

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149333 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 2785/76

(22) Indleveringsdag: 22 jun 1976

(41) Alm. tilgængelig: 24 dec 1976

(44) Fremlagt: 05 maj 1986

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: 23 jun 1975 CH 8224/75

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

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

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

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) **Tripeptidderivater samt salte deraf med mineral-syrer eller organiske syrer til anvendelse som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor i legemsvæsker fra mennesker og pattedyr samt i dyriske celleekstrakter og i kirtelgifte fra koldblodede dyr ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensfotometriske metoder samt anvendelsen af tripeptidderivaterne eller saltene deraf som substrater til sådan bestemmelse**

Den foreliggende opfindelse angår tripeptidderivater samt salte deraf med mineralsyrer eller organiske syrer til anvendelse som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor i legems-væsker fra mennesker og pattedyr samt i dyriske celleekstrakter og i kirtelgifte fra koldblodede dyr ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensfotometriske metoder.

I tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.322.116 beskrives et syntetisk substrat, som er beregnet til kvantitativ bestemmelse af enzymer af gruppen E.C.3.4.21., herunder thrombin og plasmin (enzymnomenklatur: "E.C." er forkortelsen for "International Union of Biochemistry"'s "Enzyme Committee"). Dette substrat har f.eks. en tripeptidkæde med formlen $H - Phe - Val - Arg - OH$, hvor den N-terminale aminosyre er blokeret med en acylgruppe, og den C-terminale aminosyre er substitueret med en chromogen eller fluorescerende gruppe, som fraspaltes under indvirkning af de nævnte enzymer. Det herved dannede spaltningsprodukt kan bestemmes kvantitativt ved fotometri. På grundlag af den pr. tidsenhed frigjorte mængde chromogent spaltningsprodukt kan den enzymatiske aktivitet beregnes. Substratet kan også have andre tripeptidkæder. Således kan Phe f.eks. være erstattet med Ph.Gly, Tyr, 4-methoxy-Tyr eller 4-methyl-Phe, Val kan f.eks. være erstattet med Ile, Leu, nor-Val, Ph.Gly eller Phe, og Arg kan f.eks. være erstattet med Lys, Homo-Arg eller Orn.

Det i tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.322.116 beskrevne substrat indeholder i peptidkæden mindst to optisk aktive aminosyrefragmenter, som ved syntetisk opbygning af peptidkæden efter de i peptidkemien sædvanlige metoder har tilbøjelighed til at racemisere. Omfanget af denne racemisering er afhængig af de ved syntesen anvendte reaktionsbetingelser og varierer fra gang til gang, da det i praksis er udelukket altid at overholde nøjagtigt de samme reaktionsbetingelser. Dannelsen af ringe mængder af de tilsvarende D-aminosyrer fører til, at substratets evne til at kunne spaltes af enzymerne, især thrombin, er stærkt nedsat. Som L. Svendsen et al.

[jfr. Thromb. Res. 1, 267 - 278 (1972)] har vist, nedsættes substratets spaltelighed med en faktor på 160, når L-phenylalanin erstattes med D-phenylalanin i tripeptidkæden. Allerede en racemiseringsgrad for den N-terminale aminosyre på kun 1% bevirker en reduktion i substratets spaltelighed på 1,6%. På grund af de dermed forbundne uønskeligheder er dette kendte substrat uegnet til anvendelse i en standardiseret metode til enzymaktivitetsmåling.

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes et substrat, som på den ene side spaltes i et større omfang pr. tidsenhed af enzymer af gruppen E.C.3.4.21. og på den anden side ikke udviser racemisering ved syntesen. Herved er dette hidtil ukendte substrat egnet til anvendelse i en standardiseret metode til enzymaktivitetsmåling. Ved forhøjelsen af substratets spaltelighed er der endvidere opnået, at man ved enzybestemmelsen kan klare sig med mindre prøvemængder af biologisk testmateriale, f.eks. blodprøver eller prøver af andre legemsvæsker. Dette er af praktisk betydning, da der ofte kun står meget ringe mængder prøvemateriale til rådighed, og da man ved udtagelsen af prøver, f.eks. blodprøver hos børn og ældre personer, lymfeprøver, vævsprøver osv., bestræber sig på at skåne disse mennesker så meget som muligt. Endvidere opnås en forenkling af teknikken ved den af sygehuspersonalet foretagne prøveudtagning og dermed en omkostningsbesparelse.

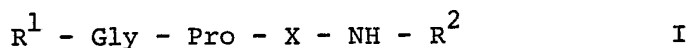
Opfindelsen bygger bl.a. på den erkendelse, at thrombin og thrombinlignende enzymer, f.eks. det fra slangegift fremstillede produkt Rep-tilase[®] samt plasmin, spalter det frie α "A"-kædefragment fra humant fibrinogen under dannelse af hexadecapeptidet fibrinopeptid A og tripeptidet glycyl-prolyl-arginin [jfr. Birgit Hessel et al. FEBS LETTERS 18, nr. 2, side 318 - 320 (1971)]. Heraf kan sluttes, at et tripeptid med nævnte struktur har en særlig susceptibilitet over for thrombin, thrombinlignende enzymer og plasmin. Man er endvidere gået ud fra den betragtning, at det af thrombin og thrombinlignende enzymer fra α "A"-kædefragmentet fraspaltede tripeptid som N-terminal aminosyre indeholder det optisk inaktive glycin. Denne aminosyre egner sig særlig godt til opbygning af peptidkæder, da den overhovedet ikke kan racemisere. Det nævnte tripeptid indeholder som midteraminosyre prolin, som ganske vist er optisk aktiv, men som på grund af den ejendommelighed i sin struktur, som består i, at det asymmetriske α -carbonatom via en propy-

lenbro er forbundet med α -aminogruppen til dannelse af en fem-ring, er stabiliseret således, at en racemisering kun kan finde sted under meget ekstreme betingelser, som ikke optræder ved de sædvanlige peptidsyntesemetoder.

Ved anvendelse af de i det ovennævnte tripeptid Gly-Pro-Arg indeholdte tre aminosyrer eller de i det strukturelt lignende tripeptid Gly-Pro-Lys indeholdte tre aminosyrer er det nu lykkedes at opbygge et syntetisk substrat, som fuldstændigt opfylder de ovenfor stillede krav.

Dette resultat var i sig selv overraskende, da man, som det fremgår af den videnskabelige litteratur, hidtil havde antaget, at et substrat nødvendigvis måtte indeholde en L-phenylalanin gruppe i stilling 3 til en arginingruppe i stilling 1 i peptidkæden for at besidde maksimal susceptibilitet i forhold til thrombin [jfr. L. Svendsen et al., Thrombosis Research 1, 276 (1972)]. Denne teori er underbygget af den kendsgerning, at fibrinopeptid A af thrombin fraspaltes meget hurtigere fra humanfibrinogen end tripeptidet Gly-Pro-Arg. Fibrinopeptid A indeholder en L-phenylalanin gruppe i stilling 9 til arginingruppen i stilling 1. Da imidlertid fibrinopeptid A, som det almindeligt antages, danner en α -helix, er afstanden mellem L-phenylalanin gruppen og arginingruppen praktisk taget den samme som i en strakt tripeptidkæde, som indeholder L-phenylalanin gruppen i stilling 3 til arginingruppen i stilling 1 [jfr. Blombäck et al., Scand.J.Clin.Lab.Invest. 24, Suppl. 107, 59 (1969)].

Opfindelsen angår således tripeptidderivater samt salte deraf med mineralsyrer eller organiske syrer til anvendelse som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor i legemsvæsker fra mennesker og pattedyr samt i dyriske celleekstrakter og i kirtelgifte fra koldblodede dyr ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensfotometriske metoder, hvilke tripeptidderivater er ejendommelige ved, at de har den almene formel I



hvor R^1 betegner hydrogen eller en alkanoylgruppe med 2-8 carbonatomer, en phenylalkanoylgruppe med 2-3 carbonatomer i alkanoyldelen, en cyclohexylcarbonylgruppe, en alkoxy-carbonylgruppe med 1-4 carbonatomer i alkoxydelen, en benzyloxycarbonylgruppe, en alkansulfonylgruppe med 1-2 carbonatomer eller en benzen-, p-toluen- eller 2-naphthalensulfonylgruppe, R^2 betegner en p-nitrophenyl-, 2-naphthyl- eller 4-methoxy-2-naphthylgruppe, og X betegner en arginyl- eller lysylgruppe.

Saltene kan være salte med sådanne mineralsyrer som HCl, HBr, H_2SO_4 eller H_3PO_4 , eller med sådanne organiske syrer som myresyre, oxalsyre eller vinsyre.

