

NORGE

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 130481



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

(51) Int. Cl. C 07 g 7/00

(52) Kl. 12p-16

(21) Patentsøknad nr. 4817/70

(22) Inngitt 15.12.1970

(23) Løpedag 15.12.1970

(41) Søknaden alment tilgjengelig fra 22.6.1971

(44) Søknaden utlagt og
utlegningsskrift utgitt 9.9.1974

(30) Prioritet begjært fra: 19.12.1969 Forbundsrepublik-
ken Tyskland, nr. P 19 63 733

-
- (71)(73) BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT,
509 Leverkusen-Bayerwerk,
Forbundsrepublikken Tyskland.
- (72) Eugen Werle, Rümelinstr. 6, München 2,
Hans Fritz, Magdalenenstr. 36, München og
Harald Schult, Wiener Str. 36, München 80,
alle: Forbundsrepublikken Tyskland.
- (74) Bryns Patentkontor A/S
- (54) Analogifremgangsmåte til fremstilling
av acylderivater av kallikrein-trypsin-
inhibitoren.

Kallikrein-trypsin-inhibitoren, i det følgende betegnet som KTI ("trasylol"), har i de senere år vært et helt spesielt verdifullt legemiddel, fremfor alt overfor betennelsesprosesser og overfor forbrukskoagulopater.

KTI lagres sterkt i nyrene hvilket har til følge at KTI-blodspeilet synker temmelig hurtig. Man har av denne grunn tilstrebet å finne KTI-derivater som lagres mindre sterkt i nyrene og som derfor gir et lengere vedvarende høyt blodspeil.

Det er nå blitt funnet at acylderivater av KTI oppfyller dette krav i høy grad.

I britisk patent nr. 1.173.556 omtales acylderivater av KTI fremstillet ved direkte omsetning av KTI med N-karboksydehydrid

av en aminosyre; spesielt omtales polyglutamyl- og polyseryl-KTI. Slik direkte omsetning fremstiller imidlertid acyl-KTI, hvori det reaktive senter av KTI-molekylet er acylert og derfor inaktivert i en del av molekylerne. Disse kjente acyl-KTI er derfor vesentlig mindre aktive enn ikke modifisert KTI.

Med acylderivater skal det her forstås alle de derivater av KTI hvori ϵ -aminogruppen av lysin-resten av KTI i stilling 26, 41 og 46 samt aminogruppen av det N-terminale arginin av KTI delvis eller fullstendig er acylert, nemlig såvel ved karboksylsyre som også med sulfonsyreester.

Antallet av de angjeldende acyleringsmidler er meget stort. Eksempelvis kan det nevnes:

- Eddiksyreanhydrid
- Acetylchlorid
- Diacetyl
- Trifluoreddiksyre-tioetyler
- N,S-diacetyl-2-aminoetantol
- Nitrofenylacetat
- Trinitrobenzolsulfonsyre
- N-acetylimidazol
- N-trifluoracetylimidazol
- Tetrafluoracetylanhydrid
- Trifluoreddiksyreanhydrid
- Keten
- N-acetyl-alanin-p-nitrofenylester
- Homoserinlacton
- Benzyloksykarbonylchlorid
- N-etoksykarbonyl-ftalimid.

De nye forbindelser som fremstilles ifølge oppfinnelsen er likeså godt tålbare som KTI. En vesentlig fordel ved de nye forbindelser består i at de ikke lagres meget sterkt i nyrene og derfor gir et langvarig høyt blodspeil. De nye forbindelser utskilles desuten med urinen og har derfor vist seg spesielt verdifulle ved sykdommer av urogenitalkanalen. Det har forøvrig den samme aktivitet som KTI selv.

Denne aktivitet måles i inhibitorenheten IE. En IE-tilsvarende hemningene av aktiviteten av et mg trypsin, målt med N- α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid som substrat under følgende standardbetingelser:

3 ml samlet volum
Temperatur 25°C
i cm lysvei
1 mg substrat i 1 ml destillert vann
+ 10 mE trypsin i 0,001 normal HCl
+ x ml inhibitoroppløsning
ad 3,0 ml 0,2 molar trietanolaminpuffer
pH 7,8
0,02 mol kalsiumklorid.

