriger Lösung bei Temperaturen zwischen -20 und $+30^{\circ}\text{C}$ umsetzt und die bei der Umsetzung in saurer Lösung erhaltenen Reaktionsprodukte fraktioniert.

Das zweite erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von neuen Desamino-Derivaten des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen, deren Tyrosinreste 10 und/oder 21 in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe gegebenenfalls Nitrogruppen tragen oder Desamidoderivate des BPTI und welche neben den inhibitorischen Wirkungen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) zusätzlich noch eine Elastasehemmung aufweisen und welche im Molekül 0 bis 3 Lysinreste und/oder 3 bis 6 Argininreste und/oder 2 bis 4 Tyrosinreste enthalten, ist dadurch gekennzeichnet, dass man den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI), ein Nitroderivat des BPTI oder ein Desamidoderivat des BPTI bei pH 1 bis 12 mit Diazonium-Verbindungen bei Temperaturen zwischen -20 und $+30^{\circ}\text{C}$ umsetzt und die bei der Umsetzung in alkalischer Lösung erhaltenen Reaktionsprodukte fraktioniert.

Diese neuen, erfindungsgemäßen erhaltenen Desamino-Derivate des BPTI hemmen nicht nur wie BPTI die Enzyme, Chymotrypsin, Katherpsin G, Plasmin, Trypsin und Kininogenine (Kininogenasen), sondern zusätzlich auch Elastasen, z. B. aus Pankreas oder Granulozyten. Sie sind deshalb als Arzneimittel zur Therapie von Erkrankungen verwendbar, die ausgelöst werden entweder durch eine Überproduktion von Proteasen infolge einer erhöhten Freisetzung aus den Zymogenen bzw. einer Ausschüttung beim Zellzerfall oder aber durch einen Mangel bzw. ein Fehlen von natürlichen, körpereigenen Inhibitoren dieser Enzyme in Organen und Gewebsflüssigkeiten. Erkrankungen mit derartiger Ätiologie sind die verschiedenen Formen des Schocks und posttraumatische oder postoperative Komplikationen, Störungen der Blutgerinnung, akute und chronische Entzündungsreaktionen, insbesondere auch chronische Entzündungsreaktionen mit nekrotischen und degenerativen Bindegewebschädigungen, wie Pankreatitis sowie durch Immunkomplexe bedingte Vasculitiden, Glomerulonephritiden, rheumatoide Arthritis und andere Collagenosen sowie durch stoffwechselbedingte Ablagerungen verursachte Arthritiden (Gicht), aber auch degenerative Veränderungen der elastischen Elemente von Gefäßwänden (Atherosklerose) oder der Lunge (Lungenemphysem). Es ist bereits bekanntgeworden, dass BPTI [H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, Z. Physiol. Chem. 189, 97 (1930)], auch als Kunitz-Inhibitor bezeichnet [M. Kunitz, H. H. Northrop, J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)], eine Reihe von physiologisch bedeutsamen Enzymen, wie z. B. Kininogenine (Kininogenasen), Plasmin, Chymotrypsin und Trypsin hemmt (E. Werle in W. Brendel, G. L. Haberland: Neue Aspekte der Trypsin-Therapie 5, 9, F. K. Schattauer-Verlag Stuttgart-New York 1972; H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit (Hrsg.): Proteinase Inhibitors (Bayer Symposium V), Proc. 2nd International Research Conference, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974). BPTI wird als Aprotinin (generic name) zur Therapie und Prophylaxe von Schockzuständen sowie zur Prophylaxe postoperativer und posttraumatischer Komplikationen eingesetzt.

Es ist weiterhin bekannt, dass Proteine durch salpetrige Säure desaminiert werden [L. A. Cohen, Ann. Rev. Biochemistry 37, 695 (1968)]. Dabei kann zusätzlich Tyrosin durch elektrophile Substitution mit dem Nitrylkation in 3-Stellung nitriert bzw. mit dem Nitrosylierung nitrosiert [O. Wagner, E. Irion, A. Arens und K. Bauer, Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 383 (1969)] werden. Es ist zudem bekannt, dass man BPTI bei pH 5,0 mit salpetriger Säure desaminieren kann [F. A. Anderer und S. Hörnle, Ann. New

York Acad. Sci. 146, 381 (1968)]. In Abhängigkeit von der Reaktionszeit verringert sich nach dieser Arbeit der Anteil des Tyrosins, und Lysin wird völlig abgebaut, während Arginin nicht angegriffen wird. Weiterhin geht parallel zur Abnahme des Lysingehaltes die inhibitorische Wirkung völlig verloren. Experimentelle Einzelheiten sind in dieser Arbeit nicht beschrieben.

Das erste erfindungsgemässe Verfahren kann in Gegenwart nucleophiler Reagenzien durchgeführt werden. Man arbeitete bevorzugt unter einer Schutzgas-Atmosphäre oder unter Evakuierung und die Umsetzung kann in wässriger Lösung im Gemisch mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

Weiterhin wurde gefunden, dass die neuen Desamino-Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen (BPTI) neben der an sich bekannten Hemmwirkung des BPTI zusätzlich noch eine Elastasehemmung aufweisen.

Überraschenderweise besitzen die erfindungsgemäss erhaltenen Desamino-Derivate des BPTI eine starke inhibitorische Wirkung und zusätzlich zu den bekannten Hemmwirkungen des BPTI auch noch eine wertvolle Elastasehemmung. Dies ist umso überraschender als nach dem Stand der Technik [F. A. Anderer und S. Hörnle, Ann. New York Acad. Sci. 146, 381 (1968)] nach einer Desaminierung mit salpetriger Säure die inhibitorische Wirkung verlorengehen sollte.

Es wurde weiterhin überraschend gefunden, dass bei der erfindungsgemässen Desaminierungsreaktion von BPTI und seinen Derivaten, auch unter den von Anderer und Hörnle [Ann. New York Acad. Sci. 146, 381 (1968)] angegebenen pH-Wert-Bedingungen, Desamino-Derivate erhalten werden, die im Gegensatz zu den von Anderer und Hörnle (s. o.) beschriebenen noch inhibitorisch aktiv sind. Alle erfindungsgemäss hergestellten Desamino-Derivate hemmen im Gegensatz zu BPTI Elastasen aus Pankreas und Granulozyten. Gegenüber anderen Proteasen wie Chymotrypsin, Pankreas-Kallikrein, Plasma-Kallikrein, Kathepsin G, Plasmin und Trypsin unterscheiden sich die Hemmspektren der einzelnen Derivate qualitativ und/oder quantitativ von dem des BPTI. Bei der Elastasehemmung handelt es sich nicht um die von Pütter und Schmidt-Kastner [Biochim. Biophys. Acta 127, 538 (1966)] beschriebene Blockierung des Substrats, die nur bei sehr hohen BPTI-Konzentrationen erfolgt, sondern um eine Hemmung des Enzyms.

Diese Elastase-Hemmwirkung ist umso überraschender, als aus dem derzeitigen Stand der Technik folgt [D. M. Blow, C. S. Wright, D. Kukla, A. Rühlmann, W. Steigemann und R. Huber, J. Mol. Biol. 69, 137 (1972); R. Huber, D. Kukla, W. Steigemann, J. Deisenhofer und A. Jones in H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proteinase Inhibitors (Bayer-Symposium V) Proc. 2nd Intern. Res. Conference, S. 484, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974], dass BPTI substratartig mit seinem aktiven Zentrum (Lysin-15-Rest) in die Spezifitätstasche der hemmbaren Enzyme eingelagert wird und damit die Enzymaktivität blockiert. Selbst wenn die Seitenkette des Lysin-15-Restes bei allen erfindungsgemäss herstellbaren Derivaten desaminiert ist, ist nach dem derzeitigen Wissensstand nicht zu erwarten, dass sie in die relativ kleine Spezifitätstasche der Elastasen [D. Shotton in H. Fritz und H. Tschesche (Hrsg.), Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, S. 47, Walter de Gruyter, Berlin-New York (1971)] hineinpasst.

Ausserdem erhält man bei der Umsetzung gemäss dem zweiten Verfahren bei pH 1 bis 12 überraschenderweise nicht, wie nach den Angaben der Literatur zu erwarten war [L. A. Cohen, Ann. Rev. Biochemistry 37, 695 (1968)], Azoderivate des BPTI, sondern farblose Verbindungen mit, nach

den Resultaten der Aminosäureanalyse, reduziertem Gehalt an Lysin und Arginin, nicht jedoch an Tyrosin (vgl. Tabelle 2). Dies ist umso erstaunlicher, als die im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Diazoniumverbindungen mit Acyl-Tyrosin-Derivaten unter analogen Reaktionsbedingungen zu intensiv gefärbten Azoderivaten kuppeln. So wird das Diazoniumtetrazol wegen seiner Spezifität für Histidin und Tyrosin in der Literatur [H. Horinishi, Y. Hachimori, K. Kurihara und K. Shibata, Biochim. Biophys. Acta 86, 477 (1964)] besonders für die quantitative Bestimmung dieser Reste in Proteinen empfohlen.

Aus den Absorptionsspektren (siehe Fig. 1) ist ersichtlich, dass weder Kupplung an Tyrosinresten zu Azoderivaten noch mit der freien terminalen Aminogruppe oder mit den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste zu den ebenfalls farbigen Triazenen [H. G. Higgins und K. J. Harrington, Arch. Biochem. Biophys. 85, 409 (1959)] erfolgte. Bei der Umsetzung des BPTI oder seiner Derivate mit den genannten Diazoniumverbindungen entstehen vorwiegend Desamino-Derivate des BPTI mit relativ wenig verminderten Lysin- und Arginingehalten (vgl. Tabelle 2, Beispiele 18 und 20).

Die erfindungsgemäss erhaltenen Desamino-BPTI-Derivate sind in Modellen der akuten Entzündungsreaktion dem BPTI überlegen, da mit ihnen nicht nur in deutlich geringeren Dosierungen die gleiche Wirkung wie mit BPTI erreicht wird, sondern die Entzündungsreaktion auch dann signifikant gehemmt wird, wenn sie mehrere Stunden nach Setzen der Entzündungsnoxe verabreicht werden. Eine solche therapeutische Wirkung ist mit BPTI im Kaolin- und Aerosilmodell bei einmaliger Gabe nicht zu erreichen (Näheres dazu siehe im experimentellen Teil der Anmeldung).

Diese im Vergleich zu BPTI veränderte Wirkung und Wirksamkeit der erfindungsgemäss erhaltenen neuen Desamino-BPTI-Derivate ist auf das veränderte Hemmspektrum und andere veränderte Eigenschaften, wie grössere Verweildauer und Wirkungszeit im Körper der Versuchstiere zurückzuführen. Die genannten BPTI-Derivate sind deshalb biologisch deutlich vom BPTI abzugrenzen.

