



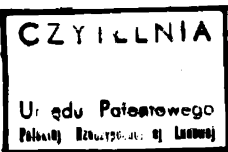
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 04.12.75 (P. 185 228)

Pierwszeństwo: 05.12.74 Szwecja

Zgłoszenie ogłoszono: 25.09.76

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1978



Int. Cl.² C07C 103/52

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: AB Kabi, Sztokholm (Szwecja)

**Sposób wytwarzania nowych enzymatycznych substratów
chromogenicznych oraz ich soli do oznaczania proteaz seryny
a zwłaszcza czynnika Xa**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych enzymatycznych substratów chromogenicznych do oznaczania proteaz seryny a zwłaszcza czynnika Xa.

Otrzymane sposobem według wynalazku nowe substraty lub ich sole są typu amidowego, o wysokiej wrażliwości na czynnik Xa i określone są następującym wzorem ogólnym $R_1-A_1-A_2-Gly-Arg-NH-R_2$, w którym R_1 oznacza atom wodoru, grupę alkanoilową o 1–12 atomach węgla, grupę cykloheksylokarbonylową, benzoilową, benzoilową podstawioną na przykład jednym lub dwoma atomami chlorowca, grupami metylowymi, aminowymi lub fenyłowymi, benzenosulfonylową i 4-toluenosulfonylową, R_2 oznacza grupę nitrofenylową, naftylową, nitronaftylową, metoksynaftylową, chinolilową i nitrochinolilową, A_1 oznacza wiązanie pojedyncze lub oznacza aminokwas taki jak Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Pro, Met, Phe i Tyr, A_2 może oznaczać aminokwas taki jak Glu, Gln, Asp i Asn.

Te nowe substraty są szczególnie przydatne do diagnostycznego oznaczania czynnika Xa (E.C.3.4.21.6), śledzenie reakcji powodujących powstawanie Xa, zahamowanie tego procesu, lub jego zużycie, albo nawet do oznaczania tych czynników, które mają wpływ lub biorą udział w tych reakcjach.

Czynnik X jest podstawową substancją w serii reakcji prowadzących do koagulacji krwi. Aktywacja czynnika X daje poprzez powstawanie enzymu proteolitycznego, czynnik Xa, który jest bez-

2

pośrednio odpowiedzialny za przekształcenie protrombiny w trombinę. Posiadanie prostej metody oznaczania czynnika Xa byłoby bardzo cenne przy stawianiu diagnozy.

5 Stosowane dotychczas odczynniki do oznaczania czynnika Xa składały się zazwyczaj z substratów estrowych o bardzo niespecyficznym charakterze. Jednym z nich jest na przykład benzosan p-nitrofenylo-p'guanidyny (p-NPGB), który jest dobrym substratem tak dla trombiny, jak i dla trypsyny i plasminy. Jego praktyczny zakres zastosowania dla czynnika Xa ogranicza się do oczyszczania preparatów enzymowych. Wyniki otrzymane przy użyciu krwi nie nadają się do praktycznego wykorzystania z powodu obecności innych esteraz aktywnych wobec p-NPGB (R.L. Smith, J. Biol. Chem. 248, 2418 (1972)).

15 W szwedzkim zgłoszeniu patentowym nr 5757/72 opisano bardzo dobre chromogeniczne substraty amidowe dla enzymów podobnych do trombiny. Jeden z nich o wzorze benzoilo-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid (S-2160) pracuje bardzo dobrze dla trombiny, natomiast stosowany z czynnikiem Xa, ulega tylko nieznaczniemu rozszczepieniu. Jeżeli substrat 20 ma być stosowany do oznaczania Xa w diagnostycznej analizie krwi, to jego wrażliwość na trombinę powinna być znikoma.

25 Dlatego byłoby pożądanym dysponowanie substratem bardziej właściwym dla czynnika Xa, a więc mniej podatnym na rozszczepianie przez trom-

binę. Substrat powinien mierzyć biologiczną funkcję enzymu rozszczepiającego wiązania amidowe. Co więcej, byłoby pożądane by substrat mógł być szybko rozszczepiany na produkty łatwe do zmierzenia, takie jak związki chromoforowe, które można łatwo określić spektrofotometrycznie.

Nowe substrakty można wytwarzać dwiema podstawowymi różnymi metodami.

