

FRITZ MICHEEL und HARRO PETERSEN

## Kondensationsprodukte des D-Glucosamins und L-Tyrosins mit Poly-vinylamin und ihre biochemische Wirksamkeit

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 5. Juni 1959)

Poly-vinylamin wird mit *N*-Acetyl-1- $\beta$ -[*S*-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin-hydrobromid zu Kondensationsprodukten umgesetzt, die *N*-Acetyl-D-glucosaminreste über Guanidino-Brücken an Poly-vinylamin gebunden enthalten. Ebenso läßt sich Poly-vinylamin mit *N*-Carbobenzoxy-L-tyrosin-azid zu Poly-*N*-carbobenzoxy-L-tyrosyl-vinylamin umsetzen. Letztere Reaktion wird auch auf das Poly-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin angewandt. Für elektrophoretische Untersuchungen, die Bestimmung der Sedimentationskonstanten, sowie für die Ermittlung der Glucosamin- und Tyrosingehalte wurden die Reaktionsprodukte durch Einwirkung von Keten in Gegenwart von Triäthylamin acetyliert. Die erhaltenen Poly-vinylamin-Derivate wurden auf ihre serologischen Eigenschaften untersucht; ihr Einfluß auf experimentell erzeugte Benzpyrentumoren an Mäusen wurde geprüft.

Für die Synthese von D-Glucose- und D-Glucosaminderivaten des Poly-vinylamins wurde dessen Hydrochlorid aus *N*-[ $\beta$ -Acetoxy-äthyl]-phthalimid durch thermische Abspaltung von Essigsäure, anschließende Polymerisation des Monomeren und Verseifung der Phthalylreste hergestellt<sup>1)</sup>. Das Produkt erwies sich nach Acetylierung mit Keten in der Ultrazentrifuge als praktisch einheitlich (s. Abbild. 1).

Für die Charakterisierung des Poly-vinylamins (I) und seiner Derivate wurden neben den Bestimmungen des Gesamtstickstoffes, des Aminostickstoffes, des D-Glucosamin- und des L-Tyrosingehaltes die Messungen der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge und elektrophoretische Untersuchungen herangezogen. Um ein höheres Mol.-Gewicht zu erhalten und um den vielfach störenden Polyelektrolytcharakter des Poly-vinylamins und seiner Derivate abzuschwächen, wurden die Aminogruppen der Umsetzungsprodukte acetyliert. Durch Acetylierung wurde ferner die analytische Ermittlung der Glucosamin- und Tyrosingehalte erleichtert, weil die Bildung von Halogeniden oder Carbonaten, wie sie bei freier  $\text{NH}_2$ -Gruppe leicht eintritt, unterblieb. F. MICHEEL und H. WESTERMANN<sup>2)</sup> haben bei der Acetylierung von Poly-vinylamin-Derivaten mit Acetanhydrid unlösliche Produkte erhalten. Die Acetylierung der obigen Poly-vinylamin-Derivate mit Keten in absol. Methanol ergab uneinheitliche Polymerisate, die in der Ultrazentrifuge sich als stark heterodispers erwiesen. Dies mag mit einer teilweisen Polymerisation des Ketens in der methanolischen Lösung zusammenhängen. Auch die Acetylierung von Poly-vinylamin-hydrochlorid bei Gegenwart von Triäthylamin ergab recht heterodisperse Acetate. Dagegen lieferte die Ketenisierung von Poly-vinylamin-hydrochlorid in Wasser bei Gegenwart

<sup>1)</sup> D. D. REYNOLDS und W. O. KENYON, J. Amer. chem. Soc. **69**, 911 [1947].

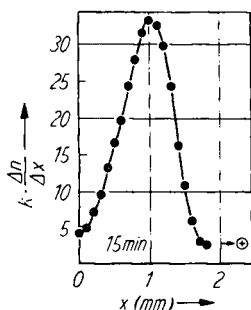
<sup>2)</sup> H. WESTERMANN, Dissertat. Univ. Münster 1958.

von Triäthylamin einheitliche Produkte, die in ihren Eigenschaften mit einem Poly-vinylacetamid (III) übereinstimmen, das nach D. D. REYNOLDS und W. O. KENYON<sup>1)</sup> hergestellt worden war. Die Untersuchung in der Ultrazentrifuge ergab bei diesen Präparaten die Sedimentationskonstante  $[s]_{20}^{0,42} = 2.55$  Svedberg (s. Abbild. 1)\*) gegenüber 2.57 eines von uns nach D. D. REYNOLDS und W. O. KENYON dargestellten Präparates. Die elektrophoretischen Messungen (s. Abbild. 2) bestätigten ebenfalls, daß es sich um ein praktisch einheitliches Präparat handelt.



