



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5415/83

(51) Int.Cl.6

C 07 K 5/04

(22) Indleveringsdag: 25 nov 1983

C 12 Q 1/37

(41) Alm. tilgængelig: 28 maj 1984

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 24 jun 1996

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 27 nov 1982 DE 3244030

(73) Patenthaver: *BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; 3550 Marburg 1, DE

(72) Opfinder: Helmut *Heber; DE, Reinhard *Eberle; DE, Volker *Teetz; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

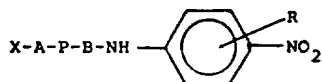
(54) Chromogene forbindelser, fremgangsmåde til deres fremstilling samt deres anvendelse til påvisning og bestemmelse af et enzym

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5415-83

Chromogene forbindelser med formlen



I

hvor X er et hydrogenatom, en i peptidkemiens gængs beskyttelsesgruppe eller en gruppering, der irreversibelt blokerer den endestillede aminogruppe, A og P, der kan være ens eller forskellige, er en af 2-15 carbonatomer sammen med 3 nitrogenatomer, 2 svovlatomer og 6 oxygenatomer bestående α -, β - eller γ -aminosyre, hvis sidekæde kan være substitueret, og B er desuden et dipeptid dannet af sådanne aminosyrer, B er arginin, homoarginin, lysin, homolysin, ornithin eller histidin, og R er en substituent i 2- eller 3-stillingen, samt svreadditionssalte heraf fremstilles ved forskellige fremgangsmåder.

Forbindelserne med formelen I kan anvendes som substrater til påvisning og kvantitativ bestemmelse af hydrolytisk virkende enzymer i enzymklasse 3.4.21.

Den foreliggende opfindelse angår chromogene forbindelser, en fremgangsmåde til deres fremstilling samt deres anvendelse til påvisning og bestemmelse af et enzym.

Chromogene forbindelser til bestemmelse af proteaser
5 er kendt fra DE-offentliggørelsesskrifter nr. 32 02 289,
23 22 115, 25 27 932, 25 52 570, 26 29 067, 24 36 543 og
26 29 198 samt fra EP-offentliggørelsesskrifter nr 0.019.589
og 0.034.122.

Disse kendte, til bestemmelse af proteaser anvendte
10 substrater har dog betydelige ulemper, hvad angår deres
specificitet. Således spaltes f.eks. til bestemmelse af
thrombin anvendte, chromogene substrater, såsom Tos-Gly-Pro-
Arg-pNA (forkortelser, se senere) og H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, i
betydeligt omfang af andre proteaser i koagulations- og
15 fibrinolysekaskaden, såsom plasmakallikrein, faktor XII a
(M 28.000 fra placenta), plasmin og faktor X a samt også
trypsin og urokinase. Lignende konstateringer med hensyn
til manglende substrat-enzym-specificitet viser sig også
for chromogene forbindelsers vedkommende, som de forhandles
20 til andre proteaser, såsom plasmakallikrein, plasmin, faktor
X a og urokinase. Substraterne ifølge DE-offentliggørel-
sesskrift nr. 24 36 543 med forøget enzymspecificitet har
den ulempe, at de efter spaltning ved hjælp af det pågældende
enzym kræver et hjælpeenzym med aminopeptidasevirkning til
25 efterfølgende frigørelse af chromophoren.

Til forbedring af disse mangler er der i DE-offentlig-
gørelsesskrift nr. 32 02 289 og 23 22 115 beskrevet chromo-
phorer, hvori p-nitroanilinet indeholder substituenten.
Disse substituenten er halogenatomer, en methylgruppe, en
30 yderligere nitrogruppe, eller hele nitroanilingruppen er
erstattet af en aminonaphthyl-, aminonitronaphthyl-, amino-
quinolyl- eller aminonitroquinolylgruppe.

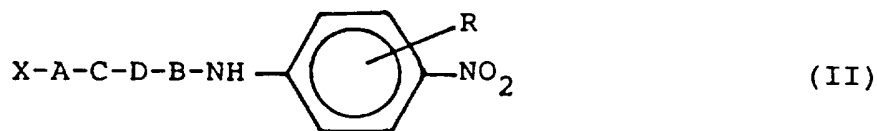
Det er således den foreliggende opfindelses formål
at tilvejebringe chromogene forbindelser, som har større
35 enzymspecificitet, og som kan anvendes uden hjælpeenzymer.

Dette formål opnås ifølge opfindelsen med de her

omhandlede chromogene forbindelser med nedenstående formel II.

Opfindelsen angår således chromogene forbindelser, som er ejendommelige ved, at de har den almene formel II

5



10 hvor

X er et hydrogenatom, benzyloxycarbonyl, tert.butylloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl, methylsulfonethyloxycarbonyl eller 9-fluorenylmethyloxycarbonyl eller en gruppe $\text{R}_4\text{-CO}$, hvor R_4 er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-6 carbonatomer, der eventuelt er substitueret med 1-3 halogenatomer, eller en (alk)arylgruppe med 6-10 carbonatomer, eller X er en benzensulfonylgruppe eller en alkarylsulfonylgruppe med 7-10 carbonatomer, mesyl, methoxybensensulfonyl, succinoyl eller maleoyl,

20 A er en aminosyre valgt blandt Ala, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Pyr, Thr, Tyr og Val,

C er en binding eller en aminosyre valgt blandt Ala, Asp, Glu, Gly, Leu, Lys, Ser og Val,

25 D er en aminosyre valgt blandt Ala, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Phe, Pip, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val,

B er arginin, homoarginin, lysin, homolysin, ornithin eller histidin, og

R er COOR_1 , CONR_2R_3 , $\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, CO-Y-OR_1 og $\text{CO-Y-NR}_2\text{R}_3$ i 3-stilling eller OR_1 i 2-stilling i 4-nitroanilinet,

30 hvor

R_1 er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-6 carbonatomer, en aromatisk carbonhydridgruppe med 6-10 carbonatomer, en aralifatisk carbonhydridgruppe med 7-11 carbonatomer eller en alicyclisk carbonhydridgruppe med 3-8 carbonatomer,

35 R_2 er et hydrogenatom eller en under R_1 defineret gruppe,

R_3 er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-10 carbonatomer,

0

3

en aromatisk carbonhydridgruppe med 6 eller 10 carbonatomer,
 en araliphatisk carbonhydridgruppe med 7-11 carbonatomer
 eller en alicyclisk carbonhydridgruppe med 3-8 carbonatomer,
 Y er en α -, β - eller γ -aminosyre valgt blandt Ala, Asn,
 5 Asp, β -Ala, γ -But, Cys, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Arg,
 Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val, og
 n er 1-10,
 samt syreadditionssalte heraf.

10

I de ovenfor anførte definitioner og i beskrivelsen
 i øvrigt har de anvendte forkortelser følgende betydninger:

	Ac	Acetyl
	Ala	Alanin
	β -Ala	β -Alanin
15	ANBS	5-Amino-2-nitrobenzoesyre
	Arg	Arginin
	Asn	Asparagin
	Asp	Asparaginsyre
	Boc	t-Butyloxycarbonyl
20	But	Aminosmørsyre
	γ -But	γ -Aminosmørsyre
	Bz	Benzoyl
	Bzl	Benzyl
	CHA	Cyclohexylalanin
25	Cys	Cystein
	DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
	DCH	Dicyclohexylurinstof
	Ddm	4,4'-Dimethoxybenzhydryl
	DMF	Dimethylformamid
30	EE	Eddikesyreethylester
	Gln	Glutamin
	Glu	Glutaminsyre
	Gly	Glycin
	HAc	Eddikesyre
35	His	Histidin
	HOBt	Hydroxybenzotriazol

0	Ile	Isoleucin
	Leu	Leucin
	Lys	Lysin
	Me	Methyl
5	Met	Methionin
	MM	Molmasse
	Msc	Methylsulfoethyloxycarbonyl
	NMM	N-Methylmorpholin
	Orn	Ornithin
10	PE	Petroleumether
	Pip	Pipecolinsyre
	pNA	para-Nitroanilin (4-nitroanilin)
	Pro	Prolin
	Pyr	Pyroglutaminsyre
15	Ser	Serin
	tBu	tert. Butyl
	TCP	2,4,5-Trichlorphenyl
	Thr	Threonin
	TDM	4,4'-Bis-(dimethylamino)-diphenylmethan
20	Tos	Toluensulfonyl
	Tyr	Tyrosin
	Val	Valin
	Z	Benzyloxycarbonyl
25	ZTE	Benzyloxycarbonyl-amino-2,2,2-trifluor-ethyl

For så vidt andet ikke er anført, forekommer aminosyrerne i L-formen.

