



F.C. 5 - XI - 75

414251

cofc

PATENTE DE INVENCION

que por 20 años, para España y sus Posesiones, se solicita a favor de AKTIE BOLAGET BOFORS, de nacionalidad sueca, domiciliada en BOFORS (Suecia), por: "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN NUEVO SUBSTRATO PARA USO DIAGNOSTICO, ALTAMENTE SENSIBLE A LA TRIPSINA Y OTRAS ENZIMAS PROTEOLITICAS DEL TIPO PEPTIDO PEPTIDOHIDROLASAS".

Memoria descriptiva

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nuevos substratos para uso diagnóstico, altamente sensibles a las enzimas proteolíticas del tipo péptido péptidohidrolasas. Los substratos según la invención están destinados para la determinación cuantitativa de enzimas clasificadas y hasta aquí sin clasificar del tipo E.C. 3.4.4., especialmente las que descomponen los péptidos o las proteínas en la cadena péptido en el lado carboxílico de la arginina o lisina, por ejemplo la tripsina, trombina, plasmina, Reptilasa (R) de Pentapharm, de Basilea, Suiza, Arvine (R) de Ferring AB, Malmö, Suecia, y las enzimas hasta aquí sin clasificar Brinase (R) de AB Astra, Södertälje, Suecia. Los substratos pueden además ser usados para el estudio de reaccio-

10



nes en las cuales tales enzimas son formadas, inhibidas o consumidas, así como para la determinación de factores que afectan o participan en dichas reacciones, por ejemplo la determinación de proenzimas, activadores, anti-enzimas e inhibidores de enzimas.

15 Para la clasificación de las enzimas se usó la Nomenclatura de Enzimas recomendada por la Unión Internacional de Bioquímica Elsevier, Amsterdam, 1965.

Los compuestos (substratos) previamente usados para la determinación cuantitativa de las enzimas mencionadas anteriormente están descritos en  
20 los "Methoden der enzymatischen Analyse", tomo I, pág. 1023 (Ed. Bergmeyer, H.U., Verlag Chemie, 1970). Según la reacción catalítica de las enzimas proteolíticas que tiene lugar - la esterolítica o la amidolítica - estos substratos sintéticos pueden ser divididos en principio en dos grupos principales : los substratos de éster y los substratos de amida. El grupo más  
25 grande de substratos sintéticos previamente usados es el de los substratos de éster. Esto depende del hecho de que éstos son convertidos mucho más rápidamente por las péptido péptidohidrolasas que los substratos de amida hasta aquí producidos. Sin embargo, la principal función biológica de las enzimas clasificadas como péptido péptidohidrolasas es evidente por su nombre :  
30 la de hidrolizar los enlaces péptido o amida, pero no los enlaces éster, de substratos naturales. En la literatura (Blood Clotting Enzymology, págs. 36 y 42 - 44, Ed. Seegers W.H., Academic Press, 1967) se dice que la relación entre las velocidades de reacción de las catálisis esterolítica y amidolítica de la trombina no es constante en condiciones distintas de reacción.  
35 Por esta razón, los substratos de amida sintéticos, que tienen una sensibilidad mucho mayor a las enzimas en cuestión, y que pueden también ser descompuestos más rápidamente en productos mensurables que los conocidos hasta aquí, han sido deseables.

Para estudiar y seguir el desarrollo de la reacción de la hidrólisis  
40 enzimática, los substratos de amida son particularmente adecuados, ya que

414251



pueden proporcionar :

- a) productos cromofóricos fáciles de medir espectrofotométricamente y que tienen unos máximos de absorción de luz que no coinciden con los de los substratos de amida originales;
- 45 b) productos fluorescentes que pueden ser medidos mediante la espectrofotometría de fluorescencia;
- c) productos que, acoplados con un adecuado reactivo, dan origen a productos copuladores que pueden ser medidos fotométricamente con gran sensibilidad.

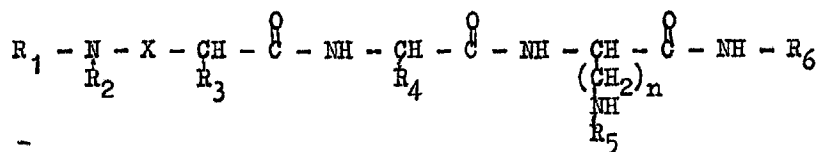
50 Se han empezado a usar algunos substratos de amida sintéticos con grupos promofóricos hidrolizables. Se trata en primer lugar de los tipos de los derivados de mono-aminoácido-p-nitroanilida sin sustituir en N<sup>alfa</sup> y sustituidos en N<sup>alfa</sup> y de los derivados mono-aminoácido-beta-naftilamida. Entre estas sustancias puede mencionarse el clorhidrato de N<sup>alfa</sup>-benzoil-DL-arginina-p-nitro

55 anilida (BAPNA) como reactivo para la tripsina (E.C. 3.4.4.) y para las reacciones en las que participa la tripsina. La hidrólisis enzimática de este substrato produce el producto cromofórico p-nitroanilina, que puede ser medido fácilmente espectrofotométricamente.

Sin embargo, estos anteriores substratos de amida conocidos no poseen

60 la especificidad y la sensibilidad deseadas. Éste es un importante inconveniente que puede dar lugar a un procedimiento más complicado en la toma de muestras, porque entonces se necesitará una considerable cantidad de material biológico. Además, el tiempo de reacción enzimática es largo y la precisión de la determinación de enzima puede ser poco satisfactoria.

65 Los nuevos substratos del tipo amida según la invención que tienen una muy elevada sensibilidad a las péptido péptidohidrolasas están representados por la fórmula general siguiente :





o sus sales, donde  $R_1$  puede ser elegido entre hidrógeno, un acilo con 1 a 12 átomos de carbono, un omega-aminoacilo con 1 a 12 átomos de carbono, ciclohexilcarbonilo, un omega-ciclohexil-acilo, 4-aminometil-ciclohexilcarbonilo, benzofilo, un benzofilo sustituido por ejemplo con 1 o más átomos de halógeno, grupos metilo, amino o fenilo, etc., un omega-fenil-acilo con 1 a 6 átomos de carbono en la parte acilo y donde el grupo fenilo puede estar sustituido, bencensulfonilo y 4-toluen-sulfonilo.

$R_2$  puede ser elegido entre hidrógeno, fenilo y un alquilo con 1 - 6 átomos de carbono y ciclohexilo.

$X$  puede ser elegido entre un enlace de metileno y un enlace único.

$R_3$  puede ser elegido entre un grupo recto, ramificado o alquilo cíclico con 3 a 8 átomos de carbono.