Abbild. 1

Sedimentationsbild einer 0.42-proz. abs. methanol. Lösung von Poly-vinylacetamid, hergestellt durch Ketenisierung von Poly-vinylamin-hydrochlorid in Wasser + Triäthylamin; Laufzeit 85 Min. bei 49 000 U/Min. in der Phywe-Ultrazentrifuge, Kantenwinkel 10°



Abbild. 2

Elektropherogramm (Antweiler-Gerät) von Poly-vinylacetamid, hergestellt durch Ketenisierung von Poly-vinylamin-hydrochlorid in Wasser + Triäthylamin; Veronalpuffer  $p_H$  8.6; 56 V, 1.4 mA

Substituierte Guanidine lassen sich durch Aminolyse von S-Alkyl-isothioharnstoffen mit Aminen und Aminosäuren erhalten. Dabei wird Mercaptan abgespalten.



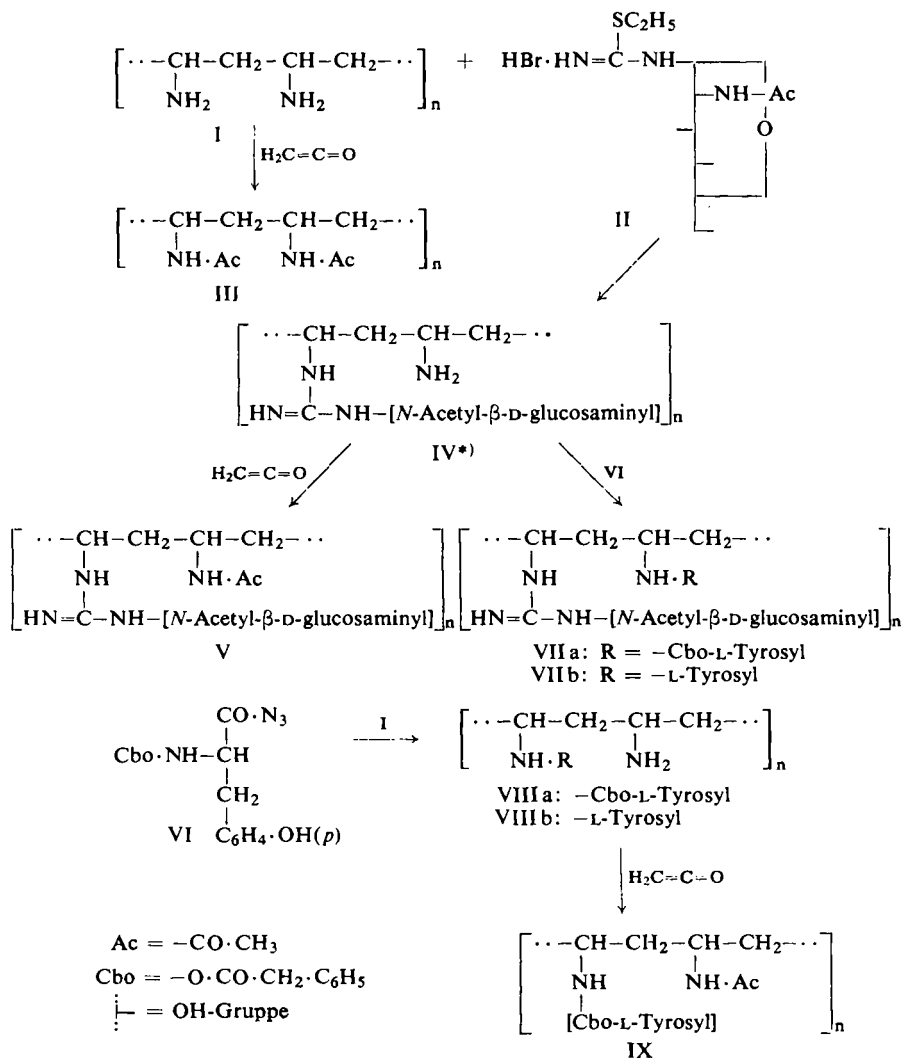
F. MICHEEL und W. HIMMELMANN<sup>3)</sup> haben Poly-vinylamin mit 1-[S-Äthyl-isothioureido]-D-glucose-hydrochlorid zu einem Poly-guanyl-Derivat umgesetzt. F. MICHEEL und H. WESTERMANN<sup>2)</sup> stellten aus 1-[S-Äthyl-isothioureido]-D-glucose-hydrobromid und Poly-vinylamin ebenfalls Poly-D-glucosyl-guanyl-vinylamine her. Die Kondensationsprodukte sind durch geringe Löslichkeit ausgezeichnet. Mit Rücksicht auf die beabsichtigte biochemische Untersuchung und die Ergebnisse von WESTERMANN wurden analoge Umsetzungen mit N-Acetyl-1-β-[S-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin-hydrobromid (II) durchgeführt. Die Darstellung des Glucosaminderivates erfolgte nach der von F. MICHEEL und W. LENGSELD<sup>4)</sup> beschriebenen Methode.

