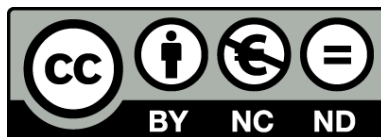




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Utilització de 9-fluorenilmetoxycarbonilaminoàcids a la síntesi en fase sòlida de segments peptídics protegits

Ana María Grandas Sagarra



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

"UTILITZACIÓ DE 9-FLUORENILMETOXCARBONILAMINOÀCIDS  
A LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE SEGMENTS PEPTÍDICS  
PROTEGITS"

Revisada



Dr. Enrique Pedrosa Muller

Barcelona, maig de 1985.

Memòria presentada per a  
aspirar al grau de Doctor  
en Ciències Químiques per  
ANA MARIA GRANDAS SAGARRA.

A mis padres.

Mentre estava redactant aquesta Memòria, s'ha concedit el Premi Nobel de Química 1984 a R. B. Merrifield.

Voldria que aquesta Tesi fos un petit homenatge a la seva personalitat, científica i humana.

Aquesta Tesi s'ha dut a terme al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, dirigit pel Dr. Josep Castells i Guardiola, a qui vull expressar el meu reconeixement. Em vaig incorporar com alumne en aquest Departament pràcticament al mateix temps que ell ho feia com a Catedràtic, i al llarg d'aquests anys he pogut apreciar la tasca que hi ha realitzat.

Vull donar les gracies, en primer lloc, a Ernest Giralt, Jurphaas Van Rietschoten i Enrique Pedroso, que tant d'aprop han seguit i encoratjat aquest treball, i a tots els companys del grup de pèptids amb qui he compartit tantes hores de laboratori. Gracies a tots ells durant aquests anys he arribat a la feina i he trobat un ambient de treball i companyonia, on mai han mancat el sentit de l'humor ni la capacitat de fer gresca. En aquest sentit, vull recordar molt particularment Ramon Eritja, Fernando Albericio, David Andreu i Miquel Pons, i agrair a M<sup>a</sup>. Angeles Saralegui, Nuria Solé, Xavi de las Heras i Joan Carles Amor la seva col.laboració en alguns aspectes del present treball.

Vull donar les gracies, també, a Claude Granier, Marie Tessier i Brigitte Céard, del Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine d'Aix-Marsella, així com al Dr. Francis Miranda, director d'aquest Departament on sempre m'he sentit ben rebuda. Ells han contribuït, també, a que aquest treball arribés a bon terme, i en els freqüents viatges al seu Departament he pogut realitzar una bona part de la tasca experimental, sobretot al començament de la Tesi.

Hi ha moltes altres persones que han col.laborat a la realització d'aquest treball. M<sup>a</sup>. Dolors Portabella, en qui sempre he trobat amistat a més a més de paciència i totes les facilitats per a solucionar les coses; Miguel Feliz, Josep Rizo i M<sup>a</sup>. Pilar Navarro, que han enregistrat els espectres de ressonància magnètica nuclear; Jordi Canals i Carles Celma, encarregats dels espectres de masses; Gerard Martinez i Thérèse, i Ernesto Nicolás i Josep Rizo, que s'han ocupat de les anàlisis d'aminoàcids; Maria Guerra, que s'ha preocupat per a obtenir bones anàlisis elementals de polímers, i el Dr. Rivera, que ha fet possible l'obtenció dels espectres de masses per bombardeig amb àtoms ràpids.

Finalment, vull fer extensiu el meu reconeixement a tots els altres membres del Departament de Química Orgànica.

	Pàgina.
Part teòrica	1
Abreviatures	2
Introducció	4
1. Síntesi del LHRH per condensació de dos segments peptídics protegits	16
1.1. Introducció	17
1.1.1. Disseny de la síntesi	17
1.1.2. Consideracions generals sobre la metodologia de síntesi amb Fmoc-aminoàcids	27
1.2. Síntesi dels segments peptídics protegits	
Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH <u>3</u> i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-OH <u>4</u>	30
1.2.1. Síntesi del suport sòlid 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) <u>1</u>	30
1.2.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid <u>1</u>	31
1.2.3. Síntesi del segment peptídic protegit <u>4</u>	35
1.2.3.A. Síntesi del pèptid	35
1.2.3.B. Purificació i caracterització del pèptid <u>4</u>	41
1.2.4. Síntesi del segment peptídic protegit <u>3</u>	45
1.2.4.A. Síntesi del pèptid	45
1.2.4.B. Purificació i caracterització del pèptid <u>3</u>	47
1.3. Síntesi del LHRH	49
1.3.1. Engalzament dels segments peptídics protegits sobre el suport polimèric	49
1.3.1.A. Síntesi d' $\alpha$ -aminobenzilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè)	49
1.3.1.B. Estabilitat del grup protector Fmoc a l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè	50
1.3.1.C. Engalzament dels segments peptídics protegits <u>3</u> i <u>4</u> sobre l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè	53
1.4. Síntesi dels segments peptídics protegits	
Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-NH-NH <sub>2</sub> <u>5</u> i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH-NH <sub>2</sub> <u>6</u>	60
1.4.1. Síntesi del 4-carbazoiloximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè)	60

	Pàgina
1.4.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid <u>2</u>	61
1.4.3. Síntesi del segment peptídic protegit <u>6</u>	61
1.4.3.A. Síntesi del pèptid	61
1.4.3.B. Purificació i caracterització del pèptid <u>6</u>	63
1.4.4. Síntesi del segment peptídic protegit <u>5</u>	65
1.4.4.A. Síntesi del pèptid	65
1.4.4.B. Purificació del pèptid <u>5</u>	66
1.4.5. Estudi de la reacció secundària que té lloc sobre $\text{H-Gly-NH-NH-CO-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-CH}_2\text{-}$ Ⓟ	69
1.5. Discussió	73
2. Estudi dels problemes sorgits al llarg de la síntesi amb Fmoc-aminoàcids i 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè	76
2.1. Síntesi del suport polimèric 4-hidroximetilfenoxi- metilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè)	77
2.1.1. Síntesi de clorometilcopoli(estirè-1%-divi- nilbenzè)	77
2.1.1.A. Síntesi de clorometilpoliestirè	77
2.1.1.B. Anàlisi de clorometilpoliestirè	79
2.1.1.C. Resultats i discussió	81
2.1.2. Síntesi de 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(es- tirè-1%-divinilbenzè)	83
2.2. Ancoratge de l'aminoàcid C-terminal al 4-hidroximetil- fenoximetilpoliestirè	95
2.2.1. Esterificació amb l'anhídrid simètric i 4-dimetilaminopiridina	97
2.2.2. Esterificació amb carbonildiimidazole	104
2.3. Estudi de la reacció de formació de dicetopiperazines	105
2.3.1. Síntesi de Fmoc-D-Val-L-Pro-O-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-CH <sub>2</sub> -Ⓟ	108
2.3.2. Cinètiques de formació de dicetopiperazines	108
2.3.3. Estudi cinètic de la labilitat del grup Fmoc a diferents condicions de desprotecció, i influència d'aquestes en la formació de diceto- piperazines	112

	Pàgina
3. Síntesi dels segments peptídics protegits 32-34 i 35-43 de la toxina II de l'escorpí AaH	115
3.1. Introducció	116
3.1.1. Disseny de la síntesi	118
3.1.2. Obtenció dels Fmoc-aminoàcids	120
3.1.3. Consideracions generals sobre la metodologia de síntesi dels pèptids <u>7</u> i <u>8</u>	123
3.2. Síntesi del segment peptídic protegit Fmoc-Glu(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-OH <u>7</u>	126
3.2.1. Síntesi del pèptid	126
3.2.2. Purificació i caracterització del segment peptídic protegit <u>7</u>	131
3.2.2.A. Primers assaigs de purificació del pèptid <u>7</u>	131
3.2.2.B. Intent de purificació del pèptid <u>7</u> per HPLC	134
3.2.2.C. Purificació i caracterització del pèptid <u>7</u>	139
3.3. Síntesi del segment peptídic protegit Fmoc-Tyr(cHex)-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH <u>8</u>	145
3.3.1. Síntesi del pèptid	145
3.3.2. Purificació i caracterització del segment peptídic protegit <u>8</u>	149
3.3.2.A. Primers assaigs de purificació del pèptid <u>8</u>	150
3.3.2.B. Recerca de condicions de purificació per HPLC semi-preparativa en fase reversa	154
3.3.2.C. Purificació i caracterització del pèptid <u>8</u>	160
3.4. Caracterització dels pèptids <u>7</u> i <u>8</u> per espectrometria de masses mitjançant bombardeig amb àtoms ràpids (FAB)	166
3.5. Estudi de condicions de separació de pèptids protegits per HPLC	168
Part experimental	179
Materials i mètodes	180
1. Instrumentació	181
2. Columnes de cromatografia líquida	182
3. Dissolvents i reactius	183
4. Cromatografia en capa fina	185



	Pàgina
5. Anàlisis sobre resina, d'aminoacil- i peptidil-resina	186
5.1. Detecció d'amines lliures sobre un polímer.	
Avaluació de l'extensió dels acoblaments	186
5.2. Detecció d'amines lliures sobre un polímer:	
quantificació	187
6. Preparació de mostres per a anàlisi d'aminoàcids	188
7. Protocols de síntesi	190
7.1 Benzoilació dels grups hidroxil que queden lliures	
sobre el polímer després d'ancorar l'aminoàcid	
C-terminal	190
7.2. Cicle d'incorporació d'un Fmoc-aminoàcid	191
7.3. Bloqueig de grups amino lliures. Acetilació	194
7.4. Bloqueig de grups hidroxil lliures després del	
cicle d'incorporació del tercer aminoàcid.	
Acetilació	195
7.5. Acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina	195
7.6. Preparació de mostres per a determinar la	
proporció Gly <sub>2</sub> /Gly	196
1. Síntesi del LHRH per condensació de dos segments peptídics	
protegits	197
1.2. Síntesi dels segments peptídics protegits	
Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH <u>3</u> i	
Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-OH <u>4</u>	198
1.2.1. Síntesi del suport sòlid 4-hidroximetilfenoxi-	
metilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) <u>1</u>	198
1.2.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid <u>1</u> .	
9-fluorenilmetanol. Cloroformiat de 9-fluorenil-	
metil. N-(9-fluorenilmetil)piperidina	199
1.2.3. Síntesi del segment peptídic protegit <u>4</u>	202
1.2.3.A. Síntesi del pèptid	202
1.2.3.B. Purificació del pèptid <u>4</u>	203
1.2.4. Síntesi de segment peptídic protegit <u>3</u>	204
1.2.4.A. Síntesi del pèptid	204
1.2.4.B. Purificació del pèptid <u>3</u>	206

	Pàgina
1.3. Síntesi del LHRH	207
1.3.1. Engalzament dels segments peptídics protegits sobre el suport polimèric	207
1.3.1.A. Síntesi d' $\alpha$ -aminobenzilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè)	207
1.3.1.B. Estabilitat del grup protector Fmoc a l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè. Síntesi de l'ester metílic de la Fmoc-glicina	208
1.3.1.C. Engalzament dels segments peptídics protegits <u>3</u> i <u>4</u> sobre l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè	212
1.3.2. Obtenció del crú peptídic. Purificació del LHRH	213
1.4. Síntesi dels segments peptídics protegits	
Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-NH-NH <sub>2</sub> <u>5</u>	
i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH-NH <sub>2</sub> <u>6</u>	214
1.4.1. Síntesi del 4-carbazoiloximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè). Preparació d'hidrazina anhidre	214
1.4.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid <u>2</u>	216
1.4.3. Síntesi del segment peptídic <u>6</u>	217
1.4.3.A. Síntesi del pèptid	217
1.4.3.B. Purificació del pèptid <u>6</u>	218
1.4.4. Síntesi del segment peptídic protegit <u>5</u>	219
1.4.4.A. Síntesi del pèptid	219
1.4.4.B. Purificació del pèptid <u>5</u>	221
1.4.5. Estudi de la reacció secundària que té lloc sobre H-Gly-NH-NH-CO-O-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-CH <sub>2</sub> - <u>(P)</u> . Fenoxicarbonilglicinat d'etil. 3,6-dioxo-1,2,4-triazina	221
2. Estudi dels problemes sorgits al llarg de la síntesi amb Fmoc-aminoàcids i 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè	224
2.1. Síntesi del suport polimèric 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè)	225
2.1.1. Síntesi de clorometilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè)	225
2.1.1.A. Síntesi de clorometilpoliestirè	225

2.1.1.B. Anàlisi de clorometilpoliestiré. Mètode de Volhard. Ancoratge de Boc-ProOCs	225
2.1.2. Síntesi de 4-hidroximetilfenoximetilco- poli(estirè-1%-divinilbenzè). Síntesi de la resina 1 <sub>A-II</sub> : mètode de Wang. Síntesi de la resina 1 <sub>A-VI</sub> : mètode de Merrifield. Purificació de l'alcohol 4-hidroxibenzílic. Preparació de NaOMe	227
2.2. Ancoratge de l'aminoàcid C-terminal al 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè. Preparació de la mostra per a l'anàlisi de la proporció Gly <sub>2</sub> /Gly	231
2.2.1. Esterificació amb l'anhídrid simètric i 4-dimetilaminopiridina	232
2.2.2. Esterificació amb carbonildiimidazole. Estudi de l'estabilitat del grup protector Fmoc enfront de l'imidazole	232
2.3. Estudi de la reacció de formació de dicetopiperazines	233
2.3.1. Síntesi de Fmoc-D-Val-L-Pro-O-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-CH <sub>2</sub> - <u>(P)</u> . Fmoc-D-Val-OH	233
2.3.2. Cinètiques de formació de dicetopiperazines	235
3. Síntesi dels segments peptídics protegits 32-34 i 35-43 de la toxina II de l'escorpí AaH	236
3.1.2. Obtenció dels Fmoc-aminoàcids. Fmoc-Tyr(cHex)-OH. Determinació de la puresa òptica de Fmoc-Tyr(cHex)-OH. Fmoc-Cys(Acm)-OH. Azidoformiat de 9-fluorenilmetil	237
3.2. Síntesi del segment peptídic protegit Fmoc-Glu(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-OH <u>7</u>	244
3.2.1. Síntesi del pèptid	244
3.2.2.A. Primers assaigs de purificació del pèptid <u>7</u>	245
3.2.2.C. Purificació del pèptid <u>7</u> . Extracció amb dissolvents orgànics i precipitació. HPLC semi-preparativa	246
3.3. Síntesi del segment peptídic Fmoc-Tyr(cHex)-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH <u>8</u>	247
3.3.1. Síntesi del pèptid	

	Pàgina
3.3.2. Purificació del segment peptídic protegit <u>8</u>	249
3.3.2.A. Primers assaigs de purificació del pèptid <u>8</u>	249
3.3.2.C. Purificació del pèptid <u>8</u> . Extracció amb dissolvents i precipitació. HPLC semi-prepa- rativa	250
Conclusions	251
Referencies	257

PART TEÓRICA.

## ABREVIATURES.

Fins on ha sigut possible, s'han emprat les abreviatures recomanades l'any 1983 per la Comissió Conjunta de Nomenclatura Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB. Quan una abreviatura no està contemplada en aquestes recomanacions, hem triat el símbol més usualment emprat en el camp de la síntesi de péptids.

Les abreviatures que es fan servir al llarg de la Memòria s'indiquen a continuació:

Ac	acetil
Acm	acetamidometil
Ala	alanina
Arg	arginina
Boc	<u>t</u> -butoxicarbonil
Bpoc	2-(4-bifenilil)isopropiloxicarbonil
Bzl	benzil
CDI	carbonildiimidazole
cHex	ciclohexil
Cys	cisteïna
Dcbzl	2,6-diclorobenzil
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DKP	dicetopiperazina
DMA	N,N-dimetilacetamida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfòxid
EDIA	etildiisopropilamina
Et	etil
FAB	bombardeig amb àtoms ràpids
Fm	9-fluorenilmetil
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
Fmp	N-(9-fluorenilmetil)piperidina
Gln	glutamina
Glp	àcid piroglutàmic

Glu	àcid glutàmic
Gly	glicina
His	histidina
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HPLC	cromatografia líquida d'alta eficàcia
<u>i</u> Pr	isopropil
Leu	leucina
LHRH	luliberina (factor alliberador de l'hormona luteïnitzant)
Me	metil
ODS	octadecilsiloxà
Pro	prolina
Pyr	piridina
Ser	serina
Su	succinimidil
<u>t</u> -Bu	<u>tert</u> -butil
TEAP	fosfat de trietilamina
TFA	àcid trifluoroacètic
Tos	tosil
Trp	triptofan
Tyr	tirosina

f indica el grau de substitució d'un polímer funcionalitzat, i sempre s'expressa en mmol/g.

Ⓟ poliestirè-co-1%-divinilbenzè. Sovint, en el text, es parla simplement de poliestirè com una manera més senzilla de referir-nos al copolímer d'estirè i divinilbenzè.

Ⓟ polidimetilacrilamida copolimeritzada amb bisacriloil-etilendiamina.

Ⓡ matriu sòlida o resina, derivada sempre del copolímer d'estirè i divinilbenzè. El tipus de funcionalització concret s'indica, en cada cas, en el text.

INTRODUCCIÓ.



L'obtenció d'un pèptid pot èsser abordada per mètodes químics mitjançant dues estratègies (1): la síntesi linial o pas a pas on a cada etapa es va afegint un aminoàcid, o la síntesi convergent o per condensació de segments que es van engalçant per a donar la molècula desitjada.

Una síntesi convergent presenta, a priori, molts més avantatges que una síntesi linial. D'una banda, si els rendiments de les etapes intermedies són del mateix ordre, el rendiment global d'una síntesi convergent sempre serà millor que el d'una síntesi linial. D'altra banda, ens permet de reservar per les etapes finals del procés els intermedis més elaborats. Tanmateix, ha sigut una estratègia linial la que ha donat l'empenta més gran a l'obtenció de pèptids: la síntesi de pèptids en fase sòlida pas a pas, introduïda per R.B. Merrifield l'any 1963 (2).

L'aplicació d'aquesta metodologia, amb totes les millores introduïdes els darrers anys (3), ha fet possible la síntesi d'un gran nombre de seqüències peptídiques d'estructura idèntica a la natural o d'anàlegs emprats força sovint per a estudis de relació estructura-activitat. S'han pogut sintetitzar polipèptids llargs con la ribonucleasa A de 124 aminoàcids (4), la lisozima d'ou de pollastre de 129 aminoàcids (5) o un anàleg de l'hormona humana del creixement de 188 aminoàcids (6); ara bé, en general els autors conclouen haver obtingut un producte només parcialment purificat

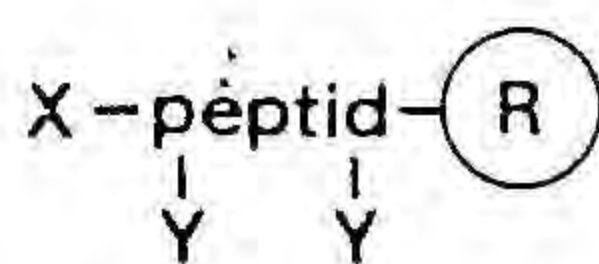
amb un cert percentatge de l'activitat biològica del producte natural. Cal citar, com a resultat més exitós, la síntesi de la  $\beta$ -lipotropina de 91 aminoàcids duta a terme per Yamashiro i Li (7), que obtenen després de la purificació un 0.66% d'un producte molt pur indistingible del natural tant per diferents criteris analítics com per la seva activitat biològica. A la literatura es troben descrites bastantes síntesis reixides en fase sòlida pas a pas de pèptids de talla més reduïda, 40-60 aminoàcids, però també hi ha exemples de pèptids que no s'han pogut purificar fins a homogeneïtat total (8,9). L'èxit d'una síntesi està lligat tant a la dificultat intrínseca de la seqüència del pèptid com a la tàctica que es tria per a obtenir-lo (grups protectors dels aminoàcids, mètode d'acoblament i tipus de funcionalització de la matriu polimèrica). En qualsevol cas, creiem que per un pèptid relativament llarg el menys arriscat és abordar la síntesi mitjançant una estratègia convergent. L'avantatge principal d'aquesta estratègia rau en que a la purificació del producte final haurem de separar pèptids que difereixen en blocs d'aminoàcids, mentre que en el cas d'una síntesi pas a pas, on no es purifiquen els intermedis, podem haver de separar pèptids que es diferencien en un sol aminoàcid, la qual cosa pot fer molt difícil o gairebé impossible la purificació.

Per a dur a terme la síntesi convergent d'un polipèptid, és necessari obtenir blocs o segments peptídics, que per poder-se engalzar posteriorment han d'estar convenientment protegits. Tant la síntesi com l'engalzament d'aquests pèptids es poden dur a terme en dissolució o en fase sòlida. Pel que fa a la síntesi en dissolució, gairebé sempre s'han trobat els mateixos problemes (10, 11): baixa solubilitat d'alguns segments peptídics protegits, rendiments d'acoblament febles sobretot amb segments de gran longitud i, de vegades, dificultat de purificació fins a homogeneïtat i de caracterització inequívoca dels productes finals. A tall d'exemple, durant la síntesi d'un anàleg de la lisozima (12), la insolubilitat d'alguns segments peptídics protegits ha obligat en algun cas a canviar part de l'estratègia, dissenyant la síntesi de nous segments de longitud i composició en aminoàcids diferents, així com la tàctica, canviant algun grup protector per tal d'augmentar la solubilitat del pèptid (13). Així mateix, K. Hofmann i col.laboradors (14) assenyalen a la seva síntesi de la ribonucleasa  $T_1$  que la insolubilitat d'alguns segments només els permet de purificar-los per rentats en suspensió, i els impedeix l'anàlisi del grau d'homogeneïtat

dels productes per cromatografia en capa fina perquè el pèptid resta a l'origen en diferents sistemes d'elució. Finalment, Fujii i Yajima a la seva síntesi de la ribonucleasa A (15) troben els mateixos problemes, veient-se obligats a dur a terme alguns acoblaments en mescles de diversos dissolvents (N,N-dimetilformamida, dimetilsulfòxid i N-metilpirrolidona). Cal dir, però, que el mètode d'acoblament emprat en aquest cas, el mètode de l'azida, crea encara més problemes degut al fet que cal treballar a baixa temperatura, disminuint encara més la solubilitat dels pèptids. Durant la mateixa síntesi, a les etapes finals d'engalzament de segments els cal emprar fins a 30 vegades d'excés d'agent acilant i tot i així no arriben a rendiments quantitius.

A la vista de tots aquests resultats, la síntesi convergent en fase sòlida es presenta com una bona alternativa. D'una banda, a la literatura es troben exemples d'engalzament de segments sobre un suport sòlid amb rendiments d'acoblament força acceptables (16 a 19). D'altra banda, hi ha moltes tàctiques de protecció que han fet possible la síntesi de segments peptídics protegits sobre una matriu polimèrica (vegeu (20) per a una revisió d'aquestes tàctiques i els inconvenients que presenten). Per tant, la nostra alternativa és la síntesi convergent totalment en fase sòlida: tant la síntesi dels segments peptídics protegits com l'engalzament d'aquests segments tenen lloc sobre un suport sòlid. Donats els bons resultats de la síntesi de pèptids en fase sòlida pas a pas per a pèptids relativament curts, l'obtenció de segments peptídics protegits en fase sòlida és més senzilla que en dissolució. En aquell cas només ha de ser soluble el segment i no els intermedis de síntesi, i tan sols hi ha una etapa de purificació tot i que sigui bastant complexa. Pel que fa a l'engalzament dels segments, els problemes de solubilitat també es simplifiquen, ja que només cal tenir dissolt el segment que actua d'agent acilant alhora que ha de ser accessible l'extrem N-terminal del pèptid ancorat al polímer.

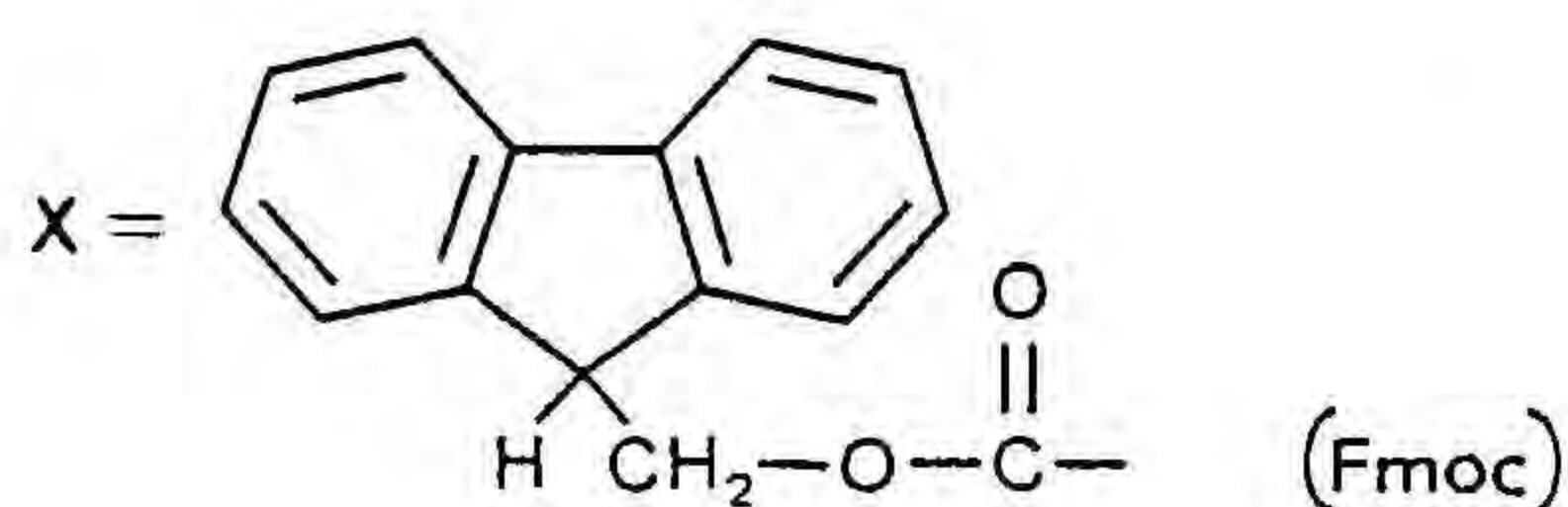
La condició ideal per a dur a terme una síntesi de segments peptídics protegits és la d'ortogonalitat (21), on tots els grups protectors X de l'extrem N-terminal, Y de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals i el suport polimèric R, que actua de protector del carboxil C-terminal de la cadena peptídica, són independents entre si, és a dir que cada tipus de grup protector es pot eliminar en qualsevol ordre i en la presència de tots els altres.



La condició d'ortogonalitat suposa que la desprotecció de les funcions  $\alpha$ -amino, la de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals i el trencament de l'enllaç pèptid-resina tenen lloc en condicions totalment diferents com, per exemple, medi àcid, medi bàsic i fotòlisi. Així doncs, l'ús d'àcids de força diferent (com TFA/diclorometà i HF) per a efectuar dos d'aquests tractaments, essent possible d'emprar l'àcid menys fort sense alterar les funcions làbil a l'àcid més fort, no correspon estrictament a la definició d'ortogonalitat.

En tota síntesi en fase sòlida ha d'ésser possible eliminar el grup protector de l'extrem amino terminal a cada etapa sense desprotegir cap altra funció. Donat que l'operació de desprotecció de les funcions  $\alpha$ -amino es repeteix unes quantes vegades al llarg de la síntesi, és desitjable que es faci en condicions totalment diferents de les que s'han d'emprar per a desprotegir les cadenes laterals dels aminoàcids i per a desencorar el pèptid del polímer. D'altra banda cal no oblidar que per a sintetitzar segments peptídics protegits en fase sòlida, l'enllaç pèptid-resina s'ha de poder trencar sense alterar per res els grups protectors X i Y.

L'objectiu d'aquesta Tesi és posar a punt una metodologia de síntesi en fase sòlida de segments peptídics protegits. La tàctica que nosaltres hem triat consisteix a protegir les funcions  $\alpha$ -amino amb el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), làbil a les bases (22); les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals amb grups de tipus benzil o tosil, làbils a àcids forts com l'àcid fluorhídric anhidre, i ancorar l'aminoàcid C-terminal sobre el polímer 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) (23), de manera que l'enllaç ester entre el pèptid i la resina sigui làbil en condicions menys dràstiques que el HF, tals com 55% d'àcid trifluoroacètic (TFA) en diclorometà.



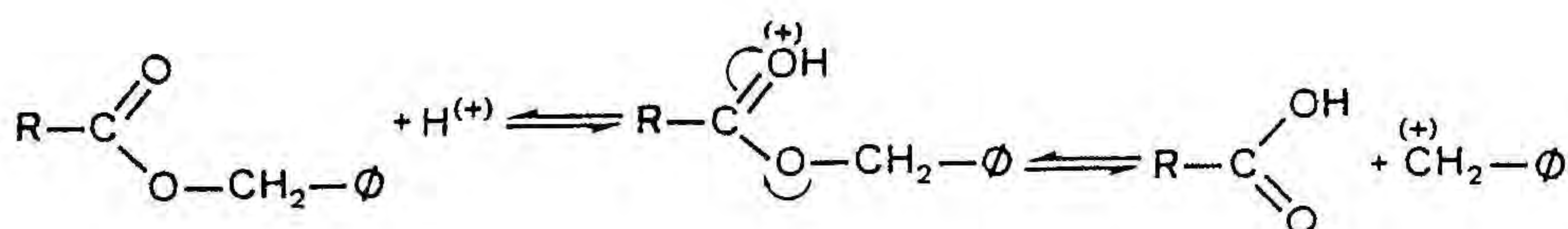
Y = benzil, tosil, etc.



Els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids són els clàssics de la síntesi linial de pèptids en fase sòlida. El seu ús implica, tal com ja hem esmentat, una etapa de desprotecció al final de la síntesi del polipèptid amb àcid fluorhídric anhidre (24, 25).

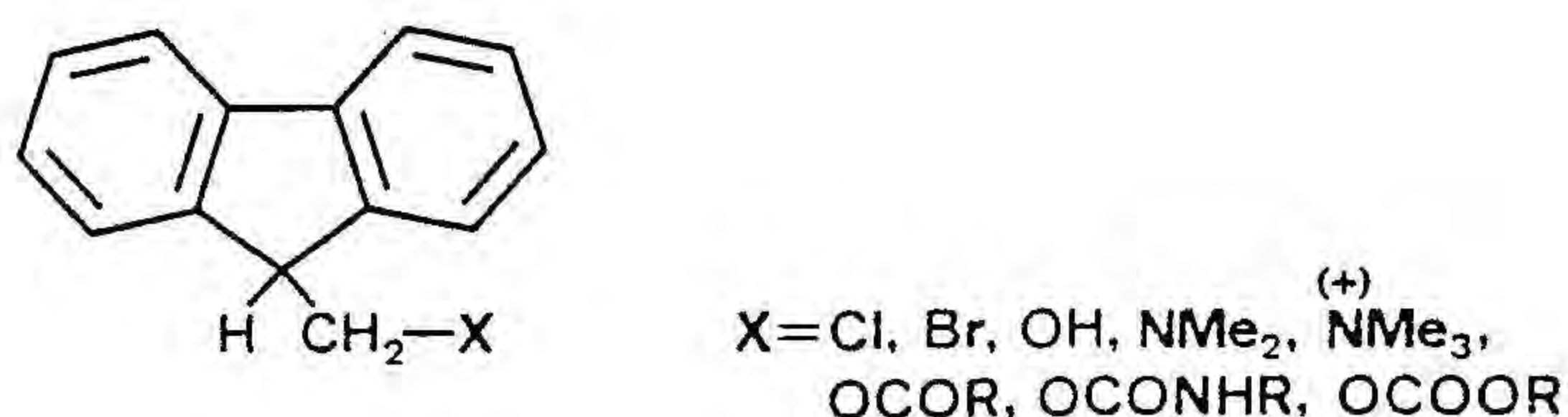
El 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè ha estat emprat per a sintetitzar segments peptídics (26 a 28) protegits en les cadenes laterals amb grups làbils al HF i en la funció  $\alpha$ -amino amb el grup 2-(4-bifenilil)-propil(2)oxicarbonil (Bpoc), làbil al 0.5% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà. La crítica més important que es pot fer a aquesta tàctica és la seva manca d'ortogonalitat, que es tradueix en un 0.2% de pèrdua de cadenes peptídiques a cada etapa de desprotecció amb TFA (3). Els darrers anys, aquesta resina ha estat emprada també per a sintetitzar pèptids lliures (vegeu més endavant).

L'enllaç d'ester benzílic que s'estableix entre el pèptid i el 4-hidroximetilpoliestirè és més làbil als àcids que la protecció com a esters benzílics de les cadenes laterals dels àcids aspàrtic i glutàmic o l'enllaç pèptid-resina emprat convencionalment, degut a la presència del substituent alcoxi en posició para-. L'acidòlisi de l'ester té lloc a través d'un mecanisme  $A_{AL}1$  (29), de manera que es forma un carbocatió benzílic en l'etapa determinant de la velocitat del procés. Com més estable és aquest carbocatió, i els grups alcoxi incrementen la seva estabilitat, més suaus poden ésser les condicions d'acidòlisi.

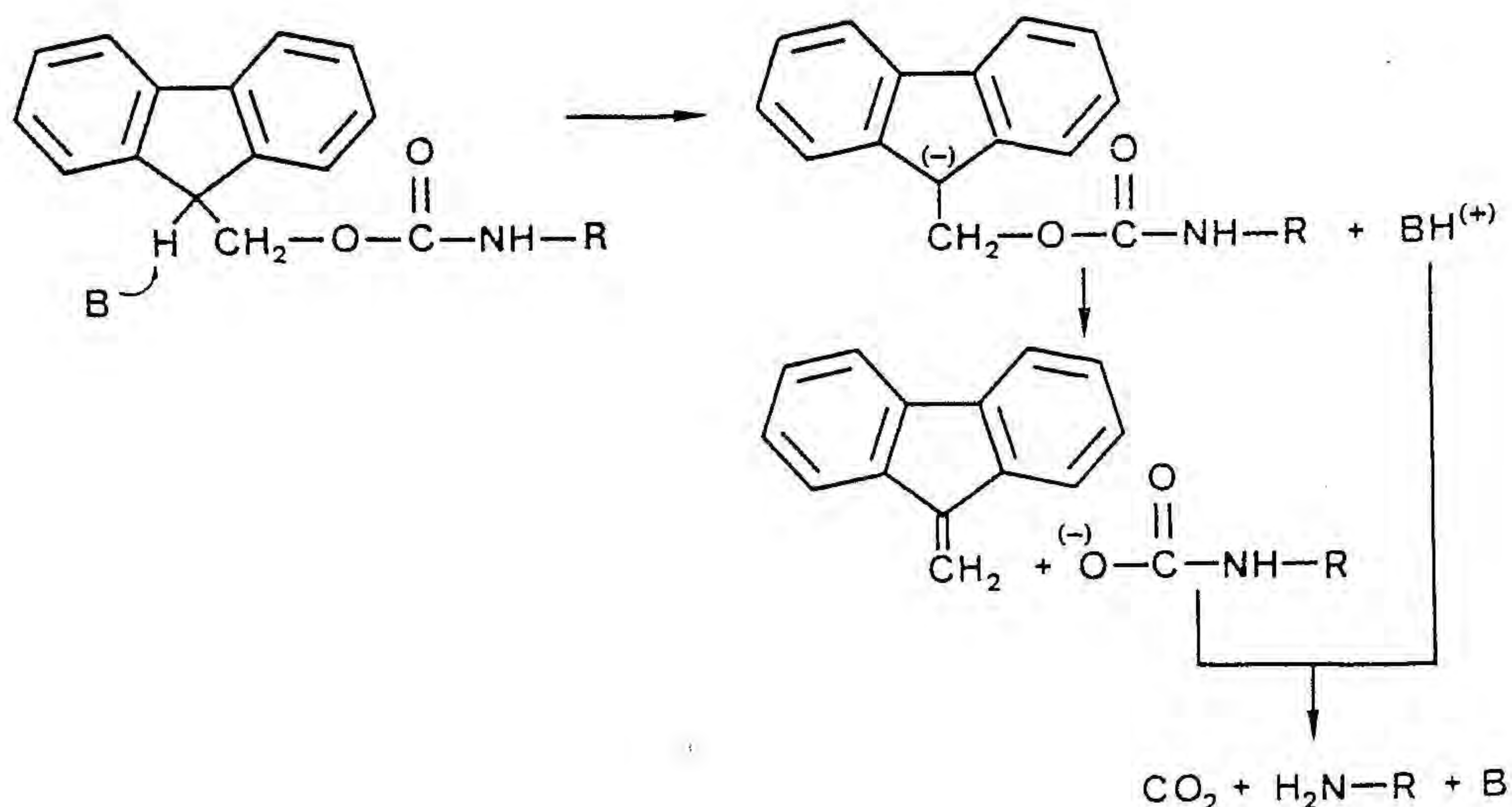


El grup protector Fmoc va ser introduït l'any 1970 per L.A. Carpino i G.Y. Han (30) com una alternativa als protectors de grups amino làbils als àcids, que són els més correntment emprats en síntesi de pèptids. Aquests autors varen descriure un nou grup protector estable als àcids i làbil en condicions bàsiques suaus i no hidrolítiques, i varen mostrar la seva aplicabilitat com a protector de les funcions  $\alpha$ -amino dels aminoàcids (22).

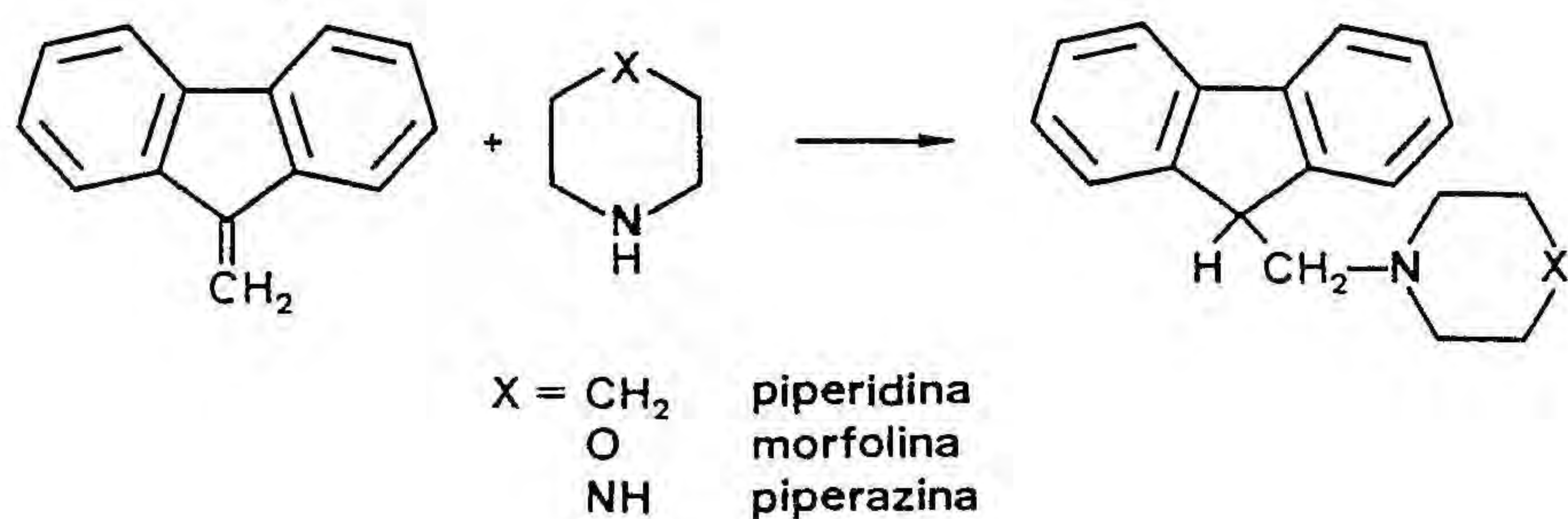
El mecanisme de desprotecció implica una  $\beta$ -eliminació per a donar dibenzofulvè, diòxid de carboni i l'amina lliure. Estudis més aprofundits sobre el mecanisme d'eliminació de derivats del fluorè del tipus



(31 a 35) han conduït a la proposta de que, en el cas on  $X = \text{O-CO-NHR}$  (carbamat), l'etapa d'eliminació té lloc a través d'un mecanisme E1cB (35)



Quan el reactiu emprat per a la desprotecció és una amina secundària i cíclica, en comptes de dibenzofulvè s'obté l'adducte d'aquest amb la base emprada per a la reacció



Es a destacar que l'adducte format, de la mateixa manera que els Fmoc-aminoàcids, presenta un espectre d'ultraviolat molt característic, amb màxims d'absorció a 301, 290 i 267nm, la qual cosa, com veurem, permet de controlar l'evolució d'una síntesi peptídica.

