

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149215 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 2355/77

(22) Indleveringsdag: 27 maj 1977

(41) Alm. tilgængelig: 29 nov 1977

(44) Fremlagt: 17 mar 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 maj 1976 CH 6816/76

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 5/08
C 12 Q 1/34

(71) Ansøger: *PENTAPHARM A.G.; Basel, CH.

(72) Opfinder: Lars Gundro *Svensden; CH.

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) **Tri- eller tetrapeptider eller salte deraf til anvendelse som substrat til kvantitativ bestemmelse af plasminogenaktivatorer, inhibitorer for disse og plasminogen-præaktivatorer samt trypsin, trypsin-inhibitorer og trypsinogen i legemsvæsker hos mennesker og pattedyr og i vævsekstrakter samt en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af plasminogenaktivatorer og trypsin i legemsvæsker hos mennesker og pattedyr og i vævsekstrakter**

Den foreliggende opfindelse angår tri- eller tetrapeptider eller salte deraf med mineralsyrer eller organiske syrer til anvendelse som substrat til kvantitativ bestemmelse af plasminogenaktivatorer, inhibitorer for disse og plasminogen-præaktivatorer samt trypsin, trypsin-inhibitorer og trypsinogen i legemsvæsker hos mennesker og pattedyr og i vævsekstrakter.

Den menneskelige organisme frembringer flere aktivatorer, der bevirker omdannelse af proenzymet plasminogen til det aktive lyse-enzym plasmin. Til denne gruppe af aktivatorer hører f.eks. vævs- og blodkinase og urokinase. Disse aktivatorer spiller en vigtig rolle i blodkoagulationsmekanismen. Ved en abnormt stor udløsning af disse aktivatorer er der fare for forhøjet fibrinolyseaktivitet og således for en forhøjet blødningstendens eller hæmorrhagi. Omvendt bevirker en for svag udløsning af disse aktivatorer en forstyrrelse af ligevægten mellem koagulationsevne og fibrinolyse og som følge deraf forhøjet thrombosefare. Bestemmelsen af plasminogen-aktivatorer i legemsvæsker og vævsekstrakter har derfor stor betydning i den kliniske praksis, hvilket f.eks. er defineret af I. Witt i "Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse", Verlag Chemie, Weinheim, 1975, side 119 (oversættelse): "Bestemmelsen af den fibrinolytiske aktivitet i plasma eller serum tjener for det første til erkendelse af hyperfibrinolytiske tilstande, der optræder ved forskellige sygdomsbilleder. Desuden er der i de senere år opnået mange gode resultater ved lyse af intravaskulære thromber ved administration af plasminogen-aktivatorer. Til kontrol af denne thrombolytiske terapi er det ligeledes absolut nødvendigt at kunne måle den fibrinolytiske aktivitet." F.E. Smyrniotis et al., [Thromb. Diath. et Haemorrh. bind III, 1959, s. 257 - 270] fremfører bl.a. følgende (oversættelse): "Udskillelsen af urokinase er hos raske mennesker uafhængig af alder, køn og urinmængde. Urokinaseudskillelsen er forhøjet efter et myocardiæinfarktanfald og efter et anfald af coronarinsufficiens. Udskillelsen er nedsat hos patienter med carcinose, cardial emboli og uræmi. Disse forskelle gør det nærliggende, at der kan forekomme signifikante forandringer i det fibrinolytiske plasmasytem som følge af disse sygdomme."

Der har hidtil ikke været kendt nogen virkelig pålidelige metoder til bestemmelse af plasminogen-aktivatorer i legemsvæsker og organekstrakter. Der kendes i princippet tre metoder:

1. Spontanlyse af et blodkoagulat. Man lader blod koagulere spontant eller ved tilsætning af thrombin og iagttager spontanlysen af koagulatet ved 37°C. Lyse finder normalt først sted efter 24 timer. Denne metode er uspecifik, da aktivatoraktiviteten ikke måles direkte, men indirekte via lyse-enzymet plasmin (jfr. I. Witt "Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse", Verlag Chemie, Weinheim, 1975, side 119).

2. Hydrolyse af casein. Ved denne metode gøres der brug af plasmins evne til hydrolytisk at nedbryde casein. Casein inkuberes med den prøve, der skal undersøges. I starten og ved slutningen sættes trichloreddikesyre til en alikvotdel af inkubationsblandingen. I den overstående væske bestemmes tyrosinindholdet ved spektrofotometrisk måling ved 280 nm, af hvilket indhold aktivatoraktiviteten indirekte kan måles tilnærmelsesvist [L.F. Remmert et al., J. Biol. Chem. 181, 431 (1949)].

3. Esterolytisk metode (til urokinase). Ved denne metode gøres der brug af urokinases evne til direkte at katalysere hydrolysen af N^α-acetyl-L-lysin-methylesteren. Denne metode er også blevet anvendt til opstilling af den såkaldte CTA-urokinaseenhed (CTA = Committee on Thrombolytic Agents of the National Heart Institute, USA). En CTA-enhed er den mængde urokinase, som på 1 time ved 37°C frigør $46,2 \times 10^{-3}$ μM methanol fra N^α-acetyl-L-lysin-methylester (jfr. N.U. Bang et al., "Thrombosis and Bleeding Disorders", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971, side 377). Denne metode kan kun anvendes til bestemmelse af rene urokinasepræparater, men kan ikke anvendes til bestemmelse af urokinase i legemsvæsker eller vævs-ekstrakter, da den nævnte ester spaltes hurtigere af andre deri værende proteolytiske enzymer (f.eks. plasmin og plasmakallikrein) end af urokinase.

I J. Org. Chem. 30 (1965) 1781-1785 beskrives syntesen af chromogene argininderivater, der skal anvendes som substrater til bestemmelse af trypsin i blodserum. De nævnte argininderivater spaltes ikke kun af trypsin, men også af de i blodserum tilstedeværende trypsininhibitorer, og de er derfor uegnede til en pålidelig trypsinbestemmelse.

I Arch. Biochem. Biophys. 108 (1964) 266-274 beskrives de samme chromogene argininderivater.

I USA patentskrift nr. 3.862.011 er det foreslået at anvende forbindelsen benzyloxycarbonyldiglycyl-1-arginyl-4-methoxy-2-naphthylamid til bestemmelse af trypsin. Denne forbindelse adskiller sig fra den i J. Org. Chem. 30 (1965), side 1781-1785, nævnte forbindelse kun derved, at den chromogene naphthylgruppe er substitueret med en methoxygruppe. Som ovenfor anført er forbindelser, som har diglycyl-arginyl-struktur, uanvendelige til bestemmelse af trypsin i nærværelse af tryptsininhibitorer.

I USA patentskrift nr. 3.886.136 er beskrevet tripeptidderivater, der bl.a. skal anvendes til bestemmelse af trypsin. De to første aminosyrer i disse peptidderivater indeholder ifølge definitionen i alle tilfælde sidekæder med mindst tre carbonatomer, hvilket medfører, at peptidderivaterne har kraftig hydrofob karakter og derfor er ufølsomme over for plasminogenaktivatorer såsom urokinase.

Det har været forsøgt at udvikle syntetiske amid- og peptidsubstrater til bestemmelse af urokinase. Disse forsøg har dog hidtil været resultatløse (jfr. f.eks. W. Troll et al., Journal of Biological Chemistry 208, 85 (1954)).

Ved forsøg på at udvikle et syntetisk substrat til bestemmelse af kallikrein er de nedenfor anførte tripeptid-p-nitro-anilider med formlerne A og B

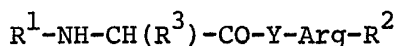
Pro-Phe-Arg-pNa og Val-Gly-Arg-pNa

A

B

syntetiseret på baggrund af teoretiske overvejelser. Disse tripeptider indeholder de tre sidste C-terminale aminosyrer af de ved indvirkning af kallikrein på kininogen dannede spaltningsprodukter. Det kunne derfor ventes, at disse to substrater ville blive hydrolyseret af kallikrein, hvilket dog kun har vist sig at holde stik for substratet med formlen A. Det har imidlertid overraskende nok vist sig, at det af kallikrein overhovedet ikke spaltelige substrat med formlen B hurtigt spaltes amidolytisk af urokinase og andre plasminogen-aktivatorer.

Opfindelsen bygger på denne erkendelse, og tri- eller tetrapeptiderne til den ovennævnte anvendelse er ejendommelige ved, at de har den almene formel



hvor R^1 betegner hydrogen, en eventuelt i ω -stilling med amino substitueret alkanoylgruppe med 2-18 carbonatomer, en phenylalkanoylgruppe, hvis alkanoyldel indeholder 2-6 carbonatomer, og hvis phenyldel eventuelt er substitueret med en aminogruppe, en eventuelt med amino eller aminomethyl substitueret cyclohexyl-carbonylgruppe, en eventuelt med methyl, amino eller aminomethyl substitueret benzoylgruppe, en benzyloxycarbonylgruppe eller en methyl-, ethyl-, phenyl-, methylphenyl- eller naphthylsulfonylgruppe, R^3 betegner en ligekædet eller forgrenet alkylgruppe med 1-4 carbonatomer eller en cyclohexyl- eller cyclohexylmethylgruppe, Y betegner en glycy- eller serylgruppe, og R^2 betegner en p-nitrophenylamino-, 2-naphthylamino- eller 4-methoxy-2-naphthylaminogruppe.

Gruppen R^2 er en chromogen gruppe, der fraspaltes ved den hydrolytiske indvirkning, dels af plasminogenaktivatorer, dels af trypsin, og danner et farvet eller fluorescerende spaltningsprodukt R^2H , hvis mængde kan måles ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensfotometriske metoder.

De omhandlede substrater kan være protoniseret med en mineralsyre, f.eks. saltsyre, brombrintesyre, svovlsyre eller phosphorsyre, eller med en organisk syre, f.eks. myresyre, eddikesyre, oxalsyre eller vinsyre.

Ved udviklingen af tri- og tetrapeptidderivaterne ifølge opfindelsen er det overraskende nok konstateret, at for at et peptidderivat kan anvendes til bestemmelse af plasminogenaktivatorer, skal det som midteraminosyre i tripeptider eller som tredje aminosyre i tetrapeptider indeholde en ikke-hydrofob aminosyre, som højst indeholder ét carbonatom i sidekæden. Det er endvidere konstateret, at ved indføring af en ikke-hydrofob midter - eller tredje - aminosyre, som kun indeholder et carbonatom i sidekæden,

forøges tripeptidsubstraternes følsomhed over for trypsin signifikant. De omhandlede peptidderivater er ca. 5 gange så følsomme som de mest følsomme af de i USA patentskrift nr. 3.886.136 beskrevne tripeptidsubstrater.

De omhandlede peptidderivater er særlig velegnede til bestemmelse af trypsin i duodenalsaft og i blodet ved akut panchreatitis, hvor trypsin kommer ind i blodbanen, men dog kun optræder i meget lav koncentration på grund af det store blodvolumen. De substrater, der tidligere er blevet anvendt til bestemmelse af trypsin, bl.a. de i USA patentskrift nr. 3.886.136 beskrevne tripeptidderivater, er alt for lidt følsomme til bestemmelse af så lave koncentrationer.