\*) Die Messungen mit den Ultrazentrifugen wurden von HANS RUDOLPH durchgeführt (vgl. Dissertat. RUDOLPH, Univ. Münster (Westf.) 1959); wir danken dem WIRTSCHAFTSMINISTERIUM DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN für die aus seinen Forschungsmitteln angeschaffte Ultrazentrifuge „Spinco“.

<sup>3)</sup> Naturwissenschaften **42**, 297 [1955].

<sup>4)</sup> Chem. Ber. **89**, 1246 [1956]; vgl. auch Dissertat. H. PETERSEN, Univ. Münster 1958.

Die aus II durch Zusatz einer äquivalenten Menge von 1 *n* NaOH gewonnene freie Base hat in mäßig verdünnten Lösungen einen  $p_H$ -Wert von 8,3, das Poly-vinylamin I dagegen einen solchen von 11. Poly-vinylamin-hydrochlorid und II wurden im Mol.-



\*) Diese und die entsprechenden Formeln sollen *nicht* ausdrücken, daß jede zweite Aminogruppe frei bzw. besetzt ist.

Verhältnis 1:2 bei  $p_H$ -Werten zwischen 7 und 9 umgesetzt. Dabei muß der  $p_H$ -Wert durch Zugabe von  $n/10$  NaOH dauernd nachreguliert werden, weil bei der Reaktion aus den beiden basischen Gruppen der Reaktionspartner nur *eine* basische Funktion im Kondensat entsteht. Das Poly-glucosaminyl-guanyl-vinylamin IV wurde in wäßriger Lösung unter Zusatz von Triäthylamin mit Keten acetyliert. Nach Dialyse und

Gefriertrocknung wurden die Glucosaminreste kolorimetrisch nach der Methode von W. T. J. MORGAN und L. A. ELSON<sup>5)</sup> bestimmt. Die Versuche haben ergeben, daß bei  $p_H$ -Wert 8.5 die höchste Kohlenhydrataufnahme erreicht wurde.

Tab. 1. Abhängigkeit der Glucosaminaufnahme vom  $p_H$ -Wert

$p_H$ -Wert	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
Glucosamingehalt in %	4	16	21	22	19

Überschüssiges II erhöht den Grad der Guanylierung wenig (Tab. 2).

Tab. 2. Abhängigkeit der Glucosaminaufnahme vom Mol.-Verhältnis der Komponenten

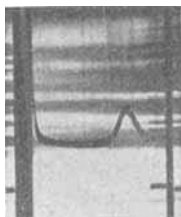
Mol.-Verhältnis PVA:Glucosaminderivat	1:1	1:2	1:5
Glucosamingehalt des Kondensationsproduktes in %	20	22	26

Den Einfluß der Reaktionstemperatur beim Mol.-Verhältnis 1:2 (PVA:Glucosamin-derivat) und  $p_H$ -Wert 8.5 zeigt Tab. 3.

Tab. 3. Abhängigkeit der Glucosaminaufnahme von der Temperatur

Reaktionstemperatur °C	21	40
Glucosamingehalt in %	13	22

Die besten Bedingungen für die Kohlenhydrataufnahmen liegen also beim  $p_H$ -Wert 8.5, beim Mol.-Verhältnis der Reaktionspartner 1:3 bis 1:5 und bei einer Temperatur von 40°. Ein anschließend mit Keten acetyliertes Poly-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (V) mit einem Gehalt von 24% D-Glucosamin erwies sich in der Ultrazentrifuge als weitgehend homodispers (Abbild. 3).



