

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 800396 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **800396**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
C07G 7/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.09.1976**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **08.02.1980**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.01.1981**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

09.09.1975 US 611657

09.09.1975 US 611659

09.12.1975 US 639076

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Diagnostic Data, Inc., 518 Logue Avenue Mountain View, Cal. 94040, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Huber, Wolfgang, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Saifer, Mark Gary, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Williams, Lewis D., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä tulehdusta estävien orgoteiinijohdannaisien valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av antiinflammatoriska orgoteinderivat.

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan - Divided from application: **762566**

Diagnostic Data, Inc., 518 Logue Avenue, Mountain View, Kalifornia
94043, Yhdysvallat

A. VALL
Menetelmä tulehdusta estävien orgoteiini johdannaisten valmistamiseksi - Förfarande för framställning av antiinflammatoriska orgoteinderivat

57112
Jakamalla erotettu hakemuksesta 762566

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä tulehdusta estävien orgoteiini johdannaisten valmistamiseksi.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että annetaan orgoteiinin, kuten naudan orgoteiinin, reagoida

a) alkylointiaineen, kuten primäärisen dialkyyli sulfaatin, edullisesti dimetyyli sulfaatin, tai aktiivisen alkyylihalogenidin, tai aktiivisen vinyyli yhdisteen kanssa, N-alkyloidun orgoteiinin tuottamiseksi, jossa on alkyyliryhmä samassa järjestyksessä ainakin yhdessä sen lysiinin ϵ -aminoryhmässä, ja jossa edullisesti on vähintään 10-18 alkyloitua ϵ -aminoryhmää molekyylillä kohti, tai

b) esteröintiaineen kanssa vesi- tai puskuriliuoksessa, joka esteröintiaine edullisesti on dimetyyli- tai dietyyli sulfaatti, atsiidi, jolla on kaava N_2CH_2COX , jossa X on OCH_3 , OC_2H_5 , NH_2 tai $NHCH_2CONH_2$ tai muu diatsoetikkahapon esteri tai amidi, josta puuttuu

reaktiokykyinen ryhmä esteröidyn orgoteiinin tuottamiseksi, jossa 1-10 orgoteiiniproteiinimolekyylin vapaista karboksyylihapporyhmistä on esteröity.

Orgoteiini on vesiliukoinen proteiini johdannainen oleellisesti puhtaassa, injektoitavassa muodossa, so. oleellisesti puhtaana muista proteiineista, ks. US-patentti 3 758 682, sekä suomalaiset patentit 48 603, 48 744, 48 884, 48 932, 49 170 ja 49 983.

Orgoteiinilla on luonteenomainen fysikaalisten, kemiallisten, biologisten ja farmakodynaamisten ominaisuuksien yhdistelmä. Se on pallomainen, puskuri- ja vesiliukoinen proteiiniyhdiste, jolla on erittäin luja natiivi rakenne, vaikka se onkin lämpölabiili, on se kuitenkin melko stabiili puskuriliuoksessa, jonka pH on 4-10, ja kestää 65°C kuumentamisen useita minuutteja. Kemiallisesti orgoteiinille on luonteenomaista, että se sisältää yleensä kaikkia proteiiniaminohappoja, pienen määrän hiilihydraattia, ei lainkaan lipidejä, 0,1-1,0 % metallia, eli 0-5 gramma-atomia (moolia kohti) yhtä tai useampaa kelatoitua kaksiarvoista metallia, jonka ionisäde on 0,60-1,00 Å, eikä oleellisesti lainkaan kelatoimatonta yksiarvoista metallia eikä myrkyllistä metallia.

Orgoteiini johdannaisten aminohappokoostumus on huomattavan yhdenmukainen riippumatta lähteestä, josta ne on eristetty.

Taulukossa I on esitetty orgoteiinin aminohappokoostumus.

Taulukko I

Orgoteiinin aminohappokoostumus (aminohappoluku orgoteiinimolekyyliä kohti, orgoteiinin molekyylipaino otettu 32 500:ksi)

Punaista verisoluista saatu orgoteiini

Aminohappo	Härän maksasta saatu orgoteiini	Härkä	Lammas	Hevonen	Sika	Koira	Kaniini	Rotta	Marsu	Kananpoika	Ihminen	Keski- arvo
Alaniini	19	19	18	18	18	16	19	22	22	23	22	16-23
Arginiini	8	8	10	6	8	8	8	7	8	8	8	6-10
Asparagiinihappo	37	36	35	35	31	29	34	30	34	36	37	29-37
Kystiini-1/2	6	6	6	6	6	6	6	6	4	10	8	4-10
Glutamiinihappo	21	23	22	30	28	30	25	38	29	26	28	21-38
Glysiini	53	52	52	51	52	53	54	54	53	56	51	51-56
Histiidiini	16	16	14	20	16	15	17	20	15	17	14	14-20
Isoleusiini	18	18	18	14	16	18	16	16	18	15	17	14-18
Leusiini	17	17	17	18	16	16	19	12	17	15	20	12-22
Lysiini	22	21	23	26	23	20	21	18	20	21	23	18-26
Metioniini	2	2	2	2	2	6	3	4	2	3	1	1-6
Fenyylialaniini	8	8	7	9	8	8	9	6	8	8	8	6-9
Proliini	12	13	15	10	10	10	13	10	12	13	12	10-15
Serini	17	17	14	14	13	20	18	18	18	15	19	13-30
Treoniini	26	25	20	16	27	20	21	17	17	18	13	16-27
Tryptofaani 1) ei laink.	ei laink.	ei laink.	ei laink.	ei laink.	ei laink.	ei	ei	ei	ei	1	2	0-2
Tyrosiini 2)	2	2	2	"	4	2	"	2	"	2	ei lainkaan	0-4
Valliini	33	32	31	29	29	34	31	35	32	30	30	29-35
Yhteensä	317	315	306	304	307	311	315	315	309	317	318	304-318

1) Kolorimetrinen määrittäminen

2) Aminohappoanalyyisin ja spektrofotometrisen määrittäksen keskiarvo

Taulukosta I voidaan nähdä, että orgoteiinilla on 18-26 ja tavallisesti 20-23 lysiiniryhmää, joissa kaikissa paitsi 1-3:ssa on trinitrobenseenisulfonihapolla titrattavat ϵ -aminoryhmät. Nämä ryhmät voidaan alkyloida tai karbamyloida.

Taulukosta I voidaan myös nähdä, että orgoteiini johdannaisissa on 29-37 asparagiinihapporyhmää ja 21-38 glutamiinihapporyhmää. Nämä ryhmät voidaan esteröidä.

Tietyt reagenssit kykenevät tietyissä olosuhteissa samanaikaisesti alkyloimaan orgoteiinimolekyylissä olevia vapaita aminoryhmiä ja esteröimään karboksyylihapporyhmiä.