De omhandlede peptidderivater har den yderligere fordel, at de i modsætning til de substrater, der tidligere er blevet anvendt til bestemmelse af trypsin, ikke spaltes af trypsininhibitorer.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af plasminogen-aktivatorer og trypsin i legemsvæsker hos mennesker og pattedyr og i vævsekstrakter. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at de nævnte legemsvæsker eller vævsekstrakter omsættes med et af de omhandlede tri- eller tetrapeptidderivater, og mængden af det ved den enzymatiske hydrolytiske indvirkning af plasminogenaktivatorerne eller trypsin på tri- eller tetrapeptidet dannede spaltningsprodukt R^2H bestemmes ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensspektrofotometriske metoder.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det endvidere muligt indirekte at bestemme inhibitorer og præaktivatorer for plasminogenaktivatorer samt trypsininhibitorer og trypsinogen. Inhibitorerne kan bestemmes på den måde, at der til det inhibitorholdige medium sættes et afmålt overskud af plasminogenaktivator eller trypsin, hvorefter den ikke-inhiberede resterende mængde plasminogenaktivator eller trypsin bestemmes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Af differencen mellem den an-

vendte mængde plasminogenaktivator eller trypsin og den resterende mængde af disse enzymer udregnes den oprindeligt, i det afprøvede medium værende inhibitormængde. Proenzymerne, dvs. plasminogen-præaktivatorerne og trypsinogen, kan bestemmes på den måde, at der til det proenzymholdige medium sættes en aktivator, der fuldstændigt omdanner det inaktive proenzym til det aktive enzym, dvs. plasminogenaktivator eller trypsin, og mængden af det dannede aktive enzym bestemmes derefter ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Da 1 molekyle proenzym danner 1 molekyle aktivt enzym, kan der af den dannede mængde af det aktive enzym beregnes den oprindeligt, i det afprøvede medium værende mængde proenzym.

Ved en variant af fremgangsmåden ifølge opfindelsen bestemmes plasminogen-aktivatorer i blodplasma eller urin, f.eks. urokinase i urin i en pufferopløsning, som indeholder aprotinin og/eller hirudin, og det foretrækkes især, at der anvendes en puffer, som har en pH-værdi på 8,2 - 8,6 og en ionstyrke på 0,15 - 1,00 og indeholder 0,02 - 0,2 trypsinenheder aprotinin og/eller 0,001 - 10 antithrombinenheder hirudin/ml.

Fremstillingen af tri- eller tetrapeptiderne ifølge opfindelsen kan ske efter forskellige, til dels kendte metoder:

1) Ved den første metode hænges de chromogene grupper (R^2 i formel I), på den C-terminale aminosyregruppe. Disse grupper virker samtidig som C-terminale carboxybeskyttelsesgrupper under den trinvis sammenknytning af aminosyrer til opbygning af det ønskede peptidskelet. De øvrige beskyttelsesgrupper fraspaltes selektivt fra slutproduktet, uden at den chromogene gruppe påvirkes. Denne metode er f.eks. beskrevet i "Peptide Synthesis" af Miklos Bodanszky et al., Interscience Publishers, 1966, side 163 - 1965.

2) Ved den anden metode kobles den chromogene gruppe til det færdigopbyggede peptidskelet, på den måde, at der først foretages en trinvis opbygning af det ønskede peptidskelet, hvorefter den C-terminale carboxygruppe frigøres ved alkalisk hydrolyse af esteren, hvorefter den chromogene gruppe hænges på carboxygruppen. De øvrige beskyttelsesgrupper fraspaltes til slut selektivt

under betingelser, under hvilke den chromogene gruppe forbliver intakt. Denne metode er beskrevet i "Peptide Synthesis", jfr. ovenfor, side 43 og 44.

Til beskyttelse af N^{α} -aminogrupperne under den trinvis opbygning af peptidkæderne kan anvendes de sædvanlige, selektivt fraspaltelige kendte aminbeskyttelsesgrupper. Disse er først og fremmest:

Cbo, MeOCbo, NO_2 Cbo, MCbo, BOC, TFA eller formyl. α -Carboxygruppen i aminosyrerne kan gøres reaktionsdygtige efter forskellige kendte metoder, f.eks. ved fremstilling af p-nitrophenylesterderivaterne, trichlorphenylesterderivaterne, pentachlorphenylesterderivaterne eller N-hydroxysuccinimidesterderivaterne og isolering af disse derivater, eller ved fremstilling in situ af syreaziderne eller syreanhydriderne, som kan være enten symmetriske eller asymmetriske.

Aktiveringen af carboxygruppen kan også ske ved hjælp af et carbodiimid, f.eks. N,N'-dicyclohexylcarbodiimid.

Den C-terminale carboxygruppe i peptidderivaterne beskyttes under den trinvis opbygning af det ønskede peptidskelet enten med den chromogene amidgruppe eller som en methyl-, ethyl- eller isopropylester.

Endvidere kan δ -guanidinogruppen i arginin beskyttes med NO_2 , Tos eller ved simpel protonisering.

Ved syntesen af tripeptidkæden kan man først forsyne den N-terminale aminosyre eller dipeptidsyre med blokeringsgruppen (acyl- eller sulfonylgruppe), derefter aktivere carboxygruppen i den blokerede aminosyre eller dipeptidsyre og til sidst knytte det på denne måde vundne aktiverede aminosyrederivat eller dipeptidsyrederivat til det til fuldstændiggørelse af peptidkæden nødvendige dipeptidderivat.

Fremstilling af tri- eller tetrapeptiderne ifølge opfindelsen efter de to ovenfor nævnte metoder er udførligere beskrevet i de følgende eksempler.

Analysen af de ifølge eksemplerne fremstillede eluater og produkter er udført ved tyndtlagschromatografi. Til dette formål anvendes glasplader, der er overtrukket med siliciumdioxidgel F 254 (Merck). Til udvikling af tyndtlagschromatogrammerne anvendes følgende opløsningsmiddelsystemer:

- A chloroform/methanol (9:1)
- B n-propanol/ethylacetat/vand (7:1:2)
- C n-butanol/eddikesyre/vand (3:1:1).

Chromatogrammerne udvikles først i UV-lys og derefter ved reaktion med chlor/toluidin (jfr. G. Pataki, "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie", Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1966, side 125).

I nærværende beskrivelse med krav anvendes følgende forkortelser:

Ala	=	L-alanin
β-Ala	=	β-alanin
Arg	=	L-arginin
But	=	L-2-aminosmørsyre
4-But	=	4-aminosmørsyre
Gly	=	glycin
Ile	=	L-isoleucin
D-Ile	=	D-isoleucin
Leu	=	leucin
CHA	=	cyclohexylalanin
Lys	=	L-lysin
NLeu	=	L-norleucin
NVal	=	L-norvalin
Ser	=	L-serin
Val	=	L-valin
D-Val	=	D-valin
Ac	=	acetyl
Ac ₂ O	=	eddikesyreanhydrid
AcOH	=	eddikesyre
BOC	=	tert.butoxycarbonyl
Bz	=	benzoyl
Bzl	=	benzyl
Bz ₂ O	=	benzoesyreanhydrid

Cbo	=	benzyloxycarbonyl
DCCI	=	N,N'-dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	=	dicyclohexylamin
DCH	=	N,N'-dicyclohexylurinstof
DMF	=	dimethylformamid
DSC	=	tyndtlagschromatogram
Et ₃ N	=	triethylamin
HMPA	=	N,N,N',N',N'',N''-hexamethylphosphor- syretriamid
LMS	=	opløsningsmiddelsystem
MCbo	=	p-methoxyphenylazobenzyloxycarbonyl
MeOH	=	methanol
NA	=	naphthylamid
OtBu	=	tert.butoxy
OEt	=	ethoxy
OisoPr	=	isopropoxy
OMe	=	methoxy
OpNP	=	p-nitrophenoxy
OSu	=	N-succinimidoxy
pNA	=	p-nitroanilid
TFA	=	trifluoracetyl
Tos	=	p-toluensulfonyl.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler:

Eksempel 1.

I. N^α-Bz-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.

Ia) N^α-Cbo-Arg(NO₂)-pNA.

1) I en 500 ml's tre-halset rundkolbe opløses 32,55 g (92,1 millimol) grundigt tørret Cbo-Arg(NO₂)-OH i 200 ml over P₂O₅ tørret og frisk destilleret N,N,N',N',N'',N''-hexamethylphosphorsyretriamid under udelukkelse af fugtighed ved 20°C. Til denne opløsning sættes portionsvis først 9,32 g (92,1 millimol) Et₃N og derefter 18,90 g (115,1 millimol) p-nitrophenylisocyanat i 25%'s overskud. Efter 24 timers reaktionstid ved stuetemperatur dryppes reaktionsopløs-

ningen under omrøring til 1,5 liter 2%'s natriumhydrogencarbonatopløsning. Det udfældede produkt frafiltreres og vaskes tre gange med hver gang 0,7 liter 2%'s natriumhydrogencarbonatopløsning, tre gange med hver gang 0,7 liter destilleret vand, tre gange med hver gang 0,5 liter 0,5N HCl og endelig tre gange med hver gang 0,5 liter destilleret vand. Det på denne måde vundne produkt tørres i vakuum ved 40°C og ekstraheres derefter to gange med hver gang 200 ml kogende methanol, hvorved den overvejende mængde af det som biprodukt dannede N^α-Cbo-ω-nitroargininlactam opløses sammen med kun ringe mængder af det ønskede produkt. Det på denne måde vundne, forrensede råprodukt ekstraheres efter tørring to gange med hver gang 50 ml til 70°C opvarmet dimethylformamid, hvorved det ønskede produkt fuldstændig opløses, medens biproduktet, nemlig N,N'-bis-p-nitrophenylurinstof, bliver uopløst tilbage. Dimethylformamidopløsningen inddampes i vakuum ved 40°C. Efter tilsætning af methanol udkrystalliserer en substans, som i opløsningsmiddelsystemerne A og B er chromatografisk rene og har smeltepunkt 186 - 188,5°C.

Udbytte: 29,75 g (68,2% af det teoretiske).

Ved elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₀H₂₃N₇O₇ er opnået følgende værdier:

Beregnet: C 50,74 H 4,90 N 20,71
Fundet: C 50,42 H 4,98 N 20,90.

$[\alpha]_D^{22} = 1,27^\circ$ (c = 1,0 i AcOH).

2) I en 500 ml's tre-halset rundkolbe opløses 17,7 g (50 millimol) tørret Cbo-Arg(NO₂)-OH i 350 ml THF:DMF (1:1), hvorefter der under udelukkelse af fugtighed tilsættes 5,05 g (50 millimol) Et₃N. Efter afkøling af reaktionsopløsningen til -10°C tilsættes der dråbevis i løbet af 15 minutter 6,85 g (50 millimol) chlormyresyreisobutylester opløst i 30 ml tetrahydrofuran, medens temperaturen holdes mellem -10 og -5°C. Efter ca. 10 minutters forløb tildryppes 8,2 g (50 millimol) p-nitroanilin opløst i 15 ml dimethylformamid, medens temperaturen igen holdes mellem -10 og -5°C. Efter 2 timers forløb afbrydes afkølingen, og reaktionsblandingen lades henstå ved stuetemperatur i 24 timer. Efter afdestillation af

opløsningsmidlet i vakuum digereres remanensen tre gange med destilleret vand, tre gange med 5%'s natriumhydrogencarbonatopløsning og igen tre gange med destilleret vand i den anførte rækkefølge. Efter tørring i vakuum opløses råproduktet i methanol og lades løbe gennem en med methanol ækvilibreret søjle af "Sephadex[®] LH-20" (tværbundet dex-trangel). Af en fraktion af eluatet fås 7,67 g stof (32,4% af det teoretiske) med samme fysiske egenskaber som det i afsnit 1) vundne slutprodukt.

