



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.151.35:547.466.1

### ХРОМОГЕННЫЕ И ФЛУОРОГЕННЫЕ ПЕПТИДНЫЕ СУБСТРАТЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

*Гершкович А. А., Кибирев В. К.*

*Институт биоорганической химии Академии наук УССР,  
Киев*

Обзор посвящен принципам конструирования хромогенных и флуорогенных субстратов протеолитических ферментов, главным образом сериновых протеиназ. Рассмотрены основы дизайна полипептидной цепи субстратов и способы детектирования продуктов их ферментативного гидролиза — хромогенных и флуорогенных групп. Приводятся сведения об использовании этих субстратов для изучения протеолитических ферментов, в частности для тестирования ферментов системы свертывания крови, а также применении их для клинической диагностики. Рассмотрены способы синтеза основных хромогенных и флуорогенных субстратов.

#### Содержание обзора

- Введение
- I. Принципы дизайна субстратов протеолитических ферментов
- II. Способы детектирования ферментативного гидролиза субстратов
- III. Практическое использование хромогенных субстратов
- IV. Применение хромогенных субстратов в медицине
- Заключение

#### Введение

Хромогенные и флуорогенные (в общем случае мы будем пользоваться термином «хромогенные») субстраты в течение многих лет широко используются в биологических исследованиях для изучения гидролаз — ферментов, расщепляющих белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды и др. Поскольку среди представителей этих биокатализаторов наиболее изучены протеолитические ферменты, большинство исследований, проведенных с использованием хромогенных субстратов, было посвящено изучению сериновых протеиназ, в особенности ферментов системы гемостаза. Стимулом для бурного развития соответствующих исследований явились доступность хромогенных субстратов, высокая чувствительность методов с их использованием, а также возможность применения педорого оборудования — обычных спектрофотометров и фотоколориметров — для контроля процесса ферментативного гидролиза. Внедрение высокоселективных пептидных хромогенных субстратов позволило эффективно изучать отдельные ферменты в смесях с другими протеиназами, что привело к созданию эффективных методов диагностики различных заболеваний.

---

Принятые сокращения: DMF — диметилформамид; Py — пиридин; НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, -OSu — N-гидроксисукцилимидная группа, Dns — дансил. Расшифровка остальных сокращений приведена в табл. 1, 2, 5, 6. Сокращенные названия аминокислот и защитных групп даны согласно правилам IUPAC — IUB. Все аминокислоты, кроме особо указанных, L-конфигурации.

Несмотря на наличие большого количества обзоров и монографий по этой теме, изданных за рубежом (например, [1-6]), на русском языке опубликован только один обзор Е. У. Раменского (1972 г.), посвященный анилидным субстратам [7], который, естественно, не отражает значительных достижений последних лет.

Так как наряду с рентгеноструктурным анализом субстратный анализ является мощным орудием изучения тонкого строения активных центров ферментов, хромогенные субстраты приобретают все большее значение в энзимологии и других смежных областях биологии, где применяются ферменты. Они, в частности, используются для изучения природы субстратной специфичности ферментов и определения их активности, исследования механизмов катализа, выяснения деталей действия разнообразных ингибиторов и т. д. Для конструирования хромогенных субстратов существует лишь несколько общих принципов, которые будут рассмотрены в данном обзоре. Ввиду ограниченности его объема будут представлены структуры только основных хромогенных и флуорогенных групп и соответствующих коммерческих субстратов, нашедших в настоящее время наиболее широкое применение. Более подробную информацию читатель найдет в оригинальных работах.

## 1. ПРИНЦИПЫ ДИЗАЙНА СУБСТРАТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

При создании субстратов протеолитических ферментов в первую очередь принимают во внимание так называемую *первичную специфичность* гидролаз, т. е. их способность расщеплять пептидные связи, образованные лишь определенными аминокислотными остатками. Первичную специфичность протеиназ устанавливают, анализируя структуру фрагментов, образованных при гидролизе природных субстратов (белков). Однако гораздо удобнее для этих целей использовать набор небольших синтетических субстратов, являющихся сложными эфирами, тиоэфирами или амидами различных ациламино кислот, способных расщепляться протеолитическими ферментами по эфирной или амидной связи. В табл. 1 приведены формулы распространенных субстратов протеиназ, сконструированных на основе специфической аминокислоты, соответствующей аминокислоте, локализованной в подцентре P<sub>1</sub> природного субстрата.

На ранних стадиях дизайна синтетических субстратов интерес исследователей в основном сосредоточивался на остатках аминокислот, образующих расщепляемую связь. Впоследствии было показано, что для многих ферментов скорость гидролиза белков и пептидов зависит также от так называемых вторичных взаимодействий, т. е. от строения участков

Таблица 1

Некоторые простые синтетические субстраты

Субстрат	Аббревиатура	Фермент (КФ)
Ac-Arg-Ome	AAAE	Трипсин (3.4.21.4)
Bz-Arg-OEt	BAEE	»
		Тромбин (3.4.21.5)
Tos-Arg-Ome	TAME	»
Ac-Lys-Ome	ALME	Трипсин
		Плазмин (3.4.21.7)
Z-Lys-ONp	ZLNPE	Трипсин
		Плазмин
Bz-Tyr-Ome	BTME	Химотрипсин (3.4.21.1)
Ac-Tyr-OEt	ATEE	»
Ac-Tyr-NH <sub>2</sub>	L-BAPNA	»
Bz-Arg-pNA		Трипсин

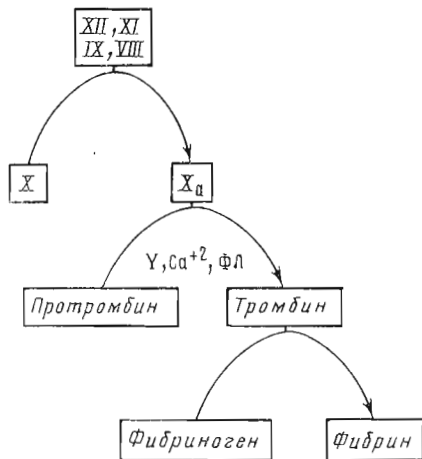


Рис. 1. Упрощенная схема каскадных процессов, происходящих на последнем этапе свертывания крови. V, XII, XI, IX, VIII — факторы свертывания, приводящие к активации фактора X; X<sub>a</sub> — активированный фактор X; ФЛ — фосфолипиды

субстрата, удаленных от расщепляемой связи. Для проявления этой *вторичной специфичности* важны аминокислоты, находящиеся по обе стороны от расщепляемой связи. Хасби и Смит [3] отмечают, что вторичные контактные зоны необходимы для «правильной» укладки полипептидного субстрата вдоль щели в активном центре фермента. Концепция протяженности связывающего участка предполагает, что у протеиназ (например, у папаина, химотрипсина, тромбина и др.) его длина соответствует шести-семи аминокислотным остаткам субстрата, причем место разрыва пептидной цепи локализовано среди тех семи остатков, которые могут связаться с ферментом в указанной щели [3].

Эта идея оказалась чрезвычайно полезной при изучении таких регуляторных сериновых протеиназ, как ферменты гемостаза, в частности важнейшего среди них — тромбина. Прежде чем перейти к рассмотрению субстратной специфичности тромбина, кратко рассмотрим его роль в системе свертывания крови. На рис. 1 крайне упрощенно представлена схема «каскада» свертывания [4]. Среди последовательности этих ферментативных реакций важнейшими являются превращение зимогена протромбина в тромбин и дальнейшее расщепление тромбином высокомолекулярного белка фибриногена до фибрин-мономера. Последний полимеризуется, образуя основу сгустка, останавливающего кровотечение. На последней стадии «каскада» тромбин расщепляет в фибриногене только четыре связи Arg-Gly, находящиеся вблизи N-концов цепей, что приводит к освобождению двух небольших фибринопептидов с каждой пары одинаковых A $\alpha$ - и B $\beta$ -цепей фибриногена. Таким образом, основная роль тромбина в гемостазе — отщепление четырех N-концевых пептидов от фибриногена [8]. Исследуя строение фибринопептидов A различных видов животных, Бломбэк с соавт. [9] отметили удивительную консервативность остатков Arg-16, Val-15 и Phe-8 и предположили, что высокая специфичность тромбина к фибриногену может определяться этими остатками. Действительно, синтетический пептид Bz-Phe-Val-Arg-OH оказался хорошим ингибитором свертывания, а синтезированный позднее хромогенный субстрат Bz-Phe-Val-Arg-pNA (S-2160) [10] является прекрасным субстратом тромбина. Следует отметить, что скорость расщепления связи Arg-X в других белках значительно ниже скорости гидролиза четырех аргинин-глициновых связей в фибриногене [8].

На рис. 2 изображена аминокислотная последовательность фибринопептида A (фрагмент 7-19 A $\alpha$ -цепи фибриногена). По предложению Шехтера и Бергера [11], аминокислоты в молекуле субстрата обозначаются буквой P, а соответствующие подцентры связывания фермента — буквой S. Согласно данным Шераги с соавт. [12, 13], фенилаланин P<sub>9</sub> в результате  $\beta$ -изгиба в полипептидной цепи располагается вблизи от расщепляемой связи. Таким образом, размещение остатка фенилаланина

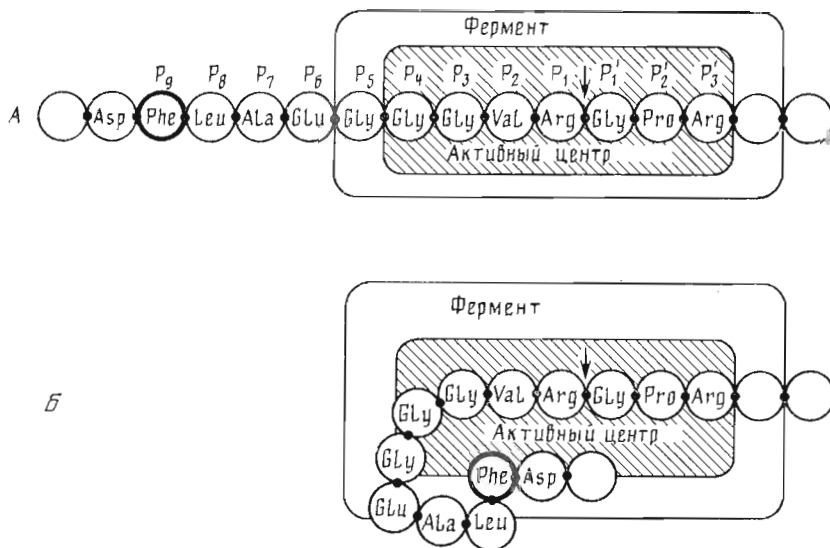


Рис. 2. Схематическое изображение вторичных связывающих участков для фибриногена в тромбине. А — линейное расположение аминокислотных остатков N-концевого участка  $\alpha z$ -цепи фибриногена; Б — предполагаемая локализация остатка фенилаланина ( $P_9$ ) в активном центре тромбина

в положении  $P_3$  синтетического субстрата в определенной мере моделирует природный субстрат.

Изучение природы аминокислот, определяющих вторичную специфичность ферментов, имеет не только большое теоретическое значение, но и практическое: для конструирования синтетических субстратов и ингибиторов ферментов. Специфический субстрат фермента должен быть построен с учетом структуры не только аминокислоты, локализованной в подцентре  $P_1$ , но и аминокислот вторичной контактной зоны.

Синтез пептидных хромогенных субстратов начался в 70-х годах и интенсивно продолжается в настоящее время; в особенности с целью изучения ферментов гемостаза. Использование именно пептидных субстратов, соответствующих высокой вторичной специфичности регуляторных ферментов системы свертывания крови, позволяет изучать отдельные энзимы в смеси с другими родственными ферментами.

