

## Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung primärer Amine und Aminosäuren bei der Inhibierung von Trypsin

Von

Hermann Mix, Hans-Joachim Trettin und Martin Gülzow

Aus dem Institut für organische Katalyseforschung (Direktor: Prof. Dr. W. Langenbeck)  
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin  
und der Medizinischen Universitätsklinik Rostock (Direktor: Prof. Dr. M. Gülzow)

(Der Schriftleitung zugegangen am 11. August 1965)

In der vorausgegangenen Arbeit<sup>1</sup> hatten wir festgestellt, daß die Aktivierung von Trypsinogen und Chymotrypsinogen mittels Enteropeptidase oder Trypsin durch bestimmte Basen, vor allem n-Alkylguanidine gehemmt wird. Zugleich konnte gezeigt werden, daß die untersuchten Verbindungen in höheren Konzentrationen auch Trypsin selbst inhibierten. Hierauf erhebt sich die Frage, ob die beobachtete Zymogenhemmung durch Amine, speziell durch n-Propylguanidin, nicht zumindest teilweise auf einer Inhibierung des aktivierenden Enzyms beruht. Die Vermutung, daß die Zymogenhemmung in erster Linie das Resultat einer Verdrängungsreaktion ist, in der Proenzym und Inhibitor miteinander um das aktive Zentrum der aktivierenden Peptidase konkurrieren, drängt sich auch deshalb auf, weil die inhibierenden Verbindungen den Substraten bzw. Proteinbezirken, die dem Angriff durch Trypsin ausgesetzt sind, in gewissen Einzelheiten ähnlich sind. Da Trypsin Peptid- und Esterbindungen der beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet, ist es ganz natürlich, daß eine Reihe von organischen Basen in kompetitiver Reaktion hemmt. Tatsächlich wurde die stärkste Inhibitorwirkung an Substanzen beobachtet, die mit den trypsinspezifischen Aminosäuren weitgehende strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten haben, wie z. B. die 4-Guanido-buttersäure<sup>2</sup>.

Unsere früheren Untersuchungen machten zwar die Bedeutung der Guanidogruppe für die Hemmwirkung offenkundig, zugleich aber wurde deutlich, wie wenig die absolute Stärke der Base ins Gewicht fällt, vergleicht man sie mit dem Effekt, den Veränderungen am Alkylrest hervorrufen. Mit dieser Arbeit soll der Versuch gemacht werden, systematisch einige der strukturellen und sterischen Erfordernisse der Trypsinhemmung zu erkunden, wobei die notwendige Basenfunktion hier allein durch die primäre Aminogruppe übernommen wird.

<sup>1</sup> H.-J. Trettin u. H. Mix, diese Z. **340**, 24 [1965].

<sup>2</sup> J. D. Geratz, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **56**, 599 [1962]; *Arch. Biochem. Biophysics* **102**, 327 [1963].

Guanidinverbindungen bleiben einstweilen unberücksichtigt, obwohl sie durchweg erheblich wirksamer sind als die entsprechenden Amine. Hier stellen die räumliche Gestaltung und die größere Basizität der Guanidgruppe Elemente dar, die sich bei der Substratverdrängung als außerordentlich förderlich erweisen. Unsere an einfachen Aminen entwickelten Vorstellungen dürften jedoch durch die Einbeziehung von Guanidinderivaten grundsätzlich kaum verändert werden. Man wird lediglich in Rechnung setzen müssen, daß Guanidinreste anstelle von Aminogruppen eine aliphatische Kette zwangsläufig um ein bis zwei C-Einheiten verlängern.

Von größtem Wert für die vorliegende Untersuchung war die besondere Eignung des  $N^\alpha$ -Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilids<sup>3</sup> als Substrat. Es besitzt nicht nur den bekannten Vorzug, daß man die tryptische Hydrolyse an ihm schnell und genau verfolgen kann, sondern es spricht auch auf bestimmte Hemmstoffe außerordentlich leicht an. Wie sich zeigen sollte, registriert es schon scheinbar geringfügige Veränderungen an der Inhibitormolekel zuverlässig und, im Vergleich zum Casein um einen Faktor, der teilweise über 100 liegt, empfindlicher.