3) 17,7 g (50 millimol) Cbo-Arg(NO₂)-OH opløses i 75 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 10,3 g (50 millimol) DCCI og 8,2 g (50 millimol) p-nitroanilin i den anførte rækkefølge. Efter 4 timer ved -10°C og 20 timer ved 20°C filtreres det dannede DCH, og filtratet inddampes til tørhed. Råproduktet opløses i methanol og lades løbe over en med methanol ækvilibreret søjle af "Sephadex[®] LH-20". Foruden meget biprodukt, nemlig N-Cbo-Arg-(NO₂)-N,N'-dicyclohexylurinstof, vindes af en fraktion af eluatet 4,32 g stof (17,9% af det teoretiske), som har samme fysiske egenskaber som det ifølge afsnit 1) fremstillede slutprodukt.

Ib) N^α-Cbo-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

Under udelukkelse af fugtighed behandles 9,5 g (20 millimol) N^α-Cbo-Arg(NO₂)-pNA (jfr. eksempel Ia) i en kolbe med 80 ml 2N HBr i iseddike under omrøring i 1 time ved 20°C, hvorved dette stof opløses under CO₂-udvikling. Reaktionsopløsningen dryppes langsomt under kraftig omrøring til 600 ml tørret ether, hvorved der udfældes HBr.H-Arg(NO₂)-pNA. Etherfasen frasuges med en filterstav. Det tilbageværende bundfald behandles yderligere fire gange med hver gang 150 ml tør ether til fjernelse af det dannede benzylbromid og overskydende HBr samt eddikesyre. Efter tørring i vakuum over natriumhydroxidspåner fås det deblokerede produkt i kvantativt udbytte. Det tørre hydrobromidderivat opløses i 50 ml dimethylformamid, afkøles til -10°C og tilsættes 4,16 ml (30 millimol) Et₃N til frigørelse af H-Arg(NO₂)-pNA fra hydrobromidet. Det dannede Et₃N.HBr-salt isoleres ved sugefiltrering og eftervaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid, og til filtratet sættes 6,94 g (21 millimol) Cbo-Gly-OpNP ved -10°C. Efter nogle timers forløb har reaktionsopløsningen antaget stuetemperatur. Den afkøles igen til

-10°C og pufres med 1,4 ml (10 millimol) Et₃N. Efter ca. 5 timers forløb tilsættes yderligere 1,4 ml Et₃N. Efter yderligere 24 timers forløb inddampes reaktionsopløsningen til tørhed i vakuum ved 40°C. Remanensen digerereres tre gange med hver gang 100 ml destilleret vand og tørres igen i vakuum ved 40°C over NaOH-spåner. Det tørrede produkt omkrystalliseres af methanol, hvorved der fås 6,77 g stof, som i opløsningsmiddelsystemerne A og B er chromatografisk rene. Af moderluden fås ved gelfiltrering over en med MeOH ækvilibreret søjle af "Sephadex LH-20" yderligere 4,29 g stof. Der fås i alt således 11,06 g (87,7% af det teoretiske) rent stof med smeltepunkt 159 - 161°C. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₂H₂₆N₈O₈ giver følgende værdier:

Beregnet: C 49,81 H 4,94 N 21,12

Fundet: C 50,07 H 4,99 N 21,48.

Ic) N^α-Cbo-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

10,6 g (20 millimol) N^α-Cbo-Gly-Arg(NO₂)-pNA (jfr. eksempel Ib) behandles med 120 ml 2N HBr i iseddike (0,24 mol) og oparbejdes som beskrevet i eksempel Ib). Det over NaOH-spåner i vakuum tørrede hydrobromid af dipeptidderivatet opløses i 50 ml dimethylformamid og tilsættes efter afkøling 3,04 g Et₃N i 10 ml dimethylformamid (30 millimol). Dannet Et₃N.HBr frafiltreres og vaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid. Til filtratet sættes 8,20 g (22 millimol) Cbo-Val-OpNP. Den videre oparbejdning foretages analogt med eksempel Ib. Ved gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle fås efter eluering med MeOH 10,95 g (87,0% af det teoretiske) af i opløsningsmiddelsystemerne A og B chromatografisk rent stof med smeltepunkt 212 - 214°C. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₇H₃₅N₉O₉ viser følgende værdier:

Beregnet: C 51,50 H 5,60 N 20,02

Fundet: C 52,01 H 5,68 N 20,27.

Id) N^α-Bz-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

10,90 g (17,3 millimol) N^α-Cbo-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNa (jfr. eksempel Ic) behandles med 70 ml 2N HBr i iseddike (0,14 mol). Reaktions-

blandingen oparbejdes som beskrevet i eksempel Ib. Efter opløsning af det tørrede tripeptidhydrobromidderivat i 60 ml dimethylformamid sættes der til opløsningen efter afkøling 3,60 ml Et_3N (26 millimol). Det dannede $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HBr}$ frafiltreres og vaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid. Til det vundne filtrat sættes 6,66 g (29,4 millimol) benzoesyreanhydrid. Opløsningen pufres derefter og oparbejdes som beskrevet i eksempel Ib). Det tørrede produkt omkrystalliseres af MeOH, hvorved der fås 4,28 g stof, der i opløsningsmiddelsystemerne A og B er chromatografisk rent, smeltepunkt $222 - 223^\circ\text{C}$. Af moderluden fås ved gelfiltrering og en med MeOH ækvilibreret søjle af "Sephadex LH-20" yderligere 3,75 g stof med smeltepunkt $222 - 223^\circ\text{C}$. I alt fås der således 8,03 g (77,4% af det teoretiske) rent stof. Ved elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{O}_8$ fås følgende værdier:

Beregnet: C 52,08 H 5,55 N 21,03

Fundet: C 51,88 H 5,63 N 21,56.

I) N^α -Bz-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.

6,044 g (10,08 millimol) N^α -Bz-Val-Gly-Arg(NO_2)-pNA (jfr. eksempel Id) indvejes i en Erlenmeyerkolbe med slib. 81 ml 1M bor-tris-trifluoracetat i trifluoreddikesyre tilsættes. Efter en reaktionstid på 2 timer ved 0°C og derefter 22 timer ved 20°C fraspaltes nitrobeskyttelsesgruppen under omrøring og udelukkelse af luftfugtighed. Reaktionsopløsningen inddampes til tørhed i vakuum, og remanensen optages i MeOH. For at omdanne peptidderivatet til HCl-saltet tilsættes 1,0 ml koncentreret HCl, og opløsningen inddampes i vakuum til tørhed. Efter 3 ganges gentagelse af denne metode opløses remanensen i 200 ml 30%'s eddikesyre. Til rensning overføres AcOH-opløsningen til en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle og elueres med 30%'s AcOH. Den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 0,85 ml (10,1 millimol) koncentreret HCl. Der fås 4,75 g (79,7% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_6\text{Cl}$ viser følgende værdier:

Beregnet: C 52,83 H 5,97 N 18,96 Cl 6,00

Fundet: C 52,71 H 5,88 N 19,07 Cl 5,95.

Aminosyreanalyse viser de ventede aminosyrer i det rigtige forhold:
Arg: 0,97 - Gly: 1,0 - Val: 0,98.

Eksempel 2.

II. H-Val-Gly-Arg-pNa.2HCl.

630 mg (1 millimol) af det som beskrevet i eksempel 1, afsnit Ic, fremstillede N^{α} -Cbo-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA indvejes i reaktionsbeholderen i et Sakakibara-apparat. 10 ml tørret hydrogenfluoridgas kondenseres i reaktionsbeholderen. Efter en reaktionstid på 1 time ved 0°C fraspaltes N^{α} -benzyloxycarbonylbeskyttelsesgruppen samt nitrobeskyttelsesgruppen for arginin. Den kondenserede hydrogenfluoridgas afdestilleres i vakuum, og remanensen opløses i dimethylformamid. For at omdanne peptidderivatet til HCl-saltet tilsættes 0,2 ml koncentreret HCl, og opløsningen inddampes til tørhed. Efter to ganges gentagelse af denne metodik opløses remanensen i 25 ml 30%'s AcOH. Til rensning hældes AcOH-opløsningen på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle og elueres med 30%'s AcOH. Den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 160 μ liter (2 millimol) koncentreret HCl. Der fås 360 mg (68,8% af det teoretiske) af et amorft pulver, der er rent ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $C_{19}H_{32}N_8O_5Cl_2$ giver følgende resultat:

Beregnet:	C 43,60	H 6,16	N 21,41	Cl 13,55
Fundet:	C 43,85	H 6,23	N 21,65	Cl 13,42.

Aminosyreanalysen viser de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,98 - Gly: 1,00 - Val: 0,96.

Eksempel 3.

III. N^{α} -Bz-Ile-Gly-Arg-pNA.HCl.

IIIa) N^{α} -Cbo-Ile-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

5,3 g (10 millimol) af den ifølge eksempel 1, afsnit Ib, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, opløses

i 35 ml dimethylformamid og tilsættes 2,08 ml (15 millimol) Et_3N . Efter afkøling til -10°C frafiltreres det dannede $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HBr}$ og vaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid. Til det resulterende filtrat sættes 4,25 g (11 millimol) Cbo-Ile-OpNP, og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 5,50 g (85,5% af det teoretiske) af den krystallinske forbindelse IIIa, som smelter ved $197 - 200^\circ\text{C}$ og ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_9$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,25 H 5,79 N 19,59
 Fundet: C 51,98 H 5,91 N 19,73.

IIIb) $\text{N}^\alpha\text{-Bz-Ile-Gly-Arg(NO}_2\text{)-pNA}$.

1,29 g (2 millimol) af den ifølge eksempel 3, afsnit IIIa, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, opløses i 15 ml dimethylformamid og tilsættes 420 μl (3 millimol) Et_3N . Efter afkøling til -10°C sættes 680 mg (3 millimol) Bz_2O til reaktionsblandingen, og reaktionsopløsningen viderebehandles som beskrevet i eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 1,05 g (85,6% af det teoretiske) af den amorfte forbindelse IIIb, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_8$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,85 H 5,75 N 20,54
 Fundet: C 52,54 H 5,85 N 20,68.

III. $\text{N}^\alpha\text{-Bz-Ile-Gly-Arg-pNA}\cdot\text{HCl}$.

614 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 3, afsnit IIIb, fremstillede forbindelse indvejes i reaktionsbeholderen i et Sakakibara-apparat. 10 ml tørret hydrogenfluoridgas kondenseres i reaktionsbeholderen. Efter en reaktionstid på 1 time ved 0°C fraspaltes arginin-nitrobeskyttelsesgruppen under omrøring. Den kondenserede hydrogenfluoridgas afdestilleres fra reaktionsblandingen under vakuum, og remanensen opløses i dimethylformamid. For at omdanne peptidderivatet til HCl-saltet tilsættes 0,2 ml (~2,5 millimol) koncentreret HCl, og opløsningen inddampes til tørhed. Efter to gan-

ges gentagelse af denne teknik opløses remanensen i 50 ml 30%'s AcOH. Til rensning hældes AcOH-opløsningen på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle og elueres med 30%'s AcOH. Den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 80 μ liter (1 millimol) koncentreret HCl. Der fås 505 mg (83,5% af det teoretiske) af et amorf pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $C_{27}H_{37}N_8O_6Cl$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 53,59 H 6,16 N 18,52 Cl 5,86
 Fundet: C 53,28 H 6,21 N 18,70 Cl 5,82.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold:
 Arg: 0,96 - Gly: 1,00 - Ile: 0,98.

