

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 490 222

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 17406

(54) Dérivés de la phénylalanylarginine, procédé pour leur préparation et procédé de mesure de l'activité d'enzymes utilisant ceux-ci.

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

(22) Date de dépôt..... 15 septembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Japon, 16 septembre 1980, n° 128270/80.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 11 du 19-3-1982.

(71) Déposant : Société dite : TORII & CO., LTD., résidant au Japon.

(72) Invention de : Setsuro Fijii, Mamoru Sugimoto et Takashi Yaegashi.

(73) Titulaire : *Idem* (71) Protection des Inventions,
25, rue de Ponthieu, 75008 Paris.

(74) Mandataire :

La présente invention concerne un dérivé de la phénylalanylarginine, un procédé pour sa production et un procédé de mesure d'activité d'enzymes utilisant ce composé comme substrat.

5 Jusqu'à présent, on connaissait de nombreux procédés pour la mesure de l'activité des enzymes. L'un d'entre eux consiste à mettre en contact un ester alkylique d'un acide aminé en tant que substrat, avec une enzyme et à déterminer l'activité de l'enzyme à partir du degré d'hydrolyse de l'ester alkylique. On citera comme exemple de ces procédés, le procédé bien connu de Hestrin. Il s'agit d'un procédé qui consiste à mettre en contact une enzyme avec un ester alkylique d'un acide aminé, à convertir le groupe ester restant au bout d'une période de temps donné avec de l'hydroxylamine... en un acide hydroxamique, à le laisser réagir avec du chlorure ferrique jusqu'à ce qu'il apparaisse une couleur, et à mesurer la couleur en temps qu'absorbance, puis à déterminer l'attitude de l'enzyme à hydrolyser l'ester, c'est à dire, l'activité de l'enzyme, à partir de l'absorbance.

10

15

20

En outre, il existe un procédé dans lequel on utilise un paranitroanilide d'un acide aminé comme substrat et dans lequel on utilise l'aptitude à hydrolyser celui-ci comme indice, etc. Dans ces procédés, une très grande quantité d'enzymes est nécessaire et lorsque la concentration en enzymes est faible, ou lorsque celle-ci présente une faible activité, il est difficile de mesurer l'activité de l'enzyme.

25

30

35

La demanderesse a poursuivi des études approfondies sur des composés satisfaisant les trois conditions suivantes : il présente une affinité vis à vis d'une enzyme, la détermination de leur quantité est aisée, et leur sensibilité de détection est satisfaisante. En conséquence, la demanderesse a découvert des

composés utilisables comme substrats qui présentent d'excellentes propriétés en ce qui concerne les conditions mentionnées ci-dessus, par comparaison aux composés classiques, ainsi qu'un procédé simple pour mesurer 5 l'activité des enzymes en utilisant ses composés.

La présente invention a pour objet de fournir un nouveau dérivé d'acide aminé utilisable comme substrat d'excellente qualité pour une enzyme.

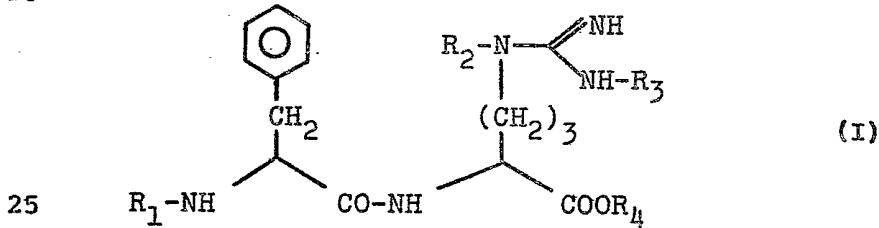
Un autre but de l'invention est de fournir 10 un procédé de production de ce nouveau dérivé d'acide aminé.

L'invention a également pour but de fournir un procédé pour mesurer l'activité d'une enzyme utilisant ce nouveau dérivé d'acide aminé comme substrat pour 15 l'enzyme.

D'autres buts et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description ci-après.

L'invention concerne un dérivé de la phénylalanylarginine répondant à la formule :

20



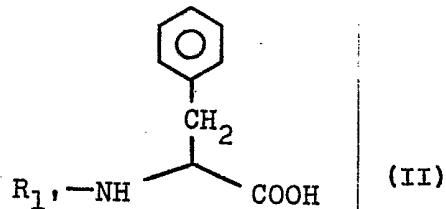
25

30 dans laquelle R_1 est l'hydrogène ou un groupe de protection des radicaux amino ; R_2 et R_3 sont l'hydrogène ou des groupes de protection des radicaux guanidino ; et R_4 est un naphtyle.

