

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145461 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Ansøgning nr. 5494/75 (51) Int.Cl.³ C 07 C 103/52
(22) Indleveringsdag 4. dec. 1975 C 12 Q 1/34
(24) Løbedag 4. dec. 1975
(41) Alm. tilgængelig 6. jun. 1976
(44) Fremlagt 22. nov. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 5. dec. 1974, 7415229, SE

(71) Ansøger AKTIEBOLAGET KABI, S-104 25 Stockholm, SE.
(72) Opfinder Leif Erik Aurell, SE: Karl Goeran Claeson, SE.
(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree.

- (54) Peptider eller salte deraf til
anvendelse som substrat ved di-
agnostisk bestemmelse af serin-
proteaser, især faktor Xa.

Opfindelsen angår hidtil ukendte peptider eller salte deraf til anvendelse som substrat ved diagnostisk bestemmelse af serinproteaser, især faktor Xa. De nye peptider er særligt egnede til bestemmelse af faktor Xa (E.C.3.4.21.6) eller til studium af reaktioner, hvori Xa dannes, inhiberes eller forbruges, eller til bestemmelse af faktorer, som påvirker eller deltager i disse reaktioner.

Faktoren X er en nøglekomponent i den reaktionssekvens, som fører til blodets koagulation. Aktivering af faktoren X giver anledning til dannelse af det proteolytiske enzym, faktor Xa, som er direkte ansvarligt for prothrombinets omdannelse til thrombin. En simpel måde til bestemmelse af koagulationsfaktoren Xa vil være af stor diagnostisk værdi.

Hidtil anvendte reagenser til bestemmelse af faktoren Xa har sædvanligvis bestået af estersubstrater med noget uspecifik karakter. Et af disse er f.eks. p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat (p-NPGB), som også er et godt substrat for thrombin, thrypsin og plasmin. Dets anvendelse i forbindelse med faktoren Xa begrænser sig til rensede enzymtilberedninger.

Med blod fås uanvendelige resultater som følge af tilstedeværelsen af andre esteraser med aktivitet overfor p-NPGB (R.L.Smith, J.Biol.Chem., 248, 2418 (1972)).

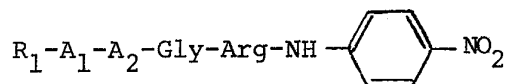
Særlige gode chromogene amidsubstrater til thrombinlignende enzymer er beskrevet i beskrivelsen til svensk patent nr. 380.257. Et af disse, som har formelen benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid (S-2160), fungerer udmærket overfor thrombin, medens faktoren Xa kun spalter substratet ubetydeligt. For at kunne anvendes til diagnostiske blodanalyser bør et substrat for faktoren Xa kun i forsvindende lille udstrækning kunne påvirkes af thrombin.

Fra svensk fremlæggeskrift nr. 401.738, Archives of Biochemistry and Biophysics 108 (1964), 266-274, og Journal of Organic Chemistry 30 (1965), 1781-1785, kendes endvidere peptider indeholdende sekvensen Gly-Arg- β NA, hvori β NA betegner β -naphthylamin, til anvendelse som substrater ved bestemmelse af proteolytiske enzymer, såsom trypsin. Det som trypsinsubstrat bedste eksempel på et sådant peptid er det i ovennævnte Archives of Biochemistry and Biophysics og Journal of Organic Chemistry angivne peptid carbobenzoxydiglycyl-L-arginin-2-naphthylamid, Cbo-Gly-Gly-Arg- β NA forkortet til GGANA. Af en sammenlignende afprøvning mellem dette peptid og Bz-Phe-Val-Arg- β NA som trypsinsubstrat omtalt i svensk fremlæggeskrift nr. 380.257, side 46, fremgår det imidlertid, at sidstnævnte peptid er et ca. dobbelt så godt trypsinsubstrat som GGANA. Bz-Phe-Val-Arg- β NA er det med S-2160 (Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid) nærmest beslægtede peptid, som kan sammenlignes med GGANA som substrat for trypsin, idet såvel anvendelsen af GGANA som Bz-Phe-Val-Arg- β NA som trypsinsubstrat er baseret på en fluorescensmåling af fraspaltet β -naphthylamin. Da anvendelsen af S-2160 som trypsinsubstrat imidlertid er baseret på en spektrofotometrisk måling af fraspaltet p-nitroanilin, kan den ikke direkte sammenlignes med anvendelsen af GGANA men må dog således anses for at være det hidtil bedste, kendte trypsinsubstrat, i forhold til hvilket peptiderne ifølge nærværende opfindelse bør evalueres som substrat for trypsin, jvf. tabel 1 i nærværende beskrivelse.