Eksempel 4.

IV. N^{α} -Bz-Leu-Gly-Arg-pNA.HCl.

IVa) N^{α} -Cbo-Leu-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

2,65 g (5 millimol) af den ifølge eksempel 1, afsnit Ib, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, opløses i 25 ml dimethylformamid og tilsættes 1,04 ml (7,5 millimol) Et₃N. Efter afkøling til -10°C frafiltreres det dannede Et₃N.HBr og vaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid. Til det vundne filtrat sættes 2,13 g (5,5 millimol) Cbo-Leu-OpNP, og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 2,85 g (88,6% af det teoretiske) af den krystallinske forbindelse IVa, der smelter ved 189 - 191°C og ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $C_{28}H_{37}N_9O_9$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,25 H 5,79 N 17,59
 Fundet: C 52,05 H 5,79 N 19,91.

IVb) N^{α} -Bz-Leu-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

1,29 g (2 millimol) af den ifølge eksempel 4, afsnit IVa, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, opløses i 15 ml dimethylformamid og tilsættes 420 μ liter (3 millimol) Et₃N. Efter afkøling til -10°C tilsættes 680 mg (3 millimol) Bz₂O, og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 0,99 g (80,7% af det teoretiske) af den amorfte forbindelse IVb, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₇H₃₅N₉O₈ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,85 H 5,75 N 20,54
Fundet: C 52,49 H 5,81 N 20,59.

IV. N^{α} -Bz-Leu-Gly-Arg-pNA.HCl.

614 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 4, afsnit IVb, fremstillede forbindelse omsættes ifølge eksempel 2, afsnit II, til dannelse af forbindelse IV. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 30%'s AcOH.

Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der ved trypsinbehandling kan spaltes under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 80 μ liter (1 millimol) koncentreret HCl. Der fås 508 mg (84,0% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₇H₃₇N₈O₆Cl giver følgende resultat:

Beregnet: C 53,59 H 6,16 N 18,52 Cl 5,86
Fundet: C 53,75 H 6,21 N 18,74 Cl 5,76.

Aminosyreanalyse giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,97 - Gly: 1,00 - Leu: 1,02.

Eksempel 5.

V. N^α-Bz-Val-Ser-Arg-pNA.HCl.

Va) N^α-BOC-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA.

3,55 g (7,5 millimol) af den ifølge eksempel 1, afsnit Ia, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, opløses i 35 ml dimethylformamid og tilsættes 1,56 ml (11,3 millimol) Et₃N. Efter afkøling til -10°C frafiltreres det dannede Et₃N.HBr og eftervaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid. Til det vundne filtrat sættes 3,35 g (8 millimol) BOC-Ser(OBzl)-OpNP, og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 4,09 g (88,4% af det teoretiske) af en delvis krystallinsk forbindelse Va, som ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₇H₃₆N₈O₉ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,59 H 5,88 N 18,17

Fundet: C 52,82 H 5,78 N 18,30.

Vb) N^α-BOC-Val-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA.

3,08 mg (5 millimol) af den ifølge eksempel 5, afsnit Va, fremstillede forbindelse indvejes i en Erlenmeyerkolbe og tilsættes under udelukkelse af fugtighed 15 ml trifluoreddikesyre. Under omrøring ved 20°C i 30 minutter opløses stoffet under CO₂-udvikling. Reaktionsopløsningen dryppes langsomt under intensiv omrøring til 250 ml tørret ether, hvorved CF₃COOH.H-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA udfældes. Etherfasen frasuges med en filterstav. Det tilbageværende bundfald behandles yderligere tre gange med hver gang 50 ml tør ether til fjernelse af det dannede tert.butanol og den overskydende mængde trifluoreddikesyre. Efter tørring i vakuum over NaOH-spåner fås det deblokerede produkt i næsten kvantitativt udbytte. Det tørrede trifluoracetatderivat opløses i 25 ml dimethylformamid, afkøles til -10°C og tilsættes 1,04 ml (7,5 millimol) Et₃N til frigørelse af H-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA fra trifluoracetatet, og derefter tilsættes 1,73 g (5,5 millimol) BOC-Val-OSu. Efter nogen timers forløb har reaktionsopløsningen antaget stuetemperatur. Den afkøles igen til -10°C og pufres med 0,35 ml (2,5 millimol) Et₃N. Efter ca. 5

timers forløb tilsættes yderligere 0,35 ml Et_3N . Efter yderligere 24 timers forløb inddampes reaktionsopløsningen til tørhed i vakuum ved 40°C . Remanensen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 2,81 g (78,5% af det teoretiske) af et amorft pulver, som ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_{10}$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 53,70 H 6,34 N 17,61
Fundet: C 54,03 H 6,40 N 17,88.

Vc) N^α -Bz-Val-Ser(OBzl)-Arg(NO_2)-pNA.

716 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 5, afsnit Vb, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 5, afsnit Vb, opløses i 8 ml dimethylformamid og tilsættes 210 μ liter (1,5 millimol) Et_3N . Efter afkøling til -10°C tilsættes 450 mg (2 millimol) Bz_2O , og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 532 mg (73,9% af det teoretiske) af den krystallinske forbindelse Vc, der smelter ved $175 - 178^\circ\text{C}$ og ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_9$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 56,74 H 5,74 N 17,52
Fundet: C 56,65 H 5,69 N 17,83.

V. N^α -Bz-Val-Ser-Arg-pNA.HCl.

360 mg (0,5 millimol) af den ifølge eksempel 5, afsnit Vc, fremstillede forbindelse omsættes ifølge eksempel 2, afsnit II, til dannelsen af forbindelsen V. Rensning: gelfiltering på "Sephadex G-15" i 30%'s AcOH.

Udbytte: Den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 40 μ liter (0,5 millimol) koncentreret HCl. Der fås 160 mg (51,5% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_7\text{Cl}$ viser følgende resultat:

Beregnet: C 52,21 H 6,00 N 18,04 Cl 5,71
 Fundet: C 52,49 H 6,08 N 18,26 Cl 5,63.

Aminosyreanalysen viser de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,99 - Ser: 0,95 - Val: 1,00.

Eksempel 6.

VI. N^α-Bz-Ile-Ser-Arg-pNA.HCl.

VIa) N^α-BOC-Ile-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA.

1,54 g (2,5 millimol) af den ifølge eksempel 5, afsnit Va, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 5, afsnit Vb, opløses i 15 ml dimethylformamid og tilsættes 520 μliter (3,75 millimol) Et₃N. Efter afkøling til -10°C tilsættes 905 mg (2,75 millimol) BOC-Ile-OSu, og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 1,45 g (79,5% af det teoretiske) af den amorfe forbindelse VIa, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₃₃H₄₇N₉O₁₀ viser følgende resultat:

Beregnet: C 54,31 H 6,49 N 17,27
 Fundet: C 54,82 H 6,52 N 17,35.

VIb) N^α-Bz-Ile-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA.

730 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 6, afsnit VIa, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 5, afsnit Vb og opløses i 7 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 210 μliter (1,5 millimol) Et₃N og lige derefter 450 mg (2 millimol) Bz₂O. Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 615 mg (83,8% af det teoretiske) af den amorfe forbindelse VIb, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₃₅H₄₃N₉O₉ giver følgende resultat:

Beregnet: C 57,29 H 5,91 N 17,18
 Fundet: C 57,61 H 6,01 N 17,53.

VI. N^α-Bz-Ile-Ser-Arg-pNA.HCl.

367 mg (0,5 millimol) af den ifølge eksempel 6, afsnit VIb, fremstillede forbindelse omsættes ifølge eksempel 2, afsnit II, til forbindelse VI. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 30%'s AcOH.

Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 40 μ liter (0,5 millimol) koncentreret HCl. Der fås 168 g (45,8% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₈H₃₉N₈O₇Cl giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,95 H 6,19 N 17,64 Cl 5,58
 Fundet: C 53,21 H 6,26 N 17,88 Cl 5,57.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,96 - Ser: 0,95 - Ile: 1,00.

Eksempel 7.

VII. N^α-Bz-Leu-Ser-Arg-pNA.HCl.

VIIa) N^α-BOC-Leu-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA.

1,55 g (2,5 millimol) af den ifølge eksempel 5, afsnit Va, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 5, afsnit Vb, opløses i 15 ml dimethylformamid og tilsættes 520 μ liter (3,75 millimol) Et₃N. Efter afkøling til -10°C tilsættes 0,91 g (2,78 millimol) BOC-Leu-OSu, og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 1,44 g (78,9% af det teoretiske) af den amorfe forbindelse VIIa, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₃₃H₄₇N₉O₁₀ giver følgende resultat:

Beregnet: C 54,31 H 6,49 N 17,27
 Fundet: C 54,70 H 6,55 N 17,43.

VIIb) N^α-Bz-Leu-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA.

1,46 g (2 millimol) af den ifølge eksempel 7, afsnit VIIa, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 5, afsnit Vb, og opløses i 15 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C sættes 420 μ liter (3 millimol) Et₃N til opløsningen og lige derefter 0,90 g (4 millimol) Bz₂O. Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 1,25 g (85,2% af det teoretiske) af den amorfe forbindelse VIIb, som ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₃₅H₄₃N₉O₉ giver følgende resultat:

Beregnet: C 57,29 H 5,91 N 17,18
 Fundet: C 57,38 H 5,98 N 17,57.

VII. N^α-Bz-Leu-Ser-Arg-pNA.HCl.

735 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 7, afsnit VIIb, fremstillede forbindelse omsættes ifølge eksempel 2, afsnit II, til forbindelsen VII. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 30%'s AcOH.

Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 80 μ liter (1 millimol) koncentreret HCl. Der fås 355 mg (55,9% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₈H₃₉N₈O₇Cl giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,95 H 6,19 N 17,64 Cl 5,58
 Fundet: C 53,09 H 6,09 N 17,91 Cl 5,49.

Aminosyreanalysen viser de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,95 - Ser: 0,93 - Leu: 1,00.

Eksempel 8.

VIII. N^α-3-phenylpropionyl-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.

VIIIa) N^α-3-phenylpropionyl-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

3,15 g (5 millimol) af den ifølge eksempel 1, afsnit Ic, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, og opløses i 25 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C tilsættes 1,05 ml (7,5 millimol) Et₃N og derefter 1,50 g (5,5 millimol) 3-phenylpropionsyre-p-nitrophenylester. Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 2,75 g (87,6% af det teoretiske) af den krystal-linske forbindelse VIIIa, som smelter ved 216 - 218°C og ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₈H₃₇N₉O₈ giver følgende resultat:

Beregnet: C 53,58 H 5,94 N 20,09

Fundet: C 53,38 H 6,02 N 20,40.

VIII. N^α-3-phenylpropionyl-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.

1,26 g (2 millimol) af den ifølge eksempel 8, afsnit VIIIa, fremstillede forbindelse omsættes ifølge eksempel 1, afsnit I, til forbindelsen VIII. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 30%'s AcOH.

Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter til-sætning af 160 μliter (2 millimol) koncentreret HCl. Der fås 1,12 g (90,4% af det teoretiske) af et amorft pulver, som ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₈H₃₉N₈O₆Cl giver følgende resultat:

Beregnet: C 54,32 H 6,35 N 18,10 Cl 5,73

Fundet: C 54,58 H 6,29 N 18,40 Cl 5,67.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,96 - Gly: 1,00 - Val: 1,02.