Oppfinnelsen vedrører altså fremstilling av acylderivater av kallikrein-trypsin-inhibitoren (KTI), hvori minst en aminogruppe valgt fra ϵ -aminogruppen av lysinresiduet ved 26-, 41- og 46-stillingene og aminogruppen av den N-terminale argininrest er acylert, men det reaktive senter av KTI forblir uacylert.

De nye forbindelser fremstilles ved at man i første rekke på i og for seg kjent måte overfører KTI med enzymer, f.eks. trypsin i et KTI-enzym-kompleks/Chauvet og Acher, J.Biol. Chemistry 242, (1967), side 4274). Dette kompleks omsettes deretter med de ovennevnte acyleringsmidler. Av de således dannede acyl-KTI-komplekser, avspaltes enzymet på i og for seg kjent måte (se ovennevnte litteratur). Man får derved acylderivatene av KTI i forholdsvis ren form, hensiktsmessig underkastes de imidlertid ved de i og for seg kjente rensemetoder for eksempel gelfiltrering eller ionutvekslingskromatografi.

De i denne fremgangsmåte gjennomførte binding av KTI til et enzym og senere avspaltning av enzymet er nødvendig for å hindre en acylering av det reaktive sentrum av KTI.

Acylderivatene fremstilt ifølge oppfinnelsen av KTI, kan anvendes i medisinen for samme indikasjoner for hvilke man med godt resultat i mange år har anvendt KTI selv. Også applikasjonsformene og dosene som skal anvendes tilsvarende sterkt de som er kjent fra KTI.
Eksempel 1.

50 mg KTI og 188 mg trypsin oppløses i 30 ml isavkjølt (0°C), 0,1 molar NaHCO_3 -puffer pH 8,5 (innstilt med 2 normal NaOH). Oppløsningen blandes så lenge med små mengder trypsin, resp. KTI inntil det med 0,05 ml prøver ikke mere kan fastslås noen trypsin-hemmende resp. tryptisk aktivitet. Den således dannede oppløsning av KTI-trypsinkomplekset blandes etter to timers henstand (0°C) med 0,5 g finpulverisert maleinsyreanhydrid og oppløsningens pH-verdi holdes ved stadig tilsetning av 2 normal NaOH ved 8,5. Hver gang

130481

mot slutten av forsøkingsreaksjonen (synlig på sterk tilbakegang av forbruk av natronlut) tilsettes ytterligere 0,5 g maleinsyreanhydrid, tilsammen 2 g i 4 porsjoner. Når etter den siste tilsetning av maleinsyreanhydrid pH-verdien har stabilisert seg, tilsettes 18,5 g urinstoff til en sluttkonsentrasjon på 6 molar til oppløsningen og innstilles med 2 normal HCl pH-verdien på 1,9, idet maleinsyren og en del av det modifiserte trypsin faller ut. I fullstendig utfelling av det modifiserte trypsin, innrøres 2,5 g ammoniumsulfat i den til 0°C avkjølte suspensjon. Utfellingen frasentrifugeres deretter under avkjøling, den overstående klare oppløsning avdekanteres, blandes med 2 ml 0,2 molar trietanolaminpuffer pH 7,8, og nøytraliseres med 2 normal NaOH (pH 7-8). Den nøytrale oppløsning som inneholder tetra(maleoyl)-KTI ved siden av mindre mengder av maleinsyre og modifisert KTI-trypsinkompleks påføres på en sefadex G-50-søyle som på forhånd ble ekvilibrert med 0,02 molar ammoniumacetatpuffer, pH 6,0. Fraksjoneringen etter molekyllstørrelse foregår med samme puffer som elueringsmiddel. Ved den tetra(maleoyl)-KTI-holdige fraksjon inndampes i vakuumrotasjonsfordamper ved 20°C badetemperatur til ca. 5 ml og avsaltes ved hjelp av en bio-gel-P-2-søyle, hvorved det som elueringsmiddel anvendes destillert vann. Den saltfrie fraksjon av tetra(maleoyl)-KTI lyofiliseres.

