

# Capítol 5 Resultats i discussió

## 5.1 N-Protecció/desprotecció de derivats d'aminoàcids i pèptids amb PGA immobilitzada

La síntesi peptídica comporta diferents passos de protecció i desprotecció d'aminoàcids i pèptids pels que la utilització d'enzims presenta certs avantatges respecte a la via química convencional degut a la seva selectivitat, especificitat i condicions suaus d'operació. Així doncs, la introducció i eliminació enzimàtica de grups protectors pot ser un bon complement tant per a la síntesi enzimàtica com química de derivats peptídics (Waldmann *et al.*, 1994).

Un dels grups protectors més coneguts que es poden eliminar enzimàticament és el fenilacetil (PhAc), el qual pot ser extret biocatalíticament mitjançant la penicil·lina G acilasa (PGA). Aquest enzim ha estat emprat en la desprotecció de grups  $\alpha$ -amino (vegi's Taula **Error!Argumento de modificador desconocido.**), grups N- $\alpha$ -amino de la lisina (Brtnik *et al.*, 1981) i el grup sulfidril de la cisteïna (Greiner *et al.*, 1991; Royo *et al.*, 1995), al llarg de la síntesi de pèptids. A més, el grup fenilacetamida no es veu afectat durant la saponificació, hidrogenòlisi i tractament amb àcids, fent-lo compatible amb altres grups protectors convencionals (Waldmann, 1988; Waldmann *et al.*, 1991).

La PGA presenta una alta especificitat pel grup fenilacetil, tot i així altres grups com mandelil, tienilacetil i fenilglicil també són acceptats com a substrats per aquest enzim (Caldas *et al.*, 1980). A més, accepta diferents derivats d'aminoàcids i de pèptids com a nucleòfils. Aquest fet permet la possibilitat de preparar l'acil-N- $\alpha$ -derivat més convenient per a ser utilitzat tant en síntesi enzimàtica com química de pèptids, la qual cosa és particularment important en la síntesi enzimàtica de pèptids, on els grups N- $\alpha$  i C- $\alpha$  d'un aminoàcid poden influenciar fortament la reactivitat dels substrats, així com la seva solubilitat (Calvet *et al.*, 1993.). A més, l'extracte de PGA que s'ha utilitzat no mostra activitat proteolítica i per això, no hi ha risc d'hidròlisi de l'enllaç peptídic.

Al començar aquesta investigació, calia plantejar-se com dur a terme la introducció i eliminació dels grups protectors dels diferents fragments peptídics que

s'aniran sintetitzant, de forma que facilités la consecució de l'objectiu principal del treball, o sigui el disseny d'un procés global per a la síntesi enzimàtica de la CCK-8. En els estudis previs realitzats –tal i com s'esmenta a la introducció (§2.7)– s'havia fet servir el grup protector Z (benziloxicarbonil). L'eliminació d'aquest grup en pèptids que contenen metionina –com és el cas de la CCK-8– per hidrogenació catalítica resulta problemàtica. Això és degut a que el sofre del grup tioèter de la cadena lateral de la metionina pot enverinar el catalitzador i es fa necessari l'ús de condicions especials com ara la presència de bases que dificulta el canvi d'escala. L'alternativa és utilitzar àcid fluorhídric, però degut a que és altament corrosiu és necessari treballar en unes instal·lacions especials el que suposa poca aplicabilitat a nivell industrial. Per aquests motius, es va creure interessant aplicar la introducció enzimàtica de grups protectors en algunes etapes del procés de síntesi de la CCK-8 per tal de facilitar la subseqüent desprotecció. Així mateix s'inclou l'estudi de la influència d'aquests nous grups protectors en la reactivitat del donador d'acil en la síntesi Gly-Trp i es compara amb altres grups protectors, emprats habitualment en síntesi enzimàtica de pèptids.

## 5.1.1 N-protecció d'aminoàcids

### 5.1.1.1 N-protecció d'esters d'aminoàcids amb el grup fenilacetil en sistemes bifàsics amb control termodinàmic

En aquest apartat es presenta l'estudi de la introducció enzimàtica del grup N- - fenilacetil en derivats de l'àcid aspàrtic, metionina i glicina. Les reaccions es van dur a terme sota control termodinàmic en sistemes bifàsics (acetat d'etil/tampó citrat), utilitzant com a biocatalitzador PGA immobilitzada sobre gels d'agarosa per enllaç covalent multipuntual.

L'aplicabilitat d'aquest enzim quant a la N- protecció es discutirà en funció dels rendiments i altres variables com  $r_{0 \text{ síntesi}}/r_{0 \text{ hidròlisi}}$  (velocitat inicial de síntesi/velocitat inicial d'hidròlisi).

La introducció d'un grup protector a un derivat d'aminoàcid consisteix en la formació d'un enllaç amida entre el grup carboxil del grup protector en qüestió i el grup amino de l'aminoàcid.

La manera més simple de dur a terme aquesta reacció és per control termodinàmic de la reacció i, donat que els productes que s'obtenen són majoritàriament solubles en dissolvents orgànics, es va seleccionar un sistema de reacció bifàsic amb una continua

extracció del producte cap a la fase orgànica per tal de desplaçar l'equilibri cap a la síntesi.

L'obstacle més important per la formació d'un enllaç amida catalitzat enzimàticament sota control termodinàmic és l'equilibri d'ionització dels reactants. La reacció de condensació té lloc entre les formes no iòniques dels grups carboxil i amino, la concentració de les quals depèn del pH del medi de reacció. Aquest pH ha de ser un valor intermedi entre ambdós valors de pK ( $\text{pH}_{\text{opt}} = \frac{1}{2}(\text{pK}_a + \text{pK}_b)$ ) per a obtenir rendiments alts (Apèndix C). És més, el pH determina dràsticament la partició dels substrats i dels productes en barreges bifàsiques especialment quan aquests tenen grups ionitzables. La Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. mostra esquemàticament les constants de síntesi i dissociació i les particions dels substrats i producte en les fases, en un sistema d'aquest tipus.

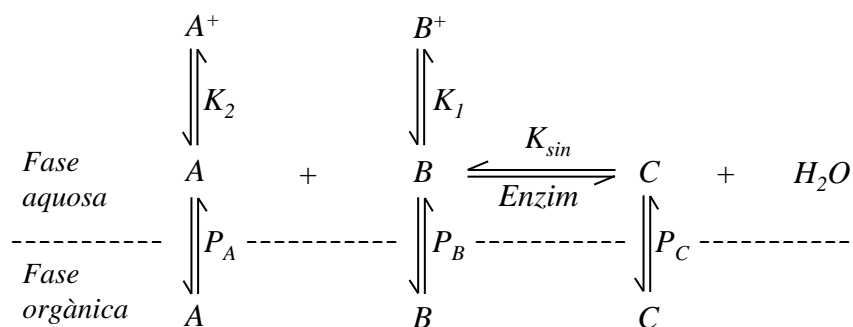


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema de les particions dels substrats i producte entre les fases aquosa i orgànica i de les constants de síntesi i dissociació que intervenen en un sistema de reacció bifàsica. Essent: A: el substrat de la reacció amb el grup carboxil desprotegit i en la forma no ionitzada. B: el substrat de la reacció amb el grup amino desprotegit en forma no ionitzada.  $\text{A}^+$  i  $\text{B}^+$ : les formes ionitzades dels substrats, que es troben en equilibri amb les formes no ionitzades segons les constants de dissociació  $K_1$  i  $K_2$ . C: el producte de la síntesi enzimàtica.  $K_{\text{sin}}$ : la constant d'equilibri de formació del producte.

Per iniciar l'estudi, es va dur a terme la introducció enzimàtica –a escala analítica– del grup fenilacetil a diferents derivats d'aminoàcids amb l'extrem carboxiterminal esterificat (H-Gly-OMe, H-Met-OMe, H-Asp(OBu<sup>1</sup>)-OMe, H-Asp(OBzl)-OBzl i H-Asp(OMe)-OMe), utilitzant concentracions equimolars d'àcid fenilacètic i del nucleòfil corresponent. Donat que no es coneixen els pKs d'aquests derivats d'aminoàcids i tenint present que el pH influeix tant en la ionització com en el repartiment dels substrats i producte entre fases, per tal de veure l'efecte conjunt, es van realitzar els experiments a diferents pH. Aquests assaigs es van dur a terme en

sistemes bifàsics: acetat d'etil/tampó citrat, sota control termodinàmic de la reacció. Els rendiments de síntesi dels diferents derivats N- protegits obtinguts es mostren a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

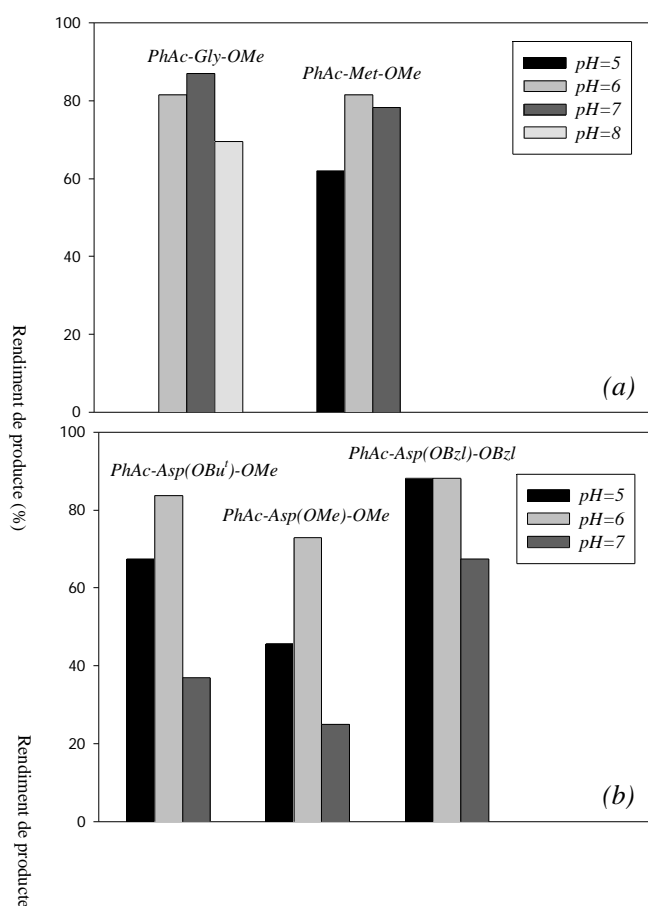


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Influència del pH en les reaccions de síntesi de N- $\alpha$  fenilacetil derivats d'aminoàcids, catalitzades per PGA immobilitzada. Les reaccions es van dur a terme en un sistema bifàsic (acetat d'etil/tampó citrat 200 mM (1/1 (v/v))– excepte per PhAc-Gly-OMe (4/1 (v/v))– sota control termodinàmic de la reacció. En tots els experiments es van emprar concentracions equimolars d'àcid fenilacètic i nucleòfil: 120 mM per PhAc-Gly-OMe, 75 mM per PhAc-Met-OMe i 25 mM pels N-fenilacetil derivats de l'aspàrtic.

A partir dels resultats de la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.a, es desprèn que els derivats PhAc-Gly-OMe i PhAc-Met-OMe es van sintetitzar amb rendiments alts. El pH òptim va ser 7 per H-Gly-OMe i 6 per H-Met-OMe i els rendiments de producte van ser superiors al 80%. Els resultats representats

a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.b**, indiquen que la protecció de diferents **¡Error!Argumento de modificador desconocido**, diesters de l'àcid aspàrtic es va assolir amb rendiments de producte similars als que s'obtenien amb glicina i metionina. En tots els casos el producte s'extreia majoritàriament cap a la fase orgànica –més del 90% de l'ester d'aminoàcid N-protegit es trobava en aquesta fase– ja que es tracta de molècules hidrofòbiques sense cap grup ionitzable.

Aquesta investigació es va ampliar duent a terme la N-protecció de derivats C- ester de l'àcid aspàrtic no protegits en la posició **¡Error!Argumento de modificador desconocido**, com ara H-Asp-OMe i H-Asp-OBzl, a pH 5, 6 i 7, utilitzant el mateix sistema de reacció que en els experiments anteriors. En aquests assajos es va obtenir com a màxim un rendiment del 25% de síntesi de PhAc-Asp-OBzl, a pH 6. En referència a la síntesi de PhAc-Asp-OMe, els rendiments assolits encara van ser inferiors. Aquests valors tan baixos probablement eren deguts a que la partició dels substrats i/o producte en les fases aquosa/orgànica no afavorien l'avanç de la reacció. Per tant es va creure interessant estudiar el repartiment de substrats i producte en les fases –a diferents pH– en funció de si el nucleòfil presenta el grup -carboxil protegit o no. Així a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido**, es compara un grup d'experiments de N-protecció de H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe i H-Asp-OBzl.

Nucleòfil	pH	Repartiment Aq. /Or. (%)		Rendiment (%)
		Àcid fenilacètic	Producte	
H-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OMe	5	10/90	1/99	68
	6	54/46	2/98	84
	7	91/9	3/97	38
H-Asp-OBzl	5	15/85	3/97	20
	6	46/54	13/87	25
	7	86/14	60/40	12

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido**.: Síntesi sota control termodinàmic de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe i PhAc-Asp-OBzl en sistemes bifàsics, utilitzant PGA immobilitzada com a catalitzador. Efecte del pH en el repartiment de l'àcid fenilacètic i del producte en la fase aquosa/orgànica i sobre el rendiment de síntesi. Les reaccions es van dur a terme en sistemes bifàsics: acetat d'etil/tampó citrat 200 mM (1/1 v/v) a diferents pH. La concentració inicial d'ambdós substrats era 25mM.*

Com s'ha esmentat prèviament, el pH òptim per a obtenir rendiments alts no està determinat només per la partició dels substrats i el producte sinó que a més està influenciat per la concentració de les formes no iòniques dels reactius. A partir dels valors que es presenten a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., s'observa que els millors rendiments (84% per PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe i 25% per PhAc-Asp-OBzl) s'obtenen a pH 6. Les diferències de rendiment podrien ser degudes al repartiment del producte en la fase orgànica –en aquestes condicions la concentració de PhAc-Asp-OBzl en la fase aquosa era 6.5 vegades més gran que per PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe– i/o a la concentració de formes no iòniques dels substrats en la fase aquosa.

En el cas en que el producte no té grups ionitzables (PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe), aquest majoritàriament es reparteix en la fase orgànica (>97%) i no es veu afectat pel pH. En canvi, el repartiment de PhAc-Asp-OBzl entre les fases sí que depèn del pH. Així a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. s'observa que la seva concentració en la fase aquosa és del 3% a pH 5 i del 60% a pH 7. Per tant, la presència de grups carboxílics no protegits incrementa la solubilitat d'aquest producte en la fase aquosa (fins i tot utilitzant un grup fortament hidrofòbic, OBzl, en la posició C- ) i això fa baixar el rendiment de síntesi.

D'altra banda si ens centrem en la reacció de síntesi del PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe s'observa que s'obtenen rendiments bastant diferents variant el pH, malgrat que com ja s'ha esmentat el repartiment d'aquest producte entre fases és pràcticament igual pels diferents pH assajats. En aquest cas els percentatges de síntesi de producte tan diferents es podrien atribuir al repartiment de l'àcid fenilacètic entre fases i a la concentració de formes iòniques. Així a pH 7, bona part de l'àcid es troba en la fase aquosa i majoritàriament ionitzat, el que indica que no pot reaccionar. A pH 5 malgrat que l'àcid es troba principalment en forma no iònica, només n'hi ha un 10% a la fase aquosa on té lloc la reacció. Per tant, el pH òptim de treball resulta ser 6, ja que en aquestes condicions hi ha un 54% d'àcid en la fase aquosa i amb un percentatge en forma no iònica més elevat que a pH 7.

### 5.1.1.2 N-Protecció d'esters d'aminoàcids amb el grup fenilacetil en sistemes monofàsics amb control cinètic

Tal i com s'esmenta en la secció prèvia, l'ús de sistemes bifàsics sota control termodinàmic donava rendiments baixos quan s'utilitzaven els derivats H-Asp-OMe i H-Asp-OBzl. El problema principal és que els productes no es podien extreure eficaçment cap a la fase orgànica i la posició de l'equilibri de la reacció era

desfavorable. Així doncs, era necessari canviar el sistema de reacció per formar l'enllaç amida. Per aquest motiu, com a nova estratègia de reacció, es van seleccionar sistemes monofàsics utilitzant barreges de tampó/cosolvent orgànic per a la protecció de derivats C- ester de l'àcid aspàrtic no protegits en la posició N- i C- , sota control cinètic.

Inicialment es va fer l'estudi de protecció de H-Asp-OMe (50 mM) amb el grup metilfenilacetat (PhAc-OMe, 50 mM) amb PGA immobilitzada. En primer lloc es van fer uns assaigs preliminars per a seleccionar el dissolvent orgànic amb el que es treballaria. La presència d'un cosolvent orgànic era necessària per a solubilitzar el metilfenilacetat i per reduir la hidròlisi de l'intermedi acil-enzim. Aquesta síntesi es va dur a terme a pH 7 en presència de diferents dissolvents miscibles en aigua (60%(v/v)). Els dissolvents provats van ser: dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH), 2,3-butanodiol (Bu(OH)<sub>2</sub>) i acetonitril (CH<sub>3</sub>CN). Els rendiments de síntesi que es van obtenir van ser similars per a aquests quatre dissolvents (13-17%). Es va escollir metanol per a la resta d'experiments perquè les recomanacions de la FDA admeten que el producte final contingui més p.p.m. de metanol que dels altres dissolvents i en segon lloc perquè el seu punt d'ebullició és més baix i per tant seria més fàcil la seva eliminació posterior.

<i>Dissolvent</i>	<i>Punt d'ebullició</i>	<i>p.p.m. admeses en el producte final</i>
Acetonitril	79 - 82°C	410
Metanol	63 - 65°C	3000
Dimetilformamida	153 - 155°C	880
2,3-Butanodiol	81 - 83°C	-

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Punts d'ebullició dels dissolvents emprats en la síntesi del derivat PhAc-Asp-OMe, sota control cinètic de la reacció i p.p.m. admeses en el producte final (segons recomanacions de la FDA). Una llista exhaustiva d'aquestes recomanacions es presenta a l'apèndix D.*

Per tal de millorar el rendiment d'aquesta reacció es va seguir estudiant alguns paràmetres com ara el pH, la concentració de metanol i la concentració de nucleòfil.

### 5.1.1.2.1 Influència del pH

Per a estudiar la influència del pH en la reacció esmentada es va dissenyar un grup d'assaigs, utilitzant una relació equimolar (30 mM) de PhAc-OMe i H-Asp-OMe. Les reaccions es van dur a terme en una barreja metanol/tampó bicarbonat 80 mM (60/40% (v/v)), a pH= 7, 8, 9 i 10.

Els resultats d'aquests experiments es troben recollits a la **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, on s'observa que tant el rendiment de síntesi com el quocient:  $r_{0\text{ sint}}/r_{0\text{ hid}}$  creixen amb el pH, assolint un valor màxim a pH 10. Es va evitar treballar amb valors de pH més elevats ja que llavors la hidròlisi química de l'ester donador d'acil i del nucleòfil esdevé significant. Sota control cinètic –tal i com s'ha explicat a la introducció (§2.1.2.2)– el complex acil-enzim que es forma per reacció de l'enzim amb el donador d'acil pot ser desacilat per l'aigua (el que significa la hidròlisi del metilfenilacetat) o pel nucleòfil (per donar la reacció de síntesi). Només la forma no protonada del nucleòfil (H-Asp-OMe) pot desacilar el complex donant el producte. Així, quan el pH es va incrementar de 7 a 10, la concentració efectiva de nucleòfil va augmentar i s'obtingueren rendiments de síntesi més elevats. Per tant, la resta d'experiments es van dur a terme a pH 10.

pH	Rendiment reacció (%)	$r_{0\text{ síntesi}} / r_{0\text{ hidròlisi}}$
7	9	0.32
8	31	0.92
9	34	0.93
10	39	1.36

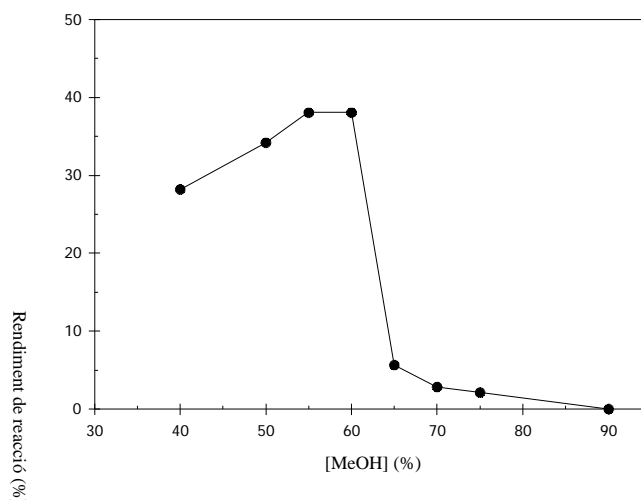
*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Influència del pH en la síntesi controlada cinèticament de PhAc-Asp-OMe amb PGA immobilitzada. Les reaccions es van dur a terme en una barreja metanol/tampó bicarbonat 80 mM (60/40% (v/v)). La concentració inicial de donador d'acil (PhAc-OMe) i nucleòfil (H-Asp-OMe) era en ambdós casos 30mM.  $r_{0\text{ síntesi}}/r_{0\text{ hidròlisi}}$  es defineix com la velocitat inicial de síntesi de PhAc-Asp-OMe dividida per la velocitat inicial d'hidròlisi de PhAc-OMe.*

### 5.1.1.2.2 Influència de la concentració de metanol

El segon paràmetre estudiat va ser la concentració de cossolvent. En totes les reaccions que es van realitzar es van utilitzar concentracions equimolars (30 mM) de PhAc-OMe i H-Asp-OMe. Els diferents percentatges metanol/tampó bicarbonat (pH



10) que es van provar van ser: 40/60, 50/50, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25 i 90/10. La influència de la concentració de metanol en el rendiment de producte es presenta a la Figura **Argumento de modificador desconocido.** En un rang de concentració de metanol des de 40% (v/v) fins 55-60% (v/v), el rendiment augmenta linealment fins a un valor del 40%. A concentracions de metanol majors del 60% s'observa una ràpida davallada en el rendiment de producte. Aquesta és una clara conseqüència de l'efecte negatiu que tenen les altes concentracions dels dissolvents miscibles en aigua sobre l'activitat i estabilitat de la PGA (Álvaro *et al.*, 1990). Així doncs, a la vista d'aquests resultats, es va decidir utilitzar una concentració del 55% (v/v) en els experiments posteriors.



*Figura **Argumento de modificador desconocido.**: Influència de la concentració de metanol en la síntesi de PhAc-Asp-OMe sota control cinètic de la reacció, catalitzada per PGA immobilitzada. Les reaccions es van dur a terme en diferents mescles metanol/tampó bicarbonat pH=10, utilitzant concentracions equimolars d'ambdós substrats (30 mM).*

### 5.1.1.2.3 Influència de la concentració de nucleòfil

La influència de la concentració de nucleòfil en aquesta reacció també es va estudiar. Amb aquesta finalitat es van dur a terme diferents experiments mantenint la concentració de donador d'acil (PhAc-OMe) constant (30 mM) i variant la concentració de nucleòfil (H-Asp-OMe). Els resultats obtinguts es mostren a la Taula **Argumento de modificador desconocido.**

<i>Excés de nucleòfil</i>	<i>Rendiment de producte (%)</i>
1.0	39
2.0	49
2.3	62
2.7	59
5.3	62

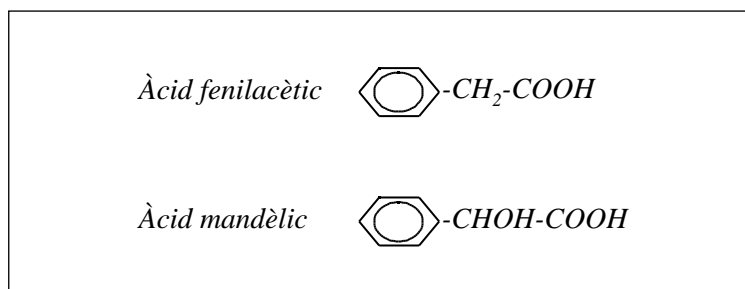
*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Efecte de la concentració de nucleòfil en la síntesi de PhAc-Asp-OMe controlada cinèticament i catalitzada per PGA immobilitzada. Les reaccions es van dur a terme a pH 10 en una barreja de metanol/tampó bicarbonat 80 mM (55/45% (v/v)). La concentració inicial de metilfenilacetat era 30 mM. L'excés de nucleòfil es defineix com la concentració de nucleòfil dividida per la concentració de donador d'acil.*

A partir dels valors d'aquesta taula s'observa que el rendiment de producte augmenta fins a un valor del quocient [nucleòfil]/[donador d'acil] de 2.3. Un excés més gran de nucleòfil no millora el rendiment de síntesi (60%). Això suggereix que a aquest quocient de [nucleòfil]/[donador d'acil] el centre actiu de l'enzim està saturat amb nucleòfil.

En referència a l'altre substrat –amb el grup desprotegit– estudiat a §5.1.1.1 (H-Asp-OBzl), es va dur a terme la síntesi de PhAc-Asp-OBzl sota control cinètic de la reacció, treballant en les millors condicions trobades per PhAc-Asp-OMe. En aquest cas, el rendiment (45%) va ser inferior a l'obtingut amb H-Asp-OMe (62%), degut a la menor solubilitat de l'ester benzílic en metanol i es va descartar augmentar la concentració de dissolvent en el medi de reacció per no afectar l'estabilitat de la PGA.

### 5.1.1.3 N-protecció de H-Gly-OBzl amb el grup mandelil

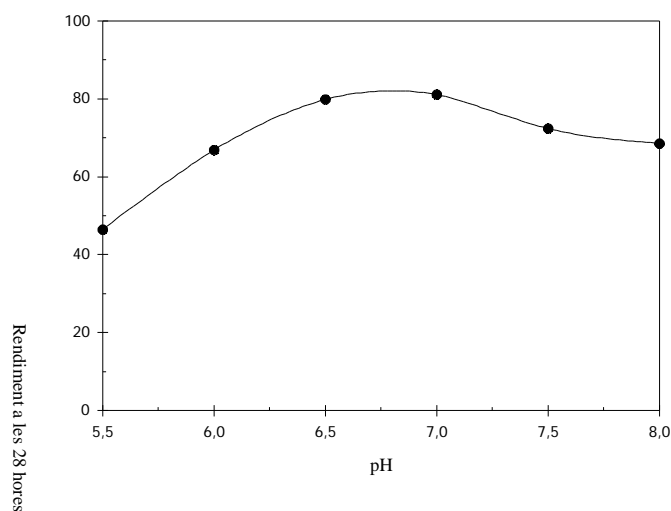
Una vegada fet l'estudi amb el grup protector fenilacetil, es va creure interessant provar la introducció enzimàtica d'un altre grup protector, el mandelil (Mand). Aquest grup té una estructura química molt similar a la del fenilacetil (vegi's Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.) i també es reconegut com a substrat per la PGA.



**Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.:** Estructura química de l'àcid fenilacètic i mandèlic\*.

Així es va dur a terme la N-protecció de H-Gly-OBzl amb el grup mandèlic a diferents pH (5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 i 8) amb PGA immobilitzada. Aquests experiments es van realitzar en un sistema de reacció bifàsic (acetat d'etil/tampó citrat), sota control termodinàmic igual que en la investigació prèvia amb el grup fenilacetil.

Els rendiments assolits (a les 28 hores de reacció) per aquest conjunt d'assajos es presenten a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**



**Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.:** Influència del pH en la síntesi de Mand-Gly-OBzl, catalitzada per PGA immobilitzada. Els experiments es van dur a terme en un sistema bifàsic (acetat d'etil/tampó citrat 200 mM (1/1 (v/v))), sota control termodinàmic de la reacció. En totes les reaccions es van utilitzar concentracions equimolars d'àcid mandèlic i H-Gly-OBzl (30 mM).

\* En tots els experiments es va utilitzar l'isòmer D(-) de l'àcid mandèlic (àcid [R]- -hidroxi-fenilacètic).

El perfil de la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. indica que la zona òptima de treball és a pH 6.5-7. En aquestes condicions si es deixaven evolucionar les reaccions fins a l'equilibri s'obtenien rendiments de 82-86%. A la vista d'aquests resultats, s'extreu com a conclusió que la N- protecció enzimàtica amb el grup mandelil també és factible.

#### 5.1.1.4 Síntesi preparativa de derivats d'aminoàcids N-protegits

En els apartats anteriors s'han optimitzat les condicions de reacció per a la preparació enzimàtica de diferents derivats d'aminoàcids N-protegits. Treballant en aquestes condicions es va decidir preparar a escala de grams diferents derivats d'aminoàcids protegits amb els grups fenilacetil o mandelil, alguns dels quals posteriorment van ser utilitzats com a substrats en la síntesi enzimàtica de l'octapèptid C-terminal de la colecistoquinina (CCK-8).

A la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenta un resum dels derivats N-protegits sintetitzats i dels rendiments obtinguts. Tots els derivats es van obtenir amb rendiments elevats excepte el PhAc-Asp-OBzl. Els resultats concordaven amb els que es van aconseguir al llarg del procés d'optimització descrit anteriorment. La purificació d'aquests derivats es va dur a terme tal i com es descriu al capítol de materials i mètodes (§4.4.1.1.4), obtenint-se els productes amb un grau de puresa >99.5%.

<i>Producte</i>	<i>Estratègia</i>	<i>Rendiment reacció (%)</i>
PhAc-Gly-OMe	CT, SB	89
PhAc-Gly-OBzl	CT, SB	90
Mand-Gly-OBzl	CT, SB	92
PhAc-Asp-OBzl	CC, SM	50
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OMe	CT, SB	97
PhAc-Asp(OMe)-OMe	CT, SB	86
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	CT, SB	91

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi preparativa de diferents derivats d'aminoàcids N- $\alpha$  protegits catalitzada per PGA immobilitzada.

CT, SB: síntesi controlada termodinàmicament, en sistemes bifàsics.

CC, SM: síntesi controlada cinèticament, en sistemes monofàsics.

En resum, a §5.1.1 s'ha dut a terme la N-protecció amb el grup fenilacetil de derivats ester -carboxílics d'aminoàcids utilitzant PGA immobilitzada sobre gels d'agarosa. Fent servir aquesta metodologia, s'ha dut a terme per primer cop la N-protecció de derivats de l'àcid aspàrtic.

Aquest estudi s'ha realitzat amb diferents sistemes de reacció en funció dels derivats d'aminoàcids utilitzats.

S'han obtingut rendiments alts (>72%) en la N-protecció de derivats d'aminoàcids que no contenen grups carboxil lliures (H-Gly-OBzl, H-Gly-OMe, H-Met-OMe, H-Asp(OBzl)-OBzl, H-Asp(OBu<sup>1</sup>)-OMe, H-Asp(OMe)-OMe) utilitzant sistemes bifàsics sota control termodinàmic de la reacció.

Els resultats obtinguts són similars als publicats prèviament per la N-protecció de H-Gly-OMe (>80% Didziapetris *et al.*, 1991) i H-Met-OEt (70-75%, Pessina *et al.*, 1988) catalitzada per PGA no immobilitzada. En el nostre cas, el fet d'utilitzar PGA immobilitzada en agarosa presenta avantatges importants: permet reutilitzar l'enzim, evita la desactivació de l'enzim per contacte amb interfases hidrofòbiques (Khmelnitsky *et al.*, 1988) i la purificació del producte és molt més senzilla.

En els casos en que s'ha treballat amb derivats de l'àcid aspàrtic amb el grup -carboxil lliure (H-Asp-OMe i H-Asp-OBzl), la millor estratègia per a la N- -protecció ha estat un sistema monofàsic sota control cinètic, obtenint-se rendiments moderats (50-60%).

Aquesta metodologia es pot estendre a altres aminoàcids o altres grups protectors que també siguin substrats per la PGA, com ara el grup mandelil, tal i com s'ha demostrat en la síntesi de Mand-Gly-OBzl.

Algunes d'aquestes reaccions s'han realitzat a escala de grams, assolint-se rendiments més alts de síntesi (>85%) que a nivell analític.

En tots els casos el procés de purificació un cop acabades les reaccions ha sigut senzill, donant lloc a productes molt purs simplement mitjançant extraccions líquides, evitant més purificacions i/o cristallitzacions.

### 5.1.2 Reaccions de síntesi de R-Gly-Trp-OBzl (on R: PhAc, Mand, Boc, Z)

A l'apartat anterior s'ha estudiat la introducció enzimàtica de grups protectors a diferents derivats d'aminoàcids susceptibles d'intervenir en diversos passos de síntesi de la CCK-8. Els resultats obtinguts indiquen que –en principi– aquesta metodologia

tindria aplicabilitat en la protecció de derivats d'aminoàcids. No obstant, donat que l'objectiu d'aquest treball és la síntesi d'un octapèptid, ha estat necessari continuar investigant la reactivitat d'aquests derivats protegits en la síntesi d'enllaços peptídics.

Amb aquesta finalitat, en aquest apartat es presenta l'estudi de l'efecte dels grups N- protectors de la glicina, fenilacetil i mandelil, sobre la reactivitat del donador d'acil en la síntesi del dipèptid Gly-Trp, catalitzada mitjançant papaïna immobilitzada. Al mateix temps, la reactivitat del donador d'acil treballant amb aquests grups protectors es compara amb la del mateix substrat protegit amb els grups Z o Boc, els quals són àmpliament utilitzats tant en la síntesi enzimàtica com química de pèptids.

### 5.1.2.1 Influència del grup protector fenilacetil sobre la reactivitat del donador d'acil en la síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl

Tal i com ja s'ha esmentat a la introducció (§2.7.1), en els treballs previs es van obtenir bons rendiments duent a terme la síntesi del dipèptid Z-Gly-Trp-OBzl amb una relació donador d'acil/nucleòfil: 1/1.5. Cal assenyalar, però, que la finalitat principal en aquell estudi era optimitzar el rendiment de la reacció, mentre que el present treball té com a objectiu final simplificar el procés global d'obtenció de la CCK-8. Per això l'estudi d'aquest acoblament –a banda de centrar-se en la influència dels grups protectors fenilacetil i mandelil sobre la reactivitat del donador d'acil– pretén trobar unes condicions de reacció per a la síntesi del dipèptid, que evitin a ser possible, posteriors etapes de purificació. Per aquest motiu en aquesta reacció és important que es consumeixi totalment el nucleòfil, ja que en cas contrari podria seguir reaccionant en les etapes posteriors de síntesi de la CCK-8, donant lloc a subproductes que complicarien el procés.

Possiblement la manera més directa per aconseguir esgotar tot el H-Trp-OBzl del medi de reacció implica treballar amb concentracions equimolars dels dos substrats; però tenint en compte que el donador d'acil és susceptible de ser hidrolitzat, sembla també convenient utilitzar un excés d'aquest substrat, ja que a més no pot interferir en les etapes posteriors. Així doncs, es van dur a terme unes proves preliminars de síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl en condicions de síntesi similars a treballs previs (Capellas *et al.*, 1997), amb el donador d'acil PhAc-Gly-OCam,  $a_w=0.1$  i relacions donador d'acil/nucleòfil: 40/20 i 20/20 mM.

A la ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es recullen els rendiments màxims de les reaccions i les concentracions de nucleòfil romanents en el moment de parar-les.

<i>Relació donador d'acil/nucleòfil (mM)</i>	<i>Rendiment màxim reacció (%)</i>	<i>Nucleòfil romanent (mM)</i>
40/20	33	1.25
20/20	15	7.88
20/40	14	17.34

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Concentracions de nucleòfil romanent i rendiments màxims obtinguts en la reacció de síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl (amb el donador d'acil PhAc-Gly-OCam), en funció de diferents relacions donador d'acil/nucleòfil.*

Tal i com s'esperava, aquests resultats indiquen que quan s'utilitza un excés de donador d'acil queda menys nucleòfil en el medi de reacció, només 1.25 mM treballant amb una relació 40/20 mM. Això significa que es consumeix gairebé del tot, ja que malgrat que una part del donador d'acil s'hidrolitza, a l'estar aquest en excés en resta una quantitat equimolar per reaccionar amb el nucleòfil. Aquest resultat contrasta molt amb el que es desprèn de l'experiment realitzat amb la relació 20/40 mM que també s'ha inclòs a la taula, en el que el percentatge de nucleòfil romanent és força superior (17.34 mM).

Si a més a més, afegim el fet que en el cas de la relació 40/20 mM –en que el nucleòfil és el reactiu limitant que no és susceptible de ser hidrolitzat– s'obté un rendiment màxim de reacció superior al de les altres condicions, tot sembla indicar que utilitzar una relació donador d'acil/nucleòfil: 2/1 és adequada pel propòsit del treball.

Per tant, en aquestes condicions es va començar a estudiar l'efecte del grup fenilacetil en la reactivitat del donador d'acil PhAc-Gly-OR, (on OR era l'ester metílic (OMe), l'ester benzílic (OBzl), o l'ester carboxamidometílic (OCam)).

L'elecció d'aquests esters es va fer en base als resultats obtinguts en treballs previs (Capellas *et al.*, 1996b) i a través de la revisió bibliogràfica (Cohen *et al.*, 1976; Kuhl *et al.*, 1986; Clapés *et al.*, 1995). A partir d'aquestes fonts es coneixia que els esters carboxamidometílics malgrat no ser comercials tenen un gran interès donada la seva alta reactivitat. D'altra banda els esters benzílics i metílics tenen l'avantatge que són comercials, els primers són bastant reactius i els segons –tot i que la seva reactivitat està descrita com a moderada– són interessants des d'un punt de vista de procés, donat el seu baix cost.

Al començar l'estudi, calia identificar els diferents productes que es formaven en el transcurs de la reacció per facilitar la interpretació dels resultats que s'obtinguessin al llarg dels experiments. Amb aquest objectiu es va realitzar una prova de síntesi del dipèptid amb PhAc-Gly-OCam com a donador d'acil, en acetat d'etil amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v) i poliamida com a suport d'immobilització de la papaïna.

L'evolució dels productes de la reacció es va seguir per HPLC. A continuació es presenta un cromatograma d'aquest experiment (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), on es poden observar els substrats, un producte d'hidròlisi, el dipèptid (PhAc-Gly-Trp-OBzl), i un producte identificat per espectrometria de masses com a PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl que provindria de la posterior reacció del dipèptid amb el nucleòfil (H-Trp-OBzl).

Així doncs, tenint la certesa que les condicions d'anàlisi utilitzades permetien separar bé els productes i havent identificat els pics, ja es podia continuar amb l'estudi de les condicions de síntesi del dipèptid. D'altra banda, la identificació dels productes d'aquesta reacció també ens permet donar una explicació més detallada dels resultats presentats a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., on s'estudia la diferent relació de substrats per aquesta reacció. A partir dels valors d'aquesta taula s'observa que el consum de nucleòfil és major treballant amb una relació donador d'acil/nucleòfil 20/40 mM que 20/20 mM. Aquest fet però, no suposa un increment en el rendiment de la reacció donat que en aquest cas es detecta molta més síntesi del subproducte PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl.

