

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 147495 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4208/79

(51) Int.Cl.³: C 07 C 103/52
C 12 Q 1/34

(22) Indleveringsdag: 05 okt 1979

(24) Løbedag: 06 feb 1979

(41) Alm. tilgængelig: 05 okt 1979

(44) Fremlagt: 03 sep 1984

(86) International ansøgning nr.: PCT/SE79/00024

(86) International indleveringsdag: 06 feb 1979

(85) Videreførelsesdag: 05 okt 1979

(30) Prioritet: 07 feb 1978 SE 7801373

(71) Ansøger: *KABI AB; 112 87 Stockholm, SE.

(72) Opfinder: Karl Goeran *Claeson; SE, Leif Erik *Aurell; SE, Leif Roger *Simonsson; SE, Salo *Arielly; SE.

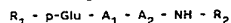
(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Tripeptider til anvendelse som enzymsubstrat til kvantitativ bestemmelse af proteaser og fremgangsmåde til laboratoriediagnosticering af proteaser

(57) Sammendrag:

4208-79

Letspaltelige enzymsubstrater til kvantitativ bestemmelse af proteaser, hvilke substrater har den generelle formel



hvor

R_1 = H eller en beskyttende gruppe, fortrinsvis t-butyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl;

A_1 = Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Pro, Pip, Phe eller Tyr;

A_2 = Arg eller Lys;

R_2 = en aromatisk, eventuelt substitueret, carbonhydridgruppe, hvor -NH-R_2 er en fysisk-kemisk bestemt gruppe, fortrinsvis en chromogen- eller fluorogen gruppe, som fraspaltes af et tilstedeværende enzym og derefter danner et spaltningsprodukt med formlen $\text{H}_2\text{N} - R_2$, hvor mængden heraf kan kvantiteres.

Fremgangsmåde til fremstilling af substraterne. Fremgangsmåde ved laboratoriediagnosticering af proteaser, hvor disse substrater anvendes.

DK 147495 B

Teknisk område

Opfindelsen angår nye tripeptider til anvendelse som enzymsubstrat til kvantitativ bestemmelse af proteaser. De nye tripeptider er særligt egnede til bestemmelse af serinproteaser og SH-proteaser eller til studium af reaktioner, hvor der dannes, inhiberes eller forbruges serinproteaser, eller til bestemmelse af faktorer, der influerer på eller deltager i sådanne reaktioner.

Teknik, hvorpå opfindelsen bygger

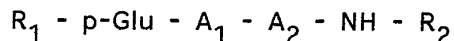
Der er fornylig blevet beskrevet et antal af syntetiske peptidsubstrater. Hovedparten af disse har en tripeptidkæde, hvor aminogruppen i den N-terminale aminosyre enten blokeres med en acylgruppe eller er fri men da har D-konfiguration. Den C-terminale aminosyre blokeres med en chromogen gruppe eller en fluorogen gruppe, som fraspaltes i enzymreaktionen med substratet. Den således dannede, frigjorte chromofore gruppe eller fluorescerende gruppe kan bestemmes kvantitativt ved fotometriske eller fluorescens-fotometriske metoder. Den enzymatiske aktivitet kan beregnes ved måling af mængden af spaltningsprodukt, der frigøres pr. tidsenhed.

Fra svensk fremlæggeskrift nr. 407.058 og nr. 407.571 samt fra tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.527.932 og fra Journal of Biochemistry, 82, 1495-1498 (1977) kendes chromogene tripeptider til bestemmelse af serinproteaser.

Formålet med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe nye peptidsubstrater, der hydrolyseres hurtigere end de kendte peptidsubstrater.

Forklaring af opfindelsen

Dette formål opnås med tripeptiderne ifølge den foreliggende opfindelse, hvilke tripeptider er ejendommelige ved, at de har den almene formel:



hvor

R_1 betegner hydrogen eller en benzyloxycarbonylgruppe,
 A_1 betegner Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Pro, Pip, Phe eller Tyr,

- A₂ betegner Arg eller Lys,
 R₂ betegner p-nitrophenyl, β-naphyl, 4-methoxy-β-naphthyl eller 4-methylcoumarin-7-yl.