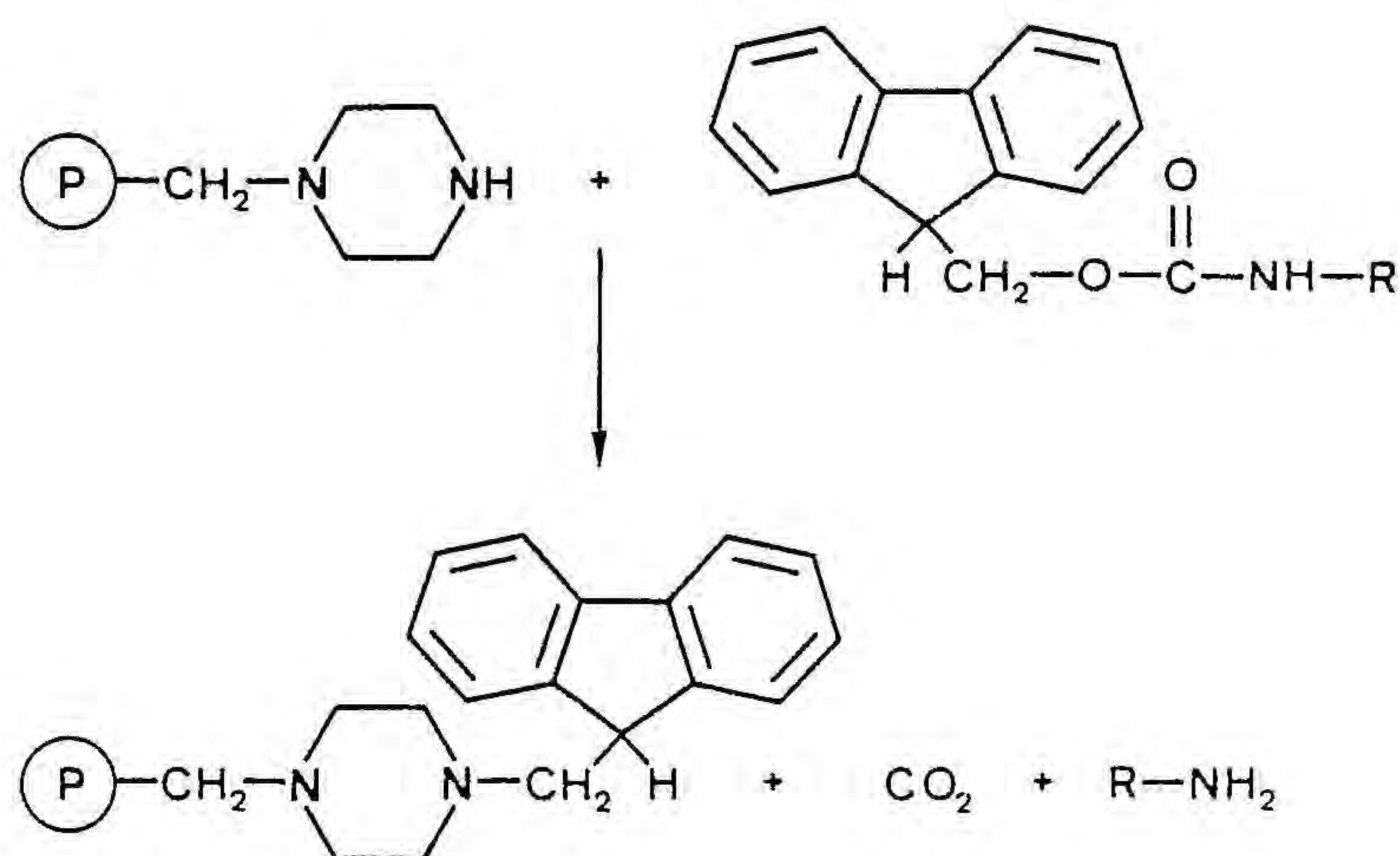
Tot i que aquest grup protector és conegut des de començament de la dècada dels setanta, van haver de passar uns quants anys perquè els peptidistes hi prenguessin veritablement interès. L'any 1978, al quinzè Congrés Europeu de Pèptids, el grup americà de J. Meienhofer (36) i el grup anglès de R.C. Sheppard (37) varen presentar els resultats obtinguts en la síntesi en fase sòlida de pèptids no protegits combinant el grup Fmoc com a protector de les funcions  $\alpha$ -amino amb grups de tipus tert-butil, làbils als àcids, per a protegir les cadenes laterals dels aminoàcids i un enllaç pèptid-resina d'ester 4-alcoxibenzílic (amb l'única diferència de que l'equip americà treballa amb resines de poliestirè i l'anglès amb poliacrilamides). La finalitat d'ambdós grups era substituir el tractament final amb àcid fluorhídric anhidre, clàssic dins la metodologia de la fase sòlida, per un tractament més suau amb 55% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà, i els tractaments àcids per a desbloquejar l'extrem  $\alpha$ -amino (habitualment protegit amb el grup tert-butoxicarbonil) per un tractament en medi bàsic.

Des d'aleshores, el grup protector Fmoc s'ha anat introduint cada vegada més en la síntesi de pèptids. Mentre que aquests dos equips i d'altres han seguit treballant amb aquesta tàctica (38 a 45), l'ús d'esters actius de Fmoc-aminoàcids s'ha anat incorporant també a la síntesi de pèptids en dissolució (46 a 48).

Paral·lelament, Bodanszky i col.laboradors (49) han estudiat l'estabilitat d'un Fmoc-aminoàcid als grups amino lliures d'una cadena

peptídica en creixement durant la reacció d'acoblament, posant de manifest que la possibilitat de desprotecció és negligible en la síntesi de pèptids sobre suport sòlid i molt poc important en la síntesi de pèptids en fase homogènia. Aquest mateix grup (50) i el grup de Sheppard (51) han estudiat també l'estabilitat del grup Fmoc a la hidrogenòlisi. Tots dos han demostrat que, contràriament al que indicaven les primeres dades existents a la literatura (22), el grup Fmoc no és gaire estable a la hidrogenació catalítica, essent possible que les discrepàncies entre els resultats d'uns i d'altres siguin degudes al catalitzador emprat en aquest tractament.

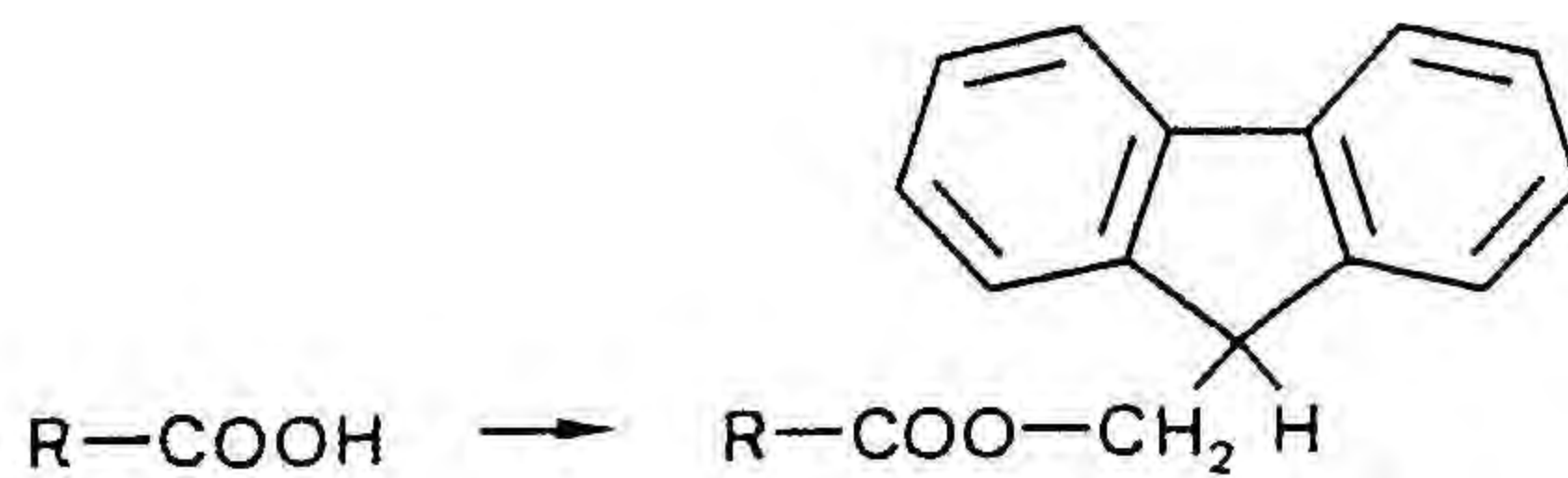
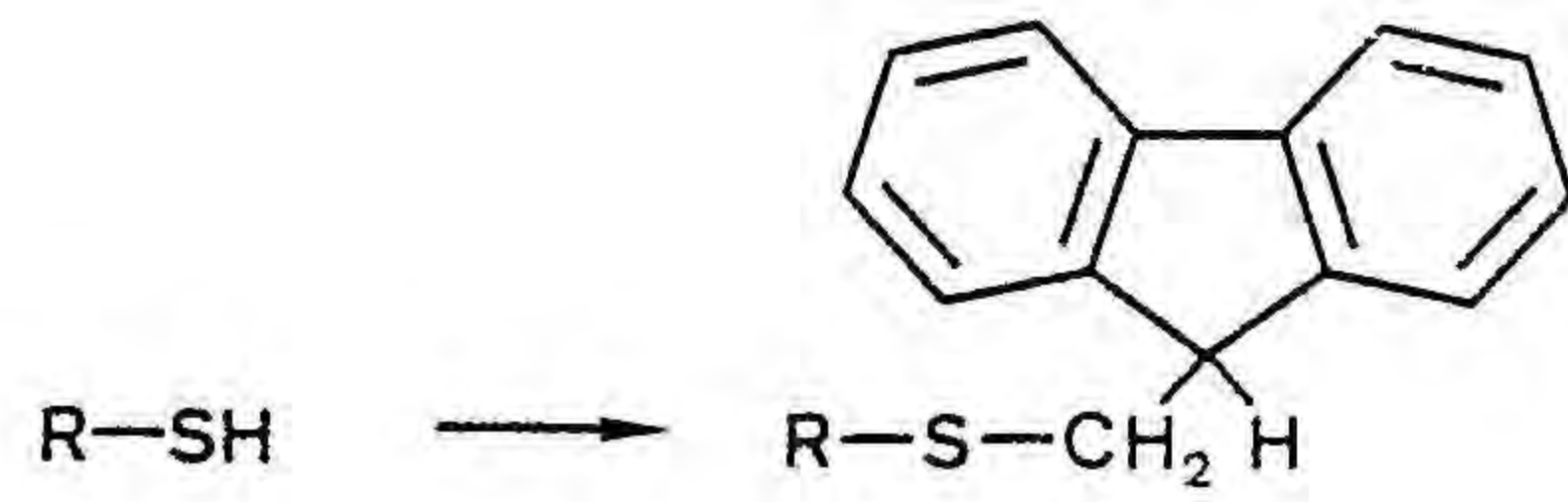
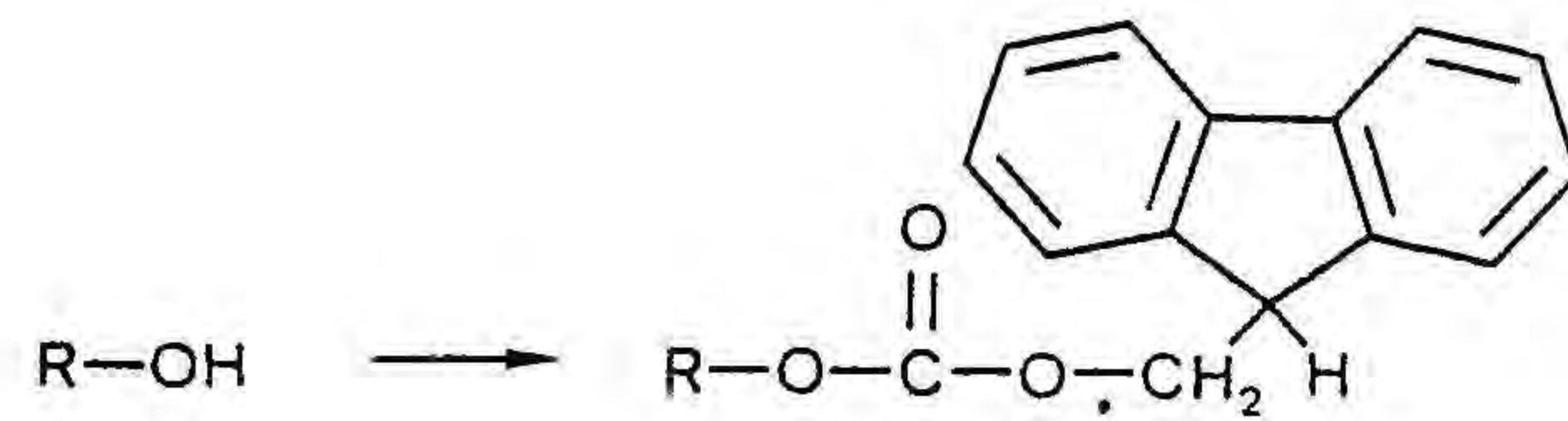
Tant el grup de Shepard com, sobretot, el de Carpino, han assajat l'ús d'amines ancorades a polímers com a agents de desprotecció de Fmoc-amines que es troben en dissolució (52 a 55). Aquestes amines polimèriques actuen també com a capturadors del dibenzofulvè alliberat durant la desprotecció, formant un adducte que permet de separar fàcilment el dibenzofulvè de l'amina lliure. En la figura es mostra aquest procés per una de les resines estudiades.



Els darrers anys, diversos autors, basant-se en la labilitat del grup protector Fmoc en medi bàsic, han proposat l'ús d'estructures relacionades per a protegir altres grups funcionals. Així, grups hidroxil es poden protegir com a carbonats de 9-fluorenilmetil (56), grups tiol com 9-fluorenilmetiltioèters (57) i grups carboxil com a esters de 9-fluorenilmetil (58, 59).\*

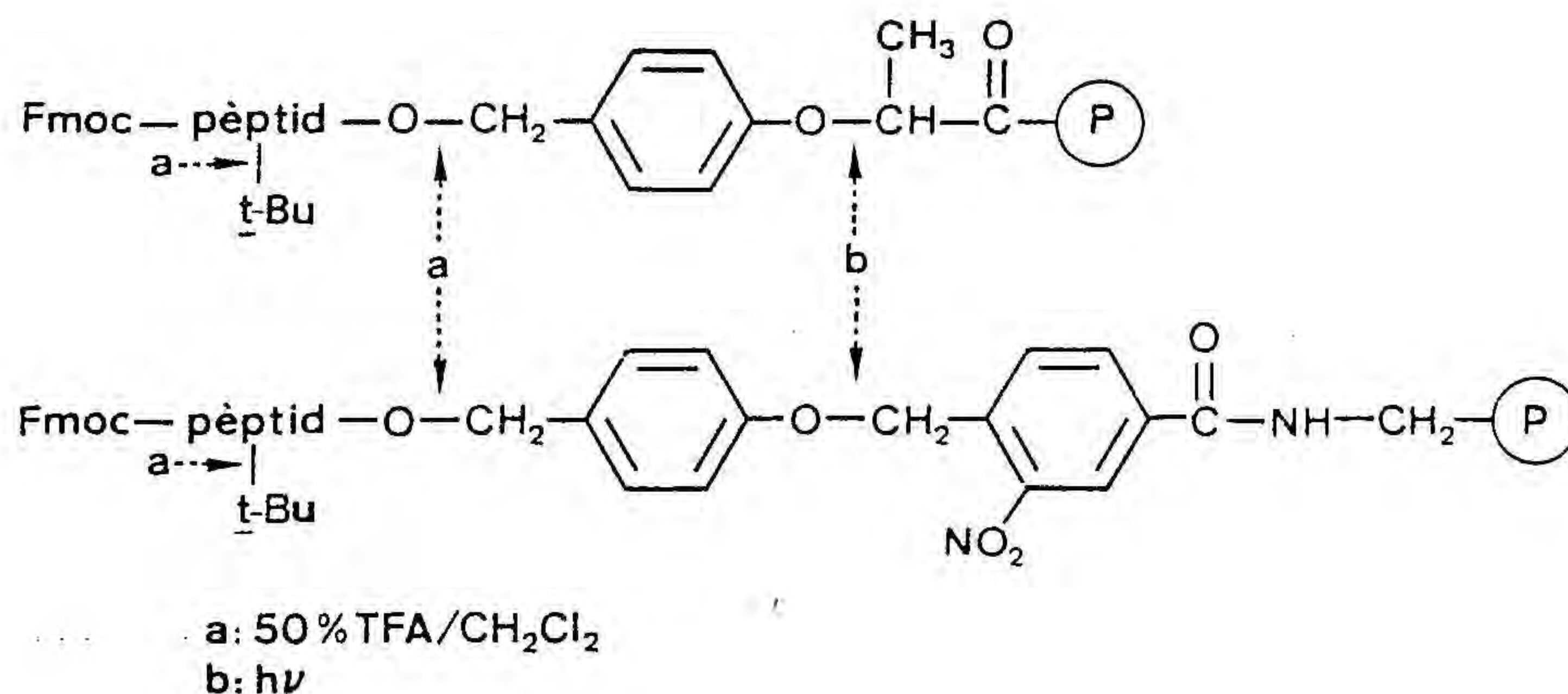
\*Amb la mateixa idea, M.Mutter i D.Bellof han desenvolupat molt recentment un nou suport polimèric que estableix entre l'aminoàcid C-terminal i la resina un enllaç d'ester de 9-fluorenilmetil, X-aa-O-Fm-CO-NH-...-(P), làbil a les bases (Helv. Chim. Acta 67, 2009 (1984) ).





Finalment, és important ressaltar que, darrerament, tant l'equip de Merrifield com el de Sheppard s'han interessat en la possible utilització de Fmoc-aminoàcids per a la síntesi de segments peptídics protegits.

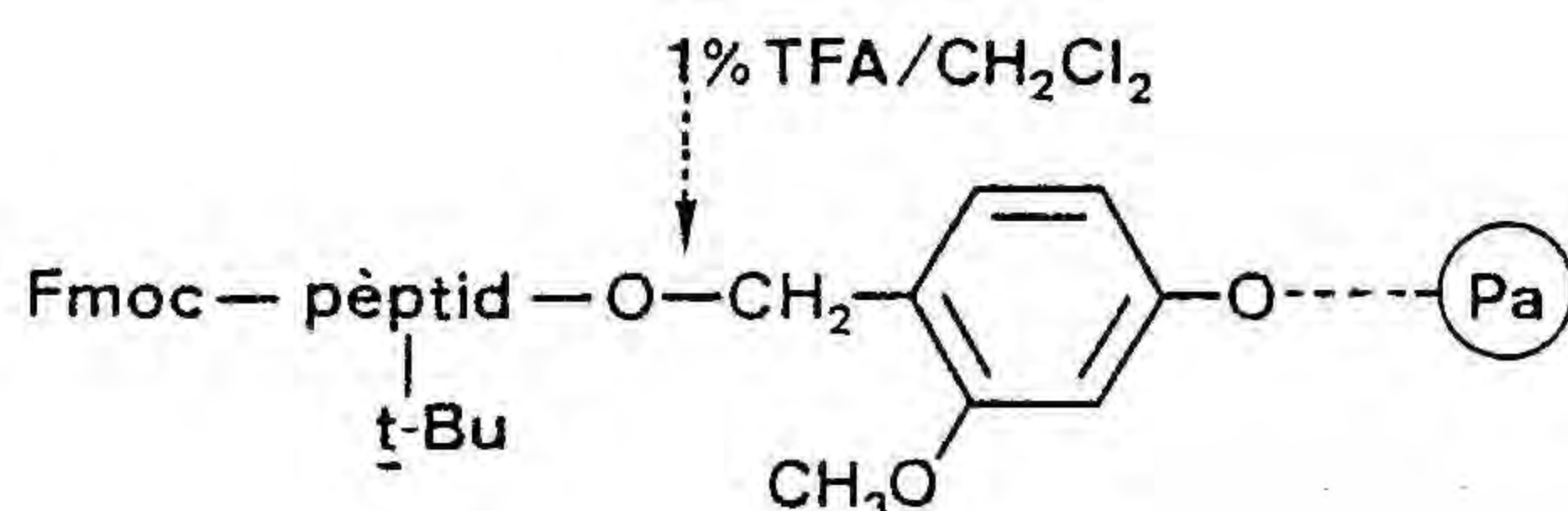
La proposta de Merrifield i col.laboradors (60) consisteix a combinar l'ús de Fmoc-aminoàcids protegits en les seves cadenes laterals amb grups tert-butil amb resines làbils a diferent reactius:



Un cop sintetitzat el pèptid, un tractament amb 50% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà permet d'obtenir el pèptid lliure (trencament als punts a), mentre que la fotòlisi de la peptidil-resina dona l'ester 4-hidroxibenzílic

del pèptid protegit. Un tractament a pH=9 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) amb  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  d'aquest darrer, proporciona el pèptid protegit amb el grup carboxil C-terminal lliure. Fins ara, únicament s'ha sintetitzat amb aquesta tàctica el tetrapèptid H-Leu-Ala-Gly-Val-OH, que no té cap aminoàcid trifuncional. D'altra banda, cal fer notar que per a obtenir el segment peptídic protegit en la forma desitjada calen dos tractaments, la fotòlisi i la desprotecció del carboxil C-terminal.

La tàctica adoptada pel grup de Sheppard (61) és la mateixa que la de Merrifield per a la protecció de les funcions  $\alpha$ -amino i les cadenes laterals, és a dir, grups Fmoc i tert-butil respectivament. Pel que fa a la matriu polimèrica (Pa), és una poliacrilàmida que estableix amb l'aminoàcid C-terminal un enllaç d'ester 2,4-dialcoxibenzílic làbil a l'1% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà.



L'inconvenient d'aquesta tàctica és la labilitat dels grups protectors de les cadenes laterals d'alguns aminoàcids a les condicions de trencament de l'enllaç pèptid-resina. Els residus que presenten més problemes són la  $\text{N}^\epsilon$ -Boc-lisina (30min de tractament àcid, en dissolució, produeixen un 7% de desprotecció) i la O-tBu-tirosina (12% de desprotecció en fase homogènia i 2.4% en fase sòlida amb el mateix tractament). Així com per la lisina la solució consisteix a canviar de grup protector, fent servir el trifluoroacetil en comptes del tert-butil, per la tirosina els autors no han proposat de moment cap alternativa.

Tal com abans hem assenyalat, l'objectiu principal d'aquesta Tesi és posar a punt una metodologia de síntesi en fase sòlida de segments peptídics protegits, la qual cosa comporta l'engalzament successiu dels

aminoàcids sobre el suport sòlid, el desencorament del pèptid de la matriu polimèrica, la purificació del crú peptídic i la caracterització final del pèptid protegit. Aquest objectiu s'ha pogut ampliar a la síntesi d'un pèptid per condensació de dos segments peptídics protegits.

En el primer capítol d'aquesta Memòria es detalla la síntesi del decapeptid luliberina a partir de dos segments de sis i quatre aminoàcids.

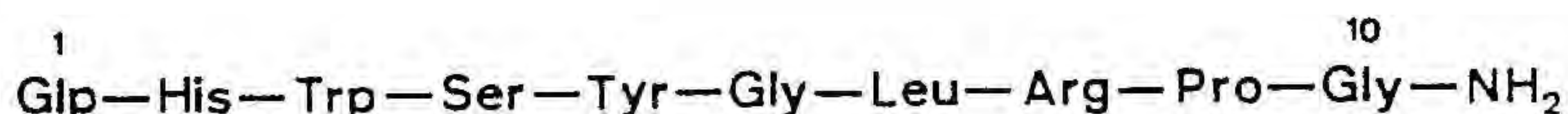
Els esforços realitzats per a obviar als problemes més importants que s'han posat de manifest en aquesta síntesi-prova, així com els resultats obtinguts, s'indiquen en el capítol segon.

En el tercer capítol, es descriu l'aplicació de la nostra tàctica de síntesi de segments peptídics protegits a l'obtenció i purificació dels segments 32-34 i 35-43 de la toxina II de l'escorpí nord-africà *Androctonus australis Hector*, polipèptid de seixanta-quatre aminoàcids reticulat amb quatre ponts disulfur.

1. SÍNTESI DEL LHRH PER CONDENSACIÓ DE DOS  
SEMENTS PEPTÍDICS PROTEGITS.

## 1.1. Introducció.

El factor alliberador de l'hormona luteïnitzant, LHRH, és un decapeptid amidat en el seu extrem C-terminal de seqüència



El LHRH fou aïllat i caracteritzat per primera vegada l'any 1971 (62, 63). Es sintetitzat a les cèl.lules nervioses de l'hipotàlam i estimula a la hipòfisi anterior la secreció de l'hormona luteïnitzant que intervé en el procés d'ovulació i secreció de progesterona a les femelles i en el de secreció de testosterona als mascles.

Diferents raons ens han dut a triar el LHRH per a fer un primer assaig de síntesi per condensació de segments peptídics protegits.

Com es pot veure, el LHRH conté dos residus de glicina, un a l'extrem C-terminal (posició 10) i un cap al mig de la seqüència (posició 6). Aixó permet de dissenyar la síntesi de dos segments peptídics protegits, 1-6 i 7-10, que no han de presentar problemes d'epimerització a l'hora de dur a terme l'engalament dels segments, doncs és ben conegut que en aquest procés, i segons el mètode que s'empra, es pot produir racemització a l'aminoàcid C-terminal del pèptid que actua com agent acilant (64).

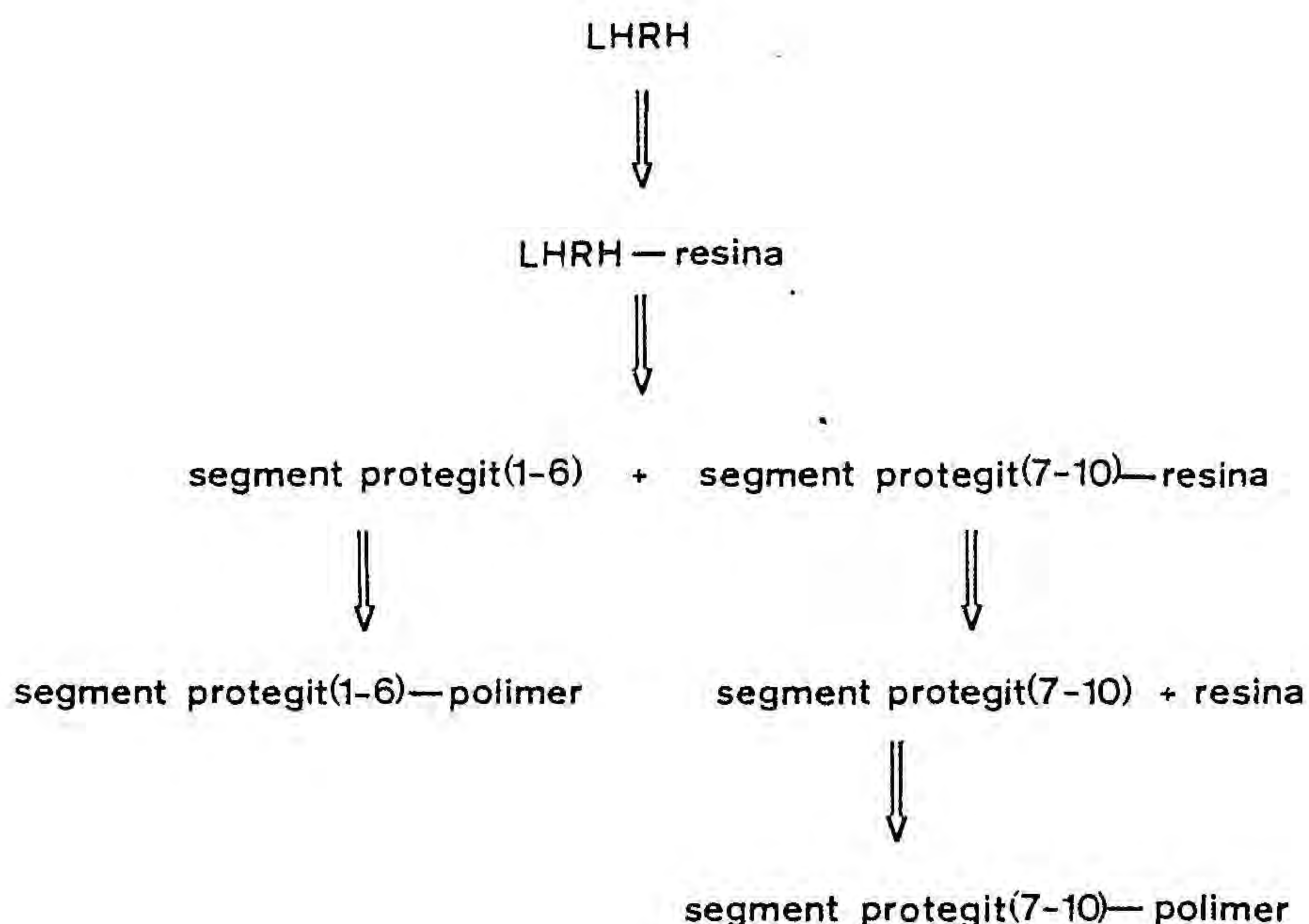
Podem veure també que el LHRH conté bastants aminoàcids trifuncionals, la qual cosa implica un grau de dificultat "elevat", però raonable, tant a la síntesi com a l'engalament dels segments peptídics protegits.

Finalment, en el moment d'engegar aquest treball, el LHRH era ja un pèptid força conegut al nostre laboratori, doncs ja s'havia dut a terme la seva síntesi en fase sòlida pas a pas i la seva purificació (65).

### 1.1.1. Disseny de la síntesi.

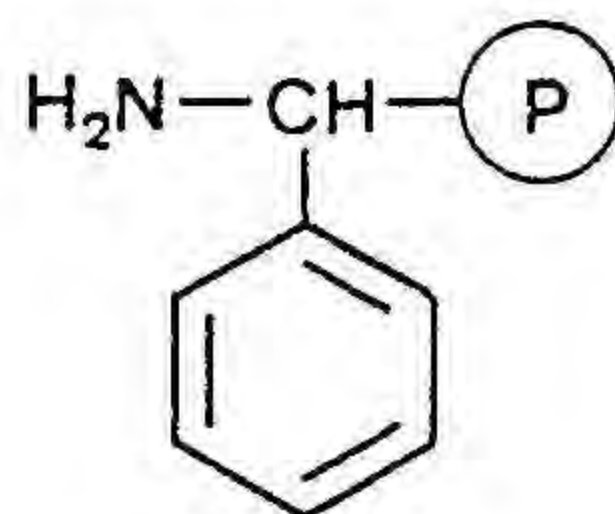
Com ja hem assenyalat a la introducció, l'estratègia que hem triat és la de síntesi convergent de pèptids duta a terme totalment en fase

sòlida, la qual cosa comporta la síntesi en fase sòlida pas a pas dels segments peptídics protegits i l'engalzament successiu d'aquests segments sobre una matriu polimèrica. Tenint en compte aquesta premisa, al següent esquema es resumeix l'anàlisi retrosintètica de l'obtenció del LHRH.



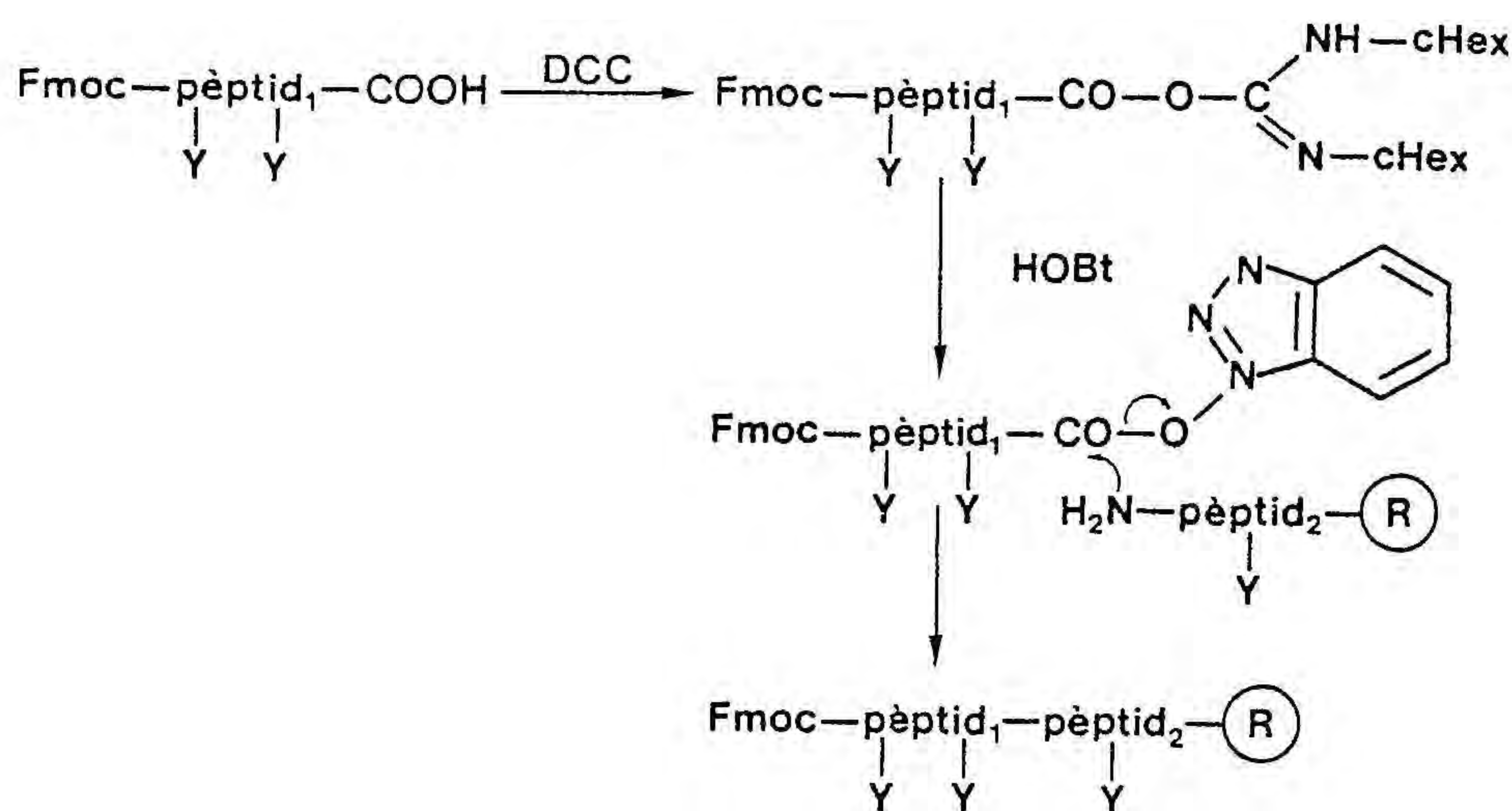
El primer punt a considerar és la matriu polimèrica sobre la qual s'han d'engalzar els segments peptídics protegits, indicada a l'esquema com a "resina" i diferenta del "polímer" que s'empra per a sintetitzar els segments.

El LHRH és un pèptid amidat en el seu extrem C-terminal. Hi ha dues alternatives per a poder obtenir un pèptid com a carboxamida C-terminal. El primer mètode que es va emprar fou sintetitzar el pèptid sobre una resina que protegís l'aminoàcid C-terminal com a ester benzílic, i formar l'amida per amonòlisi d'aquest ester. Posteriorment, Pietta i Marshall (66) van introduir l' $\alpha$ -aminobenzilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) o resina benzhidrilamina,



que permet d'obtenir el pèptid-amida per acidòlisi amb HF anhidre amb bon rendiment i evitant les reaccions secundàries que poden tenir lloc durant l'amonòlisi (3). L'engalzament dels segments 1-6 i 7-10 del LHRH s'ha dut a terme sobre una resina benzhidrilamina.

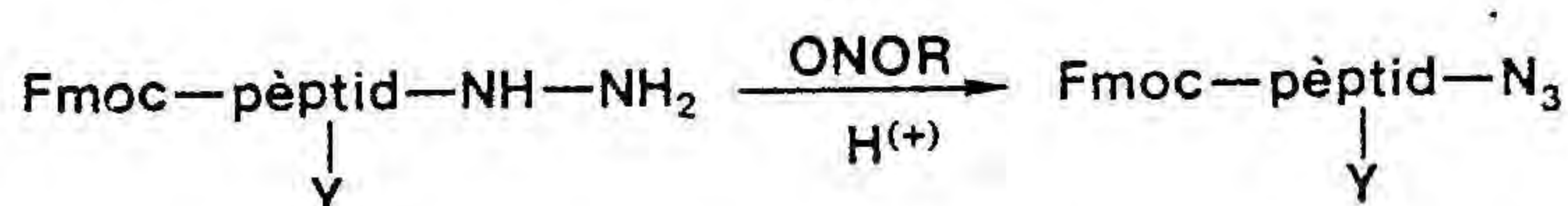
Tant l'acoblament del segment peptídic protegit 7-10 sobre l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè, com el del segment peptídic 1-6 sobre la tetrapeptidil-resina (després d'haver desprotegit l'extrem N-terminal) suposen la formació d'un enllaç amida, i es poden efectuar ambdós pel mateix mètode. La majoria d'acoblements entre segments peptídics s'han dut a terme activant el grup carboxil amb DCC i N-hidroxisuccinimida (67) o 1-hidroxibenzotriazole (68), o bé activant-lo en forma d'acil-azida (69). En el cas de l'activació amb DCC, l'agent acilant sembla ésser l'ester actiu del pèptid (succinimidil o hidroxibenzotriazolil ester), tal com es mostra al següent esquema utilitzant HOBT.



La N-hidroxisuccinimida és el primer additiu a la DCC que es va emprar per l'acoblament de segments. La reacció d'acilació tenia lloc amb rendiments correctes (70, 71) i pràcticament no hi havia racemització a l'aminoàcid C-terminal quan la reacció es duia a terme en diclorometà. Quan el dissolvent era la DMF, però, l'acoblament no estava lliure de racemització. Aquest fet és greu, ja que molt sovint els segments peptídics protegits són solubles tan sols en dissolvents com DMF, DMA i DMSO, essent la DMF un dels dissolvents més correntment emprats en l'acoblament de segments.

Els darrers anys, l'HOBt ha anat desplaçant la N-hidroxisuccinimida. La combinació DCC/HOBt és la que ha donat millors resultats en l'acoblament de segments, tant des del punt de vista de rendiments com de supressió de l'epimerització fins i tot en DMF i amb temps d'acoblament llargs (vegeu, per exemple, 17,19,72 i 73).

Pel que fa al mètode de l'azida, cal, en primer lloc, obtenir el pèptid com a hidrazida C-terminal. La hidrazida es transforma en azida per reacció amb un nitrit orgànic en un dissolvent orgànic i medi àcid a baixa temperatura (69).

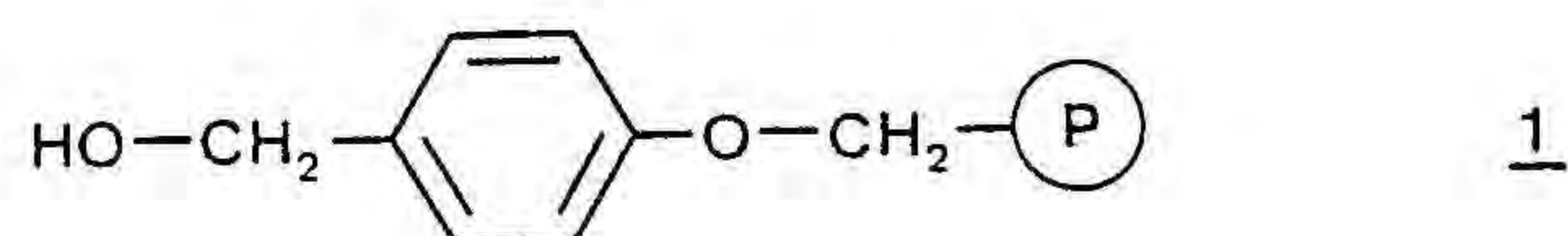


Les acil-azides són bons agents acilants, i el seu gran avantatge és el molt baix risc d'epimerització. Tot i que hi ha reaccions secundàries (74, 75) tant en l'obtenció de l'azida a partir de la hidrazida (nitrosació d'anells aromàtics, formació d'amides) com en l'acoblament entre acil-azida i amina (transposició de Curtius de l'azida a l'isocianat), aquest mètode és un dels més correntment emprats en la síntesi de pèptids, i principalment en l'engalzament de segments (15, 76 i 77).

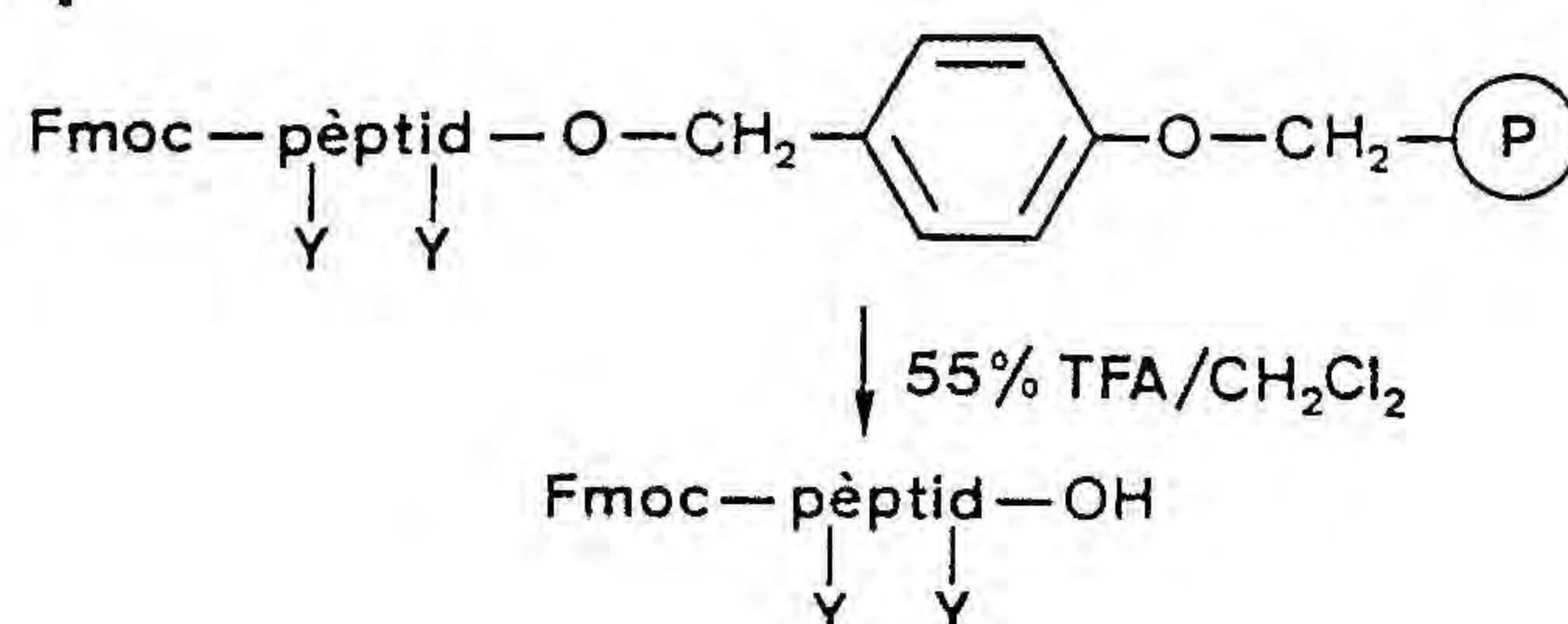
El nostre objectiu inicial ha estat dur a terme la síntesi del LHRH assajant per l'acoblament dels segments el mètode d'activació amb DCC i HOBt i el mètode de l'azida, per tal de poder-los comparar en les mateixes condicions, és a dir, en la síntesi del mateix pèptid i acoblant segments amb la mateixa seqüència. Naturalment, això també comporta comparar dos mètodes d'obtenció de segments peptídics protegits, segons hagin de tenir l'extrem C-terminal com a àcid carboxílic lliure o en forma d'hidrazida.