Лучшим подходом к конструированию пептидной цепочки субстратов является имитация последовательности природного субстрата. Иногда она может отличаться от природной — производится замены отдельных остатков, вводятся *D*-аминокислоты или аминокислоты неприродного происхождения. Пригодность синтезированных субстратов определяют путем кинетического анализа ферментативной реакции. В табл. 2 приведены формулы некоторых распространенных хромогенных субстратов, созданных на основе известной последовательности в районе расщепляемой связи в природных субстратах, а в табл. 3 представлены данные относительной атакуемости различных нитроанилидов некоторыми ферментами гемостаза. Как видно, лучшими субстратами тромбина оказались те, у которых аминокислотная последовательность скоррелирована, т. е. отличается от структуры природного субстрата: Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Tos-Chromosym TH), *N-D*-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238). В первом из приведенных субстратов в подцентре  $P_2$  локализован пролин (подчеркнуто) — остаток, образующий изгиб в цепи. Этот субстрат гидролизует тромбином почти в 10 раз быстрее, чем S-2160. В двух других соединениях в подцентре  $P_2$  находятся структурные аналоги пролина — пипеколиновая кислота и азетидинкарбоновая кислота:

## Принципы построения пептидных субстратов

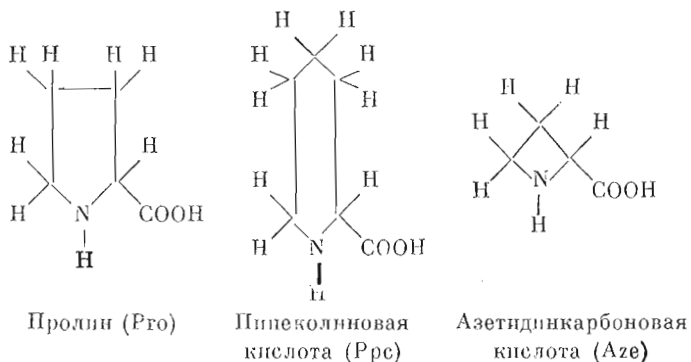
Фермент (КФ)	Природный субстрат	Расщепляемая последовательность	Синтетические субстраты			
			Имитирующие природную последовательность		Скоррелированные	
			Строение	Шифр	Строение	Шифр
Тромбин (3.4.21.5)	Фибриноген	-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly- ↓ Gly-Gly-Val-Arg-Gly- ↓ -Ile-Glu-Gly-Arg-Thr-Ser	Bz-Phe-Val-Arg-pNA	S-2160	H-D-Phe-Aze-Arg-pNA Tos-Gly-Pro-Arg-pNA Z-Gly-Pro-Arg-pNA H-D-Phe-Ppc-Arg-pNA Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA Pip	S-2383 Tos-Chromozym TH Cbz-Chromozym TH S-2238 S-2337
Фактор Ха (3.4.21.6)	Протромбин		Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA	S-2222		
Плазмин	Плазминоген	-Glu-Lys-Lys-Val-Trp- ↓			H-D-Val-Leu-Lys-pNA	S-2251
Каликреин плазмы (3.4.21.8)	Кининоген	-Ser-Leu-Met-Lys-Arg- ↓ -Ser-Pro-Phe-Arg-Ser ↓	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA	S-2302	H-D-Val-Leu-Arg-pNA	S-2266
Урокиназа (3.4.99.26)	Плазминоген	-Cys-Pro-Gly-Arg-Val- ↓	Bz-Val-Gly-Arg-pNA	Chromozym UK	pGlu-Gly-Arg-pNA	S-2444

Примечания: Glu — γ-глутаминовая кислота, pGlu — пироглутаминовая кислота; Ppc — пирролидиновая кислота; Aze — азетидинарбоновая кислота; подчеркнуты аминокислоты, существенные для дизайна синтетических субстратов.

## Атакующесть некоторых хромогенных субстратов различными ферментами [14]

Субстраты	Структура *	Тромбин	Фактор Ха	Плазмин	Трипсин	Субстраты	Структура *	Тромбин	Фактор Ха	Плазмин	Трипсин
S-2160	HK	36,69	0,035	1,18	20,85	Tos-Chromozym TH S-2222 S-2251	K	308,2	44,40	10,89	155,9
S-2238	K	241,5	0,104	2,04	23,73		HK	0,47	13,2	1,81	89,73
Cbz-Chromozym TH	K	178,8	0,094	4,98	83,3		K	0,40	0,12	26,2	37,8

\* K — коррелированные, HK — некоррелированные. Атакующесть субстратов выражена в кат/моль фермента. Катаг (kat) — международная единица фермента, соответствующая количеству фермента, способному вызвать превращение 1 моль субстрата в продукт в 1 с [14].



Интересно, что в недавно опубликованной работе Чапа [15] по изучению расщепления тромбином около 50 белков отмечено, что лучше всего ферментом гидролизуются последовательности типа  $P_4$ - $P_3$ -Pro-Arg, где  $P_3$  и  $P_4$  — гидрофобные остатки. Следует отметить, что скорость расщепления тромбином многих пептидных субстратов и некоторых белков с подходящей первичной структурой вблизи гидролизуемой связи [15] составляет лишь 5–10% от скорости расщепления фибриногена. Это наблюдение привело к представлению о существовании в тромбине так называемого дополнительного центра связывания макромолекулярных субстратов (фибриногена) [15–17], который локализован вне классического активного центра фермента. Кроме того, в работе [15] на белковых субстратах были подтверждены выводы о высокой вторичной специфичности тромбина, сделанные в результате исследований синтетических низкомолекулярных субстратов. Это свидетельствует о корректности использования низкомолекулярных модельных пептидов для изучения природы субстратной специфичности ферментов.

В качестве еще одного примера последовательности, наилучшим образом отвечающей вторичной специфичности фермента, можно привести исследование, проведенное Клаэссоном с соавт. [18], по созданию новых хромогенных субстратов калликреина плазмы. Авторы показали, что замена в субстрате S-2249 (Bz-Pro-Phe-Arg-pNA) бензоил-*L*-пролина на незащищенный *D*-пролин приводит к субстрату (S-2302), который расщепляется калликреином почти в 3 раза быстрее, чем S-2249. В работе [19] путем «проб и ошибок», т. е. введением различных остатков аминокислот в последовательность Bz- $P_3$ - $P_2$ -Arg-pNA (где  $P_3$  — Val, Leu, Ile, Phe;  $P_2$  — Val, Leu, Ile, Pro, Leu), были получены и испытаны в качестве субстратов калликреина 23 трипептида. Наиболее атакуемым оказался пептид строения Bz-Val-Leu-Arg-pNA. Однако при замене в нем Bz-*L*-валина на незащищенный *D*-валин синтезировали еще более подходящий для фермента субстрат (S-2266).

Таблица 4

Относительные скорости гидролиза субстратов Bz-Ile-Glu(X)-Gly-Arg-pNA фактором  $X_a$  [20]

Заместитель в $\gamma$ -карбоксовой группе Glu X	Относительная скорость гидролиза субстрата		
	Фактор $X_a$ быка	Фактор $X_a$ человека	Трипсин
—OH	100	100	100
—OMe	170	160	115
—OEt	190	190	110
—OPri	210	200	110
—NH <sub>2</sub>	120	120	110
—NHPr <sup>1</sup>	220	220	105
—N<img alt="piperidine ring structure" data-bbox="195 925 265 950"/> (Pip)	250	280	90

N-Ацильные группы, используемые в субстратах [3]

Группа	Символ	Характеристика
Бензоильная	Bz	Стабильна, обеспечивает ароматический связывающий участок для некоторых ферментов
Бензилоксикарбонильная	Z, Cbz	То же. Защитная группа в пептидной химии
<i>n</i> -Толуолсульфонильная	Tos	То же. Повышает растворимость субстратов
<i>tert</i> -Бутилоксикарбонильная	Boc	Кислотолабильная защитная группа в пептидной химии
Ацетильная	Ac	Стабильная малогидрофобная группа
Сукцинилльная	Suc	Используется для повышения растворимости субстратов в воде
Глутарильная	Glut	То же
Метилсукцинилльная	Suc(OMe)	То же, но отрицательный заряд блокирован
Пироглутаминовая кислота	pGlu	Часто обнаруживается на N-конце природных субстратов, придает им устойчивость к экзопептидазам

Интересный пример конструирования субстратов для фактора  $X_a$  приведен в работе [20]. В ней описано влияние на катализ модификации остатка глутаминовой кислоты в подцентре  $P_3$  последовательности Bz-Phe-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2222). Как видно из табл. 4, введение  $\gamma$ -пиперидил-амида глутаминовой кислоты вместо остатка Glu приводит к увеличению скорости гидролиза в 2,5 раза. Таким путем был получен лучший субстрат для фактора  $X_a$  — S-2337.

На подверженность субстратов атаке ферментом могут влиять не только аминокислотная последовательность и характер отщепляющейся при гидролизе группы, но и природа ацильных группировок, обычно применяемых для блокирования концевой аминогруппы субстратов. Иногда их вводят с целью изменения некоторых физико-химических свойств субстратов: гидрофобности, растворимости, заряда и др. Структура основных ацильных защитных групп приведена в табл. 5.

## II. СПОСОБЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА СУБСТРАТОВ

В природных (белковых) субстратах протеиназы гидролизуют пептидные связи. Детектировать образующиеся продукты довольно сложно, поэтому для определения активности гидролаз чаще используют синтетические субстраты, содержащие хромогенные или флуорогенные группы. При расщеплении ферментом пептидной, амидной или сложноэфирной (тиоэфирной) связи в молекуле субстрата уходящие группы могут быть небольшими пептидами, аминокислотами, аминами, фенолами или спиртами (меркаптанами).

Для вычисления кинетических констант  $K_m$  и  $K_{cat}$  строят график зависимости количества продуктов гидролиза от времени протекания реакции:  $P=f(t)$ . Таким образом, все существующие методы контроля гидролиза субстратов сводятся к способам определения количества образующихся в процессе реакции продуктов, для чего необходимо следить за изменением физико-химических свойств реакционной смеси в процессе гидролиза, величины pH, электропроводности, спектров поглощения в видимой или УФ-области, спектров флуоресценции и т. д. Наиболее простыми и эффективными оказались спектрофотометрические методы, которые получили широкое распространение. Ниже будут рассмотрены различные способы контроля гидролиза субстратов ферментами.

## II. 1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

### а) Метод автоматического титрования

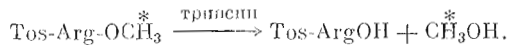
В результате гидролитической реакции происходит освобождение карбоксильной группы субстрата; во избежание снижения рН реакционной смеси производят автоматическое добавление раствора щелочи. Количество израсходованной щелочи пропорционально количеству расщепившегося субстрата в единицу времени. Метод используется при изучении гидролиза сложноэфирных субстратов [21].

### б) Электрический метод

Оригинальный способ измерения активности тромбина был предложен Арвином с сотр. [22]. Они использовали способность пептидных субстратов адсорбироваться на металлических поверхностях. При сорбции субстрата на платиновых электродах создается поверхностная емкость, которая измеряется автоматическим мостом. При гидролизе субстрата происходит его десорбция, что приводит к изменению емкости и разбалансировке моста. Скорость десорбции пропорциональна активности фермента в растворе, что позволяет построить график в координатах изменение напряжения в цепи моста — концентрация гидролизованного субстрата. Прибор прост в изготовлении и эксплуатации и имеет большое преимущество перед оптическими измерительными приборами, поскольку позволяет определять активность фермента в окрашенных и мутных растворах, что может оказаться важным при исследовании физиологических жидкостей. В указанной работе использовали субстрат S-2160, однако могут быть использованы и другие соединения, имеющие уходящие группы, которые способствуют адсорбции субстрата на электроде.

