

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

ES 11  
21  
NUMERO 479072  
Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria a. J. W. S.  
FECHA DE PRESENTACION 29 MAR 1979

PATENTE DE INVENCION

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO P 28 13 772.6	62 FECHA 30 de marzo de 1.978	63 PAIS República Federal Alemana.
64 FECHA DE PUBLICIDAD	65 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07C 103/52; G01N 33/16	66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
67 TITULO DE LA INVENCION PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DEL ACETILFENILALANIL- ARGININ-ETILESTER.		
67 SOLICITANTE (S) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.		
68 INVENTOR (ES) Dr. Franz Fiedler,		
69 TITULAR (ES)		
70 REPRESENTANTE GOMEZ ACEBO.		

La presente invención se refiere al nuevo derivado dipéptido  $\alpha$ -N-acetil-L-fenilalanil-L-arginin-etiléster (forma abreviada: Ac-Phe-Arg OEt) y sus sales de adición de ácido, así como a su empleo como sustrato de calicreina, preferentemente para ser usado en la determinación diagnóstica del contenido de calicreina, preferentemente de pequeñas cantidades de calicreina, tal y como se presentan, por ejemplo, en la orina ó saliva.

Debido al papel de la calicreina (EC 3.4.4.21) en la regulación de la presión sanguínea ó en la función renal, la determinación de la calicreina en la orina es diagnósticamente importante.

Debido a las reducidas cantidades de calicreina en la orina resulta extraordinariamente difícil efectuar una determinación fiable del contenido de calicreina en la orina. Los métodos hasta ahora conocidos tienen las siguientes desventajas: el Z-Tyr-p-nitrofeniléster es un sustrato sensible para la calicreina de la orina, pero sin embargo menos sensible que el compuesto según la presente invención y la hidrólisis espontánea se desarrolla muy rápidamente.

Además, recientemente se ha introducido la D-Valil-leucil-arginin-p-nitranilida (D-Val-Leu-Arg-p-nitranilid S 2266 KABI, Mölndal) como sustrato para la calicreina de las glándulas. El método de determinación con los compuestos de la presente invención es, sin embargo, 38 veces más sensible.

Un método de determinación muy sensible para la calicreina de la orina es posible con ayuda de Tos-Arg-OMe (Tosylarginimetiléster-TAME) radiactivamente marcado (Beaven et al; Clin. Chim. Acta 32, 67 - 73). Este método exige, sin

embargo, un equipo muy especial y costoso y un calibrado empleando un preparado standard de calicreina de la orina, y no permite un registro continuo de la reacción.

5 Por el contrario, la sensibilidad de la determinación de calicreina al emplear Ac-Phe-Arg OEt como sustrato es ampliamente suficiente para realizar una determinación cómoda y sin problema alguno de la calicreina, por ejemplo, en la orina ó en la saliva.

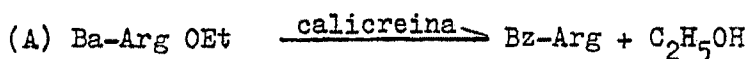
10 La enzima calicreina pertenece al grupo de las hidrolasas de los peptidilpéptidos y se destaca, en comparación con la mayoría de las enzimas de esta clase por una alta especificidad del sustrato. Mediante disociación de dos enlaces péptido libera las quininas farmacológicamente extremadamente activas solo de la glicoproteína que se presenta en la fracción globulina de suero y que se denomina quinínogeno.

15 La actividad de calicreina se puede determinar cuantitativamente con ayuda de su acción hipotensiva en el animal de ensayo mediante comparación con un preparado standard (Padutin <sup>®</sup>, calicreina standardizada del páncreas del credo) (E.K. Frey et. al.: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke-Verlag, Stuttgart 1968). Este método es sin embargo relativamente inexacto.

20 Otro método biológico para determinar la calicreina comprende la cantidad de quinina liberada por unidad de tiempo que se puede determinar, asimismo en comparación con un preparado de quinina standard, mediante medición de la acción de contracción en el útero ó intestino (E.K. Frey et. al.: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke-Verlag Stuttgart 1968). Como método biológico este método es asimismo relativamente inexacto y costoso.