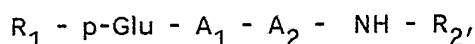
Opfindelsen bygger på den erkendelse, at substrater med en N-terminal pyroglutaminsyregruppe meget nemt spaltes af en del serinproteaser. Pyroglutaminsyre, som har en α-aminogruppe, der ikke er fri, men acyleret ved ringslutning, dvs. er en lactam af glutaminsyre, er ikke tidligere blevet anvendt i peptider, der er beregnet til brug som substrat ved enzymbestemmelser.

Ved syntesen af de nye substrater ifølge den foreliggende opfindelse kan traditionelle beskyttende grupper og koblingsmetoder, der er velkendte i peptidkemi, bruges.

Synteseprincippet kan være en trinvis kobling af aminosyrerne til den C-terminale arginyl- eller lysylrest, der i begyndelsen enten er udstyret med en påkoblet bestemmelig gruppe (-R₂ ifølge formlen), som tjener som en carboxylsyre-beskyttende gruppe, eller er udstyret med en carboxylsyre-beskyttende gruppe, som kan fjernes, og i dette tilfælde kobles den bestemmelige gruppe til det beskyttede tripeptid-derivat, eller den N-terminal-beskyttede dipeptidfraktion kan syntetiseres separat og derefter kobles til arginyl- eller lysylresten, med eller uden bestemmelig gruppe, ifølge det foregående.

Hvilken af disse synteseveje, der end vælges, renses mellem- og slutprodukterne ved omkrystallisering og/eller gelfiltreringskromatografi.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til laboratoriediagnosticering af proteaser, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der som substrat bruges et tripeptid med den almene formel:



hvor

R₁ betegner hydrogen eller en benzyloxycarbonyl-gruppe;

A₁ betegner Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Pro, Pip, Phe eller Tyr;

A₂ betegner Arg eller Lys;

R₂ betegner pNA, β-NA, 4-MeO-β-NA eller 7-A-4-M-C.

Opfindelsen illustreres ved de efterfølgende eksempler.

I tyndtlagskromatografianalysen af eluaterne og produktet bruges glasplader med silicagel F₂₅₄ (Merck) som et absorptionsmedium. De anvendte solventsystemer er:

- 5 A: n-butanol:HOAc:vand, 3:2:1 (volumen)
 P₁: chloroform:MeOH 9:1 (volumen)

10 Efter tyndtlagskromatografi studeres pladerne først i UV-lys (254 nm), og derefter sprøjtes de med ninhydrin og behandles dernæst med dicarboxidin/chlor. De angivne R_f-værdier er resultaterne af enkelte chromatografer.

Forkortelserne, der bruges nedenfor, er som følger:

15 Forkortelserne refererer til aminosyrerester. Den frie aminosyre eller det frie peptid angives med et H- ved aminogruppen og et -OH ved carboxylgruppen. Aminogruppen angives altid til venstre og carboxylgruppen til højre.

Med mindre andet er anført har aminosyrerne med undtagelse af Gly L-konfigurationen.

20	Ala	=	Alanin	Phe	=	Phenylalanin
	Arg	=	Arginin	Pip	=	Pipecolinsyre
	Gly	=	Glycin	Pro	=	Prolin
	Ile	=	Isoleucin	Ser	=	Serin
	Leu	=	Leucin	Thr	=	Threonin
	Lys	=	Lysin	Tyr	=	Tyrosin
25	p-Glu	=	pyroglutaminsyre	Val	=	Valin

Yderligere forkortelser:

30	HOAc	=	Eddikesyre
	Bzl	=	Benzylgruppe
	Bz	=	Benzoylgruppe
	OBzl	=	Benzyloxygruppe
	Cbo	=	Carbobenzoxymgruppe
	BOC	=	tert-butoxycarbonylgruppe
35	DCCI	=	Dicyclohexylcarbodiimid
	PCl ₃	=	Phosphortrichlorid
	DMF	=	Dimethylformamid
	Et ₃ N	=	Triethylamin
	HOBT	=	Hydroxybenzotriazol

DCHA	=	Dicyclohexylamin
DCU	=	Dicyclohexylurinstof
EtOH	=	Ethanol
MeOH	=	Methanol
EtOAc	=	Ethylacetat
OpNP	=	p-nitrophenoxy
pNA	=	p-Nitroanilino
TFA	=	Trifluoreddikesyre
β -NA	=	β -Naphthylamino
4-MeO- β -NA	=	4-Methoxy- β -naphthylamino
7-A-4-M-C	=	4-methylcoumarin-7-amino
TLC	=	Tyndtlagskromatografi.