### в) Метод радиоактивной метки

Очень чувствительный способ детектирования гидролиза субстрата, предложенный Роффманом с соавт. [23], состоит в использовании разницы в растворимости субстрата и продукта реакции в двухфазной системе. При гидролизе меченного тритием ТАМЕ образуется  $[^3\text{H}]$ метанол, который распределяется между водной фазой и сцинтилляционным толуольным раствором. Реакцию проводят в сцинтилляционном флаконе, отщепившийся  $[^3\text{H}]$ метанол экстрагируют и измеряют его радиоактивность.



Степень гидролиза субстрата рассчитывают, измеряя радиоактивность (имп/мин) в начальный момент времени ( $A_0$ ), в момент времени  $t$  ( $A_t$ ) и после полного гидролиза ( $A_{100}$ ) по формуле

$$\text{Степень гидролиза} = \frac{A_t - A_0}{A_{100} - A_0} \cdot 100, \%$$

Чувствительность метода —  $4 \cdot 10^{-14}$  моль трипсина.

## II. 2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

### а) Методы с использованием спектров поглощения

При спектральном контроле процесса ферментативного гидролиза регистрируется изменение поглощения реакционной смеси, связанное с изменением распределения электронов в продуктах реакции. Принцип основан на том, что величина поглощения вещества при данной длине волны проходящего света пропорциональна концентрации поглощающего вещества (закон Ламберта — Бэра). Чувствительность метода зависит от молярного коэффициента поглощения соединений. Метод непригоден для исследования мутных растворов, рассеивающих свет.





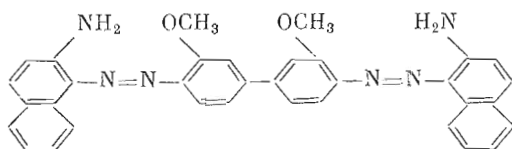
Основные методы работы с хромогенными субстратами включают следующие приемы:

1) непрерывное измерение поглощения реакционной смеси на автоматическом спектрофотометре;

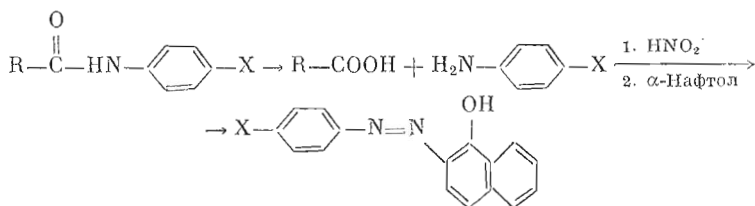
2) периодический отбор проб через определенные промежутки времени и измерение поглощения после предварительной остановки реакции (например, подкислением раствора);

3) метод «конечной точки». Реакцию останавливают до выхода на плато, т. е. когда скорость ее еще будет постоянной. Предварительно определив «конечную точку» для стандартной концентрации фермента, а затем для исследуемого образца, легко рассчитать активность используемого препарата фермента в исследуемом растворе.

Существуют два метода измерения поглощения реакционной смеси: прямое измерение поглощения отщепившегося хромогена и не прямое, которое производится после химической модификации отщепившейся группы, превращающей ее в краситель. Например, субстраты на основе  $\beta$ -нафтамина обычно детектируют флуориметрически, однако выделяющийся в результате гидролиза  $\beta$ -нафтамин можно (после остановки реакции) вводить в реакцию азосочетания с устойчивой солью диазония, полученной из 3,3'-диметоксибензидина, что дает азокраситель, поглощающий при длине волны 525 нм [3]:



Иной способ модификации был предложен Братеном и Маршаллом [27]. Ароматический амин, отщепляющийся в результате гидролиза субстрата, диазотируется и вводится в азосочетание с подходящими составляющими (обычно производными нафталина):



Другие примеры модификации детекторных групп будут рассмотрены ниже. Следует отметить, что рассмотренные выше способы детектирования «уходящих групп» используются и при работе с флуорогенными субстратами.

#### б) Методы с использованием спектров флуоресценции

Поглощение фотона некоторыми молекулами сопровождается последующим испусканием света с большей длиной волны, т. е. меньшей энергией. Флуоресценция измеряется под углом  $90^\circ$  по отношению к пучку падающего света. Явление потери энергии возбужденной молекулой при столкновении с другой молекулой называется тушением флуоресценции. Этот эффект может быть также вызван растворителем. Теоретически спектрофлуориметрия примерно в 100 раз чувствительнее спектрофотометрии, однако она требует более дорогостоящего оборудования и предъявляет более жесткие требования к чистоте используемых реагентов.

Способ контроля гидролиза флуорогенных субстратов можно проиллюстрировать на примере весьма распространенных субстратов, содержащих в качестве «уходящей группы» 4-метилкумарин-7-ил-аминогруппу (МСА), количество которого определяют по флуоресценции реакцион-

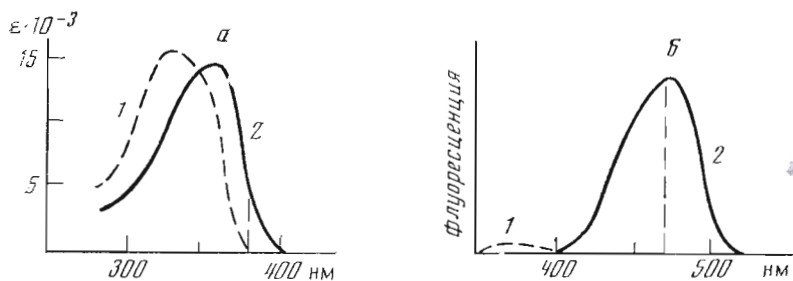
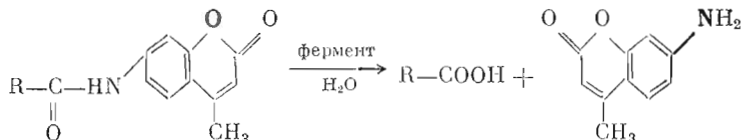


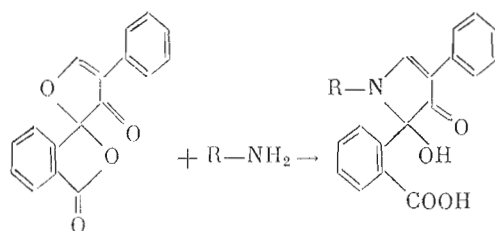
Рис. 4. Спектры поглощения (а) и флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} 380 \text{ нм}$ ) (б) метилкумариламида бензилоксикарбонил-аргинина (1) и 7-амино-4-метилкумарина (2)

ной смеси:



Как видно из рис. 4, максимум поглощения 7-амино-4-метилкумарина находится при длине волны 350 нм, где еще поглощает субстрат — 4-метилкумариламида бензилоксикарбонил-аргинина. Поэтому возбуждение производят светом с длиной волны 380 нм, при которой субстрат почти не поглощает, а спектры флуоресценции снимают при 460 нм. При этой длине волны интенсивность флуоресценции 7-амино-4-метилкумарина примерно в 500 раз выше, чем субстратов на его основе [28].

В качестве примера непрямого флуоресцентного детектирования можно привести способ контроля ферментативного гидролиза пептидной связи в полипептидах и белках при помощи флуорескамина [29]. Флуорескамин [30] является бесцветным соединением, которое при взаимодействии с первичными аминогруппами дает флуоресцирующий продукт:



Флуоресценцию этого продукта измеряют при 480 нм ( $\lambda_{\text{возб}} 390 \text{ нм}$ ).

Очень интересный способ детектирования ферментативного гидролиза субстратов по пептидной связи, основанный на явлении внутримолекулярного гашения флуоресценции, будет рассмотрен ниже в отдельном разделе.

В табл. 6 приведены формулы некоторых распространенных хромогенных и флуорогенных детекторных групп. Характеристики отдельных мало используемых групп будут приведены в тексте.

### III. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ

#### III. 1. ХРОМОГЕННЫЕ СУБСТРАТЫ

##### III. 1. 1. *p*-Нитроанилиды

Субстраты этой группы используются энзимологами уже более 50 лет (история вопроса хорошо освещена в обзоре [7]) и в настоящее время являются самыми распространенными субстратами протеиназ. Этому способствовали простота определения продукта гидролиза спектрофото-

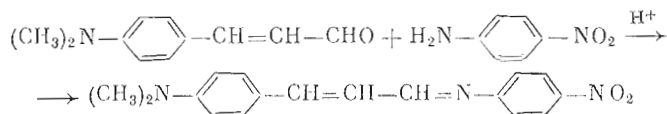
## Некоторые распространенные хромо- и флуорогены

Соединение	Аббревиатура отщепляемой группы	Способ детектирования *
<i>n</i> -Нитроанилин	pNA	К; λ 405 нм
<i>n</i> -Нитрофенол	ONp	К; λ 400 нм
Бензилмеркаптан	SBzl	К; λ 412 нм, после обработки реактивом Эллмана
4-Фенилазобилилин, 4-(Фенилазо)фениламин	PAF	К; λ 495–500 нм
2-Нафтиламин	BNA, βNA	Ф; λ 425 нм (λ <sub>возб</sub> 340 нм) К; λ 525 нм, после азосочетания с 3,3'-диметоксипбензидином.
4-Метокси-2-нафтиламин	4-MNA, MβNA	То же
Диметилвый эфир 5-амино-изофталевой кислоты	AIE	Ф; λ 430 нм (λ <sub>возб</sub> 335 нм)
7-Гидрокси-4-метилкумариин (4-метилумбеллиферон)	MeUmb	Ф; λ 446 нм (λ <sub>возб</sub> 323 нм)
7-Амино-4-метилкумариин	MCA	Ф; λ 460 нм (λ <sub>возб</sub> 380 нм)
7-Амино-4-трифторметилкумариин	AFC	К; λ 380 нм Ф; λ 505 нм (λ <sub>возб</sub> 400 нм)

\* К — колориметрический, Ф — флуориметрический.

метрически, высокий молярный коэффициент поглощения *n*-нитроанилина ( $\epsilon_{405} = 1,06 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) и его невысокая стоимость, а также устойчивость *n*-нитроанилидов при хранении.

Другой способ определения *n*-нитроанилина, предложенный Кваном с сотр. [31], заключается в получении основания Шиффа при взаимодействии *n*-нитроанилина с *n*-диметиламинокоричным альдегидом:



Измерение проводили непрямым способом: отбирали пробы через 1, 3, 5 и 10 мин, добавляли в них трихлоруксусную кислоту, затем *n*-диметиламинокоричный альдегид и выдерживали 15 мин. Поглощение образовавшегося основания Шиффа измеряли при 570 нм ( $\epsilon = 9,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ). Значительное углубление цвета связано с увеличением длины хромофора в полученном соединении по сравнению с хромофором в *n*-нитроанилине, а также обусловлено введением более сильного донора электронов ( $(\text{CH}_3)_2\text{N}-$ ). Чувствительность метода почти в 10 раз выше, чем при прямом измерении *n*-нитроанилина.

*n*-Нитроанилидные субстраты очень широко используются в энзимологии, в частности для изучения ферментов гемостаза [4–6], а также в клинических исследованиях [5, 6]. В дальнейшем мы акцентируем внимание на строении и свойствах некоторых коммерческих хромогенных субстратов, выпускаемых разными фирмами. Хромогенные субстраты серии S производит фирма Kabi (Швеция), серии Chromozym — фирма Boehringer Mannheim (США); большая часть субстратов, указанных в табл. 7, 8 и 10, поставляется фирмами Serva (ФРГ), Chemalog (США) и др. В настоящее время некоторые *n*-нитроанилидные субстраты производит НПО «Биолар» (г. Олайн, ЛатвССР). Формулы ряда распространенных *n*-нитроанилидных субстратов представлены в табл. 7, а хромогенные субстраты для исследования ферментов системы свертывания крови приведены в табл. 8.

