



Erfolgspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

11

634 662

21 Gesuchsnummer: 6816/76

73 Inhaber:
Pentapharm AG, Basel

22 Anmeldungsdatum: 28.05.1976

72 Erfinder:
Lars Gundro Svendsen, Reinach BL

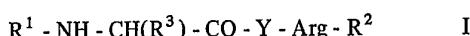
24 Patent erteilt: 15.02.1983

74 Vertreter:
Paul Wenger, Commugny

45 Patentschrift
veröffentlicht: 15.02.1983

54 Verwendung von Tripeptidderivaten zur quantitativen Bestimmung von Plasminogen-Aktivatoren.

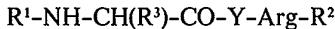
57 Verwendung von Tripeptidderivaten der Formel



in welcher R^1 , R^3 , Y und R^2 die im Patentanspruch 1 angegebene Bedeutung haben, oder von Salzen dieser Tripeptide mit Mineralsäuren oder organischen Säuren, als Substrate zur quantitativen Bestimmung von Urokinase und anderen Plasminogen-Aktivatoren sowie von Inhibitoren dieser Enzyme und Plasminogen-Proaktivatoren in Körperflüssigkeiten des Menschen und der Säugetiere und Gewebeextrakten, wobei die genannten Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakte mit einem der genannten Tripeptidderivate oder einem ihrer Salze zur Reaktion gebracht werden und die Menge des durch die hydrolytische Einwirkung der genannten Enzyme auf das Tripeptidderivat oder sein Salz gebildeten Spaltproduktes R^2 -H durch photometrische, spektrophotometrische oder fluoreszenzspektrophotometrische Methoden gemessen wird.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung von Tripeptidderivaten der Formel



I

in welcher R¹ Wasserstoff, eine gegebenenfalls in ω -Stellung eine Aminogruppe tragende Alkanoylgruppe mit 2 bis 18 Kohlenstoffatomen, eine Alkoxy carbonylgruppe mit 2 bis 13 Kohlenstoffatomen, eine Phenylalkanoylgruppe, deren Alkanoylrest 2 bis 11 Kohlenstoffatome enthält und deren Phenylrest gegebenenfalls eine Aminogruppe trägt, eine gegebenenfalls eine Amino- oder Aminoalkylgruppe tragende Cyclohexylcarbonylgruppe, eine gegebenenfalls eine Alkyl-, Amino- oder Aminoalkylgruppe tragende Benzoylgruppe, eine Benzyloxy carbonylgruppe, eine Alkylsulfonylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen oder eine Arylsulfonylgruppe, deren Arylrest ein- oder mehrkernig ist und gegebenenfalls Substituenten trägt, darstellt, R³ einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen darstellt, Y eine Glycyl- oder Serylgruppe darstellt und R² eine unter Bildung eines farbigen oder fluoreszierenden Amins R²-H enzymatisch abspaltbare, chromogene, substituierte Aminogruppe darstellt, oder von Salzen dieser Tripeptide mit Mineralsäuren oder organischen Säuren, als Substrate zur quantitativen Bestimmung von Urokinase und anderen Plasminogen-Aktivatoren sowie von Inhibitoren dieser Enzyme und Plasminogen-Proaktivatoren in Körperflüssigkeiten des Menschen und der Säugetiere und Gewebeextrakten, wobei die genannten Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakte mit einem der genannten Tripeptidderivaten oder einem ihrer Salze zur Reaktion gebracht werden und die Menge des durch die hydrolytische Einwirkung der genannten Enzyme auf das Tripeptidderivat oder sein Salz gebildeten Spaltproduktes R²-H durch photometrische, spektrophotometrische oder fluoreszenzspektrophotometrische Methoden gemessen wird.

2. Verwendung gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für die genannte Bestimmung ein Puffer verwendet wird, der Aprotinin und/oder Hirudin enthält, um andere in den Körperflüssigkeiten bzw. Gewebeextrakten gegebenenfalls vorhandene Enzyme, welche die Bestimmung der Plasminogen-Aktivatoren stören könnten, zu hemmen.

3. Verwendung gemäß Patentansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Puffer mit einem pH von 8,2 bis 8,6 und einer Ionenstärke von 0,15 bis 1,0 verwendet wird, der 0,02 bis 0,2 Trypsin-Inhibitor-Einheiten Aprotinin pro ml enthält.

4. Verwendung gemäß Patentansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Puffer mit einem pH von 8,2 bis 8,6 und einer Ionenstärke von 0,15 bis 1,0 verwendet wird, der 0,001 bis 10 Antithrombineinheiten Hirudin pro ml enthält.

5. Verwendung gemäß Patentansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Puffer mit einem pH von 8,2 bis 8,6 und einer Ionenstärke von 0,15 bis 1,0 verwendet wird, der 0,02 bis 0,2 Trypsin-Inhibitor-Einheiten Aprotinin und 0,001 bis 10 Antithrombineinheiten Hirudin pro ml enthält.

6. Verwendung gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Körperflüssigkeiten bzw. Gewebeextrakten, welche Inhibitoren der Urokinase bzw. anderer Plasminogen-Aktivatoren enthalten, ein Überschuss an Urokinase zugesetzt und nach einigen Minuten Präinkubation die restliche Urokinase-Aktivität bestimmt wird, indem eines der genannten Tripeptidderivat zugesetzt und die Menge des Spaltproduktes gemessen wird.

7. Verwendung nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Körperflüssigkeit unkonzentrierter Urin verwendet wird.

Der menschliche Organismus erzeugt mehrere Aktivatoren, die die Umwandlung des Proenzymes Plasminogen in das aktive Lysisenzym Plasmin bewirken. Zu dieser Gruppe von Aktivatoren gehören z.B. Gewebe- und Blutkinase und Urokinase. Diese Aktivatoren spielen im Mechanismus der Blutkoagulation eine wichtige Rolle. Bei einer abnorm grossen Ausschüttung dieser Aktivatoren besteht die Gefahr einer erhöhten Fibrinolyseaktivität und somit einer erhöhen Blutungstendenz oder Hämorrhagie. Umgekehrt wirkt sich eine zu schwache Ausschüttung dieser Aktivatoren in einer Störung des Gleichgewichts zwischen Koagulationsvermögen und Fibrinolyse und als Folge in einer erhöhten Thrombosegefahr aus. Der Bestimmung von Plasminogen-Aktivatoren in Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten kommt deshalb in der klinischen Praxis eine grosse Bedeutung zu, die z.B. von I. Witt in «Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse», Verlag Chemie, Weinheim, 1975, S. 119, wie folgt definiert wird: «Die Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität im Plasma oder Serum dient erstens der Erkennung von hyperfibrinolytischen Zuständen, mit denen verschiedene Krankheitsbilder einhergehen. Ausserdem sind in den letzten Jahren vielfach gute Ergebnisse bei der Lyse von intravasculären Thromben durch Verabfolgung von Plasminogen-Aktivatoren erreicht worden. Zur Kontrolle dieser thrombolytischen Therapie sind ebenfalls Messungen der fibrinolytischen Aktivität unerlässlich.» F.E. Smyrniotis et al. [Thromb. Diath. et Haemorrh. Bd. III, 257-270 (1959)] führen u.a. Folgendes aus: «Die Ausscheidung der Urokinase ist bei Normalpersonen unabhängig von Alter, Geschlecht und Harnmenge. Die Urokinaseausscheidung ist erhöht nach dem Auftreten eines Myokardinfarktes und nach einem Anfall von Koronarinsuffizienz. Die Ausscheidung ist vermindert bei Patienten mit Karzinose, kardialer Stauung und Urämie. Diese Unterschiede legen nahe, dass signifikante Veränderungen im fibrinolytischen System des Plasmas als Folge dieser Erkrankungen vorkommen können.»

Es gibt bisher keine wirklich zuverlässigen Methoden zur Bestimmung von Plasminogen-Aktivatoren in Körperflüssigkeiten und Organextrakten. Man kennt prinzipiell drei Methoden.

40 1. Spontan-Lyse eines Blutgerinnsels. Man lässt Blut spontan oder durch Zugabe von Thrombin gerinnen und beobachtet die Spontan-Lyse des Gerinnsels bei 37 °C. Eine Lyse findet normalerweise erst nach 24 Stunden statt. Diese Methode ist unspezifisch, da die Aktivatorenwirksamkeit nicht direkt, sondern indirekt über das Lysis-Enzym Plasmin gemessen wird (siehe I. Witt «Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse», Verlag Chemie, Weinheim, 1975, S. 119).