Luonnon orgoteiinilla on muun muassa tulehduksia vastustavaa aktiivisuutta (ks. US-patentti 3 758 682). Sillä on myös erittäin suuri peroksididismutaasiaktiivisuus (ks. McCord & Fridovich, J.Biol.Chem., 244, 6, 176, (1970); ibid, 246, 2, 875 (1971)). On yllättävää, ettei N-alkylointi tai esteröinti vaikuta käytännöllisesti katsoen lainkaan keksinnön mukaisesti valmistetun orgoteiini johdannaisen tulehduksia vastustavaan aktiivisuuteen. Näin ollen tämän keksinnön mukaisesti valmistetut orgoteiini johdannaiset ovat erittäin käyttökelpoisia esim. nisäkkäillä tai muilla eläimillä esiintyvien tulehdustilojen hoitoon. Huomattava osa luonnon orgoteiinin peroksididismutaasiaktiivisuudesta (20-100 %) säilyy myös.

N-alkyloitu orgoteiini

Kuten yllä esitettiin orgoteiini johdannaiset sisältävät 18-26 lysiiniryhmää. Koska orgoteiinimolekyyli muodostuu kahdesta identtisestä peptidiketjusta (alayksiköistä), puolet lysiiniryhmistä on kussakin ketjussa, jotka ovat voimakkaasti (tosin ei-kovalenttisesti) sitoutuneet toisiinsa laajalla lämpötila- ja pH-alueella. Vain muutaman lysiinin ϵ -aminoryhmä ei ole titrattavissa trinitrobenseenisulfonihapolla (TNBS); näitä aminoryhmiä ei voida alkyloida muilla kuin erittäin voimakkailla alkylointiaineilla, esim. dimetyylisulfaattilla alkaalisessa liuoksessa. Alkyloimisaste voidaan määrittää TNBS:n avulla. Tällöin on otettava huomioon, että kaikki aminoryhmät eivät ole titrattavissa (esimerkiksi naudan orgoteiinia titrattaessa vain 18 sen 20-22 lysiiniryhmistä reagoi); lisäksi on pidettävä mielessä, että monoalkyloidut lysiinit ovat vielä asyloitavissa.

Lyysiiniryhmien di- ja trialkylointia voidaan seurata las-
kemalla varauksen muutos, joka esiintyy N-alkyloidun tuotteen
elektroforeesissa. Esimerkiksi orgoteiini, joka oli alkyloitu
dimetyylisulfaattilla pH-arvossa 10, osoitti varauksen muutosta -2
etikkahappoanhydridillä tapahtuneen asyloinnin jälkeen verrattu-
na arvoon -20 alkyloimattomalla orgoteiinilla.

Kuten tiedetään ionin elektroforeettinen liikkuvuus on
sähkökentän voimakkuuden, ionin nettovarauksen (mukaanluettuna
sitoutuneet vastaionit) ja kitkakertoimen funktio (ks. esimerkik-
si C.Tanford "Physical Chemistry of Macromolecules" Wiley, New York
(1966)). Koska kitkakerroin riippuu molekyylin koosta ja muodosta
ja liuoksen koostumuksesta, eri proteiinien vertailut eivät ole
kovin informatiivisia. Kuitenkin vertailemalla kooltaan ja muo-
doltaan samanlaisia proteiineja, tässä tapauksessa orgoteiini-
molekyyliä, jotka on modifioitu suhteellisen pienillä ryhmillä,
identtisissä elektroforeesiolosuhteissa, ainoa muuttuja, joka
vaikuttaa tähän elektroforeettiseen liikkuvuuteen, on nettovaraus.

Useiden kemiallisesti modifioitujen orgoteiinimolekyylien
elektroforeettisten analyysitulosten vertailu on yhdenmukainen
tämän johtopäätöksen kanssa. Naudan orgoteiini liikkuu pääasiassa
yhtenä nauhana (nauha 1); vain pieniä ainemääriä liikkuvat nopeam-
min (nauhat 2, 3 jne.), nämä edustavat orgoteiinimolekyyliä, joil-
la on suurempi -COOH/-NH_2 -ryhmien suhde kuin pääosalla orgoteiini-
molekyyleistä (nauha 1). Naudan orgoteiinin käsittely suurenevalla
etikkahappoanhydridin väkevyyksillä pH:ssa 7, tai metyyli-isotio-
syanaatilla pH-arvolla 9, johtaa peräkkäin anodisempien (vaelta-
vat kohti anodia) elektroforeettisten nauhojen sarjan muodostumi-
seen, sitä mukaa kuin useampia orgoteiinimolekyylien vapaita ami-
noryhmiä asetyloituu tai karbamyloituu. Käsiteltäessä vastaavasti
dimetyylisulfaattilla saadaan nauhasarja, joka on siirtynyt kato-
diin päin.

Käyrä, jossa esitetään nauhan kulkema matka vs. nauhanumero,
on suhteellisen lineaarinen pienillä -COOH- tai -NH_2 -modifiointi-
asteilla, mutta alkaa poiketa suorasta suuremmalla modifiointias-
teella. Varsinkin liuoksen ionivahvuuden ollessa suuri nopeiden
ionien kulkunopeus huomattavasti hidastuu. Koska useamman kuin
noin kahden nauhan sijainnin ekstrapolointi ei ole tarkkaa, täs-

mällinen varauksen laskeminen vaatii, että käytetään sisäistä standardia.

Kaikki tavanomaiset proteiinin modifiointireaktiot, joita on sovellettu orgoteiinimolekyyllille tähän saakka, ovat olleet yhdenmukaisia tämän tulkinnan kanssa, nimittäin että nauhojen sijainnit vastaavat itsenäisiä varauksen muutoksia luonnon orgoteiinimolekyyllissä. Asetylointi antaa nauhat 2,3,4,5 jne. osoittaen, että 1,2,3 ja 4 vapaata aminoryhmää samassa järjestyksessä on kemiallisesti modifioitu. Esteröinti dimetyylisulfaattilla tai etyyli-diatsoasetaatilla antaa nauhat -1, -2, -3, -5 jne. osoittaen, että 1,2,3 ja 4 vapaata karboksyylihapporyhmää samassa järjestyksessä on kemiallisesti modifioitu.

Vain 2-4 lyysiiniryhmistä ovat sellaisia, joita ei voida alkyloida lievillä alkylointiaineilla. Vain suunnilleen yksi TNBS:lla titrattavista lyysiiniryhmistä jokaisessa orgoteiinin peptidialayksikössä on sellainen, jota ei voida polyalkyloida käyttäen voimakkaampia alkylointiolosuhteita, esim. ylimäärin dimetyylisulfaatin 0,04-m karbonaattipuskuria, pH 10.

Kun kaikkia titrattavista lyysiiniaminoryhmistä ei alkyloida orgoteiinimolekyyllissä olevien karbamyyli ryhmien alkyliosien jakautuma on todennäköisesti sattumanvarainen, sillä mikään titrattavista lyysiiniaminoryhmistä ei osoittaudu epänormaalin helposti alkyloituvaksi aminoryhmäksi. Koska orgoteiinimolekyyli koostuu kahdesta identtisestä peptidiketjusta, osittain alkyloidun orgoteiinin alkyyliryhmät jakautuvat enemmän tai vähemmän sattumanvaraisesti pitkin jokaista peptidin alayksikköä, mutta enemmän tai vähemmän tasaisesti näiden kahden ketjun välille. Koska tavallisesti käytetään vain yhtä alkylointiainetta, alkyyliryhmät ovat kaikki identtisiä. On kuitenkin mahdollista valmistaa alkyloituja orgoteiineja, joiden molekyylissä ja jopa jokaisessa sen ketjussa on kaksi tai useampia erilaisia alkyyliryhmiä.