После создания в 1972 г. Свендсенем с соавт. [10] первого хромогенного пептидного субстрата для тромбина и трипсина (S-2160) было выпущено более 60 коммерческих хромогенных субстратов для определения различных ферментов системы свертывания крови [6]. Кратко рассмотрим, для каких целей используются эти субстраты. Прежде всего

Некоторые коммерческие хромогенные *m*-нитроанилидные субстраты протеолитических ферментов

Субстрат *	Обозначение субстрата	Фермент (КФ)
Bz-Phe-Val-Arg-pNA Bz-Arg-pNA Z-Arg-pNA Tos-Arg-pNA Z-Val-Gly-Arg-pNA Ac-Phe-pNA Ac-Tyr-pNA Bz-Tyr-pNA Glut-Phe-pNA	S-2160 BAPNA ZAPA TAPA	Трипсин (3.4.21.4)
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA Ac-(Ala) <sub>3</sub> -pNA Ac-(Ala) <sub>2</sub> -Pro-Ala-pNA Ac-Ala-Pro-Ala-pNA Ala-pNA Glu-pNA Leu-pNA	GPANA	Химотрипсин (3.4.21.1) Эластаза (3.4.21.11) Аминопептидазы (3.4.11.1)
Boc-Gly-Gly-Leu-pNA Z-Gly-Gly-Leu-pNA Z-Gly-Gly-Phe-pNA Suc-Gly-Gly-Phe-pNA		Субтилизин А (3.4.21.14) Субтилопептидаза А (3.4.21.14)

Таблица 8

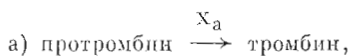
## Кинетические константы некоторых эффективных хромогенных субстратов ферментов системы свертывания крови [2]

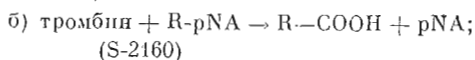
Субстраты *	$K_m$ , мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , мкМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	Фермент
S-2883	0,43	48	110	Тромбин
D-He-Pro-Arg-pNA (S-2288)	1,1	74	62	
S-2238	1,6	95	59	
D-Val-Pro-Arg-pNA (S-2234)	2,0	89	44	
Tos-Chromozym TH	4,0	100	25	
S-2160	18,0	38	2,1	Фактор X <sub>a</sub>
Bz-pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2405)	150	260	1,7	
S-2337	83	140	1,8	
S-2222	140	130	0,89	Плазмин
Tos-Chromozym TH	110	74	0,68	
pGlu-Phe-Lys-pNA	29	24	0,83	
Tos-Chromozym TH	150	34	0,23	Урокиназа
S-2251	120	14	0,11	
Z-Lys-SBzl	30	60	2,0	
S-2444	35	10,3	0,29	Трипсин
Tos-Chromozym TH	50	5,3	0,11	
S-2222	190	120	0,61	
Tos-Chromozym TH	17	69	4,1	
S-2160	38	28	0,74	

\* Структуру субстратов см. табл. 2.

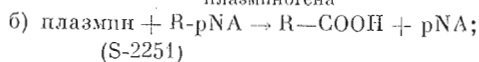
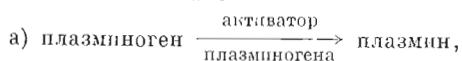
они нашли применение для прямого определения активности тромбина, фактора X<sub>a</sub>, трипсина, плазмина, калликреина и других протеиназ. Их также можно использовать для определения других факторов системы свертывания крови косвенным путем [3—5]:

1) для определения количества проферментов (фактора X, протромбина, фактора VII, прекалликреина, плазминогена) с использованием соответствующих активаторов и определением активности образовавшихся ферментов:

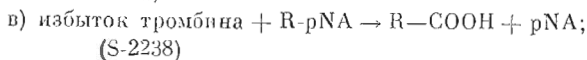
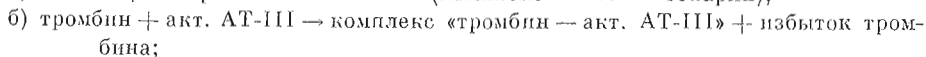
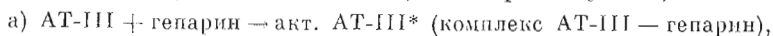




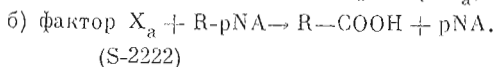
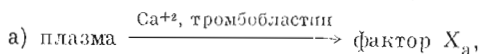
2) для тестирования активаторов (клеточных активаторов фактора X, протромбина, плазминогена, урокиназы, стрептокиназы) исходя из соответствующих проферментов:



3) для измерения активности ингибиторов протеиназ (антитромбина III, (AT-III), α<sub>2</sub>-антиплазмина, α<sub>2</sub>-макроглобулина):



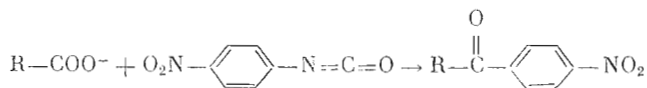
4) для определения кофакторов ферментативных реакций (фактора VIII, факторов пластинок 3 и 4):



Так как фактор VIII является кофактором превращения фактора X в фактор X<sub>a</sub> под действием активаторов плазмы и скорость образования X<sub>a</sub> пропорциональна концентрации фактора VIII в плазме, определяя количество образующегося фактора X<sub>a</sub>, можно судить об активности фактора VIII.

а) Химический синтез *n*-нитроанилидных хромогенных субстратов

Синтез *n*-нитроанилидов защищенных аминокислот представляет определенные трудности ввиду низкой основности (и соответственно слабой нуклеофильности) аминогруппы *n*-нитроанилина, а также из-за того, что получаемые производные плохо кристаллизуются из растворов, содержащих примесь *n*-нитроанилина. Обычно *n*-нитроанилиды получают следующими методами: карбодимидным [32], изоцианатным [33], фосфоразным [32, 34] и фосфораноангидридным [35]. Изоцианатный способ дает хорошие результаты, однако применяется он только для синтеза нитроанилидов основных аминокислот (Arg и Lys):



Окада с соавт. [32] исследовали возможность синтеза *n*-нитроанилидов *N*-бензилоксикарбониламино кислот двумя методами — карбодимидным с добавкой НОВТ и фосфоразометодом. Второй способ дал значительно лучшие выходы. Интересный прием был предложен Краутом с соавт. [36] — *n*-нитроанилиды аминокислот получали взаимодействием хлористоводородных солей хлорангидридов аминокислот с *n*-нитроанилином в хлороформе.

Хороший способ синтеза *n*-нитроанилидов из ациламино кислот с использованием ди-*трет*-бутилпирокарбоната в присутствии пиридина предложен В. Ф. Поздеевым [37]. Автор полагает, что промежуточным продуктом являются симметричные ангидриды ациламино кислот. Выход *n*-нитроанилидов защищенных аминокислот составил 66–89%.

\* акт. AT-III — активированный AT-III.

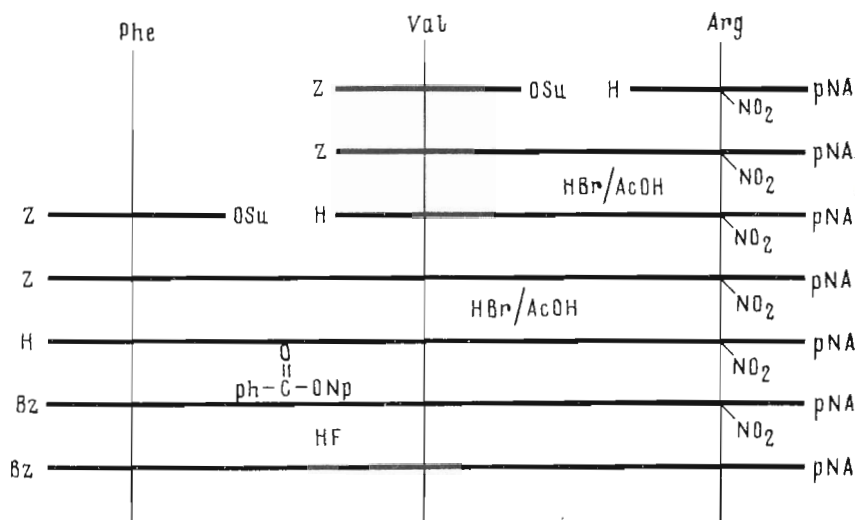
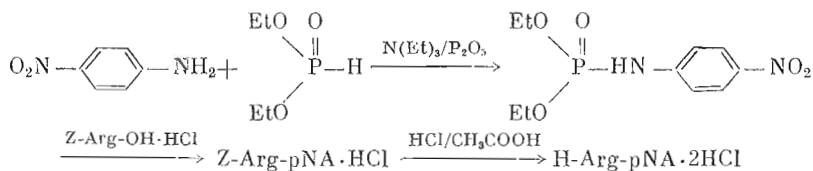


Рис. 5. Схема синтеза субстрата S-2160 [10]

Обычно синтез пептидных субстратов проводят с С-конца, исходя из *n*-нитроанилидов соответствующей аминокислоты, как указано на рис. 5. Аналогично получают все хромогенные субстраты, выпускаемые шведской фирмой «AB Kabi» [33]. При этом для синтеза аргининсодержащих хромогенных субстратов используют *n*-нитроанилид  $\omega$ -нитро-*L*-аргинина, который получают изоцианатным методом, исходя из бензилоксикарбонил- $\omega$ -нитроаргинина [33, 38]. Защитную нитрогруппу удаляют на последней стадии безводным фтористым водородом. Подобным образом из Boc-Lys(Z)-OH можно с хорошим выходом получить изоцианатным методом Lys(Z)-pNA [33, 39].

В 1980 г. Такада с соавт. [35] показали, что в ходе синтеза субстрата S-2160 по схеме, разработанной фирмой «AB Kabi» при обработке защищенного пептида безводным фтористым водородом для удаления нитрогруппы происходит ее миграция в ароматическое ядро остатка фенилаланина с превращением его в 4-нитрофенилаланин. Авторы работы [35] разработали метод синтеза субстрата S-2160 с незащищенным по гуанидиновой группе *n*-нитроанилидом аргинина. Последний они получали по схеме



Описан синтез Tos-Arg-pNA из хлоридрата Tos-Arg-OH фосфоразометодом [34]. Недавно Куроива с соавт. [40] предложили эффективный способ получения *n*-нитроанилидов аргинина с различными защитными группами. Синтез проводили взаимодействием производных аргинина с *n*-нитроанилином в абс. Ру в присутствии дициклогексилкарбодимиды или *N*-этил-*N'*-3-диметиламинопропилкарбодимиды. Выход *n*-нитроанилида бензилоксикарбонил- $\omega$ -нитроаргинина составил 84,6%, *n*-нитроанилида хлоридрата бензилоксикарбониларгинина — 80,7%, *n*-нитроанилида хлоридрата *трет*-бутилоксикарбониларгинина — 83%. Метод может оказаться очень перспективным для синтеза *n*-нитроанилидов аргинина и его производных. Синтез хромогенных субстратов с использованием незащищенного *n*-нитроанилида аргинина производят методом активированных эфиров [35] или карбодимидным с добавкой НОВТ [41].



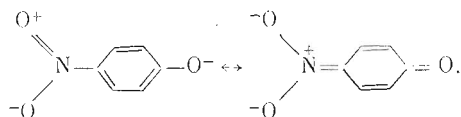


тают, что пептидные хромогенные субстраты на основе 5-амино-2-нитробензойной кислоты могут быть использованы для селективного определения тромбина в смеси с другими факторами — плазмином, фактором X<sub>a</sub> и калликреином — колориметрическими методами.

