

442,997

Int. CIRCOTC/AGIK

PATENTE DE INVENCION

que por 20 años, para España y sus Posesiones, se solicita a favor de AKTIEBOLAGET HOFORS, de nacionalidad sueca, domiciliada en HOFORS (Suecia), por: "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA ENZIMAS". - - - - -

Memoria descriptiva

5

La presente invención trata de un procedimiento para obtener nuevos substratos cromogénicos para proteasas de serina. Estos nuevos substratos son esencialmente apropiados para determinación del factor Xa (E.C. 3.4. 21.6) o para el estudio de las reacciones que hacen que se forme, se inhiba o se consuma el factor Xa, o también para la determinación de los factores que influyen o participan en dicha reacción.

10

El factor X es una sustancia clave en la serie de reacciones que llevan a la coagulación de la sangre. La activación del factor X produce la formación del enzima proteolítico, factor Xa, que es directamente responsable de la transferencia de la protrombina del trombo. La disponibilidad de un método simple para determinar el factor Xa sería muy valiosa para el diagnóstico.

15

Los reactivos utilizados hasta ahora para la determinación del factor Xa consistían por lo general en substratos estéricos de carácter muy específico. Uno de estos es, por ejemplo,

POOR
QUALITY

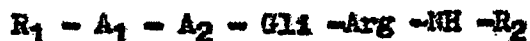
el p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato (p-NPGB), que es un buen su-
trato para la trombina, la tripsina, así como para la plasmina. Su
20 practicabilidad para el factor Xa queda limitada a su uso para pre-
parados enzimáticos purificados.

Los resultados obtenidos cuando se utiliza sangre no son viables
debido a la presencia de otras esterases con actividad para el ---
p-NPGB. (R.L. Smith J. Biol. Chem. 248, 2418 (1972)).

25 En la solicitud de patente sueca nº. 5757/72 se han descrito es-
tos sustratos cromogénicos de amida muy buenos para enzimas simila-
res a la trombina. Uno de estos, que tiene la fórmula Benzoil-Fe-Val
-Arg-p-nitroanilida (S-2165) puede aplicarse perfectamente a la trom-
bina mientras que, al ser utilizado con el factor Xa, se escinde só-
30 lo ligeramente. La susceptibilidad de un sustrato ante la trombina
debe ser despreciable si se quiere utilizar para el factor Xa en -
análisis de sangre para diagnóstico.

Sería pues muy conveniente la disponibilidad de un sustrato más
específico para el factor Xa, y por tanto menos susceptible de ser
35 extinguido por la trombina. El sustrato debería medir la función
biológica del enzima, es decir, escindir los enlaces de la amida.
Por otra parte, es muy conveniente que el sustrato pueda escindir
se rápidamente en productos que se midan fácilmente tales como los
compuestos cromofóricos que pueden ser seguidos con facilidad espe-
40 ctofotométricamente.

Los nuevos sustratos según la invención son del tipo amida, tie-
nen una elevada sensibilidad al factor Xa y están representados por
la siguiente fórmula general:



45 o sus sales, en donde R₁ puede seleccionarse entre el hidrógeno, un

alcanofilo que tenga 1 a 12 átomos de carbono, ciclohexilcarbonilo, benzofilo, un benzofilo sustituido con, por ejemplo, 1 o 2 átomos de halógeno, grupos metilo, amino o fenilo, benzensulfonilo y 4-toluen sulfonilo. R₂ puede seleccionarse entre el nitrofenilo, naftilo, 50 nitronaftilo, metoxinaftilo, quinolilo y nitroquinolilo. A₁ puede ser un solo enlace, o puede seleccionarse entre los aminoácidos Gli, Ala, Val, Leu, Ileu, Pro, Met, Fe y Tir. A₂ puede seleccionarse entre los aminoácidos Glu, Gln, Asp y Asn.

Los nuevos substratos pueden producirse según dos procedimientos diferentes. 55

1. El primer procedimiento se basa en el acoplamiento del grupo cromofórico R₂ a la arginina y a continuación una acumulación paso a paso de la estructura peptídica deseada por medio del acoplamiento gradual de los aminoácidos restantes. El grupo cromofórico se utiliza aquí como grupo bloqueante para el grupo carboxilo C-terminal de los primeros aminoácidos. 60

2. En otro procedimiento se basa en una formación paso a paso de la estructura peptídica deseada, después de lo cual los grupos de bloqueo utilizados se extraen, y se acopla el grupo cromofórico R₂ a la estructura peptídica. 65

Utilizando esta síntesis paso a paso de la estructura peptídica según los dos procedimientos mencionados, se puede purificar adecuadamente, por medio de filtración en gel, después de cada acoplamiento de un nuevo aminoácido.

