DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(19) DD (11) 279 485 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

5(51) C 07 K 17/02

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 07 K / 306 382 7	(22)	26.08.87	(44)	06.06.90
(31)	P3629175.7	(32)	28.08.86	(33)	DE

(71) siehe (73)
(72) Stüber, Werner, Dr.; Schnaitmann, Dieter, Dr., DE
(73) Behringwerke AG, Marburg, DE
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung chromogener Verbindungen und ihre Verwendung

(55) Verfahren; Herstellung; chromogene Verbindungen; Löslichkeit; Spezifität; Kondensation

(57) Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung neuer chromogener Verbindungen und ihre Verwendung, die zu diagnostischen Zwecken in der Medizin geeignet sind. Mit der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung neuer chromogener Verbindungen zur Verfügung gestellt, die eine hervorragende Löslichkeit und Spezifität aufweisen. Aufgabe der Erfindung ist es, neue chromogene Verbindungen mit vorteilhaften Eigenschaften bereitzustellen. Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der allgemeinen Formel I hergestellt, worin die Substituenten, die in der Beschreibung angegebene Bedeutung aufweisen, in dem ein Aminosäurederivat der Formel (II), worin R_1 bis R_8, An^-, Y und C die Bedeutungen entsprechend Formel (I) besitzen, wobei jedoch zusätzlich reaktive Gruppen der Aminosäuren durch Schutzgruppen blockiert sein können, mit einem Oligopeptid der allgemeinen Formel (III)

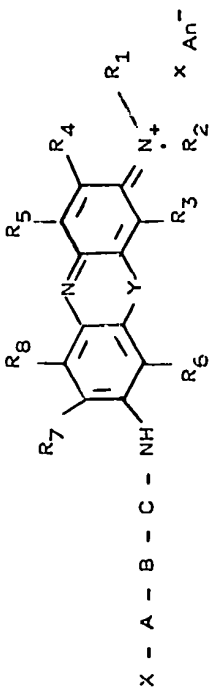
X–A–B–OH (III)

worin X, A und B obengenannte Bedeutungen haben, kondensiert wird, oder mit einer geschützten Aminosäure, die die allgemeine Formel (IV)

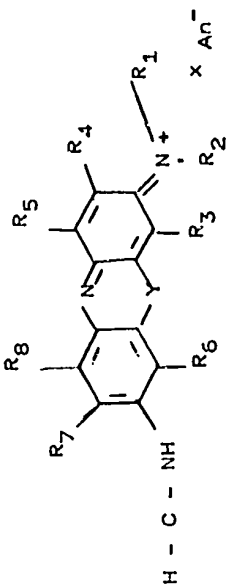
X–A–OH
X–B–OH (IV)

erfüllen und worin X, A und B die obengenannten Bedeutungen haben, kondensiert wird. Formeln (I), (II)

(I)



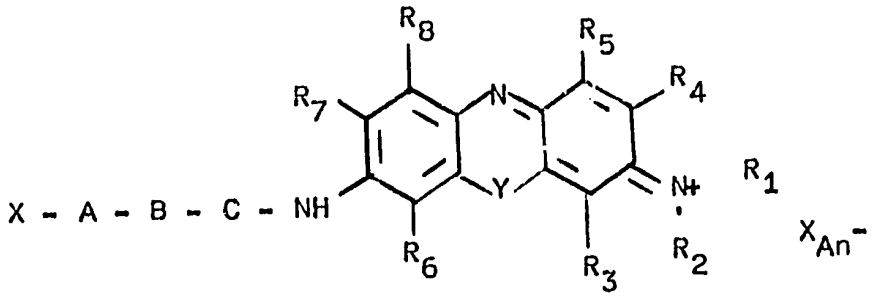
(II)



ISSN 0433-6461

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung chromogener Verbindungen der Formel I,



worin

X ein Wasserstoffatom, eine die endständige Aminogruppe irreversibel blockierende Gruppierung oder eine in der Peptidchemie übliche Schutzgruppe, wie zum Beispiel Boc-, Z- oder Fmoc-,

A und B
gleich oder verschieden sein können und eine aus 2 bis 15 Kohlenstoffatomen mit bis zu 4 Stickstoffatomen, 2 Schwefelatomen und 6 Sauerstoffatomen bestehende alpha-, beta- oder gamma-Aminosäure, deren Seitenkette substituiert sein kann, und B gegebenenfalls ein Dipeptid gebildet aus diesen Aminosäuren,

C Arginin, Lysin, Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan sowie deren Homologe.