GGANA har ikke hidtil været kendt som substrat for faktor Xa, og det har da også vist sig, at det ikke er anvendeligt som sådant. Dets Xa-aktivitet er mindre end 1% af Xa-aktiviteten af peptiderne ifølge nærværende opfindelse.

Det ville således være ønskeligt at have et for faktoren Xa mere specifikt substrat, som kun i ubetydelig grad spaltes af thrombin. Substratet bør måle enzymets biologiske funktion, nemlig spaltning afamidbindingerne. Desuden ønskes en hurtig spaltning af substratet til målelige produkter, f.eks. chromofore forbindelser, som let kan følges spektrofotometrisk.

Peptiderne ifølge opfindelsen er ejendommelige ved, at de har den almene formel:



hvor R_1 er H eller benzoyl, A_1 er en enkeltbinding, Ile, Leu, Val, Pro, Gly, Phe eller Tyr, og A_2 er Glu, Gln, Asp eller Asn.

Saltene kan være af organiske eller uorganiske syrer, som f.eks. HCl, HBr, HF, HNO_3 , $HCOOH$, $ACOH$, TFA (trifluoreddikesyre), benzoesyre, metansulfonsyre, fluorsulfonsyre og p-toluensulfonsyre.

Peptiderne kan fremstilles ved to principielt forskellige fremgangsmåder.

1. Den ene fremgangsmåde er baseret på, at den chromofore pNA-gruppe kobles til argininet, og at den ønskede peptidstruktur derefter opbygges trinvis ved successiv tilkobling af de øvrige aminosyrer. Den chromofore gruppe tjener derved som beskyttelsesgruppe for den C-terminale carboxylgruppe i den første aminosyre.

2. Den anden fremgangsmåde er baseret på en trinvis opbygning af den ønskede peptidstruktur og først derefter fraspaltning af de anvendte beskyttelsesgrupper og tilkobling af den chromofore pNA-gruppe.

Ved den ifølge begge disse fremgangsmåder anvendte trinvis opbygning af peptidstrukturen kan man passende gennemføre en rensning ved hjælp af gelfiltrering efter hver tilkobling af en ny aminosyre.

Ved den trinvis opbygning af peptidderivaterne anvendes sædvanlige og inden for peptidkemien gennem lang tid kendte og anvendte koblingsmetoder. Som α -aminobeskyttelsesgrupper kan anvendes de sædvanlige, indenfor peptidkemien velkendte beskyttelsesgrupper som f.eks. Cbo (carbобензоxy), MeOCbo (p-methoxycarbобензоxy), NO_2 Cbo (p-nitrocarbобензоxy), MCbo (p-methoxyphenylazo-carbобензоxy), BOC (tert-butyl-

oxycarbonyl), trifluoracetyl eller formyl. α -Carboxylgruppen kan aktiveres ved, at den overføres til forskellige aktiverede, inden for peptidkemien velkendte og ofte anvendte derivater, som enten kan isoleres eller dannes in situ, såsom f.eks. p-nitrophenylester, trichlorphenylester, pentachlorphenylester, N-hydroxysuccinimidester, syreazid eller syreanhydrid, som enten kan være symmetrisk eller usymmetrisk, eller også kan den aktiveres med et carbodiimid, såsom N,N'-dicyclohexylcarbodiimid. Den C-terminale carboxylgruppe i aminopeptidderivatet eller aminosyrederivatet kan beskyttes ved at forestre den til f.eks. methyl-, ethyl- eller isopropylester eller ved at overføre den til det chromofore anilinderivat, som således fungerer som beskyttelsesgruppe under opbygningen af peptidkæden. Frie funktionelle grupper, som ikke deltager i reaktionen, kan ved opbygningen af peptiderne eller peptidderivaterne beskyttes på følgende måde:

Til blokering af arginylrestens δ -guanidogruppe anvendes sædvanlige, indenfor peptidkemien brugte aminobeskyttelsesmåder eller -grupper, såsom f.eks. protonisering, NO_2 eller Tos (p-toluensulfonyl). Som beskyttelse for carboxylgruppen i glutaminsyre og asparaginsyre anvendes sædvanlige, indenfor peptidkemien brugte beskyttelsesgrupper som f.eks. benzyl- og tert.butylgrupper.

Opfindelsen vil blive beskrevet mere detaljeret i nedenstående udførelseseksempler, som viser fremstillingen af forskellige peptider ifølge opfindelsen ved trinvis syntese.

Ved den tyndtlagschromatografiske analyse (TLC) af eluat og produkter anvendes glasplader med kiselgel F_{254} (Merck) som absorptionsmiddel. Anvendte opløsningsmiddelsystemer betegnes som det fremgår af følgende tabel.

<u>Betegnelse</u>	<u>I systemet indgående opløsningsmidler</u>	<u>Volumenforhold</u>
A:	n-butanol: iseddike: vand	(3:1:1)
C:	n-propanol: ethylacetat: vand	(7:1:2)
D:	n-heptan: n-butanol: iseddike	(3:2:1)
P ₁ :	chloroform: methanol	(9:1)

Efter tyndtlagschromatograferingen studeredes pladerne først i UV-lys (254 nm), og derefter anvendtes chlor/toluidinreaktionen (G. Pataki: Dünnschichtchromatografie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Walter de Gruyter & Co. Berlin, 1966, side 125) som fremkaldelsesmetode.

De nedenfor anvendte forkortelser har følgende betydninger:

Aminosyrer:

Forkortelserne angår aminosyrerester. Den frie aminosyre eller peptidet angives af H- ved aminogruppen og -OH ved carboxylgruppen. Aminogruppen angives altid til venstre og carboxylgruppen til højre.

Alle aminosyrer i forbindelserne har L-konfiguration, hvis andet ikke er angivet.

Arg = Arginin	Ile = Isoleucin
Asn = Asparagin	Leu = Leucin
Asp = Asparaginsyre	Phe = Phenylalanin
Gln = Glutamin	Pro = Prolin
Glu = Glutaminsyre	Tyr = Tyrosin
Gly = Glycin	Val = Valin

Øvrige forkortelser:

Ac	= Acetyl
Ac ₂ O	= Eddikesyreanhydrid
AcOH	= Eddikesyre
BOC	= tert. Butyloxycarbonyl
Bz	= Benzoyl
Bzl	= Benzyl
Bz ₂ O	= Benzoesyreanhydrid
Cbo	= Carbobenzoxy
DCCI	= Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	= Dimethylformamid
Et ₃ N	= Triethylamin
MCbo	= p-Methoxyphenylazocarbobenzoxy
MeOH	= Methanol
OtBU	= tert.-Butyloxy
OET	= Ethyloxy
OMe	= Methyloxy
OpNP	= p-Nitrophenoxy
OisoPr	= iso-Propyloxy
pNA	= p-Nitroanilid
TFA	= Trifluoreddikesyre
Tos	= p-Toluensulfonyl

De i eksemplerne anvendte temperaturangivelser er i °C, hvis andet ikke er angivet.

EKSEMPEL I: HCl·Bz-Ile -Glu-Gly-Arg-pNA

Ia Cbo-Gly-Arg (NO₂)-pNA (m.v. 530,4)

5,0 g (10,6 mmol) Cbo-Arg(NO₂)-pNA opløses i 21 ml AcOH og 22 ml 4N HBr i AcOH under fugtighedsfrie betingelser. Reaktionsopløsningen omrøres ved stuetemperatur i 1 time og hældes derefter langsomt ned i 200 ml tør ether under kraftig omrøring. Etherfasen skilles derefter fra den fremkomne udfældning, som vaskes yderligere 2 gange med 100 ml ether. Efter tørring i vakuum over P₂O₅ og KOH-tabletter ved 30° fås HBr-saltet af aminosyrederivatet i praktisk taget kvantitativt udbytte (4,95 g). Produktet er entydigt ved TLC i A.