Die erfindungsgemäss hergestellten Desamino-BPTI-Derivate haben gegenüber dem BPTI überlegene biologische Eigenschaften. Von besonderem Vorteil sind ihre inhibitorischen Wirkungen auf die Elastasen aus Pankreas und Granulozyten, die neue therapeutische Einsatzmöglichkeiten eröffnen. Pankreas-Elastase spielt eine wichtige Rolle bei der Pankreatitis [M. C. Geokas, H. Rinderknecht, V. Swanson, B. P. Vitron und B. J. Haverback, Clin. Res. 16, 285 (1968)]; Serum-Elastase bei der Atherosklerose [U. Butturini und M. Langen, Klin. Wochenschr. 40, 472 (1962)] und Granulozyten-Elastase bei akuten und chronischen Entzündungen mit Bindegewebschädigung [A. Janoff, Amer. J. Pathol. 68, 579 (1972)], bei Gefässwandschädigungen [A. Janoff und J. D. Zeligs, Science 161, 702 (1968)] sowie bei nekrotisierenden Erkrankungen und Degeneration von Lungengewebe, z. B. beim Emphysem [G. M. Turino, R. M. Senior, B. D. Garg, S. Keller, M. M. Levi und I. Mandl, Science 165, 709 (1969); H. E. Evans, M. M. Levi und I. Mandl, Amer. Rev. Respir. Dis. 101, 359 (1970) sowie A. Janoff, R. A. Sandhaus, V. D. Hospelhorn und R. Rosenberg, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140, 516 (1972)]. Ebenso wichtig ist die Rolle von lysosomalen Enzymen und insbesondere der Granulozyten-Elastase bei immunologisch bedingten Entzündungsreaktionen [M. Koono, M. Muto und H. Hayashi, Tohoku J. Exptl. Med. 94, 231 (1968)], z. B. der rheumatoiden Arthritis [G. Weissmann und J. Spilberg, Arthritis Rheumat. 11, 162 (1968)].

Die Bereitstellung der neuen erfindungsgemäss herstellbaren Desamino-Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors

aus Rinderorganen (BPTI) stellt somit eine grosse Bereicherung der Pharmazie dar.

Die Umsetzung des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen (BPTI), von Nitroderivaten des BPTI oder von Desamidderivaten des BPTI in saurer Lösung gemäss dem ersten Verfahren kann sowohl im homogenen als auch im heterogenen System erfolgen. Auch unter Bedingungen, unter denen die Konformation des Inhibitors beeinflusst wird, z. B. in Gegenwart von Dimethylsulfoxid, kann die Umsetzung durchgeführt werden. Es ist vorteilhaft, den Inhibitor in Konzentrationen von 0,1–10%, vorzugsweise 0,2–5% einzusetzen. Es sind aber auch höhere Inhibitor-Konzentrationen möglich. Zur Umsetzung kann man das Nitrosylion aus dem Donator mit organischen Säuren, vorzugsweise Essigsäure, freisetzen. Geeignet sind aber auch z. B. Ameisensäure, Zitronensäure, Trifluoressigsäure, p-Toluolsulfonsäure. Weiterhin eignen sich auch anorganische Säuren, z. B. Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure. Die Freisetzung des Nitrosylions kann im gepufferten oder ungepufferten Milieu erfolgen. Als Donatoren der salpetrigen Säure bzw. des Nitrosylions sind Salze der salpetrigen Säure, insbesondere die Alkalinitrite, geeignet; weiterhin gemischte Anhydride, wie Nitrosylchlorid oder Nitrosylschwefelsäure oder organische Derivate der salpetrigen Säure, wie z. B. die Alkylester, insbesondere Äthylnitrit, tert. Butylnitrit oder Isoamyl-nitrit. Zur Umsetzung kann man sowohl zum Gemisch aus Inhibitor und Säure bzw. saurer Lösung das das Nitrosylion liefernde Agens zufügen als auch die Säure bzw. saure Lösung zum Gemisch aus Inhibitor und dem Nitrosyl-Ionen-Donator zugeben. Es ist unter Umständen vorteilhaft, die Reaktion in Gegenwart von Zusatzstoffen, wie Guanidinhydrochlorid, Harnstoff oder anderen Säureamiden und/oder Netzmitteln durchzuführen.

Bei der Umsetzung kann neben der Desaminierung der Lysin- und Argininreste auch eine Nitrosierung der Tyrosinreste erfolgen. Schliesst man während der Umsetzung und/oder der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches Sauerstoff nicht aus, so erfolgt darüber hinaus noch eine Nitrierung der Tyrosinreste, deren Ausmass von den Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen abhängt, was durch Messung der Extinktion der Reaktionsprodukte bei 425 nm bestimmt werden kann. Nitro-Derivate des desaminierten Inhibitors werden auch erhalten, wenn man bei der Desaminierungsreaktion von Nitro-Derivaten des BPTI [B. Meloun, I. Frič und F. Šorm, *Europ. J. Biochem.* 4, 112 (1968)], die auch desamidiert sein können, ausgeht.

Die Nitrierung lässt sich verhindern, wenn man die Desaminierungs-Reaktion und die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches unter Schutzgas oder unter Evakuierung durchführt. Das Schutzgas ist bei der Aufarbeitung entbehrlich, wenn man den pH-Wert des Reaktionsgemisches nach der Umsetzung auf 7,5–12, vorzugsweise auf 8,0–10,5 einstellt.

Als Zusätze zum Zurückdrängen der elektrophilen Nitrierung und/oder Nitrosierung der Tyrosinreste während der Desaminierungs-Reaktion sind Verbindungen geeignet, die – wie z. B. Phenol – stärker nucleophil sind als die phenolische Gruppe der Tyrosinreste [O. Wagner, E. Irion, A. Arens und K. Bauer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37, 383 (1969)].

Bei den Umsetzungen resultieren Gemische verschiedener Komponenten. Die Zusammensetzung der Gemische ist von den Reaktionsbedingungen abhängig und kann über die Konzentration der Reaktionspartner, die Acidität des Mediums, die Temperaturführung und die Reaktionsdauer sowie durch Zusätze von Denaturierungs- und Schutzstoffen gesteuert werden. Die Gemische lassen sich durch Ionenaustauschchromatographie auftrennen. So bilden sich beispiels-

4

weise bei der Desaminierung von BPTI mit Natriumnitrit in essigsaurer Lösung unter den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen nach einer Reaktionsdauer von 1 oder 24 Std. Gemische, die durch Ionenaustauschchromatographie an Sulfopropylgruppen enthaltenden Gelen aus vernetztem Dextran in mehrere Komponenten aufgetrennt werden können. Die Lysin- und Arginingehalte einzelner Komponenten sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Lysin- und Arginingehalte von BPTI und Desamino-BPTI-Derivaten, die nach unterschiedlicher Reaktionsdauer erhalten wurden.

15 Substanz	Reaktionsdauer (Std.)	Lysinreste/Inhib. (Mol/Mol)	Argininreste/Inhib. (Mol/Mol)
BPTI (nativ)	–	4	6
20 Komponente I	1	0	4
Komponente II		1	5
Komponente III		2	5
Komponente IV		3	5
25 Komponente I'	24	0	3
Komponente II'		0	4
Komponente III'		0	5
Komponente IV		1	5

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, sind im Gegensatz zu den Angaben von Anderer und Hörnle [Ann. New York Acad. Sci. 146, 381 (1968)] auch die Arginingehalte der Desaminierungsprodukte vermindert.

Zum zweiten beschriebenen Verfahren (Umsetzung mit Diazonium-Salzen) ist folgendes zu bemerken:

Neuartige Desaminoverbindungen des BPTI werden erfindungsgemäss auch erhalten, wenn man den Inhibitor oder seine Derivate bei pH-Werten zwischen 1 und 12, vorzugsweise bei pH 5,0–11,5 mit solchen Diazoniumverbindungen, die mit BPTI unter den üblichen Bedingungen [vgl. K. H. Schündehütte in *Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl) Band 10, 3, 213, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1965, E. Müller, O. Bayer, H. Meerwein und K. Ziegler (Hrsg.)] praktisch keine Kupplungsreaktionen eingehen, umsetzt. Für die Umsetzung geeignete Diazoniumsalze können durch Diazotierung von vorzugsweise heterocyclischen Aminen, z. B. 3-Amino-1,2,4-triazol oder 5-Aminotetrazol erhalten werden. Die Diazoniumsalze werden gewöhnlich dabei in 1- bis 20fach molarer Menge, bezogen auf BPTI bzw. seine Derivate, eingesetzt, vorzugsweise 2 bis 10 Mole pro Mol Inhibitor. Die Umsetzungen werden bei Temperaturen von –20 bis +30 °C durchgeführt, vorzugsweise zwischen 0 und 10 °C.

Die Konzentrationen an BPTI bzw. Derivaten können dabei bis zu 50%, vorzugsweise 5–20%, betragen. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches liegt zwischen pH 1 und pH 12, vorzugsweise zwischen pH 5 und pH 11 und wird vorzugsweise durch Versetzen des Reaktionsgemisches mit Basen, wie z. B. Alkalimetall- oder Erdalkalimetall-hydroxiden, -carbonaten, -hydrogencarbonaten, tertiären Aminen (Diäthylamin), N-Methylmorpholin, Triäthylanolamin, eingestellt.

Nitro-Derivate des desaminierten Inhibitors werden erfindungsgemäss auch erhalten, wenn man bei der Umsetzung mit Diazoniumverbindungen von Nitro-Derivaten des BPTI [B. Meloun, I. Frič und F. Šorm, *Europ. J. Biochem.* 4, 112 (1968)], die auch desamidiert sein können, ausgeht.

Aus den Absorptionsspektren (Fig. 1) ist ersichtlich, dass weder Kupplung an Tyrosinresten zu Azoderivaten noch mit der freien terminalen Aminogruppe oder mit den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste zu den ebenfalls farbigen Triazenen [H.G. Higgins und K.J. Harrington, Arch. Biochem. Biophys. 85, 409 (1959)] erfolgte. Bei der Umsetzung des BPTI oder seiner Derivate mit den im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Diazoniumverbindungen entstehen vorwiegend Desamino-Derivate des BPTI mit relativ wenig verminderten Lysin- und Arginingehalten (vgl. Tabelle 2, Beispiele 18 und 20).

In Fig. 1 sind die Spektren einiger Desaminoderivate von BPTI in 0,1M Trispuffer, pH 8,0 gegenübergestellt.

Kurve A entspricht $1,44 \cdot 10^{-4}$ molarer Lösung BPTI,
Kurve B entspricht $1,20 \cdot 10^{-4}$ molarer Lösung des Umsetzungsproduktes von BPTI mit diazotiertem Aminotetrazol nach Beispiel 18,

Kurve C entspricht $0,8 \cdot 10^{-4}$ molarer Lösung des Reaktionsproduktes von BPTI und salpetriger Säure nach Beispiel 2,

Kurve D entspricht $1,05 \cdot 10^{-4}$ molarer Lösung des Umsetzungsproduktes aus BPTI und salpetriger Säure nach Beispiel 1.

Die Ordinate ist ein Mass für die Extinktion und die Abszisse zeigt die Wellenlänge in nm an.

Tabelle 2

Bei der Aminosäureanalyse von einigen Desamino-BPTI-Derivaten ermittelte Gehalte an charakteristischen Aminosäuren

Bezeichnung der Substanz	Herstellung, beschrieben in Beispiel	Mol Glycin ²	Aminosäure-Rest/Mol BPTI-Derivate ¹ Alanin ²	Tyrosin	Lysin	Arginin
BPTI ³		6,09	6,00	3,80	4,08	6,01
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. A		6,18	6,66	2,11	0,27	3,51
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. B		6,08	6,35	2,83	0	4,27
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. C	1	6,19	6,80	2,61	0	3,95
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. D		6,81	5,81	2,53	0,18	4,44
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. E		6,58	6,24	3,32	0	4,40
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. F		6,31	5,92	2,98	0,25	4,50
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. A		6,32	6,08	3,51	0,30	3,61
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. B		5,98	5,61	3,76 ⁴	0,26	3,84
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. C		6,01	5,62	4,55 ⁴	0,21	4,81
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. D	2	6,49	5,93	3,74	0,14	4,64
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. E		6,82	5,58	4,72 ⁴	1,06	4,88
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. F		6,53	5,58	3,71	0,92	3,92
Desamino-BPTI-Derivat	4	5,95	6,65	4,08 ⁴	1,68	4,59
Desamino-BPTI-Derivat	5	5,68	5,95	4,36 ⁴	0,51	5,69
Desamino-BPTI-Derivat	6	6,00	6,45	1,26	0,13	4,39
Desamino-BPTI-Derivat	7	5,31	5,89	2,77	3,45	4,33
Desamino-BPTI-Derivat	13	5,80	6,25	2,65	2,47	5,42
Desamino-BPTI-Derivat	14	6,17	5,87	1,28	0,53	4,71
Desamino-BPTI-Derivat	18	6,01	6,12	3,90	2,62	5,02
Desamino-BPTI-Derivat	20	5,83	6,02	4,16	2,02	5,16

¹ Das Molekulargewicht der Derivate wurde zu 6511 wie für nativen BPTI angenommen.