$R_4$  puede ser elegido entre un grupo recto, ramificado o cíclico con 3 - 8 átomos de carbono, fenilo y bencilo.

$n$  puede ser elegido entre 2, 3 y 4.

$R_5$  puede ser elegido entre hidrógeno y guanilo.

$R_6$  puede ser elegido entre fenilo, nitrofenilo, metilnitrofenilo, dinitrofenilo, naftilo, nitronaftilo, quinolilo y nitroquinolilo.

Los nuevos substratos pueden ser producidos según dos métodos distintos :

1. El primer método se basa en la copulación del grupo cromofórico  $R_5$  con el aminoácido en cuestión, y luego una construcción gradual de la estructura péptido deseada mediante la gradual copulación de los aminoácidos restantes. El grupo cromofórico es usado aquí como grupo de bloqueo del grupo carboxilo que termina en C del primer aminoácido.

2. El otro método se basa en estructurar gradualmente la estructura péptido deseada y la sucesiva eliminación de los grupos de bloqueo usados, y en la copulación final del grupo cromofórico  $R_5$  con la estructura péptido.

En la síntesis gradual de los derivados péptido se han usado métodos de copulación que son bien conocidos y corrientemente usados en la química de los péptidos. Tales grupos conocidos de bloqueo usados corrientemente en la



química de los péptidos - como por ejemplo Cbo (carbобензоxi), MeOCbo (p-  
metoxycarbобензоxi)NO<sub>2</sub>Cbo (p-nitrocarbобензоxi), MCbo (p-metoxifenilazo-  
carbобензоxi), BOC (tercio-butiloxicarbonilo), TFA (trifluoroacetilo) o for-  
milo - son usados como grupos de bloqueo amino. El grupo alfa-carboxilo pue-  
105 de ser activado por conversión a una activación distinta de derivados bien  
conocidos y usados con frecuencia en la química de los péptidos, que pueden  
ser aislados o producidos "in situ", como por ejemplo el p-nitrofeniléster,  
triclorofeniléster, pentaclorofeniléster, N-hidrosuccinimidaéster, acida  
ácida, anhídrido ácido, que pueden ser simétricos o asimétricos. También pue-  
110 de ser activado con una carbodiimida, como por ejemplo la N,N'-diciclohexil  
carbodiimida. El grupo carboxilo que termina en C en el derivado péptidoamino  
o el derivado aminoácido pueden ser protegidos mediante esterificación en  
por ejemplo el éster metílico, etílico o isopropílico o por conversión en  
el derivado cromfórico de anilina, que actúa así como grupo de bloqueo du-  
115 rante la construcción de la cadena péptido. Los grupos funcionales libres  
que no intervienen en la reacción pueden ser protegidos durante la síntesis  
de los péptidos o de los derivados péptido, de la siguiente manera :

Para bloquear el grupo arginil-delta-guanido y el grupo lisil-épsilon-  
amino, se pueden usar los grupos de bloqueo amino corrientemente usados en  
120 la química de los péptidos, como por ejemplo NO<sub>2</sub>, Tos (p-toluensulfonilo),  
o sólo la protonización como protección para el grupo guanido, y Cbo (carbo  
benzoxi), BOC (tercio-butiloxicarbonilo) o también Tos para el grupo épsilon-  
amino. Como protección para el grupo hidroxilo de la tirosina, se pueden usar  
los grupos de bloqueo corrientemente usados en la química de los péptidos,  
125 como por ejemplo los grupos de protección bencilo y terciobutilo.

En la síntesis gradual de la estructura péptido, puede ejecutarse des-  
pués de cada copulación de un nuevo aminoácido una purificación sistemática  
mediante filtración con gel. Para dicha filtración con gel, se usa una co-  
luna llena de un material adecuado para la filtración de gel, por ejemplo  
130 un gel de dextrana con enlaces transversales del tipo Sephadex (R) G o LH



de la Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia. Otro gel adecuado se compone de copolímeros de acetato de vinilo, por ejemplo del tipo Merckogel (R) OR-PVA, de la A.G. E. Merck, de Darmstadt, Alemania Occidental. El material de gel es usado equilibrado con un adecuado disolvente y se ejecuta entonces una elución con el mismo disolvente, por ejemplo metanol, etanol, acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido o triamida hexametilfosfórica.

Se describirá más detalladamente la invención en los Ejemplos siguientes que describen la producción de diferentes substratos según la invención por síntesis escalonada. Sin embargo, dichos ejemplos no limitan el alcance de la invención.

Para el análisis cromatográfico en capa delgada del eluado y de los productos, se usaron placas de vidrio con gel de sílice (F 254 de la A.G. E. Merck, de Darmstadt, Alemania Occidental) como medio de absorción. Para el revelado de los cromatogramas en capa delgada, se usaron los sistemas de disolvente siguientes :

- A : n-butanol : ácido acético : agua (3:1:1)
- G : n-propanol : acetato de etilo : agua (7:1:2)
- D : n-heptano : n-butanol : ácido acético (3:2:1)
- P : cloroformo : metanol (9:1)

Después de cromatografiar en capa delgada, se revelaron las placas primero en luz UV (254 nm) y luego con la reacción cloro/toluidina (Ref.: G. Pataki: Dünnschichtchromatografie in der Aminosäure und Peptid-Chemie, Walter de Gruyter & Co., Berlín, 1966, pág. 125) como método de revelado.

A menos que se diga otra cosa, todos los aminoácidos usados tienen configuración en L y las abreviaturas tienen los significados siguientes :

- Ala = alanina
- Arg = arginina
- Ile = isoleucina
- Leu = leucina



Lys = lisina

Val = valina

Otras abreviaturas usadas en los Ejemplos :

- Ac = acetilo
- 165 Ac<sub>2</sub>O = anhídrido acético
- AcOH = ácido acético
- BOC = tercio-butiloxycarbonilo
- Bz = benzóilo
- Bzl = bencilo
- 170 Bz<sub>2</sub>O = anhídrido benzoico
- Cho = carbobenzoxi
- DCCI = dicitclohexilcarbodiimida
- DCHA = dicitclohexilamina
- DCU = dicitclohexilcarbamida
- 175 DMF = dimetilformamida
- Et<sub>3</sub>N = trietilamina
- HMPFA = N,N,N',N',N'',N''-hexametilfosfórica triamida
- MCbo = p-metoxifenilazocarbobenzoxi
- MeOH = metanol
- 180 NA = naftilamina
- OtB u = tercio-butiloxi
- OEt = etiloxi
- OMe = metiloxi
- OpNP = p-nitrofenoxi
- 185 OisoPr = iso-propiloxi
- pNA = p-nitroanilida
- TFA = trifluoroacetilo
- Tos = p-toluensulfonilo
- TLC = cromatografía en capa delgada
- 190 Los geles Sephadex (R) G-15 y G-25 usados para la filtración con gel



son ambos geles de dextrana con enlaces transversales de distinto grado de enlaces transversales de la Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia. El gel Sephadex (R) LH-20 es un gel de dextrana con enlaces transversales hidroxipropilado de la Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia.