Eksempel 9.

IX. N^α-2-phenylacetyl-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.IXa) N^α-2-phenylacetyl-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA.

1,57 g (2,5 millimol) af den ifølge eksempel 1, afsnit Ic, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 1, afsnit Ib, og opløses i 15 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C tilsættes 520 μliter (3,75 millimol) Et₃N og derefter 710 mg (2,75 millimol) 2-phenyleddikesyre-p-nitrophenylester. Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 1, afsnit Ib. Efter gelfiltrering på "Sephadex LH-20" i MeOH fås 1,35 g (88,0% af det teoretiske) af den krystallinske forbindelse IXa, der smelter ved 180 - 184°C og ifølge tyndtlagschromatografi i LMS A og B er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₇H₃₅N₉O₈ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,85 H 5,75 N 20,54
Fundet: C 53,09 H 5,82 N 20,91.

IX. N^α-2-phenylacetyl-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.

615 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 9, afsnit IXa, fremstillede forbindelse omsættes ifølge eksempel 1, afsnit I, til forbindelsen IX. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 30%'s AcOH.

Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der ved trypsinbehandling kan spaltes under frigørelse af p-nitroanilin, lyofiliseres efter tilsætning af 80 μliter (1 millimol) koncentreret HCl. Der fås 515 mg (85,1% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₇H₃₇N₈O₆Cl giver følgende resultat:

Beregnet: C 53,59 H 6,16 N 18,52 Cl 5,86
Fundet: C 53,19 H 6,21 N 18,77 Cl 5,75.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,94 - Gly: 1,00 - Val: 0,98.

Eksempel 10.

X. N^{α} -Cbo-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.2HCl.

Xa. N^{α} -Cbo-Arg-pNA.HCl.

I en 250 ml's tre-halset rundkolbe opløses 16,0 g (47,0 millimol) over P_2O_5 i vakuum tørret Cbo-Arg-OH.HCl i 90 ml absolut HMPTA under udelukkelse af fugtighed ved $20^{\circ}C$. Ved stuetemperatur sættes til den vundne opløsning portionsvis først en opløsning af 4,74 g (47,0 millimol) Et_3N i 10 ml HMPTA og derefter 16,4 g (100 millimol) p-nitrophenylisocyanat (100%'s overskud). Efter 24 timers reaktionstid ved $20^{\circ}C$ afdestilleres størstedelen af HMPTA i vakuum. Remanensen ekstraheres flere gange med 30%'s AcOH. Remanensen kasseres. De samlede eddikesyrestrakter holdes til yderligere rensning på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15" søjle og elueres med 30%'s AcOH. De fraktioner af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres. Der fås 12,6 g af et amorf pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $C_{20}H_{25}N_6O_5Cl$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 51,67 H 5,42 N 18,08 Cl 7,63

Fundet: C 51,29 H 5,48 N 17,92 Cl 7,50.

Xb. N^{α} -Cbo-Gly-Arg-pNA.HBr.

Under udelukkelse af fugtighed behandles 4,65 g (10 millimol) af forbindelsen Xa med 40 ml 2N HBr i iseddike under omrøring i 45 minutter ved $20^{\circ}C$. Aminosyrederivatet opløses derved under udvikling af CO_2 . Reaktionsopløsningen dryppes under intensiv omrøring til 250 ml absolut ether, hvorved $(2HBr).H-Arg.pNA$ udfældes. Etherfasen frasuges, hvorpå den faste fase vaskes yderligere fire gange med hver gang 100 ml absolut ether for at fjerne det som biprodukt dannede benzylbromid samt overskuddet af HBr og AcOH. Ved tørring i vakuum over NaOH-spåner fås det deblokerede produkt i kvantitativt udbytte. Det tørre $(2HBr).H-Arg.pNA$ opløses i 25 ml dimethylformamid. Til den til $-10^{\circ}C$ afkølede opløsning sættes 1,40 ml (10 milli-

mol) Et_3N . Der dannes et bundfald af $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HBr}$, der frafiltreres og eftervaskes med en ringe mængde koldt dimethylformamid. Til filtratet sættes 3,65 g (11 millimol) Cbo-Gly-OpNP ved -10°C . Efter nogle timers forløb er reaktionsopløsningens temperatur steget til 20°C . Opløsningen afkøles igen til -10°C og pufres med 0,35 ml (2,5 millimol) Et_3N . Efter yderligere 16 timers forløb tilsættes yderligere 0,35 ml Et_3N ved -10°C . Efter yderligere 24 timers forløb inddampes reaktionsopløsningen til tørhed ved 40°C i vakuum. Remanensen opløses i 33%'s AcOH. Opløsningen renses ved gelfiltrering på en med 33%'s AcOH ækvilibreret søjle af "Sephadex G-15". De fraktioner af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, inddampes til tørhed i vakuum. Remanensen opløses i 30 ml MeOH og dryppes under intensiv omrøring til 300 ml absolut ether, hvorved N^α -Cbo-Gly-Arg-pNA.HBr udfældes. Etherfasen frasuges, hvorefter den faste fase yderligere vaskes to gange med hver gang 100 ml absolut ether til fjernelse af MeOH og spor af AcOH. Efter tørring i vakuum over NaOH-spåner fås 4,45 g (78,6% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_6\text{Br}$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 46,65 H 4,98 N 17,31 Br 14,11

Fundet: C 46,33 H 5,04 N 17,88 Br 14,20.

Xc. N^α -Cbo-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.HCl.

2,85 g (5 millimol) af den ifølge eksempel 10, afsnit Xb, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 10, afsnit Xb, og opløses i 20 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C tilsættes 0,70 ml (5 millimol) Et_3N og derefter 2,30 g (5,5 millimol) N^α -Cbo-L-cyclohexylglycin-p-nitrophenylester (smeltepunkt $93 - 94^\circ\text{C}$). Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 10, afsnit Xb. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 33%'s AcOH. Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 400 μl (5 millimol) koncentreret HCl. Der fås 2,47 g (74,7% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_7\text{Cl}$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 54,50 H 6,25 N 16,95 Cl 5,36
 Fundet: C 54,15 H 6,33 N 17,18 Cl 5,18.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,97 - Gly: 1,00 - L-cyclohexylglycin: 1,05.

Eksempel 11.

XI. H-L-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.2HCl.

660 mg (1 millimol) af det ifølge eksempel 10 fremstillede N^α-Cbo-L-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.HCl deblokeres ifølge eksempel 10, afsnit Xb. Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 33% s AcOH.

Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 160 μ liter (2 millimol) koncentreret HCl. Der fås 465 mg (84,9% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₂H₃₆N₈O₄Cl₂ giver følgende resultat:

Beregnet: C 48,26 H 6,63 N 20,47 Cl 12,95
 Fundet: C 47,95 H 6,75 N 20,90 Cl 12,42.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,99 - Gly: 1,00 - L-cyclohexylglycin: 1,03.

Eksempel 12.

XII. N^α-Bz-L-cyclohexylglycin-Gly-Arg.pNA.HCl.

550 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 11 vundne forbindelse opløses i 10 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 140 μ liter (1 millimol) Et₃N og derefter 340 mg (1,5 millimol) Bz₂O. Efter nogle timer er reaktionsopløsningens

temperatur steget til 20°C. Opløsningen afkøles igen til -10°C og pufres med 140 μ liter (1 millimol) Et₃N. Efter yderligere 4 timers forløb tilsættes yderligere 140 ml Et₃N ved -10°C. Efter yderligere 16 timers forløb inddampes reaktionsopløsningen i vakuum ved 40°C til tørhed. Remanensen opløses i 20 ml MeOH. Ved gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20" søjle fås efter eluering med MeOH 530 mg endnu noget forurenset produkt. Til yderligere rensning opløses produktet i 33% AcOH og holdes på en med 33% AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15" søjle og elueres med 33% AcOH. Den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ liter (1 millimol) koncentreret HCl. Der fås 475 mg (75,3% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₉H₃₉N₈O₆Cl giver følgende resultat:

Beregnet: C 55,19 H 6,23 N 17,76 Cl 5,62

Fundet: C 54,92 H 6,34 N 17,96 Cl 5,51.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold:
Arg: 1,01 - Gly: 1,0 - L-cyclohexylglycin: 0,98.

Eksempel 13.

XIII. H-D-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.2HCl.

XIIIa. N ^{α} -Cbo-D-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.HCl.

2,85 g (5 millimol) af den ifølge eksempel 10, afsnit Xb, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 10, afsnit Xb, og opløses i 20 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 0,70 ml (5 millimol) Et₃N og derefter 2,30 g (5,5 millimol) N ^{α} -Cbo-D-cyclohexylglycin-p-nitrophenylester (smeltepunkt 93,5°C). Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 10, afsnit Xb.

Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 33% 's AcOH. Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 400 μ liter (5 millimol) koncentreret HCl. Der fås 2,55 g (77,1% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $C_{30}H_{41}N_8O_7Cl$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 54,50 H 6,25 N 16,95 Cl 5,36
 Fundet: C 54,01 H 6,30 N 17,05 Cl 5,28.

XIII. H-D-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.2HCl.

660 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 13, afsnit XIIIa, fremstillede N^{α} -Cbo-D-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.HCl deblokeres ifølge eksempel 10, afsnit Xb.

Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 33% 's AcOH. Udbytte: den del af AcOH-eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 160 μ liter (2 millimol) koncentreret HCl. Der fås 460 mg (84,0% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $C_{28}H_{36}N_8O_4Cl_2$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 48,26 H 6,63 N 20,47 Cl 12,95
 Fundet: C 48,05 H 6,73 N 20,91 Cl 12,50.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 1,01 - Gly: 1,00 - D-cyclohexylglycin: 0,97.

Eksempel 14.

XIV. N^{α} -Bz-D-cyclohexylglycyl-Gly-Arg.pNA.HCl.

550 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 13 fremstillede forbindelse opløses i 10 ml dimethylformamid. Efter afkøling til $-10^{\circ}C$

sættes til opløsningen 140 μ liter (1 millimol) Et_3N og derefter 340 mg (1,5 millimol) Bz_2O , og reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 12, afsnit XII.

Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 33%'s AcOH . Udbytte: den del af AcOH -eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ liter (1 millimol) koncentreret HCl . Der fås 450 mg (71,3% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_6\text{Cl}$ giver følgende resultat:

Beregnet:	C 55,19	H 6,23	N 17,76	Cl 5,62
Fundet:	C 54,70	H 6,25	N 18,01	Cl 5,55.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,96 - Gly: 1,00 - D-cyclohexylglycin: 0,98.

Eksempel 15.

XV. N^α -Cbo-Val-Gly-Arg-pNA.HCl.

2,85 g (5 millimol) af den ifølge eksempel 10, afsnit Xb, fremstillede forbindelse deblokeres ifølge eksempel 10, afsnit Xb, og opløses i 20 ml dimethylformamid. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 0,70 ml (5 millimol) Et_3N og derefter 2,05 g (5,5 millimol) Cbo-Val-OpNP. Reaktionsopløsningen viderebehandles ifølge eksempel 10, afsnit Xb.

Rensning: gelfiltrering på "Sephadex G-15" i 33%'s AcOH . Udbytte: den del af AcOH -eluatet, der kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 400 μ liter (5 millimol) koncentreret HCl . Der fås 2,55 g (82,1% af det teoretiske) af et amorft pulver, der ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_7\text{Cl}$ giver følgende resultat:

Beregnet: C 52,21 H 6,00 N 18,04 Cl 5,71
 Fundet: C 52,12 H 6,16 N 18,48 Cl 5,63.