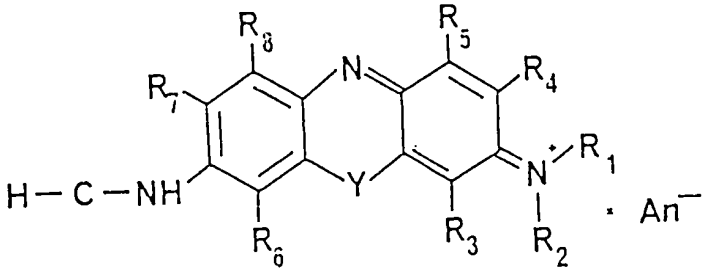
R_1 und R_2
gleich oder verschieden sein können und ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen,

R_3 bis R_8
gleich oder verschieden sein können
und Wasserstoff, einen Alkylrest, einen Alkyloxyrest oder einen Halogenrest,

Y Sauerstoff und

An^- ein Anion bedeuten,

sowie dessen wasserlöslichen Salze, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein Aminosäurederivat der Formel (II),



(II)

worin R_1 bis R_8, An^-, Y und C die Bedeutungen entsprechend Formel (I) besitzen, wobei jedoch zusätzlich reaktive Gruppen der Aminosäuren durch Schutzgruppen blockiert sein können, mit einem Oligopeptid der allgemeinen Formel (III),

X–A–B–OH (III)

worin X, A und B obengenannte Bedeutungen haben, X aber nicht Wasserstoff, sondern eine Schutzgruppe oder eine den N-Terminus irreversibel verschließende Gruppierung ist, kondensiert wird, oder mit einer geschützten Aminosäure, die die allgemeine Formel (IV)

X–A–OH
X–B–OH (IV)

erfüllen und worin X, A und B die obengenannten Bedeutungen haben, kondensiert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung beschreibt Verfahren zur Herstellung neuer chromogener Verbindungen. Sie sind als Enzymsubstrate zu diagnostischen Zwecken geeignet, um damit proteolytische Enzyme nachzuweisen. Die erfindungsgemäßen neuen Verbindungen dienen vor allem zur quantitativen Erfassung von Endoproteasen, insbesondere solcher, die Peptide und Proteine hinter Aminosäuren wie Arginin, Lysin oder Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen spalten. Diese chromogenen Verbindungen können somit zur Quantifizierung von Reaktionen benutzt werden, in denen obengenannte Enzyme entstehen, verbraucht oder inhibiert werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