195 Ejemplo I : H - Leu - Leu - Arg - pNA - 2 HCl (I)

Ejemplo Ia : Cbo - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA (Ia)

Se disuelven en 200 ml de HMPA recién destilada a temperatura ambiente 35,3 g (0,1 mol) de Cbo - Arg (NO<sub>2</sub>) - OH seco, después de lo cual se añaden agitando y en condiciones de completa sequedad 10,1 g (0,1 mol) de Et<sub>3</sub>N y 24,6 g (0,15 moles) de p-nitro-fenilisocianato. Después de dejarla reposar 24 horas a temperatura ambiente, se vierte la mezcla de reacción en 2 litros de una solución al 2% de bicarbonato sódico, agitando. El precipitado que se separa es filtrado y lavado tres veces con solución al 2% de bicarbonato sódico (0,5 litros), dos veces con 0,2 litros de agua destilada, dos veces con 0,5 litros de ácido clorhídrico 0,5 N y, por fin, cinco veces con 0,2 litros de agua destilada. Una vez seco, el producto bruto es suspendido en MeOH caliente. La parte insoluble, consistente en N,N<sup>1</sup>-bis-p-nitrofenil-carbamida, es separada por filtración. El filtrado es purificado por cromatografía de gel en una columna de Sephadex (R) LH-20, equilibrado con MeOH.

205 Rendimiento : 29,8 g (63,0%) de Ia, p.f. 185-188° C., homogéneo según TLC en P<sub>1</sub> y G, y  $\alpha_D^{24} = -1,30$  (c = 1,1; AcOH).

Ejemplo Ib : Cbo - Leu - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA (Ib)

215 Método de síntesis : Se disuelven 5,0 g (10,6 mmoles) de Ia en 21 ml de AcOH y 22 ml de HBr 4 N en AcOH en condiciones de completa sequedad. Se agita durante una hora la mezcla de reacción y se vierte lentamente a continuación en 200 ml de éter agitado vigorosamente, precipitando 1,5 HBr • H - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA. Se decanta la solución etérea y se trata otras tres veces el residuo granular con 100 ml de éter para eliminar el bromuro de bencilo y el exceso de HBr y AcOH. Después de secar en vacío



sobre  $P_2O_5$ , el rendimiento en sal bromhidrato del derivado aminoácido es cuantitativo (4,87 g). Se disuelven 4,87 g (10,6 mmoles) de 1,5 HBr.H - Arg ( $NO_2$ ) - pNA en 50 ml de DMF destilada. Se enfría la solución a  $-10^\circ C$ . y 1,6 g (15,9 mmoles) de  $Et_3N$  son añadidos para liberar la H - Arg ( $NO_2$ ) - pNA de su sal bromhidrato. Se hace reaccionar la mezcla durante una hora en condiciones de sequedad. Se separa por filtración el  $Et_3N \cdot HBr$  y se enfría el filtrado a  $-10^\circ C$ . Se añaden 4,3 g (12,7 mmoles) de Cbo - Leu - OpNP y la solución puede alcanzar ahora lentamente la temperatura ambiente. Después de tres horas, se vuelve a enfriar la solución a  $-10^\circ C$ . y se tampona con 0,55 g (5 mmoles) de  $Et_3N$ . El tamponado es repetido una vez más a las 2-3 horas. Después de un tiempo de reacción de 24 horas, se evapora la solución a  $40^\circ C$ . en vacío, hasta la sequedad. Se trata tres veces el residuo con 100 ml de agua destilada y se seca después en vacío. Purificación : se disuelve en MeOH el residuo seco y se purifica por cromatografía de gel en una columna de Sephadex (R) LH-20 equilibrado con MeOH. Rendimiento : 6,1 g (98%) de Ib amorfo, homogéneo según la TLC en  $P_1$  y  $\alpha_D^{25} = -33,3^\circ$  ( $c = 1,0$ ; MeOH).

Ejemplo Ic : Cbo - Leu - Leu - Arg ( $NO_2$ ) - pNA (Ic)

240 Materiales iniciales : 2,8 g (4,77 mmoles) de Ib y 2,22 g (5,72 mmoles) de Cbo - Leu - OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 2,5 g (80%) de Ic amorfo, homogéneo según la TLC en  $P_1$  y  $\alpha_D^{25} = -9,9^\circ$  ( $c = 1,0$ ; DMF).

245 Ejemplo Id : H - Leu - Leu - Arg - pNA . 2HCl (I)

Se ponen 134,2 mg (0,192 mmoles) de Ic en el recipiente de reacción de un aparato Sakakibara. Se destilan 5 ml de fluoruro de hidrógeno seco en el recipiente y se dejan reaccionar durante una hora, agitando. Así, el grupo nitro que protege la función guanidino de la arginina y el grupo Cbo son separados. Después, se destila el fluoruro de hidrógeno a presión reducida



y se disuelve en DMF el residuo seco. Para convertir el derivado de fluorhidrato obtenido del péptido en su sal clorhidrato, se añaden 0,25 ml de ácido clorhídrico concentrado a la solución DMF. Después de evaporación, se repite una vez más el procedimiento de conversión.

- 255 Purificación : después de la última evaporación, se disuelve el residuo en una solución al 50% de AcOH y se purifica por cromatografía de gel en una columna de Sephadex (R) G-25 equilibrado con AcOH al 50%. La fracción del eluado que contiene el derivado de clorhidrato de tripeptido puro es liofilizada.
- 260 Rendimiento : 80,0 mg (71 %) de I amorfo, contenido de cloro 11,83%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -29,9$  ( $c = 0,59$ ; 50% AcOH). El análisis de aminoácidos mostró las siguientes proporciones : Leu : 2,0; Arg:0,95.
- Ejemplo II : N<sup>alfa</sup> - Bz - Leu - Leu - Arg - pNA • HCl (II)
- Ejemplo IIa : N<sup>alfa</sup> - Bz - Leu - Leu - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA (IIa)
- 265 Materiales iniciales : 703 mg (1 mmol) de Ic y 272 mg (1,2 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.  
Método de síntesis : decarbobenzoxilación de Ic, que se ejecuta según el Ejemplo Ib. Se filtra el producto seco de H - Leu - Leu - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA.HBr. Se enfría el filtrado a -10° C. y se añaden 272 mg (1,2 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O. A las 3 horas de tiempo de reacción, la solución ha alcanzado la temperatura ambiente. Se vuelve a enfriar y se tampona con 0,07 ml (0,5 mmoles) de Et<sub>3</sub>N. Se repite el tamponado después de otras 3 horas. Después de 24 horas de tiempo de reacción, se evapora en vacío hasta la sequedad la solución. Se trata el residuo y se seca según el procedimiento descrito en el Ejemplo Ib.  
Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.
- 275 Rendimiento : 550 mg (82%) de IIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{25} = -3,6^{\circ}$  ( $c = 1,01$ ; DNF).
- II : N<sup>alfa</sup> - Bz - Leu - Leu - Arg - pNA • HCl (II)
- Material inicial : 554,8 mg (0,828 mmoles) de IIa.  
Método de síntesis : según el Ejemplo Id.
- 280 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 20% AcOH y Se-