Det ovenfor fremkomne produkt opløses i 50 ml destilleret DMF. Opløsningen afkøles til -10°C, og der tildryppes så meget Et₃N, at opløsningen neutraliseres (2,1 ml). Udfældet Et₃N·HBr filtreres fra, og filtratet afkøles igen til -10°. 3,9 g (11,8 mmol) Cbo-Gly-OpNP tilsættes, og opløsningen får lov til langsomt at antage stuetemperatur. Efter ca. 3 timer afkøles reaktionsopløsningen igen til -10° og pufres med 0,54 g (5,3 mmol) Et₃N. Denne fremgangsmåde gentages efter yderligere 2 - 3 timer. Efter reaktion natten over inddampes opløsningen til en sejtflydende olie i vakuum ved 40°. Remanensen opslættes i og omrøres med tre portioner destilleret vand. Vandet fradekanteres, og den tilbageværende olie opløses i MeOH, hvorfra produktet fås på krystallinsk form.

Udbytte: 4,2 g (75%) af Ia.

TLC i P₁ (R_f = 0,16) viser kun én plet.

[α]_D²⁴ - 36° (C 0,5, MeOH).

Ib t-BOC-Glu(γ-OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA (m.v. 715,8)

2,65 g (5,0 mmol) Ia decarbobenzoxyleres samt kobles med 2,50 g (5,5 mmol) t-BOC-Glu(γ-OBzl)-OpNP ifølge beskrivelsen under Ia. Råproduktet renses ved chromatografering på en kolonne med SEPHADEX® LH-20 i MeOH med MeOH som elueringsmedium.

Udbytte: 3,25 g (91%) af Ib.

TLC i P₁ (R_f = 0,22) viser kun én plet.

[α]_D²⁴ - 34° (C 1,0, MeOH).

Ic Cbo-Ile -Glu(γ -OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA (m.v. 862,9)

1,08 g (1,5 mmol) Ib opløses i 10 ml TFA. Reaktionsopløsningen omrøres i 45 minutter ved stuetemperatur og hældes derefter langsomt ned i 75 ml tør ether under kraftig omrøring. Fremkommet udfældning skilles fra etherfasen og vaskes yderligere to gange med 50 ml ether. Efter tørring i vakuum over P₂O₅ og KOH-tabletter ved 30°C fås TFA-saltet af tripeptidderivatet i praktisk taget kvantitativt udbytte (1,08 g). Produktet er entydigt ved TLC i A.

Det ovenfor fremkomne produkt opløses i 20 ml DMF, afkøles til -10° og neutraliseres med Et₃N (0,23 ml). 0,65 g (1,68 mmol) Cbo-Ile -OpNP tilsættes, og opløsningen får lov til langsomt at antage stuetemperatur. Efter ca. 3 timer afkøles reaktionsopløsningen igen til -10° og pufres med 0,12 ml Et₃N. Denne procedure gentages efter yderligere 2 - 3 timer. Efterreaktion sker natten over. For at omsætte overskuddet af Cbo-Ile -OpNP og derved undgå, at det ønskede tetrapeptidderivat ved den efterfølgende chromatografiske rensning forurenes af den aktive ester, sættes nu ca. 100 mg (ca. 1,4 mmol) n-butylamin til opløsningen. Efter ca. 30 minutter indampes opløsningen til en sejt-flydende olie i vakuum ved 40°C. Remanensen opslættes i og omrøres med 3 portioner destilleret vand. Efter dekantering af vandet opløses olien i MeOH og renses på en kolonne med SEPHADEX® LH-20 i MeOH med MeOH som elueringsmedium.

Udbytte: 1,07 g (83%).

TLC i P₁ (R_f = 0,35) viser kun én plet.

[α]_D²⁴ - 32° (C 0,3, MeOH:DMF 95:5).