Som substrater til anvendelse ved bestemmelse af proteolytiske enzymer kendes ganske vist fra svensk fremlæggeskrift nr. 401.738 peptider indeholdende prolin bundet til arginin, der på sin side er bundet til en chromofor aromatisk amin, ligesom der fra Journal of Organic Chemistry 30 (1965), 1781-1785, Archives of Biochemistry and Biophysics 108 (1964) 266-274, Chemical Abstracts 69 (1968) 9270v samt de svenske fremlæggeskrifter nr. 380.257, 380.258 og 401.738 kendes peptider indeholdende glycin bundet til arginin eller lysin via en anden aminosyre, hvorhos argininet eller lysinet er bundet til en chromofor aromatisk amin til anvendelse ved bestemmelse af proteolytiske enzymer. Tripeptiderivaterne ifølge opfindelsen, der skal anvendes som substrater til bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer samt plasmin og plasminlignende enzymer, adskiller sig imidlertid fra de kendte peptider ved, at de indeholder såvel glycin som prolin. Deres specielle egnethed til deres anvendelsesformål var ikke forventelig på baggrund af den kendte teknik, som enten viser, at peptider af den pågældende art kan anvendes til bestemmelse af trypsin (dette gælder Journal of Organic Chemistry 30 (1965), 1781-1785, Archives of Biochemistry and Biophysics 108 (1964), 266-274 og svensk fremlæggeskrift nr. 401.738), eller at visse peptider nok kan anvendes til bestemmelse af thrombin eller plasmin, men at de udviser en langt ringere følsomhed end tripeptiderne ifølge opfindelsen. Således er fx de substrater, der nævnes i publikationen Chemical Abstracts 69 (1968) 9270v ca. 50 gange mindre følsomme over for thrombins og plasmins proteolytiske virkning end tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen, ligesom de substrater, der er beskrevet i svensk

fremlæggesesskrift nr. 380.258, har thrombin- og plasminaktiviteter, der er flere gange lavere end aktiviteterne hos tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen. Det ovennævnte svenske fremlæggesesskrift nr. 380.257 svarer til det tidligere ovenfor omtalte tyske offentliggørelsesskrift nr. 2.322.116; den overlegenhed, som tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen udviser i forhold til de substrater, der er beskrevet i dette fremlæggesesskrift, fremgår af de sammenligningsforsøg, der er anført i nærværende beskrivelses eksperimentelle del.

Særlig foretrukne tripeptidderivater ifølge opfindelsen, især til anvendelse som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, er sådanne, i hvilke R^1 betegner en alkoxycarbonylgruppe med 1-4 carbonatomer, en benzyloxycarbonylgruppe eller en benzen-, p-toluen- eller 2-naphthalensulfonylgruppe, R^2 betegner en p-nitrophenyl-, eller 2-naphthylgruppe, og X betegner en arginylgruppe.

Opfindelsen angår endvidere anvendelsen af de ovenfor definerede tripeptidderivater eller saltene deraf som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor, specielt de i krav 2 angivne tripeptidderivater som substratet til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, i legems-væsker fra mennesker og pattedyr samt i dyriske celleekstrakter og i kirtelgifte fra koldblodede dyr.

Fremstillingen af tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen kan ske efter forskellige i og for sig kendte metoder.

1. Ved den første metode hænges de chromofore grupper (R^2 i formel I) på den C-terminale aminosyregruppe. Disse grupper virker samtidig som C-terminale carboxylbeskyttelsesgrupper under den trinvis sammenknytning af aminosyrerne ved opbygningen af den ønskede peptidkæde. De øvrige beskyttelsesgrupper fraspaltes selektivt fra slutproduktet, uden at den chromofore gruppe påvirkes. Denne metode er f.eks. beskrevet i "Peptide Synthesis" af Miklos Bodanszki et al., Interscience Publishers, 1966, side 163 - 165.

2. Ved den anden metode kobles den chromofore gruppe til det færdigt opbyggede peptidskelet, efter at man først har fraspaltet de øvrige beskyttelsesgrupper. Den C-terminale carboxylgruppe frigøres i dette tilfælde ved racemiseringsfri enzymatisk esterspaltning. De til dette formål anvendte esterspaltende enzymer kan enten være frie eller bundne til en matrix.

Til beskyttelse af N^{α} -aminogrupperne under den trinvis opbygning af peptidkæderne kan anvendes de sædvanlige selektivt fraspaltelige aminobeskyttelsesgrupper. Disse er først og fremmest: Cbo, MeOCbo, NO_2 Cbo, MCbo, BOC, TFA eller formyl. α -Carboxylgruppen i aminosyrerne kan gøres reaktionsdygtig efter forskellige kendte metoder, f.eks. ved fremstilling af p-nitrophenylesterderivaterne, trichlorphenylesterderivaterne, pentachlorphenylesterderivaterne eller N-hydroxysuccinimidesterderivaterne og isolering af disse derivater, eller ved fremstilling in situ af syreaziderne eller syreanhydriderne, som kan være enten symmetriske eller asymmetriske.

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

Den C-terminale carboxylgruppe i peptidderivaterne kan under den trinvis opbygning af den ønskede peptidkæde beskyttes af enten den chromofore amidgruppe eller af en methyl-, ethyl- eller isopropylestergruppe. De øvrige frie reaktionsdygtige grupper, som ikke tager del i opbygningen af peptidkæden, kan blokeres ved følgende specifikke foranstaltninger: δ -Guanidinogruppen i arginin beskyttes med NO_2 , Tos eller ved simpel protonisering, medens ϵ -aminogruppen i lysin beskyttes med Cbo, BOC eller Tos.

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

Fremstillingen af tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen efter de ovenfor nævnte metoder er udførligere beskrevet i de følgende eksempler.

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

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

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

I den foreliggende beskrivelse med krav anvendes følgende forkortelser:

Arg	= L-arginin
Gly	= glycin
Lys	= lysin
Pro	= L-prolin
Ac	= acetyl
AcOH	= eddikesyre
BOC	= tert.butoxycarboxyl
Bz	= benzoyl
Bzl	= benzyl
Bz ₂ O	= benzoesyreanhydrid
Cbo	= carbobenzoxo
DMF	= dimethylformamid
DSC	= tyndtlagschromatogram
Et ₃ N	= triethylamin
HMPTA	= N,N,N',N',N",N"-hexamethylphosphorsyretetramid
LMS	= opløsningsmiddelsystem
MeOH	= methanol
NA	= naphthylamid
OMe	= methoxy
OpNP	= p-nitrophenoxy
pNA	= p-nitroanilid

2-NA	= 2-naphthylamid
Smp.	= smeltepunkt
THF	= tetrahydrofuran
Tos	= p-toluensulfonyl.

Eksempel 1.

I. N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

Ia. Cbo-Arg-pNA·HCl.

I en trehalset rundkolbe, der rummer 250 ml, opløses 16,0 g (47,0 millimol) over P_2O_5 i vakuum tørret Cbo-Arg-OH·HCl i 90 ml absolut HMPTA under fugtighedsudelukkelse ved 20°C. Ved stuetemperatur sættes der til den resulterende opløsning portionsvis først en opløsning af 4,74 g (47,0 millimol) Et_3N i 10 ml HMPTA og derefter 16,4 g (100 millimol) p-nitrophenylisocyanat (100%'s overskud). Efter en reaktionstid på 24 timer ved 20°C afdestilleres størstedelen af HMPTA i vakuum. Remanensen ekstraheres flere gange med 30%'s AcOH. Remanensen kasseres. De forenede eddikesyreekstrakter sættes til en yderligere rensning på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle og elueres med 30%'s AcOH. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres. Der fås 12,6 g af et amorf pulver, som i henhold til DSC i LMS C er ensartet.

Analyse:

Beregnet for $C_{20}H_{25}N_6O_5Cl$:	C 51,67	H 5,42	N 18,08	Cl 7,63
Fundet	: C 51,29	H 5,48	N 17,92	Cl 7,50.

I. N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl.

Under udelukkelse af fugtighed behandles 4,65 g (10 millimol) af forbindelsen Ia med 40 ml 2N HBr i iseddike i 1 time under omrøring ved 20°C. Peptidderivatet opløses herved under CO₂-udvikling. Reaktionsopløsningen dryppes under intensiv omrøring til 250 ml absolut ether, hvorved der udfældes (2 HBr)·H-Arg-pNA. Etherfasen fraskilles ved sugefiltrering, hvorpå den faste fase yderligere vaskes fire gange med hver gang 100 ml absolut ether til fjernelse af det som biprodukt dannede benzylbromid samt overskud af HBr og AcOH. Ved tørring i vakuum over NaOH-tabletter fås det afblokerede produkt i kvantitativt udbytte. Det tørre (2 HBr)·H-Arg-pNA opløses i 25 ml DMF. Til den til -10°C afkølede opløsning sættes 1,40 ml (10 millimol) Et₃N. Der dannes et bundfald af Et₃N·HBr, som frafiltreres og vaskes med en ringe mængde koldt DMF. Til filtratet sættes 4,70 g (11 millimol) Cbo-Gly-Pro-OpNP ved -10°C. Efter nogle timers forløb er reaktionsopløsningens temperatur steget til 20°C. Opløsningen afkøles igen til -10°C og pufres med 0,35 ml (2,5 millimol) Et₃N. Efter yderligere 16 timer tilsættes der igen 0,35 ml Et₃N ved -10°C. Efter yderligere 24 timer inddampes reaktionsopløsningen i vakuum ved 40°C til tørhed. Remanensen opløses i 50 ml MeOH. Efter tilsætning af 0,8 ml (10 millimol) koncentreret saltsyre inddampes opløsningen i vakuum ved 20°C til tørhed. Denne operation gentages tre gange til omdannelse af tripeptidhydrobromidet til hydrochloridet. Det rå tripeptidhydrochlorid opløses i 50 ml MeOH og forrenses ved gelfiltrering over en med MeOH ækvilibreret søjle af "Sephadex LH-20". Til yderligere rensning inddampes den fraktion af MeOH-eluatet, som ved trypsinbehandling kan spaltes under frigørelse af p-nitroanilin, i vakuum. Remanensen opløses i 30%'s AcOH. Opløsningen renses ved gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret søjle af "Sephadex G-15". Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 0,80 ml (10 millimol) koncentreret HCl. Der fås 3,64 g (58,8% af det teoretiske) af et amorft let pulver, som i henhold til DSC i LMS C er ensartet.