414251



phadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 476 mg (87%) de II amorfo, liofilizado, contenido de cloro 5,30%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -73,0^\circ$  ( $c = 0,66$ ; 50% AcOH).

285 El análisis de aminoácidos indicó las siguientes proporciones : Leu : 2,0, Arg: 0,95.

Ejemplo III : H - beta - ciclohexil - Ala - Val - Arg - pNA • 2 HCl (III)  
Cbo - Val - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA (IIIa)

Materiales iniciales : 20,6 g (43,5 mmoles) de Ia y 20,3 g (54,3 mmoles) de Cbo - Val - OpNP.

290 Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : recristalización del producto bruto en MeOH. El líquido-madre es purificado por cromatografía de gel en Sephadex (R) LH-20, en MeOH.

Rendimiento : 23,2 g (93,3%) de IIIa, p.f. 200-202° C., homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y C y  $\alpha_D^{24} = +5,8^\circ$  ( $c = 1,0$ ; DMF).

295 Cbo - beta - ciclohexil - Ala - Val - Arg (NO<sub>2</sub>) - pNA (IIIb)

Materiales iniciales : 0,48 g (0,83 mmoles) de IIIa y 0,53 g (1,24 mmoles) de Cbo - beta - ciclohexil - Ala - OpNP de un p.f. 105-106° C. y  $\alpha_D^{24} = -28,8^\circ$  ( $c = 1,0$ ; DMF).

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

300 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 531 mg (88%) de IIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = -7,3^\circ$  ( $c = 2,0$ ; DMF).

H - beta - ciclohexil - Ala - Val - Arg - pNA • 2 HCl (III)

Material inicial : 120,4 mg (0,165 mmoles) de IIIb.

305 Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 20% AcOH.

Rendimiento : 56,6 mg (55%) de III amorfo liofilizado, contenido de cloro 11,32%, homogéneo según la TLC en A,  $\alpha_D^{23} = -36,8^\circ$  ( $c = 0,62$ ; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las siguientes proporciones : Val : 1,0,

310 beta-ciclohexilo - Ala : 1,1; Arg : 1,0.



Ejemplo IV : N - Bz - beta - ciclohexil - Ala - Val - Arg - pNA·HCl (IV)

N - Bz - beta - ciclohexil - Ala - Val - Arg(NO<sub>2</sub>) - pNA (IVa)

Materiales iniciales : 243 mg (0,335 mmoles) de IIIb y 93 mg (0,41 mmol) de Bz<sub>2</sub>O.

315 Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 147 mg (63%) de IVa, p.f. 148-152° C., homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = -6,33^\circ$  (c = 0,84; DMF).

N - Bz - beta - ciclohexil - Ala - Val - Arg - pNA · HCl (IV)

320 Material inicial : 106,0 mg (0,152 mmol) de IVa.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 20% AcOH.

Rendimiento : 86,7 mg (84%) de IV liofilizado amorfo, contenido de cloro 5,10%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -77^\circ$  (c = 0,3; 50% AcOH).

325 El análisis de los aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Val : 1,0, beta-ciclohexil - Ala : 1,2, Arg : 1,0.

Ejemplo V : N-Bz-N-ciclohexil-beta-Ala-Val-Arg-pNA·HCl (V)

N-Cbo-N-ciclohexil-beta-Ala-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (Va)

Materiales iniciales : 286 mg (0,5 mmol) de IIIa y 300 mg (0,7 mmol) de

330 N-Cbo-N-ciclohexil-beta-Ala-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 313 mg (86%) de Va amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{24} = \frac{+}{-} 0^\circ$  (c = 1,0; DMF).

335 N-Bz-N-ciclohexil-beta-Ala-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (Vb)

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 243,5 mg (87%) de Vb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = 0,5^\circ$  (c = 0,43; DMF).

340 N-Bz-N-ciclohexil-beta-Ala-Val-Arg·pNA·HCl (V)



Material inicial : 170 mg (0,242 mmol) de Vb.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

345 Rendimiento : 126 mg (76%) de V liofilizado amorfo, contenido de cloro 5,11%, homogéneo según la TLC en A,  $\alpha_D^{23} = -38,5^\circ$  (C = 0,69; 50% AcOH). Análisis de aminoácidos, reveló las proporciones siguientes : Val : 1,0, N-ciclohexil-beta-Ala : 1,3, Arg : 0,9.

Ejemplo VI : N<sup>alfa</sup>-Bz-Val-Val-Arg-pNA·HCl (VI)

Cbo-Val-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (VIa)

350 Materiales iniciales : 1,97 g (3,43 mmoles) de IIIa y 1,6 g (4,2 mmoles) de Cbo-Val-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 1,9 g (82%) de VIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y C.

355 N<sup>alfa</sup>-Bz-Val-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (VIb)

Materiales iniciales : 1,9 g (2,83 mmoles) de VIa y 0,77 g (3,40 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

360 Rendimiento : 1,45 g (80%) de VIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = +5,6^\circ$  (C = 1,01; DMF).

N<sup>alfa</sup>-Bz-Val-Val-Arg-pNH·HCl (VI)

Material inicial : 362 mg (0,564 mmoles) de VIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

365 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Rendimiento : 248 mg (69,7%) de VI liofilizado amorfo, contenido de cloro 5,54%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{24} = -57,0^\circ$  (C = 0,65; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Val : 2,0; Arg : 0,9.

370 Ejemplo VII : N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Val-Arg-pNA·HCl (VII)



30

Cbo-Leu-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA

(VIIa)

Material inicial : 1,97 g (3,43 mmoles) de IIIa y 1,7 g (4,2 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

375 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 2,05 g (87%) de VIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y C.

N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA

(VIIb)

380 Materiales iniciales : 1,75 g (2,55 mmoles) de VIIa y 695 mg (3,06 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 1,49 g (91%) de VIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub>, y / $\alpha$ /D<sup>23</sup> = + 2,4° (C = 1,01; DMF).