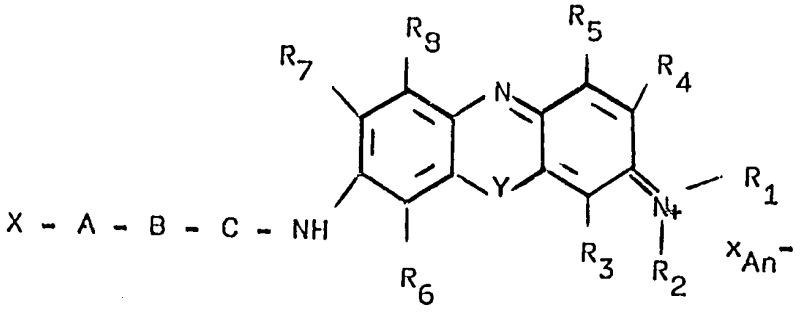
Nach dem Stand des Wissens dienen über Amidbindungen an Peptide oder Peptidderivate gebundene Chromophore, die durch proteolytische Enzyme abgespalten werden können, diesem Zweck. Insbesondere sind Peptidsubstrate bekannt, von denen besagte Enzyme photometrisch bzw. fluorimetrisch quantifizierbare Gruppierungen abspalten können (EPA 0046742, DE 3244030 Al). Zur photometrischen Bestimmung von Enzymen werden bislang bevorzugt Peptidderivate des para-Nitranilins benutzt. Enzymatisch abgespaltenes para-Nitranilin wird bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Chromogene Substrate haben als wichtige Voraussetzungen gute Löslichkeit im Testansatz, hohe Spezifität und Sensivität im Nachweis sowie einfache Handhabung und Detektion. Bei den bislang benutzten Substraten sind diese Voraussetzungen nur unzureichend erfüllt und deshalb verbesserungswürdig.
Insbesondere nachteilig ist die photometrische Auswertung von para-Nitranilin bzw. dessen Derivaten, da die Messung bei 405nm beispielsweise durch Plasmabestandteile oder andere Körperflüssigkeiten gestört bzw. unmöglich gemacht wird. Zur photometrischen Quantifizierung oberhalb 580nm sind bereits Substanzen beschrieben, bei denen die Farbstoffentwicklungen durch chemische Reaktionen nach Spaltung des Substrates erfolgen. Diese Reaktionen erlauben jedoch nur eine Endpunktbestimmung, da die kinetische Verfolgung der enzymatischen Reaktion durch Zugabe organischer oder anorganischer Chemikalien oftmals gestört oder zumindest recht umständlich gemacht wird (EPA 0076042; H.C. Kwaan et al., Thromb. Res. **13**, 5–13, 1978).

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung neuer chromogener Verbindungen bereitgestellt, die eine hervorragende Löslichkeit und Spezifität aufweisen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

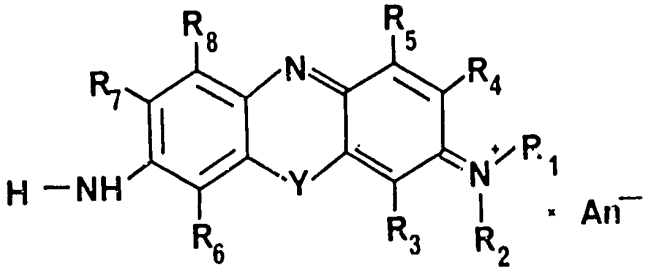
Aufgabe dieser Erfindung ist es, chromogene Verbindungen mit vorteilhafter Löslichkeit und Spezifität zu schaffen, die es gestatten, in Gegenwart von Blut, Plasmabestandteilen oder anderen Körperflüssigkeiten proteolytische Enzyme qualitativ und quantitativ zu bestimmen.
Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel (I):



(I),

worin
X ein Wasserstoffatom, eine die endständige Amingruppe irreversibel blockierende Gruppierung oder eine in der Peptidchemie übliche Schutzgruppe, wie zum Beispiel Boc-, Z- oder Fmoc-, bedeutet.
A und B
gleich oder verschieden sein können,
eine aus 2 bis 15 Kohlenstoffatomen mit bis zu 4 Stickstoffatomen, 2 Schwefelatomen und 6 Sauerstoffatomen bestehende alpha-, beta- oder gamma-Aminosäure, deren Seitenkette substituiert sein kann, und B gegebenenfalls ein Dipeptid gebildet aus diesen Aminosäuren,
C Arginin, Lysin, Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan sowie deren Homologe,
R_1 und R_2
gleich oder verschieden
und ein Wasserstoffatom oder Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen,
R_3 bis R_8
gleich oder verschieden,
und Wasserstoff, ein Alkylrest, ein Alkyloxyrest oder ein Halogenrest,

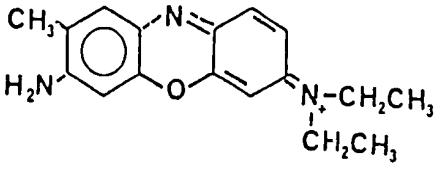
Y Sauerstoff
An^- ein Anion zum Beispiel Chlorid oder Acetat
bedeutet,
sowie deren wasserlösliche Salze zum Beispiel Formiat, Acetat oder Chlorid.
Wesentlich ist bei den erfindungsgemäßen Verbindungen der heteroaromatische Chromophor. Dadurch erhält man gegenüber dem Stand der Technik wesentliche Vorteile. Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Anknüpfen einer Aminosäure an Chromophore des Typs der Formel (II)