### Methodik

Die Trypsinwirkung in Abwesenheit und in Gegenwart von Inhibitoren wurde am  $N^\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid-hydrochlorid als Substrat bestimmt<sup>3</sup>. In Parallelansätzen enthielt jedes Reagenzglas 1 ml 0,1*m* Tris-Puffer vom pH 7,6 (zugleich 0,05*m* an  $\text{CaCl}_2$ ), 1 ml Substrat-Lösung (0,2, 0,3 oder 0,4 millimolar) und 0,5 ml Tris-Puffer mit dem zu untersuchenden Inhibitor. Gleichzeitig wurde ein drittes, sog. Leerwertgefäß zur unmittelbaren Inaktivierung zusätzlich mit 0,5 ml 0,2*n* HCl versehen. Nach einer Vorwärmzeit von 5 Min. im Wasserbad von 30° wurden in jedes Reaktionsgefäß 0,5 ml der frisch bereiteten Trypsinlösung gegeben; diese war mit 0,4 millimolar Substrat so eingestellt, daß unter den Versuchsbedingungen eine Extinktion um 0,34 gemessen wurde (etwa 6,25  $\gamma$ ). Anschließend wurde 30 Min. bei 30° inkubiert, danach mit 0,5 ml 0,2*n* HCl inaktiviert und schließlich im Beckman-Photometer bei 400 nm photometriert.

### Präparate

Das verwendete Trypsin (EC 3.4.4.4) war ein krist. Präparat der Firma Novo Industri A/S Kopenhagen (25 Anson-Einheiten pro g)\*.

Das Substrat  $N^\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid-hydrochlorid wurde nach den Angaben von Tuppy und Mitarbeitern<sup>3</sup> hergestellt.

Ein Teil der getesteten Substanzen bestand aus Handelsprodukten\*\*. Sämtliche Basen wurden in die Hydrochloride übergeführt und umkristallisiert. Folgende unkor. Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte der Hydrochloride wurden erhalten: Für Methyamin 226°, Äthylamin 108°, Propylamin 160°, Butylamin 205°, Pentylamin 228°, Hexylamin 219°, Heptylamin 218°, Isopropylamin 156°, Allylamin 112°, Isobutylamin 175°, *sek.*-Butylamin 145°, *tert.*-Butylamin 270°, Isopentylamin 224°, Äthanolamin 80°, Cyclohexylamin 206°, 2-Methyl-cyclohexylamin 158°, 2-Phenyl-

\* Für großzügige Hilfe durch Überlassung von krist. „Trypsin Novo“ danken wir der Firma Novo-Industri, Kopenhagen.

\*\* Für kostenlose Übersendung von Isoamylamin, 1.10-Diamino-decan und 1.12-Diamino-dodecan sind wir der Fluka AG, Buchs SG (Schweiz), zu Dank verpflichtet.

<sup>3</sup> H. Tuppy, U. Wiesbauer u. E. Wintersberger, diese Z. **329**, 278 [1962].

äthylamin 218<sup>0</sup>, 2-Phenyl-propylamin 218<sup>0</sup>, 1,2-Diamino-äthan 329<sup>0</sup>, 1,3-Diamino-propan 245<sup>0</sup>, 1,4-Diamino-butan 300<sup>0</sup>, 1,5-Diamino-pentan 255<sup>0</sup>, 1,6-Diamino-hexan 250<sup>0</sup>, 1,10-Diamino-decan 328<sup>0</sup>, 1,12-Diamino-dodecan 345<sup>0</sup>, Diäthylamin 225<sup>0</sup>, Benzylamin 259<sup>0</sup>.