385 N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Val-Arg-pNA·HCl

(VII)

Material inicial : 319 mg (0,486 mmoles) de VIIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

390 Rendimiento : 276 mg (88%) de VII amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,41%, homogéneo según la TLC en A, / $\alpha$ /D<sup>24</sup> = -52° (C = 0,65; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Val : 1,0; Leu : 1,1; Arg : 0,95.

Ejemplo VIII : N<sup>alfa</sup>-Bz-Ile-Val-Arg-pNA·HCl (VIII)

Cbo-Ile-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA

(VIIIa)

395 Materiales iniciales : 1,97 g (3,43 mmoles) de IIIa y 1,7 g (4,2 mmoles) de Cbo-Ile-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 2,0 g (85%) de VIIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub>.

400 N<sup>alfa</sup>-Bz-Ile-Val-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA

(VIIIb)



Materiales iniciales : 1,75 g (2,55 mmoles) de VIIIa y 695 mg (3,06 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

405 Rendimiento : 1,46 g (89%) de VIIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub>.



Material inicial : 319 mg (0,486 mmoles) de VIIIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

410 Rendimiento : 264 mg (84%) de VIII amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,43%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -29,9$  (c = 0,59; 50% AcOH).

El análisis de los aminoácidos reveló las siguientes proporciones : Val : 1,0; Ile : 0,9; Arg : 1,1.

Ejemplo IX : N<sup>alpha</sup>-Bz-Val-Ile-Arg-pNA·HCl (IX)

415 Cbo-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (IXa)

Materiales iniciales : 4,9 g (10,4 mmoles) de Ia y 6,2 g (16 mmoles) de Cbo-Ile-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

420 Rendimiento : 4,75 g (78,1%) de IXa cristalino parcialmente, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = +2,3^\circ$  (c = 1,0; DMF).



Materiales iniciales : 800 mg (1,37 mmoles) de IXa y 615 mg (1,65 mmoles) de Cbo-Val-OpNP.

425 Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 833 mg (88,5%) de IXb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{24} = -3,23^\circ$  (c = 1,1; DMF).



430 Materiales iniciales : 500 mg (0,73 mmoles) de IXb y 198 mg (0,876 mmoles)



de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

435 Rendimiento : 374 mg (78%) de IXc amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  
 $\alpha_D^{23} = +1,9^\circ$  (c = 0,99; DMF).



Material inicial : 200 mg (0,305 mmoles) de IXc.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

440 Rendimiento : 153 mg (77,5%) de IX amorfo liofilizado, contenido de cloro  
 5,40%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -56,4^\circ$  (c = 0,64; 50% AcOH).  
 El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Val : 1,0;  
 Ile : 1,1; Arg : 1,1.



445 Cbo-Val-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (Xa)

Materiales iniciales : 880 mg (1,5 mmoles) de Ib y 670 mg (1,8 mmoles) de  
 Cbo-Val-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

450 Rendimiento : 882 mg (86%) de Xa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  
 $\alpha_D^{23} = -6,6^\circ$  (c = 1,01; DMF).



Materiales iniciales : 400 mg (0,583 mmoles) de Xa y 160 mg (0,707 mmoles)  
 de Bz<sub>2</sub>O.

455 Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 279 mg (73%) de Xb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  
 $\alpha_D^{23} = -0,4^\circ$  (c = 1,04; DMF).



460 Material inicial : 150 mg (0,23 mmoles) de Xb.



Método de síntesis : según el Ejemplo I.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% de AcOH.

Rendimiento : 126 mg (84,5%) de X amorfo, liofilizado, contenido de cloro 5,45%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -54,0^\circ$  ( $c = 0,64$ ; 50% AcOH).

465 El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Val : 1,0; Leu : 1,1 ; Arg : 1,0.

Ejemplo XI : N<sup>alpha</sup>-Bz-Ile-Ile-Arg-pNA.HCl (XI)

Cbo-Ile-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (XIa)

Materiales iniciales : 800 mg (1,37 mmoles) de IXa y 640 mg (1,66 mmoles)

470 de Cbo-Ile-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 838 mg (87,5%) de XIa parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = -5,7^\circ$  ( $c = 1,04$ ; DMF).

475 N<sup>alpha</sup>-Bz-Ile-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-pNA (XIb)

Materiales iniciales : 440 mg (0,63 mmoles) de XIa y 171 mg (0,76 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

480 Rendimiento : 409 mg (97%) de XIb parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub>.

N<sup>alpha</sup>-Bz-Ile-Ile-Arg-pNA.HCl (XI)

Material inicial : 202 mg (0,3 mmoles) de XIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo I.

485 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Rendimiento : 172 mg (87%) de XI amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,33%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{23} = -57,0^\circ$  ( $c = 0,67$ ; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Ile : 2,0; Arg : 0,9.

490 Ejemplo XII : N<sup>alpha</sup>-Bz-Leu-Ile-Arg-pNA.HCl (XII)



(XIIa)

Materiales iniciales : 800 mg (1,37 mmoles) de IXa y 640 mg (1,66 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

495 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 772 mg (81%) de XIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y /alfa/<sub>D</sub><sup>23</sup> = -7,3° (c = 1,02; DMF).



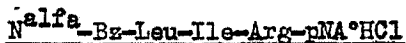
(XIIb)

500 Materiales iniciales : 500 mg (0,72 mmoles) de XIIa y 205 mg (0,86 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 482 mg (82%) de XIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y /alfa/<sub>D</sub><sup>23</sup> = + 0,5° (c = 1,03; DMF).



(XII)

505

Material inicial : 193 mg (0,288 mmoles) de XIIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo I.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

510 Rendimiento : 166 mg (86%) de XII amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,34%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/<sub>D</sub><sup>23</sup> = -51,4° (c = 0,67; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Leu : 1,0; Ile : 1,2 ; Arg : 0,9.



(XIII)



(XIIIa)

515 Materiales iniciales : 880 mg (1,5 mmoles) de Ib y 696 mg (1,8 mmoles) de Cbo- Ileu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

520 Rendimiento : 750 mg (71%) de XIIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y /alfa/<sub>D</sub><sup>23</sup> = -9,85° (c = 1,05; DMF).

30



N<sup>alpha</sup>-Bz-Ileu-Leu-Arg (NO<sub>2</sub>)-pNA (XIIIb)

Materiales iniciales : 498 mg (0,71 mmoles) de XIIIa y 193 mg (0,85 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

525 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 345 mg (73%) de XIIIb parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha/D^{23} = -5,7^\circ C.$  (c = 1,04; DMF).