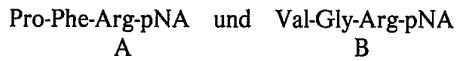
45 2. Hydrolyse von Casein. Bei dieser Methode wird von der Eigenschaft des Plasmins, Casein hydrolytisch abzubauen, Gebrauch gemacht. Casein wird mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Zu Beginn und am Ende wird ein aliquoter Teil der Inkubationsmischung mit Trichloressigsäure versetzt. Im Überstand wird durch spektrophotometrische Messung bei 280 nm der Tyrosingehalt bestimmt, aus welchem sich indirekt die Aktivatorenwirksamkeit annähernd errechnen lässt [L.F. Remmert et al., J. Biol. Chem. 181, 431 (1949)].

50 3. Esterolytische Methode (für Urokinase). Bei dieser Methode wird von der Eigenschaft der Urokinase, die Hydrolyse des N^α-Acetyl-L-lysin-methylesters direkt zu katalysieren, Gebrauch gemacht. Diese Methode hat auch zur Aufstellung der sogen. CTA-Urokinase-Einheit gedient (CTA = Committee on Thrombolytic Agents of the National Heart Institute, USA). Eine CTA-Einheit ist diejenige Menge Urokinase, die aus N^α-Acetyl-L-lysin-methylester $46,2 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ Methanol in 1 Stunde bei 37 °C freigesetzt (siehe N.U. Bang et al., «Thrombosis and Bleeding Disorders», Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971, S. 377). Diese Methode kann nur zur Bestimmung von reinen Urokinasepräparaten angewendet werden, eignet sich

jedoch nicht zur Bestimmung von Urokinase in Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakten, da der genannte Ester durch andere darin enthaltene proteolytische Enzyme (z.B. Plasmin, Plasmakallikrein usw.) schneller gespalten wird als durch Urokinase.

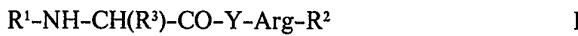
Es ist versucht worden, synthetische Amid- und Peptidsubstrate für die Bestimmung von Urokinase zu entwickeln. Diese Versuche sind jedoch erfolglos geblieben [siehe z.B. W. Troll et al., *Journal of Biological Chemistry* 208, 85 (1954)].

Bei Versuchen, ein synthetisches Substrat für die Bestimmung von Kallikrein zu entwickeln, wurden auf Grund theoretischer Überlegungen die folgenden Tripeptid-p-nitroanilide der Formel



synthetisiert. Diese Tripeptide enthalten die 3 letzten C-terminalen Aminosäuren der durch Einwirkung von Kallikrein auf Kininogen entstehenden Spaltprodukte. Es hätte deshalb erwartet werden können, dass diese beiden Substrate durch Kallikrein hydrolysiert würden, was sich jedoch nur für das Substrat der Formel A bewahrheitet hat. Es hat sich jedoch überraschenderweise gezeigt, dass das durch Kallikrein überhaupt nicht spaltbare Substrat der Formel B durch Urokinase und andere Plasminogen-Aktivatoren rasch amidolytisch gespalten wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tripeptidderivaten der Formel



in welcher R¹ Wasserstoff, eine gegebenenfalls in ω -Stellung eine Aminogruppe tragende Alkanoylgruppe mit 2 bis 18 Kohlenstoffatomen, eine Alkoxy carbonylgruppe mit 2 bis 13 Kohlenstoffatomen, eine Phenylalkanoylgruppe, deren Alkanoylrest 2 bis 11 Kohlenstoffatome enthält und deren Phenylrest gegebenenfalls eine Aminogruppe trägt, eine gegebenenfalls eine Amino- oder Aminoalkylgruppe tragende Cyclohexylcarbonylgruppe, eine gegebenenfalls eine Alkyl-, Amino- oder Aminoalkylgruppe tragende Benzoylgruppe, eine Benzyloxy carbonylgruppe, eine Alkylsulfonylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen oder eine Arylsulfonylgruppe, deren Arylrest ein- oder mehrkernig ist und gegebenenfalls Substituenten trägt, darstellt, R³ einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen darstellt, Y eine Glycyl- oder Serylgruppe darstellt und R² eine unter Bildung eines farbigen oder fluoreszierenden Amins R²-H enzymatisch abspaltbare, chromogene, substituierte Aminogruppe darstellt, oder von Salzen dieser Tripeptide mit Mineralsäuren oder organischen Säuren, als Substrate zur quantitativen Bestimmung von Urokinase und anderen Plasminogen-Aktivatoren sowie von Inhibitoren dieser Enzyme und Plasminogen-Proaktivatoren in Körperflüssigkeiten des Menschen und der Säugetiere und Gewebeextrakten, wobei die genannten Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakte mit einem der genannten Tripeptidderivaten oder einem ihrer Salze zur Reaktion gebracht werden und die Menge des durch die hydrolytische Einwirkung der genannten Enzyme auf das Tripeptidderivat oder sein Salz gebildeten Spaltproduktes R²-H durch photometrisches, spektrophotometrische oder fluoreszenzspektrophotometrische Methoden gemessen wird.

R¹ in der Formel I kann eine Acetyl-, Propionyl-, Butyryl-, Pentanoyl-, Hexanoyl- usw. bis Octadecanoylgruppe sein. Diese Gruppen können in ω -Stellung eine Aminogruppe tragen. R¹ kann somit z.B. auch eine ω -Aminobutyryl-, ω -Aminohexanoyl- oder ω -Aminodecanoylgruppe sein. R¹ kann ferner eine Phenylacetyl-, 3-Phenylpropionyl-, 4-Phenylbutyryl- usw. bis 12-Phenyldecanoylgruppe bezeichnen. Der Phenylrest der genannten Gruppen kann in p-Stellung eine Aminogruppe tragen. Somit kann R¹ eine p-Aminophenyl-acetyl-, 3-p-Aminophenyl-propionyl-, 4-p-Aminophenyl-butyryl- usw. bis 12-p-Aminophenyl-decanoylgruppe sein. R¹ kann zusätzlich eine Cyclohexylcarbonyl-, 4-Aminocyclohexylcarbonyl-, 4-Aminomethylcyclohexylcarbonyl-, 4-Aminoäthylcyclohexylcarbonyl-, 4-Aminopropylcyclohexylcarbonyl- oder 4-Aminobutylcyclohexylcarbonylgruppe darstellen. R¹ kann noch eine Benzoylgruppe darstellen, die eine Amino-, Aminoalkyl- oder Alkylgruppe tragen kann, wobei das Alkyl Methyl, Äthyl, Propyl, Isopropyl, Butyl oder Isobutyl sein kann.

R¹ kann z.B. auch eine Methyl-, Äthyl-, Phenyl-, Methylphenyl- oder Naphthylsulfonylgruppe sein.

R² bezeichnet enzymatisch abspaltbare, chromogene, substituierte Aminogruppen, die auf dem Peptidgebiet an sich bekannt sind. R² kann insbesondere eine p-Nitrophenylamino-, 2-Naphthylamino-, 4-Methoxy-2-naphthylamino- oder 1,3-Di(methoxycarbonyl)-phenyl-(5)-aminogruppe (abgeleitet von 5-Amino-isophthalsäure-dimethylester) sein.

Die Herstellung der erfundungsgemäss verwendeten Substrate kann nach verschiedenen, z.T. bekannten Methoden erfolgen:

1. Bei der ersten Methode werden die chromophoren Gruppen (R² in Formel I) an der C-terminalen Aminosäuregruppe angehängt. Diese Gruppen üben gleichzeitig die Funktion von C-terminalen Carboxylschutzgruppen während der stufenweisen Anknüpfung von Aminosäuren bis zum gewünschten Peptidgerüst aus. Die übrigen Schutzgruppen werden vom Schlussprodukt selektiv abgespalten, ohne dass die chromophore Gruppe beeinflusst wird. Diese Methode ist z.B. in «Peptide Synthesis» von Miklos Bodanszky et al., Interscience Publishers, 1966, Seiten 163-165, beschrieben.