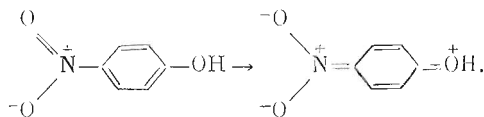
### III. 1.2. *n*-Нитрофениловые эфиры

При расщеплении хромогенных субстратов, *n*-нитрофениловых эфиров ациламинокислот в нейтральном растворе образуется равновесная смесь *n*-нитрофенола и *n*-нитрофенолят-иона ( $pK_a$  последнего 7,15).

*n*-Нитрофенолят-ион обладает в воде интенсивной желтой окраской ( $\lambda_{max}=400$  нм,  $\epsilon=1,8 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>) вследствие того, что в ароматическом хромофоре находится в сопряжении сильная донорная и акцепторная группы. Это приводит к значительной резонансной стабилизации:



Растворы *n*-нитрофенола окрашены менее интенсивно, так как OH-группа является менее сильным донором, чем O<sup>-</sup>, что приводит к меньшей делокализации электронов ( $\lambda_{max}=320$  нм,  $\epsilon=0,9 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>):



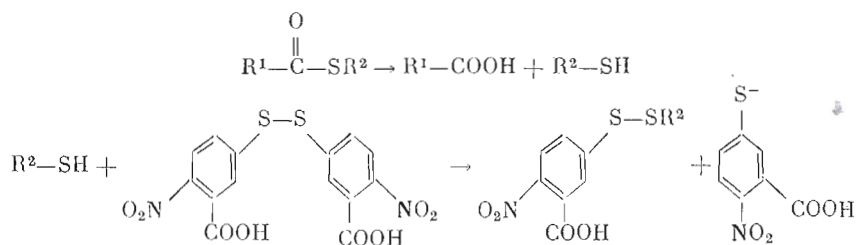
Спектрофотометрический контроль гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров производят при 400–410 нм (pH > 7) или 320–340 нм (pH < 7). *n*-Нитрофениловые эфиры защищенных аминокислот обычно используются в качестве титрантов активных центров ферментов: для трипсина и трипсиноподобных протеиназ в этом случае применяют *n*-нитрофенил-*n'*-гуанидобензоат [45] и *n*-нитрофениловый эфир *N*-бензилоксикарбониллизина [46], для химотрипсина — *n*-нитрофениловые эфиры бензилоксикарбонилтирозина [47] и бензилоксикарбонилтриптофана. Эти титранты использовались также для определения папаина и фичина [48]. Недостатком *n*-нитрофениловых эфиров является их высокая склонность к самопроизвольному гидролизу.

### III. 1.3. Тиоэфиры

Тиоэфиры до последнего времени находили ограниченное применение в энзимологии. Широкое распространение получил только тиобензиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина, который использовали для изучения химотрипсина [49], а также тиобензиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-лизина, нашедший применение для тестирования трипсина и трипсиноподобных ферментов (тромбина, урокиназы, калликреина, плазмина и фактора X<sub>a</sub>) [50]. По данным работы [50], метод позволяет определять 10<sup>-14</sup>–10<sup>-13</sup> моль фермента. В работе Кастилло с соавт. [50] описаны субстраты строения Suc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-X, где X=pNA, SBzl, -OEt, -MCA, MβNA, используемые для изучения эластазы из лейкоцитов человека. Лучшим из этой серии соединений оказался тиоэфирный субстрат. С его помощью можно определить 2,4–5 пмоль фермента.

Образующиеся в результате гидролиза тиоэфирных субстратов меркаптаны определяют калориметрически при помощи реактива Эллмана — 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты). Образующийся 3-карбокси-4-нитротрофеноксид-ион поглощает в видимой области ( $\lambda_{max}=412$  нм,

13 600 M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>), что дает возможность контролировать ход реакции



В начале 80-х годов группа Пауэрса начала изучение ферментов: системы гемостаза при помощи тиоэфирных субстратов — производных отдельных аминокислот и пептидов [51–53]. Они использовали тиобензиловые, тиоизобутиловые, тиоизопентиловые, тио-втор-пентиловые эфиры аргининсодержащих ди-, три- и тетрапептидов, многие из которых проявили высокую селективность. Образующиеся при гидролизе субстратов меркаптаны обрабатывали 4,4'-дитиопиридоном, что приводило к образованию 4-тиопиридона, который детектировали при 324 нм ( $\epsilon = 1,98 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ). В работе [53] описаны трипептидные субстраты для эластазы, которые содержали новые хромогенные группы: 4-хлор-, 4-нитро- и 4-метокситиобензиловые. В указанных работах подчеркивается, что тиоэфирные субстраты имеют величину  $k_{cat}/K_m$ , в 2–3 раза большую, чем амидные субстраты. Спектрофотометрически можно определять очень низкие концентрации ферментов: 0,5–1,5 пмоль тромбина, трипсина и калликреина и 10–30 пмоль факторов IX<sub>1</sub>, X<sub>a</sub>, XI<sub>a</sub> и XII<sub>a</sub>. Эти субстраты могут оказаться весьма полезными при определении активности ферментов плазмы, в которой присутствуют различные трипсиноподобные протеиназы. Самыми перспективными субстратами для изучения ферментов гемостаза оказались Z-Gly-Arg-SBzl и Z-Trp-Arg-SBzl [52].

### III. 1.4. 4-(Фенилазо)фениламиды

Для исследования дипептидиламинопептидазы Барт с соавт. [54] использовал хромогенные субстраты, содержащие новую детекторную группу — 4-(фенилазо)фениламино (или 4-фенилазоанилино). Позднее аналогичные производные применяли и другие исследователи [55]. При гидролизе рассматриваемых субстратов образуется 4-фенилазоанилин,

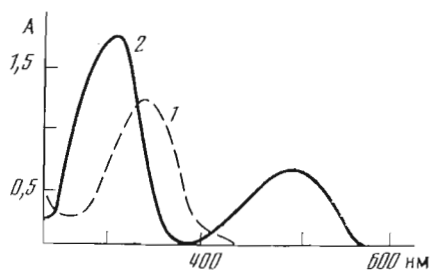


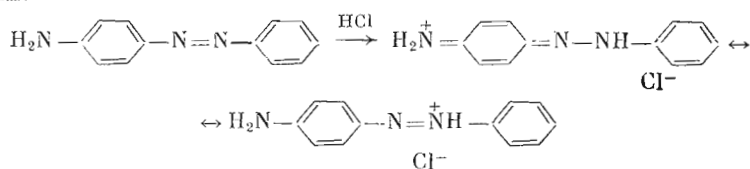
Рис. 6. Спектры поглощения тозилата *n*-фенилазоанилида глицил-*L*-пролина (1) и 4-фенилазоанилипа (2) в 0,1 н. HCl [55]

который поглощает при 390 нм, в то время как исходный субстрат имеет максимум поглощения при 344 нм ( $\epsilon = 24\,910 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ). Как видно, разница в максимумах поглощения субстрата и «уходящей» группы составляет всего ~50 нм, т. е. в 2 раза меньше, чем у *n*-нитроанилидных субстратов. Поэтому оказалось удобнее детектировать 4-фенилазоанилин в кислой среде при 500 нм ( $\epsilon = 7615 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), т. е. в области, в которой субстрат практически не поглощает (рис. 6). Определение

производят методом отбора проб реакционной смеси в определенные промежутки времени с подкислением их 40% трихлоруксусной кислотой или 1 н. HCl.

При детектировании 4-фенилазоанилина в кислой среде используют так называемый галохромный эффект, т. е. углубление окраски при солеобразовании, которое в данном случае происходит из-за того, что образующиеся граничные структуры эквивалентны [26]. Это приводит к большей делокализации электронов и снижению энергии возбуждения моле-

кул, т. е. к смещению максимума поглощения в область более длинных волн:



Из рис. 6 видно, что 4-фенилазоанилин имеет в кислой среде еще один максимум поглощения при 325 нм, поэтому можно вести и непрерывный контроль гидролиза на УФ-спектрофотометре [55]. Авторы отмечают, что недостатком субстратов этого типа является более высокое значение  $K_m$  по сравнению с  $K_m$  для аналогичных *p*-нитроанилидных производных. Однако 4-фенилазоанилиды являются очень чувствительными субстратами, и их использование позволяет определять активность фермента после электрофореза в полиакриламидном геле.

В заключение данного раздела приведем пример еще одного субстрата, предложенного Зассенхаузем с соавт. [56] для определения активности трипсина *in vivo*. Это 4-(*N*-бензоил-*L*-аргинил)бензойная кислота, которая хорошо растворима в воде и при гидролизе высвобождает *p*-аминобензойную кислоту, которую детектируют колориметрически по Браттону — Маршаллу [27]. Субстрат оказался удобным для определения активности трипсина в растворах низкой чистоты.

### III. 2. ФЛУОРОГЕННЫЕ СУБСТРАТЫ

#### III. 2.1. 4-Метилкумарил-7-амиды

Флуорогенные субстраты на основе 7-амино-4-метилкумарина были предложены Циммерманом с соавт. в 1976 г. [57] и в последующее десятилетие получили широкое распространение в изучении протеолитических ферментов спектрофлуориметрическим методом. Пептид Glut-Phe-MCA оказался хорошим субстратом химотрипсина. В работе [28] описаны еще несколько MCA-производных, использованных для тестирования трипсина (Z-Arg-MCA и Bz-*D,L*-Arg-MCA), химотрипсина (Ala-Ala-Phe-MCA) и эластазы (Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-MCA). Минимальное количество субстрата, необходимое для контроля гидролиза, составляло: для химотрипсина — 25 нг, для трипсина — 5 нг и для эластазы — 2 нг. Такая высокая чувствительность субстратов может оказаться очень полезной для исследования клеточных экстрактов нейтральных протеиназ [23]. Морита с соавт. [58] получил 20 флуорогенных субстратов, из которых 6 оказались наиболее подходящими: Boc-Val-Pro-Arg-MCA (для тромбина), Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA и Boc-Ser-Gly-Arg-MCA (для фактора  $X_a$ ), Z-Phe-Arg-MCA (для калликреина плазмы), Pro-Phe-Arg-MCA (для калликреина поджелудочной железы) и Glu-Gly-Arg-MCA (для урокиназы). Все эти соединения оказались устойчивыми к плазмину.

В работе [59] описан синтез шести субстратов для плазмина; лучшими из них являются соединения Boc-Val-Leu-Lys-MCA и Boc-Gly-Lys-Lys-MCA. Оба трипептида устойчивы к тромбину и факторам  $X_a$ , IX<sub>a</sub>, XI<sub>a</sub> и XII<sub>a</sub>. Хороший субстрат для эластазы из лейкоцитов человека (Suc-OMe-Ala-Ala-Pro-Val-MCA) описан в работе [51], его применение позволяет определять 11–18 пмоль фермента. Предложены два чувствительных субстрата для определения субтилизина [60]: Z-Gly-Gly-Leu-MCA и Z-Asp-Pro-Leu-MCA. Метод позволяет обнаружить 0,1 мкг/мл субтилизина, в то время как при помощи соответствующего *p*-нитроанилидного субстрата можно определить лишь не менее 5,5 мкг/мл фермента.

Недавно Кунуги с соавт. [61] опубликовали результаты исследования гидролиза ряда кумариламидных субстратов сериновыми карбоксипептидазами из *Penicillium janthinellum* и пришли к заключению, что некоторые из испытанных субстратов могут быть использованы для определения активности карбоксипептидаз в неочищенных экстрактах.