Los procedimientos de acoplamiento que se han utilizado en esta 70 -síntesis paso a paso de los derivados peptídicos son bien conocidos y se utilizan comúnmente en la química de los péptidos. Grupos bloqueantes muy conocidos y comúnmente utilizados dentro de la qui

75

mica de los péptidos, es como el Cbo (carbobenzoxi), MeCCbo (p-metoxycarbobenzoxi), BOC (terc.-butiloxycarbonilo), TFA (trifluoroacetilo) o formilo se utilizan como grupo amino bloqueantes. El grupo carboxilo puede activarse por medio de conversión a otros derivados diferentes y activados, conocidos y utilizados frecuentemente en la química de los péptidos, que pueden ser aislados o generados in situ, como por ejemplo, el p-nitrofeniléster, triclorofeniléster, pentaclorofeniléster, N-hidroxisuccinimida-éster, acida ácida, anhídrido ácida, que pueden ser simétricos o asimétricos. Pueden también activarse con una carbodimida tal como la N,N'-dicietilcarbodiimida. El grupo carboxilo C-terminal en el derivado de aminopéptido o en el derivado aminoácido puede protegerse esterificando, por ejemplo, en metil-, etil- o isopropiléster o por medio de la conversión al derivado cromofórico de la anilina, que así trabaja como grupo bloqueante durante la formación de la cadena péptida. Los grupos funcionales libres que no participan en la reacción, pueden protegerse durante la síntesis de los péptidos o de los derivados de los péptidos de la forma siguiente:

80

85

90

A efectos de bloqueo, el grupo arginil- -guanido restante puede utilizar tales grupos amino-bloqueantes, utilizados comúnmente en la química de los péptidos, como por ejemplo la protonización, --NO₂ o Tos (p-toluensulfonilo). Como protección para el grupo carboxilo en el ácido glutámico y aspártico, se pueden utilizar los grupos bloqueantes que se utilizan comúnmente en la química de los péptidos, tales grupos como los de protección de benzilo y butilo terciario.

95

100

La invención se describirá con mayor detalle en los ejemplos siguientes que demuestran la producción de diferentes substratos según la invención por medio de la síntesis paso a paso.

.../...

105 En el análisis de cromatografía de capa fina de eluidos y productos, se utilizaron placas de vidrio con gel de sílice F254 -- (Merck) como medio de absorción. Los sistemas disolventes utilizados han sido designados de acuerdo con la tabla siguiente:

<u>Designación</u>	<u>Disolventes</u>	<u>Relación en volumen</u>
A :	n-butanol:ácido acético:agua	(3:1:1)
C :	n-propanol:acetato de etilo:agua	(7:1:2)
110 D :	n-heptano:n-butanol:ácido acético	(3:2:1)
P ₁ :	cloroformo:metanol	(9:1)

115 Después de la cromatografía en capa fina, se estudiaron las placas primero a la luz ultravioleta (254 nm) y posteriormente utilizando la reacción del cloro/toluidina (Ref.: G.Pataki: *Dünnschichtchromatografie in der Aminosäure - und Peptidchemie*, Walter de Gruyter and Co. Berlin, 1966, p. 125) como método de desarrollo.

El significado de las abreviaturas utilizadas a continuación son los siguientes:

Amino ácidos:

120 Estas abreviaturas se refieren a restos de amino ácidos. El amino ácido o péptido libre se indica por medio de H- en el grupo amino y -OH en el grupo carboxilo. El grupo amino se indica siempre a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha.

125 Salvo que se indique de otro modo, todos los amino ácidos utilizados tienen la configuración L

Ala = Alanina	Ileu = Isoleucina
Arg = Arginina	Leu = Leucina
Asn = Asparagina	Met = Metionina
Asp = Acido aspártico	Pe = Fenilalanina
130 Gln = Glutamina	Pro = Prolina
Gli = Glicina	Tir = Tirosina
Glu = Acido glutámico	Val = Valina

Otras abreviaturas:

	Ac	= Acetilo.
135	Ac ₂ O	= Anhídrido acético.
	AcOH	= Acido acético.
	BCC	= Terce-Butiloxicarbonilo.
	Bz	= Benzilo.
	Bzl	= Benzilo.
140	Bz ₂ O	= Anhídrido benzoico.
	Cbo	= Carbobenzoxi.
	DCOL	= Diciclohexilcarbodiimida.
	Et ₃ N	= Trietilamina.
	DMF	= Dimetilformamida.
145	NCbo	= p-Metoxifenilazocarbobenzoxi.
	MeOH	= Metanol.
	OTBU	= Terc-Butiloxi.
	OEt	= Etiloxi.
	OMe	= Metiloxi.
150	OpNP	= p-Nitrofenoxi.
	OisoPr	= iso-Propiloxi.
	pNA	= p-Nitroanilida.
	TFA	= Trifluoroacetilo.
	Tos	= p-Toluensulfonilo.