2. Bei der zweiten Methode wird die chromophore Gruppe an das fertig aufgebaute Peptidgerüst angekuppelt, und zwar dadurch, dass nach erfolgtem, stufenweisem Aufbau des gewünschten Peptidgerüstes die C-terminale Carboxylgruppe zuerst durch alkalische Hydrolyse des Esters freigesetzt wird, worauf die chromophore Gruppe an die Carboxylgruppe angehängt wird. Die übrigen Schutzgruppen werden zum Schluss selektiv abgespalten, und zwar unter Bedingungen, bei welchen die chromophore Gruppe intakt bleibt. Diese Methode ist in «Peptide Synthesis», siehe oben, Seiten 43 und 44, beschrieben.

3. Bei der dritten Methode wird die chromophore Gruppe an das fertig aufgebaute Peptidgerüst angekuppelt, nachdem zuvor die übrigen Schutzgruppen abgespalten worden sind. Die C-terminale Carboxylgruppe wird in diesem Fall durch racemisierungsfreie enzymatische Esterspaltung freigesetzt. Diese esterspaltenden Enzyme können entweder frei oder an einer Matrix gebunden sein.

Zum Schutz der N^α-Aminogruppen während des stufenweisen Aufbaus der Peptidketten können gewöhnliche, bekannte Aminoschutzgruppen, die selektiv abgespalten werden können, verwendet werden. Es handelt sich in erster Linie um Cbo, MeOCbO, NO₂Cbo, MCbo, BOC, TFA oder Formyl. Die α -Carboxylgruppe der Aminosäuren kann nach verschiedenen bekannten Methoden reaktionsfähig gemacht werden, z.B. durch Herstellung der p-Nitrophenylesterderivate, Trichlorphenylesterderivate, Pentachlorphenylesterderivate, N-Hydroxy-succinimidesterderivate und Isolierung dieser Derivate oder durch Herstellung in situ der Säureazide oder Säureanhydride, die entweder symmetrisch oder asymmetrisch sein können.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe kann auch mittels eines Carbodiimids, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, erfolgen.

Die Carboxylgruppe, die in den Peptidderivaten C-terminal steht, wird entweder mittels der chromophoren Amidgruppe

oder aber als Methyl-, Äthyl- oder Isopropylester während des stufenweisen Aufbaus des gewünschten Peptidgerüstes geschützt.

Die übrigen freien reaktionsfähigen Gruppen, die nicht am Aufbau des Peptidgerüstes beteiligt sind, können durch folgende spezielle Massnahmen blockiert werden: Die δ -Guanidogruppe des Arginins wird durch NO_2 , Tos oder durch einfache Protonisierung geschützt, während die ϵ -Aminogruppe des Lysins mittels CbO, BOC oder Tos geschützt wird.

Bei der Synthese der Tripeptidkette kann man zuerst die N-terminale Aminosäure oder Dipeptidsäure mit der Blockierungsgruppe (Acyl- oder Sulfonylgruppe) versehen, dann die Carboxylgruppe der blockierten Aminosäure oder Dipeptidsäure aktivieren und schliesslich das so erhaltene aktivierte Aminosäurederivat oder Dipeptidsäurederivat an das zur Vollständigung der Peptidkette benötigte Dipeptidderivat anknüpfen.

Die Herstellung der erfindungsgemäss verwendeten Substrate nach den oben genannten Methoden ist in den folgenden Beispielen ausführlicher beschrieben.

Die Analyse der gemäss den Beispielen erhaltenen Eluate und Produkte wurde durch Dünnschichtchromatographie ausgeführt. Zu diesem Zweck wurden mit Siliciumdioxydgel F 254 (Merck) überzogene Glasplatten verwendet. Zur Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurden die folgenden Lösungsmittelsysteme verwendet:

- A Chloroform/Methanol (9:1)
- B n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:1:2)
- C n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1)

Die Chromatogramme wurden zuerst im UV-Licht und dann durch Reaktion mit Chlor/Toluidin (siehe G. Pataki, «Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie», Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1966, S. 125) entwickelt.

In der vorliegenden Beschreibung (einschliesslich Patentansprüchen) werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ala	=	L-Alanin
β -Ala	=	β -Alanin
Arg	=	L-Arginin
But	=	L-2-Aminobuttersäure
4-But	=	4-Aminobuttersäure
Gly	=	Glycin
Ile	=	L-Isoleucin
D-Ile	=	D-Isoleucin
Leu	=	Leucin
NLeu	=	L-Norleucin
NVal	=	N-Norvalin
Ser	=	L-Serin
Val	=	L-Valin
D-Val	=	D-Valin
Ac	=	Acetyl
Ac ₂ O	=	Acetanhydrid
AcOH	=	Essigsäure
BOC	=	tert.-Butoxycarbonyl
Bz	=	Benzoyl
Bzl	=	Benzyl
Bz ₂ O	=	Benzoesäureanhydrid
Cbo	=	Carbobenzoxy
DCCI	=	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	=	Dicyclohexylamin
DCH	=	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
DMF	=	Dimethylformamid
DPA	=	1,3-Di(methoxycarbonyl)-phenyl-(5)-amid
DSC	=	Dünnschichtchromatogramm
Et ₃ N	=	Triäthylamin
HMPTA	=	N,N,N',N'',N''-Hexamethylphosphorsäuretriamid

LMS	=	Lösungsmittelsystem
MCbo	=	p-Methoxyphenylazocarbobenzoxy
MeOH	=	Methanol
NA	=	Naphthylamid
⁵ OtBu	=	tert.-Butoxy
OEt	=	Äthoxy
OisoPr	=	Iso-Propoxy
OMe	=	Methoxy
OpNP	=	p-Nitrophenoxy
¹⁰ OSu	=	N-Succinimidoxy
pNA	=	p-Nitroanilin
Smp	=	Schmelzpunkt
TFA	=	Trifluoracetyl
Tos	=	p-Toluolsulfonyl

¹⁵ Beispiel 1

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

Ia) $\text{N}^{\alpha}\text{-Cbo-Arg(NO}_2\text{)-pNA}$

1. In einem 500-ml-Dreihalsrundkolben wurden 32,55 g (92,1 mMol) gut getrocknetes Cbo-Arg(NO₂)-OH in 200 ml von über P₂O₅ getrocknetem und frisch destilliertem N,N,N',N',N''-Hexamethylphosphorsäuretriamid unter Feuchtigkeitsausschluss bei 20 °C gelöst. Zu dieser Lösung wurden zuerst 9,32 g (92,1 mMol) Et₃N und nachfolgend 18,90 g (115,1 mMol)

²⁵ p-Nitrophenylisocyanat in 25%igem Überschuss portionenweise zugesetzt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wurde die Reaktionslösung unter Röhren zu 1,5 Liter 2%iger NaHCO₃-Lösung zugetropft. Das ausgefällte Produkt wurde abfiltriert und dreimal mit je 0,7 Liter 2%iger

³⁰ NaHCO₃-Lösung, dreimal mit je 0,7 Liter dest. Wasser, dreimal mit je 0,5 Liter 0,5-n HCl und schliesslich dreimal mit je 0,5 Liter dest. Wasser gewaschen. Das derart gewonnene Produkt wurde im Vakuum bei 40 °C getrocknet und hierauf zweimal mit je 200 ml siedendem Methanol extrahiert, wobei die Hauptmenge des als Nebenprodukt angefallenen $\text{N}^{\alpha}\text{-Cbo-}\omega\text{-nitroargininlactams}$ neben nur geringen Mengen an gewünschtem Produkt herausgelöst wurde. Das auf diese Weise gewonnene, vorgereinigte Rohprodukt wurde nach dem Trocknen zweimal mit je 50 ml auf 70 °C erhitzen DMF extrahiert, wobei das

⁴⁰ gewünschte Produkt vollständig herausgelöst wurde, während das Nebenprodukt, nämlich N,N'-bis-p-Nitrophenylharnstoff, ungelöst zurückblieb. Die DMF-Lösung wurde im Vakuum bei 40 °C eingegengt. Nach Zusatz von MeOH kristallisierte eine Substanz aus, welche in den Lösungsmittelsystemen A und B

⁴⁵ chromatographisch einheitlich war und einen Smp. von 186–188,5 °C aufwies.