(II),

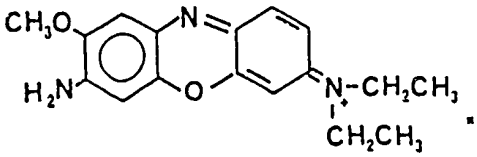
wobei R_1–R_8 und X obengenannte Bedeutung haben, eine hypsochrome Verschiebung von 70 oder mehr nm resultiert. Das bedeutet, die an sich blauen Farbstoffe weisen in peptidisch gebundener Form eine rote Farbe vor. Gegenstand der Erfindung sind deshalb Substanzen der Formel I, die den Farbstoff laut Formel II kovalent gebunden enthalten und sich dadurch auszeichnen, daß die Absorptionsmaxima des freien Farbstoffes und des gebundenen Farbstoffes eine Differenz von 70 oder mehr nm vorweisen und die Absorptionswellenlänge des freien Chromophors mehr als 550 nm ist. Durch diese langwellige Absorption ergibt sich u. a. die mögliche Testauswertung über Photodiodentechnik bzw. eine reflektometrisch Auswertung im kurzwelligen Bereich, beispielsweise bei 405 nm, ist nicht möglich. Die günstigen spektralen Eigenschaften erlauben die Messungen von Enzymaktivitäten in Gegenwart von Körperflüssigkeiten, beispielsweise im Blut, da die Absorpionswellenlänge des Farbstoffsystems genügend weit von der Absorptionswellenlänge des Hämoglobins entfernt liegt. Vorteilhaft ist auch die Möglichkeit der Auswertung mit herkömmlichen Photometersystemen. Der molare Extinktionskoeffizient der Farbstoffe (Formel II) übertrifft den des para-Nitranilins um den 6- bis 10fachen Wert.
Die genannten Vorteile gegenüber dem Stand der Technik werden noch dadurch unterstützt, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen extrem gut löslich sind und sich die Substrate durch eine überlegene Spezifität auszeichnen.
Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden nach in der Peptidchemie an sich üblichen Arbeitsmethoden hergestellt. Die eingesetzten Aminosäuren liegen, soweit nicht anders vermerkt, vorzugsweise in der L-Form vor. Der Ausdruck Aminosäuren steht für alpha-, beta- oder gamma-Aminosäuren, bestehend aus 2 bis 15 Kohlenstoffatomen mit bis zu 4 Stickstoffatomen, 2 Schwefelatomen und 6 Sauerstoffatomen. Die unter A und B definierten Aminosäuren sind nicht nur natürlich vorkommende, sondern können auch Aminosäuren wie beispielsweise Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Phenylglycin sein.
Die neuen chromogenen Verbindungen enthalten erfindungsgemäß eine chromophore Gruppierung, die sich von Dibenzo-1.4.-oxazin (Phenoxazin) ableiten. Wie in Formel II dargestellt, sind diese Farbstoffsysteme mit einer auxochromen Gruppe, besonders mit einer Dialkylaminogruppe, und mit einer Aminogruppe, die spiegelbildlich zur Dialkylaminogruppe steht, versehen. Die in Formelbild II dargestellten Reste R_3–R_8 können gleich oder verschieden sein, Wasserstoffatome, Halogenatome, Alkylreste mit bis zu 3 Kohlenstoffatomen und 7 Wasserstoffatomen oder Alkyloxyreste mit bis zu 3 Kohlenstoffatomen und 7 Wasserstoffatomen sein. Die primäre Aminogruppe des aromatischen Systems ist befähigt, erfindungsgemäß mit Aminosäuren bzw. Peptiden Amidbindungen zu bilden.
Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen, chromogenen Substrate, dadurch gekennzeichnet, daß Phenoxazinderivate entsprechend Formel II mit geschützten Aminosäuren, Aminosäurederivaten oder Peptiden umgesetzt werden. Die reaktiven Gruppen, die während der Herstellung der C-terminalen Aminosäure an die primären Aminogruppen des Farbstoffs nicht reagieren sollen, müssen entsprechend ihrer Reaktivität geschützt werden. Als temporäre Schutzgruppen werden bevorzugt Schutzgruppen des Urethantyps benutzt. Hierzu zählen beispielsweise die tert.-Butyloxycarbonylgruppe, die Benzyloxycarbonylgruppe oder die Biphenylylpropyloxycarbonylgruppe. Reaktive Seitengruppen der Aminosäuren bzw. Peptide können auch hinsichtlich der weiterführenden Peptidsynthese mit Schutzgruppen versehen sein, die je nach Bedarf erst am Ende der Synthese entfernt werden. So kann beispielsweise die Guanidinogruppe des Arginins mit der Nitrogruppe, der Tosylgruppe oder durch Protonierung, Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure durch Veresterung, Aminogruppen des Ornithins und Lysins durch Urethantypschutzgruppen und die phenolische Gruppe des Tyrosins durch Verätherung geschützt sein. Die Auswahl der Schutzgruppenkombination orientiert sich an den Gegebenheiten der üblichen bekannten Techniken der Peptidchemie, so daß obengenannte Schutzgruppen nur beispielhaft sind, da deren Vielfalt beträchtlich größer sein kann.
Die Herstellung der Amidbindungen bzw. Peptidbindungen erfolgt nach den üblichen Methoden der Peptidchemie. Üblicherweise werden dabei die Carboxylgruppen der geschützten Aminosäuren bzw. Peptide aktiviert und mit Aminogruppen der Reaktionspartner umgesetzt. Die Aktivierung der Carboxylgruppen erfolgt beispielsweise nach der Carbodiimid-, Azid-, Anhydrid-, Säurechlorid- oder Aktivestertechnik, wobei die Verknüpfungsreaktionen mit den Reaktanten in den üblichen Lösungsmitteln, wie beispielsweise Dimethylformamid, Methylenchlorid, Chloroform, Pyridin, Dimethylsulfoxid oder Hexamethylenphosphorsäuretriamid bzw. dessen Ersatzstoffe, gegebenenfalls unter Zusatz von Basen erfolgt. Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens können die als Ausgangsprodukte benutzten Phenoxazinderivate auch in die entsprechenden Isocyanate überführt werden, die mit N-geschützten Aminosäuren reagieren.