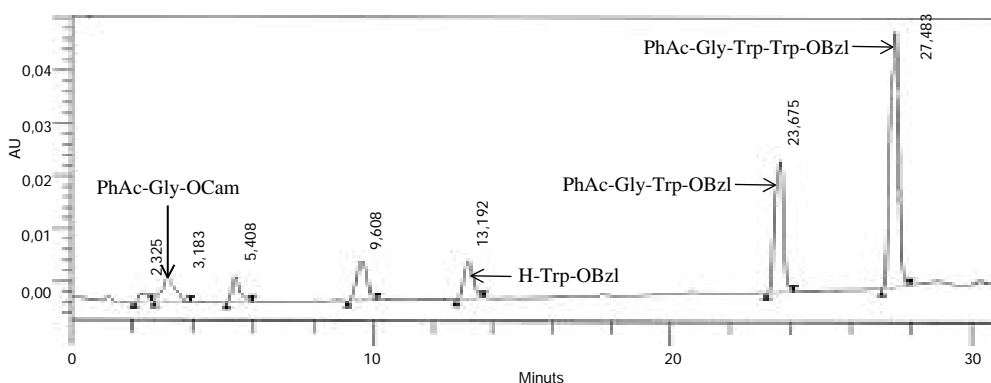


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl. Cromatograma on es poden observar els pics identificats com a H-Trp-OBzl, PhAc-Gly-OCam, PhAc-Gly-Trp-OBzl, PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl i un producte d'hidròlisi (a 9.608 minuts).



### 5.1.2.1.1 Comparació de la reactivitat de PhAc-Gly-OCam, PhAc-Gly-OBzl i PhAc-Gly-OMe

Per a començar a estudiar la reactivitat dels tres derivats: PhAc-Gly-OCam, PhAc-Gly-OBzl i PhAc-Gly-OMe en la síntesi del dipèptid es va dissenyar un grup d'experiments en els que es va fer servir com a dissolvent acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó (contingut de tampó que equival aproximadament a una activitat d'aigua de 0.1) i la papaïna es va immobilitzar sobre poliamida.

Durant la preparació d'aquestes reaccions, (treballant amb aquest contingut de tampó: 0.2% (v/v)), es va observar que el donador d'acil PhAc-Gly-OCam no era del tot soluble en el medi de reacció. Aquest fet implicava que la relació donador d'acil/nucleòfil real no era 2/1 com havíem establert. Tot i així es va decidir començar igualment aquest conjunt d'assaigs. D'altra banda es va determinar experimentalment que la completa solubilització del derivat PhAc-Gly-OCam en aquest dissolvent s'aconseguia quan s'afegia un 1.5% (v/v) de tampó. Tot seguit es va repetir la síntesi del dipèptid amb els tres derivats esmentats anteriorment però ara amb un contingut de tampó d'1.5% en el medi de reacció.

L'objectiu d'aquests experiments era –en particular– comparar la reactivitat del PhAc-Gly-OCam en unes condicions en que només es trobava parcialment soluble en el medi de reacció, d'unes altres en que estava completament soluble i d'altra banda veure com afectava l'increment del contingut de tampó en el medi en el rendiment de producte a partir dels tres derivats.

A la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es compara la reactivitat dels derivats PhAc-Gly-OCam, PhAc-Gly-OBzl i PhAc-Gly-OMe a partir dels resultats dels experiments realitzats amb acetat d'etil (amb 0.2 i 1.5% (v/v) de tampó). Aquesta figura reflecteix l'evolució en el temps del dipèptid (PhAc-Gly-Trp-OBzl), de la hidròlisi del dipèptid (PhAc-Gly-Trp-OH) i del subproducte (PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl).

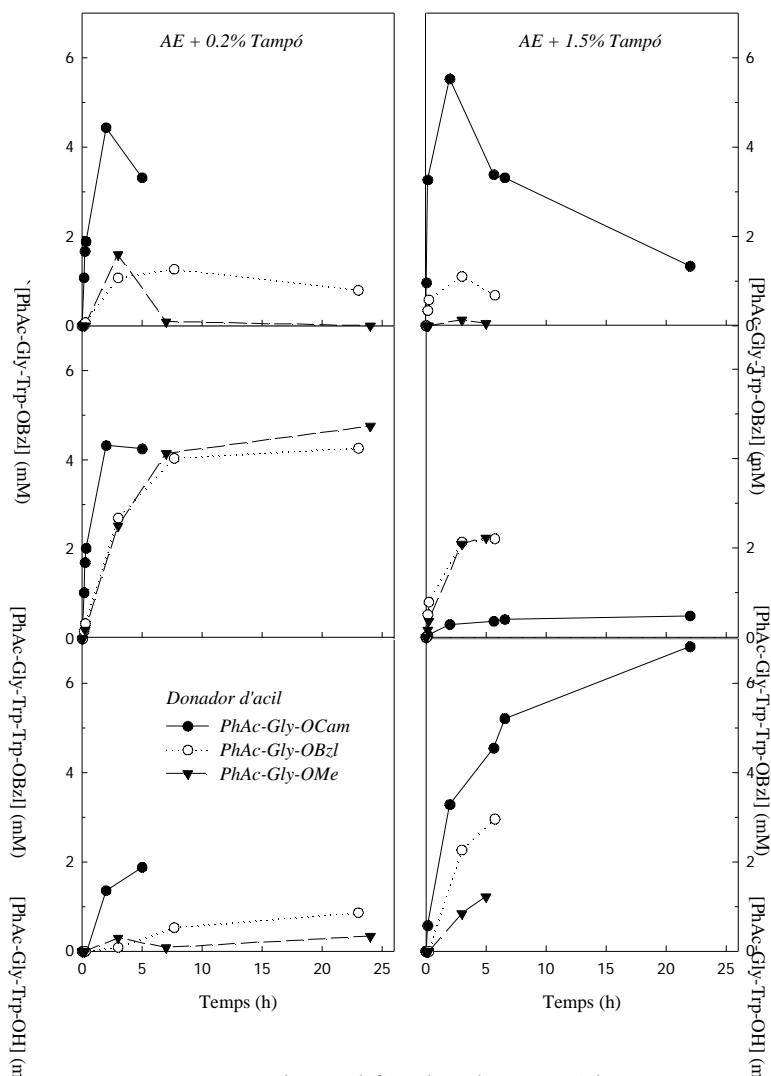


Figura 4. ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Evolució en el temps de les concentracions de productes obtinguts en la reacció entre PhAc-Gly-OR (on R: Me, Bzl, Cam) (40 mM) i H-Trp-OBzl (20 mM) amb acetat d'etil (0.2 o 1.5% (v/v) de tampó) i papaïna immobilitzada sobre poliamida (100 mg d'enzim/g de suport).

La hidròlisi del donador d'acil (PhAc-Gly-OH) no es va quantificar, perquè la seva evolució en el temps no afectava els càlculs del rendiment del dipèptid donat que el donador d'acil estava en excés. D'altra banda, el PhAc-Gly-OH és un compost que es pot separar fàcilment del dipèptid mitjançant extraccions líquides.

A partir dels resultats recollits a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** s'extreu que els rendiments de producte (concentració de dipèptid/concentració inicial de reactiu limitant) eren baixos, essent el millor rendiment 29% amb un 1.5% (v/v) de tampó amb el derivat PhAc-Gly-OCam (condicions en les que estava totalment solubilitzat). Treballant amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v), la raó donador d'acil/nucleòfil real en solució era menor de dos, el que implica que el H-Trp-OBzl podia estar en excés i que per tant augmentés la velocitat de síntesi de PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl. D'altra banda, treballant amb un contingut de tampó de 1.5% (v/v), augmentava la hidròlisi del producte (PhAc-Gly-Trp-OH); no obstant, tal i com s'ha mencionat abans en aquestes condicions es va obtenir el rendiment més alt.

Es pot observar que pels tres derivats estudiats la formació del producte d'hidròlisi treballant amb un contingut de tampó de 0.2% com és lògic era menor que amb 1.5% (v/v). En canvi la formació del subproducte PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl es veia afavorida quan el contingut de tampó en el medi de reacció era baix.

#### **5.1.2.1.2 Influència del contingut d'aigua en el medi de reacció i del suport d'immobilització**

Dels experiments anteriors es pot extreure com a conclusió que amb els dos continguts de tampó estudiats, el millor donador d'acil és el que té l'ester carboxamido-metilic, ja que dóna els rendiments més elevats.

Tot i així els rendiments de síntesi del dipèptid obtinguts fins al moment no eren gens satisfactoris i per tant calia intentar millorar-los. El que sí reflectien els resultats d'aquestes proves és que el contingut de tampó del medi influenciava fortament l'evolució de la reacció. Per aquest motiu es va creure necessari estudiar aquest paràmetre amb més detall amb el donador d'acil PhAc-Gly-OCam i també amb PhAc-Gly-OBzl. Si bé amb el primer s'obtenien rendiments superiors, té com a inconvenient que s'ha de sintetitzar i purificar prèviament en el laboratori, mentre que el segon es pot obtenir comercialment.

D'altra banda també es va investigar l'efecte de treballar amb papaïna immobilitzada per deposició sobre dos suports amb diferents propietats físiques (aquafilicitat, àrea superficial i diàmetre de porus) com són la Celite i la poliamida.

Es va realitzar un conjunt d'experiments amb PhAc-Gly-OCam com a donador d'acil i acetat d'etil amb els següents continguts de tampó (v/v): 0.2%, 0.6%, 1.5%, 2.1%, 2.8% i 3.3% (saturació). El suport que es va utilitzar per a immobilitzar la papaïna era Celite. Posteriorment es va realitzar un estudi similar amb papaïna

immobilitzada sobre poliamida i amb els següents continguts de tampó en el medi de reacció: 0.2%, 0.6%, 1.5% i 3.3% (saturació).

A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenta el rendiment de producte en funció del contingut de tampó pels dos suports assajats.

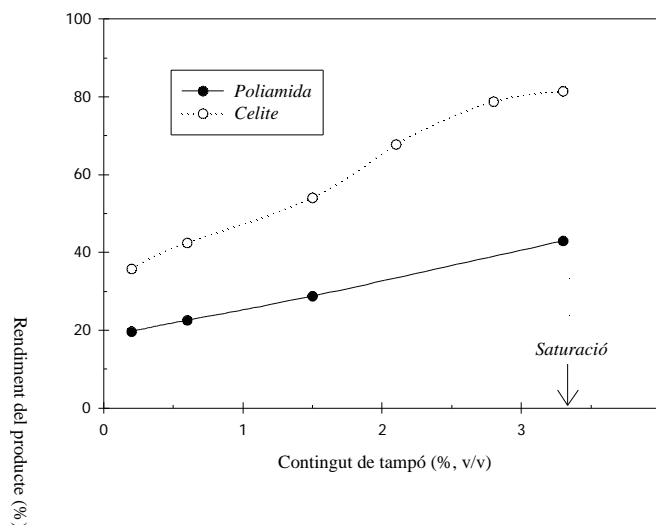


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims obtinguts en la condensació entre PhAc-Gly-OCam (40 mM) i H-Trp-OBzl (20 mM) en acetat d'etil amb diferents continguts de tampó, treballant amb papaïna immobilitzada sobre poliamida o Celite (100 mg d'enzim/g de suport).

A partir de la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. s'observa que augmentant el contingut de tampó en el medi de reacció s'obtenen rendiments més alts amb ambdós suports. Treballant amb continguts de tampó inferiors a 1.5% (v/v) en que la solubilització del PhAc-Gly-OCam no és completa, la relació donador d'acil/nucleòfil era menor de dos i per tant s'incrementava la formació de PhAc-Gly-Trp-Trp-OBzl, fet que impedia assolir rendiments de reacció més elevats tal i com s'ha esmentat abans.

Quan el contingut de tampó en el medi de reacció era igual o superior a 1.5% (v/v), la relació donador d'acil/nucleòfil era sempre la mateixa (2/1). En aquests casos l'increment de rendiment amb el percentatge de tampó podria ser atribuït a una major activitat de l'enzim a l'estar en un medi orgànic amb un contingut de tampó més elevat. Els resultats obtinguts semblen indicar que un augment en el contingut de

tampó incrementaria la velocitat de formació del complex PhAc-Gly-enzim en major mesura que la del PhAc-Gly-Trp-enzim.

Aquests resultats semblen contradictoris amb els obtinguts en reaccions similars estudiades en treballs previs (Capellas *et al.*, 1996a) en els que el rendiment augmentava quan s'utilitzava uns continguts de tampó més baixos. Cal tenir en compte però, que en aquells experiments el donador d'acil era el reactiu limitant i la seva hidròlisi augmentava quan s'incrementava el contingut de tampó, disminuint així el rendiment de producte. En canvi en el present treball, l'augment de tampó en el medi no té influència sobre la concentració de reactiu limitant (nucleòfil) i d'altra banda malgrat que quan es treballa amb més quantitat de tampó hi ha un increment d'hidròlisi del donador d'acil, aquest fet no influencia el rendiment de la reacció perquè s'està utilitzant un excés de substrat.

Una altra conclusió que s'extreu a partir de la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** és que en tots el casos, el rendiment obtingut treballant amb Celite és més alt que amb poliamida, tot i que ambdues preparacions enzimàtiques contenen la mateixa càrrega enzimàtica, definida com mg de papaïna depositada per g de suport. Per tant, segurament la naturalesa química del suport i la seva interacció amb l'enzim i/o substrat té un paper important. En aquest cas, la Celite, un suport amb menys àrea superficial però amb menys aquafilicitat (Capellas *et al.*, 1996a; Reslow *et al.*, 1988a) incrementa el rendiment de síntesi al voltant de dues vegades si es compara amb la poliamida.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment també es va ampliar l'estudi amb el derivat PhAc-Gly-OBzl. En aquest cas es van fer experiments amb acetat d'etil amb dos continguts de tampó: 0.2% i 3.3% (v/v) i també es va estudiar l'efecte dels dos suports d'immobilització: Celite i poliamida. Cal assenyalar, però, que en aquestes proves es va utilitzar el doble de concentració de substrats (80/40 mM) respecte als experiments anteriors (40/20 mM) per a intentar afavorir l'increment del rendiment.

Els rendiments obtinguts en aquesta sèrie d'experiments es presenten a la **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** A partir dels resultats d'aquesta taula, s'extreu que amb el derivat benzílic, els rendiments obtinguts quan la papaïna està immobilitzada sobre Celite són superiors que amb poliamida i que aquest comportament es repeteix independentment del contingut de tampó del medi de reacció tal i com passa també amb el PhAc-Gly-OCam.

Suport d'immobilització	Contingut de tampó (v/v)	Rendiment màxim (%)
Celite	0.2	19
	3.3 (saturació)	27
Poliamida	0.2	10
	3.3 (saturació)	14

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims obtinguts en la reacció de síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl (a partir del donador d'acil PhAc-Gly-OBzl), variant el contingut de tampó del medi de reacció i el suport d'immobilització de la papaïna. Les reaccions es van dur a terme amb una relació DA/Nu: 80/40 mM.*

D'altra banda, amb els dos continguts de tampó estudiats, el rendiment de reacció va incrementar-se a l'afegir més tampó en el medi de reacció, tot i que aquest augment va ser molt inferior comparat amb els valors obtinguts amb el PhAc-Gly-OCam. Així, les millors condicions per a la síntesi del dipèptid, utilitzant PhAc-Gly-OBzl com a donador d'acil fins al moment eren: acetat d'etil saturat com a dissolvent i Celite com a suport d'immobilització per a la papaïna.

Tot i així, donat que el màxim rendiment obtingut amb aquest derivat només era del 27%, es va pensar en la possibilitat de dur a terme aquest acoblament amb un altre dissolvent, ja que com s'ha esmentat abans semblava interessant la utilització d'aquest donador d'acil. En el següent experiment que es va realitzar es va fer servir acetonitril, perquè és un dissolvent emprat àmpliament en treballs previs d'estudis bàsics i amb el que s'havia obtingut bons resultats. El contingut de tampó que es va afegir en el medi de reacció va ser 0.5% v/v (contingut que correspon a la mateixa activitat d'aigua que quan es treballa amb acetat d'etil amb 0.2% v/v de tampó). Això significava que si amb acetat d'etil i acetonitril s'obtinguessin rendiments diferents, aquesta diferència seria deguda únicament a l'efecte del dissolvent perquè la quantitat d'aigua accessible en el medi de reacció era la mateixa. Aquest experiment es va realitzar tant amb papaïna immobilitzada sobre poliamida com sobre Celite.

Els rendiments que es van obtenir en aquests experiments van ser: 6% i 12% amb poliamida i Celite respectivament, valors comparables amb els obtinguts amb acetat d'etil (amb 0.2% v/v de tampó): 10% i 19%. Per tant aquests resultats indicaven que en aquest cas l'ús d'acetonitril no millorava el rendiment de la reacció. Així doncs, la utilització de PhAc-Gly-OBzl com a donador d'acil quedava descartada.

Es pot concloure que treballant amb el grup protector fenilacetil, les millors condicions trobades per a la síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl són: PhAc-Gly-OCam com a donador d'acil, utilitzant acetat d'etil saturat com a dissolvent i Celite com a suport d'immobilització de la papaïna, obtenint-se així un rendiment del 81%.

### 5.1.2.2 Influència del grup protector mandelil sobre la reactivitat del donador d'acil en la síntesi del dipèptid Mand-Gly-Trp-OBzl

La influència d'altres grups N- protectors com ara el mandelil, també es va estudiar en aquesta reacció.

Per tal d'obtenir Mand-Gly-OCam com a donador d'acil de la reacció, es va dur a terme l'extracció de l'ester benzílic a partir de Mand-Gly-OBzl utilitzant papaïna com a catalitzador i seguidament es va introduir l'ester carboxamidomètilic. Desafortunadament, l'últim pas de purificació d'aquest producte tenia un rendiment baix –donada la baixa solubilitat del Mand-Gly-OCam en el dissolvent extractor– i feia que la síntesi del Mand-Gly-OCam no fos competitiva.

Pel que fa al Mand-Gly-OMe com a donador d'acil, la reacció de síntesi resultava molt lenta. Conseqüentment, la reacció es va estudiar només amb el derivat Mand-Gly-OBzl com a donador d'acil i els experiments es van dur a terme amb acetat d'etil amb dos continguts de tampó (v/v): 0.2% i 3.3% (saturació) i amb els dos suports d'immobilització: Celite i poliamida. Els resultats d'aquests assajos es detallen a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**

<i>Suport d'immobilització</i>	<i>Contingut de tampó (v/v)</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
Celite	0.2	89
	3.3 (saturació)	86
Poliamida	0.2	65
	3.3 (saturació)	72

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments màxims obtinguts en la reacció de síntesi del dipèptid Mand-Gly-Trp-OBzl (a partir del donador d'acil Mand-Gly-OBzl), variant el contingut de tampó del medi de reacció i el suport d'immobilització de la papaïna. Les reaccions es van dur a terme amb una relació DA/Nu: 80/40 mM.*

A partir dels valors de la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., es pot extreure com a conclusió que amb el grup protector mandelil no s'observen variacions significatives de rendiment en funció del contingut de tampó del medi de reacció. D'altra banda quan s'utilitza Celite com a suport d'immobilització de la papaïna s'obtenen rendiments més alts que amb poliamida, fenomen que ja s'havia observat en l'estudi anterior amb el grup protector fenilacetil.

Un altre fet a destacar és que tant si es treballa amb acetat d'etil saturat com amb un 0.2% (v/v) de tampó, els rendiments de producte obtinguts amb el grup protector mandelil són lleugerament superiors que el rendiment que s'havia observat amb el grup fenilacetil en les millors condicions.

A partir dels perfils dels cromatogrames obtinguts treballant amb el grup mandelil, s'observa que en aquestes reaccions pràcticament no es sintetitza Mand-Gly-Trp-Trp-OBzl. Aquest fet indica que el Mand-Gly-Trp-OBzl no és un bon substrat per a la papaïna, minimitzant-se així, la formació de Mand-Gly-Trp-OH o Mand-Gly-Trp-Trp-OBzl; no obstant, el que sí es detecta és el producte d'hidròlisi del donador d'acil.

La presència del grup hidroxil lliure en l'àcid mandèlic, fa pensar que la molècula protegida és més soluble en dissolvents hidrofílics, fet que pot ser un avantatge en algunes reaccions de síntesi en que el nucleòfil també sigui hidrofílic.

Així doncs, treballant amb el grup N- protector mandelil, les millors condicions que s'han trobat per a la síntesi del dipèptid Mand-Gly-Trp-OBzl són: Mand-Gly-OBzl com a donador d'acil, acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó o saturat i papaïna immobilitzada sobre Celite, assolint un rendiment màxim del 86-89%.

### **5.1.2.3 Comparació de la influència dels grups protectors mandelil i fenilacetil amb altres grups protectors sobre la reactivitat del donador d'acil en la síntesi del dipèptid.**

En aquest apartat s'estudia la influència dels grups protectors –introduïts químicament– benziloxicarbonil (Z) i tert-butiloxicarbonil (Boc) sobre la reactivitat del donador d'acil i es comparen amb els resultats obtinguts amb els grups mandelil i fenilacetil.

Per a poder dur a terme la comparació entre aquests grups protectors es van realitzar dos experiments de síntesi del dipèptid amb Z-Gly-OCam i Boc-Gly-OCam com a donadors d'acil, en les condicions trobades com a òptimes pel grup fenilacetil.

A la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es mostren els resultats que es van obtenir amb els grups Z i Boc, junt amb el fenilacetil protegint el



derivat H-Gly-OCam i el mandelil protegint el derivat H-Gly-OBzl ja que en aquest darrer cas no fou possible obtenir l'èster carboxamidomètilic.

<i>Substrat</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>	<i>Temps (min)</i>
PhAc-Gly-OCam	83	5
Z-Gly-OCam <sup>a</sup>	81	20
Boc-Gly-OCam <sup>a</sup>	74	160
Mand-Gly-OBzl <sup>b</sup>	89	40

<sup>a</sup> Experiments realitzats amb 0.25 g de preparació immobilitzada.

<sup>b</sup> Experiment realitzat en acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó.

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims obtinguts en la condensació entre els donadors d'acil R-Gly-OCam (on R: PhAc, Boc, Z) i Mand-Gly-OBzl (80 mM) i el nucleòfil H-Trp-OBzl (40 mM) en acetat d'etil saturat.*

Cal assenyalar que els resultats dels experiments fets amb els grups Z i Boc que es presenten a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, es van dur a terme amb 2.5 vegades més d'enzim immobilitzat que amb els grups mandelil i fenilacetil, degut a les baixes velocitats que s'obtenien amb l'anterior quantitat d'enzim utilitzada.

El Boc-Gly-OCam va ser el pitjor donador d'acil que es va provar, perquè ens va conduir al rendiment més baix amb un temps més llarg, fet que indicava que la seva reactivitat és inferior a la dels altres grups.

Els altres grups estudiats donaven resultats similars i es feia difícil triar-ne un, utilitzant només com a criteris de selecció el rendiment i la productivitat.

#### **5.1.2.4 Efecte de la càrrega enzimàtica del biocatalitzador en el rendiment**

En els experiments que s'han presentat anteriorment amb el grup protector fenilacetil, es va observar que la reacció era tan ràpida que el màxim rendiment presentat provenia de la primera mostra extreta, així doncs aquest valor podia no correspondre al màxim real. D'altra banda, utilitzant PhAc-Gly-OCam com a donador d'acil s'observava que quan s'extreia la primera mostra, la hidròlisi del producte que es detectava ja era significativa. Per aquests motius es va creure necessari dur a terme un conjunt d'experiments amb càrregues enzimàtiques més baixes, utilitzant

PhAc-Gly-OCam com a donador d'acil per tal de tenir velocitats de reacció inferiors i determinar el temps òptim d'aturada de la reacció.

Així doncs, es va dissenyar un conjunt d'experiments de síntesi del dipèptid a partir de les condicions òptimes trobades anteriorment o sigui: acetat d'etil saturat com a dissolvent i Celite com a suport d'immobilització de la papaïna i les càrregues enzimàtiques estudiades van ser: 10 mg/g, 15 mg/g, 30 mg/g, 60 mg/g i 100 mg/g.

A la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., es presenta per a les diferents càrregues enzimàtiques el màxim rendiment obtingut i el temps de reacció corresponent.

<i>Càrrega enzimàtica (mg enzim/g de suport)</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>	<i>Temps (min)</i>
10	88	60
15	91	30
30	88	10
60	87	8
100	81	<5

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Influència de la càrrega enzimàtica en el rendiment màxim, en la reacció entre PhAc-Gly-OCam (40 mM) i H-Trp-OBzl (20 mM) amb acetat d'etil saturat i papaïna immobilitzada sobre Celite.*

Com es pot veure a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., els rendiments obtinguts són molt similars però les anàlisis cromatogràfiques mostren grans diferències. Fins a una càrrega enzimàtica de 15 mg/g, el producte d'hidròlisi apareix quan el reactiu limitant s'ha consumit totalment i llavors s'obté un rendiment màxim del 91%. Es podria esperar un 100% de rendiment, però l'adsorció en el suport fa decreïxer el màxim rendiment obtingut en el líquid. Des de 30 mg/g fins a 100 mg/g, la detecció del producte d'hidròlisi comença abans que el reactiu limitant estigui completament exhaurit. Conseqüentment, en aquesta reacció la càrrega òptima és 15 mg/g, perquè el rendiment màxim s'obté en un temps raonable de reacció (30 min). D'altra banda treballar a una càrrega enzimàtica baixa és més barat, la qual cosa és interessant des d'un punt de vista de procés.

Així doncs, de §5.1.2 es pot concloure que el PhAc-Gly-OCam i Mand-Gly-OBzl són similars com a donadors d'acil en la síntesi d'aquest dipèptid i lleugerament

millors que el Z-Gly-OCam el qual s'ha estudiat amb una quantitat d'enzim més elevada que els altres. A més, ambdós grups (PhAc i Mand) són susceptibles de ser extrets enzimàticament, fent que siguin unes bones alternatives en la síntesi enzimàtica de pèptids.

### 5.1.3 Desprotecció del pentapèptid

En els apartats anteriors s'ha presentat l'estudi de la introducció enzimàtica dels grups N- protectors fenilacetil i mandelil, i també l'efecte que exerceixen aquests grups sobre la reactivitat del donador d'acil en la síntesi enzimàtica del dipèptid Gly-Trp. Després d'haver comprovat la viabilitat d'aquestes reaccions, en el present apartat –per completar l'estudi de protecció/desprotecció amb penicil·lina G acilasa– es comença a investigar les condicions per a l'eliminació d'aquests grups protectors i s'escull com a substrat per a aquesta reacció el pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, ja que a banda de servir com a estudi bàsic, un cop s'hagi desprotegit aquesta molècula, s'utilitza com a nucleòfil en la reacció de síntesi de l'octapèptid.

Es coneix a partir de la bibliografia que hi ha autors (Waldmann, 1988; Didziapetris *et al.*, 1991) que utilitzen barreges de dissolvents orgànics (miscibles en aigua) amb tampó fosfat per a la desprotecció de diversos pèptids protegits amb el grup fenilacetil. Per tant, es va considerar oportú començar aquest estudi utilitzant una barreja acetonitril/tampó fosfat pH=8, 20/80% (v/v). La concentració de pentapèptid inicial era 5.1 mM, la temperatura de reacció 30°C i la PGA es va immobilitzar per enllaç covalent multipuntual sobre gels d'agarosa.

El seguiment de la reacció es va fer extraient mostres i analitzant-les per HPLC, però degut a que el pentapèptid protegit és molt insoluble en el medi de reacció, les àrees corresponents a aquest substrat no servien de referència per seguir l'evolució de l'experiment ni pel càlcul del rendiment. Donat que com a productes d'aquesta reacció, s'obté àcid fenilacètic i pentapèptid desprotegit i que d'aquests dos compostos només el primer és soluble en el medi de reacció, es va establir seguir l'evolució de l'àrea d'àcid en el temps per poder determinar en quin moment la reacció s'aturava, arribant a l'equilibri.

D'altra banda un cop finalitzat l'experiment es va rentar l'enzim amb dissolvent orgànic per tal d'extreure tot el pentapèptid desprotegit que podia estar adsorbit i solubilitzar-lo. Aquesta metodologia es va continuar aplicant en tots els experiments posteriors per comprovar l'extensió de la reacció. Així, després de rentar l'enzim i

solubilitzar el producte i el substrat, s'observava que quedava molt pentapèptid protegit. Per tant, malgrat que s'havia comprovat que el pentapèptid es podia desprotegir enzimàticament, es va creure oportú modificar algunes variables per intentar desplaçar l'equilibri i d'aquesta manera afavorir més la reacció de desprotecció.

Així es va decidir estudiar la influència de diferents factors, entre ells: el pH, la concentració inicial de pentapèptid, la temperatura de reacció, etc.

### 5.1.3.1 Influència del pH

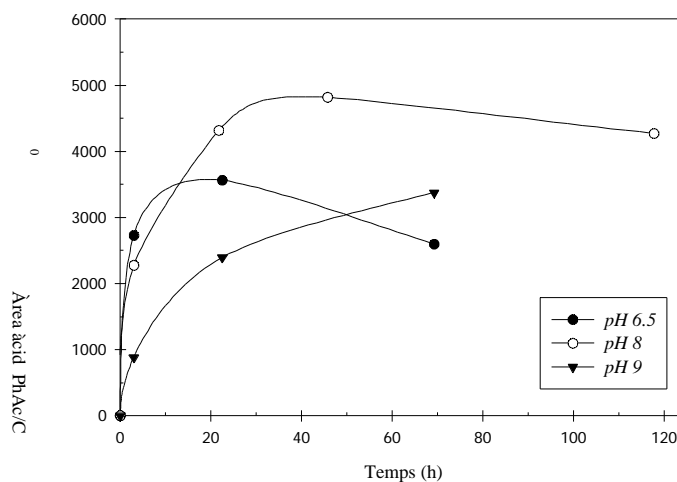
Aquest estudi s'inicia dissenyant un grup d'experiments per conèixer com afecta la variació del pH en aquesta reacció. Així es va determinar seguir treballant amb les mateixes condicions que s'han exposat per l'experiment anterior però assajant els següents valors de pH: 6.5, 8 i 9.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la insolubilitat del pentapèptid impedeix que el càlcul del rendiment d'aquestes reaccions es realitzi a partir de les àrees dels cromatogrames corresponents. Per tant, per comparar el grau de desprotecció de les diferents reaccions realitzades s'estableix utilitzar –a més de l'àrea d'àcid fenilacètic, com ja s'ha comentat– el quocient: àrea de pentapèptid desprotegit (després de rentar l'enzim) entre la concentració inicial de pentapèptid protegit (determinada per pes) ja que pot ser diferent en funció de l'experiment ( $A/C_0$ ).

A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenta l'àrea d'àcid fenilacètic/ $C_0$  al llarg del temps pels tres experiments realitzats amb diferents valors de pH. Així, s'observa que treballant a pH 8, s'allibera més àcid a partir del pentapèptid protegit que amb els altres valors de pH estudiats. Aquest resultat concorda amb el fet que després de rentar l'enzim un cop acabades les reaccions, s'obté més pentapèptid desprotegit en el cas en que s'ha treballat a pH 8, tal i com es pot observar a partir dels valors que es presenten a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

<i>pH</i>	<i>A/C<sub>0</sub></i>
6.5	34616
8	71384
9	46962

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Efecte del pH en  $A/C_0$  en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar en ACN/tampó 20/80% (v/v), una concentració inicial de pentapèptid 5.1 mM i a 30°C.*



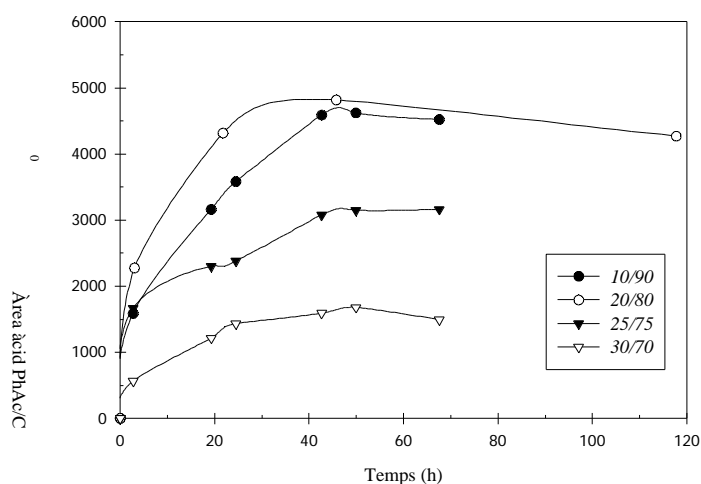
*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Efecte del pH en l'evolució en el temps de l'àrea àcid PhAc/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar en ACN/tampó 20/80% (v/v), una concentració inicial de pentapèptid 5.1 mM i a 30°C.*

### 5.1.3.2 Influència de la relació dissolvent/tampó fosfat

El següent factor que es va estudiar per a intentar desplaçar la posició de l'equilibri en favor de la desprotecció del pentapèptid, va ser la relació dissolvent/tampó (v/v). Amb aquesta finalitat, es va posar en marxa un grup d'experiments amb les següents condicions: concentració inicial de pentapèptid (5.1 mM), el pH òptim trobat anteriorment (pH=8) i les següents relacions acetonitril/tampó fosfat: 10/90, 20/80, 25/75 i 30/70% (v/v). Els resultats obtinguts en aquests experiments es veuen reflectits a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

Aquesta figura mostra que treballant amb relacions acetonitril/tampó: 20/80, 10/90% (v/v), s'obtenen àrees d'àcid fenilacètic superiors que amb acetonitril/tampó 25/75 o 30/70% (v/v). Aquests resultats indiquen que possiblement la presència de

percentatges elevats de dissolvent orgànic pot provocar efectes negatius sobre l'activitat i estabilitat del derivat enzimàtic.



**Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.:** Efecte de la relació ACN/tampó en l'evolució en el temps de l'àrea àcid PhAc/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar a una concentració inicial de pentapèptid 5.1mM, pH=8 i 30°C.

Com és d'esperar, després de rentar l'enzim s'obté una major desprotecció de pentapèptid treballant amb uns percentatges de dissolvent entre 10-20% (v/v), tal i com es pot observar a partir dels valors que es presenten a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

Medi de reacció (%)	A/C <sub>0</sub>
ACN/Tampó (10/90)	73472
ACN/Tampó (20/80)	71384
ACN/Tampó (25/75)	38829
ACN/Tampó (30/70)	22040

**Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.:** Efecte de la relació ACN/tampó en l'evolució en A/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid

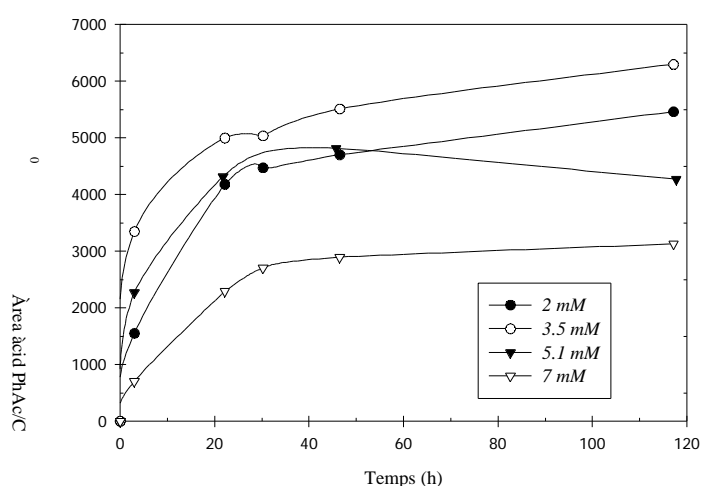
*PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar a una concentració inicial de pentapèptid 5.1mM, pH=8 i 30°C.*

Donat que el grau de desprotecció del pentapèptid utilitzant 10 o 20% (v/v) d'acetonitril és molt similar, es va determinar continuar treballant amb un 20%, degut a que una major quantitat de dissolvent en el medi de reacció, ajuda a incrementar la solubilització del pentapèptid, el que es veu reflectit en un augment de la velocitat de reacció.

### 5.1.3.3 Influència de la concentració inicial de pentapèptid

El següent factor que es va estudiar és la concentració inicial de pentapèptid protegit en el medi de reacció. Així, es va preparar un grup d'experiments treballant amb les condicions trobades com a òptimes anteriorment (tampó fosfat pH=8, acetonitril/tampó 20/80% (v/v)) i amb les següents concentracions de pentapèptid: 2, 3.5, 5.1 i 7 mM.

D'aquests assaigs s'extreu com a conclusió que l'aparició d'àcid fenilacètic al llarg del temps, és superior quan es treballa amb una concentració inicial de pentapèptid 3.5 mM, tal i com es pot observar a partir de la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**



*Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Efecte de la concentració inicial de pentapèptid en l'evolució en el temps de l'àrea àcid PhAc/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-*

*Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar en ACN/tampó 20/80% (v/v), pH=8 i 30°C.*

Així mateix, un cop acabades les reaccions i després de rentar l'enzim, s'obté més pentapèptid desprotegit en el cas en que la concentració inicial de pentapèptid protegit és 3.5 mM, tal i com es pot observar a partir dels valors que es presenten a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, malgrat que no hi ha grans diferències respecte de quan es treballa amb 5.1 mM. També es pot destacar que sembla que es produeix una inhibició pel substrat quan la concentració inicial de pentapèptid protegit és 7 mM.

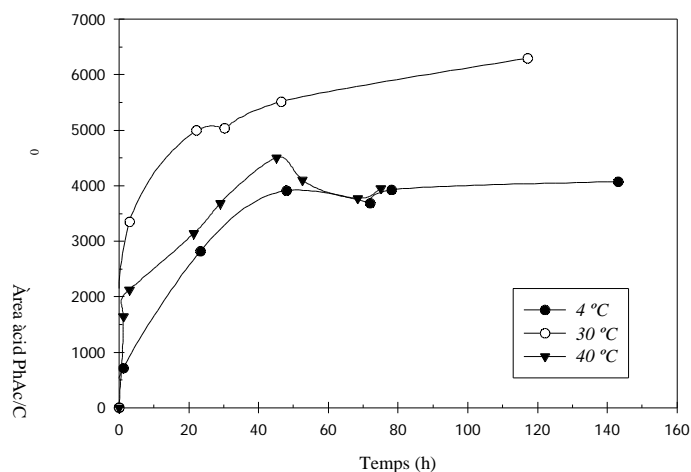
Concentració de pentapèptid (mM)	A/C <sub>0</sub>
2.0	52346
3.5	76857
5.1	71384
7.0	37579

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Efecte de la concentració inicial de pentapèptid en A/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar en ACN/tampó 20/80% (v/v), pH=8 i 30°C.*

#### 5.1.3.4 Influència de la temperatura

Un altre factor que es va estudiar com afecta sobre la posició de l'equilibri en aquesta reacció va ser la temperatura. Per aquest motiu es van realitzar tres experiments amb les condicions òptimes trobades en els experiments anteriors i es van assajar les següents temperatures de reacció: 4, 30 i 40°C. A la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es pot observar el perfil d'àrea d'àcid fenilacètic/C<sub>0</sub> al llarg del temps de reacció per aquests assajos.