N<sup>alpha</sup>-Bz-Ile-Leu-Arg-pNA·HCl (XIII)

Materiales iniciales : 170 mg (0,254 mmoles) de XIIIb.

530 Método de síntesis : según el Ejemplo I.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Rendimiento : 129 mg (77%) de XIII amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,31%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha/D^{23} = -49,9^\circ C.$  (c = 0,68; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las siguientes proporciones : Leu : 1,0;

535 Ile : 1,1; Arg : 1,05.

Ejemplo XIV : N<sup>alpha</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg-2-NA·HCl (XIV)

Cbo-Arg (NO<sub>2</sub>)-2-NA (XIVa)

Se disuelven 3,6 g (10 mmoles) de Cbo-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH en 200 ml de THF, 1,0 g (10 mmoles) de Et<sub>3</sub>N, después de lo cual se enfría la solución a -10° C. en

540 condiciones de total ausencia de humedad.

Se añaden a la solución enfriada durante 10 minutos 1,3 g (10 mmoles) de clorocformato de isobutilo disueltos en 10 ml de THF y, después de otros

10 minutos, se añaden 1,72 g (10 mmoles) de 2-naftilamina. Se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se deja a dicha tem-

545 peratura durante 24 horas. Se evapora la mezcla de reacción en vacío hasta sequedad, se trata 3-5 veces con agua destilada, 3-5 veces con una solución de bicarbonato de sodio al 5% y otras 3-5 veces con agua destilada, después de lo cual es secada en vacío.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

550 Rendimiento : 4,05 g (84%) de XIVa parcialmente cristalino, homogéneo según



la TLC en P<sub>1</sub> y C y  $\alpha_D^{23} = +7,35^\circ$  (c = 1,0; DMF).

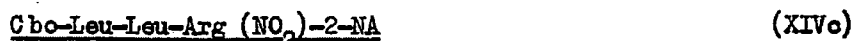


Materiales iniciales : 1,5 g (3,1 mmoles) de XIVa y 1,43 g (3,7 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

555 Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 1,6 g (86%) de XIVb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{22} = -9,1^\circ$  (c = 1,0; DMF).



560 Materiales iniciales : 1,35 g (2,26 mmoles) de XIVb y 1,05 g (2,71 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

565 Rendimiento : 1,00 g (62,4%) de XIVc parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{24} = -20,6^\circ$  (c = 1,0; DMF).



Materiales iniciales : 990 mg (1,4 mmoles) de XIVc y 407 mg (1,8 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

570 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 800 mg (84%) de XIVd amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{20} = -13,4^\circ$  (c = 1,0; DMF).



Materiales iniciales : 350 mg (0,52 mmoles) de XIVd.

575 Método de síntesis : según el Ejemplo I.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Rendimiento : 260 mg (75%) de XIV amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,30%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{20} = -51,8^\circ$  (c = 0,57; 50% AcOH).

El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Leu : 2,0;

580 Arg : 0,95.



Ejemplo XV : N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg-1-nitro-2-NA·HCl (XV)

Cbo-Arg (NO<sub>2</sub>)-1-nitro-2-NA (XVa)

Materiales iniciales : 3,6 g (10 mmoles) de Cbo-Arg (NO<sub>2</sub>)-OH y 2,26 g (12 mmoles) de 1-nitro-2-naftilamina.

585 Método de síntesis : según el Ejemplo XIVa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 3,1 g (58,7%) de XVa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y C y  $\alpha_D^{19} = -11,8^\circ$  (c = 1,0; DMF).

Cbo-Leu-Arg (NO<sub>2</sub>)-1-nitro-2-NA (XVb)

590 Materiales iniciales : 950 mg (1,8 mmoles) de XVa y 850 mg (2,2 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 900 mg (78%) de XVb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y

595  $\alpha_D^{22} = -10,2^\circ$  (c = 1,02; DMF).

Cbo-Leu-Leu-Arg (NO<sub>2</sub>)-1-nitro-2-NA (XVc)

Materiales iniciales : 900 mg (1,4 mmoles) de XVb y 650 mg (1,7 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

600 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 810 mg (77%) de XVc amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y

$\alpha_D^{24} = -18,2^\circ$  (c = 1,01; DMF).

N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg (NO<sub>2</sub>)-1-nitro-2-NA (XVd)

Materiales iniciales : 680 mg (0,88 mmoles) de XVc y 260 mg (1,15 mmoles)

605 de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 480 mg (73%) de XVd amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y

$\alpha_D^{24} = -31,4^\circ$  (c = 0,9; DMF).

610 N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg-1-nitro-2-NA·HCl (XV)

Material inicial : 74 mg (0,1 mmol) de Xvd.

Método de síntesis : según el Ejemplo I.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

615 Rendimiento : 47 mg (66%) de XV amorfo liofilizado, contenido de cloro 4,94%, homogéneo según la TLC en A y  $\alpha_D^{22} = -33,6^\circ$  ( $c = 0,72$ ; 50% AcOH). El análisis de aminoácidos reveló las proporciones siguientes : Leu : 2,0; Arg : 0,9

Ejemplo XVI : N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg-4-nitro-1-NA·HCl (XVI)

Cbo-Arg (NO<sub>2</sub>)-4-nitro-1-NA (XVIa)

620 Materiales iniciales : 3,6 g (10 mmoles) de Cbo-Arg (NO<sub>2</sub>)-OH y 2,26 g (12 mmoles) de 4-nitro-1-naftilamina.

Método de síntesis : según el Ejemplo XIVa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 2,9 g (55%) de XVIa amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y C y  $\alpha_D^{22} = -11,4^\circ$  ( $c = 1,01$ ; DMF).

625 Cbo-Leu-Arg (NO<sub>2</sub>)-4-nitro-1-NA (XVIb)

Materiales iniciales : 650 mg (1,23 mmoles) de XVIa y 560 mg (1,45 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

630 Rendimiento : 520 mg (66%) de XVIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{22} = -11,8^\circ$  ( $c = 0,2$ ; DMF).

Cbo-Leu-Leu-Arg (No<sub>2</sub>)-4-nitro-1-NA (XVIc)

Materiales iniciales : 520 mg (0,81 mmoles) de XVIb y 375 mg (0,97 mmoles) de Cbo-Leu-OpNP.

635 Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 378 mg (62%) de XVIc parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{23} = -18,0^\circ$  ( $c = 1,0$ ; DMF).