Bevorzugt werden als Chromophore Phenoxazinderivate folgender Struktur eingesetzt:



Colour Index Basic Blue 49

oder



Colour Index Basic Blue 124

Diese tiefblau gefärbten Chromophore wurden in bevorzugter Weise mit geschützten Aminosäuren nach dem DCC/HOBt-Verfahren zu rot gefärbten Verbindungen umgesetzt. Wurde die Aminosäure Arginin eingesetzt, so war die N^{α}-Gruppe mit der Boc-, Z- oder Fmoc-Gruppe und die N^{G}-Gruppe mit der Nitro-, Di-Z- oder Mtr-Gruppe geschützt. Im Falle des Lysins wurde die Schutzgruppenwahl Boc/Z gewählt.
Für beide Chromophore, sowohl das Colour Index Basic Blue 49 als auch das Colour Index Basic Blue 124 wurden hinsichtlich der spektralen Eigenschaften analoge Verbindungen erhalten, deren Absorptionsmaxima weniger als 5 nm differierten. So zeigen diese Farbstoffe in einem physiologischen Puffersystem eine Absorption bei etwa 625 nm, wogegen die peptidisch gebundenen Farbstoffe bei 545 nm absorbierten.
Der Aufbau zu Di-, Tri- oder Tetrapeptidsubstraten kann stufenweisen, d. h. unter Einführung geschützter, aktivierter Aminosäuren erfolgen oder vorteilhafterweise auch durch Einbeziehung geschützter, aktivierter Oligopeptide. Die N-terminalen Aminosäuren liegen vorzugsweise in der D-Form vor oder sind mit einer Schutzgruppe oder einer irreversiblen, den N-Terminus verschließenden Gruppierung, wie beispielsweise Tosyl-, Benzoyl-, Acetyl-, Benzoyloxycarbonyl versehen.
Die Entfernung von gegebenenfalls abzuspaltenden, permanenten Schutzgruppen erfolgt besonders bevorzugt am Ende der Synthese. Acidolytisch abspaltbare Schutzgruppen werden mit 1,2 n HCl/AcOH oder Trifluoressigsäure entfernt.
Hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppen werden im Wasserstoffdurchfluß mit Palladium/Aktivkohle abgespalten, wobei die Farbeigenschaften des Chromophors reversibel verschwinden.
Hinsichtlich einer schonenden Abspaltung der N^{G}-Schutzgruppen erwiesen sich mild-sauer entfernbare Gruppierungen als besonders günstig. Insbesondere zeigt die N^{G}-Mtr-Gruppe hier ein vorteilhaftes Verhalten.
Im folgenden zeigen die Beispiele die Herstellung der Peptidsubstrate. (Verwendete Abkürzungen siehe Seite 17).