Eräs tapa valmistaa seka-alkyyliorgoteiini on alkyloida vaihteittain eri alkylointiaineilla. Esimerkiksi osa titrattavan lyysiinin ϵ -aminoryhmistä voidaan alkyloida esim. laimealla jodi-asetamidilla ja loput reaktiokykyisistä aminoryhmistä esim. väkevällä dimetyylisulfaattilla. Sopiva alkylointiaineen väkevyys riippuu suhteellisista reaktionopeuksista ja käytetyistä liuottimista;

reaktionopeus riippuu pH-arvosta ja alkylointiaineesta, ja vähemmässä määrin puskurista ja lämpötilasta.

Tämän keksinnön ϵ -N-alkyyliorgoteiineilla näyttää olevan oleellisesti sama ulkomuoto kuin luonnon orgoteiinimolekyylillä. Kelatoitunut Cu^{++} ja Zn^{++} -pitoisuus (gramma-atomia/mooli) on suunnilleen sama kuin orgoteiinilla. Kuten orgoteiinikin ne ovat erittäin kestäviä pronaasi- ja muuta proteolyyttistä entsyymihajoamista vastaan. Peroksididismutaasin (SOD) entsyymaattinen aktiivisuus säilyy.

Vaikka vallitseva luonnon orgoteiinin rakennemuutos, joka tapahtuu sen alkyloinnissa alkaalisella pH-arvolla, on sen lysiinien ϵ -aminoryhmien mono-, di- ja vähemmässä määrin trialkyloiminen, muutkin molekyylissä olevat alkyloituvat ryhmät, erityisesti -OH ja imidatsolityppi ja mahdollisesti myös guanidinityppi, -SH, -SCH₃ jne. voivat myös samanaikaisesti alkyloitua riippuen käytetyistä olosuhteista ja alkylointiaineen reaktiivisuudesta. Esimerkiksi kun pH-arvolla 10 jodiasetamidia käytettäessä alkylointi näyttää olevan pelkästään ϵ -N-alkylointia, alkylointi dimetyylisulfaatilla pH-arvolla 10 on vähemmän selektiivinen ja liittyy samanaikaisesti metyyliiryhmiä muualle molekyyliin. Kuitenkin, kun kyseessä on karbamylointi, tällaiset samanaikaisesti modifioidut ryhmät ovat labiileja ja helposti hydrolysoituvia vesiliuoksessa päivässä tai lyhyemmässä ajassa riippuen pH-arvosta.

Alkyloinnin kulkua, sikäli kuin se koskee -COOH-alkylointia, voidaan seurata suoraan elektroforeettisen kokonaisvarauksen muutoksella ja uusien kaistojen ilmestymisestä elektroforeesissa. Samalla tavoin N-alkylointia, sikäli kuin se tekee muutoin asyloituvan -NH₂-ryhmän asylointia kestäväksi, voi seurata asyloivien aminoryhmien lukumäärän pienentyminen verrattuna luonnon orgoteiinimolekyyliin.

N-alkyyli-ryhmien tarkka luonne enempää kuin niiden lukumääräkään ei ole kriittinen sikäli kuin alkyyli-ryhmä on fysiologisesti hyväksyttävä. Johtuen orgoteiinimolekyylin korkeammasta molekyylipainosta silloinkin kun orgoteiinimolekyyli on täysin alkyloitu alkyyli-ryhmillä, joilla on kohtuullinen molekyylipaino, esim. ≤ 100 , vaikutus kemialliseen kokonaiskoostumukseen on suhteellisen pieni, so. alle 10 %. Alkyloinnilla ei myöskään ole

ilmeistä merkittävää vaikutusta molekyylin tiiviiseen avaruus- rakenteeseen eikä saatuun stabiilisuteen, esim. lämmitettäessä tunnin ajan 60°C :ssa, eikä proteolyyttisten entsyymien vaikutukseen.

On selvää, että alkyyli-ryhmän on myös oltava peräisin sellaisesta alkylointi-aineesta, joka kykenee alkyloimaan amino-ryhmän vedessä tai puskuriliuoksessa, sillä reaktio suoritetaan tavallisesti niissä.

Tällaisia alkylointiaineita ovat primääriset dialkyyli-sulfaatit: $(\text{RO})_2\text{SO}_2$ ($\text{R}=\text{CH}_3, \text{H}_2\text{H}_5, \text{n-C}_3\text{H}_7, \text{n-C}_4\text{H}_9$), aktivoituneet alkyylihalidit: JCH_2COX ($\text{X}=\text{OH}, \text{NH}_2$), bentsyyli- ja alkyylibromidit: aktivoituneet vinyyliryhmät: $\text{CH}_2=\text{CHX}$ ($\text{X}=\text{CN}, \text{SOCH}_3, \text{SOC}_2\text{H}_5, \text{COOCH}_3$); pelkistävät alkylointiaineet: $\text{RCOR}' + \text{BH}_4^-$ tai BH_3CN^- ($\text{R}, \text{R}' = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_6\text{H}_5$).

Mitä tulee menetelmään proteiinien pelkistäväksi alkyloimiseksi aromaattisilla aldehydeillä ja natriumsyanoboorihydridillä, kts. Friedman M. et al., Int. J. Peptide Protein Res. 6, 1974, 183-185; alkylointiin akryylnitriilillä, kts. Means & Feeney, "Chemical Modifications of Proteins" Chapter 6, sivut 114-117; Fletcher, J.C.Biochem. J. 98 34 C (1966); Friedman, M. et al. J. Amer. Chem. Soc. 87, 3672 (1965); Friedman, M. et al., J.Org.Chem., 31, 2888 (1966).

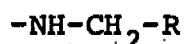
—> N-alkyloidut orgoteiinit

Koska alkyyliryhmän tarkka kemiallinen luonne ei ole kriittinen sikäli kuin se ei ole fysiologisesti myrkyllinen orgoteiinimolekyyliin ja voidaan muodostaa lysiini ϵ -aminoryhmiin, yllä kuvattujen suositeltavien hiilivetyalkyyliryhmien mahdollisia korvikkeita, sikäli kuin ne voidaan muodostaa, ovat syklopentyyli-, sykloheksyyli-, mentyyli yms. sykloalkyyliryhmät, sykloheksyyli-metyyli-, β -syklopentyylipropyyli yms. sykloalkyylialkyyliryhmät, bentsyyli-, p-ksyyli- ja fenetyyli- yms. aralkyyliryhmät, sekä myös 1-8 ja mieluummin 1-4 hiiliatomia sisältävät alkyyliryhmät, kaikkein mieluummin metyyli- tai etyyli-ryhmä, jossa on yksi tai useampia, mieluummin yksi yksinkertainen substituentti esim. karboksi-, syano-, karbalkoksi- ja amidoryhmä, esimerkiksi karboksimeetyyli-, syanometyyli-, karbetoksimeetyyli-, karbometoksimeetyyli- yms. alemmat karboalkoksi-metyyliryhmät, karbamyylimetyyli- ja

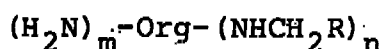
vastaavat substituoidut etyyli-ryhmät, esim. $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ja $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$, jossa R on esim. metyyli- tai etyyli-ryhmä, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COC}_2\text{H}_5$ ja $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$.