Abbild. 3

Sedimentationsbild der 0.5-proz. Lösung eines ketenisierten Poly-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamins in 0.2 *n* NaCl; Laufzeit 85 Min. bei 59780 U/Min. in der Spinco-Ultrazentrifuge, Kantenwinkel 40°

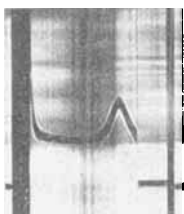
Für die Kupplung von L-Tyrosin an die Aminogruppen des Poly-vinylamins eignete sich das Azid-Verfahren nach TH. CURTIUS<sup>6)</sup>. Die Umsetzung von Poly-vinylamin-base mit *N*-Carbobenzoxy-L-tyrosin-azid (VI) gelang in Methanol/Wasser (9:1). Der  $p_H$ -Wert wurde durch Zugabe von alkoholischer Natronlauge zwischen 7.5 und 8.5 gehalten (Reaktionstemperatur +5°). Das Poly-cbo-tyrosyl-vinylamin (VIIIa) wurde durch Keten in wäßriger Lösung unter Zusatz von Triäthylamin acetyliert (IX). Nur so wurden reine, von Anionen freie Produkte erhalten. Die Tyrosinbestimmungen wurden nach der Methode von F. MICHEEL und E. GIESBERT<sup>7)</sup> ausgeführt. Die Produkte

<sup>5)</sup> L. A. ELSON und W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.* **27**, 1824 [1933]; K. MEYER, J. PALMER und E. SMYTH, *J. biol. Chemistry* **119**, 491 [1937].

<sup>6)</sup> TH. CURTIUS, *J. prakt. Chem.* **70**, 57 [1904]; *Ber. dtsch. chem. Ges.* **35**, 3226 [1902].

<sup>7)</sup> Dissertat. E. GIESBERT, Univ. Münster (Westf.) 1954.

wiesen durchschnittlich nur einen Gehalt von 5 bis 10% Tyrosin auf. Die Einheitlichkeit der Reaktionsprodukte wurde durch Aufnahmen in der Ultrazentrifuge und durch elektrophoretische Messungen überprüft. Ein ketenisiertes Poly-carbobenzoxyl-L-tyrosyl-vinylamin-Derivat mit einem Tyrosingehalt von 6% ergab im Spinco-Gerät, Modell E, in 0.2 *n* NaCl-Lösung bei 59780 U/Min. die Sedimentationskonstante  $[s]_{20}^{0.5} = 1.37$  Svedberg (s. Abbild. 4).

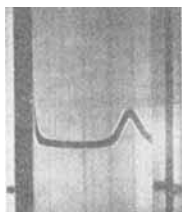


Abbild. 4

Sedimentationsbild der 0.5-proz. Lösung eines ketenisierten Poly-carbobenzoxyl-L-tyrosyl-vinylamins in 0.2 *n* NaCl, Laufzeit 90 Min. bei 59780 U/Min. in der Spinco-Ultrazentrifuge, Kantenwinkel 40°

Auch die elektrophoretischen Messungen im Antweiler-Gerät zeigten, daß das Reaktionsprodukt einheitlich ist.

Für die Kupplung von Carbobenzoxyl-L-tyrosin-azid an Poly-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (IV) wurden Präparate verwendet, die einen Glucosamingehalt von 22 bzw. 8% aufwiesen. Es wurden dabei die oben beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Das Produkt, das sich aus der Kupplung der Substanz mit dem höheren Glucosamingehalt ergab (VIIa), wurde durch Einwirkung von Keten acetyliert und in der Ultrazentrifuge und Mikro-Elektrophorese-Apparatur untersucht. Die Sedimentationskonstante wies den Wert  $[s]_{20}^{0.5} = 1.84$  Svedberg gegenüber  $[s]_{20}^{0.5} = 1.74$  Svedberg beim Ausgangsprodukt auf (Abbild. 5).



Abbild. 5

Sedimentationsbild der 0.5-proz. Lösung eines ketenisierten Poly-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-*N*-carbobenzoxyl-L-tyrosyl-vinylamins in 0.2 *n* NaCl; Laufzeit 90 Min. bei 59780 U/Min. in der Spinco-Ultrazentrifuge

Die Abspaltung der Carbobenzoxyl-Reste wurde in bekannter Weise mit HBr/Eisessig vorgenommen (VIIfb). Um die Substanzen für Tierversuche verwenden zu können, wurden die Bromionen durch aufeinanderfolgende Dialyse gegen verd. Natriumcarbonatlösung, verd. Salzsäure und zuletzt gegen Wasser gereinigt.