**Figura **Argumento de modificador desconocido.**** Efecte de la temperatura en l'evolució en el temps de l'àrea àcid PhAc/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu')-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar en ACN/tampó 20/80% (v/v), pH=8 i una concentració inicial de pentapèptid 3.5 mM.

A partir d'aquests experiments s'extreu com a conclusió que l'àrea d'àcid fenilacètic que es detecta en el transcurs de les reaccions quan es treballa a una temperatura de 30°C, és bastant superior a la que s'obté a 4 o 40°C. Així s'aprecia que a 4°C la velocitat de reacció és lenta i la posició de l'equilibri està per sota respecte a 30°C. D'altra banda a 40°C la velocitat de reacció inicialment és alta però l'enzim ràpidament perd activitat i no s'assoleix l'equilibri perquè possiblement es desactiva.

Els resultats que s'obtenen d'aquests experiments després de rentar l'enzim es presenten a la Taula **Argumento de modificador desconocido.**, on s'observa que la desprotecció del pentapèptid es veu afavorida treballant a 30°C.

Temperatura (°C)	A/C <sub>0</sub>
4	67078
30	76857
40	44214

**Taula **Argumento de modificador desconocido.**** Efecte de la temperatura en A/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-

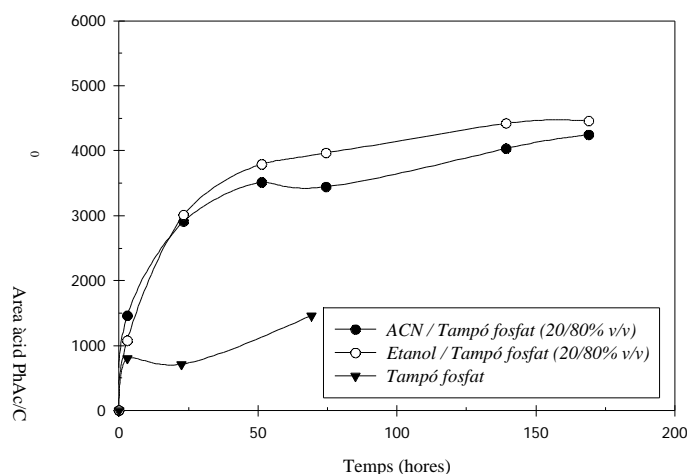
*Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar en ACN/tampó 20/80% (v/v), pH=8 i una concentració inicial de pentapèptid 3.5 mM.*

### 5.1.3.5 Influència del dissolvent

Simultàniament als estudis corresponents a la concentració de pentapèptid i temperatura de reacció que s'han presentat, es van realitzar també, uns experiments assajant diversos dissolvents. Aquesta investigació es va dur a terme amb l'objectiu de seleccionar un dissolvent que sigui més adequat que l'acetonitril, tant des del punt de vista de que la posició de l'equilibri estigui més desplaçada cap a la desprotecció del pentapèptid, com que sigui més adequat ambientalment.

Així, es van realitzar uns experiments amb els següents dissolvents: acetat de metil i acetat d'etil saturats, tampó fosfat 100% (v/v), etanol/tampó 20/80% (v/v) i acetonitril/tampó 20/80% (v/v) (aquest últim per comparar-lo amb els altres).

A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenten els valors d'àrea d'àcid fenilacètic/C<sub>0</sub> al llarg del temps, excepte pels experiments realitzats amb acetat de metil i acetat d'etil, en els que la reacció de desprotecció del pentapèptid està tan desfavorida que no es detecta aparició d'àcid fenilacètic. A partir d'aquesta figura, s'observa que l'àrea d'àcid fenilacètic que s'allibera al medi és similar quan es treballa amb acetonitril/tampó 20/80% (v/v) i amb etanol 20/80% (v/v).



*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Efecte del dissolvent en l'evolució en el temps de l'àrea àcid PhAc/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció*

*del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar a pH=8, una concentració inicial de pentapèptid 5.1 mM i 30°C.*

Els valors que relacionen el pentapèptid desprotegit després de rentar l'enzim es mostren a la Taula **Argumento de modificador desconocido.**

<i>Medi de reacció</i>	<i>A/C<sub>0</sub></i>
Acetat de metil saturat	-
Acetat d'etil saturat	-
Tampó fosfat	29238
Etanol/Tampó fosfat (20/80)	85371
Acetonitril/Tampó fosfat (20/80)	74630

*Taula **Argumento de modificador desconocido.**: Efecte del dissolvent en A/C<sub>0</sub> en la reacció de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Els experiments es van realitzar a pH=8, una concentració inicial de pentapèptid 5.1 mM i 30°C.*

A partir dels resultats que es presenten a la Taula **Argumento de modificador desconocido.**, es conclou que amb els dissolvents que s'han estudiat com alternativa a l'acetonitril –excepte l'etanol– la reacció de desprotecció no avança. D'altra banda, treballant amb etanol s'obtenen resultats similars als d'acetonitril –comportament que concorda amb el de la Figura **Argumento de modificador desconocido.**– però amb l'avantatge que el primer és un dissolvent molt més adequat des d'un punt de vista ambiental.

La conclusió general que es pot extreure de §5.1.3 és que després d'estudiar diversos factors que influeixen en l'evolució de la reacció desprotecció, no s'han trobat unes condicions de reacció òptimes ja que l'equilibri encara està poc desplaçat cap a la desprotecció del pentapèptid. Per tant es fa necessari trobar una solució de procés i en aquest sentit es proposa que un cop acabada la reacció de desprotecció es torni a començar el procés a partir del pentapèptid que no s'ha desprotegit en la primera etapa. D'altra banda, entre els dissolvents que s'han assajat, donat que amb etanol s'ha obtingut resultats lleugerament superiors que amb acetonitril es considera més adequat realitzar el procés amb el primer i amb les següents condicions de reacció: concentració de pentapèptid inicial: 3.5/5.1 mM, etanol/tampó fosfat pH 8, 20/80% (v/v), i temperatura de reacció 30°C.

## 5.2 Síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8

En aquesta secció es planteja la síntesi del tripèptid N-terminal Asp-Tyr-Met de la CCK-8.

L'objectiu principal d'aquesta part del treball es estudiar diversos factors que afecten a l'optimització de la síntesi del tripèptid i a partir dels resultats que s'obtinguin escollir una via de síntesi per posteriorment aplicar-la a nivell de procés.

En primer lloc, per a iniciar aquest estudi cal plantejar-se com abordar alguns aspectes generals d'aquesta síntesi, utilitzant les diferents aproximacions que es coneixen a partir de la bibliografia i de l'experiència adquirida en els acoblaments realitzats en treballs precedents.

Tot seguit, es presenten aquests aspectes que posteriorment es desenvoluparan amb més detall al llarg de la secció.

### Estratègia de síntesi

En el present cas, al tractar-se d'obtenir un tripèptid, és clar, que només existeixen dues estratègies de síntesi possibles per a preparar aquesta molècula, que són: (Asp+Tyr)+Met i Asp+(Tyr+Met).

L'aplicació de la segona estratègia esmentada –Asp+(Tyr+Met)– suposa una etapa addicional si es compara amb la via (Asp+Tyr)+Met, ja que cal desprotegir el dipèptid R<sub>1</sub>-Tyr-Met-OR<sub>2</sub> prèvia addició del derivat de l'àcid aspàrtic. Per aquesta raó es va decidir començar l'estudi de la síntesi del tripèptid aplicant l'estratègia d'acoblament (Asp+Tyr)+Met i a partir dels resultats obtinguts s'avaluaria la conveniència d'investigar l'altra estratègia o no.

### Sistema de reacció

Un aspecte a considerar a l'hora de començar a estudiar una reacció enzimàtica és l'elecció del sistema reaccionant. Aquesta elecció depèn fonamentalment de la solubilitat dels substrats i producte, excepte quan s'utilitzen sistemes de reacció sòlid-sòlid en els que interessa que els reactants siguin insolubles donada la pròpia naturalesa d'aquests sistemes.

En aquest estudi es va triar treballar amb medis de reacció sòlid-sòlid perquè –a més de ser una metodologia més recent– aquests sistemes presenten l'avantatge que no es precisa utilitzar dissolvents orgànics. D'altra banda la utilització d'aquest tipus de medi de reacció permet obtenir una relació de producte per volum de reactor més

elevada que amb els sistemes convencionals, fet que té un gran interès des del punt de vista d'aplicació a nivell industrial (Erbeldinger *et al.*, 1998b).

Tanmateix, en funció dels resultats obtinguts no es descartava la utilització de medis orgànics amb baix contingut en aigua.

### **Grups N- $\alpha$ protectors**

Un cop escollit el sistema de reacció i abans de començar a optimitzar algunes variables com la temperatura de reacció, l'ester carboxiterminal del donador d'acil, el suport d'immobilització de l'enzim, etc., calia preguntar-se quin/s grup/s protegiran les funcions N- amino dels donadors d'acil de les dues reaccions que es plantegen a continuació (síntesi del dipèptid i del tripèptid).

Revisant la bibliografia, es coneix que són molts els grups protectors emprats en síntesi enzimàtica de pèptids (Calvet *et al.*, 1992), tot i així, cal tenir present que en aquest treball interessa estudiar la influència d'un grup protector sobre la reactivitat del donador d'acil, però també el fet que la seva introducció/eliminació siguin viables a nivell de procés i compatibles amb l'obtenció de la molècula final. En el cas que ens ocupa, cal tenir en consideració que la CCK-8 presenta dins la seva seqüència una tirosina sulfatada i que no tots els grups protectors poden ser eliminats químicament sense alterar la molècula. Per aquest motiu, es va descartar d'entrada la utilització del grup protector Boc ja que la seva eliminació –en condicions àcides– provoca la desulfatació de la tirosina. El grup Z tampoc resultava adequat pels motius exposats a §5.1.

D'altra banda, els resultats favorables obtinguts a §5.1.2, treballant amb el grup protector PhAc, junt amb els avantatges que comporta la seva introducció/eliminació enzimàtica, feien suposar que la seva utilització en la present investigació podia ser adequada. Alternativament, també es va decidir dur a terme aquest estudi amb el grup protector Fmoc, perquè tot i que la seva introducció/eliminació es realitza químicament, en aquest cas es tracta d'un grup compatible amb l'obtenció de la molècula final.

#### **5.2.1 Estratègia (Asp+Tyr)+Met. Utilització de Fmoc com a grup N- $\alpha$ protector de l'àcid aspàrtic**

Pels motius exposats anteriorment, es va iniciar l'estudi i optimització de la síntesi del tripèptid a partir de l'estratègia (Asp+Tyr)+Met, en un sistema de reacció sòlid-sòlid i utilitzant com a grup N- protector de l'àcid aspàrtic el grup Fmoc.

### 5.2.1.1 Síntesi de Fmoc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub> (on R<sub>1</sub>: H, Bu<sup>t</sup> i R<sub>2</sub>: Me o Bzl)

Com ja s'ha esmentat als estudis previs (§2.7) un dels avantatges de treballar amb enzims és la possibilitat d'utilitzar aminoàcids amb les cadenes laterals pràcticament desprotegides, disminuint així el nombre d'etapes sintètiques –en general ambientalment poc recomanables– i l'economia del procés. Per tant en iniciar aquest estudi es va utilitzar com a donadors d'acil el derivat d'aspàrtic protegit per l'èster tert-butílic en posició (Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH) i amb l'aspàrtic desprotegit en aquesta posició (Fmoc-Asp-OH) a fi i efecte d'avaluar i comparar la reactivitat dels dos substrats.

La síntesi del dipèptid Fmoc-Asp(OR)-Tyr-OMe (on R: H, Bu<sup>t</sup>) inicialment es va abordar en un sistema de reacció sòlid-sòlid, treballant sota control termodinàmic ja que és una opció més atractiva des del punt de vista que no es precisa realitzar l'estereofitació de l'extrem C-terminal del donador d'acil.

Amb aquest sistema de reacció es van estudiar diferents aspectes que s'aniran desenvolupant al llarg d'aquest apartat.

#### 5.2.1.1.1 Temperatura de reacció

Quan es revisa la bibliografia relativa als sistemes sòlid-sòlid, s'observa que en els acoblaments catalitzats per termolisina alguns autors duen a terme les reaccions a 40°C o en algun cas a temperatures inferiors (Halling *et al.*, 1995). Cenyint-nos a aquestes condicions es va realitzar un estudi d'aquesta reacció treballant a 25 i 40°C.

Per a cada experiment s'utilitzava 0.05 mmols de donador d'acil Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH i de nucleòfil H-Tyr-OMe i s'addicionava 100 µl de tampó MOPS (50 mM) a pH 7.

En els casos en que el donador d'acil tenia l'aspàrtic amb el grup -carboxil desprotegit, la relació donador d'acil/nucleòfil utilitzada era 1/2, donat que calia un excés de nucleòfil per a poder neutralitzar el residu àcid de l'aspàrtic amb una tirosina. Per a començar els experiments s'addicionava 20 mg de termolisina lliure.

Degut a les característiques de baixa homogeneïtat que presenten els sistemes de reacció sòlid-sòlid, la presa de mostres es feia de manera que cadascuna d'elles corresponia a un eppendorf que contenia el sistema reaccionant, tal i com s'ha detallat en el capítol de materials i mètodes. L'objectiu d'aplicar aquesta metodologia era obtenir així mostres més representatives que extraïent-les pel mètode més habitual o sigui a partir d'un mateix reactor.

Cal esmentar també, que donat que cada mostra que s'extreia corresponia a un vial de reacció i tenint en compte que treballant sota control termodinàmic el producte es manté estable, la presa de mostres es feia de forma espaiada en el temps. Així doncs, els temps de reacció que es presenten a la Taula **Argumento de modificador desconocido.**, mostren simplement de forma indicativa quan es tardava en arribar a l'equilibri tot i que realment podien ser temps menors.

A la Taula **Argumento de modificador desconocido.** estan resumits els resultats d'aquests primers experiments de síntesi del dipèptid, d'on s'extreu que treballant a 40°C s'obtenen millors rendiments amb els dos substrats (Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH i Fmoc-Asp-OH) que a 25°C, per tant a partir d'aquest moment la resta d'experiments ja es van dur a terme a 40°C.

D'altra banda si es comparen els experiments realitzats a 40°C pels dos substrats emprats, s'observa que el rendiment obtingut amb el donador d'acil Fmoc-Asp-OH (54%) no és excessivament inferior al que es va obtenir amb Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH (75%), fet favorable que fa que el derivat amb l'aspàrtic desprotegit sigui un bon candidat com a donador d'acil en aquesta síntesi.

<i>Substrat</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Temps (h)</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OH	25	72	25
	40	72	75
Fmoc-Asp-OH	25	24	33
	40	25	54

*Taula **Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments màxims obtinguts en la reacció entre Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i H-Tyr-OMe, variant la temperatura de reacció (25 o 40°C). En tots els experiments s'addicionava 100 µl de tampó MOPS (50 mM, pH 7) i 20 mg de termolisina lliure.*

#### 5.2.1.1.2 Quantitat d'enzim

Tal i com s'ha comentat a la introducció, la utilització d'enzims immobilitzats en síntesi enzimàtica de pèptids, comporta diversos avantatges, entre els que es pot destacar la reutilització del biocatalitzador, fet que condueix a un abaratiment del procés. Pel contrari, si es treballa amb l'enzim lliure, com en el cas present, al no poder-se

reutilitzar el biocatalitzador, es fa necessari optimitzar la quantitat d'enzim que s'addiciona per no malbaratar-lo.

Per a investigar si aquesta variable afecta molt el temps que es tarda en arribar a l'equilibri, es va dissenyar un conjunt d'experiments treballant a les mateixes condicions que en les reaccions de l'apartat anterior (a 40°C) i variant les quantitats d'enzim addicionades al medi de reacció en un rang entre 4 i 20 mg.

Dels resultats obtinguts es pot destacar que en tots els casos estudiats, el temps que es tarda en arribar a l'equilibri és del mateix ordre. Conseqüentment es va decidir que la quantitat d'enzim més apropiada per continuar treballant era 4 mg.

A partir d'aquestes proves, cal assenyalar també que el rendiment màxim assolit utilitzant el donador d'acil Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH és del 75%, mentre que amb el donador d'acil Fmoc-Asp-OH és del 55%, resultats que corroboren els que s'han presentat a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., treballant a la mateixa temperatura.

### 5.2.1.1.3 Sonicació

La importància de millorar la transferència de matèria en sistemes de reacció sòlid-sòlid es troba recollida a la bibliografia (Kuhl *et al.*, 1992). Segons aquests autors, la sonicació o agitació magnètica del sistema de reacció incrementa la velocitat i la productivitat de la reacció. Per tal d'esbrinar si el fet de sonicar produeix el mateix efecte en la reacció de síntesi del dipèptid que ens ocupa, es van dur a terme uns experiments treballant amb els donadors d'acil Fmoc-Asp-OH i Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH en les condicions òptimes trobades prèviament (4 mg de termolisina i temperatura de reacció 40°C) i sonicant els vials de reacció de tant en tant.

Els rendiments d'aquests experiments assolits a les 24 i 48 hores de reacció es presenten a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. junt amb els valors obtinguts anteriorment treballant en les mateixes condicions però sense aplicar sonicació.

Temps (h)	Rendiment			
	Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OH		Fmoc-Asp-OH	
24	41	71 (√)	36	53 (√)
48	75	75 (√)	53	53 (√)



*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments assolits a les 24 i 48 hores de reacció entre Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i H-Tyr-OMe, amb o sense sonicació. En tots els experiments es van addicionar 4 mg de termolisina lliure i la temperatura de reacció era 40°C. Els símbol √ indica els casos en que es van sonicar els vials de reacció.*

A partir d'aquests resultats s'observa que amb els dos substrats estudiats, sonicant els vials de reacció, s'assoleix l'equilibri i per tant el rendiment màxim –75 i 53% amb Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH i Fmoc-Asp-OH respectivament– amb menys temps, possiblement degut a que en aquestes condicions s'afavoreix la homogeneïtzació del medi de reacció. Per tant a la vista d'aquests resultats en els experiments posteriors es va seguir aplicant aquesta metodologia.

Posteriorment, s'han trobat referits estudis en que el tractament del medi de reacció amb ultrasons no millora la velocitat de la reacció (Erbeldinger *et al.*, 1999). Tanmateix, aquests autors atribueixen el contrast d'aquests resultats amb els obtinguts per Kuhl *et al.* al fet que s'han utilitzat diferents medis de reacció en ambdós casos.

#### 5.2.1.1.4 Estructura del nucleòfil

Fins al moment, l'estudi de la síntesi del dipèptid Asp-Tyr en un sistema de reacció sòlid-sòlid s'havia dut a terme utilitzant H-Tyr-OMe com a nucleòfil, obtenint un rendiment màxim del 75%.

Tot i així, arribats en aquest punt de l'estudi, calia pensar que l'objectiu final d'aquesta part del treball era la síntesi del tripèptid, i que l'acoblament Asp-Tyr+Met, a priori no es coneixia si s'hauria d'abordar sota control cinètic o termodinàmic de la reacció. En el cas hipotètic de que la millor alternativa passés per utilitzar el control cinètic, està clar, que la naturalesa de l'ester carboxiterminal del dipèptid Fmoc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub> seria de gran importància de cara a la reactivitat en la síntesi del tripèptid. Per aquest motiu es va creure interessant dur a terme la síntesi del dipèptid Asp-Tyr emprant H-Tyr-OBzl com a nucleòfil, donat que és coneguda l'alta reactivitat dels esters benzílics com ja s'ha esmentat anteriorment a §5.1.2.1.

Així doncs, amb les millors condicions de síntesi que s'havien trobat anteriorment treballant amb el nucleòfil H-Tyr-OMe, (addició de 4 mg de termolisina i temperatura de reacció 40°C), es van dissenyar uns experiments de síntesi del dipèptid utilitzant com a donador d'acil Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i com a nucleòfil H-Tyr-OBzl.

Els rendiments màxims obtinguts es presenten a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., on es comparen amb els resultats dels experiments realitzats amb el nucleòfil H-Tyr-OMe.

Nucleòfil	Donador d'acil	Rendiment (%)
H-Tyr-OBzl	Fmoc-Asp-OH	49
	Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OH	75
H-Tyr-OMe	Fmoc-Asp-OH	53
	Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OH	75

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims assolits en la reacció entre el donador d'acil Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i el nucleòfil H-Tyr-OR (on R: Bzl, Me). Els experiments es van dur a terme en sistemes de reacció sòlid-sòlid. Les relacions donador d'acil/nucleòfil eren: 1/1 i 1/2 amb els donadors d'acil Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH i Fmoc-Asp-OH respectivament. Per iniciar els experiments s'addicionava 4 mg de termolisina i la temperatura de reacció era 40°C.*

Dels resultats que es presenten a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., s'extreu com a conclusió que la naturalesa de l'ester C-terminal de la tirosina pels casos estudiats, no influeix en la reacció de síntesi del dipèptid, ja que treballant amb el nucleòfil H-Tyr-OBzl s'obtenen uns rendiments de reacció molt similars als que s'havien obtingut prèviament amb el nucleòfil H-Tyr-OMe. A partir d'aquesta constatació, s'obre la possibilitat d'estudiar i comparar les reactivitats dels derivats Fmoc-Asp(OR)-Tyr-OMe i Fmoc-Asp(OR)-Tyr-OBzl (on R: H, Bu<sup>t</sup>) com a donadors d'acil en la següent reacció de síntesi del tripèptid.

#### 5.2.1.1.5 Síntesi del dipèptid Fmoc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub> (on R<sub>1</sub>: H, Bu<sup>t</sup> i R<sub>2</sub>: Me, Bzl) a escala preparativa

Fins al moment doncs, s'havia aconseguit dur a terme la síntesi del dipèptid Asp-Tyr en un sistema sòlid-sòlid a escala analítica amb uns resultats favorables. No obstant, cal assenyalar que no es tenia una experiència prèvia de síntesi amb sistemes sòlid-sòlid i si a més a més s'afegeix el fet que aquest tipus de sistemes de reacció és dels més novells i per tant menys estudiats, tot duia a pensar que abans de triar aquesta via de síntesi del dipèptid com a vàlida, calia verificar que el canvi d'escala d'aquesta reacció a nivell preparatiu en aquests sistemes era factible.

Per aquest motiu es va dissenyar un grup d'experiments a escala preparativa, utilitzant com a donador d'acil Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i com a nucleòfil H-Tyr-OR (on R: Me, Bzl).

A partir d'aquests experiments s'extreu com a conclusió que aquesta síntesi a escala preparativa funciona, tot i que els valors dels rendiments de reacció obtinguts són poc consistents, fet que s'atribueix a la manca d'homogeneïtat a l'hora d'extreure les mostres del sistema.

Tot i així, els rendiments de reacció + purificació assolits (entre 50 i 70%), acaben de corroborar la viabilitat d'aquestes reaccions a escala preparativa, ja que aquests valors validen o fins i tot superen els rendiments obtinguts en aquestes mateixes síntesis a escala analítica.

En resum, a partir de §5.2.1.1 es pot concloure que s'ha dut a terme la síntesi del dipèptid Asp-Tyr, utilitzant com a donador d'acil Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i com a nucleòfil H-Tyr-OR (on R: Me, Bzl). Aquestes síntesis s'han realitzat en un sistema de reacció sòlid-sòlid treballant sota control termodinàmic, assolint un rendiment màxim del 75% en els casos en que el donador d'acil utilitzat era Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH, el nucleòfil H-Tyr-OMe o H-Tyr-OBzl i la temperatura de reacció 40°C. A continuació s'ha comprovat la viabilitat d'aquestes reaccions a escala preparativa.

A la vista d'aquests resultats, es va considerar que els rendiments obtinguts eren prou satisfactoris i consegüentment no es va aprofundir en l'estudi de la síntesi d'aquest dipèptid a partir d'altres alternatives.

### 5.2.1.2 Síntesi de Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OEt (on R: H, Bu<sup>t</sup>)

Als apartats anteriors s'han trobat unes condicions de reacció que fan factible la síntesi del dipèptid Fmoc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub> (on R<sub>1</sub>: H, Bu<sup>t</sup> i R<sub>2</sub>: Me, Bzl). Per tant, arribats a aquest punt, només queda estudiar les condicions de síntesi del tripèptid, per tal de poder avaluar globalment la viabilitat de la via (Asp+Tyr)+Met com alternativa per a la síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8.

A tal efecte es va dur a terme aquesta síntesi tant sota control cinètic com termodinàmic de la reacció. Com a donadors d'acil es va utilitzar Fmoc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub> (on R<sub>1</sub>: H, Bu<sup>t</sup> i R<sub>2</sub>: Me, Bzl, H) i com a nucleòfil H-Met-OEt.

Aquest enllaç es va abordar utilitzant dos tipus de sistemes de reacció: sòlid-sòlid i medis orgànics amb baix contingut en aigua (acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó i acetonitril amb 0.5/4% (v/v) de tampó).

En les reaccions sota control cinètic, l'enzim emprat va ser -QT, mentre que sota control termodinàmic s'utilitzava termolisina. Treballant en medis orgànics amb baix contingut en aigua aquests biocatalitzadors s'utilitzaven immobilitzats per deposició sobre poliamida o Celite, mentre que en els sistemes de reacció sòlid-sòlid es trobaven en forma lliure.

El comportament general que es desprèn a partir de les reaccions que s'han descrit és que majoritàriament els substrats no es consumeixen, i en els casos en que ho fan es sintetitzen subproductes, majoritàriament dibenzofulbè.

El dibenzofulbè prové de la desprotecció del grup Fmoc que protegeix el dipèptid –que actua com a donador d'acil en aquesta reacció– i del propi tripèptid que es sintetitza. Es tracta d'una -eliminació catalitzada per bases, les quals actuen produint un atac nucleofílic que comporta la desprotecció del grup Fmoc. Per tant la H-Met-OEt present en el medi de reacció pot actuar com a nucleòfil donant lloc a la síntesi del tripèptid o produint l'atac nucleofílic que provoca l'aparició de dibenzofulbè.

Així la tendència comú que s'observa al llarg de totes les reaccions és la formació de molts subproductes que corresponen a: dibenzofulbè, compostos corresponents a l'eliminació del grup Fmoc i subproductes d'hidròlisi. Aquest fet junt amb la baixa efectivitat de la H-Met-OEt com a nucleòfil de la reacció comporta que els rendiments de síntesi de tripèptid assolits siguin baixos (el valor més elevat és 49% treballant sota control termodinàmic de la reacció amb acetonitril 4% (v/v) de tampó). Aquest rendiment podria semblar acceptable, però degut als problemes que s'han esmentat es desestima aquesta via per a la síntesi del tripèptid.

### **5.2.2 Estratègia (Asp+Tyr)+Met. Utilització de PhAc com a grup N- $\alpha$ protector de l'àcid aspàrtic**

Els estudis de l'estratègia de síntesi (Asp+Tyr)+Met van continuar utilitzant el grup protector PhAc tal i com s'havia proposat inicialment.

Aquest fet implica que prèviament calia investigar la reacció de síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub> i posteriorment passar a estudiar la síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-Met-OR<sub>2</sub>.

### 5.2.2.1 Síntesi de PhAc-Asp(OR<sub>1</sub>)-Tyr-OR<sub>2</sub>

Inicialment es van realitzar uns experiments de síntesi del dipèptid en sistemes de reacció sòlid-sòlid, treballant sota control termodinàmic de la reacció, en els quals es va comprovar que ni la termolisina ni la papaïna reconeixien el substrat.

També es va provar l'efectivitat de diversos enzims en la hidròlisi dels substrats, per tal d'esbrinar quin d'ells seria el més convenient per a realitzar la síntesi del dipèptid en un medi orgànic amb baix contingut en aigua.

A partir dels enzims que es van provar: papaïna, quimopapaïna, bromelaïna i alcalasa, es va detectar activitat hidrolítica utilitzant papaïna i alcalasa, tant amb el substrat PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe com amb PhAc-Asp-OBzl. Per tant, seguidament es van provar aquests dos enzims per dur a terme la síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR)-Tyr-OMe.

#### 5.2.2.1.1 Estudi de la reactivitat del donador d'acil en la reacció de síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR)-Tyr-OMe (on R: H, Me, Bzl, Bu<sup>t</sup>)

L'estudi de la síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR)-Tyr-OMe (on R: H, Me, Bzl, Bu<sup>t</sup>) es va començar treballant amb diferents donadors d'acil, els quals es detallen a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** i fixant com a nucleòfil H-Tyr-OMe.

Tots aquests experiments es van realitzar en un sistema de reacció format per un medi orgànic amb baix contingut en aigua, on el dissolvent era acetonitril amb un contingut de tampó de 0.5% (v/v) i el catalitzador emprat papaïna o alcalasa immobilitzada sobre Celite.

Treballant amb alcalasa immobilitzada, en aquestes condicions de síntesi, aquest enzim no mostrava activitat, per tant els experiments que es presenten a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, només corresponen als que es van realitzar amb papaïna.

A partir dels resultats d'aquests experiments, es pot extreure com a conclusió, que amb els substrats PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i PhAc-Asp(OBzl)-OBzl, s'assoleixen rendiments de reacció superiors respecte als altres donadors d'acil assajats. Tot i així, cal destacar que la utilització del substrat PhAc-Asp(OBzl)-OBzl no tenia interès des d'un punt de vista de procés, donat que la desprotecció de l'ester benzílic que protegeix la funció -carboxílica de l'àcid aspàrtic requereix hidrogenació catalítica.

D'altra banda, malgrat que la preparació del derivat PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam implica afegir dues etapes de síntesi en el procés, la diferència de rendiment obtingu-

da utilitzant aquest substrat respecte als altres, es va creure que justificava l'ús d'aquest donador d'acil en els subseqüents experiments de síntesi del dipèptid.

A continuació es va preparar un experiment –amb el donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam– similar als que ja s'han descrit, però utilitzant com a dissolvent acetat d'etil amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v). El rendiment màxim de síntesi de producte obtingut en aquesta prova va ser del 69%, valor comparable al 68% assolit quan es va emprar acetonitril com a dissolvent. Per tant d'aquests resultats es pot concloure que l'ús d'acetat d'etil o acetonitril en aquesta reacció sota les condicions estudiades no afecta al rendiment de la reacció.

<i>Donador d'acil</i>	<i>Relació DA/Nu (mM)</i>	<i>Dissolvent</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
PhAc-Asp-OBzl	20/30	ACN	ND
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	20/30	ACN	57
PhAc-Asp(OMe)-OMe	20/30	ACN	28
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OMe	20/30	ACN	ND
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OCam	20/40	ACN	68
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OCam	20/40	AE	69

ND: No detectat.

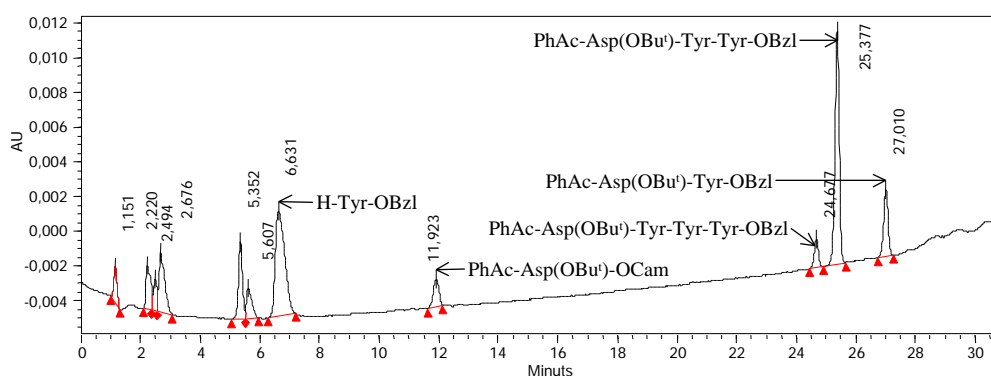
*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims obtinguts en la reacció entre PhAc-Asp(OR<sub>1</sub>)-OR<sub>2</sub> (on R<sub>1</sub>: H, Bzl, Me, Bu<sup>t</sup> i R<sub>2</sub>: Bzl, Me, Cam) i H-Tyr-OMe. Els experiments es van realitzar amb acetonitril o acetat d'etil (addicionant 0.5% o 0.2% (v/v) de tampó) i papaïna immobilitzada sobre Celite (100 mg/g Celite).*

### 5.2.2.1.2 Influència de l'estructura del nucleòfil en la reacció de síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OR

Continuant amb l'optimització de les condicions de síntesi d'aquest acoblament, es va començar a investigar la influència de la naturalesa del nucleòfil en aquesta reacció. L'estudi d'aquesta variable té importància donat que pot afectar el rendiment de la reacció de formació del dipèptid i posteriorment del tripèptid ja que el PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OR esdevé el donador d'acil de la segona reacció i la seva reactivitat depèn en bona part de la naturalesa del grup R. Així es provà com a grup R: Bzl i Al, com a alternatives a l'ester metílic, utilitzat anteriorment.

### Utilització de H-Tyr-OBzl com a nucleòfil de la reacció

Per començar aquest estudi es va dissenyar un experiment de síntesi del dipèptid amb H-Tyr-OBzl com a nucleòfil, utilitzant una relació donador d'acil/nucleòfil 20/30 mM. A ser possible es volia evitar treballar amb un excés de donador d'acil (PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam) ja que com s'ha indicat anteriorment, la preparació d'aquest substrat és molt laboriosa. El dissolvent utilitzat en aquesta síntesi era acetat d'etil amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v) i el catalitzador papaïna immobilitzada sobre Celite. El rendiment de síntesi que es va obtenir va ser del 12%. L'explicació de perquè s'obtenia un rendiment tan baix es va trobar a partir de les anàlisis per HPLC, d'on s'extreia que a mesura que avançava la reacció, els substrats s'anaven consumint i es detectava l'aparició de tres pics nous entre els minuts 24 i 27 de l'anàlisi, tal i com es pot observar en el cromatograma que es presenta a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..



*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OBzl. Cromatograma on es poden observar els pics que corresponen al dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OBzl i als subproductes PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OBzl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-Tyr-OBzl.*

Aquests pics, després de ser analitzats per espectrometria de masses van ser identificats com a PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OBzl, PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OBzl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-Tyr-OBzl.

Així doncs, el que indicaven aquests resultats, és que el producte d'interès de la reacció, o sigui el dipèptid, era altament reactiu i per tant un bon donador d'acil per a la següent reacció de formació del compost PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OBzl, el qual també podia actuar com a substrat i per tant es sintetitzava un compost amb tres residus de tirosina, aquesta última reacció, però, era minoritària respecte a les anteriors.

És evident, doncs, que aquesta cadena de reaccions es veia afavorida per l'excés de nucleòfil respecte de donador d'acil en el medi de reacció; conseqüentment semblava lògic que la millora del rendiment d'aquest acoblament implicava treballar amb un excés d'aquest últim.

Per aquest motiu es va dur a terme un assaig similar a l'anterior, però ara utilitzant una relació donador d'acil/nucleòfil 20/10 mM. En aquest cas, es va obtenir un rendiment màxim de síntesi de producte del 21%, valor superior al de l'experiment previ (12%), però tot i així continuava essent baix, donat que amb aquestes condicions de síntesi es seguia detectant la formació de productes amb més d'un residu de tirosina.

Els resultats obtinguts es detallen a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, junt amb el resultat d'un experiment que es va realitzar amb unes concentracions de substrats superiors, fet que no va conduir a un increment en el rendiment de la reacció.

<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Temps (min)</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
20/30	45	12
20/10	165	21
40/20	60	22

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments màxims assolits en la condensació entre PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i H-Tyr-OBzl, variant la relació donador d'acil/nucleòfil. Els experiments es van realitzar amb acetat d'etil (0.2% (v/v) de tampó) i papaïna immobilitzada sobre Celite.*

### **Utilització de H-Tyr-OAl com a nucleòfil de la reacció**

A partir de la discussió anterior, s'extreu com a conclusió que l'ester benzílic de la tirosina no es pot considerar un nucleòfil adequat per a la síntesi del dipèptid que ens ocupa. A continuació com a alternativa per intentar millorar els resultats obtinguts fins al moment, es va decidir estudiar la reactivitat de l'ester al·lílic de la tirosina com a nucleòfil d'aquesta reacció.

Per aquest motiu es van realitzar un conjunt d'experiments utilitzant diferents relacions de donador d'acil/nucleòfil en un medi on el dissolvent emprat era acetat d'etil amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v) i el catalitzador papaïna immobilitzada sobre Celite.



Els resultats obtinguts es presenten tot seguit a la Taula **Argumento de modificador desconocido.**, d'on es desprèn com a tret general que els rendiments de síntesi de producte utilitzant aquest nucleòfil són superiors als obtinguts anteriorment amb H-Tyr-OBzl (vegi's Taula **Argumento de modificador desconocido.**).

<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Temps</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
30/20	23h	55
40/20	18h 25'	58
80/40	33h	61

*Taula **Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments màxims obtinguts en la reacció entre PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-OCam i H-Tyr-OAl, variant la relació donador d'acil/nucleòfil. Els experiments es van dur a terme amb acetat d'etil (0.2% (v/v) de tampó) i papaïna immobilitzada sobre Celite.*

Revisant les anàlisis cromatogràfiques corresponents a aquests experiments, s'observava l'aparició de dos pics nous, que un cop identificats per espectrometria de masses es va saber que corresponien al dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-OAl i al tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-Tyr-OAl. Per tant, amb aquests resultats es pot afirmar que el dipèptid a mesura que es va sintetitzant també actua com a donador d'acil d'una reacció secundària en que es forma un compost amb dos residus de tirosina.

Tot i així, s'observava que la raó: àrea de PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-Tyr-OAl/àrea de dipèptid treballant amb H-Tyr-OAl era inferior si es compara amb un experiment similar on el nucleòfil era H-Tyr-OBzl.

D'altra banda –a diferència del que passava amb el nucleòfil H-Tyr-OBzl– quan s'utilitzava l'èster al·lílic de la tirosina no es detectava l'aparició del compost amb tres residus de tirosina.

Així doncs, a partir d'aquestes observacions es pot concloure que el dipèptid amb l'èster C-terminal al·lílic és menys reactiu que el benzílic i aquest fet condueix a que s'obtinguin millors rendiments de síntesi del dipèptid amb el nucleòfil H-Tyr-OAl.