Analyse:

Beregnet for C₂₇H₃₅N₈O₇Cl: C 52,38 H 5,70 N 18,10 Cl 5,73

Fundet : C 52,09 H 5,83 N 18,33 Cl 5,75.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,96 - Gly: 1,00 - Pro: 0,96.

Eksempel 2.

II. H-Gly-Pro-Arg-pNA.2HCl.

61,91 g (0,1 mol) af den ifølge eksempel 1 fremstillede forbindelse I behandles under udelukkelse af fugtighed med 300 ml 3N HCl i is-eddike under omrøring i 2 timer ved 35°C. Peptidderivatet opløses herved under CO₂-udvikling. Reaktionsopløsningen dryppes under intensiv omrøring til 2 liter absolut ether, hvorved der fremkommer et fnugagtigt bundfald af H-Gly-Pro-Arg-pNA.2HCl. Etherfasen fraskilles ved sugefiltrering, hvorpå den faste fase vaskes yderligere fire gange med hver gang 0,5 liter absolut ether til fjernelse af det som spaltningsprodukt dannede benzylchlorid samt overskud af HCl og AcOH. Ved tørring i vakuum over NaOH-tabletter fås det afblokerede produkt i kvantitativt udbytte. Til yderligere rensning opløses det tørrede produkt i 900 ml 30%'s AcOH. Opløsningen renses ved gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Herved opdeles AcOH-eluatet i to fraktioner, som begge kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin. Hovedfraktionen indeholder det ønskede produkt, og sidefraktionen indeholder det anvendte udgangsmateriale. Efter tilsætning af 8 ml (0,1 mol) koncentreret HCl til hovedfraktionen frysetørres denne. Der fås 43,5 g (83,4% af det teoretiske) af et amorf pulver, som ved DSC i LMS C er ensartet.

Analyse:

Beregnet for C₁₉H₃₀N₈O₅Cl₂: C 43,77 H 5,80 N 21,49 Cl 13,60

Fundet : C 43,38 H 5,88 N 21,72 Cl 13,41.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,95 - Gly: 1,00 - Pro: 0,94.

Eksempel 3.

III. N^α-2-Phenylacetyl-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 μl (4 millimol) Et_3N og straks derefter 1,13 g (4,4 millimol) phenyleddikesyre-p-nitrophenyl-ester (smeltepunkt $61,5 - 62^{\circ}\text{C}$). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som ved trypsinbehandling kan spaltes under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 μl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1,99 g (82,5% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_6\text{Cl}$: C 53,77 H 5,85 N 18,58 Cl 5,88
Fundet : C 54,06 H 5,78 N 18,83 Cl 5,79.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,99 - Gly: 1,00 - Pro: 0,97.

Eksempel 4.

IV. N^{α} -3-Phenylpropionyl-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 μl (4 millimol) Et_3N og straks derefter 1,19 g (4,4 millimol) 3-phenylpropionsyre-p-nitrophenyl-ester (smeltepunkt $97 - 98,5^{\circ}\text{C}$). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 μl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 2,06 g (83,5% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_6\text{Cl}$: C 54,50 H 6,04 N 18,16 Cl 5,75
Fundet : C 54,25 H 5,98 N 18,29 Cl 5,63.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 1,02 - Gly: 1,00 - Pro: 0,98.

Eksempel 5.

V. N^α-Cyclohexylcarbonyl-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 µl (4 millimol) Et₃N og straks derefter 1,10 g (4,4 millimol) cyclohexylcarbonyl-p-nitrophenyl-ester (smeltepunkt 49 - 50°C). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 µl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1,87 g (78,6% af det teoretiske) af et amorf pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for C ₂₆ H ₃₉ N ₈ O ₆ Cl:	C 52,47	H 6,61	N 18,83	Cl 5,96
Fundet	: C 52,70	H 6,72	N 19,03	Cl 5,83.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,96 - Gly: 1,0 - Pro: 0,96.

Eksempel 6.

VI. N^α-Capryloyl-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 µl (4 millimol) Et₃N og straks derefter 1,17 g (4,4 millimol) caprylsyre-p-nitrophenyl-ester. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 μ l (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1,99 g (81,4% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{27}H_{43}N_8O_6Cl$: C 53,06 H 7,09 N 18,34 Cl 5,80
 Fundet : C 52,84 H 7,15 N 18,58 Cl 5,73.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,95 - Gly: 1,00 - Pro: 0,99.

Eksempel 7.

VII. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til $-10^{\circ}C$ tilsættes 555 μ l (4 millimol) Et_3N og straks derefter 840 mg (4,4 millimol) p-toluensulfonsyrechlorid (tosylchlorid) (smeltepunkt $67 - 69^{\circ}C$). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 μ l (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 2,17 g (84,9% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{26}H_{35}N_8O_7SCl$: C 48,86 H 5,52 N 17,53 S 5,02 Cl 5,55
 Fundet : C 48,50 H 5,61 N 17,73 S 5,19 Cl 5,49.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,99 - Gly: 1,00 - Pro: 0,93.

Eksempel 8.

VIII. N^α-Benzensulfonyl-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 µl (4 millimol) Et₃N og straks derefter 780 mg (4,42 millimol) benzensulfonsyrechlorid (smeltepunkt 16 - 17°C). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 µl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1,95 g (78,0% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for C ₂₅ H ₃₃ N ₈ O ₇ SCl:	C	48,03	H	5,32	N	17,93	S	5,13	Cl	5,67	
Fundet	:	C	47,79	H	5,40	N	18,11	S	5,06	Cl	5,61.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold:
Arg: 1,01 - Gly: 1,00 - Pro: 0,96.

Eksempel 9.

IX. N^α-Methansulfonyl-Gly-Pro-Arg-pNA·HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 µl (4 millimol) Et₃N og straks derefter 345 µl (4,44 millimol) methansulfonsyrechlorid. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 µl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte:

1,70 g (75,5% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{20}H_{31}N_8O_7SCl$: C 42,66 H 5,55 N 19,90 S 5,70 Cl 6,30
Fundet : C 42,88 H 5,63 N 20,08 S 5,62 Cl 6,21.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,99 - Gly: 1,00 - Pro: 0,96.

Eksempel 10.

X. N^{α} -2-Naphthalensulfonyl-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til $-10^{\circ}C$ tilsættes 555 μl (4 millimol) Et_3N og straks derefter 1,0 g (4,41 millimol) naphthalen-2-sulfonylchlorid (smeltepunkt $74 - 76^{\circ}C$). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 μl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1,81 g (66,8% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{29}H_{35}N_8O_7SCl$: C 51,59 H 5,23 N 16,60 S 4,75 Cl 5,25
Fundet : C 51,88 H 5,19 N 16,75 S 4,62 Cl 5,12.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 1,02 - Gly: 1,00 - Pro: 0,98.

Eksempel 11.

XI. N^{α} -Isobutyloxycarbonyl-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl.

2,09 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 2 fremstillede forbindelse II opløses i 25 ml DMF. Efter afkøling til -10°C tilsættes 555 μl (4 millimol) Et_3N og straks derefter 650 μl (5,0 millimol) chlormyresyre-isobutylester. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 μl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1,71 g (73,1% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for: $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_7\text{Cl}$:	C 49,27	H 6,37	N 19,15	Cl 6,06
Fundet	: C 49,06	H 6,42	N 19,33	Cl 5,98.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 1,01 - Gly: 1,00 - Pro: 0,94.

Eksempel 12.

XII. N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-2-NA·HCl.

XIIa. N^{α} -Cbo-Arg(NO_2)-2-NA.