Aminosyren A forekommer fortrinsvis i D-formen, når X er et hydrogenatom.

Aminosyrerne C og D kan forekomme i D- eller L-konfiguration.

Det nye ved substraterne ifølge opfindelsen beror på derivatiseringen af p-nitroanilidgruppen. De nye derivaters spektrofotometriske egenskaber adskiller sig ikke eller kun uvæsentligt fra 4-nitroanilins.

Den ulempe, der er forbundet med manglende specificitet ved deres anvendelse som enzymsubstrater, har de nye forbindelser ifølge opfindelsen ikke, eller i hvert fald kun i langt ringere udstrækning end de kendte substrater.

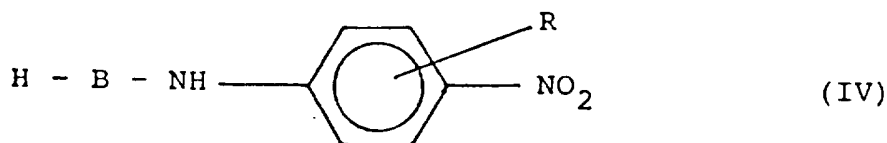
5 De nye substrater udmærker sig ved en derivatisering af den chromogene gruppe, i dette tilfælde 4-nitroanilin. Ved indførelse af forskellige substituenter bliver chromophoren stærkt ændret i sin rumlige dimension. Dette fører til en betydelig specificitetsgevinst ved bestemte enzymer, især
10 thrombin, plasmin, kallikrein, faktor X a, urokinase og C₁-esterase.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser ifølge opfindelsen, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at et peptidderivat med
15 den almene formel III



hvor X, A, C og D har den ovenfor anførte betydning, idet X
20 dog ikke er et hydrogenatom, og yderligere funktionelle grupper i aminosyresidekæderne er substitueret med beskyttelsesgrupper, kondenseres med et aminosyrederivat med den almene formel IV

25



30

hvor B har den ovenfor anførte betydning, idet dog yderligere funktionelle grupper i aminosyrens sidekæde er substitueret med beskyttelsesgrupper, og R har den for formel II anførte betydning, hvorefter forekommende beskyttelsesgrupper eventuelt fraspaltes.
35

0

Til kondensationen kan anvendes gængse metoder inden for peptidkemien, f.eks. azidmetoden, metoden med blandede anhydrider eller metoderne med aktiverede estere (trichlorphenylester, pentachlorphenylester, hydroxysuccinimidester, nitrophenylester). Fortrinsvis anvendes carbodiimidmetoden, eventuelt med tilsætning af hydroxybenzotriazol ifølge Chem. Ber. 103, 788 (1970).

5-Amino-2-nitrobenzoesyrederivaterne (ANBS-derivaterne) ifølge opfindelsen kan fås ved kendte forestrings- og amidannelsesreaktioner. En formålstjenlig fremstillingsmåde for ANBS-esterne er syrechloridmetoden med thionylchlorid, phosphor-trichlorid eller phosphorpentachlorid. Fortrinsvis anvendes thionylchlorid med den tilsvarende alkohol. ANBS-estere er i reglen opløselige i chloroform eller eddikesyreethylester.

15 En fordelagtig metode til fremstilling af ANBS-amiderne, ANBS-aminosyreestrene, ANBS-aminosyreamidene og ANBS-dimethylaminoalkylamidene er kondensation ifølge gængse metoder inden for peptidkemien, f.eks. metoden med blandede anhydrider, syrechloridmetoden eller carbodiimidmetoden. Fortrinsvis anvendes carbodiimidmetoden under tilsætning af hydroxybenzotriazol. Produkterne er kun delvis opløselige i eddikesyreethylester, men kan ofte renses deri ved omkrystallisation. En beskyttelsesgruppe for den frie aminogruppe i ANBS er ikke nødvendig.

Omsætning af ANBS-derivaterne med en af de i den al-
25 mene formel I med B betegnede aminosyrer kan ske via ANBS-derivatets isocyanat. Ligeledes kan aminosyrederivatet aktiveres ved hjælp af azidmetoden eller phosphoroxychloridmetoden. Fortrinsvis anvendes phosphoroxychloridmetoden. Alle funktionelle grupper indtil carboxylgruppen i aminosyrerne skal blokeres med
30 de i peptidkemien almindeligt anvendte beskyttelsesgrupper. Til beskyttelse af guanidinofunktionen i arginin kan den være protoniseret.

35

Gængse beskyttelsesgrupper inden for peptidkemien er f.eks. de af E. Wunsch i Houben-Weyl, bd. XV/1, og The Peptides, bd. 3, "Protection af Functional Groups in Peptide Synthesis", Academic Press 1981, nævnte. Fortrinsvis anvendes
5 benzyloxycarbonyl, tert. butyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl, methylsulfonyloxycarbonyl og 9-fluorenylmethyloxycarbonyl.

En irreversibelt blokerende gruppering kan være en acyl- eller sulfonylgruppe, fortrinsvis en R_4 -CO-gruppe,
10 hvor R_4 er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-6 carbonatomer, der kan være substitueret med 1-3 halogenatomer, eller en alkarylgruppe med 6-10 carbonatomer eller en benzen-sulfonyl-, eller alkarylsulfonylgruppe med 7-10 carbonatomer, især dog formyl-, acetyl-, benzoyl-, trifluoracetyl-, toluen-sulfonyl-, mesyl-, methoxybensensulfonyl-, succinoyl- eller
15 maleoylgruppe.

Fortrinsvis anvendes der som beskyttelse for syreamid-funktionen i Gln og Asn 4,4'-dimethoxybenzhydryl og 4,4'-dimethylbenzhydryl. Som beskyttelse af imidazolfunktionen i His anvendes fortrinsvis benzyloxycarbonylamino-2,2,2-trifluorethyl
20 (ZTE), tert.butylcarbonyl og tosyl. Som beskyttelse af guanidinofunktionen i arginin kan denne være protoniseret eller substitueret med N^G -tosyl, N^G -nitro, N^G -adamantyloxycarbonyl og N^G -benzyloxycarbonyl. Som beskyttelse af ϵ -aminofunktionen i
25 lysin anvendes fortrinsvis benzyloxycarbonyl, tert.butyloxycarbonyl, methylsulfoethyloxycarbonyl eller tosyl. Som beskyttelse af carboxyifunktionen i Asp og Glu anvendes fortrinsvis forestring med aliphatiske, aromatiske eller araliphatiske alkoholer, f.eks. methanol, tert.butanol, phenol og benzyalkohol. SH-funk-
30 tionen i cystein beskyttes fortrinsvis som S-benzyl eller S-alkylsulfenyl. Med henblik på hydroxyfunktionen i tyrosin, serin og threonin skal foretrinsvis nævnes etherificering med benzyl eller t-butyl.

Opfindelsen angår endvidere anvendelse af forbindelserne ifølge opfindelsen til påvisning og bestemmelse af enzymer, navnlig proteinaser. Ved indvirkning af en protei-
nase spaltes bindingen mellem B og 4-nitroanilidderivatet,
5 hvorved der opstår et chromophort nitroanilinderivat, der kan måles fotometrisk.

Anvendelse af forbindelserne med formlen I til påvisning og bestemmelse af enzymer udgør en vigtig del af opfindelsen.

10 Bestemmelsen af et hydrolytisk virksomt enzym gennemføres ved, at der til den opløsning, hvori enzymet skal bestemmes, sættes en forbindelse med formlen II, og mængden eller dannelseshastigheden for det fraspaltede mikroanilinderivat måles som et direkte mål for det hydrolytisk virk-
15 somme enzyms aktivitet.

I nedenstående tabel 1 er anført eksempler på forbindelser ifølge opfindelsen, disses udgangsforbindelser med formlerne III og IV samt de sidste reaktionstrin.