Ausbeute: 29,75 g (68,2% der Theorie). Durch Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₀H₂₃N₇O₇ wurden folgende Werte ermittelt (die Werte für die Bruttoformel sind

⁵⁰ in Klammern gesetzt): 8: C = 50,42% (50,74%); H = 4,98%

(4,90%); N = 20,90% (20,71%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 1,27^{\circ}$ (c = 1,0; AcOH).

2. In einem 500 ml Dreihalsrundkolben wurden 17,7 g (50 mMol) getrocknetes Cbo-Arg(NO₂)-OH in 350 ml THF:DMF (1:1) gelöst, worauf unter Feuchtigkeitsausschluss 5,05 g (50 mMol) Et₃N zugesetzt wurden. Nach Abkühlung der Reaktionslösung auf -10 °C wurden dann 6,85 g (50 mMol) Chlorameisensäureisobutylester, gelöst in 30 ml THF, innerhalb 15 Minuten zugetropft, wobei eine Temperatur von -10 bis -5 °C eingehalten wurde. Nach etwa 10 Minuten wurden 8,2 g (50

⁶⁰ mMol) p-Nitroanilin, gelöst in 15 ml DMF, zugetropft, wobei wiederum eine Temperatur von -10 bis -5 °C eingehalten wurde. Nach 2 Stunden wurde die Kühlung unterbrochen und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur während 24 Stunden stehengelassen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im

⁶⁵ Vakuum wurde der Rückstand nacheinander je dreimal mit dest. Wasser, dreimal mit 5%iger NaHCO₃-Lösung und wiederum dreimal mit dest. Wasser dirigiert. Nach dem Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt in Methanol gelöst und

über eine mit Methanol äquilibrierte Säule von «Sephadex LH-20» (vernetztes Dextrangel) laufengelassen. Aus einer Fraktion des Eluats erhielt man 7,67 g Substanz (32,4% der Theorie) mit den gleichen physikalischen Eigenschaften wie das gemäss Absatz 1) erhaltene Endprodukt.

3. 17,7 g (50 mMol) Cbo-Arg(NO₂)-OH wurden in 75 ml DMF gelöst. Nach Abkühlung auf -10 °C wurden der Lösung nacheinander 10,3 g (50 mMol) DCCI und 8,2 g (50 mMol) p-Nitroanilin zugesetzt. Nach 4 Stunden bei -10 °C und 20 Stunden bei 20 °C wurde der gebildete DCH abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und über eine mit MeOH äquilibrierte Säule von «Sephadex LH-20» laufengelassen. Neben viel Nebenprodukt, nämlich N-Cbo-Arg-(NO₂)-N,N'-dicyclohexylharnstoff, wurden aus einer Fraktion des Eluats 4,32 g Substanz (17,9% der Theorie) gewonnen, welche die gleichen physikalischen Eigenschaften wie das nach Absatz 1 hergestellte Endprodukt aufwies.

Ib) N^a-Cbo-Gly-Arg(NO₂)-pNA

Unter Feuchtigkeitsausschluss wurden 9,5 g (20 mMol) N^a-Cbo-Arg(NO₂)-pNA (siehe Beispiel Ia) in einem Kolben mit 80 ml 2-n HBr in Eisessig unter Röhren eine Stunde bei 20 °C behandelt, wobei diese Substanz sich unter CO₂-Entwicklung löste. Die Reaktionslösung wurde unter intensivem Röhren zu 600 ml getrocknetem Äther langsam zugetropft, wobei HBr · H₂Arg(NO₂)-pNA ausfiel. Die Ätherphase wurde mit einem Filterstab abgesaugt. Die verbleibende Fällung wurde noch viermal mit je 150 ml trockenem Äther behandelt, um das gebildete Benzylbromid und überschüssiges HBr sowie Essigsäure zu entfernen. Nach dem Trocknen im Vakuum über NaOH-Plättchen wurde das deblockierte Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten. Das trockene Hydrobromidderivat wurde in 50 ml DMF gelöst, auf -10 °C gekühlt und mit 4,16 ml (30 mMol) Et₃N versetzt, um H-Arg(NO₂)-pNA aus dem Hydrobromid freizusetzen. Das gebildete Et₃N · HBr-Salz wurde abgenutscht, mit wenig kaltem DMF nachgewaschen, und dem Filtrat wurden 6,94 g (21 mMol) Cbo-Gly-OpNP bei -10 °C zugesetzt. Nach einigen Stunden hatte die Reaktionslösung Zimmertemperatur angenommen. Sie wurde wieder auf -10 °C gekühlt und mit 1,4 ml (10 mMol) Et₃N gepuffert. Nach etwa 5 Stunden wurden nochmals 1,4 ml Et₃N zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Reaktionslösung im Vakuum bei 40 °C zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 100 ml dest. H₂O digeriert und wiederum im Vakuum bei 40 °C über NaOH-Plättchen getrocknet. Das getrocknete Produkt wurde aus Methanol umkristallisiert, wobei 6,77 g Substanz, die in den Lösungsmittelsystemen A und B chromatographisch einheitlich war, gewonnen wurden. Aus der Mutterlauge wurden durch Gelfiltration über eine mit MeOH äquilibrierte Säule von «Sephadex LH-20» noch 4,29 g Substanz gewonnen. Total wurden somit 11,06 g (87,7% der Theorie) einheitlicher Substanz mit einem Smp. von 159–161 °C erhalten. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₂H₂₆N₈O₈ ergaben die folgenden Werte (die aus der Bruttoformel errechneten Werte sind in Klammern gesetzt): C = 50,07% (C = 49,81%); H = 4,99% (H = 4,94%); N = 21,48% (N = 21,12%).

Ic) N^a-Cbo-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA

10,6 g (20 mMol) N^a-Cbo-Gly-Arg(NO₂)-pNA (siehe Beispiel Ib) wurden mit 120 ml 2-n HBr in Eisessig (0,24 Mol) behandelt und wie im Beispiel Ib) aufgearbeitet. Das über NaOH-Plättchen im Vakuum getrocknete Hydrobromid des Dipeptidderivats wurde in 50 ml DMF gelöst und nach Kühlung mit 3,04 g Et₃N in 10 ml DMF (30 mMol) versetzt. Gebildetes Et₃N · HBr wurde abfiltriert und mit wenig kaltem DMF gewaschen. Zum Filtrat wurden 8,20 g (22 mMol) Cbo-Val-OpNP gegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog wie im Beispiel Ib. Durch Gelfiltrierung an einer mit MeOH äquilibrierten «Sephadex

LH-20»-Säule wurden nach Eluierung mit MeOH 10,95 g (87,0% der Theorie) von in den Lösungsmittelsystemen A und B chromatographisch-einheitlicher Substanz mit einem Smp. von 212–214 °C gewonnen. Die Elementaranalyse und die Berechnung aus der Bruttoformel C₂₇H₃₃N₉O₈ ergaben die folgenden Werte: C = 52,01% (51,50%); H = 5,68% (5,60%); N = 20,27% (20,02%). (Die aus der Bruttoformel errechneten Werte sind in Klammern gesetzt.)

10 Id) N^a-Bz-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA

10,90 g (17,3 mMol) N^a-Cbo-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA (siehe Beispiel Ic) wurden mit 70 ml 2-n HBr in Eisessig (0,14 Mol) behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde wie im Beispiel Ib beschrieben aufgearbeitet. Nach Lösen des getrockneten Tripeptidhydrobromidderivates in 60 ml DMF wurden der Lösung nach Abkühlung 3,60 ml Et₃N (26 mMol) zugesetzt. Das gebildete Et₃N · HBr wurde abfiltriert und mit wenig kaltem DMF gewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde mit 6,66 g (29,4 mMol) Benzoesäureanhydrid versetzt. Anschliessend wurde gepuffert und wie im Beispiel Ib) aufgearbeitet. Das getrocknete Produkt wurde aus MeOH umkristallisiert, wobei 4,28 g Substanz, die in den Lösungsmittelsystemen A und B chromatographisch einheitlich war, mit einem Smp. von 222–223 °C gewonnen wurden. Aus der Mutterlauge wurden durch Gelfiltration über eine mit MeOH äquilibrierte Säule von «Sephadex LH-20» noch 3,75 g Substanz mit einem Smp. von 222–223 °C gewonnen. Total ergab dies somit 8,03 g (77,4% der Theorie) einheitlicher Substanz. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₆H₃₃N₉O₈ ergaben die folgenden Werte: C = 51,88% (52,08%); H = 5,63% (5,55%); N = 21,56% (21,03%).