Aminosyreanalysen giver de ventede aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 1,01 - Gly: 1,00 - Val: 0,97.

Eksempel 16

XVI. N^α-Bz-Val-Gly-Arg-2-Na.HCl

XVIa. N^α-Bz-Val-Gly-Arg-OH.HCl

5,9 g af forbindelsen I (eksempel 1) opløses i 200 ml puffer med pH-værdi 8,2. Til denne opløsning sættes 2000 NF-enheder trypsin for at fraspalte p-nitroanilinogruppen racemiseringsfrit, idet pH-værdien holdes konstant ved tildrypning af 1N natriumhydroxidopløsning. Efter endt reaktion tilsættes 40 ml koncentreret eddikesyre for at inaktivere trypsinet. Opløsningen inddampes til tørhed. Remanensen opløses i 50 ml 33%'s eddikesyre, og opløsningen chromatograferes på en "Sephadex G-15"-søjle, som er ækvilibreret med 33%'s eddikesyre. Fra den første fraktion fås 4,43 g (94,1%) af et amorft stof, som ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er rent.

Ved elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen C₂₀H₃₁N₆O₅Cl fås følgende resultat:

Beregnet: C 51,01 H 6,63 N 17,85 Cl 7,53
 Fundet: C 50,48 H 6,71 N 18,17 Cl 7,38.

XVIb. N^α-Bz-Val-Gly-Arg-2NA.HCl

I en tre-halset rundkolbe på 100 ml opløses 942 mg (2 millimol) af den tørrede forbindelse XVIa i en blanding af 7,5 ml frisk destilleret vandfrit dimethylformamid og 15 ml absolut tetrahydrofuran ved 20°C. Til den til den -10°C afkølede opløsning sættes under

omrøring og udelukkelse af fugtighed 280 μ liter (2 millimol) triethylamin. Til blandingen dryppes i løbet af 20 minutter en opløsning af 273 mg (2 millimol) chlormyresyre-isobutylester i 5 ml tetrahydrofuran, imedens reaktionstemperaturen ikke lades stige til over -5°C . Efter en yderligere reaktionstid på 10 minutter ved en temperatur på mellem -10 og -5°C dryppes der til reaktionsblandingen en opløsning af 286,4 mg (2 millimol) 2-naphthylamin i 5 ml dimethylformamid i løbet af 30 minutter, idet reaktionstemperaturen konstant holdes på under -5°C . Reaktionsblandingen lades viderereagere i yderligere 1 time ved -5°C . Den omrøres natten over ved -20°C og afkøles derefter til -15°C for at lade $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ udkrystallisere. Det dannede $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ frafiltreres og eftervaskes med lidt koldt dimethylformamid. Filtratet inddampes til tørhed ved 50°C i vakuum sammen med vaskeopløsningen. Remanensen opløses i 10 ml 33%'s eddikesyre og renses ved gelfiltrering på en med 33%'s eddikesyre ækvilibreret søjle af "Sephadex G-15". Den hovedfraktion af eddikesyreeluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af 2-naphthylamin, inddampes til tørhed ved 40°C i vakuum. Efter tørring af remanensen i vakuumbørreskab ved 50°C over P_2O_5 fås 506 mg (42,5% af det teoretiske) af den amorfe forbindelse XVI, som ifølge tyndtlagschromatografi i LMS C er ren. Elementaranalyse og beregning ud fra bruttoformlen giver følgende resultat:








Beregnet:	C 60,44	H 6,43	N 16,45	Cl 5,95
Fundet:	C 59,88	H 6,47	N 16,75	Cl 5,83.

Ved de i eksemplerne beskrevne metoder er syntetiseret en række yderligere substrater. Resultaterne af disse synteser er sammenstillet i nedenstående tabel.

Ek- sem- pel	Slutprodukt	Udgangsmaterialer (millimol)	Metode Udbytte %	Elementar- analyse Fundet & Ber. %	Amino- syre- ana- lyse
17	Bz-Val-Gly-Arg-4-MeO- 2NA.HCl	Forb. xVIA (2 mMol) 4-Methoxy-2-naphthyl-amin (2 mMol)	Eks. 16, xVIIb 38,7	C 59,06 H 6,50 N 15,83 Cl 5,55	Val:Gly:Arg 59,46 1,01 : 1,00 : 6,44 0,98 15,66 5,66
18	Cbo-Ala-Gly-Arg-pNA. HBr	2HBr.H-Gly-Arg-pNA (2 mMol) Cbo-Ala-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 10, Xc 82	C 46,76 H 5,28 N 17,75 Br 12,38	Ala:Gly:Arg 47,10 1,01 : 1,00 : 5,22 0,99 17,58 12,43
19	Cbo-Nleu-Gly-Arg-pNA. HBr	2HBr.H-Gly-Arg-pNA (2 mMol) Cbo-Nleu-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 10, Xc 79,4	C 49,19 H 5,82 N 16,68 Br 11,58	Nleu:Gly:Arg 49,40 1,02 : 1,00 : 5,78 1,00 16,49 11,76
20	Cbo-But-Gly-Arg-pNA. HBr	2HBr.H-Gly-Arg-pNA (2 mMol) Cbo-But.OpNP (2,2 mMol)	Eks. 10, Xc 80,6	C 47,73 H 5,45 N 17,40 Br 12,11	But:Gly:Arg 47,93 1,01 : 1,00 : 5,41 0,98 17,20 12,26
21	Cbo-CHA-Gly-Arg-pNA. HBr	2HBr.H-Gly-Arg-pNA (2 mMol) Cbo-CHA-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 10, Xc 75,9	C 51,55 H 6,08 N 15,77 Br 10,95	CHA:Gly:Arg 51,74 0,97 : 1,00 : 6,02 0,99 15,57 11,10

22	Ac-Val-Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) Eddikesyreanhydrid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 82,4	C 47,53 H 6,33 N 21,38 Cl 6,58	47,68 6,29 21,18 6,70	Val:Gly:Arg 1,01 : 1,00 : 0,98
23	Octanoyl-Val-Gly-Arg- pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) Octanoylchlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 82,5	C 52,45 H 7,47 N 18,61 Cl 5,57	52,89 7,40 18,28 5,78	Val:Gly:Arg 1,00 : 1,00 : 0,98
24	Stearoyl-Val-Gly-Arg- pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) Stearoylchlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 65,4	C 59,43 H 8,79 N 15,02 Cl 4,62	58,98 8,70 14,87 4,71	Val:Gly:Arg 1,01 : 1,00 : 0,98
25	Cbo-Gly-Val-Gly-Arg-pNA. HCl Mellemprodukt	Forb. II (2 mMol) Cbo-Gly-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 83,7	C 51,07 H 6,03 N 18,83 Cl 5,18	51,36 5,95 18,59 5,23	Val:Gly:Arg 1,02 : 1,00 : 1,00
26	H-Gly-Val-Gly-Arg-pNA. 2HCl	Forb. XXV (2 mMol) HBr/AcOH 2N (10 mMol)	Eks. 11 - 91,4	C 43,28 H 6,11 N 21,98 Cl 12,05	43,45 6,08 21,72 12,22	Val:Gly:Arg 1,01 : 2,00 : 0,99
27	Cbo-NH-(CH ₂) ₇ -CO-Val- Gly-Arg-pNA.HCl Mellemprodukt	Forb. II (2 mMol) Cbo-NH(CH ₂) ₇ -CO-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 79,4	C 54,76 H 6,93 N 16,75 Cl 4,60	55,14 6,88 16,54 4,65	Val:Gly:Arg 1,02 : 1,00 : 1,01

28	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{pNA} \cdot 2\text{HCl}$	Forb. XXVII(2 mMol) 2N HBr/AcOH (10 mMol)	Eks. 11 - 85,6	C H N Cl	48,58 7,20 19,21 10,51	48,79 7,13 18,97 10,67	Val:Gly:Arg 1,01 : 1,00 : 0,98
29	Cyclohexylcarbonyl-Val-Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) Cyclohexylcarboxyl- syre-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 81,2	C H N Cl	51,95 7,01 19,04 5,86	52,30 6,92 18,77 5,94	Val:Gly:Arg 1,02 : 1,00 : 0,99
30	Cbo-NH-CH ₂ -<H>-CO-Val-Gly-Arg-pNA.HCl Mellemprodukt	Forb. II (2 mMol) Cbo-NH-CH ₂ -<H>-CO- OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 75,6	C H N Cl	54,88 6,68 16,81 4,60	55,29 6,63 16,58 4,66	Val:Gly:Arg 1,01 : 1,00 : 1,01
31	$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\langle\text{H}\rangle-\text{CO}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{pNA} \cdot 2\text{HCl}$	Forb. XXX (2 mMol) 2N HBr/AcOH (10 mMol)	Eks. 11 - 88,4	C H N Cl	48,74 6,91 19,33 10,58	48,94 6,85 19,03 10,70	Val:Gly:Arg 0,99 : 1,00 : 0,98
32	Cbo-NH-<H>-CO-Val-Gly-Arg-pNA.HCl Mellemprodukt	Forb. II (2,0 mMol) Cbo-NH-<H>-CO-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 74,9	C H N Cl	54,28 6,53 17,02 4,67	54,72 6,48 16,89 4,75	Val:Gly:Arg 1,02 : 1,00 : 0,98
33	$\text{H}_2\text{N}-\langle\text{H}\rangle-\text{CO}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Arg}-\text{pNA} \cdot 2\text{HCl}$	Forb. XXXII(2 mMol) 2N HBr/AcOH (10 mMol)	Eks. 11 - 85,7	C H N Cl	48,06 6,72 19,58 10,68	48,15 6,68 19,44 10,93	Val:Gly:Arg 1,00 : 1,00 : 0,98

34	CH ₃ -  -CO-Val-Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) 4-Methylbenzoyl-chlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 74,5	C H N Cl	53,28 6,21 18,68 5,89	53,59 6,16 18,52 5,86	Val:Gly:Arg 0,99 : 1,00 : 0,97
35	Cbo-NH-  -CO-Val-Gly-Arg-pNA.HCl Mellemprodukt	Forb. II (2 mMol) Cbo-NH-  -CO-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 67,8	C H N Cl	54,85 5,76 17,33 4,71	55,17 5,72 17,03 4,79	Val:Gly:Arg 0,98 : 1,00 : 0,98
36	H ₂ N-  -CO-Val-Gly-Arg-pNA.2HCl	Forb. XXXV (2 mMol) 2N HBr/AcOH (2,2 mMol)	Eks. 11 - 83,0	C H N Cl	48,40 5,82 19,80 10,81	48,60 5,80 19,12 11,04	Val:Gly:Arg 0,99 : 1,00 : 0,97
37	Cbo-NH-CH ₂ -  -CO-Val-Gly-Arg-pNA.HCl Mellemprodukt	Forb. II (2 mMol) Cbo-NH-CH ₂ -  -CO-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 76,3	C H N Cl	55,51 5,93 16,99 4,58	55,73 5,88 16,71 4,70	Val:Gly:Arg 1,00 : 1,00 : 0,98
38	H ₂ N-CH ₂ -  -CO-Val-Gly-Arg-pNA.2HCl	Forb. XXXVII (2 mMol) 2N HBr/AcOH (10 mMol)	Eks. 11 - 70,9	C H N Cl	49,12 6,05 19,43 10,50	49,39 5,99 19,20 10,80	Val:Gly:Arg 0,99 : 1,00 : 0,99
39	4-Phenylbutyryl-Val-Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) 4-Phenylbutyryl-OpNP (2,2 mMol)	Eks. 12 - 77,3	C H N Cl	54,88 6,55 17,81 5,48	55,01 6,53 17,70 5,60	Val:Gly:Arg 1,01 : 1,00 : 0,98