Más sencillo y exacto que en los dos métodos de determinación biológicos anteriormente mencionados es la medición óptica de la actividad a base del efecto disociador del éster de la calicreina.

5 Como sustrato para la medición de la actividad estereolítica de la calicreina es preferentemente adecuado el benzoil-L-argininetil-éster (Bz-Arg OEt = BAEE). Véase a este respecto: Methoden der enzymatischen Analyse tomo I, 1071 - 1080, Weinheim 1974. En principio de este método se puede representar brevemente como sigue:



15 teniendo las abreviaciones empleadas en las fórmulas anteriores el siguiente significado:

Bz-Arg OEt = benzoilargininetiléster

Bz-Arg = benzoilarginina

NAD<sup>⊕</sup> = forma del NAD cargada positivamente (dinucleotido de nicotinamidoadenina)

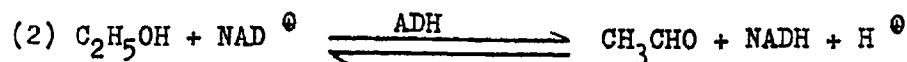
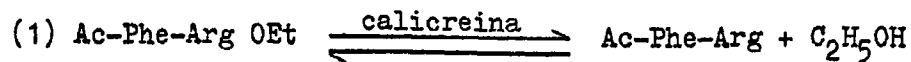
20 ADH = dehidrogenada de alcohol (de levadura)

NADH = forma del NAD reducida (reducida en la parte piridina).

25 El equilibrio (A) se encuentra ampliamente en el lado de los productos de disociación. De la disociación de Ba-Arg OEt se desprenden 5 posibilidades para la determinación de la actividad. Lo más seguro y sencillo es la medición enzimática de la cantidad de etanol liberada en reacción copulada (véase a este respecto la ecuación (B)). La cantidad de etanol reaccionada por unidad de tiempo, medido en 30 el aumento de la extinción de NADH a una longitud de onda

determinada (por ejemplo a 340, 334 ó 365 nm) es una medida para la actividad de la calicreina.

La determinación de la calicreina con ayuda del sustrato según la presente invención se efectúa en analogía al procedimiento Bz-Arg OEt según el principio siguiente:



(Ac-Phe-Arg: acetilfenilalanilarginina).

El principio corresponde por lo tanto al descrito por Trautschold y Werle 1961 (benzoilargininetiléster Bz-Arg OEt = BAEE como sustrato), siendo solo la sensibilidad de la determinación con Ac-Phe-Arg OEt en el factor 46 superior. Las reacciones no enzimáticas competitivas (por ejemplo la hidrólisis) son comparativamente reducidas.

La reacción se puede seguir y registrar en forma continua en un fotómetro espectral, por ejemplo, a 366 ó 340 nm.

La cantidad de etanol reaccionada según la ecuación (2) por unidad de tiempo, medido en el incremento de la extinción de NADH es una medida de la actividad de la calicreina.

La cantidad de NADH que se forma según la ecuación (2) se puede determinar según los métodos siguientes:

- a) Procedimiento manual (ensayo UV) con fotómetro espectral ó fotómetro de líneas espectrales, medición de la extinción NADH.
- b) Terminación en el analizador automático: el mismo principio que para a).
- c) Procedimiento fluorimétrico: el NADH formado por unidad

de tiempo (véase ecuación (2)) se convierte en un producto fluorescente, después de destruir el exceso en NAD mediante tratamiento con alcali fuerte. El aumento de la fluorescencia por unidad de tiempo es una medida para la actividad de la calicreina.

Además de por los métodos biológico-farmacológicos arriba mencionados se puede realizar la determinación de la actividad a base de la disociación esterolítica de Ac Phe-Arg OEt (según la ecuación (1)), además mediante los siguientes métodos conocidos para el Bz-Arg OEt:

- 1) Microtitración automática continua de los grupos carboxilo liberados (en analogía a Tautschold und Werle Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)).
- 2) Determinación volumétrica de los grupos carboxilo con hidrogenocarbonato/tampón de CO<sub>2</sub> (en analogía a la literatura mencionada bajo 1)).
- 3) Determinación de la formación de éster como ensayo de color (en analogía a S. Hestrin, J. biol. Chem 180, 249 (1949)).