35 L'invention fournit en outre un procédé pour la production d'un dérivé de la phénylalanylarginine répondant à la formule (I), qui consiste à soumettre à

une déshydratation-condensation un composé (II) répondant à la formule :

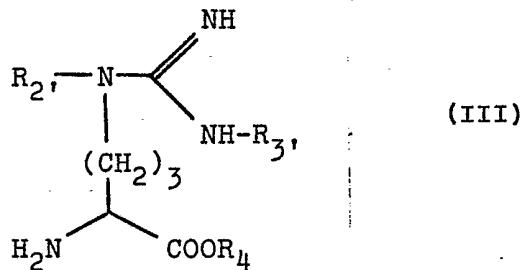
5



10

dans laquelle R₁ représente un groupe de protection de radicaux amino, et un dérivé d'arginine (III) répondant à la formule :

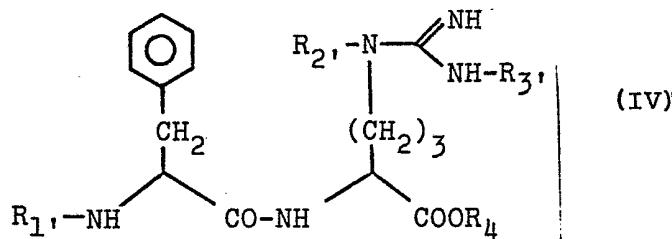
15



20

dans laquelle R₂ et R₃ sont des groupes de protection des radicaux guanidino et R₄ est tel que défini ci-dessus, par un procédé classique, ce qui donne un composé (IV) répondant à la formule :

25



5 dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , et R_4 sont tels que définis ci-dessus, puis si nécessaire, à éliminer le groupe de protection des radicaux amino et/ou le groupe de protection des radicaux guanidino du composé (IV) par un procédé classique.

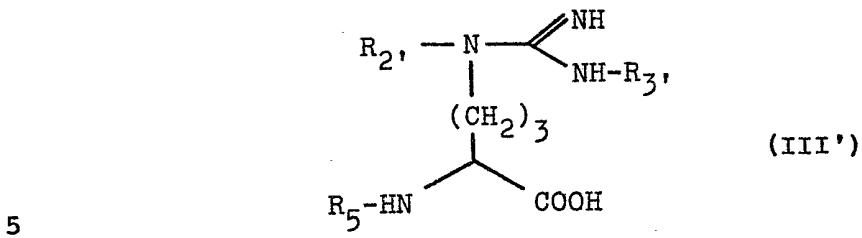
10 L'invention concerne en outre un procédé pour mesurer l'activité d'une enzyme qui consiste à mettre en contact un dérivé de la phénylalanylarginine répondant à la formule (I) en tant que substrat, avec l'enzyme.

15 Dans les formules (I), (II), (III) et (IV), le groupe de protection des radicaux aminos peut être un groupe de protection couramment utilisé dans la synthèse d'une peptide, telle qu'un radical t-butyloxycarbonyle, benzyloxycarbonyle, acétyle, benzoyle, tosyle, etc, parmi lesquelles on préfère l'acétyle et le benzoyle. Le groupe de protection des radicaux guanidinos peut être un groupe couramment utilisé dans la synthèse d'une peptide tel qu'un radical nitro, tosyle, benzyloxycarbonyle etc, ou bien le groupe guanidino peut donner naissance à un sel d'addition aux acides par addition de protons. Parmi ceux-ci on préfère le benzyloxycarbonyle.

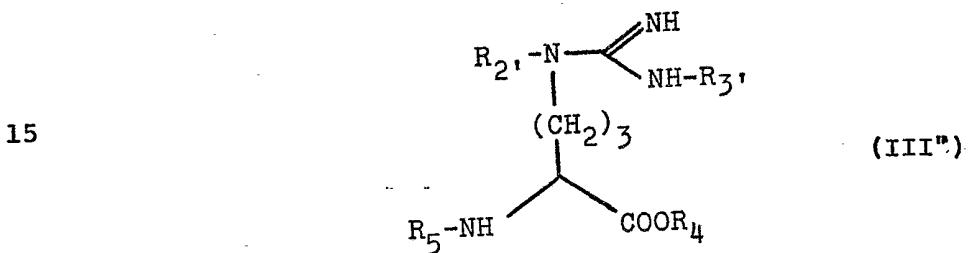
20

25 Le composé de départ (II) utilisé dans la production du composé (I) de l'invention peut être n'importe quel composé disponible dans le commerce.