Pierwsza metoda polega na sprzęganiu chromoforowej grupy R_2 z arginina i następnie stopniowo rozbudowywaniu żądanej struktury peptydowej sposobem stopniowego sprzęgania z pozostałymi aminokwasami. Grupa chromoforowa jest tu użyta jako grupa blokująca końcowy węgiel grupy karboksylowej pierwszego aminokwasu.

Druga metoda polega na stopniowym rozbudowywaniu żądanej struktury z wyżej wymienionych aminokwasów, po czym usuwa się grupy blokujące i sprzęga chromoforową grupę R_2 z rozbudowanym peptydem.

W stopniowanych syntezach rozbudowanych peptydów według tych dwóch metod, możliwe jest oczyszczenie w sposób wystarczający na drodze filtracji żelowej, produktu każdego następnego sprzężenia z nowym aminokwasem.

Metody sprzęgania stosowane w tych stopniowanych syntezach pochodnych peptydowych są dobrze znane i powszechnie stosowane w chemii peptydów. Jako grupy blokujące aminy znane są dobrze i powszechnie stosowane w chemii peptydów takie grupy blokujące jak Cbo (grupa karbobenzoksylowa), MeOCbo (p-metoksykarbobenzoksylowa), NO_2Cbo (p-nitrokarbobenzoksylowa), MCbo (p-metoksyfenyloazo-karbobenzoksylowa), BOC trzeciorzędowa butoksykarbonylowa), TFA (trójfluoroacetylowa) lub grupa formylowa.

Grupa α -karboksylowa może być uaktywniona przez przeprowadzenie jej na drodze konwersji w różne aktywne pochodne, dobrze znane i często stosowane w chemii peptydów, które można albo wydzielić albo wytwarzać „in situ”, jak na przykład ester p-nitrofenylowy, ester trójchlorofenylo-owy, ester pięcioklorofenylo-owy, ester imidowy kwasu N-hydroksybursztynowego, azydek kwasowy, bezwodnik kwasowy, który może być symetryczny albo niesymetryczny. Grupa ta może być także uaktywniona przez karbodwuimidy takie jak: N,N'-dwucykloheksylokarbodwuimidy. Końcowy węgiel grupy karboksylowej w pochodnej amino-peptydowej lub pochodnej aminokwasu zabezpiecza się albo przez estyfikację przeprowadzając na przykład w ester metylowy, etylowy lub izopropylowy lub przekształcając na drodze konwersji w chromoforową pochodną aniliny, która w ten sposób działa podczas rozbudowywania łańcucha peptydowego jako grupa blokująca. Wolne grupy funkcyjne nie biorące udziału w reakcji, mogą być podczas syntezy peptydów lub pochodnych peptydowych chronione w sposób następujący:

W celu zablokowania pozostałej grupy arginylo- γ -guanidowej można użyć takich grup blokujących aminę jak na przykład powszechnie stosowana w chemii peptydów protonizacja, grupa NO_2 , lub Tos-p-toluenosulfonylowa. Do zabezpieczania grupy karboksylowej w kwasie glutaminowym lub kwasie

asparaginowym można stosować grupy blokujące, stosowane powszechnie w chemii peptydów, jak grupy benzylowe, i trzeciorzędowe butylowe.

Wynalazek zostanie przedstawiony szczegółowiej w następujących przykładach, ilustrujących sposób wytwarzania różnych substratów według wynalazku na drodze stopniowanych syntez.

W analizach eluatów i produktów, metodą chromatografii cienkowarstwowej, zastosowano jako medium absorbcyjne płytki szklane z silika-żelem F_{254} (Merck).

Zestaw stosowanych rozpuszczalników przedstawiono w poniższej tabeli:

Określenie	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy
A:	n-butanol:kwas octowy:woda	/3 : 1 : 1/
C:	n-propanol:octan etylu:woda	/7 : 1 : 2/
D:	n-heptan-butanol:kwas octowy	/3 : 2 : 1/
P ₁ :	chloroform:metanol	/8 : 1/

Po przeprowadzeniu chromatograficznej analizy cienkowarstwowej, przebadano najpierw płytki w świetle UV (254 nm) i następnie zastosowano metodę bardziej postępową, z reakcją chloro(toluidynową) Ref. G. Pataki: Dünnschichtchromatografie in der Aminosäure-und Peptidchemie, Walter de Gruyter u. Co, Berlin, 1966, s. 125).