20 Peptidderivaterne med formlen III fremstilles ved kendte fremgangsmåder ifølge E. Wünsch i Houben-Weyl, bd. XV/1+2, og The Peptides, bd. 1, "Major Methods of Peptide Bond Formation", Academic Press, 1979.

Fremstillingen af de chromogene aminosyrederivater med formlen IV vil blive beskrevet nedenfor.

25 Alle nye forbindelser er blevet karakteriseret ved hjælp af grundstofanalyse, aminosyreanalyse og tyndtlagschromatografi. Den kemiske renhed er konstateret ved hjælp af tyndtlagschromatografi i forskellige opløsningsmiddelblandinger. Racemiseringen kontrolleres ved hjælp af gaschromatografi på en med "Chirasil-Val" belagt glaskapillarkolonne
30 ifølge J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977), og ligger konstant under 2%.

Ved syntesen af de nye forbindelser, der er anført i nedenstående tabel I, foretages de enkelte reaktionstrin
35 alle på samme måde. Der gives en almen beskrivelse af hvert syntesetrin:

1. Syntese af chromogene ANBS-estere ($R = \text{COOR}_1$).

a) Til 1 mol af den tilsvarende alkohol sættes ved -5°C under udelukkelse af fugtighed 7,9 ml (0,11 mol) thionylchlorid. Til denne opløsning sættes ved -5°C 18,2 g (0,1 mol) ANBS. Efter afsluttet tilsætning opvarmes langsomt til 50°C , og der omrøres ved denne temperatur i 4 timer. Opløsningsmidlet afdestilleres i vakuum, og den olieagtige remanens opløses i chloroform. Den organiske fase vaskes med 1 molær KHCO_3 , vand, 5%'s citronsyre og igen med vand. Der tørres over NaSO_4 . Efter filtrering afdestilleres opløsningsmidlet i vakuum. Produktet kan omkrystalliseres ud fra et egnet opløsningsmiddel eller renses ved hjælp af silicagelchromatografi. Udbytte ligger omkring 60%.

b) Alkoholer, hvis reaktivitet over for thionylchlorid er ringe, såsom aliphatiske alkoholer fra 6 carbonatomer eller araliphatiske alkoholer fra 7 carbonatomer, samt alkoholer, der er faste ved de ovenfor beskrevne reaktionsbetingelser såsom phenol eller naphthol, omdannes til kaliumsaltet. 0,1 mol ANBS og 0,1 mol HOBt opløses i 100 ml DMF, og der tildryppes en opløsning af 0,1 mol DCCI i 100 ml DMF i løbet af 30 minutter. Efter omrøring i 1 time ved stuetemperatur tilsættes 0,1 mol af det tilsvarende kaliumalkoholat, og der omrøres i 16 timer ved stuetemperatur. Oparbejdningen sker som beskrevet ovenfor. Udbytte ligger omkring 40%.

2. Syntese af chromogene ABNS-aminer ($R = \text{CONR}_2\text{R}_3$, $\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CO-Y-OR_1 , $\text{CO-Y-NR}_2\text{R}_3$).

18,2 g (100 mmol) 5-amino-2-nitrobenzoesyre (ANBS) og 15,3 g (100 mmol) HOBt x H_2O opløses i 100 ml DMF, og der tildryppes en opløsning af 20,6 g (100 mmol) DCCI i 100 ml DMF i løbet af 30 minutter. Efter omrøring i en time ved stuetemperatur tilsættes 0,1 mol af aminkomponenten. Foreligger aminkomponenten som saltet heraf, tilsættes yderligere 0,1 mol NMM. Efter omrøring i 16 timer ved stuetemperatur frafiltreres det udfældede DCH, og opløsningsmidlet fjernes i vakuum. Den tilbageblevne, olieagtige remanens opløses i EE og vaskes flere gange med 5%'s (vægt/vol) citronsyre,

vand, 1 molær KHCO_3 -opløsning og vand. Efter tørring over Na_2SO_4 afdestilleres opløsningsmidlet i vakuum. Det krystal-linske produkt omkrystalliseres fra et egnet opløsningsmid-del. Udbyttet ligger ved 80-90%.

5 3. Syntese af chromogene 2-alkoxy-pNA-derivater
(R = OR_1).

7,7 g (50 mmol) 2-amino-5-nitrophenol opløses i 100 ml acetone, skylles med nitrogen, og der tilsættes 7,0 g (50 mmol) K_2CO_3 og 50 mmol alkylobromid. Der opvarmes under omrøring i 10 8 timer ved tilbagesvaling. Efter afkøling til 0°C filtreres der, og opløsningsmidlet afdestilleres i vakuum. Remanensen opløses i ether og krystalliseres med PE (40/60). Udbyttet ligger omkring 50%.

4. Kobling af chromogen komponent.

15 50 mmol $\text{N}^\alpha, \text{N}^\text{G}$ -beskyttet arginin eller $\text{N}^\alpha, \text{N}^\text{G}$ -beskyt-tet lysin eller ornithin, 50 mmol chromogen amin ifølge 1, 2 eller 3 og 6,8 g (100 mmol) imidazol opløses i 250 ml pyridin, og opløsningen afkøles til -20°C . Derpå tildryppes under opret-holdelse af denne temperatur 7,5 ml (80 mmol) POCl_3 . Efter af- 20 sluttet tilsætning får blandingen lov til langsomt at varme op til stuetemperatur. Opløsningsmidlet fjernes i vakuum, og den fremkomne olie tages op i 1 molær KHCO_3 . Den vandige fase ekstraheres 3 gange med EE. Den organiske fase vaskes med 1 molær KHCO_3 -opløsning, vand, 5%'s citronsyre og igen 25 med vand og tørres over Na_2SO_4 . Efter filtrering afdestil-leres opløsningsmidlet, og forbindelsen krystalliseres med ether. Udbyttet ligger omkring 40-60%.

5. Fraspaltning af beskyttelsesgrupper.

a) Fraspaltning af benzyloxycarbonylgruppen (Z-).

30 10 mmol beskyttet, chromogent aminosyrederivat ifølge 4 opløses i 20 ml HAC, og der tilsættes 30 ml 33%'s HBr i HAC ved stuetemperatur under udelukkelse af fugtighed. Efter omrø-ring i 40 minutter ved stuetemperatur afdampes opløsningsmid-let i vakuum, og produktet krystalliseres med ether. Efter 35 flere ganges vask med ether tørres stoffet i vakuum over fast KOH i 20 timer.

Udbytterne ligger omkring 90%.

b) Fraspaltning af t-butyloxycarbonylgruppen (Boc-).

10 mmol beskyttet, chromogent aminosyrederivat ifølge
4 opløses i 50 ml 1,2N HCl i Hac og omrøres i 20 minutter
5 ved stuetemperatur. Opløsningsmidlet fjernes i vakuum, og
produktet krystalliseres med ether. Efter flere gange vask
med ether tørres stoffet i vakuum over fast KOH i 20 timer.
Udbytterne ligger omkring 95%.

6. Koblingsreaktion.

10 5 mmol beskyttet di- eller tripeptidderivat, hvis
endestillede carboxylgruppe er fri, opløses i 20 ml DMF, og
der tilsættes ved 0°C 5 mmol DCCI og 5 mmol HOBT. Efter
omrøring i 30 minutter ved 0°C opvarmes til stuetemperatur,
og der tilsættes 5 mmol chromogent aminosyrederivat ifølge
15 5a eller 5b samt 5,5 mmol NMM. Efter omrøring i 16 timer
ved stuetemperatur frafiltreres DCH, og opløsningsmidlet
afdampes i vakuum. Den gule remanens opløses i MeOH og chro-
matograferes på en "Sephadex® LH-20"-kolonne. Fraktionerne
af rent stof slås sammen, og opløsningsmidlet fjernes i
20 vakuum. Det fremstillede, amorfe faststof vaskes flere gange
med ether og tørres i vakuum over P₄O₁₀. Udbytterne ligger
omkring 70%.

7. Fraspaltning af beskyttelsesgruppe.

25 a) Fraspaltning af t-butyloxycarbonylgruppen (Boc)
og eventuelt t-butylestergruppen i sidekæden på
Glu og Asp.