30 Le dérivé d'arginine de départ (III) peut être le trifluoroacétate de l'ester N^{δ}, N^{ω} -dibenzyloxy-carbonyl-L-arginine 1-naphtylique, etc, et peut être préparé par naphtylation d'un dérivé d'arginine (III') ayant un groupe protecteur adéquate, répondant à la formule :



10 dans laquelle R_2 , et R_3 , sont tels que définis ci-dessus, et R_5 représente un groupe de protection des radicaux aminos différent des groupes R_2 , et R_3 , ce qui donne un composé (III'') répondant à la formule :



20 dans laquelle R_2 , R_3 , R_4 et R_5 sont tels que définis ci-dessus, puis en n'éliminant sélectivement que le groupe protecteur des radicaux amino se trouvant sur la position α du composé (III'').

25 Pour produire le composé (IV), on dissout le composé (II) et le dérivé d'arginine (III) dans un solvant approprié, et on ajoute à la solution obtenue un agent d'activation classique tel que le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le diphenylphosphorylazide (DPPA), un chlorocarbonate d'alkyle, etc, puis, si nécessaire, on y ajoute une base telle que la triéthylamine, etc et on ajoute le mélange obtenu, ce qui donne le composé (IV). Comme solvant, on peut utiliser des solvants classiques tels que le chloroforme,

le dichlorométhane, le diméthylformamide, le tétrahydrofurane, etc, pour autant que les produits de départ puissent y être dissous. La température réactionnelle peut être comprise entre 0° et 40°C.

5 Une fois la réaction achevée, on peut isoler le composé (IV) du mélange réactionnel par un traitement classique. Plus précisément, lorsqu'on utilise comme agent d'activation du DCC, on élimine par filtration la dicyclohexylurée (DCU) précipitée, et on ajoute au filtrat un solvant d'extraction appropriée tel que l'acétate d'éthyle, et on lave ensuite l'extrait avec une solution aqueuse d'acide citrique, une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium ou une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, on le séche sur du sulfate de magnésium anhydre, puis on l'évapore sous pression réduite pour éliminer le solvant, ce qui donne le composé (IV).

20 On élimine le groupe de protection des radicaux amino et/ou le groupe de protection des radicaux guanidinos du composé (IV) par un procédé classique. Plus précisément, lorsque le groupe de protection des aminos et le groupe de protection des guanidino sont le benzyloxycarbonyle, on dissout le composé (IV) dans un solvant adéquat et on ajoute à la solution obtenue 25 un catalyseur tel que du palladium sur carbone, ou un produit de ce type, pour éliminer par réduction le groupe protecteur, ou bien on ajoute le composé (IV) à une solution d'acide bromhydrique dans de l'acide acétique et on filtre le composé recherché précipité, 30 ce qui donne le composé (I).

35 Le composé (I) de l'invention est utilisable comme substrat d'excellente qualité pour diverses enzymes telles que la trypsine, la plasmine, la kallikréine l'urokinase, la Cl-éstérase, la thrombine, etc. C'est précisément, lorsque l'on met le composé (I) de l'invention en contact avec une enzyme, le composé joue le

rôle d'un substrat et du naphtol est libéré par hydrolyse par l'enzyme au bout d'un temps donné, puis on mesure la quantité de naphtol pour déterminer l'activité de l'enzyme. Le fait que l'activité d'une enzyme puisse 5 être mesurée facilement est d'une très grande importance pour l'analyse quantitative d'une préparation d'enzyme, les diagnostics par mesure du tableau enzymatique dans le sang, pour les diagnostics par mesure de la concentration en enzymes du sang ou de l'urine, etc.

10 Lorsqu'on mesure l'activité d'une enzyme par le procédé de l'invention, on met en contact l'enzyme avec une quantité donnée du composé (I) de l'invention dans une solution tampon appropriée, puis au bout d'un temps donné, à une température donnée, on mesure la 15 quantité de naphtol libéré, déterminant ainsi l'activité de l'enzyme. La solution tampon peut être une solution appropriée ayant le ph optimale vis-à-vis de l'enzyme. La réaction peut s'effectuer dans des conditions stables appropriées en ce qui concerne la température et la durée, bien qu'il soit préférable de mesurer la quantité de naphtol libérée à une température 20 de 25° à 37°C au bout de 30 minutes.

La mesure de la quantité de naphtol peut s'effectuer par l'un quelconque des procédés connus, 25 comme par exemple un procédé physico-chimique tel que la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie sur couches minces, etc ; ou par un procédé chimique telle que la réaction avec le chlorure ferrique, la réaction de copulation avec un diazoïque, la 30 méthode du sel Fast Violet B (FVB), etc, bien que l'on préfère un procédé qui consiste à ajouter du FVB au mélange réactionnel afin de développer une couleur et à mesurer l'absorbance au moyen d'un photomètre, compte tenu de sa simplicité et de sa sensibilité de détection.

