

Über Azoproteine. VI

Zusammenhänge zwischen proteolytischer Spaltbarkeit und chemotherapeutischer Wirksamkeit der Chemoseren

G. ZIMMERMANN und H.-D. MÜLLER

Mit 2 Abbildungen

Inhaltsübersicht

Es wird über Versuche zur Klärung des Wirkungsmechanismus der Chemoseren (Sulfonamidazoserumproteinen) berichtet. Die Überprüfung der Präparate im klassischen DOMAGKschen Mäuseschutzversuch ergibt den direkten Zusammenhang zwischen fermentativer Spaltbarkeit und chemotherapeutischer Wirksamkeit der Chemoseren.

Die in den vorangegangenen Mitteilungen¹⁾²⁾ dargelegten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die hochmolekularen Chemoseren in der injizierten Form nicht therapeutisch wirksam sind. Es ist vielmehr in vivo eine Partialhydrolyse (zu Sulfonamidazo-Peptiden?) anzunehmen; diesen Spaltprodukten wäre dann die therapeutische Wirksamkeit zuzuschreiben. Eine solche Partialhydrolyse ist offenbar nur dann möglich, wenn die primären Aminogruppen des konjugierten Proteins frei sind. Hochgekuppelte Chemoseren, bei denen nicht nur aromatische Aminosäurereste, sondern auch primäre Aminogruppen in den Kupplungsprozeß einbezogen sind, erweisen sich danach trotz eines hohen Sulfonamidgehaltes als therapeutisch wenig oder unwirksam.

Ziel dieser Arbeit war es, die proteolytische Spaltbarkeit von Chemoseren in vitro mit ihrer therapeutischen Wirksamkeit in vivo zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst durch Umsatz von Rindernormalserum mit Formalin oder Benzazid Proteinderivate mit unterschiedlich, aber definiert blockierten Aminogruppen hergestellt (Methylen- und Benzoylseren).

¹⁾ G. ZIMMERMANN, Z. Imm. **116**, 228 (1958).

²⁾ G. ZIMMERMANN, Arch. exp. Vet. Med. **14**, 17 (1960)

Zur analytischen Erfassung des abgestuften Umsetzungsgrades der freien Aminogruppen zeigen Tabelle 1 und 2 Analysenwerte der zur Azokupplung verwendeten Serumproteinderivate. Da die Aminostickstoffbestimmung nach VAN SLYKE bei Methylserumproteinen versagte, sind für diese Präparate die abgestuften Viskositäten 5proz. neutraler Lösungen angegeben. Anschließend wurden die Methyl- und Benzoylseren nach 1) mit gleichen Mengen diazotiertem Sulfanilamid azogekuppelt.

Tabelle 1
Viskositäten 5proz., neutraler Methylseren

Präparat	Umsetzungsquotient *) „F Q“	Viskosität (c P) bei 20 °C
1	0	1,46
2	2,5	1,48
3	13	2,03
4	19	1,91
5	24	2,21

*) $\frac{\text{mg reiner Formaldehyd}}{\text{g Methylserum}}$

Die Azomethylen- und Azobenzoylseren wurden tryptisch abgebaut, alles höhermolekulare Proteid mit Trichloressigsäure gefällt, zentrifugiert und die in Lösung verbliebenen, farbigen Abbauprodukte kolorimetriert: Die Abbildungen 1 und 2 zeigen die beim Abbau von Azomethylen- und Azobenzoylserumproteinen erhaltenen, unterschiedlichen Extinktionen in Abhängigkeit von der Zeit des Fermentabbaues. Auf beiden Abbildungen ist deutlich zu sehen, daß die fermentative Spaltbarkeit von Azoproteinen mit zunehmender Blockierung der primären Aminogruppen abnimmt.