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
7-(D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginylamino)-3-diethylamino-8-methylphenoxyzonium-triacetat
Stufe A: **7-(N^{α}-Boc-N^{G}-Mtr-L-Arginylamino)-3-diethylamino-8-methylphenoxazonium-triacetat-hemitetrachlorozinkat**
4,3 g N-Boc-N^{G}-Mtr-L-Arginin, 2,54 g 7-Amino-3-diethylamino-8-methylphenoxazonium-hemitetrachlorozinkat und 1,22 g HOBt wurden in 100 ml DMF gelöst und mit 1,1 ml NMM versetzt. Der Reaktionsansatz wurde im Eisbad gekühlt und man gab 2,1 g DCC dazu. Nach 2 Stunden wurde auf Raumtemperatur erwärmt, und die Kopplungsreaktion wurde 6 Stunden weitergeführt. Ausgefallener DCU wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in Butanol aufgenommen, dreimal mit Wasser extrahiert und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat gefällt, die Kristalle abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute: 4,7 g
Charakterisierung: DC $R_F = 0,15$ (B)
$R_F = 0,39$ (A)

Stufe B: **7-N^{G}-Mtr-Arginylamino-4-diethylamino-8-methylphenoxazoniumdihydrochlorid**
1,2 g des in Stufe A erhaltenen Produktes wurden mit 50 ml 1,2 N HCl/AcOH 30 min lang behandelt. Das Abspaltungsmittel wurde im Vakuum abgedampft und zweimal mit Toluol nachgeschleppt. Man erhielt nach Lyophilisation 950 mg rotes Kristallpulver.
Reinheitskontrolle: DC $R_F = 0,17$ (A)

Stufe C: **7-(N^{α}-Boc-D-Phenylalanyl-L-Prolyl-N^{G}-Mtr-arginylamino)-3-diethylamino-8-methylphenoxazoniumhydrochlorid**
720 mg des in Stufe B hergestellten Produktes wurden zusammen mit 135 mg HOBt und 362 mg Boc-D-Phe-Pro-OH in 25 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 4 °C gekühlt. Es wurden 215 mg DCC zugesetzt, 2 Stunden bei 4 °C und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ausgefallener DCU wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel abgedampft. Der ölige Rückstand wurde an Kieselgel (100 g KG 60 40–63 µm, Lösemittel D) chromatographiert. Das Produkt wurde zur weiteren Reinigung an (R)Sephadex LH 20 (MeOH) chromatographiert.
Ausbeute: 290 mg
Reinheitskontrolle: DC $R_F = 0,48$ (D)

Stufe D: **7-(D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginylamino)-3-diethylamino-8-methylphenoxazoniumtriacetat**
200 mg des in Stufe C erhaltenen Substrates wurden nach gründlicher Trocknung mit 4,5 ml Trifluoressigsäure und 0,5 ml Anisol 4 Stunden bei 40°C behandelt. Die Säure wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose (Whatman CM32, Ammoniumacetatgradient 0,01 M *p*H 4,5 bis 0,3 M *p*H 6,8) gereinigt. Der Elutionspuffer wurde durch mehrfaches Lyophilisieren entfernt.
Ausbeute: 135 mg rotes Pulver
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0,27 (20/10/2/1)