Id Bz-Ile -Glu(γ -OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA (m.v. 832)

260 mg (0,30 mmol) Ic decarbobenzoxyleres ifølge beskrivelsen under Ib. Det fremkomne produkt viser ved TLC i A to pletter (R_f = henholdsvis 0,45 og 0,60) og ifølge IR er produktet en blanding af HBr·H-Ile -Glu(γ -OH)-Gly-Arg(NO₂)-pNA og HBr·H-Ile -Glu(γ -OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA. Den således fremkomne blanding kobles som under Ia med 800 mg (0,35 mmol) benzoesyreanhydrid. Råproduktet renses ved chromatografering på en kolonne med SEPHADEX® LH-20 i MeOH med MeOH som elueringsmiddel. Derved isoleres to fraktioner α : 130 mg, [α]_D²⁴ - 15 (C 0,5, CH₃CN) og R_f = 0,20 i P₁ samt β : 105 mg, [α]_D²⁴ - 11 (C 0,5, CH₃CN) og R_f = 0,06 i P₁. IR viser produkterne Bz-Ile -Glu(γ -OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA og Bz-Ile -Glu-Gly-Arg(NO₂)-pNA. Ved reaktion med HF (se Ie) giver begge produkterne samme slutprodukt (Ie).

Ie HCl·Bz-Ile—Glu-Gly-Arg-pNA (m.v. 734,3)

100 mg (0,12 mmol) af Id-fraktion α placeres i et reaktionsrør til et sakakibara-apparat og tilsættes 0,5 ml anisol. Røret tilsluttes til apparatet, og efter evakuering kondenseres ca. 5 ml tør hydrogenfluorid i røret. Efter 75 minutters omsætning ved 0° under omrøring afdestilleres hydrogenfluoridet i vakuum. Den olieagtige remanens opløses i 10 ml 33% AcOH i vand og renses ved chromatografering på en kolonne med SEPHADEX® G-15 i 33% AcOH i vand og med samme opløsningsmiddel som elueringsmiddel. Det således fremkomne tetrapeptidderivat, der ved TLC har vist sig at være entydigt, isoleres ved frysetørring. Stoffet opløses derefter i MeOH:destilleret vand 95:5 og chromatograferes på en svagt basisk anionbytter QAE-SEPHADEX® A-25 på chloridform i MeOH:vand 95:5 og med samme opløsningsmiddel som elueringsmedium. Eluatet frysetørres for vand efter at MeOH er afdrevet ved 30° i vakuum.

Udbytte: 75 mg (85%).

TLC i A ($R_f = 0,48$) viser kun én plet.

$[\alpha]_D^{24} = -40$ (C 0,5, 50% AcOH i destilleret vand).

Aminosyreanalyse: Ile : 0,98, Glu: 0,95, Arg: 0,98, Gly: 1,00.

EKSEMPEL II: 2HCl·H-Ile -Glu-Gly-Arg-pNA.

IIa 2HCl·H-Ile—Glu-Gly-Arg-pNA (m.v. 666,6)

100 mg (0,116 mmol) Ic omsættes med hydrogenfluorid samt renses og ionbyttes som beskrevet under Ie.

Udbytte: 56 mg (73%).

TLC i A ($R_f = 0,34$) viser kun én plet.

$[\alpha]_D^{24} = -35^0$ (C 0,5, 50% AcOH i destilleret vand).

Aminosyreanalyse: Ile : 0,96, Glu: 0,94, Arg: 0,96, Gly: 1,00.

EKSEMPEL III: HCl·Bz-Ile—Gln-Gly-Arg-pNA (m.v.733,2)

IIIa: Cbo-Gln-Gly-Arg(NO₂)-pNA (m.v.658.5)

2,65 g (5,0 mmol) Ia blev beskyttet med HBr i AcOH og kobledes med 2,2 g (5,5 mmol) Cbo-Gln-OpNP ifølge beskrivelsen under Ia. Råproduktet blev rensat ved omkrystallisation to gange i MeOH.

Udbytte: 2,07 g (63%) af IIIa.

TLC i A ($R_f=0,62$) viser kun en plet.