2 mmol beskyttet, chromogent peptidderivat opløses i
30 ml 1,2 N HCl/Hac og omrøres i 20 minutter ved stuetempera-
tur. Opløsningsmidlet fjernes i vakuum, og produktet krystal-
30 liseres med ether. Efter flere gange vask med ether tørres
stoffet i højvakuum over fast KOH.

b) Fraspaltning af benzyloxycarbonylgruppen (Z).

2 mmol beskyttet, chromogen peptidderivat opløses i
10 ml Hac, og der tilsættes 15 ml 33%'s HBr i Hac ved stue-
35 temperatur under udelukkelse af fugtighed. Efter 1 times
omrøring ved stuetemperatur afdampes opløsningsmidlet i

vakuum, og produktet krystalliseres med ether. Efter flere gange vask med ether opløses stoffet i vand, overføres med en ionbytter til hydrochloridet og frysetørres.

c) Fraspaltning af alle beskyttelsesgrupper.

5 2 mmol af det beskyttede, chromogene peptidderivat opløses i 10 ml HF i nærvær af 1,0 ml anisol, og der omrøres 1 time ved 0°C. HF fjernes med en tør nitrogenstrøm, og stoffet tørres over fast KOH ved højvakuum. Produktet vaskes flere gange med ether, opløses i vand, overføres med en ionbytter til
10 hydrochloridet og frysetørres.

15

20

25

30

35

Tabel I

	Forbindelse ifølge opfindelsen	Udgangsforbindelse med formel III og IV	Sidste reaktions-trin
5			
1	H-D-Val-Leu-Lys-ANBS-methylester x 2HCl	Boc-D-Val-Leu-OH	6, 7b
2	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-methylester	H-Lys (Z) -ANBS-methylester x HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
10	Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg-ANBS-methylester x HCl	H-Arg-ANBS-methylester x 2HCl Bz-Ile-Glu(OMe)-OH	6
4	Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-ANBS-methylester x HCl	H-Gly-Arg-ANBS-methylester x 2HCl Boc-Leu-Ser-Thr-OH	6
5	H-D-Leu-Val-Gly-Lys-ANBS-methylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-methylester x 2HCl Boc-D-Leu-Val-Gly-OH	6, 7b
6	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-ethylester x 2HCl	H-Lys (Z) -ANBS-methylester x HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
7	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS-ethylester x HCl	H-Arg-ANBS-ethylester x 2HCl Tos-Gly-Pro-OH	6
20	Pyr-Gly-Arg-ANBS-ethylester x HCl	H-Arg-ANBS-ethylester x 2HCl Pyr-Gly-OH	6
9	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-ethylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-ethylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
10	H-D-Val-Asp-Arg-ANBS-n-propylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-ethylester x 2HCl Boc-D-Val-Asp(OtBu)-OH H-Arg-ANBS-n-propylester x 2HCl	6, 7a
25			

11	H-D-Phe-Tyr-Arg-ANBS-n-propylester x 2HCl	Boc-D-Phe-Tyr-OH	6, 7a
12	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-isopropylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-n-propylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
5	H-D-Cys(sBzl)-Pro-Arg-ANBS-isopropylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylester x 2HCl Boc-D-Cys(sBzl)-Pro-OH	6, 7a
14	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-n-butylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
15	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS-n-butylester x HCl	H-Arg-ANBS-n-butylester x 2HCl Z-D-Leu-Gly-OH	6
10	Pyr-Gly-Arg-ANBS-n-butylester x HCl	H-Arg-ANBS-n-butylester x 2HCl Pyr-Gly-OH	6
17	H-D-Pro-Phe-Arg-ANBS-n-butylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-n-butylester x 2HCl Boc-D-Pro-Phe-OH	6, 7a
15	H-D-Val-Thr-Arg-ANBS-isobutylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-n-butylester x 2HCl Boc-D-Val-Thr-OH	6, 7a
19	Msc-Gly-Ser-Lys-ANBS-t-butylester x HCl	H-Arg-ANBS-isobutylester x 2HCl Msc-Gly-Ser-OH	6, 7b
20	H-D-Phe-Tyr-Lys-ANBS-n-pentylester x 2HCl	H-Lys(Z)-ANBS-t-butylester Boc-D-Phe-Tyr-OH	6, 7b
20	Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg-ANBS-n-pentylester x HCl	H-Lys(Z)-ANBS-n-pentylester Bz-Ile-Glu(OMe)-OH	6
22	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-pentyl(2)-ester x 2HCl	H-Gly-Arg-ANBS-n-pentylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-pentyl(2)-ester	6, 7a

23	H-D-Lys (Z) -Gly-Arg-ANBS- n-hexylester x 2HCl	Boc-D-Lys (Z) -Gly-OH	6, 7a	
24	N-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- benzylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-n-hexylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a	
5	25	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS- benzylester x HCl	Tos-Gly-Pro-OH	6
26	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS- benzylester x HCl	H-Arg-ANBS-benzylester x 2HCl Z-D-Leu-Gly-OH	6	
10	27	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- methyramid x 2HCl	H-Arg-ANBS-benzylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
28	H-D-Val-Leu-Lys-ANBS- methyramid x 2HCl	H-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Boc-D-Val-Leu-OH	6, 7b	
15	29	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS- methyramid x HCl	H-Lys (Z) -ANBS-methyramid x HCl Tos-Gly-Pro-OH	6
30	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS- methyramid x HCl	H-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Z-D-Leu-Gly-OH	6	
31	Bz-Ile-Glu(OMe) -Gly-Arg- ANBS-methyramid x HCl	H-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Bz-Ile-Glu(OMe) -OH	6	
20	32	Pyr-Gly-Arg-ANBS- methyramid x HCl	H-Gly-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Pyr-Gly-OH	6
33	H-D-Pro-Phe-Arg-ANBS- methyramid x 2HCl	H-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Boc-D-Pro-Phe-OH	6, 7a	
34	H-D-Ala-Gly-Arg-ANBS- methyramid x 2HCl	H-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Boc-D-Ala-Gly-OH	6, 7a	
25	35	H-D-Phe-Tyr-Arg-ANBS	H-Arg-ANBS-methyramid x 2HCl Boc-D-Phe-Tyr-OH	6, 7a

36	ethylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-ethylamid x 2HCl	6
	Boc-His-(Boc)-Gly-Arg-ANBS-	Boc-His-(Boc)-Gly-OH	
	ethylamid x HCl	H-Arg-ANBS-ethylamid x 2HCl	
37	H-D-Phe-Ser(OBzl)-Arg-ANBS-	Boc-D-Phe-Ser(OBzl)-OH	6, 7a
5	n-propylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-n-propylamid x 2HCl	
38	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-	Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
	isopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
39	H-D-Val-Tyr(OBzl)-Arg-	Boc-D-Val-Tyr(OBzl)-OH	6, 7a
10	ANBS-isopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
40	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS-	Tos-Gly-Pro-OH	6
	isopropylamid x HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
41	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS-	Z-D-Leu-Gly-OH	6
	isopropylamid x HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
42	Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg-	Bz-Ile-Glu(OMe)-OH	6
15	ANBS-isopropylamid x HCl	H-Gly-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
43	Pyr-Gly-Arg-ANBS-	Pyr-Gly-OH	6
	isopropylamid x HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
44	H-D-Pro-Phe-Arg-ANBS-	Boc-D-Pro-Phe-OH	6, 7a
	isopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
20	H-D-Phe-Pip-Arg-ANBS-	Boc-D-Phe-Pip-OH	6, 7a
	isopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
46	H-D-Glu-Gly-Leu-Arg-	Boc-D-Glu(OBzl)-Gly-Leu-OH	6, 7c
	ANBS-isopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-isopropylamid x 2HCl	
47	H-D-Glu-Gly-Leu-Lys-ANBS-	Boc-D-Glu(OBzl)-Gly-Leu-OH	6, 7c
25	isopropylamid x 2HCl	H-Lys(Z)-ANBS-isopropylamid x HCl	