#### TIERVERSUCHE MIT DEN POLY-VINYLAMIN-DERIVATEN

Für die Tierversuche wurden III und die nichtacetylierten Polyvinylamin-Derivate IV, VIIb und VIIIb herangezogen. Zunächst wurden die Präparate auf antigene Eigenschaften untersucht. Hierzu wurden aktive Immunisierungs-Teste an Kaninchen durchgeführt. Da die Stoffe IV und VIIIb mit Normalserum unspezifische Fällungen ergaben, konnten die Präzipitin-Reaktionen nicht angewandt werden. Einen Anhaltspunkt für das Vorliegen von antigenen Eigenschaften gab jedoch der anaphylaktische

Schock. Den immunisierten Tieren wurde 10 bis 15 Tage nach der letzten Immunisierungs-Injektion eine bestimmte Menge von IV bzw. VIIIb, die bei unbehandelten Tieren noch eine gute Verträglichkeit aufwies, intravenös injiziert. Dabei zeigte sich, daß Poly-vinylacetamid (III) keine Schockreaktionen hervorrief. Dagegen zeigten folgende Polyvinylamid-Derivate, mit denen die Tiere immunisiert worden waren, einen anaphylaktischen Schock mit tödlichem Ausgang:

- a) Poly-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (IV) (24% Glucosamin)
- b) Poly-L-tyrosyl-vinylamin (VIIIb) (9% Tyrosin)
- c) Poly-L-tyrosyl-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (VIIb) (18% Glucosamin und 6% Tyrosin).

In früheren Arbeiten haben F. MICHEEL und Mitarbb.<sup>8)</sup> gezeigt, daß die Bildung von Benzpyrentumoren bei Mäusen durch subcutane Injektion von Antigenlösungen stark eingeschränkt werden kann. Deshalb wurden IV und VIIIb analogen Versuchen unterzogen.

Die Tabellen im Versuchsteil zeigen beim Poly-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (IV), daß neben einer zeitlichen Verzögerung des Beginns des Auftretens der Tumoren in den ersten Wochen nach Auftreten der ersten Tumoren nur ein schwacher Anstieg in der Tumorquote gegenüber unbehandelten Tieren zu verzeichnen ist.

Ein ähnliches Ergebnis liegt bei der Versuchsreihe mit Poly-L-tyrosyl-vinylamin (VIIIb) vor. Das Auftreten der ersten Tumoren verzögert sich gegenüber der normalen Benzpyrentest-Kurve um etwa 30 Tage. Der Anstieg der Tumorquote ist ebenfalls flacher als der der normalen Benzpyren-Kurve. Die Tabellen im Versuchsteil zeigen die Einzelheiten. Nach wesentlich längerer Versuchsdauer erreichen die mit IV und VIIIb behandelten Tiere eine ähnliche Tumorrare wie die Kontrolltiere.

Wir danken dem KULTUSMINISTERIUM DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN für die Bereitstellung von Mitteln aus dem Fonds zur Förderung der Krebsforschung, desgleichen dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Poly-vinylamin-hydrochlorid (I)* wird nach den Angaben der Literatur hergestellt<sup>1)</sup>. Das freie *Poly-vinylamin* wird aus dem Hydrochlorid durch Schütteln mit einer äquivalenten Menge Natriummethylat erhalten<sup>9)</sup>.

*N-Acetyl-1-β-[S-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin-hydrobromid (II)* wurde nach der von F. MICHEEL und Mitarbb. angegebenen Vorschrift dargestellt<sup>4)</sup>.

*N-Carbobenzoxy-L-tyrosin-azid (VI)*: 10 g *N-Carbobenzoxy-L-tyrosin-äthylester*<sup>10)</sup> werden mit 20 ccm 85-proz. *Hydrazinhydrat* umgesetzt. Die zähflüssige Masse beginnt nach kurzer Zeit zu kristallisieren und wird nach dem Trocknen über Schwefelsäure aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 7 g (70% d. Th.). Schmp. 222°.

4 g *N-Carbobenzoxy-L-tyrosin-hydrazid* werden in 200 ccm 2 n methanol. Salzsäure gelöst. Unter Eiskühlung wird dieser Lösung tropfenweise eine 5-proz. methanol. Natriumnitrit-

<sup>8)</sup> F. MICHEEL, *Angew. Chem.* **54**, 293 [1941]; F. MICHEEL und H. EMDE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 249 [1940]; **269**, 217 [1941]; **275**, 215 [1942]; **280**, 88 [1944]; F. MICHEEL und H. DÖRNER, ebenda **280**, 92 [1944]; F. MICHEEL, H. EMDE und H. DÖRNER, ebenda **275**, 258 [1942] und weitere Arbeiten.

