



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	10	AT
		21	11440730		
		22	FECHA DE PRESENTACION		

PATENTE DE INVENCION

90 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
75 07975-6	11-julio-1975	Suecia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE NUEVOS SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA TROMBINA ₂ .		
26 OCT. 1977		
71 SOLICITANTE (S)		
AKTIEBOLAGET KABI.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
S-104 25 ESTOCOLMO (Suecia)		
72 INVENTOR (ES)		
Dr. Bo Thu Resson af Ekesnatan;.- Dr. Leif Erik Aurell;.- Dr. Karl Göran Claesson ;.- Ing. Brigitte Gunilla Karlsson.		
73 TITULAR (ES)		
AKTIEBOLAGET KABI		
74 REPRESENTANTE		
D. Santiago HESSE MURGA.- Agente Oficial.		

BAD ORIGINAL



PATENTE DE INVENCION

que por veinte años, para España y sus Posesiones, se solicita a favor de AKTIEBOLAGET KABI, de nacionalidad sueca, domiciliada en S-104 25 ESTOCOLMO (Suecia), por "PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NUEVOS SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA TROMBINA"

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a nuevos substratos cromogénicos para trombina y encimas similares a la trombina. Los substratos según esta invención son adecuados especialmente para una determinación cuantitativa de la trombina o para un estudio de las reacciones en las que se forma, inhibe o consume trombina o para la determinación de los factores que ejercen influencia o toman parte en dichas reacciones, v.g. para la determinación de la antitrombina, la protombina y heparina.

Los substratos sintéticos para las determinaciones de las enzimas tienen grandes ventajas en comparación con los naturales, siempre que cumplan con ciertas condiciones, tales como gran sensibilidad y especificidad para la enzima, una buena sensibilidad en agua o en el líquido de ensayo biológico y fácil detectabilidad de algunos de los productos de descomposición.

Hasta ahora uno de los mejores substratos para la determinación de la trombina se describe en nuestra Patente nº 380.257 y está constituido por el derivado de tripéptido cromogénico (en lo que respecta a las abreviaturas, véase la página 4).

Bz-Phe-Val-Arg-pNA (S2160) A

Este tiene una gran sensibilidad para la trombina y da por



hidrólisis enzimática el producto cromofórico para-nitroanilina que se puede determinar con facilidad espectrofotométricamente. Sin embargo, el S-2160 tiene una delimitación debida a su relativamente baja solubilidad (1 mg/ml). Una baja solubilidad tiene la desventaja de que se ha de trabajar muy cerca del límite de saturación para el sustrato a fin de conseguir una concentración satisfactoria del sustrato. En la determinación de las enzimas en diferentes sistemas biológicos puede tener lugar una precipitación del sustrato como tal o una precipitación proteína/sustrato combinada. La citada precipitación producirá lecturas erróneas de la enzima. El sustrato de enzima S-2160 se hace considerablemente más soluble si el grupo benzilo se reemplaza por H quedando:

H-Phe-Val-Arg-pNA

B

El ahora libre grupo amino protonizado en Phe aumenta la solubilidad, pero también hace que disminuya notablemente la velocidad con la que la trombina descompone al sustrato, del orden de 30 veces menor (cotejese Tabla I). Además, en una solución de ensayo biológico, el sustrato se puede descomponer en una forma indeseable a partir del extremo del terminal N por medio de amino peptidasas.

Según la presente invención, el sustrato de acuerdo con la fórmula B se ha modificado cambiando por un ácido imino cíclico (Aze, Pro o Pip) y L-Phe por D-Phe. Tal como se preveía, los sustratos así obtenidos son todavía muy solubles pero en forma muy sorprendente la actividad contra la trombina no disminuye sino que, por el contrario, es 30-50 veces más alta que la actividad para el correspondiente sustrato con solamente L-amino ácidos (Tabla I). Además, los nuevos sustratos son aproximadamente un 400% más activos que S-2160. El D-amino ácido de terminal N también impide un ataque no deseado por amino peptidasas



plo, p-nitrofenilo, triclorofenilo, pentaclorofenilo o éster de succinimida, anhídrido simétrico o asimétrico, azida de ácido o éster de N-hidroxibenzotriazol.