Eksempel I:

p-Glu-Gly-Arg-pNA . HCl (molekylvægt = 498,9)

Ia Cbo-Gly-Arg(NO₂)-pNA (molekylvægt = 530,5)

175 ml koncentreret HOAc og 105 ml 5,6 M HBr i HOAc tilsættes til 35 g (0,074 mol) Cbo-Arg(NO₂)-pNA. Blandingen får lov til at reagere og omrøres i 30 minutter, efter at reaktionsopløsningen er klaret op. Blandingen hældes derefter over i ca. 2 l tørt ether, medens der røres kraftigt. Den resulterende udfældning filtreres, vaskes med tørt ether og vakuumtørres derefter over NaOH. Det opnåede HBr-salt af H-Arg(NO₂)-pNA opløses i 150 ml tørt, destilleret DMF og neutraliseres ved en lav temperatur (-10°C) med Et₃N, indtil en svag basisk reaktion opnås på et befugtet pH-papir, der holdes over reaktionsblandingen. (Sædvanligvis neutraliseres ca. 1,5 ækvivalenter af HBr.) Det resulterende Et₃NHBr filtreres fra. Under kølige omstændigheder tilsættes 1,1 ækvivalent = 0,81 mol = 26,8 g Cbo-Gly-OpNP til reaktionsblandingen; efter 30 minutter tilsættes yderligere 1/2 ækvivalent = 5,2 ml Et₃N. Blandingen får lov til at reagere natten over ved stuetemperatur og indampes derefter in vacuo under opnåelse af en olie. Olien tritureres i en vandig opløsning af 2% NaHCO₃ og opløses derefter i varmt MeOH og omkrystalliseres, medens det omrøres og afkøles. De resulterende krystaller filtreres fra og vaskes med koldt MeOH. TLC viser kun mindre forureninger, og produktet omkrystalliseres derfor i det samme solvent. Dette resulterer i hvide krystaller, der er rene ifølge TLC.

Udbytte: 34 g (86%) af Ia.

$R_f = 0,20$ (P_1)

$[\alpha]_D^{23} - 35,4^\circ$ (c 0,3 MeOH)

- 5 Ib' Cbo-p-Glu-OH (molekylvægt = 263,3)
 56,3 g (0,20 mol) Cbo-Glu-OH opløses i 400 ml EtOAc, og 49,4 g (0,24 mol) af DCCI opløst i 60 ml EtOAc tilsættes og omrøres i et isbad. Efter to timer filtreres det resulterende DCU, og den tilbageværende opløsning indampes til tørhed. Produktet (anhydrid af
 10 Cbo-Glu-OH) omkrystalliseres fra EtOAc og petroleumether. Anhydridet opløses i 120 ml dioxan plus 260 ml ether, og derefter tilsættes 48 ml af DCHA opløst i ether til et volumen på 100 ml. Efter et stykke tid bundfælder Cbo-p-Glu·DCHA. Det omrøres i ca. 1 time, og derefter filtreres det dannede DCHA-salt fra og vaskes med ether og
 15 EtOAc. DCHA-saltet suspenderes i EtOAc og rystes med 25 g (0,18 mol) KHSO_4 opløst i vand, og det således dannede Cbo-p-Glu-OH går derefter over i EtOAc-fasen. EtOAc-fasen vaskes med 10% NaCl i H_2O og tørres over Na_2SO_4 (der er en risiko for, at produktet bundfælder). EtOAc-fasen indampes til et lille volumen og bundfældes med
 20 petroleumether; dette resulterer i tunge krystaller af Ib', som er rene ifølge TLC.

Udbytte: 36,9 g (80%) af Ib'.