² Der Alanin- bzw. Glycingehalt dienen als interner Standard. Je nach den Elutionsbedingungen bei der Aminosäureanalyse werden unbekannte mit Ninhydrin anfärbare Substanzen zusammen mit Glycin und/oder Alanin eluiert, die dann höhere Glycin- und/oder Alanin-Gehalte vortäuschen.

³ Zum Vergleich wurde eine Aminosäureanalyse von BPTI mit aufgenommen. Die theoretischen Werte der betreffenden Aminosäuren betragen: Gly und Ala = 6,0; Tyr = 4,0; Lys = 4,0; Arg. = 6,0.

⁴ Ein Desaminierungsprodukt von Lysin wird unmittelbar vor Tyrosin eluiert. Deshalb wird der Tyrosin-Peak im Chromatogramm entweder unsymmetrisch oder begleitet von einem nicht ganz aufgelösten Gipfel gefunden.

Die erfindungsgemäss erhaltenen Desaminoderivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen (BPTI) sind neu. Sie lassen sich durch chemische, physikalisch-chemische, biochemische sowie biologische Eigenschaften charakterisieren und gegenüber bekannten Substanzen abgrenzen. Es wurden folgende Kriterien herangezogen:

1) Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung wurde nach S. Moore, D.H. Spackmann, W.H. Stein [Anal. Chem. 30, 1185 (1958)] bestimmt. Für einige charakteristische Desamino-BPTI-Derivate sind in Tabelle 2 die Werte der Aminosäurereste angegeben, deren Gehalt durch die erfindungsgemässen Desaminierungs-Reaktionen verändert wird.

2) Elektrophoretische Eigenschaften

Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese der Desamino-BPTI-Derivate wurde in 10%igem Polyacrylamidgel, das 0,8% Agarose enthielt, in der Ultraphor-Elektrophoreseapparatur (LKB) bei pH 8,6 durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung und unter Konstanthaltung der Spannung auf 300 Volt. Die Laufzeit betrug im allgemeinen 2 Std. Für die Herstellung des Polyacrylamid-Agarose-Gels wurden in der Literatur (A.J. Crowle «Immunodiffusion», 2. Auflage, Academic Press New York-London, 1973, S. 143–147) angegebene Methoden leicht modifiziert. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einer 0,1%igen Amidoschwarz-Lösung in 7,5%iger Essigsäure an-

gefärbt (30–60 Min.). Die Entfernung von überschüssigem, nicht Protein-gebundenem Amidoschwarz erfolgte mit 7,5%iger Essigsäure.

In Fig. 6 sind die elektrophoretischen Beweglichkeiten verschiedener BPTI-Derivate mit der von BPTI verglichen. Die Abbildung zeigt die Pherogramme folgender Derivate:

- I BPTI;
- II–V Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 1
Fraktionen A, B, E und F;
- VI–IX Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 2
Fraktionen A, B, D und F;
- X Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 4;
- XI Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 5;
- XII Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 10;
- XIII Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 16;
- XIV Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 13;
- XV Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 14.

3) UV-Absorptionsspektrum

Zum Nachweis der nitrierten und/oder nitrosierten Tyrosin-Reste wurde der Quotient der Extinktionen bei 280 nm und 425 nm ermittelt (Spektralphotometer von Perkin-Elmer 124; die Substanzen wurden in 0,1 m Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-Puffer, pH 8,0 gelöst).

Nach B. Meloun, I. Frič und F. Šorm [Europ. J. Biochem. 4, 112 (1968)] beträgt dieser Quotient für Mononitro-BPTI ~ 2,5, für Dinitro-BPTI ~ 1,5. Höhere Werte als 3 sprechen für Gemische von BPTI-Derivaten, die nichtnitrierte Anteile enthalten.

4) Proteasen-Inhibitionsspektrum

a) Elastase-Inhibition

α) Pankreas-Elastase-Inhibition

Für die Hemmversuche mit den erfindungsgemäss erhaltenen Desamino-BPTI-Derivaten wurde kristallisierte Pankreas-Elastase (Schwein) der Fa. Nutritional Biochemicals Corp. verwendet. Als Substrate wurden Elastin-Kongorot [M. A. Naughton und F. Sanger, Biochem. J. 78, 156 (1961)], lösliches Elastin [S. Keller und I. Mandl, Biochem. Med. 5, 342 (1971)] sowie besonders vorteilhaft Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid [J. Bieth, B. Spiess und C. G. Wermuth, Biochem. Med. 11, 350 (1974)] verwendet. Das synthetische Peptidsubstrat ermöglicht eine einfache colorimetrische Bestimmung der im Test eingesetzten Enzymaktivität. Der Elastase-Einsatz betrug im Elastin-Kongorot-Test ca. 1,1 nkat (vgl. Enzyme Nomenclature, Recommendations [1972] of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry, 1973, Elsevier Amsterdam-New York, S. 26–27); mit löslichem Elastin als Substrat und ebenso mit Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid wurden ca. 0,25 nkat Elastase pro Test-Ansatz eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung der Elastase-Hemmungen wurden die oben angegebenen Enzym-Mengen zu der mit Inhibitor-

lösungen definierter Konzentration versetzten Substratlösung gegeben. Um maximale Komplexbildung sicherzustellen, wurden in einigen Fällen Enzym und Inhibitor vor der Zugabe des Substrats für 15 bis 30 Min. vorinkubiert. Die Hydrolyse des Substrats wurde beim Elastin-Kongorot-Test durch Messung der Extinktion bei 492 nm der nach einer definierten Zeit gebildeten löslichen Spaltprodukte bestimmt. Beim Test mit löslichem Elastin wurde die Hydrolyse-Rate durch photometrische Bestimmung der nach einer definierten Zeit in Lösung gegangenen, mit Ninhydrin färbaren Spaltprodukte ermittelt. Bei Verwendung von Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid als Substrat wurde die Hydrolyse durch kontinuierliche Messung der Extinktion des freigesetzten p-Nitroanilins bei 410 nm bestimmt.

Die Hemmwerte (ausgedrückt in Prozent Hemmung) wurden ermittelt, indem man die nach Inhibitorzusatz gemessene Elastase-Restaktivität von der Aktivität der Enzymkontrolle subtrahierte. Die Hemmwerte einiger Desamino-BPTI-Derivate sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengestellt. Fig. 2 zeigt die Abhängigkeit der Elastasehemmung von der Menge dreier Inhibitoren. Andere erfindungsgemässe Desamino-BPTI-Derivate zeigen einen ähnlichen Hemmverlauf.

In Fig. 2 ist die prozentuale Hemmung von 0,25 nkat Pankreas-Elastase (Schwein) durch einige Desamino-BPTI-Derivate, bestimmt nach Bieth et al., mit 15 Minuten Vorinkubation von Inhibitor und Enzym, aufgeführt (siehe dazu auch Tabelle 3 der Anmeldung).

In Fig. 2 bezieht sich Kurve A auf das Desamino-BPTI-Derivat nach Beispiel 4, Kurve B bezieht sich auf das Desamino-BPTI-Derivat nach Beispiel 3 und Kurve C auf das Desamino-BPTI-Derivat nach Beispiel 18 der vorliegenden Anmeldung.

Die Ordinate von Fig. 2 gibt die Hemmung in Prozent an und die Abszisse die Menge Desamino-BPTI-Derivat in µg.

β) Granulozyten-Elastase-Inhibition

Das für die Hemmteste verwendete Isoenzymgemisch wurde nach K. Ohlsson und I. Olsson [Europ. J. Biochem. 42, 519 (1974)] aus Humangranulozyten gewonnen. Als Substrat ist besonders Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid [J. Bieth, B. Spiess und C. G. Wermuth, Biochem. Med. 11, 350 (1974)] geeignet. Die Hemmwerte einiger Desamino-BPTI-Derivate sind in Tabelle 5 aufgenommen; die Abhängigkeit der Hemmung von den Inhibitorkonzentrationen ist für einige Derivate in Fig. 3 wiedergegeben.

In Fig. 3 der Anmeldung wird die prozentuale Hemmung von 0,25 nkat Granulozyten-Elastase (human) durch einige Desamino-BPTI-Derivate, bestimmt nach Bieth et al., mit 15 Minuten Vorinkubation vom Inhibitor und Enzym angegeben. (Vergleiche dazu auch Tabelle 5 der Anmeldung.)

Die Ordinate von Fig. 3 gibt den Prozentsatz der Hemmwirkung und die Abszisse die Menge Desamino-BPTI-Derivat in µg an.

Tabelle 3

Prozentuale Hemmung¹ von 0,25 nkat Pankreas-Elastase (Schwein) durch verschiedene Desamino-BPTI-Derivate mit Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid als Substrat, bestimmt nach J. Bieth et al. [Biochem. Med. 11, 350 (1974)] mit 15 Min. Vorinkubation (+) und ohne Vorinkubation (–) von Enzym und Inhibitor

Desamino-BPTI-Derivat hergestellt nach Beispiel	zugesetzte Inhibitormenge 50 µg		25 µg		12,5 µg		5 µg		2,5 µg	
	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–
Fraktion A	100	98	98	98	93	90	53	63	35	35
Fraktion B				100		100		76		58
Fraktion C				100		96		73		53

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Desamino-BPTI-Derivat hergestellt nach Beispiel		50 µg		25 µg		zugeetzte Inhibitormenge				2,5 µg	
		+	–	+	–	12,5 µg	–	5 µg	–	+	–
2	Fraktion D				100		90		60		40
	Fraktion E				100		99		69		32
	Fraktion F	87	86	64	87	40	74	28	44	10	21
	Fraktion A		100		92		70		55		31
	Fraktion B		99		90		75		60		30
2	Fraktion C		100		98		90		40		34
	Fraktion D		100		95		85		70		52
	Fraktion E		100		96		90		65		30
	Fraktion F		100		90		78		55		38
3		97	95	89	91	69	74	44	47	25	15
4		97	99	90	92	76	73	50	48	33	38
5		100	99	95	87	86	77	47	35	25	15
6			91		85		48		21		12
7		97	97	82	90	75	77	44	35		
10		100	100	94	92	75	75	37	38	21	20
11			93		85		58		17		10
13		100	100	96	92	91	72	48	37	29	13
14		100	99	97	98	87	86	45	40	22	20
18		84	97	77	70	55	51	42	26	26	19
21		96	95	90	71	55	44	28	18	15	10
22			67		45		27		12		–

$$^1 \text{ Berechnet nach: \% Hemmung} = \left(1 - \frac{\Delta \text{OD Test}}{\Delta \text{OD Enzymkontrolle}} \right) \cdot 100$$

Tabelle 4

Prozentuale Hemmung¹ von 0,25 nkat Pankreas-Elastase (Schwein) durch einige Desamino-BPTI-Derivate mit löslichem Elastin als Substrat nach S. Keller und I. Mandl [Biochem. Med. 5, 342 (1971)] mit 15 Min. (+) bzw. ohne Vorinkubation (–) von Enzym und Inhibitor