155 A menos que se indique de otro modo, las indicaciones de temperatura que se den en los ejemplos son en grados C.

Ejemplo I : HCl.Bz-Ileu-Glu-Gli-Arg-pNA

Ia: Cbo-Gli-Arg-(NO₂)-pNA (M.w. 530.4)

160 5.0 g (10.6 mmoles) de Cbo-Arg (NO₂)-pNA se disuelven en 21 ml. de AcOH y 22 ml. de 4N Hbr en AcOH en condiciones libres de humedad. La solución se agita durante una hora a la temperatura am-

165 biente y a continuación se vierte lentamente en 200 ml. de éter agitado vigorosamente. La solución etérea se decanta y el residuo granular obtenido se trata otras dos veces con 100 ml de éter. Después de secado en vacío con P_2O_5 y gránulos de KOH a $30^{\circ}C$, el rendimiento de la sal hidrobromuro del derivado de amino ácida es casi cuantitativo (4,95 g). El producto es homogéneo según TLC en A.

170 Este producto se disuelve en 50 ml. de DMF destilado. La solución se enfría a $-10^{\circ}C$ y se añade Et_3N hasta que la solución se pone neutra (2,1 ml). El $Et_3N \cdot HBr$ precipitado se filtra y el filtrado se enfría a $-10^{\circ}C$. Se añaden 3,9 g (11,8 moles) de Obo-Gli-OpNP y la solución puede dejarse que alcance lentamente la temperatura ambiente. A las tres horas se enfría de nuevo la solución a $-10^{\circ}C$ y se tampona con 0,54 g (5,3 moles) de Et_3N . El procedimiento de tamponado se repite una vez más a las 2-3 horas. La solución de la reacción se deja estar durante la noche y a continuación se evapora en vacío a $40^{\circ}C$. El aceite pesado restante se agita cuidadosamente con 100 ml de agua destilada. El agua se decanta y el procedimiento de lavado se repite otras dos veces. El aceite restante se disuelve en MeOH
175
180 caliente y al enfriarse el producto se precipita en forma cristalina.

Rendimiento : 4,2 g (75%) de Ia

Homogéneo según TLC en P_1 ($R_f=0,16$)

185 $[\alpha]_D^{24} -36^{\circ}$ (c 0,50 MeOH).

Ib: t-Boc-Glu (δ -OBzl)-Gli-Arg (NO_2) -pNA (M.w. 715,8)

190 2,65 g (5,0 moles) de Ia se descarboxila y se acopla con 2'50 g (5,5 moles) de t-Boc-Glu (δ -OBzl)-OpNP según el método del ejemplo Ia. El producto crudo se purifica por cromatografía de gel en una columna que contiene SEPHADEX^(R) LH-20 en MeOH.

Homogéneo según TLC en P₁ (R_F = 0,22)

Rendimiento : 3,25 g (91%) de Ib

195 [c] ²⁴
D -34° (c 1,0 MeOH).

Ioc Obo-Ileu-Glu (γ-OBzl)-Gly-Arg (NO₂)-pNA (M.w. 862,9)

200 1,08 g (1,5 mmoles) de Ib se disuelven en 10 ml de TFA. La solución se agita durante una hora a la temperatura ambiente, y a continuación se echa lentamente en 75ml de éter seco, vigorosamente agitado. La solución etérea se decanta, y el residuo granular obtenido se trata otras dos veces con 50 ml de éter. Después de secado en vacío con P₂O₅ y gránulos de KOH a 30°C, el rendimiento de la sal TFA del derivado tripeptídico es casi cuantitativo (1,08 g).