<sup>9)</sup> F. MICHEEL und R. BÜNING, *Chem. Ber.* **90**, 1606 [1957].

<sup>10)</sup> M. BERGMANN und L. ZERVAS, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **65**, 1192 [1932].

lösung zugesetzt, bis kein Nitrit mehr verbraucht wird (5 g  $\text{NaNO}_2$  werden in 5 ccm Wasser gelöst und auf 100 ccm mit Methanol aufgefüllt). Die so erhaltene *N*-Carbobenzoxy-*L*-tyrosin-azid-Lösung wird sofort für weitere Umsetzungen verwendet.

*Poly-vinylacetamid (III)*: Zur Überführung von *Poly-vinylamin-hydrochlorid* in *Poly-vinylacetamid* werden 1.5 g des Hydrochlorids in 250 ccm Wasser gelöst und mit 3 ccm Triäthylamin versetzt. Unter Eiskühlung wird in die Lösung 2 Stdn. Keten eingeleitet. Anschließend wird mit Wasser verdünnt, drei Tage gegen dest. Wasser dialysiert, i. Wasserstrahlvak. eingengt und gefriergetrocknet. Ausb. 1.2 g.



Die Substanz enthält keinen Aminostickstoff (van Slyke).

*Umsetzungen von Poly-vinylamin-hydrochlorid mit N-Acetyl-1- $\beta$ -[S-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin-hydrobromid (II) in Abhängigkeit vom  $p_{\text{H}}$ -Wert*: Je 1 g *Poly-vinylamin-hydrochlorid* wird in 50 ccm Wasser gelöst, im Thermostaten auf 40° erwärmt und mit  $n/_{10}$  NaOH auf den gewünschten  $p_{\text{H}}$ -Wert eingestellt. Zu jeder Lösung läßt man langsam unter ständigem Rühren 10.5 g (2 Moll.) II, ebenfalls in 50 ccm Wasser gelöst, aus einer Bürette zutropfen. Durch Zugabe von  $n/_{10}$  NaOH wird der für den Zusatz vorgeschriebene  $p_{\text{H}}$ -Wert streng eingehalten. Es tritt sofort starker Mercaptangeruch auf. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert muß auch nach beendeter Zugabe der Isothioharnstoff-Lösung kontrolliert werden. Im allgemeinen ändert er sich nach 8 bis 10stdg. Reaktionszeit nicht mehr. Nach 24 Stdn. werden die Reaktionslösungen auf Raumtemperatur abgekühlt und 3 Tage gegen dest. Wasser dialysiert. Die Lösungen werden filtriert, i. Vak. eingengt und gefriergetrocknet.

Für die *Acetylierung mit Keten* werden jeweils 500 mg Reaktionsprodukt in 100 ccm dest. Wasser gelöst. Nach Zugabe von je 3 ccm Triäthylamin wird unter Eiskühlung in die Lösungen 2 Stdn. Keten eingeleitet. Die Aufarbeitung der Produkte erfolgt in der üblichen Weise durch Dialyse und Gefrier Trocknung. Die Zusammensetzung der Präparate zeigt Tab. 1.

*Umsetzungen von Poly-vinylamin-hydrochlorid mit N-Acetyl-1- $\beta$ -[S-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin-hydrobromid (II) in Abhängigkeit vom Mol.-Verhältnis der Reaktionspartner*: Die Lösungen von je 1 g *Poly-vinylamin-hydrochlorid* in 50 ccm dest. Wasser werden mit  $n/_{10}$  NaOH auf den  $p_{\text{H}}$ -Wert 8.5 eingestellt und im Thermostaten auf 40° erwärmt. Diesen Lösungen werden unter ständiger Kontrolle des  $p_{\text{H}}$ -Wertes die in dem gewünschten Mol.-Verhältnis zubereiteten Lösungen von II zugesetzt. Nach 24 Stdn. werden die Reaktionslösungen in der oben angegebenen Weise aufgearbeitet und anschließend durch Einwirkung von Keten in wäßriger Lösung unter Zusatz von Triäthylamin acetyliert.

*Die Abhängigkeit der Umsetzung von der Reaktionstemperatur* wird bei 21° und bei 40° beim  $p_{\text{H}}$ -Wert 8.5 und beim Mol.-Verhältnis der Reaktionspartner 1:2 in der oben beschriebenen Weise ermittelt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Präparate ergibt sich aus den Tabellen 2 und 3.