Desamino-BPTI-Derivat hergestellt nach Beispiel		50 µg		25 µg		zugeetzte Inhibitormenge				2,5 µg	
		+	–	+	–	12,5 µg	–	5 µg	–	+	–
3		97	94	94	88	92	84	59	45	38	20
4		95	98	94	92	86	82	52	55	46	39
5			97		94		92		51		23
6			98		92		82		38		15
7		97	98	96	97	89	90	65	50	41	28
10			97		91		82		33		18
11			98		96		88		43		20
13		97	97	92	93	89	85	59	64	36	31
14		96	100	88	98	73	84	36	43	18	23
17		87	81	81	79	75	70	64	53	28	25
21		96	86	90	84	65	83	54	59	31	25
22			68		39		28		15		–

$$^1 \text{ Berechnet nach: \% Hemmung} = \left(1 - \frac{\Delta \text{OD Test}}{\Delta \text{OD Enzymkontrolle}} \right) \cdot 100$$

b) Chymotrypsin- und Trypsin-Inhibition

Die Aktivität von Chymotrypsin wurde photometrisch mit L-Tyrosinäthylester als Substrat im optischen Test nach H. U. Bergmeyer (Methoden der enzymatischen Analyse, Band 1, S. 469, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, 1974) bestimmt. Die Bestimmung von Trypsin im pH-Stat-Verfahren mit Benzoyl-L-arginin-äthylester-hydrochlorid als Substrat ist in R. Ruysen (Symposium on Pharmaceutical Enzymes and their Assay, Universitaire Pers, Ghent, Belgium

60 1969, S. 107) angegeben. Die Chymotrypsin- und Trypsin-Inhibition wurde, wie bei R. Ruysen (s. o. S. 117) für Trypsin mit BPTI angegeben, bestimmt. Die in Tabelle 6 für einige Desamino-BPTI-Derivate aufgeführten Hemmwerte (ausgedrückt in %) wurden auf die durch die gleiche Menge 65 BPTI bewirkte Hemmung (= 100%) bezogen. Die absoluten Hemmwerte wurden sowohl für BPTI als auch für Desamino-BPTI-Derivate ermittelt, wie unter «Pankreas-Elastase-Inhibition» angegeben.

c) Kininogenasen-Inhibition

α) Plasma-Kininogenasen-Inhibition

Die Kininogenasen-Aktivität wurde nach C. Sampaio, S. C. Wong und E. Shaw [Arch. Biochem. Biophys. 165, 133 (1974) im pH-Stat-Verfahren bestimmt, jedoch wurde als Substrat anstelle von Tosyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid Benzoyl-L-arginin-äthylester-hydrochlorid wegen

der größeren Hydrolysegeschwindigkeit verwendet. Das Gemisch der Isoenzyme wurde nach C. Sampaio et al. [Arch. Biochem. Biophys. 165, 133 (1974)] durch Affinitätschromatographie aus der Human-Plasmafraktion Cohn IV-1 isoliert. Die in Tabelle 6 für einige Desamino-BPTI-Derivate aufgeführten Hemmwerte wurden, wie unter «Chymotrypsin- und Trypsin-Inhibition» angegeben, ermittelt.

Tabelle 5

Prozentuale Hemmung¹ von 0,25 nkat Granulozyten-Elastase (human) durch verschiedene Desamino-BPTI-Derivate mit Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanalid als Substrat, bestimmt nach J. Bieth et al. [Biochem. Med. 11, 350 (1974)] mit 15 Min. Vorinkubation (+) und ohne Vorinkubation (–) von Enzym und Inhibitor

	Desamino-BPTI-Derivat, hergestellt nach Beispiel	zuge setzte Inhibitormenge							
		50 µg +	–	25 µg +	–	12,5 µg +	–	5 µg +	–
1	Fraktion A	88	73	55	60	38	44	17	18
	Fraktion B		83		49		35		20
	Fraktion C		83		53		45		10
	Fraktion D		89		62		40		21
	Fraktion E		78		48		35		9
	Fraktion F	55	60	39	42	28	29	6	7
2	Fraktion A		58		38		15		8
	Fraktion B		68		43		18		4
	Fraktion C		72		55		33		11
	Fraktion D		76		55		23		6
	Fraktion E		65		45		20		8
	Fraktion F		60		47		22		5
3		68	71	43	50	23	26	15	10
4		72	74	43	43	27	33	18	14
5		72	75	46	45	26	26	13	11
6			56		31		18		8
10		69	66	48	45	27	32	14	14
13		83	78	55	53	35	22	20	10
14		81	74	55	44	34	31	19	15
18		63	61	45	43	28	29	17	16
21			53		29		20		9
22			60		46		24		9

$$^1 \text{ Berechnet nach: \% Hemmung} = \left(1 - \frac{\Delta \text{OD Test}}{\Delta \text{OD Enzymkontrolle}} \right) \cdot 100$$

Tabelle 6

Hemmung von Serin-Proteasen durch einige Desamino-BPTI-Derivate im Vergleich zu BPTI

Bezeichnung der Substanz	Herstellung, beschrieben in Beispielen	Chymotrypsin	Kininogenase Pankreas	Plasma	Plasmin	Trypsin
BPTI (Vergleich)		100%	100%	100%	100%	100%
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. A		110	4	37	0	10
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. B		104	20	37	28	25
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. C		73	10	51	0	30
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. D	1	75	25	70	10	30
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. E		102	35	45	5	48
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. F		44	84	45	5	50
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. A		12	10	57	0	10
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. B		80	10	31	10	10
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. C	2	72	12	45	36	26
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. D		78	10	46	23	15
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. E		83	10	49	0	20
Desamino-BPTI-Derivat, Fr. F		96	86	96	36	60

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Bezeichnung der Substanz	Herstellung, beschrieben in Beispielen	Chymotrypsin	Kininogenase Pankreas	Plasma	Plasmin	Trypsin
Desamino-BPTI-Derivat,	3	93	38	62	93	39
Desamino-BPTI-Derivat,	4	10	54	71	86	40
Desamino-BPTI-Derivat,	6	95	50	81	86	31
Desamino-BPTI-Derivat,	10	56	5	10	86	23
Desamino-BPTI-Derivat,	11	87	18	48	86	15
Desamino-BPTI-Derivat,	13	116	31	81	86	23
Desamino-BPTI-Derivat,	14	78	108	21	86	99
Desamino-BPTI-Derivat,	18	84	152	121	95	70
Desamino-BPTI-Derivat,	21	145	57	52	86	54
Desamino-BPTI-Derivat,	22	102	80	127	86	80

β) Pankreas-Kininogenase-Inhibition

Das Testenzym wurde nach C. Kutzbach und G. Schmidt-Kastner [Z. Physiol. Chem. 353, 1099 (1972)] erhalten, und die Aktivitätsbestimmungen wurden nach denselben Autoren (s. o.) durchgeführt. Die in Tabelle 6 für einige Desamino-BPTI-Derivate aufgeführten Hemmwerte wurden, wie unter «Chymotrypsin- und Trypsin-Inhibition» angegeben, ermittelt.

d) Plasmin-Inhibition

Die enzymatische Aktivität von Plasmin wurde mit dem Substrat N-Benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid bestimmt. Als Enzym wurde mit Urokinase aktiviertes Plasminogen benutzt, das mittels Affinitätschromatographie [D. G. Deutsch, E. T. Mertz, J. Med. 3, 224 (1972)] aus Humanplasma gewonnen wurde. (Das Substrat wird von der AB Bofors, Nobel Division, Mölndal, Schweden, unter der Bezeichnung S 2160 vertrieben.)

Die Testvorschrift wurde mit geringen Veränderungen von Svendsen und Amundsen (Abstract of a paper, read at IVth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Vienna, June 1973) übernommen: Man bereitet für jede Bestimmung zwei parallele Ansätze (A und B) mit je 0,3 CU [«casein units» nach J. T. Sgouris, Vox. Sang. 5, 357 (1960)] Plasmin, gelöst in 1,0 ml Puffer (0,1 m Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl/0,05 m NaCl, pH 7,2). Zur Bestimmung ihrer inhibitorischen Wirkung werden BPTI und Desamino-BPTI-Derivate zu 50 µg/ml in dem genannten Puffer gelöst; 1,0 ml davon werden zu dem vorgelegten Plasmin gegeben. In die Ansätze zur Bestimmung der vollen Plasminaktivität gibt man 1,0 ml des genannten Puffers. Man inkubiert alle Ansätze 10 Min. bei 20 °C, gibt zu einem der Parallelansätze (A) 0,25 ml einer 10⁻³ m wässrigen Lösung von S 2160 und zu dem anderen (B) zuerst 0,25 ml Eisessig, dann 0,25 ml der Lösung des S 2160. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 20 °C wird auch Ansatz A mit 0,25 ml Eisessig versetzt.

Das durch das Enzym freigesetzte p-Nitroanilin bestimmt man, indem man die Extinktionsdifferenz der parallelen Ansätze A und B bei 405 nm photometrisch bestimmt.

Bezeichnet man die Extinktionsdifferenz, die von Plasmin allein hervorgerufen wird, mit ΔE_{100} und die in Gegenwart von Inhibitoren gemessene Extinktionsdifferenz mit ΔE , so ergibt sich die Hemmung des Plasmins durch die Inhibitoren unter den angegebenen Bedingungen durch den folgenden Ausdruck:

$$\frac{\Delta E_{100} - \Delta E}{\Delta E_{100}} \cdot 100\%$$

Für einige Desamino-BPTI-Derivate wurden die so ermittelten Hemmwerte, die mit 50 µg Derivat pro 0,3 CU Plasmin erhalten wurden, in Tabelle 6 aufgeführt. Diese Werte wurden im Gegensatz zu denen für die anderen in Tabelle 6 wiedergegebenen Enzyme nicht auf BPTI bezogen. Bereits 0,6 µg BPTI hemmen 0,3 CU Plasmin zu 50%.

e) Kathepsin-G-Inhibition

Das Enzym wurde nach W. Schmidt und K. Havemann [Z. Physiol. Chem. 355, 1077 (1974)] isoliert. Die Hemmteste wurden mit Acetyl-L-tyrosin-äthylester, wie bei A. Vandermeers et al. [J. Clin. Chem. 18, 1514 (1972)] beschrieben, durchgeführt.

Die neuen, erfindungsgemäss erhaltenen Desamino-Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen (BPTI) können aufgrund ihrer biologischen Wirksamkeit insbesondere zur Behandlung folgender Krankheiten bzw. Krankheitserscheinungen eingesetzt werden:

1. Verschiedene Formen des Schocks, posttraumatische und postoperative Komplikationen,
2. Störungen der Blutgerinnung,
3. akute und chronische Entzündungsreaktionen, insbesondere zur Therapie und Prophylaxe von Organschädigungen, wie beispielsweise Pankreatitis und strahleninduzierte Enteritis, immunkomplexbedingte Entzündungsreaktionen, wie Immunvasculitis, Glomerulonephritis und Arthritiden; Kollagenosen, insbesondere rheumatoide Arthritis,
4. durch stoffwechselbedingte Ablagerungen verursachte Arthritiden (z. B. Gicht),
5. Degeneration der elastischen Bestandteile der Bindegewebssteile von Organen, wie bei der Atherosklerose,
6. strahleninduzierte Enteritis.

Die neuen Wirkstoffe können in bekannter Weise (analog BPTI) in die üblichen Formulierungen übergeführt werden.

Folgende Formulierungen sind dabei bevorzugt zu nennen:

1. Lösungen für parenterale Anwendung zur intravenösen, intramuskulären, subkutanen Injektion, bzw. zur intraartikulären und intratumoralen Injektion.
2. Lösungen für intravenöse Dauerinfusion.
3. Lösungen zur Anwendung als Aerosole zur Inhalation.
4. Lösungen, Emulsionen, Salben, Pasten, Cremes, Lotionen, Puder zur äusserlichen lokalen Anwendung.
5. Kombination verschiedener Hemmstoffe, deren Wirkungsspektrum sich gegenseitig ergänzt.