48	Bz-Ile-Asp-Ala-Arg- ANBS-n-butylamid x HCl	Bz-Ile-Asp(OtBu)-OH	6, 7a
49	H-D-Phe-Tyr-Arg-ANBS t-butylamid x 2HCl	H-Ala-Arg-ANBS-n-butylamid x 2HCl Boc-D-Phe-Tyr-OH	6, 7a
50	H-D-Leu-Val-Gly-Lys- ANBS-isobutylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-t-butylamid x 2HCl Boc-D-Leu-Val-Gly-OH	6, 7b
51	H-D-Phe-Ser(OBzl)- Orn-ANBS-n-pentylamid x 2HCl	H-Lys(Z)-ANBS-isobutylamid x HCl Boc-D-Phe-Ser(OBzl)-OH	6, 7b
52	H-D-Phe-Pro-His-ANBS- neopentylamid x 2 HCl	H-Orn(Z)-ANBS-n-pentylamid x HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7b
53	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- neopentylamid x 2HCl	H-His(ZTE)-ANBS-neopentylamid x HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
54	H-D-Val-Leu-Lys-ANBS- neopentylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-neopentylamid x 2HCl Boc-D-Val-Leu-OH	6, 7a
55	Z-D-Val-Leu-Arg-ANBS- neopentylamid x HCl	H-Lys(Z)-ANBS-neopentylamid x HCl Z-D-Val-Leu-OH	6
56	H-D-Phe-His(ZTE)-Arg- ANBS-neopentylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-neopentylamid x 2HCl Boc-D-Phe-His(ZTE)-OH	6, 7a
57	H-D-Pro-Phe-Arg- ANBS- neopentylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-neopentylamid x 2HCl Boc-D-Pro-Phe-OH	6, 7a
58	Tos-Val-Pro-Arg-ANBS- n-hexylamid x HCl	H-Arg-ANBS-neopentylamid x 2HCl Tos-Val-Pro-OH	6
59	Tos-Gly-Val-Orn-ANBS- n-octylamid x HCl	H-Arg-ANBS-n-hexylamid x 2HCl Tos-Gly-Val-OH	6, 7b
60	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-	H-Orn(Z)-ANBS-n-octylamid x HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a

61	n-decylamid x 2 HCl	H-Arg-ANBS- n-decylamid x 2HCl	6, 7a
62	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- benzylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6
63	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS- benzylamid x HCl	Tos-Gly-Pro-OH H-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6
64	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS benzylamid x HCl	Z-D-Leu-Gly-OH H-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6
65	Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg- ANBS-benzylamid x HCl	Bz-Ile-Glu(OMe)-OH H-Gly-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6
66	Pyr-Gly-Arg-ANBS- benzylamid x HCl	Pyr-Gly-OH H-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6
67	H-D-Pro-Phe-Arg-ANBS- benzylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6, 7a
68	Bz-Ile-Asp-Gly-Arg-ANBS- benzylamid x HCl	Bz-Ile-Asp(OtBu)-OH H-Gly-Arg-ANBS-benzylamid x 2HCl	6, 7a
69	H-Gly-Val-Orn-ANBS- benzylamid x 2HCl	Z-Gly-Val-OH H-Orn(Z)-ANBS-benzylamid x HCl	6, 7b
70	Ac-Phe-Glu(OtBu)-Arg-ANBS- phenethylamid x HCl	Ac-Phe-Glu(OtBu)-OH H-Arg-ANBS-phenethylamid x 2HCl	6
71	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- phenethylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-phenethylamid x 2HCl	6, 7a
72	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- phenethylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-phenethylamid x 2HCl	6, 7a
25	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS- cyclopentylamid x HCl	Tos-Gly-Pro-OH H-Arg-ANBS-cyclopentylamid x 2HCl	6

73	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-cyclohexylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a	
74	Ac-Phe-Glu(OtBu)-Arg-ANBS-cyclohexylamid x HCl	H-Arg-ANBS-cyclohexylamid x 2HCl Ac-Phe-Glu(OtBu)-OH	6	
5	75	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-diethylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
76	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS-diisopropylamid x HCl	H-Arg-ANBS-diethylamid x 2HCl Tos-Gly-Pro-OH	6	
77	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-diisopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-diisopropylamid x 2HCl	6, 7a	
10	78	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-dicyclohexylamid x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
79	H-D-Phe-His(ZTE)-Arg-ANBS-dimethylaminoethylamid x 3HCl	H-Arg-ANBS-dicyclohexylamid x 2HCl Boc-D-Phe-His(ZTE)-OH	6, 7a	
15	80	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-dimethylaminoethylamid x 3HCl	H-Arg-ANBS-dimethylaminoethylamid x 3HCl	6, 7a
20	81	Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg-ANBS-dimethylaminoethylamid x 3HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH + H-Arg-ANBS-dimethylaminoethylamid x 3HCl Bz-Ile-Glu(OMe)-OH	6
82	H-D-Phe-Pro-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	H-Gly-Arg-ANBS-dimethylaminoethylamid x 3HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a	
83	Ac-Phe-Glu(OtBu)-Arg-2-methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl Ac-Phe-Glu(OtBu)-OH	6	
25	84	Z-D-Leu-Gly-Arg-2-methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl Z-D-Leu-Gly-OH	6

85	5	pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS-	Tos-Gly-Pro-OH	
		2-methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
86		Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg-	Bz-Ile-Glu(OMe)-OH	
	5	2-methoxy-pNA xHCl	H-Gly-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		Z-D-Val-Leu-Arg-2-	Z-D-Val-Leu-OH	
87		methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		H-D-Val-Leu-Arg-2-	Z-D-Val-Leu-OH	6, 7b
88		methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
	10	Pyr-Gly-Arg-2-	Pyr-Gly-OH	
		methoxy-pNA x CH1	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6, 7a
89		H-D-Pro-Phe-Arg-2-	Boc-D-Pro-Phe-OH	
		methoxy-pNA x 2HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA- 2HCl	6
90		Boc-D-Lys (Z)-Gly-Arg-	Boc-D-Lys (Z)-Gly-OH	
	15	2-methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		H-D-Lys (Z)-Gly-Arg-	Boc-D-Lys (Z)-Gly-OH	6, 7a
91		2-methoxy-pNA x 2HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		Boc-D-Lys (Z)-Gly-Gly-Arg-	Boc-D-Lys (Z)-Gly-OH	
92		2-methoxy-pNA x HCl	H-Gly-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
	20	Bz-Ile-Asp-Ala-Arg-2-	Bz-Ile-Asp(OtBu)-OH	6, 7a
		methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
93		H-D-Thr-Ala-Thr-Arg-	Boc-D-Thr-Ala-Thr-OH	
	25	2-methoxy-pNA x 2HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-	Boc-Leu-Ser-Thr-OH	
94		2-methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6
		2-methoxy-pNA x HCl	H-Arg-2-methoxy-pNA x 2HCl	6

97	H-D-Phe-Pro-Arg-2-butoxy- pNA x 2HCl	Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
98	Pyr-Gly-Arg-2-butoxy- pNA x HCl	H-Arg-2-butoxy-pNA x 2HCl Pyr-Gly-OH	6
5	99	Z-D-Leu-Gly-Arg-2- butoxy-pNA x HCl	6
100	H-D-Val-Leu-Arg-2- butoxy-pNA x 2HCl	H-Arg-2-butoxy-pNA x 2HCl Z-D-Val-Leu-OH	6, 7b
101	H-D-Lys (Z)-Gly-Arg- 2-butoxy-pNA x 2HCl	H-Arg-2-butoxy-pNAx 2HCl Boc-D-Lys (Z)-Gly-OH	6, 7a
10	102	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS- Gly-methylester x HCl	6
103	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- Gly-ethylester x 2HCl	H-Arg-2-butoxy-pNA x 2HCl Tos-Gly-Pro-OH	6, 7a
15	104	Pyr-Gly-Arg-ANBS-Ala- methylester x HCl	6
105	Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-ANBS- Ala-methylester x HCl	H-Arg-ANBS-Gly-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
106	H-D-Lys (Z)-Gly-Arg-ANBS- β -Ala-ethylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-Gly-methylester x 2HCl Pyr-Gly-OH	6
20	107	Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS-Ala- ethylester x HCl	6
108	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- γ -But-ethylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-Ala-methylester x 2HCl Boc-Leu-Ser-Thr-OH	6, 7a
25	109	H-D-Tyr-His (ZTE)-Arg- pNA x 2HCl	6, 7a