2-Methyl-cyclohexylamin wurde aus dem entsprechenden Keton durch Druckhydrierung in Gegenwart von Ammoniak, 2-Phenyl-äthylamin unter den gleichen Bedingungen aus Benzylcyanid erhalten. Zur Synthese von 2-Phenyl-propylamin wurden Benzol und Allylamin in Gegenwart von Aluminiumchlorid miteinander umgesetzt<sup>4</sup>. Die Vorschrift zur Herstellung von 3-Aminomethyl-benzoessäure (Schmp. 284—285<sup>0</sup>) und 4-Aminomethyl-benzoessäure (Schmp. 300<sup>0</sup>) stammte von Levin und Sedlecky<sup>5</sup>; nach ihren Angaben wurden die entsprechenden Tolunitrile zu den Cyanobenzoessäuren oxydiert und diese katalytisch reduziert. 2-Aminomethyl-benzoessäure (Schmp. d. Hydrochlorids 230<sup>0</sup>) ließ sich aus Phthalaldehyd durch reduktive Aminierung bei 90<sup>0</sup> und einem H<sub>2</sub>-Druck von 100 Atm. mit nachfolgender saurer Hydrolyse des entstandenen Phthalimidins (Schmp. 150<sup>0</sup>) gewinnen. 4-Hydroxy-benzylamin und 4-Dimethylamino-benzylamin wurden aus ihren *p*-substituierten Aldehyden, 3,5-Dimethyl-benzylamin aus Mesitylaldehyd hergestellt. Der Syntheseweg für alle anderen Derivate des Benzylamins führte über die Nitrile. Ausgangsprodukte für die Sandmeyer-Reaktion waren *o*-, *m*- und *p*-Toluidin, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6- und 3,4-Dimethyl-anilin sowie *p*-Nitro-anilin. Reduktion zum Amin durch katalytische Hydrierung in ammoniakgesättigter Methanol-Lösung, Zimmertemperatur, 100—150 Atm. H<sub>2</sub>-Druck, Raney-Urushibara-Nickel.

Verbindung	Schmp. der Hydrochloride	Ber.			Gef.		
		C	H	N	C	H	N
4-Hydroxy-benzylamin . . .	202 <sup>0</sup>	52,67	6,32	8,78	52,78	6,47	9,06
4-Amino-benzylamin . . . .	350 <sup>0</sup>	43,09	6,06	14,36	43,08	6,36	14,62
4-Dimethylamino-benzylamin.	212 <sup>0</sup>	48,44	7,23	12,56	48,21	7,35	12,25
2-Methyl-benzylamin . . . .	223 <sup>0</sup>				61,21	7,75	8,94
3-Methyl-benzylamin . . . .	214 <sup>0</sup>	60,95	7,50	8,89	61,07	7,64	9,06
4-Methyl-benzylamin . . . .	244 <sup>0</sup>				61,11	7,76	8,80
2,3-Dimethyl-benzylamin . . .	238 <sup>0</sup>				63,14	8,29	8,17
2,4-Dimethyl-benzylamin . . .	221 <sup>0</sup>				63,07	8,24	8,08
2,5-Dimethyl-benzylamin . . .	233 <sup>0</sup>	62,97	8,22	8,16	62,91	8,20	8,05
2,6-Dimethyl-benzylamin . . .	266 <sup>0</sup>				63,26	8,16	8,26
3,4-Dimethyl-benzylamin . . .	215 <sup>0</sup>				62,93	8,48	8,21
3,5-Dimethyl-benzylamin . . .	257 <sup>0</sup>				63,22	8,23	8,04

### Ergebnisse und Diskussion

Wie eingangs erwähnt, ließ sich das differenzierte Hemmvermögen der untersuchten Basen am Substrat *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilid sehr genau feststellen. Über die Wirksamkeit der hemmenden Verbindungen informieren im folgenden die jeweiligen Inhibitorkonstanten

<sup>4</sup> A. W. Weston, A. W. Ruddy u. C. M. Suter, J. Amer. chem. Soc. **65**, 674 [1943]; Houben-Weyl, Methoden d. organ. Chemie, 4. Aufl., Bd. XI/1, S. 1022, Verlag G. Thieme, Stuttgart 1957.