Hem comentat ja a la introducció que per a obtenir segments peptídics protegits en fase sòlida ha d'ésser possible desencorar el pèptid del polímer sense alterar els grups protectors de l'extrem N-terminal i de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals. Tot i que encara no hem entrat en el detall de la protecció de les cadenes laterals dels aminoàcids, hem dit que emprariem grups protectors làbils a l'HFanhidre, i que les funcions  $\alpha$ -amino les protegiriem amb el grup Fmoc, làbil a les bases. El polímer que hem triat per a sintetitzar els segments peptídics amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure és el 4-hidroximetilfenoximetil-

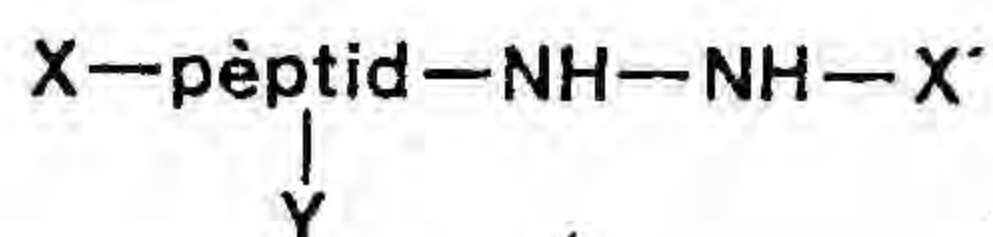




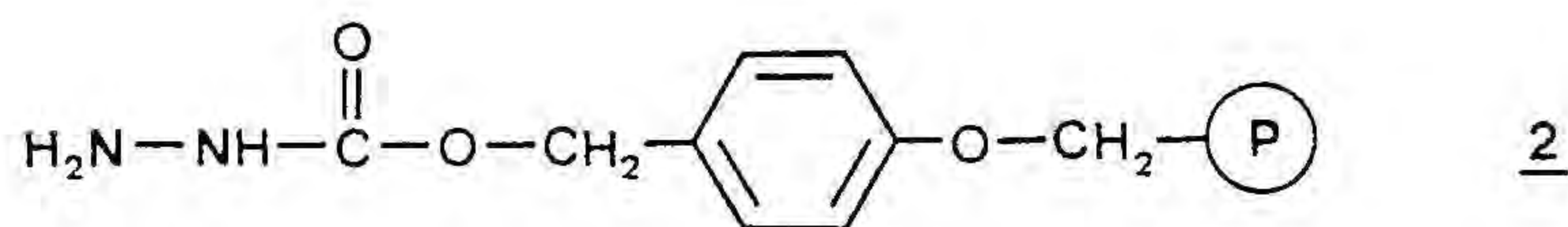
poliestirè 1 (23). L'enllaç d'ester 4-alcoxibenzílic que s'estableix entre l'aminoàcid C-terminal i la matriu polimèrica és làbil al 55% de TFA en diclorometà, condicions en les quals són estables els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids (vegeu introducció).



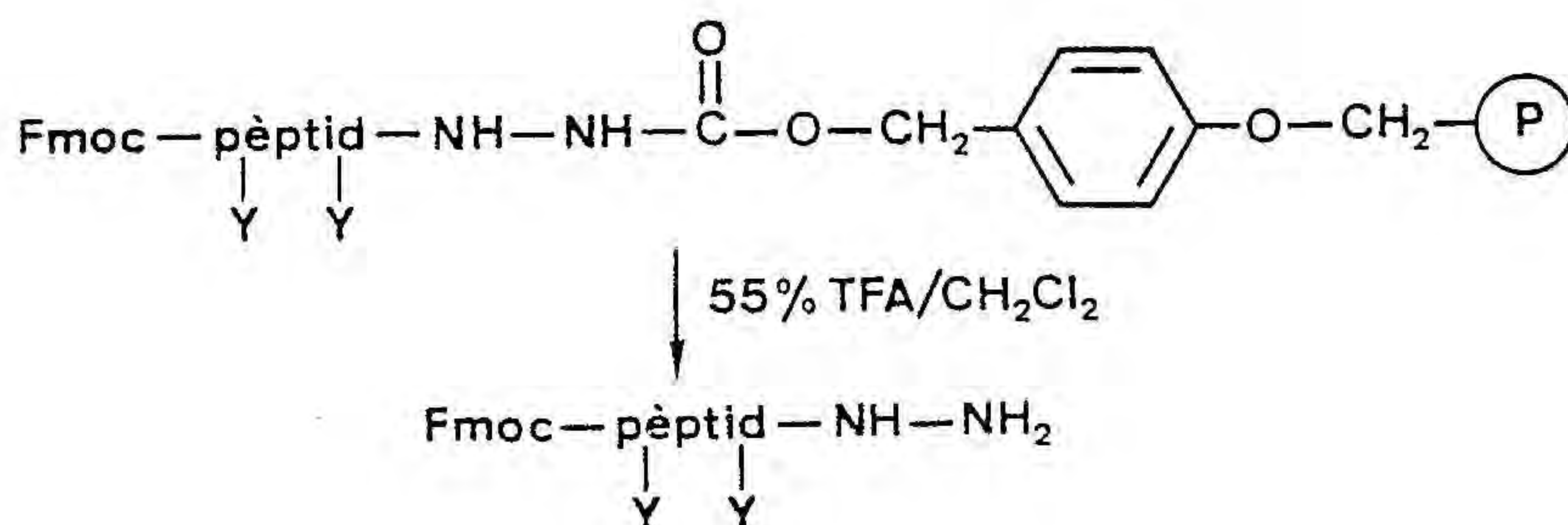
Els pèptids-hidrazida s'obtenen usualment per dos camins. El tractament amb hidrazina d'una peptidil-resina en la qual l'enllaç entre el pèptid i el polímer és d'ester benzílic dóna el pèptid en forma d'hidrazida C-terminal. Ara bé, de la mateixa manera que aquest enllaç pèptid-resina és làbil a la hidrazinòlisi, també ho són els ester benzílics que serveixen per protegir els grups  $\beta$ - i  $\gamma$ -carboxil dels àcids aspàrtic i glutàmic respectivament. S'han descrit també reaccions secundàries amb altres aminoàcids, com la  $\text{N}^{\text{G}}-\text{NO}_2$ -arginina (78, 79), la glutamina i la S-benzilcisteïna (80). L'altra alternativa és partir ja d'entrada d'una hidrazida N' protegida i sintetitzar tot el pèptid amb aquesta protecció (X').



Dels diferents suports polimèrics descrits que permeten de sintetitzar el pèptid com a hidrazida N' protegida (23, 81 i 82) nosaltres hem triat el 4-carbazoiloximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) 2, que s'obté molt fàcilment a partir de la resina 1.



Un tractament amb 55% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà permet de separar el segment peptídic protegit del polímer com a hidrazida C-terminal.



Els grups que hem emprat per a protegir les funcions  $\alpha$ -amino i les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals durant la síntesi són els següents:

#### $\alpha$ -amino

Les funcions  $\alpha$ -amino s'han protegit amb el grup Fmoc, i no és necessari protegir el que de fet és una amida secundària en l'àcid piroglutàmic.

#### Histidina

La protecció de l'anell imidazòlic de la histidina és un dels punts delicats. Es conegut que el risc de racemització de la histidina durant el procés d'acoblament (tot i estant protegida la funció  $\alpha$ -amino en forma d'uretà) és molt gran, i que l'extensió d'aquesta reacció secundària està lligada al tipus de protecció de l'anell imidazòlic (3). Els resultats descrits a la bibliografia mostren que no es produeix racemització si l'anell imidazòlic es protegeix amb un grup força atraient d'electrons (83, 84) o específicament en la seva posició  $\pi^*$  (85). Per a la síntesi del LHRH, hem optat per protegir l'imidazole amb el grup tosil, introduït per Sakakibara i Fujii l'any 1969 (83) i correntment emprat amb èxit a la síntesi de pèptids en fase sòlida.

#### Triptofan

L'anell indòlic del triptofan no s'ha protegit. El triptofan és làbil a l'oxidació per l'oxigen atmosfèric en medi àcid, i pot experimentar reac-

\*La nomenclatura  $\pi$  i  $\tau$  dels nitrogensimidazòlics de la histidina és la recomanada per la Comissió Conjunta de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB(86).

cions d'alquilació (87) sobretot quan les funcions  $\alpha$ -amino estan protegides amb grups làbils als àcids, de manera que en el tractament àcid de l'etapa de desprotecció es formen carbocations que poden actuar com agents alquilants. En el nostre cas, com que utilitzem un grup protector de les funcions  $\alpha$ -amino làbil a les bases, només hem hagut de prendre les precaucions necessàries per a evitar reaccions secundàries sobre el triptofan en el tractament àcid final (TFA) que separa el pèptid protegit de la resina (vegeu 1.2.4.A).

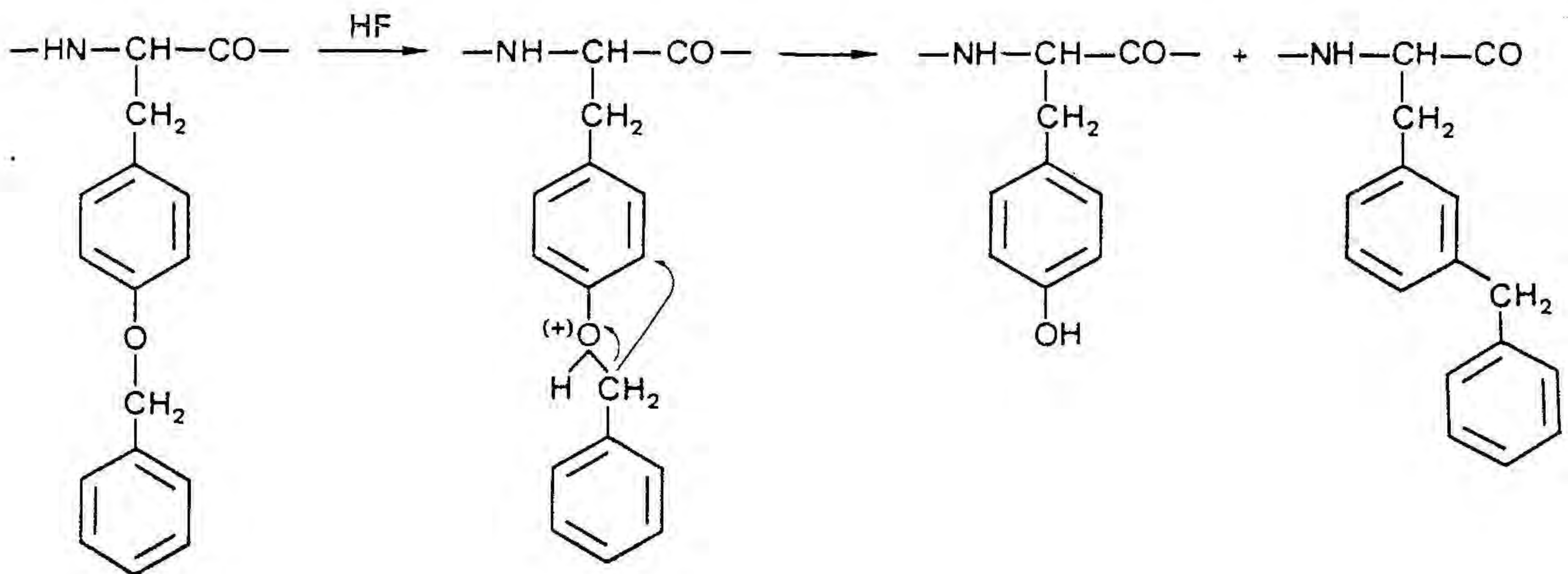
#### Serina

Alguns autors deixen sense protegir la cadena lateral de la serina, opció que va molt lligada al tipus d'activació del carboxil C-terminal per les reaccions d'acoblament. Això només és possible quan l'aminoàcid s'acobla com a ester actiu (88 a 90) o un segment peptídic que el conté com a acilazida, és a dir, quan els agents acilants són prou febles com per no acilar fàcilment grups hidroxil (10, 15, 76 i 91). En el nostre cas, ja que els acoblaments, com veurem més endavant, s'efectuen amb l'anhidrid simètric preformat, per tal d'evitar possibles reaccions secundàries el grup hidroxil de la serina s'ha protegit com a benzil èter (92), d'acord amb la tàctica més habitual a la metodologia de síntesi en fase sòlida.

#### Tirosina

La protecció de l'hidroxil fenòlic de la tirosina és un altre punt conflictiu. Igual que per la serina, es pot deixar sense protegir dins de la tàctica de mínima protecció, duent a terme els acoblaments amb esters actius o acilazides, cas que no és el nostre.

S'han assajat molts tipus de protectors per la tirosina, però els més usuals són els grups benzil. El grup benzil sense cap substituent està totalment desaconsellat per dues raons diferents (93). En primer lloc és poc estable als àcids, de manera que caldria esperar una certa desprotecció en l'etapa d'acidòlisi amb TFA (de l'ordre d'un 2.3%/h). D'altra banda, durant el tractament amb HF anhidre per a obtenir el LHRH lliure, es pot produir alquilació de la tirosina en la posició 3 de l'anell benzènic, per transposició intramolecular del catió benzil que s'allibera en trencar el benzil èter. L'extensió d'aquesta reacció secundària és de l'ordre del 15%.

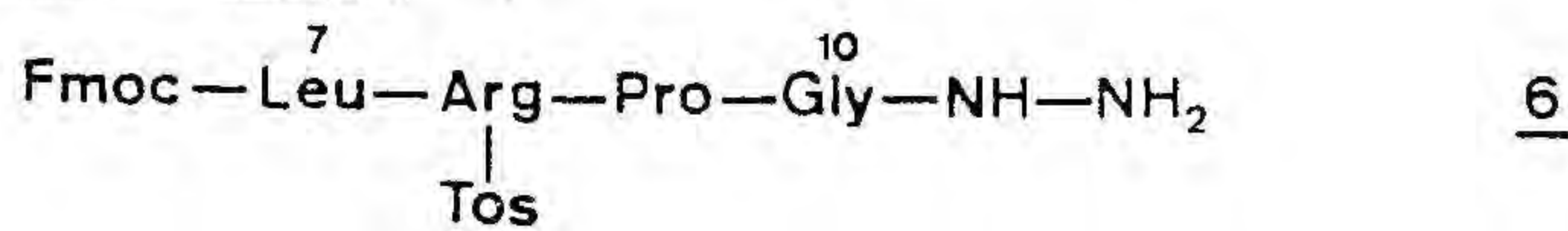
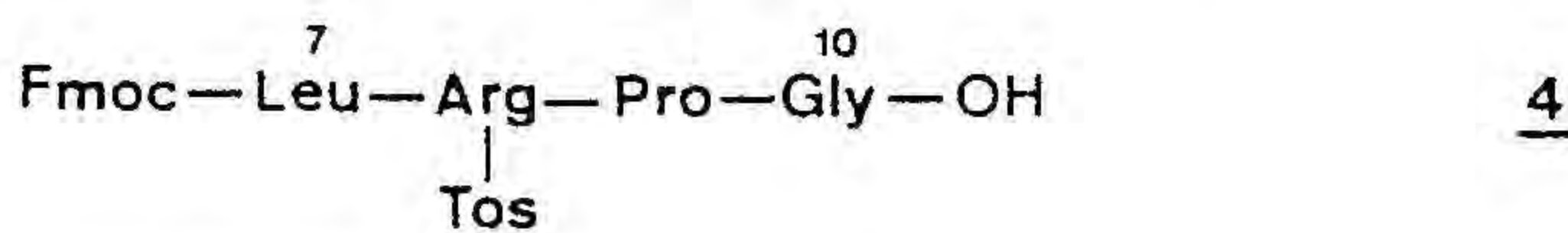
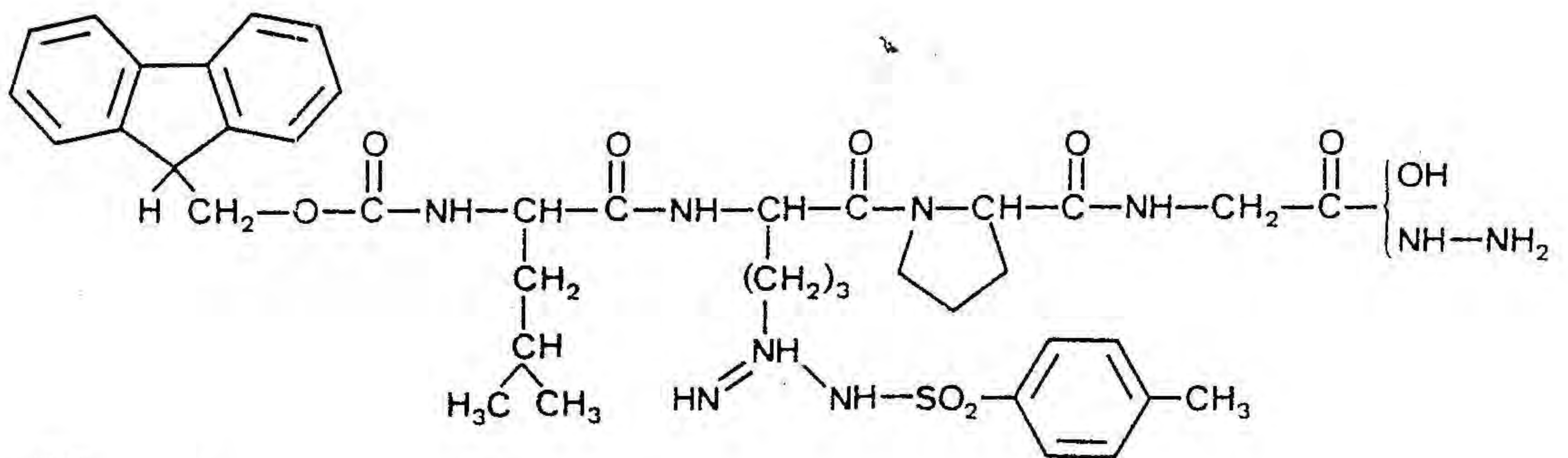
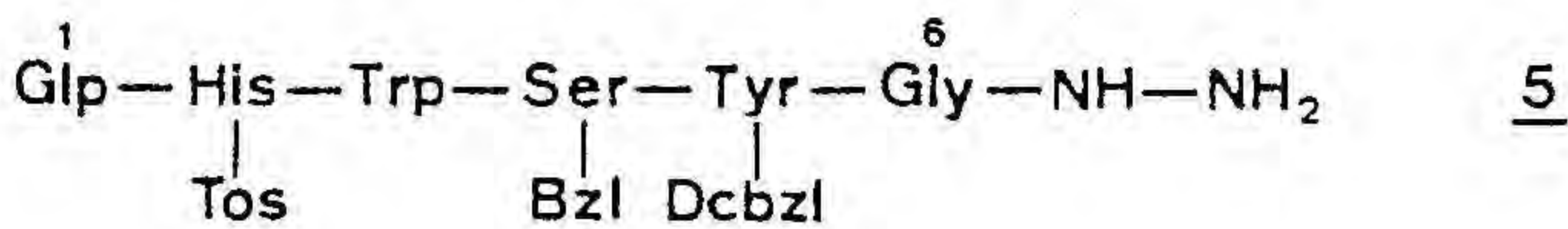
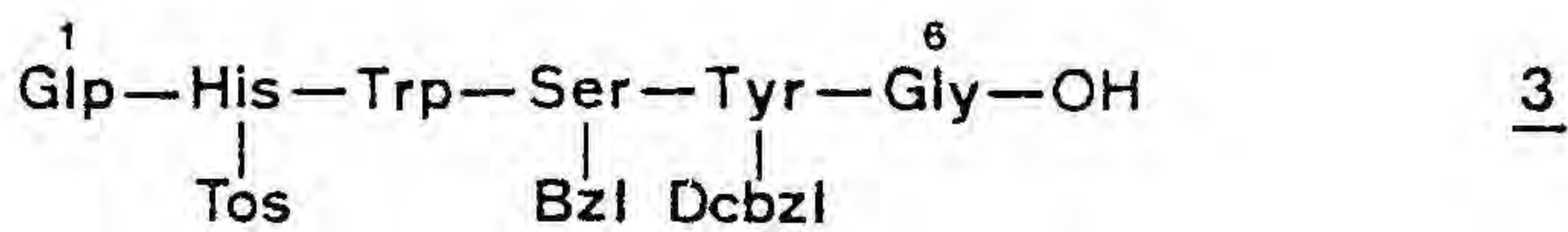
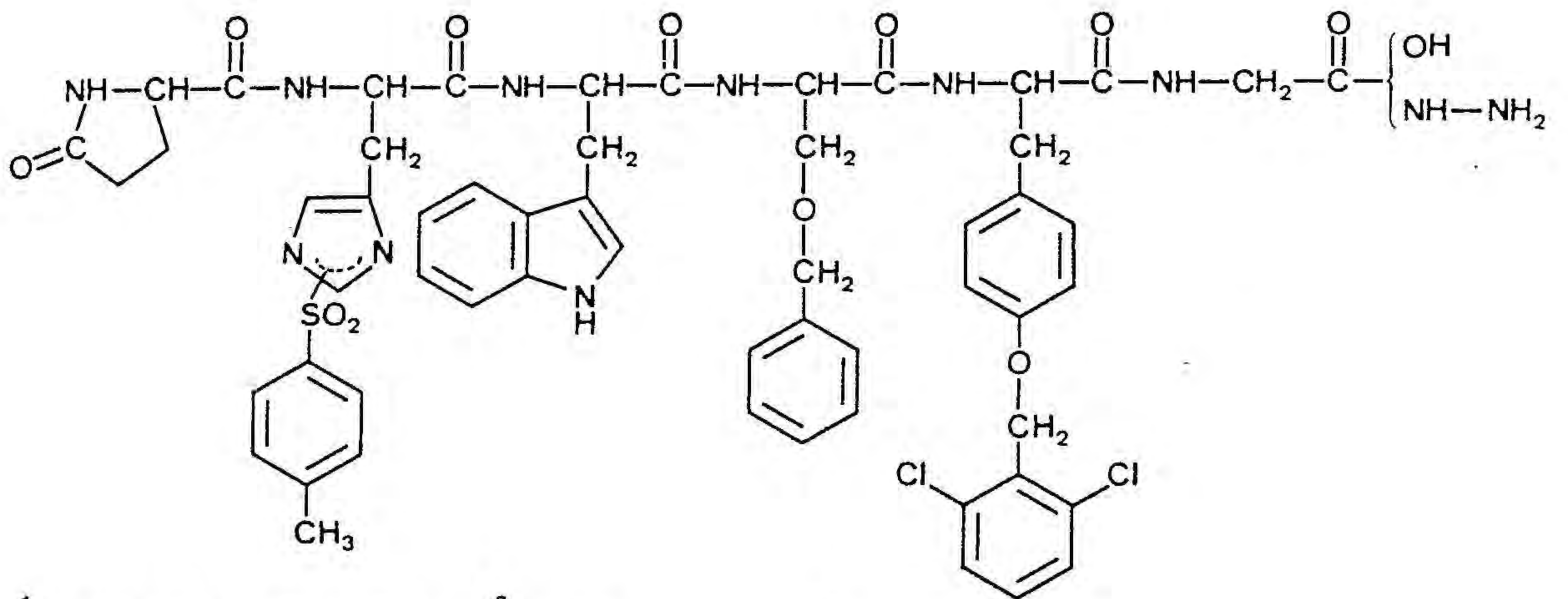


Posteriorment, es va descriure el grup protector 2,6-diclorobenzil (93 i 94), suficientment estable als àcids i amb el qual l'extensió de l'alquilació intramolecular quedava reduïda aproximadament a un 5%, si bé en síntesis dutes a terme en el nostre laboratori (95) s'ha observat que l'extensió d'aquesta reacció secundària depen també de la seqüència del pèptid. La protecció de l'hidroxil fenòlic de la tirosina per a la síntesi del LHRH s'ha efectuat, doncs, amb el grup 2,6-diclorobenzil.

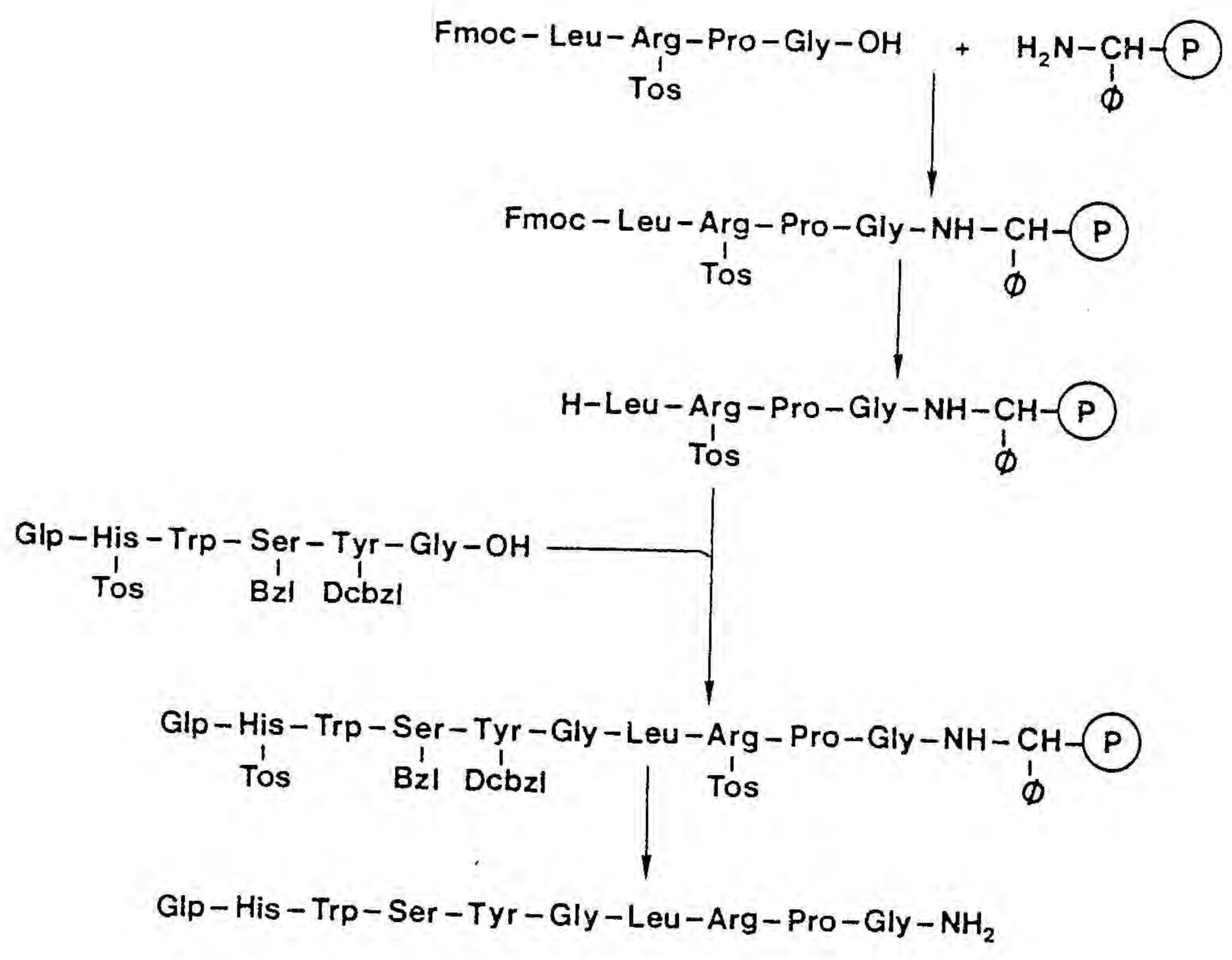
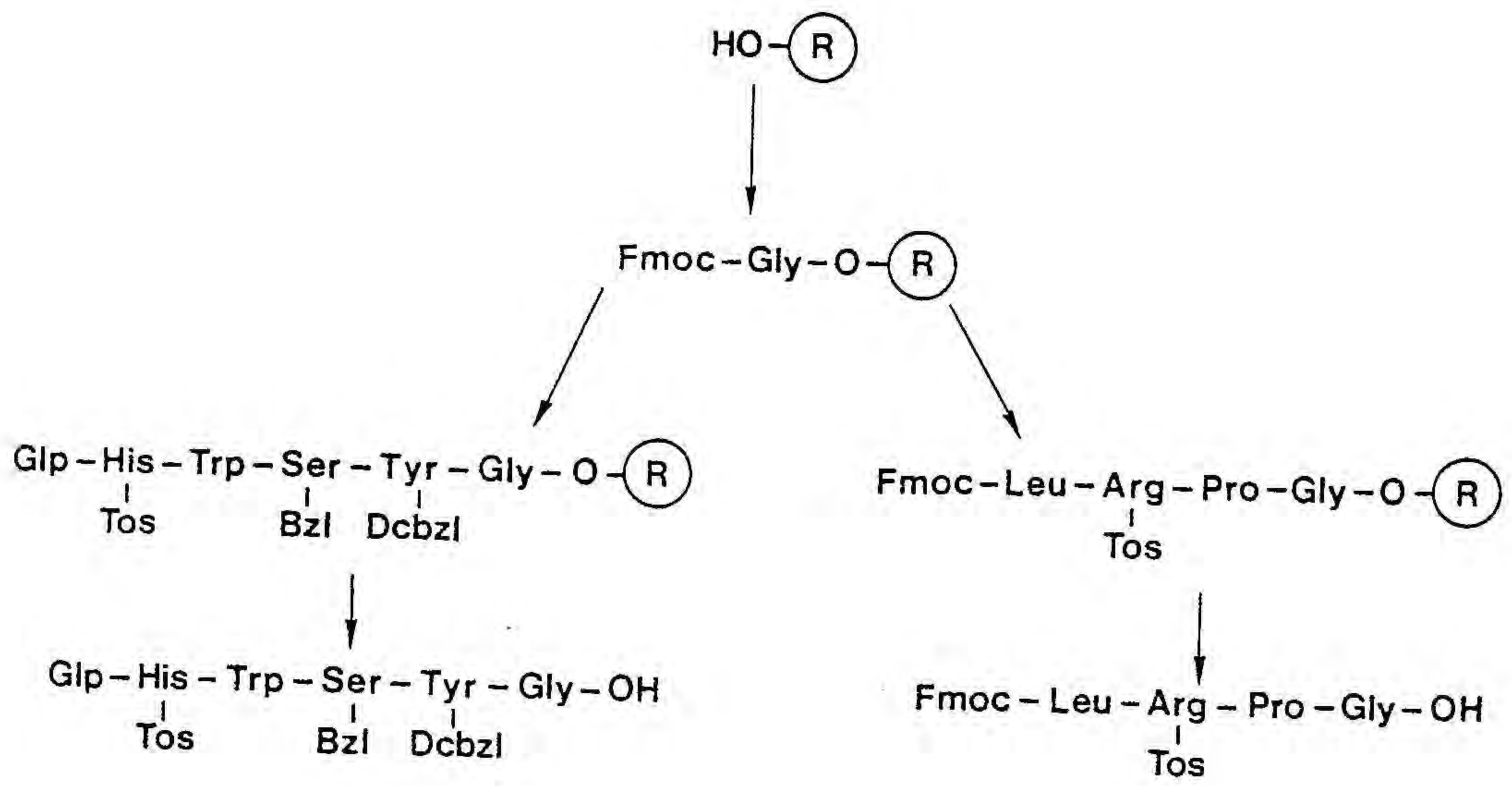
#### Arginina

La funció guanidino de la cadena lateral de l'arginina s'ha protegit amb el grup tosil (96), làbil a l'àcid fluorhídric anhidre, i que s'ha consolidat com al protector més correntment emprat a la síntesi en fase sòlida.

En resum, ens hem proposat de sintetitzar els segments peptídics corresponents a les seqüències 1-6 (N-terminal) i 7-10 (C-terminal) del LHRH, en forma d'àcid carboxílic i d'hidrazida, les estructures dels quals s'indiquen a continuació:



Per acabar, a la figura de la pàgina següent es mostra el resum del procés global de síntesi del LHRH, emprant els segments amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure.



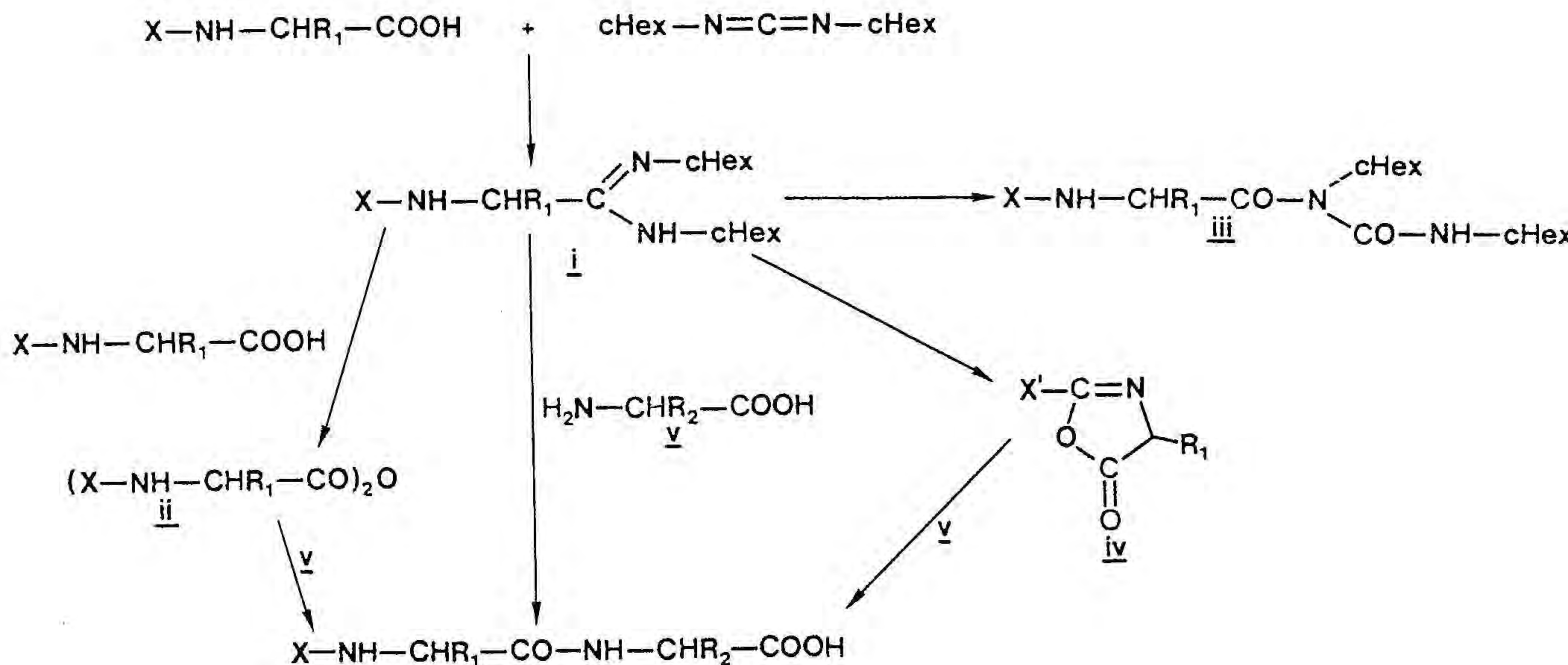
### 1.1.2. Consideracions generals sobre la metodologia de síntesi amb Fmoc-aminoàcids.

L'ancorament de l'aminoàcid C-terminal als suports sòlids 1 i 2 és diferent en cada cas, i es descriu a les seccions 1.2.2 i 1.4.2. Un cop ancorat l'aminoàcid C-terminal a la resina, cal procedir a l'engal·lament successiu dels altres aminoàcids. Cada cicle d'incorporació d'un residu suposa: 1) desprotecció de la funció  $\alpha$ -amino, 2) rentats, 3) acoblament del següent aminoàcid, 4) rentats i 5) control de l'acoblament.

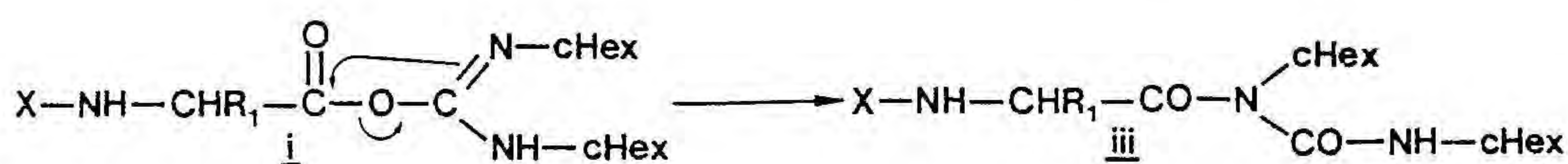
La desprotecció de les funcions  $\alpha$ -amino s'ha efectuat mitjançant un tractament de 30min amb 50% de piperidina en diclorometà. Aquesta dissolució de piperidina s'ha de preparar cada vegada just abans d'emprar-la, ja que al cap de poc temps d'haver barrejat la base i el dissolvent (1-2h) apareixen cristalls d'hidroclorur de piperidini. Les agulles que es formen són d'hidroclorur de piperidini i no d'hidroclorur de N-clorometil piperidini com hem comprovat per punt de fusió, ressonància magnètica nuclear i espectrometria de masses.

Les determinacions espectrofotomètriques (a  $\lambda=301\text{nm}$ ) de la quantitat de Fmp formada a cada etapa de desprotecció és convenient de fer-les totes en condicions el més semblants possible, per tal de tenir resultats reproduïbles. Convé també de fer-les el més ràpidament possible, per tal d'evitar la formació de cristalls d'hidroclorur de piperidini en els filtrats. Totes les quantificacions s'han dut a terme per mesura de l'absorbància a 301nm, que encara que no correspon al més alt dels màxims d'absorció de la Fmp (267nm,  $\epsilon=17500$ ; 290nm,  $\epsilon=5800$ ; 301nm,  $\epsilon=7800$ ) (39) és el que presenta menys interferències amb els reactius i els dissolvents emprats a la desprotecció (piperidina, DMF).

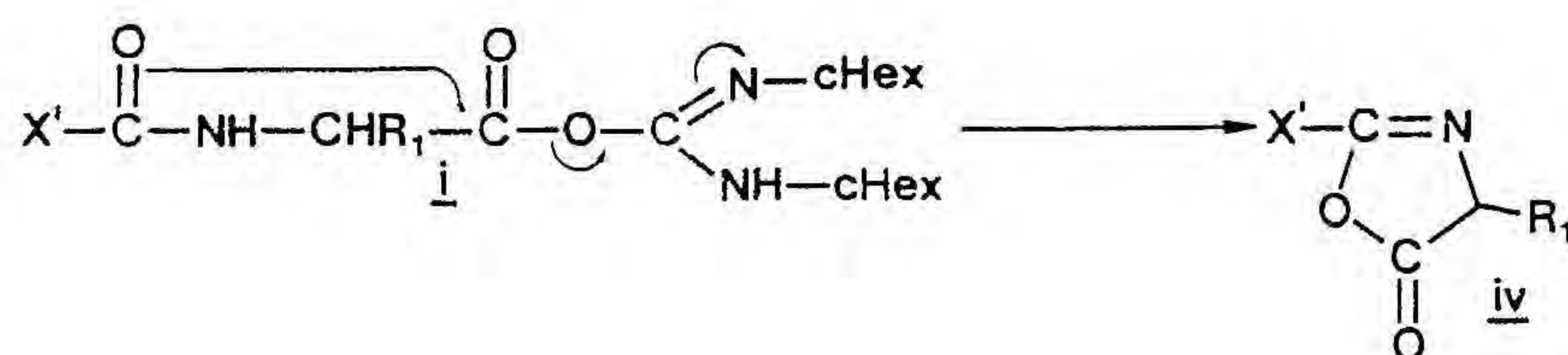
Els aminoàcids s'han acoblat com a anhídrids simètrics, que es preformen just abans de l'acoblament per reacció de 2mols d'aminoàcid i 1mol de DCC (97). Als articles de revisió sobre el mecanisme de la reacció entre un àcid carboxílic i una carbodiimida (98, 99) es posa de manifest que la reacció és molt complexa. El primer intermedi que es forma, la O-acilisourea i, és molt reactiu, i pot evolucionar de maneres molt diferents segons el dissolvent emprat, la concentració i l'estequiometria dels reactius, i la presència en el medi d'àcids o bases.



La transposició intramolecular a N-acilurea iii és una reacció secundària que provoca la disminució d'agent acilant, i està afavorida en dissolvents d'elevada constant dielèctrica (DMF, CH<sub>3</sub>CN, DMSO, H<sub>2</sub>O).



La oxazolona iv es forma per ciclació intramolecular de la O-acilisourea i, i és susceptible de reaccionar amb una amina per formar un enllaç peptídic.

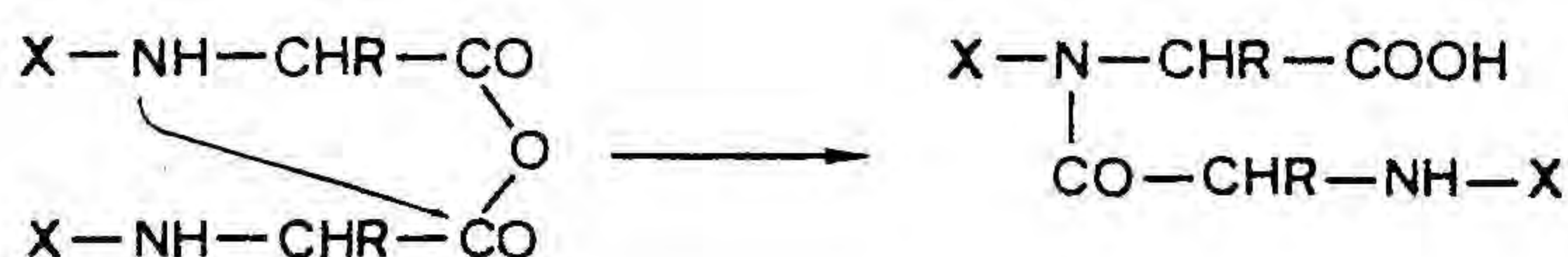


El problema de la formació de l'oxazolona és que es produeix racemització al C- $\alpha$  de l'aminoàcid, de manera que, després de reaccionar amb un altre aminoàcid, s'obtenen dos pèptids diastereoisomèrics. Tanmateix, la ciclació a oxazolona està desafavorida quan la funció  $\alpha$ -amino està protegida com a carbamat.

Pel que fa a la formació de l'anhídrid simètric, inicialment es creia que tenia lloc quan la proporció aminoàcid/DCC és 1/1, perquè l'aminoàcid reacciona més ràpidament amb la O-acilisourea que amb la carbo-



diimida (100, 101). Ara bé, l'estudi per  $^1\text{H-RMN}$  de la reacció mol a mol entre benziloxocarbonil-L-valina i diisopropilcarbodiimida en el si de  $\text{CDCl}_3$  (102), mostra que, en aquestes condicions, l'única espècie present en el medi és la O-acilisourea que es mantén inalterada durant 9h. No és evident, doncs, quin és realment l'agent acilant, ni tan sols si és un únic agent, quan l'acoblament es du a terme amb una relació equimolar d'aminoàcid i carbodiimida. En qualsevol cas, suposant que aquesta estequiometria condueixi a l'anhídrid simètric, no sembla aconsellable d'efectuar acoblaments durant temps molt llargs, ja que la DCC, que és lleugerament bàsica i restaria en excés, pot catalitzar la descomposició de l'anhídrid simètric via acilació intramolecular



donant lloc a un dipèptid que pot ésser activat i ancorat en comptes del monòmer desitjat (103). Tanmateix, aquesta reacció secundària que té lloc preferiblement quan l'aminoàcid que s'activa està poc impedit estèricament és pràcticament negligible en les condicions usuals de síntesi de pèptids en fase sòlida (103, 104).