$[\alpha]_D^{24} = -23^0$ (C 0,5, MeOH/DMF 9/1).

IIIb: BOC-Ile-Gln-Gly-Arg(NO₂)-pNA (m.v.737,6)

0,66 g (1,0 mmol) IIIa blev beskyttet med HBr og AcOH ifølge Ia. Det således opnåede produkt blev opløst i 10 ml destilleret DMF. Opløsningen blev afkølet til -10°C, og der blev tildryppet så meget Et₃N, at opløsningen blev neutraliseret. Udfældet Et₃N·HBr blev filtreret fra, og filtratet blev påny afkølet til -10°C. 0,40 g (1,1 mmol) BOC-Ile-OpNP blev tilsat, og opløsningen fik langsomt lov til at antage stuetemperatur. Efter ca. 3 timer afkøledes reaktionsopløsningen påny til -10°C og blev pufret med 0,1 ml (0,7 mmol) Et₃N. Denne procedure blev gentaget efter yderligere 2-3 timer. Efter reaktion natten over omsattes overskuddet af BOC-Ile-OpNP med 0,1 ml (1,0 mmol) n-butylamin for at undgå, at det ønskede tetrapeptidderivat blev forurennet af aktiv ester ved samtidig eluering under den efterfølgende chromatografiske rensning. Efter ca. 30 minutter inddampes opløsningen til en sejt flydende olie under vacuum ved 40°. Remanensen opslæmmedes i og omrørtes med tre portioner destilleret vand. Efter dekantering af vandet opløstes olien i MeOH og rensedes på en søjle af Sephadex[®] LH-20 i MeOH med MeOH som elueringsmiddel.

Udbytte: 0,56 g (76%).

TLC i A (R_F=0,66) viste kun en plet.

IIIc: Bz-Ile-Gln-Gly-Arg(NO₂)-pNA (m.v.741,6)

0,56 g (0,76 mmol) IIIb opløstes i 5 ml TFA. Reaktionsopløsningen omrørtes i 15 minutter ved stuetemperatur og udhældtes derefter langsomt i 100 ml tør ether under kraftig omrøring. Den fremkomne udfældning fraskiltes etherfasen og vaskedes yderligere to gange med 50 ml ether. Efter tørring i vacuum over P₂O₅ og KOH-piller ved 30°C opnåedes TFA-saltet af tetrapeptidderivatet i kvantitativt udbytte. Ved TLC i A er produktet ensartet.

Det ovenfor opnåede produkt blev opløst i 8 ml DMF, blev afkølet til -10°C og blev neutraliseret med Et₃N. Der blev tilsat 0,23 g (1,0 mmol) benzoesyreanhydrid. Efter ca. 30 minutter tilsattes yderligere 100 ml Et₃N. Efter reaktion natten over inddampedes opløsningen under vacuum ved 40°C til en sejt flydende olie. Remanensen slæmmedes og omrørtes med destilleret vand, som derefter

blev dekanteret af. Tilbagebleven olie blev opløst i MeOH og blev rensset på en søjle af Sephadex[®] LH-20 i MeOH med MeOH som elueringsmiddel.

Udbytte: 0,55 g (95%).

TLC i A ($R_f=0,64$) viste kun en plet.

IIIId: Bz-Ile--Gln-Gly-Arg-pNA·HCl (m.v.733,3)

0,55 g (0,75 mmol) IIIc blev omsat med hydrogenfluorid, blev rensset og ionbyttet ifølge beskrivelsen under Ie.

Udbytte: 0,34 g (62%).

TCL i A ($R_f=0,41$) viste kun en plet.

$[\alpha]_D^{24} -40^{\circ}$ (C 0,5, 50% AcOH (aq)).

Øvrige mellem- og slutprodukter blev syntetiseret i analogi med fremgangsmåden, der er beskrevet under eksempel I-III. De øvrige produkters fremstilling og deres egenskaber er sammenfattet i tabel A, hvor * angiver slutprodukter, der er anvendelige som substrat ifølge den foreliggende opfindelse.