Arribats en aquest punt de la investigació, es va descartar la subseqüent utilització de H-Tyr-OBzl com a nucleòfil en la síntesi del dipèptid i restava escollir entre els altres dos derivats estudiats, o sigui H-Tyr-OMe i H-Tyr-OAl.

El rendiment màxim assolit emprant com a nucleòfil H-Tyr-OMe (69%, vegi's Taula **Argumento de modificador desconocido.**) és lleugerament superior

als que s'obtenen amb H-Tyr-OAl (Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.) ja que la síntesi del dipèptid utilitzant com a nucleòfil l'ester metílic de la tirosina, presenta l'avantatge que no condueix a la formació de subproductes amb més d'un residu de tirosina. De totes maneres aquest fet no es prou decisiu com per escollir H-Tyr-OMe com a nucleòfil de la reacció. Primer cal estudiar la reactivitat dels dos dipèptids PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl com a donadors d'acil en la síntesi del tripèptid i després avaluar globalment quin dels dos és el millor ester carboxiterminal de la tirosina.

### 5.2.2.2 Síntesi de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl

Paral·lelament als estudis de síntesi del tripèptid, i amb l'objectiu d'avançar en l'estudi global de síntesi de la CCK-8, es va provar si era possible dur a terme l'acoblament 3+5.

Aquesta prova es va realitzar a partir del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl, que va ser sintetitzat químicament, tot i que cal constatar que en aquest procés es va produir racemització. Per sintetitzar el tripèptid es va escollir l'ester al·lílic com a grup carboxiterminal de la metionina perquè en estudis previs es va comprovar la seva alta reactivitat (Capellas *et al.*, 1996b).

Efectivament l'acoblament 3+5 va tenir èxit i per tant es va decidir que s'utilitzaria el nucleòfil H-Met-OAl en l'estudi de la síntesi enzimàtica del tripèptid.

#### 5.2.2.2.1 Estudi de la síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe

##### Estudi de la relació donador d'acil/nucleòfil

Tal i com ja s'ha vist en apartats anteriors (§5.1.2.1), la relació molar donador d'acil/nucleòfil és un factor important a tenir en compte quan es comença a estudiar una reacció, ja que en funció d'aquest paràmetre pot variar el rendiment de síntesi de producte i la formació de subproductes que poden interferir en posteriors reaccions si no es realitza prèviament una purificació.

Per tal d'iniciar l'estudi d'aquest factor en la síntesi del tripèptid es va dissenyar un grup d'experiments en els que es van fixar unes condicions de reacció. En aquest cas es tractava d'un medi orgànic amb baix contingut en aigua on el dissolvent utilitzat era acetat d'etil amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v). L'enzim emprat va ser -QT immobilitzada sobre poliamida.

Les diferents relacions donador d'acil/nucleòfil amb les que es va treballar van ser: 1.42/1, 0.95/1 i 1/1.5.

Es coneix que la trietilamina (TEA) pot actuar com a dissolvent mimètic de l'aigua degut a l'existència d'enllaços d'hidrogen entre la TEA i les molècules d'enzim. Això podria millorar tant la flexibilitat conformacional de la -QT com el seu estat d'ionització facilitant les interaccions enzim-substrat amb el nucleòfil (Bell *et al.*, 1995; Kitaguchi *et al.*, 1989).

Per aquest motiu, es va preparar també un experiment amb una relació de substrats 0.95/1, addicionant un 0.5% (v/v) de TEA al medi de reacció, per tal de comparar-lo amb l'experiment on no s'havia addicionat TEA i poder avaluar així el seu efecte en aquesta reacció. El perfil del rendiment al llarg del temps per a aquests assajos es pot observar a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** En general a partir d'aquesta figura es pot constatar que sota les condicions estudiades, les reaccions són extremadament lentes. D'altra banda s'observa que el millor rendiment s'assoleix treballant amb una relació donador d'acil/nucleòfil: 1.42/1 (60/42.26 mM).

A partir de les anàlisis efectuades en aquests experiments es detecta la formació d'uns subproductes que corresponen a la posterior reacció del tripèptid amb el nucleòfil H-Met-OAl, donant lloc a compostos amb diversos residus de metionina: PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-(Met)<sub>n</sub>-OAl, (n>1). El motiu de perquè es sintetitzen aquests subproductes sembla que es troba en el fet que el tripèptid acaba essent més reactiu com a donador d'acil que el propi dipèptid.

Així doncs, una raó que podria explicar perquè no s'obtenen rendiments superiors en aquest enllaç (el màxim assolit és del 47%), seria la formació d'aquests subproductes que es sintetitzen a partir del tripèptid i que ja es comencen a detectar a partir de les primeres hores de reacció.

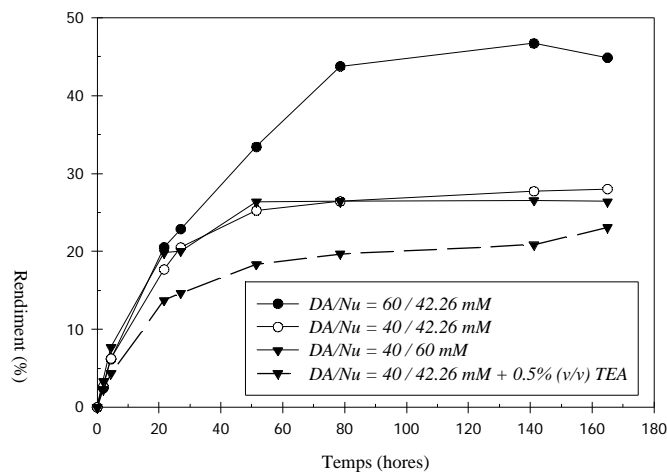


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Perfil del rendiment al llarg del temps en la reacció entre PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-OMe i H-Met-OAl, variant la relació donador d'acil/nucleòfil. Els experiments es van realitzar amb AE (0.2% (v/v) de tampó) i  $\alpha$ -QT immobilitzada sobre poliamida.

D'altra banda, a partir de la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido., s'observa que els rendiments obtinguts afegint un 0.5% (v/v) de TEA en el medi de reacció són menors que els que s'obtenen sense afegir-ne. Aquest fet es pot explicar a partir de les anàlisis cromatogràfiques, on es detecten més productes d'hidròlisi quan en el medi de reacció hi és present la TEA.

### Estudi de la influència del dissolvent i del suport d'immobilització de l'enzim

Amb l'objectiu d'estudiar la influència del dissolvent i del suport d'immobilització de l'enzim en el rendiment de síntesi de producte d'aquesta reacció, es va dissenyar un grup d'experiments treballant en tots els casos amb la millor relació donador d'acil/nucleòfil trobada en l'estudi de l'apartat anterior o sigui: 1.42/1 (60/42.26 mM).

Com a dissolvent es va utilitzar acetat d'etil o acetonitril, (afegint el contingut de tampó que correspon a una  $a_w$  de 0.1) i els suports d'immobilització assajats van ser Celite i poliamida.

A partir de les anàlisis d'aquests experiments s'extreu com a conclusió que treballant amb  $\alpha$ -QT immobilitzada sobre Celite no es detecta activitat enzimàtica, independentment del dissolvent utilitzat. Aquest comportament ja s'havia observat en la síntesi del tripèptid Z-Gly-Trp-Met-OEt realitzada en estudis previs (Capellas *et al.*,

1996a), on per sota d'una activitat d'aigua de 0.5 es detectava molt poca activitat enzimàtica. Pel contrari, quan la -QT està immobilitzada sobre poliamida s'observa una activitat similar amb els dos dissolvents emprats.

Respecte als resultats obtinguts amb els dos dissolvents estudiats, es pot destacar que la reacció transcorre més ràpidament amb acetonitril que amb acetat d'etil, tot i que finalment els rendiments que s'obtenen en ambdós casos són similars. En contra, utilitzant acetonitril, es detecten certs problemes de solubilitat del producte i tenint en compte que aquest dissolvent és menys recomanable des del punt de vista ambiental, es va decidir seguir treballant amb acetat d'etil.

#### **5.2.2.2.2 Estudi de la síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl**

##### **Estudi de la relació donador d'acil/nucleòfil**

A l'apartat anterior s'ha arribat a la conclusió que per a la síntesi del tripèptid –utilitzant com a donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe– la millor relació donador d'acil/nucleòfil, sota les condicions estudiades és 1.42/1.

A continuació, per tal de comparar la reactivitat del donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl amb la del derivat metílic, es va dissenyar un experiment treballant amb una relació donador d'acil/nucleòfil 1.5/1 i amb la resta de condicions trobades com a òptimes anteriorment (dissolvent: acetat d'etil i suport d'immobilització: poliamida).

Cal assenyalar, que en aquest assaig es va addicionar el doble de quantitat de preparació immobilitzada respecte als experiments realitzats amb PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe, amb l'objectiu de reduir el temps de reacció, ja que s'havia comprovat que amb el derivat metílic el temps necessari per assolir el rendiment màxim de síntesi de producte era extremadament llarg (141h 12').

Com a resultat d'aquest experiment s'obté que sota les condicions estudiades, amb el donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl es tarda 21h 45' en assolir el rendiment màxim de síntesi de producte. El fet que la reacció sigui més ràpida amb el derivat al·lílic que amb el derivat metílic (tot i tenint present les diferents quantitats d'enzim adicionades), permet extreure com a conclusió que el primer és més bon donador d'acil per a aquesta reacció. Com a conseqüència treballant amb PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl –en aquestes condicions– es detecta menys formació de subproductes amb diversos residus de metionina que amb el derivat metílic. Aquest fet és important des

d'un punt de vista de procés, donat que la purificació d'aquests subproductes pot ser bastant complexa.

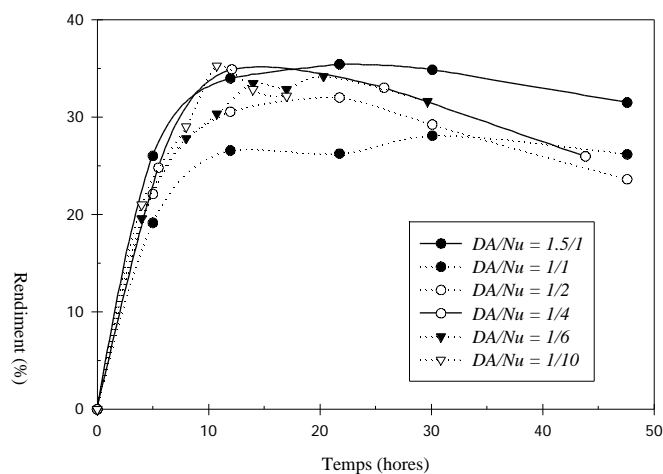
Per tant, malgrat que el rendiment de síntesi de producte obtingut amb el donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)Tyr-OAl (35%) és lleugerament inferior a l'assolit amb PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe (47%), els dos avantatges indicats anteriorment: menys temps de reacció i menys formació de subproductes amb diversos residus de metionina, fan que es triï el derivat al·lílic per a continuar l'estudi de la síntesi del tripèptid.

Tot i així, el fet que el PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl sigui un bon donador d'acil en aquesta reacció indica que és més fàcilment atacable tant per l'aigua com pel nucleòfil H-Met-OAl. Per aquest motiu treballant amb el derivat al·lílic –amb una relació donador d'acil/nucleòfil 1.5/1– es detecten més subproductes d'hidròlisi que quan s'emprava el derivat metílic en unes condicions similars (relació donador d'acil/nucleòfil 1.42/1). Per tant, amb la intenció d'afavorir l'atac al complex acil-enzim per part del nucleòfil respecte al de l'aigua es va decidir fer un estudi de la reacció incrementant la concentració de H-Met-OAl en el medi de reacció. Així es va dissenyar un grup d'experiments de síntesi del tripèptid utilitzant les següents relacions donador d'acil/nucleòfil: 1/1, 1/2, 1/4, 1/6, i 1/10 i la resta de condicions les que s'havien determinat com a òptimes anteriorment.

El perfil del rendiment al llarg del temps per a aquestes reaccions es pot seguir a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido., on s'inclou també l'experiment que s'ha detallat prèviament (amb una relació donador d'acil/nucleòfil 1.5/1).

A partir dels resultats d'aquests experiments s'observa que s'obté un increment del rendiment màxim de la reacció a mesura que augmenta l'excés de nucleòfil fins a una relació donador d'acil/nucleòfil: 1/4. Un excés més gran de H-Met-OAl: 1/6, 1/10, no incrementa el rendiment.

D'altra banda comparant l'experiment realitzat amb una relació donador d'acil/nucleòfil 1/4 amb el que té un excés de donador d'acil (1.5/1), s'observa que s'obtenen els mateixos rendiments (35%). Cal assenyalar però, que en el primer cas es detecten bastants subproductes amb més d'un residu de metionina degut a l'excés de nucleòfil que hi ha en el medi de reacció i en el segon cas la síntesi d'aquests subproductes és inferior però a més es detecten subproductes d'hidròlisi. Per tant es va decidir continuar treballant amb una relació donador d'acil/nucleòfil 1/4 ja que d'aquesta manera només es detecten subproductes d'un sol tipus.



*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Perfil del rendiment al llarg del temps en la reacció entre PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl i H-Met-OAl, variant la relació donador d'acil/nucleòfil. Els experiments es van realitzar amb acetat d'etil (0.2% (v/v) de tampó) i  $\alpha$ -QT immobilitzada sobre poliamida.*

### Estudi de la reacció amb papaïna com a catalitzador

En els dos últims apartats s'han estudiat diverses variables que afecten a la síntesi del tripèptid i a partir dels resultats obtinguts s'han determinat les condicions més favorables per a la síntesi d'aquest enllaç (donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl, relació donador d'acil/nucleòfil 1/4 i acetat d'etil). Tot i així –com ja s'ha esmentat– es segueix detectant la formació de subproductes amb més d'un residu de metionina. L'aparició d'aquests compostos impedeix en part, que s'obtinguin rendiments més elevats en aquesta reacció i d'altra banda presenten l'inconvenient que la seva posterior eliminació condueix a una disminució del rendiment global en el procés d'obtenció del tripèptid. Per tant arribats en aquest punt de la investigació l'objectiu següent era intentar trobar una via que evités la formació d'aquests subproductes.

Així, la clau per solucionar aquest problema es creia que podia consistir en trobar una proteasa que presenti especificitat pel donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl, de manera que catalitzi la síntesi del tripèptid però que al mateix temps no reconegui aquesta última molècula com a substrat.

Un enzim que ja s'ha utilitzat extensament en aquest treball i que compleix aquestes requisits és la papaïna –proteasa que accepta un nombre ampli d'aminoàcids,

tant com a donadors d'acil com a nucleòfils, amb la condició de que en posició P<sub>2</sub> s'hi trobi un residu hidrofòbic (preferentment Phe, Val, Leu)–. Aquest requeriment també es pot acomplir treballant amb aminoàcids protegits amb grups aromàtics o alifàtics.

Així doncs, es va dissenyar un experiment treballant amb les condicions òptimes trobades anteriorment però utilitzant papaïna immobilitzada sobre Celite en comptes de  $\alpha$ -QT.

L'objectiu d'aquest assaig era comprovar si amb aquest canvi s'obtenien rendiments més elevats i si realment utilitzant aquest biocatalitzador es sintetitzaven menys subproductes al llarg de la reacció.

Els rendiments obtinguts al llarg del temps es mostren a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. junt amb els de l'experiment realitzat en les mateixes condicions però emprant  $\alpha$ -QT com a biocatalitzador.

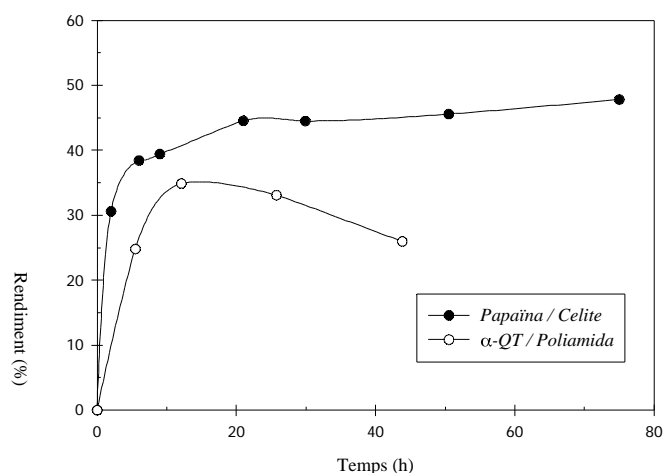


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Perfil del rendiment al llarg del temps en la reacció entre PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-OAl i H-Met-OAl (relació donador d'acil/nucleòfil 1/4). Les reaccions es van dur a terme amb acetat d'etil (0.2% (v/v) de tampó), variant l'enzim.

A partir de la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es desprèn que utilitzant papaïna s'assoleix un rendiment del 45% en 21 hores de reacció. A partir d'aquest moment s'observa que la reacció evoluciona molt lentament fins assolir un 48% de rendiment a les 75 hores de reacció, moment en que

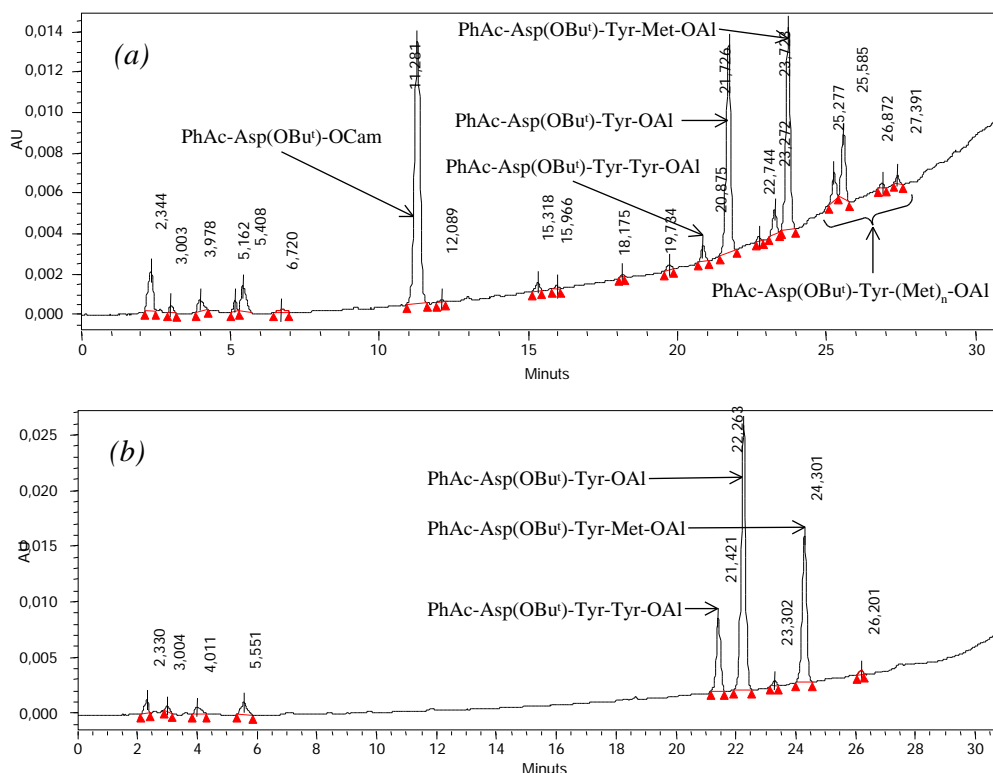


l'experiment va ser parat. D'altra banda es pot destacar que aquests rendiments són lleugerament superiors al màxim obtingut amb -QT (35%).

En referència a la síntesi de subproductes amb més d'un residu de metionina a partir del tripèptid, no es va detectar la síntesi d'aquests compostos en el transcurs de la reacció. Tot i així, en les anàlisis cromatogràfiques d'aquest experiment es detectava l'aparició de dos pics nous que corresponien a PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Met-OAl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Met-Met-OAl. Aquests subproductes provenien de l'addició de residus de H-Met-OAl al derivat PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam. Cal recordar que aquest derivat es trobava en el medi de reacció donat que en la síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl –a partir de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i H-Tyr-OAl– es va utilitzar un excés de donador d'acil i no es va realitzar cap purificació al llarg del procés per eliminar aquest excés.

L'eliminació dels esmentats subproductes (PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Met-OAl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Met-Met-OAl) del medi de reacció presenta els mateixos inconvenients que l'extracció dels subproductes amb més d'un residu de metionina que es formen a partir del tripèptid quan es treballa amb -QT. Per tant és necessari intentar evitar la síntesi d'aquests compostos ja que en cas contrari l'ús de papaïna en comptes de -QT no suposa un avantatge rellevant pel procés. En aquest sentit es va considerar que una solució factible consistia en dur a terme l'eliminació del derivat PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam mitjançant la hidròlisi selectiva de l'ester carboxiterminal i la posterior extracció del compost hidrolitzat, donat que és un procés senzill de realitzar. Un cop eliminat el PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam del medi de reacció (tal i com es detalla en el capítol de materials i mètodes) es va realitzar un experiment igual que l'anterior. En aquesta ocasió es va obtenir un rendiment màxim de síntesi de producte del 40% i no es va detectar cap subproducte en les anàlisis corresponents. No obstant, restava molt dipèptid sense reaccionar, fet que suggeria la possible desactivació de l'enzim, per la qual cosa es va decidir que s'aprofundiria l'estudi, al mateix temps que s'intentaria millorar el rendiment de la reacció, tal i com es mostra a §5.4.2.2.

A continuació es presenten dos cromatogrames que corresponen a dos experiments de síntesi del tripèptid catalitzats per -QT (Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.a**) o per papaïna (Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.b**). A partir d'aquests cromatogrames es poden observar els subproductes que es sintetitzen en el cas en que s'ha utilitzat -QT, mentre que en el cromatograma que correspon a la síntesi amb papaïna (prèvia extracció del derivat PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam) no es detecten subproductes.



*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl, catalitzada per  $\alpha$ -QT (a) o papaïna (b). En el cromatograma (a) es poden observar els pics que corresponen als subproductes amb més d'un residu de metionina, a diferència del cromatograma (b) on no hi són presents.*

En els darrers apartats s'ha presentat l'estudi de la síntesi del tripèptid utilitzant com a grup N- protector del donador d'acil el grup PhAc. Donada la seva extensió, a continuació se'n presenta un resum aclaridor.

Aquesta investigació –utilitzant com a donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe– s'ha iniciat assajant diferents relacions donador d'acil/nucleòfil (1.42/1, 0.95/1, 1/1.5) i s'ha comprovat que el rendiment màxim (47%) s'obté amb una relació 1.42/1. També s'ha observat que l'addició de TEA al medi de reacció condueix a l'obtenció de rendiments inferiors ja que es sintetitzen subproductes d'hidròlisi.

Cal assenyalar que en tots els experiments realitzats s'ha detectat la formació de subproductes que provenen de la posterior reacció del tripèptid amb H-Met-OAl.

Fent referència a l'estudi del suport d'immobilització i treballant a una  $a_w$  de 0.1, s'ha determinat que la poliamida és un suport més adequat que la Celite en aquesta

síntesi donat que la -QT immobilitzada sobre Celite en aquestes condicions no presenta activitat enzimàtica.

D'altra banda s'han obtingut rendiments similars treballant amb acetat d'etil o acetonitril. Donat que amb acetonitril s'han presentat problemes de solubilitat i que aquest dissolvent és menys recomanable des d'un punt de vista ambiental, s'ha cregut convenient continuar l'estudi utilitzant acetat d'etil.

Utilitzant les condicions òptimes trobades treballant amb PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OMe, s'ha començat un estudi amb el donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl i s'ha comprovat que aquest últim és més bon donador d'acil per aquesta reacció, ja que la síntesi del tripèptid evoluciona més ràpidament i la síntesi de subproductes amb diversos residus de metionina és lleugerament inferior. Seguidament s'ha ampliat l'estudi amb el derivat al·lílic i s'ha trobat que la relació donador d'acil/nucleòfil més adequada és 1/4. De totes maneres treballant amb aquesta relació de substrats també es detecta la formació de subproductes amb més d'un residu de metionina. Tenint en compte que l'eliminació d'aquests subproductes és molt complexa, interessa evitar que es sintetitzin. Amb aquest objectiu es busca una proteasa que degut a la seva especificitat no sintetitzi aquests compostos. Així, es comprova que treballant amb papaïna s'evita la síntesi d'aquests subproductes i s'obté un rendiment de síntesi del tripèptid lleugerament més elevat. En contrapartida, utilitzant aquest enzim es detecta la formació dels subproductes PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Met-OAl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Met-Met-OAl, que provenen de la reacció entre PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam –romanent en el medi de reacció– i H-Met-OAl. Com a solució, per a evitar la formació d'aquests compostos, es determina hidrolitzar l'ester carboxiterminal del PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i extreure el producte hidrolitzat abans de començar la síntesi del tripèptid.

### 5.2.3 Estratègia Asp+(Tyr+Met)

Fins al moment, s'ha dut a terme la síntesi del tripèptid R<sub>1</sub>-Asp(OR<sub>2</sub>)-Tyr-Met-OR<sub>3</sub> (on R<sub>1</sub>: Fmoc o PhAc, R<sub>2</sub>: H o Bu<sup>t</sup>, R<sub>3</sub>: Et o Al), seguint la via (Asp+Tyr)+Met. Donat que seguint aquesta via el màxim rendiment assolit va ser de l'ordre del 40% (utilitzant el grup N-protector PhAc), es va proposar continuar l'estudi seguint l'estratègia Asp+(Tyr+Met) per a intentar millorar els resultats.

Així doncs, era precís plantejar-se com abordar primerament la síntesi del dipèptid R-Tyr-Met-OAl. En primer lloc, calia escollir el grup protector (R) de l'extrem N-terminal de la tirosina. En aquest cas es va decidir utilitzar com a grup protector el grup Boc donat que es troba referit que és un bon grup protector (Calvet *et al.*, 1992),

el seu preu és més assequible que el d'altres grups protectors comercials i d'altra banda la seva eliminació en aquesta molècula no comporta dificultats.

### 5.2.3.1 Síntesi de Boc-Tyr-Met-OAl

La síntesi del dipèptid Boc-Tyr-Met-OAl es va realitzar a partir dels substrats Boc-Tyr-OCam i H-Met-OAl en un medi on el dissolvent era acetonitril amb un contingut de tampó de 0.5% (v/v) i 0.5% (v/v) de TEA. L'enzim que es va utilitzar era -QT immobilitzada sobre poliamida.

Aquesta síntesi es va realitzar a escala preparativa (obtenint-se un rendiment de reacció + purificació del 86%), amb la finalitat d'obtenir una quantitat de dipèptid suficient que permetés realitzar l'estudi posterior del tripèptid.

Un cop obtingut el dipèptid, a continuació, era necessari dur a terme l'eliminació del grup protector Boc, prèvia síntesi del tripèptid. La desprotecció química d'aquest grup es va realitzar tal i com es detalla al capítol de materials i mètodes (§4.4.2.3.1) assolint un rendiment del 100%.

### 5.2.3.2 Síntesi de R<sub>1</sub>-Asp(OR<sub>2</sub>)-Tyr-Met-OAl (on R<sub>1</sub>: Fmoc, PhAc i R<sub>2</sub>: H, Bu<sup>t</sup>)

#### 5.2.3.2.1 Síntesi de Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OAl (on R: H, Bu<sup>t</sup>)

Un cop preparat el dipèptid H-Tyr-Met-OAl es va iniciar l'estudi de la síntesi del tripèptid. En primer lloc es van fer unes proves preliminars de síntesi d'aquesta molècula utilitzant el grup Fmoc com a grup N- protector del donador d'acil. El motiu d'utilitzar aquest grup protector és el mateix que s'exposa a §5.2 per a la síntesi del mateix tripèptid mitjançant l'estratègia (Asp+Tyr)+Met.

A priori, es podia contemplar la possibilitat d'abordar aquest enllaç tant per control cinètic com termodinàmic de la reacció. Cal tenir present, però, que els esters en posició C-terminal dels derivats Fmoc-Asp-OH i Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH no són comercials, fet que implicava que aquestes esterificacions s'havien de realitzar en el laboratori. Aquestes reaccions presentaven l'inconvenient afegit de que si es duïen a terme en medi àcid es podia desprotegir el grup OBU<sup>t</sup> que protegeix l'aspàrtic, alternativament si l'esterificació es plantejava utilitzant el mètode de la sal de cesi, el medi bàsic podia provocar la desprotecció del grup Fmoc. Vistes així les coses, es va optar per dur a terme la síntesi sota control termodinàmic de la reacció. Així, es van realitzar uns experiments en un medi orgànic amb baix contingut en aigua, utilitzant com a donador d'acil Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu<sup>t</sup>) i com a nucleòfil H-Tyr-

Met-OAl. El dissolvent emprat era acetonitril i es va assajar l'addició de diferents quantitats de tampó en el medi de reacció. Com a biocatalitzador es va utilitzar termolisina immobilitzada sobre Celite.

Globalment, la conclusió que s'extreu a partir d'aquests experiments és que es produeix l'eliminació del grup protector Fmoc del tripèptid. D'altra banda, cal tenir en consideració que la síntesi de l'octapèptid serà catalitzada per -QT (proteasa que treballa a pH bàsic) i possiblement amb l'addició de TEA en el medi de reacció. Per tant, aquestes condicions de síntesi de caràcter bàsic, encara afavoririen més l'eliminació espontània del grup protector Fmoc, tant del tripèptid (que actuaria com a donador d'acil), com del mateix octapèptid que s'aniria sintetitzant. Per aquest motiu es va descartar la utilització del grup Fmoc i es va començar a estudiar la viabilitat de la síntesi del tripèptid utilitzant el grup protector PhAc.

#### 5.2.3.2.2 Síntesi de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl

Per a la síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl es va utilitzar com a donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i com a nucleòfil H-Tyr-Met-OAl en una relació 20/60 mM respectivament. El dissolvent emprat va ser acetonitril amb un contingut de tampó de 0.5% (v/v) i la papaïna es va immobilitzar sobre Celite.

El rendiment màxim assolit en aquesta reacció va ser únicament de l'11%, després de 4h 45' de reacció, moment en que ja només quedava un 4% de nucleòfil romanent. L'explicació de perquè s'obté un valor de rendiment màxim tan baix, es troba en la gran quantitat de subproductes que es detecten a partir de les anàlisis cromatogràfiques, tal i com es pot observar en el cromatograma que es presenta a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**

Així, es pot esmentar que alguns dels pics corresponen a subproductes d'hidròlisi, mentre que altres –tot i que no ha estat comprovat mitjançant anàlisi per espectrometria de masses– es considera que corresponen a compostos que estan formats per més d'una molècula de nucleòfil. La formació d'aquests últims subproductes explicaria el fet que malgrat que el rendiment assolit en el moment de parar la reacció és molt baix, gairebé no resta nucleòfil en el medi de reacció.

Davant d'aquests resultats es va creure que l'estudi de diferents factors per a intentar optimitzar aquesta reacció possiblement incrementaria el rendiment que s'havia obtingut, però l'aparició de tants subproductes al llarg de la síntesi implicaria un procés de purificació del tripèptid complex i per tant també disminuiria el rendiment global, donant lloc a un procés complicat i no gaire viable. Per tant, vistes així les coses es va optar per desestimar aquesta via.

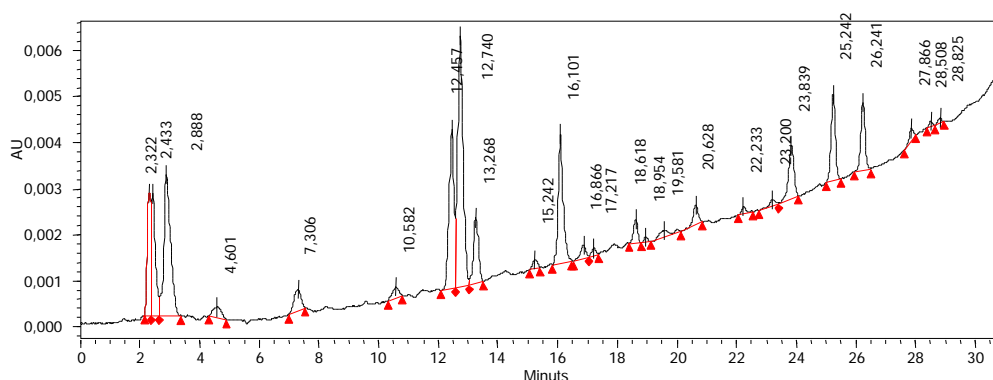


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu)-Tyr-Met-OAl. Cromatograma on es reflecteix la gran quantitat de subproductes que es sintetitzen en aquesta reacció.

## 5.2.4 Avaluació de les dues estratègies de síntesi

L'estudi de la síntesi del tripèptid  $R_1$ -Asp(OR<sub>2</sub>)-Tyr-Met-OR<sub>3</sub> (on  $R_1$ : Fmoc, PhAc,  $R_2$ : H, Bu<sup>t</sup> i  $R_3$ : Et, Al) s'ha abordat a partir de les dues estratègies de síntesi possibles (Asp+Tyr)+Met i Asp+(Tyr+Met), utilitzant diferents grups N- protectors dels donadors d'acil, sistemes de reacció i esters carboxiterminals dels substrats. Conseqüentment els resultats obtinguts permeten avaluar quina és la via de síntesi més adequada per a l'aplicació posterior a nivell de procés.

Donat que un dels objectius del treball és evitar al màxim les etapes de purificació intermèdies, és evident que interessa escollir l'estratègia de síntesi amb la que s'obtinguin rendiments més elevats i menys subproductes de reacció.

Aplicant l'estratègia de síntesi Asp+(Tyr+Met), s'han obtingut rendiments satisfactoris (86%) en les reaccions de síntesi+desprotecció del dipèptid Boc-Tyr-Met-OAl. Tot i així, es conclou que aquesta via no resulta adequada degut al baix rendiment assolit (11%) i al gran nombre de subproductes que es generen en la reacció de síntesi del tripèptid (Asp + Tyr-Met), quan el donador d'acil està protegit amb el grup PhAc. A més s'ha pogut constatar que aquesta estratègia tampoc resulta apropiada en el cas de treballar amb el donador d'acil protegit amb el grup Fmoc, ja que es produeix l'eliminació espontània d'aquest grup protector a partir del tripèptid que es va formant.

D'altra banda, aplicant l'estratègia de síntesi (Asp+Tyr)+Met s'han obtingut bons rendiments (75%) en la síntesi del dipèptid Asp-Tyr a partir del donador d'acil

protegit amb el grup Fmoc i en un sistema de reacció sòlid-sòlid, però a l'hora de sintetitzar el tripèptid també s'ha detectat l'eliminació del grup Fmoc i la formació de molts subproductes.

En canvi, utilitzant la mateixa estratègia de síntesi (Asp+Tyr)+Met, però treballant amb el grup protector PhAc s'obtenen rendiments de síntesi del tripèptid més elevats (40%) que amb l'estratègia Asp+(Tyr+Met), no es produeix l'eliminació del grup protector i la formació de subproductes és molt menor. Per aquests motius, es determina que aquesta és l'estratègia més adequada per a la síntesi del tripèptid Asp-Tyr-Met.

### 5.3 Estudi de les condicions de síntesi de la CCK-8

En aquest apartat es planteja com abordar la síntesi enzimàtica de l'octapèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> a partir del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl i del pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. Al llarg dels diversos apartats que s'han presentat en aquest treball, per la síntesi dels diferents enllaços peptídics i també en els estudis previs, majoritàriament s'han utilitzat sistemes de reacció orgànics amb baix contingut en aigua, treballant a una  $a_w$  de 0.1. Aquestes condicions de reacció han resultat efectives en la preparació dels fragments peptídics que condueixen a l'obtenció de l'octapèptid. Per tant, davant l'experiència adquirida en les reaccions prèvies, es va plantejar començar a explorar l'ensamblatge d'aquesta molècula treballant també en les mateixes condicions. Posteriorment es va estudiar la introducció de les modificacions necessàries per a obtenir la CCK-8.

#### 5.3.1 Síntesi enzimàtica de l'octapèptid

Tal i com es detalla a §5.2.2.2, es va dur a terme una prova prèvia de síntesi de l'octapèptid amb la finalitat de comprovar-ne la viabilitat. A partir d'aquest experiment es va detectar la formació d'un subproducte majoritari que correspon a la hidròlisi del tripèptid. A la vista d'aquest resultat i amb la intenció de maximitzar el rendiment de la reacció, es va creure convenient treballar amb un excés de tripèptid. Així doncs, per a iniciar aquest estudi, es va dissenyar un experiment utilitzant una relació donador d'acil (PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl)/nucleòfil (H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>): 2.44/1 (24.08/9.86 mM). Com a dissolvents es van emprar acetat d'etil o acetonitril (amb 0.2% i 0.5% (v/v) de tampó respectivament), ja que

són els que s'han utilitzat durant tot el treball\*. En el medi de reacció es va addicionar 0.5% (v/v) de TEA i com a biocatalitzador es va utilitzar -QT immobilitzada per deposició sobre poliamida. Un cop acabades les reaccions, es rentava l'enzim amb dimetilformamida (DMF) per tal d'extreure els compostos que podien estar adsorbits i els rendiments corresponents es calculaven després d'haver realitzat aquests rentats.

Els rendiments màxims de síntesi obtinguts a partir d'aquests experiments són: 1% i 81% amb acetat d'etil i acetonitril respectivament. El producte va ser aïllat i identificat per espectrometria de masses.

En el cas en que es va utilitzar acetat d'etil com a dissolvent, sorprèn el fet que no es sintetitza octapèptid, ja que al llarg de tots els enllaços peptídics realitzats anteriorment, s'han obtingut rendiments de síntesi de producte similars treballant amb acetat d'etil i acetonitril (aquest experiment es va repetir per assegurar la veracitat del resultat). Després de rentar l'enzim amb DMF, es va comprovar que no s'havia consumit gens de pentapèptid i que l'únic subproducte de reacció que s'havia generat era la hidròlisi del tripèptid.

En referència a l'experiment realitzat amb acetonitril, a partir de les anàlisis cromatogràfiques corresponents, al llarg del temps, es detecta la disminució d'àrea dels substrats i l'aparició d'octapèptid. Un cop acabada la reacció també es va rentar l'enzim i es va recuperar una part d'octapèptid que estava adsorbit assolint un rendiment màxim del 81% com ja s'ha esmentat.

D'altra banda, malgrat l'alt rendiment obtingut en aquest experiment, cal assenyalar que es detecta l'aparició del pic –amb una àrea important– que correspon a la hidròlisi del tripèptid. Tot i que a l'inici de la reacció, el tripèptid es troba en el medi en excés respecte al nucleòfil, en el moment d'aturar l'experiment s'observa que ja pràcticament s'ha consumit tot, entenent que una part d'aquest substrat reacciona per donar la síntesi de l'octapèptid i l'altra s'hidrolitza.