A la vista d'aquests resultats, el mètode d'acoblament triat és el de l'anhídrid simètric, preformat a partir de 2mols d'aminoàcid i 1mol de DCC. Amb això s'evita que hi hagi O-acilisourea en el medi de reacció, intermedi molt reactiu que, com hem vist pot donar reaccions secundàries la més perjudicial de les quals és la ciclació intramolecular a oxazolona amb la consegüent racemització en l'aminoàcid que s'acobla. Els acoblaments s'han dut a terme en la mínima quantitat de dissolvent possible, per tal d'augmentar al màxim la concentració en el medi d'agent acilant i aconseguir que l'acoblament sigui més ràpid. El temps d'acoblament ha sigut d'una hora, i a mig acoblament hem addicionat un equivalent d'EDIA que, d'acord amb la literatura (39), serveix per "regenerar" amines lliures sobre la resina parcialment protonades pel mol d'àcid carboxílic alliberat per mol d'anhídrid que ha reaccionat. Aquesta amina terciària, estèricament molt impedida, no desprotegeix les funcions  $\alpha$ -amino en aquestes condicions de reacció, perquè la seva concentració en el medi és molt baixa i el temps de contacte amb el Fmoc-aminoàcid o Fmoc-pèptid és relativament curt. Les

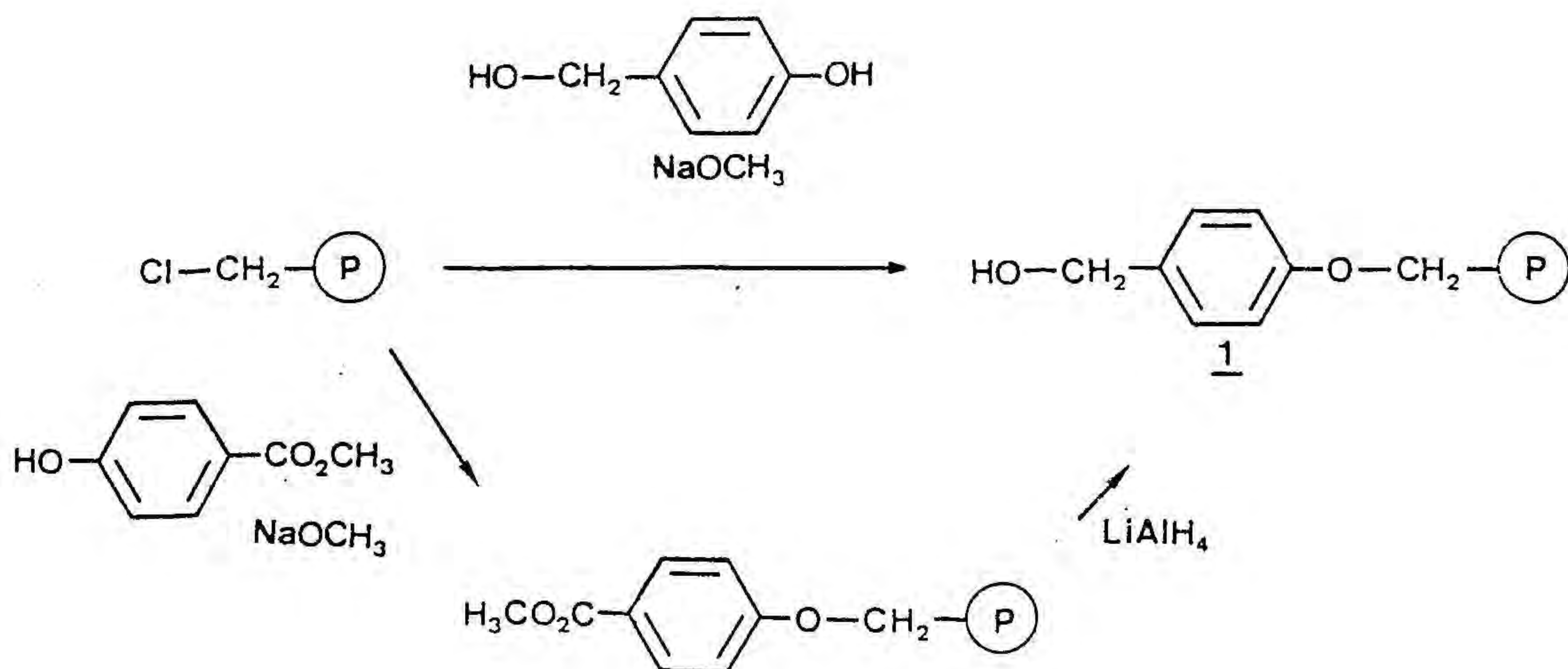
dades descrites a la literatura indiquen que un Fmoc-aminoàcid resta inalterat durant el temps d'acoblament en presència d'una concentració baixa d'EDIA ( $\leq 1\%$  v/v) (105).

El control de l'extensió de l'acoblament, o, dit d'una altra manera, la comprovació de si després de l'acoblament queden grups amino lliures sobre la resina, s'ha fet mitjançant els assaigs de la ninhidrina (106) i/o la fluorescamina (107), que detecten quantitats de l'ordre de  $5\mu\text{mol}$  i  $0.6\mu\text{mol}$  de grups amino per g de resina respectivament. Cap d'aquests dos reactius permet la detecció d'amines secundàries lliures sobre el polímer (cas de la prolina), i en el moment de començar aquest treball no es disposava de cap altre mètode alternatiu per a poder controlar acoblaments sobre prolina.

## 1.2. Síntesi dels segments peptídics Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH 3 i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-OH 4.

### 1.2.1. Síntesi del suport sòlid 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) 1.

A la literatura s'han descrit dos camins alternatius per sintetitzar el 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè 1 a partir de clorometilpoliestirè (23), que s'indiquen al següent esquema:



Tot i que sembla més atractiva la síntesi en un sol pas, per més curta, varem triar la síntesi en dues etapes perquè l'autor assenyala que quan s'efectua la substitució nucleòfila directament sobre l'alcohol 4-hidroxibenzílic, el rendiment és una mica inferior que per l'altre camí, ja que es detecten més grups clorometil que no han reaccionat sobre el polímer.

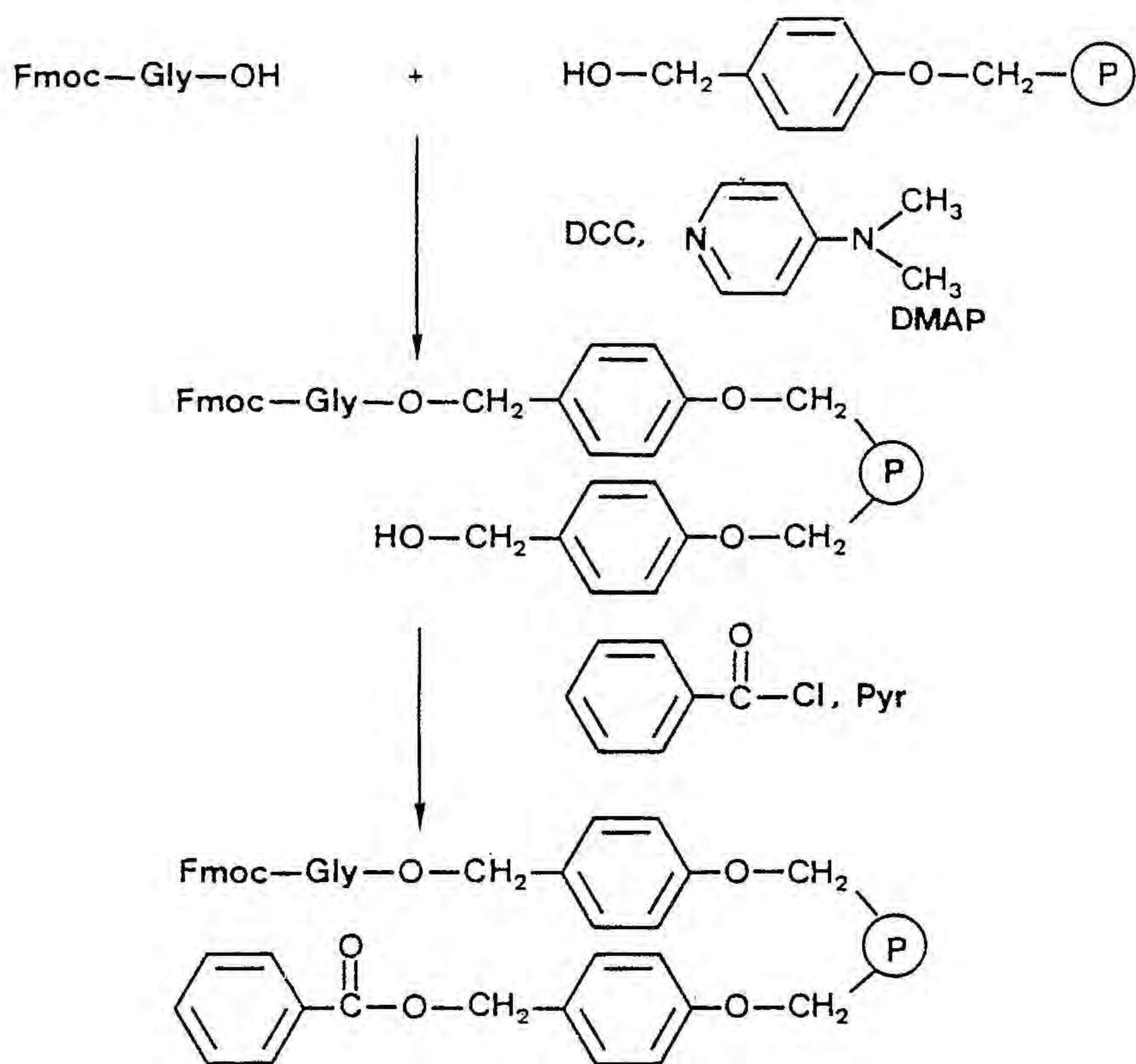
El primer pas és una substitució nucleòfila amb 4-hidroxibenzoat de metil i metòxid sòdic, base amb la qual la possible transesterificació torna a donar el mateix producte de partida. La segona etapa de la síntesi és la reducció de l'ester a alcohol amb tetrahidrur d'alumini i liti.

Hem dut a terme aquesta seqüència de reaccions partint de clorometilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) comercial. Després del primer pas, s'han detectat tan sols traces de Cl per anàlisi elemental. La reducció de l'ester no ha sigut quantitativa, perquè per espectroscòpia infrarroja es comprova que no ha desaparegut del tot la banda de carbonil. Tanmateix, no sembla que una petita quantitat d'ester sobre la resina pugui ésser perjudicial per a la síntesi.

#### 1.2.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid 1.

L'acoblament de l'aminoàcid C-terminal, Fmoc-Gly-OH, dels segments peptídics 3 i 4 al 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè 1 s'ha efectuat segons el mètode descrit a la literatura per Meienhofer i cols. (39), esterificant l'alcohol polimèric (resina) amb Fmoc-Gly-OH, DCC i 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (108, 109). L'addició de la DMAP és fonamental per aconseguir un bon rendiment, ja que, en general, en les reaccions d'esterificació emprant només DCC els rendiments són baixos i es poden produir reaccions secundàries (110).

Posteriorment, els grups hidroxil que han quedat sense reaccionar s'han bloquejat per tractament amb clorur de benzoil i piridina, per tal d'impedir que s'hi puguin ancorar altres aminoàcids en els acoblaments posteriors, fet que conduiria al final de la síntesi a un producte molt poc homogeni.



Abans de continuar la síntesi s'ha determinat el grau de substitució (f) de la Fmoc-glicil-resina per tres mètodes:

- a partir del % de N determinat per anàlisi elemental d'una mostra de Fmoc-glicil-resina
- per desprotecció d'una alíquota de Fmoc-glicil-resina amb piperidina i quantificació per espectroscòpia ultraviolada de la N-(9-fluorenilmetil)piperidina (Fmp) formada.
- un cop desprotegida la funció  $\alpha$ -amino, quantificació dels grups amino lliures que hi ha sobre la resina per valoració espectrofotomètrica amb àcid pícric (mètode de Gisin) (111).

Els resultats obtinguts s'indiquen a la següent taula:

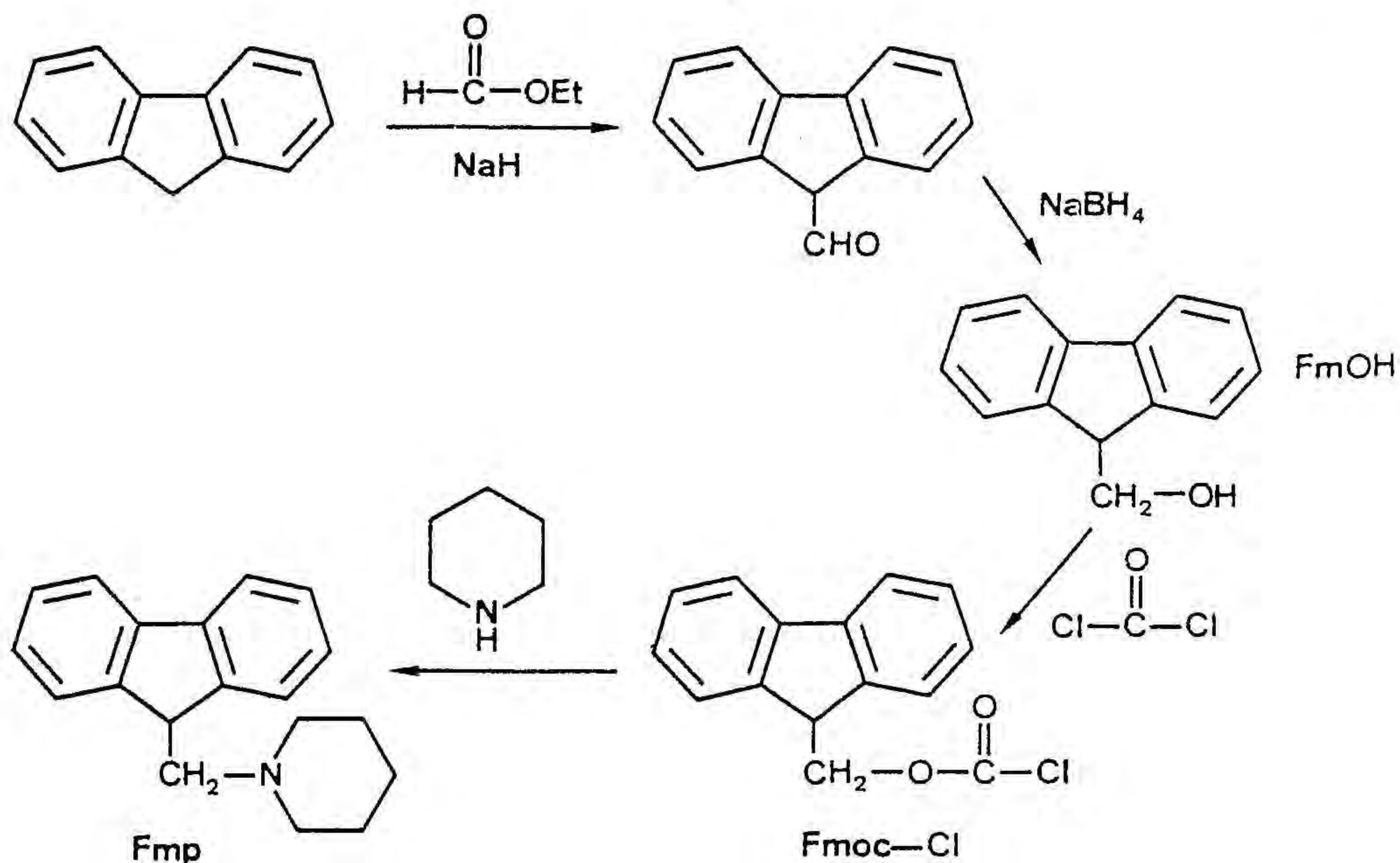
Mètode analític	$f\left(\frac{\text{mmol}}{\text{g Fmoc-Gly-resina}}\right)$
a) Anàlisi elemental N	0.38
b) UV Fmp	0.37
c) Gisin	0.34

Tal com es pot observar, els valors determinats de f són força concordants entre si, dins de l'ordre d'error dels mètodes analítics emprats.

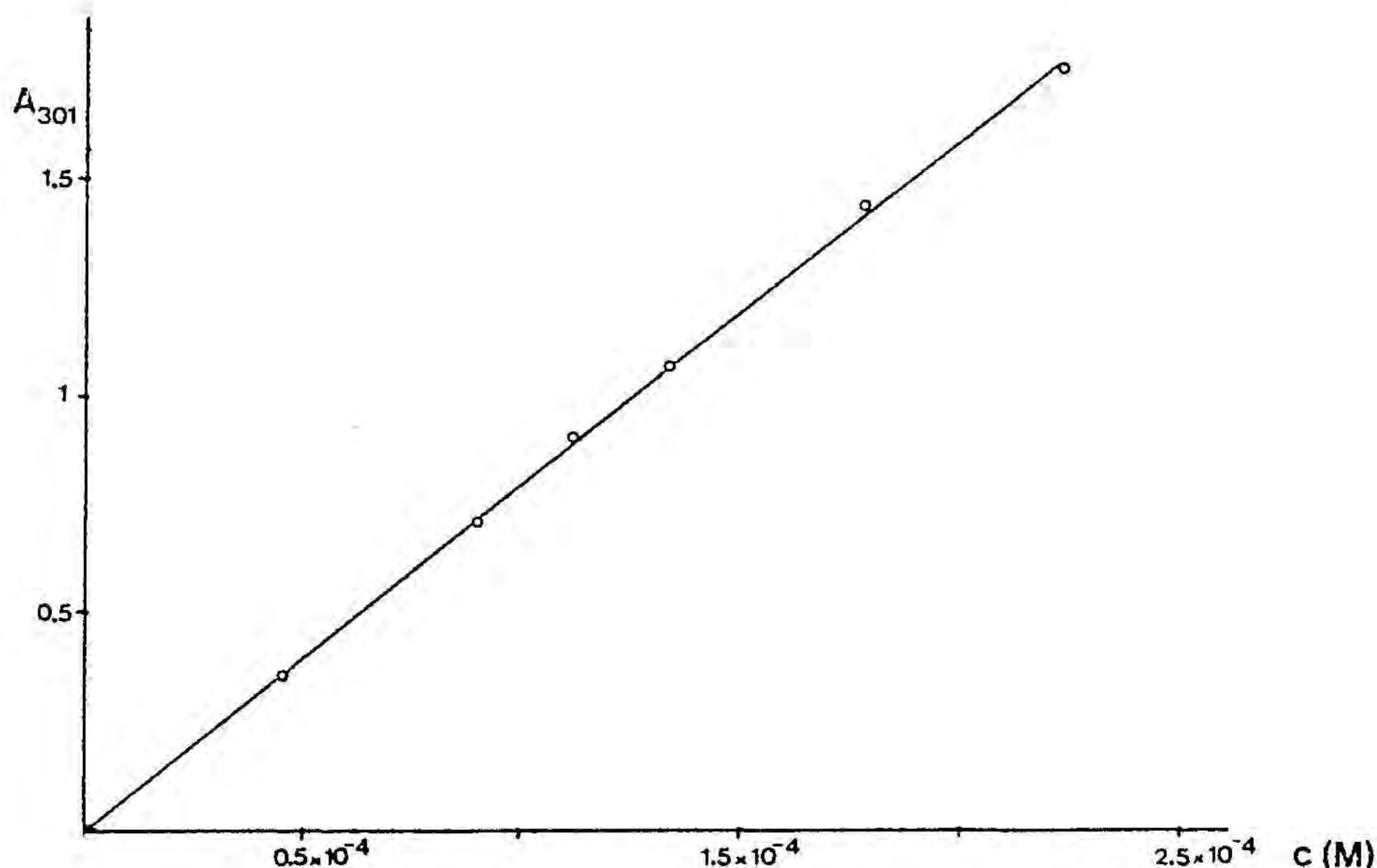
Ara bé, perquè la quantificació sigui fiable pels mètodes b i c, ha sigut necessari fer dues comprovacions:

- i) mètode b: calia saber dins de quin marge de concentracions de Fmp es compleix la llei de Beer i Lambert
- ii) mètode c: calia comprovar l'estabilitat a l'àcid pícric de l'enllaç pèptid-resina, perquè ja hem dit que aquest enllaç és làbil als àcids (TFA)

i) En primer lloc s'ha procedit a sintetitzar la N-(9-fluorenilmetil)piperidina fent reaccionar cloroformiat de 9-fluorenilmetil amb piperidina, anàlogament al mètode emprat per Carpino i Han (22), que obtenen la Fmp per tractament amb piperidina de la 9-fluorenilmetoxicarbonilànilina. El cloroformiat de 9-fluorenilmetil s'ha preparat per reacció del 9-fluorenilmetanol amb foscè (22). El 9-fluorenilmetanol s'ha obtingut a partir del fluorè en dues etapes: en primer lloc el fluorè es formila en posició 9 per reacció amb formiat d'etil i hidrur sòdic, i el 9-formilfluorè (que no s'aïlla) es redueix a alcohol amb borohidrur sòdic (112).



Per determinar dins de quin marge de concentració de Fmp es compleix la llei de Beer i Lambert, s'han preparat dissolucions de concentració diferent de N-(9-fluorenilmetilpiperidina), i de cada una d'elles s'ha enregistrat l'espectre ultraviolat. A la següent figura es representen els valors de les absorbancies a 301nm enfront de la concentració molar de les respectives dissolucions.



Tal com podem observar, a la longitud d'ona a la qual normalment es quantifica Fmp (301nm), la llei de Beer i Lambert es compleix per dissolucions de concentració menor o igual a  $1.7 \cdot 10^{-4}$  M, o, el que és el mateix, podem determinar el contingut en Fmp de dissolucions que absorbeixen fins a  $A=1.6$ .

ii) L'enllaç pèptid-resina és làbil a l'àcid trifluoroacètic en diclorometà. Per quantificar grups amino pel mètode de Gisin cal tractar l'aminoacil- o peptidil-resina amb àcid pícric, que té el mateix ordre d'acidesa que l'àcid trifluoroacètic (en H<sub>2</sub>O i a 25°C, els pKa del TFA i de l'àcid pícric són, respectivament, 0.59 i -0.33 (113) ). Tot i que la dissolució d'àcid pícric que s'empra al mètode de Gisin és molt més diluïda (0.01M) que la dissolució de TFA que habitualment s'empra per trencar l'enllaç pèptid-resina (7.4M), ens preocupava la possibilitat de que, en una certa extensió,

es produís separació de pèptid o aminoàcid del suport polimèric. Per tal de comprovar si tenia lloc o no aquesta reacció secundària, s'han tractat alíquotes de Fmoc-glicil-resina de grau de substitució conegut amb una dissolució 0.01M d'àcid pícric en diclorometà durant temps diferents. Després de rentar exhaustivament, s'ha determinat la quantitat de Fmoc-aminoàcid que resta ancorada al polímer tractant amb piperidina i quantificant la Fmp formada.

Els resultats obtinguts s'indiquen a la següent taula:

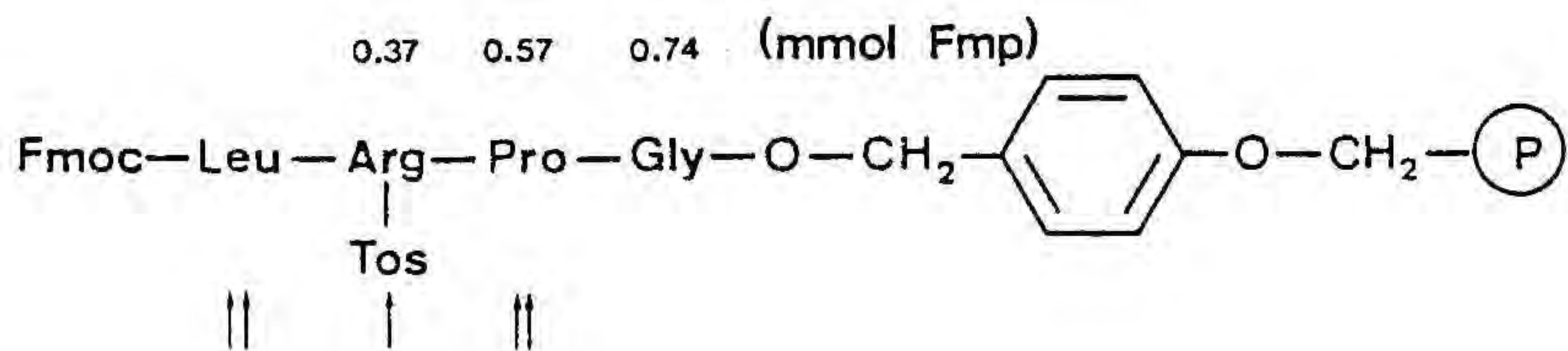
<u>Temps de tractament amb àcid pícric (min)</u>	<u><math>f\left(\frac{\text{mmol Gly}}{\text{g Fmoc-Gly-resina}}\right)</math></u>
0	0.41
15	0.40
30	0.42
60	0.40
100	0.43

Aquestes dades mostren clarament que l'enllaç pèptid-resina és perfectament estable en aquestes condicions experimentals, de manera que és vàlid l'assaig de Gisin per a determinar el grau de substitució d'aminoacil- o peptidil-resines quan la resina és el 4-hidroximetilfenoximetil-poliestirè.

### 1.2.3. Síntesi del segment peptídic protegit 4.

#### 1.2.3.A. Síntesi del pèptid.

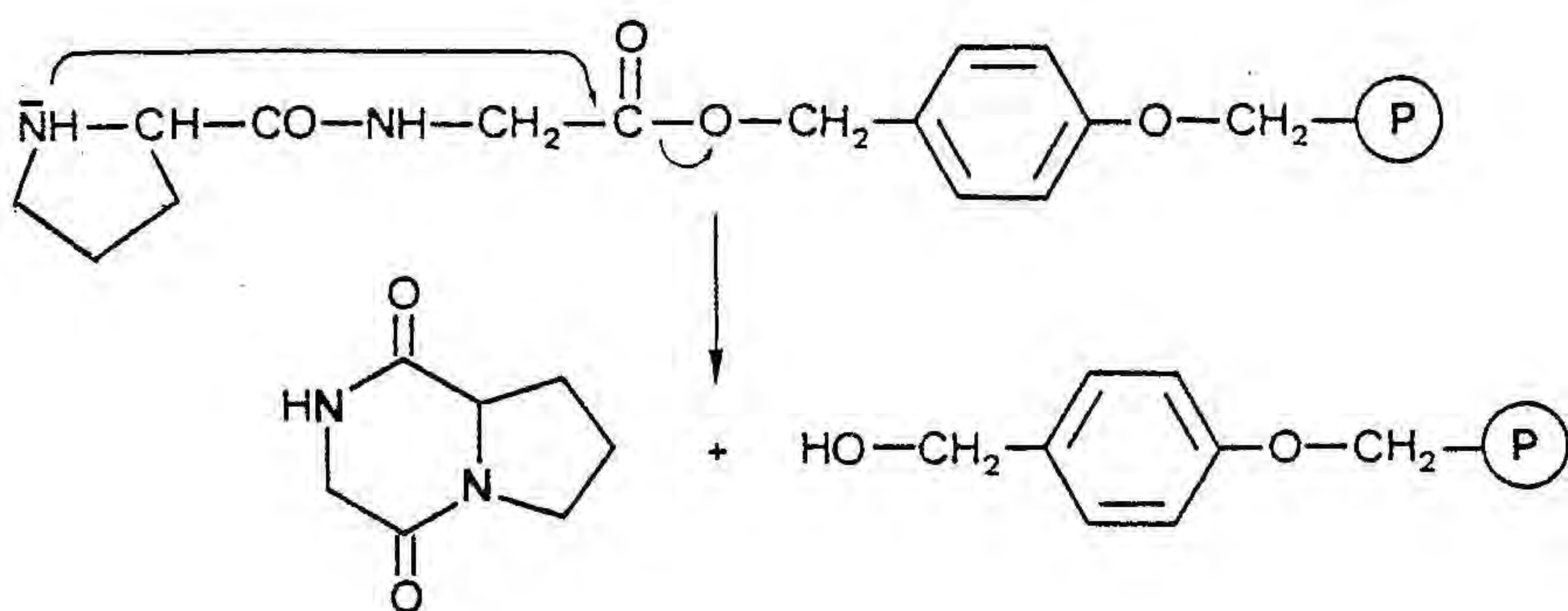
El primer segment peptídic que hem sintetitzat és el 4, que correspon a la seqüència 7-10 del LHRH amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure. Hem partit de 2.05g de Fmoc-glicil-resina i una substitució de 0.38mmol/g Fmoc-Gly-resina. Al següent esquema s'indiquen els trets essencials de la síntesi:



on el número de ↑ indica el d'acoblaments necessaris per a incorporar cada aminoàcid i els números al damunt de cada residu els mmol de Fmp obtinguts a cada etapa de desprotecció.

Aquesta síntesi presenta, a priori, dos problemes: la possible reacció secundària de formació de dicetopiperazines i el control de l'acoblament de Fmoc-Arg(Tos)-OH sobre la prolina.

La formació de dipèptids cíclics o dicetopiperazines, en aquest cas ciclo(L-Pro-Gly), pot tenir lloc a partir del moment en que hem desprotegit la prolina:



En el moment d'engegar aquesta síntesi, les dades de la bibliografia indicaven que aquesta reacció és catalitzada principalment per àcids carboxílics (114) (vegeu el capítol 2 d'aquesta Memòria per a més detalls). A més a més, la seqüència -Pro-Gly- afavoreix aquesta ciclació intramolecular. Per tal d'intentar evitar la formació de dicetopiperazines, un cop desprotegida la prolina s'ha procedit a acoblar l'arginina el més ràpidament possible, fent servir un excés d'aminoàcid superior a l'emprat per a acoblar prolina i afegint l'amina (EDIA) 10min després que l'anhidrid simètric preformat de l'arginina. Amb tot això s'intenta tenir l'amina lliure el mínim temps possible i evitar la possible catàlisi deguda a l'àcid carboxílic alliberat durant l'acoblament (1mol d'àcid per cada mol d'anhidrid que reacciona).

Pel que fa al control de l'acoblament de Fmoc-Arg(Tos)-OH, s'ha efectuat separant una alíquota de Fmoc-Arg(Tos)-Pro-Gly-resina després de



l'acoblament i determinant-ne el grau de substitució.

L'anàlisi de les dades sobre la Fmp obtinguda a cada etapa de desprotecció posa de manifest els problemes que hi ha hagut en aquesta síntesi.

El primer problema que trobem és un acoblament incomplet de prolina sobre glicina (disminució de la quantitat de Fmp en desprotegir el total de Fmoc-Pro-Gly-resina), fet molt sorprenent donat que l'assaig de la fluorescamina després del segon acoblament de prolina sobre la glicil-resina havia donat negatiu, indicant, per tant, l'absència d'amines sobre el polímer (<0.2%). D'altra banda, creiem que es pot descartar la hipòtesi d'una desprotecció incompleta, ja que sempre que s'ha repetit el tractament habitual amb piperidina, s'ha trobat una quantitat de Fmp pràcticament nul·la. En aquest cas hem procedit a acoblar l'arginina ràpidament, sense esperar la quantificació de la Fmp formada en la desprotecció, per intentar evitar la formació de dicetopiperazines. No és evident, doncs, l'origen d'aquesta disminució de la quantitat de Fmp formada a l'etapa de desprotecció.

Un cop acabat el primer acoblament de Fmoc-arginina, s'ha procedit a separar una alíquota de peptidil-resina, assecar-la i desprotegir-la amb piperidina. La determinació per espectroscòpia ultraviolada de la Fmp formada ha posat de manifest un bon grau de substitució i, per tant, acoblament complet. Ara bé, quan hem procedit a desprotegir el total de Fmoc-peptidil-resina hem trobat que, una altra vegada, ha disminuït el grau de substitució i que la desprotecció de l'alíquota ha donat un resultat erroni. Es possible, en aquest cas, que això sigui degut a l'error de pesada de l'alíquota (4-5mg) de Fmoc-tripeptidil-resina. Aquest resultat ens posa de manifest que no hem aconseguit evitar del tot la reacció secundària de formació de dicetopiperazines, que ha tingut lloc en un 35% suposant que l'arginina s'hagi acoblat sobre el total d'amines lliures que hi havia sobre la resina i que no han donat la ciclació intramolecular. Caldrà, doncs, dur a terme un estudi més detallat sobre la formació de dipèptids cíclics amb el suport sòlid 1, per tal de veure com es pot evitar o minimitzar aquesta reacció secundària.

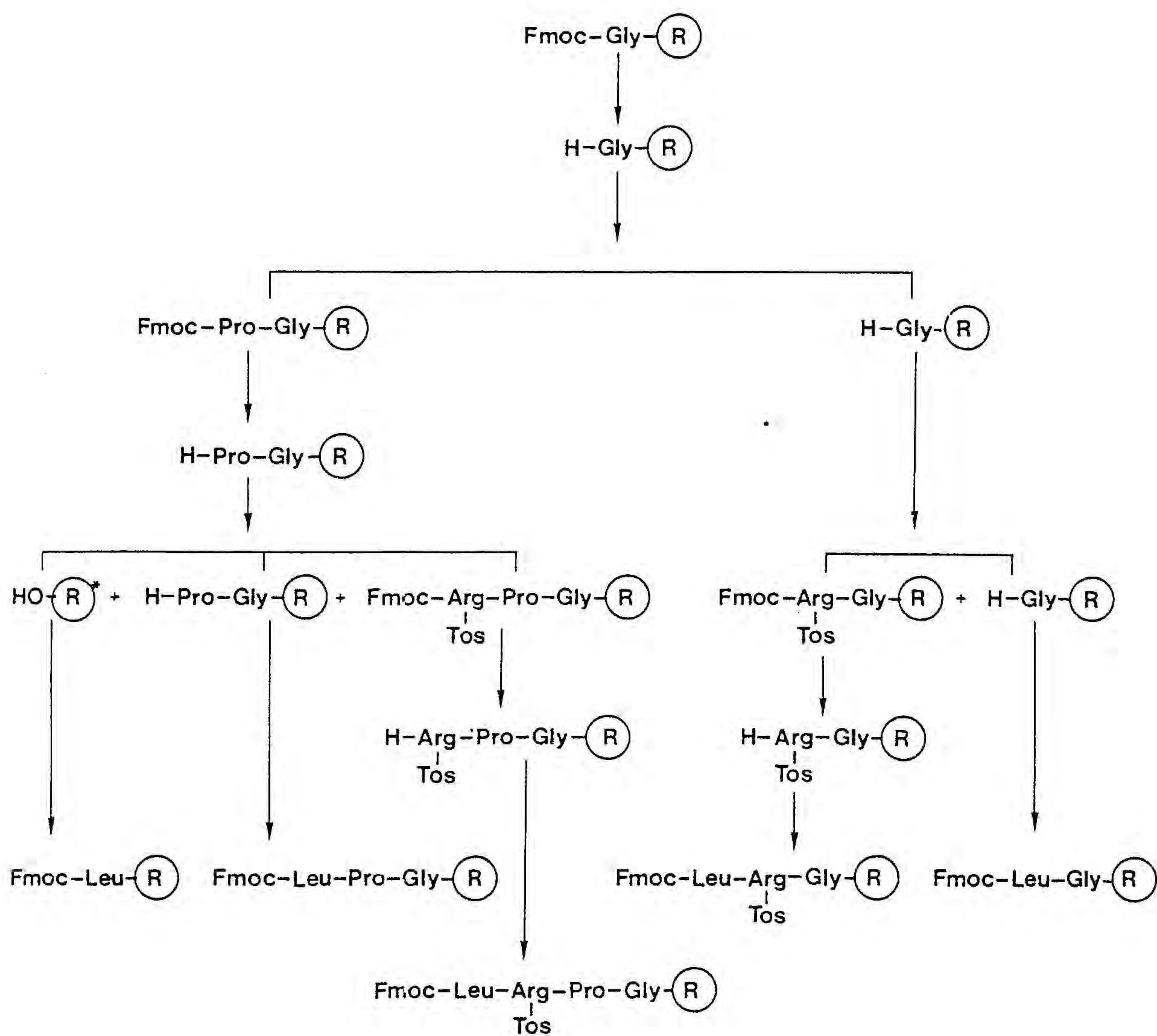
La referència que hem fet a la possibilitat de no haver acoblat quantitativament l'arginina es basa en resultats aparescuts posteriorment en la literatura: alguns autors assenyalen la dificultat d'acoblar

Fmoc-arginina protegida en la seva funció guanidino per protonació, amb dos grups adamantiloxicarbonil o amb el grup 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonil (42, 48 i 115). A la síntesi del segment 18-31 de la toxina II de l'escorpí AaH hi ha hagut molts problemes per aconseguir acoblament quantitatiu de Fmoc-arginina protegida amb el grup tosil (116). Tanmateix, hi ha autors que no assenyalen haver tingut cap problema (45), ni l'hem tingut nosaltres a la síntesi del pèptid 6 (vegeu 1.4.3.A).

A l'anàlisi que hem fet sobre l'origen de les perdues de funcionalització que han tingut lloc en aquesta síntesi, no hem tingut en compte la possible inestabilitat de l'enllaç pèptid-resina a la piperidina, que també conduiria a una disminució successiva del grau de substitució sobre la resina. No hem considerat aquest aspecte en cap moment perquè les dades de la literatura indiquen que l'enllaç pèptid-resina és resistent als tractaments amb piperidina. Meienhofer i cols. (39) no detecten traces de valina després de tractar Fmoc-Val-resina amb 50% de piperidina en DMF durant 5 dies, mentre que Brown et al. (44) troben un 6% de pèrdua després de 24h de tractament de Fmoc-Gly-resina amb 20% de piperidina en DMF, la qual cosa equival a un 0.04% de pèrdua per cada tractament en una síntesi (10min en aquestes condicions de concentració i dissolvent).

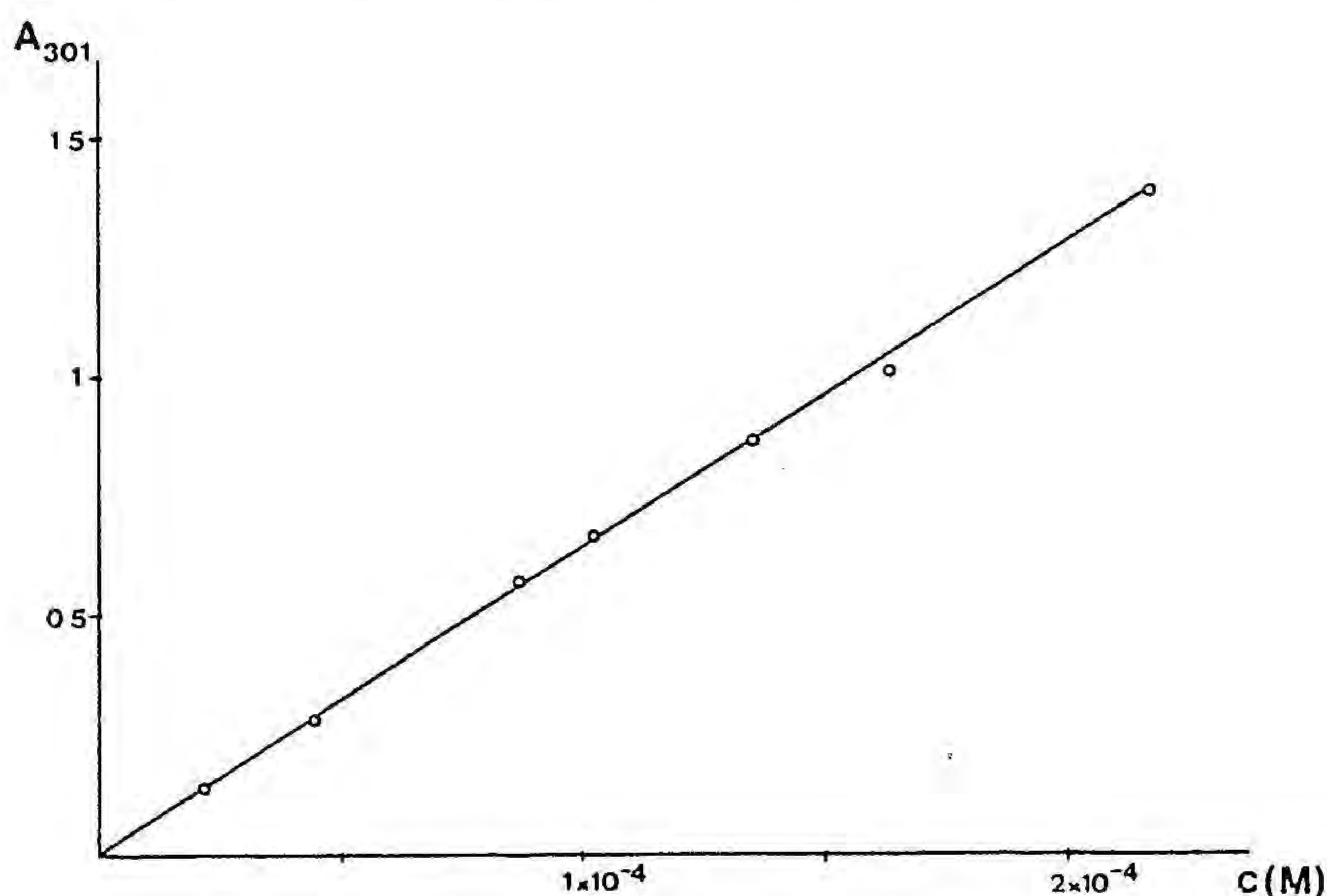
Finalment, s'ha ancorat la Fmoc-leucina mitjançant doble acoblament, després del qual l'assaig de la fluorescamina ha sigut encara lleugerament positiu però el de la ninhidrina negatiu. No hem acetilat les amines residuals perquè creiem que en la purificació del pèptid ens ha de ser més fàcil separar un Fmoc-tetrapèptid d'un tripèptid que d'un acetil-tripèptid. La desprotecció d'una alíquota de Fmoc-tetrapeptidil-resina ha posat de manifest que el grau de substitució (0.24mmol/g Fmoc-pèptid-resina) és superior en un 25% al que caldria esperar (0.19mmol/g en base als mmol de Fmp trobats en desprotegir l'arginina), de manera que la Fmoc-Leu s'ha ancorat en part o bé als grups OH que han quedat lliures sobre la resina després de la formació de la dicetopiperazina, o bé a grups amino lliures de la prolina sobre els quals no s'hauria acoblat arginina. La primera d'aquestes possibilitats es sustenta per l'aparició d'un pic cromatogràfic de Fmoc-Leu-OH en les purificacions del crú de síntesi (vegeu apartat següent).