N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg (NO<sub>2</sub>)-4-nitro-1-NA (XVI d)

640 Materiales iniciales : 150 mg (0,2 mmoles) de XVIc y 57 mg (0,25 mmoles) de

414251

30



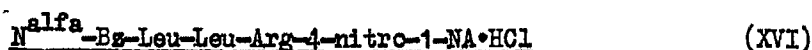
Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : según el Ejemplo IIa.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 120 mg (83%) de XVII<sub>d</sub> amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y

645 / $\alpha$ /<sub>D</sub><sup>23</sup> = 30,9° (c = 0,95; DMF).



Material inicial : 120 mg (0,165 mmoles) de XVII<sub>d</sub>.

Método de síntesis : según el Ejemplo I.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

650 Rendimiento : 48 mg (42%) de XVI amorfo liofilizado, contenido de cloro 4,95%, homogéneo según la TLC en A y / $\alpha$ /<sub>D</sub><sup>22</sup> = -36,0° (c = 0,71; 50% AcOH). El análisis de aminoácidos reveló las siguientes proporciones : Leu : 2,0; Arg:0,9.

Ejemplo XVII : N<sup>alfa</sup>-Bz-Leu-Lys-pNA·HCl (XVII)



655 Se disuelven 6,3 g (11,2 mmoles) de N<sup>alfa</sup>-BOC-Lys (épsilon-Cbo)-OH·DCHA en 40 ml de HMPTA seca recién destilada a temperatura ambiente, después de lo cual se añaden 5 g (30,5 mmoles) de p-nitrofenilisocianato agitando en condiciones completamente exentas de humedad. Después de 24 horas a temperatura ambiente, se trabaja la mezcla de reacción como se describe en el Ejemplo Ia.

660 La parte insoluble, consistente en N,N<sup>1</sup>-bis-p-nitrofenilcarbamida, es separada por filtración. Se purifica el filtrado mediante cromatografía de gel en una columna de Sephadex (R) LH-20 equilibrado con MeOH.

Rendimiento : 4,17 g (74,5%) de XVIIa parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y / $\alpha$ /<sub>D</sub><sup>21</sup> = +1,7° (c = 1,0; DMF).

665 N<sup>alfa</sup>-BOC-Leu-Lys (épsilon-Cbo)-pNA (XVIIb)

Se disuelven 2,20 g (4,4 mmoles) de XVIIa en 10 ml de ácido trifluoroacético recién destilado en condiciones de total ausencia de humedad. Se agita la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente y, después, es vertida lentamente en 150 ml de éter agitado vigorosamente y seco, precipitando

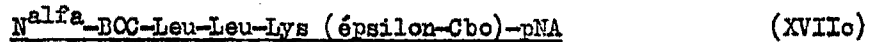
670 CF<sub>3</sub> COOH·H-Lys (épsilon-Cbo)-pNA después del enfriamiento. Se decanta la so-



lución de éter y se trata el residuo amorfo otras tres veces con 75 ml de éter. Después de secar en vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y NaOH, el rendimiento de la sal de ácido trifluoroacético del derivado de aminoácido es cuantitativo (2,25 g).

675 Se disuelven en 10 ml de DMF 2,25 g (4,4 mmoles) de CF<sub>3</sub>COOH·H-Lys (épsilon-Cbo)-pNA. Se enfría la solución a -10° C. y se añaden 0,78 ml (5,5 mmoles) de Et<sub>3</sub>N para liberar la sal aminoácida. Se añaden 2,4 g (6,5 mmoles) de BOC-Leu-OpNP y se deja que la solución alcance la temperatura ambiente. Después de 3 horas, se vuelve a enfriar la solución a -10° C. y se tampona con 0,31  
680 ml (2,2 mmoles) de Et<sub>3</sub>N. Se repite el tamponado una vez más a las 2-3 horas. Después de un tiempo de reacción de 24 horas, se evapora la solución a 40° C. en vacío hasta la sequedad. Se trata tres veces el residuo de evaporación con 20 ml de agua destilada y luego se seca en vacío. Se disuelve en MeOH el residuo bruto y seco y se purifica mediante cromatografía de gel en una  
685 columna de Sephadex (R) LH-20 equilibrado con MeOH.

Rendimiento : 1,70 g (70%) de XVIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y C y  $\alpha_D^{22} = -4,9^\circ$  (c = 1,1; DMF).



Materiales iniciales : 950 mg (1,55 mmoles) de XVIIb y 1,16 g (3,1 mmoles)  
690 de BOC-Leu-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo XVIIb.

Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Rendimiento : 985 mg (88%) de XVIIc amorfo, homogéneo según la TLC en P<sub>1</sub> y  $\alpha_D^{20} = -22,0^\circ$  (c = 1,0; DMF).



Materiales iniciales : 1,25 g (1,4 mmoles) de XVIIc y 384 mg (1,7 mmoles) de Bz<sub>2</sub>O.

Método de síntesis : se ejecutó la decarbobutiloxilación de XVIIc según el procedimiento del Ejemplo XVIIb.

700 La CF<sub>3</sub>COOH·H-Leu-Leu-Lys (épsilon-Cbo)-pNA seca fue disuelta en 20 ml de DMF

414251



y enfriada a  $-10^{\circ}$  C., después de lo cual se añadieron 200 ml (1,45 mmoles) de  $\text{Et}_3\text{N}$  para liberar la amina péptido de su sal. Se añadieron 384 mg (1,7 mmoles) de  $\text{Bz}_2\text{O}$  a la solución a  $-10^{\circ}$  C., después de lo cual se realizaron el tamponado y la preparación según el Ejemplo XVIIb.

- 705 Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) LH-20 en MeOH.  
Rendimiento : 920 mg (90%) de XVIIId parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en  $\text{P}_1$  y G, y  $\alpha_D^{20} = -5,95^{\circ}$  ( $c = 1,02$ ; DMF).



Material inicial : 300 mg (0,41 mmoles) de XVIIId.

- 710 Método de síntesis : Según el Ejemplo I.  
Purificación : cromatografía de gel con Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.  
Rendimiento : 170 mg (66%) de XVII amorfo liofilizado, contenido de cloro 5,51%, homogéneo según la TLC en A, y  $\alpha_D^{22} = -50,5^{\circ}$  ( $c = 0,62$ , 50% AcOH).  
El análisis de aminoácidos reveló las siguientes proporciones : Leu : 2,0;  
715 Lys : 0,35.

Los substratos producidos según los Ejemplos fueron usados para determinar distintas enzimas de la siguiente manera :

- El principio de la determinación se basa en que el producto formado por la hidrólisis enzimática muestra un espectro UV enteramente separado  
720 del espectro del substrato. Así, el substrato según el Ejemplo II N<sup>alpha</sup>-Bz-Leu-Leu-Arg-pNA·HCl tiene un máximo de absorción a 302 nm con el coeficiente de extinción molar 12920. La absorción del substrato es insignificante a 405 nm. La p-nitroanilina (pNA), que se forma desde el substrato durante la hidrólisis enzimática, tiene un máximo de absorción a 380 nm  
725 con un coeficiente de extinción molar de 13200, que a 405 nm ha sido reducido sólo a 9620.