*Umsetzungen von Poly-vinylamin (I) mit N-Carbobenzoxy-*L*-tyrosin-azid (VI)*: Die Umsetzungen von *Poly-vinylamin* mit *N*-Carbobenzoxy-*L*-tyrosin-azid (VI) werden in einem Lösungsmittelgemisch Methanol/Wasser (9:1) durchgeführt. Die Carbobenzoxy-*L*-tyrosin-azid-Lösung läßt man in dem gewünschten Mol.-Verhältnis unter Rühren der alkoholischen Lösung des *Poly-vinylamins* zutropfen. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert der Reaktionslösung wird durch Zugabe alkoholischer Natronlauge zwischen 7.5 und 8.5 gehalten. Die Reaktionstemperatur beträgt +5 bis +8°. Nach einer Stunde wird das Methanol durch Vakuumdestillation weitgehend entfernt und das klebrige Reaktionsprodukt drei Tage gegen eine 0.5-proz. Natriumcarbonatlösung und anschließend gegen dest. Wasser dialysiert. Die Acetylierung mit Keten wird in der oben angegebenen Weise durchgeführt.

*Abspaltung der Carbobenzoxy-Reste aus den Poly-carbobenzoxy-L-tyrosyl-vinylamin-Derivaten VIIa und VIIIa:* Die Decarbobenzoxylierungen werden mit einer gesättigten HBr/Eisessig-Lösung vorgenommen. Die Produkte werden mit 36-proz. HBr/Eisessig-Lösung übergossen und 2 Stdn. im verschlossenen Kolben geschüttelt. Die Substanzen zeigen nur eine geringe Löslichkeit in HBr/Eisessig. Danach werden die Reaktionsgemische mit der doppelten Menge absol. Äther versetzt, abfiltriert und mehrfach mit Äther gewaschen. Die wäßr. Lösungen der Produkte werden 3 Tage gegen verd. Salzsäure und 3 Tage gegen dest. Wasser dialysiert, eingeengt und gefriergetrocknet.

*Umsetzungen von Poly-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin-Derivaten (IV) mit N-Carbobenzoxy-L-tyrosin-azid (VI):* Diese Kupplungen werden analog der Umsetzung von Poly-vinylamin mit Carbobenzoxy-L-tyrosin-azid ausgeführt.

Zur Lösung des PVA-Glucosamin-Derivates VIIa ist eine erheblich größere Menge des Lösungsmittelgemisches Methanol/Wasser (9:1) erforderlich. Die Acetylierung mit Keten und die Decarbobenzoxylierung erfolgen in der angegebenen Weise.

Es werden Präparate von IV mit einem D-Glucosamingehalt von 22 bzw. 8% umgesetzt. Man erhielt aus ersterem z.B. ein Präparat (nach Abspaltung der Carbobenzoxy-Reste) mit 18% D-Glucosamin- und 6% Tyrosinresten.

### *Beschreibung der Tierversuche*

Für den anaphylaktischen Test wurden als Versuchstiere Kaninchen verwendet.

a) *Poly-vinylacetamid (III):* Ein Kaninchen erhielt an 10 aufeinanderfolgenden Tagen eine Gesamtdosis von 200 mg Poly-vinylacetamid, in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst, in die Ohrvene injiziert. Am 11. Tag nach der letzten Injektion wurden dem Tier 30 mg Poly-vinylacetamid, in 3 ccm physiolog. NaCl-Lösung gelöst, intravenös injiziert. Es trat keine Temperaturänderung ein. Messung anal mit dem elektrischen Thermometer „Thermorapid“ \*). Sichtbare Veränderungen im Befinden des Tieres wurden nicht festgestellt.

b) *Poly-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (IV)* (mit einem Gehalt von 24% Glucosamin-Resten, Aminogruppen nicht acetyliert): Ein Kaninchen mit dem Gewicht 5450 g erhielt an 13 aufeinanderfolgenden Tagen eine Gesamtdosis von 235 mg Substanz IV in die Ohrvene injiziert. Nach weiteren 13 Tagen wurde der anaphylaktische Test mit 20 mg Substanz, die in 2 ccm physiolog. NaCl-Lösung gelöst waren, durchgeführt. Die Temperatur betrug zu Beginn des Versuches 38.15°. Nach 8 Min. traten starke Krämpfe auf. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte die Temperatur verfolgt werden; sie blieb konstant. Danach war eine Temperaturmessung nicht mehr möglich. Nach weiteren 2 Min. trat Tod ein.