85 El principio para la síntesis puede ser una unión escalonada de los aminoácidos al grupo arginilo terminal C, ya suministrado con un grupo cromofórico copulado que funciona como un grupo protector carboxilo o proporcionado con un grupo protector carboxílico desdoblable y entonces, el grupo cromofórico se une al derivado de
90 tripéptido protegido o alternativamente es posible sintetizar el fragmento de dipéptido terminal N 'per se' que luego se une al grupo arginilo con o sin un grupo cromofórico, de acuerdo con lo anteriormente expuesto.

Independientemente del principio elegido, es conveniente una purificación de los productos intermedios y finales por medio de la
95 cromatografía de filtración de gel puesto que permitirá una rápida síntesis y dará el máximo rendimiento.

El análisis TLC (cromatografía de capa delgada) se ha realizado en parte de eluatos de GPC y en parte de productos intermedios y
100 finales evaporados y secados.

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos específicos no limitantes.

Abreviaturas

Aminoácidos (si no se indica de otro modo, se supone la forma L):

- 105 Arg = Arginina.
Aze = 2 Azetidina carboxílica.
Phe = Fenilalanina.
Pip = Acido pipercolínico.
Pro = Prolina.
110 Val = Valina.
AcOH = Acido acético.
Bz = Benzilo.



- Cbo = carbobenzoxi-
- DMF = Dimetilformamida.
- 115 Et₃N = Trietilamina.
- EtOAc = Etilacetato.
- HMPA = Triamida N,N,N',N',N'',N''-hexametilfosfórica.
- GPC = Cromatografía de filtración de gel.
- MeOH = Metanol.
- 120 -OpNP = p-nitrofenoxi.
- pNA = p-nitroanilida.
- TLC = Cromatografía de capa delgada.

Cromatografía de capa delgada:

Para análisis TLC se utilizan placas de vidrio previamente pre-

125 paradas con gel de sílice F₂₅₄ (Merck) como agente de absorción.

Los sistemas disolventes utilizados son los siguientes:

P₁: cloroformo: MeOH 9:1 (relación en volumen).

A: n-butanol: AcOH: agua 3:2:1 (relación en volumen).

Una vez acabada la cromatografía, la placa se estudia en luz

130 ultravioleta (254 nm) y se realiza un revelado posteriormente

con reactivo de cloro/orto-toluidina de acuerdo con la práctica

común. Cuando se establece un "producto homogéneo según TLC" se

realiza el análisis en un orden de magnitud de 10^9 . Los valores

R_F establecidos son resultados de procedimientos cromatográficos

135 independientes.

El gel Sephadex ^(R)G-15 utilizado para la filtración de gel,

es un gel de dextrano de enlaces cruzados. El gel Sephadex ^(R)

IH-20 es un gel de dextrano de enlaces cruzados hidroxipropilado.

El intercambiador de iones Sephadex ^(R) QAE-25 utilizado es un

140 gel de dextrano de enlaces cruzados con dietil-(2-hidroxipropil)-

amino-etil como grupo funcional. Estos gels proceden de Pharmacia

Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.



Descripción de la síntesis.

I. Cbo-Arg(NO₂)-pNA

145

35,3 grs. (10 milimoles) de Cbo-Arg(NO₂)-OH seco se disuelven en 200 ml de EMPTA seco recientemente destilado a la temperatura del recinto, después de lo cual se añaden 10,1 g(100 milimoles) de Et₃N y 24,6 g (150 mmol) de p-nitrofenil-isocianato durante las condiciones de agitación y sin humedad alguna. Después de un tiempo

150

de reacción de 24 horas, la solución se vierte en 2 litros de solución de bicarbonato sódico al 2% bajo agitación. El precipitado formado se elimina por filtración y se lava con una solución de bicarbonato al 2%, agua, 0,5N HCl (ac.) y agua y finalmente se seca. El producto bruto se extrae con MeOH caliente y se filtran

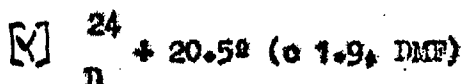
155

los subproductos difícilmente solubles. El filtrado se purifica por cromatografía en una columna de Sephadex^(R) III-20, se esponja y se eluye con MeOH.

Rendimiento: 29,8 grs (63%).

Análisis: Homógeno de acuerdo con TLC en F₁ (R_F: 0,34).