Stosowane poniżej skróty mają następujące znaczenie:

Aminokwasy: Skróty dotyczą reszt aminokwasów. Wolny aminokwas lub peptyd pokazuje oczywiście H— w grupie aminowej i —OH— w grupie karboksylowej. Grupa aminowa jest wskazana po lewej stronie, grupa karboksylowa — po prawej. O ile nie stwierdzono inaczej, wszystkie stosowane aminokwasy mają konfigurację —L.

Ala = alanina

Arg = arginina

Asn = asparagina

Asp = kwas asparaginowy

Gln = glutamina

Glu = kwas glutaminowy

Gly = glicyna

Dalsze skróty:

Ac = grupa acetylowa

Ac_2O = bezwodnik octowy

AcOH = kwas octowy

BOC = trzeciorzędowy-butoksykarbonyl

Bz = grupa benzoilowa

Bzl = grupa benzylowa

Bz_2O = bezwodnik kwasu benzoowego

Cbo = grupa karbobenzoksylowa

DCCl = dwucykloheksylokarbodwuimid

DMF = dwumetyloformamid

Ileu = izoleucyna

Leu = leucyna

Met = metionina

Phe = fenyloalanina

Pro = prolina
 Tyr = tyrozyna
 Val = walina
 Et₃N = trójetiloamina
 MCbo = grupa p-metoksyfenyloazokorbobenzo-
 ksykowa
 MeOH = metanol
 OtBU = grupa trzeciorzędowa-butoksykowa
 OEt = grupa etoksykowa
 OMe = grupa metoksykowa
 OpNP = grupa p-nitrofenoksykowa
 OisoPr = grupa izo-propoksykowa
 pNA = p-nitroanilid
 TFA = grupa trójfluoroacetylowa
 Tos = grupa p-toluenosulfonylowa

Wskaźniki temperatur w przykładach podano w °C, o ile nie określono inaczej.

Przykład I. HCl. Bz-Ileu-Glu-Gly-Arg-pNA

Przykład Ia. Cbo-Gly-Arg-(NO₂)-pNA (ciężar molowy 530,4) 5,0 g (10,6 mola) Cbo-Arg(NO₂)-pNA rozpuszcza się w 21 ml AcOH (kwasu octowego) i 22 ml 4n HBr w AcOH w warunkach pozbawionych wilgoci. Roztwór miesza się przez godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie wlewa się go powoli do 200 ml szybko mieszanego eteru. Roztwór eterowy dekantuje się i otrzymaną ziarnistą pozostałość ponownie traktuje dwa razy 100 ml eteru. Po wysuszeniu pod próżnią znad P₂O₅ i granulę KOH w temperaturze 30°C otrzymuje się bromowodorową sól pochodnej aminokwasu z prawie ilościową wydajnością (4,95 g).

Produkt jest jednorodny, zgodnie z TLC w A.

Tak otrzymany produkt rozpuszcza się w 50 ml destylowanego DMF (dwumetyloformamidu). Roztwór oziębia się do -10°C i dodaje ET₃N (trójetiloamina) aż do zneutralizowania (2,1 ml). Wytrącony osad ET₃N. HBr odsąca się i przesącz oziębia do -10°C. Dodaje się 3,9 g (11,8 mmola) Cbo-Gly-OpNP i powoli roztwór może osiągnąć temperaturę pokojową. Po trzech godzinach roztwór schładza się ponownie do -10°C i buforuje za pomocą 0,54 g (5,3 mmola) trójetiloaminy (ET₃N). Po 2–3 godzinach powtarza się proces buforowania jeszcze raz. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się na noc i potem odparowuje pod próżnią w temperaturze 40°C. Pozostały ciężki olej miesza się bardzo dokładnie z 100 ml wody destylowanej. Wodę się dekantuje i proces mycia powtarza się następnie dwukrotnie. Pozostały olej rozpuszcza się w ciepłym metanolu (MeOH) i otrzymuje podczas chłodzenia osad produktu w postaci krystalicznej. Wydajność: 4,2 g (75%) produktu Ia Cbo-Gly-Arg-(NO₂)-pNA. Jednorodny zgodnie z TLC w P₁ (R_f = 0,16) [α]_D²⁵ -36° (c 0,50, MeOH—metanol).