3,53 g (10 millimol) godt tørret Cbo-Arg(NO_2)-OH opløses i 150 ml THF:DMF (3:1) under udelukkelse af fugtighed. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 1,39 ml (10 millimol) Et_3N , og derefter tildryppes i løbet af 15 minutter en opløsning af 1,35 g (10 millimol) chlormyresyre-isobutylester i 20 ml THF, idet temperaturen holdes mellem -10°C og -5°C . Til den resulterende opløsning dryppes derefter en opløsning af 1,72 g (12 millimol) β -naphthylamin i 15 ml THF, idet den ovennævnte temperatur overholdes. Reaktionsblandingen henstår i 24 timer ved stuetemperatur. Efter afdestillation af opløsningsmidlet i vakuum digereres remanensen tre gange med destilleret vand, tre gange med 5%'s NaHCO_3 -opløsning og tre gange med destilleret vand i den anførte rækkefølge. Efter tørring i vakuum opløses råproduktet i MeOH og chromatograferes gennem en med

MeOH ækvilibreret søjle af "Sephadex LH-20". Af en fraktion af eluatet fås 3,75 g af den krystallinske forbindelse XIIa (78,4% af det teoretiske) med smeltepunkt 173 - 174,5°C, hvilken forbindelse er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{24}H_{26}N_6O_5$: C 60,24 H 5,48 N 16,72
 Fundet : C 60,82 H 5,63 N 17,48.

XIIb. H-Arg-2-NA·HCl.

957 mg (2 millimol) af forbindelsen XIIa indvejes i reaktionsbeholderen i et Sakakibara-apparat. 15 ml tørret hydrogenfluoridgas kondenseres i reaktionsbeholderen. Efter en reaktionstid på 1 time ved 0°C fraspaltes under omrøring arginin-nitrobeskyttelsesgruppen samt carbobenzoxygruppen. Den kondenserede hydrogenfluoridgas afdestilleres i vakuum fra reaktionsblandingen, og remanensen opløses i DMF. Til omdannelse af aminosyrederivatet til HCl-saltet tilsættes 0,5 ml (ca. 6 millimol) koncentreret HCl, og opløsningen inddampes til tørhed. Efter to ganges gentagelse af denne procedure opløses remanensen i 50 ml 40%'s AcOH. Til rensning sættes AcOH-opløsningen på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle og elueres med 30%'s AcOH. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 320 µl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 473 mg (63,5% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{16}H_{23}N_5OCl_2$: C 51,62 H 6,23 N 18,81 Cl 19,05
 Fundet : C 51,82 H 6,18 N 17,08 Cl 18,75.

XII. N^α-Cbo-Gly-Pro-Arg-2-NA·HCl.

372 mg (1 millimol) af forbindelsen XIIb omsættes som beskrevet i eksempel 1 med 470 mg (1,1 millimol) Cbo-Gly-Pro-OpNP til dannels af forbindelsen XII. Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet,

som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af β -naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ l (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 425 mg (68,1% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{31}H_{38}N_7O_5Cl$: C 59,65 H 6,14 N 15,71 Cl 5,68
 Fundet : C 60,11 H 6,25 N 16,07 Cl 5,59.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,98 - Gly: 1,00 - Pro: 0,97.

Eksempel 13.

XIII. N^α -Tos-Gly-Pro-Arg-2-NA.HCl.

625 mg (1 millimol) af forbindelsen XII (eksempel 12) deblokeres som beskrevet i eksempel 2 og opløses i 8 ml DMF. Efter afkøling til $-10^\circ C$ tilsættes 140 μ l (1 millimol) Et_3N og straks derefter 210 mg (1,1 millimol) p-toluensulfonsyrechlorid (smeltepunkt $67 - 69^\circ C$). Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1.

Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af β -naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ l (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 500 mg (77,6% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{30}H_{38}N_7O_5S$: C 55,93 H 5,95 N 15,22 S 4,98 Cl 5,50
 Fundet : C 56,13 H 5,86 N 15,48 S 5,07 Cl 5,39.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 0,95 - Gly: 1,00 - Pro: 0,96.

Eksempel 14.

XIV. N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-4-MeO-2-NA.HCl.

XIVa. N^{α} -Cbo-Arg(NO₂)-4-MeO-2-NA.

3,53 g (10 millimol) Cbo-Arg(NO₂)-OH omsættes som beskrevet i eksempel 12, afsnit XIIa, med 2,17 g (12,5 millimol) 4-methoxy-2-naphthylamin, hvorefter der oparbejdes. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Fra en fraktion af eluatet fås 3,35 g (65,9% af det teoretiske) af den delvis krystallinske forbindelse XIVa, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for C₂₅H₂₈N₆O₆: C 59,05 H 5,55 N 16,23

Fundet : C 59,18 H 5,43 N 16,49.

XIVb. H-Arg-4-MeO-2-NA.2HCl.

1,02 g (2 millimol) af forbindelsen XIVa omsættes som beskrevet i eksempel 12, afsnit XIIb, til dannelse af forbindelsen XIVb. Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G1-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved behandling med trypsin under frigørelse af 4-methoxy-2-naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 320 µl (4 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 570 mg (71,0% af det teoretiske) af et amorf pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for C₁₇H₂₄N₅O₂Cl₂: C 50,88 H 6,03 N 17,45 Cl 17,67

Fundet : C 51,08 H 5,98 N 17,75 Cl 17,55.

XIV. N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-4-MeO-2-NA.HCl.

402 mg (1 millimol) af forbindelsen XIVb omsættes som beskrevet i eksempel 1, afsnit I, med 470 mg (1,1 millimol) Cbo-Gly-Pro-OpNP til dannelse af forbindelsen XIV. Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse

af 4-methoxy-2-naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ l (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 493 mg (75,4% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{32}H_{40}N_7O_6Cl$: C 58,75 H 6,16 N 14,99 Cl 5,42
 Fundet : C 59,01 H 6,10 N 15,19 Cl 5,35.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold: Arg: 1,02 - Gly: 1,00 - Pro: 0,95.

Eksempel 15.

XV. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Arg-4-MeO-2-NA.HCl.

655 mg (1 millimol) af den ifølge eksempel 14 fremstillede forbindelse XIV deblokeres som beskrevet i eksempel 2 og opløses i 8 ml DMF. Efter afkøling til $-10^{\circ}C$ tilsættes 140 ml (1 millimol) Et_3N og straks derefter 210 mg (1,1 millimol) p-toluensulfonsyrechlorid. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1. Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af 4-methoxy-2-naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ l (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 465 mg (69,0% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{31}H_{40}N_7O_6SCl$: C 55,22 H 5,98 N 14,54 S 4,76 Cl 5,26
 Fundet : C 55,75 H 6,01 N 14,89 S 4,59 Cl 5,16.

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

Eksempel 16.

XVI. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Lys-pNA.HCl.

XVIa. N^{α} -BOC- N^{ϵ} -Cbo-Lys-pNA.

19,0 g (50 millimol) af forbindelsen N^{α} -BOC- N^{ϵ} -Cbo-Lys-OH opløses som beskrevet i eksempel 1, afsnit Ia, i 100 ml HMPTA, og der til-sættes 5,06 g (50 millimol) Et_3N og derefter 16,4 g (100 millimol) p-nitrophenylisocyanat. Efter 24 timers reaktionstid dryppes reaktionsopløsningen under omrøring til 1 liter 2% 's $NaHCO_3$ -opløsning. Det udfældede produkt frafiltreres og vaskes tre gange med hver gang 0,5 liter 2% 's $NaHCO_3$ -opløsning, tre gange med hver gang 0,5 liter destilleret vand, tre gange med hver gang 0,5 liter 0,5N HCl og til slut tre gange med hver gang 0,5 liter destilleret vand. Det på denne måde vundne produkt tørres i vakuum ved $40^{\circ}C$ og ekstraheres derefter to gange med hver gang 30 ml til $70^{\circ}C$ opvarmet DMF, hvorved det ønskede produkt fuldstændigt går i opløsning, medens biproduktet, N,N'-bis-p-nitrophenylurinstof, forbliver tilbage i uopløst tilstand. DMF-Opløsningen inddampes i vakuum ved $40^{\circ}C$. Residualen opløses i MeOH, og ved gelfiltrering over en med MeOH ækvilibreret søjle af "Sephadex LH-20" fås 18,85 g (75,3% af det teoretiske) af den krystallinske forbindelse XVIa med smeltepunkt $125 - 125,5^{\circ}C$, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{25}H_{32}N_4O_7$: C 59,99 H 6,44 N 11,19

Fundet : C 60,49 H 6,35 N 11,48.

XVIb. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Lys-(ϵ -Cbo)-pNA.

1,5 g (3 millimol) af forbindelsen XVIa behandles under udelukkelse af fugtighed og under omrøring i 1 time ved $20^{\circ}C$ med 20 ml trifluoreddikesyre, hvorved aminosyrederivatet opløses under CO_2 -udvikling. Reaktionsopløsningen dryppes under intensiv omrøring langsomt til 150 ml tørret ether, hvorved der udfælder H-Lys(ϵ -Cbo)-pNA.trifluoracetat. Etherfasen frasuges med en filterstav. Det tilbageblivende bundfald vaskes fire gange med hver gang 50 ml tør ether til fjernelse af overskud af trifluoreddikesyre. Ved tørring i vakuum over NaOH-tabletter fås det afblokerede produkt i kvantitativt udbytte. Det tørre aminosyrederivat-trifluoracetatsalt opløses i 15 ml DMF. Efter afkøling til $-10^{\circ}C$ sættes til opløsningen 415 μ l (3 millimol) Et_3N til frigørelse af aminosyrederivatet fra trifluoracetatet. Til reaktionsblandingen sættes 1,48 g (3,31 millimol) Tos-Gly-Pro-OpNP. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1, afsnit I. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvi-

libreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 1,77 g (83,2% af det teoretiske) af et amorft stof, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{34}H_{40}N_6O_9S$: C 57,61 H 5,69 N 11,86 S 4,52

Fundet : C 57,95 H 5,59 N 12,27 S 4,49.

