

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 85 588

**REQUERENTE:** BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com  
sede em D-3550 Marburg, Alemanha

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS  
CROMOGÉNICOS"

**INVENTORES:** Werner Stuber e Dieter Schnaitmann

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

Alemanha, em 28 de Agosto de 1986, sob o No. P 36 29 175

Memória descritiva referente à patente de invenção de BEHRING WERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Werner Stüber e Dr. Dieter Schnaitmann, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS CROMOGÊNICOS".

#### MEMÓRIA DESCRITIVA

A invenção descreve novos compostos cromogênicos. Estes compostos são apropriados como substratos enzimáticos para fins de diagnóstico por meio da identificação de enzimas proteolíticas. Os novos compostos de acordo com a invenção destinam-se principalmente à determinação quantitativa de endoproteases, especialmente daquelas que provocam a cisão de peptídeos e de proteínas antes de aminoácidos como arginina, lisina ou aminoácidos com grupos laterais aromáticos. Estes compostos cromogênicos podem por isso utilizar-se para a quantificação de reacções em que se formam, se consomem ou se inibem os enzimas acima mencionados.

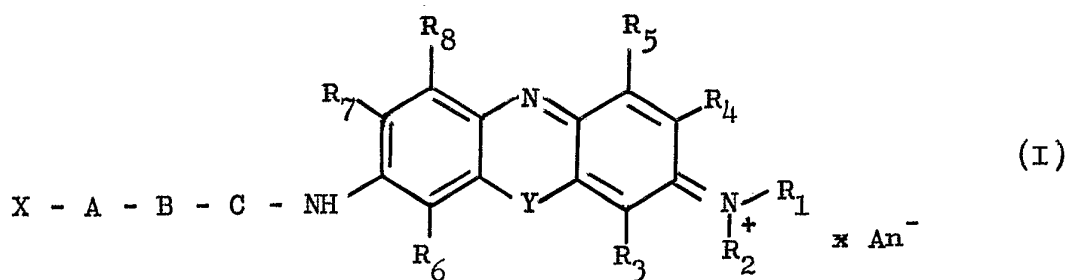
No estado actual do conhecimento, servem para este fim, os cromóforos ligados através de ligações amida a péptidos ou derivados peptídicos, que podem ser cindidos por meio de enzimas proteolíticas. Conhecem-se em particular substratos peptídicos a partir dos quais os enzimas mencionados

podem cindir grupos quantificáveis fotométrica ou fluorimetricamente (EPA 0046 742, DE 32 440 30 A1). Para a determinação fotométrica de enzimas utilizam-se até ao momento, de preferência, derivados peptídicos da p-nitroanilina. A p-nitroanilina libertada por via enzimática mede-se a um comprimento de onda de 405 nm. Os substratos cromogénicos têm como requisitos importantes uma boa solubilidade nas condições do ensaio, alta especificidade e sensibilidade na identificação, bem como facilidade de manejo e detecção. No caso dos substratos até agora utilizados estes requisitos estão insuficientemente preenchidos e como tal necessitam de ser melhorados.

É particularmente desvantajosa a determinação fotométrica da p-nitroanilina ou dos seus derivados, uma vez que a medição a 405 nm é afectada ou impossibilitada por exemplo pela presença de componentes do plasma ou de outros líquidos corporais. Para a quantificação fotométrica acima de 580 nm encontram-se já substâncias descritas, nas quais se verifica uma formação de corantes por reacções químicas após a cisão do substrato. Estas reacções permitem, contudo, apenas uma determinação no ponto final, uma vez que o decurso cinético da reacção enzimática é muitas vezes afectado ou pelo menos dificultado pela adição de compostos químicos orgânicos ou inorgânicos (EPA 00 76 042; H. C. Kwaan et al., Thromb. Res. 13, 5-13, 1978).

O propósito desta invenção é o de obter compostos cromogénicos de elevada solubilidade e especificidade, que permitam determinar, de forma qualitativa e quantitativa, enzimas proteolíticos na presença de sangue, componentes do plasma e outros líquidos corporais.