Die Konzentrationen der neuen Wirkstoffe in den erfindungsgemässen Formulierungen bewegen sich dabei in den

Grenzen 0,01 bis 100 mg/ml Lösung, vorzugsweise zwischen 0,1 bis 10 mg/ml Lösung.

Die neuen Wirkstoffe können in üblicher Weise angewendet werden, insbesondere sind folgende Anwendungsmethoden als bevorzugt zu nennen:

- a) parenteral: intravenös, intramuskulär, subkutan, intraartikulär, intratumoral
- b) lokal: z. B. intranasal
- c) oral

Als Dosierungsbereich kann für die neuen Wirkstoffe angegeben werden:

0,1–20 mg Wirkstoff/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 10 mg Wirkstoff/kg Körpergewicht, die Dosierung ist dabei vor allem abhängig von der zu behandelnden Spezies sowie von der Applikationsart.

Die erfindungsgemäss hergestellten neuen Wirkstoffe können bei Mensch und Tier eingesetzt werden.

Versuchsanordnung zum Nachweis entzündungshemmender Wirkung bei der Ratte

a) Carrageenan-induzierte Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion wurde durch intraplantare Injektion von 0,1 ml einer 0,5%igen Carrageenanlösung (Carrageenan, Marine Colloids, Inc., New York) in eine Hinterpfote von 130–160 g schweren Wistarratten induziert. Die für die Behandlung der Entzündungsreaktion verwendeten erfindungsgemässen Desamino-BPTI-Derivate sowie BPTI wurden in 0,9%iger Natriumchloridlösung in einer Konzentration von 10–20 mg/ml gelöst. Die Behandlung der Versuchstiere erfolgte durch intraperitoneale, intramuskuläre, subkutane oder intravenöse Injektion von 0,5–1,0 ml Lösung von Desamino-BPTI-Derivaten und zum Vergleich BPTI entweder prophylaktisch, d. h. vor Setzen der Entzündungsnoxe, oder therapeutisch, d. h. nach Setzen der Entzündungsnoxe. Die Schwellung der entzündeten Pfote, die ein Mass für die Schwere der Entzündungsreaktion ist, wurde mit dem Antiphlogmeter nach Kemper [F. Kemper und G. Ameln, Z. ges. exp. Med. 131, 407–411 (1959)] zeitlich verfolgt.

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehungen wurde der 4 Stunden nach Setzen der Entzündungsnoxe gemessene Wert verwendet. Das Ergebnis des Vergleiches eines Desamino-BPTI-Derivates nach Beispiel 3 mit BPTI ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Es sind die Dosen in mg/kg angegeben, die eine 10%ige (ED_{10}), 30%ige (ED_{30}) bzw. 50%ige (ED_{50}) Hemmung der Pfortenschwellung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bewirken.

b) Kaolin-induzierte Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion wurde durch intraplantare Injektion von 0,1 ml einer 10%igen Kaolinsuspension (Bolus weiss, fein gepulvert, Merck AG, Darmstadt) in eine Hinterpfote von 130–160 g schweren Wistarratten induziert. Die Prüfung der Substanzen und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie unter a) angegeben.

Der Wirkungsvergleich der Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 3 und 18 zeigt, dass sie dem BPTI in ihrer entzündungshemmenden Wirkung überlegen sind (Tab. 8).

Die Überlegenheit der Desamino-BPTI-Derivate als Arzneimittel gegenüber dem BPTI ergibt sich auch aus dem Befund, dass BPTI in der Kaolin-induzierten Entzündungsreaktion nur dann entzündungshemmende Wirkungen zeigt,

wenn es vor oder bis zu 30 Minuten nach Setzen der Entzündungsnoxe verabreicht wird, während die Desamino-BPTI-Derivate auch zu späteren Zeitpunkten nach Setzen der Entzündungsnoxe wirksam sind (Abb. 5).

c) Aerosil-induzierte Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion wurde durch intraplantare Injektion von 0,1 ml einer 2%igen Aerosilsuspension (Aerosil 200, Degussa AG, Frankfurt) in eine Hinterpfote von 130–160 g schweren Wistarratten induziert. Die für die Behandlung der Entzündungsreaktion verwendeten erfindungsgemässen Desamino-BPTI-Derivate bzw. BPTI wurden in 0,9%iger Natriumchloridlösung in einer Konzentration von 10–20 mg/ml gelöst. Die Behandlung der Versuchstiere erfolgte durch intraperitoneale, subkutane oder intravenöse Injektion von 0,5–1,0 ml Lösung von Desamino-BPTI-Derivaten und zum Vergleich BPTI 15 Stunden nach Setzen der Entzündungsnoxe. Die Schwellung der entzündeten Pfote, die ein Mass für die Schwere der Entzündungsreaktion ist, wurde mit dem Antiphlogmeter nach Kemper zeitlich verfolgt. Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehungen wurde der 21-Stundenwert nach Entzündungsinduktion (= 6 Stunden nach Injektion der erfindungsgemässen Desamino-BPTI-Derivate bzw. des BPTI) ermittelt. Das Ergebnis des Vergleichs der Desamino-BPTI-Derivate nach Beispiel 3 und 18 mit BPTI ist in Tabelle 9 wiedergegeben. Es sind die Dosen in mg/kg angegeben, die eine 10%ige (ED_{10}), 15%ige (ED_{15}) bzw. 30%ige (ED_{30}) Hemmung der Pfortenschwellung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen bewirken.

Aus den Fig. 4A und 4B ist ein Vergleich der entzündungshemmenden Wirkung von BPTI (A) und des Desamino-BPTI-Derivates nach Beispiel 3 (B) in der Kaolin-induzierten Entzündung der Rattenpfote nach intravenöser Gabe von 20 mg Inhibitor/kg Körpergewicht zu verschiedenen Zeiten vor und nach Setzen der Entzündungsnoxe zu entnehmen.

In Fig. 4A wurde BPTI 30 und 15 Minuten vor, gleichzeitig mit und 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten nach der Entzündungsinduktion gegeben. In Fig. 4B wurde 15, 60 und 120 Minuten nach Setzen der Entzündungsnoxe (Entzündungsinduktion) das Desamino-BPTI-Derivat nach Beispiel 3 verabreicht.

Die Zahlenwerte auf den drei Achsen I, II und III geben folgendes an:

- I: Hemmung der Pfortenschwellung in Prozent
 - II: Zahl der Stunden nach der Entzündungsinduktion
 - III: Zahl der Minuten vor/bzw. nach Gabe von BPTI (Fig. 4A) bzw. Zahl der Minuten nach Gabe von Desamino-BPTI-Derivat nach Beispiel 3 (Fig. 4B)
- E = Zeitpunkt der Entzündungs-Induktion

Das Ergebnis der Therapieversuche mit den Desamino-BPTI-Derivaten nach Beispiel 3 und 18 (Tab. 9) zeigt die Wirksamkeit der verwendeten Desamino-BPTI-Derivate in diesem experimentellen Modell, in dem BPTI in gleicher Dosierung die Entzündungsreaktion nicht hemmt. Damit ist die Überlegenheit der Desamino-BPTI-Derivate als Arzneimittel gegenüber dem BPTI nachgewiesen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit dem Kaolin-Modell (b), bei dem sich die therapeutische Überlegenheit durch die entzündungshemmende Wirkung zu einem späten Zeitpunkt nach Setzen der Entzündungsnoxe ebenfalls erweist.

Tabelle 9

Hemmung der Aerosil-induzierten Entzündungsreaktion der Rattenpfote durch intravenöse Behandlung mit BPTI und den BPTI-Derivaten nach Beispielen 3 und 18.
Die Behandlung erfolgte 15 Stunden nach Setzen der Entzündungsnoxe. Aufgezeichnet sind die Mittelwerte und der 5%-Vertrauensbereich

Bezeichnung der Substanz	erhalten nach Beispiel	ED ₁₀ mg/kg	ED ₁₅ mg/kg	ED ₃₀ mg/kg
BPTI		keine Hemmung nachweisbar		
Desamino-BPTI-Derivat	3	2,0 (0,1–4,6)	4,9 (1–8,5)	61,5 (32–500)
Desamino-BPTI-Derivat	18	5,1 (3,7–6,4)	6,3 (4,8–7,6)	11,4 (9,6–13,4)

Tabelle 7

Hemmung der Carrageenan-induzierten Entzündungsreaktion der Rattenpfote durch intravenöse Behandlung mit BPTI und dem Desamino-BPTI-Derivat nach Beispiel 3.
Die Behandlung erfolgte 15 Minuten nach Setzen der Entzündungsnoxe. Aufgezeichnet sind die Mittelwerte und der 5%-Vertrauensbereich (in Klammern)

Bezeichnung der Substanz	erhalten nach Beispiel	ED ₁₀ mg/kg	ED ₃₀ mg/kg	ED ₅₀ mg/kg
BPTI		7,0	12,7	22,8
Desamino-BPTI-Derivat	3	0,07 (0,03–0,14)	0,5 (0,3–0,8)	3,9 (3,1–5,1)

Tabelle 8

Hemmung der Kaolin-induzierten Entzündungsreaktion der Rattenpfote durch intravenöse Behandlung mit BPTI und den Desamino-BPTI-Derivaten nach Beispiel 3 und 18.
Die Behandlung erfolgte 15 Minuten nach Setzen der Entzündungsnoxe. Aufgezeichnet sind die Mittelwerte und der 5%-Vertrauensbereich (in Klammern)

Bezeichnung der Substanz	erhalten nach Beispiel	ED ₁₀ mg/kg	ED ₃₀ mg/kg	ED ₅₀ mg/kg
BPTI		9,1 (5,2–12,3)	17,6 (13,7–22,1)	33,9 (26,7–52,1)
Desamino-BPTI-Derivat	3	1,3 (0,02–0,71)	7,2 (5,9–9,1)	36,5 (26,7–55,4)
Desamino-BPTI-Derivat	18	0,6 (0,12–1,4)	2,7 (1,1–4,4)	11,7 (8,8–15,6)

Herstellungsbeispiele

Beispiel 1

500 mg BPTI (77 µMol) wurden in 200 ml eiskalter, sauerstofffreier 0,25 m Essigsäure gelöst. Unter Durchleitung von Stickstoff und gutem Rühren tropfte man bei 0–4 °C im Verlaufe von 30 Min. 50 ml 2 m Natriumnitritlösung in die Lösung des Inhibitors und hielt das Reaktionsgemisch schliesslich 24 Std. unter Stickstoffatmosphäre bei +4 °C. Dabei stieg der pH-Wert der Lösung von 3,7 auf 4,1.