I. N^a-Bz-Val-Gly-Arg-pNA · HCl

6,044 g (10,08 mMol) N^a-Bz-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA (siehe Beispiel Id) wurden in einem Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen. 81 ml 1molare Bor-tris-trifluoracetat in Trifluoressigsäure wurden zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei 0 °C und anschliessend 22 Stunden bei 20 °C wurde unter Röhren und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit die Nitroschutzgruppe abgespalten. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne im Vakuum eingeengt, der Rückstand in MeOH aufgenommen. Um das Peptidderivat in das HCl-Salz überzuführen, wurden 1,0 ml konz. HCl zugesetzt und die Lösung zur Trockne im Vakuum eingeengt. Nach dreimaligem Wiederholen dieses Vorgangs wurde der Rückstand in 200 ml 30%iger Essigsäure gelöst. Zur Reinigung wurde die AcOH-Lösung auf eine mit 30%iger AcOH äquilibrierte «Sephadex G-15»-Säule aufgetragen und mit 30%iger AcOH eluiert. Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach dem Zusatz von 0,85 ml (10,1 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 4,75 g (79,7% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC in LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₆H₃₃N₉O₆C ergaben die folgenden Werte: C = 52,71% (52,83%); H = 5,88% (5,97%); N = 19,07% (18,96%) und Cl = 5,95% (6,00%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,97 – Gly: 1,0 – Val: 0,98.

Beispiel 2

II. H-Val-Gly-Arg-pNA · 2HCl

630 mg (1 mMol) von gemäss Beispiel 1, Absatz Ic, hergestelltem N^a-Cbo-Val-Gly-Arg(NO₂)-pNA wurden im Reaktionsgefäß eines Sakakibara-Apparates eingewogen. 10 ml getrocknetes Fluorwasserstoffgas wurden im Reaktionsgefäß kondensiert. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde bei 0 °C wurde unter Röhren die N^a-Carbobenzoxychlorogruppe sowie die Nitroschutzgruppe von Arginin abgespalten. Das kondensierte Fluorwasserstoffgas wurde im Vakuum abgestilliert und der

Rückstand in DMF gelöst. Um das Peptidderivat in das HCl-Salz überzuführen, wurden 0,2 ml konz. HCl zugesetzt und die Lösung zur Trockne eingeengt. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Vorgangs wurde der Rückstand in 25 ml 30%iger AcOH gelöst. Zur Reinigung wurde die AcOH-Lösung auf eine mit 30%iger AcOH äquilierte «Sephadex G-15»-Säule aufgetragen und mit 30%iger AcOH eluiert. Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach Zusatz von 160 µl (2 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 360 mg (68,8% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC in LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{19}H_{32}N_8O_5Cl_2$ ergaben die folgenden Werte: C = 43,85% (43,60%); H = 6,23% (6,16%); N = 21,65% (21,41%) und Cl = 13,42% (13,55%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,98 - Gly: 1,00 - Val: 0,96.

Beispiel 3

III. N^{α} -Bz-Ile-Gly-Arg-pNA · HCl

IIIa) N^{α} -Cbo-Ile-Gly-Arg(NO₂)-pNA

5,3 g (10 mMol) der gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert, in 35 ml DMF gelöst und mit 2,08 ml (15 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurde das gebildete Et₃N · HBr abfiltriert und mit wenig kaltem DMF gewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde mit 4,25 g (11 mMol) Cbo-Ile-OpNP versetzt und die Reaktionslösung wurde gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 5,50 g (85,5% der Theorie) der kristallinen Verbindung IIIa, die bei 197–200 °C schmolz und im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{28}H_{37}N_9O_9$ ergaben die folgenden Werte: C = 51,98% (52,25%); H = 5,91% (5,79%) und N = 19,73% (19,59%).

IIIb) N^{α} -Bz-Ile-Gly-Arg(NO₂)-pNA

1,29 g (2 mMol) der gemäss Beispiel 3, Absatz IIIa, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert, in 15 ml DMF gelöst und mit 420 µl (3 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurde das Reaktionsgemisch mit 680 mg (3 mMol) Bz₂O versetzt, und die Reaktionslösung wurde gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 1,05 g (85,6% der Theorie) der amorphen Verbindung IIb, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{35}N_9O_8$ ergaben die folgenden Werte: C = 52,54% (52,85%); H = 5,85% (5,75%) und N = 20,68% (20,54%).

III. N^{α} -Bz-Ile-Gly-Arg-pNA · HCl

614 mg (1 mMol) der gemäss Beispiel 3, Absatz IIIb, hergestellten Verbindung wurden im Reaktionsgefäß eines Sakakibara-Apparates eingewogen. 10 ml getrocknetes Fluorwasserstoffgas wurden im Reaktionsgefäß kondensiert. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei 0 °C wurde unter Rühren die Arginin-Nitroschutzgruppe abgespalten. Das kondensierte Fluorwasserstoffgas wurde im Vakuum aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert und der Rückstand in DMF gelöst. Um das Peptidderivat in das HCl-Salz überzuführen, wurden 0,2 ml (~2,5 mMol) konz. HCl zugesetzt und die Lösung zur Trockne eingeengt. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Vorgangs wurde der Rückstand in 50 ml 30%iger AcOH gelöst. Zur Reinigung wurde die AcOH-Lösung auf eine mit 30%iger AcOH äquilierte «Sephadex G-15»-Säule aufgetragen und mit 30%iger AcOH eluiert. Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach Zusatz von 80 µl (1 mMol) konz. HCl

lyophilisiert. Man erhielt 505 mg (83,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC in LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{37}N_8O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte: C = 53,28% (53,59%); H = 6,21% (6,16%); N = 18,70% (18,52%) und Cl = 5,82% (5,86%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,96 - Gly: 1,00 - Ile: 0,98.

10 Beispiel 4

IV. N^{α} -Bz-Leu-Gly-Arg-pNA · HCl

IVa) N^{α} -Cbo-Leu-Gly-Arg(NO₂)-pNA

2,65 g (5 mMol) der gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert, in 25 ml DMF gelöst und mit 1,04 ml (7,5 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurde das gebildete Et₃N · HBr abfiltriert und mit wenig kaltem DMF gewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde mit 2,13 g (5,5 mMol) Cbo-Leu-OpNP versetzt und die Reaktionslösung wurde weiterbehandelt gemäss

20 Beispiel 1, Absatz Ib. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 2,85 g (88,6% der Theorie) der kristallinen Verbindung IVa, die bei 189–191 °C schmolz und im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{28}H_{37}N_9O_9$ ergaben die 25 folgenden Werte: C = 52,05% (52,25%); H = 5,79% (5,79%) und N = 19,91% (17,59%).

IVb) N^{α} -Bz-Leu-Gly-Arg(NO₂)-pNA

1,29 g (2 mMol) der gemäss Beispiel 4, Absatz IVa, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert, in 15 ml DMF gelöst und mit 420 µl (3 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurde das Reaktionsgemisch mit 680 mg (3 mMol) Bz₂O versetzt und die Reaktionslösung gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 0,99 g (80,7% der Theorie) der amorphen Verbindung IVb, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{35}N_9O_8$ ergaben die folgenden Werte: C = 52,49% (52,85%); H = 5,81% (5,75%) und N = 20,59% (20,54%).

IV. N^{α} -Bz-Leu-Gly-Arg-pNA · HCl

614 mg (1 mMol) der gemäss Beispiel 4, Absatz IVb, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 2, Absatz II, zur 45 Verbindung IV umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung an «Sephadex G-15» in 30%iger AcOH.

Ausbeute: Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten liess, wurde nach Zusatz von 80 µl (1 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 508 mg (84,0% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{37}N_8O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte: C = 53,75% (53,59%); H = 6,21% (6,16%); N = 18,74% (18,52%) und Cl = 5,76% (5,86%). Die 55 Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,97 - Gly: 1,00 - Leu: 1,02.

