

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 773242 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **773242**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **31.10.1977**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **31.10.1977**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.06.1978**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

01.12.1976 SE 7613463

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Kabi Ab, Lindhagensgatan 133 S-11251 Stockholm, Sverige, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Claeson, Karl Göran, Sverige, SVERIGE, (SE)

2 • Aurell, Leif Erik, Sverige, SVERIGE, (SE)

3 • Simonsson Leif Roger, Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Spesifisiä kromogeenisiä entsyymisubstraatteja

Specifika kromogena enzymsubstrat

AKTIEBOLAGET KABI, S-112 87 Stockholm, Ruotsi

Spesifisiä kromogeenisiä entsyymisubstraatteja - Specifika
kromogena enzymsubstrat

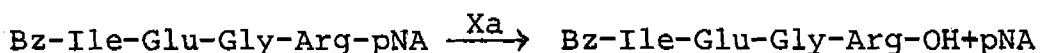
Tämä keksintö kohdistuu uudenlaisiin kromogeenisiin substraatteihin seriiniproteaaseja varten. Nämä uudet substraatit ovat sopivia tekijän Xa (E.C. 3, 4, 21.6) määrittämiseen tai niiden reaktioiden tutkimiseen, jotka aiheuttavat Xa:n muodostumista, inhiboitumista tai kulumista tai jopa sellaisten tekijöiden määrittämiseen, jotka vaikuttavat tai ottavat osaa näihin reaktioihin.

Tekijä X on avainaine veren koaguloitumiseen johtavassa reaktiosarjassa. Tekijän X aktivoituminen aiheuttaa proteolyyttisen entsyymin, tekijän Xa, muodostumisen, joka on välittömästi vastuussa protrombiinin muuntumisesta trombiiniksi. Tekijän Xa aiheuttamaan protrombiinin ~~trombiiniksi~~ muuntumiseen sisältyy kahden peptidisiidoksen halkaisu protrombiinimolekyylissä. Näitä kahta halkaisu-kohtaa edeltää täsmälleen sama aminohapposarja: -Ile-Glu-Gly-Arg-.

Yksinkertainen koagullatiotekijän Xa määrittäminen on erittäin arvokas diagnoositarkoituksia varten. Tähän saakka parhaita reagensseja tekijän Xa määrittämistä varten ovat kromogeeniset peptidi-

substraatit, joissa on amiinihapposarja -Ile-Glu-Gly-Arg-, joka vastaa luonnollisen substraatin, protrombiinin halkaisukohtia edeltävää sarjaa.

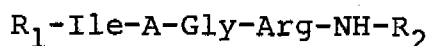
Substraatissa bentsoyyli-Ile-Glu-Gly-Arg, p-nitroanilidi (S-2222), joka on tämän sarjan paras substraatti, on aminohapposarja, joka on identtinen luonnollisen substraatin edellä käsitellyn osan kanssa. Tätä substraattia on jo käytetty esimerkiksi antifaktorin Xa ja hepariinin kliinisissä määrityksissä (A.N. Teien, M. Lie ja U. Abildgaard, Thrombosis Research 8, 413, 1976). Menetelmät perustuvat seuraavaan reaktioon:



Vapauteella p-nitroanilidilla (pNA) on substraattiin nähden valon absorptiomaksimi, ja entsymaattista reaktiota voidaan helposti seurata mittaamalla absorption suurenemista 405 nm:ssa, joka on suhteellinen aktiivisen tekijän Xa määrään.

Suuren määrän synteettisiä substraatteja tekijää Xa varten ovat selittäneet L. Aurell, G. Claeson, G. Karlsson ja P. Friberger julkaisussa Peptides 1976, p. 191, Proc. from the XIVth European Peptide Symposium, Weipon, Belgium, 1976. Luonnollisen sarjan aminohappoja vaihdeltiin. Ne korvattiin vuoron perään muilla samankaltaisilla aminohapoilla, mutta yhdessäkään tapauksessa ei saatu parempaa substraattia kuin S-2222. Hyvin pienetkin muutokset luonnollisessa sarjassa, kuten Ile:n korvaaminen Leu:lla, antaa substraatteja, joiden herkkyys on paljon pienempi.