$R_f = 0,45$ (A)

- 25 $[\alpha]_D^{24} - 30,3^\circ$ (c 1,0 MeOH)

- Ib Cbo-p-Glu-Gly-Arg(NO_2)-pNA (molekylvægt = 641,6)
 10,25 g (18,3 mmol) H-Gly-Arg(NO_2)-pNA·HBr, opnået ved at fjerne beskyttelsen fra Cbo-Gly-Arg(NO_2)-pNA med HBr ifølge fremgangsmåden beskrevet i Ia, opløses i 35 ml tørt DMF og neutraliseres ved en
 30 lav temperatur (-10°C) med Et_3N , indtil en basisk reaktion opnås på befugtet pH-papir. Det resulterende $\text{Et}_3\text{N}^+\text{HBr}^-$ filtreres fra. 2,47 g (18,3 mmol) HOBT og 5,26 g (20 mmol) Cbo-p-Glu-OH (Ib') tilsættes til reaktionsblandingen, og derefter tilsættes ved en lav temperatur
 35 4,53 g (22 mmol) DCCI opløst i en lille mængde DMF. Blandingen får lov til at reagere natten over ved stuetemperatur; dernæst indampes reaktionsopløsningen til en olie. Olien tritureres med 2% NaHCO_3 i vand og med rent vand. Den opnåede faste forbindelse opløses i en lille mængde acetone, og derefter tilsættes varmt MeOH og en lille

mængde vand. Produktet omkrystalliseres, medens det afkøles og omrøres, og de resulterende krystaller filtreres fra. Det opnåede lb er rent ifølge TLC. Efter omhyggelig vakuumtørring opnås 8,90 g (76%) af lb.

5

$R_f = 0,06$ (P_1).
 $[\alpha]_D^{21} = -21,5^0$ (c 0,8 DMF)

1. Med 30 ml HF fjernes beskyttelsen fra 0,8 g (1,25 mmol) lb ved 0°C 1 time i nærværelse af 0,6 ml anisol. Efter inddampning in vacuo opløses produktet i ca. 30 ml 2% HOAc og vaskes med en lille mængde ether. H₂O-fasen kromatograferes på en kolonne med Sephadex G-15 (Pharmacia Fine Chemicals) i 2% HOAc med samme medium til eluering. Fraktionen med det rene acetat af I frysetørres og ionbyttes på en søjle med QAE-25 (Pharmacia Fine Chemicals) i chloridform med EtOH-H₂O (1:1) med samme medium til eluering.

15

Fraktionen med det rene hydrochlorid af I frysetørres.

Udbytte: 485 mg (78%) af I.

20 TLC [$R_f = 0,29$ (A)] viser kun én plet
 $[\alpha]_D^{24} = -54,1^0$ (c 1,0, 50% HOAc/H₂O)

Eksemplerne II-XIII som beskrevet i tabel 1 udføres i princippet på samme måde som de foregående eksempler; kun de fysiske data, udbytter såvel som koblings- og rensningsmetoder er derfor opført i denne tabelform.

25

Eksempel XIV:

p-Glu-Gly-Arg-4-MeO-β-NA . HCl (molekylvægt = 534,0)
 30 XIVa p-Glu-Gly-Arg-OH . HCl (molekylvægt = 378,8)

Trypsin (Novo, 400 µl af en opløsning af 2,0 mg trypsin pr. ml 1 mM HCl) tilsættes til en opløsning af 250 mg (0,50 mmol) p-Glu-Gly-Arg-pNA . HCl (S-2444) i 100 ml 0,1 M NaHCO₃ i H₂O. Friggørelsen af p-nitroanilin følges i et spektrofotometer ved 405 nm. Friggørelsen afsluttes efter ca. 45 minutter, og opløsningen gøres herefter sur med HOAc til en pH-værdi på ca. 4. Den inddampes derefter til tørhed, opløses i MeOH og chromatograferes på en søjle med LH-20 (Pharmacia

35

Fine Chemicals) i MeOH med det samme medium til eluering. Fraktionen med det rene sure XIVa indampes, opløses i H₂O og frysetørres.

Udbytte: 167 mg (88%) XIVa, som er rent ifølge TLC.

5 $R_f = 0,08$ (A).

XIV:

En opløsning af 27 µl (0,25 mmol) PCl₃ i 450 µl tørt pyridin tilsættes under fugtfrie betingelser og i et isbad til en opløsning af 105 mg
10 (0,50 mmol) 4-methoxy-β-naphthylamin·HCl i 2,25 ml tørt pyridin. Efter henstand i ca. 45 minutter ved stuetemperatur tilsættes alt det XIVa, der er fremstillet ifølge det foregående. Når reaktionen ophører (efter ca. 1 time) indampes reaktionsblandingen til en mørkerød olie (reduceret tryk). Olien opløses i en lille mængde EtOH-H₂O (1:1) og
15 påføres en kolonne med QAE-25 (Pharmacia Fine Chemicals) i chloridform i EtOH-H₂O (1:1) med det samme medium til eluering. Fraktionen med det næsten rene hydrochlorid af XIV indampes, opløses igen i en lille mængde EtOH-H₂O (1:1), og fremgangsmåden gentages. Det således opnåede hydrochlorid af XIV er rent, og det frysetørres,
20 efter at al alkohol er blevet afdampet.