Das Reaktionsgemisch wurde nun durch Ultrafiltration in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) mit Hilfe einer Diaflow-UM-05-Membran eingengt, mit Wasser verdünnt und erneut konzentriert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, wobei ein Teil des Reaktionsproduktes schliesslich ausfiel. Man versetzte das Retentat mit 0,1 m Ammoniumhydroxidlösung bis zur weitgehenden Lösung des Nieder-

schlags, stellte den pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 0,1 m Essigsäure auf 6,8 und fügte so viel Wasser hinzu, dass eine 0,05 m Ammoniumacetat-Konzentration erreicht wurde. Man trennte eine kleine Menge ungelöstes Material durch Zentrifugieren ab und chromatographierte die überstehende Lösung an einer mit 0,05 m Ammoniumacetatlösung pH 6,8 äquilibrierten SP-Sephadex®C-25-Säule (2,5 × 80 cm). (Sephadex® = quervernetztes Dextran). Die Säule wurde zunächst mit 500 ml 0,05 m Ammoniumacetatlösung pH 6,8 und anschliessend mit 500 ml 0,5 m Ammoniumacetatlösung des gleichen pH-Wertes eluiert. Das Elutionsprofil ist in Fig. 5 wiedergegeben. Die einzelnen Fraktionen A bis F (vgl. Fig. 5) wurden gefriergetrocknet und die Lyophilisate teils durch Chromatographie an Biogel P 2 mit 0,1 m Ammoniumhydroxid als Elutionsmittel, teils durch Ultrafiltrieren entsalzt. Die Ausbeuten und spektroskopischen Daten der aus den einzelnen Fraktionen erhal-

tenen Präparate sind in Tab. 10 zusammengestellt und die Resultate der quantitativen Aminosäureanalysen in Tab. 2 wiedergegeben. Die Angaben über die Hemmspektren können aus den Tab. 3–6 entnommen werden. In Fig. 5 ist auf der Ordinate die Extinktion in Prozent und auf der Abszisse die Bezeichnung der jeweiligen Fraktion A bis F aufgeführt. Beim Punkt W wird das Elutionsmittel gewechselt (0,5 Ammoniumacetatlösung anstelle von 0,05 m Ammoniumacetatlösung).

Beispiel 2

500 mg BPTI wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit Natriumnitrit in essigsaurer Lösung umgesetzt. Nach 24 Stunden wurde der pH-Wert durch Zugabe von konz. wässrigem Ammoniak auf 9,0 gestellt, die Lösung, wie in Beispiel 1 beschrieben, durch Ultrafiltration entsalzt. Höhermolekulare Anteile wurden durch Chromatographie an einer Sephadex®G-50-Säule (2,5 × 100 cm) mit 0,1 m Ammoniak-Lösung abgetrennt. Nach dem Gefriertrocknen wurde der Rückstand in 10 ml 0,1 m wässrigem Ammoniak gelöst und mit 0,1 m Essigsäure auf pH 6,8 gestellt. Die klare Lösung wurde nun, wie in Beispiel 1 angegeben, auf eine SP-Sephadex®C-25-Säule (2,5 × 70 cm) aufgetragen und zunächst mit 500 ml 0,05 m Ammoniumacetatlösung pH 6,8 eluiert, gefolgt von 500 ml 0,5 m Ammoniumacetatlösung pH 6,8 und schliesslich 200 ml 0,1 m wässrigem Ammoniak. Das Elutionsprofil ist mit dem nach Beispiel 1 erhaltenen vergleichbar. Die Ausbeuten und spektroskopischen Daten sind für die einzelnen Fraktionen in Tab. 11 wiedergegeben. Die Hemmspektren sind aus den Tabellen 3–6 ersichtlich.

Beispiel 3

2 g BPTI wurden, wie in Beispiel 2 beschrieben, desaminiert. Nach dem Einengen der Reaktionslösung durch Ultrafiltrieren wurde das Retentat an einer Biogel-P-2-Säule mit 0,1 m wässrigem Ammoniak als Elutionsmittel entsalzt. Der Gefriertrocknungsrückstand wurde zum Abtrennen von höhermolekularen Reaktionsprodukten (ca. 5%) mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel an Sephadex®G-50 chromatographiert. Man erhielt 1,6–1,72 g Substanz (80–85%).

Beispiel 4

500 mg BPTI wurden in 200 ml 0,25 m Essigsäure, die zugleich 8 m an Harnstoff war, mit Natriumnitrit, wie in Beispiel 2 beschrieben, umgesetzt. Nach 20 Std. Reaktionsdauer wurde das Reaktionsgemisch durch Ultrafiltrieren auf 30 ml eingengt und das Retentat zum Abtrennen des Harnstoffs an einer Sephadex®G-10-Säule (2,5 × 150 cm) mit 0,1 m wässrigem Ammoniak als Elutionsmittel gefiltert. Die unmittelbar nach dem Ausschlussvolumen eluierte Fraktion wurde lyophilisiert und anschliessend an Sephadex®G-50 mit 0,2 m Essigsäure als Elutionsmittel chromatographiert. Nach dem Gefriertrocknen wurden aus der ersten Fraktion 40 mg (8%) höhermolekulare Anteile und aus der zweiten Fraktion 392 mg (79%) einer farblosen Substanz erhalten.

Tabelle 10

Fraktionierung des nach Beispiel 1 dargestellten Desamino-BPTI-Gemisches an SP-Sephadex® C-25 (vgl. Abb. 6)

Fraktions-Nr.	Bezeichnung	Menge (mg)	E 280 nm
			425 nm
21–30	A	224	5,53
31–40	B	73	8,57
41–52	C	37	6,15
53–63	D	87	4,61
75–105	E	67	16,60
106–140	F	12	13,25

Tabelle 11

Fraktionierung des nach Beispiel 2 dargestellten Desamino-BPTI-Gemisches an SP-Sephadex® C-25

Fraktions-Nr.	Bezeichnung	Menge (mg)	E 280 nm
			425
19–27	A	7	9,0
28–42	B	22	13,3
43–48	C	177	17,4
49–51	D	44	21,2
52–59	E	9	15,5
113–127	F	185	22,1

Beispiel 5

500 mg BPTI wurden in einem Gemisch von 195 ml Wasser und 5,7 g Trifluoressigsäure in der in Beispiel 2 beschriebenen Weise mit Natriumnitrit umgesetzt. Nach dem Zutropfen der Nitritlösung war der pH-Wert von 1,65 auf 3,43 angestiegen. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Std. bei +4 °C gerührt und der pH-Wert vor dem Einengen mit konz. Ammoniaklösung auf 8,8 gestellt. Die eingengte Lösung wurde über Sephadex®G-10 entsalzt. Anschliessend wurden höhermolekulare Anteile durch Chromatographie an Sephadex®G-50 abgetrennt. Durch Lyophilisieren der Hauptfraktion wurden 360 mg (72%) Rückstand erhalten.

Beispiel 6

500 mg BPTI wurden analog der Beschreibung von Beispiel 4 in 200 ml 0,25 m Essigsäure, die zugleich 3 m an Guanidin-hydrochlorid war, umgesetzt. Dabei stieg der pH-Wert der Lösung von 2,86 über 3,86 auf 3,96 an. Nach dem üblichen Aufarbeiten erhielt man 320 mg Lyophilisat (64%).

Beispiel 7

200 mg BPTI (30,8 µMol) wurden, wie in Beispiel 2 angegeben, in 90 ml 0,25 m Essigsäure gelöst und unter Rühren und Überleiten von Stickstoff bei 4 °C mit 4,7 ml Isoamylnitrit (40 mMol) tropfenweise versetzt. Nach 20 Std. erfolgte die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben. Die Ausbeute an Lyophilisat betrug 168 mg (84%).

Beispiel 8

200 mg BPTI (30,8 µMol) wurden analog zu der in Beispiel 2 wiedergegebenen Vorschrift in 90 ml 0,5 m Natriumacetatpuffer, pH 5,5 gelöst. In N₂-Atmosphäre unter gutem Rühren trug man bei +4 °C 5,1 g Nitrosylschwefelsäure (40 mMol) in Abständen von 10 Min. in insgesamt 4 Anteilen ein. Man rührte weitere 5 Std. bei +4 °C und stellte durch Zugabe von konz. Ammoniumhydroxidlösung den pH-Wert des Reaktionsgemisches (1,25) auf 9,8. Die Aufarbeitung erfolgte wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben. Die Ausbeute an Lyophilisat betrug 158 mg (79%).

Beispiel 9

200 mg BPTI (30,8 µMol) wurden in einem Gemisch von 72 ml absol. Dimethylsulfoxid, 8 ml Wasser und 1,35 ml Eisessig gelöst. Man kühlte die Lösung auf +4 °C und fügte im Verlaufe von 30 Min. unter gutem magnetischem Rühren und Einleiten von Stickstoff eine Lösung von 2,75 g Natriumnitrit (40 µMol) in 16 ml Dimethylsulfoxid und 4 ml Wasser zu. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Std. bei +4 °C gerührt. Man trennte das Dimethylsulfoxid und die Salze durch Gefiltration des Reaktionsgemisches über

Sephadex®G-10 (Säule 5 × 100 cm) mit 0,1 m Ammoniumhydroxid-Lösung als Elutionsmittel ab. Die Protein enthaltende Fraktion wurde gefriergetrocknet. An Sephadex®G-50 mit 0,1 m wässrigem Ammoniak als Elutionsmittel erhielt man aus der Hauptfraktion 108 mg Rückstand (54%). Der Quotient der UV-Extinktionen bei 285 nm und 425 nm betrug für dieses Präparat 1,72. Daraus folgt, dass 2 Tyrosinreste im Molekül des Derivates nitriert sind.

Beispiel 10

500 mg BPTI (77 µMol) wurden in 200 ml einer 0,5 m Natriumnitritlösung gelöst. Bei +4 °C wurde unter Durchleiten von Stickstoff und gutem magnetischem Rühren mit 2 n Salzsäure der pH-Wert der Lösung auf 3,5 eingestellt und über 24 Std. konstant gehalten. Danach wurde der pH-Wert durch Zugabe von konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung auf 8,8 gestellt und das Volumen der Reaktionslösung durch Ultrafiltration über ein UM-2-Filter auf ca. 20 ml eingengt. Die eingengte Lösung wurde durch Gelfiltration über Sephadex®G-10 entsalzt. Nach dem Gefrierdrehen der Protein enthaltenden Eluate wurde der Rückstand mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel an Sephadex G-50 chromatographiert. Aus der Hauptfraktion wurden durch Gefrierdrehen 390 mg (78%) Substanz isoliert. Weiterhin wurden 48 mg (ca. 10%) höhermolekulare Anteile erhalten.

Beispiel 11

500 mg BPTI (77 µMol) wurden, wie in Beispiel 2 beschrieben, in 200 ml 0,25 m Essigsäure gelöst. Nach Zusatz von 282 mg Phenol (3 m Mol) zu der Lösung wurden bei 4 °C unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff 50 ml einer 2 m Natriumnitritlösung im Verlaufe von 2 Std. zugegeben. Dabei färbte sich die Reaktionslösung gelb. Man hielt das Gemisch 17 Std. bei +4 °C und stellte den pH-Wert der Lösung dann mit konz. Ammoniumhydroxidlösung auf 8,5. Dabei färbte sich die intensiv gelbe Lösung rotbraun. Das Reaktionsgemisch wurde durch Ultrafiltration in der üblichen Weise auf ein Volumen von ca. 50 ml eingengt und das Retentat auf eine Sephadex®G-10-Säule (5 × 100 cm) aufgetragen. Man eluierte zum Abtrennen der Salze und der vom Phenol abgeleiteten Nebenprodukte mit 0,1 m Ammoniumhydroxidlösung. Das beim Gefrierdrehen der unmittelbar nach dem Ausschlussvolumen eluierten proteinhaltigen Fraktionen erhaltene Lyophilisat wurde nun in 0,1 m Essigsäure gelöst und zum Abtrennen der höhermolekularen Anteile an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel rechromatographiert. Aus der Hauptfraktion wurden 335 mg (67%) Lyophilisat erhalten.

Beispiel 12

200 mg BPTI wurden, wie in Beispiel 8 beschrieben, in 100 ml 1 m Natriumacetatpuffer, pH 5,3, mit 5,1 g Nitrosylschwefelsäure (40 mMol) in 4 Anteilen versetzt. Dabei fiel der pH-Wert über 4,0, 2,9 schließlich auf 1,7. Nach 10 Minuten stellte man den pH-Wert der Lösung auf 3,25 und rührte 20 Std. bei +4 °C. Dann versetzte man das Reaktionsgemisch mit Ammoniak bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 8,5 und entsalzte die Lösung über Sephadex®G-10 mit 0,1 m Ammoniumhydroxidlösung als Laufmittel. Die nach dem Gefrierdrehen erhaltene Substanz wurde zum Abtrennen der polymeren Anteile an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel chromatographiert. Die Hauptfraktion lieferte beim Gefrierdrehen 166 mg (83%) Substanz.