205 El producto es homogéneo según TLC en A. Este producto se disuelve en 20 ml de DMF. La solución se enfría a -10°C y se neutraliza con Et₃N (0,23 ml). Se añade 0,65 (1,68 mmoles) de Obo-Ileu-OpNP y la solución se deja subir lentamente a la temperatura ambiente. Después de unas tres horas, la solución se enfría de nuevo hasta -10°C
210 y se tampona con 0,12 ml de Et₃N. El procedimiento de tamponado se repite una vez más a las 2-3 horas y la solución se deja estar durante la noche. A continuación se destruye el exceso de Obo-Ileu-OpNP añadiendo a la solución alrededor de 100 mg (aproximadamente
215 1,4 mmoles) de n-butilamina. (El exceso de éster activo es indeseado porque es difícil separarlo del tetrapéptido en la filtración con gel). Después de unos 30 minutos, se evapora la solución en vacío a 40°C. El aceite pasado restante se lava con tres porciones de agua destilada. El aceite se disuelve en MeOH y se purifica por cromatografía de gel en una columna con SEPHADEX (R₁IN-20 en metanol.

220 Rendimiento : 1,07 g (83%) de Ioc, homogéneo según TLC en P₁ (R_F=0,35)

(α)²⁴
D -32^o (c 0,3, MeOH : DMF, 95:5)

Id: Hs-Ileu-Glu (γ -OBzl)-Gli-Arg (NO₂)-pNA

225 260 mg (0,30 mmol) de Id se descarbobenzoxila según el procedimiento del ejemplo Ia. El producto muestra dos manchas en TLC en A -- (R_f=0,45 y 0,60) y la espectroscopia IR indica que el producto es una mezcla de HBr . H-Ileu-Glu (γ -OH)Gli-Arg (NO₂)-pNA y HBr . H-Ileu-Glu (γ -OBzl)-Gli-Arg (NO₂)-pNA. Esta mezcla se hace reaccionar

230 con 800 mg (0,35 mmol) de anhídrido benzoico según el procedimiento del ejemplo Ia. El producto benzoylado crudo se purifica en una columna de SEPHADEX^(R) LH-20 en metanol. Se obtienen dos fracciones,

235 α : 130 mg, (α)²⁴
D -15^o (c 0,5, CH₃OH), R_f=0,20 en P₁ y

β : 105 mg, (α)²⁴
D -11^o (c 0,5, CH₃OH), R_f=0,06 en P₁. La espectros-

240 copia IR indica que las dos fracciones son Hs-Ileu-Glu (γ -OBzl)-Gli-Arg (NO₂)-pNA. (La reacción con HF proporciona entre ambas fracciones el mismo producto final, Ia).

Ie: HCl . Hs-Ileu-Glu-Gli-Arg-pNA (M.w.734,3)

245 100 mg (0,12 mmol) de la fracción α del Id y 0,5 ml de anisol se colocan en el recipiente de reacción de un aparato Sakakibara. Unos 5 ml de fluoruro de hidrógeno seco se destilan en el recipiente y se dejan reaccionar durante 75 minutos bajo agitación a 0^oC. El fluoruro de hidrógeno se destila entonces a presión reducida y el residuo aceitoso se disuelve en 10 ml de AcOH (33% en agua) y se purifica por cromatografía en una columna de SEPHADEX^(R) G-15 en
250 AcOH al 33% en agua. La fracción del eluido que contiene el derivado de tetrapéptido desbloqueado y puro se liofiliza a continuación. El compuesto obtenido se disuelve en MeOH: agua destilada (95:5) y se cromatografía en un intercambiador aniónico débilmente básico

255 QAE-SEPHADEX (R) A-25 en su forma de cloruro con la misma mezcla de disolvente como eluyente. El metanol se retira del eluado a 30°C y a presión reducida, liofilizándose la solución acuosa restante.

Rendimiento: 75 mg (85%), homogéneo según TLC en A ($R_f = 0,48$)

260 (X) 24
D -40° (c 0,5, AcOH al 50% en agua destilada)

análisis de los amino ácidos: Ileu: 0,98, Glu: 0,95, Arg: 0,98, Glic: 1,00.

Ejemplo II : 2HCl . H -Ileu-Glu-Gli-Arg-pNA

Tia : 2HCl.H-Ileu-Glu-Gli-Arg-pNA (M.w. 666,6)

265 100 mg (0,116 mmol) de Ia se hacen reaccionar con fluoruro de hidrógeno, se purifican y se intercambian los iones según los procedimientos del ejemplo Ia.

Rendimiento : 56 mg (73%), homogéneo según TLC en A ($R_f = 0,34$)

270 (X) 24
D - 35° (c 0,5 , AcOH al 50% de agua destilada).