Кинетические константы гидролиза некоторых флуорогенных субстратов сериновых протеиназ

Субстраты	Ферменты	$K_m$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-2}$ , М <sup>-1</sup> /с <sup>-1</sup>	Литература
Glut-Phe-MCA	Химотрипсин	0,67	0,052	0,78	[57]
Ala-Ala-Phe-MCA		0,5	0,83	16,6	[28]
Bz-Arg-MCA	Трипсин	0,25	0,2	8	[28]
Z-Arg-MCA		0,25	1,3	53	[28]
Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-MCA	Панкреатическая эластаза свиный	0,5	7,5	150	[28]
»	Эластаза из гранулоцитов	0,63	2,0	32	[28]
Z-Gly-Gly-Leu-MCA	Субтилизин	0,55	0,52	9,5	[60]
Z-Asp-Pro-Leu-MCA		1,7	0,31	1,8	[60]
Z-Gly-Gly-Leu-MCA	Субтилизин Карлсберг	0,74	0,65	8,8	[60]
Z-Asp-Pro-Leu-MCA		0,79	2,38	30	[60]

Таблица 10

Некоторые коммерческие флуорогенные субстраты – производные 7-амино-4-метилкумарина

Субстраты	Ферменты (ЖФ)
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	Тромбин
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	Фактор X <sub>a</sub>
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	
Glut-Gly-Arg-MCA	Факторы XI <sub>a</sub> (3.4.21.-) и XII <sub>a</sub> (3.4.21.38)
Boc-Gly-Lys-MCA	
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	Урокиназа
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	
Pro-Phe-Arg-MCA	Плазмин
Z-Phe-Arg-MCA	
Bz-Arg-MCA	Калликреин плазмы
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	
Leu-Thr-Arg-MCA	Панкреатический калликреин
Ala-Ala-Phe-MCA	
Glut-Phe-MCA	Трипсин
Suc-Ala-Ala-Ala-MCA	
Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	Химотрипсин
H-Arg-MCA	
Boc-Val-Gly-Arg-MCA	Эластаза
H-Leu-MCA	
Gly-Pro-MCA	Катепсин В (3.4.22.1)

В табл. 9 и 10 приведены кинетические константы некоторых МСА-производных, а также формулы основных коммерческих субстратов на основе 7-амино-4-метилкумарина.

Синтез МСА-субстратов осуществляли взаимодействием защищенных аминокислот с 7-амино-4-метилкумарином следующими методами: карбонимидным [36, 28], смешанных алгидридов [28], фосфорноагидридным в диэтилфосфите [62] и с использованием ди-трет-бутилпиروкарбоната [37]. Последний из указанных методов характеризуется высоким выходом — 70–85%.

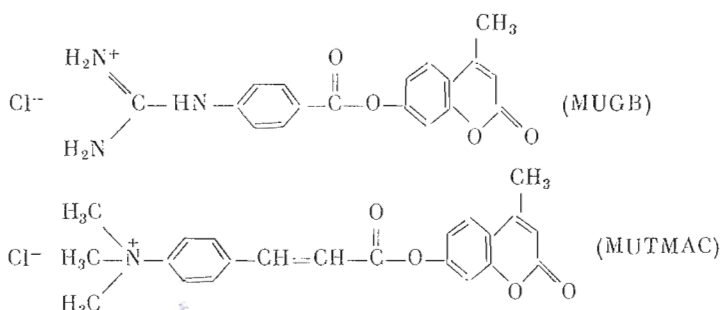
### III. 2.2. 4-Трифторметил-кумаринил-7-амиды

Смит с соавт. [63] предложил использовать в качестве «уходящей» группы модифицированную МСА-группировку — 4-трифторметилкумаринил-7-амин (АФС). Введение электроноакцепторного заместителя (CF<sub>3</sub>-группы) вместо донорной метильной группы в положение 4 кумаринильного ядра вызывает смещение спектра поглощения в длинноволновую область — 350–365 нм, поэтому скорость гидролиза АФС-субстратов можно детектировать колориметрически при длине волны 380 нм. Флуори-

метрический контроль осуществляют при 505 нм ( $\lambda_{\text{возб}}=400$  нм). При сравнении интенсивности флуоресценции при 460 нм одноступенчатых субстратов Z-Gly-Gly-Arg-AFC Z-Gly-Gly-Arg-MCA оказалось, что второй пептид флуоресцирует более интенсивно. В качестве AFC-производных изучались следующие флуорогенные субстраты: Z-Gly-Gly-Arg-AFC (ферменты — трипсин, урокиназа), D-Ala-Leu-Lys-AFC (плазмин) и H-Leu-AFC (аминопептидаза М). Исходное соединение Z-Arg-AFC получали методом эмишанных ангидридов [63].

### III. 2.3. 4-Метилумбеллиферинные эфиры

В целях поиска новых флуорогенных субстратов использовали также другое производное 4-метилкумарина, а именно 4-метилумбеллиферон (7-гидрокси-4-метилкумарин), который имеет максимум флуоресценции при 446 нм ( $\lambda_{\text{возб}}=323$  нм). Его производные использовали в качестве титрантов активных центров различных ферментов: Z-Lys-MeUmb — для трипсина [64], 4-метилумбеллиферил-*n*-гуанидинобензоат (MUGB) [64] и 4-метилумбеллиферил-*n*-(*N,N,N*-триметиламмоний)коричную кислоту (MUTMAC) [65] — для трипсиноподобных протеиназ:



Чувствительность метода при использовании таких титрантов составляет  $10^{-9}$ — $10^{-11}$  моль фермента; применение Z-Lys-MeUmb позволяет определять  $(1-5) \cdot 10^{-14}$  моль трипсина или плазмина, что почти в 200 раз чувствительнее, чем при использовании соответствующего *n*-нитроанилидного субстрата.

### III. 2.4. 2-Нафтиламиды и 4-метокси-2-нафтиламиды

Субстраты на основе 2-нафтиламина (или  $\beta$ -нафтиламина) используются уже более 30 лет. Эта группа была предложена Гомори в 1954 г. [66] и остается популярной до настоящего времени, хотя имеются указания на то, что  $\beta$ -нафтиламин является канцерогеном. Так же широко применяется в качестве детекторного соединения 4-метокси-2-нафтиламин, субстраты на основе которого несколько более чувствительны к ферментативному гидролизу. Степень расщепления нафтиламидных субстратов контролируют спектрофлуориметрически при 425 нм (возбуждение 340 нм), но можно детектировать и колориметрически: после сочетания выделившегося нафтиламина с диазотированным 3,3'-диметоксибензидином [3] (см. раздел II.2).

$\beta$ NA-, M $\beta$ NA-субстраты широко используются для определения протеолитических ферментов: химотрипсина [67], трипсина [68], эластазы [69], тромбина, плазмина [70], урокиназы [71], фактора  $X_n$  [72] и др. Доступность и высокая чувствительность нафтиламидных субстратов способствуют их повсеместному распространению для указанных целей.

Синтез 2-нафтиламидов и 4-метокси-2-нафтиламидов защищенных аминокислот легко осуществляется карбодимидным способом [72], однако для их получения могут быть использованы и методы, применяемые для синтеза *n*-нитроанилидов. Формулы наиболее распространенных коммерческих нафтиламидных субстратов приведены в табл. 11.

## Некоторые распространенные субстраты — производные нафтил-2-амин и 4-метокси-нафтил-2-амин

Субстраты	Ферменты (КФ)
Glut-Gly-Gly-Phe-βNA Gly-Gly-Gly-Phe-βNA H-Tyr-βNA H-Phe-βNA Bz-Arg-βNA H-Arg-βNA Z-Arg-Arg-Arg-MβNA Z-Ala-βNA Glu-Ala-Ala-Ala-Ala-MβNA Glut-Ala-Ala-Ala-MβNA H-Leu-βNA Bz-Arg-Gly-Leu-MβNA Gly-Phe-MβNA Bz-Arg-Gly-Leu-MβNA Z-Val-Lys-Lys-Arg-MβNA Bz-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-MβNA Z-Gly-Pro-Arg-βNA Bz-Phe-Val-Arg-MβNA Z-Gly-Pro-Arg-MβNA Gly-Arg-βNA Val-Gly-Arg-βNA Boc-Val-Gly-Arg-βNA Z-Ala-Ala-Lys-MβNA Z-Gly-Pro-Arg-MβNA Val-Gly-Arg-βNA Boc-Val-Gly-Arg-βNA Z-Gly-Gly-Arg-MβNA Z-Pro-Ala-Gly-Pro-MβNA Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-βNA	Химотрипсин  Трипсин  Эластаза  Пептидаза (3.4.22.—)  Катепсин С (3.4.14.1) В D (3.4.23.5) Тромбин  Плазмин  Урокиназа  Коллагеназа (3.4.24.7) Энтерокиназа (3.4.21.9)

## III. 2.5. Нафтиловые эфиры

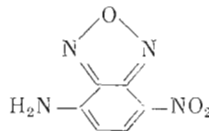
β- и α-Нафтиловые эфиры аминокислот и пептидов нашли применение в качестве титрантов активных центров ферментов. Выделяющийся в результате гидролиза нафтол имеет максимум флуоресценции при 410 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  325–330 нм). β-Нафтиловые эфиры использовали для определения трипсина и трипсиноподобных протеиназ [65]. Стандартные субстраты: для трипсина — N-Me-N<sup>α</sup>-Tos-L Lys-ONft, для химотрипсина — Bz-Phe-ONft и для эластазы — Z-Ala-ONft. α-Нафтиловые эфиры использовались для определения эстеропротеиназ [73].

## III. 2.6. Амиды 5-аминоизофталевой кислоты

В качестве детектируемого флуорогенного соединения успешно используют диметилловый эфир 5-аминоизофталевой кислоты, который определяют при 430 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  335 нм). Пептид H-D-Phe-Pro-Arg-AIE — стандартный субстрат для определения активности тромбина [74]. Хорошим субстратом плазмина является H-D-Val-Leu-Lys-AIE [75], при помощи которого можно тестировать также активность ингибитора α<sub>2</sub>-плазмина [75].

## III. 2.7. 7-Нитробенз-2-окса-1,3-диазолил-4-амиды

Перспективное флуорогенное соединение — 4-амино-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол (Nbd) было недавно предложено Сато с соавт. [76]:

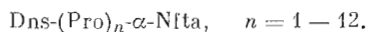


Изучался гидролиз субстрата Tos-Phe-Nbd химотрипсином с флуоресцентным контролем реакции при длине волны 555 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  475 нм). Чувствительность метода составила 0,8 пмоль химотрипсина. Интенсивность флуоресценции 4-амино-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазола ниже, чем 7-амино-4-метилкумарина, по-видимому, из-за наличия нитрогруппы, которая обычно гасит флуоресценцию. Однако новая группа имеет то преимущество, что максимум ее флуоресценции лежит в области очень длинных волн и интенсивность флуоресценции постоянна в широкой области значений pH — от 2 до 9 [76].

### III. 2.8. Субстраты с внутримолекулярным гашением флуоресценции

Эта группа флуорогенных субстратов имеет ряд преимуществ и поэтому будет рассмотрена более подробно.

Принцип дизайна таких соединений заключается во введении в состав одной и той же молекулы одновременно флуорофора и гасителя. Гашение флуоресценции донора происходит из-за поглощения энергии его возбуждения акцептором. Гаситель должен иметь максимальное поглощение в области, близкой к длине волны флуоресценции донора. Такая передача энергии возбуждения называется резонансной. Безызлучательный обмен энергией между двумя хромофорами называется резонансным переносом энергии. Его необходимым условие — перекрывание спектра испускания донора со спектром поглощения акцептора [77]. Квантово-механическая трактовка механизма резонансного переноса энергии была сделана Ферстером [78]. Энергия возбуждения донора переносится по резонансному механизму на ограниченное расстояние — до 50–100 Å [79]. Зависимость эффективности переноса от расстояния и ориентации хромофоров используется в биохимических исследованиях для измерения расстояний между лигандами [77]. В частности, была проверена на экспериментальной модели [80] — фрагменте поли-*L*-пролина, имеющем на концах молекулы дансильную (акцептор) и  $\alpha$ -нафтиламидную (донор) группу



На рис. 7 изображен график зависимости эффективности резонансного переноса энергии от расстояния между дансильной и  $\alpha$ -нафтильной группами [80]. Как видно из рисунка, эффективный перенос осуществляется при расстоянии до 20 Å, а затем начинает резко уменьшаться.