XVI. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Lys-pNA·HCl.

1,42 g (2 millimol) af forbindelsen XVIb deblokeres som beskrevet i eksempel 2. Rensning: Gelfiltrering på en med 30% 's AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 160 μ l (2 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 1040 mg (85,1% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{26}H_{35}N_6O_7SCl$: C 51,10 H 5,77 N 13,75 S 5,25 Cl 5,80

Fundet : C 50,76 H 5,68 N 13,98 S 5,19 Cl 5,68.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold:
Lys: 0,99 - Gly: 1,00 - Pro: 0,96.

Eksempel 17.

XVII. N^{α} -Isobutoxycarbonyl-Gly-Pro-Lys-pNA·HCl.

XVIIa. N^{α} -BOC-Gly-Pro-Lys(ϵ -Cbo)-pNA.

2,0 g (4 millimol) af den ifølge eksempel 16 fremstillede forbindelse XVIa deblokeres som beskrevet i eksempel 16, afsnit XVIb, og opløses i 20 ml DMF. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 555 μ l (4 millimol) Et_3N og straks derefter 1,73 g (4,40 millimol) BOC-Gly-Pro-OpNP. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1, afsnit I. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 2,20 g (84,0% af det teoretiske) af en amorf substans, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{32}H_{42}N_6O_9$: C 58,70 H 6,47 N 12,84

Fundet : C 59,03 H 6,46 N 12,89.

XVIIb. N^α -Isobutoxycarbonyl-Gly-Pro-Lys(ϵ -Cbo)-pNA.

1,31 g (2 millimol) af forbindelsen XVIIa deblokeres som beskrevet i eksempel 16, afsnit XVIb, og opløses i 12 ml DMF. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 280 μl (2 millimol) Et_3N og straks derefter 285 μl (2,2 millimol) chlormyresyre-isobutylester. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1, afsnit I.

Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 1,15 g (87,8% af det teoretiske) af et amorf stof, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{32}H_{42}N_6O_9$: C 58,70 H 6,47 N 12,84

Fundet : C 58,01 H 6,40 N 12,99.

XVII. N^α -Isobutoxycarbonyl-Gly-Pro-Lys-pNA.HCl.

660 mg (1 millimol) af forbindelsen XVIIb deblokeres som beskrevet i eksempel 2. Rensning: Gelfiltrering på en med 30% s AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af p-nitroanilin, frysetørres efter tilsætning af 80 μl (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 430 mg (77,2% af det teoretiske) af et amorf pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{26}H_{33}N_6O_6Cl$: C 51,75 H 6,70 N 15,09 Cl 6,36

Fundet : C 52,04 H 6,82 N 15,30 Cl 6,18.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold:
Lys: 0,93 - Gly: 1,00 - Pro: 0,96.

Eksempel 18.

XVIII. N^α -Tos-Gly-Pro-Lys-2-NA.HCl.XVIIIa. N^α -BOC- N^ϵ -Cbo-Lys-2-NA.

1,90 g (5 millimol) af forbindelsen N^{α} -BOC- N^{ϵ} -Cbo-Lys-OH omsættes som beskrevet i eksempel 12, afsnit XIIa, til dannelse af forbindelsen XVIIIa. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 1,60 g (63,3% af det teoretiske) af en amorf forbindelse, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{29}H_{35}N_3O_5$: C 68,89 H 6,98 N 8,32

Fundet : C 68,08 H 7,03 N 8,59.

XVIIIb. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Lys(ϵ -Cbo)-2-NA.

1,05 g (2 millimol) af forbindelsen XVIIIa deblokeres som beskrevet i eksempel 16, afsnit XVIb, og opløses i 20 ml DMF. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 280 μl (2 millimol) Et_3N og straks derefter 985 mg (2,21 millimol) Tos-Gly-Pro-OpNP. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1, afsnit I. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 1,11 g (77,7% af det teoretiske) af et amorft stof, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for $C_{38}H_{43}N_5O_7S$: C 63,94 H 6,07 N 9,81 S 4,49

Fundet : C 64,30 H 5,98 N 10,18 S 4,35.

XVIII. N^{α} -Tos-Gly-Pro-Lys-2-NA·HCl.

715 mg (1 millimol) af forbindelsen XVIIIb deblokeres som beskrevet i eksempel 2. Rensning: Gelfiltrering på en med 30% 's AcOH ækvilibreret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af 2-naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 80 μl (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte 470 mg (76,3% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{30}H_{38}N_5O_5\text{SCl}$: C 58,48 H 6,22 N 11,37 S 5,20 Cl 5,75

Fundet : C 58,11 H 6,15 N 11,79 S 5,13 Cl 5,63.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold:
Lys: 0,94 - Gly: 1,00 - Pro: 0,98.

Eksempel 19.

XIX. N^α-Tos-Gly-Pro-Lys-4-MeO-2-NA.HCl.

XIXa. N^α-BOC-N^ε-Cbo-Lys-4-MeO-2-NA.

1,90 g (5 millimol) af forbindelsen N^α-BOC-N^ε-Cbo-Lys-OH omsættes som beskrevet i eksempel 12, afsnit XIIa, med 1,22 g (7 millimol) 4-methoxy-2-naphthylamin. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 1,82 g (68,0% af det teoretiske) af en amorf forbindelse, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for C₃₀H₃₇N₃O₆: C 67,27 H 6,96 N 7,85

Fundet : C 68,05 H 8,83 N 9,10.

XIXb. N^α-Tos-Gly-Pro-Lys(ε-Cbo)-4-MeO-2-NA.

1,07 g (2 millimol) af forbindelsen XIXa deblokeres som beskrevet i eksempel 16, afsnit XVIb, og opløses i 20 ml DMF. Efter afkøling til -10°C sættes til opløsningen 280 μl (2 millimol) Et₃N og straks derefter 985 mg (2,21 millimol) Tos-Gly-Pro-OpNP. Reaktionsproduktet viderebehandles som beskrevet i eksempel 1, afsnit I. Rensning: Gelfiltrering på en med MeOH ækvilibreret "Sephadex LH-20"-søjle. Udbytte: 895 mg (60,2% af det teoretiske) af et amorf stof, som er ensartet ved DSC i LMS A og LMS B.

Analyse:

Beregnet for C₃₉H₄₅N₅O₈S: C 62,97 H 6,10 N 9,42 S 4,31

Fundet : C 63,62 H 6,02 N 9,88 S 4,21.

XIX. N^α-Tos-Gly-Pro-Lys-4-MeO-2-Na.HCl.

745 mg (1 millimol) af forbindelsen XIXb deblokeres som beskrevet i eksempel 2. Rensning: Gelfiltrering på en med 30%'s AcOH ækvili-

breret "Sephadex G-15"-søjle. Den fraktion af AcOH-eluatet, som kan spaltes ved trypsinbehandling under frigørelse af 4-methoxy-2-naphthylamin, frysetørres efter tilsætning af 80 μ l (1 millimol) koncentreret HCl. Udbytte: 470 mg (72,7% af det teoretiske) af et amorft pulver, som er ensartet ved DSC i LMS C.

Analyse:

Beregnet for $C_{31}H_{40}N_5O_6SCl$: C 57,62 H 6,24 N 10,84 S 4,96 Cl 5,49
 Fundet : C 57,95 H 6,31 N 11,09 S 4,88 Cl 5,41.

Aminosyreanalysen giver de ventelige aminosyrer i det rigtige forhold:
 Lys: 1,03 - Gly: 1,00 - Pro: 0,97.

Tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen med den almene formel I skal anvendes til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombin-lignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor. Ved hjælp af tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen kan således på indirekte vis også proenzymer, f.eks. prothrombin og plasminogen, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer, f.eks. antithrombiner, især heparin-cofaktor (antithrombin III) og dermed også heparin og antiplasmin (α_2 -makroglobulin), bestemmes.

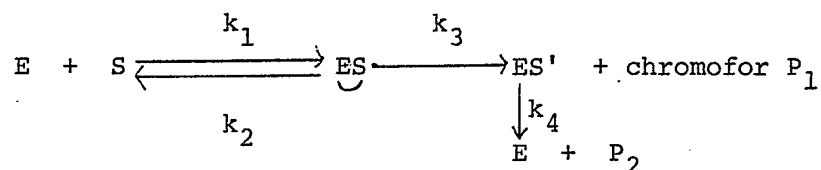
Ved den fuldstændige aktivering af proenzymer med aktivatorer eller aktivatorblandinger dannes den ækvivalente mængde enzym, der kan måles som sådan. Målingen af aktivator-koncentrationen udføres indirekte på den måde, at man bestemmer hastigheden af enzymets dannelse ud fra proenzymet. Denne hastighed er proportional med aktivator-koncentrationen.

Tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen, f.eks. det ifølge eksempel 1 fremstillede substrat, nemlig N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg.pNA.HCl, anvendes f.eks. til bestemmelse af de nævnte enzymer i blodplasma. Bestemmelsen sker efter det princip, at det ved den enzymatiske hydrolyse af substratet dannede spaltningsprodukt NH_2-R^2 har et UV-spektrum, som er forskelligt fra substratets UV-spektrum, og som er forskudt mod højere bølgelængder. Således har substratet ifølge eksempel 1, dvs.

N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl, et absorptionsmaksimum ved 302 nm og en molær ekstinktionskoefficient på 12920. Substratets absorption er praktisk taget 0 ved 405 nm. Det ved den enzymatiske hydrolyse af substratet dannede spaltningsprodukt NH_2R^2 , dvs. p-nitroanilin, har et absorptionsmaksimum ved 380 nm og en molær ekstinktionskoefficient på 13200. Ved 405 nm falder ekstinktionskoefficienten kun lidt, dvs. til 9650.

Ved spektrofotometrisk måling ved 405 nm kan graden af enzymatisk hydrolyse af substratet, hvilken grad er proportional med mængden af fraspaltet p-nitroanilin, let bestemmes. Det i overskud tilstedeværende substrat forstyrrer således ikke målingen ved 405 nm. Forholdene er praktisk taget identiske for de andre tripeptidderivater ifølge opfindelsen, som indeholder en p-nitroanilinogruppe. Den spektrofotometriske måling udføres derfor i alle tilfælde ved 405 nm.

Den enzymatiske hydrolysereaktion kan skematisk vises på følgende måde:



E = enzym

S = substrat

ES = enzym-substrat-complex

P_1 og P_2 = produkter

k_1 , k_2 , k_3 og k_4 = hastighedskonstanter

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

Når $[S] \gg [E]$ og $k_4 \ll k_3$, gælder:

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

Den hastighed, ved hvilken P_1 dannes, er: $v = k_3 \cdot [ES]$

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

Når E er fuldstændigt bundet til S, gælder: $[ES] = [E]$ og

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

Lineweaver-Burk-ligningen:

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

Af ligning 2 følger, at konstanterne K_m og k_3 bestemmer substratets aktivitet for et bestemt enzym. Til bestemmelse af disse konstanter kan anvendes følgende metode:

Man blander enzymet og substratet i en pufferopløsning og følger hydrolysereaktionen i 2 - 30 minutter. Substratets koncentration $[S]$ varieres, medens enzymkoncentrationen holdes konstant. Når ekstinktionen ($OD =$ optisk tæthed) optegnes i et koordinatsystem som funktion af tiden, fås en kurve, hvis tangent i nulpunktet svarer til det ideale forløb af hydrolysen. Ved hjælp af denne tangent kan man bestemme hydrolysens begyndelseshastighed. Når $\frac{1}{v}$ tegnes som funktion af $\frac{1}{[S]}$, fås et Lineweaver-Burk-diagram (jfr. "Kurzes Lehrbuch der Biochemie", P. Karlson, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967, side 70), af hvilket $v_{\max}$ og K_m kan bestemmes grafisk.

K_m og $k_3 = \frac{v_{\max}}{E}$ bestemmes under anvendelse af N^α -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl (substratet ifølge eksempel 1) for humant thrombin, humant plasmin og okse-trypsin. Ved hjælp af Lineweaver-Burk-ligningen bestemmes K_m og $v_{\max}$ for de nævnte enzymer (Lineweaver-Burk-diagrammet for humant thrombin er vist i fig. 6). Da den af humant thrombin forårsagede enzymatiske hydrolyse af substratet følger Michaelis-Menton-loven, er det muligt at bestemme store variationer i thrombinmængden nøjagtigt. Efter samme princip bestemmes K_m og $v_{\max}$ for de andre enzymer. De resulterende værdier er sammenstillede i tabel III. Alle bestemmelse er udført i tris-imidazol-puffer ved en ionstyrke på 0,15 og en pH-værdi på 8,4 ved 37°C.

På tegningen er fig. 1 - 5 grafiske afbildninger, der viser den af den hydrolytiske virkning af humant thrombin, ecarin-thrombin, humant staphylo-thrombin, batroxobin (af gift fra Bothrops moojeni), og humant plasmin på substratet ifølge eksempel 1 fremkaldte ændring af den optiske densitet OD som funktion af

tiden i et koordinatsystem. Til sammenligning er også indført den af virkningen af de nævnte enzymer på N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl (substratet ifølge tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.322.116) fremkaldte ændring af den optiske densitet som funktion af tiden. Alle bestemmelser er udført i tris-imidazol-puffer ved en ionstyrke på 0,15, en pH-værdi på 7,9 og ved 37°C. Opløsningerne af de to substrater har samme molære koncentration (1 μ mol/ml).

Fig. 6 viser Lineweaver-Burk-diagrammet for humant thrombin.

De målinger, hvis resultater er angivet i fig. 1 - 5, er udført på følgende måde:

0,25 ml enzymopløsning (0,56 NIH/ml humant thrombin, 0,28 NIH/ml humant ecarin-thrombin, 1,05 NIH/ml humant staphylo-thrombin, 4,0 NIH/ml batroxobin (moojeni) og 0,4 CU/ml humant plasmin sættes til 2,0 ml tris-imidazol-puffer (pH-værdi = 8,4, ionstyrke = 0,15). Blandingen præinkuberes i 2 minutter ved 37°C. Derefter sættes til blandingen 0,25 ml vandig substratopløsning (1 μ mol/ml af substratet ifølge eksempel 1 og af det kendte substrat N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl) ved 37°C. Absorptionens tiltagen måles spektrofotometrisk ved 405 nm og følges kontinuerligt ved hjælp af en skriver. De i tabellerne I og II sammenstillede måleresultater er opnået under de ovenfor angivne forsøgsbetingelser. Mængden af det dannede spaltningsprodukt er et mål for substraternes følsomhed over for enzymerne. Ved beregningen af den pr. minut dannede mængde (nmol) p-nitroanilin anvendes af forenklingsgrunde en molær ekstinktionskoefficient på 10000 i stedet for 9620, da relationen mellem de forskellige substraters evne til at spaltes af enzymerne ikke ændres derved. Til beregning af den pr. minut dannede mængde (nmol) β -naphthylamin og 4-methoxy- β -naphthylamin (substraterne XII - XV, XVIII og XIX) bestråles prøven i et fluorescensfotometer med lys med en bølgelængde på 350 nm. Mængden af det dannede spaltningsprodukt konstateres ved måling af intensiteten af det ved 420 nm emitterede lys.

Af nedenstående tabel I ses susceptibiliteten af de ifølge eksemplerne 1 - 19 fremstillede substrater over for humant thrombin og humant plasmin .

Tabel I

Aktivitet af humant thrombin og humant plasmin, målt ved hjælp af substraterne ifølge opfindelsen ved konstant substrat- og enzymkoncentration. Til sammenligning de tilsvarende med N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl konstaterede værdier.

Substratkoncentration 10^{-4} -m	Mængde af det pr. minut af 1 NIH-enhed humant thrombin eller 1 CU-enhed humant plasmin fra substraterne enzymatisk frigjorte spaltningsprodukt NH_2 -R ² i nanomol	
Substrater	Humant thrombin	Humant plasmin
N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl	28,6	36,0
I	45,7	204,0
II	11,2	20,2
III	18,0	49,5
IV	21,3	60,8
V	2,4	33,8
VI	14,6	47,3
VII	73,8	195,5
VIII	65,8	111,0
IX	16,2	126,0
X	86,9	196,0
XI	43,8	93,5
XII	28,5	116,9
XIII	29,6	109,0
XIV	19,5	95,6
XV	25,9	125,0
XVI	0,9	192,6
XVII	0,85	150,8
XVIII	1,1	126,5
XIX	0,6	98,5

Af tabel I ses det, at de ifølge eksemplerne 1 - 19 fremstillede substrater, med undtagelse af substraterne II og V, over for humant plasmin har en signifikant og i de fleste tilfælde væsentlig større susceptibilitet end det kendte N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl. Af tabel I kan det endvidere ses, at susceptibiliteten af den gruppe substrater, der omfatter I, VII, VIII, X og XI, over for humant thrombin er meget større end det kendte substrats susceptibilitet.

Tabel II

Aktivitet af humant ecarin-thrombin, humant thrombinkoagulase og batroxobin (af gift fra Bothrops moojeni), målt ved hjælp af substratet I fra eksempel 1 ved konstant substrat- og enzymkoncentration. Til sammenligning de tilsvarende med N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl målte værdier.