Przykład Ib. III-rzęd.Boc-Glu-γ-OBzl(Gly-Arg(NO₂)-p-NA) (ciężar molowy 715,8) 2,65 g (5,0 mmola) produktu Ia poddaje się dekarbобенzo-ksylacji i sprzęga z 2,50 g (5,5 mmola) III-rzęd.-Boc-Glu-(γ-OBzl)-OpNP zgodnie z metodą podaną w przykładzie Ia. Surowy produkt oczyszcza się na drodze chromatografii żelowej w kolumnie zawierającej SEPHADEX LH-20 w metanolu.

Wydajność: 3,25 g (91% produktu Ib)

Jednorodny zgodnie z TLC w P₁ (R_f = 0,22)

[α]_D²⁴ -34° (c 1,0 metanol).

Ic: Cbo-Ileu-Glu (γ-OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA (ciężar molekularny 862,9) 1,08 g (1,5 mmola) produktu Ib rozpuszcza się w 10 ml TFA. Roztwór miesza się przez godzinę w temperaturze pokojowej i następnie wlewa powoli do 75 ml szybko mieszanego osuszonego eteru. Roztwór eterowy dekantuje się i otrzymaną ziarnistą pozostałość traktuje dwukrotnie 50 ml eteru. Po osuszeniu pod próżnią znad P₂O₅ i granulę KOH w temperaturze 30°C, wydajność trójfluoroacetylowej (TFA) soli pochodnej trójetilowej jest prawie ilościowa (1,08 g). Produkt jest jednorodny zgodnie z TLC w A. Powyższy produkt rozpuszcza się w 20 ml DMF-dwumetyloformamidzie. Roztwór oziębia się do temperatury -10°C i neutralizuje ET₃N-trójetilaminą (0,23 ml). Dodaje się 0,65 g (1,68 mmola) produktu Cbo-Ileu-OpNP i roztwór powoli osiąga temperaturę pokojową. Po około trzech godzinach roztwór schładza się ponownie do -10°C i buforuje trójetilaminą (0,12 ml). Po 2–3 godzinach powtarza się jeszcze raz procedurę buforowania i roztwór pozostawia przez noc. Nadmiar Cbo-Ileu-OpNP rozkłada się potem przez dodanie do roztworu około 100 mg (około 1,4 mmola) n-butyloaminy. (Nadmiar aktywnego estru jest niekorzystny, gdyż trudno jest go oddzielić podczas filtracji żelowej). Po około 30 minutach roztwór odparowuje się pod próżnią w temperaturze 40°C. Pozostały olej przemawia się trzema porcjami wody destylowanej. Olej rozpuszcza się w MeOH (metanolu) i oczyszcza za pomocą chromatografii żelowej w kolumnie zawierającej SEPHADEX LH-20 w metanolu.

Wydajność: 1,07 g (83%) produktu Ic, jednorodny zgodnie z TLC w P₁ (R_f = 0,35).

[α]_D²⁴ -32° (c. O. 3, MeOH (metanol): DMF (dwumetyloformamid) (95:5).

Id: Bz-Ileu-Glu γ-OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA 260 mg (0,30 mmola) produktu Ic dekarbобенzo-ksylowano jak w przykładzie Ia. Produkt wykazuje 2 plamki w TLC w A (R_f = 0,45 i 0,80), a IR — spektroskopia wykazuje, że produkt jest mieszaniną HBr. H-Ileu-Glu γ-OH-(Gly-Arg(NO₂)-pNA i HBr. H-Ileu-Glu-γ-OBzl (Gly-Arg(NO₂)-pNA).

Mieszaninę tę poddaje się reakcji z 800 mg (0,35 mmola) bezwodnika kwasu benzoowego jak w przykładzie Ia. Surowy benzoilowany produkt oczyszcza się w kolumnie chromatograficznej z SEPHADEX LH-20 w metanolu.

Otrzymano dwie frakcje: α-130 mg [α]_D²⁴ -15°C (c 0,5, CH₃CN), R_f = 0,20 w P₁ i β: 105 mg [α]_D²⁴ -11° (c 0,5, CH₃CN), R_f = 0,06 w P₁.