Lorsqu'on mesure l'activité d'une enzyme en utilisant comme substrat l'ester 1-naphtylique de l'acétyle-1-phénylalanyl-L-arginine, la sensibilité de détection est plus élevée que lorsqu'on mesure l'activité en utilisant l'ester éthylique de la Nα-benzoyl-L-arginine ou l'ester méthylique de la Nα-tosyl-L-arginine (EMTA), qui était jusqu'à présent un substrat connu pour les enzymes, selon la méthode de Hestrin, et plus précisément, l'ester 1-naphtylique de l'acétyl-L-phénylalanyl-L-arginine présente une sensibilité de détection vis-à-vis de la kallikréine environ 105 fois supérieure à celle de l'ester éthylique de Nα-benzoyl-L-arginine ou de l'ester méthylique de la Nα-tosyl-L-arginine.

La quantité de naphtol mesurée par ce procédé correspond à l'activité ou à la quantité d'enzyme.

Selon le procédé de l'invention, on peut facilement déceler une variation de la concentration en enzyme dans le sang ou dans l'urine dûe à diverses maladies. A titre d'exemple, il existe une relation entre l'hypertension essentielle et la concentration en kallikréine dans l'urine chez un hypertendu, et on pense que l'hypertension essentielle peut être diagnostiquée par mesure de la concentration en kallikréine. Jusqu'à présent, on connaissait les procédés suivants pour mesurer la concentration en kallikréine :

1. Test utilisant l'EMTA (Tohoku J. Med., 116 (1975) par Masahide Seino).
2. Biostest (Tohoku J. Exp. Med., 87 (1965) par Keishi Abe)
3. Test radioimmunologique.

Ces tests sont d'une mise en œuvre compliquée et les résultats obtenus sont soumis à d'importantes fluctuations. En outre, ces procédés sont onéreux et souvent mal adaptés à l'examen clinique. Cependant, lorsque le composé (I) de l'invention est utilisé,

on peut déterminer la concentration en kallikréine à partir d'une petite quantité d'urine par une simple opération.

Le procédé de mesures de l'activité d'une enzyme de l'invention peut non seulement être appliquée à un système contenant une seule enzyme mais également à un système contenant diverses enzymes. Plus précisément, la mesure du tableau enzymatique de l'urine ou du sang présente un intérêt pour le diagnostic d'une maladie, mais les procédés classiques n'étaient pas utilisés très souvent en raison de leur complexité. Cependant, ce problème est résolu grâce à la présente invention. C'est ainsi que lorsqu'on mesure l'activité d'une enzyme contenue dans l'urine, il est possible d'observer un tableau enzymatique dans l'urine n'ayant jamais été observé antérieurement par addition d'urine sur un support approprié, en séparant les enzymes de celle-ci par électrophorèse ou par un procédé de ce type, en plongeant les enzymes dans une solution aqueuse du composé (I) de l'invention pendant un temps approprié puis en ajoutant l'agent de développement de la couleur mentionné ci-dessus.

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention. Les dessins annexés représentent des courbes d'étalement donnant la concentration de la kallikréine urinaire humaine, l'absorbance étant indiquée en ordonnée et la quantité de kallikréine (mg) étant indiquée en abscisse, étant entendu que les nombres entre parenthèses désignent les quantités de kallikréine dans le cas de l'ester méthylique de Na-tosylarginine. La courbe A est la courbe étalon obtenue par le procédé de l'exemple 4 et la courbe B est la courbe étalon obtenue par le procédé de l'exemple comparatif.

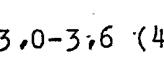
35 Exemple 1

Production du dichloridate de l'ester 1-naphtylique de la L-phénylalanyle-L-arginine.

Dans 8 ml de diméthylformamide (DMF), on

dissout 898 mg de benzyloxycarbonyle-L-phénylalanine et 2,05 g de trifluoracétate de l'ester 1-naphtylique de la N^{δ} , N^{ω} -dibenzylloxycarbonyle-L-arginine, et on ajoute à la solution obtenue 681 mg de dicyclohexyl-carbodiimide (DCC), 405 mg de 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) et 304 mg de triéthylamine (TEA) en refroidissant par de la glace et en agitant, puis on agite le mélange pendant 3 heures à la même température. On chauffe à la température ambiante et on agite le mélange pendant 24 heures supplémentaires. Une fois la réaction achevée, on élimine par filtrage les cristaux de dicyclohexylurée (DCU) précipités, et on ajoute au filtrat l'acétate d'éthyle, puis on lave le mélange avec une solution aqueuse à 10 % d'acide citrique, une solution saturée de bicarbonate de sodium et une solution saturée de chlorure de sodium, dans cet ordre, on le sèche sur du sulfate de magnésium anhydre, puis on l'évapore sous pression réduite pour éliminer le solvant. On recueille la poudre blanche ainsi précipitée et on la recristallise dans du chloroforme-éther diéthylique, ce qui donne 1,1 g (rendement 43 %) d'ester 1-naphtylique de la benzyloxycarbonyle-L-phénylalanyle- N^{δ} , N^{ω} -dibenzylloxycarbonyle-L-arginine, Pf : 125-130°C.