Tabelle 2

Aminostickstoffgehalt nach VAN SLYKE der Benzoylseren

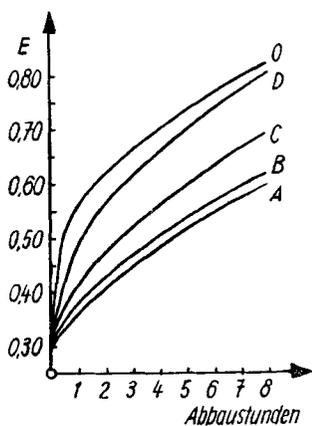
Präparat	Aminostickstoff %
6	0,63
7	0,43
8	0,17

Tabelle 3 zeigt die Therapieergebnisse der Azomethylseren im Streptokokken-Mäuseschutzversuch. In Übereinstimmung mit der tryptischen Spaltbarkeit in vitro sind die Therapieergebnisse um so schlechter, je mehr Aminogruppen blockiert sind.

In Umkehrung der Problematik wurde ein hochgekuppeltes und daher therapeutisch fast unwirksames Albucid-Pferdealbumin (A 214) in vitro tryptisch partiell und total gespalten und die Abbauprodukte im Streptokokken-Mäuseschutzversuch chemotherapeutisch geprüft.

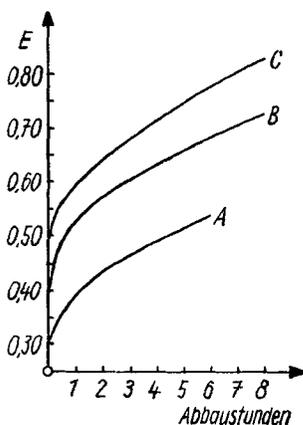
Tabelle 4 zeigt, daß die nach zweistündiger Fermenteinwirkung erhaltenen Partial-Abbauprodukte (Sulfonamid-Azo-peptide) therapeutisch sehr gut wirksam sind. Bei den Totalabbauprodukten ist die Wirk-

samkeit wieder etwas abgeschwächt. Vermutlich fehlt hierbei die Depotwirkung der höhermolekularen Spaltprodukte.



Kurve	azogekuppeltes Präparat
O	1
D	2
C	3
B	4
A	5

Abb. 1. Tryptischer Abbau von Azomethylen-Serumproteinen in vitro



Kurve	azogekuppeltes Präparat
C	6
B	7
A	8

Abb. 2. Tryptischer Abbau von Azobenzoyl-Serumproteinen in vitro

Experimenteller Teil

1. Umsatz des Serums mit Formaldehyd und Azokupplung

Je 139 ml 7,2proz. Rindernormalserum (= 10 g Trockenprotein) wurden mit 6,0, 4,9, 3,8, 2,7, 1,6, 0,5 ml 5proz. Formalin versetzt, 2 Tage bei 37 °C belassen, anschließend ohne vorherige Dialyse, die sich durch Niederschlagsbildung nachteilig auswirkt, je Ansatz 810 mg diazotiertes Sulfanilamid (Hydrierwerk Rodleben) azogekuppelt (K. Q. 75)³⁾ und die Präparate dialysiert. Lyophilisierung ist in diesem Falle unangebracht, da hierdurch die Löslichkeit dieser Verbindungen wesentlich verschlechtert wird.

2. Benzoylierung des Serums und Azokupplung

Zur Benzoylierung in Anlehnung an (4) wurden je 125 ml mit 2,8 g KH_2PO_4 und 8,1 g Borax nach KOLTHOFF auf pH 8,7 gepuffertes, 11proz. Rindernormalserum mit 5,0, 3,5, 2,0 und 0,5 g feinerriesenem Benzazid versetzt und unter gelegentlichem Umschütteln

³⁾ K. Q. = Kupplungsquotient = $\frac{\text{mg Amin}}{\text{g Azoprotein}}$.

⁴⁾ J. JONES, J. chem. Soc. (London) 1952, 5016.

Tabelle 3

Streptokokken-Mäuseschutzversuch Nr. 71

Gewicht der Mäuse (nur Böcke): 15–17 g; infiziert mit je 0,5 ml ip. der 1:100 verdünnten Abschwemmung des Stammes 1855.

Behandelt: a) 2 h, b) 6 h und c) 22 h nach Infektion

a) mit 0,5 ml i. v. und 0,5 ml s. c.

b) und c) mit nur 0,5 ml i. v.