Если на концах полипептидного субстрата поместить подходящие донор и акцептор энергии возбуждения, то при расстоянии между ними до 20 Å энергия возбуждения флуорофора будет поглощаться акцептором, что приведет к снижению интенсивности флуоресценции донора. При концентрациях субстрата  $10^{-4}$  моль происходит чисто внутримолекулярное гашение, однако при повышении концентрации будет происходить также межмолекулярный перенос, поэтому концентрация субстрата  $10^{-4}$  моль является предельной. При разрыве пептидной связи в субстрате соответствующим ферментом фрагменты, содержащие донор и акцептор, расходятся на значительное расстояние, в результате чего возрастает легко измеряемая интенсивность флуоресценции фрагмента, несущего флуоресцентную группу. Такое возрастание флуоресценции дает возможность создания чувствительных методов изучения ферментативных реакций.

Первый флуорогенный субстрат нового типа DNS-(Gly) $_n$ -Trp ( $n = 1-3$ ) предложили Латт с соавт. [81] в 1972 г. В данном соединении дансильная группа является акцептором для молекулы триптофана и гасит ее флуоресценцию при 290 нм. При гидролизе указанного субстрата интенсивность флуоресценции (которая пропорциональна скорости гидролиза субстрата) возрастала почти в 100 раз.

В 1977 г. Кармел с соавт. [82] предложили использовать в качестве флуорофора остаток 2-аминобензойной кислоты (Abz), а в качестве гаси-

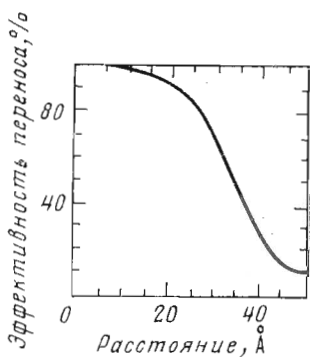


Рис. 7

Рис. 7. Эффективность переноса энергии как функция расстояния между хромофорами в  $\alpha$ -нафтиламиде Dps-олигопролина ( $n=1-12$ ) [80]

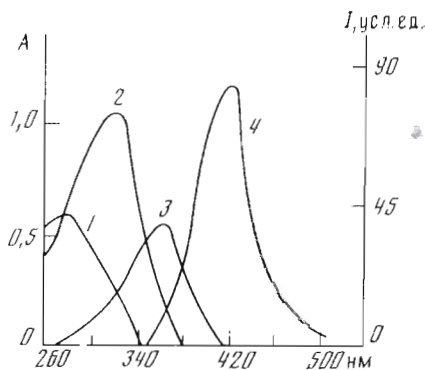
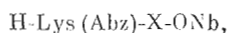


Рис. 8

Рис. 8. Спектры поглощения Phe-Nba (1), Phe-pNa (2), Phe-Ded (3) и спектр флуоресценции антралиловой кислоты (4) ( $\lambda_{возб}=340$  нм) [88]

теля — *n*-нитробензильную группу (ONb) в субстратах строения:



где X=Ala, Phe или Ala-Ala.

Гидролиз контролировали по возрастанию флуоресценции при 415 нм ( $\lambda_{возб}$  340 нм).

Кастилло с соавт. [83] получили ряд субстратов, включающих до семи аминокислотных остатков, в которых в качестве флуорофора применили Abz-группу, а в качестве гасителя — 4-нитробензиламидную группу (Nba). Субстраты использовали для изучения активности факторов системы свертывания крови IX<sub>a</sub>, X<sub>a</sub> и XI<sub>a</sub>. Структура указанных субстратов соответствовала аминокислотной последовательности в районе расщепляемой связи факторов IX и X быка. Измерение флуоресценции производили при 415 нм, при этом она возрастала в 2–3 раза. Параллельно контроль ферментативной реакции осуществляли нингидриновым и флуорескаминным методами. Субстраты указанного типа использовались разными авторами для изучения аминопептидазы [84], дипептидилкарбоксиинттидазы [85], термелизина [86] и энкефалиназ A и B [87].

Интересное применение нашли субстраты с внутренним гашением флуоресценции при изучении карбоксильных протеиназ, которые строго ограничены в своей специфичности пептидными связями и не обладают ни эстеразной, ни амидазной активностью. И. Ю. Филиппова с соавт. [88] сообщила об использовании синтетических субстратов общей формулы Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-X (X=—pNa, Nba, Ded). Ввиду того что спектр поглощения 2,4-динитрофенилэтилендиамидной группы (Ded) более эффективно перекрывается со спектром флуоресценции Abz-группы (рис. 8), эта группа оказалась лучшей из трех указанных гасителей. Изучалась кинетика гидролиза указанных субстратов пепсином и аспергиллопепсином А. Субстраты расщеплялись по связи Phe-Phe, что приводило к возрастанию флуоресценции в 2,5–8,5 раза в зависимости от использованного «гасителя». Авторы работы [88] отмечают, что величины  $k_{cat}/K_m$ , полученные при использовании вышеуказанных субстратов, сопоставимы с величинами для лучших известных субстратов аспартатных протеиназ.

В заключение данного раздела мы можем отметить, что субстраты с внутренним гашением флуоресценции — единственные хромогенные субстраты, позволяющие изучать гидролиз природной пептидной связи простыми методами без использования сложной техники с применением нингидрина, флуорескамина или тринитробензолсульфокислоты. Большим достоинством указанных субстратов является то, что они позволяют исследовать роль остатков аминокислот, образующих расщепляемую связь



Содержание плазминогена в антитромбина III при некоторых заболеваниях, определенное различными методами

Метод определения	Содержание белка по отношению к норме, %	
	Антитромбин III	Плазминоген
Флуорогенный	71,8±11,6	74,8±12,6
Хромогенный	76,7±12,2	78,9±13,6
Радиальная иммунодиффузия	88,1±10,6	79,6±12,1
Казеинополитический	69,1±11,8	76,1±11,1

своей  $\text{NH}_2$ -группой ( $\text{P}_1'$ ), в то время как при исследовании всех вышеописанных хромогенных субстратов (у которых на С-конце стоит отщепляющаяся детекторная группа) можно изучать влияние модификаций аминокислот, участвующих в образовании расщепляемой связи своей карбоксильной группой ( $\text{P}_1$ ).

#### IV. ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ В МЕДИЦИНЕ

В последние годы хромогенные и флуорогенные субстраты оказались высокоэффективным инструментом в клинической диагностике. Использование их для этой цели описано в обзорах [4] и [5]: диагностика основана на определении активности антитромбина III, тромбина, плазминогена,  $\alpha_2$ -антиплазмина, гепарина и фактора  $\text{X}_a$  в плазме больных. Например, уменьшение концентрации антитромбина III (АТ-III) в плазме может быть вызвано наследственной повышенной сворачиваемостью крови — тромбозом вен. Самые низкие концентрации ингибитора тромбина — АТ-III — обнаружены при заболевании печени — нефротическом синдроме. В табл. 12 приведен результат четырех различных методов определения АТ-III у 100 пациентов с заболеваниями печени [4].

Другим примером могут служить результаты определения уровня плазминогена в крови. Снижение этого показателя может быть результатом наследственных или приобретенных заболеваний. При пониженном содержании плазминогена возникают фибринолитические расстройства. Выработка плазминогена в крови часто нарушается при заболеваниях печени в процессе лечения лейкозов *L*-аспарагиназой. В табл. 12 представлены данные определения плазминогена различными методами у 100 пациентов с болезнью печени [4].

Как видно, амидолитический метод по точности не уступает другим методам диагностики и является более простым.

Так как методы с использованием хромогенных субстратов основаны на высвобождении (или подавлении высвобождения) хромогена или флуорогена, для оценки активности ферментов системы свертывания можно использовать рутинные лабораторные методы анализа. С целью интенсификации клинических анализов при определении различных факторов системы свертывания крови в настоящее время уже производятся автоматические анализаторы. Следует отметить, что для успешного создания и широкого внедрения в клиниках амидолитических методов диагностики одного лишь набора хромогенных субстратов недостаточно — необходимы также высокоэффективные образцы различных ферментов и других факторов системы свертывания крови.

#### Заключение

Краткое рассмотрение структуры и свойств хромогенных субстратов протеолитических ферментов показывает, что существующие в настоящее время пептидные субстраты вполне отвечают требованиям не только первичной, но и вторичной специфичности ферментов. Хотя гомологичные

сериновые протеиназы имеют одинаковый каталитический центр и сходную первичную специфичность, их контактные зоны различаются. Эти особенности в организации вторичного связывающего центра индивидуальных протеиназ можно с успехом использовать для создания селективных субстратов даже для таких сходных ферментов, как тромбин, фактор X<sub>a</sub>, калликреин и др. Это достигается путем варьирования аминокислотной последовательности и природы защитных и отщепляемых в процессе гидролиза групп.

В настоящее время наиболее распространенными субстратами являются производные на основе *n*-нитроанилина, 2-нафтиламина и 7-амино-4-метилкумарина. Однако, как показали исследования последних лет, очень перспективны тиоэфирные субстраты.

Контроль гидролиза хромогенных субстратов можно осуществлять только в прозрачных растворах; по-видимому, в дальнейшем будут разрабатываться методы, которые позволят использовать также мутные неочищенные экстракты (например, электрический метод).

Полипептидные субстраты с внутренним гашением флуоресценции могут оказаться полезными при создании субстратов для ферментов, вызывая селективность к которым определяется строением подцентров связывания S'<sub>1</sub>'—S'<sub>n</sub>' от расщепляемой связи, а также ферментов, специфичность которых строго ограничена определенными пептидными связями (пенсин и др.).

Хромогенные субстраты находят все большее применение в медицинской диагностике, где они успешно конкурируют с другими более сложными методами или дополняют их. Промышленный выпуск хромогенных и флуорогенных субстратов в настоящее время осуществляется химическим путем, однако успешное применение для этих целей ферментативного метода позволяет предположить, что в будущем он будет широко использоваться для синтеза указанных соединений.

Промышленный выпуск хромогенных пептидных субстратов, а также высокоактивных факторов системы свертывания крови наряду с автоматическими анализаторами позволяет широко внедрить амидолитические методы диагностики в клиники.

Авторы выражают признательность В. Ф. Поздневу и А. А. Серейской за оказанную помощь в подборе литературы и проф. С. Б. Серебряному за прочтение рукописи и ценные замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chromogenic peptide substrates chemistry and clinical usage/Eds Scully M. F., Kakkar Churchill-Livingstone, Edinburgh, London, 1978, 230 p.
2. Lottenberg R., Christensen U., Jackson C. M., Coleman P. L. // Meth. Enzymol. 1981. V. 80. P. 341—361.
3. Huseby R. M., Smith R. E. // Semin. Thromb. Hemostasis. 1980. V. 6. № 3. P. 173—314.
4. Fareed J., Messmore H. L., Walenga J. M., Bermes E. W. // CRC crit. rev. clin. lab. sci. 1983. V. 19. № 2. P. 71—134.
5. Fareed J., Messmore H. L., Walenga J. M., Bermes E. W., Jr. // Clin. Chem. 1983. V. 29. № 2. P. 255—256.
6. Iwanga S., Morita T., Kato H., Harada T., Adachi N., Sugo T., Maruyama I., Takoda K., Kimura T., Sakakibara S. // Fluorogenic peptide substrates for proteases in blood coagulation, Kallikrein-kinin and fibrinolysis system in kinins II, biochemistry patterns, physiology and clinical aspects/Eds Fuji S., Morita H., Suzuki T. N. Y.: Plenum Publ., 1979, 147 p.
7. Раменский Е. В. // Успехи биол. химии. 1972. Т. 43. С. 28—48.
8. Downing M. R., Eliot J., Butkowski R. J., Mann K. G. // Bibl. Haematol. 1978. № 44. P. 39—53.
9. Blombäck B. // Haemostasis. 1978. V. 7. P. 183.
10. Svendsen L., Blombäck B., Blombäck M., Olsson P. J. // Thromb. Res. 1972. V. 1. № 2. P. 267—285.
11. Schechter I., Berger A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. № 2. P. 267—285.
12. March H. C., Meinwald Y. C., Lee S., Scheraga H. A. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 21. P. 6167—6171.
13. March H. C., Meinwald Y. C., Thannhauser Th. W., Scheraga H. A. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 18. P. 4170—4174.