Keksinnön mukaisia uusia kromogeenisiä substraatteja edustaa seuraava yleinen kaava:



tai sen suolat, jossa R_1 on asyyli, mieluimmin asetyyli tai bensoyyli; R_2 on p-nitrofenyyli, β -naftyyli tai 4-metoksi- β -naftyyli, so. aromaattisia ryhmiä, jotka antavat kromofoorin tai fluorisoiivan yhdisteen R-NH_2 , entsymaattisessa hydrolyysissä; A on Asp tai Glu, substituotuna karboksyyli-ryhmän osalta mieluimmin esteröimällä tai amidoimalla. Sopivat esterit sisältävät lyhyen alkyyl-, hydroksi-alkyyli-, substituoidun aminoalkyyli- tai sykloalkyyli-ryhmän. Sopivat amidit sisältävät mono- tai disubstituoidun lyhyen alkyyl-,

hydroksialkyyli- tai substituoidun aminoalkyyli-ryhmän, tai heterosyklisen ryhmän, jossa amidotyyppi muodostaa osan piperidiini-, morfoliini- tai piperatsiinirenkaasta.

Luonnollinen Glu:n γ -karboksiryhmä, joka biologisessa pH:ssa on negatiivisesti varattu ja hydrofiilinen, on keksinnön mukaan korvattu huomattavasti suuremmalla ryhmällä, joka on neutraali ja lipofiilinen. Koska aikaisemmat luonnollisen sarjan -Ile-Glu-Gly-Arg-muutokset ovat antaneet pelkästään huonompia substraatteja (L. Aurell, G. Claeson, G. Karlsson ja P. Friberger julkaisussa *Peptides* 1976, p. 191, Proc. from the 14th European Peptide Symposium, Weipon, Belgia. 1976), on varsin yllättävää, että keksinnön mukaan tehdyt verrattain suuret muutokset ovat johtaneet substraatteihin joilla on olennaisesti paremmat ominaisuudet (katso taulukko 1), kuin aikaisemmalla parhaalla substraattilla S-2222. Michaels'in vakion (K_m) raju aleneminen on huomiota herättävin, käytännöllisen työn kannalta tärkein näillä uusilla substraateilla saavutettu parannus. K_m on määritelmän mukaan se substraatin väkevyys, joka on tarpeen maksiminopeuden (V_{maks}) puolikkaan saavuttamiseen. Ennestään tunnettujen substraattien ja myös keksinnön mukaisten substraattien liukoisuudet ovat rajoitetut, ja tästä syystä substraatin konsentraation pitäisi olla alle 1 mM kun toimitaan puskuriliuoksessa ja veriplasmassa käytännön olosuhteissa. S-2222:n tapauksessa, jonka K_m on yhtä kuin 0,83 mM, voidaan käyttää täysin hyväksi vain puolet V_{maks} :ista, kun taas keksinnön mukaisten substraattien tapauksessa, joiden K_m on 2-5 kertaa alempi, voidaan paljon paremmin käyttää hyväksi maksiminopeutta. Näin ollen saavutetaan ilmeisiä etuja mitattaessa Xa-aktiviteettia näillä uusilla substraateilla. Niiden herkkyys on useita satoja prosentteja suurempi kuin S-2222:n herkkyys, mikä mahdollistaa paljon suuremman tarkkuuden, olennaisesti alemman herkkyysrajan ja paljon pienemmän verinäytteen tilavuuden.

Entsyymien määritykset kromogeenisten substraattien avulla sopivat varsin hyvin käytettäväksi autoanalysaattoreissa, ja näiden uusien substraattien parempi herkkyys saa aikaan lyhyemmän reaktioajan laitteessa ja niin ollen myös mahdollisuuden analysoida useampia näytteitä aikayksikköä kohti.

Keksinnön mukaisia substraatteja voidaan valmistaa kromogeenisista

tai fluorogeenisista substraateista, jotka sisältävät aminohapposarjan -Ile-Glu-Gly-Arg- ja vast. -Ile-Asp-Gly-Arg-, esteröimällä tai amidoimalla vapaa γ - tai β -karboksyyli-ryhmä peptidikemiassa vanhastaan tunnetuilla ja yleisesti käytetyillä menetelmillä.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavilla esimerkeillä.

Eluaattien ja tuotteiden ohutkerros-kromatograafisessa analyysissä käytettiin absorptioväliaineena lasilevyjä silikageelin F₂₅₄ (Merck) kanssa. Käytetyssä liuotinjärjestelmässä on kloroformia, metanolia, etikkahappoa ja vettä tilavuussuhteissa 34:4:9:2.