Utbytte: Referert til anvendt mengde av nativt KTI utgjør utbytte av lyofilisert tetra(maleoyl)-KTI 84% med spesifikk aktivitet på 3,3 IE/mg.

Eksempel 2.

Analogt den i eksempel 1 omtalte fremgangsmåte dannes ved omsetning av KTI-trypsin-komplekset med den halve mengde av maleinsyreanhydrid tri(maleoyl)-KTI idet ved siden av dette, dannes dessuten tetra(maleoyl)-KTI. Etter fraksjonering ved gelfiltrering på Sephadex G-50 påføres 300-500 γ blandingen av reaksjonsproduktet på celluloseacetatfolie som ble impregnert med 0,05 molar boratpuffer pH 8,0. Elektroferogrammet løpetid utgjør en time ved en spenning på 6 V/cm. Det fåes to bånd som ved vandringsstrekningene på 0,56 er karakteristisk for tetra(maleoyl)-KTI og for 0,64 for tri(maleoyl)-KTI, referert til en vandringsstrekning på 1,0 for den native KTI. Ved preparativt elektroforese med f.eks. polyakrylamidgel som bæremateriale lar det seg utvinne de to derivater av KTI i står målestokk.

Utbytte: Referert til den anvendte mengde av nativt KTI, utgjør utbyttet av lyofilisert materiale 85% med spesifikk aktivitet

på 3,3 IE/mg. Forholdet mellom tetra- og tri(maleoyl)-KTI utgjør 2/3 til 1/3.

Eksempel 3.

200 mg KTI og 715 mg trypsin oppløses i 50 ml isavkjølt puffer og analogt den i eksempel 1 omtalte fremgangsmåte dannes KTI-trypsinkomplekset. Oppløsningen av KTI-trypsin-komplekset omsettes med 2 g ravsyreanhydrid, tilsatt i 4 porsjoner til tetra(succinyl)-KTI. Etter utfelling av det modifiserte trypsin med ammoniumsulfat frafiltreres utfellingen og filtratet innstilles med 8 N NaOH til pH 6,5. Denne oppløsning påføres på en Sephadex G-50-søyle som ble ekvilibrert med 0,01 molar eddiksyre. Som elueringsmiddel tjener 0,01 molar eddiksyre. Den tetra(succinyl)-KTI-holdige fraksjon lyofiliseres. Utbytte: Referert til anvendt mengde av nativt KTI, utgjør utbyttet (i flere forsøk) av lyofilisert tetra(succinyl)-KTI 80-90% med en spesifikk aktivitet på 3,3-3,7 IE/mg.

Eksempel 4.

200 mg KTI omsettes analogt den i eksempel 1 omtalte fremgangsmåte med 715 mg trypsin til KTI-trypsin-kompleks. Kompleksets oppløsning omsettes med 2 g acetylmerkaptoravsyre-anhydrid, tilsatt i 4 porsjoner, til en blanding av tetra-, tri-, di- og mono(acetylmerkaptosuccinyl)-KTI, som etter kjente metoder lar seg adskille elektroforetisk i enkeltkomponentene.

Utbytte: Referert til mengden av anvendt nativt KTI, utgjør utbyttet av lyofilisert materiale 80% med en spesifikk aktivitet på 3,3-3,7 IE/mg.

Eksempel 5.