14. *Bang N. U., Mattler L. E.* // Haemostasis. 1978. V. 7. P. 98–104.
15. *Chang G. Y.* // Eur. J. Biochem. 1985. V. 151. № 11. P. 217–224.
16. *Серебряный С. Б.* // Биохимия животных и человека. 1982. Вып. 6. С. 14–26.
17. *Fenton II J. W., Landis B. H., Walz D. A., Bing D. H., Feinman R. D., Zabinski M. P., Sonder S. A., Berliner L. J., Finlayson J. S.* // Chemistry and physiology of human proteins/Ed. Bing D. H. N. Y.: Pergamon Press, 1979. P. 151–183.
18. *Claeson G., Friberger R., Knös M., Eriksson E.* // Haemostasis. 1978. V. 7. P. 66–78.
19. *Claeson G., Aurell L., Friberger R.* // Haemostasis. 1978. V. 7. P. 62–68.
20. *Aurell L., Simonsson R., Arielly S., Karlsson G., Friberger P., Claeson G.* // Haemostasis. 1978. V. 7. P. 92–94.
21. *Baines N. I., Baird J. B., Elmore D. T.* // Biochem. J. 1964. V. 90. № 3. P. 470–476.
22. *Arwin H., Lundström I., Claeson G., Ekenstam B., Aurell L.* // FEBS Lett. 1976. V. 64. № 1. P. 95–97.
23. *Roffman S., Sanocka U., Troll W.* // Anal. Biochem. 1970. V. 36. № 1. P. 11–17.
24. *Schwert G. M., Takenaka Y. A.* // Biochim. et biophys. acta. 1955. V. 16. № 4. P. 570–575.
25. *Plaut G. W. E.* // Haemostasis. 1978. V. 7. P. 105–108.
26. *Куприянов А. И.* Введение в электронную теорию органических соединений. Киев: Наук. думка, 1975. 190 с.
27. *Bratton A. C., Marshall E. K., Babbitt D., Hendrickson A. R.* // J. Biol. Chem. 1939. V. 128. № 2. P. 537–550.
28. *Zimmerman M., Ashe B., Yurewicz E. C., Patel G.* // Anal. Biochem. 1977. V. 78. № 1. P. 47–51.
29. *Van Nispen J. W., Hageman T. C., Scheraga H. A.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1977. V. 182. № 2. P. 227–243.
30. *Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W.* // Science. 1972. V. 178. № 4063. P. 871–872.
31. *Kwaan H. C., Friedman R. B., Szczecinski M.* // Thromb. Res. 1978. V. 13. № 1. P. 5–13.
32. *Okada Y., Tsuda Y., Hirata A., Nagamatsu Y., Okamoto U.* // Chem. Pharm. Bull. 1962. V. 30. № 11. P. 4060–4068.
33. Пат. 700060 СССР, МКИ<sup>2</sup> С 07 С 103/52, А 61 К 37/02. Экенстам Б. Т., Аурелл Л. Э., Клаэсон К. И., Карлссон Б. Г., Густавссон С. И., Олаусон Г. А. Оpubл. 25.11.79. Бюл. № 43.
34. *Kasafirek E., Chavko M., Bartik M.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 1971. V. 36. № 12. P. 4070–4074.
35. *Takada K., Sakakibara S., Kato H., Goto T., Iwanga S.* // Thromb. Res. 1980. V. 20. № 5/6. P. 533–542.
36. *Kraut J., Sieker C., High D. F., Freer S. T.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1962. V. 48. P. 1417–1419.
37. *Поздnev В. Ф.* // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 583–589.
38. *Nishi N., Tokura S., Noguchi J.* // Bull. Chem. Soc. Japan. 1970. V. 43. № 9. P. 2900–2907.
39. *Mackenzie N. E., Malthouse J. P., Scott A. J.* // Biochem. J. 1985. V. 226. № 2. P. 601–606.
40. Заявка 60–61577, Япония. МКН С 07 С 129/12, С 07 С 143/78, Куроява К., Накацуяма Х., Нагасава Т. Оpubл. 9.04.85. РЖ. «Химия», 1986, № 12, реф. 12 0 16 И.
41. *Somori O., Tokura S., Nishi N., Noguchi J.* // J. Biochem. 1979. V. 85. № 1. P. 157–162.
42. *Люблинская Л. А., Воюшина Т. П., Степанов В. М.* // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1620–1624.
43. *Filipova I. Yu., Lysogorskaya E. N., Oksenoit E. S.* // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 3. P. 293–297.
44. *Kolde H.-J., Eberle R., Heber H., Heimburger N.* // Thrombosis and Haemostasis. 1986. V. 56. № 2. P. 155–159.
45. *Chase Th., Shaw E.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 29. № 4. P. 508–514.
46. *Bender M. L., Killhefer J. V., Roeske R. W.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1965. V. 19. № 2. P. 161–165.
47. *Bender M. L., Brubacher L. J.* // J. Amer. Chem. Soc. 1966. V. 88. № 24. P. 5880–5889.
48. *Holloway M. R., Hardman M. J.* // Eur. J. Biochem. 1973. V. 32. № 3. P. 537–546.
49. *Farmer D. A., Hageman J. H.* // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 18. P. 7366–7371.
50. *Green G. D. J., Shaw E.* // Anal. Biochem. 1979. V. 93. № 2. P. 223–226.
51. *Castillo M., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J. C.* // Anal. Biochem. 1979. V. 99. № 1. P. 53–64.
52. *McRae B. I., Kurachi K., Heimark R. L., Fujikawa K., Davie E. W., Powers J. C.* // Biochemistry. 1981. V. 20. № 25. P. 7196–7206.
53. *Harper J. W., Cook R. R., Roberts C. J., McLaughlin B. J., Powers J. C.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 13. P. 2995–3002.
54. *Barth A., Schulz H., Neubert K.* // Acta biol. med. Germ. 1974. B. 32. № 2/3. S. 157–174.
55. *Kato T., Iwase K., Nagatsu T., Hino M., Takemoto T., Sakakibara S.* // Mol. and Cell. Biochem. 1979. V. 24. № 1. P. 9–13.
56. *Zassenhaus P. H., Hanson K. M., Wolgemuth R. L.* // Anal. Biochem. 1976. V. 76. № 6. P. 324–329.
57. *Zimmerman M., Yurewicz E., Patel G.* // Anal. Biochem. 1976. V. 70. № 1. P. 258–262.

58. *Morita T., Kato H., Iwanga S., Takada K., Kimura T., Sakakibara S.* // J. Biochem. 1977. V. 82. № 5. P. 1495-1498.
59. *Kato H., Adachi N., Ohno Y., Iwanga S., Takada K., Sakakibara S.* // J. Biochem. 1980. V. 88. № 1. P. 183-190.
60. *Kanaoka Y., Takahashi T., Nagayama H., Kazutaka T.* // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 33. № 4. P. 1721-1724.
61. *Kunagi S., Fukuda M., Hayashi R.* // Eur. J. Biochem. 1985. V. 153. № 1. P. 37-40.
62. *Khammungkhune S., Sigler G.* // Synthesis. 1980. № 8. P. 614-665.
63. *Smith R. E., Bissell E. R., Mitchell A. R., Pearson K. W.* // Thromb. Res. 1980. V. 17. № 3/4. P. 393-402.
64. *Coleman P. L., Latham H. G., Shaw E. N.* // Meth. Enzymol. 1976. V. 45. P. 12-26.
65. *Jameson G. W., Roberts D. V., Adams R. W., Kyle W. S. A., Elmore D. T.* // Biochem. J. 1973. V. 131. № 1. P. 107-117.
66. *Gomori G.* // Proc. Soc. Exptl Biol. and Med. 1954. V. 87. № 3. P. 559-561.
67. *Rinderknecht H., Flemming R. M.* // Clin. chim. acta. 1975. V. 59. № 7. P. 139-146.
68. *Riedel A., Wünsch E., Harll A.* // Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem. 1959. B. 316. № 1. S. 61-70.
69. *Nesvadba H.* // Monatsh. Chem. 1962. B. 93. S. 386-396.
70. *Mitchell G. A., Hudson P. M., Huseby R. M., Pochron S. P., Gargiulo R. J.* // Thromb. Res. 1978. V. 12. № 2. P. 219-225.
71. *Bigbee W. L.* // Anal. Biochem. 1978. V. 88. № 1. P. 114-122.
72. *Hill J. B., Sumner G. K., Pender M. W., Roszel N. O.* // Clin. Chem. 1965. V. 11. № 5. P. 541-546.
73. *Schaller E., von Deimblung O.* // Anal. Biochem. 1979. V. 93. № 2. P. 251-256.
74. *Mitchell G. A., Gargiulo R. J., Huseby R. M., Lawson D. E., Pochron S. P., Schuannes J. A.* // Thromb. Res. 1978. V. 13. № 1. P. 47-52.
75. *Lawson D. E., Mitchell G. A., Huseby R. M.* // Thromb. Res. 1979. V. 14. № 2-3. P. 323-332.
76. *Sato E., Miyakawa M., Kanaoka Y.* // Chem. Pharm. Bull. 1984. V. 32. № 1. P. 336-339.
77. *Фрайфелдер Д.* Физическая биохимия. М.: Мир, 1980. 582 с.
78. *Förster T.* // Disc. Faraday Soc. 1952. V. 27. № 1. P. 7-17.
79. *Турро Н.* Молекулярная фотохимия. М.: Мир, 1967. 328 с.
80. *Stryer L., Haugland R. P.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1957. V. 58. P. 719-726.
81. *Latt S. A., Auld D. S., Vallec B. I.* // Anal. Biochem. 1972. V. 50. № 1. P. 56-62.
82. *Carmel A., Kessler E., Yaron A.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 73. № 2. P. 617-625.
83. *Castillo M. J., Kurachi K., Nishino N., Ohkubo I., Powers J. C.* // Biochemistry. 1983. V. 22. № 5. P. 1021-1029.
84. *Fleminger G., Carmel A., Goldenberg D., Yaron A.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 73. № 3. P. 617-625.
85. *Carmel A., Yaron A.* // Eur. J. Biochem. 1978. V. 87. № 2. P. 265-273.
86. *Kam C. M., Nishino N., Powers J. C.* // Biochemistry. 1979. V. 18. № 14. P. 3032-3038.
87. *Rush R. S., Mitas M., Powers J. C., Tanaka T., Hersh L. B.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 231. № 2. P. 390-399.
88. *Филиппова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Комаров Ю. Е., Степанов В. М.* // Биоорган. химия. 1966. Т. 12. № 9. С. 1172-1180.

Поступила в редакцию  
14.VIII.1987

После доработки  
10.V.1988

## CHROMOGENIC AND FLUOROGENIC POLYPEPTIDE SUBSTRATES FOR ASSAY OF PROTEOLYTIC ENZYMES

GERSHKOVICH A. A., KIBIREV V. K.

*Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

The review describes approaches to designing chromogenic and fluorogenic substrates for proteolytic enzymes, mainly for assay of serine proteinases. Principles of substrate polypeptide chain construction and some methods for detection of chromogenic and fluorogenic products of their hydrolysis are considered. The use of these substrates for the study of blood clotting enzymes and for clinical diagnostics is briefly treated. Methodology of chemical synthesis of principal chromogenic and fluorogenic substrates is also discussed.