Näin ollen tämän keksinnön mukaisesti alkyloidut orgoteiinit ovat orgoteiinijohdannaisia, kuten naudan, lampaan, hevosen, sian, koiran, kaniinin, marsun, kananpojan ja ihmisen orgoteiineja, joiden titrattavista aminoryhmistä vähintään yksi, esim. 1,2,3,4,5 ja jopa kaikki (noin 18-26) on alkyloitu, so. niissä on substituoi-maton tai substituoitu alkyyliryhmä.

Suosittelavassa toteutusmuodossa alkyloidut aminoryhmät ovat niitä, joilla on kaava:

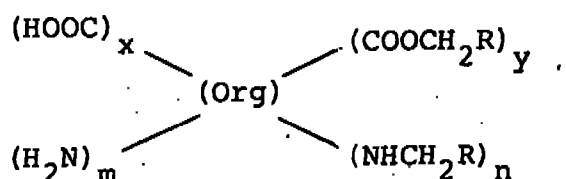


jossa R on H, CH_3 , C_2H_5 , $n\text{-C}_3\text{H}_7$, $\text{iso-C}_3\text{H}_7$, tai muu korkeintaan 7 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä, $-\text{COOH}$, $-\text{COO-LA}$, $-\text{CONH-LA}$, $-\text{CON(LA)}_2$, $-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{Ph}$, COPh , $-\text{CH}_2\text{OH}$ tai $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$, jois-sa LA on 1-4 hiiliatomia sisältävä alempi alkyyliryhmä ja Ph on substituoi-maton fenyyli-ryhmä tai fenyyli-ryhmä, joka sisältää 1-3 yksinkertaista substituenttia, esim. metyyli-, kloori-, bromi-, nitro-, amido- ja metoksiryhmän, karbometoksi- tai karboetoksiryh-män, esim. p-tolyyli-, sym.-ksylyyli, p-amidofenyyli-, m-kloori-fenyyli- ja p-metoksifenyyli-ryhmä. Tällaisilla orgoteiineilla on kaava:



jossa n on kokonaisluku 1 - noin 26, mieluummin vähintään 10 ja vielä mieluummin noin 10-18 ja summa $m + n$ on titrattavien vapai-den aminoryhmien kokonaislukumäärä modifioimattomassa johdannai- sessa ja R merkitsee samaa kuin yllä, mieluummin H- tai LA-ryhmää, esim. metyyli- tai etyyli-ryhmää ja "Org" on orgoteiinimolekyylin loppuosa.

Jotkut tämän keksinnön prosessissa käytetyistä alkylointi- aineista alkyloivat samanaikaisesti joitakin orgoteiinimolekyylin vapaista happoryhmistä. Näitä alkyloituja orgoteiineja voidaan esittää kaavalla:



jossa "Org", R, m ja n merkitsevät samaa kuin yllä, y on alkyloitujen vapaiden karboksyylihappojen lukumäärä, esim. yhdestä noin kahdeksaan ja mieluummin 2-6 ja x on loppuosa orgoteiinimolekyylissä olevista vapaista karboksyylihapporyhmistä.

Reagensseja, jotka ovat käyttökelpoisia karboksimeetyyli- ja karbamyylimetyyliyryhmien liittämiseen ovat samassa järjestyksessä jodietikkahappo ja jodiasetamidi. Jodietikkahappo voi muodostaa stabiileja tuotteita kysteiinin (sulfhydryyli), lysiinin (amino), histidiinin (imidatsolitypet) ja metioniinin (sulfidiriikki) jäännösten kanssa proteiineissa. Koska minkä tahansa näistä ryhmistä paitsi metioniinin karboksimeetylointi suurentaa negatiivista nettovarausta orgoteiiniproteiiniin pH-arvolla 8,4, elektroforeesi voi määrätä kokonaisreaktion (paitsi metioniinin karboksimeetylointia ja toisen imidatsolitypen karboksimeetylointia).

Luonnon orgoteiinissa jodietikkahappo ja jodiasetamidi reagoivat pääasiassa, elleivät yksinomaan lysiinin aminoryhmien kanssa. Vaikka vapaat tiolit reagoivat jodietikkahapon kanssa monta suuruusluokkaa nopeammin kuin amiinit, muutamat ensimmäiset ryhmät orgoteiinissa, jotka karboksimeetyloituivat, eivät reagoi merkittävästi nopeammin kuin seuraavat 10-20 ryhmää. Tämä on sopu- soinnussa p-merkuribensoaatin ja orgoteiinisulfhydryylien välisen reaktion kanssa: mitään reaktiota holo-proteiinin kanssa ei esiinny. Edes apo-proteiinin kanssa, joka antaa p-merkuribensoaattisulfhydryylireaktion (vaikka hitaasti ei-denaturoivissa olosuhteissa), jodietikkahappo 10-kertaisella molaarisella ylimäärällä pH-arvolla 7 ei antanut mitään pienenemää sulfhydryylipitoisuudessa usean viikon kuluttua 4°C:ssa (määritettynä spektrofotometrisesti p-merkuribensoaattititrauksella). Karboksimeetylointi-reaktion pH-riippuvuus on elektroforeesin osoittamalla tavalla yhdenmukainen lysiinin reaktion kanssa ($\text{pK} > 8$) eikä histidiinin reaktion kanssa ($\text{pK} < 6$) sillä reaktion määrä identtisillä lähtö-

väkevyyksillä kasvaa tasaisesti kun pH lähestyy arvoa 9 eikä mitään huomattavaa reaktiota tapahdu neutraalissa kohdassa tai sen alapuolella, jossa histidiinin pitäisi vielä olla protonoimaton ja reaktiivinen. Toisaalta etyyliklooriformiaattititraus histidiinille osoitti vain viittä histidiiniä karboksimeetyloidussa orgoteiinissa olosuhteissa, jotka osoittivat niitä olevan 16 luonnon orgoteiinissa.

Todistus siitä, että enempää metioniinia kuin histidiiniäkään ei ole käytettävissä reaktioon luonnon naudan orgoteiinissa, saatiin kokeella, jossa orgoteiinia käsiteltiin 0,2-M jodiasetamidin kanssa pH-arvossa 6,5 olevassa 0,5-M fosfaattipuskurissa 48 tuntia. Metioniinin alkyloinnin tai histidiinin kaksoisalkyloinnin olisi pitänyt antaa positiivisemmin varautunut proteiini pH-arvossa 8,4, mutta elektroforeesi ei osoittanut mitään muutosta SOD-aktiivisuudessa tai kaistarakenteessa.

Orgoteiinissa olevat lysiinin aminoryhmät reagoivat kuitenkin selvästi jodiasetaatin kanssa. Voimakkaasti karboksimeetyloitu orgoteiini vaeltaa elektroforeesissa samalla tavoin kuin asetyloitu orgoteiini, mutta sillä on pienempi SOD-aktiivisuus (noin 20 % modifioimattomasta orgoteiiniproteiinista).