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr cm}^{-1}}$: 3380, 3280, 1750, 1720, 1650.
 RMN δ ppm (CDCl_3): 1,6-2,2 (4H, b, $>\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}<$),
 3,0 (2H, d, $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}<$), 3,8-4,2 (2H, b,
 $>\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4,4-5,0 (2H, b, $\geq\text{CH} \times 2$),
 5,0, 5,1, 5,3 chacun (2H, s, $\text{O}-\text{CH}_2\text{OCO}-$),
 7,1-8,0 (27H, m, protons aromatiques).

- On dissout 935 mg de l'ester ci-dessus dans du DMF, et on ajoute à la solution obtenue 0,5 g de palladium sur carbone à 10 % (Pd-C) et 0,98 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 2 N- dioxane, puis on fait barboter de l'hydrogène gazeux dans le mélange obtenu en refroidissant par de la glace et en agitant pendant 4 heures. Une fois la réaction achevée, on élimine le Pd-C par filtrage et on ajoute goutte à goutte au filtrat 300 ml d'éther diéthylique anhydre, ce qui conduit à la précipitation d'une poudre. On recueille la poudre par filtrage, ce qui donne 450 mg (rendement 78 %) de chlorhydrate de l'ester l-naphtylique de la L-phénylalanyle-L-arginine, Pf : 215°C (décomp).
- 15 IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3380, 3180, 1740, 1650.
- RMN δ ppm (DMSO-d₆): 1,6-2,2 (4H, b, >N-CH₂CH₂CH₂CH<), 3,0-3,6 (4H, b,  -CH₂-CH<, -NH-CH₂CH₂-), 4,0-4,5, 4,5-4,9 chacun (1H, b, \geqslant CH), 7,1-8,7 (12H, m, protons aromatiques).

Exemple 2

Production de chlorhydrate de l'ester l-naphtylique d'acétyle-L-phénylalanyle-L-arginine.

- Dans 15 ml de DMF, on dissout 2,07 g d'acétyl-L-phénylalanine et 6,80 g de trifluoracétate de l'ester l-naphtylique de la N,N-dibenzylloxycarbonyl-L-arginine puis on ajoute à la solution obtenue 2,27 g de DCC, 1,35 g HOBt et 1,01 g de TEA avec refroidissement par de la glace et agitation pendant 3 heures. On porte ensuite la température à la température ambiante et on

agite le mélange pendant 24 heures supplémentaires à la température ambiante. Une fois la réaction achevée, on filtre le DCU ainsi précipité et on ajoute au filtrat de l'acétate d'éthyle puis on lave le mélange obtenu avec une solution d'acide citrique à 10 %, une solution de bicarbonate de sodium saturé et une solution de chlorure de sodium saturé, dans cet ordre, on le sèche sur du sulfate de magnésium anhydre puis on l'évapore sous pression réduite pour éliminer le solvant. On recristallise le résidu dans du chloroforme-éther diéthylique, ce qui donne 5,55 g (rendement : 73 %) d'une poudre blanche, ayant un pf de 179-179,5°C, constituée par de l'ester 1-naphtylique d'acétyle-L-phénylalanyle- N^{δ}, N^{ω} -dibenzylloxycarbonyl-L-arginine.

15 IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3380, 3260, 1750, 1720, 1640
 RMN δ ppm (CDCl_3): 1,6-2,2 (4H, b, $>\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}<$), 1,8 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CONH}-$), 3,0 (2H, d, -CH₂CH<), 3,8-4,2 (2H, b, $>\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4,7-5,0 (2H, b, $\geq\text{CH} \times 2$), 5,12, 5,21 chacun (2H, s, -CH₂OCO-), 7,0-8,0 (22H, m, protons aromatiques).

25 Dans 100 ml de DMF, on dissout 5,3 g de l'ester mentionné ci-dessus, puis on ajoute à la solution obtenue 3,0 g de Pd-C à 10 % et 7,0 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 2 N -dioxane. On agite le mélange obtenu en le refroidissant avec de la glace pendant 6 heures tout en y faisant barboter de l'hydrogène gazeux. Une fois la réaction achevée, on filtre le 30 Pd-C et on ajoute au filtrat de l'éther diéthylique anhydre, ce qui provoque la précipitation d'une substance huileuse. On élimine le produit surnageant par décantation et on ajoute de nouveau au résidu de l'éther

diéthylique anhydre puis on agite le mélange, ce qui donne 3,1 g (rendement : 84 %) d'une poudre blanche ayant un Pf de 115°C (décomp.), qui est constitué par le chlorhydrate de l'ester l-naphtylique de l'acétyle-L-phénylalanyl-L-arginine.