Spektroskopia IR określa te dwie frakcje jako: Bz-Ileu-Glu γ-OBzl)-Gly-Arg(NO₂)-pNA i Bz-Ileu-Glu-Gly-Arg(NO₂)-pNA. Z obu frakcji, reakcja z HF daje ten sam produkt końcowy Ie.

Ie: HCl.Bz-Ileu-Glu-Gly-Arg-pNA (ciężar molowy 734,5).

100 mg (0,12 mmola) produktu Id frakcji i 0,5 ml anizolu umieszcza się w naczyniu reakcyjnym aparatu Sakakibara. Następnie do tego naczynia przedestylowuje się około 5 ml osuszonego fluoro-

wodoru i pozwala przereagować w ciągu 75 minut mieszając w temperaturze 0°C. Następnie fluorowódór oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i oleistą pozostałość rozpuszcza się w 10 ml AcOH (33%-owy wodny roztwór kwasu octowego), potem oczyszcza się w kolumnie chromatograficznej zawierającej SEPHADEX G-15 w 33%-owym wodnym roztworze AcOH (kwasu octowego). Następnie frakcję eluentu zawierającą czystą odblokowaną pochodną czteropeptydową poddaje się liofilizacji. Otrzymany związek rozpuszcza się w mieszaninie metanolu i wody destylowanej (95:5) i w postaci chlorku poddaje chromatografii na lekko zasadowym wymienniaczu anionowym QAE—SEPHADEX A-25, przy czym mieszanina rozpuszczalników jest taka sama jak w eluencie. Metanol usuwa się z eluentu w temperaturze 30°C pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostały wodny roztwór poddaje liofilizacji.

Wydajność: 75 mg (85%), jednorodny z TLC w A ($R_f = 0,48$)

$[\alpha]_D^{24} -40^\circ$ (c 0,5, 50%-owy AcOH (kwas octowy-wodny roztwór)).

Analiza aminokwasów: izoleucyna: 0,98, kwas glutaminowy: 0,95, arginina: 0,98, glicyna: 1,00.

Przykład II. $2HCl.H-Ileu-Glu-Gly-Arg-pNA$.

Przykład IIa. $2HCl.H-Ileu-Glu-Gly-Arg-pNA$ (o ciężarze molowym 666,6) 100 mg (0,116 mmola) produktu Ic poddaje się reakcji z fluorowodorem, oczyszcza i poddaje na wymienniacz jonowy jak w przykładzie Ie.

Wydajność: 56 mg (73%), jednorodny zgodnie z TLC w A ($R_f = 0,34$).

$[\alpha]_D^{24} -35^\circ$ (c 0,5 50% AcOH — kwas octowy w wodzie destylowanej).

Analiza aminokwasów: Ileu (izoleucyna): 0,96; Glu (kwas glutaminowy): 0,94; Arg (arginina): 0,96; Gly (glicyna): 1,00.

Substraty opisane w powyższych przykładach zastosowano do oznaczania czynników w sposób następujący:

Zasada oznaczania polega na tym, że produkt powstały z enzymatycznej hydrolizy daje zupełnie inne widmo UV niż widmo substratu. W ten sposób substrat z przykładu I, Bz-Ileu-Glu-Gly-Arg-pNA-HCl wykazuje maximum absorpcji przy 315 nm przy współczynniku molarnej ekstynkcji 12000. Absorpcja substratu przy 405 nm jest nieznaczna. P-nitroanilina (pNA), która powstaje z substratu podczas jego enzymatycznej hydrolizy wykazuje maksymalną absorpcję przy 380 nm a współczynnik molarnej ekstynkcji 13200, który przy 405 nm spada tylko do 9620. Dlatego możliwym jest na drodze pomiaru spektrometrycznego przy 405 nm

śledzić z łatwością stopień enzymatycznej hydrolizy, który jest proporcjonalny do ilości wyprodukowanej p-nitroaniliny.

Obecny nadmiar substratu nie wpływa na pomiar przy tej długości fali. Sytuacja jest prawie identyczna dla innych substratów według wynalazku i z tego powodu spektrofotometryczne pomiary były cały czas przeprowadzane przy 405 nm. Tabela I daje zestawienie porównawcze względnego stopnia (szybkości) reakcji różnych enzymów typu proteaz seryny (E. C. 3. 4. 21), na poprzednio wymieniony substrat S-2160 i substrat I według wynalazku. Stopnie reakcji określono wyżej opisaną metodą.