O objectivo da invenção são por isso os compostos de fórmula geral (I)



na qual

X significa um átomo de hidrogénio, um grupo que bloqueia de forma irreversível um grupo amino terminal, ou um grupo de protecção habitual em química de péptidos, como por exemplo Boc-, Z- ou Fmoc-,

A e B podem ser iguais ou diferentes, e significam um aminoácido alfa, beta ou gama, constituído por 2 a 15 átomos de carbono, com até 4 átomos de azoto, 2 átomos de enxofre e 6 átomos de oxigénio, cujas cadeias laterais podem ser substituídas, e B significa, conforme o caso, um dipéptido formado a partir destes aminoácidos,

C significa arginina, lisina, tirosina, fenilalanina ou triptofano, bem como os seus homólogos,

$R_1$  e  $R_2$  são iguais ou diferentes, e significam um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo com até 4 átomos de carbono,

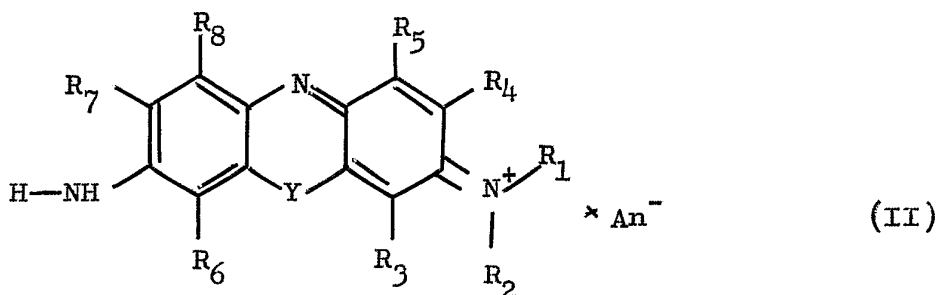
$R_3$  até  $R_8$  são iguais ou diferentes, e significam hidrogénio, um grupo alquilo, um grupo alquilo-oxi ou um halogéneo,

Y significa oxigénio

$An^-$  significa um anião, por exemplo cloreto ou acetato,

bem como os respectivos sais solúveis em água, como por exemplo formiato, acetato ou cloreto.

Nos compostos de acordo com a invenção está presente um cromóforo heteroaromático. Com isso obtêm-se vantagens apreciáveis em relação aos compostos até agora utilizados. Descobriu-se surpreendentemente que, por acoplamento de um aminoácido a um cromóforo do tipo da fórmula (II).



em que

$R_1 - R_8$  e Y possuem os significados acima mencionados, se obtém um desvio hipsodrômico de 70 nm ou mais. Isto significa que compostos azuis isoladamente, apresentam na forma peptídica ligada uma cor vermelha. O objectivo da invenção são por isso substâncias de fórmula I, que contêm o corante ligado de forma covalente de acordo com a fórmula II e que se caracterizam por os máximos de absorpção do corante livre e do corante ligado apresentarem uma diferença de 70 nm ou mais e por o comprimento de onda de absorpção do cromóforo livre ser superior a 550 nm. Devido a esta absorpção a elevado comprimento de onda é possível, entre outras, a determinação pela técnica de fotodiodo ou a determinação reflectométrica de tiras teste. Uma determinação deste tipo a baixos comprimentos de onda, por exemplo a 405 nm, não é possível. As propriedades espectrais favoráveis possibilitam a medição das actividades enzimáticas na presença de líquidos corporais, por exemplo no sangue, uma vez que o comprimento de onda de absorpção do sistema corante está suficientemente afastado do comprimento de onda de absorpção da hemoglobina. Também é vantajosa a possibilidade de fazer a determinação com sistemas fotométricos tradicionais. Os coeficientes de extinção molar dos corantes (fórmula II) são superiores cerca de 6 a 10 vezes ao da p-nitroanilina.

As vantagens mencionadas em relação aos com-

postos habitualmente utilizados, são ainda reforçadas pelo facto de os compostos de acordo com a invenção serem extremamente solúveis e de os substratos apresentarem uma especificidade superior.

Os compostos de acordo com a invenção preparam-se de acordo com os métodos habituais da química dos péptidos. Os aminoácidos empregues existem, salvo indicação em contrário, de preferência na forma-L. A expressão "aminoácidos" aplica-se a aminoácidos alfa, beta ou gama, constituídos por 2 a 15 átomos de carbono com até 4 átomos de azoto, 2 átomos de enxofre e 6 átomos de oxigénio.

Os aminoácidos definidos em A e B, são não só os que ocorrem naturalmente mas também podem ser aminoácidos como por exemplo ácido pipercolínico, ácido azetidino-carboxílico ou fenilglicina.

Os novos compostos cromogénicos contêm, de acordo com a invenção, um grupo cromóforo derivado da dibenzo-1,4-oxazina (fenoxazina). Como se representa na fórmula II, estes sistemas corantes possuem um grupo auxocrómico, especialmente um grupo dialquilamino, e um grupo amino colocado simetricamente em relação ao grupo dialquilamino. Os grupos  $R_3$ - $R_3$  representados na fórmula II, podem ser iguais ou diferentes e significar átomos de hidrogénio, átomos de halogéneo, grupos alquilo com até 3 átomos de carbono e 7 átomos de hidrogénio ou grupos alquiloxi com até 3 átomos de carbono e 7 átomos de hidrogénio. O grupo amino primário do sistema aromático é capaz de, de acordo com a invenção, formar ligações amida com aminoácidos ou com péptidos.