160



II. Cbo-Pro-Arg (NO₂)-pNA.

165

4,8 grs (10 mmol) de Cbo-Arg(NO₂)-pNA se mezclan en forma pastosa con 25 ml de AcOH seco, después de lo cual se añaden 15 ml de 5,6 N Hbr en AcOH. Después de un período de reacción de 50 minutos a la temperatura ambiental del recinto, la solución se vierte con una fuerte agitación en 300 ml de éter seco. La fase de éter se extrae por aspiración del precipitado obtenido y el precipitado

170

se lava con 2 partes de 100 ml de éter cada una. El Hbr-H-Arg (NO₂)-pNA así obtenido se seca en vacío en NaOH a 40°C durante 16 horas. Posteriormente se disuelve en 25 ml de DMF y la solución se enfría a -10°C. En este momento, se añade Et₃N en cantidad suficiente pa-



175 ra obtener un papel de pH húmedo mantenido inmediatamente por encima de la superficie de la solución, una reacción débilmente básica (1,9 ml). El precipitado $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HBr}$ se elimina por filtración y se añaden 4,7 g (11 mmol) de Cbo-Pro-OpNP. Después de 1 hora, se añaden 0,7 ml de Et_3N y también después de 4 h. Se deja que la solución se ajuste a la temperatura ambiente durante la noche.

180 A fin de evitar que el exceso de Cbo-Pro-OpNP contamine el producto final durante GPC puesto que tienen volúmenes de elución similares en el sistema cromatográfico utilizado, se añade 0,5 ml. (5 milimoles) de n-butyl-amina. Después de 30 minutos, se agregan 10 milimoles de Cl_2N diluido, la solución de reacción se evapora

185 en un rotavapor, se agita con un par de partes de agua que se elimina por decantación. El residuo se disuelve en MeOH y es objeto de cromatografía en una columna de Sephadex^(R) LH-20, se esponja y se eluye con MeOH. El producto obtenido es homogéneo de acuerdo con TLC.

190 Rendimiento: 5,5 g. (96%).
Análisis: TLC en F_1 (R_f : 0,28)
[✓] $\begin{matrix} 24 \\ \text{D} \end{matrix}$ -33,0% (c 1,0, DMF)

195 III. Cbo-Pip-Arg (NO_2)-pNA.
Realizado según II.
Rendimiento: 5,7 g (86%).
Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en F_1 (R_f : 0,30)

200 [✓] $\begin{matrix} 24 \\ \text{D} \end{matrix}$ -26,2% (c 1,0, DMF)

IV. Cbo-Phe-Pip-Arg (NO_2)-pNA
2,9 gramos (5 milimoles) de Cbo-Pip-Arg (NO_2)-pNA se dicarboxibenzoilan en BrH en AcOH, se precipitan y lavan con éter y se secan



205 según II. A continuación, HBr-II-Pip-Arg (NO₂)-pNA se disuelven en 15 ml de DMF. La solución se enfría a -10°C, se hace debilmente básica con 0,9 ml de Et₃N y se filtra. Se añaden 3,0 grs (7.15 milimoles) de Cbc-Phe-OpNP y luego 0,65 gramos (5 milimoles) de N-hidroxibenzotriazol como catalizador. Después de 1 hora se añaden 0,35 ml de Et₃N y el mismo procedimiento se repite después de 4 horas. Se deja que la solución de la reacción llegue a la temperatura del recinto durante la noche. La solución se evapora a sequedad en un rotavapor. El residuo se disuelve en EtOAc y se trata con una solución de bicarbonato sódico al 2% y agua y luego se evapora. El residuo se disuelve ahora en MeOH y es objeto de cromatografía en Sephadex^(R) LH-20, se esponja y eluye con -- MeOH. El producto obtenido es homogéneo de acuerdo con TLC.

210

215

Rendimiento: 2,7 g (73%).

Análisis: TLC en P₁ (R_F: 0,35).

220

[X]_D²⁴ -32.9^o (c 1.0, DMF).

V. Cbc-D-Phe-Pip-Arg (NO₂)-pNA.

Realizado según IV.

225

Rendimiento: 2,6 gramos (70%).

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,44)

[X]_D²⁴ -38.4^o (c 1.0, DMF).