Ohutkerros-kromatografian jälkeen levyjä tutkittiin ensiksi UV-valossa (254 nm) ja sen jälkeen käyttämällä kloori/toluidiini-reaktiota (G. Pataki, Dünnschichtchromatografie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Walter de Gruyter & Co Berlin, p. 125, 1966) kehitysmenetelmänä.

Jäljempänä käytettyjen lyhennysten merkitykset ovat seuraavat:

Aminohapot:

Nämä lyhennykset koskevat aminohappojäännöksiä. Vapaa aminohappo tai peptidi ilmaistaan H:n avulla aminoryhmän ja -OH:n avulla karboksyyli-ryhmässä. Aminoryhmä ilmaistaan aina vasemmalla, karboksyyli-ryhmä oikealla.

Ellei toisin mainita, kaikki käytetyt aminohapot ovat L-muodossa.

Arg = arginiini

Asp = aspariinihappo

Glu = glutamiinihappo

Gly = glysiini

Ile = isoleusiini

Leu = leusiini

Muita lyhennyksiä:

Ac = asetyyli

AcOH = etikkahappo

Bz = bensoyyli

DCCI = disykloheksyylikarbodi-imidi

DMF = dimetyyliformamidi
 Et₃N = trietyyliamiini
 HOBT = α-hydroksibentsotriatsoli
 HOSu = N-hydroksisukkinimidi
 MeOH = metanoli
 OEt = etyylioksi
 OMe = metyylioksi
 OpNp = p-nitrofenoksi
 OisoPr = isopropyylioksi
 pNA = p-nitroanilidi
 QAE = kvaternaari amino-etyylisefaroosi (Pharmacia Fine Chemicals)
 SOCl₂ = tionyylikloridi

Esimerkki 1

Bz-Ile-Clu(OMe)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 748,2)

Kosteudettomissa olosuhteissa 0°C:ssa lisätään 0,5 ml:aan abs. metanolia 30 μl tislattua SOCl₂. Ensimmäisen vilkkaan reaktion jälkeen liuos jätetään n. 15 minuutiksi huoneen lämpötilaan, ja 75 mg (0,10 mmoolia) Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA · HCl (S-2222) lisätään. Liuosta hämmennetään 5 tuntia ja sitten se haihdutetaan. Saatu öljy liuotetaan pieneen määrään metanolia ja puhdistetaan geelikromatografialla kolonnissa, joka sisältää Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) metanolissa, käyttäen metanolia eluoimisaineena. Puhdas metyyliesteri, joka saadaan haihduttamalla metanoli pois, liuotetaan veteen ja lyofilisoidaan. Saanto: 30 mg (40 %).

Homogeenista TLC:n mukaan, R_f = 0,33

$\angle \alpha \gamma_D^{20} -40,3^\circ$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂)

Esimerkki 2

Bz-Ile-Glu(OEt)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 762,2)

Kosteudettomissa olosuhteissa -10°C:ssa 1,0 ml:aan abs. etanolia lisätään 60 μl tislattua SOCl₂. 30 minuutin kuluttua huoneen lämpötilassa lisätään 150 mg S-2222. Kun reaktio on päättynyt noin 15 tunnin kuluttua (TCl:n mukaan), liuos haihdutetaan. Saatu öljy liuotetaan pieneen määrään 30 % HOAc vedessä ja puhdistetaan kromatograafisesti kolonnissa, joka sisältää Sephadex G 15 (Pharmacia Fine Chemicals) 10 % HOAc sisältävässä H₂O:ssa. Eluaatista saatu puhdas etyyliesteri lyofilisoidaan.

Saanto: 70 mg (46 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, R_f = 0,40

$\angle \alpha \gamma_D^{20} -37,7^\circ$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂)

Esimerkki 3Bz-Ile-Clu(OisoPr)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 776,3)

Synteesi suoritetaan esimerkin 2 mukaisella menetelmällä, paitsi että etanolin sijasta käytetään absoluuttista isopropanolia. Reaktio päättyy 16 tunnin kuluttua. Kromatografia ja lyofilisointi suoritetaan esimerkin 2 mukaisin menettelyin.