50 mg KTI og 188 mg trypsin reagerer analogt den i eksempel 1 omtalte fremgangsmåte til KTI-trypsin-kompleks. Kompleksets oppløsning tilsettes 2 g karboksymetylmerkaptoravsyreanhydrid i 4 porsjoner. Etter tilsetning av urinstoff og surgjøring av reaksjonsblandingen med 2 N HCl til pH 2,0, tilsettes trikloreddiksyre til en sluttkonsentrasjon på 3%. Det utfelte modifiserte trypsin frafiltreres og filtratet innstilles med 8 N NaOH til pH 6,5. Oppløsningen kromatograferes på en Sephadex G-50 søyle som ble ekvilibrert med 0,01 molar eddiksyre og fraksjonen som inneholder modifisert KTI lyofiliseres. Den modifiserte KTI oppdeles ifølge den i eksempel 2 omtalte fremgangsmåte ved elektroforese på celluloseacetat-folie i tetra-(karboksymetylmerkaptosuccinyl)-KTI og tri(karboksymetylmerkaptosuccinyl)-KTI.

130481

Utbytte: Referert til anvendt mengde av nativt KTI, utgjør utbyttet av lyofilisert tetra- og tri(karboksymetyl-merkaptosuccinyl)-KTI 65% med en spesifikk aktivitet på 3,3 - 3,7 IE/mg.

Eksempel 6.

Oppløsningen av 50 mg av det native KTI og 190 mg trypsin i 15 ml 0,1 molar NaHCO_3 -puffer, pH 8,5 blandes godt med en oppløsning av 50 mg 1-dimetylamino-naftalin-5-sulfonyl (Dansyl)-klorid i 7,5 ml aceton og reaksjonsblandingen inkuberes i 18 timer ved 20°C . Deretter surgjøres reaksjonsblandingen med 2 N HCl til pH 2,0 og trikloreddiksyre tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 3%. Etter kort henstand frafiltreres det modifiserte trypsin og filtratet kromatograferes på en Sephadex G-50-søyle som ble ekvilibrert med forty-net maursyre, pH 2,0. Fraksjonene elueres med maursyre, pH 2,0 og den Dansyl-KTI-holdige oppløsning lyofiliseres.

Utbytte: Referert til mengde av anvendt nativt KTI, utgjør utbyttet av lyofilisert poly-(1-dimetylamino-naftalin-5-sulfonyl)-KTI 35% med en spesifikk aktivitet på 3,3 - 3,7 IE/mg.

Eksempel 7.

Oppløsningen av 50 mg av nativt KTI og 190 mg trypsin i 30 ml 0,1 molar NaHCO_3 -puffer, pH 8,5, blandes i løpet av 2 timer under livlig omrøring med 2 g homocystein-tiolakton-hydroklorid i porsjoner på 0,5 g, idet det arbeides i nitrogenatmosfære. Etter tilsetning av urinstoff inntil en sluttkonsentrasjon på 6 molar og trikloreddiksyre til en sluttkonsentrasjon på 3%, viderearbeides uten nitrogenatmosfære. Blandingen ble hensatt i kort tid, deretter ble utfellingen frafiltrert og filtratet innstilt med 8 N NaOH på pH 6,0. Fraksjonering ved gelfiltrering på Sephadex G-50 foregikk ifølge den i eksempel 1 omtalte metode. Fraksjonen som inneholder blandingen av poly(α -amino- γ -merkaptobutyryl)-KTI lyofiliseres.

Utbytte: Referert til anvendt mengde av nativt KTI, utgjør utbyttet av lyofilisert poly(α -amino- γ -merkaptobutyryl)-KTI 60% med en spesifikk aktivitet på 3,3 - 3,7 IE/mg.

P a t e n t k r a v :

Analogifremgangsmåte til fremstilling av acylderivater av kallikrein-trypsin-inhibitoren, hvori minst en aminogruppe valgt fra ϵ -aminogruppen av lysinresiduer ved 26-, 41- og 46-stillinger og aminogruppen av den N-terminale argininrest er acylert, men det reaktive senter av KTI forblir uacylert, k a r a k t e r i s e r t v e d at man overfører kallikrein-trypsin-inhibitoren i et enzym-

130481

kompleks, behandler dette med acylerende midler og spalter det derved dannede acyl-kallikrein-trypsin-inhibitor-enzymkompleks på i og for seg kjent måte.

(56) Anførte publikasjoner: Ingen.