40	Tos-Val-Gly-Arg-pNA HCl	Forb. II (2 mMol) Tosylchlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 80,5	C 48,60 H 5,83 N 17,88 Cl 5,45	48,71 5,82 17,48 5,53	Val:Gly:Arg 1,02: 1,00 : 0,99
41	Benzensulfonyl-Val- Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) Benzensulfonyl- chlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 84,1	C 47,63 H 5,66 N 17,89 Cl 5,53	47,88 5,63 17,87 5,65	Val:Gly:Arg 1,00 : 1,00 : 0,97
42	β -Naphthalensulfonyl- Val-Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) 2-Naphthalensul- fonylchlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 78,3	C 51,14 H 5,55 N 16,78 Cl 5,18	51,44 5,51 16,55 5,24	Val:Gly:Arg 0,99 : 1,00 : 0,99
43	Methansulfonyl-Val- Gly-Arg-pNA	Forb. II (2 mMol) Methansulfonyl- chlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 75,5	C 42,29 H 5,94 N 20,01 Cl 6,11	42,51 5,89 19,83 6,27	Val:Gly:Arg 0,98 : 1,00 : 1,01
44	Ethansulfonyl-Val- Gly-Arg-pNA.HCl	Forb. II (2 mMol) Ethansulfonyl- chlorid (2,2 mMol)	Eks. 12 - 71,4	C 43,28 H 6,13 N 19,55 Cl 6,03	43,56 6,09 19,35 6,12	Val:Gly:Arg 0,98 : 1,00 : 0,98

E = enzym

S = substrat

ES = enzym-substrat-complex

P₁ og P₂ = produkter

k₁, k₂, k₃ og k₄ = hastighedskonstanter

dissociationskonstant for ES = $\frac{k_2}{k_1} = K_m$ (Michaelis-konstant)

Når [S] » [E] og k₄ < k₃, gælder:

$$K_m = \frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} \quad (1)$$

Den hastighed, ved hvilken P₁ dannes, er:

$$v = k_3 \cdot [ES]$$

$$v = \frac{k_3 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Når E er fuldstændig bundet til S, gælder:

$$[ES] = [E] \text{ og}$$

$$v = v_{\max} = k_3 \cdot [E] \quad (3)$$

Lineweaver-Burk-ligning:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (4)$$

Af ligning (2) fremgår det, at konstanterne K_m og k_3 bestemmer substratets aktivitet for et givet enzym. Til bestemmelse af disse konstanter anvendes følgende metode:

Enzymet og substratet blandes i en pufferopløsning, og hydrolyse-reaktionen følges i 2 - 30 minutter. Substratets koncentration $[S]$ varieres, medens enzymkoncentrationen holdes konstant. Når ekstinktionen (OD = optisk tæthed) optegnes i et koordinatsystem som funktion af tiden, fås en kurve, hvis tangent i nulpunktet svarer til det ideelle forløb af hydrolysen. Ved hjælp af denne tangent kan hydrolysebegyndelsehastigheden bestemmes.

Når $\frac{1}{v}$ optegnes som funktion af $\frac{1}{[S]}$, fås et Lineweaver-Burk-diagram

(jfr. "Kurzes Lehrbuch der Biochemie" af P. Karlson, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967, side 70), ud fra hvilket v_{max} og K_m kan bestemmes grafisk.

K_m og $k_3 = \frac{v_{max}}{[E]}$ bestemmes som angivet nedenfor under anvendelse af et substrat ifølge opfindelsen, f.eks. N^{α} -Bz-Val-Gly-Arg-pNA.HCl (substrat I ifølge eksempel 1), for urokinase og trypsin. Resultaterne er sammenfattet i nedenstående tabel I.

Tabel I

Urokinase-aktivitet målt ved hjælp af et tripeptidderivat ifølge opfindelsen som substrat.

Substrat	K_m (mol/liter)	v_{max} (μ mol/minut)
N-Bz-Val-Gly-Arg-pNA.HCl	$6,06 \times 10^{-5}$	$7,27 \times 10^{-5}$ pr. 1 CTA

Trypsin-aktivitet målt ved hjælp af et tripeptidderivat ifølge opfindelsen som substrat.

H-D-Val-Gly-Arg-pNA.2HCl	$1,83 \times 10^{-5}$	$4,17 \times 10^{-3}$ pr. 1 NF
--------------------------	-----------------------	--------------------------------

En NF-enhed trypsin er den mængde enzym, som bevirker en absorptionsændring ΔOD på 0,003 pr. minut, målt på benzoyl-L-arginin-ethylester under normale betingelser (jfr. "The National Formulary XII", udgivet af "The American Pharmaceutical Association", Washington D.C., 1965, side 417 og 418).

En CTA-enhed er den mængde urokinase, som af N-acetyl-L-lysin-methylester frigør $46,2 \times 10^{-3}$ μ mol methanol på 1 time ved $37^{\circ}C$ (jfr. N.U. Bang et al., "Thrombosis and Bleeding Disorders", Georg Thieme Verlag, 1971, side 377).

De ved hjælp af andre substrater ifølge opfindelsen for urokinase og trypsin beregnede værdier af K_m og v_{max} er af samme størrelsesorden. Af de konstaterede K_m -værdier fremgår det, at substraterne ifølge opfindelsen har særlig høj følsomhed over for urokinase og trypsin. Som sammenligningsværdier anvendes K_m -værdierne fra acetyl-L-lysin-methylester for urokinase og fra benzoyl-L-arginin-ethylester for trypsin. Disse K_m -værdier ligger ca. en tiendepotens højere end de tilsvarende værdier for tri- og tetrapeptidderivatene ifølge opfindelsen og andrager ca. 10^{-4} mol/liter, hvilket svarer til en følsomhed på ca. en tiendedel.

Til bestemmelse af de i tabel I anførte kinetiske konstanter K_m og v_{max} fremstilles vandige fortyndingsrækker af substraterne med koncentrationer på 0,1 - 2 μ mol/ml. I en målecuvette optages 2 ml tris-imidazol-puffer med pH-værdi 8,4 og ionstyrke 0,30 ved $37^{\circ}C$, hvorefter der først tilsættes 0,25 ml af en vandig urokinaseopløsning med en koncentration på 400 CTA/ml. Blandingen forinkuberes i 1 minut ved $37^{\circ}C$. Den forinkuberede blanding tilsættes derefter 0,25 ml substratopløsning. Forløbet af den enzymatiske hydrolyse af substratet følges for de forskellige substratkoncentrationer ved hjælp af et fotometer i 10 minutter ved 405 nm. Værdien af den pr. minut dannede mængde p-nitroanilin er et mål for hydrolysehastigheden for en given substratkoncentration. I et koordinatsystem optegnes som abscisse den reciprokke værdi af substratkoncentrationerne, som ordinat den tilhørende reciprokke værdi af hydrolysehastigheden. I dette såkaldte Lineweaver-Burk-diagram fås for de i tabel I an-

førte substrater lige kurver, hvilket er et bevis for, at den af urokinase forårsagede hydrolyse af substratet følger Michaelis-Menten's lov, hvorfor substraterne er ideelle til bestemmelse af urokinase. Ud fra kurvernes skæringspunkter med abscissen og ordinanten bestemmes de i tabel I anførte kinetiske konstanter K_m og v_{max} . På analog måde bestemmes de tilsvarende K_m - og v_{max} -værdier for trypsin.

Tabel II

Urokinase-aktivitet, målt ved hjælp af substraterne ifølge opfindelsen ved konstant substrat- og urokinasekoncentration, ved 37°C, pH-værdi 8,4 og ionstyrke 0,3.

Substrat	Mængde af det af 100 CTA-enheder urokinase i 1 minut dannede spaltningprodukt R ^H i nanomol
I	3,64 pNA
II	0,92 pNA
III	3,21 pNA
IV	1,00 pNA
V	2,82 pNA
VI	2,91 pNA
VII	1,73 pNA
VIII	1,32 pNA
IX	1,13 pNA
X	1,50 pNA
XI	1,33 pNA
XII	3,56 pNA
XIII	1,78 pNA
XIV	1,05 pNA
XV	1,12 pNA
XVI	2,41 2NA
XVII	2,19 4-MeO-2NA
XVIII	0,88 pNA
XIV	0,41 pNA
XX	0,29 pNA
XXI	0,75 pNA

Tabel II fortsat

XXII	1,75 pNA
XXIII	1,66 pNA
XXIV	1,40 pNA
XXVI	2,93 pNA
XXVIII	2,48 pNA
XXIX	3,58 pNA
XXXI	1,64 pNA
XXXIII	2,22 pNA
XXXIV	3,39 pNA
XXXVI	2,11 pNA
XXXVIII	2,67 pNA
XXXIX	2,01 pNA
XL	2,59 pNA
XLI	2,71 pNA
XLII	2,48 pNA
XLIII	2,89 pNA
XLV	3,01 pNA

Tegningen viser en grafisk afbildning, hvor ændringen af den optiske tæthed ΔOD , der er fremkaldt ved den hydrolytiske indvirkning af forskellige mængder urokinase på substrat I i løbet af 10 minutter, er optegnet som funktion af urokinasemængden i et koordinatsystem. Af denne figur fremgår det, at urokinasekoncentrationen kan bestemmes nøjagtigt i området mellem 1 og 10 CTA/ml. Ved bestemmelse af urokinase-indholdet i urin fra 14 sunde forsøgspersoner er der fundet værdier på ca. 8 CTA-enheder/ml urin.

Bestemmelsen af urokinase i urin er særlig vigtig, da det herved, som ovenfor anført, er muligt at konstatere patologiske tilstande forholdsvis simpelt og hurtigt. Den tidligere, oftest anvendte metode til bestemmelse af urokinase i urin er den såkaldte fibrinplademetode [I. Bjerrehaus, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 179 (1952); F.E. Smyrniotis et al., Thromb. Diath. et Haemorrh. Bd. III, 258 (1959)], der udføres på følgende måde: Efter Mullertz' metode [Acta physiol. Scand. 26, 174 (1954)] fremstilles fibrinplader (fibrinogenindhold: 0,2%). Til hver urokinasebestemmelse anvendes en fibrinplade og 30 lambdaadråber (lambdaadråbepipette) af uforyndet, 1:2 og 1:4 fortyndet urin (når urokinasekoncentrationen

er meget høj, kan fortyndingsfaktoren fordobles). Pladerne inkuberes i 16 timer ved 30°C. De lyserede zoner gøres synlige ved til sætning af en dråbe kongorødt (0,1%'s). Produktet af to vinkelret på hinanden stående diametre (de lyserede zoner) tjener som mål for de lyserede zoner. Urokinasekoncentrationen (enheder/ml) bestemmes ved hjælp af en sammenligningskurve, der er opstillet ved anvendelse af en fortyndingsrække med standard-urokinase.

Ved denne metode bestemmes urokinasekoncentrationen ikke direkte, men via den ud fra plasminogen med urokinase dannede plasminmængde. Denne via en række reaktioner foretagne bestemmelse af slutprodukterne er behæftet med mange fejlkilder. Yderligere tungtvejende ulemper ved denne metode ligger i, at inkubationstiden er meget lang, og at der til hver bestemmelse skal opstilles en justérkurve. Vurderingen af resultaterne er endvidere forholdsvis komplikeret og på grund af justérkurvens ikke-linearitet unøjagtig.