Udbytte: 85 mg (36%) XIV.

TLC ($R_f = 0,24$ mg (A) viser kun én plet.

$[\alpha]_D^{22} - 45,7^\circ$ (c 0,6, 50% HOAc/H₂O)

25

Eksempel XV:

p-Glu-Gly-Arg-7-A-4-M-C

(molekylvægt = 536,0)

30

Fremgangsmåde analog til eksempel XIV men med 88 mg (0,50 mmol) 7-amino-4-methylcoumarin som amin i stedet for 4-methoxy-β-naphthylamin·HCl.

Udbytte: 84 mg (32%) XV.

TLC [$R_f = 0,25$ (A)] viser kun én plet.

35

$[\alpha]_D^{25} - 51,5^\circ$ (c 1, 50% HOAc/H₂O).

Eksemplerne XVI-XVIII

Udføres i princippet på samme måde som eksempel I; derfor er kun de fysiske data, udbytter såvel som koblings- og rensningsmetoder opført i tabel 1 og tabel 1A.

T A B E L I

Substans	Nr.	R _f (System)	[α]	Solvent	Udbytte %
p-Glu-Gly-Arg-pNA	I	0,29 A	-54,1	50% HOAc	78
Cbo-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	Ia	0,20 P ₁	-35,4	MeOH	86
Cbo-p-Glu-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	Ib	0,06 P ₁	-21,5	DMF	76
p-Glu-Ser-Arg-pNA	II	0,29 A	-58,2	50% HOAc	81
Boc-Ser(OBzl)-Arg(NO ₂)-pNA	IIa	0,19 P ₁	-24,9	95% EtOH	84
Cbo-p-Glu-Ser(OBzl)-Arg(NO ₂)-pNA	IIb	0,15 P ₁	-18,5	DMF	53
p-Glu-Thr-Arg-pNA	III	0,32 A	-55,7	50% HOAc	72
Boc-Thr(OBzl)-Arg(NO ₂)-pNA	IIIa	0,18 P ₁	-25,4	95% EtOH	85
Cbo-p-Glu-Thr(OBzl)-Arg(NO ₂)-pNA	IIIb	0,16 P ₁	-25,2	DMF	65
p-Glu-Val-Arg-pNA	IV	0,33 A	-66,5	50% HOAc	56
Cbo-Val-Arg(NO ₂)-pNA	IVa	0,38 P ₁	+ 5,4	DMF	86
Cbo-p-Glu-Val-Arg(NO ₂)-pNA	IVb	0,08 P ₁	-21,5	DMF	38
p-Glu-Ala-Arg-pNA	V	0,25 A	- 0,68	50% HOAc	58
Cbo-Ala-Arg(NO ₂)-pNA	Va	0,25 P ₁	+ 2,4	DMF	85
Cbo-p-Glu-Ala-Arg(NO ₂)-pNA	Vb	0,05 P ₁	-30,9	DMF	48

T A B E L I (fortsat)

Substans	Nr.	R _f (System)	[α]	Solvent	Udbytte %
p-Glu-Pro-Arg-pNA	VI	0,38 A	-95,6	MeOH	73
Cbo-Pro-Arg(NO ₂)-pNA	VIa	0,45 P ₁	-33,0	DMF	82
Cbo-p-Glu-Pro-Arg(NO ₂)-pNA	VIb	0,69 A	-66,3	DMF	63
p-Glu-Phe-Arg-pNA	VII	0,36 A	-22,8	50% HOAc	66
Cbo-Phe-Arg(NO ₂)-pNA	VIIa	0,29 P ₁	+ 5,5	DMF	94
Cbo-p-Glu-Phe-Arg(NO ₂)-pNA	VIIb	0,03 P ₁	- 7,4	DMF	55
D-p-Glu-Gly-Arg-pNA	VIII	0,27 A	-41,8	50% HOAc	53
Cbo-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	VIIIa	0,20 P ₁	-35,4	MeOH	86
Cbo-D-p-Glu-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	VIIIb	0,06 P ₁	- 5,7	DMF	72
D-p-Glu-Pro-Arg-pNA	IX	0,35 A	-99,0	50% HOAc	56
Cbo-Pro-Arg(NO ₂)-pNA	IXa	0,45 P ₁	-33,0	DMF	82
Cbo-D-p-Glu-Pro-Arg(NO ₂)-pNA	IXb	0,10 P ₁	-37,7	DMF	66
p-Glu-Phe-Lys-pNA	X	0,33 A	-28,7	50% HOAc	69
Boc-Phe-Lys(ε-Cbo)-pNA	Xa	0,55 P ₁	+ 3,4	DMF	77
Cbo-p-Glu-Phe-Lys(ε-Cbo)-pNA	Xb	0,40 P ₁	- 8,8	DMF	76