En la següent figura es mostra la possible evolució de la síntesi, indicant quins productes podrien acompanyar el pèptid desitjat. Malauradament la descripció no és complerta, perquè posteriorment varem posar de manifest una altra reacció secundària (vegeu 2.2.1).



\* + ciclo(-L-Pro-Gly-)

La totalitat de peptidil-resina s'ha tractat amb un 55% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà a temperatura ambient. El rendiment de l'acidòlisi (58%) s'ha determinat comparant la quantitat de pèptid que ha passat a la dissolució amb el total de pèptid que hi havia ancorat a la matriu polimèrica al final de la síntesi. El grau de substitució de la Fmoc-tetra-peptidil-resina s'ha determinat per tractament d'una alíquota amb piperidina i quantificació de la Fmp formada. La quantificació del pèptid en dissolució s'ha fet mesurant l'absorbància a 301nm, i agafant com a valor d'absorbtivitat molar el descrit com a general pels Fmoc-aminoàcids,  $\epsilon=6200$  (105). La fiabilitat d'aquesta mesura es basa en els resultats obtinguts en veure dins de quin marge de concentracions de Fmoc-aminoàcid o Fmoc-pèptid es compleix la llei de Beer i Lambert, la qual cosa s'ha fet mesurant l'absorbància a 301nm de dissolucions de Fmoc-Gly-OH de diferent concentració. A la següent figura es representen els valors de les absorbancies enfront de les corresponents concentracions.



Veiem, doncs, que fins a concentracions de  $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  (és a dir,  $A=1,3$ ) es compleix la llei de Beer i Lambert pel màxim d'absorció de 301nm.

Com que tan sols hem pogut separar del polímer un 58% de pèptid, hem intentat amillarar el rendiment d'acidòlisi efectuant un segon tractament amb 55% TFA/diclorometà i un tercer amb àcid trifluoroacètic pur. Aquests dos últims tractaments només han proporcionat un 1% més de pèptid protegit, de manera que hem aconseguit en total desencorar el 59% de pèptid (189  $\mu\text{mol}$ ) de la resina.

Es conegut que les resines clorometilades comercials tenen com a impuresa grups hidroximetil (117 a 119). En aquest punt ens hem plantejat la possibilitat de tenir pèptid ancorat al polímer a través d'un enllaç amb aquests grups hidroximetil, enllaç que no és làbil a l'àcid trifluoroacètic sino a l'àcid fluorhídric anhidre. Una acidòlisi amb àcid fluorhídric anhidre i 10% d'anisol a 0°C de la resina que ja ha estat tractada amb TFA, ha proporcionat 2.7µmol de pèptid, quantitat molt petita en relació als 131µmol de pèptid que restaven ancorats a la matriu polimèrica. En qualsevol cas, el crú peptídic que prové del tractament amb HF no es pot ajuntar amb la resta de producte, doncs encara que té protegit el grup amino N-terminal la cadena lateral de l'arginina està desprotegida.

De tota manera, s'ha de dir aquí que és coneguda la dificultat d'assolir rendiments quantitativs a les acidòlisis d'un enllaç pèptid-resina fins i tot quan està unívocament funcionalitzada.

#### 1.2.3.B. Purificació i caracterització del pèptid 4.

Els segments peptídics protegits, solubles en dissolvents orgànics i insolubles en aigua, no es poden purificar pels mètodes que s'empren clàssicament per pèptids hidrofílics, és a dir, filtracions moleculars sobre gels de tipus Sephadex (polímer de dextrans) o Bio-Gel (gel de poliacrilamida) i cromatografia de bescanvi iònic, totes elles en dissolvents aquosos. En el cas dels pèptids protegits, és possible separar productes de talla diferent mitjançant filtració molecular sobre gels compatibles amb dissolvents orgànics: Bio-Beads (poliestirè reticulat), Sephadex LH-20 (120) o LH-60 (121) (polímers de dextrans amb els grups hidroxil transformats en propil èters) i Enzacril (gel de poli(N-acriloilmorfolina) reticulat) (122). Ara bé, pel que fa a la possibilitat de separar productes amb càrrega neta diferent, els segments peptídics protegits acostumen a tenir tan sols un grup ionitzable, el C-terminal (carboxil, hidrazida), que molt probablement contenen també totes les impureses que l'acompanyen i que per tant no permet de purificar per cromatografia de bescanvi iònic.

Els mètodes més correntment emprats per purificar pèptids protegits són els mètodes clàssics que s'empren en la purificació dels produc-

tes orgànics: cristal·lització, cromatografia sobre gel de sílice, de vegades extraccions i cromatografia de distribució en contra-corrent. Cal matissar, pel que fa a la cristal·lització, que sovint el que es descriu no és veritablement una cristal·lització sino més aviat una precipitació aconseguida tractant un oli amb un dissolvent orgànic.

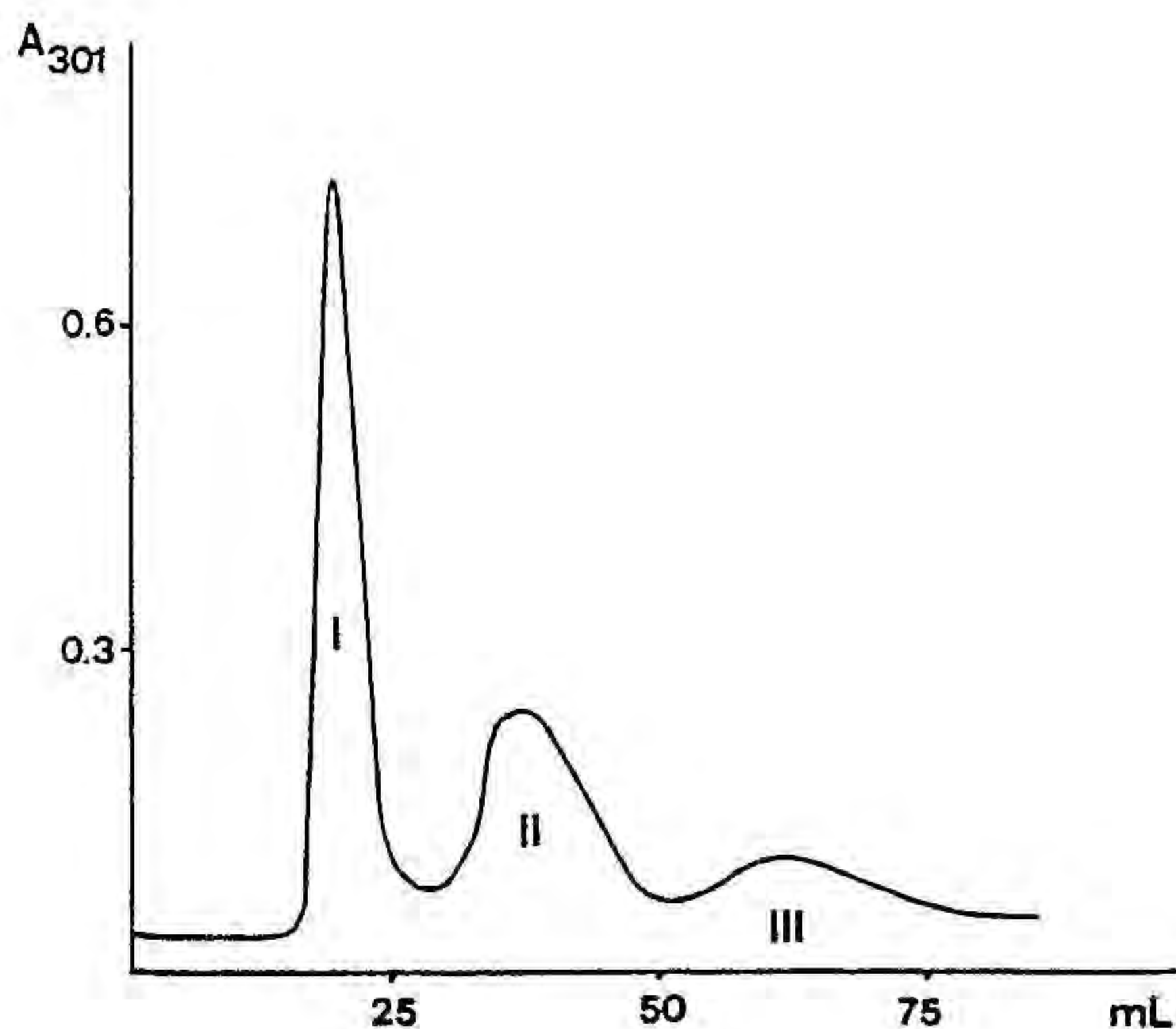
A la literatura es troben algunes referències d'aplicació de la cromatografia líquida d'alta eficàcia sobre gel de sílice a la purificació de segments peptídics protegits (123, 124). Segons els autors, l'eluent que s'ha d'emprar per a la cromatografia líquida es tria en base a un determinat valor del Rf del producte en cromatografia en capa fina. Concretament, aconsellen fer servir aquell eluent que en cromatografia en capa fina dóna taques amb Rf entre 0.2 i 0.5 (124).

Hem abordat la purificació del pèptid 4 combinant la filtració molecular sobre Sephadex LH-20 (adequat per la talla d'aquest pèptid) i la cromatografia líquida d'alta eficàcia sobre gel de sílice, per dos camins diferents. En tots dos cassos, les cromatografies s'han seguit per la mesura de l'absorbància de l'eluit a 301nm (màxim d'absorció del grup Fmoc).

i) En primer lloc s'ha dut a terme una pre-purificació del crú peptídic mitjançant cromatografia sobre gel de sílice en una columna oberta, eluint amb  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  70/20/5. Es tracta simplement de netejar una mica el producte eliminant les impureses de polaritat més diferent. Després d'anàlitzar les diferents fraccions per cromatografia en capa fina, n'hem separat una que conté una mescla de tots els productes presents en el crú peptídic per a fer algun assaig de purificació. Amb aquest producte s'han efectuat assaigs anivell analític, injectant la mostra a una columna Lobar C (Merck) de gel de sílice 60 i eluint a 2mL/min amb tres eluents diferents:

- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  85/5/2
- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85/5
- $\text{CHCl}_3/\underline{\text{iPrOH}}/\text{AcOH}$  88/5/2.

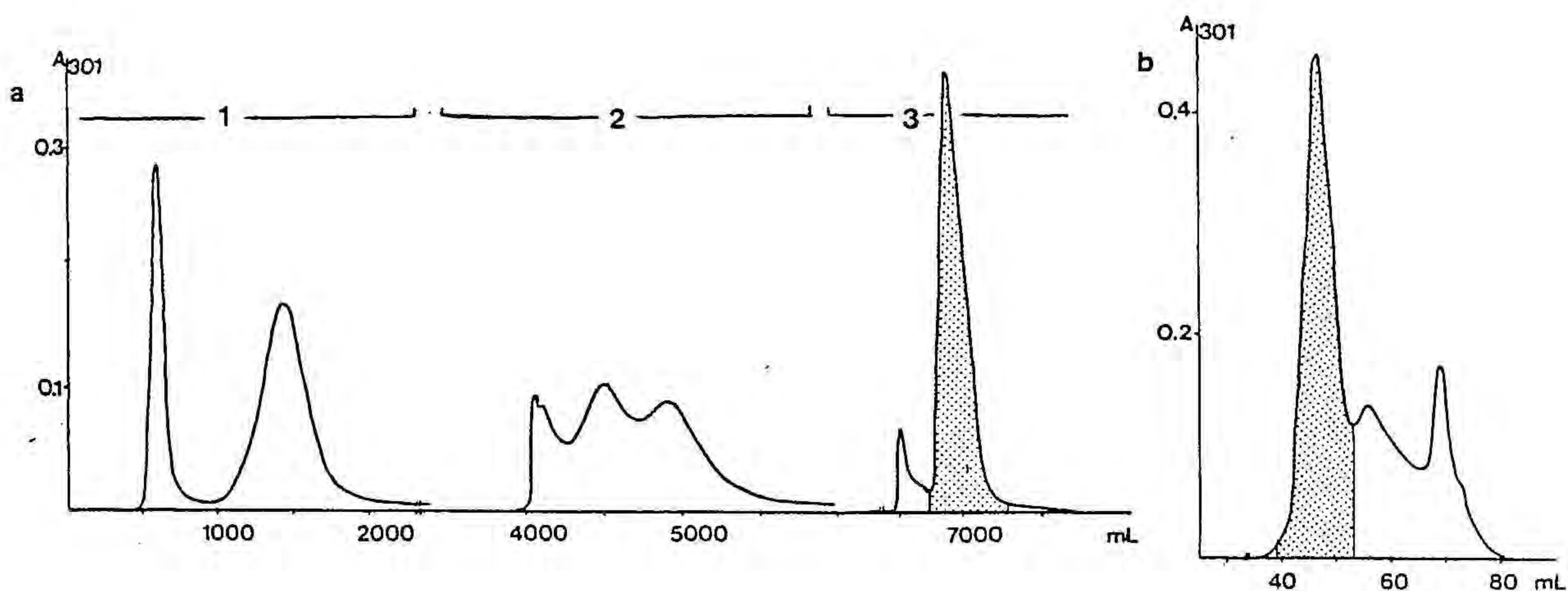
Tan sols amb el darrer eluent s'ha aconseguit una certa resolució separant-se tres fraccions, l'anàlisi de les quals per cromatografia en capa fina i anàlisi d'aminoàcids ens ha permès d'identificar el producte desitjat, contingut en la fracció III.



	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
Pro	-	0.84	1.09
Gly	-	1.16	0.92
Leu	54	4.08	0.73
Arg	-	2.23	0.38

Les fraccions procedents de la pre-purificació que contenen majoritàriament el pèptid 4 s'han injectat a un cartutx (30x5cm) de gel de sílice 60 d'un aparell preparatiu de cromatografia líquida d'alta eficiència. Per a eluir el producte desitjat s'han fet servir tres mescles de dissolvents de polaritat creixent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{iPrOH}/\text{AcOH}$  88/1.5/0.5,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{iPrOH}/\text{AcOH}$  88/10/5 i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  88/10/5, eluint a 200mL/min. La fracció que conté el producte desitjat, que s'elueix amb el darrer sistema, finalment s'ha filtrat a través de Sephadex LH-20 eluint amb MeOH a 6mL/h, obtenint-se un 35% de producte pur.

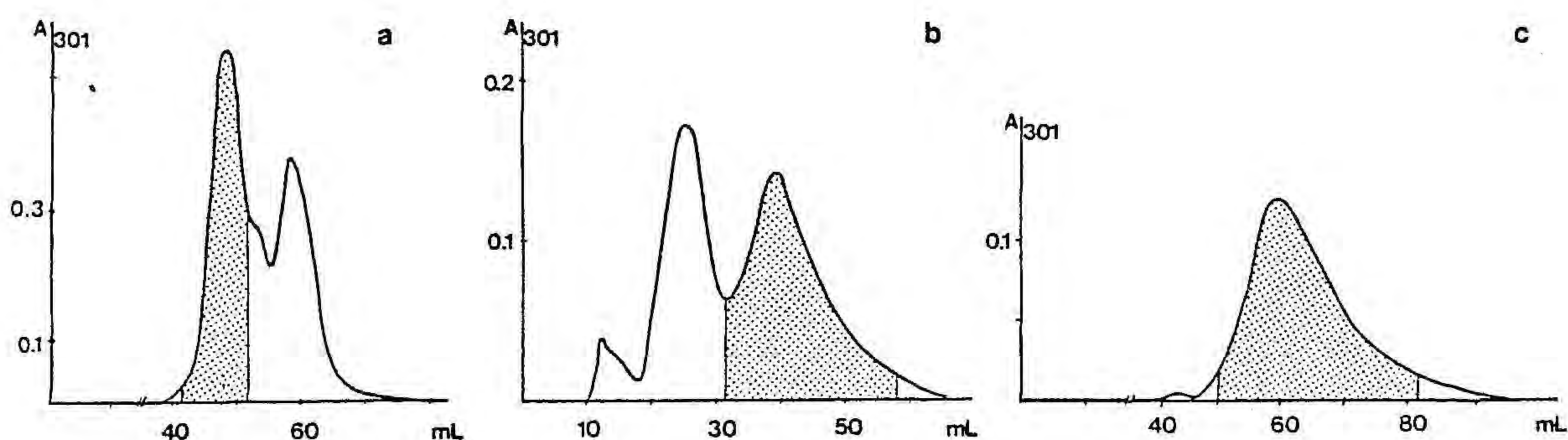
A continuació es mostren els cromatogrames corresponents a aquestes cromatografies:



a: HLPC preparativa sobre gel de sílice; 1, 2 i 3 corresponen a cada un dels dissolvents emprats a la cromatografia (vegeu text). b: filtració molecular sobre Sephadex LH-20.

ii) Per aquest camí hem intentat primer purificar el producte per filtració molecular sobre Sephadex LH-20 eluint amb MeOH. Les fraccions que contenen el producte desitjat s'han cromatografiat a continuació en una columna Lobar de gel de sílice, eluint amb  $\text{CHCl}_3/\underline{i}\text{PrOH}/\text{AcOH}$  88/5/2. Una recromatografia en les mateixes condicions ha donat el pèptid 4 pur amb un rendiment del 23%.

Seguidament es mostren els cromatogrames corresponents als tres passos d'aquesta purificació.



a: filtració molecular sobre Sephadex LH-20. b: cromatografia sobre gel de sílice. c: recromatografia en les mateixes condicions.

El pèptid 4, un cop purificat, s'ha analitzat en primer lloc per cromatografia en capa fina (cromatoplaques de gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  70/20/5,  $R_f=0.55$ ). A la següent taula s'indiquen les anàlisis d'aminoàcids del crú peptídic (obtingut del tractament amb TFA) i del pèptid purificat:

	<u>Crú peptídic</u>	<u>Pèptid pur</u>
Pro	0.75	1.04
Gly	1.10	0.99
Leu	1.30	0.97
Arg	0.86	0.96



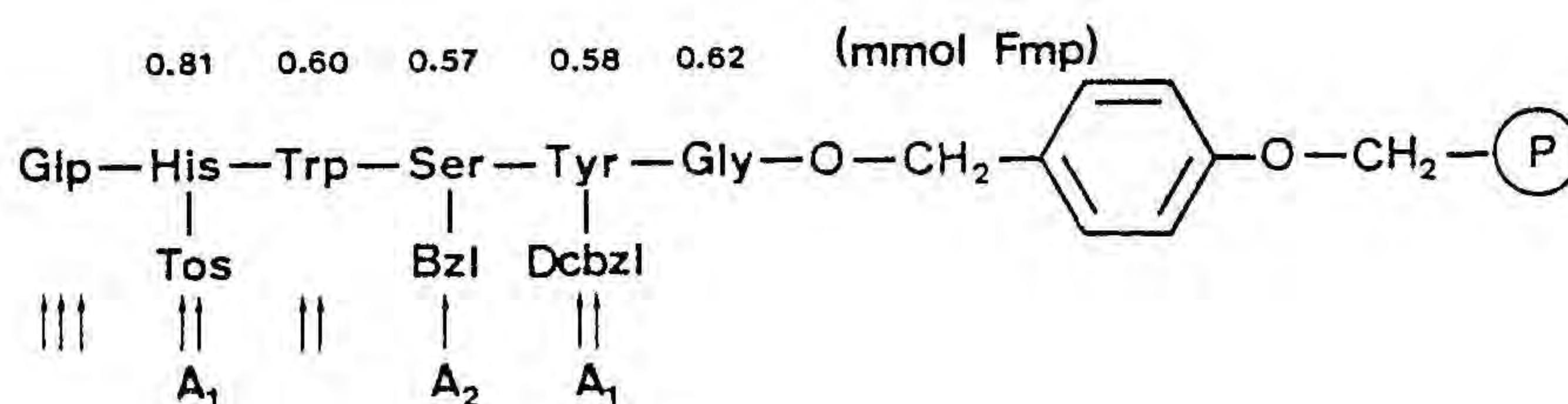
La determinació del poder rotatori específic ha donat el següent valor:

$$[\alpha]_D = -44.1 \pm 2 \text{ (c } 0.4, \text{ DMF)}$$

#### 1.2.4. Síntesi del segment peptídic protegit 3.

##### 1.2.4.A. Síntesi del pèptid.

Per a la síntesi del segment 1-6 del LHRH amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure hem partit de 1.86g de Fmoc-glicil-resina amb els hidroxils bloquejats per benzoilació i un grau de substitució de 0.33mmol/g Fmoc-Gly-resina. A continuació s'indica esquemàticament el progrés de la síntesi:



De la mateixa manera que pel pèptid 4, els valors indicats al damunt de cada residu corresponen als mmol de Fmp obtinguts a l'etapa de desprotecció del residu en qüestió, ↑ indica acoblament i A acetilació, indicant els subíndex 1 i 2 un objectiu i procediment diferents.

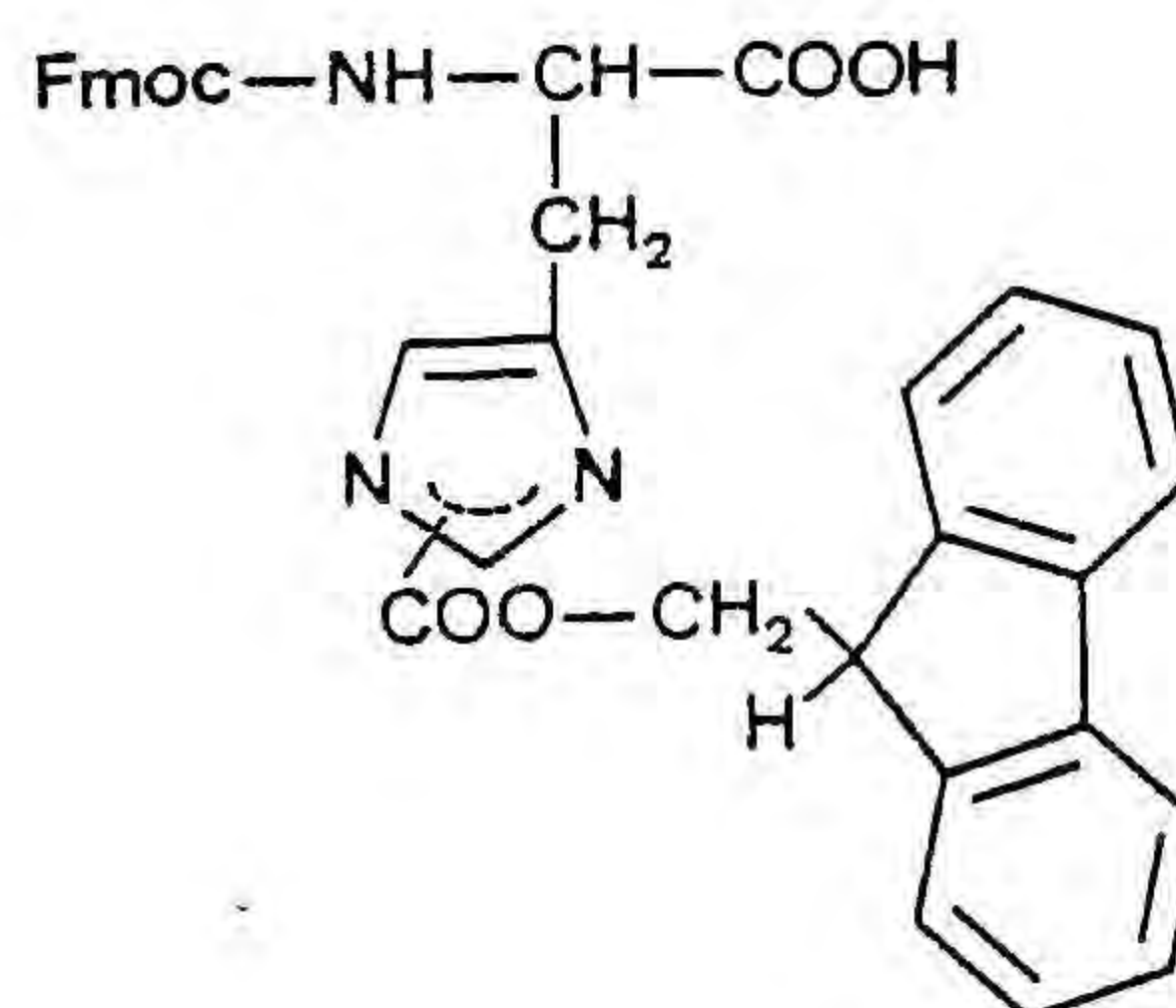
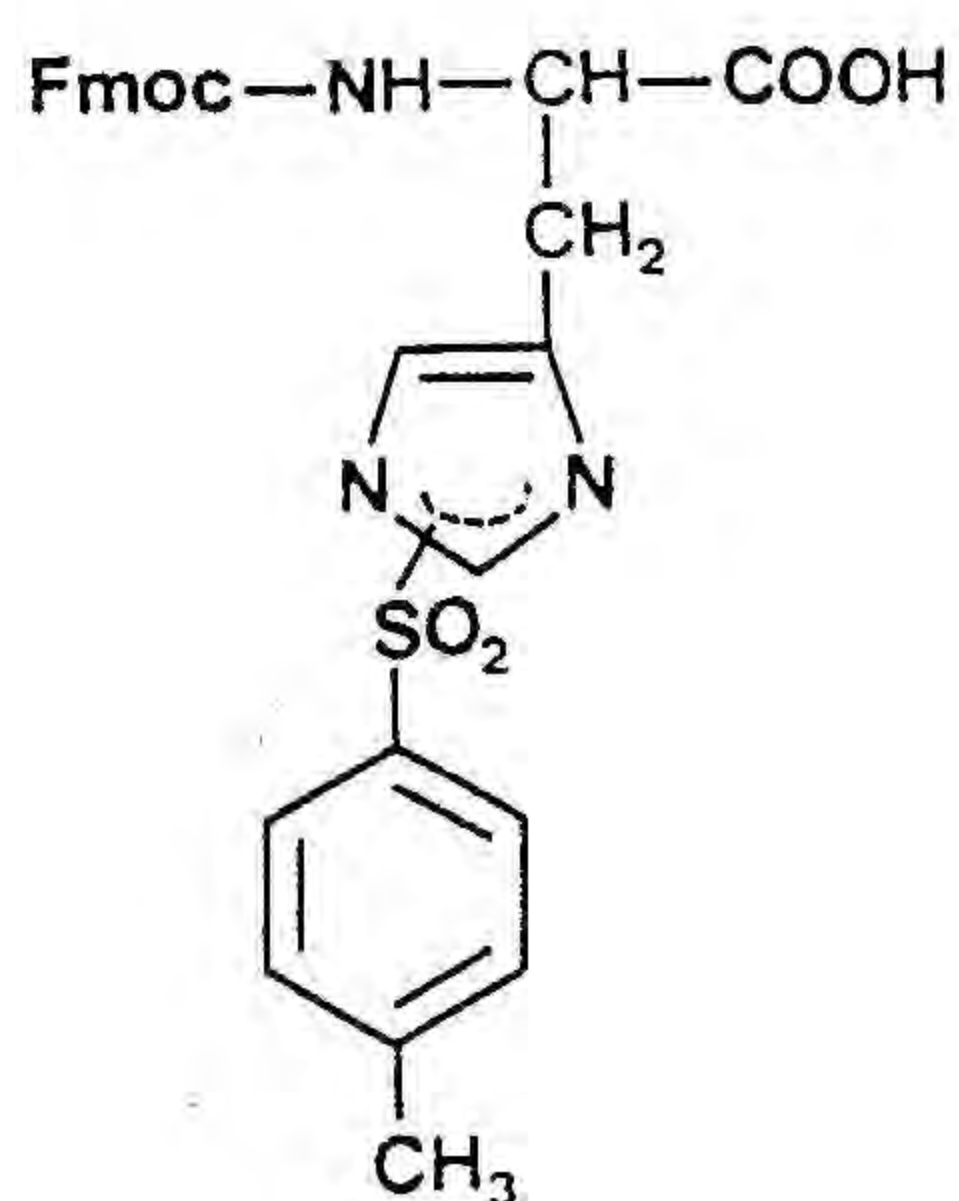
A<sub>1</sub> és l'acetilació que es du a terme normalment quan, després d'haver fet dos acoblaments d'un aminoàcid, l'assaig de la fluorescamina no és encara clarament negatiu i es procedeix a bloquejar les amines residuals amb anhídrid acètic i etildiisopropilamina.

Abans de desprotegir la funció α-amino de la serina i per a bloquejar els possibles OH que haurien quedat lliures si s'haguessin format dicetopiperazines, hem efectuat un tractament amb anhídrid acètic i piridina (condicions més indicades per una esterificació), que correspon a l'acetilació A<sub>2</sub>.

De tota manera, per a intentar obviar a la formació de dicetopiperazines, hem dut a terme l'acoblament de la serina amb un excés d'anhidrid més gran que el que s'empra normalment (2.5 en comptes de 1.5), per que sigui el més ràpid possible, i hem afegit l'equivalent d'amina des del començament per a evitar la presència d'àcid carboxílic lliure. Amb això hem aconseguit amb un sol acoblament resultat negatiu a l'assaig de la fluorescamina.

Els mmol de Fmp obtinguts en la desprotecció dels quatre primers residus són essencialment correctes, i resten dins del marge d'error del mètode.

El més sorprenent de la síntesi és la quantitat de Fmp obtinguda a la desprotecció de la histidina. Per tal de discernir quin és l'origen del problema, s'ha començat per enregistrar l'espectre ultraviolat de la suposada Fmoc-His(Tos)-OH comercial, i una quantitat coneguda del mateix producte s'ha tractat amb piperidina quantificant la Fmp formada per absorció a 301nm. En els dos casos s'han obtingut resultats que indiquen que el producte no conté un sol grup Fmoc, sino entre 1.5 i 2. L'anàlisi elemental del producte no lliga amb les dades teòriques calculades i, sobretot, dona sofre negatiu. L'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  tan sols indica excés de Fmoc. Posteriorment, hem sintetitzat Fmoc-His(Fmoc)-OH, comprovant que el seu espectre d'infrarroig és idèntic al del producte comercial adquirit com a Fmoc-His(Tos)-OH, així com els punts de fusió i la cromatografia en capa fina. L'anàlisi elemental trobada pel que crèiem Fmoc-His(Tos)-OH lliga força bé amb la calculada per Fmoc-His(Fmoc)-OH.



Així doncs, a la síntesi del pèptid 3, l'acoblament del darrer

aminoàcid s'ha dut a terme sobre una histidina amb el grup imidazole desprotegit, de manera que també s'hi va ancorar àcid piroglutàmic. Cal dir, però, que l'enllaç àcid piroglutàmic-imidazole és molt probablement totalment làbil en les condicions de trencament de l'enllaç pèptid-resina (125).

Després de l'acidòlisi varem obtenir, per tant, un crú peptídic que contenia Glp-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH en comptes del pèptid desitjat Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH 3. Tanmateix, seguirem anomenant el nou pèptid 3 al llarg del capítol.

Finalment, cal comentar que l'acoblament de l'àcid piroglutàmic ha sigut una mica dificultós. Després de dos acoblaments pel mètode de l'anhídrid simètric amb 3 i 2 equivalents d'aminoàcid, respectivament, l'assaig de la fluorescamina ha donat encara clarament positiu. Només ha sigut negatiu després d'un tercer acoblament amb aminoàcid i DCC mol a mol, sense preformar l'anhídrid.

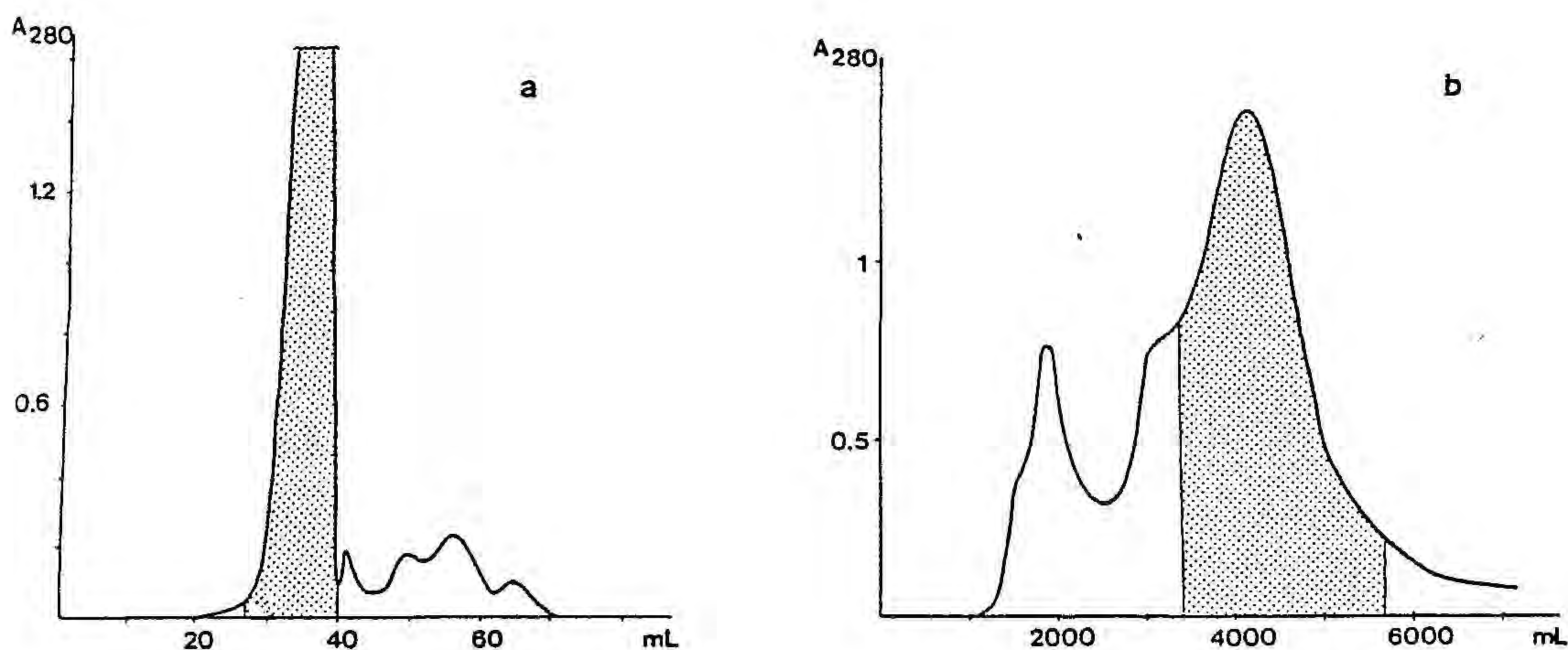
Per desencorar el pèptid 3 del polímer s'ha tractat la peptidil-resina amb 55% de TFA en diclorometà durant 1h a temperatura ambient, en presència d'un 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol per evitar l'oxidació del triptofan en medi àcid. El rendiment d'aquesta etapa, 56%, s'ha calculat comparant la quantitat de pèptid que passa a la dissolució, determinada a partir d'hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids, amb el total de pèptid ancorat al polímer, calculat en base al promig dels darrers valors fiables de Frap trobats en la desprotecció durant la síntesi. Un segon tractament en les mateixes condicions ha proporcionat un 1% més de pèptid.

#### 1.2.4.B. Purificació i caracterització del pèptid 3.

La purificació del pèptid 3 s'ha abordat amb una cromatografia de filtració molecular sobre Sephadex LH-20 eluint amb metanol, i columnant el total del crú peptídic en cinc lots. Les fraccions que contenen el producte desitjat (anàlisi d'aminoàcids força correcta i revelat positiu al reactiu d'Ehrlich, específic pel triptofan (126, 127), en cromatografia en capa fina) s'han cromatografiat a continuació en un cartutx de gel de sílice 60 d'un aparell d'HPLC preparativa, eluint amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

57/40/3 a 200mL/min. Una darrera filtració sobre Sephadex LH-20 ha donat pràcticament un únic pic de pèptid 3, purificat amb un rendiment global del 37%.

Els cromatogrames que es mostren a continuació corresponen a la primera cromatografia sobre Sephadex LH-20 i a la duta a terme sobre gel de sílice. Tal com es pot veure, el seguiment del perfil d'elució s'ha fet a 280nm, màxim d'absorció de tirosina i triptofan (en aquest cas no tenim grup Fmoc a l'extrem N-terminal).



a: filtració molecular sobre Sephadex LH-20. b: HPLC preparativa sobre gel de sílice.

A la següent taula s'indiquen les anàlisis d'aminoàcids del producte a diferents estadis de la purificació:

	<u>crú peptídic</u>	<u>pèptid després de LH-20</u>	<u>pèptid pur</u>
Ser	0.92	0.88	0.85
Glu	2.38	1.22	1.05
Gly	1.16	1.01	0.98
Tyr	0.98	0.93	0.97
His	0.94	1.06	1.04

L'anàlisi d'aminoàcids del pèptid purificat és correcte, i tot i que no hem determinat triptofan (requereix un procediment d'hidròlisi diferent, ja que es destrueix en la hidròlisi amb HCl 6N; vegeu també 3.2.2.C) el pèptid dóna positiu al revelat amb el reactiu d'Ehrlich en cromatografia en capa fina:  $R_f=0.43$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10/10/1.

La determinació del poder rotatori específic dóna un valor

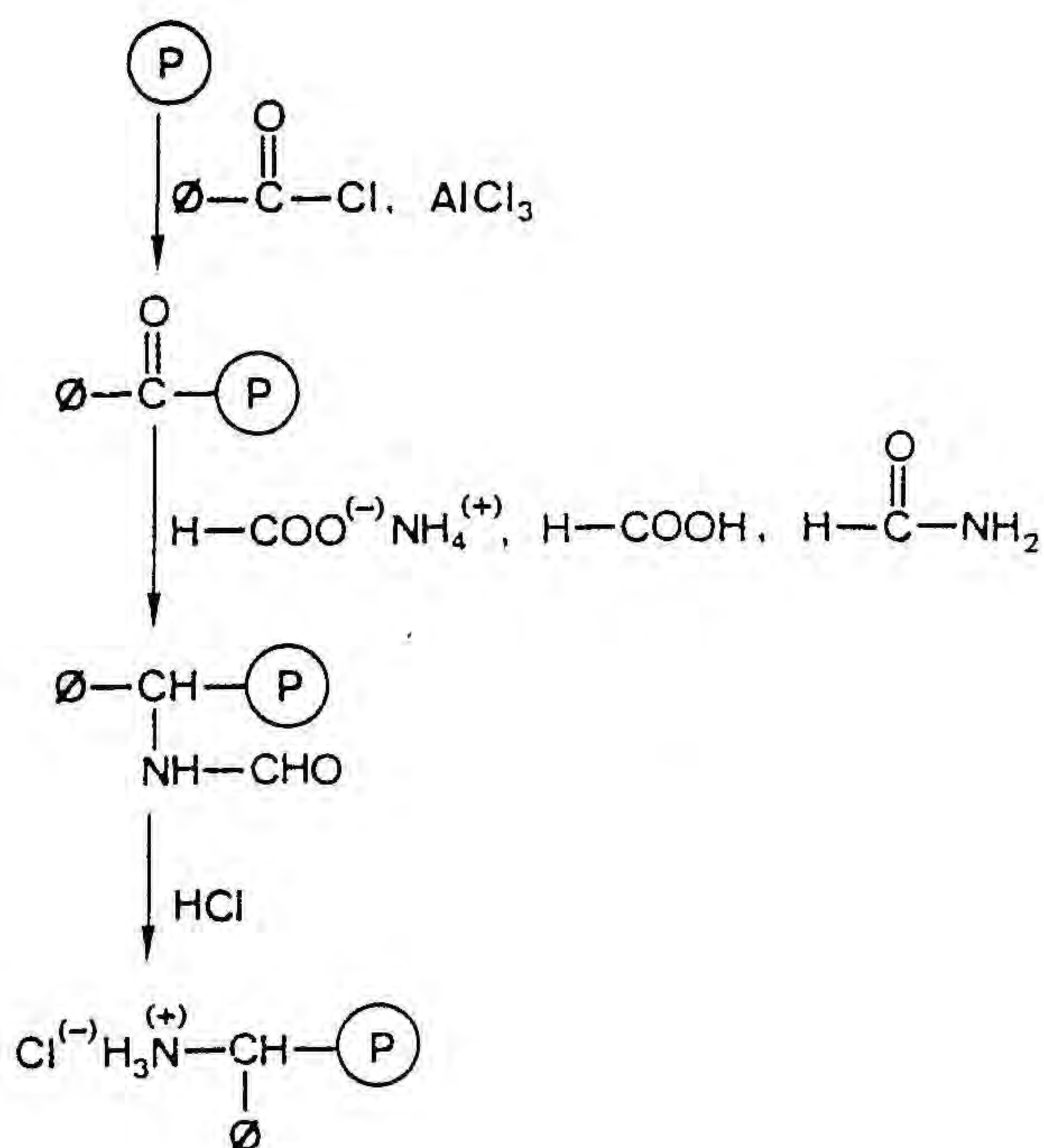
$$[\alpha]_D = -13.7 \pm 0.4 \quad (c \ 1.2, \text{DMF})$$

### 1.3. Síntesi del LHRH.

#### 1.3.1. Engalzament dels segments peptídics protegits sobre el suport polimèric.

##### 1.3.1.A. Síntesi d' $\alpha$ -aminobenzilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

L'engalzament dels segments peptídics protegits 3 i 4 per a obtenir el LHRH s'ha efectuat sobre una resina benzhidrilamina o  $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè (vegeu 1.1.1). Aquest suport sòlid s'ha sintetitzat segons el següent esquema (20, 128, 129):



S'ha partit de poliestirè reticulat amb un 1% de divinilbenzè comercial, rentat exhaustivament per tal d'eliminar impureses com polímer linial, monòmers residuals, agents de reticulació, catalitzadors i additius (3).

El primer pas de la síntesi és una reacció de Friedel-Crafts en la que s'obté el benzoilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) per tractament del poliestirè amb clorur de benzoil i triclorur d'alumini. El benzoilpolímer es transforma en el N-formil- $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè mitjançant aminació reductora de Leuckart amb formiat amònic, formamida i àcid fòrmic. Finalment, una hidròlisi amb àcid clorhídric dóna l'hidroclorur de la resina benzhidrilamina.

El grau de substitució de l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè es determina per l'assaig de Gisin.