Saanto 90 mg (58 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,44$

$\angle \alpha \gamma_D^{20} -36,4$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂O)

Esimerkki 4Bz-Ile-Glu(O-sykloheksyyli)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 833,3)

60 µl SOCl₂ lisätään 1,0 ml:aan kuivaa sykloheksanolia, ja 1 tunnin kuluttua huoneen lämpötilassa lisätään 200 mg S-2222. Kun reaktio on päättynyt noin 12 tunnin kuluttua, liuos haihdutetaan ja kromatografoidaan esimerkkien 2 ja 3 mukaisesti menetellen, minkä jälkeen tuote lyofilisoidaan.

Saanto: 170 mg (75 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,50$

$\angle \alpha \gamma_D^{20} -38,60$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂O)

Esimerkki 5Bz-Ile-Glu(O-CH₂CH₂N(CH₃)₂)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 859,8)

75 mg (0,10 mmoolia) S-2222 ja 100 mg (0,8 mmoolia) dimetyyliaminoetanoli-hydrokloridia liuotetaan 1,0 ml:aan kuivaa, tislattua DNF, minkä jälkeen 10 µl pyridiiniä, 10 mg HOBT (0,074 mmoolia) ja vihdoin 25 mg (0,12 mmoolia) DCCI lisätään. Muodostunut disykloheksyyliurea suodatetaan noin 24 tunnin kuluttua, ja DMF-liuos haihdutetaan alipaineessa. Jäljelle jäänyt öljy liuotetaan pieneen määrään 95 % MeOH - 5 % H₂O ja puhdistetaan kolonnissa joka sisältää QAE-25 ioninvaihdinta sen kloridimuodossa. Samaa liuotinseosta käytetään eluoimisaineena. Tällä menettelyllä dimetyyliaminoetyyliesterin hydrokloridi saadaan vapaana muista peptideistä, mutta sisältää eräitä pienempiä epäpuhtauksia, esimerkiksi dimetyyliaminoetanoli-hydrokloridia. Dimetyyliaminoetyyliesterin sisältävä jae haihdutetaan ja puhdistetaan kromatograafisesti kolonnissa, joka sisältää Sephadex G 15 (Pharmacia Fine Chemicals) 10 % HOAc/H₂O:ssa. Puhtaan esterin liuos lyofilisoidaan.

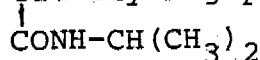
Saanto: 60 mg (58 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,50$

$\angle \alpha \gamma_D^{20} -35,0^\circ$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂O)

Esimerkki 6

Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 775,3)

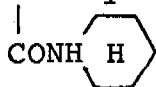


240 mg (0,33 mmoolia) S-2222 ja 45 mg (0,39 mmoolia) HOSu liuotetaan 1 ml:aan kuivaa tislattua DMF. Liuos jäädytetään -5°C:een ja 120 mg (0,58 mmoolia) DCCI lisätään. Lämpötilan annetaan nousta huoneen lämpötilaan, ja 4 tunnin kuluttua liuos jälleen jäädytetään 0°C:een ja saostunut disykloheksyyliurea suodatetaan ja pestään. DMF-liuos (noin 2 ml) jäädytetään 0°C:een ja 0,1 ml puhdasta isopropyylimiiniä lisätään. Noin 70 tunnin kuluttua huoneen lämpötilassa liuos haihdutetaan alipaineessa, siihen sekoitetaan 5 ml vettä ja haihdutetaan taas. Tuote liuotetaan noin 4 ml:aan 50 % HOAc/H₂O ja puhdistetaan kromatografisesti kolonnissa, joka sisältää Sephadex G15 (Pharmacia Fine Chemicals) 33 %:ssa HOAc/H₂O. Samaa liuotinseosta käytetään eluomisaineena. Puhdaan isopropyylimidin sisältävä jae haihdutetaan ja ionivaihdetaan kolonnissa, joka sisältää kvaternaaria aminoetyylisefarooseja QAE25 (Pharmacia Fine Chemicals) sen klorodimuodossa 95 % MeOH 5 % H₂O:ssa. Eluaatti haihdutetaan, liuotetaan veteen ja lyofilisoidaan.

Saanto: 120 mg (47 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,39$ $\angle \alpha_D^{25} -30,6^\circ$ (c 0,5, MeOH)Esimerkki 7

Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 802,3)

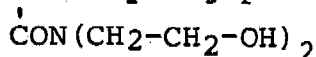


Synteesi suoritetaan esimerkin 6 mukaisella menetelmällä, paitsi että isopropyylimiinin sijasta käytetään piperidiiniä.