<sup>5</sup> M. Levin u. R. Sedlecky, J. organ. Chemistry **24**, 115 [1959].

$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$ , die nach der Methode von Dixon<sup>6</sup> graphisch ermittelt wurden. Zugleich konnte damit der kompetitive Hemmungstyp nachgewiesen werden, der, wie auch Auswertungen nach Lineweaver und Burk<sup>7</sup> ergaben, für die Wirkungsweise aller aufgeführten Substanzen zutraf.

Die erste Tabelle enthält eine Aufstellung von primären aliphatischen Aminen, aus der hervorgeht, wie sich  $K_i$  innerhalb einer homologen Reihe und bei strukturisomeren Verbindungen verändert.

Tab. 1. Inhibitor- und Basenkonstanten ( $K_i$  und  $pK_B$ ) von aliphatischen primären Aminen. Hemmung der Proteolyse von  $N^\alpha$ -Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilid. 6,25  $\gamma$  Trypsin und 261 bzw. 522  $\gamma$  Substrat in 3,0 ml 0,05*m* Tris-Puffer +  $CaCl_2$  vom pH 7,6, Inkubation 30 Min. bei 30°.

Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]	$pK_B$	Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]	$pK_B$
Methylamin . . .	170	10,62 <sup>a</sup>	Isopropylamin .	196	10,72 <sup>a</sup>
Äthylamin . . .	46	10,67 <sup>b</sup>	Allylamin . . .	9,0	9,76 <sup>a</sup>
Propylamin . . .	5,45	10,75 <sup>a</sup>	Isobutylamin . .	11,7	10,72 <sup>b</sup>
Butylamin . . .	1,34	10,71 <sup>b</sup>	sek.-Butylamin .	≈ 30	
Pentylamin . . .	2,3	10,64 <sup>a</sup>	tert.-Butylamin .	≈ 200	10,49 <sup>a</sup>
Hexylamin . . .	6,25	10,63 <sup>a</sup>	Isopentylamin .	2,1	10,64 <sup>a</sup>
Heptylamin . . .	9,3	10,04 <sup>b</sup>			

<sup>a</sup> Landolt-Börnstein, Zahlenwerte und Funktionen, Bd. II/7, 6. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg 1960.

<sup>b</sup> Bjerrum-Schwarzenbach-Sillén, Stability Constants of Metal-Ion-Complexes, JUPAC Special Publication Nr. 6, London: The Chem. Soc., Burlington House, W. 1, 1957.

Man erkennt, daß n-Butylamin die kleinste Inhibitorkonstante und damit die größte Hemmwirkung besitzt. Durch Verzweigung der Kohlenstoffkette wird die Affinität der Base zum Enzym erheblich gemindert, ganz besonders stark durch Substitution in unmittelbarer Nachbarschaft zur Aminogruppe, wie  $K_i \approx 200$  für Isopropylamin und tert.-Butylamin beweist.

In Tab. 1 sind auch die  $pK_B$ -Werte der Amine mitaufgeführt. Sie sollen lediglich veranschaulichen, daß im vorliegenden Fall kein Zusammenhang zwischen der absoluten Stärke der Basen und ihrer Hemmwirkung besteht; während die Basenkonstanten der einfachen primären Amine eng zusammenliegen, unterscheiden sich die Inhibitorkonstanten um mehr als zwei Zehnerpotenzen.

Die Ergebnisse der vorstehenden Tabelle lassen bereits erste Schlüsse zu. Sie beziehen sich auf die ungefähre Größe und Struktur der im folgenden heranzuziehenden Substanzen. Für sie wird das Wirkungsoptimum in Nähe des n-Butylrestes ebenso bestimmend sein, wie die Tatsache, daß Verbindungen, die in einem Bereich nahe der Aminogruppe verzweigt sind, nur geringfügig hemmen. Der Einfluß von polaren oder

<sup>6</sup> M. Dixon, Biochem. J. 55, 170 [1953].