Beispiel 5

V. N^{α} -Bz-Val-Ser-Arg-pNA · HCl

60 Va) N^{α} -BOC-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-pNA

3,55 g (7,5 mMol) der gemäss Beispiel 1, Absatz Ia, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert, in 35 ml DMF gelöst und mit 1,56 ml (11,3 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurde das gebildete Et₃N · HBr abfiltriert und mit wenig kaltem DMF nachgewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde mit 3,35 g (8 mMol) BOC-Ser(OBzl)-OpNP versetzt und die Reaktionslösung gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an

«Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 4,09 g (88,4% der Theorie) einer teilweise kristallinen Verbindung Va, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{36}N_8O_9$ ergaben die folgenden Werte: C = 52,82% (52,59%); H = 5,78% (5,88%) und N = 18,30% (18,17%).

Vb) N^{α} -BOC-Val-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA

3,08 mg (5 mMol) der gemäss Beispiel 5, Absatz Va, hergestellten Verbindung wurden in einem Erlenmeyerkolben einge-wogen und unter Feuchtigkeitsausschluss mit 15 ml Trifluoresigsäure versetzt. Unter Röhren bei 20 °C, 30 Minuten, löste sich die Substanz unter CO₂-Entwicklung. Die Reaktionslösung wurde unter intensivem Röhren zu 250 ml getrocknetem Äther langsam zugetropft, wobei CF₃COOH · H-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA ausfiel. Die Ätherphase wurde mit einem Filterstab abgesaugt. Die verbleibende Fällung wurde noch dreimal mit je 50 ml trockenem Äther behandelt, um das gebildete tert. Butanol und überschüssige Trifluoresigsäure zu entfernen. Nach dem Trocknen im Vakuum über NaOH-Plättchen wurde das deblockierte Produkt in fast quantitativer Ausbeute erhalten. Das trockene Trifluoracetatderivat wurde in 25 ml DMF gelöst, auf -10 °C gekühlt und mit 1,04 ml (7,5 mMol) Et₃N versetzt, um H-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA aus dem Trifluoracetat freizusetzen, und danach wurde 1,73 g (5,5 mMol) BOC-Val-OSu zugesetzt. Nach einigen Stunden hatte die Reaktionslösung Zimmertemperatur angenommen. Sie wurde wieder auf -10 °C gekühlt und mit 0,35 ml (2,5 mMol) Et₃N gepuffert. Nach etwa 5 Stunden wurden nochmals 0,35 ml Et₃N zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Reaktionslösung im 30 Vakuum bei 40 °C zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 2,81 g (78,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{32}H_{45}N_9O_{10}$ ergaben die folgenden Werte: C = 54,03% (53,70%); H = 6,40% (6,34%) und N = 17,88% (17,61%).

Vc) N^{α} -Bz-Val-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA

716 mg (1 mMol) der gemäss Beispiel 5, Absatz Vb, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 5, Absatz Vb, deblockiert, in 8 ml DMF gelöst und mit 210 µl (1,5 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurden 450 mg (2 mMol) Bz₂O zugesetzt und die Reaktionslösung gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 532 mg (73,9% der Theorie) der kristallinen Verbindung Vc, die bei 175–178 °C schmolz und im DCS in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{34}H_{41}N_9O_9$ ergaben die folgenden Werte: C = 56,65% (56,74%); H = 5,69% (5,74%) und N = 17,83% (17,52%).

V. N^{α} -Bz-Val-Ser-Arg-pNA · HCl

360 mg (0,5 mMol) der gemäss Beispiel 5, Absatz Vc, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 2, Absatz II, zur Verbindung V umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung an «Sephadex G-15» in 30%iger AcOH.

Ausbeute: Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach Zusatz von 40 µl (0,5 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 160 mg (51,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC in LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{37}N_8O_3Cl$ ergaben die folgenden Werte: C = 52,49% (52,21%); H = 6,08% (6,00%); N = 18,26% (18,04%) und Cl = 5,63% (5,71%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,99 – Ser: 0,95 – Val: 1,00.

Beispiel 6

VI. N^{α} -Bz-Ile-Ser-Arg-pNA · HCl

VIIa) N^{α} -BOC-Ile-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA
1,54 g (2,5 mMol) der gemäss Beispiel 5, Absatz Va, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 5, Absatz Vb, deblockiert, in 15 ml DMF gelöst und mit 520 µl (3,75 mMol) Et₃N versetzt. Nach Kühlen auf -10 °C wurden 905 mg (2,75 mMol) BOC-Ile-OSu zugesetzt und die Reaktionslösung gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 1,45 g (79,5% der Theorie) der amorphen Verbindung VIIa, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{33}H_{47}N_9O_{10}$ ergaben die folgenden Werte: C = 54,82% (54,31%); H = 6,52% (6,49%) und N = 17,35% (17,27%).

VIIb) N^{α} -Bz-Ile-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA

730 mg (1 mMol) der gemäss Beispiel 6, Absatz VIIa, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 5, Absatz Vb, deblockiert und in 7 ml DMF gelöst. Nach dem Kühlen auf -10 °C wurde die Lösung mit 210 µl (1,5 mMol) Et₃N und gleich anschliessend mit 450 mg (2 mMol) Bz₂O versetzt. Die Reaktionslösung wurde gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 615 mg (83,8% der Theorie) der amorphen Verbindung VIIb, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{35}H_{45}N_9O_9$ ergaben die folgenden Werte: C = 57,61% (57,29%); H = 6,01% (5,91%) und N = 17,53% (17,18%).

VI. N^{α} -Bz-Ile-Ser-Arg-pNA · HCl

367 mg (0,5 mMol) der gemäss Beispiel 6, Absatz VIIb, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 2, Absatz II, zur Verbindung VI umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung an «Sephadex G-15» in 30%iger AcOH.

Ausbeute: Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten liess, wurde nach Zusatz von 40 µl (0,5 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 168 g (45,8% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{28}H_{39}N_8O_3Cl$ ergaben die folgenden Werte: C = 53,21% (52,95%); H = 6,26% (6,19%); N = 17,88% (17,64%) und Cl = 5,57% (5,58%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,96 – Ser: 0,95 – Ile: 1,00.

Beispiel 7

VII. N^{α} -Bz-Leu-Ser-Arg-pNA · HCl

VIIa) N^{α} -BOC-Leu-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA

1,55 g (2,5 mMol) der gemäss Beispiel 5, Absatz Va, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 5, Absatz Vb, deblockiert, in 15 ml DMF gelöst und mit 520 µl (3,75 mMol) Et₃N versetzt. Nach dem Kühlen auf -10 °C wurden 0,91 g (2,78 mMol) BOC-Leu-OSu zugesetzt und die Reaktionslösung gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 1,44 g (78,9% der Theorie) der amorphen Verbindung VIIa, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{33}H_{47}N_9O_{10}$ ergaben die folgenden Werte: C = 54,70% (54,31%); H = 6,55% (6,49%) und N = 17,43% (17,27%).

VIIb) N^{α} -Bz-Leu-Ser(BOzl)-Arg(NO₂)-pNA

1,46 g (2 mMol) der gemäss Beispiel 7, Absatz VIIa, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 5, Absatz Vb, deblockiert und in 15 ml DMF gelöst. Nach dem Kühlen auf -10 °C wurde die Lösung mit 420 µl (3 mMol) Et₃N und gleich

anschliessend mit 0,90 g (4 mMol) Bz₂O versetzt. Die Reaktionslösung wurde gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 1,25 g (85,2% der Theorie) der amorphen Verbindung VIIb, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₃₅H₄₃N₉O₉ ergaben die folgenden Werte: C = 57,38% (57,29%); H = 5,98% (5,91%) und N = 17,57% (17,18%).

VII. N^α-Bz-Leu-Ser-Arg-pNA · HCl

735 mg (1 mMol) der gemäss Beispiel 7, Absatz VIIb, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 2, Absatz II, zur Verbindung VI umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung an «Sephadex G-15» in 30%iger AcOH.

Ausbeute: Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach Zusatz von 80 µl (1 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 355 mg (55,9% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₈H₃₉N₈O₇Cl ergaben die folgenden Werte: C = 53,09% (52,95%); H = 6,09% (6,19%); N = 17,91% (17,64%) und Cl = 5,49% (5,58%). Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,95 – Ser: 0,93 – Leu: 1,00.