110	ANBS-γ-But-ethylester x 2HCl H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Val-methylester x 2HCl Pyr-Gly-Arg-ANBS-Val-methylester x HCl Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS-Leu-methylester x HCl H-D-Thr-Ala-Thr-Arg-ANBS-Ile-methylester x 2HCl H-D-Val-Lys-Val-Arg-ANBS-Ile-methylester x 3HCl H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Ile-methylester x 2HCl H-D-Phe-Tyr-Arg-ANBS-Pro-methylester x 2HCl Ac-Gln(Ddm)-Leu-Gly-Arg-ANBS-Phe-methylester x HCl H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Lys(Z)-methylester x 2HCl Boc-D-Lys(Z)-Gly-Arg-ANBS-Lys(Z)-methylester x HCl H-D-Lys(Z)-Gly-Arg-ANBS-Lys(Z)-methylester x 2HCl H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Ser-methylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-γ-But-ethylester x 2HCl Boc-Arg-ANBS-γ-But-ethylester x 2HCl H-Arg-ANBS-Val-methylester x 2HCl Pyr-Gly-OH H-Arg-ANBS-Val-methylester x 2HCl Z-D-Leu-Gly-OH H-Arg-ANBS-Leu-methylester x 2HCl Boc-D-Thr-Ala-Thr-OH H-Arg-ANBS-Ile-methylester x 2HCl Z-D-Val-Lys(Z)-Val-OH H-Arg-ANBS-Ile-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-Ile-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Tyr-OH H-Arg-ANBS-Pro-methylester x 2HCl Hc-Gln(Ddm)-Leu-Gly-OH H-Arg-ANBS-Phe-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-Lys(Z)-methylester x 2HCl Boc-D-Lys(Z)-Gly-OH H-Arg-ANBS-Lys(Z)-methylester x 2HCl Boc-D-Lys(Z)-Gly-OH H-Arg-ANBS-Lys(Z)-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH H-Arg-ANBS-Ser-methylester x 2HCl	6, 7a 6 6 6, 7a 6, 7b 6, 7a 6, 7a 6 6, 7a 6 6, 7a 6 6, 7a 6 6, 7a 6, 7a
111			
112			
113			
114			
115			
116			
117			
118			
119			
120			
121			
122			

122	H-D-Ala-Gly-Arg-ANBS-Thr-methylester x 2HCl	Boc-D-Ala-Gly-OH	6, 7a
123	H-D-Tyr-His(ZTE)-Arg-ANBS-Tyr-methylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-Thr-methylester x 2HCl Boc-D-Tyr-His(ZTE)-OH	6, 7a
5	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Arg-methylester x 3HCl	H-Arg-ANBS-Tyr-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7c
125	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Glu-methylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-Arg(NO ₂)-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
126	H-D-Val-Leu-Lys-ANBS-Asp-methylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-Glu-methylester x 2HCl Z-D-Val-Leu-OH	6, 7b
10	Pyr-Gly-Arg-ANBS-Cys-methylester x HCl	H-Lys(Z)-ANBS-Asp-methylester x HCl Pyr-Gly-OH	6
128	H-D-Pro-Phe-Arg-ANBS-Met-methylester x 2HCl	H-Arg-ANBS-Cys-methylester x 2HCl Boc-D-Pro-Phe-OH	6, 7a
15	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Ala-isopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-Met-methylester x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7a
130	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS-Ile-methylamid x HCl	H-Arg-ANBS-Ala-isopropylamid x 2HCl Z-D-Leu-Gly-OH	6
131	H-D-Val-Tyr(OBzl)-Arg-ANBS-Ile-diisopropylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-Ile-methylamid x 2HCl Boc-D-Val-Tyr(OBzl)-OH	6, 7a
20	H-Gly-Val-Arg-ANBS-Ile-dicyclohexylamid x 2HCl	H-Arg-ANBS-Ile-diisopropylamid x 2HCl Z-Gly-Val-OH	6, 7b
133	H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Arg-isopropylamid x 3HCl	H-Arg-ANBS-Ile-dicyclohexylamid x 2HCl Boc-D-Phe-Pro-OH	6, 7c
25	H-D-Phe-Pip-Arg-ANBS-Arg-isopropylamid x 3HCl	H-Arg-ANBS-Arg(NO ₂)-isopropylamid x 2HCl Boc-D-Phe-Pip-OH H-Arg-ANBS-Arg(NO ₂)-isopropylamid x 2HCl	6, 7c

Nedenfor følger eksempler på anvendelsen af de nye forbindelser til enzym- og inhibitorbestemmelser.

Eksempel 1

5 Thrombinbestemmelse

Substrat: H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-neopentylamid

Prøveblanding: 20 μ l af et med fysiologisk NaCl i forvejen 1:51 fortyndet plasma inkuberes med 500 μ l aktive-ringsreagens (se nedenfor) i 4 minutter ved 37°C. Derpå
10 tilsættes 100 μ l substratopløsning (3 mmol/liter), og $\Delta E/\text{min}$ bestemmes fotometrisk ved 405 nm. Som norm anvendes en referencekurve med standardhumanplasma.

Aktiveringsreagens: PTT-Reagens (reagens til bestemmelse af den partielle thrombintid) fra Behringwerke opløses
15 efter forskriften i destilleret vand og fortyndes i forholdet 1:4 med en opløsning, der indeholder 50 $\mu\text{g/ml}$ RVV (Russel-viper venom, Sigma), 50 mmol/liter Tris, 7b mmol/liter NaCl, 7,5 mmol/liter Ca^{2+} og 0,1 g/100 ml humanalbumin.

20 Eksempel 2

Antithrombin III-bestemmelse

Substrat: H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Ile-methylester

Prøveblanding: 50 μ l af et i forholdet 1:51 med fysiologisk NaCl i forvejen fortyndet plasma forinkuberes med
25 1,0 ml af en human- α -thrombinopløsning (0,3 IE/ml, 100 mmol/liter Tris, 100 mmol/liter NaCl, pH 8,2) i 5 minutter ved 37°C. Derpå tilsættes 100 μ l substratopløsning (2 mmol/liter), og $\Delta E/\text{min}$ bestemmes fotometrisk ved 405 nm.

Som norm anvendes en referencekurve med standardhuman-
30 plasma.

Eksempel 3

Plasminogenbestemmelse

Substrat: H-D-Val-Leu-Lys-ANBS-methylester

35 Prøveblanding: 20 μ l plasma inkuberes med 1,0 ml streptokinasereagens (1000 Fibr E/ml, 100 mmol/liter KH_2PO_4 ,

100 mmol/liter NaCl, pH = 7,2) i 10 minutter ved 37°C. Derpå tilsættes 100 µl substratreagens (3 mmol/liter), og ΔE/min bestemmes fotometrisk ved 405 nm.

Som norm anvendes en referencekurve med standardhuman-
5 plasma.

Eksempel 4

α₂-Antiplasminbestemmelse

Substra: H-D-Val-Leu-Lys-ANBS-methylamid

10 Prøveblanding: a) 20µl plasma forinkuberes med 1,0 ml plasmin(human)-reagens (0,1 CTA-E/ml, 100 mmol/liter KH₂PO₄, 150 mmol/liter NaCl, 25% glycerol, pH = 7,2) i 1 minut ved 37°C. Derpå tilsættes 100 µl substratreagens (3 mmol/liter), og ΔE/min bestemmes fotometrisk ved 405 nm. Som
15 norm anvendes en referencekurve med standardhumanplasma.

b) 20 µl plasma blandes ved 37°C med 1,0 ml substratreagens (0,3 mmol/liter, 100 mmol/liter KH₂PO₄, 150 mmol/liter NaCl, pH = 7,2) og 100 µl plasminreagens (1 CTA-E/ml, 25-50% glycerol, 2 mmol/liter HCl, pH = 2,5). Efter 1 minut
20 bestemmes ΔE/min.

Som norm anvendes en referencekurve med standardhuman-
plasma.

Eksempel 5

Faktor Xa-bestemmelse

Substrat: Z-D-Leu-Gly-Arg-2-methoxy-pNA.

Prøveblanding: 20 µl plasma forinkuberes med 1 ml aktiveringsreagens ved 37°C i 1 minut. Derpå tilsættes 100 µl substratreagens (3 mmol/liter), og ΔE/min bestemmes.