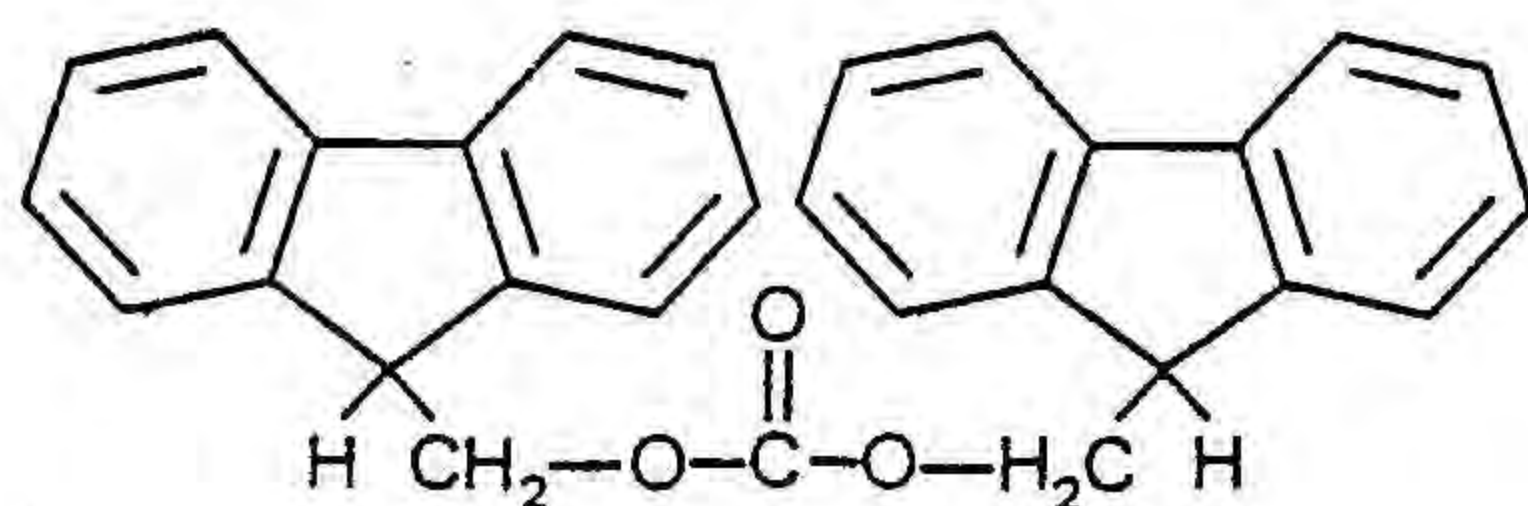
#### 1.3.1.B. Estabilitat del grup protector Fmoc a l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè.

Tot i que és conegut que els Fmoc-aminoàcids no es desprotegeixen, en fase sòlida, pels grups amino d'una cadena peptídica en creixement (49), hem volgut assegurar-nos de que els grups amino de la resina benzhidrilamina no desprotegirien el grup Fmoc, protector de l'extrem N-N-terminal del pèptid 4, durant el procés d'acoblament d'aquest pèptid a l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè, que és molt més llarg (48h) que el temps d'acoblament d'un Fmoc-aminoàcid (1h).

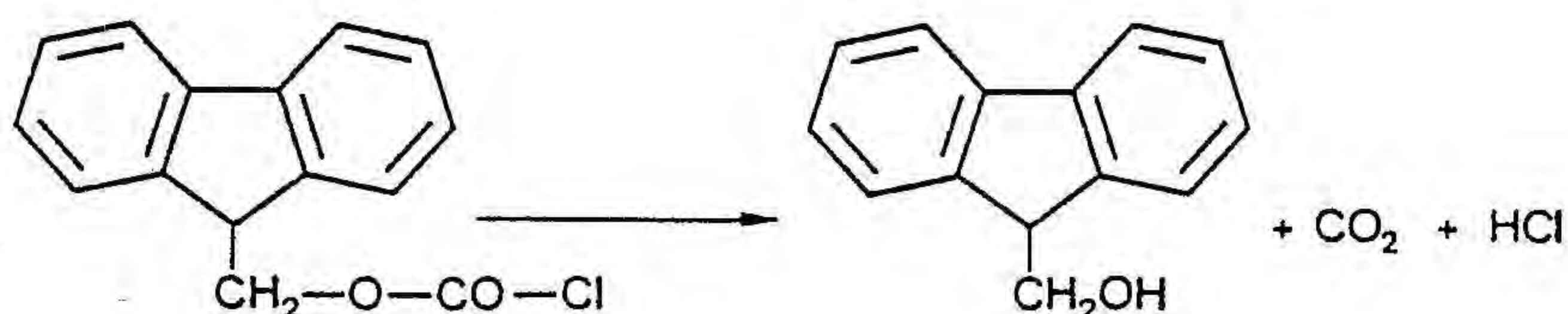
Per a dur a terme aquest estudi s'ha sintetitzat l'ester metílic de la Fmoc-glicina, producte model del qual es vol comprovar l'estabilitat enfront de la resina benzhidrilamina. El grup carboxil de l'aminoàcid s'ha protegit en forma d'ester per tal d'evitar la protonació dels grups amino del polímer.

En primer lloc s'ha esterificat la glicina amb clorur d'hidrogen en el si de metanol absolut. La incorporació del grup Fmoc a l'hidroclorur del glicinat de metil es va intentar sense èxit pel procediment descrit a la literatura (105), que fa reaccionar els hidroclorurs d'esters d'aminoàcids amb cloroformiat de 9-fluorenilmetil en presència de piridina. Tampoc va reïxir l'intent d'obtenir el producte desitjat alliberantprèviament el

grup amino del glicinat de metil amb una base més forta com la dietilamina. Un cop eliminada totalment la base, per impedir que pugui reaccionar amb el reactiu, Fmoc-Cl, o amb el Fmoc-Gly-OMe que es va formant, es fa reaccionar el glicinat de metil amb Fmoc-Cl. Cap d'aquests dos camins, en principi tan senzills, ha permès d'obtenir l'ester metílic de la Fmoc-glicina amb un rendiment acceptable, i en els dos cassos s'ha format, en quantitats apreciables, un subproducte que s'ha identificat com a carbonat de bis-(9-fluorenilmetil)



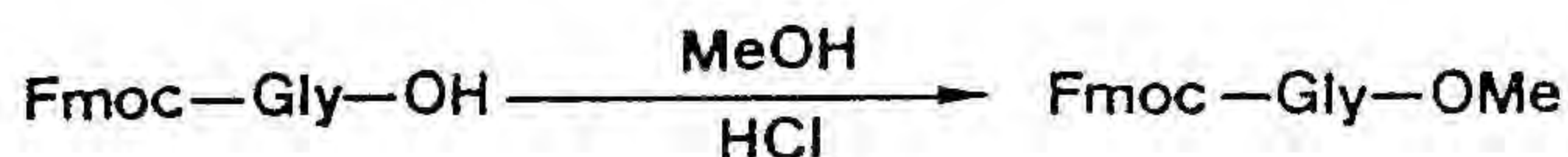
El cloroformiat de 9-fluorenilmetil es pot hidrolitzar i donar 9-fluorenilmetanol, diòxid de carboni i clorur d'hidrogen.



La realitat és que sovint una certa quantitat de 9-fluorenilmetanol acompanya el Fmoc-Cl com a impuresa. Sigui quin sigui el seu origen, la presència de 9-fluorenilmetanol en el medi de reacció pot explicar la formació del carbonat a que ens hem referit abans (130), que s'obté per atac nucleòfil de l'alcohol al grup carbonil del cloroformiat.



Finalment, l'ester metílic de la Fmoc-glicina s'ha sintetitzat sense cap problema per esterificació de Fmoc-Gly-OH comercial amb metanol anhidre i clorur d'hidrogen.



La comprovació de l'estabilitat del Fmoc-Gly-OMe enfront dels grups amino de l' $\alpha$ -aminobenzilresina s'ha fet agitant durant 48h una suspensió de resina benzhidrilamina en una dissolució de Fmoc-Gly-OMe en diclorometà. A diferents temps del tractament s'han pres mostres del sobrenadant, que s'han analitzat per cromatografia en capa fina revelant amb ninhidrina, i pel mètode de la ninhidrina quantitativa (131), per detectar la possible aparició de glicinat de metil. El valor de la constant de resposta colorimètrica s'ha determinat per mesura de l'absorció a 570nm del producte que es forma en fer reaccionar ninhidrina amb una mostra patró de glicinat de metil corresponent al 5% de desprotecció de Fmoc-Gly-OMe.

A la següent taula s'indica el resultat de les mesures d'absorció al visible corresponents a la reacció amb ninhidrina de Fmoc-Gly-OMe en el moment inicial de la reacció i al cap de 48h d'estar en presència de l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè, i del patró de glicinat de metil ja indicat. Indiquem també les diferències entre aquests valors i les mesures d'absorció del corresponent blanc, efectuades totes per duplicat.

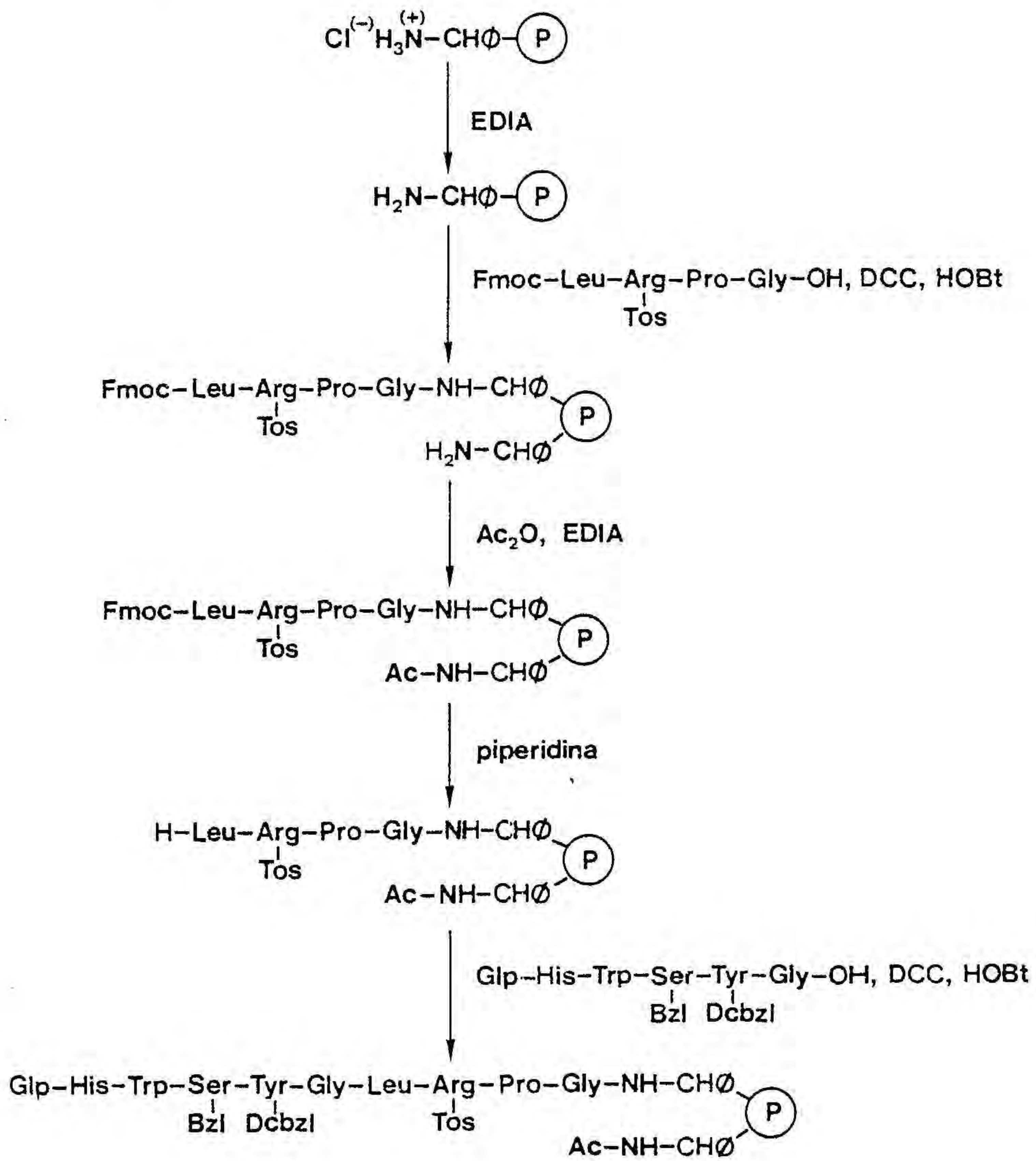
	$A_{\text{mostra}}$		$A_{\text{mostra}} - A_{\text{blanc}}$	
	1 <sup>a</sup> mesura	2 <sup>a</sup> mesura	1 <sup>a</sup> mesura	2 <sup>a</sup> mesura
Blanc	0.16	0.19	-	-
Fmoc-Gly-OMe t = 0	0.18	0.19	0.02	0.00
Fmoc-Gly-OMe t = 48h	0.18	0.19	0.02	0.00
H-Gly-OMe patró	0.53	0.55	0.37	0.36

Podem veure en primer lloc, comparant les dades obtingudes per Fmoc-Gly-OMe a t=0 i el blanc, que pràcticament no hi ha desprotecció en el procés de la reacció amb ninhidrina. Pel que fa a l'estabilitat del grup Fmoc a l' $\alpha$ -aminobenzilpoliestirè, la comparació entre els valors obtinguts per Fmoc-Gly-OMe a t=0 i t=48h, posa de manifest que, almenys de manera significativa, no hi ha desprotecció de Fmoc-Gly-OMe.



1.3.1.C. Engalzament dels segments peptídics protegits 3 i 4 sobre l'α-aminobenzilpoliestirè.

El procés d'engalzament dels segments peptídics protegits sobre la resina benzhidrilamina s'esquematitza a continuació:



En primer lloc cal alliberar la base a partir de l'hidroclorur d'α-aminobenzilpoliestirè, per tractament amb una dissolució al 5% d'EDIA en diclorometà.

El segment peptídic protegit Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-OH, ja purificat, s'ha ancorat a la matriu polimèrica amb DCC i 1-hidroxibenzo-

triazole durant 48h. La proporció entre els grups amino polimèrics i el pèptid 4 ha sigut de 3/1, per tal d'aconseguir que s'incorpori el màxim de pèptid possible. Passades les 48h d'acoblament, s'ha procedit a la filtració i rentat de la peptidil-resina. A continuació, s'han bloquejat els grups amino que no han reaccionat per acetilació fins a obtenir assaig d'amines negatiu.

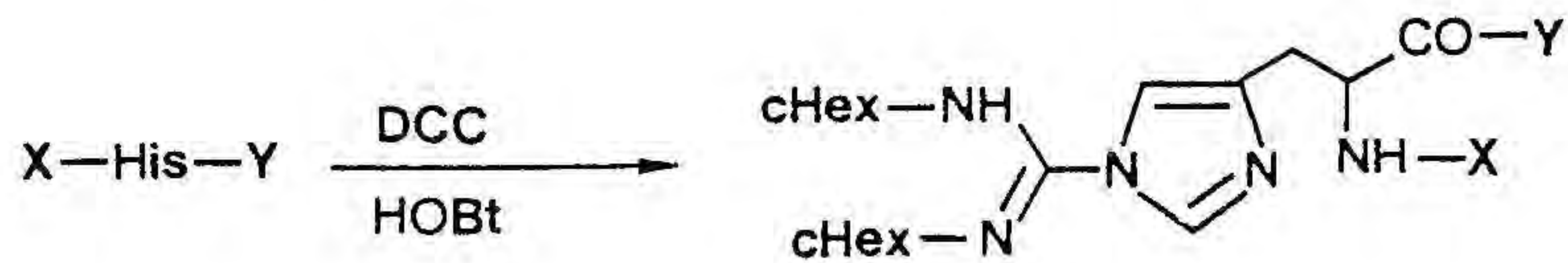
La desprotecció de l'extrem N-terminal amb 50% de piperidina en diclorometà ha posat de manifest que tan sols un 21% del pèptid 4 s'ha ancorat a la resina benzhidrilamina. Com que l'ancorament d'un aminoàcid a aquesta matriu polimèrica acostuma a tenir lloc amb rendiments pràcticament quantitativs, el baix rendiment d'ancorament del pèptid 4 es pot atribuir a l'impediment estèric que dificulta l'accés d'un pèptid, molt més voluminós, als grups amino del suport sòlid.

El segment peptídic Glp-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH, 3, en un excés de 2.5 vegades respecte als punts reactius de la peptidil-resina, s'ha engalzat a l'extrem N-terminal del pèptid 4 mitjançant activació amb DCC i HOBT. Després d'un acoblament, 48h, l'assaig de la ninhidrina ja ha donat negatiu.

El fet d'haver acoblat el pèptid 3 amb l'anell imidazòlic de la histidina desprotegit no suposa cap complicació en l'acoblament que no haguéssim trobat de poder acoblar el pèptid 3 d'estructura inicialment prevista, és a dir, amb l'imidazole protegit amb el grup tosil. En aquest cas, al cap d'un temps relativament curt (aproximadament 2h), l'anell imidazòlic de la histidina hagués estat també desprotegit, perquè en tractar N<sup>im</sup>-tosil-histidina amb 1-hidroxibenzotriazole es produeix desprotecció de l'anell imidazòlic (132).

El fet de tenir l'imidazole lliure produeix una disminució de la concentració efectiva d'agent acilant (com a ester actiu d'HOBT), que reacciona tant amb els grups  $\alpha$ -amino lliures com amb l'anell imidazòlic, si bé s'ha de tenir en compte que el peptidil-imidazole pot actuar també com agent acilant. D'altra banda, si no en el tractament amb àcid fluorhídric anhidre, en posar el pèptid en presència d'aigua i medi àcid després d'aquesta reacció, es produeix la "des-acilació" de la histidina, de manera que des d'aquest punt de vista, no hem d'esperar que entre les impureses que acompanyen el LHRH es trobin productes de talla superior a la d'un decapèptid.

Un altre problema que es pot haver produït és l'addició de la DCC a l'anell imidazòlic lliure de la histidina, reacció catalitzada per l'HOBt (133).



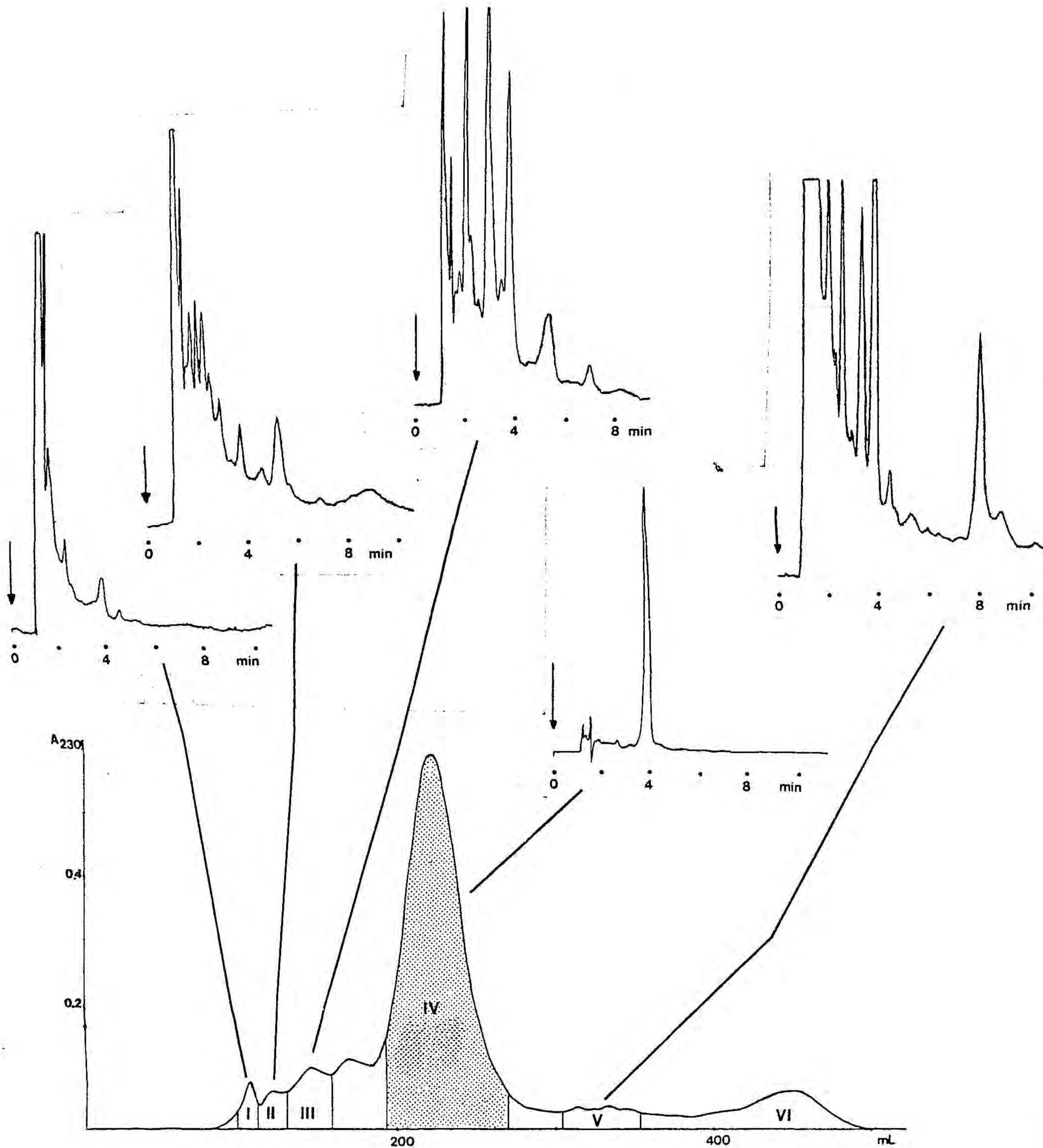
A la síntesi del fragment 1-34 de la paratirina, els autors assenyalen que durant la condensació dels segments 18-24 i 25-34 amb DCC i HOBt es va formar  $N^{\text{im}}$ -amido-His<sup>32</sup> en un 13% (98). La DCC es pot eliminar de l'adducte format escalfant amb metanol, però això té l'inconvenient de que es forma O-metil-N,N'-dicyclohexilisourea, bon agent metilant que podria metilar algun residu del nostre pèptid (histidina, triptofan, serina, tirosina i arginina). A la síntesi del LHRH no hem dut a terme cap tractament per a destruir el possible adducte DCC/imidazole.

### 1.3.2. Obtenció del crú peptídic. Purificació i caracterització del LHRH.

El LHRH lliure s'ha obtingut per tractament de la peptidil-resina amb HF anhidre en presència d'un 10% d'anisol. En aquest tractament àcid no s'afegeix cap antioxidant pel triptofan, ja que la reacció es fa en absència d'aire. Com a precedent, l'acidòlisi amb HF anhidre sobre LHRH sintetitzada al nostre laboratori per elongació seqüencial sobre una resina benzhidrilamina no va presentar cap problema (65). El rendiment d'aquesta etapa ha sigut del 59%, en base a la comparació de la quantitat de pèptid desencorada del polímer (determinada per hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids) amb la quantitat de Fmp formada a la desprotecció de la Fmoc-tetrapeptidil-resina.

La purificació del crú peptídic obtingut després de l'acidòlisi amb HF s'ha efectuat segons el mètode ja establert (65). En primer lloc el pèptid s'ha sotmés a una filtració molecular sobre Sephadex G-15, eluint amb acetat amònic 0.1M pH=8.5.

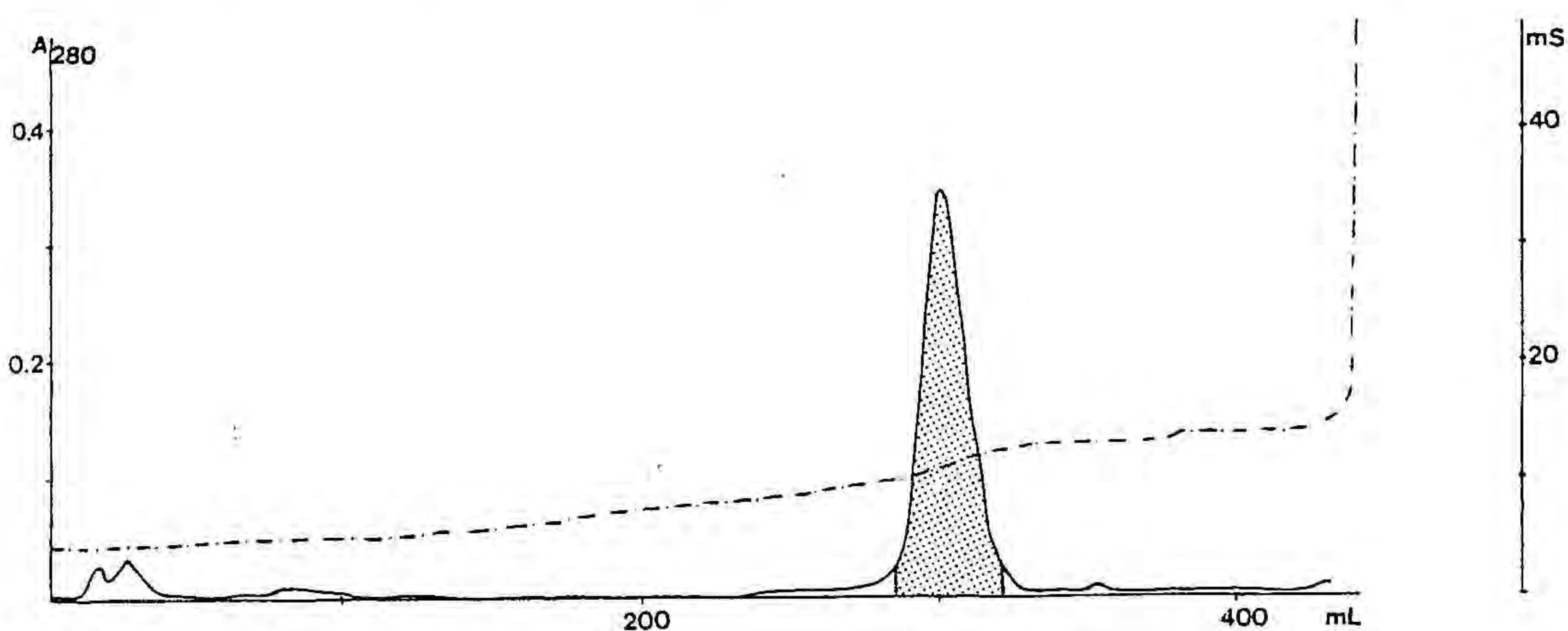
A continuació es mostra el perfil cromatogràfic obtingut en aquesta etapa, així com els cromatogrames d'HPLC analítica en fase reversa de les diferents fraccions recollides (Merck Lichrosorb C<sub>18</sub>, 20% CH<sub>3</sub>CN/TEAP 0.05M pH=3.0, 2mL/min, detecció a 280nm). A la següent pàgina, en forma de taula, s'indiquen els resultats de les anàlisis d'aminoàcids.



	<u>Crú</u>	<u>Fr. I</u>	<u>Fr. II</u>	<u>Fr. III</u>	<u>Fr. IV</u>	<u>Fr. V</u>	<u>Fr. VI</u>
Ser	0.77	0.03	0.50	0.85	0.88	1.32	1.37
Glu	0.91	0.05	0.74	1.06	0.98	1.67	1.65
Pro	0.87	1.03	0.97	0.94	0.94	0.60	-
Glv	2.02	1.08	1.73	1.96	2.07	2.59	2.25
Leu	1.03	0.97	0.96	0.97	0.95	1.00	0.29
Tyr	0.63	0.01	0.41	0.62	0.93	1.03	1.00
His	0.69	0.06	0.53	0.75	0.85	0.99	0.81
Arg	1.04	0.99	1.08	1.01	0.93	0.97	0.21

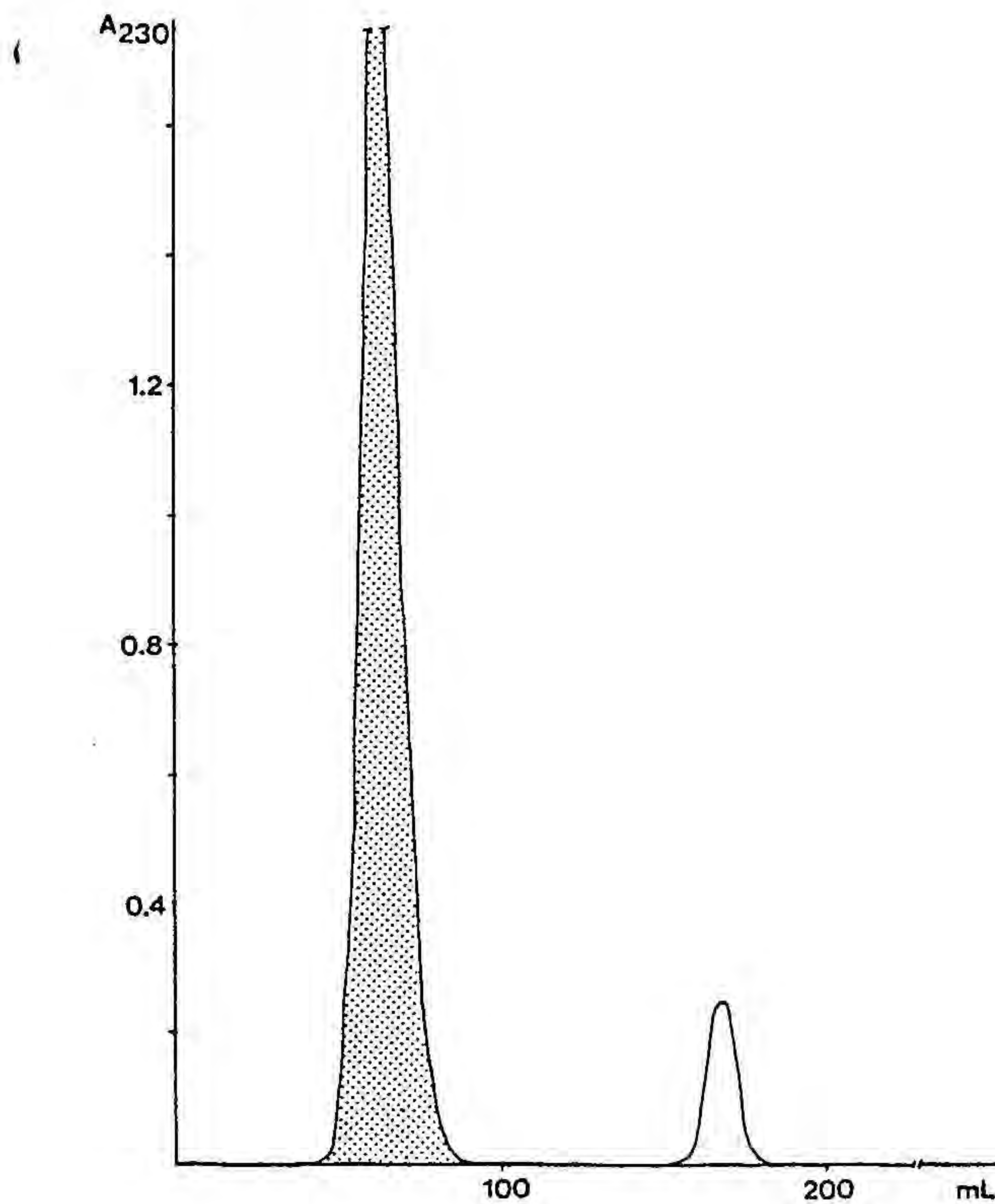
Podem veure que les primeres fraccions de la cromatografia estan enriquides en els aminoàcids corresponents al segment C-terminal, inversament al que passa amb les darreres. Donat que en aquests processos cromatogràfics els pèptids que s'elueixen primer són els de pes molecular més elevat, potser es pot explicar el resultat obtingut en base a fenòmens d'agregació de part del segment C-terminal sobre el qual no s'hauria ancorat l'hexapèptid.

Les fraccions que corresponen al pic majoritari (68%) i que contenen el producte desitjat s'han ajuntat i liofilitzat, i s'han aplicat a una columna de bescanvi iònic de carboximetilcellulosa CM-52, on el pèptid s'ha eluït amb un gradient de pH i força iònica d'acetat amònic. El cromatograma resultant és el següent

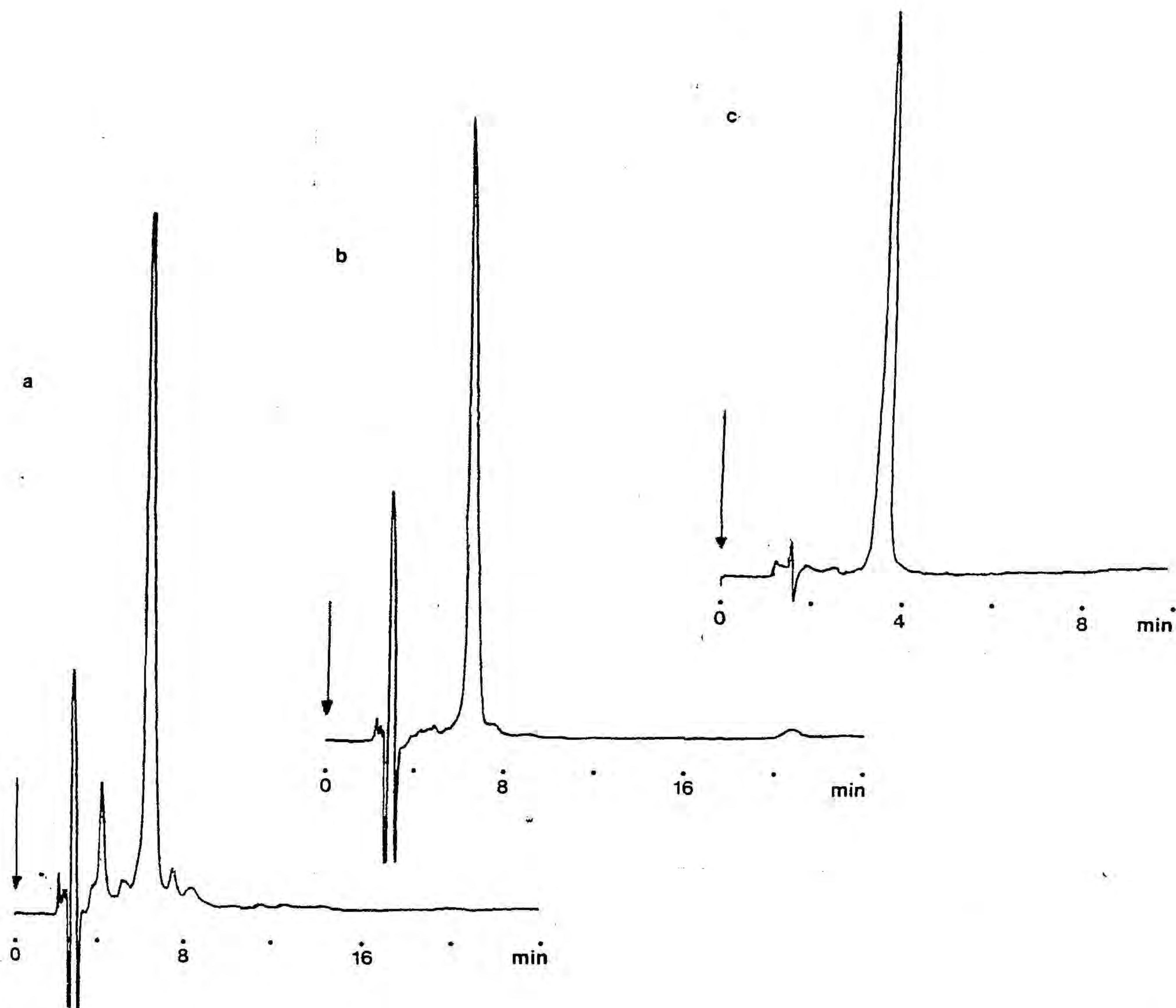


Com es pot observar, la cromatografia de bescanvi iònic presenta un pic molt majoritari (90%), ja que la major part d'impureses ja han estat eliminades amb la filtració molecular sobre Sephadex G-15.

Finalment, el LHRH s'ha dessalat mitjançant cromatografia sobre Bio-Gel P-2 eluint amb àcid acètic 0.1M, obtenint-se amb un 56% de rendiment global de purificació.



Tal com abans hem vist, tant l'anàlisi de les diferents fraccions obtingudes com el progrés de la purificació s'han seguit per cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase reversa ( $C_{18}$ ). Comparant els cromatogrames obtinguts a diferents estadis de la purificació veiem que hem purificat el crú peptídic, arribant a un producte molt homogeni que s'elueix en HPLC amb el mateix temps de retenció que el LHRH sintetitzat prèviament al nostre laboratori (65) i que havia estat caracteritzat exhaustivament (HPLC i cromatografia en capa fina en diferents condicions, poder rotatori específic, etc.).



Cromatogrames d'HPLC analítica del LHRH a diferents estadis de la purificació. a) crú peptídic; b) LHRH després de la filtració molecular sobre Sephadex G-15; c) pèptid pur. (Merck Lichrosorb C<sub>18</sub>, 20% CH<sub>3</sub>CN/TEAP 0.05M pH=3.0, 2mL/min, detecció a 280nm)

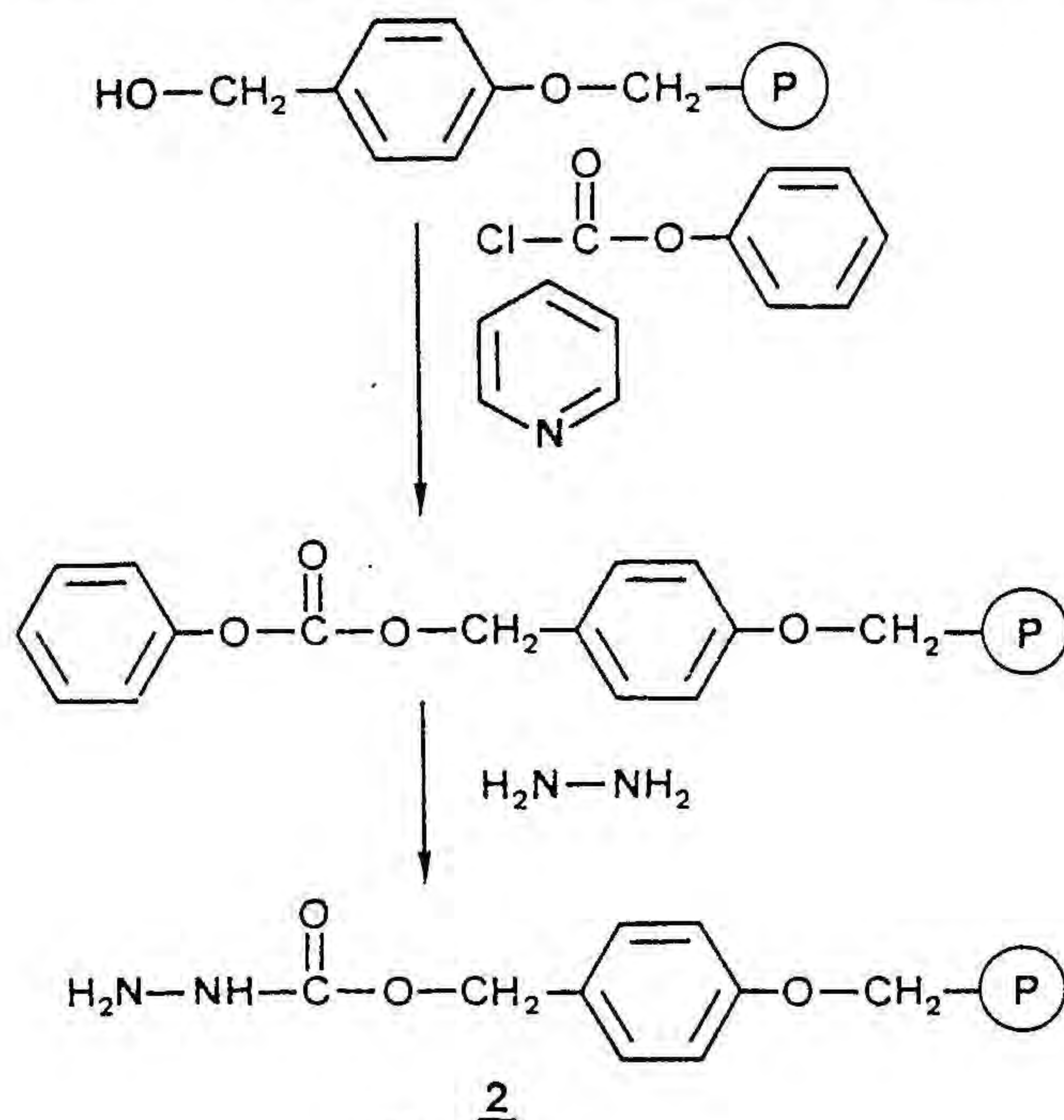
També a efectes comparatius, en la següent taula s'indiquen els resultats obtinguts en les anàlisis d'aminoàcids del pèptid en els diferents passos del procés de purificació. El triptofan, donat que requereix una hidròlisi especial, només s'ha determinat pel producte pur (vegeu materials i mètodes).

	<u>Crú</u> <u>peptídic</u>	<u>Després de</u> <u>S. G-15</u>	<u>Després de</u> <u>CMC-52</u>	<u>Pèptid</u> <u>pur</u>	<u>Valor</u> <u>teòric</u>
Ser	0.77	0.88	0.93	0.93	1
Glu	0.91	0.98	0.99	0.99	1
Pro	0.87	0.94	1.00	0.97	1
Gly	2.02	2.07	2.08	2.11	2
Leu	1.03	0.95	0.96	0.97	1
Tyr	0.63	0.93	1.00	0.98	1
His	0.69	0.85	0.99	0.98	1
Arg	1.04	0.93	1.00	0.97	1
Trp	-	-	-	0.96	1

1.4. Síntesi dels segments peptídics protegits Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-  
-Tyr(Dcbzl)-Gly-NH-NH<sub>2</sub> 5 i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH-NH<sub>2</sub> 6.

1.4.1. Síntesi del 4-carbazoiloximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinil-  
benzè) 2.

El suport sòlid 4-carbazoiloximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) 2 s'ha sintetitzat d'acord amb el procediment descrit per Wang (23). La resina 1 s'ha tractat amb cloroformiat de fenil, i la hidrazinòlisi del carbonat resultant ha donat la matriu polimèrica desitjada 2.





#### 1.4.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid 2.

L'ancorament de l'aminoàcid C-terminal, Fmoc-Gly-OH, al suport polimèric 2 s'ha efectuat mitjançant l'anhídrid simètric preformat de l'aminoàcid. Contràriament al que passa amb la resina 1, aquest acoblament té lloc en les mateixes condicions que la resta d'acoblements de la síntesi.