Substratkonzentration 10^{-4} -m Mængden af det pr. minut af den til 1 NIH-enhed svarende mængde humant ecarin-thrombin, humant thrombinkoagulase og batroxobin fra substratet enzymatisk fraspaltede p-nitroanilin i nanomol

Substrat	Humant ecarin-thrombin	Humant thrombin-koagulase	Batroxobin
N^{α} -Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl	30,7	102	3,26
I	246,4	575	15,81

Tabel III

K_m og v_{max} af forskellige enzymer, bestemt ved hjælp af de to tripeptidderivater ifølge opfindelsen N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl (I) og N^{α} -Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl (VII) [bestemt grafisk ud fra Lineweaver-Burk-diagrammet (fig. 6)].

Enzym	K_m mol/liter		v_{max} μ mol/minut	
	Substrat I	Substrat VII	Substrat I	Substrat VII
Humant thrombin	$5,71 \cdot 10^{-5}$	$1,70 \cdot 10^{-5}$	$5,34 \cdot 10^{-2}$ pr. 1 NIH	$7,57 \cdot 10^{-2}$ pr. 1 NIH
Humant plasmin	$3,57 \cdot 10^{-4}$	$3,23 \cdot 10^{-4}$	$67,3 \cdot 10^{-2}$ pr. 1 CU	$61,8 \cdot 10^{-2}$ pr. 1 CU

Definitioner:

Thrombin-NIH-enheden er enheden ifølge "US National Institute of Health", og thrombinstandarden svarer til "US Standard Thrombin Lot B-3" (21,7 NIH/mg), udgivet 21.3.1973 af "Division of Biologics Standards, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20014, USA".

Den til NIH-enheden svarende mængde humant ecarin-thrombin, humant thrombinkoagulase og batroxobin (moojeni) er den mængde af enzymet, som under standardbetingelser bringer en fibrinogenopløsning til koagulation på samme tid som 1 NIH-enhed standard-thrombin. Forsøgsbetingelser: En blanding af 0,2 ml af en opløsning af 1 NIH/ml "US Standard Thrombin Lot B-3" i albuminpuffer (pH-værdi 7,2) og 0,2 ml 0,4% 's okse-fibrinogenopløsning i destilleret vand giver en koagulationshastighed på 20,2 sekunder.

Plasmin-CU-enheden er den casein-enhed, der måles på casein under standardbetingelser.

En enzymenhed er den mængde enzym, der hydrolyserer 1 μ mol substrat på 1 minut ved substratmætning og ved fastlagt temperatur, ionstyrke og pH-værdi. En tusindedel af denne enhed er en millienzymenhed (mU), som altså på tilsvarende vis hydrolyserer 1 nanomol substrat/minut under de ovenfor nævnte betingelser.

En human-thrombin-enhed (1 U), målt med substratet I ifølge eksempel 1 (N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl) ved en $1,5 \times 10^{-4}$ molær substratkoncentration, en temperatur på 37°C , en ionstyrke på 0,15 og en pH-værdi på 8,4, svarer til mængden af 27,1 NIH-enheder humant thrombin (1 millienhed = 0,0271 NIH-enhed eller 1 NIH-enhed = 36,9 millienhed).

Således er det muligt at bestemme mindre mængder af disse enzymer ved hjælp af tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen end med det kendte substrat, hvilket er af største vigtighed i den kliniske praksis, hvor der ofte kun står små prøvemængder til rådighed, eller når prøvernes koncentration af de enzymer, proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer, der skal bestemmes, ved patologiske tilstande er ekstremt lille.

Tripeptidderivaterne ifølge opfindelsen kan f.eks. også anvendes til bestemmelse af prothrombin og antithrombin, således som det vises i det følgende.

Til prothrombinbestemmelse sættes til 0,5 ml glycinpuffer med pH-værdi 8,4 og en ionstyrke på 0,3 5 μ l citratplasma (handelsprodukt "Ci-TROLTM Normal" fra firmaet American Hospital Supply Corp.,

DADE division, Miami). Blandingen præinkuberes i 30 sekunder ved 37°C . Derefter sættes til den præinkuberede blanding 100 μl vandig calciumthromboplastinopløsning (calciumthromboplastin er en af firmaet Boehringer, Mannheim forhandlet prothrombinaktivator). Den resulterende blanding inkuberes ved 37°C . Efter 2 1/4 minuts inkubationstid er prothrombinaktivering fuldstændig. Efter inkubationstider på mere end 5 minutter forsvandt en del af det dannede thrombin som følge af indvirkning af de i plasmaet tilstedeværende antithrombiner. Efter en inkubationstid på 4 minutter sættes til den nævnte blanding 1 ml glycinpuffer med pH-værdi 8,4, en ionstyrke på 0,3 og en temperatur på 37°C og derefter 0,25 ml af en $1,5 \times 10^{-3}$ molær vandig opløsning af substrat I. Forløbet af substratets hydrolyse følges ved fotometrisk måling af mængden af det pr. minut frigjorte p-nitroanilin ved 405 nm. Forøgelsen i optisk densitet er 0,162 pr. minut. Af denne værdi og den molære ekstinktionskoefficient på p-nitrophenylanilin ved 405 nm på 10.000 beregnes værdien 5,99 mU for det af prothrombin dannede thrombin pr. μl plasma. Deraf følger, at der er dannet 5,99 substrat I enheder thrombin pr. ml plasma af prothrombinet, hvilket svarer til 162,3 NIH-enheder thrombin pr. ml plasma.

Til antithrombinbestemmelsen sættes til 1 ml af en 3 USP-enheder heparin indeholdende glycinpuffer med pH-værdi 8,4 og en ionstyrke på 0,3 0,1 ml af en vandig thrombinopløsning med en koncentration på 25 - 40 NIH-enheder pr. ml ved 37°C . Til den resulterende blanding sættes mængder på 2,5 - 10 μl citratplasma, hvorpå blandingen inkuberes i 30 sekunder ved 37°C . Til den inkuberede blanding sættes straks 0,25 ml "Polybren"-opløsning (koncentration 1 mg "Polybren" pr. 1 ml 0,3-molær kogsaltopløsning) ("Polybren" er et af 1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylen-polymethobromid bestående, af firmaet Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA forhandlet produkt). Den resulterende blanding inkuberes i 30 sekunder ved 37°C . Derefter sættes til blandingen 0,5 ml af en $0,75 \times 10^{-3}$ molær vandig substrat-I-opløsning. Forløbet af substratets hydrolyse forårsaget af det ikke af antithrombin neutraliserede thrombin følges ved fotometrisk måling af mængden af det pr. minut frigjorte p-nitroanilin ved 405 nm. Herved viste det sig, at den af forskellige mængder citratplasma forårsagede hæmning af det tilsatte thrombin er proportionalt med disse mængder.

Tabel IV

mIU/ l plasma beregnet på grundlag af formindskelsen Δ OD/minut forårsaget af 10 μ l plasma	6,14	6,60	6,51	6,42
Δ OD/minut med 10 μ l plasma i inkubetet	0,505	0,405	0,305	0,180
mIU/ μ l plasma beregnet på grundlag af formindskelsen Δ OD/minut forårsaget af 7,5 μ l plasma	6,22	6,69	6,56	6,32
Δ OD/minut med 7,5 μ l plasma i inkubetet	0,584	0,490	0,390	0,270
mIU/ μ l plasma beregnet på grundlag af formindskelsen Δ OD/minut forårsaget af 5 μ l plasma	6,31	6,38	6,31	6,38
Δ OD/minut med 5 μ l plasma i inkubetet	0,665	0,588	0,485	0,353
mIU/ μ l plasma beregnet på grundlag af formindskelsen Δ OD/minut forårsaget af 2,5 μ l plasma	6,30	6,59	6,45	6,22
Δ OD/minut med 2,5 μ l plasma i inkubetet	0,750	0,671	0,568	0,441
Δ OD/minut af det tilsatte thrombin uden plasma	0,835	0,760	0,655	0,525
Tilsat thrombinmængde i NIH-enheder i inkubetet	4,16	3,78	3,26	2,61

mIU = milli-inhibitorenheder

Af tabel IV fremgår det, at variationer i mængden af det i inkubationsblandingen indeholdte thrombin mellem 2,6 og 4,1 NIH-enheder ikke har nogen indflydelse på bestemmelsen af antithrombin, når plasmamængderne ligger mellem 2,5 og 10 μ l. Der måles pr. μ l plasma $6,40 \pm 4\%$ substrat-I-milli-inhibitorenheder antithrombin, hvilket svarer til $6400 \pm 4\%$ substrat-I-milli-inhibitorenheder pr. μ l plasma. Dette betyder, at 1 ml plasma er i stand til at hæmme $173,4 \pm 4\%$ NIH-enheder thrombin.