30 Som norm anvendes en referencekurve med standardhuman-
plasma.

Aktiveringsreagens: 25 µg RVV/ml (Russelviper venom, Sigma), 50 mmol/liter Tris, 25 mmol/liter CaCl₂, 200 mmol/liter NaCl, pH = 8,3.

Eksempel 6**Prekallikreinbestemmelse**

Substrat: H-D-Pro-Phe-Arg-ANBS-isopropylamid

Prøveblanding: 10 μ l plasma inkuberes med 1 ml aktiveringsreagens i 1 minut ved 37°C. Derpå tilsættes 100 μ l substratreagens (3 mmol/liter), og $\Delta E/\text{min}$ bestemmes. Som norm anvendes en referencekurve med standardhumanplasma.

Aktiveringsreagens: Optisk klar PTT-reagens fra Behringwerke opløses efter forskriften i destilleret vand og fortyndes i forholdet 1:6 med destilleret vand. En yderligere fortynding i forholdet 1:9 sker med 50 mmol/liter Tris, 12 mmol/liter NaCl, pH = 7,8.

Eksempel 7**15 Urokinasebestemmelse**

Substrat: Pyr-Gly-Arg-ANBS-benzylamid

Prøveblanding: Til 10 μ l urokinase (100-3000 IE/ml sættes ved 37°C 1 ml triethanolaminpuffer (0,1 mol/liter TEA, 0,2 mmol/liter NaCl, pH = 8,4) og 1 ml substratreagens (2 mmol/liter), og derpå bestemmes $\Delta E/\text{min}$.

Anvendes ved hjælp af en referencekurve.

Urokinasebestemmelse i urin

Til 500 μ l urin sættes ved 37°C 500 μ l triethanolaminpuffer (0,5 mmol/liter TEA, 1 mol/liter NaCl, pH = 8,4) og 0,1 ml substratreagens (2 mmol/liter), og $\Delta E/\text{min}$ bestemmes. Anvendes ved hjælp af en referencekurve.

Eksempel 8**30 Cl-inaktivator-bestemmelse**

Substrat: H-D-Val-Leu-Arg-2-butoxy-pNA

Prøveblanding: 20 μ l plasma inkuberes i 15 minutter ved 30°C med 1 ml Cl-esterasereagens (10 mE/ml, 100 mmol/liter NaH_2PO_4 , 0,05% NaN_3 , 0,2% "Haemaccel[®]", pH = 7,5). Derpå tilsættes 100 μ l substratreagens (6 mmol/liter), og $\Delta E/\text{min}$ bestemmes fotometrisk ved 405 nm. Som norm anvendes en re-

ferencekurve med standardhumanplasma.

Nedenstående tabeller II-IX viser resultater af enzymatiske målinger. Disse viser især fordelene ved de nye forbindelser i forhold til de kendte forbindelser.

5 Koncentrationsangivelserne for enzymerne refererer til stamopløsningerne, der anvendes. Disse stamopløsninger fortyndes ved prøven i forholdet 1:10 med puffer. Pufferens pH-værdi ligger ved det tilsvarende enzyms aktivitetsoptimum.

10 Alle anvendte enzymer med undtagelse af trypsin er præparater fra Behringwerke AG. Trypsin stammer fra SERVA. Aktivator er 1:1-komplekset mellem humanplasminogen og streptokinase.

15

20

25

30

35

Tabel II

Enzymsubstraters specificitetsændring afhængigt af størrelsen af substituenten R i formelen I i eksemplet med H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-ester i Δ OD/min ved 405 nm

Syntetiske substrater 3,0 mmol/- x 2 HCl liter	Thrombin 6 IE/ml	Plasmin 2CTA/ml	Kallikrein 0,85BAEE/ml	Urokinase 5000IE/ml	Trypsin 1,4γ/ml
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-					
-methylester	0,335	0,200	0,230	0,090	0,160
-ethylester	0,360	0,180	0,180	0,070	0,110
-isopropylester	0,355	0,130	0,110	0,050	0,090
-n-butylester	0,365	0,100	0,095	0,050	0,080
-penty(2)ester	0,345	0,080	0,060	0,030	0,050
-benzylester	0,350	0,025	0,035	0,015	0,035

Medens de forskellige Peptid-ANBS-esteres sensibilitet over for thrombin forbliver den samme og ligger i en til enzymatiske målinger brugbar størrelsesorden, stiger de enkelte enzymsubstraters specificitet tydeligt med størrelsen af alkoholgruppen.

Table III

Sammenligning af spaltningshastighederne for forskellige thrombinsubstrater efter kontaktfaseaktivering af menneskelig citratplasma i Δ OD/min ved 405 nm. Der sammenlignes med spaltning med thrombin.

Syntetiske substrater x 2 HCl	Plasma efter kontaktfase-	Thrombin
3 mmol/liter	aktivering 10 μ l	6 IE/ml
Kendte substrater for thrombin:		
H-D-CHA-But-Arg-pNA	0,325	0,300
H-D-Phe-Pro-Arg-pNA	0,100	0,350
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	0,090	0,350
Substrater ifølge opfindelsen for thrombin:		
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-isopropylamid	0,037	0,350
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS- γ -But-ethylester	0,028	0,360

Dersom menneskecitratplasma aktiveres uden tilstedeværelse af phospholipid og calcium med dekstransulfat, aktiveres ifølge kendt teknik kun proteaserne faktor XII, faktor XI samt plasma-kallikrein. Hvis man i dette analysesystem sammenligner thrombinsubstrater på markedet med substraterne ifølge opfindelsen for thrombin, viser det sig, at de kendte substrater spaltes flere gange hurtigere end de nye substrater.

0

Tabellerne IV-IX viser en sammenligning af spaltnings-
hastighederne af kendte substrater og nogle forbindelser ifølge
opfindelsen ved hjælp af forskellige proteolytiske enzymer. Af disse
tabeller ses klart, hvor overlegne enzymsubstraterne ifølge op-
5 findelsen er. Således er det enkelte substrats sensibilitet over
for et bestemt enzym tilstrækkelig og af samme størrelsesorden
som for kendte substrater. De her omhandlede forbindelsers uføl-
somhed over for andre proteaser, der ligeledes kan forekomme i
plasma, stiger alt efter substituentens art og størrelse i pep-
10 tid-ANBS-derivaterne. På den måde reduceres målefejl ved anvendelse
af de nye forbindelser til enzymatiske prøver, eller de und-
gås endog.

15

20

25

30

35

Table IV

Spaltningshastigheder for nogle thrombinsubstrater ifølge opfindelsen
i Δ OD/min ved 405 nm sammenlignet med kendte substrater

3 mmol/liter	Aktivator 2700FE/ml	Thrombin 6IE/ml	Plasmin 2CTA/ml	Kallikrein 0,85BAEE/ml	F XII a 3,6IE/ml
Kendte substrater for thrombin:					
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	0,260	0,430	0,460	0,240	0,180
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	0,105	0,350	0,110	0,210	0,063
H-D-Phe-Pro-Arg-pNA	0,115	0,350	0,230	0,220	0,068
H-D-CHA-But-Arg-pNA	0,140	0,300	0,300	0,680	0,100

Tabel IV (fortsat)

Substrater ifølge opfindelsen for thrombin:						
H-D-Phe-Pro-Arg-2-methoxy-pNA	0,090	0,340	0,130	0,075	0,160	
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-ethylster	0,180	0,360	0,180	0,180	0,030	
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-isopropylamid	0,090	0,350	0,045	0,020	0,012	
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Ile-O-CH ₃	0,060	0,360	0,040	0,030	0,011	
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-dimethylamino-propylamid	0,070	0,345	0,020	0,015	0,010	
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBS-Ala-isopropylamid	0,045	0,325	0,030	0,020	0,005	
Tos-Gly-Pro-Arg-ANBS-isopropylamid	0,090	0,320	0,120	0,040	0,020	

Tabel V

Spaltningshastigheder for nogle substrater ifølge opfindelsen for kallikrein
i Δ OD/min ved 405 nm sammenlignet med kendte substrater