Saanto: 105 mg (40 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,50$ $\angle \alpha_D^{25} -34^\circ$ (c, 0,5, MeOH)Esimerkki 8

Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 822,3)



Synteesi suoritetaan esimerkin 6 mukaisella menetelmällä, paitsi että isopropyylimiinin sijasta käytetään dietanoliimiä.

Saanto: 120 mg (45 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,25$ $\angle \alpha_D^{25} -31^\circ$ (c 0,5, MeOH)

Esimerkki 9Bz-Ile-Asp(OisoPr)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 762,3)

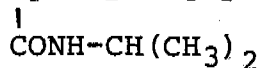
30, ul tislattua SOCl₂ lisätään 0,5 ml:aan kuivaa isopropanolia ja 30 minuutin kuluttua huoneen lämpötilassa lisätään 73 mg (0,10 mmoolia) Bz-Ile-Asp-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 720,2). Kun reaktio on päätynyt noin 18 tunnin kuluttua, liuos haihdutetaan, kromatografoidaan ja lyofilisoidaan, menetellen kuten esimerkeissä 2, 3 ja 4.

Saanto: 32 mg (42 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,46$ $[\alpha]_D^{23} -22,7^\circ$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂O)Esimerkki 10Bz-Ile-Asp(Oet)-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 748,2)

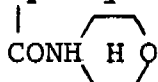
Synteesi suoritetaan esimerkin 9 mukaisella menetelmällä, paitsi että isopropanolin sijasta käytetään etanolia.

Saanto: 28 mg (37 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,40$ $[\alpha]_D^{23} -23,5^\circ$ (c 0,5, 50 % HOAc/H₂O)Esimerkki 11Bz-Ile-Asp-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 761,3)

Synteesi suoritetaan esimerkin 6 mukaisella menetelmällä, paitsi että lähtöaineena käytetään S-2222:n sijasta Bz-Ile-Asp-Arg-pNA · HCl:aa.

Saanto: 100 mg (40 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,40$ $[\alpha]_D^{25} -20,1^\circ$ (c 0,5, MeOH)Esimerkki 12Bz-Ile-Asp-Gly-Arg-pNA · HCl (mp. 818,3)

Synteesi suoritetaan esimerkin 11 mukaisella menetelmällä, paitsi että isopropyyliamiinin sijasta käytetään morfoliinia.

Saanto: 95 mg (35 %)

Homogeenista TLC:n mukaan, $R_f = 0,46$ $[\alpha]_D^{25} -24,2^\circ$ (c 0,5, MeOH)

Km:n ja Vmaks:n määrittäminen

Km ja Vmaks saadaan Lineweaver-Burk'in yhtälön avulla:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{S_o} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Entsyymi ja substraatti sekoitetaan puskuriliuokseen ja hydrolyysin nopeus mitataan spektrofotometrisesti. Substraatin konsentraatiota (S_o) vaihdella pitäen entsyymin konsentraatio vakiona. Keskinäinen nopeus $\frac{1}{v_o}$ piirretään sitten keskinäisen substraatin konsentraation $\frac{1}{S_o}$ funktiona ja Km ja Vmaks arvoidaan (taulukko 1) näin saadusta Lineweaver-Burk-diagrammasta.

Reagenssit

Puskuri Tris (tris(hydroksimetyyli)aminometaani) 0,05 moolia/l, pH = 8,3, I = 0,25 (NaCl)

Entsyymi Diageenia (6,4 Denson-yksikköä) (Diagnostic Reagents) 1 ampulli liuotetaan 2 ml:aan vettä.

Substraatti Substraatti liuotetaan veteen ad 2 mmoolia/l

Menetelmä Puskuria, + 37°C 2400-1850 μ l
 Entsyymiä, + 20°C 50 μ l } 2500 μ l
 Substraattia, + 37°C 50-600 μ l }
 Sekoitetaan ja absorptiokyvyn muutos ($\Delta OD/min$) luetaan 405 nm:ssa 37°C:ssa.

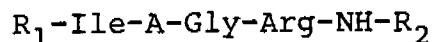
Relatiivinen aktiviteetti Puskuria, + 37°C 2200 μ l
 Entsyymiä, + 20°C 50 μ l
 Substraattia, + 37°C 250 μ l
 Sekoitetaan ja absorptiokyvyn muutos ($\Delta OD/min$) luetaan 405 nm:ssa ja 37°C:ssa.