N-metyyli-"nauta"-orgoteiinien ja jäljempänä olevien esimerkkien orgoteiinien lisäksi muita esimerkkejä tämän keksinnön N-alkyyli-nauta-orgoteiineista, ovat N-etyyli-orgoteiini, N-propyyli orgoteiini ja N-bentsyyliorgoteiini, joissa kaikissa tapauksissa on 9 tällaista alkyyli ryhmää orgoteiinimolekyylin molemmissa kahdessa alayksikössä, ja vastaavat orgoteiinit, joissa on keskimäärin 1, 6 tai 10 tällaista alkyyli ryhmää jokaisessa tällaisessa alayksikössä ja vastaavat näiden jokaisen ihmis-, lammas-, hevos-, sika-, koira-, kaniini-, marsu- ja kananpoikaorgoteiinijohdannaiset.

Esteröity orgoteiini

Kuten yllä esitettiin orgoteiinijohdannaiset sisältävät noin 50-68 glutamiinihappo- ja asparagiinihappojäännöistä, mutta vain 20-27:llä näistä on vapaat happoryhmät. Koska orgoteiinimolekyyli koostuu kahdesta identtisestä tai lähes identtisestä peptidiketjusta (alayksiköstä), puolet näistä aminohappojäännöksistä on kummassakin ketjussa, jotka ovat lujasti, mutta ei-kovalenttisesti sitoutuneet yhteen kohtuullisissa lämpötila- ja pH-olosuhteissa.

Esteröinti muuttaa orgoteiinimolekyylin varausta ja tavallisesti vain korkeintaan noin 10 ja mieluummin noin 6-8 näistä vapaista happoryhmistä voidaan esteröidä ja yhä säilyttää se luonnon molekyylin rakenne, josta stabiilisuus ja lääkkeen käyttökelpoisuus ovat riippuvaisia.

Tämän keksinnön mukaisesti esteröidyillä orgoteiineilla näyttää olevan oleellisesti sama avaruusrakenne kuin luonnon orgoteiinimolekyyllillä. Kelatoidut Cu^{++} - ja Zn^{++} -pitoisuudet (gramma-atomia moolia kohti) ovat suunnilleen samat kuin orgoteiinilla. Kuten orgoteiinikin ne ovat erittäin kestäviä pronaasi- ja muuta proteolyyttistä entsyymiaattista hajaantumista vastaan. Entsyymaattinen peroksididimutaasi-(SOD) aktiivisuus ei merkittävästi pienene ennenkuin yli 6-8 karboksyylihapporyhmää on esteröitynyt.

Esteröintiryhmien tarkka luonne enempää kuin esteröintiryhmien lukumääräkään ei ole kriittinen sikäli kuin esteröintiryhmä on fysiologisesti hyväksyttävä. Johtuen orgoteiinimolekyylin suuresta molekyyllipainosta silloinkin, kun orgoteiinimolekyyli esteröidään esteröintiryhmillä, joilla on kohtalainen molekyyllipaino, esim. 160 vaikutus koko kemialliseen koostumukseen on suhteellisen pieni, so. alle 5 %. Luonnollisesti vapaiden karboksyylihapporyhmien esteröinnillä on ilmeisesti suuri vaikutus isoelektriseen pisteeseen ja saatuun elektroforeettiseen liikkuvuuteen, mutta kuten yllä selostettiin, sikäli kuin esteröinti rajoittuu noin 10:en tai harvempaan glutamiini- ja asparagiinihapporyhmään, sillä ei ole mitään ilmeistä merkittävää vaikutusta molekyylien tiiviiseen avaruusrakenteeseen ja saatuun stabiiliisuuteen, esim. yhden tunnin lämmityksessä 60°C :ssa eikä proteolyyttisten entsyymien vaikutukseen.

Kuten ilmeistä on esteröintiryhmän myös oltava sellainen, joka on peräisin esteröintiaineesta, joka kykenee esteröimään karboksyylihapporyhmän vedessä tai puskuriliuoksessa, sillä reaktio suoritetaan tavallisesti niissä. Tällaisia esteröintiaineita ovat dimetyyli- ja dietyylisulfaatti, diatsometaani ja muut diatsoyhdisteet, esim. ne, joilla on kaava $\text{N}_2\text{CH}_2\text{COX}$, jossa X on esim. OCH_3 , OC_2H_5 , NH_2 tai $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$, ja muut diatsoetikkahapon esterit ja amidit, joista puuttuvat reaktiokykyiset ryhmät, kuten karboksyyli- tai iminoryhmät.

Tällaisten estereiden valmistusmenetelmien suhteen ks. Methods in Enzymology, Vol. XI, sivu 612 (1967); K.T. Fry et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 30 489 (1968); G.R. Delpierre ja J.S. Fruton, PNAS, 56 1817 (1966).

Tarkemmin sanoen tämä keksintö koskee -COOH-esteröityä orgoteiinia, jossa esteriryhmä sisältää mieluummin korkeintaan 4 hiiliatomia, esim. yksiarvoisesta alkanolista ja on esim. metyyli-, etyyli- ja kaikkein mieluummin metyyli-ryhmä.

Koska esteriradikaalin tarkka kemiallinen luonne ei ole kriittinen, sikäli kuin se ei ole fysiologisesti myrkyllinen ja se voidaan muodostaa orgoteiinin vapaisiin happoryhmiin, ajateltavissa olevia korvikkeita yllä kuvatuille suositeltaville alkyylisteröintiryhmille, sikäli kuin ne voidaan muodostaa, ovat ne, joissa on yksi, kaksi tai useampia yksinkertaisia substituentteja, esim. halo-, alkoksi-, karbalkoksi-, karbamidoryhmä jne., erityisesti ne, joissa substituentin tai substituentteja sisältävä esteriryhmä on metyyli-ryhmä. Näin ollen esteröidyn orgoteiinin lisäksi, jossa esteröidyt happoryhmät ovat -COOCH₃-ryhmiä, ajateltavia korvikkeita ovat ne, joissa esteriryhmät ovat -COOR-ryhmiä, joissa R on -CH₂COX, jossa X on -OCH₃, -OC₂H₅, -NH₂, -NHCH₂CHCH₂CONH₂ tai -CH₂CH₂-fenyyli, tai R on -CH(fenyyli)₂.

-COOH-ryhmien esteröintiä voidaan seurata laskemalla elektroforeesissa esiintyvä varauksen muutos verrattuna luonnon orgoteiineihin.

Korkeintaan vain noin kahdeksan vapaista -COOH-ryhmistä voidaan esteröidä ilman haitallisia vaikutuksia. Yritykset esteröidä enemmän kuin 6-8 -COOH-ryhmää, so. esteröidä enemmän kuin kolme -COOH-ryhmää kummastakin kahdesta orgoteiinin peptidialayksiköstä johtaa tavallisesti denaturoitumiseen ja peroksididismutaasiaktiivisuuden menetykseen.