Aquest fet suggereix que si s'aconseguís disminuir la reacció d'hidròlisi del donador d'acil, que es dona degut a la competició de l'aigua amb el nucleòfil en l'atac al complex acil-enzim, possiblement augmentaria el rendiment de síntesi de l'octapèptid. Amb aquest objectiu es va determinar repetir l'estudi anterior, però ara addicionant quantitats inferiors de tampó en el medi de reacció: 0.3% i 0.4% (v/v). Els rendiments obtinguts a partir d'aquests experiments, junt amb el que s'ha detallat

---

\* Tant amb acetat d'etil com amb acetonitril, s'observava que el pentapèptid no era totalment soluble en el medi de reacció.



prèviament (amb 0.5% (v/v) de tampó) es troben recollits a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**

<i>Tampó (%)</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
0.3	83
0.4	79
0.5	81

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments màxims de síntesi de l'octapèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> obtinguts variant el contingut de tampó del medi de reacció.*

A partir dels valors de la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es conclou que la variació del rendiment és irrellevant en el rang de contingut d'aigua estudiat. A la vista d'aquests resultats, es considera que per detectar diferències apreciables en el rendiment de la reacció, caldria ampliar l'estudi assajant continguts d'aigua en un interval més ampli. D'aquesta manera continguts d'aigua molt inferiors disminuirien la hidròlisi del tripèptid però possiblement afectarien negativament l'activitat de l'enzim, efecte que ja ha sigut detectat en estudis previs en la síntesi del tripèptid Z-Gly-Trp-Met-OEt (Capellas *et al.*, 1996a). Per tant es va determinar seguir treballant a una  $a_w$  de 0.1.

Fins al moment, s'havia dut a terme la síntesi de l'octapèptid amb -QT immobilitzada sobre poliamida. A continuació, per ampliar aquest estudi, es va decidir realitzar un experiment (amb acetonitril, 0.5% (v/v) de tampó, 0.5% (v/v) de TEA) i l'enzim immobilitzat sobre Celite, ja que és l'altre suport utilitzat al llarg de tot el treball.

El rendiment màxim de síntesi de producte obtingut en aquest experiment es troba recollit a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, junt amb el de l'experiment realitzat en les mateixes condicions però amb l'enzim immobilitzat sobre poliamida. Així, s'observa que en el segon cas el rendiment obtingut és notablement superior i el temps de reacció molt més curt.

A més es pot destacar que, utilitzant Celite com a suport, la velocitat de síntesi d'octapèptid és menor que la d'hidròlisi del tripèptid, de manera que en el moment de parar la reacció, tot el tripèptid que no ha reaccionat per donar octapèptid s'ha hidrolitzat, mentre que encara queda un 70% de pentapèptid sense reaccionar.

Per aquests motius, resulta evident que la poliamida és un suport molt més adequat que la Celite, dins les condicions de síntesi estudiades per aquest enllaç. A partir d'estudis previs sobre la síntesi del tripèptid Z-Gly-Trp-Met-OEt, duts a terme per col·laboradors del mateix grup d'investigació, ja s'havia detectat que la  $\alpha$ -QT immobilitzada sobre Celite, a aquesta  $a_w$  pràcticament no presenta activitat (Capellas *et al.*, 1996a). Posteriorment van comprovar que l'addició de TEA en el medi de reacció incrementava l'activitat; efecte que no s'observa en el present estudi, possiblement degut a que la hidrofobicitat dels substrats provoca problemes d'interaccions negatives substrat-enzim/suport.

Suport d'immobilització	Temps	Rendiment màxim (%)
Celite	170h	24
Poliamida	47h 18'	81

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims de síntesi de l'octapèptid PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> obtinguts utilitzant poliamida o Celite com a suports d'immobilització de la  $\alpha$ -QT.*

Com ja s'ha esmentat àmpliament al llarg del treball, un dels objectius del mateix, és utilitzar en la síntesi dels diferents enllaços peptídics, dissolvents que siguin el menys tòxics possible de cara a una aplicació a nivell industrial. Tenint present que en aquest acoblament, treballant amb acetat d'etil no es va detectar síntesi d'octapèptid, es va determinar a continuació ampliar l'estudi d'aquest enllaç, assajant diferents dissolvents que a l'igual que l'acetat d'etil es consideren més adequats des del punt de vista ambiental.

Així, es va realitzar un grup d'experiments amb els següents dissolvents –que pertanyen al grup 3 de la classificació segons la Food and Drug Administration dels EUA (Apèndix D)-: acetona, dimetilsulfòxid, acetat de metil, 2-propanol, tert-butilmetilèter i tetrahidrofurà. En cada cas es va addicionar el contingut d'aigua que correspon aproximadament a una  $a_w$  de 0.1, (aquests valors van ser estimats a partir del model teòric de contribució de grups UNIFAC). La resta de condicions experimentals eren les mateixes que s'han descrit per a l'experiment realitzat amb acetoni-tril i 0.5% (v/v) de tampó i per tant un cop acabades les reaccions també es rentava l'enzim amb dimetilformamida per solubilitzar els substrats i el producte.

A partir de la prova realitzada amb dimetilsulfòxid, no es va detectar disminució de l'àrea de pentapèptid; comportament similar al que s'havia observat anteriorment utilitzant acetat d'etil.

En general, treballant amb els altres dissolvents, s'observava que malgrat que es consumia bona part del pentapèptid –en el cas del 2-propanol s'esgotava tot–, gairebé no es detectava octapèptid, excepte quan es treballava amb acetat de metil (tot i que en aquest cas, l'àrea d'octapèptid obtinguda era molt inferior si es compara amb la dels experiments realitzats amb acetonitril). Tenint en compte, que es va rentar l'enzim amb dimetilformamida (dissolvent que com s'ha demostrat anteriorment és capaç d'extreure el producte adsorbit), es va descartar la possibilitat de que s'hagués quedat l'octapèptid adsorbit sobre la preparació enzimàtica. A més, cal esmentar que al llarg d'aquests experiments es detectava l'aparició d'uns pics nous, amb àrees bastant diferents en funció del dissolvent utilitzat. Es desconeix la causa d'aquest fenomen. Per a determinar què succeeix realment en aquestes reaccions caldria aïllar aquests subproductes i identificar-los per espectrometria de masses.

A la vista d'aquests resultats, per a futures investigacions, es proposa seguir estudiant el contingut d'aigua amb acetat de metil, ja que dins d'aquest grup de dissolvents és l'únic amb el que s'ha detectat síntesi d'octapèptid o bé assajar altres dissolvents nous. Com a solució per a aquest treball, es va determinar continuar l'estudi amb acetonitril, donat el bon rendiment obtingut amb aquest dissolvent.

### **5.3.2 Modificacions de l'octapèptid per a obtenir la CCK-8**

Després d'haver sintetitzat l'octapèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, per a obtenir la CCK-8 era necessari primer eliminar els esters tert-butílics que protegeixen els residus d'àcid aspàrtic en posició i posteriorment sulfatar la tirosina.

#### **5.3.2.1 Eliminació dels esters tert-butílics de l'àcid aspàrtic**

L'eliminació dels esters tert-butílics es va realitzar químicament, tal i com es descriu al capítol de materials i mètodes (§4.4.4.1), obtenint-se un rendiment del 78%. Cal destacar que l'aplicació d'aquest protocol suposa utilitzar productes molt agressius des del punt de vista ambiental; per aquest motiu de cara al procés seria aconsellable poder protegir els residus d'àcid aspàrtic amb un ester que sigui fàcilment eliminable mitjançant una metodologia més suau o alternativament fer la síntesi sense protegir aquests residus d'aminoàcids. En aquest aspecte, s'havia

estudiat la formació d'alguns enllaços peptídics, en els que hi és present un residu d'àcid aspàrtic –com ara el pentapèptid Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> i el tripèptid Asp-Tyr-Met– sense protegir aquest aminoàcid en posició . Malgrat que en aquests estudis s'havien obtingut rendiments inferiors respecte de quan es troba protegit, la millora que suposa des d'un punt de vista de procés és important, i per tant caldria avaluar globalment les dues opcions.

### 5.3.2.2 Sulfatació de la tirosina

La reacció de sulfatació enzimàtica de l'hidroxil fenòlic del residu de tirosina, va ser estudiada per diversos membres del mateix equip d'investigació (Delhom *et al.*, 1996). En aquest estudi es va utilitzar com a biocatalitzador una arilsulfotransferasa d'*Eubacterium* sp., immobilitzada per enllaç covalent multipuntual amb gels d'agaro-sa. Es van assajar diversos derivats peptídics, que es van sulfatar amb rendiments superiors al 90%, excepte la Z-CCK-8 –pèptid més llarg que es va provar– cas en que no es va detectar sulfatació.

A la vista d'aquests resultats i tenint present que l'enzim utilitzat en l'esmentat estudi no és comercial –per tant poc útil per a un procés– es va optar per dur a terme la sulfatació de la CCK-8 per via química, utilitzant com a reactiu acetil sulfat de piridina (PAS). Així, es va dissoldre l'octapèptid en una mescla al 50% (v/v) d'acetonitril/dimetilformamida. Seguidament es va addicionar el PAS i el transcurs de la reacció es va seguir per HPLC. Cal tenir present, que abans d'iniciar el procés de sulfatació de la tirosina, és important haver liofilitzat l'octapèptid per eliminar qualsevol traça dels compostos de la barreja que s'ha utilitzat prèviament en la reacció d'extracció dels grups tert-butil i, d'altra banda, és necessari utilitzar el PAS recent preparat i sec, ja que és un compost que s'hidrata amb molta facilitat. En aquestes condicions es va sulfatar la tirosina, assolint un rendiment de reacció del 100%. Posteriorment el producte va ser aïllat i caracteritzat per espectrometria de masses.

## 5.4 Procés de síntesi de la CCK-8

### 5.4.1 Procés de síntesi del pentapèptid C-terminal de la CCK-8 (4-8)

#### 5.4.1.1 Plantejament i comprovació d'un nou esquema de síntesi

En el capítol d'introducció (§2.7), es detalla l'estudi realitzat en treballs previs per dur a terme les tres reaccions de síntesi que condueixen a l'obtenció del pentapèptid C-terminal de la CCK-8: H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, des d'un punt de vista d'optimització del rendiment de cada acoblament enzimàtic. Així, a partir de l'esquema de síntesi que es va seguir (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), es pot destacar que es purificava cada intermedi abans de ser utilitzat en la següent reacció. D'altra banda en cada acoblament s'emprava l'ester del donador d'acil amb el que s'obtenia millors rendiments, malgrat que aquest fet impliqués incrementar el número d'etapes. Cal assenyalar també, que com a grup protector de la glicina s'utilitzava el grup Z, tot i que l'eliminació d'aquest grup, comporta certs inconvenients –sobretot quan a la seqüència peptídica hi ha residus de metionina– com ja s'ha esmentat a §5.1.

En el present treball, en canvi, aquestes síntesis s'enfoquen amb la idea de definir un procés global per a la síntesi del pentapèptid, que resulti senzill i factible a escala preparativa. L'assoliment d'aquest objectiu comporta intentar maximitzar tant el rendiment de reacció com de separació però simplificant o evitant sempre que sigui possible les purificacions, disminuint el número d'etapes intermèdies o introduint qualsevol altre canvi que faci més senzill el procés. Amb aquesta finalitat, i tenint com a base els resultats i l'esquema anterior (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), a continuació es proposa un altre esquema per a la síntesi del pentapèptid (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), en el que es modifiquen alguns factors que afecten a les diferents reaccions.

Així mateix, la viabilitat d'aquests canvis es va comprovar duent a terme un conjunt d'experiments de cada acoblament enzimàtic, a escala analítica, els quals es presenten a continuació.

#### Dipèptid: R-Gly-Trp-OBzl (on R: PhAc, Mand)

A partir de l'estudi de síntesi del dipèptid Gly-Trp (detallat a §5.1.2), es conclou que tant el grup PhAc com Mand són bons grups N- protectors per aquest enllaç.

Treballant amb el grup PhAc, entre els esters carboxiterminals assajats, el que va donar millors resultats és el carboxamidometílic (Cam). En el cas del grup Mand es va sintetitzar el Mand-Gly-OCam però el rendiment de purificació que es va assolir era molt baix; per aquest motiu es va decidir utilitzar el Mand-Gly-OBzl.

Per tant en l'esquema que es presenta, com a donador d'acil de la reacció es va emprar PhAc-Gly-OCam o Mand-Gly-OBzl i com a nucleòfil H-Trp-OBzl. Donat que els experiments que s'han realitzat al respecte ja han sigut presentats, a continuació només es comenten les modificacions incloses en el nou esquema i el perquè de la seva introducció.

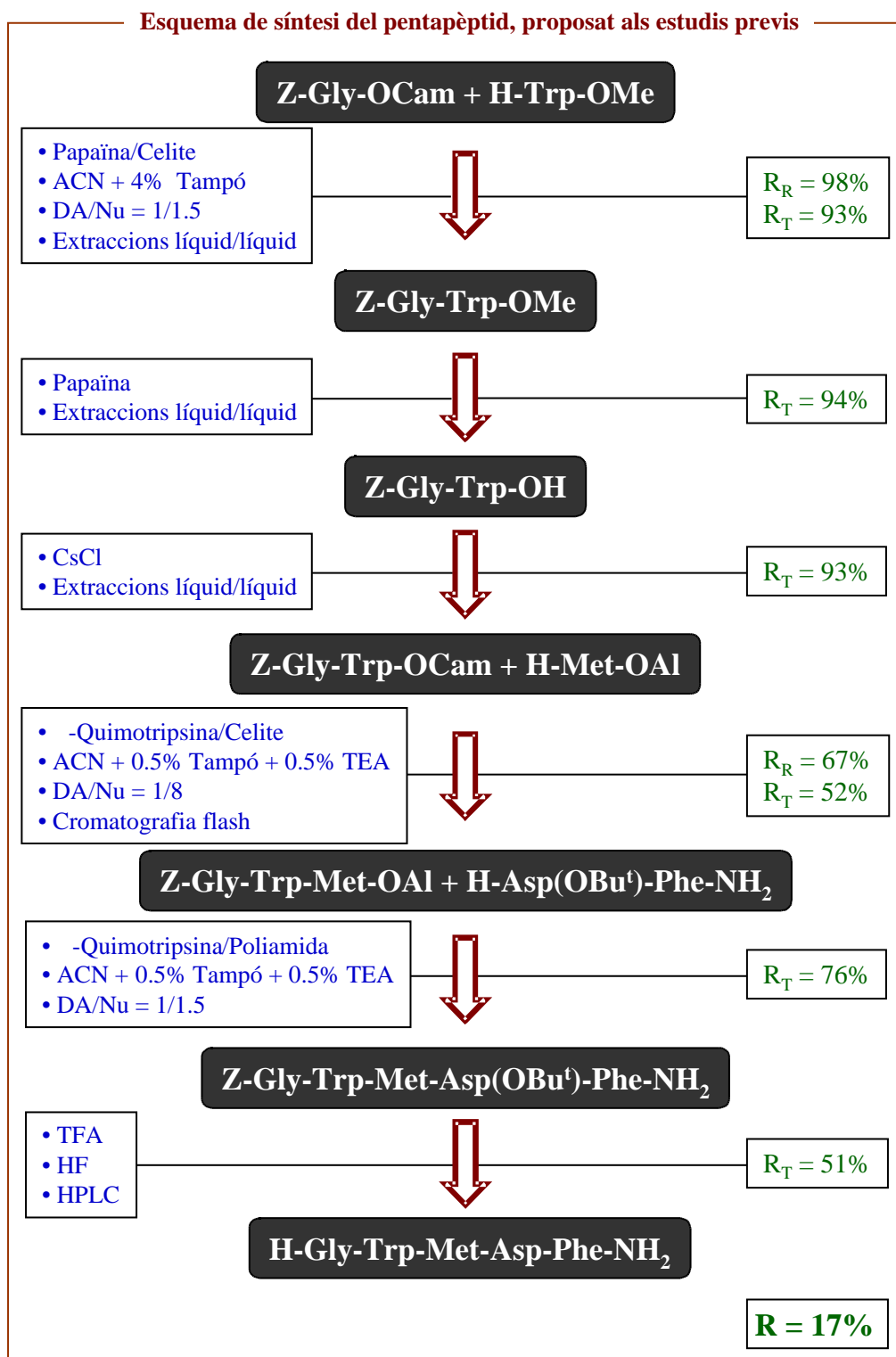


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema de síntesi del pentapéptid, proposat als estudis previs.

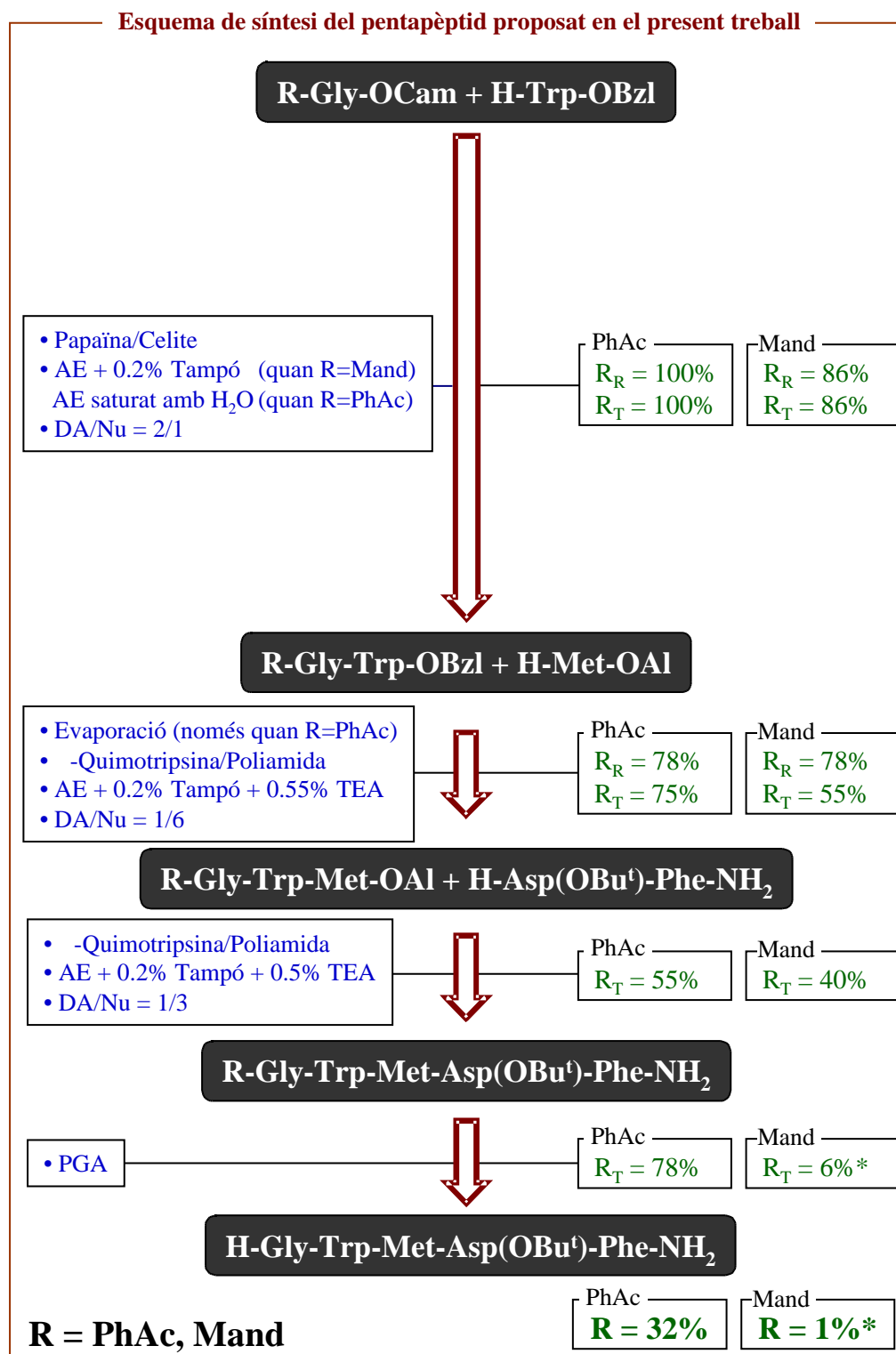


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema de síntesi del pentapéptid, proposat en el present treball.  
 \*= Només es va realitzar una etapa de desprotecció.



- Dissolvent

Es proposa utilitzar acetat d'etil en aquesta reacció perquè els resultats obtinguts amb acetonitril són molt similars i el primer és un dissolvent més adequat des del punt de vista mediambiental, com ja s'ha esmentat anteriorment al llarg del treball.

- Grup protector

S'estudia si és factible la utilització dels grups protectors PhAc i Mand com a grups N- protectors del donador d'acil en la síntesi del dipèptid. A més es compara l'efecte que exerceixen aquests dos grups protectors sobre la reactivitat dels donadors d'acil assajats en la síntesi del dipèptid Gly-Trp.

- Relació donador d'acil/nucleòfil

En els estudis previs es va utilitzar una relació donador d'acil/nucleòfil 1/1.5, ara es proposa emprar una relació 2/1. Tal i com es va explicar a §5.1.2.1, aquesta modificació és necessària per a evitar que es produeixin reaccions secundàries que donen lloc a subproductes del tipus R-Gly-(Trp)<sub>n</sub>-OBzl essent n>1 (on R: PhAc, Mand). Una altra raó per a introduir aquest canvi és que el H-Trp-OBzl romanent en el medi de reacció –al no realitzar cap purificació intermèdia– podria reaccionar en el següent acoblament o sigui en la síntesi del tripèptid, produint subproductes indesitjats i reduint així el rendiment de la reacció.

- Nucleòfil

En l'estudi anterior de síntesi del dipèptid es va fer servir com a nucleòfil H-Trp-OMe, però l'ester metílic en posició C-terminal del dipèptid li conferia baixa reactivitat com a donador d'acil en la següent reacció; consegüentment va ser necessari hidrolitzar aquest ester i introduir el derivat carboxamidometílic (Cam) que és molt més reactiu.

En l'esquema actual, es proposa utilitzar el nucleòfil H-Trp-OBzl. Així el fet de sintetitzar el dipèptid amb l'ester benzílic en posició C-terminal li proporciona una reactivitat elevada com a donador d'acil en la següent reacció.

- Eliminació d'etapes intermèdies de purificació

En el nou esquema que es planteja, s'eliminen el màxim nombre possible d'etapes intermèdies i purificacions entre la reacció de síntesi del dipèptid i del tripèptid. En canvi en l'esquema seguit en els treballs previs es purificava entre etapes per eliminar els substrats que no havien reaccionat i els subproductes formats. En particular va ser necessari purificar el substrat Z-Gly-Trp-OCam un cop preparat, ja que en cas

contrari els reactius romanents utilitzats en la síntesi de l'ester carboxamidomètilic (Cam) podien inhibir les reaccions subseqüents.

### **Tripèptid: R-Gly-Trp-Met-OEt (on R: PhAc, Mand)**

Per a iniciar l'estudi de síntesi del tripèptid Gly-Trp-Met es va dissenyar un grup d'experiments utilitzant com a donador d'acil Mand-Gly-Trp-OBzl i com a nucleòfil H-Met-OEt, treballant amb la mateixa relació molar donador d'acil/nucleòfil (1/8) que en els estudis previs.

Donat que aquest estudi es realitzava amb una finalitat de procés, es va començar assajant amb acetat d'etil (amb 0.2% (v/v) de tampó) ja que és un dissolvent adequat des d'aquest punt de vista. A més el fet d'utilitzar el mateix dissolvent i contingut d'aigua que en la reacció prèvia (síntesi del dipèptid) podia suposar un avantatge perquè simplificaria el procés. Per tant només en el cas que en aquestes condicions no funcionés la síntesi, es passaria a provar altres dissolvents.

Així aquests experiments de síntesi del tripèptid es duen a terme a partir del medi de reacció del dipèptid, prèvia filtració de l'enzim. A aquest medi se li addicionava H-Met-OEt i -QT immobilitzada sobre poliamida o Celite per iniciar la reacció.

Treballant amb l'enzim immobilitzat sobre Celite es va obtenir un rendiment del 6% després de 23h 15' de reacció, mentre que amb poliamida es va obtenir un rendiment màxim del 73% després de 7h 36'. Aquest últim valor es va considerar prou satisfactori ja que d'altra banda el rendiment obtingut en aquesta reacció a partir de l'esquema previ amb acetonitril (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.) era molt similar (67%). Per tant es va determinar continuar la investigació utilitzant acetat d'etil com a dissolvent i poliamida com a suport d'immobilització de l'enzim.

El següent factor que es va estudiar va ser la relació donador d'acil/nucleòfil, per tal de comprovar com afecta la disminució de l'excés de nucleòfil en el rendiment de la reacció. Així, treballant en les condicions òptimes trobades anteriorment, es va realitzar un grup d'experiments amb les següents relacions donador d'acil/nucleòfil: 1/2, 1/4.5, 1/6 i 1/8. Els resultats d'aquests assajos es troben recollits a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

A partir dels valors d'aquesta taula es desprèn que l'increment d'excés de nucleòfil en el medi de reacció condueix progressivament a un petit augment del rendiment de síntesi de producte. Tenint present el canvi d'escala que es realitzarà posteriorment es considera oportú arribar a un compromís entre el rendiment de reacció que s'assoleix

i l'excés de nucleòfil utilitzat. Amb aquest criteri doncs, es va considerar adequat treballar amb un excés de nucleòfil de 6 en comptes de 8 com s'havia fet fins al moment.

<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
1 / 2	67
1 / 4.5	69
1 / 6	73
1 / 8	77

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments màxims obtinguts en la reacció de síntesi del tripèptid Mand-Gly-Trp-Met-OEt a partir d'un estudi realitzat amb diferents relacions donador d'acil/nucleòfil.*

Seguidament es va realitzar l'estudi de síntesi del tripèptid amb el grup N-protector PhAc, partint de les condicions que s'havien determinat com a òptimes en la investigació prèvia amb el grup Mand, o sigui utilitzant acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó, relació donador d'acil/nucleòfil 1/6 i poliamida com a suport d'immobilització de l'enzim.

Donat que la reacció de síntesi del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl s'havia realitzat utilitzant acetat d'etil saturat amb tampó, abans d'iniciar la síntesi del tripèptid va ésser necessari filtrar el medi de reacció, evaporar el dissolvent, assecar el sòlid i re-suspendre'l amb acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó.

En aquest experiment no es va detectar síntesi de tripèptid. Es va creure que això es devia a que es produïa una acumulació de sals que provenien del medi de la reacció anterior com a conseqüència de que en la reacció de síntesi del tripèptid només es dissolien amb un 0.2% (v/v) de tampó i aquest fet comportava una elevada força iònica que podia afectar l'activitat de l'enzim. Per evitar aquest problema es va considerar la possibilitat de dur a terme la reacció de síntesi del dipèptid amb acetat d'etil saturat amb aigua en comptes de tampó i es va comprovar experimentalment que s'obtenia el mateix rendiment de síntesi de producte en ambdós casos. A continuació, es va dur a terme la síntesi del tripèptid en les mateixes condicions de reacció que s'han descrit, obtenint-se un rendiment del 72% (valor comparable al 73% obtingut amb el grup protector Mand).

Anteriorment, utilitzant el grup protector Mand s'havia comprovat que a una  $a_w$  de 0.1, la -QT no presenta activitat si es troba immobilitzada sobre Celite. El fet de treballar ara amb el grup PhAc a la mateixa activitat d'aigua, feia pensar que l'enzim tampoc seria actiu amb aquest suport. Aquesta suposició es va comprovar experimentalment ja que no es va detectar formació de producte en aquestes condicions.

Un cop sintetitzat el tripèptid R-Gly-Trp-Met-OEt (on R: Mand, PhAc), donat que en la reacció de síntesi del pentapèptid també s'utilitza -QT com a biocatalitzador, és necessari eliminar l'excés de nucleòfil (H-Met-OEt) present en el medi de reacció, ja que altrament es podrien formar subproductes del tipus R-Gly-Trp-(Met)<sub>n</sub>-OEt, (n>1).

Al llarg de les reaccions de síntesi del tripèptid R-Gly-Trp-Met-OEt (on R: Mand, PhAc) que s'han descrit, s'observava la formació d'una emulsió blanca –tot i que homogènia– en el medi. Per conèixer la seva composició es va filtrar el medi d'una reacció, obtenint així un sòlid blanc que un cop analitzat es va saber que corresponia al tripèptid, mentre que el filtrat –transparent– contenia els substrats romanents (sobretot l'excés de nucleòfil H-Met-OEt), altres subproductes de la reacció i una petita porció del tripèptid que és soluble en el medi de reacció. Per tant, la baixa solubilitat que presenta el tripèptid en el medi de reacció, es podia aprofitar per realitzar una purificació “in situ” només filtrant. Aquesta metodologia és molt operativa a nivell de procés ja que al treballar amb volums grans es poden emprar filtres de placa porosa amb diferents mides de porus. En els experiments a escala analítica però, la separació de H-Met-OEt es va seguir realitzant mitjançant extraccions líquides.

A partir dels estudis previs es sabia que la síntesi del pentapèptid Z-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> és més ràpida amb el donador d'acil Z-Gly-Trp-Met-OAl que amb Z-Gly-Trp-Met-OEt (Capellas *et al.*, 1997). Així, malgrat que l'ester al·lílic sembla més adequat per la síntesi del pentapèptid, fins al moment l'estudi del tripèptid s'havia realitzat amb l'ester etílic per criteris econòmics. Arribats a aquest punt de la investigació es va decidir comprovar (amb els grups N- protectors PhAc i Mand) si hi havia diferències en la síntesi del tripèptid treballant amb el nucleòfil H-Met-OAl o H-Met-OEt.

A tal efecte es va realitzar la síntesi de R-Gly-Trp-Met-OAl (on R: PhAc, Mand) i els resultats d'aquests experiments es comparen amb els que s'havien obtingut en la

síntesi de R-Gly-Trp-Met-OEt a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**

Donat que la síntesi del tripèptid no es veu afectada per la naturalesa de l'èster carboxiterminal de la metionina (Et o Al), es va continuar el procés utilitzant H-Met-OAl.

<i>Donador d'acil</i>	<i>Nucleòfil</i>	<i>Rendiment màxim (%)</i>
Mand-Gly-Trp-OBzl	H-Met-OEt	73
Mand-Gly-Trp-OBzl	H-Met-OAl	71
PhAc-Gly-Trp-OBzl	H-Met-OEt	72
PhAc-Gly-Trp-OBzl	H-Met-OAl	70

Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments màxims obtinguts en la reacció de síntesi del tripèptid  $R_1$ -Gly-Trp-Met-OR<sub>2</sub> (on R<sub>1</sub>: PhAc, Mand i R<sub>2</sub>: Et, Al).

Així doncs, les modificacions que es proposen en el nou esquema de síntesi del pentapèptid (Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**), respecte a l'anterior (Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**) pel que fa a la reacció de síntesi del tripèptid es poden resumir en els següents apartats.

- Dissolvent

Es proposa utilitzar acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó en comptes d'acetonitril perquè s'obté un rendiment raonable i en el cas en que es treballa amb el grup protector Mand aquest fet suposa l'avantatge d'aprofitar el mateix medi de reacció del dipèptid sense realitzar etapes addicionals.

- Grups protectors

A l'igual que es va fer en la reacció anterior, es conclou que és factible dur a terme la reacció de síntesi del tripèptid amb els dos grups N- protectors (Mand i PhAc) que s'han provat.

- Relació donador d'acil/ nucleòfil

Es considera adequat des del punt de vista econòmic i de rendiment de la reacció, utilitzar un excés de donador d'acil (1/6), inferior al que s'utilitzava en l'esquema previ (1/8).

- Purificacions

En l'esquema anterior, un cop sintetitzat el tripèptid, es realitzava una purificació per cromatografia flash, en el present cas, aprofitant que el producte és insoluble en el medi, la purificació del producte és molt senzilla ja que es realitza mitjançant filtracions.

- Suport d'immobilització

En el treball anterior s'emprava Celite com a suport d'immobilització de l'enzim, mentre que en aquest s'utilitza poliamida ja que dona millors resultats quan es treballa amb acetat d'etil com a dissolvent.

### **Pentapèptid: R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc, Mand)**

L'estudi de la síntesi del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc, Mand) es va realitzar utilitzant com a dissolvent acetat d'etil (amb 0.2% (v/v) de tampó). La resta de condicions de reacció eren iguals a les dels estudis previs: relació donador d'acil/nucleòfil 1/1.5, 0.5% (v/v) de TEA i -QT immobilitzada sobre poliamida (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.).

Com a resultat d'aquests experiments es desprèn que es podia sintetitzar pentapèptid amb els dos grups N- protectors assajats (PhAc i Mand). Tot i així s'observava que aquestes reaccions eren més lentes que les reaccions de síntesi del pentapèptid realitzades en estudis previs (Capellas *et al.*, 1997), possiblement a causa de que en el present cas no es purificava entre etapes. A fi d'incrementar la velocitat de reacció es va decidir augmentar l'excés de nucleòfil, treballant amb una relació donador d'acil/nucleòfil 1/3 i es va comprovar experimentalment que efectivament disminuïa el temps de reacció. De totes maneres la dificultat fonamental era que no es podia avaluar acuradament els rendiments de les reaccions degut a la insolubilitat d'aquest producte, que no permetia l'extracció de mostres homogènies (a diferència del que succeïa amb el tripèptid). Per solucionar aquesta qüestió es va optar per treballar a escala preparativa amb un reactor de 200 ml de capacitat i determinar els rendiments per pesada.

Així doncs, fins al moment s'ha comprovat –a escala analítica– la viabilitat del nou esquema de síntesi del pentapèptid i s'han determinat les condicions idònies per a dur a terme les diferents reaccions que condueixen a l'obtenció d'aquesta molècula.

### 5.4.1.2 Detecció de problemes operacionals

A nivell preparatiu, les síntesis es van dur a terme en un reactor discontinu de tanc agitat, d'on s'extreien mostres del medi reaccionant, per seguir l'evolució amb el temps dels substrats i productes i així poder determinar el moment d'aturada de les reaccions.

Malgrat haver decidit treballar amb acetat d'etil en totes les reaccions, el fet d'utilitzar una preparació enzimàtica diferent per a cada enllaç, implicava que un cop finalitzada una síntesi calia filtrar el medi de reacció i addicionar l'enzim corresponent per iniciar la següent.

A nivell pràctic aquest aspecte es va resoldre treballant amb un reactor dissenyat amb una placa porosa a la seva part inferior; de forma que un cop acabada una reacció, per a obtenir l'enzim separat del sistema reaccionant, es col·locava un recipient a la sortida inferior del reactor que s'obria al mateix temps que s'aplicava una sobrepressió de N<sub>2</sub> a dins del reactor o bé alternativament s'obria la sortida inferior del reactor acoblada a un kitasato connectat al buit.

Cal esmentar també, que el reactor estava connectat a un sistema de gasificació que permetia bombollear nitrogen anhidre, per tal de desplaçar inicialment l'oxigen present en el seu interior i mantenir posteriorment una sobrepressió de nitrogen. Aquest corrent s'aplicava per mantenir una atmosfera no oxidant a l'interior del reactor quan l'enzim emprat era papaïna, ja que altrament s'oxidarien els ponts disulfur de les cisteïnes de la papaïna, impeding el seu funcionament.

En primer lloc, es van realitzar uns experiments inicials treballant amb aquest reactor, per tal d'establir els problemes operacionals que es podien derivar degut al canvi d'escala. Cal esmentar que en algunes d'aquestes proves es va utilitzar el donador d'acil protegit amb el grup Boc, concretament Boc-Gly-OCam, tenint present que la viabilitat del procés amb aquest substrat ja s'havia comprovat prèviament a escala analítica. El motiu d'utilitzar aquest grup protector en aquests assajos preliminars no era altre que evitar el consum de Mand-Gly-OBzl i PhAc-Gly-OCam, ja que la seva síntesi –bastant laboriosa– es realitzava íntegrament en el laboratori.

Es va realitzar un primer experiment de síntesi del dipèptid a partir dels substrats Boc-Gly-OCam i H-Trp-OBzl amb una relació entre ells 80/40 mM. Com a dissolvent es va utilitzar acetat d'etil (100 ml) i es va addicionar un contingut de tampó de 0.2% (v/v).

Per criteris econòmics es va considerar que es podia treballar amb una quantitat de preparació immobilitzada per unitat de volum de medi de reacció inferior a la

utilitzada en les reaccions a escala analítica ja que en principi aquest fet només allargaria el temps de reacció. Així es va iniciar la reacció addicionant 2g de papaïna immobilitzada sobre Celite.

Donat que aquesta reacció va evolucionar molt lentament es va haver d'addicionar enzim fresc per aconseguir la conversió dels substrats. Seguidament es va iniciar la reacció de síntesi del tripèptid, en aquest cas, però, la reacció no va avançar. Per aquest motiu es va analitzar el contingut d'aigua d'una mostra del medi de reacció, tal i com s'ha detallat en el capítol de materials i mètodes (§4.3.5.1). Els resultats obtinguts indicaven que hi havia: 3.66% (v/v) d'aigua en el medi; valor molt superior al 0.2% (v/v) al que s'havia determinat dur a terme la reacció i fins i tot a la saturació de l'acetat d'etil (3.3%).

Per resoldre aquest problema es va realitzar un seguit de proves amb la intenció de determinar quin factor o bé operació feia incrementar el contingut d'aigua del medi de reacció.

- En totes les proves, l'acetat d'etil utilitzat, era pràcticament anhidre i sempre estava guardat en una ampolla amb tamís molecular per tal de mantenir-lo en aquestes condicions. En primer lloc, es va comprovar que si es deixava un cert volum d'aquest dissolvent dins el reactor amb totes les entrades tancades, passades unes hores el contingut d'aigua també havia augmentat, de la mateixa manera que succeïa quan el reactor contenia el medi de reacció.
- Seguidament es va comprovar que després de rentar el reactor, assecar-lo amb calor –com es feia habitualment– no era suficient per eliminar l'aigua retinguda a la placa porosa. A partir d'aquest moment es va establir, abans de començar una reacció, connectar el reactor al buit i tot seguit fer-hi passar una certa quantitat d'acetat d'etil per acabar d'arrossegar l'aigua romanent.
- Després de prendre aquestes mesures, es va tornar a dipositar acetat d'etil, dins el reactor durant un cert temps. Així, es va poder comprovar que immediatament després d'haver-lo transvasat, el contingut d'aigua ja era de 0.5% i passades 24 hores: 0.59%. Per tant tot indicava que el problema de l'increment del contingut d'aigua només s'havia solucionat parcialment. Arribats en aquest punt, i vistes les proves que s'havien realitzat, es sospitava que el problema provenia del fet de transvasar l'acetat d'etil a l'ampolla on es preparava el medi i d'aquí al reactor. Per aquesta raó, es va comprovar experimentalment que el transvasament de l'acetat d'etil a un altre recipient incrementava el contingut d'aigua del dissolvent per contacte amb l'atmosfera, mentre que si aquesta operació es feia utilitzant una



xeringa/bomba, el contingut d'aigua de l'acetat d'etil un cop dins el reactor era de: 0.082-0.099%. Per tant, es va determinar que en els següents experiments es seguiria la següent metodologia: preparar i introduir el medi dins el reactor utilitzant una xeringa de vidre. A continuació mesurar el contingut d'aigua i addicionar només el percentatge de tampó restant per assolir un contingut total de 0.2% (v/v) d'aigua. A més a més, amb la mateixa finalitat de preservar el contingut d'aigua del medi constant –evitant l'entrada d'aire humit– es va determinar aplicar una sobrepressió de nitrogen durant el transcurs de les reaccions.