230

VI. Cbc-Phe-Pro-Arg (NO₂)-pNA.

Realizado según IV.

Rendimiento: 2,9 grs (80%)

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,38)

235

[X]_D²⁴ -39.2^o (c 1.0, DMF).



VII. ~~Obo-D-Phe-Pro-Arg~~ (NO₂)-pNA.

Realizado según IV.

Rendimiento 3.1 grs (86%).

240 Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,46).

$$[\alpha]_D^{24} -6.22 \text{ (c 1.0, DMF).}$$

VIII. ~~H-D-Phe-Pro-Arg~~-pNA.2HCl.

245 175 mg (0,246 milimoles) de ~~Obo-D-Phe-Pro-Arg~~(NO₂)-pNA se "desprotegen" mediante reacción con 5 ml. de FH en seco en la presencia de 0,3 ml de anisol en un apartado destinado a este fin, de acuerdo con Sakakibara, durante 60 minutos a 0°C. Después de acabada la reacción y tras la destilación de todo el FH, el producto bruto se purifica y se somete a un intercambio de iones en dos etapas:

- 250 a) GPC en una columna de Saphadex (R)G-15, esponjado en 33% AcOH en agua, con el mismo medio que el disolvente y de eluación. El producto puro se liofiliza a partir de AcOH (aq.)
- 255 b) Intercambio de iones en una columna de Saphadex (R) QAE-25 en la forma de cloruro, esponjado en MeOH: agua (95:5) con el mismo medio que el disolvente y de eluación. El producto puro se liofiliza a partir de agua.

260 Rendimiento: 120 mg (80%).

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en A (R_F: 0,29)

Contenido en cloruro 11,53% (teóricamente 11,6%)

265 $[\alpha]_D^{24} -1222 \text{ (c 0.5, 50% AcOH (aq))}$

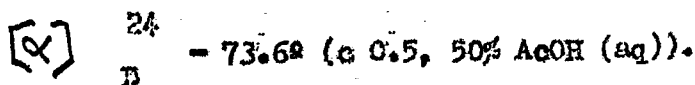
IX. ~~H-Phe-Pro-Arg~~-pNA.2HCl

Realizado según VIII.

Rendimiento: (71%)



270 Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en A (R_f : 0,22)
 Contenido en cloruro 11,0% (teóricamente 11,6%).

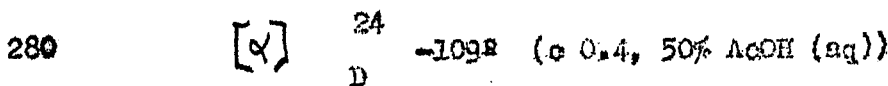


X. H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl

275 Realizado según VIII.

Rendimiento: (72%).

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en A (R_f : 0,44)
 Contenido en cloruro 11,4% (teóricamente 11,3%)

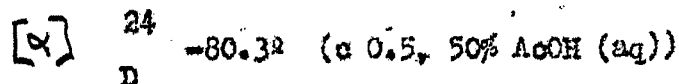


XI. H-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl

Realizado según VIII.

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en A (R_f : 0,41).

285 Contenido en cloruro 11,3% (teóricamente 11,3%)



XII. Cho-D-Tyr (OEt)-Pip-Arg(NO₂)-pNA.

290 Realizado según IV.

Rendimiento: 3,2 grs (75%).

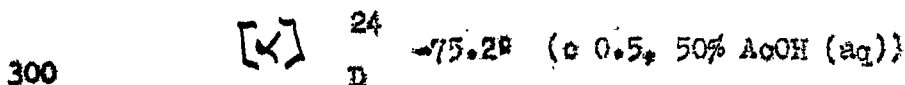
Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_f : 0,50).

XIII. H-D-Tyr-Pip-Arg-pNA.

Realizado según VIII.

295 Rendimiento: (68%).

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_f : 0,44).
 Contenido en cloruro 10,8% (teóricamente 11,1%).





XIV. Cbo-Aze-Arg(NO₂)-pNA

Realizado según II

Rendimiento: 4,2 g (75%)

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_f: 0,27).

305

XV. Cbo-D-Phe-Aze-Arg(NO₂)-pNA

Realizado según IV

Rendimiento: 2,4 g (69%)

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_f: 0,47).