Kuten on odotettavissa esteröityvien alkyyliryhmien jakaantuminen orgoteiinimolekyylissä on todennäköisesti sattumanvarainen, sillä mikään titrattavista vapaista karboksiryhmistä ei osoittaudu epänormaalin helposti esteröityväksi. Koska orgoteiinimolekyyli koostuu kahdesta identtisestä peptidiketjusta, osittain esteröidyn orgoteiinin esteriryhmät jakautuvat enemmän tai vähemmän sattumanvaraisesti pitkin kumpaakin peptidialayksikköä, mutta enemmän

tai vähemmän tasaisesti näiden kahden ketjun kesken. Koska yleensä käytetään yhtä ainoaa esteröintiainetta, esteriryhmät ovat kaikki identtisiä. On kuitenkin mahdollista valmistaa esteröityjä orgoteiineja, joissa on kaksi tai useampia erilaisia esteriryhmiä molekyylissä ja jopa sen kummassakin ketjussa.

Eräs tapa valmistaa sekaesteröity orgoteiini on esteröidä vaiheittain erilaisilla esteröintiaineilla. Esimerkiksi osa vapaita -COOH-ryhmistä voidaan esteröidä yhdellä esteröintiaineella, esim. dimetyylisulfaattilla ja loppuosa reaktiokykyisistä -COOH-ryhmistä esteröidä toisella esteröintiaineella, esim. etyyli-diatsoasetaatilla.

Muita esimerkkejä esteröidyistä naudan orgoteiineista ovat karbometoksimetyyliorgoteiini ja karbamyylimetyyliorgoteiini, joissa kummassakin tapauksessa on 3-4 tällaista esteröityä ryhmää molemmissa orgoteiinimolekyylin kahdessa alayksikössä ja vastaavat esteröidyt orgoteiinit, joissa on 1 tai 2 tällaista esteriryhmää kummassakin tällaisessa alayksikössä ja vastaavat jokaisen näiden ihmis-, lammas-, hevos-, sika-, koira-, kaniini-, marsu- ja kananpoikaperäiset aineet.

Orgoteiinijohdannaiset voidaan eristää reaktioliuoksesta, mieluummin vieraiden ionien poistamiseksi tapahtuvan dialyysin jälkeen tavanomaisella lyofilisoinnilla, esim. amerikkalaisessa patentissa 3 658 682 kuvatulla tavalla. Haluttaessa orgoteiinijohdannainen voidaan ensin puhdistaa ioninvaihtohartsikromatografialla, elektroforeesilla ja/tai geelisuodatuksella käyttäen polymeeria, joka toimii molekyyliseulana.

Suodattaminen mikrohuokossuodattimen läpi, jonka huokoskoko on 0,01-0,22 mikronia, aseptisella tavalla steriileihin lääkepuloihin valinnaisesti senjälkeen, kun ionivahvuus on säädetty NaCl:lla ja/tai natriumfosfaatilla esim. isotoniseen pisteeseen, saa aikaan bakteeri- ja virusopillisesti tai bakteeriopillisesti steriilin liuoksen, joka sopii annettavaksi ruiskeena. Suodattimen 0,1 mikronin huokossuodattimen läpi vähentää tai poistaa myös liuoksessa olevat pyrogeenit.

Esimerkki 1

Liuosta, jossa oli 5 mg naudan orgoteiinia 4 ml:ssa 0,04-m karbonaattipuskuria, käsiteltiin 20 µl:lla dimetyylisulfaattia

ja pH pidettiin arvossa 10,0 lisäämällä 0,5-m NaOH:a. Emäksen yhtymisellä oli noin 37 minuutin puoliintumisaika. Elektroforeesi osoitti SOD-aktiivikaistoja 1- -5 (keskimäärin -3). Dialyysin, lyofilisoinnin ja uudelleenliuotuksen jälkeen 1 ml:aan vettä proteiinin SOD-aktiivisuus ja Cu^{++} - ja Zn^{++} -sisältö olivat yhä muuttumattomat käsittelemättömästä orgoteiinista. Modifioidun proteiinin 85 $\mu\text{g/ml}$:n liuoksen asetylointi kaikkiaan 3 μl :lla etikkahappoanhydridiä 0,4 ml:ssa boraattipuskuria pH-arvolla 9 antoi keskimääräiseksi elektroforeettisen varauksen muutokseksi vain noin -2 verrattuna arvoon -20 luonnon orgoteiinilla samassa liuoksessa. pH-arvolla 10 olevalla dimetyylisulfaattilla käsitelty orgoteiini on tämän vuoksi voimakkaasti N-metyloitu, so. noin 18 ryhmällä molekyylillä kohti.

Esimerkki 2

Noudatetaan esimerkin I menettelyä käyttäen vuoron perään vastaavia ihmisen, lampaan, hevosen, sian, koiran, kaniinin, marsun ja kananpojan orgoteiinijohdannaisia lähtöaineina. Kaikissa tapauksissa kaikki paitsi noin yksi lyysiini orgoteiinimolekyylin kummastakin alayksiköstä alkyloituu.

Esimerkki 3

Noudatetaan esimerkin I menettelyä käyttäen dietyylisulfaattia dimetyylisulfaatin sijasta. Saadun ϵ -N-etyloidun orgoteiinin ominaisuudet ovat oleellisesti samat kuin ϵ -N-metyloidulla orgoteiinilla.

Esimerkki 4

Naudan orgoteiinin lyysiinijäännösten ϵ -aminoryhmät karboksimeetyloitiin 0,2-m natriumjodiasetaatilla ympäristön lämpötilassa seuraavassa esitetyissä olosuhteissa ja siinä esitetyin tuloksien.

Puskuri

Varauksen muutos elektroforeesissa,
keskiarvo $\pm$ vaihteluväli

Orgoteiini (1,4 mg/ml) + $\text{JCH}_2\text{CO}_2^4\text{Na}^+$ (0,2-m)

- 0,3-m -H 3,8 asetaatti (ainoat muutokset ovat alhaisesta pH-arvosta johtuvia)
- 0,4-m pH 5,0 asetaatti ei muutosta 72 tuntiin mennessä
- 0,23-m pH 9,2 karbonaatti 0 (15 min), 3 ± 2 (2 1/2h),
 5 ± 3 (6 1/2h) 18 (72 h)

Näistä elektroforeesikuvioista käy ilmi, että mitään N-alkylointia ei tapahtunut pH-arvolla 3,8 ja 5,0 ja että pH-arvolla 9,2 keskimäärin noin 3 $-\text{CH}_2\text{COO}-$ ryhmää liittyi mukaan 2 1/2 tunnissa; noin 5 tällaista ryhmää liittyi mukaan 6 1/2 tunnissa; ja noin 18 tällaista ryhmää liittyi mukaan 72 tunnissa ξ -amino-typpi-atomeihin.

Puskuri

Varauksen orgoteiini (2,8 mg/ml) +
 $\text{JCH}_2\text{CO}_2^-\text{Na}^+$ (0,43-m).

d) pH 6,0	0,4 5 päivän jälkeen huoneenlämpötilassa
e) pH 7,0	0,6 (1 päivä), 1,0 (2 päivää), 1,5 (5 päivää)
f) pH 10	0 (10 min), > 3 (2 1/2 tuntia), > 10 (6 1/2 tuntia)

Näin käsitellyn orgoteiinin elektroforeesikuvioista käy ilmi, että pH-arvolla 6 alle puolet orgoteiinimolekyyleistä alkyloitui; pH-arvolla 7 kahdessa päivässä orgoteiinimolekyyleissä oli keskimäärin yksi ξ -aminoryhmä alkyloitunut $-\text{CH}_2\text{COO}-$ ryhmällä ja viidessä päivässä keskimäärin kaksi tällaista ryhmää molekyyliä kohti oli liittynyt mukaan. pH-arvolla 10 keskimäärin yli kolme tällaista ryhmää oli liittynyt mukaan 2 1/2 tunnissa ja 6 1/2 tunnissa keskimäärin yli 10 tällaista ryhmää molekyyliä kohti oli liittynyt mukaan.