Beispiel 13

200 mg Mononitro-BPTI [erhalten nach B. Meloun, I. Frič und F. Šorm, Europ. J. Biochemistry 4, 112 (1968)] wurden in 80 ml 0,25 m Essigsäure gelöst und bei +4 °C unter Stickstoff mit 20 ml einer 2 m wässrigen Lösung von Natriumnitrit, wie in Beispiel 2 beschrieben, umgesetzt und nach 20stündigem Rühren bei +4 °C, wie ebenfalls in Beispiel 2 beschrieben, aufgearbeitet. Nach dem Gefrierdrehen des entsalzten und an Sephadex®G-50 chromatographisch gereinigten Reaktionsproduktes wurden 150 mg eines gelblichen Lyophilisats erhalten (75%).

Beispiel 14

500 mg Dinitro-BPTI (erhalten nach den in Beispiel 12 angegebenen Autoren) wurden in 200 ml 0,25 m Essigsäure gelöst und bei +4 °C im Stickstoffstrom mit 50 ml 2 m Natriumnitritlösung im Verlaufe einer Stunde versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Std. bei +4 °C gerührt. Dabei fielen feste Anteile aus, die durch Einstellen des pH-Wertes auf 9,2 mit Ammoniumhydroxidlösung vollständig gelöst wurden. Nach dem Einengen der Lösung durch Ultrafiltration wurde das Retentat durch Gelfiltration über Biogel P-2 entsalzt. Höhermolekulare Anteile wurden durch Chromatographie an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel abgetrennt. Nach dem Lyophilisieren wurden 470 mg einer gelben Substanz (94%) erhalten.

Beispiel 15

430 mg nach Beispiel 14 erhaltenes Desamino-dinitro-BPTI-Derivat wurden in 8 ml 0,1 m Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochloridpuffer, pH 7,5 gelöst. Zu dieser Lösung fügte man unter gutem Rühren bei +4 °C in 2 Anteilen im Abstand von 10 Minuten 300 mg Natriumdithionit. Nach weiteren 10 Min. wurde das Reaktionsgemisch durch Gelfiltration über Sephadex®G-10 entsalzt und die Proteinfraktion durch Gefrierdrehen isoliert. Man löste die Substanz in 10 ml 0,1 m Essigsäure und chromatographierte die Lösung an Sephadex®G-50. Aus der Hauptfraktion wurden durch Lyophilisation 320 mg (75%) farblose Substanz erhalten. Weitere 50 mg höhermolekulare Anteile fielen aus einer Protein enthaltenden Vorfraktion an (12%).

Beispiel 16

500 mg BPTI wurden, wie in Beispiel 2 beschrieben, in 200 ml 0,25 m Essigsäure gelöst. Man fügte 2,95 g Acetamid (50 mMol) zu der Lösung und tropfte bei +4 °C 50 ml einer 2 m Natriumnitritlösung zu. Nach 20stündigem Rühren bei +4 °C wurde der pH-Wert der Reaktionslösung mit wässrigem Ammoniak auf 9,0 gestellt und das Volumen durch Ultrafiltration auf 50 ml vermindert. Man entsalzte das Retentat durch Gelfiltration an Sephadex®G-10 mit 0,1 m wässrigem Ammoniak als Elutionsmittel. Das aus der Protein enthaltenden Fraktion gewonnene Lyophilisat wurde in 0,1 m Essigsäure gelöst und an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel chromatographiert. Durch Lyophilisieren wurde neben 35 mg (7%) höhermolekularen Anteilen eine Hauptfraktion von 418 mg (84%) erhalten.

Beispiel 17

200 mg BPTI wurden in 100 ml 0,25 m Essigsäure gelöst und nach Zugabe von 1,51 g Dimethylanilin (12,5 mMol) zu der Lösung, wie in Beispiel 11 beschrieben, mit Natriumnitritlösung umgesetzt. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 8,5 mit konz. wässrigem Ammoniak wurde das Reaktionsgemisch durch Filtration über Sephadex®G-10 entsalzt. Die nach Gefrierdrehung der Protein enthaltenden Fraktion isolierte Substanz wurde in 0,1 m Essigsäure gelöst und die Lösung an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elu-

tionsmittel chromatographiert. Aus der Hauptfraktion wurden nach dem Gefriertrocknen 146 mg (73%) Rückstand erhalten. Aus der Vorfraktion wurden weitere 20 mg (10%) Substanz isoliert.

Beispiel 18

27 mg (0,31 mMol) 5-Aminotetrazol-(1,H) [J. Thiele, Liebigs Ann. Chem. 270, 1 (1892)] wurden in 5 ml 1 m Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde bei +4 °C unter magnetischem Rühren mit 25 mg (0,35 mMol) festem Natriumnitrit versetzt. Nach 10minütigem Rühren wurde eine geringe Menge Harnstoff zugefügt. Nach weiteren 10 Min. setzte man 4 ml eiskalte Natronlauge (1 m) zu. Die so erhaltene Lösung wurde unter gutem Rühren zu einer Lösung von 1 g BPTI (0,154 mMol) in 10 ml 1 m Kaliumhydrogenkarbonat-Natriumkarbonat-Puffer, pH 9,4, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 10 Min. bei +4 °C gerührt, mit einer geringen Menge Phenol versetzt und schliesslich mit Eisessig auf einen pH-Wert von 5,5 gebracht. Die leicht gefärbte Lösung wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex®G-10-Säule (2,2 × 90 cm) mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel entsalzt. Nach dem Lyophilisieren der Protein enthaltenden Fraktionen wurden 110 mg höhermolekulare Beimengungen durch Chromatographie an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel abgetrennt (11%). Beim Gefriertrocknen der Hauptfraktion wurden 660 mg Rückstand (~ 66%) erhalten. Das Absorptionsspektrum (von 250–600 nm) ist in Abb. 1 wiedergegeben; die Hemmwerte sind den Tabellen 3 bis 6 zu entnehmen.

Beispiel 19

Aus 27 mg Aminotetrazol wurde, wie in Beispiel 18 beschrieben, in 5 ml 1 m Salzsäure mit einer Lösung von 25 mg Natriumnitrit in 0,3 ml Wasser das Diazoniumsalz dargestellt und überschüssiges Nitrit durch Umsetzung mit 15 mg Harnstoff zerstört. Die Lösung des Diazoniumsalzes wurde mit einer Lösung von 1 g BPTI in 10 ml Wasser vereinigt. Man versetzte unter gutem Kühlen mit 4n Natronlauge bis zum Erreichen von pH-Wert 4,5 und rührte das Gemisch 45 Min. unter Kühlung. Dann wurde mit Essigsäure versetzt und nach Beispiel 18 die Lösung an Sephadex®G 10 entsalzt und chromatographiert. Man erhielt schliesslich 856 mg Substanz (86%).

Beispiel 20

Analog zu Beispiel 16 wurden 143 mg (1,7 mMol) 2-Amino-1,3,4-triazol in 15 ml 1 m HCl mit einer Lösung von 127 mg Natriumnitrit (1,85 mMol) in 2 ml Wasser diazotiert. Die so erhaltene Lösung wurde, wie in Beispiel 18 angegeben, mit Harnstoff und Natronlauge versetzt und anschliessend mit der Lösung von 1 g (0,154 mMol) BPTI in 10 ml 1 m Natriumkarbonat-Kaliumhydrogenkarbonat-Puffer pH 9,5 vereinigt. Nach Zusatz einer geringen Menge Phenol wurde die Reaktionslösung durch Gelfiltration über Sephadex®G-10 entsalzt und das Eluat nach dem Lyophili-

sieren mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel an Sephadex®G-50 chromatographiert, wie bereits in Beispiel 18 beschrieben. Es wurden 60 mg (6%) höhermolekulare Anteile und aus der Hauptfraktion 810 mg (81%) Substanz erhalten.

Beispiel 21

5,4 mg (64 µMol) 5-Aminotetrazol-(1,H) wurden in 1 ml 1 m Salzsäure bei +4 °C mit 5 mg Natriumnitrit (70 µMol) diazotiert. Das gebildete Diazoniumsalz wurde nach dem Umsetzen des überschüssigen Nitrits mit einer geringen Menge Amidosulfonsäure mit 100 mg (15,4 µMol) Mononitro-BPTI (vgl. Beispiel 13) in 10 ml 1 m Natriumkarbonatlösung bei pH 10,0 15 Min. gerührt. Schliesslich wurde eine geringe Menge Phenol zugegeben. Nach Entsalzen der Lösung durch Gelfiltration an Sephadex®G-10 mit 0,1 m Ammoniumhydroxidlösung als Elutionsmittel wurde das lyophilisierte Eluat an Sephadex®G-50 chromatographiert. Es wurden 10 mg (10%) höhermolekulare Anteile und aus der Hauptfraktion 68 mg (68%) gelbe Substanz erhalten.

Beispiel 22

27 mg (0,31 mMol) 5-Aminotetrazol-(1,H) wurden, wie in Beispiel 18 angegeben, diazotiert. Die Diazoniumsalzlösung wurde mit einer geringen Menge Amidosulfonsäure versetzt und mit konz. Natronlauge auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt. Die so erhaltene Lösung wurde bei +4 °C mit einer Lösung von 500 mg Dinitro-BPTI (vgl. Beispiel 14) in 15 ml 1 m Natriumkarbonatpuffer pH 9,0 vereinigt. Nach 15 Min. Rühren bei +4 °C wurde die Reaktionslösung durch Gelfiltration an Sephadex®G-10 (2,9 × 100 cm Säule) entsalzt, nachdem zuvor eine geringe Menge Phenol zum Umsetzen des überschüssigen Diazoniumsalzes zugesetzt worden war. Das gefriergetrocknete Eluat wurde an Sephadex®G-50 mit 0,1 m Essigsäure als Elutionsmittel chromatographiert. Es wurden 25 mg (5%) höhermolekulare Anteile und aus der Hauptfraktion 396 mg (79%) Substanz erhalten.

Beispiel 23

500 mg partiell desamidiertes BPTI, erhalten durch 20tägiges Stehenlassen von BPTI in 2n Salzsäure (2 g/100 ml) bei 20 °C und unter Stickstoff wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, in essigsaurer Lösung mit Natriumnitritlösung versetzt und 24 Std. bei +4 °C umgesetzt. Dann wurde das Reaktionsgemisch, wie in Beispiel 2 angegeben, auf ein Volumen von ca. 100 ml eingengt und durch Filtration über Sephadex®G-10 entsalzt mit 0,1 m wässrigem Ammoniak als Elutionsmittel. Die durch Gefriertrocknen der Protein enthaltenden Fraktionen gewonnene Substanz wurde in 0,1 m Essigsäure zum Abtrennen höhermolekularer Anteile (ca. 36 mg = ca. 7%) an Sephadex®G-50 chromatographiert. Beim Lyophilisieren der Hauptfraktion erhielt man 372 mg Substanz (74%).