De ifølge eksemplerne fremstillede substrater blev anvendt til bestemmelse af faktoren Xa som beskrevet i det følgende:

Princippet for bestemmelsen er baseret på, at det ved enzymatisk hydrolyse dannede spaltningsprodukt udviser et fra substratet helt forskelligt UV-spektrum. Således har substratet ifølge eksempel I Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA·HCl et absorptionsmaksimum ved 315 nm med en molær ekstinktionskoefficient på 12.000. Ved 405 nm er substratets absorption næsten helt ophørt. p-Nitroanilin (pNA), som dannes af substratet ved den enzymatiske hydrolyse, har et absorptionsmaksimum ved 380 nm med en molær ekstinktionskoefficient på 13.200, der ved 405 nm kun er aftaget til 9.620.

Ved spektrofotometrisk at måle ved 405 nm kan man derfor let følge graden af den enzymatiske hydrolyse, der er proportional med mængden af dannet p-nitroanilin. Det tilstedeværende substratoverskud forstyrrer ikke målingen ved denne bølgelængde. For de øvrige substrater ifølge opfindelsen hersker der stort set samme forhold, hvorfor de spektrofotometriske målinger overvejende er blevet udført ved 405 nm.

Tabel 1 viser en sammenligning af reaktionshastighederne mellem det tidligere omtalte substrat S-2160 og substrat I, III, V, VII, IX, X, XI og XX ifølge opfindelsen med forskellige enzymer af serinproteasetypen (E.C. 3.4.21). Reaktionshastighederne blev bestemt ved den ovenfor beskrevne metode.

Tabel 1

<u>Konc.</u>	<u>Substrat</u>	<u>Relative reaktionshastigheder</u>			
		<u>Thrombin</u>	<u>Xa</u>	<u>Trypsin</u>	<u>Plasmin</u>
0,1 mM	S-2160	100	1	100	100
0,25 mM	I	2	100	500	75
	III	8	120	470	40
	V	3	10	240	20
	VII	3	70	350	20
	IX	3	56	330	20
	X	3	42	340	30
	XI	3	64	280	40
	XX		12	140	5

Af tabellen ses det, at faktor Xa spalter substrat I og III 100-120 gange bedre end S-2160, hvorimod I og III kun påvirkes ubetydeligt af thrombin sammenlignet med S-2160. Det fremgår således af denne sammenligning, at I og III er langt det bedste substrat til faktor Xa. Desuden fremgår det af tabellen, at I og III med fordel kan anvendes som trypsin-substrat. Da trypsin imidlertid normalt ikke forekommer i blod, er den gode trypsineffekt ikke nogen hindring for en bestemmelse af faktoren Xa i blodbestemmelser.

De øvrige substrater ifølge opfindelsen fremviser tilsvarende, omend ikke helt så markante egenskaber, som dem, der er omtalt ovenfor for substraterne I og III's vedkommende.

T A B E L A

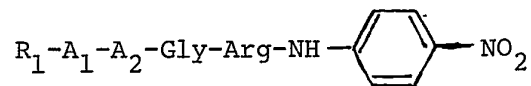
Kromogent substrat	Eksempel	Start- materiale	Beskyttelses- metode - eks.	Koblings- metode - eks.	Udbytte %	TLC R _f ensartet forbindelse
BOC-Asp(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	V a	I a	I a	I a	65	A 0,28
BOC-Ile-Asp(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	V b	V a	III c	I c	67	A 0,73
Bz-Ile-Asp(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	V c	V b	III c	III c	84	P ₁ 0,17
* HCl·Bz-Ile-Asp-Gly-Arg-pNA	V	V c	I e	-	66	A 0,50
Cbo-Asn-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	VII a	I a	I a	I a	86	A 0,65
BOC-Ile-Asn-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	VII b	VII a	I a	III b	78	A 0,66
Bz-Ile-Asn-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	VII c	VII b	I c	III c	88	A 0,66
* HCl·Bz-Ile-Asn-Gly-Arg-pNA	VII	VII c	I e	-	80	A 0,41
BOC-Leu-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	IX a	I b	III c	I c	75	P ₁ 0,29
Bz-Leu-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	IX b	IX a	III c	III c	93	P ₁ 0,23
* HCl·Bz-Leu-Glu-Gly-Arg-pNA	IX	IX b	I e	-	81	A 0,51
BOC-Val-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	X a	I b	III c	I c	77	P ₁ 0,31
Bz-Val-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	X b	X a	III c	III c	69	P ₁ 0,21
* HCl·Bz-Val-Glu-Gly-Arg-pNA	X	X b	I e	-	85	A 0,48
BOC-Pro-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XI a	I b	III c	I c	73	P ₁ 0,34
Bz-Pro-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XI b	XI a	III c	III c	86	P ₁ 0,33
* HCl·Bz-Pro-Glu-Gly-Arg-pNA	XI	XI b	I e	-	95	A 0,40
* 2HCl·H-Pro-Glu-Gly-Arg-pNA	XII	XI a	I e	-	73	A 0,20
BOC-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XIII a	I b	III c	I c	88	P ₁ 0,24
Bz-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XIII b	XIII a	III c	III c	92	P ₁ 0,22
* HCl·Bz-Gly-Glu-Gly-Arg-pNA	XIII	XIII b	I e	-	87	A 0,40