Aminosäureanalyse:
Phe = 0,98
Pro = 1,04
Arg = 1,00
Peptidgehalt = 96 %

Beispiel 2
7-(L-Alanyl-L-alanyl-L-phenylalanyl)-2-diethylamino-8-methyl-phenoxazonium-diacetat
Stufe 1 **7-(Boc-L-Phenylalanyl)-3-diethylamino-8-methyl-phenoxazoniumhemitetrachlorozinkat**
1,33 g Boc-L-Phe, 1,41 g 7-Amino-3-diethylamino-8-methyl-phenoxazoniumhemitetrachlorozinkat und 0,76 g HOBt wurden in 50 ml DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wurden 0,55 ml NMM und 1,05 g DCC zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden im Eisbad und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene DCU wurde abfiltriert und der Rückstand in MeOH gelöst. Durch Zugabe von Ether wurde das Produkt ausgefällt. Die Kristalle wurden abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute: 1,95 g
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0,77 (C)

Stufe 2 **7-L-Phenylalanyl-3-diethylamino-8-methyl-phenoxazoniumdihydrochlorid**
1,8 g des in Stufe 1 hergestellten Produktes wurden zur Entfernung der Boc-Gruppe mit 50 ml 1,2 N HCl/AcOH 25 min gerührt. Das Abspaltungsreagenz wurde im Vakuum abdestilliert und das ölige Produkt zweimal mit Toluol abgedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und zweimal mit einer Butanol/Ethylacetatmischung (1:2/Volumenanteile) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde lyophilisiert.
Ausbeute: 1,65 g
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0,26 (D)

Stufe 3 **7-Boc-L-Alanyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-3-diethylamino-8-methyl-phenoxazoniumhydrochlorid**
1 g Boc-Ala-Ala-OH, 0,58 g HOBt und 1,6 g des in Stufe 2 hergestellten Produktes wurden in 50 ml DMF gelöst und im Eisbad gekühlt. Man setzte 0,8 g DCC und 420 µl NMM hinzu und rührte 1 Stunde im Eisbad und 4 Stunden bei Raumtemperatur. Unlösliches wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der ölige Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (100 g Kieselgel, 40–63 µm, Laufmittel D). Das Produkt wurde zur weiteren Reinigung an (R)Sephadex LH 20 (MeOH) chromatographiert.
Ausbeute: 820 mg
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0,45 (D)

Stufe 4 **7-L-Alanyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-3-diethylamino-8-methylphenoxazoniumdiacetat**
300 mg des in Stufe 3 erhaltenen Produktes wurden in 20 ml 1,2 N HCl/AcOH 25 min gerührt. Die Säure wurde im Vakuum abdestilliert und anhaftende Säurespuren durch Destillation mit Toluol (zweimal) vertrieben. Der Rückstand wurde durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt (Whatman CM32, Ammoniumacetatgradient 0,01 M, *p*H 4,5 bis 0,3 M, *p*H 6,8). Das reine Produkt wurde durch Lyophilisation kristallin erhalten.
Ausbeute: 160 mg
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0,53 (20/10/2/1)
Aminosäureanalyse: Ala 2,06 Peptidgehalt: 0,89 %
Phe 1,00

In analoger Weise wurden die in Tabelle I aufgeführte Verbindungen/Substrate hergestellt:

TABELLE I

SUBSTRAT	VORSTUFE	REINIGUNG
pyro-Glu-Pro-Arg-Blue 49	pyro-Glu-Pro-Arg(Mtr)-Blue 49	Ionenaustausch-chromatographie
Z-D-Leu-Gly-Arg-Blue 49	Z-D-Leu-Gly + H-Arg-Blue 49 × 3 TFA	
Tos-Gly-Pro-Arg-Blue 49	Tos-Gly-Pro-Arg(Mtr)-Blue 49	
D-Leu-Pro-Arg-Blue 49	Boc-D-Leu-Pro-Arg(Mtr)-Blue 49	
D-Phe-Tyr-Arg-Blue 49	Boc-D-Phe-Tyr-Arg(Mtr)-Blue 49	
D-Val-Leu-Lys-Blue 49	Boc-D-Val-Leu-Lys(Boc)-Blue 49	
Z-D-Leu-Glu-Gly-Arg-Blue 49	Z-D-Leu-Glu(tBu)-Gly-Arg-Blue 49	
D-Phe-Pro-Arg-Blue 124	Boc-D-Phe-Pro-Arg(Mtr)-Blue 124	
D-Pro-Phe-Arg-Blue 49	Boc-D-Pro-Phe-Arg(Mtr)-Blue 49	