<sup>7</sup> H. Lineweaver u. D. Burk, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 [1934].

polarisierbaren Gruppen sowie des Arylrestes läßt sich am Beispiel des Äthylamins, an den  $\omega$ -Aminosäuren und an den homologen  $\alpha$ - $\omega$ -Diamino-alkanen nachweisen.

Tab. 2. Inhibitorkonstanten von primären Aminen, u. a. von  $\omega$ -Aminosäuren und  $\alpha$ - $\omega$ -Diamino-alkanen. Hemmung der Trypsinproteolyse von  $N^\alpha$ -Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilid, Versuchsbedingungen s. Tab. 1.

Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]	Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]
Äthanolamin . . . . .	58	Äthylamin . . . . .	46
Cyclohexylamin . . . . .	4,0	Harnstoff . . . . .	$\approx 600$
2-Methyl-cyclohexylamin . . . . .	6,0	1.2-Diamino-äthan . . . . .	$\approx 75$
2-Phenyl-äthylamin . . . . .	3,7	1.3-Diamino-propan . . . . .	185
2-Phenyl-propylamin . . . . .	26,0	1.4-Diamino-butan . . . . .	64
Glycin . . . . .	$\approx 800$	1.5-Diamino-pentan . . . . .	19,5
$\beta$ -Alanin . . . . .	$\approx 300$	1.6-Diamino-hexan . . . . .	8,8
4-Amino-buttersäure . . . . .	85	1.10-Diamino-decan . . . . .	2,3
5-Amino-valeriansäure . . . . .	9,6	1.12-Diamino-dodecan . . . . .	0,90
6-Amino-capronsäure . . . . .	15,5	(Diäthylamin) . . . . .	> 500

Die ohnehin geringe Hemmwirkung des Äthylamins wird, wie aus den Inhibitorkonstanten des Äthanolamins, 1.2-Diamino-äthans und Glycins hervorgeht, durch Substituenten weiter vermindert. Verstärkend dagegen wirkt der aromatische Rest im 2-Phenyl-äthylamin; allerdings hebt der Methylrest in 2-Stellung die Verbesserung fast vollständig wieder auf (2-Phenyl-propylamin). Besonders nachhaltig wird das Verhalten des Inhibitors durch Säurefunktionen beeinflusst. Diese verlieren jedoch, wie sich an den  $\omega$ -Aminosäuren zeigt, mit zunehmender Entfernung von der Aminogruppe schnell an Effektivität (s. a. Tab. 3). Unter ihnen ist die 5-Amino-valeriansäure ein weiteres Mal am wirksamsten<sup>2</sup>. Für die ersten beiden Aminosäuren läßt sich nur eine ungefähre Inhibitor-Konstante angeben. Bei herabgesetzten Konzentrationen — für Glycin unterhalb 0,2*m*, für  $\beta$ -Alanin weniger als 0,15*m* — bewirken sie vice versa eine beträchtliche Aktivierung.

Auch die Anfangsglieder der Diamine erreichen nicht die Wirkung der entsprechenden einfachen n-Alkylamine. Erst bei den höheren Homologen werden  $K_i$ -Werte gemessen, die in der Größenordnung der aktivsten aliphatischen Basen liegen. Die relativ schwache Wirkung der mittleren Glieder fügt sich ganz in den Rahmen der zuvor erhaltenen Resultate. Aber im Gegensatz zu den n-Alkylaminen in Tab. 1 und den  $\omega$ -Aminosäuren (Tab. 2), bei denen Aktivitätsoptima durchschritten werden, hat man es bei den  $\alpha$ - $\omega$ -Diaminen offenbar mit einer Folge kontinuierlich stärker inhibierender Substanzen zu tun. Zwar erreicht erst 1.10-Diamino-decan die Wirkung des n-Pentylamins, formal also seiner Halbreste, doch im 1.12-Diamino-dodecan setzt sich die Aktivitätsreihe weiter fort. Es scheint also, daß Molekeln mit längeren Kohlenwasserstoffresten und zusätzlichen nukleophilen Gruppen bestimmte Substrate besonders leicht verdrängen können.