Syntetiske substrater 3 mmol/liter	Aktivator 2700FE/ml	Plasmin 2CTA/ml	Kallikrein 0,85BAEE/ml	F XII A 3,6 E/ml	α -Chymotrypsin 2 mg/ml
Kendte substrater for kallikrein: H-D-Pro-Phe-Arg-pNA Bz-Pro-Phe-Arg-pNA	0,980 0,110	0,345 0,055	1,46 0,450	0,570 0	0,040 0,010
Substrater ifølge op- findelsen for kallikrein: H-D-Pro-Phe-Arg-2- methoxy-pNA	0,480	0,125	1,00	0,186	0,010
H-D-Pro-Phe-Arg- ANBS-ethylster	0,380	0,145	1,20	0,200	0,030
H-D-Pro-Phe-Arg- ANBS-neopentylamid	0,010	0,020	0,35	0,040	0,010

5

10

15

20

Tabel VI

Spaltningshastigheder for nogle substrater ifølge opfindelsen for urokinase i Δ OD/min ved 405 nm sammenlignet med kendte substrater

Syntetiske substrater	Aktivator	Urokinase	C1-Esterase	Trypsin	α -Chymotrypsin
3 mmol/liter	2700FE/ml	5000IE/ml	160 E/ml	1,4 γ /ml	2 mg/ml
kendte substrater for urokinase:					
Pyr-Gly-Arg-pNA	0,115	0,175	0,080	0,255	0,230
Substrater ifølge opfindelsen for urokinase:					
Pyr-Gly-Arg-2-methoxy-pNA	0,110	0,205	0,065	0,090	0,040
Pyr-Gly-Arg-ANBS-isopropylamid	0,035	0,125	0,012	0,035	0,060
Pyr-Gly-Arg-ANBS-benzylamid	0,040	0,125	0,010	0,025	0,055
Pyr-Gly-Arg-ANBS-n-butylester	0,070	0,165	0,015	0,220	0,095

Tabel VII.

Spaltningshastigheder for nogle substrater ifølge opfindelsen for plasmin i Δ OD/min ved 405 nm sammenlignet med kendte substrater.

Syntetiske substrater 3,0 mmol/liter	Plasmin 2CTA/ml	Aktivator 2700FE/ml	Kallikrein 0,85BAEE/ml
Kendte substrater for plasmin:			
H-D-Val-Leu-Lys-PNA	0,180	0,320	0,060
H-D-Phe-Tyr-Arg-PNA	0,430	0,950	0,590
H-D-Phe-Tyr-Lys-PNA	0,210	0,350	0,100
Substrater ifølge opfindelsen for plasmin:			
H-D-Phe-Tyr-Lys-ANBS-isopropylamid	0,165	0,155	0,010
H-D-Val-Leu-Lys-ANBS-isopropylamid	0,270	0,100	0,005

20

Alle de i denne tabel nævnte substrater spaltes ikke af thrombin og faktor XII a.

Tabel VIII

Spaltningshastigheder for nogle substrater ifølge opfindelsen for faktor X a i Δ OD/min ved 405 nm sammenlignet med kendte substrater.

	Syntetiske substrater 3 mmol/liter	Plasmin 2CTA/ml	F X a 0,2E/ml	Kallikrein 0,85BAEE/ml	Urokinase 5000IE/ml	Trypsin 1,4Y/ml
5	Kendte substrater for faktor X a: Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly- Arg-pNA	0,020	0,110	0,015	0,035	0,140
10	Z-D-Leu-Gly-Arg-pNA Substrater ifølge opfindelsen for faktor X a:	0,210	0,250	0,148	0,178	0,093
15	Z-D-Leu-Gly-Arg-2-methoxy-pNA Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBS-methylamid	0,162	0,410	0,067	0,108	0,048
20	Bz-Ile-Glu(OMe)-Gly-Arg-ANBS-methylamid	0,057	0,151	0,050	0,082	0,069
		0,001	0,085	0,001	0,080	0,040

Tabel IX

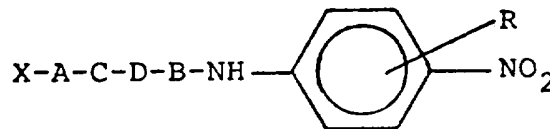
Spaltningshastighed for nogle substrater ifølge opfindelsen for Cl-esterase i Δ OD/min ved 405 nm.

Syntetiske substrater 3 mmol/liter	Cl-Esterase 160 E/ml
Boc-Lys (Z) - Gly-Arg-2-methoxy-pNA	0,34
H-Lys (Z) - Gly-Arg-2-methoxy-pNA	0,38
H-Lys (Z) - Gly-Arg-2-butoxy-pNA	0,74
H-Lys (Z) - Gly-Gly-Arg-2-methoxy-pNA	0,25
H-D-Val-Leu-Arg-2-methoxy-pNA	0,54
H-D-Val-Leu-Arg-2-butoxy-pNA	0,97

P a t e n t k r a v :

1. Chromogene forbindelser, k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel II

5



(II)

10 hvor

X er et hydrogenatom, benzyloxycarbonyl, tert.butyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl, methylsulfonethyloxycarbonyl eller 9-fluorenylmethyloxycarbonyl eller en gruppe R₄-CO, hvor R₄ er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-6 carbonatomer, der eventuelt er substitueret med 1-3 halogenatomer, eller en (alk)arylgruppe med 6-10 carbonatomer, eller X er en benzensulfonylgruppe eller en alkarylsulfonylgruppe med 7-10 carbonatomer, mesyl, methoxybensensulfonyl, succinoyl eller maleoyl,

20 A er en aminosyre valgt blandt Ala, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Pyr, Thr, Tyr og Val,

C er en binding eller en aminosyre valgt blandt Ala, Asp, Glu, Gly, Leu, Lys, Ser og Val,

25 D er en aminosyre valgt blandt Ala, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Phe, Pip, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val,

B er arginin, homoarginin, lysin, homolysin, ornithin eller histidin, og

R er COOR₁, CONR₂R₃, CONH-(CH₂)_n-N(CH₃)₂, CO-Y-OR₁ og CO-Y-NR₂R₃ i 3-stilling eller OR₁ i 2-stilling i 4-nitroanilinet,

30 hvor

R₁ er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-6 carbonatomer, en aromatisk carbonhydridgruppe med 6-10 carbonatomer, en aralifatisk carbonhydridgruppe med 7-11 carbonatomer eller en alicyclisk carbonhydridgruppe med 3-8 carbonatomer,

35 R₂ er et hydrogenatom eller en under R₁ defineret gruppe,

R₃ er en alifatisk carbonhydridgruppe med 1-10 carbonatomer,

en aromatisk carbonhydridgruppe med 6 eller 10 carbonatomer,
 en araliphatisk carbonhydridgruppe med 7-11 carbonatomer
 eller en alicyclisk carbonhydridgruppe med 3-8 carbonatomer,
 Y er en α -, β - eller γ -aminosyre valgt blandt Ala, Asn,
 5 Asp, β -Ala, γ -But, Cys, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Arg,
 Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val, og
 n er 1-10,
 samt syreadditionssalte heraf.

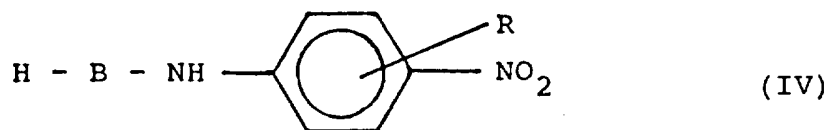
2. Forbindelser ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
 10 ved, at X er formyl, acetyl, benzoyl, trifluoracetyl, toluen-
 sulfonyl, mesyl, methoxybenzensulfonyl, succinoyl eller
 maleoyl.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser
 ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at et peptid-
 15 derivat med den almene formel III



hvor X, A, C og D har den i krav 1 anførte betydning, idet
 20 X dog ikke er et hydrogenatom, og yderligere funktionelle
 grupper i aminosyresidekæderne er substitueret med beskyttel-
 sesgrupper, kondenseres med et aminosyrederivat med den
 almene formel IV

25



hvor B har den i krav 1 anførte betydning, idet dog yder-
 30 ligere funktionelle grupper i aminosyrens sidekæde er sub-
 stitueret med beskyttelsesgrupper, og R har den i krav 1
 anførte betydning, hvorefter forekommende beskyttelsesgrupper
 eventuelt fraspaltes.

4. Anvendelse af forbindelser ifølge krav 1-2 til
 35 påvisning og bestemmelse af et enzym.