En la parte experimental a continuación tienen las abreviaciones ó bien marcas allí utilizadas los siguientes significados:

Ac-Phe-Arg OEt: acetilfenilalanil-argininetiléster

L-Arg OEt . 2 HCl: Hidrocloruro del L.argininetiléster

(= L- $\alpha$ -amino- $\delta$ -guanidil-valerianato de etilo)

CM-Sephadex<sup>®</sup>C-25: un gel de polidextrano transversalmente reticulado, sustituido por grupos carboximetilo.

Ac-Phe-Arg= acetil-fenilalanil-arginina

Bz-Arg OEt = benzoilargininetiléster  
 NAD = forma reducida del nicotinamido-adenin-dinucleo-  
 tido (reducido en la parte piridina)  
 Ac-Phe-Arg OEt = acetil-fenilalanil-argininetiléster  
 5 ADH = dehidrogenasa de alcohol de levadura  
 Phe = fenilalanina  
 Arg = arginina  
 HOAC = ácido acético

1) Síntesis de Ac-Phe-Arg OEt

10 a) L-Arg OEt . 2 HCl. En analogía a la obtención del corres-  
 pondiente éster de metilo en R.A. Boissonnas, S. Guttman,  
 R.L. Huguenin, P.-A. Jaquenod, E. Sandrin, Helv. Chim.  
 Acta, 41, 1867 (1958). 30 cc de etanol se enfrían a  $-10^{\circ}\text{C}$   
 y en el transcurso de 30 min se mezcla con 4,75 cc (65 mmc-  
 15 les) de cloruro tionílico.

Después de agregar 10,5 g (50 mmoles) de 1-argi-  
 nin . HCl se mantiene el preparado durante 90 minutos en  
 el refrigerador de reflujo bajo agitación y exclusión de  
 humedad a  $45^{\circ}\text{C}$  y después se sigue agitando durante la no-  
 20 che a temperatura ambiente. Se obtienen 8,0 g (58%) del  
 éster. La recristalización se efectúa en etanol. Punto  
 de fusión (sin corregir)  $119-120^{\circ}\text{C}$ . G. Weitzel, R. Renner,  
 H. Guglielmi, Hoppe-Seyler's. Physiol, Chem. 352, 1617  
 (1971) indica un p.f. de  $115^{\circ}\text{C}$  (síntesis con etanol/HCl).

25  $[\alpha]_{\text{D}}^{27^{\circ}\text{C}} = + 11,6^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$  (c = 2 en agua).

Análisis:

Calculado C 34,92%; H 7,33%; N 20,36%.

Hallado C 34,90%; H 7,24%; N 20,70%.

30 El producto resulta unitario en el cromatograma  
 de capa delgada (gel de sílice; eluyente: n-butanol-ácido

acético glacial-agua 80:20:20 y n-butanol-piridina-ácido acético glacial-agua 40:10:10:20; teñido con el reactante de Sakaguchi y con cloro-tolidina) también al aplicar 200 nmoles.

5 b) Ac-Phe-Arg OEt . HOAC

0,829 g (4 mmoles) de N-acetil-L-fenilalanina se disuelven en 40 cc de dimetilformamida. Se agregan 1,10 g (4 mmoles) de dihidrocloruro de L-arginin-etiléster finamente pulverizado, 0,56 cc (4 mmoles) de trietilamina y 0,69 g (6 mmoles) de N-hidroxisuccinimida, y el preparado se enfría a  $-15^{\circ}$ . Después de agregar 0,91 g (4,4 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida se agita durante 7 horas a  $-5^{\circ}\text{C}$ , durante la noche a  $5^{\circ}\text{C}$  y durante 5 horas a temperatura ambiente. El precipitado se separa por diltración y la solución se evapora en el evaporador rotativo hasta casi sequedad. Después de recoger en 80 cc de agua se ajusta el pH a 6,0 con trietilamina y la solución se aplica sobre una columna (1,5 x 40 cm) equilibrada con CM-Sephadex <sup>®</sup> C-25, con 0,05 moles de trietilamonioacetato del pH 6,0. Se eluye con un gradiente ascendiente lineal a 0,2 moles de trietilamonioacetato, pH 6,0 (720 cc; 50 cc/h; magnitud de la fracción 8 cc). Las fracciones 75-110, que después de aplicar sobre papel filtrante y pulverización con reactante según Sakaguchi contienen la cantidad principal del material hervido, se liofilizan. Los residuos reunidos se mezclan con 0,5 cc de etanol y se precipita con 60 cc de acetato de etilo. El precipitado se seca en el secador sobre pentóxido de fósforo. Rendimiento: 1,28 g  $\hat{=}$  71% p.f. (sin corregir).  $81 - 85^{\circ}\text{C}$   $[\alpha]_D^{27} = -9,8^{\circ} + 0,3^{\circ}$  (c = 2 en agua).