Aplicant les mesures operacionals descrites fins ara es van dur a terme les síntesis del di-, tri-, i pentapèptid utilitzant com a donador d'acil de la primera reacció Boc-Gly-OCam. En aquests casos, les anàlisis del contingut d'aigua de les tres reaccions indicaven que es mantenia el percentatge d'aigua al llarg dels tres experiments.

Tot i haver resolt el problema de l'augment del contingut d'aigua, l'evolució de la reacció del tripèptid no era satisfactòria, ja que part del substrat no reaccionava i la velocitat de reacció era molt lenta.

Analitzant el problema es va posar esment en el fet que en la reacció de síntesi del dipèptid es treballa amb un excés de donador d'acil (relació DA/Nu: 2/1). El donador d'acil és susceptible de ser hidrolitzat, donant lloc a un subproducte que acidifica el medi, de manera que el pH del microentorn de l'enzim pot ser molt inferior a l'òptim. A més, aquesta situació s'agreuja degut a que en cada experiment es mesurava la quantitat d'aigua del medi abans de començar la reacció i només s'addicionava la quantitat de tampó que faltava per assolir un 0.2% (v/v) d'aigua i també pel fet que per criteris econòmics, en els experiments realitzats a escala preparativa s'addicionava menys quantitat de preparació immobilitzada comparativament amb els d'escala analítica, de manera que la concentració efectiva d'àcid per gram de biocatalitzador encara resultava ser més elevada. Per aquestes raons, es creu que l'enzim no es trobava en les condicions òptimes per a dur a terme la biocatàlisi i en conseqüència les reaccions no evolucionaven com s'esperava.

Arribats en aquest punt de la investigació, es va determinar tornar a començar el procés de síntesi del pentapèptid utilitzant com a donador d'acil en la reacció del dipèptid Boc-Gly-OCam i prenent les següents mesures per intentar preservar el pH adequat al voltant de l'enzim.

- Incrementar la relació de preparació enzimàtica immobilitzada per ml de volum de reacció, de manera que sigui equivalent al de les reaccions a escala analítica.

- Incrementar la concentració del tampó.
- Addicionar una base orgànica (TEA) per a neutralitzar l'acidesa del medi de reacció.

En aquest experiment les reaccions van evolucionar més ràpidament i assolint bons rendiments.

#### 5.4.1.3 Comparació del procés de síntesi del pentapèptid utilitzant PhAc o Mand com a grups protectors dels donadors d'acil

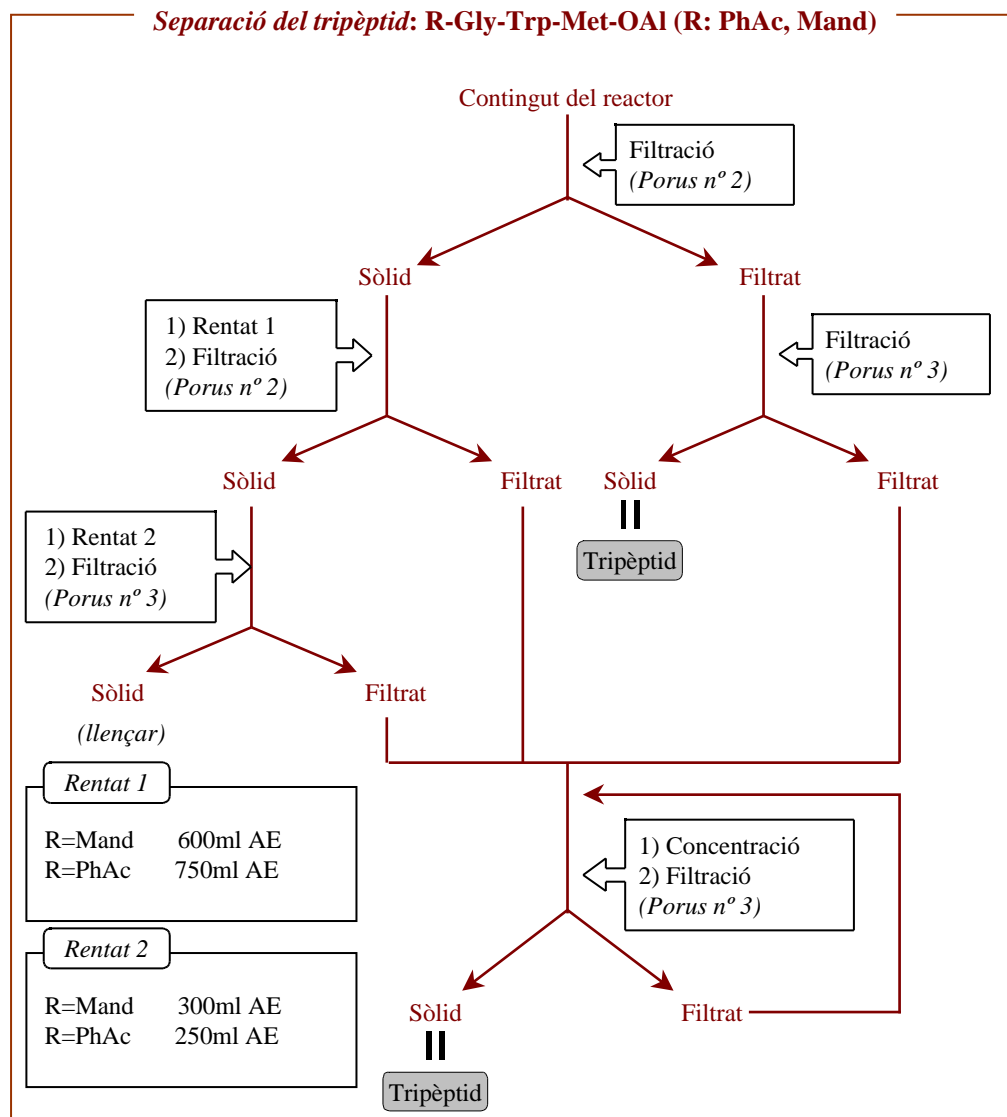
Així doncs, un cop solucionats els problemes operacionals, calia tornar a l'objectiu inicial que era l'avaluació i comparació del procés de síntesi del pentapèptid utilitzant com a grups N- protectors dels donadors d'acil: PhAc i Mand. Amb aquest objectiu, i aplicant les mesures que s'han descrit anteriorment per afavorir el bon funcionament de les reaccions, es va dur a terme la síntesi del pentapèptid: R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc o Mand). Per a iniciar aquest procés es va partir dels donadors d'acil PhAc-Gly-OCam i Mand-Gly-OBzl i del nucleòfil H-Trp-OBzl, amb una relació DA/Nu: 80/40 mM.

Cal assenyalar que en el cas de treballar amb el grup protector PhAc, donat que la reacció de síntesi del dipèptid es realitza amb acetat d'etil saturat i en la següent reacció amb 0.2% (v/v) de tampó, en acabar la primera reacció és necessari evaporar l'acetat d'etil saturat, assecar el sòlid al buit i tornar a resuspendre el dipèptid amb acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó, per a iniciar la reacció de síntesi del tripèptid.

En el cas de treballar amb el grup protector Mand, com que s'ha establert dur a terme totes les reaccions amb acetat d'etil amb un contingut de tampó de 0.2% (v/v), aquest pas intermedi d'evaporació del dissolvent no es realitza. Així, la comparació entre les vies de procés treballant amb els grups protectors PhAc o Mand és directa, excepte pel que fa a aquesta etapa d'evaporació, que d'altra banda no afecta al rendiment d'obtenció dels productes malgrat que sí repercuteix en una avaluació econòmica del procés.

En les reaccions de síntesi del tripèptid R-Gly-Trp-Met-OAl i del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc, Mand), es formaven unes suspensions sòlides a causa de la baixa solubilitat d'aquests productes en el medi de reacció tal i com ja s'ha comentat anteriorment en els mateixos experiments realitzats a escala analítica. Aquest fet suposava un avantatge ja que va permetre separar-los dels altres compostos mitjançant filtracions/extraccions.

Així el procés d'obtenció del tripèptid que es detalla a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, consistia en separar el medi de l'enzim aprofitant que la suspensió sòlida passava per un filtre amb mida de porus número 2, mentre que la preparació immobilitzada no. En segon lloc, el medi filtrat (més el rentat de l'enzim també filtrat) es passava per un filtre de mida de porus número 3 que permetia separar el tripèptid (suspensió sòlida) dels altres components del medi que quedaven en el filtrat. Aquest filtrat però, també contenia una certa quantitat de tripèptid solubilitzat (que venia donada pel producte de solubilitat del tripèptid en el dissolvent). Per tal de millorar el rendiment de purificació, es concentrava aquest filtrat –provocant d'aquesta manera la insolubilització del tripèptid– i es tornava a filtrar. Aquest procés es va repetir diverses vegades al mateix temps que es prenen mostres de les diferents fraccions per tal de conèixer la puresa del producte que s'extreia en cada etapa i si encara en quedava en el filtrat.



*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Separació del tripèptid R-Gly-Trp-Met-OAl (R:PhAc, Mand).*

A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenten els cromatogrames corresponents al tripèptid abans i després d'èsser purificat i un dels filtrats obtinguts en el procés de purificació respectivament.

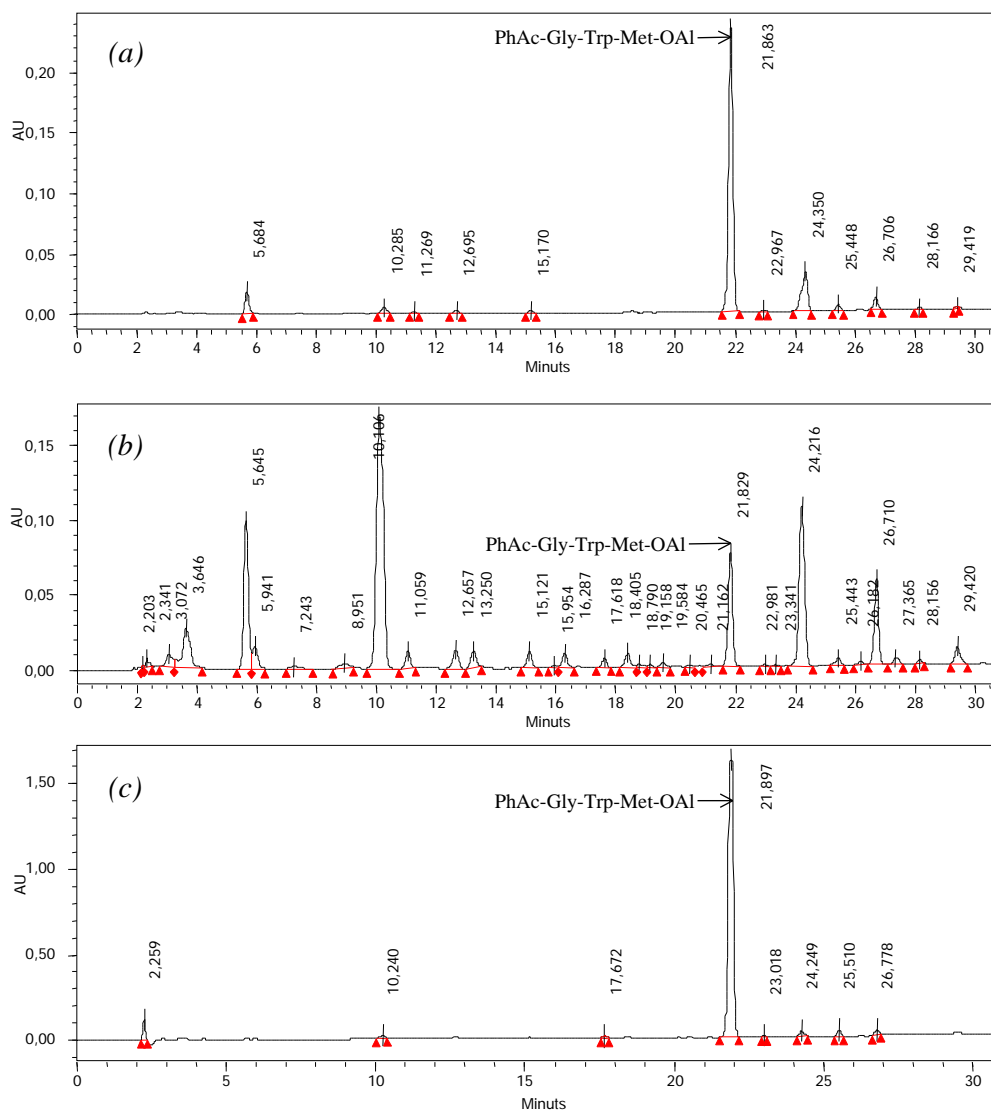


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del tripèptid PhAc-Gly-Trp-Met-OAl. En els cromatogrames (a) i (c) es pot observar el tripèptid abans i després d'èsser purificat respectivament. El cromatograma (b) correspon a una mostra d'un dels filtrats obtinguts al llarg del procés de purificació del tripèptid.

Respecte a l'experiment de síntesi del pentapèptid, un cop acabada la reacció, per tal de separar el medi de l'enzim es va seguir el mateix procediment que pel tripèptid. Així es va dipositar el contingut del reactor en un filtre de placa porosa (mida de porus nº 2) i es va realitzar una filtració. En aquest cas però la major part del pentapèptid es va quedar retingut a la placa porosa junt amb l'enzim, obturant el filtre. Per tant es va creure que hauria estat més efectiu fer una primera separació del

contingut del reactor per decantació. Finalment doncs, la purificació del pentapèptid protegit amb els grups PhAc i Mand, es va realitzar segons els procediments que es detallen a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. i Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. respectivament.

En primer lloc –com s’ha esmentat– es va decantar el contingut del reactor, obtenint-se el medi en bona part separat del sòlid (preparació immobilitzada). El sòlid es va rentar amb acetat d’etil per extreure els productes adsorbits, com es feia habitualment. D’altra banda, per acabar d’extreure la preparació immobilitzada que quedava en el medi de reacció, es va addicionar acetat d’etil fins a solubilitzar el producte i després es va filtrar. A continuació es van ajuntar els filtrats i la següent etapa a realitzar era la separació del pentapèptid de la resta de compostos, mitjançant extraccions líquides. Donat que el volum del filtrat era molt gran –i per tant poc operatiu per a realitzar extraccions– es va concentrar fins a 500 ml. Després de realitzar aquesta operació es va detectar la presència d’una emulsió blanca que es va separar per filtració. El filtrat que es va obtenir contenia el pentapèptid i altres subproductes. Mitjançant extraccions es va separar el pentapèptid de la resta de compostos. D’altra banda el sòlid que va quedar en el filtre –treballant amb el grup protector Mand– només contenia subproductes. En canvi utilitzant el grup PhAc, aquest sòlid corresponia a una mescla de subproductes i pentapèptid. En aquest últim cas el producte va ésser separat realitzant rentats amb àcid cítric/bicarbonat i posteriorment filtrant. La diferent composició observada d’aquest sòlid en funció del grup protector emprat indica que la naturalesa d’aquest grup confereix diferent solubilitat al pentapèptid.

A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenten dos cromatogrames on es pot observar el pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> abans i després de ser purificat.

A la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenten els rendiments obtinguts en cada reacció del procés de síntesi del pentapèptid i també el rendiment de separació per aquests dos grups protectors (PhAc i Mand).

Així, s’observa que el rendiment de la reacció de síntesi del dipèptid és molt elevat amb els dos grups protectors, tot i que treballant amb el grup Mand és lleugerament inferior. En l’etapa de separació, s’assoleix un rendiment del 100% en els dos casos, ja que es tracta únicament de separar el medi de reacció de l’enzim i evaporar en el cas del grup PhAc.

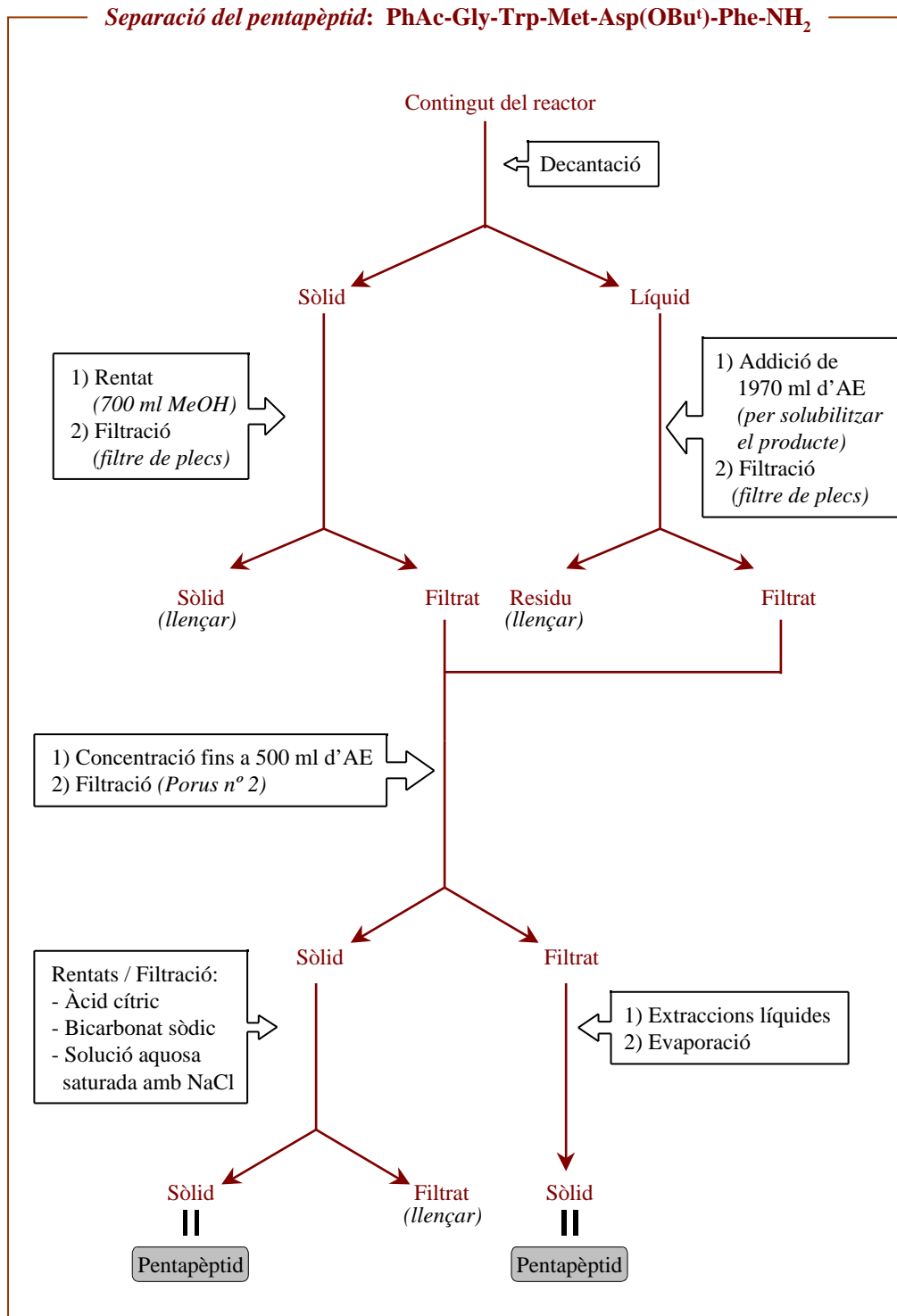


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Separació del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>.

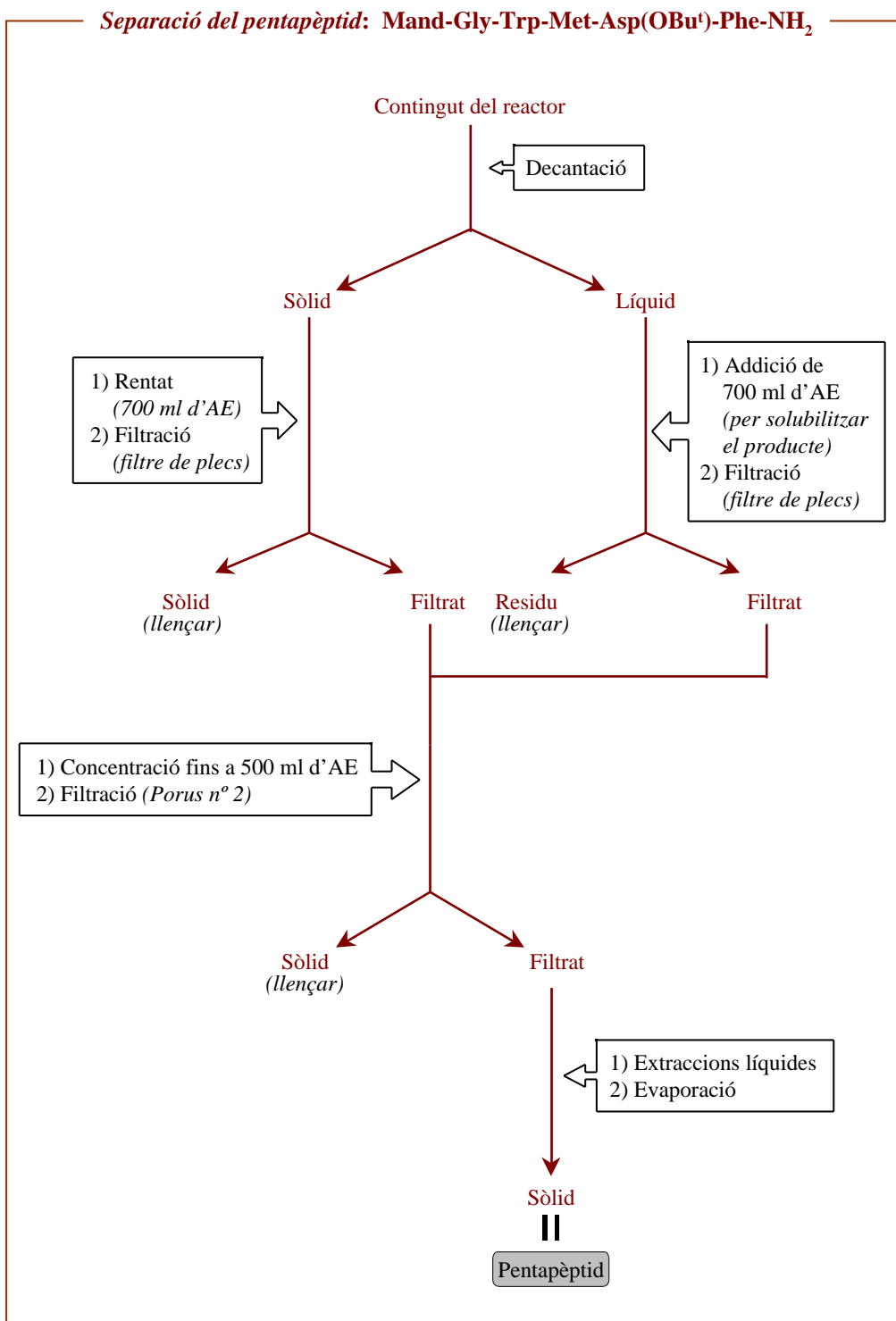


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Separació del pentapèptid Mand-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>.



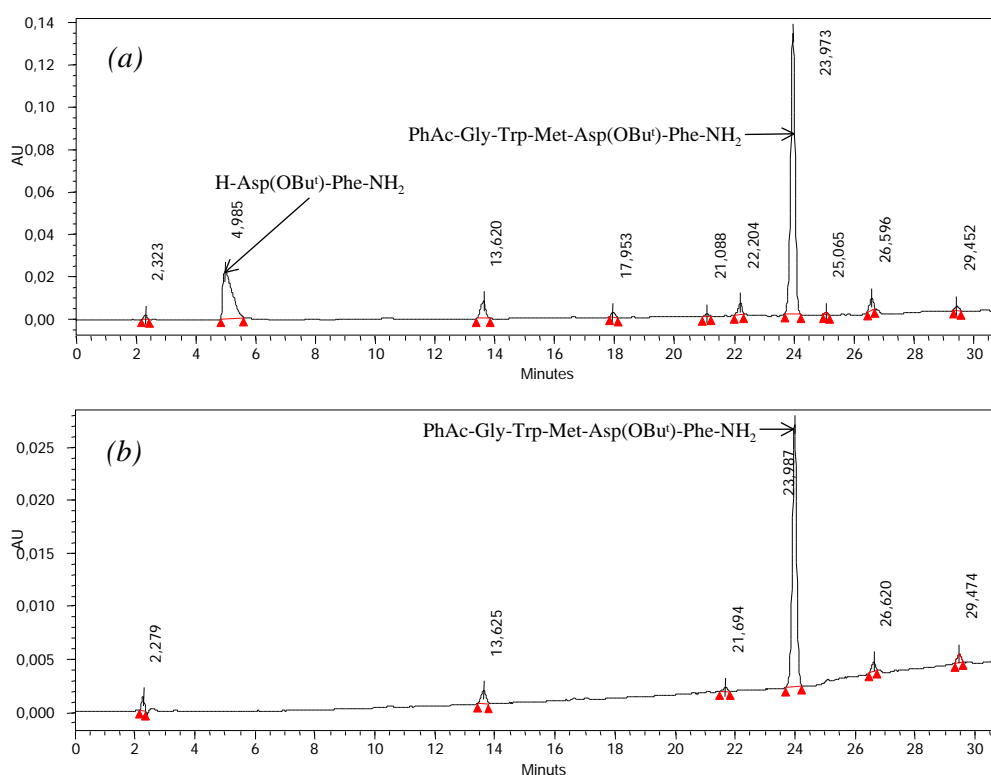


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>. En els cromatogrames (a) i (b) es mostra el pentapèptid abans i després d'èsser purificat respectivament.

Grup protector	Rendiment (%)				
	Dipèptid		Tripèptid		Pentapèptid
	r	s	r	s	r+s
PhAc	100	100	78	96	55
Mand	86	100	78	71	40

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments obtinguts en les reaccions de síntesi (r) i separació (s) dels productes R-Gly-Trp-OBzl, R-Gly-Trp-Met-OAl i R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: Mand o PhAc).

En la reacció de síntesi del tripèptid s'obtenen els mateixos rendiments (78%) pels grups PhAc i Mand, aquest fet indica que la naturalesa del grup - protector del donador d'acil no afecta a la reactivitat d'aquest substrat en aquesta reacció. En el procés de separació dels tripèptids PhAc-Gly-Trp-Met-OAl i Mand-Gly-Trp-Met-

OAI, malgrat que es realitza el mateix procediment en els dos casos, s'obté un rendiment inferior quan es treballa amb el grup protector Mand.

Cal destacar que en la reacció de síntesi del pentapèptid el rendiment de reacció i separació es presenten conjuntament degut a que el pentapèptid és molt insoluble en el medi de reacció i per tant els valors de les àrees dels cromatogrames corresponents no són fiables per a avaluar els rendiments de síntesi de producte d'aquesta reacció. Per tant es calcula el rendiment global per pesada després de realitzar la separació. Aquest rendiment també és més elevat quan es treballa amb el grup protector PhAc que amb el Mand, però no es pot determinar si aquesta diferència entre els dos grups és deguda a l'etapa de reacció, separació o ambdues.

### **Desprotecció del pentapèptid**

Després de realitzar la síntesi i separació del pentapèptid: R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc, Mand), calia eliminar enzimàticament el grup N-protector de la molècula i posteriorment avaluar globalment el procés, amb els dos grups N- protectors utilitzats: PhAc i Mand.

Com ja s'ha esmentat a §5.1.3, malgrat les variables modificades al llarg dels diferents experiments realitzats, per intentar desplaçar al màxim la posició de l'equilibri en favor de la desprotecció, no s'havien obtingut resultats gaire satisfactoris. Per aquesta raó, es feia necessari trobar una solució de procés que permetés augmentar l'avanç de la reacció de desprotecció perquè així el procés de síntesi del pentapèptid en conjunt fos viable.

L'estratègia que es va proposar, consisteix en realitzar la desprotecció del pentapèptid –treballant en les condicions òptimes trobades a partir de l'estudi de §5.1.3– separar el pentapèptid protegit del desprotegit i tornar a començar el procés de desprotecció amb el pentapèptid que no s'hagi desprotegit en la primera etapa.

Cal assenyalar, que l'etapa de separació és senzilla de realitzar perquè el fet que una molècula estigui protegida i l'altre no, els hi confereix una solubilitat molt diferent. D'aquesta manera el pentapèptid protegit es separava del desprotegit mitjançant extraccions líquides, posteriorment s'evaporava el dissolvent que contenia el pentapèptid protegit i es tornava a iniciar una segona etapa de desprotecció similar a la primera. Seguint aquest procediment, en la primera etapa de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> es va obtenir un 48% de rendiment, determinat per pesada. Seguidament es va realitzar una segona etapa i es va

assolir un rendiment global del 78%, tal i com es pot veure a partir de la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**

De la mateixa manera es va iniciar una primera etapa de desprotecció del pentapèptid Mand-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> en la que només es va obtenir un 6% de rendiment. Aquest valor tan baix, indica que treballant amb el grup protector Mand, la posició de l'equilibri és molt més desfavorable que pel grup protector PhAc amb el que es va obtenir un 48% de rendiment, treballant en les mateixes condicions. Per tant, a la vista d'aquests resultats no es va creure interessant realitzar una segona etapa de desprotecció del pentapèptid protegit amb el grup Mand.

Arribats en aquest punt de la investigació ja es podia avaluar globalment el procés del pentapèptid. A la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es presenten els rendiments del procés de síntesi del pentapèptid, els de desprotecció i els globals (síntesi + desprotecció) obtinguts amb els dos grups protectors.

Grup protector	Rendiment del pentapèptid (%)		
	Procés de síntesi	Desprotecció	Global
PhAc	41	78	32
Mand	19	6*	1*

\*: Es va realitzar una sola etapa de desprotecció del pentapèptid

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments assolits en el procés de síntesi, desprotecció i global del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc, Mand).*

Així malgrat que hi ha una notable diferència en els rendiments del procés de síntesi entre els dos grups protectors emprats (41% i 19% amb PhAc i Mand respectivament), cal assenyalar que la reacció de desprotecció és l'etapa en que s'obté una diferència de rendiment més gran entre els dos grups (tenint present que amb el grup Mand només es va realitzar una sola etapa de desprotecció del pentapèptid). D'aquesta forma globalment el procés de síntesi amb el grup PhAc, s'assoleix amb un valor bastant més elevat que amb el grup Mand (32% i 1%) respectivament.

Malgrat que l'ús del grup PhAc comporta una etapa d'evaporació addicional que disminuiria la rendibilitat econòmica del procés, com s'ha pogut comprovar, la seva viabilitat és molt superior a la via corresponent al grup Mand. Per tant a la vista d'aquests resultats, s'infereix que el grup PhAc resulta més adequat per dur a terme el

procés de síntesi del pentapèptid. A la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es presenta l'esquema del procés que es proposa per a l'obtenció del pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> utilitzant el grup N- protector PhAc.

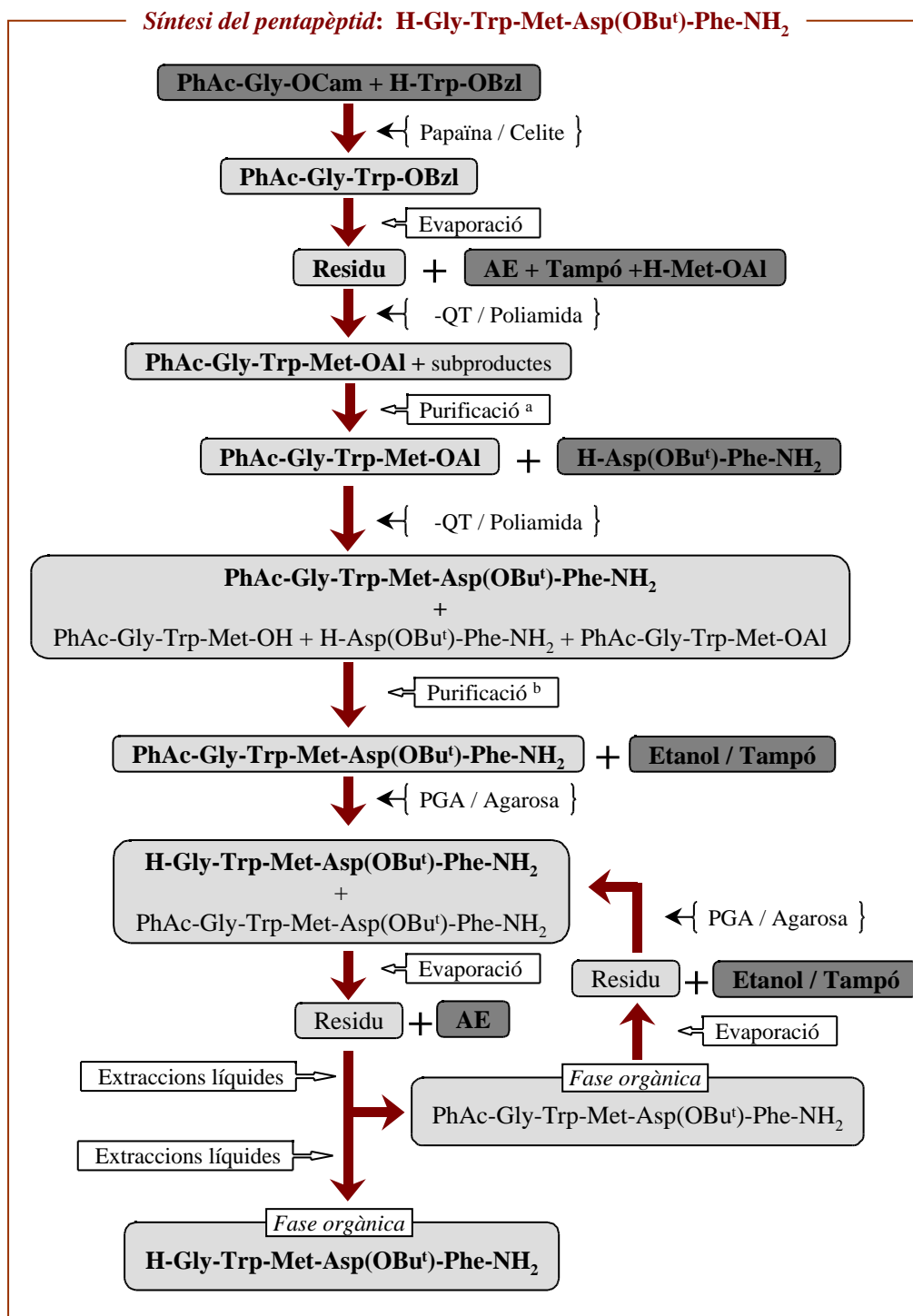


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (utilitzant el grup N-protector PhAc. a: vegi's Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.. b: vegi's figura Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

#### 5.4.1.4 Comparació i discussió dels resultats obtinguts en el present treball amb els obtinguts en l'estudi previ

A continuació es presenta la comparació i discussió dels resultats obtinguts aplicant el nou esquema de procés per a la síntesi del pentapèptid (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), utilitzant el grup N- protector PhAc, respecte els de l'esquema seguit en els treballs previs (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), emprant el grup protector Z.

Així, a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es mostren els rendiments obtinguts en els processos de síntesi del dipèptid, tripèptid i pentapèptid (els quals engloben els rendiments de reacció, separació, purificació o altres etapes intermèdies que hagin sigut necessàries per a obtenir la molècula corresponent). A més, també es presenten els rendiments de desprotecció del grup N- protector i el global per a cada esquema, treballant amb els grups protectors: Z i PhAc.

Grup protector	Rendiment (%)				
	Procés Dipèptid	Procés Tripèptid	Procés Pentapèptid	Desprotecció	Global
Z	81	52	39	100	17
PhAc	100	75	55	78	32

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Comparació dels rendiments assolits en cada etapa fins a l'obtenció de *H-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>* i *H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>*, treballant amb els grup N- $\alpha$  protectors Z i PhAc respectivament, a escala preparativa.

Els rendiments de reacció de síntesi del dipèptid assolits són: 98% i 100% amb els grups protectors: Z i PhAc respectivament. D'altra banda, els rendiments del procés del dipèptid, tal i com es pot observar a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. són: 81% i 100% respectivament pels mateixos grups protectors. D'aquests valors destaca doncs, que amb el nou esquema, un cop sintetitzat el dipèptid, l'única etapa intermèdia que es realitza és l'evaporació del dissolvent, per aquest motiu el rendiment de procés és el mateix que el de reacció. En canvi seguint l'esquema dels estudis previs (Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.), un cop sintetitzat el dipèptid, es van dur a terme un seguit d'etapes intermèdies que es resumeixen en: extraccions líquides, hidròlisi de l'ester carboxiterminal del propi dipèptid (Z-Gly-Trp-OMe) i introducció de l'ester

carboxamidometílic que li confereix una reactivitat més alta. Totes aquestes modificacions, fetes per millorar el rendiment de reacció de la síntesi posterior, compliquen el procés i comporten per tant que el rendiment global (81%) sigui bastant inferior al de la reacció de síntesi (98%).

El rendiment de síntesi del tripèptid assolit utilitzant com a donador d'acil Z-Gly-Trp-OCam és lleugerament inferior (67%) respecte al valor obtingut treballant amb el donador d'acil PhAc-Gly-Trp-OBzl (78%). A partir de l'esquema seguit en els estudis previs, un cop sintetitzat el Z-Gly-Trp-Met-OAl es realitzava una purificació mitjançant una cromatografia flash, obtenint així un rendiment de procés del tripèptid del 52%. En canvi, en l'esquema actual un cop sintetitzat el tripèptid PhAc-Gly-Trp-Met-OAl, el procés de separació es realitza simplement filtrant, de manera que s'obté un rendiment global de procés de tripèptid del 75%.

Respecte a la reacció de síntesi del pentapèptid, a partir de l'esquema dels estudis previs (Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**) s'obtenia un rendiment de reacció del 76%. Tot seguit es realitzava la desprotecció química de l'ester tert-butílic que protegeix l'àcid aspàrtic, una precipitació del producte, l'eliminació química del grup Z i una purificació del pentapèptid per HPLC. El rendiment d'aquestes dues reaccions de desprotecció va ser del 100% i el de les purificacions (precipitació + purificació per HPLC) del 51%. Per tant, el procés global de síntesi, desprotecció i purificació del pentapèptid s'assolia amb un rendiment global del 39%. Malgrat haver obtingut un rendiment de desprotecció del grup Z del 100%, cal tenir present que aquesta etapa es va realitzar amb àcid fluorhídric en unes instal·lacions especials i per tant no és factible a nivell de procés.