T A B E L I (fortsat)

Substans	Nr.	R _f (System)	[α]	Solvent	Udbytte %
p-Glu-Leu-Lys-pNA	XI	0,31 A	-61,7	50% HOAc	85
Boc-Leu-Lys(ε-Cbo)-pNA	XIa	0,49 P ₁	- 4,5	DMF	85
Cbo-p-Glu-Leu-Lys(ε-Cbo)-pNA	XIb	0,48 P ₁	-27,2	DMF	57
Cbo-p-Glu-Gly-Arg-pNA	XII	0,32 A	-45,7	50% HOAc	52
H-Gly-Arg-pNA	XIIa	0,22 A	-----	-----	~ 100
p-Glu-Pro-Arg-β-NA	XIII	0,24 A	-106	MeOH	57
Cbo-Pro-Arg(NO ₂)-β-NA	XIIIa	0,52 P ₁	-44,9	DMF	82
Cbo-p-Glu-Pro-Arg(NO ₂)-β-NA	XIIIb	0,36 P ₁	-46,5	DMF	54
p-Glu-Gly-Arg-4-MeO-β-NA	XIV	0,24 A	-45,7	50% HOAc	36
p-Glu-Gly-Arg-OH	XIVa	0,08 A	-----	-----	88
p-Glu-Gly-Arg-7-A-4-M-C	XV	0,25 A	-51,5	50% HOAc	32
p-Glu-Ile-Lys-pNA	XVI	0,30 A	-69,7	50% HOAc	78
Boc-Ile-Lys(ε-Cbo)-pNA	XVIa	0,52 P ₁	- 3,0	DMF	80
Cbo-p-Glu-Ile-Lys(ε-Cbo)-pNA	XVIb	0,48 P ₁	-25,4	DMF	72
p-Glu-Pip-Arg-pNA	XVII	0,36 A	-107	50% HOAc	59
Cbo-Pip-Arg(NO ₂)-pNA	XVIIa	0,50 P ₁	-26,2	DMF	73
Cbo-p-Glu-Pip-Arg(NO ₂)-pNA	XVIIb	0,10 P ₁	-45,0	DMF	68

T A B E L I (fortsat)

Substans	Nr.	R _f (System)	[α]	Solvent	Udbytte %
p-Glu-Tyr-Arg-pNA	XVIII	0,40 A	-30,2	50% HOAc	60
Cbo-Tyr(Bzl)-Arg(NO ₂)-pNA	XVIIIa	0,48 P ₁	+12,8	DMF	95
Cbo-p-Glu-Tyr-Arg(NO ₂)-pNA	XVIIIb	0,08 P ₁	- 4,1	DMF	85

T A B E L I AMetode til kobling, rensning o.s.v., i de forudgående eksempler5 Substans nr.

	I	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	Ia	p-nitrophenol, kryst. MeOH
	Ib	HOBT, DCCI, kryst. MeOH
10	II	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	IIa	HOBT, DCCI, kryst. ether
	IIb	HOBT, DCCI, kryst. EtOH + H ₂ O
15	III	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	IIIa	HOBT, DCCI, kryst. EtOAc
	IIIb	HOBT, DCCI, kryst. EtOAc + petr. ether
20	IV	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	IVa	p-nitrophenol, kryst. DMF, MeOH + ether
	IVb	HOBT, DCCI, kryst. EtOH + H ₂ O
	V	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	Va	p-nitrophenol, kryst. DMF, MeOH + ether
	Vb	HOBT, DCCI, kryst. acetone + MeOH
25	VI	HF, anisol, QAE-25 95% MeOH
	VIa	p-nitrophenol, kryst. EtOAc + ether
	VIIb	HOBT, DCCI, kryst. DMF + EtOAc
30	VII	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	VIIa	p-nitrophenol, kryst. MeOH + H ₂ O
	VIIb	HOBT, DCCI, kryst. acetone + MeOH + H ₂ O