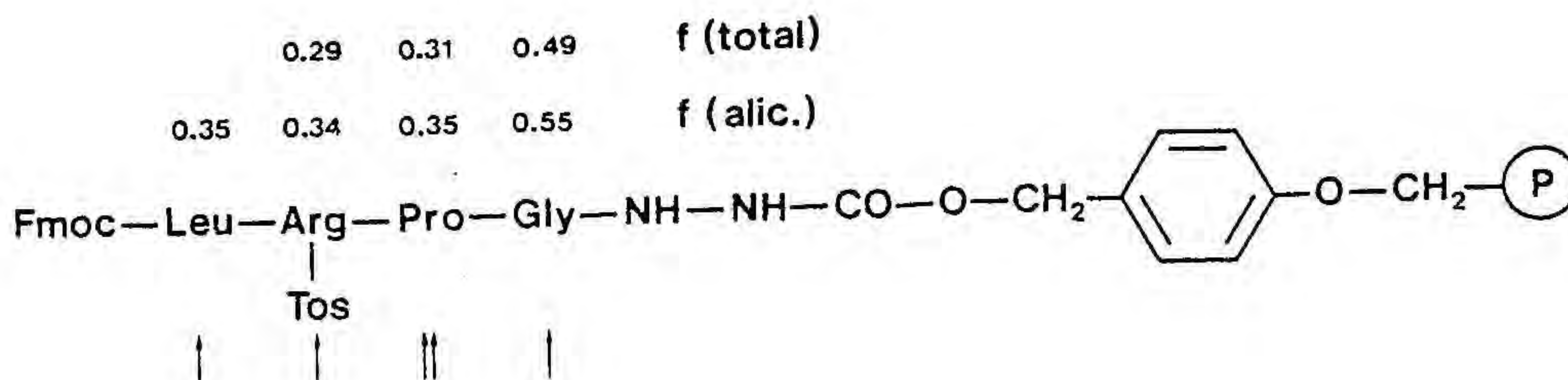
La desprotecció d'una alíquota de Fmoc-glicil-resina ha posat de manifest que hem aconseguit un grau de substitució de 0.60mmol/g Fmoc-glicil-resina. Com que l'assaig de la fluorescamina ha donat positiu, ha calgut acetilar els grups  $-NH_2$  de la resina que no han reaccionat.

El total de Fmoc-glicil-resina s'ha dividit en dues parts per a continuar amb cada una d'elles la síntesi dels pèptids 5 i 6. Després de quatre acetilacions successives sobre una de les meitats, encara no s'ha aconseguit assaig de la fluorescamina clarament negatiu, de manera que hem optat per controlar cada pas de la síntesi mitjançant l'assaig de la ninhidrina, que a aquest nivell és en canvi negatiu (pèptid 6). Amb l'altra meitat, s'ha dut a terme un intent d'acetilació amb  $Ac_2O$  i EDIA i un segon intent en les mateixes condicions però afegint DMAP, després del qual l'assaig de la fluorescamina ha sigut negatiu. L'avaluació de l'extensió dels acoblaments all llarg de la síntesi del pèptid 5 s'ha pogut fer, doncs, amb l'assaig de la fluorescamina, que, en principi, és una mica més sensible que el de la ninhidrina.

#### 1.4.3. Síntesi del segment peptídic protegit 6.

##### 1.4.3.A. Síntesi del pèptid.

El progrés de la síntesi del pèptid 6 s'indica a l'esquema següent:



on cada ↑ indica un acoblament; f és el grau de substitució, en mmol/g Fmoc-glicil-resina, o bé d'alíquotes separades per a controlar la incorporació de cada aminoàcid un cop obtingut assaig de la ninhidrina negatiu, o bé del total de Fmoc-peptidil-resina.

El primer que podem observar és que, a tots els cassos, les desproteccions de les alíquotes donen valors del grau de substitució superiors als que es troben quan es desprotegeix la totalitat de Fmoc-peptidil-resina, amb diferències bastant constants. No és fàcil trobar una explicació a aquest fet, però una de les causes pot ser que a les desproteccions de les alíquotes les absorcions residuals dels reactius i dissolvents (piperidina, DMF) incrementen la mesura de l'absorbància molt més que a les desproteccions globals, on abans de quantificar espectrofotomètricament cal efectuar una dilució més gran de la mostra.

Un cop finalitzat el primer acoblament de Fmoc-prolina, que dóna assaig de la ninhidrina negatiu, s'ha desprotegit una alíquota, i la lectura a 301nm de la N-(9-fluorenilmetil)piperidina formada ha posat de manifest una disminució del 36% respecte a la quantitat de Fmp formada en desprotegir la glicina. Hem intentat un segon acoblament, després del qual la desprotecció d'una alíquota ha tornat a donar pràcticament el mateix valor. Aquesta pèrdua s'ha confirmat en eliminar el grup Fmoc del total de la resina, posant de manifest una disminució del grau de substitució que després de dos acoblaments i assaig de la ninhidrina negatiu no es pot atribuir a una incorporació defectuosa de la prolina. De tota manera, abans d'efectuar aquesta desprotecció global, s'ha procedit a acetilar per a bloquejar possibles grups reactius (vegeu 1.4.5 per a un plantejament més detallat del problema).

A partir d'aquest punt la síntesi ha prosseguit sense cap problema, tal com podem deduir dels resultats de les successives desproteccions. Cal comentar que en aquesta síntesi l'acoblament de Fmoc-Arg(Tos)-OH ha tingut lloc normalment i amb bon rendiment.

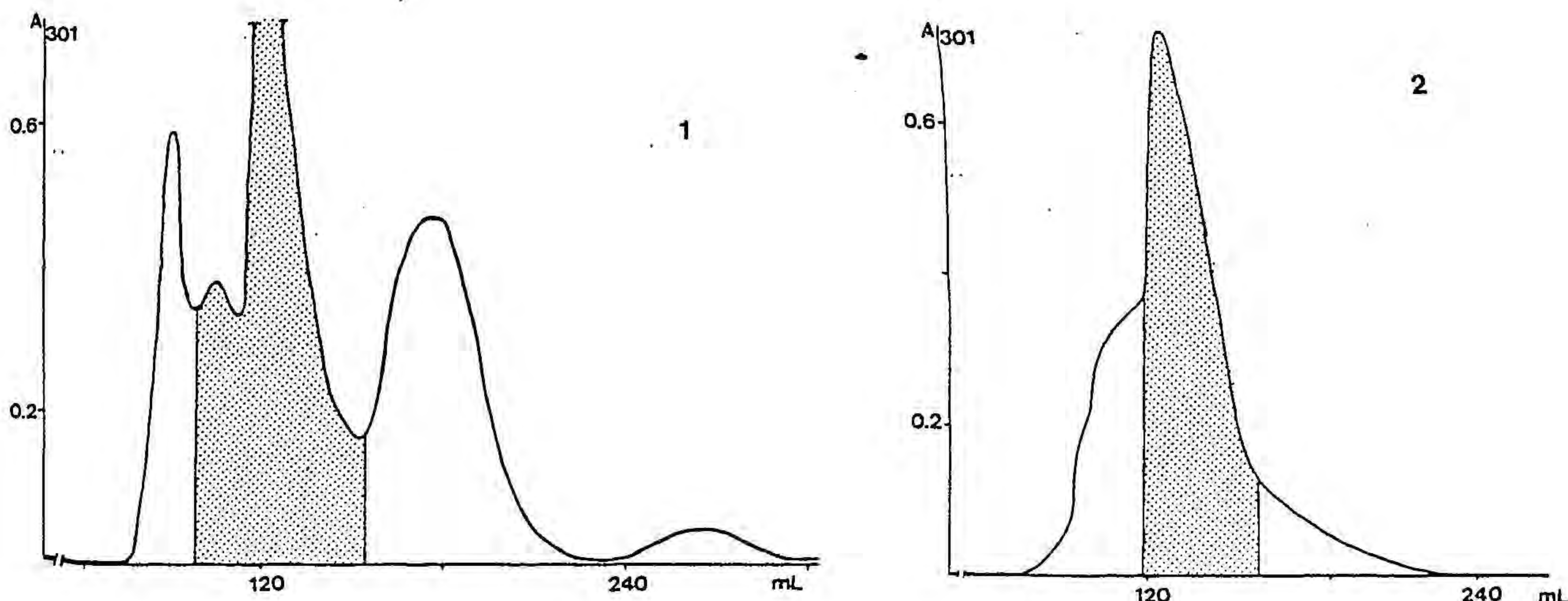
El tractament amb àcid trifluoroacètic per a desencorar el pèptid del polímer s'ha repetit tres vegades: les dues primeres en les condicions usuals, 55% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà, i la tercera amb un 100% de TFA. El rendiment del primer tractament, calculat per comparació de la quantitat de pèptid que passa a la dissolució (determinada espectrofotomètricament a partir de l'absorbància a 301nm del grup Fmoc)

amb el pèptid ancorat al polímer (en base al grau de substitució trobat a la darrera desprotecció total), ha sigut del 75%. El mateix càlcul, quantificant el pèptid que passa a la dissolució a partir de l'anàlisi d'aminoàcids, dóna un valor del rendiment del 60%. El segon i tercer tractaments han desencorat, cada un d'ells, un 1.5% de pèptid del polímer.

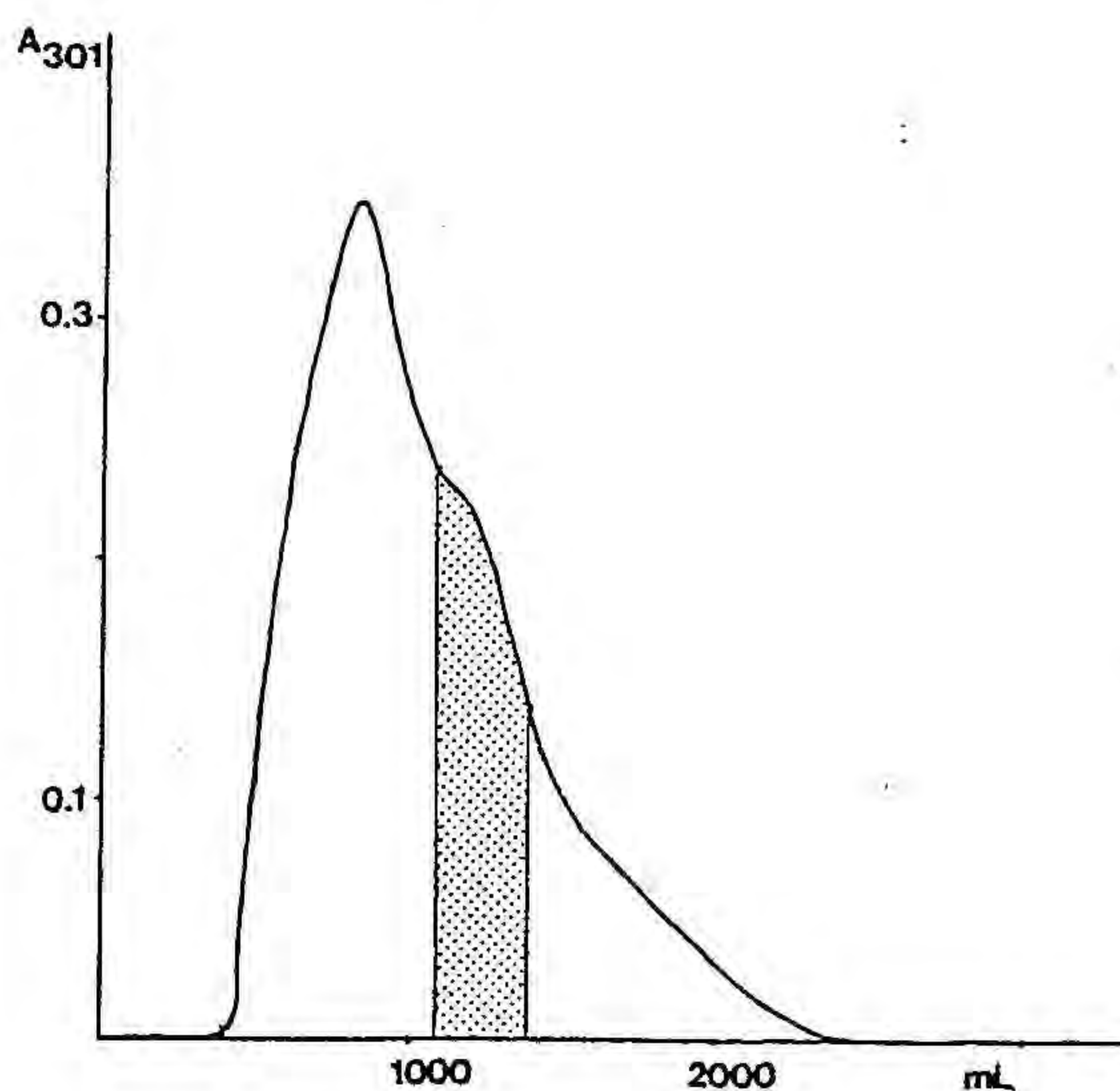
#### 1.4.3.B. Purificació i caracterització del pèptid 6.

En primer lloc s'ha procedit a separar el material peptídic d'impureses de polaritat força diferenta per "filtració" en una columna oberta de gel de sílice eluint amb un dissolvent que reten poc el producte. Després d'ajuntar les fraccions que per anàlisi per cromatografia en capa fina contenen els mateixos productes, s'ha intentat trobar condicions de purificació amb alíquotes d'aquest crú. S'ha assajat la cromatografia de filtració molecular sobre Sephadex LH-20, que ha donat un sol pic que conté tots els productes presents en la mescla. Mitjançant cromatografies d'alta eficàcia sobre gel de sílice, emprant columnes de vidre pre-empaquetades Lobar (Merck), hem aconseguit aïllar i caracteritzar per anàlisi d'aminoàcids i cromatografia en capa fina el pèptid 6, de manera que hem abordat la purificació a escala més gran en condicions semblants.

En les dues primeres etapes de la purificació, el pèptid s'ha cromatografiat i recromatografiat amb  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  80/10/2 eluint a 240mL/min. Els esquemes d'elució obtinguts, registrant de forma contínua a la sortida de la columna l'absorció a 301nm, s'indiquen a continuació.



Les fraccions procedents de la segona cromatografia que corresponen a la zona marcada s'han cromatografiat sobre gel de sílice en un aparell d'HPLC preparativa, eluint amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  87/10/3 a 200mL/min. De les tres fraccions col·lectades únicament una (la marcada) presentava una sola taca per cromatografia en capa fina corresponent al producte aïllat en els assaigs previs de purificació.



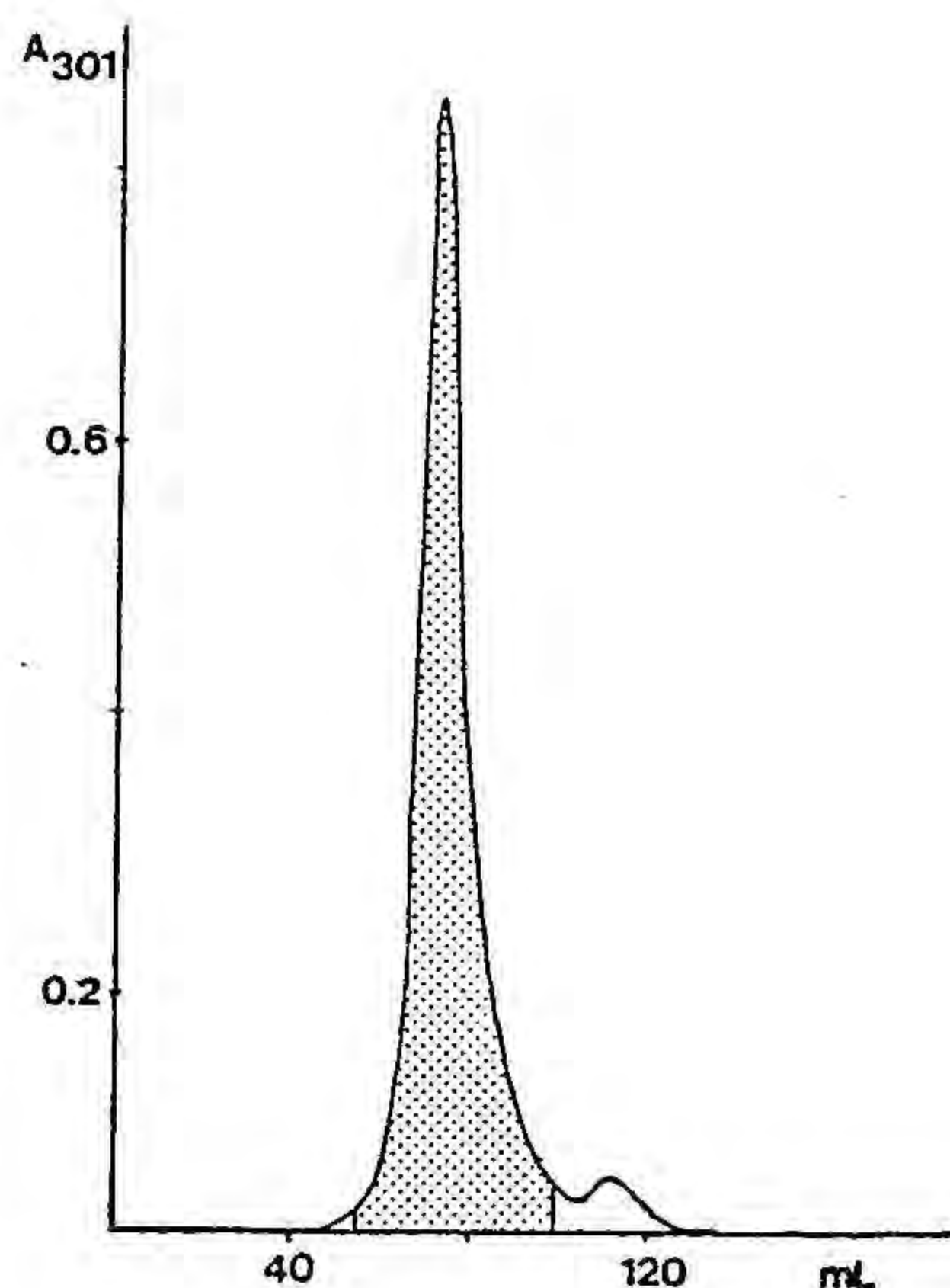
HPLC preparativa.

L'anàlisi d'aminoàcids d'aquesta fracció ha donat valors correctes que es comparen a la següent taula amb els del crú peptídic:

	<u>Crú</u> <u>peptídic</u>	<u>Fracció</u> <u>pura</u>
Pro	1.01	1.02
Gly	1.25	1.05
Leu	0.98	0.96
Arg	0.77	0.97

Finalment, com que encara s'observava alguna petita impuresa a la cromatografia en capa fina, el producte s'ha recromatografiat en les mateixes condicions que les dues primeres etapes de la purificació. El

perfil d'elució mostra pràcticament un sol pic, pur per cromatografia en capa fina ( $R_f = 0.53$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH } 3/1$ ). El rendiment de la purificació ha sigut del 7%.

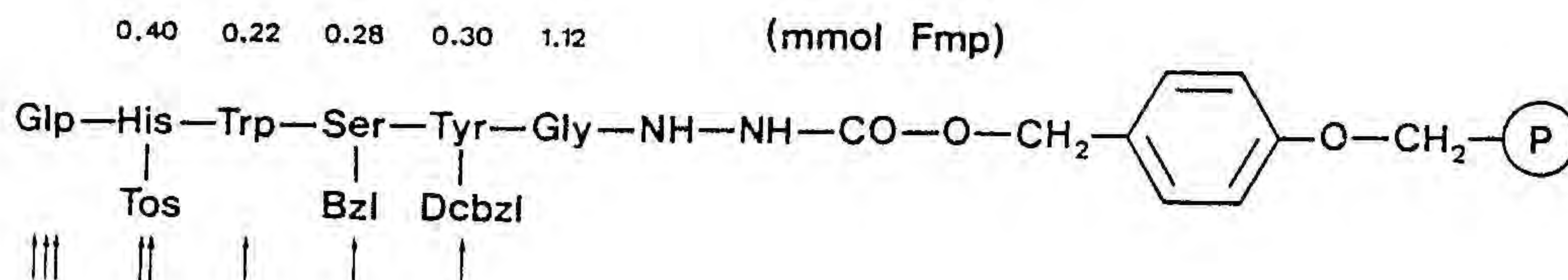


Quarta cromatografia del pèptid 6.

#### 1.4.4. Síntesi del segment peptídic protegit 5.

##### 1.4.4.A. Síntesi del pèptid.

L'evolució de la síntesi del pèptid 5 s'indica al següent esquema:



cada ↑ indica que s'ha efectuat un acoblament d'aquell aminoàcid, i els números al damunt de cada residu corresponen als mmol de Fmp trobats a cada etapa de desprotecció global. Com ja hem indicat a l'apartat 1.4.2., en aquesta síntesi no ha sigut necessari efectuar desprotecció d'alíquotes abans de dur a terme la desprotecció de la totalitat de Fmoc-peptidil-resina.

El primer problema que hem tingut en aquesta síntesi és el mateix que ja hem trobat a la síntesi del pèptid 6, la pèrdua de funcionalització detectada en desprotegir la Fmoc-Tyr(Dcbzl)-Gly-resina (73% de pèrdua). En aquest cas, preveient la possibilitat de tornar a trobar aquest problema, s'ha procedit a acetilar abans de desprotegir la tirosina per tal de bloquejar possibles grups reactius.

A partir d'aquesta etapa, la síntesi ha continuat normalment, els valors del grau de substitució s'han anat mantenint dins de límits correctes, fins a arribar a la desprotecció de la histidina on hem observat, igual que a la síntesi del pèptid 3 (1.2.4.A.), un augment de la quantitat de Fmp alliberada, que en aquest cas arriba a ésser del 70%.

De la mateixa manera que a la síntesi del pèptid 3, l'acoblament de l'àcid piroglutàmic ha presentat dificultats; l'assaig de la fluorescència ha donat clarament positiu després de dos acoblaments amb l'anhídrid simètric preformat, i només s'aconsegueix assaig negatiu després d'un tercer acoblament amb aminoàcid i DCC mol a mol.

El tractament de la peptidil-resina amb 55% de TFA en diclorometà i en presència de 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol per a evitar l'oxidació del triptofan, ha donat el segment peptídic amb un 54% de rendiment, determinat per la relació entre la quantitat de pèptid desencorat del polímer (calculada per anàlisi d'aminoàcids) i el pèptid ancorat a la matriu polimèrica abans de l'acidòlisi (determinat a partir de la Fmp alliberada en desprotegir el triptofan). Un segon tractament en les mateixes condicions gairebé no ha amillorat el rendiment.

#### 1.4.4.B. Purificació del pèptid 5.

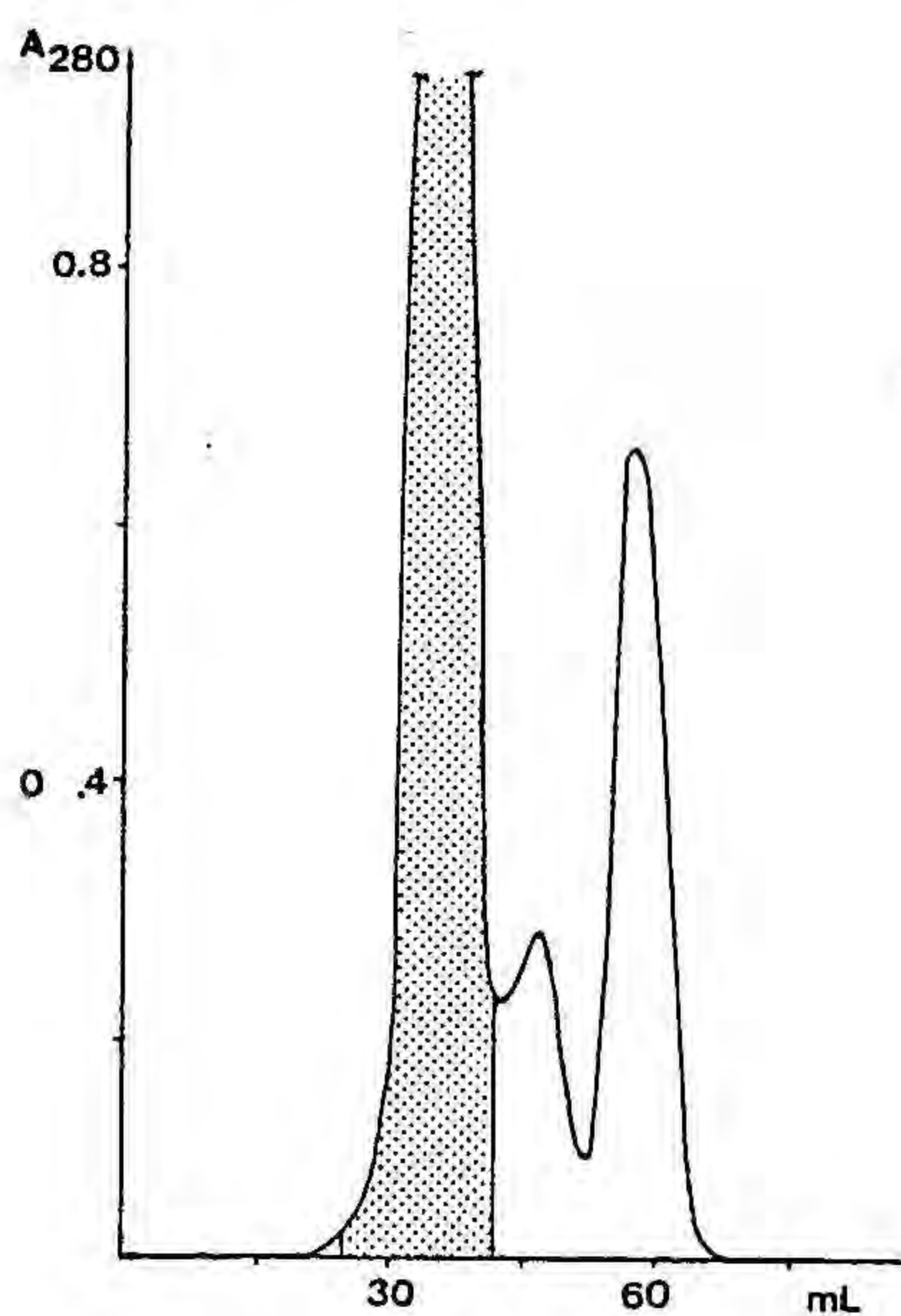
La purificació d'aquest pèptid ja d'entrada s'ha presentat problemàtica, amb inconvenients que abans no hem tingut:

- hem treballat amb quantitats de producte petites, ja que el rendiment de la síntesi ha sigut molt baix
- el producte és molt poc soluble en els dissolvents amb que es treballa habitualment (diclorometà, metanol,...)

- no hem aconseguit de trobar, tot i haver assajat moltes condicions, un eluent òptim per a l'anàlisi del producte per cromatografia en capa fina
- el crú peptídic presentava moltes impureses.

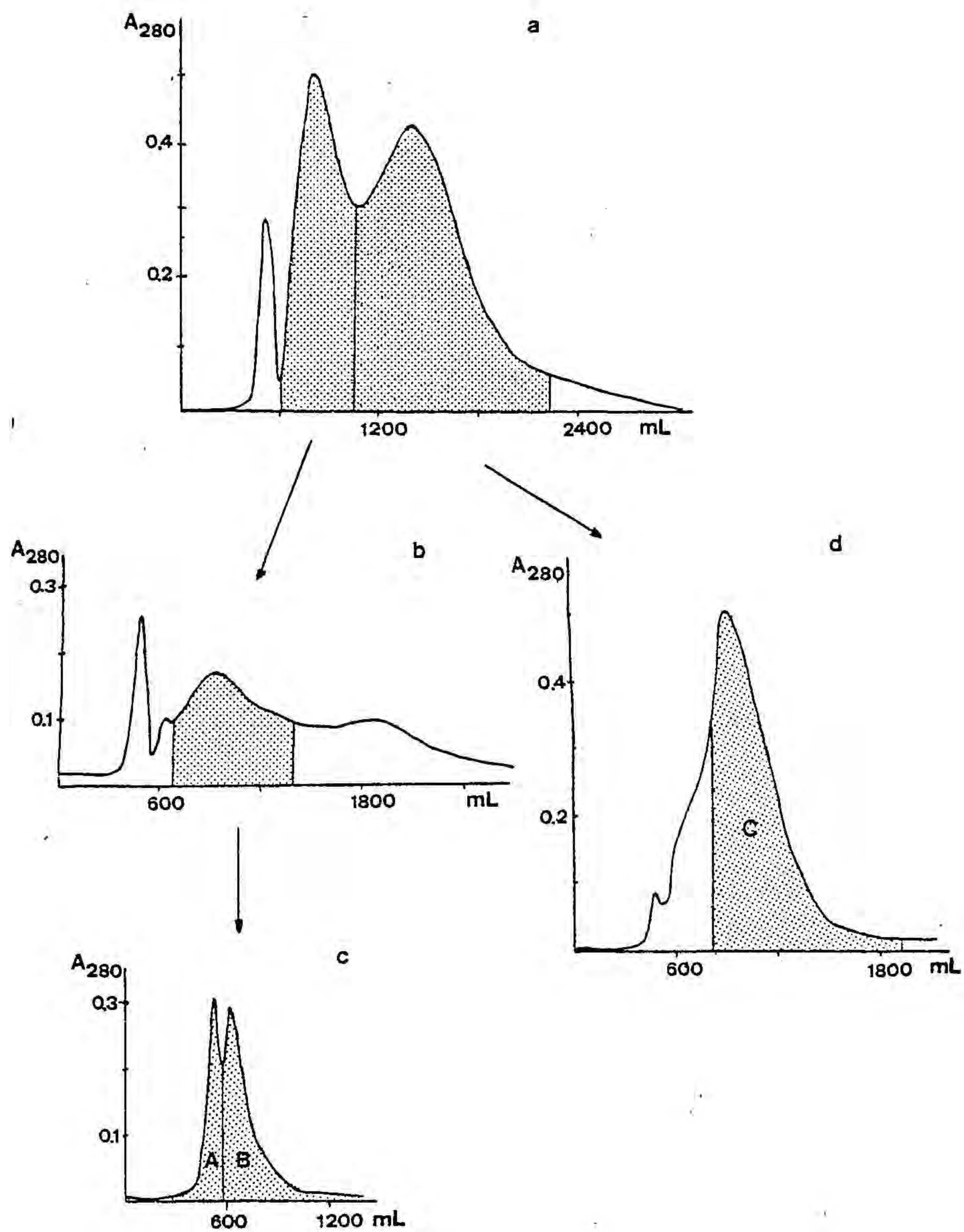
Hem abordat la purificació de la mateixa manera que la de l'hexapeptid amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure 3, per filtració molecular i cromatografia líquida d'alta eficàcia sobre gel de sílice en un aparell preparatiu.

En la cromatografia sobre Sephadex LH-20 l'elució del pèptid s'ha efectuat amb 10% de N,N-dimetilacetamida en metanol, per a aconseguir solubilitzar el pèptid. Com que no tenim grup Fmoc, hem seguit la cromatografia a 280nm, màxim d'absorció de tirosina i triptofan. Per a la següent etapa de la purificació s'han ajuntat les fraccions corresponents al pic majoritari del perfil d'elució.



Filtració molecular sobre Sephadex LH-20.

En el primer intent de purificació per HPLC preparativa sobre gel de sílice, el pèptid s'ha eluït amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  57/40/3, donant un sol pic que conté tota la mescla de productes. Un cop evaporat el dissolvent, s'ha recromatografiat amb un eluent diferent,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  77/20/3. L'anàlisi per cromatografia en capa fina ha posat de manifest novament que gairebé no hi ha hagut separació, de manera que hem ajuntat i recromatografiat les fraccions senyalades en el cromatograma a. A continuació es mostren els perfils de les cromatografies que han permès de separar productes (pàgina següent).



Cromatogrames d'HPLC preparativa sobre gel de sílice del pèptid 5. Flux: 200mL/min, detecció a 280nm. Eluents: a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  85/13/2; b)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  86.5/11.25/2.25; c)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  77/20/3; d)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  77/20/3.

A la següent taula s'indiquen els resultats de les anàlisis d'aminoàcids del producte després del tractament amb TFA (crú peptídic), després de la filtració molecular i de les tres fraccions obtingudes després d'HPLC preparativa (vegeu pàgina següent):



	<u>Crú</u> <u>peptídic</u>	<u>Després de</u> <u>S. LH-20 .</u>	<u>Fracció</u> <u>A</u>	<u>Fracció</u> <u>B</u>	<u>Fracció</u> <u>C</u>
Ser	0.99	0.85	0.94	0.97	0.89
Glu	2.38	1.29	1.05	1.14	1.16
Gly	1.71	0.98	1.01	1.01	1.00
Tyr	1.05	0.96	0.87	0.87	0.94
His	0.96	0.92	-	-	-

La quantitat de producte present a les fraccions A, B i C correspon a un rendiment de purificació del 3, 4 i 16% respectivament. Com podem observar, les tres fraccions, i principalment la A, presenten una anàlisi d'aminoàcids força correcta (cal tenir en compte que es tracta de pèptids protegits). Ara bé, el fet de que per cromatografia en capa fina encara s'observi a totes les fraccions la presència de petites impureses, la dificultat de discernir en quina fracció es troba l'hexapèptid d'estructura correcta i les petites quantitats de producte obtingudes ens han portat a abandonar la purificació sense poder dur a terme la síntesi del LHRH per condensació de segments peptídics protegits mitjançant el mètode de l'azida.

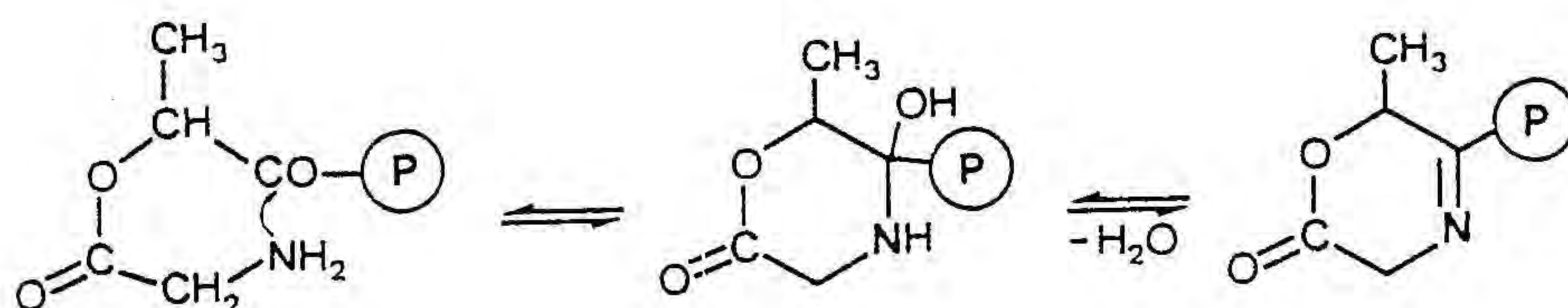
1.4.5. Estudi de la reacció secundària que té lloc sobre H-Gly-NH-NH-CO-  
-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-CH<sub>2</sub>- $\textcircled{\text{P}}$ .

Tant a la síntesi del pèptid 5 com la del 6 ha tingut lloc una pèrdua del grau de substitució en el procés que va des de la desprotecció del primer aminoàcid a la incorporació del segon, que seria interessant de saber a qué és deguda i si es pot evitar. Com ja hem vist, la disminució del grau de substitució ha oscil·lat entre el 36% (pèptid 6) i el 73% (pèptid 5).

A la segona síntesi (pèptid 5) es varen guardar per separat els filtrats procedents de la desprotecció de Fmoc-Gly-resina juntament amb els primers rentats amb diclorometà i DMF, els filtrats corresponents

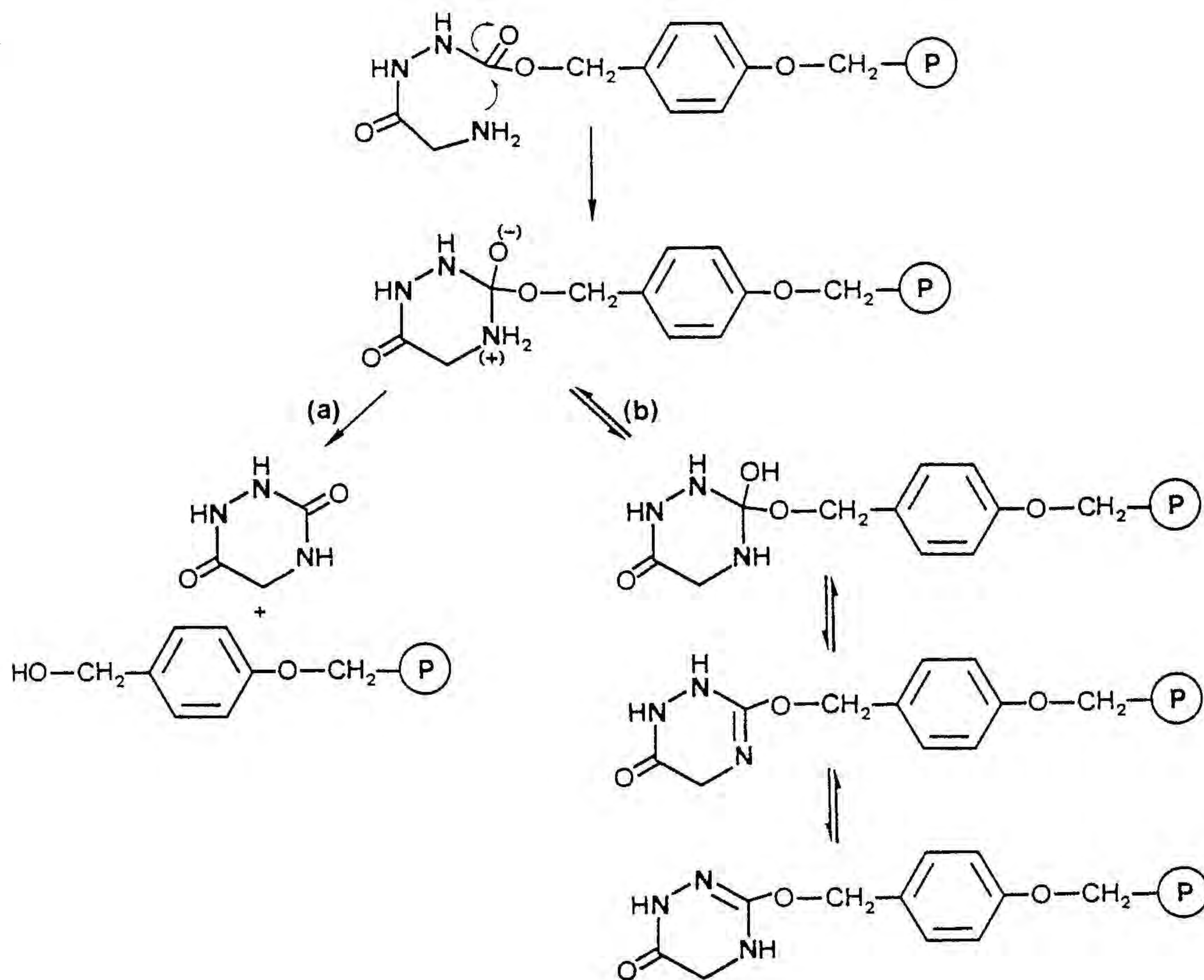
a la resta de rentats després de la desprotecció i els filtrats procedents de l'acoblament de la tirosina. Aquestes tres fraccions s'han analitzat després d'hidròlisi amb HCl 6N i s'ha trobat que contenen, respectivament, 34.6, 3.7 i 1.4  $\mu\text{mol}$  de glicina. Aquests valors no lliguen amb la pèrdua de funcionalització que ha tingut lloc durant la síntesi, que totalitza 820  $\mu\text{mol}$  de glicina, però sí que posen de manifest que, per algun mecanisme i a partir de la desprotecció, part de la glicina es desencora del suport polimèric. D'altra banda, cal no oblidar els elevats valors de glicina trobats a les anàlisis d'aminoàcids dels crús peptídics 5 i 6. Així, en el cas del pèptid 5, hi ha un 70% d'excés de glicina en relació a tirosina o serina (vegeu 1.4.4.B), la qual cosa vol dir que el crú peptídic 5 conté uns 100  $\mu\text{mol}$  de glicina (o d'algun derivat que per hidròlisi àcida dóna glicina), que estava incorporada a la resina però sobre la qual no s'havia incorporat tirosina. Tenint en compte que el rendiment del TFA no és quantitatiu, cal pensar que sobre la resina encara queda glicina en forma no peptídica, i que possiblement se n'ha anat desencorant de la resina al llarg de la síntesi.

A la bibliografia es descriu la ciclació intramolecular d'una glicil-resina per donar lloc a una base de Schiff (134):



En aquest cas no hi ha desencoratge de glicina del polímer, però el següent aminoàcid s'incorporarà en menor extensió, o, dit d'una altra manera, hi ha pèrdua del grau de substitució. D'altra banda i, el que és més greu, l'anell es pot obrir en etapes posteriors de la síntesi possibilitant la formació de pèptids erronis per acilació dels grups amino que s'alliberen.

En el nostre cas, un cop desprotegida la glicina es pot produir una aminòlisi intramolecular que pot evolucionar cap al desencorament de glicina del suport sòlid (mecanisme a) o cap a la formació d'un producte cíclic que roman ancorat al polímer i que es pot obrir en etapes posteriors (mecanisme b).

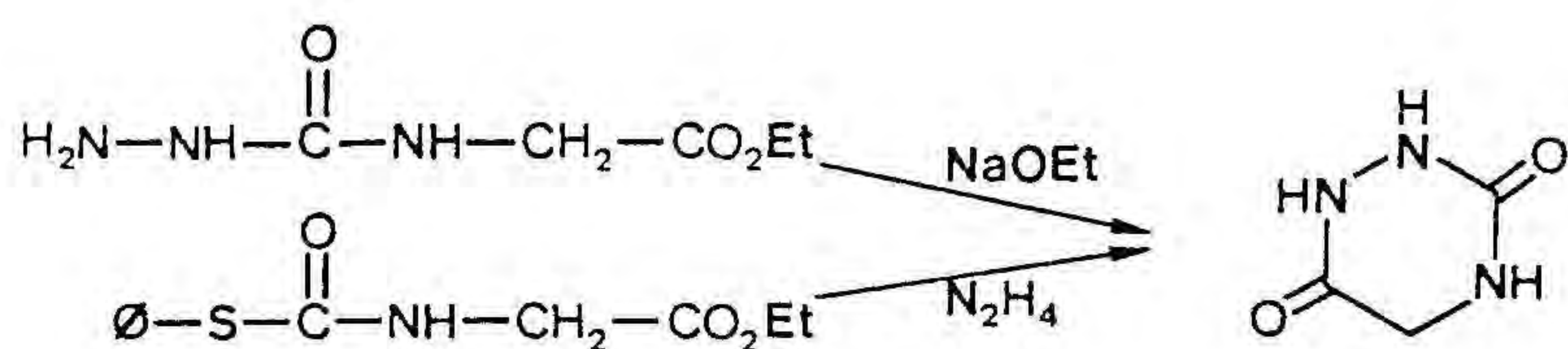


Quan el camí d'evolució és a, el grup sortint 4-hidroximetil-fenoximetilpoliestirè és el mateix que quan es forma una dicetopiperazina, reacció que hem observat a la síntesi de pèptid 4.