SUBSTRAT	VORSTUFE	REINIGUNG
D-Pro-Phe-Arg-Blue 124	Boc-D-Pro-Phe-Arg(Mtr)-Blue 124	Ionenaustausch-chromatographie
D-Ile-Leu-Pro-Arg-Blue 49	Z-D-Ile-Leu-Pro-Arg(NO_2)-Blue 49	
D-Phe-Pip-Arg-Blue 49	Z-D-Phe-Pip-Arg(NO_2)-Blue 49	
D-Ala-Gly-Arg-Blue 49	Boc-D-Ala-Gly-Arg(NO_2)-Blue 49	
D-Val-Tyr-Arg-Blue 49	Boc-D-Val-Tyr(tBu)-Arg(Mtr)-Blue 49	

Prüfung der Substrate

800 µl Pufferlösung (Trishydroxyaminomethan 50 mmol/l) pH 8,0 wurden mit 100 µl der Enzym-Lösung bei 37 °C versetzt und 100 µl 2 mmol/l Substratlösung zugegeben. Abgespaltenes pNA wurde bei 405 nm und Blue 49 bzw. Blue 124 bei 623 nm gemessen. Die Spaltgeschwindigkeiten wurden in OD/min bestimmt.
In der Tabelle II sind die relativen Spaltgeschwindigkeiten und somit die Spezifitäten einiger Substrate und Enzyme zu entnehmen.

TABELLE II

Synth. Substrat (2 mmol/l)	Urokinase	Protein C	Thrombin	Plasmin	F Xa	Kallikrein
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	–	0,075	0,41	0,035	0,025	0,11
H-D-Phe-Pro-Arg-Blue 49	–	0,03	0,395	0,00	0,01	0,00
pyro-Glu-Pro-Arg-pNA	–	0,40	0,41	0,53	0,04	0,51
H-D-Leu-Pro-Arg-Blue 49	–	0,47	0,09	0,015	0,035	0,015
pyro-Glu-Pro-Arg-Blue 49	1,0	0,22	0,015	0,03	0,02	0,015
pyro-Glu-Gly-Arg-pNA	–	0,30	0,00	0,01	0,01	0,01
Tos-Gly-Pro-Arg-Blue 49	–	0,76	0,15	0,02	0,095	0,02

Abkürzungen

pNA	para-Nitranilin
Blue 49	7-Amino-3-diethylamino-8-methylphenoxazoniumhemitetrachlorozinkat (bzw. -acetat)
Blue 124	7-Amino-3-diethylamino-8-methoxyphenoxazoniumhemitetrachlorozinkat (bzw. -acetat)
N^G	Stickstoffgruppe der Argininguanidinofunktion
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
HOBt	Hydroxybenzotriazol
DMF	Dimethylformamid
NMM	N-Methylmorpholin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	Dicyclohexylharnstoff
DC	Dünnschichtchromatographie
R_F	Retentionsfaktor
AcOH	Eisessig
MeOH	Methanol
OD	optische Dichte
Z	Carbobenzoxy-
Fmoc	9-Fluorenyloxycarbonyl-

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie:

A	Butanol/Eisessig/Wasser	3:1:1	(Volumenteile)
B	Chloroform/Methanol/Eisessig	50:10:5	(Volumenteile)
C	Chloroform/Methanol/Eisessig	50:10:2,5	(Volumenteile)
D	Chloroform/Methanol/Eisessig	50:15:3	(Volumenteile)

Die Abkürzungen der Aminosäuren sind in Übereinstimmung mit den IUPACIUB-Regeln (Biochem. J. **219**, 345–373, 1984).