Jak wynika z tabeli, czynnik Xa rozszczepia substrat I sto razy lepiej niż to ma miejsce z S-2160 i w porównaniu z S-2160 efekt ten wywołuje tylko w nieznacznej mierze trombina. Tak więc nie ma żadnych wątpliwości, że substrat I, zgodnie z zestawieniem, jest najlepszym substratem dla Xa. Co więcej z tablicy widać, że substrat I może być z powodzeniem stosowany również jako substrat dla trypsyny. Jednak ten pozytywny efekt dla trypsyny nie zakłóca oznaczania czynnika Xa, ponieważ trypsyna normalnie nie występuje we krwi.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych enzymatycznych substratów chromogenicznych oraz ich soli do oznaczania proteaz seryny, a zwłaszcza diagnostycznego oznaczania czynnika Xa, przy czym te substraty przedstawia wzór ogólny $R_1-A_1-A_2-Gly-Arg-NH-R_2$, w którym R_1 oznacza atom wodoru, grupę alkanoilową zawierającą 1—12 atomów węgla, grupę cykloheksylokarbonylową, benzoilową, benzoilową podstawioną jednym lub dwoma atomami chlorowca, grupami metylowymi, aminowymi lub fenyłowymi, benzenosulfonylową i toluenosulfonylową, R_2 oznacza grupę nitrofenylową, naftylową, nitronaftylową, metoksynaftylową, chinolilową i nitrochinolilową, A_1 oznacza pojedyncze wiązanie lub aminokwasy takie jak Gly(glicynę), Ala(alaninę), Val(walinę), Leu(leucynę), Ileu(izoleucynę), Pro(prolinę), Met(metioninę), Phe(fenylalaninę) i Tyr(tyrozynę) i A_2 oznacza aminokwasy takie jak Glu(kwas glutaminowy), Gln(glutaminę), Asp(kwas asparaginowy), Asn(asparaginę), znanymi tym, że najpierw sprzęga się z arginina (Arg), chromoforową grupę R_2 o wyżej podanym znaczeniu blokującą końcowy węgiel grupy karboksylowej pierwszego aminokwasu, a następnie stopniowo rozbudowuje strukturę peptydową poprzez stopniowe sprzęganie z odpowiednimi pozostałymi wyżej wymienionymi aminokwasami.

2. Sposób wytwarzania nowych enzymatycznych substratów chromogenicznych lub ich soli do oznaczania proteaz seryny, a zwłaszcza diagnostycznego

Tabela I

Stężenie	Substraty	Względny stopień reakcji			
		trombina	Xa	trypsyna	plazmina
0,1 mmola	S-2160	100	1	100	100
0,25 mmola	I	2	100	500	75

oznaczania czynnika Xa, przy czym te substraty przedstawia wzór ogólny $R_1-A_1-A_2-Gly-Arg-NH-R_2$, w którym R_1 oznacza atom wodoru, grupę alkanoilową zawierającą 1—12 atomów węgla, grupę cykloheksylokarbonylową, benzoilową, benzoilową podstawioną jednym lub dwoma atomami chlorowca, grupami metylowymi, aminowymi lub fenyłowymi, benzenosulfonylową i toluenosulfonylową, R_2 oznacza grupę nitrofenylową, naftylową, nitronaftylową, metoksynaftylową, chinolilową i nitrochinolilową, A_1 oznacza pojedyncze wiązanie

lub aminokwasy takie jak Gly(glicynę), Ala(alaninę), Val(walinę), Leu(leucynę), Ileu(izoleucynę), Pro(prolinę), Met(metioninę), Phe(feniloalaninę) i Tyr(tyrozynę) i A_2 oznacza aminokwasy takie jak 5 Glu(kwas agulaminowy), Gln(glutaminę), Asp(kwas asparaginowy), Asn(asparaginę), **znamienny tym**, że najpierw rozbudowuje się strukturę peptydową z wyżej wymienionych aminokwasów, po czym usuwa się grupy blokujące i sprzęga chromoforową 10 grupę R_2 o wyżej podanym znaczeniu z rozbudowanym peptydem.