Nun aber haben wir schon früher gefunden<sup>1, 8</sup>, daß die 4-Aminomethyl-benzoesäure, die neuerdings als Antifibrinolytikum<sup>9</sup> benutzt wird, ebenfalls eine beträchtliche Inhibitorwirkung bei der Aktivierung bestimmter Pankreasproteasen besitzt. Später kamen Markwardt, Landmann und Hoffmann<sup>10</sup> zu dem gleichen Ergebnis, wobei sie die Versuche auf einige strukturverwandte Aminocarbonsäuren ausdehnten. Die Wirksamkeit der 4-Aminomethyl-benzoesäure war allerdings von keiner der von ihnen untersuchten aromatischen Verbindungen mehr erreicht worden.

Wie sich zeigen sollte, beschränkt sich das bemerkenswert gute Hemmvermögen der 4-Aminomethyl-benzoesäure nicht auf das Proenzym-Aktivator-System, sondern es findet im ausgeprägten direkten Hemmeffekt auf die Trypsin-Katalyse ihre nicht unerwartete Ergänzung.

Tab. 3. Inhibitorkonstanten von Derivaten des Benzylamins. Hemmung der Trypsinproteolyse von *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilid, Versuchsbedingungen s. Tab. 1.

Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]	Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]
Benzylamin . . . . .	0,31	4-Hydroxy-benzylamin . . .	0,52
4-Aminomethyl-benzoesäure .	0,29	4-Amino-benzylamin . . . .	0,65
3-Aminomethyl-benzoesäure .	1,35	4-Dimethylamino-benzylamin	7,6
2-Aminomethyl-benzoesäure .	≈ 80	4-Methyl-benzylamin . . . .	0,78

Ein Vergleich mit den in Tab. 1 und 2 aufgeführten Inhibitorkonstanten läßt erkennen, wie wirksam diese Substanz inhibiert und in welchem Maße sie sogar dem *n*-Butylamin, der bislang wirksamsten einfachen Base, überlegen ist ( $K_i = 0,29$  bzw. 1,34). Dabei erweist sich der Vorstoß in die neue Größenordnung keineswegs als ein einmaliger, durch ganz spezielle Voraussetzungen erfüllter Vorgang. Vielmehr zeigt sich, daß die Fähigkeit zur Trypsininhibierung grundsätzlich bereits dem unsubstituierten Benzylamin innewohnt, denn dessen Inhibitorkonstante ( $K_i = 0,31$ ) weicht von der seines 4-Carboxy-Homologen kaum ab.

In Übereinstimmung mit der oben als optimal festgestellten räumlichen Ausdehnung des aliphatischen Molekelteils ist der Benzylrest demnach ein besonders geeignetes Bauelement für die Synthese weiterer Hemmstoffe.

Die Carboxygruppe in *p*-Stellung ruft, wie schon erwähnt, eine geringfügige Wirkungssteigerung hervor. Durch ihre Acidität, die mit den sterischen Erfordernissen hier offenbar im Einklang steht, wird die Affinität des Benzylamins zum Wirkungszentrum des Enzyms ein

<sup>8</sup> H.-J. Trettin, Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete 19, 729 [1964].

<sup>9</sup> K. Lohmann, F. Markwardt u. H. Landmann, Naturwissenschaften 50, 502 [1963]; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 10, 424 [1964].

<sup>10</sup> F. Markwardt, H. Landmann u. A. Hoffmann, Naturwissenschaften 51, 635 [1964]; diese Z. 340, 174 [1965].

wenig erhöht. In Übereinstimmung mit dem Verhalten der  $\omega$ -Aminosäuren schwächt sich diese bei Annäherung der sauren Gruppe an den Aminomethylrest jedoch äußerst rasch ab. Benzylamin-carbonsäure-(3) besitzt nur noch etwa 20%, Benzylamin-carbonsäure-(2) weniger als 0,5% der Wirksamkeit der Benzylamin-carbonsäure-(4).