Der Versuch wurde an einem unbehandelten Tier mit 20 mg Substanz wiederholt. Es traten keine sichtbaren Veränderungen auf.

c) *Poly-L-tyrosyl-vinylamin (VIIIb)* (mit 9% Tyrosin, Aminogruppen nicht acetyliert): Einem Kaninchen mit dem Gewicht 5250 g wurde an 11 aufeinanderfolgenden Tagen eine Gesamtdosis von 200 mg Substanz in die Ohrvene injiziert. 15 Tage nach der letzten Injektion wurde der anaphylaktische Test mit 20 mg Substanz durchgeführt. 9 Min. nach der Injektion traten Krämpfe auf, nach 12 Min. trat Tod ein. Der Versuch wurde ebenfalls mit einem unbehandelten Tier wiederholt. Das Tier erhielt 25 mg Substanz in 2.5 ccm physiologischer Kochsalzlösung in die Ohrvene injiziert. Es traten keine sichtbaren Veränderungen im Befinden des Tieres auf.

d) *Poly-L-tyrosyl-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (VIIb):* Einem Kaninchen mit dem Gewicht 4890 g wurden an 12 aufeinanderfolgenden Tagen insgesamt 220 mg Substanz in die Ohrvene injiziert. Der anaphylaktische Test wurde 14 Tage nach der letzten Injektion

\*) NETHELER & HINZ, Hamburg.



durchgeführt. 12 Min. nach der Injektion traten Krämpfe auf, die nach weiteren 4 Min. zum Tod führten. Während des Kramp fzustandes war auch hier eine Temperaturmessung nicht möglich.

*Beeinflussung von experimentell erzeugten Benzpyrentumoren durch Poly-vinylamin-Derivate:* Als Versuchstieren wurden weißen Mäusen 2 mal im Abstand von 3 Tagen je 0.5 mg Benzpyren, in 0.2 ccm Olivenöl gelöst, subcutan in die linke Flanke verabfolgt. Nach einer Woche erhielten die Mäuse 2 mal wöchentlich 15  $\gamma$  Testsubstanz (in je 0.2 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst) in die rechte Flanke injiziert (subcutan)<sup>8)</sup>.

a) *Poly-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (IV)* (24% Glucosamin, Aminogruppen nicht acetyliert): Für diesen Test wurden 45 Mäuse eingesetzt, von denen bis zum 60. Tag kein Tier starb. Bis zum 90. Tag starben 3 Tiere ohne Tumor. Die Auswertung wurde daher auf 42 Tiere bezogen. Der Vergleich der Tabellen 4 und 5 zeigt, daß eine erhebliche Verzögerung des Auftretens von Benzpyrentumoren gegenüber unbehandelten Tieren auftritt. Gleichfalls ist zu erkennen, daß die Tumorquote wesentlich tiefer als bei den Tieren liegt, die nur mit Benzpyren behandelt worden sind.

b) *Poly-L-tyrosyl-vinylamin (VIIIb)* (9% Tyrosin, Aminogruppen nicht acetyliert): Es wurden 44 Mäuse eingesetzt, von denen bis zum 60. Tag eine Maus und bis zum 90. Tag insgesamt 5 Mäuse ohne Tumor starben. Die Auswertung wurde daher auf 39 Tiere bezogen. Tab. 6 zeigt die starke Verzögerung im Auftreten der Tumoren sowie eine Erniedrigung der Tumorquote gegenüber unbehandelten Tieren.

Tab. 4. Auswertung der Tierversuche bei Verabreichung von Poly-N-acetyl-D-glucosaminyl-guanyl-vinylamin (IV) + Benzpyren

Tage	68	82	87	90	103	110	118	124	130	139	146	151
Zahl	1	1	1	1	4	4	9	14	14	16	20	21
Tumorträger in % <sup>*)</sup>	2.4	2.4	2.4	2.4	9.5	9.5	21.5	33	33	38	46.5	50

<sup>\*)</sup> Bezogen auf 42 Tiere

Tab. 5. Auswertung der Tierversuche bei Verabreichung von Benzpyren

Tage	60	70	80	90	100	110	120	130
Tumorträger in %	4	18	36	58	67	80	84	85

Tab. 6. Auswertung der Tierversuche bei Verabreichung von Poly-L-tyrosyl-vinylamin (VIIIb) + Benzpyren

Tage	68	71	87	90	103	110	118	124	130	139	146	151	158	165	173
Zahl	0	0	0	0	3	3	8	11	11	12	18	20	21	23	25
Tumorträger in % <sup>**)</sup>	0	0	0	0	7.7	7.7	20.5	28	28	30.5	46	51	54	59	64

<sup>\*\*)</sup> Bezogen auf 39 Tiere