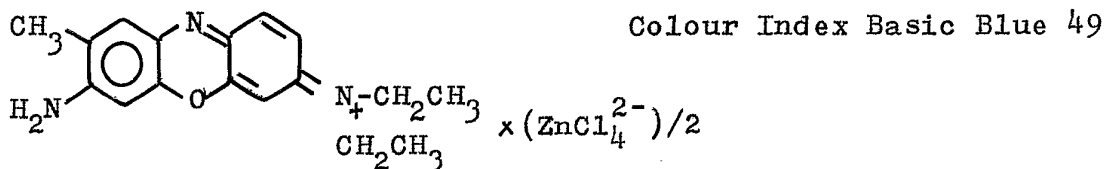
Por isso, é também um objectivo da invenção, um processo para a preparação dos substratos cromogénicos de acordo com a invenção, caracterizado por se fazerem reagir derivados da fenoxazina de acordo com a fórmula II com aminoácidos, derivados de aminoácidos ou péptidos protegidos. Os gru-

pos reactivos, que não devem reagir durante a preparação dos aminoácidos C-terminais nos grupos amino primários do corante, devem proteger-se em relação à sua reactividade. Como grupos de protecção temporários utilizam-se de preferência grupos protectores do tipo uretano. Entre estes contam-se por exemplo o grupo ter-butoxicarbonilo, o grupo benziloxicarbonilo ou o grupo bifenililpropiloxicarbonilo. Os grupos laterais reactivos dos aminoácidos ou dos péptidos podem também conter grupos protectores com vista à continuação da síntese peptídica, que, se necessário, só se removem no fim da síntese. Pode assim proteger-se, por exemplo, o grupo guanidino da arginina com o grupo nitro, o grupo tosilo ou por protonação, os grupos carboxilo do ácido asparagínico e do ácido glutâmico por esterificação, os grupos amino da ornitina e da lisina por grupos protectores do tipo uretano e o grupo fenólico da tirosina por esterificação. A escolha da combinação dos grupos protectores depende dos casos específicos das técnicas conhecidas habituais na química dos péptidos, de modo que os grupos protectores acima mencionados são apenas exemplos, uma vez que a sua variedade é consideravelmente maior.

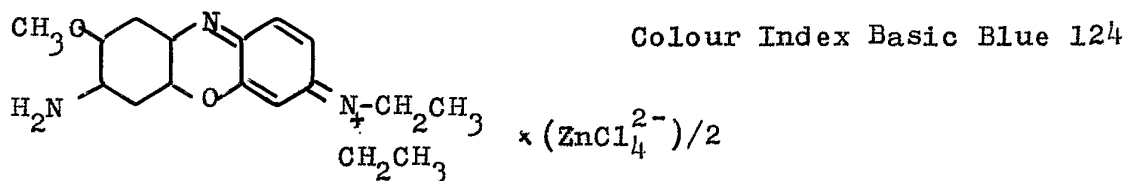
A formação das ligações amida ou peptídicas efectua-se de acordo com os métodos usuais na química dos péptidos. Normalmente activam-se os grupos carboxilo dos aminoácidos ou péptidos protegidos e fazem-se reagir com os grupos amino dos parceiros reaccionais. A activação dos grupos carboxilo faz-se por exemplo pela técnica da carbodiimida, da azida, do anidrido, do cloreto de acilo ou do éster activo, ocorrendo as reacções de acoplamento entre os reagentes nos solventes habituais, como por exemplo dimetilformamida, cloreto de metileno, clorofórmio, piridina, sulfóxido dimetílico ou hexametilenofosfotriamida, ou nos seus derivados, conforme o caso na presença de bases. No âmbito do processo de acordo com a invenção, os derivados da fenoxazina utilizados como reagentes de partida, podem ainda transformar-se nos isocianatos correspondentes, que reagem com aminoácidos N-protegidos.

Utilizam-se de preferência, como cromóforos,

os derivados da fenoxazina, com as seguintes estruturas:



ou



Estes cromóforos de cor azul escura fazem-se reagir de preferência com aminoácidos protegidos de acordo com o processo DCC/HOBt para se obterem compostos de cor vermelha. No caso de se utilizar o aminoácido arginina, protege-se o grupo  $-N^{\alpha}$  com o grupo Boc-, Z-, ou Fmoc- e o grupo  $-N^G$  com o grupo nitro-, Di-Z-, ou Mtr-. No caso da lisina, escolhe-se a combinação de grupos protectores Boc/Z.