(fortsættes)

T A B E L I A (fortsat)

5	VIII	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	VIIIa	p-nitrophenol, kryst. MeOH
	VIIIb	HOBT, DCCI, kryst. MeOH + H ₂ O
10	IX	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	IXa	p-nitrophenol, kryst. EtOAc + ether
	IXb	HOBT, DCCI, kryst. MeOH + H ₂ O
15	X	HBr/HOAc, QAE 25 50% EtOH
	Xa	p-nitrophenol, kryst. MeOH + H ₂ O
	Xb	HOBT, DCCI, kryst. MeOH + H ₂ O
20	XI	HBr/HOAc, QAE-25 50% EtOH
	XIa	p-nitrophenol, kryst. MeOH + H ₂ O
	XIb	HOBT, DCCI, kryst. acetone + MeOH
25	XII	HOBT, DCCI, kryst. 50% EtOH
	XIIa	HF, anisol, G-15 2% HOAc
	XIII	HF, anisol, G-15 10% HOAc
30	XIIIa	p-nitrophenol, kryst. EtOAc + EtOEt
	XIIIb	HOBT, DCCI, kryst. CHCl ₃
35	XIV	4-methoxy-β-naphthylamin + PCI ₃ (pyridin) + syre
	XIVa	ifølge pNA-derivat + trypsin
	XV	7-amino-4-methylcoumarin + PCI ₃ (pyridin) + syre
30	XVI	HBr/HOAc, QAE-25 50% EtOH
	XVIa	p-nitrophenol, kryst.fra MeOH + H ₂ O
	XVIb	HOBT, DCCI, kryst.fra acetone + MeOH
35	XVII	HF/anisol, QAE-25 95% MeOH
	XVIIa	p-nitrophenol, kryst.fra EtOAc + ether
	XVIIb	HOBT, DCCI, kryst.fra DMF + EtOAc
35	XVIII	HF/anisol, QAE-25 50% EtOH
	XVIIIa	p-nitrophenol, kryst.fra MeOH + H ₂ O
	XVIIIb	p-nitrophenol, kryst.fra EtOH + H ₂ O

Bestemmelse af proteaser ved hjælp af substrater med en fjernelig og fysisk-kemisk bestemmelig gruppe

5 Substraterne, der er fremstillet ifølge eksemplerne, bruges til bestemmelse af forskellige enzymer på følgende måde.

Bestemmelsesprincippet er baseret på det faktum, at spaltnings-substratet, der er opnået ved enzymatisk hydrolyse, udviser et UV-spektrum, der er væsentligt forskelligt fra substratets spektrum. Således har f.eks. alle p-nitroanilidsubstrater ifølge opfindelsen deres
10 absorptionsmaxima ved 310 nm med en molær ekstinktionskoefficient på ca. 12000. Ved 405 nm er disse substraters absorption næsten ophørt. p-Nitroanilin, som frigøres fra substraterne i den enzymatiske hydrolyse, har dets absorptionsmaximum ved 380 nm med en molær ekstinktionskoefficient på 13200, som ved 405 nm kun er formindsket til 9620.
15 Ved at måle spektrofotometrisk ved 405 nm er det derfor let at følge mængden af dannet p-nitroanilin, der er proportional med den enzymatiske hydrolysehastighed, som igen er et mål for den aktive enzymmængde.

For at beregne mængden af dannet fluorescerende amin bestråles prøverne i et fluorescensfotometer med et lys, der har en excitation-
20 bølgelængde (ca. 350 nm for β -naphthylamin og 4-methoxy- β -naphthylamin og 380 nm for 7-amino-4-methyl-coumarin), og mængden af fraspaltningsprodukt fastslås derefter ved at måle det udsendte lys (ca. 420 nm for β -naphthylamin og 4-methoxy- β -naphthylamin, og 440 nm
25 for 7-amino-4-methyl-coumarin).