5 RMN δ ppm ($CDCl_3$): 1,6-2,2 (4H, b, $>N-CH_2CH_2CH_2CH<$),
 10 3,2 (3H, d, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{CH}<$), 3,8-4,2 (2H, b, $>N-CH_2CH_2-$), 4,8-5,1 (2H, b, $>CH \times 2$), 5,1, 5,2 chacun (2H, s, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 7,1-7,9 (27H, m, protons aromatiques).

Exemple 3

15 Production du chlorhydrate de l'ester l-naphtylique de la benzoyle-L-phénylalanyle-L-arginine.

10 Dans 8 ml de DMF, on dissout 808 mg de benzoyle-L-phénylalamine et 2,05 g de trifluoracétate de l'ester N^{δ}, N^{ω} -dibenzylloxycarbonyle-L-arginine puis on y ajoute en refroidissant par de la glace 681 ml
 20 de DCC, 405 mg de HOBT et 304 mg de TEA et on agite le mélange pendant 3 heures puis à la température ambiante, pendant 24 heures. Une fois la réaction achevée, on filtre le DCU ainsi précipité et on ajoute au filtrat de l'acétate d'éthyle puis on lave le mélange
 25 avec une solution d'acide citrique à 10 %, une solution de bicarbonate de sodium saturé et une solution de chlorure de sodium saturé dans cet ordre, puis on l'assèche sur du sulfate de magnésium anhydre. On élimine le solvant par évaporation sous pression réduite, et on
 30 recristallise le résidu ainsi obtenu dans du chloroformé-éther diéthylique, ce qui donne 1,4 g (rendement : 57 %)

d'ester 1-naphtylique de la benzoyle-L-phénylalanyl-N^δ-
N^ω-dibenzylloxycarbonyl-L-arginine, Pf : 177-185°C.

5 IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3380, 3270, 1750, 1720, 1630.

10 RMN δ ppm (CDCl_3): 1,6-2,2 (4H, b, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}<$),
3,15 (3H, d, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}<$), 3,8-4,2 (2H, b,
 $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 4,8-5,1 (2H, b, $\geq\text{CH} \times 2$), 5,1,
5,2 each (2H, s, $\text{O}-\text{CH}_2\text{OCO}-$), 7,1-7,9 (27H,
m, protons aromatiques).

Dans 10 ml de DMF, on dissout 1,07 g de l'ester
mentionné ci-dessus, puis on y ajoute 0,5 g de Pd-C à
10 % et 1,65 ml d'une solution d'acide chlorhydrique
15 2 N-dioxane. On agite le mélange en le refroidissant
avec de la glace pendant 3 heures tout en y faisant
barboter de l'hydrogène. Une fois la réaction achevée,
on filtre le mélange réactionnel pour éliminer le Pd-C,
et on ajoute au filtrat 500 ml d'éther diéthylique
20 anhydre. On recueille la poudre blanche ainsi précipitée
et on la sèche sous vide sur du P_2O_5 à 110°C pendant
3 heures, ce qui donne 700 mg (rendement : 92 %) de
chlorhydrate de l'ester 1-naphtylique de la benzoyle-
L-phénylalanyl-L-arginine, Pf : 112°C - (décomp.).

25 IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3250, 1750, 1640.

30 RMN δ ppm (DMSO-d_6): 1,6-2,2 (4H, b, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}<$),
3,0-3,5 (4H, b, $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}<$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$),
4,5-5,0 (2H, b, $\geq\text{CH} \times 2$), 7,1-8,0 (17H, m,
protons aromatiques).

Exemple 4

Mesure de l'activité de la kallikréine par l'utilisation de l'ester 1-naphtylique de l'acétyle -L-phénylalanyl-L-arginine comme substrat.