Para ambos os cromóforos, tanto o Colour Index Basic Blue 49 como o Colour Index Basic Blue 124, obtiveram-se compostos análogos do ponto de vista das suas propriedades espectrais, cujos máximos de absorção diferiam de menos de 5 nm. Assim estes corantes, num sistema fisiológico tampoadado, apresentam uma absorção a cerca de 625 nm, enquanto os compostos ligados a péptidos absorviam a 545 nm.

A formação dos substratos di-, tri- ou tetra-peptídeos pode processar-se por passos, isto é, introduzindo aminoácidos protegidos activados ou, com vantagem, por inclusão de oligopéptidos protegidos activados. Os aminoácidos N-terminais existem de preferência na forma-D ou possuem um grupo protector ou um grupo que fecha o N-terminal, como por exemplo tosilo, benzoilo, acetilo, benzoiloxicarbonilo.

A remoção dos grupos protectores permanentes,

eventualmente a separar, efectua-se de preferência no fim da síntese. Os grupos protectores hidrolisáveis em meio ácido removem-se com HCl 1,2N/AcOH ou com ácido trifluoroacético. Os grupos protectores separáveis por hidrogenólise removem-se com passagem de hidrogénio com paládio sobre carvão activado, desaparecendo as propriedades còrantes do cromóforo de modo reversível.

Do ponto de vista da facilidade de remoção dos grupos de protecção de  $N^G$ -, os grupos hidrolisáveis em condições ácidas moderadas, mostram-se como os mais convenientes. Em particular, o grupo  $N^G$ -Mtr tem, nestas condições, um comportamento vantajoso.

Nos exemplos seguintes ilustra-se a preparação dos substratos peptídicos. (Para as abreviaturas utilizadas veja-se a pág. 18).

#### Exemplo 1

Triacetato de 7-(D-fenilalanil-L-prolil-L-arginilamino)-3-dietilamino-8-metilfenoxazónio

Passo A: Hemitetraclorozincato de triacetato de 7-( $N^G$ -Boc- $N^G$ -Mtr-arginilamino)-3-dietilamino-8-metilfenoxazónio

Dissolvem-se 4,3 g de  $N$ -Boc- $N^G$ -Mtr-L-arginina, 2,54 g de hemitetraclorozincato de 7-amino-3-dietilamino-8-metilfenoxiazónio e 1,22 g de HOBT em 100 ml de DMF e adiciona-se 1,1 ml de NMM. Arrefece-se a mistura reaccional num banho de gelo e adiciona-se 2,1 g de DCC. Após 2 horas aquece-se à temperatura ambiente e continua a processar-se a reacção de acoplamento durante 6 horas. Separa-se o DCU precipitado por filtração e evapora-se o solvente em vácuo. Toma-se o resíduo em butanol, extrai-se três vezes com água e concentra-se em vácuo até um volume pequeno. Precipita-se o produto com acetato de etilo, filtram-se os cristais e seca-se em alto vácuo.

Rendimento: 4,7 g

Caracterização: DC Rf = 0,15 (B)

Rf = 0,39 (A)

Passo B: Dicloridrato de 7-N<sup>G</sup>-Mtr-arginilamino-3-dietilamino-8-metilfenoxiazônio

Trata-se 1,2 g do produto obtido no passo A com 50 ml de HCl/AcOH 1,2N durante 30 minutos. Evapora-se o reagente hidrolisante em vácuo e arrasta-se duas vezes com tolueno. Após liofilização obtêm-se 950 mg de um pó cristalino vermelho.

Controle de pureza: DC Rf = 0,17 (A)

Passo C: Cloridrato de 7-(N<sup>K</sup>-Boc-D-fenilalanil-L-prolil-N<sup>G</sup>-Mtr-arginilamino)-3-dietilamino-8-metilfenoxazônio

Dissolvem-se 720 mg do produto obtido no passo B, juntamente com 135 mg de HOBt e 362 mg de Boc-D-Phe-OH em 25 ml de DMF e arrefece-se a 4°C em banho de gelo. Adiciona-se 45 mg de DCC e agita-se durante 2 horas a 4°C e durante 12 horas à temperatura ambiente. Separa-se o DCU precipitado por filtração e evapora-se o solvente. Cromatografa-se o resíduo oleoso sobre sílica gel (100 g de sílica gel 60, 40-63 µm, eluente D). Para posterior purificação cromatografa-se o produto em <sup>(R)</sup>Sephadex LH20 (MeOH).

Rendimento: 290 mg

Controle de pureza: DC Rf = 0,48 (D)

Passo D: Triacetato de 7-(D-fenilalanil-L-prolil-L-arginilamino)-3-dietilamino-8-metilfenoxazônio

Tratam-se 200 mg do substrato obtido no passo C, após secagem simples, com 4,5 ml de ácido trifluoroacético e 0,5 ml de anisole durante 4 horas a 40°C. Destila-se o áci-

do em vácuo e purifica-se o resíduo por cromatografia de permuta iônica em celulose CM (Whatman CM 32, gradiente de acetato de amônio de 0,01 M a pH 4,5 a 0,3 M a pH 6,8). Remove-se o tampão de eluição por liofilização repetida.