Gesamtdosis: 2,0 ml

Präparat	Zusammensetzung	Konzentration	KQ	appliz. SA (ber.) in mg pro Maus	Zahl d. infiz. Tiere	es leben ^{a)} nach Infektion				
						24 h	48 h	4 Tg.	7 Tg.	9. Tg.
	Kontrollen				10	10(7)	1(0)	1(0)	0	0
SAA A 250	Sulfanilamid SAA,-Methylpyrimid- u. Sulfaguanidin- gek. Rinder-Normal- serum	0,9 ^{b)}	—	18,0	10	10(0)	10(0)	10(1)	10(1)	5(0)
M 99 AK	SAA-gekuppeltes Me- thylen-Rinder-Normal- serum; FQ: 30	4,17 ^{b)}	60	5,0	10	10(0)	10(0)	9(1)	9(1)	5(0)
M 99 BK	dto.; FQ: 15	3,4 ^{c)}	150	10,2	10	2(2)	0	0	0	0
M 99 CK	dto.; FQ: 10	3,6 ^{c)}	150	10,8	10	1(1)	0	0	0	0
M 99 DK	dto.; FQ: 5	3,5 ^{c)}	150	10,5	10	4(4)	0	0	0	0
M 99 OK	dto.; FQ: 0	4,3 ^{c)}	150	12,9	10	5(5)	2(0)	2(0)	2(0)	0
		5,8 ^{c)}	150	17,4	10	9(4)	5(2)	3(0)	3(0)	1(0)

a) Die Zahlen in den Klammern () geben die erkrankten Tiere der insgesamt lebenden an.

b) Werte nach Sterilfiltration.

c) Diese Präparate waren nicht sterilfiltriert, aber kochsalzisotonisch. FQ = Formylierungsquotient (vgl. S. 97).

und Turbinieren 2 Tage bei Raumtemperatur belassen. Nach Dialyse gegen dest. Wasser wurden je Ansatz 1,54 g diazotiertes Sulfanilamid azogekuppelt (K. Q. 100)³⁾ und die Präparate dialysiert. Lyophilisierung ist auch hier aus o. a. Gründen nicht angebracht.

3. Messung des fermentativen Abbaus der Azomethylen- und Azobenzoylseren

55 ml 0,5proz. Azoproteinlösung werden mit 26,4 ml Wasser versetzt und als Nullwert 7,4 ml entnommen, nachdem die ganze Lösung mit n/10 NaOH auf pH 9,4 gebracht worden ist. Den Nullwert versetzt man mit 0,75 ml Wasser (an Stelle der Fermentlösung) und läßt 5 ml davon in 5 ml 10proz. Trichloressigsäure (TCE) einfließen. Die Weiterbehandlung erfolgt wie unten. Der Hauptansatz wird auf 40° gebracht, mit 7,5 ml 0,2proz. Trypsinlösung (eigener Herstellung aus Rinderpankreas nach ⁵⁾) versetzt und stündlich 5 ml entnommen, die man in 5 ml 10proz. TCE einfließen läßt. Der Niederschlag wird zentri-

³⁾ BAMANN-MYRBÄCK, Meth. d. Ferm. Forschg. S. 2048. Leipzig, 1941.

Tabelle 4
Streptokokken-Mäuseschutzversuch Nr. 67
Gewicht der Mäuse (nur Böcke) 16–17 g; infiziert mit je 0,5 ml i. p. der 1:100 verdünnten Abschwemmung des Stammes 1855.
Behandelt: a) 2 h b) 6 h und c) 22 h nach Infektion

a) mit 0,5 ml i. v. und 0,5 ml s. c.
b) und c) mit nur 0,5 ml i. v.
Gesamtdosis: 2,0 ml