Taulukko 1Km, Vmaks ja relatiiviset aktiviteetit

Substraatti	Km $\cdot 10^4$ moolia/l	Vmaks $\cdot 10^8$ moolia/min $\cdot U$	Relatiivinen aktiviteetti
S-2222	8,3	8,6	100
Esim. 1	2,6	8,1	230
Esim. 2	2,9	7,5	200
Esim. 3	2,1	7,1	220
Esim. 6	5,6	20,0	340
Esim. 7	1,7	8,6	300

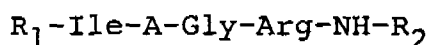
Patenttivaatimukset

1. Spesifiset kromogeeniset entsyymisubstraatit seriiniproteaaseja varten, t u n n e t u t siitä, että niitä edustaa seuraavat yleinen kaava:



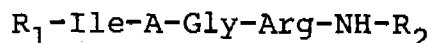
jossa kaavassa R_1 on asyyli, ensisijaisesti asetyyli tai bensoyyli; R_2 on p-nitrofenyyli, β -naftyyli tai 4-metoksi- β -naftyyli; A on Asp tai Glu, substituoituna karboksyyliryhmässä mieluummin esteröimällä tai amidoimalla, jolloin tarkoitetut esterit sisältävät lyhyen alkyyl-, hydroksialkyyl- tai substituoitun aminoalkyyli- tai sykloalkyyli-ryhmän, ja tarkoitetut amidit sisältävät mono- tai disubstituoitun lyhyen alkyyl-, hydroksialkyyl- tai substituoitun aminoalkyyli-ryhmän tai heterosyklisen ryhmän, jossa amidotyyppi muodostaa osan piperidiini-, morfoliini- tai piperatsiinirenkaasta.

2. Menetelmä seriiniproteaasien laboratoriodiagnooseja varten, t u n n e t t u niiden spesifisten kromogeenisten entsyymisubstraattien käytöstä, joita edustaa yleinen kaava:



jossa kaavassa R_1 on asyyli, ensisijaisesti asetyyli tai bensoyyli; R_2 on p-nitrofenyyli, β -naftyyli tai 4-metoksi- β -naftyyli; A on Asp tai Glu, substituoituna karboksyyli-ryhmästä mieluummin esteröimällä tai amidoimalla, jolloin tarkoitetut esterit sisältävät lyhyen alkyyl-, hydroksialkyyl- tai substituoitun aminoalkyyli- tai sykloalkyyli-ryhmän, ja tarkoitetut amidit sisältävät mono- tai disubstituoitun lyhyen alkyyl-, hydroksialkyyl- tai substituoitun aminoalkyyli-ryhmän tai heterosyklisen ryhmän, jossa amidotyyppi muodostaa osan piperidiini-, morfoliini- tai piperatsiinirenkaasta.

3. Menetelmä spesifisten kromogeenisten entsyymisubstraattien valmistamiseksi, joita edustaa yleinen kaava:



jossa kaavassa R_1 on asyyli, ensisijaisesti asetyyli tai bentsoyyli; R_2 on p-nitrofenyyli, β -naftyyli tai 4-metoksi- β -naftyyli; A on Asp tai Glu, substituoituna karboksyyli-ryhmässä mieluummin esteröimällä tai amidoimalla, jolloin tarkoitetut esterit sisältävät lyhyen alkyyl-, hydroksialkyyl- tai substituoitun aminoalkyyli- tai sykloalkyyli-ryhmän, ja tarkoitetut amidit sisältävät mono- tai disubstituoitun lyhyen alkyyl-, hydroksialkyyl- tai substituoitun amino-

alkyyli-ryhmän, tai heterosyklisen ryhmän, jossa amidotyyppi muodostaa osan piperidiini-, morfoliini- tai piperatsiinirenkaasta, t u n n e t t u siitä, että edellä mainittua yleistä kaavaa vastaava yhdiste, jossa A on substituoimaton Asp tai Glu, muunnetaan esterin tai amidin muotoon saattamalla Asp'n tai Glu'n vapaa karboksyyli-ryhmä reagoimaan sen alkoholin tai amiinin kanssa, joka vastaa tuloksena saatavaa substraattia, peptidikemiassa hyvin tunnetuilla ja yleisesti käytetyillä menetelmillä.