Rendimento: 135 mg de pó vermelho

Controle de pureza: DC Rf = 0,27 (20/10/2/1)

Análise de aminoácidos: Phe = 0,98

Pro = 1,04

Arg = 1,00

Teor peptídico = 96%

### Exemplo 2

#### Diacetato de 7-(L-alanil-L-alanil-L-fenilalanil)-2-dietilamino-8-metil-fenoxazônio

##### Passo 1 Hemitetraclorozincato de 7-(Boc-L-fenilalanil)-3-dietilamino-8-metil-fenoxazônio

Dissolvem-se 1,33 g de Boc-L-Phe, 1,41 g de hemitetraclorozincato de 7-amino-3-dietilamino-8-metil-fenoxazônio e 0,76 g de HOBt em 50 ml de DMF e arrefece-se a 0°C. Adicionam-se 0,55 ml de NMM e 1,05 g de DCC. Agita-se a mistura reaccional em banho de gelo durante 2 horas e à temperatura ambiente durante 3 horas. Filtra-se o DCU precipitado, concentra-se o filtrado e dissolve-se o resíduo em MeOH. Precipita-se o produto por adição de éter. Filtram-se os cristais e secam-se em alto vácuo.

Rendimento: 1,95 g

Controle de pureza: DC Rf = 0,77 (C)

##### Passo 2 Dicloridrato de 7-L-fenilalanil-3-dietilamino-8-metil-fenoxazônio

Agita-se 1,8 g do produto obtido no passo 1, após remoção do grupo Boc, com 50 ml de HCl/AcOH, durante 25

minutos. Destila-se o reagente hidrolisante em vácuo e arrasta-se duas vezes o produto oleoso com tolueno. Toma-se o resíduo em água e extrai-se duas vezes com uma mistura de butanol/acetato de etilo (1:2/razão volumétrica). Liofiliza-se a fase aquosa.

Rendimento: 1,65 g

Controle de pureza: DC Rf = 0,26 (D)

Passo 3 Cloridrato de 7-Boc-L-alanil-L-alanil-L-fenilalanil-3-dietilamino-8-metil-fenoxazônio

Dissolve-se 1 g de Boc-Ala-Ala-OH, 0,58 g de HOBt e 1,6 g do produto obtido no passo 2 em 50 ml de DMF e arrefece-se em banho de gelo. Adiciona-se 0,8 g de DCC e 420 µl de NMM e agita-se uma hora em banho de gelo e 4 horas à temperatura ambiente. Filtra-se a parte insolúvel e evapora-se o solvente em vácuo. Cromatografa-se o resíduo oleoso sobre sílica gel (100 g de sílica gel, 40-63 µm, eluente D). Para purificação posterior cromatografa-se o produto sobre <sup>(R)</sup>Sephadex LH20 (MeOH).

Rendimento: 820 mg

Controle de pureza: DC Rf = 0,45 (D)

Passo 4 Diacetato de 7-L-alanil-L-alanil-L-fenilalanil-3-dietilamino-8-metilfenoxazônio

Agita-se 300 mg do produto obtido no passo 3 em 20 ml de HCl/AcOH durante 25 minutos. Destila-se o ácido em vácuo e removem-se os vestígios ácidos por destilação com tolueno (duas vezes). Purifica-se o resíduo por cromatografia de permuta iônica (Whatman CM 32, gradiente de acetato de amônio de 0,01 M a pH 4,5 a 0,3 M a pH 6,8). Obtém-se o produto puro cristalino por liofilização.

Rendimento: 160 mg

Controle de pureza: DC Rf = 0,53 (20/10/2/1)

Análise de aminoácidos: Ala 2,06  
Phe 1,00

Teor peptídico: 0,89

De modo análogo preparam-se os compostos/sub-  
stractos apresentados na Tabela I