Beispiel 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 mMol) der gemäss Beispiel 1, Absatz Ic, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert und in 25 ml DMF gelöst. Nach dem Kühlen auf -10 °C wurde die Lösung mit 1,05 ml (7,5 mMol) Et₃N und anschliessend mit 1,50 g (5,5 mMol) 3-Phenylpropionsäure-p-nitrophenylester versetzt. Die Reaktionslösung wurde gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 2,75 g (87,6% der Theorie) der kristallinen Verbindung VIIIa, die bei 216–218 °C schmolz und im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₈H₃₇N₉O₈ ergaben die folgenden Werte: C = 53,38% (53,58%); H = 6,02% (5,94%) und N = 20,40% (20,09%).

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

1,26 g (2 mMol) der gemäss Beispiel 8, Absatz VIIIa, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz I, zur Verbindung VIII umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung an «Sephadex G-15» in 30%iger AcOH.

Ausbeute: Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach Zusatz von 160 µl (2 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 1,12 g (90,4% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₈H₃₉N₈O₆Cl ergaben die folgenden Werte: C = 54,58% (54,32%); H = 6,29% (6,35%); N = 18,40% (18,10%) und Cl = 5,67% (5,73%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,96 – Gly: 1,00 – Val: 1,02.

Beispiel 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 mMol) der gemäss Beispiel 1, Absatz Ic, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz Ib, deblockiert und in 15 ml DMF gelöst. Nach dem Kühlen auf -10 °C wurde die Lösung mit 520 µl (3,75 mMol) Et₃N und anschliessend mit 710 mg (2,75 mMol) 2-Phenyllessigsäure-p-nitrophenylester versetzt. Die Reaktionslösung wurde gemäss

Beispiel 1, Absatz Ib, weiterbehandelt. Nach Gelfiltrierung an «Sephadex LH-20» in MeOH erhielt man 1,35 g (88,0% der Theorie) der kristallinen Verbindung IXa, die bei 180–184 °C schmolz und im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₇H₃₅N₉O₈ ergaben die folgenden Werte: C = 53,09% (52,85%); H = 5,82% (5,75%) und N = 20,91% (20,54%).

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

615 mg (1 mMol) der gemäss Beispiel 9, Absatz IXa, hergestellten Verbindung wurden gemäss Beispiel 1, Absatz I, zur Verbindung IX umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung an «Sephadex G-15» in 30%iger AcOH.

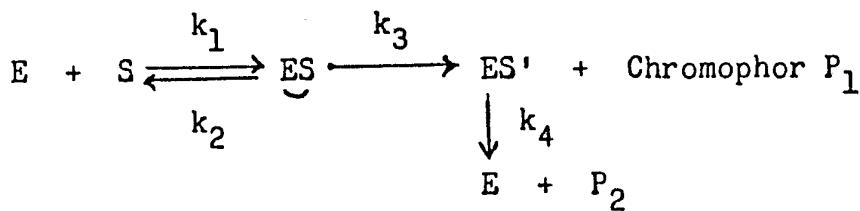
Ausbeute: Der Teil des AcOH-Eluats, der sich durch Trypsinbehandlung, unter Freisetzung von p-Nitroanilin, spalten liess, wurde nach Zusatz von 80 µl (1 mMol) konz. HCl lyophilisiert. Man erhielt 515 mg (85,1% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel C₂₇H₃₇N₈O₆Cl ergaben die folgenden Werte: C = 53,19% (53,59%); H = 6,21% (6,16%); N = 18,77% (18,52%) und Cl = 5,75% (5,86%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis: Arg: 0,94 – Gly: 1,00 – Val: 0,98.

Die erfundungsgemäss zu verwendenden Substrate, z.B. das gemäss Beispiel 1 erhaltene Substrat, nämlich N^α-Bz-Val-Gly-Arg-pNA · HCl, wurden zur Bestimmung verschiedener Enzyme in Blutplasma angewendet. Die Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip, dass das durch die enzymatische Hydrolyse des Substrates gebildete Spaltprodukt ((H-R²) ein UV-Spektrum aufweist das von demjenigen des Substrates verschieden und nach höheren Wellenlängen verschoben ist. So weist das Substrat gemäss Beispiel 1, d.h. N^α-Bz-Val-Gly-Arg-pNA · HCl, ein Absorptionsmaximum bei 302 nm (Nonameter) und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 12 950 auf. Die Absorption des Substrates ist bei 405 nm praktisch Null. p-Nitroanilin (pNA), das bei der enzymatischen Hydrolyse des Substrates gebildete Spaltprodukt (H-R²), weist ein Absorptionsmaximum bei 380 nm und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 13 200 auf. Bei 405 nm sinkt der Extinktionskoeffizient nur wenig, d.h. auf 9650.

Durch spektrophotometrische Messung bei 405 nm lässt sich der Grad der enzymatischen Hydrolyse des Substrates, welcher der Menge an abgespaltenem p-Nitroanilin proportional ist, leicht bestimmen. Das im Überschuss vorhandene Substrat stört somit die Messung bei 405 nm nicht. Die Verhältnisse sind für die anderen Substrate, die eine p-Nitroanilinogruppe als chromophore Gruppe enthalten, praktisch identisch. Die spektrophotometrische Messung wurde deshalb in allen diesen Fällen bei 405 nm durchgeführt.

Die enzymatische Hydrolysereaktion kann schematisch folgendermassen dargestellt werden:



E = Enzym

S = Substrat

ES = Enzym-Substrat-Komplex

P₁ und P₂ = Produkte

k₁, k₂, k₃ und k₄ = Geschwindigkeitskonstanten

Dissoziationskonstante für ES = k₂/k₁ = K_m (Michaelis-Konstante)

Wenn [S] > [E] und k₄ ≪ k₃, gilt:

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

Die Geschwindigkeitskonstante, bei welcher P₁ gebildet wird, ist: v = k₃ · [ES]

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

Wenn E vollständig an S gebunden ist, so gilt: [ES] = [E] und

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

Lineweaver-Burk-Gleichung:

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

Aus der Gleichung (2) folgt, dass die Konstanten K_m und k₃ die Wirksamkeit des Substrats für ein gegebenes Enzym bestimmen. Zur Bestimmung dieser Konstanten wendet man die folgende Methode an:

Man mischt das Enzym und das Substrat in einer Pufferlösung und verfolgt die Hydrolysereaktion während 2 bis 30 Minuten. Die Konzentration des Substrates [S] wird variiert, während die Enzymkonzentration konstant gehalten wird.

Wenn die Extinktion (OD = optische Dichte) in einem Koordinatensystem als Funktion der Zeit aufgetragen wird, erhält man eine Kurve, deren Tangente im Nullpunkt dem idealen Verlauf der Hydrolyse entspricht. Mit Hilfe dieser Tangente kann man die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse ermitteln.

Wenn 1/v als Funktion von 1/[S] aufgetragen wird, erhält man ein Lineweaver-Burk-Diagramm (siehe «Kurzes Lehrbuch der Biochemie» von P. Karlson, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967, Seite 70), aus welchem sich v_{max} und K_m graphisch ermitteln lassen.

K_m und k₃ = v_{max}/E wurden unter Verwendung der erfundengemäßen Substrate, z.B. N^α-Val-Gly-Arg-pNA · HCl (Substrat I gemäß Beispiel 1) für Urokinase bestimmt.