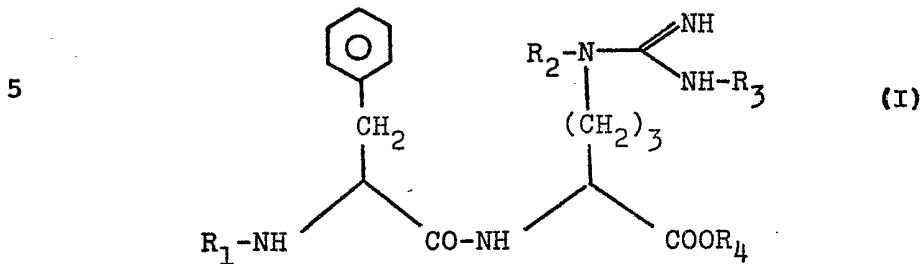
- 5 A 1,7 ml d'une solution tampon de phosphate 50 mM (pH : 7,0), on ajoute 0,1 ml de kallikréine urinaire humaine à diverses concentrations et 0,2 ml d'une solution aqueuse 1,0 mM d'ester 1-naphtylique d'acétyle-L-phénylalanyl-L-arginine, puis on soumet le mélange
- 10 réactionnel à une incubation à 25°C pendant 30 minutes. On ajoute au mélange 20 microlitres d'une solution à 8 % de lauryle de sulfate de sodium et on refroidit le mélange obtenu avec de l'eau glacée. On ajoute au mélange 0,2 ml d'une solution à 1 % de sel Fast Violet B
- 15 (FVB) et on laisse reposer le mélange à 0°C pendant 10 minutes puis on ajoute 2 ml d'acide acétique glacial. On mesure l'absorbance de la couleur ainsi développée (à 505 nm) au moyen d'un spectrophotomètre pour déterminer la quantité de naphtol libérée par hydrolyse par
- 20 l'enzyme. A titre de comparaison, on remplace le mélange de solution tampon de kallikréine par 0,1 ml de la solution tampon mentionnée ci-dessus exempte de kallikréine. La quantité de naphtol libérée correspond à l'activité de l'enzyme.
- 25 Les résultats obtenus pour chacune des concentrations de kallikréine par le procédé ci-dessus sont représentés par la courbe A dans les dessins annexés.
- Exemple comparatif
- Mesure de l'activité de la kallikréine par
- 30 utilisation de l'ester méthylique de la Na-tosyl-L-arginine comme substrat.
- A 0,5 ml de kallikréine urinaire humaine, on ajoute 0,4 ml d'une solution d'ester méthylique de Na-tosylarginine (10 micromoles/0,4 ml de DMSO à 5 %)
- 35 et 0,1 ml d'une solution tampon de phosphate 100 mM

(pH : 7,4). On soumet le mélange à une incubation à 37°C pendant 30 minutes et on y ajoute 1,5 ml d'une solution d'hydroxylamine (mélange de quantités égales de chlorhydrate de NH_2OH 2 M et de NaOH 3,5 M), puis on laisse 5 reposer le mélange à la température ambiante pendant 15 minutes. On y ajoute 1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 18 % en poids, 1 ml d'acide chlorhydrique 4 N et 1 ml d'une solution de chlorure ferrique à 10 % en poids, on agite énergiquement le mélange obtenu 10 et on le soumet à une centrifugation à 3000 tours/mn pendant 10 mn. On mesure l'absorbance (à 530 nm) de la couleur développée dans le produit surnageant au moyen d'un spectrophotomètre. La valeur obtenue correspond à la quantité de substrat restant non hydrolysée par la 15 kallikréine et par conséquent, l'activité de l'enzyme correspond à la différence entre la valeur obtenue en l'absence d'enzyme (témoin) et la valeur obtenue après réaction avec l'enzyme.

Les résultats obtenus pour chacune des concentrations de la kallikréine par le procédé ci-dessus 20 sont représentés par la courbe B dans les dessins annexés.

REVENDICATIONS

1. Dérivé de la phénylalanylarginine répondant à la formule :



10 dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe de protection des radicaux amino ; R_2 et R_3 représentent l'hydrogène ou un groupe protecteur des radicaux guanidinos ; et R_4 représente un naphtyle.

15 2. Dérivé de phénylalanylarginine selon la revendication 1, caractérisé en ce que R_1 est de l'hydrogène.

3. Dérivé de phénylalanylarginine selon la revendication 1, caractérisé en ce que R_1 est l'acétyle, le benzoyle ou le benzyloxycarbonyle.

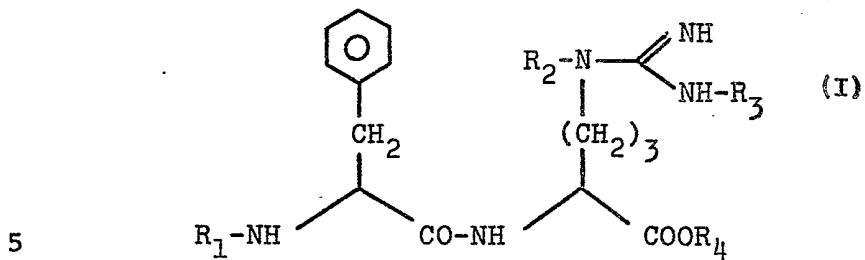
20 4. Dérivé de phénylalanylarginine selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que R_2 et R_3 représentent l'hydrogène ou un benzyloxycarbonyle.