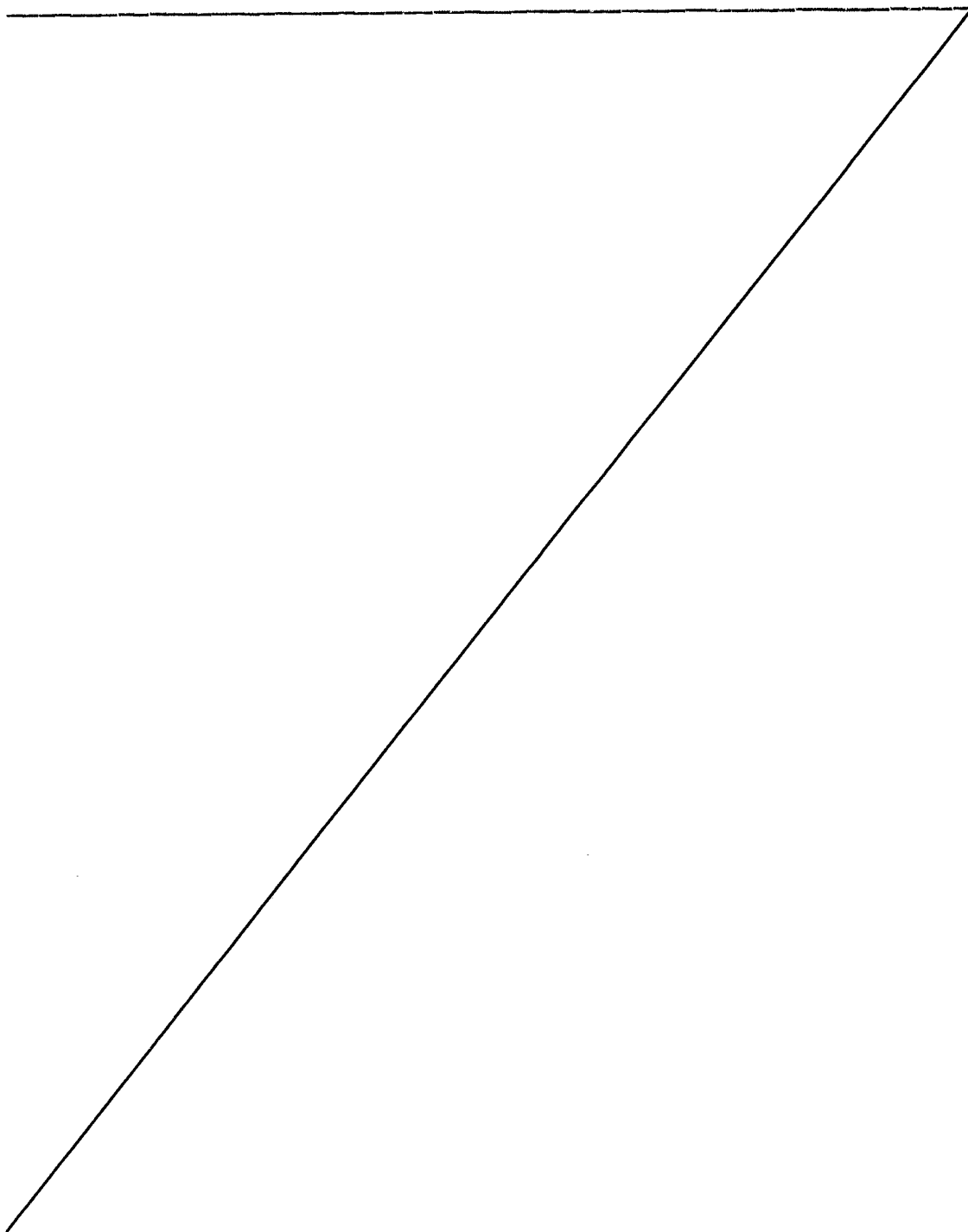


TABELA I

SUBSTRATO	PASSO PRELIMINAR	PURIFICAÇÃO
pyro-Glu-Pro-Arg-Blue 49	pyro-Glu-Pro-Arg(Mtr)-Blue 49	Cromatografia
Z-D-Leu-Gly-Arg-Blue 49	Z-D-Leu-Gly + H-Arg-Blue 49 x 3 TFA	de permuta
Tos-Gly-Pro-Arg-Blue 49	Tos-Gly-Pro-Arg(Mtr)-Blue 49	iônica
D-Leu-Pro-Arg-Blue 49	Boc-D-Leu-Pro-Arg(Mtr)-Blue 49	
D-Phe-Tyr-Arg-Blue 49	Boc-D-Phe-Tyr-Arg(Mtr)-Blue 49	
D-Val-Leu-Lys-Blue 49	Boc-D-Val-Leu-Lys(Boc)-Blue 49	
Z-D-Leu-Glu-Gly-Arg-Blue 49	Z-D-Leu-Glu(tBu)-Gly-Arg-Blue 49	
D-Phe-Pro-Arg-Blue 124	Boc-D-Phe-Pro-Arg(Mtr)-Blue 124	
D-Pro-Phe-Arg-Blue 49	Boc-D-Pro-Phe-Arg(Mtr)-Blue 49	
D-Pro-Phe-Arg-Blue 124	Boc-D-Pro-Phe-Arg(Mtr)-Blue 124	
D-Ile-Leu-Pro-Arg-Blue 49	Z-D-Ile-Leu-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-Blue 49	
D-Phe-Pip-Arg-Blue 49	Z-D-Phe-Pip-Arg(NO <sub>2</sub> )-Blue 49	
D-Ala-Gly-Arg-Blue 49	Boc-D-Ala-Gly-Arg(NO <sub>2</sub> )-Blue 49	
D-Val-Tyr-Arg-Blue 49	Boc-D-Val-Tyr(tBu)-Arg(Mtr)-Blue 49	