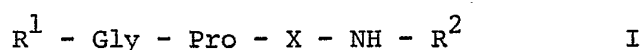
N^a-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl (substratet ifølge eksempel 1) har iøvrigt den vigtige fordel, at det har en fire gange højere vandopløselighed (>4 mg/ml) end det i tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.322.116 beskrevne thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl (ca. 1 mg/ml). Denne højere vandopløselighed gør det muligt at udføre enzymbestem-

melser i et meget bredere koncentrationsområde. Ved standardiserede biologiske testmetoder er dette af afgørende betydning, fordi man netop i disse tilfælde nøjagtigt kan bestemme ekstreme værdier, uden at det er nødvendigt i forvejen at foretage en fortynding eller koncentrering af de biologiske prøver. Den herved opnåede tidsbesparelse er ofte udslaggivende, da man i klinisk praksis stræber efter hurtigst muligt at bestemme ekstreme værdier for diagnosen. Ved lavere substratopløselighed er det ikke muligt at opnå substratmætning i hele koncentrationsområdet. Når der ikke består substratmætning, afviger enzybestemmelsens resultater fra en dosis/virkning-kurve, hvad der naturligvis er en stor ulempe ved en standardiseret biologisk testmetode.

PATENTKRAV

1. Tripeptidderivater samt salte deraf med mineralsyrer eller organiske syrer til anvendelse som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor i legemsvæsker fra mennesker og pattedyr samt i dyriske celleekstrakter og kirtelgifte fra koldblodede dyr ved fotometriske, spektrofotometriske eller fluorescensfotometriske metoder,

kendetegnet ved, at de har den almene formel I



hvor R^1 betegner hydrogen eller en alkanoylgruppe med 2 - 8 carbonatomer, en phenylalkanoylgruppe med 2 - 3 carbonatomer i alkanoyldelen, en cyclohexylcarbonylgruppe, en alkoxycarbonylgruppe med 1 - 4 carbonatomer i alkoxydelen, en benzyloxycarbonylgruppe, en alkan-sulfonylgruppe med 1 - 2 carbonatomer eller en benzen-, p-toluen- eller 2-naphthalensulfonylgruppe, R^2 betegner en p-nitrophenyl-, 2-naphthyl- eller 4-methoxy-2-naphthylgruppe, og X betegner en arginyl- eller lysylgruppe.

2. Tripeptidderivater ifølge krav 1, især til anvendelse som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer,

k e n d e t e g n e t ved, at R^1 betegner en alkoxy-carbonylgruppe med 1 - 4 carbonatomer, en benzyloxycarbonylgruppe eller en benzen-, p-toluen- eller 2-naphthalensulfonylgruppe, R^2 betegner en p-nitrophenyl- eller 2-naphthylgruppe, og X betegner en arginylgruppe.

3. Anvendelse af de i krav 1 angivne tripeptidderivater eller saltene deraf som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer, ecarinthrombin, plasmin og plasminlignende enzymer samt proenzymer, proenzymaktivatorer og enzyminhibitorer herfor i legemsvæsker fra mennesker og pattedyr samt i dyriske celleekstrakter og i kirtelgifte fra koldblodede dyr.

4. Anvendelse ifølge krav 3, af de i krav 2 angivne tripeptidderivater som substrater til kvantitativ bestemmelse af thrombin og thrombinlignende enzymer.

Fremdragne publikationer:

SE ansøgning nr 7205757-3 (fremlæggelsesskrift nr. 380257),
7205758-1 (fremlæggelsesskrift nr. 380258),
7210647-9 (fremlæggelsesskrift nr. 401738)
Journal of Organic Chemistry 30 (1965) 1781-1785
Archives of Biochemistry and Biophysics 108 (1964) 266-274
Chemical Abstracts 69 (1968) 9270 v.

Fig. 1

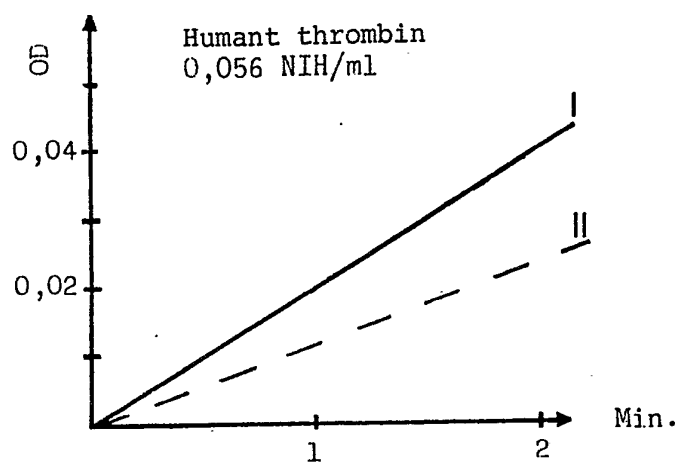


Fig. 2

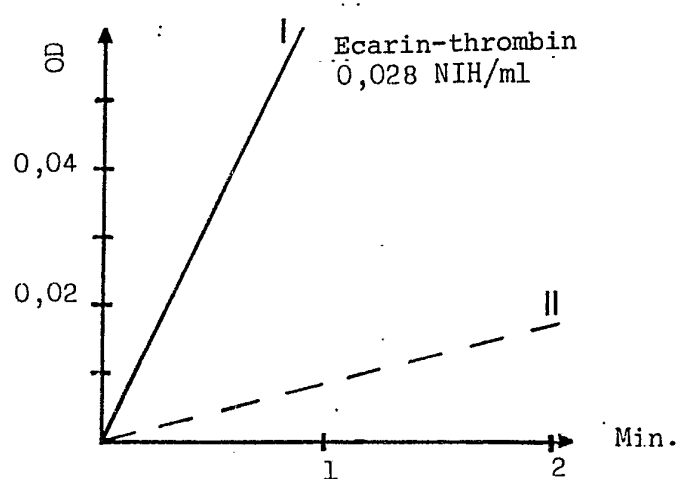
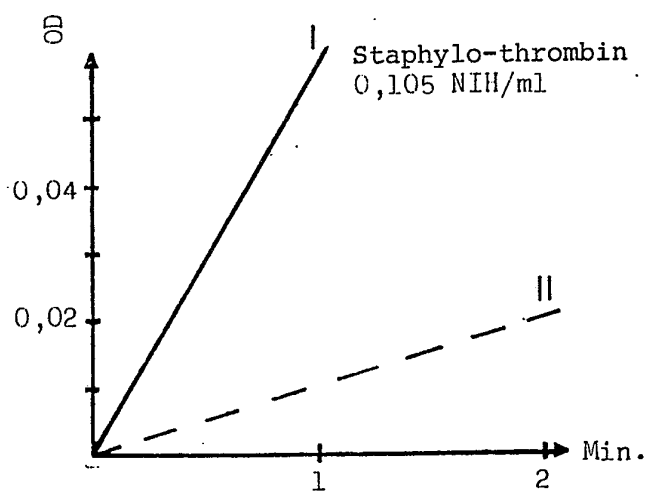


Fig. 3



I : N^{α} -Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl
 II: Bz-Phe-Val-Arg-pNA.HCl

Fig. 4

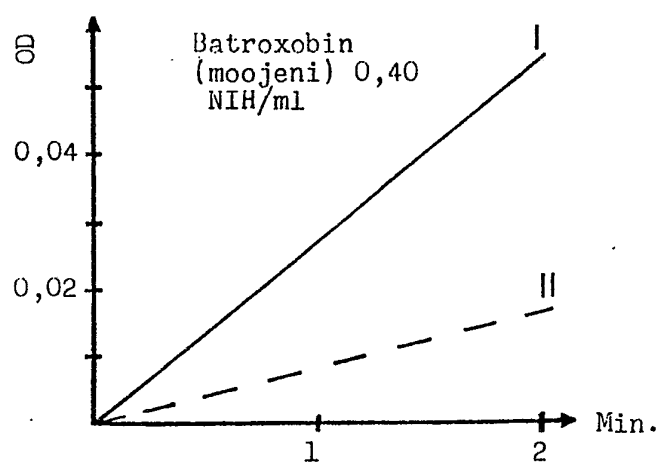


Fig. 5

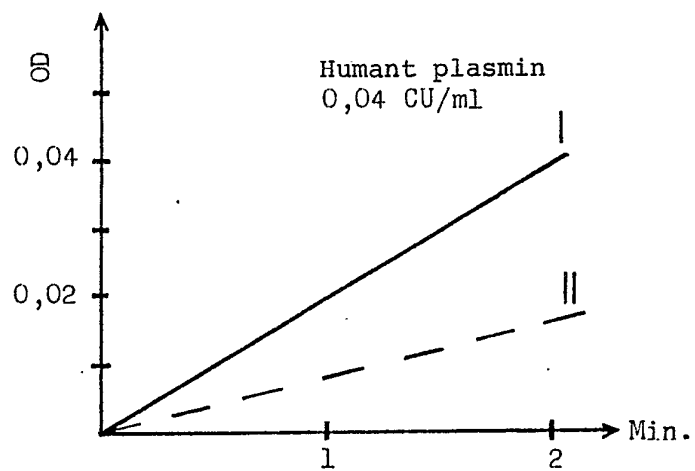


Fig. 6