Análisis de amino ácidos : Ileu: 0,96, Glu: 0,94, Arg: 0,96, Glic: 1,00

Los substratos descritos en los ejemplos anteriores se utilizaron para determinar el factor K_a en la forma siguiente:

275 El principio para la determinación se basa en el hecho de que el producto formado por la hidrólisis enzimática presente un aspecto UV totalmente diferente del del substrato. Así, el substrato del ejemplo I, H_2 -Ileu-Glu-Gli-Arg-pNA-HCl, tiene una máxima absorción a 315 nm con el coeficiente de extinción molar 12000. La absorción del substrato es insignificante a 405 nm. La p-nitroanilina (pNA) 280 que se forma a partir del substrato durante la hidrólisis enzimática, tiene un máximo de absorción a 380 nm con un coeficiente de extinción molar de 13200, que disminuye solo a 9620 a 405 nm. Por

285

consiguiente, midiendo espectrofotométricamente a 405 nm, se puede seguir con facilidad el grado de hidrólisis enzimática, que es proporcional a la cantidad de p-nitroanilina producida. El exceso de sustrato presente no afecta a la medición de dicha longitud de onda. La situación es casi idéntica para los demás sustratos de la invención, y por esta razón las mediciones espectrofotométricas se realizaron a 405 nm.

290

La Tabla I muestra una comparación relativa de las velocidades de reacción de diferentes enzimas del tipo de las proteasas de la serina (E.C. 3,4,21) entre el sustrato S-2160 anteriormente citado y el sustrato I, según la presente invención. Las velocidades de reacción se determinan según el procedimiento anteriormente descrito.

295

Tabla I

<u>Conc.</u>	<u>Sustratos</u>	<u>Velocidades relativas de reacción</u>			
		<u>Trombina</u>	<u>Xa</u>	<u>Tripsina</u>	<u>Plasmina</u>
0,1 mM	S-2160	100	1	100	100
0,25 mM	I	2	100	500	75

300

Esta Tabla demuestra que el factor Xa escinde el sustrato I 100 veces mejor que el S-2160, y solamente queda afectado en medida insignificante por la trombina, si se compara con el S-2160. Es pues evidente que el producto I es evidentemente, según esta comparación, el mejor sustrato para Xa. Por otra parte, la Tabla demuestra que I puede también utilizarse con éxito como sustrato para la tripsina. No obstante, este efecto positivo ante la tripsina no interfiere la determinación del factor Xa, ya que la tripsina no se encuentra normalmente presente en la sangre.

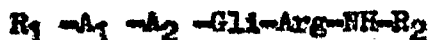
310

REIVINDICACIONES

12.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA EN

ZIMAS, especialmente apropiados para la determinación diagnóstica del factor Xa, que están representados por la siguiente fórmula general:

315



o sus sales, en donde R_1 puede seleccionarse entre el hidrógeno, alcanoilo con 1 a 12 átomos de carbono, ciclohexilcarbonilo, bencilo, bencilo sustituido, por ejemplo, con uno o dos átomos de halógeno, grupo metilamino o fenilo, benzensulfonilo y toluenulfonilo; R_2 puede seleccionarse entre el nitrofenilo, naftilo, nitroneftilo, metoxinaftilo, quinolilo y nitroquinolilo; A_1 puede seleccionarse entre un simple enlace o los aminoácidos Gli, Ala, Val, Leu, Ileu, Pro, Met, Fe y Tir; y A_2 puede seleccionarse entre los aminoácidos Glu, Gln, Asp, Asn; caracterizado por llevarse a efecto el acoplamiento del grupo cromofórico R_2 a la arginina y a continuación se proceda a una acumulación paso a paso de la estructura peptídica deseada por medio del acoplamiento gradual de los amino ácidos restantes, utilizándose el grupo cromofórico como grupo bloqueante para el grupo carboxilo C-terminal de los primeros amino ácidos.

320

325

330

2*.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA ENZIMAS, caracterizado por formarse paso a paso la estructura peptídica deseada, después de lo cual los grupos de bloqueo utilizados se extirpan y se acopla el grupo cromofórico R_2 a la estructura peptídica.

335

3*.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA ENZIMAS, según las reivindicaciones 1* y 2*, caracterizado por purificarse adecuadamente, por medio de filtración en gel después de cada acoplamiento de un nuevo aminoácido.

340

4*.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA ENZIMAS. - - - - -

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

Madrid, 26 de noviembre de 1.975.

AKTIEBOLAGET BOFORS,

P.p.

A handwritten signature in black ink, appearing to be the initials 'LH' or similar, written in a cursive style.