Die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse lassen erkennen, daß schon relativ kleine Veränderungen in der Struktur des Alkylrestes für das Hemmvermögen eines primären Amins folgenreicher sein können als neu eingeführte oder stellungsvariierte polare Gruppen. In welchem Umfange das auch für Benzylamin zutrifft, erweisen Untersuchungen an den isomeren Mono- und Dimethyl-benzylaminen. Sie wurden vorgenommen, nachdem einige reaktive Substituenten in *p*-Stellung nur zu schwächer wirkenden Produkten geführt hatten. Z. B. besaßen 4-Hydroxy-, 4-Amino- und 4-Dimethylamino-benzylamin jeweils nur 60, 35 und 4% der Hemmwirkung der unsubstituierten Verbindung. Der an den niederen aliphatischen Diaminen beobachtete störende Effekt einer zweiten Basenfunktion kommt hier also ebenfalls, wenn auch erheblich schwächer, zum Ausdruck. Darüber hinaus aber erweist sich die Raumerfüllung des Dimethylamino-Restes erneut als ein besonders ungünstiger Faktor.

Führt man Methylgruppen in den aromatischen Kern des Benzylamins ein, so können diese entsprechend ihrer Stellung ebenso verstärkend wie abschwächend wirken. Während das 3-Methyl-Derivat 115% der Benzylaminaktivität besitzt, verringert sich diese beim 2-Methyl-benzylamin auf 57% und im Falle des 4-Methyl-Isomeren auf 40%. Der Vergleich untereinander (Tab. 4) ergibt zufällig ein recht genaues Wirkungsverhältnis von 1:2:3.

Tab. 4. Inhibitorkonstanten der Mono- und Dimethyl-benzylamine. Hemmung der Trypsinproteolyse von  $N^{\alpha}$ -Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilid. Versuchsbedingungen s. Tab. 1.

Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]	Inhibitor	$K_i$ [mMol/l]
Benzylamin . . . . .	0,31	2.4-Dimethyl-benzylamin .	1,47
2-Methyl-benzylamin . . .	0,55	2.5-Dimethyl-benzylamin .	0,79
3-Methyl-benzylamin . . .	0,27	2.6-Dimethyl-benzylamin .	20,0
4-Methyl-benzylamin . . .	0,78	3.4-Dimethyl-benzylamin .	1,34
2.3-Dimethyl-benzylamin .	0,50	3.5-Dimethyl-benzylamin .	0,15

Da die *p*-Methylgruppe eine Verlängerung des Benzylrestes bedeutet, kommt diese Wirkminderung nicht unerwartet. Ebenso ist eine Störung durch *o*-Substituenten grundsätzlich vorherzusehen. Dagegen scheint sich die Benzylaminmolekel durch ein *m*-ständiges Methyl räumlich noch besser dem aktiven Enzymbezirk anzupassen; denn eine Aktivierung über die Basenfunktion kommt nicht in Betracht.

Weiteren Aufschluß über das Problem der sterischen Hinderung bei unzulänglicher Trypsinhemmung geben die sechs isomeren Dimethylbenzylamine.

Auf Grund der bisherigen Beobachtungen war damit zu rechnen, daß die symmetrischen *o*-(2.6-) und *m*-(3.5-)Dimethylverbindungen Extremfälle dieser Meßreihe darstellen würden. In der Tat unterscheiden sich ihre Inhibitor konstanten um über zwei Zehnerpotenzen.