Análisis:

Calculado C 55,86%; H 7,37% ; N 15,51%.

Hallado C 55,57%; H 7,58% ; N 15,08%.

5 Unitario en la cromatografía de capa delgada bajo las condiciones de arriba; después de la hidrólisis con tripsina de res solamente se podía demostrar Ac-Phe-Arg. Titra-  
ción con lejía después de la hidrólisis del éster con tripsina de res: 100,2% de la teoría.

10 Análisis de los aminoácidos después de la hidrólisis de HCl: Phe<sub>1</sub> Arg<sub>0,990</sub>;

Contenido en aminoácidos: 102,6% de la teoría.

2) Determinación de la calicreina en la orina humana con Ac-Phe-Arg OEt

15 (Basado en el ensayo con Bz-Arg OEt de I. Traut-schold y E. Werle, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325 (1961) 48-59).

En una cubeta con un espesor de capa de 1 cm, controlada termoestáticamente a 25,0°C, se mezclan:  
2,00 cc de tampón (0,15 moles de pirofosfato sódico, 0,15  
20 moles de hidrocloreuro de semicarbazida, 0,0375 moles de glicina; el pH ajustado a 8,7 con lejía sódica)  
0,10 cc de NAD (30 m moles en agua)  
0,10 cc de Ac-Phe-Arg OEt (como acetato; 15 mmoles en agua)  
0,020 cc de ADH (dehidrogenasa de alcohol de levadura, Boehringer; suspensión con 100 mg/3,4 cc).

25 Agua para ajustar el volumen final (después de adición de la muestra) a 3,00 cc. El preparado se incubaba previamente durante 5 minutos. Después se inicia la reacción  
30 mediante adición de 0,010 hasta 0,500 cc de muestra (solución de calicreina de orina humana purificada en agua). La cantidad

de la enzima se seleccionará de manera que el aumento de la extinción en 10 minutos se encuentre entre 0,05 y 0,2 unidades de extinción. Hasta el último valor la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de calicreina de orina. Comenzando 2 minutos después de la adición de la muestra se sigue el aumento de la extinción a 366 nm contra una cubeta de comparación con agua durante exactamente 10 minutos. En paralelo se lleva un ensayo ciego en el que la muestra de calicreina de la orina está sustituida por agua (por vía de trabajo es suficiente la determinación de 2 hasta 3 valores ciegos). Del aumento de la extinción de la muestra medido se calcula, después de restar el valor ciego con ayuda del coeficiente de extinción de la NADH la cantidad de la calicreina de la orina agregada en U (1 U corresponde a la hidrólisis de 1  $\mu$ Mol de Ac-Phe-Arg OEt por minuto bajo las condiciones de arriba). (Por mol de éster hidrolizado se libera un mol de etanol, que suministra el mol de NADH).

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para la obtención del acetilfenilalanil-arginin-etiléster, caracterizado porque N-acetil-L-fenilalanina se hace reaccionar en un disolvente orgánico en presencia de triálquilamina y un reactante aceptor de agua con L-argininetiléster, ó bien su hidrocioruro, y el producto de reacción se aísla según métodos usuales.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque N-acetil-L-fenilalanina se hace reaccionar en dimetilformamida con dihidrocioruro de L-argininetiléster en presencia de trietilamina y N-hidroxisuccinimida, y el producto de reacción se aísla por cromatografía en un gel de polidextrano transversalmente reticulado, conteniendo grupos carboximetilo y disolución a continuación en etanol y precipitación con acetato de etilo.

15

3.- Procedimiento para la obtención del acetilfenilalanil-argininetiléster, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

20 Esta Memoria consta de diez hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 29 MAR. 1979

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO

p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