Tabel II og III viser de syntetiske substraters reaktionshastigheder med forskellige enzymer. Reaktionshastigheden relateres til et referencesubstrat (reaktionshastighed = 100) for hvert enzym. Nogle af referencesubstraterne kendes allerede og er tilgængelige på marke-
30 det.

T A B E L IIRelative reaktionshastigheder

5	Enzym					
		Pli	Try	FXa	UK	TA
	Substrat					
10	Reference Substrat (=100)	S-2251	S-2160	S-2222	I	I
	I	10	330	7	100	100
	II	100	360	5	65	130
	V	140	370	2	65	150
	VI	310	250	15	50	170
15	VII	440	240	10	8	40
	X	450	40	0	0	10
	XI	230	60	0	0	10
	XII	15	340	260	15	120

20

S-2251 = H-D-Val-Leu-Lys-pNA, S-2160 = Bz-Phe-Val-Arg-pNA,
S-2222 = Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (alle Kabi Diagnostica, Stockholm, Sverige).

Pli = Plasmin, Try = Trypsin, FXa = Koagulationsfaktor Xa,

25 UK = Urokinase, TA = Plasminogen vævsaktivator.

Referencesubstraternes følsomhed overfor det pågældende enzym:

30			Aktivitet ($\Delta OD/min$) opnået med $4 \cdot 10^{-9}$ mol/l enzym
	Enzym	Substrat	
35	Plasmin	S-2251	0,040
	Trypsin	S-2160	0,150
	FXa	S-2222	0,200
	Urokinase	I	0,040
	Vævsaktivator	I	0,040

(OD = optisk densitet)

T A B E L III

Sammenlignende reaktionshastigheder med forskellige proteaser

	Plasmin ^{a)}	FXa ^{b)}	FXa ^{c)}	FXa ^{d)}	UK ^{b)}	UK ^{c)}	UK ^{e)}
Pro-Phe-Arg ¹⁾	50						
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg		2,4		50			
Boc-Ser(OBzl)-Gly-Arg		3,0		60			
Boc-Leu-Gly-Arg ²⁾		1,7	35	35			
Glutaryl-Gly-Arg					6,2		45
Gly-Gly-Arg ³⁾					5,5	40	40
Eks. I						100	100
Eks. XII			260	260			
Eks. VII	440						
Eks. X	450						
S-2251	100						
S-2222			100	100			

1) J. Biochem. 82, 1495-1498 (1977); bedste plasminsubstrat testet som pNA-derivat.

2), 3) Substrat fra ovennævnte J.B. artikel testet som pNA-derivat.

a), c) Yderligere forsøgsresultater henholdsvis resultater fra tabel II.

b) Værdier fra J.B.-artiklen

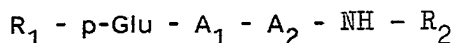
d) Forsøgsresultater omregnet på samme grundlag (S-2222)

e) Forsøgsresultater omregnet på samme grundlag (eks. I = S-2444)

Nytten af de nye substrater ifølge opfindelsen og det faktum, at de hydrolyseres hurtigere af nogle enzymer end de hidtil tilgængelige substrater, er indlysende fra disse tabeller II og III.

P a t e n t k r a v

1. Tripeptider til anvendelse som enzymsubstrat til kvantitativ bestemmelse af proteaser, k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel



hvor

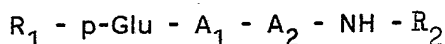
R_1 betegner hydrogen eller en benzyloxycarbonylgruppe;

A_1 betegner Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Pro, Pip, Phe eller Tyr;

A_2 betegner Arg eller Lys;

R_2 betegner p-nitrophenyl, β -naphthyl, 4-methoxy- β -naphthyl eller 4-methylcoumarin-7-yl.

2. Fremgangsmåde til laboratoriediagnosticering af proteaser, k e n d e t e g n e t ved, at der som substrat bruges et tripeptid med den almene formel:



hvor

R_1 betegner hydrogen eller en benzyloxycarbonylgruppe;

A_1 betegner Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Pro, Pip, Phe eller Tyr;

A_2 betegner Arg eller Lys;

R_2 betegner p-nitrophenyl, β -naphthyl, 4-methoxy- β -naphthyl eller 4-methylcoumarin-7-yl.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 2527932

SE ansøgninger nr. 7415229, 7507974

J.Biochem. 82, 1495-1498 (1977).