Ved hjælp af substraterne ifølge opfindelsen kan den ovenfor beskrevne bestemmelsesmetodes ulemper let overvindes, da målingen af urokinasekoncentrationen foretages direkte, og måleresultatet ikke forfalskes af bireaktioner. Endvidere er måleresultaterne tilgængelige allerede efter 10 minutters forløb, hvilket er særlig vigtigt for den kliniske diagnostik.

Når plasminogen-aktivatorer skal bestemmes i blodplasma eller urin, f.eks. når urokinase skal bestemmes i urin, er det ofte hensigtsmæssigt at udføre bestemmelsen i en pufferopløsning, som indeholder aprotinin og/eller hirudin, da disse ikke virker hæmmende på plasminogen-aktivatorerne, men hæmmer andre, eventuelt tilstedeværende aktiverede plasmaenzymmer, f.eks. thrombin, plasmin og plasma-kallikrein, som under visse omstændigheder kan virke forstyrrende på bestemmelsen af plasminogen-aktivatorerne. Man kan f.eks. anvende en tris-imidazol- eller glycin-puffer med en pH-værdi på 8,2 - 8,6 og en ionstyrke på 0,15 - 1,0, til hvilken der er sat 0,02 - 0,2 trypsin-inhibitor-enheder aprotinin og/eller 0,001 - 10 antithrombin-enheder hirudin/ml.

Når man vil bestemme inhibitorspejlet i legemsvæsker eller vævs-ekstrakter, som indeholder inhibitorer for urokinase, sætter man til legemsvæskerne eller vævsekstrakterne et afmålt overskud af urokinase, inkuberer blandingen i nogle minutter og bestemmer den resterende ikke-inhiberede urokinaseaktivitet ved tilsætning af substratet og måling af mængden af spaltningsproduktet. Af differencen mellem den anvendte urokinasemængde og den resterende ikke-inhiberede mængde urokinase beregnes den oprindeligt tilstedeværende inhibitormængde.

Det har endvidere som nævnt vist sig, at substraterne ifølge opfindelsen på grund af deres særlige konformation også er meget følsomme over for trypsin og kan spaltes katalytisk af trypsin med uventet høje hastigheder. De hidtil ukendte substrater er derfor særligt velegnede til bestemmelse af trypsin i duodenalsaft og i blod ved akut pancreatitis, hvor trypsin er kommet ud i blodbanen, men dog kun optræder i meget lav koncentration på grund af det høje blodvolumen. De tidligere til bestemmelse af trypsin anvendte kendte substrater er alt for ufølsomme til bestemmelse af sådanne lave koncentrationer.

Bestemmelsen af trypsin i duodenalsaft kan f.eks. udføres på følgende måde: I en målecuvette optages 1,79 ml tris-imidazol-puffer med en pH-værdi på 8,4 og en ionstyrke på 0,30 ved 37°C, og der iblandes 0,01 ml duodenalsaft. Herefter blandes blandingen hurtigt med 0,2 ml af en 2×10^{-3} M opløsning af et substrat ifølge opfindelsen. Man bestemmer den af trypsinet fra substratet i reaktionsblandingen frigjorte mængde p-nitroanilin, idet man måler ændringen af den optiske tæthed $\Delta OD/\text{minut}$ ved en bølgelængde på 405 nm. Mængden af det pr. minut frigjorte p-nitroanilin eller tilsvarende ændringen i den optiske tæthed er proportional med trypsinaktiviteten. Ved anvendelse af det ifølge eksempel 10 fremstillede substrat, N^{α} -Cbo-cyclohexylglycyl-Gly-Arg-pNA.HCl, kan man f.eks. bestemme trypsinmængder ned til under 0,01 NF-enheder trypsin/ml i prøven.

I den nedenstående tabel III er angivet den ved hjælp af substraterne ifølge opfindelsen ved konstant substratkoncentration og enzymkoncentration målte aktivitet af kvægtrypsin.

Tabel III

Aktivitet af kvægtrypsin, målt ved hjælp af substraterne ifølge opfindelsen ved konstant substrat- og enzymkoncentration. Til sammenligning er angivet de tilsvarende med N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl og N^{α} -Bz-DL-Arg-pNA.HCl opnåede værdier.

Substratkoncentration Mængde af det pr. minut af 1 NF-
 $2 \times 10^{-4}M$ -enhed trypsin fra substraterne
 enzymatisk frigjort spaltningsprodukt R^2H
 i nanomol

N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl	8,4	pNA
N^{α} -Bz-DL-Arg-pNA.HCl	0,45	pNA
I	20,9	pNA
II	10,8	pNA
III	28,5	pNA
IV	19,2	pNA
V	15,9	pNA
VI	19,1	pNA
VII	25,7	pNA
VIII	14,2	pNA
IX	17,5	pNA
X	46,7	pNA
XI	20,0	pNA
XII	37,9	pNA
XIII	28,8	pNA
XIV	41,9	pNA
XV	41,3	pNA
XVI	16,4	2NA
XVII	16,8	4-MeO-2NA
XVIII	24,5	pNA
XIX	33,9	pNA
XX	28,1	pNA
XXI	35,6	pNA

Tabel III fortsat

XXII	19,9	pNA
XXIII	24,1	pNA
XXIV	12,4	pNA
XXVI	19,9	pNA
XXVIII	15,8	pNA
XXIX	21,6	pNA
XXXI	15,0	pNA
XXXIII	19,1	pNA
XXXIV	22,4	pNA
XXXVI	18,5	pNA
XXXVIII	14,0	pNA
XXXIX	22,9	pNA
XL	25,4	pNA
XLI	24,8	pNA
XLII	22,0	pNA
XLIII	29,1	pNA
XLIV	31,2	pNA

De i tabel III angivne resultater er opnået under følgende reaktionsbetingelser: I en cuvette blandes 1,7 ml tris-imidazol-puffer med en pH-værdi på 8,4 og en ionstyrke på 0,30 ved 37°C med 0,1 ml af en vandig trypsinopløsning med en koncentration på 2 NF-enheder/ml. Til blandingen sættes 0,2 ml af en $2 \times 10^{-3}M$ opløsning af det substrat, der skal afprøves. Derefter bestemmes den af trypsin fra substratet frigjorte p-nitroanilinmængde, idet ændringen af den optiske tæthed Δ OD/minut måles ved en bølgelængde på 405 nm.

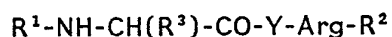
Til bestemmelse af inhibitorer for plasminogen-aktivatorer, f.eks. af urokinaseinhibitorer, gås der f.eks. frem på den måde, at en afmålt mængde urokinase inkuberes med en urokinaseinhibitorholdig legemsvæske i nærværelse eller fraværelse af et puffersystem, den inkuberede blanding fortyndes med tris-imidazol-puffer til et rumfang på 1,8 ml, og den fortyndede blanding tilsættes 0,2 ml $2 \times 10^{-3}M$ opløsning af et substrat ifølge opfindelsen. Ved måling af ændringen af den optiske tæthed/minut bestemmes den ikke-hæmmede urokinaseaktivitet. Forskellen mellem den anvendte urokinasemængde og den resterende urokinaseaktivitet er et mål for den tilstedeværende inhibitor mængde. Efter samme metode kan trypsininhibitorer bestemmes.

Til bestemmelse af plasminogen-præaktiverer i plasma aktiveres disse først kvantitativt, hvorefter de derved dannede plasminogen-aktivatorer bestemmes ved hjælp af de omhandlede substrater. Aktivering af plasminogen-præaktiverer foretages ved, at plasma efter tilsætning af et aktivt Hagemann-faktor-præparat inkuberes optimalt, og til inkubatet sættes en aprotininholdig tris-imidazol-puffer for at hæmme de ved aktivering af plasminogen-præaktiverer dannede andre enzymer, især plasma-kallikrein og plasmin.

Til bestemmelse af trypsinogen i legemsvæsker tilsættes disse en aktivator, f.eks. chymotrypsin, for at omdanne trypsinogenet til trypsin, som derefter kan bestemmes ved hjælp af et substrat ifølge opfindelsen på den ovenfor beskrevne måde.

PATENTKRAV

1. Tri- eller tetrapeptider eller salte deraf med mineralsyrer eller organiske syrer til anvendelse som substrat til kvantitativ bestemmelse af plasminogen-aktivatorer, inhibitorer for disse og plasminogen-præaktiverer samt trypsin, trypsin-inhibitorer og trypsinogen i legemsvæsker hos mennesker og pattedyr og i vævsekstrakter,
k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel



hvor R^1 betegner hydrogen, en eventuelt i ω -stilling med amino substitueret alkanoylgruppe med 2-18 carbonatomer, en phenylalkanoylgruppe, hvis alkanoyldel indeholder 2-6 carbonatomer, og hvis phenyldel eventuelt er substitueret med en aminogruppe, en eventuelt med amino eller aminomethyl substitueret cyclohexylcarbonylgruppe, en eventuelt med methyl, amino eller aminomethyl substitueret benzoylgruppe, en benzyloxycarbonylgruppe eller en methyl-, ethyl-, phenyl-, methylphenyl- eller naphthylsulfonylgruppe, R^3 betegner en ligekædet eller forgrenet alkylgruppe med 1-4 carbonatomer eller en cyclohexyl- eller cyclohexylmethylgruppe, Y betegner en glycyll- eller serylgruppe, og R^2 betegner en p-nitrophenylamino-, 2-naphthylamino- eller 4-methoxy-2-naphthylaminogruppe.

2. Fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af plasminogenaktivatorer og trypsin i legemsvæsker hos mennesker og pattedyr og i vævsekstrakter, k e n d e t e g n e t ved, at de nævnte legemsvæsker eller vævsekstrakter omsættes med et tri- eller tetrapeptidderivat ifølge krav 1, og mængden af det ved den enzymatiske hydrolytiske virkning af plasminogenaktivatorerne eller af trypsinet på tri- eller tetrapeptidderivatet dannede spaltningsprodukt R^2H bestemmes ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensfotometriske metoder.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2 til bestemmelse af urokinaseindholdet i urin k e n d e t e g n e t ved, at bestemmelsen udføres i nærværelse af en aprotinin- og/eller hirudinholdig puffer.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 og 3, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en puffer, som har en pH-værdi på 8,2-8,6 og en ionstyrke på 0,15-1,00 og indeholder 0,02-0,2 trypsinenheder aprotinin og/eller 0,001-10 antithrombinenheder hirudin/ml.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 2 til bestemmelse af indholdet af inhibitorer for urokinase i legemsvæsker eller vævsekstrakter, k e n d e t e g n e t ved, at der til legemsvæskerne eller vævsekstrakterne sættes et afmålt overskud af urokinase, hvorefter man efter inkubering i nogle minutter ved tilsætning af et tri- eller tetrapeptidderivat ifølge krav 1 og måling af mængden af det frigjorte spaltningsprodukt R^2H bestemmer den resterende ikke-inhiberede urokinaseaktivitet og af differencen mellem den anvendte urokinasemængde og den ikke-inhiberede restmængde urokinase beregner den oprindeligt tilstedeværende inhibitormængde.

Fremdragne publikationer:

US patenter nr. 3862011, 3886136

J.Org.Chem. 30 (1965) 1781-1785

Arch.Biochem. & Biophys. 108 (1964) 266-274.