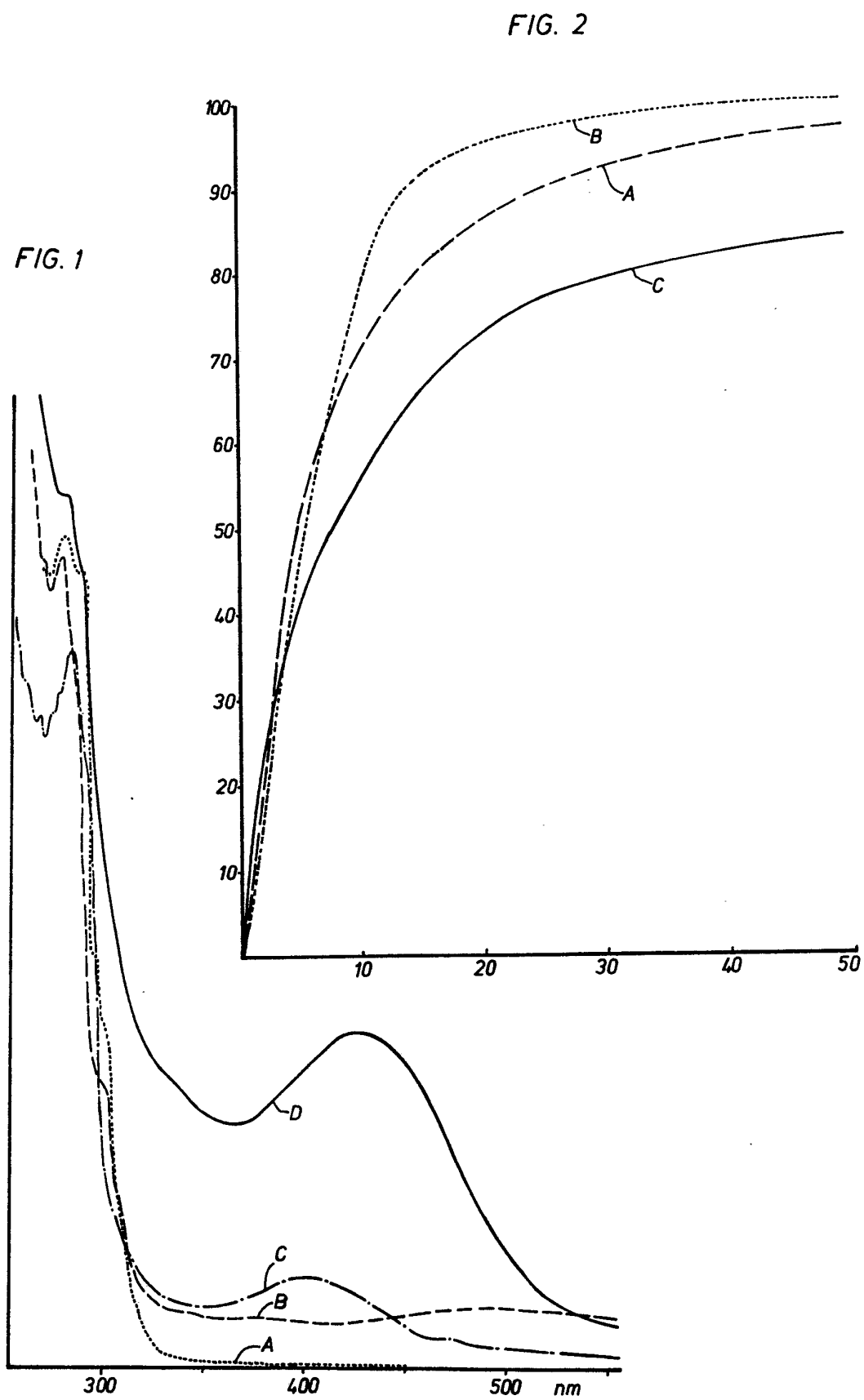


FIG. 3

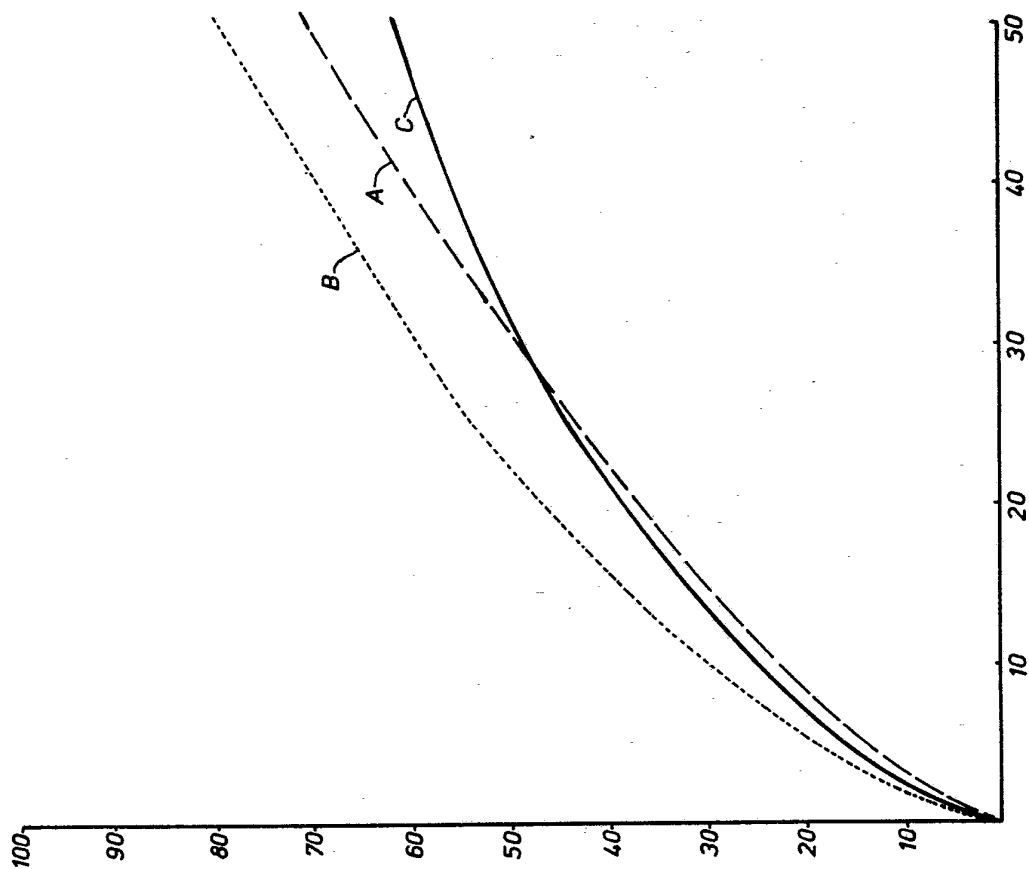


FIG. 4a

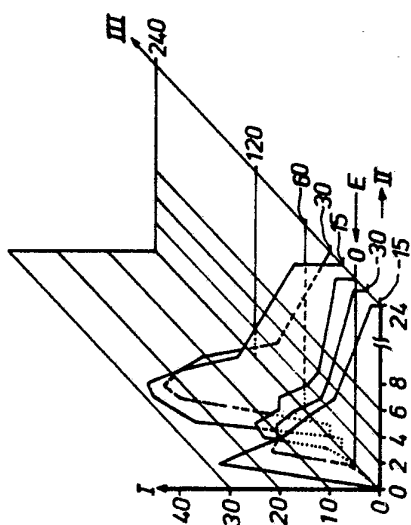
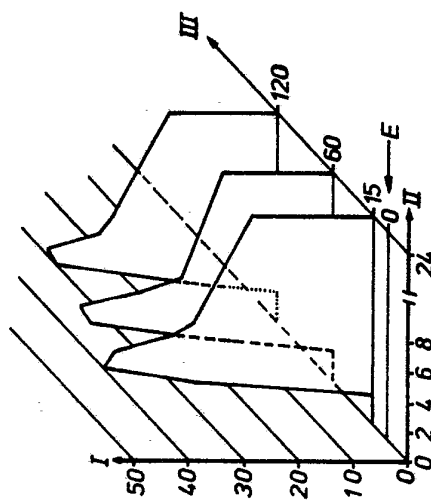


FIG. 4b



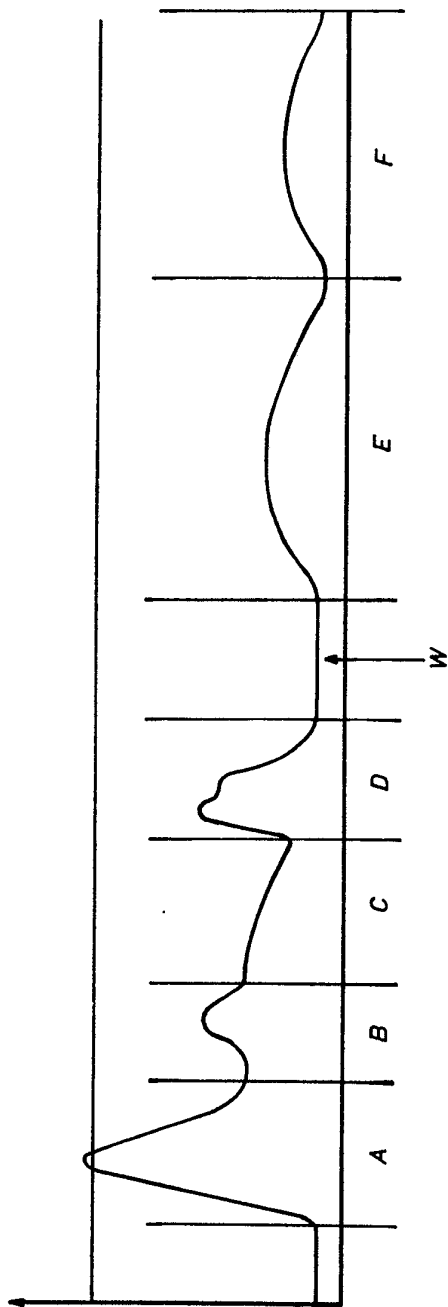


FIG. 5

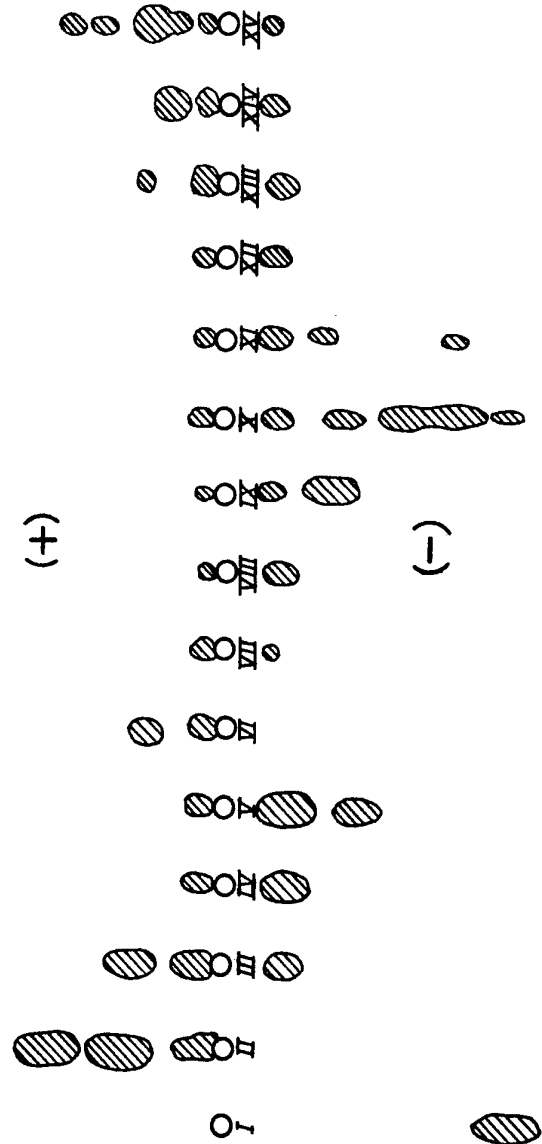


FIG. 6