5. Ester 1-naphtylique de la L-phénylalanyl-L-arginine.

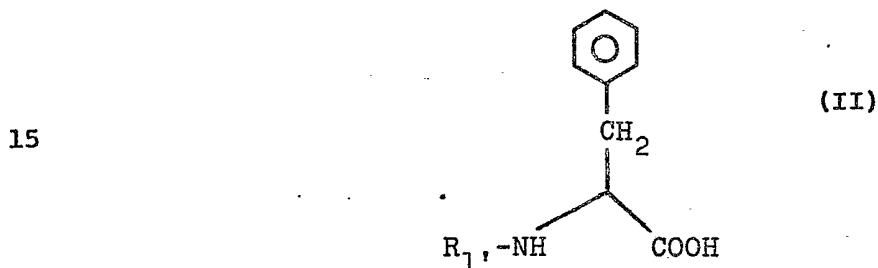
25 6. Ester 1-naphtylique de la benzoyle-L-phénylalanyl-L-arginine.

7. Ester 1-naphtylique de l'acétyle-L-phénylalanyl-L-arginine.

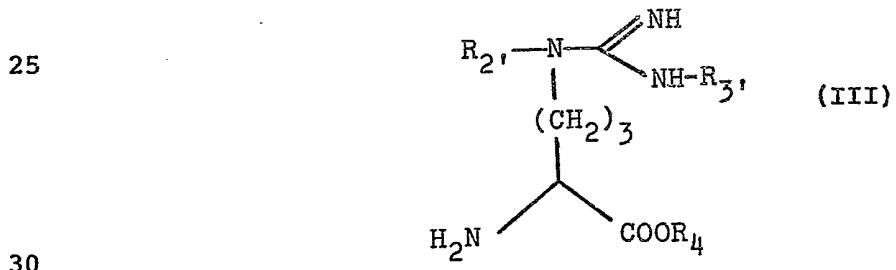
30 8. Procédé de préparation d'un dérivé de phénylalanylarginine répondant à la formule :



10 dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe de protection des radicaux aminos ; R_2 et R_3 représentent l'hydrogène ou des groupes de protection des radicaux guanidino ; et R_4 représente un naphtyle, caractérisé
 15 en ce qu'il consiste à soumettre à une déshydratation condensation un composé (II) répondant à la formule :

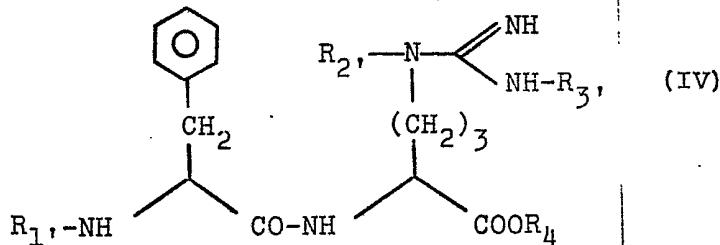


20 dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur des radicaux amino, et un dérivé d'arginine (III) répondant à la formule :



dans laquelle R_2 , et R_3 , représentent un groupe protecteur des radicaux guanidino et R_4 représente un naphtyle, par un procédé classique, ce qui donne un composé (IV) répondant à la formule :

5



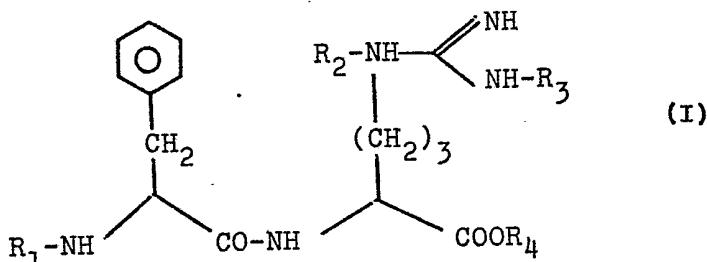
10 dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , et R_4 sont tels que définis ci-dessus, puis facultativement, en éliminant le groupe de protection des radicaux amino, ou les groupes de protection de radicaux guanidino, ou les deux du composé (IV) dans un procédé classique.

15 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la réaction de déshydratation-condensation s'effectue à une température de 0° à 40°C dans un solvant.

20 10. Procédé pour mesurer l'activité d'une enzyme, caractérisée en ce qu'il consiste à mettre en contact l'enzyme avec un dérivé de phénylalanylarginine répondant à la formule :

25

30



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe de protection des radicaux amino ; R_2 et R_3 représentent l'hydrogène ou des groupes de protection des radicaux guanidino ; et R_4 représente un naphtyle, en 5 tant que substrat.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'enzyme est mise en contact avec le dérivé de phénylalanylarginine (I) pendant un temps donné, puis en ce que l'on mesure la quantité de naphtol 10 libérée par hydrolyse par l'enzyme.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'enzyme est la kallikréine.

2490222

1 / 1