Von allen getesteten Basen wird nunmehr das 3.5-Dimethylbenzylamin ( $K_i = 0,15$ ) seiner Verdrängungsfunktion am vollkommensten gerecht. Es hemmt Trypsin etwa doppelt so stark wie Benzylamin oder 4-Aminomethylbenzoesäure und ist damit erstmals auch aktiver als *n*-Propylguanidin ( $K_i = 0,21$ ), das nach früheren Untersuchungen<sup>1</sup> die Profermentaktivierung ungewöhnlich kräftig inhibiert hatte. Vor allem aber übertrifft es die Wirkung des 2.6-Dimethylbenzylamins ( $K_i = 20,0$ ) um mehr als das Hundertfache. Hier zeigt sich mit besonderer Klarheit, wie empfindlich das untersuchte Enzym auf scheinbar geringfügige Strukturänderungen antagonistischer Verbindungen reagiert. Im zuletzt genannten Beispiel kann der notwendige unmittelbare Kontakt zwischen der Aminogruppe und der aktiven Stelle des Enzyms wegen der sperrigen Substituenten zweifellos nicht zustande kommen.

Bei allen übrigen Dimethylbenzylaminen müssen naturgemäß derart eindeutige Effekte ausbleiben, da eine der Nachbarstellungen zur basischen Gruppe stets unbesetzt ist. Die weiteren Konstanten werden demzufolge in erster Linie von der am wenigsten günstig angeordneten Methylgruppe geprägt. Dabei sind, wie Tab. 4 zeigt, auch hier durchaus Gesetzmäßigkeiten zu erkennen, wie etwa die gegenüber der 4-Methylsubstitution herabgesetzte Störung für entsprechende 2-Methylgruppierungen oder die jeweils bessere Wirkung bei Vorhandensein des *m*-Substituenten. Zweifellos eröffnen sich auf dieser Grundlage Möglichkeiten, die Reihe von zunehmend stärker wirkenden Trypsininhibitoren systematisch weiter zu verlängern.

Herrn Professor Dr. W. Langenbeck danken wir für das freundliche Interesse an dieser Arbeit.

Frau Ilse Trettin, Frau Johanna Feddern, Fräulein Uta Wroost und Fräulein Brigitte Kropp danken wir für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit.

### Zusammenfassung

Die Hemmung der tryptischen Spaltung von  $N^\alpha$ -Benzoyl-arginin-*p*-nitroanilid durch primäre Amine und Aminosäuren wurde untersucht. In allen Fällen wurden die Inhibitor konstanten bestimmt, und zwar nach der graphischen Methode von Dixon<sup>6</sup>; zugleich konnte damit der kompetitive Hemmungstyp für alle Inhibitoren nachgewiesen werden.

Auf Grund von systematischen Veränderungen an Alkyl- und Arylalkylaminen wurden Gesetzmäßigkeiten zwischen Konstitution und Hemmwirkung der untersuchten Verbindungen erkennbar. Diese führten schließlich zur Synthese von 3.5-Dimethylbenzylamin, dem

gegenwärtig stärksten Inhibitor dieser Untersuchungsreihe. Wie die Konstante  $K_i = 0,15 \text{ mMol/l}$  deutlich macht, hemmt dieses Amin noch wirksamer als Propylguanidin<sup>1</sup> und ist etwa doppelt so stark wie das Antifibrinolytikum 4-Aminomethyl-benzoessäure.

### Summary

The inhibition of the tryptic hydrolysis of  $N^\alpha$ -benzoyl-arginine-*p*-nitroamide by primary amines and amino acids was investigated. In every case, the inhibitor constant was determined by the method of Dixon<sup>6</sup>; the inhibition was found to be competitive for all the inhibitors.

Relationships between the structure of the inhibitor and its inhibitory action were shown by the systematic alteration of the alkyl and arylalkyl amines. This led finally to the synthesis of 3,5-dimethylbenzylamine, at present the most powerful inhibitor found in this series of experiments. It is clear from the constant  $K_i = 0.15 \text{ mM}$  that this amine inhibits more strongly than propylguanidine<sup>1</sup> and is about twice as active as the antifibrinolytic 4-aminomethyl-benzoic acid<sup>8</sup>.

*Dr. habil. H. Mix, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für organische Katalyseforschung, Rostock, Buchbinderstraße 5/6.*

---