T A B E L A

Kromogent substrat	Eksempel	Start- materiale	Beskyttelses- metode - eks.	Koblings- metode - eks.	Udbytte %	TLC R _f ensartet forbindelse
* 2 HCl · H-Gly-Glu-Gly-Arg-pNA	XIV	XIII a	I e	-	79	A 0,27
BOC-Phe-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XV a	I b	III c	I c	83	P ₁ 0,30
Bz-Phe-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XV b	XV a	III c	III c	70	P ₁ 0,35
* HCl · Bz-Phe-Glu-Gly-Arg-pNA	XV	XV b	I e	-	86	A 0,50
* 2 HCl · H-Phe-Glu-Gly-Arg-pNA	XVI	XV a	I e	-	83	A 0,41
Cbo-Tyr(OBzl)-Glu(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XVII a	I b	III c	I a	90	P ₁ 0,38
* HCl · Bz-Tyr-Glu-Gly-Arg-pNA	XVII	XVII a	I e	III c	45	A 0,52
Bz-Asp(OBzl)-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XVIII a	V a	III c	III c	77	A 0,68
* HCl · Bz-Asp-Gly-Arg-pNA	XVIII	XVIII a	I e	-	50	A 0,47
* 2 HCl · H-Asp-Gly-Arg-pNA	XIX	V a	I e	-	55	A 0,29
Bz-Gln-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XX a	III a	I a	I d	60	A 0,48
* HCl · Bz-Gln-Gly-Arg-pNA	XX	XX a	I e	-	86	A 0,41
* 2 HCl · H-Gln-Gly-Arg-pNA	XXI	III a	I e	-	60	A 0,22
Bz-Asn-Gly-Arg(NO ₂)-pNA	XXII a	VII a	I a	I d	72	A 0,50
* HCl · Bz-Asn-Gly-Arg-pNA	XXII	XXII a	I e	-	64	A 0,41
* 2 HCl · H-Asn-Gly-Arg-pNA	XXIII	VII a	I e	-	82	A 0,22
Bz-Glu(OBzl)-Gly-Arg-pNA	XXIV a	I b	III c	III c	80	P ₁ 0,18
* HCl · Bz-Glu-Gly-Arg-pNA	XXIV	XXIV a	I e	-	70	A 0,45
* 2 HCl · H-Glu-Gly-Arg-pNA	XXV	I b	I e	-	60	A 0,29

P a t e n t k r a v.

Peptider eller salte deraf til anvendelse som substrat ved diagnostisk bestemmelse af serinproteaser, især faktor Xa, k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel:



hvor R_1 er H eller benzoyl, A_1 er en enkeltbinding, Ile, Leu, Val, Pro, Gly, Phe eller Tyr, og A_2 er Glu, Gln, Asp eller Asn.

Fremdragne publikationer:

SE ansøgning nr. 7210647-9 (fremlæggeskrift nr. 401738)
Archives of Biochemistry and Biophysics 108 (1964), side 266-274
Journal of Organic Chemistry, bind 30 (1965), side 1781-85.