Für das Substrat I wurde eine Urokinaseaktivität von $6,06 \times 10^{-5} \text{ k}_m \text{ Mol/Liter}$ und $7,27 \times 10^{-5} \text{ v}_{\max} \text{ } \mu\text{Mol/Min/CTA}$ ermittelt.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m und v_{max} wurden wässrige Verdünnungsreihen der Substrate mit Konzentrationen von 0,1 bis 2 $\mu\text{Mol/ml}$ hergestellt. In eine Messküvette wurden 2 ml Tris-Imidazol-Puffer mit pH 8,4 und Ionen-

stärke 0,30 bei 37 °C eingetragen, worauf zuerst 0,25 ml einer wässrigen Urokinaselösung einer Konzentration von 400 CTA/ml zugesetzt wurde. Die Mischung wurde 1 Minute bei 37 °C prä-inkubiert. Der prä-inkubierten Mischung wurde dann 15 0,25 ml Substratlösung zugesetzt. Der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse des Substrates wurde für die verschiedenen Substratkonzentrationen mittels eines Photometers bei 405 nm während 10 Minuten verfolgt. Der Wert der pro Minute gebildeten Menge p-Nitroanilin ist ein Mass für die Geschwindigkeit 20 der Hydrolyse für eine gegebene Substratkonzentration. In einem Koordinatensystem wurden auf der Abszisse die reziproken Werte der Substratkonzentrationen, auf der Ordinate die zugehörigen reziproken Werte der Hydrolysengeschwindigkeit aufgetragen. In diesem sogen. Lineweaver-Burk-Diagramm 25 erhielt man für die erfundengemäß verwendeten Substrate gerade Kurven, was ein Beweis dafür war, dass die Hydrolyse der Substrate durch Urokinase dem Gesetz von Michaelis-Menten folgte und demgemäß die Substrate für die Bestimmung von Urokinase ideal sind. Aus den Schnittpunkten der 30 Kurven mit der Abszisse und der Ordinate wurden die kinetischen Konstanten K_m und v_{max} ermittelt.

Tabelle I

35 1 μM pNA pro Minute aus Substrat I	Entsprechende andere Einheiten
Urokinase	20250 CTA
Uirkallikrein	1688 BAEE
Humanthrombin	2174 NIH
Humanplasmin	6850 CE
Rindertrypsin	36,6 NF

BAEE (Benzoyl-L-arginin-ethylester) - 1 BAEE-Einheit

45 Urirkallikrein ist diejenige Menge Enzym, die 1 μMol Benzoyl-L-arginin-äthylester pro Minute unter Standardbedingungen hydrolysiert.

NIH ist eine von «US National Institute of Health» standardisierte Einheit.

CE = Caseineinheit, die am Casein unter Standardbedingungen gemessen wird.

NF = Trypsin-Einheit = diejenige Menge Enzym, die eine Absorptionsänderung $\Delta OD = 0,003$ pro Minute, gemessen an Benzoyl-L-arginin-äthylester, unter Standardbedingungen 55 bewirkt (siehe «The National Formulary XII», herausgegeben von «The American Pharmaceutical Association», Washington, D.C., 1965, Seiten 417-418).

In der ersten Kolonne der Tabelle I ist die Menge verschiedener Enzyme angegeben, die das Substrat I bei 37 °C, pH 8,4 und Ionenstärke 0,3 und bei einer Substratkonzentration von 10^{-4} M mit einer Geschwindigkeit von 1 μM pro Minute spaltet. In der zweiten Kolonne ist die entsprechende Enzymmenge in anderen Enzymeinheiten angegeben. Aus Tabelle I ist ersichtlich, dass das im Urin zusammen mit Urokinase vorhandene 65 Enzym Urirkallikrein das Substrat I nur wenig spaltet und deshalb die Bestimmung der Urokinase im Urin nicht stört. Auch von Thrombin wird das Substrat I sehr wenig und unspezifisch gespalten.

Tabelle II
Urokinase-Aktivität, gemessen mittels der Substrate gemäss Beispielen 1 bis 9 bei konstanter Substrat- und Urokinase-Konzentration, bei 37 °C, pH 8,4 und Ionenstärke 0,3

Substrat	Menge der durch 100 TA-Einheiten Urokinase in 1 Minute gebildeten Menge des Spaltproduktes NH ₂ -R ² in Nanomol
I	3,64 pNA
II	
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

In der beiliegenden Zeichnung ist die einzige Figur eine graphische Darstellung, in welcher die Änderung der optischen Dichte ΔOD , welche durch die hydrolytische Wirkung von verschiedenen Mengen Urokinase auf das Substrat I innerhalb von 10 Minuten hervorgerufen wird, als Funktion der Urokinasemenge in einem Koordinatensystem aufgetragen ist. Aus dieser Figur ist ersichtlich, dass Urokinasekonzentrationen im Bereich von 1 bis 10 CTA/ml genau bestimmt werden können. Bei der Bestimmung des Urokinasegehaltes im Urin von 14 gesunden Testpersonen wurden Werte von etwa 8 CTA-Einheiten pro ml Urin gefunden.

Die Bestimmung von Urokinase im Urin ist besonders wichtig, da man dadurch, wie bereits oben erwähnt, pathologische Zustände verhältnismässig einfach und schnell feststellen kann. Die bisher am meisten verwendete Methode zur Bestimmung von Urokinase im Urin ist die sog. Fibrinplattenmethode [I. Bjerrehuus, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 179 (1952); F.E. Smyrniotis et al., Thromb. Diath. et Haemorrh. Bd. III, 258 (1959)], die wie folgt ausgeführt wird: Nach der Methode von Mullertz [Acta physiol. Scand. 26, 174 (1954)] werden Fibrinplatten (Fibrinogengehalt: 0,2%) hergestellt. Für jede Urokinasebestimmung verwendet man eine Fibrinplatte und 30 Lambdatropfen (Lambdatropfenpipette) von unverdünntem, 1:2 und 1:4 verdünntem Urin (wenn die Urokinasekonzentration sehr hoch ist, kann man die Verdünnungsfaktoren verdoppeln). Die Platten werden während 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die lysierten

5 Zonen werden durch Zugabe eines Tropfens Kongorots (0,1%ig) sichtbar gemacht. Das Produkt von zwei senkrecht zueinander stehenden Durchmessern (der lysierten Zonen) dient als Mass der lysierten Zonen. Die Urokinasekonzentration (Einheiten pro ml) wird anhand einer Vergleichskurve ermittelt, welche durch Verwendung einer Verdünnungsreihe mit Standard-Urokinase aufgestellt wird.

Bei dieser Methode wird die Urokinasekonzentration nicht direkt, sondern über die aus Plasminogen durch Urokinase 10 gebildete Plasminmenge bestimmt. Diese über eine Kette von Reaktionen erfolgende Bestimmung von Endprodukten ist mit vielen Fehlerquellen behaftet. Weitere schwerwiegende Nachteile dieser Methode beruhen darauf, dass die Inkubationszeit sehr lang ist und für jede Bestimmung eine Eichkurve aufge- 15 stellt werden muss. Die Auswertung der Resultate ist ferner verhältnismässig kompliziert und wegen der Nichtlinearität der Eichkurve ungenau.

Mittels der erfindungsgemäss verwendeten Substrate lassen sich die Nachteile der oben beschriebenen Bestimmungsmethode glatt überwinden, da die Messung der Urokinasekonzentration direkt erfolgt und keine Nebenreaktionen das Messresultat verfälschen. Überdies stehen die Messresultate bereits nach 10 Minuten zur Verfügung, was für die klinische Diagnostik besonders wichtig ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, 20 dass die Messresultate in Substrateinheiten angegeben werden können. Eine Änderung der optischen Dichte ΔOD von 0,010/min entspricht einem Gehalt von 1 Millieinheit Urokinase pro ml Inhalt des Testansatzes.

Wenn es darum geht, Plasminogen-Aktivatoren in Blutplasma zu bestimmen, so ist es oft zweckmässig, die Bestimmung in einer Pufferlösung durchzuführen, die Aprotinin und/oder Hirudin enthält, da die letzteren auf die Plasminogen-Aktivatoren nicht hemmend wirken, wohl aber andere, gegebenenfalls vorhandene, aktivierte Plasmaenzyme, wie z.B. Thrombin, 25 Plasmin und Plasmakallikrein, welche bei der Bestimmung der Plasminogen-Aktivatoren unter gewissen Umständen störend wirken können, hemmen. Man kann z.B. einen Tris-Imidazol- oder Glycin-Puffer mit einem pH von 8,2 bis 8,6 und einer Ionenstärke von 0,15 bis 1,0 verwenden, welchem man 0,02 bis 30 0,2 Trypsin-Inhibitor-Einheiten Aprotinin und/oder 0,001 bis 10 Antithrombineinheiten Hirudin pro ml zugesetzt hat.

Die Substrate werden vorzugsweise in Form von Salzen von Mineralsäuren, z.B. HCl, HBr, H₂SO₄ oder H₃PO₄ oder organischen Säuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Oxalsäure 45 oder Weinsäure, verwendet.

Fig. 1

$\Delta OD/10 \text{ min.}$