XVI. H-D-Phe-Aze-Arg-pNA.2HCl

310

Realizado según VIII

Rendimiento: (71%).

Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en A (R_f: 0,21)

Contenido en cloruro 11,6% (teóricamente 11,9%).

315

[X] 24
D -130° (o 0.5, 50% AcOH)

XVII. Cbo-Arg(NO₂)-βNA

320

7,2 gramos (20 milimoles) de Cbo-Arg(NO₂)-OH se disuelven en 400 ml de THF. Se añaden 2,0 grs (20 milimoles) de Et₃N, con lo que la solución se enfría a -10°C bajo condiciones completamente exentas de humedad. 2,7 g. (20 milimoles) de isobutilcloroformato disueltos en 20 ml. de THF se añaden a la solución enfriada durante 10 minutos y después de transcurridos otros 10 minutos se agregan 344 grs (20 milimoles) de β-naftilamina. La mezcla de reacción se deja alcanzar la temperatura del recinto y se deja a esta temperatura durante 24 horas. La mezcla de reacción se evapora en vacío a sequedad, se trata 3-5 veces con agua destilada, 3-5 veces con una solución de bicarbonato sódico al 5% y de nuevo 3-5 veces con agua destilada, después de lo cual se seca en vacío. El producto se disuelve en MeOH y es objeto de cromatografía en una columna de Sephadex(R)

330

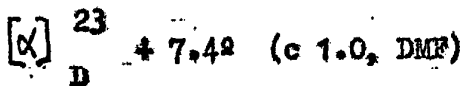


LH-20, se esponja y eluye con MeOH. El producto obtenido es homogéneo de acuerdo con TLC en P₁.

Rendimiento: 8,1 g. (84%).

ANÁLISIS: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,40)

335



XVIII. Cbo-Pip-Arg(NO₂)-βNA

Realizado según II.

340

Rendimiento: 4,8 g. (82%).

ANÁLISIS: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,36)

XIX. Cbo-D-Phe-Pip-Arg(NO₂)-βNA

Realizado según IV.

Rendimiento: 2,6 g (71%).

345

ANÁLISIS: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,48)

XX. H-D-Phe-Pip-Arg-βNA.2HCl

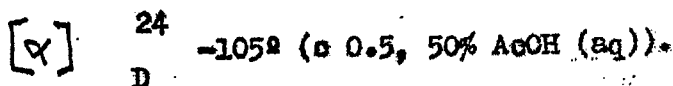
Realizado según VIII.

Rendimiento: (68%).

ANÁLISIS: Homogéneo de acuerdo con TLC en A (R_F: 0,44

350

Contenido en cloruro 11,2% (teóricamente 11 y 11,3%)



XXI. Cbo-Arg(NO₂)-βNA (4-OMe)

355

Realizado de conformidad con XVII.

Rendimiento: 7,1 g (70%)

ANÁLISIS: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,42).

XXII. Cbo-Pip-Arg(NO₂)-βNA (4-Ome)

Realizado según II.

360

Rendimiento: 4,9 g (79%).

ANÁLISIS: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,38)



XXIII. Cho-D-Phe-Pip-Arg(NO₂)-βNA (4-OMe)

Realizado según IV.

Rendimiento: 2,7 g (70%).

365 Análisis: Homogéneo de acuerdo con TLC en P₁ (R_F: 0,51)

XXIV. H-D-Phe-Pip-Arg-βNA (4-OMe)·2HCl

Realizado según VIII.

Rendimiento: (64%).

Análisis: Homogéneo según TLC en A (R_F: 0,44)

370 Contenido en cloruro 10,4% (Teóricamente el 10,7%)

[α]_D²⁴ -102° (c 0.5, 50% AcOH (aq))

Determinación de la trombina por medio de sustratos cromogénicos:

375 Los sustratos preparados de acuerdo con los ejemplos se utilizan para la determinación de la trombina tal como se expone a continuación.