Aplicant l'esquema actual (amb el grup protector PhAc, Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**), la síntesi, separació i desprotecció del pentapèptid es va realitzar amb un rendiment final del 43%. Cal assenyalar que aquest valor no és directament comparable amb el 39% esmentat anteriorment ja que no es va realitzar la desprotecció de l'ester tert-butílic. Aquesta desprotecció es va determinar que es realitzaria un cop sintetitzat l'octapèptid per tal de desprotegir els dos esters tert-butílics d'aquesta molècula en una sola etapa.

Com a conclusió, s'extreu que el procés que es planteja en el nou esquema és més senzill i ecològic ja que la purificació del producte es realitza "in situ", mitjançant filtracions/extraccions, aprofitant la baixa solubilitat del producte en el dissolvent i d'altra banda la desprotecció enzimàtica és més suau que l'eliminació química del grup Z.

Globalment, a partir de l'esquema seguit en els treballs previs, s'havia obtingut el pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> amb un rendiment del 17% i una puresa del 99.8%. En canvi aplicant l'esquema actual es va sintetitzar el pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> amb un 32% de rendiment. En aquest cas es va obtenir un producte menys pur, però donat que aquest pentapèptid s'havia d'utilitzar com a nucleòfil en la reacció de síntesi de l'octapèptid, es va considerar més adient realitzar la purificació per HPLC en cas necessari, un cop sintetitzat l'octapèptid.

D'aquests resultats s'extreu com a conclusió que la síntesi del pentapèptid seguint l'esquema actual, amb el grup N- protector PhAc, suposa una alternativa viable i amb avantatges.

### 5.4.2 Procés de síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8 (1-3)

Tal i com s'ha esmentat a §5.2.4 –on es comparen les diferents vies de síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8 (Asp-Tyr-Met)– es va determinar dur a terme l'ensamblatge d'aquesta molècula a escala preparativa seguint l'estratègia de síntesi (Asp+Tyr)+Met i utilitzant com a grup protector del donador d'acil el grup PhAc. A continuació es detallen els experiments realitzats per a l'obtenció del dipèptid Asp-Tyr i posteriorment del tripèptid Asp-Tyr-Met a escala de grams.

#### 5.4.2.1 Síntesi de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl

La síntesi del dipèptid Asp-Tyr a escala preparativa, es va realitzar a partir de les condicions trobades en l'estudi realitzat a escala analítica. Per tant, com a donador d'acil es va utilitzar PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i com a nucleòfil H-Tyr-OAl amb una relació 80/40 mM respectivament. El dissolvent emprat era acetat d'etil i es va addicionar la quantitat de tampó necessària per obtenir un contingut total de 0.2% (v/v) d'aigua en el medi de reacció.

Donat que el volum del medi de reacció d'aquest experiment era de 290 ml, no es va poder treballar amb el reactor que s'ha descrit anteriorment pel procés de síntesi del pentapèptid. Així doncs, es va utilitzar un reactor de vidre, esfèric, amb tres deflectors i 500 ml de capacitat.

En el transcurs de la reacció, va arribar un moment en que es va detectar mitjançant les anàlisis cromatogràfiques corresponents, que l'àrea de dipèptid començava a disminuir i com a conseqüència el quocient: àrea de dipèptid/àrea de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OAl també decreixia, si es comparava amb el de les mostres



extretes anteriorment. Donat que encara quedava nucleòfil en el medi sense reaccionar, es va interpretar que la velocitat de síntesi del subproducte PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OAl, en aquell moment ja era major que la de síntesi del dipèptid i per tant es va determinar aturar la reacció, filtrant l'enzim. Seguidament, amb la intenció de recuperar la major quantitat possible de producte es va rentar l'enzim amb acetat d'etil.

A continuació no es va separar el PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam ja que aquest substrat no interaccionava si l'acoblament de la H-Met-OAl es fes amb -QT, però si que fou necessari extreure el nucleòfil H-Tyr-OAl que havia quedat romanent en el medi, per a evitar que donés molècules amb varis residus de tirosina. Amb aquesta finalitat es van realitzar extraccions líquides, de manera que finalment, després d'evaporar el dissolvent, es va obtenir un sòlid que contenia: PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl, PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OAl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam (substrat que s'havia addicionat en excés a l'iniciar la reacció). El rendiment global de síntesi del dipèptid i separació del nucleòfil H-Tyr-OAl va ser del 62%.

Paral·lelament a l'experimentació que s'està detallant, es duia a terme l'estudi de síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl a escala analítica, que s'ha presentat a §5.2.2.2.2. Donat que finalment es va veure que era més convenient sintetitzar l'enllaç Asp-Tyr + Met amb papaina, calia continuar el procés del dipèptid extraient el PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam, ja que en cas contrari aquest compost podria actuar com a substrat i reaccionar amb H-Met-OAl en la següent reacció de síntesi del tripèptid.

Una manera simple d'aconseguir aquesta separació era hidrolitzant l'ester carboxi-terminal (Cam) d'aquest substrat mitjançant l'addició d'una solució de carbonat sòdic (veure materials i mètodes, §4.3.1.4). Un cop acabada aquesta reacció, es va separar el substrat hidrolitzat (PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH) del dipèptid mitjançant extraccions líquides. El rendiment d'aquest procés (hidròlisi de l'ester carboxamidomètilic i la seva extracció) va ser del 65%. Donat que el rendiment de la reacció d'hidròlisi de l'ester Cam era pràcticament del 100%, és obvi que la disminució del rendiment global d'aquesta etapa va ser deguda al procés de separació del producte hidrolitzat; per tant seria convenient optimitzar el procés d'extracció.

Analitzant de forma global les diferents etapes realitzades, es dedueix que la seqüència seguida (conseqüència de la intersecció en el temps dels dos estudis) no és la més adequada. Per tant, l'estratègia de procés que es proposa consisteix en realitzar la síntesi del dipèptid, la hidròlisi de l'ester Cam del PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OCam i extraccions líquides per extreure conjuntament el PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH i el nucleòfil

H-Tyr-OAl, de manera que segurament així el rendiment del procés de purificació seria superior.

#### 5.4.2.2 Síntesi de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl

Tal i com s'ha esmentat a §5.2.2.2.2, en realitzar l'estudi de síntesi d'aquest tripèptid a escala analítica, el rendiment de la reacció era moderat ja que aquesta no avançava malgrat que restaven substrats sense reaccionar en el medi. Aquest fet, es va creure que era degut a que es produïa una desactivació de l'enzim i en aquest cas es va considerar que l'addició d'enzim nou, prèvia filtració del que ja s'havia utilitzat, podia ser una solució de procés. En contrapartida hi havia el fet que el cost del biocatalitzador –papaïna– utilitzat habitualment al llarg del treball és molt elevat. Per aquest motiu es va creure convenient provar el mateix enzim d'una altra firma comercial, que té un preu més assequible tot i que la seva puresa no és tan elevada. Així, es va comprovar experimentalment que amb aquest nou enzim s'obtenia un perfil de reacció similar al de la papaïna utilitzada habitualment i per tant és el que es va fer servir en la síntesi del tripèptid a escala preparativa.

A continuació es detalla l'experiment realitzat per a obtenir el tripèptid N-terminal de la CCK-8 (Asp-Tyr-Met) a escala de grams, treballant amb les condicions òptimes trobades a partir de l'estudi presentat a §5.2.2.2.2.

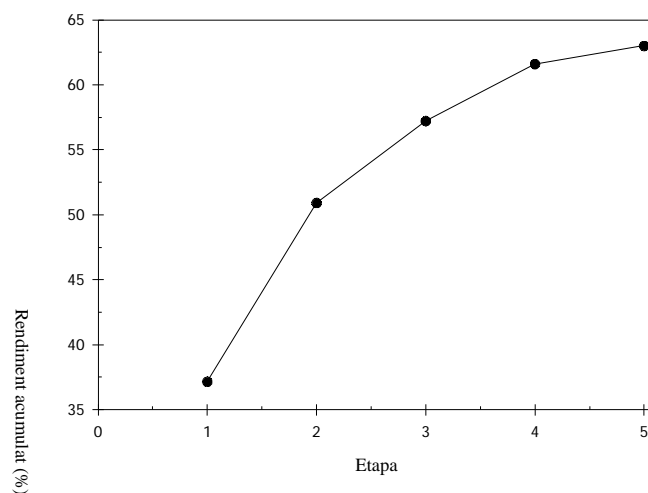
Es va utilitzar com a substrats, el donador d'acil PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl i el nucleòfil H-Met-OAl, amb una relació molar 1/4 (26.9/107.6 mM) respectivament i com a dissolvent acetat d'etil. La reacció es va dur a terme en el mateix reactor que es va emprar per a la síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl. Després de transvasar el medi de reacció en el reactor, es va addicionar el contingut de tampó necessari per assolir un contingut d'aigua total de 0.2% (v/v). Per iniciar la reacció es va addicionar papaïna immobilitzada sobre Celite.

En conjunt es van realitzar cinc etapes de síntesi del tripèptid, amb addició d'enzim nou a cadascuna d'elles. Entre les diferents etapes, per no perdre substrats i producte que estaven adsorbits en l'enzim, es rentava el biocatalitzador i com a conseqüència s'incrementava el volum del medi de reacció.

A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es recullen els rendiments acumulatius assolits en acabar cada una de les etapes.

Malgrat que seguint aquesta estratègia va augmentar el rendiment de la reacció des d'un 37% fins a un 63%, sembla que no es donava un problema de desactivació de

l'enzim, ja que en tal cas en cada etapa de síntesi s'hauria d'obtenir un increment en el rendiment similar.



*Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Perfil del rendiment acumulat en les diverses etapes de síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl.*

A la vista d'aquests resultats, es va sospitar que hi havia una inhibició pel producte i que en cada nova etapa, el fet de diluir el producte permetia avançar més la reacció. Per tant, com a solució de procés, es va proposar extreure el producte abans d'iniciar una etapa de síntesi. En concret, la separació del tripèptid del medi de reacció es va realitzar precipitant aquest compost en acetat d'etil/hexà, al mateix temps que s'anava filtrant la mescla de dissolvents que contenia els subproductes i els substrats de la reacció dissolts. El rendiment obtingut en aquesta etapa va ser del 86% i es va aconseguir un producte amb una puresa del 76%.

A la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es presenten dos cromatogrames corresponents al tripèptid, abans i després d'ésser purificat respectivament.

A la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**a es detecta el subproducte PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OAl (que prové de la reacció anterior de síntesi del dipèptid), el dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl i el tripèptid. A banda (tot i que no absorbeix a la longitud d'ona de l'anàlisi i per tant no es pot veure en el

cromatograma), també hi ha el nucleòfil H-Met-OAl ja que la reacció es va realitzar amb excés d'aquest substrat. Per tant, l'eliminació simultània d'aquests subproductes també era necessària de cara a la continuació del procés, o sigui per la subseqüent obtenció de l'octapèptid. En cas contrari es podrien obtenir com a subproductes de la reacció de síntesi de l'octapèptid: l'heptapèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> i l'octapèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> entre d'altres. Tot i així els subproductes que es van eliminar fonamentalment amb aquesta purificació van ser: H-Met-OAl i PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl mentre que la major part de PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Tyr-OAl no es va separar del tripèptid, tal i com es pot observar en el cromatograma de la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.b.

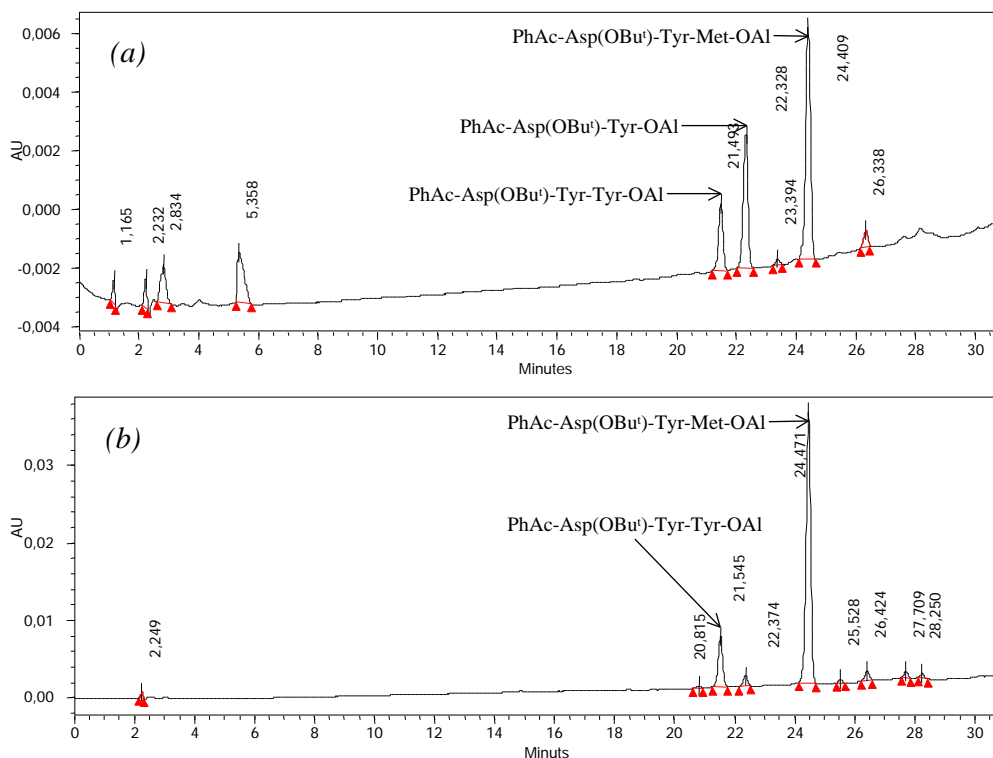


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl. En els cromatogrames (a) i (b) es mostra el tripèptid abans i després d'èsser purificat respectivament.

Donat que el líquid filtrat obtingut a partir del procés de separació del tripèptid contenia bastant dipèptid, es va optar per tornar a engegar una altra etapa de síntesi del tripèptid afegint el nucleòfil (H-Met-OAl) necessari per restaurar la relació donador d'acil/nucleòfil inicial (1/4). En aquesta reacció es va assolir un rendiment del

27%. Aquest valor demostra que el fet d'haver extret la major part de tripèptid del medi va permetre tornar a incrementar el rendiment de la reacció, ja que no es va produir inhibició pel producte. D'aquesta manera el rendiment total de síntesi del tripèptid, si es tenen en compte les cinc etapes anteriors i aquesta última, és del 71%. Per tant, el rendiment global de tot el procés (síntesi+separació) del tripèptid és del 61%.

Conseqüentment aquests resultats corroboren que resulta més adequat precipitar i separar el producte de la reacció després de cada etapa de síntesi. D'aquesta manera, amb un número inferior d'etapes, es podria assolir un rendiment igual o superior i al mateix temps també es disminuiria el consum d'enzim.

Com a resum, a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es mostra de forma conjunta els rendiments obtinguts en les diverses etapes que s'han realitzat des de que es va iniciar la síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-OAl fins a l'obtenció del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl purificat.

<i>Etapa</i>	<i>Rendiment (%)</i>
Síntesi dipèptid + separació	62
Extracció ester Cam	65
Síntesi tripèptid	71
Separació tripèptid	86
Procés global (dipèptid i tripèptid)	24

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments assolits en les diferents etapes que condueixen a l'obtenció del tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl a escala preparativa.*

Analitzant aquests resultats, s'infereix que els rendiments es podrien incrementar, donat que la separació del nucleòfil H-Tyr-OAl un cop sintetitzat el dipèptid no és necessària, perquè es pot realitzar conjuntament amb l'extracció del PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH (després d'hidrolitzar l'ester Cam). L'altra etapa que també es podria millorar seria la síntesi del tripèptid, extraient el producte més d'una vegada tal i com ja s'ha comentat anteriorment.

També s'extreu com a conclusió global que, malgrat el treball realitzat per optimitzar la reacció de síntesi del tripèptid Asp-Tyr-Met variant: grups protectors, esters carboxiterminals dels substrats, enzims, sistemes de reacció, etc. (§5.2),

l'increment més notable en el rendiment s'ha produït amb les aproximacions de procés.

Un cop fet aquest estudi doncs, l'esquema de síntesi que es proposa pel tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-Met-OAl, es pot veure a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

### 5.4.3 Síntesi de l'octapèptid PhAc-CCK-8 a escala preparativa

La síntesi de l'octapèptid C-terminal de la colecistoquinina (PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>) a escala preparativa, es va realitzar treballant amb les condicions de reacció òptimes que es van trobar a partir de l'estudi de §5.3.1. Així doncs, es va utilitzar com a donador d'acil el tripèptid PhAc-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Tyr-Met-OAl i, com a nucleòfil el pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> amb una relació: 2.44/1 (23.44/9.6 mM) respectivament. El dissolvent emprat era acetoni-tril, amb 0.5% (v/v) de TEA i es va addicionar la quantitat necessària de tampó per assolir un contingut total d'aigua de 0.5% (v/v). El biocatalitzador utilitzat era -QT immobilitzada sobre poliamida.

Quan es va detectar que la reacció ja no avançava més, es va aturar, filtrant el medi de reacció i es va rentar l'enzim amb metanol, per extreure el producte que podia estar adsorbit.

A partir de les anàlisis cromatogràfiques corresponents, es va calcular que el rendiment de síntesi de producte d'aquesta reacció era del 82%, valor molt similar al que s'havia obtingut prèviament al realitzar l'estudi a escala analítica (81%). Seguidament es va realitzar la separació de l'octapèptid de la resta de subproductes i substrats presents en el medi de reacció mitjançant un procés de precipitació/filtració amb metanol, assolint un rendiment del 72% i un producte amb una puresa del 82.4% (estimada cromatogràficament). A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es mostra un cromatograma on es pot observar l'octapèptid un cop purificat.

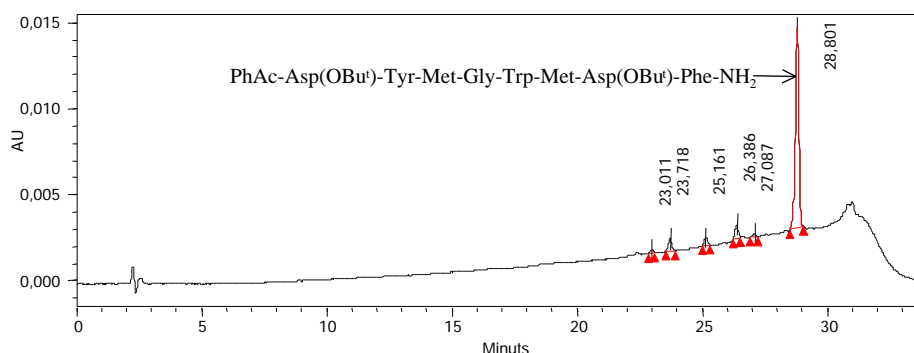


Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Síntesi de l'octapèptid PhAc-Asp(OBu')-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu')-Phe-NH<sub>2</sub>. En el cromatograma es pot apreciar el pic que correspon a l'octapèptid un cop purificat.

Així doncs, el rendiment global de síntesi i separació de l'octapèptid va ser del 59%. A continuació per obtenir la PhAc-CCK-8, era necessari realitzar les modificacions que s'han descrit a §5.3.2, o sigui l'eliminació dels esters tert-butílics que protegeixen els residus d'àcid aspàrtic i la sulfatació de la tirosina. Aquests processos es van dur a terme, assolint-se uns rendiments del 79 i 100% respectivament. A la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es troben recollits els rendiments de cada etapa realitzada per a obtenir la PhAc-CCK-8 i a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es mostra esquemàticament aquest procés. Es proposa com a objecte de treballs posteriors, realitzar la desprotecció de la PhAc-CCK-8 seguint la mateixa metodologia utilitzada en la desprotecció del pentapèptid.

<i>Etapa</i>	<i>Rendiment (%)</i>
Síntesi octapèptid	82
Separació octapèptid	72
Síntesi + separació	59
Extracció grups tert-butil	79
Sulfatació tirosina	100
Procés global	47

Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Rendiments assolits en les diferents etapes realitzades per a l'obtenció de PhAc-Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>.

Així doncs, per concloure el capítol de resultats i discussió, l'esquema global per a l'obtenció de la PhAc-CCK-8 és el que es presenta a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**



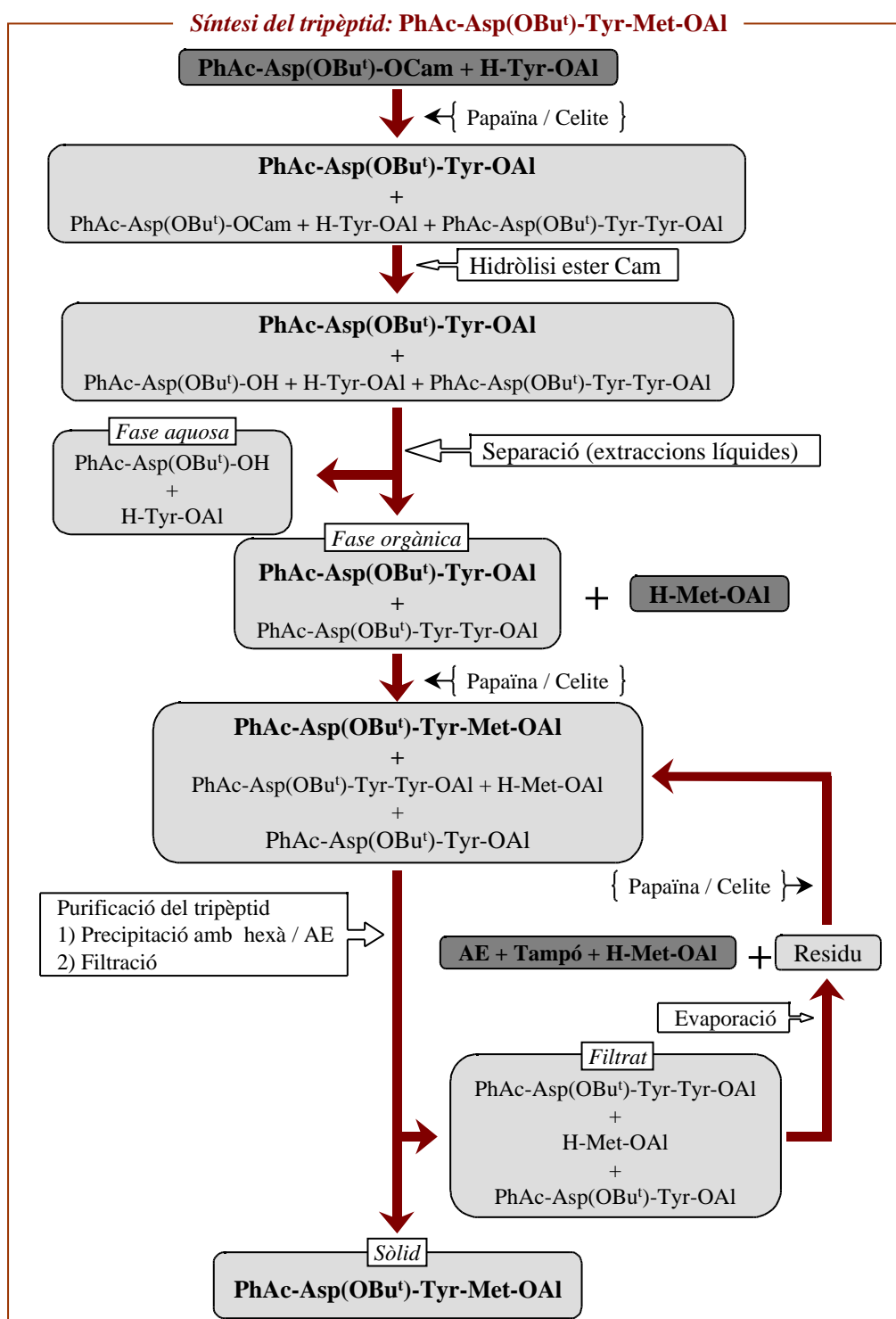


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi del tripèptid  
PhAc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-OAl.

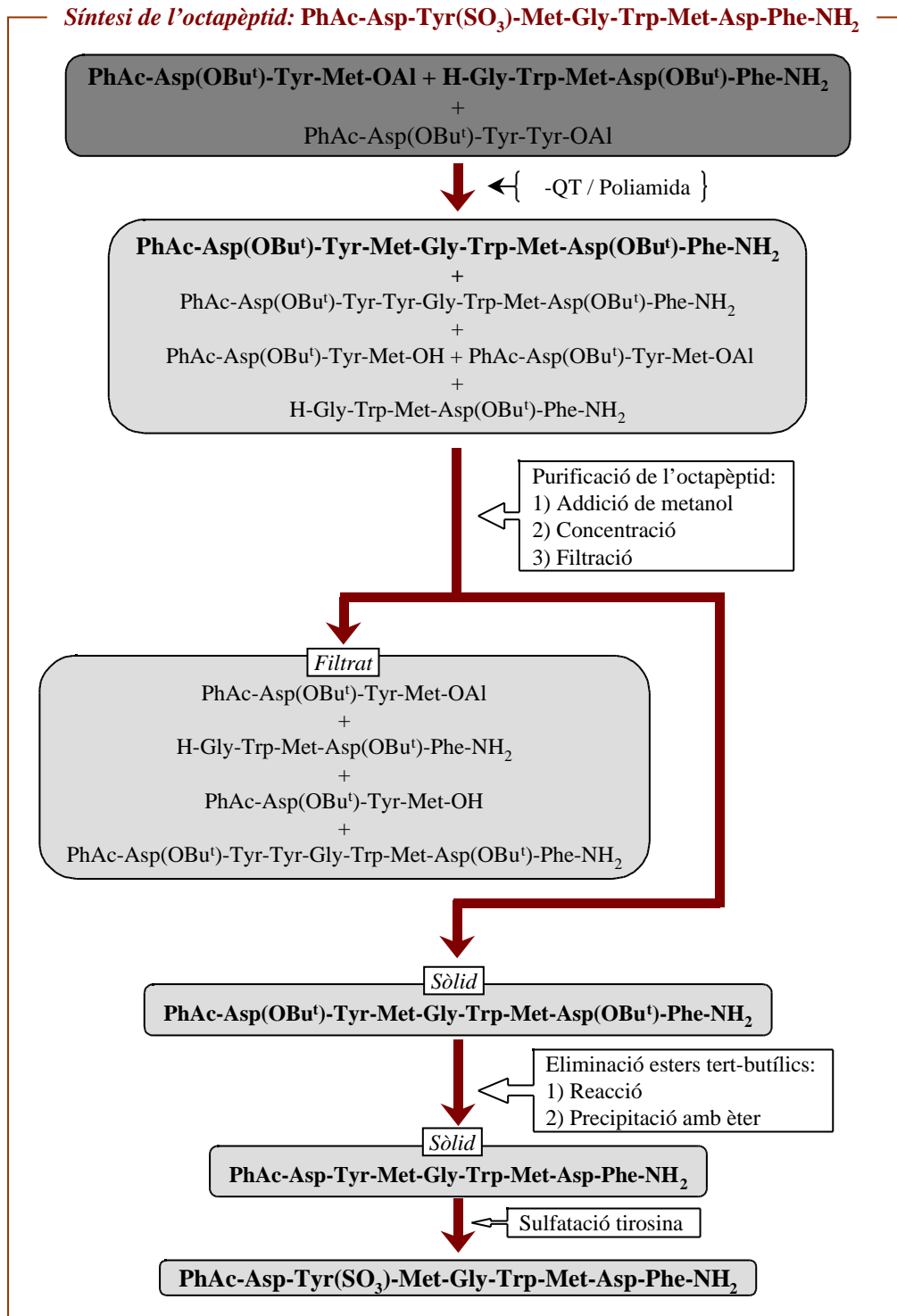
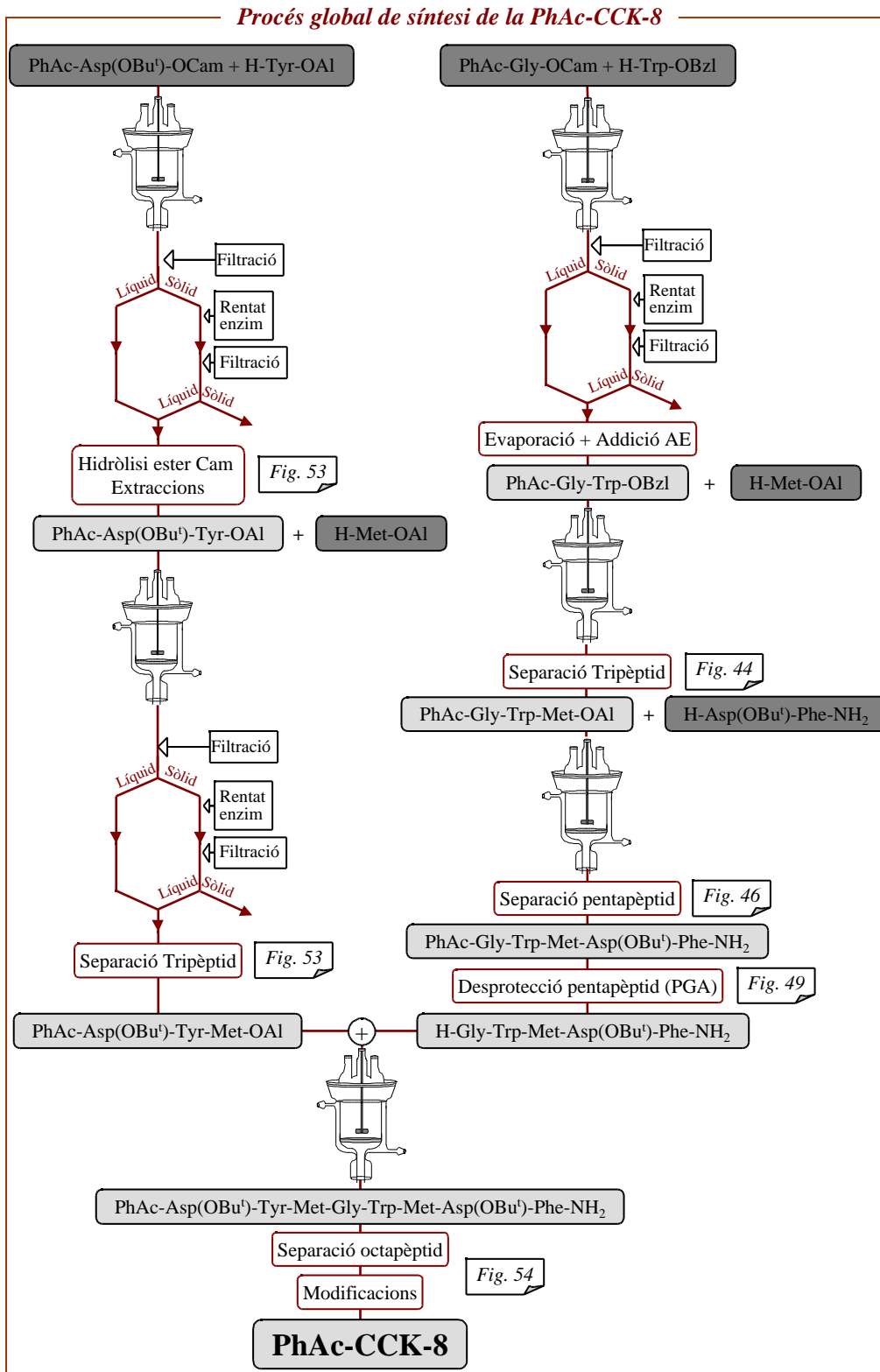


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Síntesi de l'octapèptid PhAc-Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>.



---

*Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema global de síntesi de la PhAc-CCK-8.*

## Capítol 6 Conclusions

En la present tesi s'ha desenvolupat un procés per a la síntesi enzimàtica de la PhAc-CCK-8. Com a conclusions del treball es pot destacar:

- ↪ En aquest procés s'ha aconseguit minimitzar el nombre d'etapes intermèdies i s'han simplificat o evitat les purificacions, al mateix temps que s'han optimitzat els rendiments de reacció.
- ↪ En la major part d'etapes del procés s'han utilitzat dissolvents/reactius respectuosos amb el medi ambient.
- ↪ S'ha aconseguit un procés susceptible al canvi d'escala.
- ↪ S'ha demostrat que la penicil·lina G acilasa immobilitzada per enllaç covalent multipuntual és un potent catalitzador per a la N-protecció amb els grups PhAc i Mand de diferents derivats d'aminoàcids amb l'extrem carboxiterminal esterificat. Utilitzant aquesta metodologia s'han obtingut rendiments (>72%) en la N-protecció dels derivats que no contenen grups carboxil lliures, utilitzant sistemes de reacció bifàsics, sota control termodinàmic de la reacció. La millor estratègia per a la N-protecció de derivats de l'àcid aspàrtic amb el grup -carboxil lliure ha estat un sistema monofàsic, sota control cinètic, obtenint-se rendiments de 50-60%.
- ↪ S'ha comprovat l'alta reactivitat dels derivats PhAc-Gly-OCam i Mand-Gly-OBzl en la reacció de síntesi del dipèptid Gly-Trp (4-5) de la CCK-8 –amb papaïna–, assolint-se rendiments superiors al 80%.
- ↪ S'han investigat i comparat les dues estratègies de síntesi possibles del tripèptid Asp-Tyr-Met i se n'han extret les següents conclusions:

**(Asp+Tyr)+Met:** Per sintetitzar el dipèptid Asp-Tyr –utilitzant Fmoc com a grup N-protector del derivat d'aspàrtic i termolisina com a biocatalitzador– s'ha fet ús de sistemes de reacció sòlid-sòlid, assolint un rendiment màxim de síntesi de dipèptid del 75%. Així mateix s'ha comprovat la viabilitat del canvi d'escala d'aquesta reacció en aquestes condicions.

S'ha constatat que l'acoblament Asp-Tyr+Met, a partir del derivat d'aspàrtic protegit amb el grup Fmoc no resulta efectiu. Això és deu a que la H-Met-OEt

actua com a nucleòfil en l'eliminació del grup Fmoc, fet que comporta l'aparició de molts subproductes en el medi de reacció.

S'ha constatat que quan l'acoblament Asp-Tyr + Met es realitza amb el derivat aspàrtic protegit amb el grup PhAc i utilitzant -QT com a catalitzador s'assoleix un rendiment màxim moderat, però a banda es presenta l'inconvenient que es formen molts subproductes amb més d'un residu de metionina. La utilització de papaïna en comptes de -QT en aquesta reacció condueix a rendiments de síntesi similars però amb l'avantatge que no es produeix la formació d'aquests subproductes.

**Asp+(Tyr+Met):** La síntesi i purificació del dipèptid Tyr-Met s'ha assolit amb un rendiment del 86%, utilitzant el grup N- protector Boc i -QT com a biocatalitzador.

S'ha dut a terme l'acoblament Asp + Tyr-Met utilitzant el derivat d'aspàrtic protegit amb el grup PhAc o Fmoc. La formació de molts subproductes en ambdós casos fa que es desestimi la via Asp+(Tyr+Met) per a la síntesi del tripèptid.

D'aquest estudi s'infereix que l'estratègia de síntesi més adequada per l'esmentat tripèptid és (Asp+Tyr)+Met, utilitzant PhAc com a grup N-protector i papaïna com a biocatalitzador per ambdues reaccions.

- ↳ S'ha plantejat un nou esquema per a la síntesi del pentapèptid amb una finalitat de procés i se n'ha comprovat la viabilitat a escala analítica.
- ↳ En les diferents etapes de síntesi/separació que condueixen a l'obtenció del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (on R: PhAc, Mand), s'han obtingut rendiments superiors utilitzant el grup protector PhAc. De totes maneres on es fan paleses les diferències més grans entre aquests dos grups protectors és en la reacció de desprotecció del pentapèptid.
- ↳ L'estudi de diferents factors en la reacció de desprotecció enzimàtica del grup PhAc del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>1</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, ha posat de manifest que l'equilibri de la reacció està poc desplaçat en la direcció de desprotecció. Aquesta dificultat s'ha resolt realitzant diverses etapes de desprotecció.
- ↳ En la síntesi del tripèptid Asp-Tyr-Met s'ha comprovat que no s'obtenen rendiments elevats degut a que es produeix inhibició pel producte. Com a solució

de procés s'estableix purificar el tripèptid (per precipitació) i tornar a iniciar la reacció a partir del dipèptid romanent.

- ↪ S'han obtingut rendiments de síntesi d'octapèptid del 81% utilitzant acetonitril com a dissolvent, mentre que amb la resta de dissolvents assajats aquesta síntesi és pràcticament nul·la.
- ↪ S'ha aconseguit introduir les modificacions necessàries en l'octapèptid per tal d'obtenir la PhAc-CCK-8.