Yllä olevien alkylointien tuotteet, joihin $-\text{CH}_2\text{COO}-$ ryhmiä liitettiin, olivat β -aminoalkyloitujen orgoteiinien seos, jotka orgoteiinit sisältävät vaihtelevia määriä tällaisia ryhmiä, mitä osoittaa useiden, elektroforeettiselta liikkuvuudeltaan erilaisten nauhojen esiintyminen.

Esimerkki (1C)

Metyyliesteröinti

Liuosta, jossa oli 0,5 mg naudan orgoteiinia (125 $\mu\text{g/ml}$) ja 0,5 % til./til. dimetyylisulfaattia 4 ml:ssa 0,05-m asetaattipuskuria pidettiin pH-arvossa 5 100 min. Reaktiotuotteen elektroforeettinen analyysi osoitti SOD-aktiivikaistoja välillä +1 - -6 (keskiarvo -4). Tuote on orgoteiini, jossa on keskimäärin 4 $-\text{COOCH}_3$ -ryhmää.

Esimerkki 2CMetyyliesteröinti

Liuosta, jossa oli 0,5 mg naudan orgoteiinia ja 10 μ l dimetyylisulfaattia 4 ml:ssa vettä, pidettiin muuttumattomassa pH-arvossa lisäämällä 0,1-M NaOH:a. Emäksen kulutusnopeus pH-alueella 7-10 oli melko riippumaton pH-arvosta ja 0,25 moolin natriumfosfaattipuskurimäärän lisäyksestä. Elektroforeesi osoitti katodisempien SOD-aktiivisten kaistojen muodostumista alkunopeudella noin -0,5 varausta/h. 21 tunnin kuluttua pääasiassa pH-arvolla 7-8 liuos analysoitiin N-metyloinnin ja esteröinnin suhteen alla kuvatulla tavalla. N-metylointia ei voitu todeta.

a) Esteröidyn orgoteiinin 0,5 ml:n jakeen asetylointi 1 μ l:lla etikkahappoanhydridiä sekä 3 μ l:lla 6-M NaOH:a 4°C:ssa antoi liuoksen, jonka elektroforeesikuvio oli nopeasti liikkuva anodinen kaista, joka oli samanlainen kuin asetyloidulla luonnon orgoteiinilla, osoittaen näin ollen, että vapaat aminoryhmät pysyivät muuttumattomina esteröinnin aikana.

b) 1 ml:n jae esteröidyn orgoteiinin liuoksesta säädettiin pH-arvoon 10,5 ja säilytettiin peitettyinä eksikaattorissa NaOH-tablettien kanssa. Vaikka kaistojen 1-4 katodinen kaistakuvio oli stabiili pH-arvolla 7-9, pH-arvolla 10,5 katodiset kaistat vähitellen hävisivät 4 päivän aikana, kun luonnon orgoteiinin elektroforeettinen kuvio ilmestyi takaisin. Proteiinin metyyliesterit yleensä hydrolysoituvat helposti alkaalisilla pH-arvoilla varmistuen täten, että esteröinnin jälkeen ilmestyneet katodisemmat kaistat olivat orgoteiiniestereitä.

Edellä olevasta käy ilmi, että kahden tunnin kuluttua dimetyylisulfaatti esteröi pH-arvolla 7-10 keskimäärin yhden -COOH-ryhmän molekyyliä kohti; ja jatkaa tämän jälkeen esteröityjen -COOH-ryhmien lukumäärän lisäämistä noin 6 kappaleen maksimiin saakka molekyyliä kohti.

Noudattaen esimerkkien 1C ja 2C menettelyä ja käyttäen vuoron perään lähtöaincina vastaavia ihmisen, lampaan, hevosen, sian, koiran, kaniinin, marsun ja kananpojan orgoteiinijohdannaisia muuttuu kaikissa tapauksissa keskimäärin noin heljä orgoteiinimolekyylin karboksyylihapporyhmää niiden metyyliestereiksi.

Noudattaen 1C ja 2C menettelyä ja käyttäen dietyylisulfaattia dimetyylisulfaatin sijasta saadaan orgoteiiniestereitä, joissa

on 1-6 vapaata karboksyylihapporyhmää muutettu niiden etyyliesteriksi. Saatujen esteröityjen orgoteiinien ominaisuudet ovat oleellisesti samat kuin metyyliesteröidyllä orgoteiinilla.

Esteröidyt orgoteiinit voidaan haluttaessa edelleen puhdistaa ioninvaihtokromatografialla eri nettovarauksen ja näin ollen eri esteröintiasteiden erottamiseksi kaikista muista. Esimerkiksi 200 mg:n orgoteiinimäärän eluointi mitoiltaan 2,5 x 40 cm olevan Sephadex-kolonnin läpi 4 litralla välillä 0,01-0,2-M olevan linnaarisen gradientin trispuiskuria, jonka pH on 8,5, erottaa orgoteiinikaistat toisistaan elektroforeettisesti katodisempien kaistojen eluoituessa ensin. Tällaisella menettelyllä esimerkin 1C menettelyllä valmistettujen metyyliesteröityjen orgoteiinien seos voidaan erottaa jakeiksi, jotka sisältävät pääasiassa 1,2,3,4,5 tai 6 metyyliesteriryhmää orgoteiinimolekyyliä kohti.

Tällainen osittain modifioidun orgoteiinin fraktiointi ioninvaihtokromatografialla on sovellettavissa mihin tahansa orgoteiiniin, jonka molekulaarivaraus riippuu modifioinnin määrästä; esimerkiksi metyyliesteröityyn orgoteiiniin, karbetoksimetyyliesteröityyn orgoteiiniin ja N-asetyloituun orgoteiiniin.

Esimerkki 3C

Karbetoksimetyyliesteröinti

Etyylidiatsoasetatti valmistetaan antamalla glysiinietyyliesterin reagoida typpihapokkeen kanssa kuten on esitetty teoksessa "Organic Synthesis" Coll. Vol. IV, sivu 424, mutta käyttäen CCl_4 :a eikä CH_2Cl_2 :a etyylidiatsoasetatin uuttamiseen vesiliuoksesta.

Kaksi ml suunnilleen 1-M etyylidiatsoasetatti/ CCl_4 -liuosta asetetaan 25 ml:n kolviin ja suurin osa CCl_4 :sta haihdutetaan imupumppupaineessa. Liuos, jossa on 9 mg naudan orgoteiinia 3 ml:ssa vettä, lisätään ja pyöritetään orgaanisen faasin dispergoimiseksi. Liuosta säilytetään 4°C :ssa ja pyöritetään aina muutaman päivän välein. Reaktioseos pysyy kokonaan heterogeenisena. Elektroforeesi osoittaa asteittaista katodisempien SOD-aktiivisten proteiinikaistojen -1 - -6 muodostumista. Keskimääräinen varauksen muutos on 1,2 5 päivän kuluttua ja 3 12 päivän kuluttua. Tuote on karbetoksimetyyliorgoteiiniesterien seos, joissa on 5 päivän kuluttua joko yksi tai kaksi tällaista esteriryhmää molekyyliä kohti ja 12 päivän kuluttua 1-6 tällaista esteriryhmää.