...  
Teste dos substratos

Misturaram-se 800 µl de solução tampão (trishidroxiaminometano, 50 mMol/l) a pH 8,0 com 100 µl da solução de enzima, a 37°C e adicionaram-se 100 µl de solução de substrato 2 mMole/l. O pNA separado mediu-se a 405 nm e o Blue 49 ou o Blue 124 a 623 nm. A velocidade de separação (cisão) calculou-se em OD/minuto.

Na Tabela II apresentam-se as velocidades de cisão relativas e ainda as especificidades de alguns substratos e enzimas

1  
Tabela II  
1

Substrato sintetizado (2 mMole/l)	Uroquinase	Proteína C	Trombina	Plasmina	F Xa	Kallicreína
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	-	0,075	0,041	0,035	0,025	0,11
H-D-Phe-Pro-Arg-Blue 49	-	0,03	0,395	0,00	0,01	0,00
pyro-Glu-Pro-Arg-pNA	-	0,40	0,41	0,53	0,04	0,51
H-D-Leu-Pro-Arg-Blue 49	-	0,47	0,09	0,015	0,035	0,015
pyro-Glu-Pro-Arg-Blue 49	1,0	0,22	0,015	0,03	0,02	0,015
pyro-Glu-Gly-Arg-pNA	-	0,30	0,00	0,01	0,01	0,01
Tos-Gly-Pro-Arg-Blue 49	-	0,76	0,15	0,02	0,095	0,02

## Abreviaturas

pNA	p-nitroanilina (para-nitroanilina)
Blue 49	hemitetraclorozincato (ou -acetato) de 7-amino-3-dietilamino-8-metilfenoxazônio
Blue 124	hemitetraclorozincato (ou -acetato) de 7-amino-3-dietilamino-8-metoxifenoxazônio
N <sup>G</sup>	grupo azotado da função guanidino da arginina
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonilo
Boc	<u>ter</u> -butiloxicarbonilo
HOBt	hidroxibenzotriazole
DMF	dimetilformamida
NMM	N-metilmorfolina
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCU	diciclohexilureia
DC	cromatografia em camada fina
R <sub>F</sub>	factor de retenção
AcOH	ácido acético
MeOH	metanol
OD	densidade óptica
Z	carbobenzoxi-
Fmoc	9-fluoreniloxicarbonilo

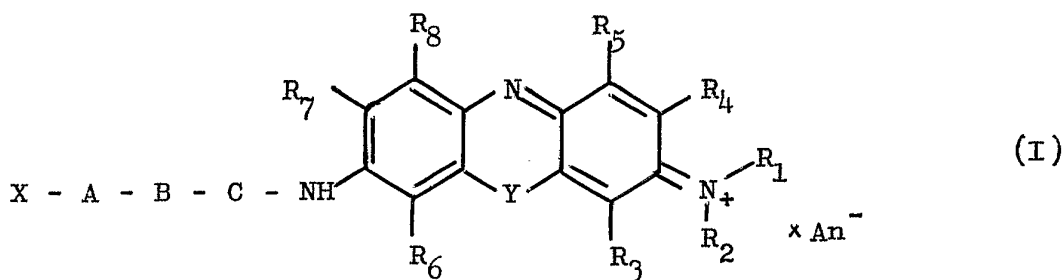
Fluentes para a cromatografia em camada fina:

A	butanol/ácido acético/água	3:1:1 (partes em volume)
B	clorofórmio/metanol/ácido acético	50:10:5 (partes em volume)
C	clorofórmio/metanol/ácido acético	50:10:2,5 (partes em volume)
D	clorofórmio/metanol/ácido acético	50:15:3 (partes em volume)

As abreviaturas dos aminoácidos estão de acordo com as regras IUPACIUB (Biochem. J. 219, 345-373, 1984).