Präparat	Zusammensetzung	Kon- zen- tra- tion ^{a)}	KQ	Appliz. SA (ber.) in mg pro Maus	Zahl d. in- fiz. Mäuse	24 h	48 h	es leben ^{b)} nach Infektion
Kontrollen								
SAA	Sulfamylamid	0,9	—	18	10	9(8)	0	0
ABC	Albucid	1,0	—	20	10	10(2)	7(0)	5(0)
A 214/G ₀	Albucid-gek. krist. Pferde- alb. (chromatograph. rein)	3,37	200	13,5	10	10(0)	7(0)	5(0)
A 214/G ₁	dgl. 2 h fermentativ gespalten	3,02	200 ^{c)}	12,1	10	9(1)	5(0)	3(0)
A 214/G ₂	dgl. 46 h fermentativ gespalten	3,62	200 ^{c)}	14,5	10	9(1)	4(0)	0
A 255	Methylpyrimid ^{d)} -Globucid- u. 4,4-Diaminodiphenyl- sulfon-gekupp. Strepto- kock.-Ser. v. Rd. (PA-Nr. 368)	4,15	60	5,0	10	8(2)	6(0)	5(0)
								4(0)
								3

a) Werte nach Sterilfiltration.

b) die Zahlen in den Klammern () geben die erkrankten Tiere der insgesamt lebenden an.

c) Kupplungsquotient vor der fermentativen Spaltung (hat hier nur Bedeutung als Berechnungsgröße).

d) die Chemotherapeutika zu gleichen Gewichtsteilen angekuppelt.

fugiert, dem Überstand 5 ml entnommen und mit 0,25 ml 5 n NaOH versetzt. Hierdurch wird die Farbe wesentlich intensiviert.

Der pH des Abbaus wird stündlich auf Konstanz kontrolliert und nach 2, 4 und 6 Stunden nochmals je 2,5 ml Fermentlösung zupipettiert. Gemessen wird im Pulfrich-Photometer gegen Wasser unter Verwendung von 5-mm-Küvetten und Blaufilter S 47.

4. Fermentativer Abbau des Albucid-Pferdealbumins A 214

a) partiell

2,5 g über Ionenaustauscher L 150 gereinigtes Albucid-Pferdealbumin wurden in 250 ml Wasser gelöst, auf pH 9 eingestellt und der Ansatz auf 40 °C erwärmt. 20 mg Chymotrypsin ⁶⁾, gelöst in 30 ml Wasser, wurden ebenfalls auf 40° erwärmt und die Lösungen vereinigt. Nach einer Stunde wurden abermals 20 mg Chymotrypsin zugefügt, der auf 7,1 abgesunkene pH-Wert auf 9 korrigiert. Nach Ablauf von 2 Stunden wurde durch halbstündiges Erhitzen des Ansatzes auf 60 °C das Enzym inaktiviert und die neutralisierte, kochsalzisonische, sterile Lösung für den Mäuseschutzversuch verwandt.

b) total

Der Ansatz erfolgte wie unter a), jedoch lief der Abbau über 46 Stunden. Nach 1, 3, 5, 7, 22, 24, 26, 28 und 30 Stunden wurden je 5 mg frisches Chymotrypsin zugegeben und der pH-Wert auf 9,0 gehalten. Dieser Ansatz ergab zum Schluß mit Trichloressigsäure nur noch eine ganz schwache Fällung.

Zusammenfassung

Es wurde bewiesen, daß die chemotherapeutische Wirksamkeit von Chemoseren (Sulfonamidazo-Serumproteinen) eine Funktion ihrer proteolytischen Spaltbarkeit ist. Danach sind nicht die Sulfonamid-Azoserumproteine, sondern ihre in vivo freigelegten Abbauprodukte (Sulfonamid-Azopeptide?) therapeutisch wirksam. Die proteolytische Spaltbarkeit ist um so geringer, je mehr primäre Aminogruppen durch Fremdradikale oder „Überkuppelung“ blockiert sind. Ein „überkuppeltes“, hochmolekulares und unwirksames Chemoserum konnte durch intensive, tryptische Partialhydrolyse in wirksame Abbauprodukte übergeführt werden.

Wir danken Herrn Chemotechniker H. DAMMANN und der Laborantin Frau N. KÜHNE für ausgezeichnete Mitarbeit.

⁶⁾ kristallisiertes, hochaktives Präparat eigener Herstellung nach (5).

Dessau, Forschungsinstitut für Impfstoffe, Chemische Abteilung.

Bei der Redaktion eingegangen am 28. Januar 1960.