Vesifaasi suodatetaan tämän jälkeen ja siitä poistetaan suola kromatografisella fraktioinnilla käyttäen 10 cm³:n Sephadex G-25-kolonnia. Proteiini-jakeet lyofilisoidaan ja liuotetaan uudelleen 2 ml:aan vettä ja pH nostetaan arvosta 3,7 arvoon 5,6 2 /ul:lla 1-M NaOH:a. Elektroforeesi ei osoita muutosta ennen suolanpoistoa ja lyofilisointia saadusta. Tämän liuoksen uudelleenreagointi kuukauden ajan samoissa olosuhteissa kuin yllä antaa proteiiniseoksen, jolla elektroforeesissa on pienempi SOD-aktiivisuus, eikä lainkaan materiaalia, joka on katodisempi kuin kais-ta -6.

Esimerkki 4C

Metyyliesteröinti

Noudattaen esimerkkien 1C ja 2C menettelyä naudan orgoteiinia alkyloitiin olosuhteissa, jotka esitetään alla olevassa taulukossa.

pH	Puskuri	Orgoteiini	Dimetyyli-sulfaattia tilavuus-%	Hydrolyysin puoliint.-aika *)	SOD-aktiivikaistat elektroforeesissa
a)	5,0 0,05-M	125 μ g/ml	0,25	54 min.	+1 - -4 (keskim.-2)
b)	5,0 asetaatti	125 -"	0,5	54 "	-1 - -6 (-" - -4)
c)	7,0 0,016-M	80 -"	0,65	1 tunti	-2 - -6
d)	7,0 fosfaatti	80 -"	1,3	1 tunti	heikkoa SOD-viirua välillä +4 -6, piikkejä -6-ase-massa
e)	11,2 0,05-M 9,3 karbonaatti	125 -"	0,5	1/2 h (pH 10)	+2 - -3

*) Puoliintumisaika NaOH:n kulutukselle, joka tarvitaan muuttumattoman pH-arvon ylläpitämiseen.

Esimerkin (a) tuotteessa on keskimäärin 2 esteröityä -COOH-ryhmää molekyyliä kohti ja esimerkin (b) tuotteessa keskimäärin 4 tällaista ryhmää. Useiden katodisten kaistojen läsnäolo varmistaa, että esteröidyt tuotteet koostuvat useista esteröidyistä orgoteiineista, jotka sisältävät 1 - noin 6 esteriryhmää molekyyliä kohti.

Esimerkki 5cMetyyliesteri/N-asetyylihybridi

Liukseen, jossa oli 0,5 mg metyyliesteröityä orgoteiinia (125 $\mu\text{g/ml}$) ja joka oli valmistettu esimerkin 1 menettelyllä, lisättiin 0,5 mg täysin N-asetyloitua orgoteiinia. Seoksen elektroforeesi osoitti vain niitä kaistoja, jotka vastaavat metyyliesteröityä orgoteiinia ynnä anodista kaistaa, joka vastaa N-asetyyliorgoteiinia. Kuitenkin kun seosta pidettiin 50°C:ssa neljä tuntia, elektroforeesi osoitti usean uuden lajin muodostumista (kaista-asemissa +7 - +11) ja yli 50 %:n pienenemistä alkuperäisissä N-asetyyli- ja metyyliesteriorgoteiinikaistoissa.

Uudet lajit, jotka on muodostettu kuumentamalla m^odifioitujen orgoteiinien seosta, ovat hybridejä (heterodimeerejä), jotka sisältävät yhden alayksikön sekä N-asetyyliorgoteiinia (joka sisältää 10 N-asetyyliylisiiniä alayksikköä kohti) ja metyyliesteröityä orgoteiinia (joka sisältää 0-3 -COOMe-ryhmää alayksikköä kohti).

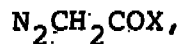
Hybridit voidaan eristää niiden tasapainoseoksesta N-asetyyli- ja COOMe-orgoteiinien (homodimeerit) kanssa ioninvaihtokromatografialla matalassa lämpötilassa esimerkissä 2C kuvatulla tavalla. Eristetyt heterodimeerit voivat varastoitaessa jatkaa uudelleenhybridisoitumista muodostaen uudelleen seoksen, joka sisältää myös molempia homodimeerejä. Uudelleenhybridisoitumisnopeus on riippuvainen lämpötilasta ja on pieni matalissa lämpötiloissa.

Patenttivaatimus:

tiwom.
Menetelmä tulehdusta estävien orgoteiini johdannaisten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että annetaan orgoteiinin, kuten naudan orgoteiinin, reagoida

*esimerkiksi
M 332 mon.
Eohk. 2*
a) alkylointiaineen, kuten primäärisen dialkyyli sulfaatin, edullisesti dimetyylisulfaatin tai aktiivisen alkyylihalogenidin tai aktiivisen vinyyliyhdisteen kanssa, N-alkyloidun orgoteiinin tuottamiseksi, jossa on alkyyliryhmä samassa järjestyksessä ainakin yhdessä sen lysiinin ϵ -aminoryhmässä, ja jossa edullisesti on vähintään 10-18 alkyloitua ϵ -aminoryhmää molekyyliä kohti, tai jossa on edullisesti vähintään 2-10 karbamyloitua ϵ -aminoryhmää molekyyliä kohti, tai

b) esteröintiaineen kanssa vesi- tai puskuriliuoksessa, joka esteröintiaine edullisesti on dimetyyli- tai dietyylisulfaatti, ^{tai}atsidi, jolla on kaava



*ks. esimerkiksi
M 332 mon. Eohk. 2*
jossa X on OCH_3 , OC_2H_5 , NH_2 tai $NHCH_2CONH_2$, tai muu diatsoetikkahapon esteri tai amidi, josta puuttuu reaktiokykyinen ryhmä.

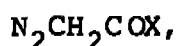
*työtyjen
OOH-ryhmien
kennä*

Patentkrav:

Förfarande för framställning av antiinflammatoriska orgoteinderivat, k ä n n e t e c k n a t därav, att orgotein, såsom nötorgotein, omsättes med

a) ett alkyleringsmedel, såsom ett primärt dialkylsulfat, lämpligen dimetylsulfat, eller en aktiv alkylhalogenid eller en aktivvinylförening, för att producera ett N-alkylerat orgotein, där alkylgruppen är i samma ordningsföljd i åtminstone en av dess lysin- ϵ -aminogrunder, och som lämpligen har minst 10-18 alkylerade ϵ -aminogrunder per molekyl, eller med

b) ett förestringsmedel i en vatten- eller buffertlösning, vilket förestringsmedel lämpligen är dimetyl- eller dietylsulfat, en azid med formeln



där X är OCH_3 , OC_2H_5 , NH_2 eller $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$, eller en annan sådan ester eller amid av diazoättiksyra, som saknar en reaktiv grupp.