# Apèndix A Nomenclatura

## A.1 Derivats comercials

### *Bachem (Bubendorf, Switzerland)*

Fmoc-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH (B-1065)  
Fmoc-Asp-OH (B-2485)  
H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH (E-1410)  
H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OMe.HCl (E-1420)  
H-Asp(OBzl)-OBzl.p-tosilat (E-1430)  
H-Asp(OMe)-OMe.HCl (E-1440)  
H-Asp-OBzl (E-1400)  
H-Asp-OMe (E-2880)  
H-Gly-OBzl.HCl (E-1970)  
H-Gly-OMe.HCl (E-2000)  
H-Met-OEt.HCl (E-2110)  
H-Phe-NH<sub>2</sub> (E-2235)  
H-Trp-OBzl.HCl (E-2390)  
H-Tyr-OBzl.p-tosilat (E-2530)  
Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH (C-1355)

### *Sigma (St. Louis, MO)*

H-Met-OMe.HCl (M-0376)  
H-Tyr-OMe.HCl (T-5004)  
D(-) àcid mandèlic (M-2500)

### *NovaBiochem (Switzerland)*

H-Met-OAl.p-tosilat (04-12-5253)  
H-Tyr-OAl.p-tosilat (04-12-5252)

### *Fluka (Buchs, Switzerland)*

Àcid fenilacètic (78490)

## A.2 Derivats sintetitzats al laboratori

PhAc-Gly-OMe  
PhAc-Gly-OBzl  
Mand-Gly-OBzl  
PhAc-Met-OMe  
PhAc-Asp-OMe

PhAc-Gly-OH  
PhAc-Gly-OCam  
Boc-Gly-OCam  
Z-Gly-OCam  
Z-Gly-Trp-OBzl

PhAc-Asp-OBzl	Boc-Gly-Trp-OBzl
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OMe	PhAc-Gly-Trp-OBzl
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	Mand-Gly-Trp-OBzl
PhAc-Asp(OMe)-OMe	PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-OMe
Mand-Gly-Trp-Met-OAl	PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-OAl
H-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub>	PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-Met-OAl
PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub>	PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OH
Mand-Gly-OMe	Fmoc-Asp-Tyr-OBzl
Mand-Gly-OH	Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-OBzl
Fmoc-Asp-Tyr-OMe	Boc-Gly-Trp-OBzl
Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-OMe	PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-OBzl
PhAc-Gly-Trp-Met-OAl	H-Tyr-Met-OAl
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OCam	Mand-Gly-Trp-Met-OEt
Boc-Tyr-Met-OAl	Fmoc-Asp-Tyr-Met-OEt
PhAc-Gly-Trp-Met-OEt	PhAc-Asp-Tyr-OMe
H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub>	PhAc-Asp(OBzl)-Tyr-OMe
Fmoc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-Met-OEt	Mand-Gly-Trp-Met-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub>
PhAc-Asp(OMe)-Tyr-OMe	Z-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub>
PhAc-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub>	
PhAc-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	
PhAc-Asp-Tyr(SO <sub>3</sub> )-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	

## A.3 Simbologia

### A.3.1 Aminoàcids

<i>Asp</i>	Àcid aspàrtic	<i>Gly</i>	Glicina
<i>Met</i>	Metionina	<i>Phe</i>	Fenilalanina
<i>Trp</i>	Triptòfan	<i>Tyr</i>	Tirosina

### A.3.2 Grups protectors

<i>Ac</i>	Acetil	<i>Boc</i>	Tert-Butiloxicarbonil
<i>Bz</i>	Benzoil	<i>Mand</i>	Mandelil
<i>PhAc</i>	Fenilacetil	<i>Z o CBZ</i>	Benziloxicarbonil

### A.3.3 Esters

<i>OAl</i>	Al·lil ester	<i>OBu<sup>t</sup></i>	Tert-butil ester
<i>OBzl</i>	Benzil ester	<i>OCam</i>	Carboxamidometil ester
<i>OEt</i>	Etil ester	<i>OMe</i>	Metil ester

### A.3.4 General

<i>ACN</i>	Acetonitril
<i>AE</i>	Acetat d'etil
<i>Apc A</i>	Ampicil·lina acilasa
<i>Aq</i>	Aquafilicitat
<i>a<sub>w</sub></i>	Activitat de l'aigua
<i>Bu(OH)<sub>2</sub></i>	2,3-Butanodiol
<i>CCK</i>	Colecistoquinina
<i>Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></i>	Carbonat de cesi
<i>DA</i>	Donador d'acil
<i>DCM</i>	Diclorometà
<i>DMF</i>	Dimetilformamida
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfòxid
<i>EDTA</i>	Etilendiamintetracetat sòdic
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
<i>HPLC</i>	Cromatografia líquida d'alta resolució
<i>K</i>	Constant d'equilibri
<i>K<sub>sin</sub></i>	Constant de síntesi
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>mM</i>	Mil·limolar
<i>MOPS</i>	Àcid 3-morfolino-propasulfònic
<i>-NH<sub>2</sub></i>	Amida
<i>NIPAB</i>	Àcid 6-nitro-3-(fenilacetamido) benzoic
<i>N-TFAc</i>	N-trifluoracetil

---

<b><i>Nu</i></b>	Nucleòfil
<b><i>PAS</i></b>	Acetil sulfat de piridina
<b><i>PGA</i></b>	Penicil·lina G acilasa
<b><i>PVA</i></b>	Penicil·lina V acilasa
<b><i>r<sub>0</sub> hidròlisi</i></b>	Velocitat inicial d'hidròlisi
<b><i>r<sub>0</sub> síntesi</i></b>	Velocitat inicial de síntesi
<b><i>R<sub>R</sub></i></b>	Rendiment de reacció
<b><i>R<sub>T</sub></i></b>	Rendiment de reacció, desprotecció i purificació
<b><i>SO<sub>3</sub></i></b>	Sulfat
<b><i>T</i></b>	Tampó
<b><i>TEA</i></b>	Trietilamina
<b><i>TFA</i></b>	Àcid trifluoracètic
<b><i>Tris-HCl</i></b>	(hidroximetil)aminometà-clorhídric
<b><i>UI</i></b>	Unitats internacionals d'activitat enzimàtica (μmol/min)
<b><i>α-QT</i></b>	-Quimotripsina

## Apèndix B Càlcul de rendiments

En aquest apèndix es mostra com s'han avaluat els rendiments assolits en les diferents reaccions que s'han presentat al capítol de resultats i discussió.

A escala preparativa sempre s'han avaluat els rendiments per pesada. En canvi, a escala analítica –sempre que ha estat possible– s'han calculat mitjançant una relació d'àrees. Aquest sistema, però, no s'ha pogut aplicar quan:

1. Algun dels substrats o el producte no són solubles. En aquests casos s'ha utilitzat algun mètode indirecte per a estimar l'avanç de la reacció, per exemple a la reacció de desprotecció del pentapèptid (§5.1.3).
2. L'ester carboxiterminal del donador d'acil té absorbància, ja que en aquest cas les àrees no es conserven. En aquests casos, s'han realitzat calibratges.

A continuació es mostra la relació d'àrees i els calibratges efectuats.

### B.1 Relació d'àrees

El rendiment de producte és la concentració de producte obtingut dividit entre la concentració inicial de substrat limitant tenint en compte l'estequiometria de la reacció. Aquest valor es dóna habitualment en percentatge. Tenint en compte que el rendiment màxim és la concentració màxima de producte dividida per la concentració inicial de substrat limitant, si dividim el rendiment pel valor màxim tindriem la relació de concentració de producte dividida per la concentració de producte màxima. Aquesta raó es pot expressar en una relació d'àrees: àrea de producte/àrea de producte màxima ja que el factor multiplicatiu seria el mateix al numerador que al denominador i alhora l'àrea de producte màxima pot expressar-se en funció dels substrats (tenint en compte les proporcions). Així doncs el rendiment obeeix la següent equació:

$$R = \frac{A_p}{\delta_1 \frac{A_1}{n} + \delta_2 A_2} 100,$$

on

$A_p$  = Àrea de producte

$n$  = Excés inicial d'  $A_1$

$A_1$  = Àrea inicial del substrat en excés

$\delta_i = 1$ , si el substrat  $A_i$  té absorbència

$A_2$  = Àrea inicial de l'altre substrat

$0$ , si el substrat  $A_i$  no té absorbència

El terme  $n$  té en consideració si un dels substrats està en excés i els termes  $\delta_i$  indiquen si els substrats tenen absorbència o no.

## B.2 Calibratges

Les figures següents mostren la correlació entre àrea i concentració per diferents productes.

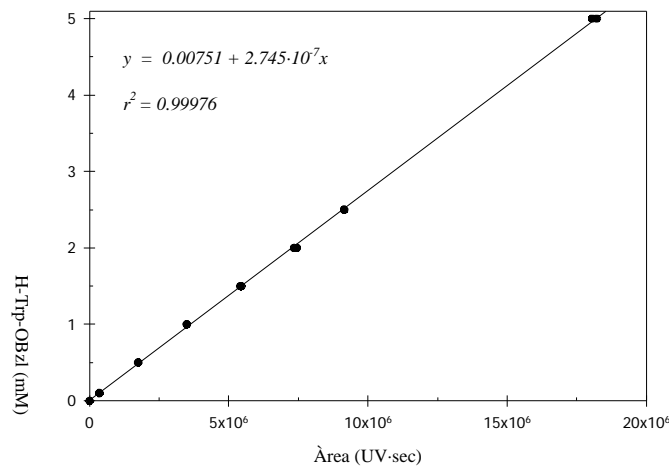


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Calibratge de H-Trp-OBzl.

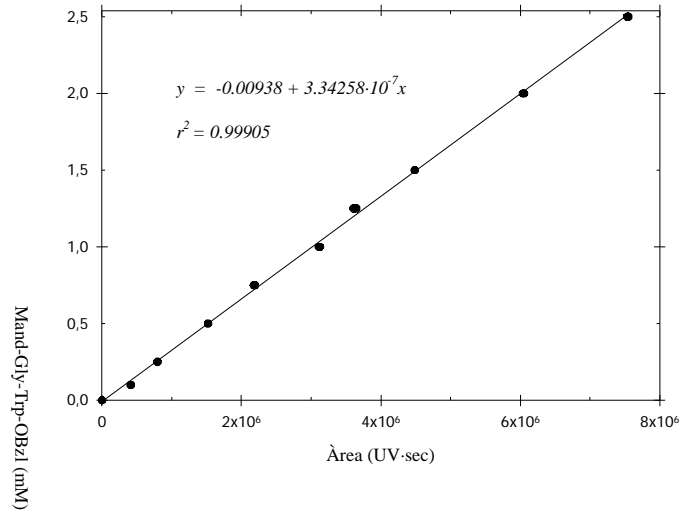


Figura *¡Error!Argumento de modificador desconocido.:* Calibratge del dipèptid Mand-Gly-Trp-OBzl.

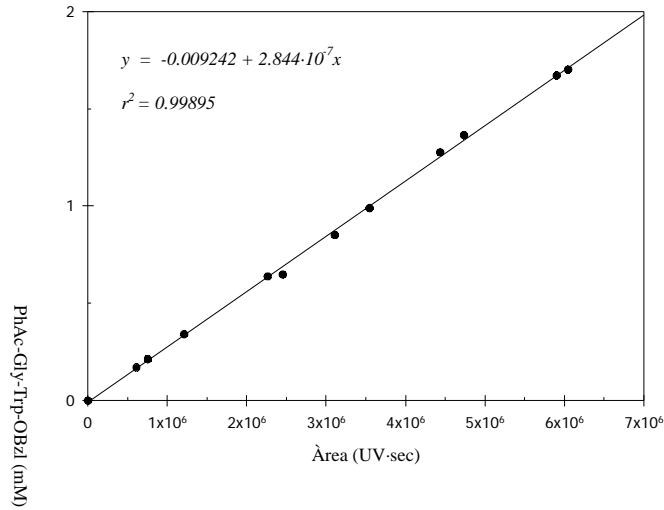


Figura *¡Error!Argumento de modificador desconocido.:* Calibratge del dipèptid PhAc-Gly-Trp-OBzl.

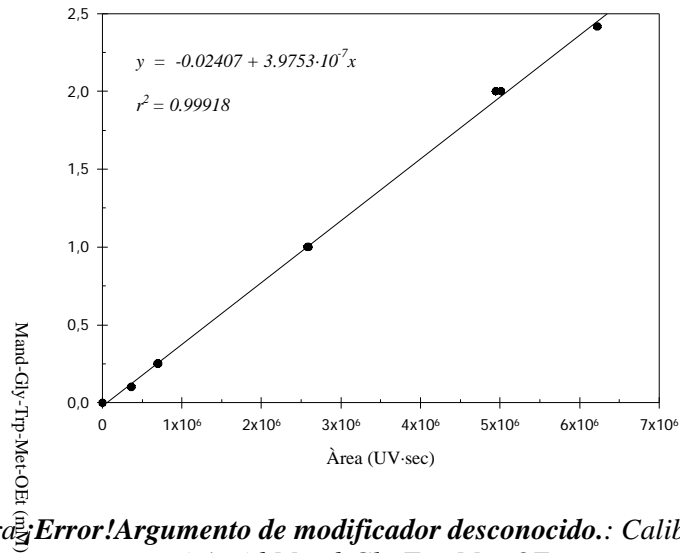


Figura 2 ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Calibratge del tripètid Mand-Gly-Trp-Met-OEt.

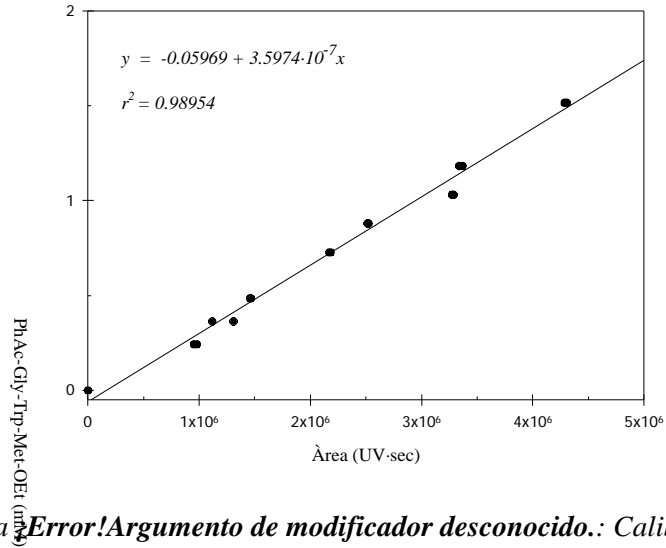
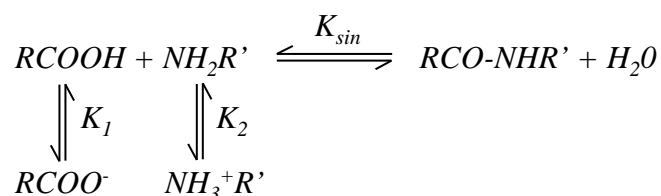


Figura 3 ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Calibratge del tripètid PhAc-Gly-Trp-Met-OEt.



## Apèndix C pH òptim en una reacció de síntesi de pèptids sota control termodinàmic

En una reacció de síntesi de pèptids el producte està completament protegit mentre que els substrats només ho estan parcialment i, per tant, els grups àcids i amino que participen en la formació de l'enllaç es troben en equilibri amb les seves formes iòniques. Així doncs, un esquema del procés global pot ser el següent:



amb

$$K_1 = \frac{[RCOO^-][H^+]}{[RCOOH]}, \quad (C.1)$$

$$K_2 = \frac{[NH_2R'][H^+]}{[NH_3^+R']}. \quad (C.2)$$

Essent  $K_1$  i  $K_2$  les constants de dissociació iònica dels reactants en tant que  $R$  i  $R'$  representen residus aminoacídics. Així doncs, la constant d'equilibri que ve donada pel quocient de les formes no iòniques (i per tant independent del pH) és la següent:

$$K_{sin} = \frac{[RCO-NHR'][H_2O]}{[RCOOH][NH_2R']}. \quad (C.3)$$

La constant d'equilibri global  $K'_{sin}$ , que té en compte tant les formes no ionitzades com les ionitzades (i per tant depenent del pH) obeeix al següent quocient:

$$K'_{sin} = \frac{[RCO-NHR'][H_2O]}{[RCOOH + RCOO^-][NH_2R'+NH_3^+R']}. \quad (C.4)$$

Introduint a l'equació (C.4) les equacions (C.1), (C.2) i (C.3) s'obté

$$K'_{sin} = \frac{K_{sin}}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} \quad 1 + \frac{[H^+]}{K_2}}. \quad (A.5)$$

La concentració de protons òptima, que hom dedueix de l'equació anterior, és

$$[H^+]_{opt} = \sqrt{K_1 K_2}. \quad (C.6)$$

La qual, en funció del pH és

$$pH_{opt} = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2). \quad (C.7)$$

Substituint (C.6) a (C.5) s'obté la constant d'equilibri corresponent al pH òptim:

$$K'_{sin / pH \text{ òptim}} = \frac{K_{sin}}{1 + \sqrt{\frac{K_1}{K_2}}}. \quad (C.8)$$

# Apèndix D Concentracions residuals de dissolvents permeses segons la FDA

## D.1 Introducció

En aquest apèndix es resumeixen les recomanacions de la FDA (Food and Drug Administration) del govern dels EUA sobre la presència residual de dissolvents en medicaments. El text íntegre de les recomanacions es pot consultar *on-line* a la pàgina web <http://www.fda.gov/cder/guidance/1907fnl.pdf>.

L'objectiu d'aquestes recomanacions és fixar quantitats residuals acceptables de dissolvents en productes farmacèutics per garantir la seguretat del pacient i recomanar l'ús de dissolvents poc tòxics en l'elaboració dels medicaments.

El document defineix un nou terme anomenat *Exposició Diària Permesa* (abreujadament PDE, de l'anglès *Permitted Daily Exposure*). Es defineix com la màxima administració diària de dissolvents residuals en productes farmacèutics.

Els dissolvents residuals tractats en el document foren avaluats segons el seu risc per a la salut i classificats segons es descriu en l'apartat següent.

## D.2 Classificació

### D.2.1 Dissolvents que han d'evitar-se (classe 1)

Els dissolvents de la classe 1 no han d'emprar-se en l'elaboració de principis actius o excipients a causa de la seva inacceptable toxicitat o pel dany que causen al medi ambient. No obstant això, si el seu ús és inevitable per a produir un medicament que suposi un avanç terapèutic significatiu, aleshores els seus nivells estan limitats a les concentracions recollides a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, a no ser que hi hagi una altra justificació.

<i>Dissolvent (Classe 1)</i>	<i>Concentració màxima (ppm)</i>	<i>Motiu</i>
Benzè	2	Cancerigen
Tetraclorur de carboni	4	Tòxic i perjudicial pel medi ambient
1,2-Dicloretà	5	Tòxic
1,1- Dicloretà	8	Tòxic
1,1,1-Tricloretà	1500	Perjudicial pel medi ambient

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Dissolvents de CLASSE 1 en productes farmacèutics (dissolvents que han d'evitar-se).*

### D.2.2 Dissolvents que han de limitar-se (classe 2)

Els dissolvents mostrats a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. han d'ésser evitats a causa de la seva toxicitat inherent.

<i>Dissolvent (classe 2)</i>	<i>PDE (mg/dia)</i>	<i>Concentració màxima (ppm)</i>
Acetonitril	4.1	410
Clorobenzè	3.6	360
Cloroform	0.6	60
Ciclohexà	38.8	3880
1,2-Diclorete	18.7	1870
Diclorometà	6.0	600
1,2-Dimetoxietà	1.0	100
N,N-Dimetilacetamida	10.9	1090
N,N-Dimetilformamida	8.8	880
1,4-Dioxà	3.8	380
2-Etoxietanol	1.6	160
Etilenglicol	6.2	620
Formamida	2.2	220
Hexà	2.9	290

(segueix)

(continuació)

<i>Dissolvent (classe 2)</i>	<i>PDE (mg/dia)</i>	<i>Concentració màxima (ppm)</i>
Metanol	30.0	3000
2-Metoxietanol	0.5	50
Metilbutil acetona	0.5	50
Metilciclohexà	11.8	1180
N-Metilpirrolidona	48.4	4840
Nitrometà	0.5	50
Piridina	2.0	200
Sulfolà	1.6	160
Tetralina	1.0	100
Toluè	8.9	890
1,1,2-Triclorete	0.8	80
Xilè (*)	21.7	2170

(\*) Usualment 60% de m-xilè, 14% de p-xilè, 9% d'o-xilè i 17% d'etil-benzè

*Taula ;Error!Argumento de modificador desconocido.: Dissolvents de CLASSE 2 en productes farmacèutics.*

Hi ha dues opcions per a situar els límits dels dissolvents de la classe 2:

- **Opció 1:** Hom pot usar les concentracions màximes en ppm de la ;Error!Argumento de modificador desconocido.. Han estat calculades usant l'equació següent, suposant que s'administren 10 grams diàriament:

$$\text{Concentració (ppm)} = \frac{1000 \times \text{PDE}}{\text{dosi}}$$

On la PDE es dona en mg/dia i la dosi en g/dia.

Si tots els excipients i principis actius del medicament tenen una presència residual de dissolvents menor que la concentració màxima i la dosi diària no supera els 10 grams, no cal fer càlculs addicionals. Altrament cal usar l'opció 2.

- **Opció 2:** Quan la presència del dissolvent en algun dels components del medicament superi la concentració màxima o la dosi diària superi els 10 grams cal sumar

la quantitat de dissolvent present en tots els principis actius i excipients en una dosi diària i comprovar que no superi la PDE.

### D.2.3 Dissolvents amb baixa toxicitat potencial (classe 3)

Els dissolvents de la classe 3 (mostrats a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.) són considerats menys tòxics i amb un risc menor per a la salut humana. No inclou dissolvents amb un risc conegut per a la salut humana en nivells farmacològicament acceptats. No obstant això, hom no disposa d'estudis a llarg termini sobre toxicitat o efectes cancerígens per a molts d'aquests dissolvents. Les dades de què disposem avui en dia indiquen que són poc tòxics en estudis a curt termini i que els assajos sobre la seva genotoxicitat donen resultats negatius.

Hom considera que es pot acceptar sense justificació quantitats residuals inferiors als 50 mg per dia (la qual cosa correspon a 5000 ppm o 0.5% usant l'opció 1). Quantitats superiors poden considerar-se acceptables si són realistes pel que fa a les capacitats de producció i a les bones tècniques de fabricació (GMP).

Àcid acètic	Heptà
Acetona	Acetat d'isobutil
Anisol	Acetat d'isopropil
1-Butanol	Acetat de metil
2-Butanol	3-Metil-1-butanol
Acetat de butil	Metiletil acetona
Tert-butil-metilèter	Metilisobutil acetona
Cumè	2-Metil-1-propanol
Dimetilsulfòxid	Pentà
Etanol	1-Pentanol
Acetat d'etil	1-Propanol
Etil èter	2-Propanol
Etil format	Acetat de propil
Àcid fòrmic	Tetrahidrofurà

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Dissolvents de CLASSE 3 que han de ser limitats per GMP o altres requisits basats en la qualitat. La PDE és de 50 mg/dia.*

### D.2.4 Dissolvents sense dades toxicològiques suficients

Els dissolvents recollits a la Taula **;***Error!Argumento de modificador desconocido.* són també d'interès per als fabricants d'excipients o medicaments. De totes maneres no es disposen de dades toxicològiques suficients amb les que elaborar una taula de PDEs. Els fabricants han de subministrar una justificació per a la presència d'aquests dissolvents en els seus productes farmacèutics.

1,1-Dietoxipropà	Metilisopropil acetona
1,1-Dimetoximetà	Metiltetrahidrofurà
2,2-Dimetoxipropà	Èter de petroli
Isooctà	Àcid tricloracètic
Isopropil èter	Àcid trifluoracètic

*Taula **;***Error!Argumento de modificador desconocido.*: Dissolvents sense dades toxicològiques suficients.*





# Bibliografia

## A

Adlercreutz P. (1991). *Eur. J. Biochem.* **199**: 609-614.

Adlercreutz P., Matiasson B. (1987). *Biocatalysis* **1**: 108-118.

Álvaro G., Fernández-Lafuente R., Blanco R.M., Guisán J.M. (1990). *Appl. Biochem. Biotech.* **26**: 181-195.

Auriol D., Paul F., Montsant P. (1990). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **613**: 201-206.

## B

Ballinger A., McLoughlin L., Medbak S., Clark M. (1995) *Clinical Sci.* **89**: 375-381.

Ballinger A.B., Clark M.L. (1994). *Metabolism* **43**: 735-738.

Bauer C.A. (1978). *Biochemistry* **17**: 375.

Bell G., Halling P.J., Moore B.D., Partridge J. Rees D.G. (1995). *TIBTECH* **13**: 468-473

Bergmann M, Fraenkel-Conrat H. (1938b). *J. Biol. Chem.* **124**: 1.

Bergmann M., Fruton J.S. (1937). *J. Biol. Chem.* **118**: 405.

Bergmann M., Fruton J.S. (1938a). *J. Biol. Chem.* **124**: 321.

Blackwood A.D., Curran L.J., Moore B.D., Halling P.J. (1994). *Biochim. Biophys. Acta* **1206**: 161-165.

Borsook H. (1953). *Adv. Prot. Chem.* **8**: 127.

Brady C., Metcalf L., Slaboszewsky D., Frank D. (1988). *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **65**: 917-921.

Brink L.E.S., Tramper J. (1985). *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1258.

Brink L.E.S., Tramper J., Luyben K.C.A.M., Vant Riet K. (1988).  
*J. Ind. Microbiol.* **29**, Suppl. 3: 171-177.

Brtnik F., Barth T., Jost K. (1981). *Collect. Czech. Chem. C.* **46**: 1983-1989.

**C**

Calam J., Bojarski J.C., Springer C.J. *et al.* (1987). *Br. J. Nutr.* **58**: 175-179.

Calvet S., Clapés P., Torres J.L., Valencia G., Feixas J., Adlercreutz P. (1993).  
*Biochim. Biophys. Acta* **11**: 189-196.

Calvet S., Clapés P., Vigo J.P., Xaus N., Jorba X., Mas R.M., Torres J.L., València G.,  
Serralheiro M.L., Cabral J.M.S., Empis J.M.A. (1992). *Biotech. Bioeng.* **39**: 539-549.

Calvet S., Torres J.L., Clapés P. (1996). *Biocatal. Biotrans.* **13**: 201-216.

Capellas M. (1997). *Optimització de la síntesi enzimàtica del pentapèptid C-terminal (CCK-5) de la colecistoquinina: H-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>*. Tesi doctoral, publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, 1997.

Capellas M., Benaiges M.D., Caminal G., González G., López-Santín J., Clapés P. (1996a). *Biocatal. Biotrans.* **13**: 165-178.

Capellas M., Benaiges M.D., Caminal G., González G., López-Santín J., Clapés P. (1996b). *Biotech. Bioeng.* **50**: 700-708.

Capellas M., Caminal G., González G., López-Santín J., Clapés P. (1997).  
*Biotech. Bioeng.* **56**: 456.

Carpenter F.H. (1960). *J. Am. Chem. Soc.* **82**: 1111-1122.

Cassells J.M., Halling P.J. (1988). *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 486-491.

Cerovsky V., Jost K. (1985). *Coll. Czech. Chem. Commun.* **50**: 878.

Chaiken I.M. (1981). *CRC Crit. Rev. Biochem.* **11**: 255-301

Clapés P., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1990a).  
Biotechnol. Appl. Biochem. **12**: 376-386.

Clapés P., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1990b). J. Biotechnol. **15**: 323-338.

Clapés P., Torres J.L., Adlercreutz P. (1995). Bioorg. Med. Chem. **3**: 245-255.

Cohen S.G., Torem B., Vaidya V. Ehret A. (1976). J. Biol. Chem. **10**: 4722-4728.

Cole M. (1964). Nature **203**: 519.

**D**

Delhom B., Álvaro G., Caminal G., Torres J.L., Clapés P. (1996).  
Biotech. Lett. **18**: 609-614.

Didziapetris R., Drabnig B., Schellenberg V., Jakubke H.D., \_vedas V. (1991)  
FEBS Lett. **287**: 31-33.

**E**

Erbeldinger M., Ni X., Halling P.J. (1998a). Biotech. Bioeng. **59**: 68-72.

Erbeldinger M., Ni X., Halling P.J. (1998b). Enzyme Microb. Technol.. **23**: 141-148.

Erbeldinger M., Ni X., Halling P.J. (1999). Biotech. Bioeng. **63**: 316.

**F**

Feder J., Garret L.R., Wildi B.S. (1971). Biochemistry **10**: 4552.

Fernández-Lafuente R., Rossell C.M., Guisán J.M. (1996).  
Biotechnol. Appl. Biochem. **24**: 139-143.

Fité M., Álvaro G., Clapés P., López-Santín J., Benaiges M.D., Caminal G. (1998)  
Enzyme Microb. Technol. **23**: 1-5.

Fité M., Capellas M., Benaiges M.D., Caminal G., Clapés P., Álvaro G. (1997)  
Biocatal. Biotransform. **14**: 317-332.

Fredenslund A., Jones R.L., Prausnitz J.M. (1975). AIChE Journal **21**: 1086-1098.

Fruton J.S., Meister A. (1982). *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **53**: 239.

Fuganti C., Grasselli P., Casati P. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**: 3191-3194.

**G**

Gaertner H., Watanabe T., Sinisterra J.V., Puigserver A. (1991). *J. Org. Chem.* **56**: 3149-3153.

Gill I., Vulfson N. (1993). *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 3348-3349.

Gill I., Vulfson N. (1994). *Trends Biotechnol.* **12**: 118-122.

Goderis H.L., Ampe G., Feyten M.P., Fowe B.L. Guffens W.M., Van Cauwenbergh S.M., Tobback P.P. (1987). *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 258-266.

Greenspan L. (1977). *J. Res. Nat. Bur. Stand. (U.S.)* **81A**: 89-96.

Greiner G., Hermann P. (1991). *Inc. Peptides 1990*. Eds. Giralt E. Andreu D. Leiden: ESCOM Science Publisher B.V.: 277-278.

Guibe-Jampel E., Rousseau G. (1987). *Tetrahedron Lett.* **28**: 3563-3568.

Guisán J.M. (1988). *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 375-382.

Guisán J.M., Bastida A., Cuesta C., Fernández-Lafuente R., Rosell C.M. (1991). *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1144-1152.

**H**

Haering G., Luisi P.L. Meussdoerffer F. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**: 911-915.

Halling P.J. (1994). *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 178-206.

Halling P.J., Eichhorn U., Kuhl P., Jakubke H.D. (1995). *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 601-606.

Han D., Rhee J.S. (1986). *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1250-1256.

Harper A.A., Raper H.S. (1943). *J. Physiol.* **102**: 115-125.

Harper A.A., Vass C.C.N. (1941). *J. Physiol.* **99**: 415-435.

Hill A.J., Peikin S.R., Ryan C.A., Blundell J.E. (1990). *Physiol. Behav.* **48**:241-246.

van't Hoff J.H. (1898). *Z. Anorg. Chem.* **18**: 1.

Holland D.R. Hausrath A.C., Juers B. Matthews B.W. (1994).

Homandberg G., Komoriya A., Chaiken J.M. (1981). *Biochemistry* **21**:3385.

**I**

Ikeda M. (1992). *Toxicol. Lett.* **64/65**: 191-201.

Iswa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. (1977). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **50**: 2766.

Ivy A.C., Oldberg E. (1928). *Am. J. Physiol* **86**: 599-613.

**J**

Jakubke H.D., Kuhl P. *et al.* (1985). *Angew. Chem. Int. Engl.* **24** (2): 85-93.

**K**

Kamphuis I.G., Kalk H., Swarte M.B.A., Drenth J. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**: 233.

Katsuura G., Hirota R., Itoh S. (1981). *Experientia* **37**: 60.

Kaur J., Wehtje E., Adlercreutz P., Chand S., Mattiasson B. (1997). *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 496-501.

Kennedy J.F., Cabral J.M.S. (1987). *Inc. Biotechnology*. Rehm H.J., Reed G. (Eds.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, **72**: 347-402.

Khan S.A., Halling P.J., Bell G. (1990). *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 453-458.

Khmelnitsky Y.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K. (1988). *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 710-721.

Kise H., Hayakawa A. (1991). *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 584-588.

Kissilieff H.R., Pi Sunyer F.X., Thornton J. *et al.* (1981).

- Am. J. Clin. Nutr. 34: 154-160.
- Kitaguchi H., Klibanov A.M. (1989). J. Am. Chem. Soc. **111**: 9272-9273.
- Klein J.U., Cerovsky V. (1996). Int. J. Peptide Protein Res. **47**: 348-352.
- Klibanov A.M. (1982). Adv. Appl. Microbiol. **29**: 1-28.
- Klibanov A.M. (1989). Trends Biochem. Sci. **14**: 141-144.
- Klibanov A.M. (1990). Acc. Chem. Res. **23**: 114-120.
- Kuhl P. Ute Z., Burekhardt H., Jakubke H.D. (1986). Monatsh. Chem. **117**: 1195-1204.
- Kuhl P., Eichhorn U., Jakubke H.D. (1992). Inc. *Biocatalysis in non-conventional media*. Ed. Tramper J. Elsevier P. Amsterdam: 513-518.
- Kuhl P., Eichhorn U., Jakubke H.D. (1995). Biotechnol. Bioeng. **45**: 276-278.
- Kuhl P., Halling P.J., Jakubke H.D. (1990). Tetrahedron Lett. **31**: 5213-5216.
- Kulkosky P.J., Holst W.E., Smith W.G., Dietze M.A. (1991). Bull. Psychonom. Soc. **29**: 441-444.
- Kullmann W. (1987). *Enzymatic Peptide Synthesis*. CRC Press Inc. Florida: 9:12.
- L**
- Latt S.A., Holmquist B., Valley B.L. (1969). Biochem. Biophys. Res. Comm. **37**: 333.
- Lee K.M., Biellmann J.F. (1986). Bioorg. Chem. **14**: 262-273.
- Lee T.H., Lee M.H. (1980). Fed. Proc. **39**: 1864, 1353a.
- Lin A.R. (1988). Inc. *Synthetic Peptides in Biotechnology*, 173-202.
- López-Fandiño R., Gill I., Vulfson E.N. (1994a). Biotechnol. Bioeng. **43**: 1016-1023.
- López-Fandiño R., Gill I., Vulfson E.N. (1994b). Biotechnol. Bioeng. **43**: 1024-1030.

Luisi P.L. *et al.* (1984). *Ann. NY Acad. Sci.* **434**: 549-557.

Lütti P., Luisi P.L. (1984). *J. Am. Chem. Soc.* **106**: 7285-7286.

**M**

Maleski A., Straus E, Yalow R.S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 597-599.

Martinek *et al.* (1982). *Science* **218**: 889-891.

Martinek K. (1977). *Dokl. Akad. Nauk SSSR (en rus)* **236**: 920-923.  
Ed. en anglès, 1978, **236**: 951-954.

Martinek K., Semenov A.N., Berezin I.V. (1981a). *Biochim. Biophys. Acta* **658**: 76-89.

Martinek K., Semenov A.N., Berezin I.V. (1981b).  
*Biochim. Biophys. Acta* **658**: 90-101.

Mattiasson B., Adlercreutz P. (1991). *TIBTECH* **9**: 394-398.

Menger F.M., Yamada K. (1979). *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 6731-6734.

Merkler D.J. (1994). *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 450-456.

Mevkh A.T. *et al.* (1985). *Biokhimiya (en rus)* **50**: 1719-1723.

Michaelis L., Mizutani M. (1925) *Phys. Chem.* **116**: 135-159.

Mitin Y.V. (1988). *Inc. Peptides 1988* (Jung G., Bayer E. Eds.).  
Walter de Gruyter, Berlin, 1989: 250-253.

Miyasaka K., Guan D. Liddle R.A. Green G.M. (1989). *Am. J. Physiol.* **257**: G175-81.

Mizutani M. (1925). *Pys. Chem* **116**: 350-358.

Morihara K. (1974). *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **41**: 179.

Morihara K. (1987). *TIBTECH* **5**: 164-169.

Morihara K., Oka T. (1977). *Biochem. J.* **163**: 531.

Morihara K., Tsuzuki H. (1970). *Eur. J. Biochem.* **15**: 374.

Morley J.E. (1982). *Life Sci.* **30**: 479-493.

Morley J.E., Levine A.S. (1980). *Clin. Res.* **28**: 721a.

Morley J.E., Levine A.S. (1981). *Life Sci.* **28**: 2187-2190.

Morley J.E., Melmed S., Briggs J., Carlson H.E., Hershman T.E., Solomon C., Lamers C. Damassa D.A. (1979). *Life Sci.* **25**: 1201-1206.

Mutt V., Jorpes J.E. (1971). *Biochem. J.* **125**: 57-58.

## O

Oka T., Morihara K. (1977). *J. Biochem.* **82**: 1055.

Okada S. (1914/15). *J. Physiol.* **49**: 457-482.

Ostwald W. (1901). *Z. Elektrochem.* **7**: 995-1004.

## P

Page M.J. (1977). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **16**: 449-454.

Panintrarux C., Adachi S., Araki, Y., Kimura Y., Matsuno R. (1995). *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 32-40.

Pera E., Torres J.L., Clapés P. (1996). *Tetrahedron Letters* **37**: 3609-3612.

Pessina A., Luthi P.L., Prenosil J., Zhang Y. (1988). *Helv. Chim. Acta* **71**: 631-641.

Petkov D.D. (1982). *J. Theor. Biol.* **98**: 419.

## R

Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1988a) *Eur. J. Biochem* **172**: 573-578.

Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1988b) *Eur. J. Biochem* **177**: 313-318.

Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1992). *Biocatalysis* **6**: 307-318.



Royo M., Alzina J., Giralt E., Slomczynska V., Albericio F. (1995). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*: 1095-1102.

Ryder S.W., Straus E., Yalow R.S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3669-3671.

**S**

Schechter I., Berger A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157

Schultz G.E., Schirmer R.H. (1979).  
*Principles of Protein Structure*. Springer-Verlag, NY.

Schwartz G.J., Netterville L.A., McHugh P.R., Moran T.H. (1991).  
*Am. J. Physiol.* **261**: R1141-1146

Shewale J.G., Deshpande B.S., Sudhakaran V.K., Ambedkar S.S. (1990)  
*Process Biochemistry Int.* **Juny**: 97-103.

Steiner D.F. (1976). Inc. *Peptide Hormones*. Parsons A.J. Ed.  
University Park Press, Baltimore. M.D.: 49-64.

Straus E., Maleski A., Yalow R.S. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5711-5714.

Sudhakaran V.K., Deshpande B.S., Ambedkar S.S., Shewale J.G. (1992)  
*Process. Biochemistry* **27**: 131-143.

\_vedas V.K., Margolin A.L., Berezin I.V. (1980).  
*Enzyme Microb. Technol.* **2**: 138-144.

**T**

Tanford C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley, NY.

Tewari Y.B., Schantz M.M., Pandey P.C., Rekharsky M.V., Goldberg R.N. (1995)  
*J. Phys. Chem.* **99**: 1594-1601.

Tsukada H., Blow D.M. (1985). *J. Mol. Biol.* **184**: 703.

**V**

Vanderhaeghen J.J., Lotstra F., De Mey J., Gilles C. (1980).  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1190-1194.

Villanueva M.L., Colliens S.M., Jansen R.T., Gardner J.D. (1982).  
Am. J. Physiol. **242**: G418

**W**

Waldmann H. (1988). Tetrahedron Lett. **29**: 1131-1134.

Waldmann H., Braun P. Kuntz H. (1991). Biomed. Biochim. Acta **50**: 243-248.

Waldmann H., Sebastian D. (1994). Chem. Rev. **94**: 911-937.

Wang Q.C., Fei J., Qui D.F., Zhu S.G., Xu L.G. (1986). Biopolymers **25**: S109.

Wang S.S., Gisin B.F., Winter D.P., Makofske R., Kulesha I.D., Tzougraki C.,  
Meinhofer J. (1977). J. Org. Chem. **42**: 1286-1290.

Watson J.D. (1977). *Molecular Biology of the Gene*. 3<sup>rd</sup> Ed. Benjamin Inc. NY: 222.

Widmer F., Bayne S., Houen G., Moss B.A., Rigby R.D., Whittaker R.G., Johansen J.T  
(1985). Inc. Peptides 1984. Proceedings of the 18<sup>th</sup> European Peptide Symposium.  
Ragharsson U. Ed. Almquist & Wiksell Int. Stockholm: 193-200

Wong C., Cheng S., Wang K. (1979). Biochim. BioPhys. Acta **576**: 247.

**Z**

Zaks A., Klibanov A.M. (1985). Proc. Nat. Acad. Sci. USA **82**: 3192-3196.

Zaks A., Klibanov A.M. (1988). J. Biol. Chem. **263**: 8016-8021.

Zetler G. (1980a). Neuropharmacology **19**: 415-422.

Zetler G. (1980b). Eur. J. Pharmacol. **65**: 133-139.

Zetler G. (1981). Neuropharmacology **20**: 277-283.