- Por consiguiente, midiendo espectrofotométricamente a 405 nm, es fácilmente posible seguir el grado de hidrólisis enzimática, que es proporcional a la cantidad de p-nitroanilina formada. El exceso de substrato presente no interfiere con la medición a esa longitud de onda. Las circunstan-  
730



414231

30 ABR 1973



contrario, la concentración (E) de enzima de cada sustrato. La extinción (OD) es marcada como función de tiempo. En la curva obtenida de este modo, la tangente (= diferencia en la extinción por min.,  $\Delta$  OD/min., con la cual puede calcularse la cantidad  $\mu$ mol formada p-NA/min. (v)) en el momento cero indica la velocidad inicial de reacción v. Si  $\frac{1}{v}$  es marcado contra  $\frac{1}{(S)}$   $K_m$  y  $v_{max}$  (de la ecuación (4)) son obtenidos del diagrama  $K_m$  y  $k_3$  ( $= \frac{v_{max}}{(E)}$ ) para la tripsina, indicándose en la Tabla 1 diferentes sustratos de enzima y en la Tabla 2 para la trombina. El dato referente a  $K_m$  y  $k_3$  falta en los casos en los que no se determinaron los valores o cuando no pudieron calcularse no habiéndose obtenido relación lineal alguna entre  $\frac{1}{v}$  y  $\frac{1}{(S)}$ .

Puede obtenerse una evaluación somera de la relación enzima-sustrato para distintos sustratos comparando la cantidad de p-nitroanilina formada por min. y por ml a la misma concentración de los sustratos. Esto se indica en la Tabla 3 para la tripsina, en la Tabla 4 para la trombina y en la Tabla 5 para la plasmina.

Las letras NIH usadas en las Tablas se refieren a unidades del National Institute of Health (Instituto Nacional de Sanidad). La unidad de tripsina es igual a la hidrólisis de una  $\mu$ mol de clorhidrato de éster N<sup>alfa</sup>-tosil-arginina-metílico (TAME) por minuto a 25° C. y pH 8,1 en presencia de 0,01 M de ión de calcio, habiéndose obtenido la tripsina de la Worthington Biochemical Corporation, de Freehold, N.J., USA. La plasmina había sido obtenida de AB Kabi, de Estocolmo, Suecia, y 1 mg era igual a 3 unidades de caseína (CU).



Tabla 1

Actividad a la tripsina,  $K_m$  y  $k_3$

790	Substrato	Conc. de substrato ( $\mu\text{mol/l}$ )	Conc. de enzima (NIH/ml)	$K_m \times 10^4$ (mol/l)	$k_3 \times 10^4$ ( $\mu\text{mol/min.}$ , NIH/ml)
	BAPNA	250-666	75	16	8,3
	I	33,6-112,0	6	7,40	330
	II	35,0-150,0	3,3	0,64	276
	IV	35,0-150,0	3,3	0,17	71

795 Tabla 2

Actividad a la trombina,  $K_m$  y  $k_3$

800	Substrato	Conc. de substrato ( $\mu\text{mol/l}$ )	Conc. de enzima (NIH/ml)	$K_m \times 10^4$ (mol/l)	$k_3 \times 10^4$ ( $\mu\text{mol/min.}$ , NIH/ml)
	BAPNA	250-666	50	$\sim 6$	$\sim 11$
	I	33,6-112,0	10	2,92	40



Tabla 3

Actividad a la tripsina

	Substrato	Conc. de substrato mmoles por ml	Conc. de enzimas unidades por ml	p-nitroanilina formada mmoles por min. por ml
805	BAPNA	333,0	50,0	1,04
	II	66,9	0,0833	14,2
	III	66,7	"	16,8
	IV	67,0	"	10,2
	V	66,3	"	22,7
810	VI	66,8	"	12,8
	VII	66,2	"	16,6
	VIII	66,7	"	17,1
	IX	67,0	"	12,0
	X	67,1	"	15,5
815	XI	66,3	"	12,4
	XII	65,9	"	16,5
	XIII	66,9	"	16,7



Tabla 4

Actividad a la trombina

	Substrato	Conc. de substrato nmoles por ml	Conc. de enzima unidades NIH por ml	p-nitroanilina formada nmoles por min. por ml
820	BAPNA	333,0	2,08	6,1
	II	66,9	0,417	1,8
	III	67,2	"	0,5
	IV	67,0	"	0,9
825	V	66,5	"	1,7
	VI	66,8	"	0,2
	VII	66,2	"	0,4
	VIII	66,7	"	0,1
	IX	67,0	"	0,3
830	X	67,1	"	0,4
	XI	66,3	"	0,2
	XII	66,3	"	0,7
	XIII	66,9	"	0,2
835	XVII	67,0	"	0,1



Tabla 5

-Actividad a la plasmina

	Substrato	Conc. de sub- trato nmoles por ml	Conc. de enzima unidades CU por ml	p-nitroanilina formada nmoles por min. por ml
840	II	66,9	0,167	2,7
	III	66,7	"	17,2
	IV	67,0	"	2,7
	V	66,5	"	7,7
	VI	66,8	"	2,8
845	VII	66,2	"	2,2
	VIII	66,7	"	4,0
	IX	67,0	"	1,5
	X	67,1	"	17,2
	XI	66,3	"	2,0
850	XII	65,9	"	1,5
	XIII	66,9	"	17,9
	XVII	67,0	"	21,3

Las Tablas 1 - 5 demuestran claramente las ventajas de los substratos de enzima de la invención en comparación con el substrato de amida antes usado para la tripsina (BAPNA). Debido a su mayor sensibilidad, los nuevos substratos permiten la determinación de pequeñas cantidades de enzima sin poner en peligro la exactitud de la determinación. Esto es muy importante desde el punto de vista clínico ya que simplifica la recogida de la muestra.





30 ABR 1973

885

bien al primer aminoácido en cuestión, usándose luego el grupo cromofórico como grupo protector.

2ª.- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN NUEVO SUBSTRATO PARA USO DIAGNOSTICO ALTAMENTE SENSIBLE A LA TRIPSINA Y OTRAS ENZIMAS PROTEOLITICAS DEL TIPO PEPTIDO PEPTIDOHIDROLASAS"

Consta la presente memoria descriptiva de treinta y tres folios numerados y mecanografiados por una sola cara.

Madrid, 30 ABR. 1973

AKTIEBOLAGET BOFORS.

P.p.

137