## REIVINDICAÇÃO

Processo para a preparação de um composto de fórmula (I)



na qual

X significa um átomo de hidrogénio, um grupo que bloqueia de forma irreversível um grupo amino terminal, ou um grupo de protecção habitual em química de péptidos, como por exemplo Boc-, Z- ou Fmoc-,

A e B podem ser iguais ou diferentes e

significam um aminoácido alfa, beta ou gama, constituído por 2 a 15 átomos de carbono, com até 4 átomos de azoto, 2 átomos de enxofre e 6 átomos de oxigénio, cujas cadeias laterais podem ser substituídas, e B significa, conforme o caso, um dipéptido formado a partir destes aminoácidos,

C significa arginina, lisina, tirosina, fenilalanina ou triptofano, bem como os seus homólogos,

R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são iguais ou diferentes e

significam um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo com até 4 átomos de carbono,

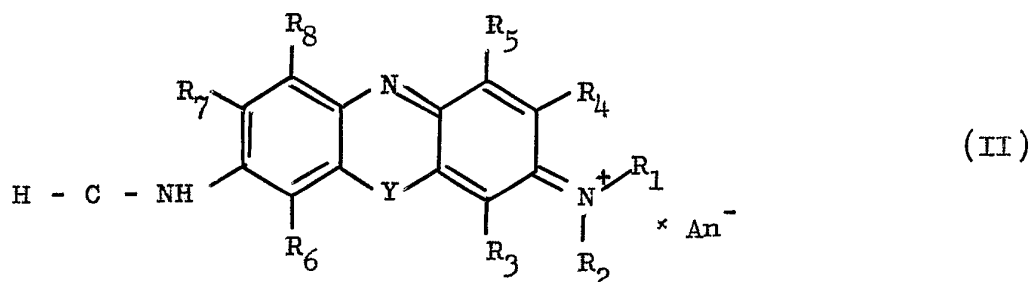
R<sub>3</sub> até R<sub>8</sub> são iguais ou diferentes e

significam hidrogénio, um grupo alquilo, um grupo alquilo-oxi ou um halogéneo,

Y significa oxigénio e

An<sup>-</sup> significa um anião,

bem como dos seus sais solúveis em água, caracterizado por se condensar um derivado de aminoácido de fórmula (II)



na qual

R<sub>1</sub> a R<sub>8</sub>, An<sup>-</sup>, Y e C possuem os mesmos significados que na fórmula (I), podendo contudo ainda os grupos reactivos dos aminoácidos estarem bloqueados por grupos protectores, com um oligopéptido de fórmula geral (III)



em que

X, A e B têm os significados acima mencionados, mas X não é hidrogénio e sim um grupo protector ou um grupo que fecha de forma irreversível o N-terminal, ou com um aminoácido protegido, correspondente à fórmula geral (IV)



em que X, A e B possuem os significados acima mencionados.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã em 28 de Agosto de 1986, sob o nº P 36 29 175.7.

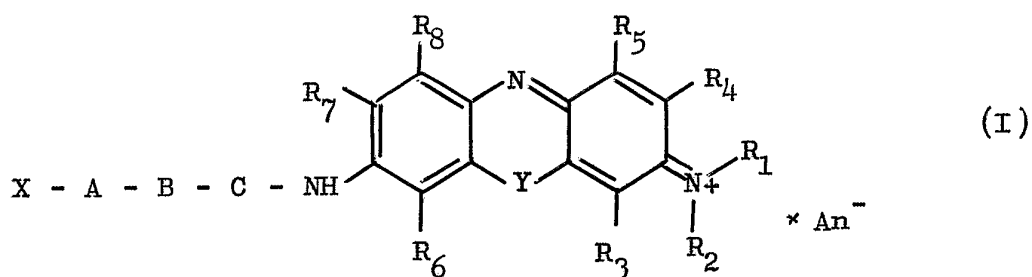
Lisboa, 26 de Agosto de 1987

SECRETARIA DE ESTADO DA ECONOMIA E FINANÇAS

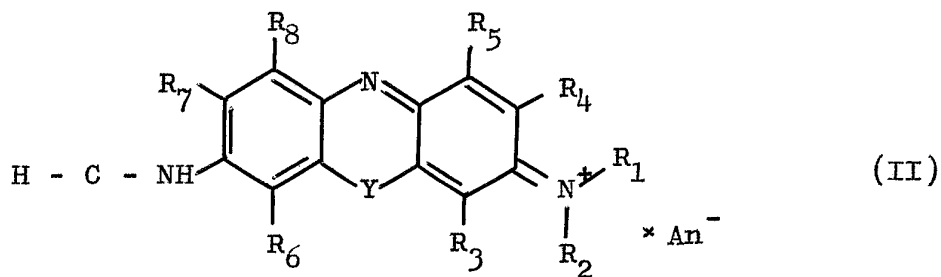
R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS CROMOGENICOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um composto de fórmula (I)



e dos seus sais solúveis em água, que compreende condensar-se um derivado de aminoácido de fórmula (II)



com um oligopéptido de fórmula geral (III)



ou com um aminoácido protegido, correspondente à fórmula geral (IV)