El principio de determinación se basa en el hecho de que el producto de descomposición formado por hidrólisis enzimática tiene un espectro ultravioleta que es esencialmente diferente del correspondiente al

380 sustrato. Así, el sustrato según el ejemplo X, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA

tiene un máximo de absorción a 315 nm y el coeficiente de extinción molar es de 12500. A 405 nm., la absorción del sustrato se ha determinado casi completamente. La p-Nitroanilina, eliminada del sustrato

385 durante la hidrólisis enzimática, tiene un máximo de absorción a 380 nm y un coeficiente de extinción molar de 13200 que a 405 nm solamente

disminuye a 9620. Es, pues, posible mediante la determinación espectrofotométrica a 405 nm. seguir fácilmente la cantidad de p-nitroanilina formada, que es proporcional al grado de hidrólisis enzimática,

390 que a su vez se determina por la cantidad activa de trombina. Para otros sustratos según la invención se tienen condiciones bastante

idénticas y por esta razón, la determinación se ha realizado normalmente a 405 nm.

La Tabla I muestra una comparación de las velocidades de reacción
relativas entre el sustrato de trombina anteriormente mencionado -
400 S-2150, su forma no benzilada y el sustrato de acuerdo con la in-
vención. Esta Tabla indica claramente la superioridad de los sub-
stratos según la invención. Reaccionan 4 veces más rápidamente con
trombina que el mejor sustrato antes mencionado, S-2160 y además
es una 10 veces más soluble en agua que el S-2160

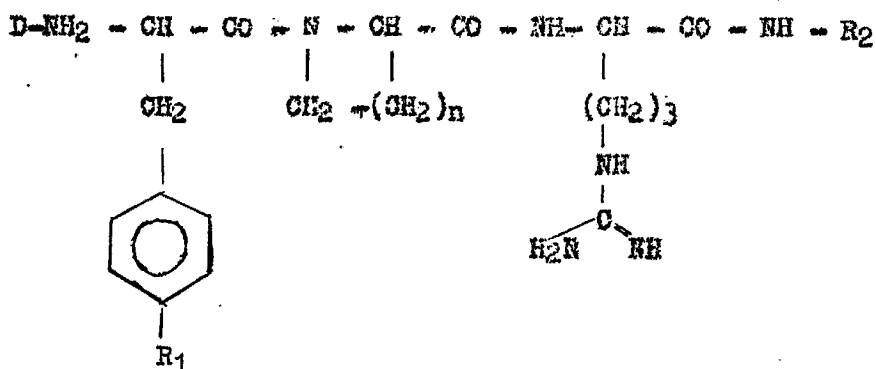
405	Substrato	Velocidad de reacción re- lativa.	Solubilidad en el agua (mg/ml)
	A (S-2160) Bz-Phe-Val-Arg-pNA	100	0.1
	B H-Phe-Val-Arg-pNA	3	3
410	IX H-Phe-Pro-Arg-pNA	15	1
	VIII H-D-Phe-Pro-Arg-pNA	400	3
	XI H-Phe-Pip-Arg-pNA	9	1
	X H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	420	3

Tabla I

415 Velocidad de reacción relativa entre trombina (0,4MIH/ml) y --
sustrato (0,1 micromol/ml).

REIVINDICACIONES

420 la.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE NUEVOS SUBSTRATOS CROMOGENICOS
PARA TROMBINA y enzimas similares a la trombina, diagnosticamen-
te activos y con una alta especificidad, caracterizados por el hecho
de que tienen la fórmula general:



425

430 y sales de este compuesto, en donde R₁ es hidrógeno o hidroxilo, R₂ es nitrofenilo, naftilo o metoxinaftilo y n es 1, 2 o 3, caracterizado porque se procede a la unión escalonada de los aminoácidos al grupo arginilo terminal C ya suministrado con un grupo cromóforo copulado que funciona como un grupo protector carboxilo o proporcionado con un grupo protector carboxilo desdoblable.

435 2ª.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NUEVOS SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA TROMBINA; y enzimas similares a la trombina, de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado porque a continuación el grupo cromóforo se une al derivado de tripéptido protegido o alterativamente se sintetiza el fragmento de dipéptido terminal "N" que luego se une al grupo arginilo con o sin un grupo cromóforo.

440 3ª.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NUEVOS SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA TROMBINA; y enzimas similares a la trombina, de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se lleva a cabo una purificación de los productos intermedios y finales por medio de la cromatografía de filtración de gel puesto.

445 4ª.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NUEVOS SUBSTRATOS CROMOGENICOS PARA TROMBINA. - - - - -

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

Madrid, 9 JUL. 1976

AKTIENGLAUBE KABI.

P.p.