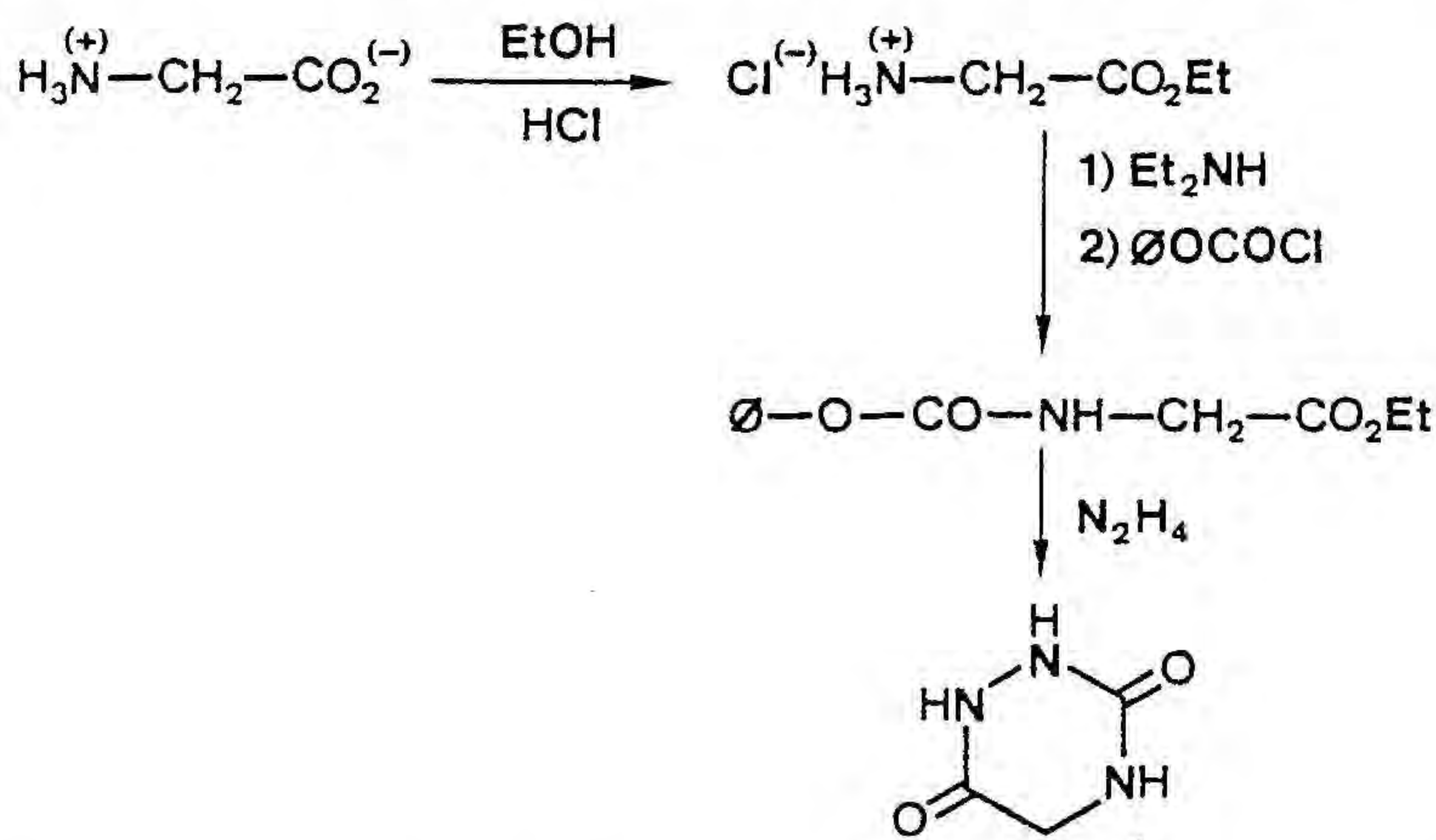
El mecanisme b explicaria tant la pèrdua del funcionalització com l'elevat contingut en glicina del crú peptídic i les grans dificultats trobades a la purificació, sobretot, del pèptid 5.

Possiblement es dona una coexistència dels dos mecanismes, però com que una certa quantitat de glicina ha passat als filtrats recollits, hem volgut veure si ho fa com al producte cíclic indicat a l'esquema anterior, és a dir, 3,6-dioxo-1,2,4-triazina, sintetitzant aquest producte.

A la literatura es troba descrita l'obtenció de la 3,6-dioxo-1,2,4-triazina per reacció del 4-semicarbazinoacetat d'etil amb etòxid sòdic (135) o per hidrazinòlisi del feniltiocarbonilglicinat d'etil (136).



Donades les disponibilitats de productes al laboratori, hem decidit de sintetitzar la 3,6-dioxo-1,2,4-triazina pel camí que indiquem a continuació que passa pel fenoxicarbonilglicinat d'etil:



Un cop sintetitzat el patró de triazina, els filtrats de la síntesi del peptid 5 que havíem guardat i als quals ens hem referit abans s'han analitzat per tres mètodes diferents:

- i) cromatografia en capa fina, eluint amb n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 4/1/1 (revelador: hipoclorit)
- ii) cromatografia de gasos
- iii) cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase reversa.

En cap cas s'ha pogut detectar, inequívocament, la presència de 3,6-dioxo-1,2,4-triazina. S'ha de dir, però, que els filtrats analitzats contenien quantitats molt considerables d'altres productes (hidroclorur de piperidini, Fmp, Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH, diciclohexilurea, etc.... segons el cas) que dificulten l'anàlisi, pel que creiem que no es pot descartar del tot la presència de la triazina.

## 1.5. Discussió.

El primer objectiu d'aquesta Tesi era dur a terme la comparació de dues tàctiques de síntesi convergent en cada una de les tres etapes que s'hi poden diferenciar: la síntesi de segments peptídics protegits, la purificació i caracterització d'aquests productes i l'engalament dels pèptids per a donar l'oligopèptid desitjat.

Com hem vist en aquest capítol, tan sols en el cas dels segments peptídics protegits amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure hem pogut sintetitzar el LHRH. Així doncs, no ha sigut possible contrastar els avantatges o inconvenients del mètode de l'azida en l'engalament dels segments, mètode que comporta la transformació prèvia de les hidrazides en acil-azides per a efectuar l'acoblament. De tota manera, els resultats que hem exposat posen clarament de manifest que no és viable l'obtenció de pèptids en forma d'hidrazida C-terminal amb Fmoc-aminoàcids i sobre el suport sòlid 2. D'una banda, les síntesis han tingut un rendiment molt baix, principalment a causa de les enormes pèrdues de grau de substitució sobre el polímer que s'han produït en el procés d'incorporació del segon aminoàcid; d'altra banda, els crús peptídics són molt heterogenis, fet que no té explicació evident i que es veu agreujat per les dificultats inherents al mètode emprat per a la purificació.

En qualsevol cas, fins i tot si aconseguíssim amillorar substancialment el mètode de síntesi, els acoblaments pel mètode de l'azida presenten dificultats, tal com hem pogut comprovar al nostre laboratori a la síntesi de l'apamina (137) i com es dedueix del conjunt de les experiències descrites a la literatura (74 i 75). El conjunt de tots aquests factors ens ha dut a abandonar aquesta via, i més tenint en compte que, si bé l'acoblament del pèptid 4 a la resina benzhidrilamina ha tingut un rendiment molt baix (possiblement per problemes d'accessibilitat d'un pèptid a una amina polimèrica estèricament impedida), l'engalament del segment peptídic 3 a la peptidil-resina ha tingut lloc amb molt bon rendiment.

Tanmateix, la tàctica que emprava els segments peptídics protegits amb l'àcid carboxílic C-terminal lliure també ha presentat molts problemes.

En l'etapa de síntesi dels segments peptídics protegits, hem pogut detectar pèrdues de grau de substitució importants en el cicle

d'incorporació del tercer aminoàcid, que inclou la desprotecció del segon i l'acoblament del tercer, i que molt probablement siguin degudes a la formació de dicetopiperazines. Conseqüentment, caldrà confirmar que es poden formar dicetopiperazines, i estudiar en quines condicions està més afavorida l'aminòlisi intramolecular. Tot i que aquesta reacció secundària és seqüència-dependent (i per això s'ha produït amb més extensió a la síntesi del pèptid 4 que a la síntesi del pèptid 3) i probablement no serà un problema greu la majoria dels cassos, caldrà també cercar condicions que minimitzin la seva extensió.

Deixant de banda la formació de dicetopiperazines, el problema aïllat de la histidina comercial i el protocol d'ancorament del primer aminoàcid a la matriu sòlida (que com veurem en el proper capítol condueix també a l'ancoratge de dipèptid), les síntesis han procedit amb "relativa" normalitat. Els grups Fmoc s'eliminen correctament en les condicions descrites (després d'un segon tractament amb piperidina no es detecta més Fmp) i els acoblaments amb l'anhídrid preformat són ràpids, no essent necessària la repetició sistemàtica d'un acoblament per a obtenir un assaig d'amines negatiu.

Ara bé, els rendiments d'acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina han sigut baixos i inferiors als descrits a la literatura, fet que podria estar lligat a la qualitat de la matriu polimèrica emprada per a dur a terme les síntesis i, per tant, a la forma d'obtenir-la.

L'etapa de purificació per cromatografia sobre gel de sílice dels segments peptídics protegits també ha presentat bastants problemes, el primer dels quals està associat a l'escassa solubilitat dels pèptids en els dissolvents orgànics més habituals. Si el pèptid que es cromatografia és soluble tan sols en dissolvents com la DMF, pot precipitar en les condicions cromatogràfiques quan en el procés d'elució s'ha eliminat la DMF que el solubilitzava. Fins i tot quan el pèptid és soluble en el dissolvent que s'empra, no existint a priori la possibilitat de precipitació, la recuperació de producte després de la cromatografia sobre gel de sílice ha sigut baixa. El segon problema rau en el propi mètode de purificació, ja que d'una banda, els perfils cromatogràfics mostren, en general, pics amples i amb tendència a donar cues, i d'altra banda, els dissolvents polars (necessaris per a obtenir pics aguts) desactiven les columnes de gel de sílice.

En conjunt, doncs, el mètode de purificació d'aquests pèptids protegits no està ben resolt; cal trobar una alternativa millor, amb més resolució i menys inconvenients pràctics, i més tenint en compte que un dels punts claus en els quals es fonamenta l'estratègia convergent de síntesi de polipèptids és la purificació exhaustiva dels segments peptídics protegits, per tal de procedir en l'etapa final a l'engalzament d'unitats homogenies.

Les dificultats de purificació s'han vist agreujades per la manca d'un bon sistema analític que ens permetés de controlar el procés de purificació. La caracterització del producte per cromatografia en capa fina no ha sigut gens fàcil, ha calgut assajar molts eluents i no sempre s'ha aconseguit una separació prou acceptable. Caldrà trobar, també, mètodes analítics alternatius, més resolutius, que facilitin el seguiment i control de la puresa del pèptid.

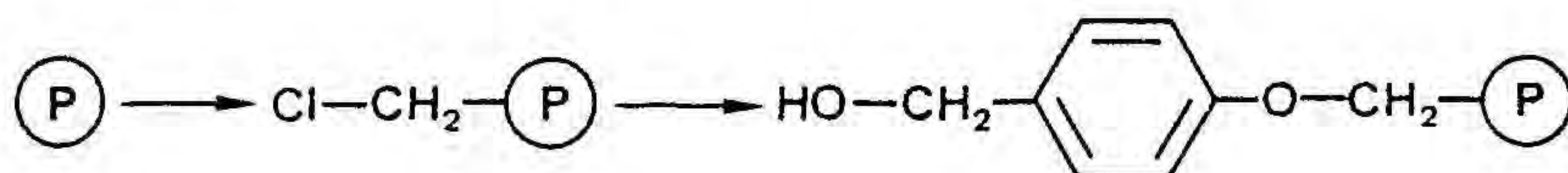
2. ESTUDI DELS PROBLEMES SORGITS AL LLARG DE  
LA SÍNTESI AMB FMOC-AMINOÀCIDS I  
4-HIDROXIMETILFENOXIMETILPOLIESTIRÈ.



## 2.1. Síntesi del suport polimèric 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

Els rendiments d'acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina obtinguts a les síntesis dels segments peptídics protegits 3 i 4 són relativament baixos si es comparen amb els rendiments descrits a la literatura pel mateix tipus de reacció, que en general són molt elevats o pràcticament quantitatius (39, 41 i 42). Val a dir que sovint no queda del tot clar com està calculat aquest rendiment, i ja hem vist que el valor del rendiment varia segons quin sigui el mètode emprat per a quantificar pèptid en dissolució o sobre la resina (vegeu 1.4.3.A). Tanmateix, creiem que el rendiment de l'acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina pot estar lligat a la qualitat del polímer sobre el qual es construeix el pèptid.

Així, ens hem proposat sintetitzar de nou el 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè però partint de poliestirè reticulat amb divinilbenzè comercial, en comptes de a partir de clorometilpoliestirè comercial. Hem comentat ja (1.2.3.A) que se sap que la resina clorometilada Bio-Rad (emprada per nosaltres a la primera síntesi de la resina 1) té grups hidroximetil a més a més de grups clorometil (117), de manera que hem volgut sintetitzar nosaltres mateixos el clorometilpoliestirè, per un mètode que en principi no condueix a la formació de grups hidroximetil. A partir del clorometilpoliestirè hem obtingut a continuació el 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè.

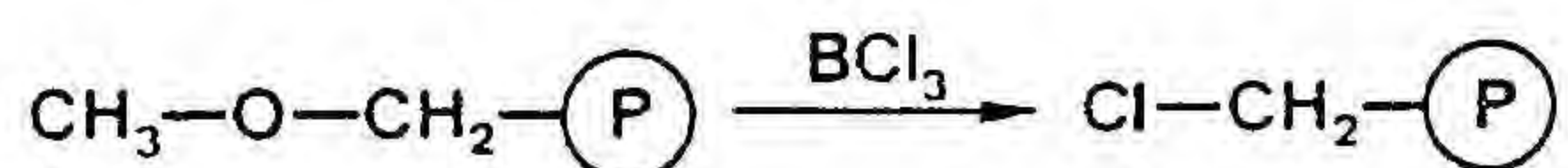


### 2.1.1. Síntesi de clorometilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

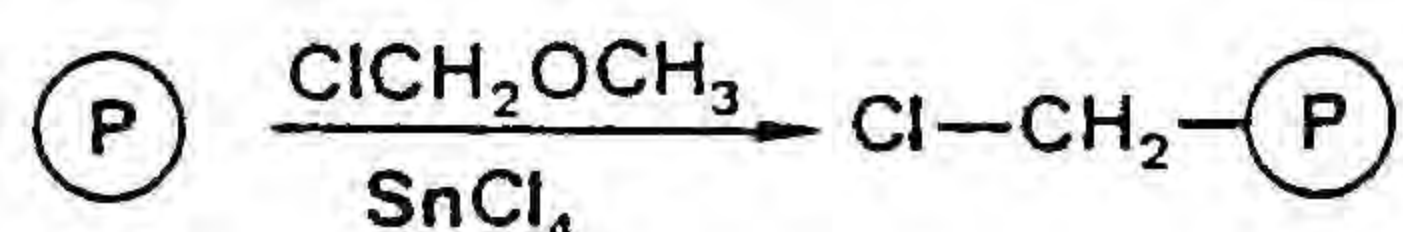
#### 2.1.1.A. Síntesi de clorometilpoliestirè.

A la literatura es descriuen dos mètodes d'obtenció de clorometilpoliestirè. En un d'aquests mètodes es tracta metoximetilpoliestirè (obtingut per copolimerització de p-metoximetilestirè, estiré i divinilbenzè)

amb triclorur de bor en  $\text{CCl}_4$  a  $0^\circ\text{C}$  per a donar el producte desitjat (138)



No obstant, el mètode d'obtenció més freqüentment emprat suposa la clorometilació directa del copolímer d'estirè i divinilbenzè amb clorometil metil èter i un àcid de Lewis (2, 126, 139 a 141).



L'àcid de Lewis més correntment emprat és el tetraclorur d'estany però també s'ha fet servir diclorur de zinc. Les condicions experimentals varien bastant d'una referència a l'altra, i donat que el grau de clorometilació depen de la concentració de  $\text{ClCH}_2\text{OCH}_3$  (141), de la concentració de  $\text{SnCl}_4$ , temps i temperatura de la reacció (126), és difícil triar les condicions adequades per a obtenir un clorometilpoliestirè amb el grau de substitució desitjat.

En principi, interessa obtenir polímers amb graus de substitució entre 0.3 i 0.8mmol/g, amb la idea de que quan es sintetitzi un pèptid sobre aquesta matriu polimèrica (o sobre una altra resina obtinguda a partir d'aquesta), el pes de pèptid ancorat al polímer al final de la síntesi no superi el pes inicial de resina (3), per tal de no modificar totalment les propietats inicials de la matriu sòlida. En aquest sentit, no és desitjable un grau de substitució molt elevat, sobretot si el pèptid té una certa llargària, perquè fàcilment es sobrepassaria el pes inicial de resina; ara bé, tampoc és desitjable un grau de substitució massa baix perquè implica emprar bastant de resina i un gran volum de dissolvent a cada etapa de rentat a la síntesi.

Com veurem més endavant, els diferents intents de clorometilació que hem dut a terme han donat resultats poc reproduïbles. Algunes vegades fins i tot no hi ha hagut reacció, però la repetició de la clorometilació sobre la mateixa mostra, fent servir els mateixos lots de reactius i en les mateixes condicions experimentals, sí que ha donat resultat positiu.

Per a obviar a aquesta manca de reproduïbilitat en les clorometilacions, Feinberg i Merrifield han recomanat l'ús de  $\text{ZnCl}_2$  en comptes

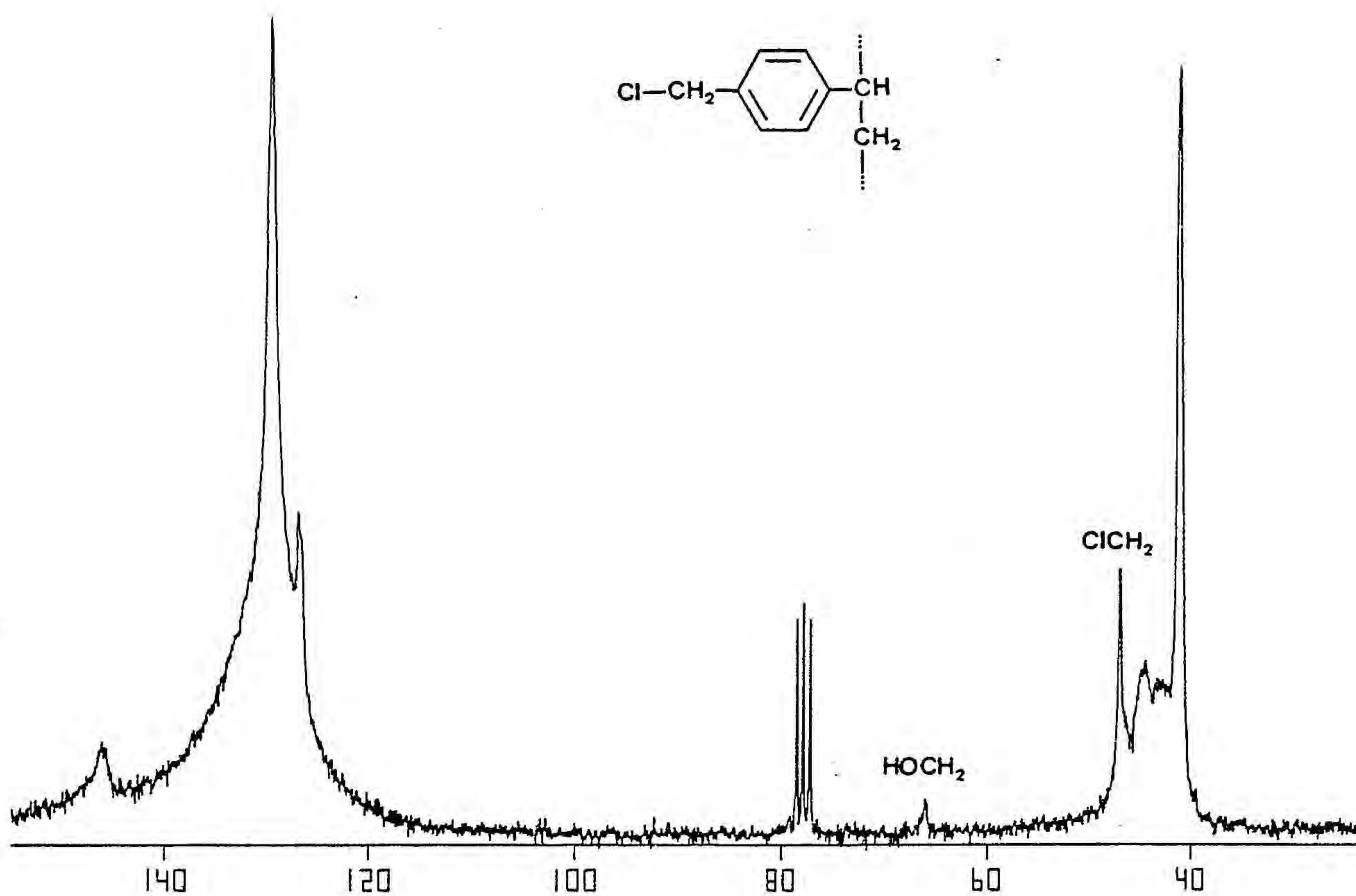
de  $\text{SnCl}_4$  (141). Quan s'empra  $\text{ZnCl}_2$ , si es volen obtenir graus de substitució superiors a 0.3mmol/g, cal treballar a temperatura més elevada que la usual amb tetraclorur d'estany ( $0^\circ\text{C}$ ) i allargar el temps de reacció. Els autors obtenen resultats reproduïbles treballant amb mostres de 0.5g de poliestirè, però aquesta reproduïbilitat es perd en treballar a l'escala dels 10g. Per aquesta raó, no hem assajat de substituir el  $\text{SnCl}_4$  per  $\text{ZnCl}_2$ , donat que nosaltres treballem normalment amb 5-10g de resina.

A la vista de les condicions experimentals descrites a la literatura i el grau de substitució que s'obté en cada cas hem triat les nostres condicions per a dur a terme la clorometilació del poliestirè amb  $\text{ClCH}_2\text{OCH}_3$  i  $\text{SnCl}_4$  (vegeu part experimental). Cal anar amb compte amb la manipulació dels reactius, tant perquè el clorometil metil èter està reconegut com a agent carcinogen com pel fet de que tots dos s'hidrolitzen en contacte amb la humitat. Així quan s'han emprat reactius nous la clorometilació ha tingut lloc amb millor rendiment.

#### 2.1.1.B. Anàlisi del clorometilpoliestirè.

La determinació del grau de substitució dels diferent lots de poliestirè sotmesos a clorometilació s'ha efectuat o bé per anàlisi elemental del polímer, després de la combustió de la mostra, o bé desplaçant al clor covalentment lligat al polímer amb piridina i valorant clorurs pel mètode de Volhard modificat (126, 142 a 144). Inicialment la quantificació del grau de substitució es va fer per anàlisi elemental, però s'obtenien resultats poc reproduïbles i de vegades totalment erronis. Posteriorment, els diferents lots de resina s'han analitzat pel mètode de Volhard, que no requereix combustió de la mostra (procés difícil en el cas dels polímers).

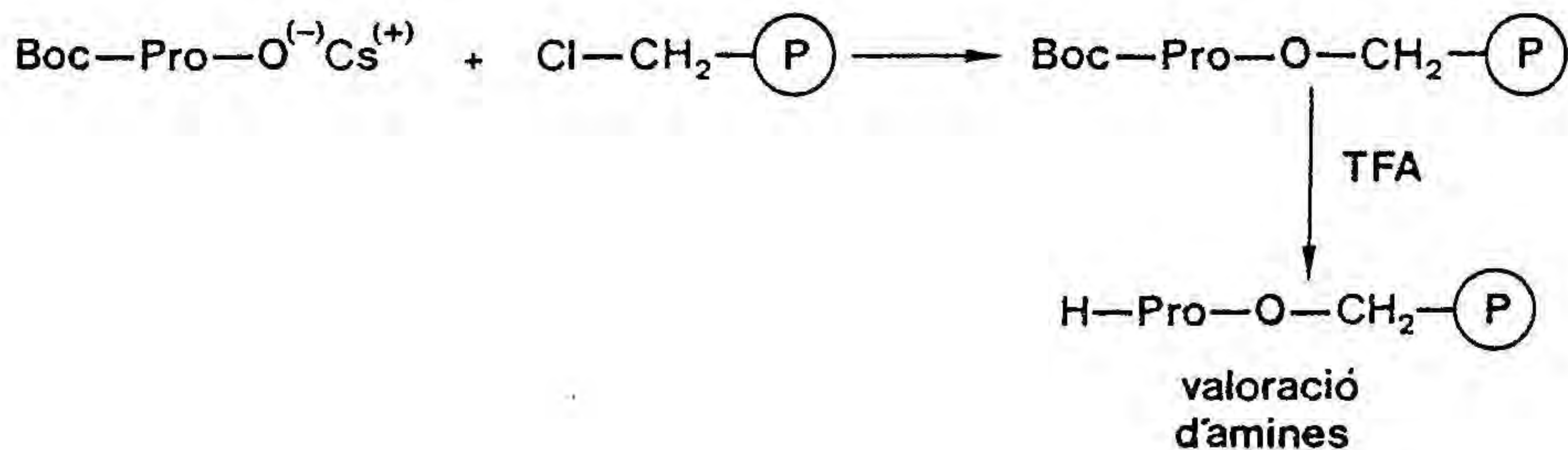
El clorometilpoliestirè ha estat estudiat per  $^{13}\text{C}$ -RMN en fase gel per diferents autors (118, 119, 145 i 146) i d'una manera aproximada es pot estimar l'extensió de la clorometilació a partir de l'anàlisi dels espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN de les resines (119). A continuació es mostra l'espectre del clorometilpoliestirè comercial (Bio-Rad) enregistrat al nostre laboratori



El senyal a 46.3ppm correspon al carboni metilènic del grup clorometil. El senyal aromàtic del poliestirè apareix més ample quan hi ha reticulació en el procés de clorometilació (146), fet que gairebé no s'observa en els lots de clorometilpoliestirè obtinguts per nosaltres però sí en el polímer comercial. En aquest darrer, s'observa també el senyal a 65.3ppm corresponent al carboni dels grups hidroximetil, tal i com era d'esperar en base a les dades de la literatura (118), però aquest senyal no apareix a les altres mostres. La integració per a determinar el grau de substitució del polímer (118) no ha donat resultats coherents, fet que es pot explicar pel baix grau de substitució de les nostres resines ( $\sim 0.5\text{mmol/g}$ ) i l'excessiu solapament del feble senyal del clorometil amb els senyals corresponents als grups metilè de l'esquelet del polímer. En qualsevol cas, fins i tot prescindint de l'aspecte quantitatiu, la comparació entre si dels espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN en fase gel de les diferents mostres ha permès de posar de manifest si el poliestirè ha sigut funcionalitzat,

d'establir una gradació del grau de substitució i de detectar la presència o no de quantitats apreciables de grups hidroximetil.

Finalment, s'ha estimat també el grau de substitució de les diferents resines clorometilades d'una manera indirecta, ancorant-hi un t-butoxicarbonil-aminoàcid pel mètode de la sal de cesi (147) i determinant el grau de substitució de la Boc-aminoacil-resina per valoració espectrofotomètrica amb àcid pícric una vegada eliminat el Boc. L'aminoàcid emprat ha sigut la Boc-prolina, un dels que dóna millor rendiment en ésser ancorat al clorometilpolímer com a sal de cesi.



#### 2.1.1.C. Resultats i discussió.

A la següent taula es resumeixen els resultats obtinguts a les clorometilacions del diferents lots de poliestirè, juntament amb les dades analítiques del polímer comercial. S'indica la quantitat de poliestirè de que s'ha partit en cada cas i el grau de substitució assolit (valors promig, excepte en les determinacions per anàlisi elemental perquè els valors obtinguts són una mica dispersos).

Denominació de ClCH <sub>2</sub> - <u>(P)</u>	Grau de substitució (mmol/g)				
	Quantitat (g) de poliestirè	Volhard	Anàlisi elemental	<sup>13</sup> C-RMN (a)	Valoració d'amines
I (Bio-Rad)	-	1.10	0.89 (b)	1.05	-
II	10	0.60	0.62 0.69	0.60	0.49
III (c)	10	-	0.45 0.46	0.45	0.35
IV (c)	8	0.54	0.52 0.58	0.41	0.29
V (d,e)	10	-	-	0.64	-
VI (e)	20	0.52	0.64 0.72	0.45	-

(a) Dades obtingudes prenent com a referència la resina II, a la que hem assignat el grau de substitució de 0.60 obtingut pel mètode de Volhard

(b) Dada de la casa comercial

(c) El poliestirè de partida havia estat sotmès, sense èxit, a un primer intent de clorometilació

(d) Aquest lot de resina es va fer servir tot seguit per a sintetitzar HO-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-CH<sub>2</sub>-(P)

(e) En aquestes síntesis es van emprar reactius nous.

El primer que podem veure, comparant entre si els lots II, III i IV, i V i VI (sintetitzats amb els mateixos reactius cada grup) és la manca de reproduïbilitat dels rendiments, fins i tot partint de quantitats semblants de poliestirè (II, III i IV).

Les discrepàncies entre els valors obtinguts pel mètode de Volhard i per anàlisi elemental queden poc paleses en aquesta taula, i es poden veure més clarament a la part experimental en el resum dels intents de síntesi del 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè.

Els valors obtinguts per anàlisi elemental de clor són, en el seu conjunt, els més elevats i presenten dispersions, entre dues determinacions, fins i tot superiors al 10%, que no sabem si es deuen a la dificultat de cremar polímers o bé reflecteixen lots de resina no homogenis. De tota manera, les determinacions de clor pel mètode de Volhard no presenten aquesta dispersió.

L'acoblament de Boc-Pro-OCs i valoració espectrofotomètrica d'amines no és un bon mètode per determinar el grau de substitució, ja que els valors obtinguts són sempre els més baixos i, sobretot, no guarden proporcionalitat amb els valors obtinguts per altres mètodes analítics com a conseqüència, segurament, d'acoblements incomplets i amb rendiments variables de l'aminoàcid al clorometilpoliestirè.

Encara que les dades determinades per  $^{13}\text{C}$ -RMN en fase gel no acaben de lligar amb les del mètode de Volhard, mantenen una certa proporcionalitat, i la utilització d'ambdós mètodes conjuntament sembla la millor manera d'analitzar la qualitat d'una resina clorometilada pel que fa a grau de substitució, possible presència de grups hidroximetil i grau de reticulació introduït a la reacció de clorometilació.

### 2.1.2. Síntesi del 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

Al primer capítol de la Memòria ja hem indicat que la síntesi del 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) es pot dur a terme per dos camins diferents (23) (vegeu figura de la pàgina 30),

i que el suport sòlid emprat per a la síntesi dels segments peptídics protegits del LHRH ha estat sintetitzat per la via més llarga, en dues etapes.

Posteriorment, hem sintetitzat la resina 1 a partir de clorometilpoliestirè en un sol pas, fent reaccionar la resina clorometilada amb alcohol 4-hidroxibenzílic i metòxid sòdic, ambdós en un 30% d'excés respecte als grups clorometil ancorats al polímer.

A partir d'aquest moment, els diferents lots de resina 1 els anomenarem afegint un subíndex que fa referència al mètode de síntesi pel qual s'han obtingut:

E: en dos passos, passant per l'ester intermedi

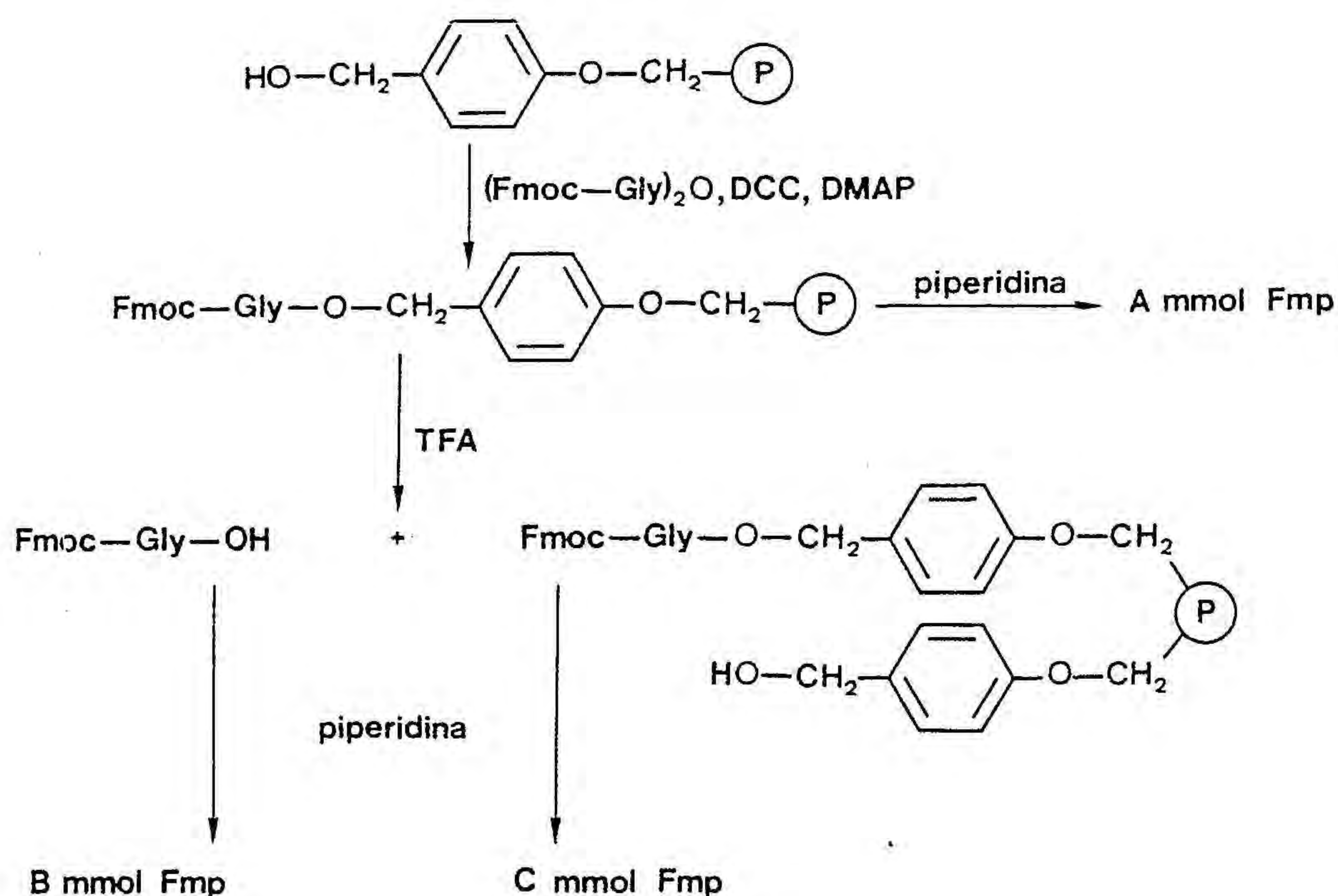
A: incorporant directament l'alcohol 4-hidroxibenzílic

i un número romà que indica el lot de clorometilpoliestirè del qual s'ha partit. Així, la resina sobre la qual s'han sintetitzat els segments peptídics protegits 3 i 4 del LHRH s'indicarà com  $1_{E-I}$ . Hem utilitzat també una resina comercial (Bachem) de la qual ignorem el mètode de síntesi i que anomenarem  $1_{Bachem}$ .

El polímer  $1_{A-II}$  s'ha comparat amb la resina  $1_{E-I}$  i amb la comercial  $1_{Bachem}$  des de dos punts de vista: rendiment d'acidòlisi amb TFA de l'enllaç pèptid-resina i capacitat d'inflament del polímer en els reactius i dissolvents normalment emprats a la síntesi d'un pèptid.

L'estudi del comportament de les tres resines enfront de la reacció amb TFA ha comportat, en primer lloc, ancorar un Fmoc-aminoàcid al polímer, en tots els cassos el mateix aminoàcid (glicina) i sempre pel mateix mètode. En segon lloc, s'ha determinat el grau de substitució f de cada Fmoc-glicil-resina per tractament d'una alíquota amb 50% de piperidina en diclorometà i quantificació espectrofotomètrica de la N-(9-fluorenilmetil)piperidina formada. Finalment, s'ha procedit a trencar l'enllaç aminoàcid-resina amb 55% de TFA en diclorometà i a quantificar el rendiment d'aquesta etapa. A l'esquema següent es resumeix el procés global:





Tant la Fmoc-glicina alliberada com la que resta ancorada al polímer es poden quantificar per desprotecció amb piperidina. Així doncs, podem determinar el rendiment de trencament de l'enllaç aminoàcid-resina a partir de les expressions

$$(B/A) \times 100 \quad \text{o} \quad (B/B+C) \times 100$$

que en principi haurien de donar valors coincidents i si no ho fan és degut al propi error del mètode.

Els resultats obtinguts s'indiquen a la taula següent:

	<u>Grau de substitució</u>	<u>Rendiment d'acidòlisi (%)</u>	
	<u>f (mmol/g)</u>	<u>(B/A)x100</u>	<u>(B/B+C)x100</u>
Fmoc-Gly-resina $1_{E-I}$	0.36	79	85
Fmoc-Gly-resina $1_{A-II}$	0.34	86	86
Fmoc-Gly-resina $1_{Bachem}$	0.34	86	90

Tal com es pot observar, el comportament del tres polímers és bastant similar, tant en el grau de substitució assolit com en el rendiment de l'acidòlisi, de manera que sembla com si el mètode d'obtenció de la resina no influís en el rendiment de l'acidòlisi.

El grau d'inflament de les tres resines en diferents medis s'ha determinat afegint un volum conegut de dissolvent (5-10mL) a una quantitat pesada de resina (ca. 50mg), i mesurant el volum que ocupa el polímer en suspensió al cap de 2h. A la taula següent es mostren els resultats obtinguts, indicant-se el grau d'inflament com la relació entre el volum que ocupa el polímer i la quantitat de resina (mL/g).

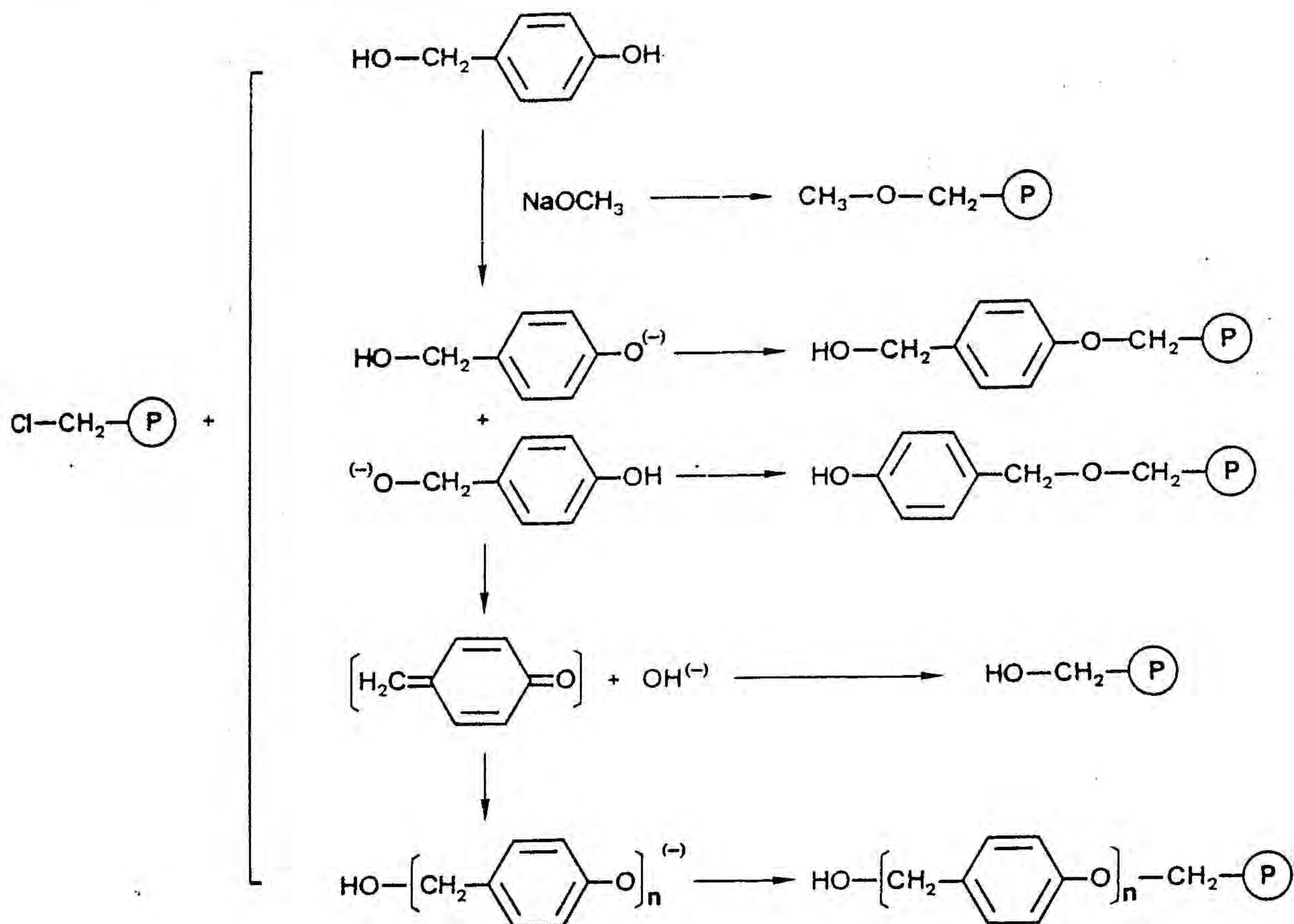
	Grau d'inflament (mL/g)		
	<u>1</u> <sub>E-I</sub>	<u>1</u> <sub>A-II</sub>	<u>1</u> <sub>Bachem</sub>
DMF	55	6	6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	12	12	12
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /DMF 2/1	10	10	9
50% piperidina/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8	7	8
50% TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8	8	8

Com podem veure, els tres lots de polímer presenten pràcticament el mateix grau d'inflament en els diferent medis assajats.

En resum, doncs, els tres polímers tenen un comportament força similar, de manera que qualsevol d'ells sembla viable per a dur a terme la síntesi d'un pèptid, sense oblidar que, tret d'altres consideracions que ara comentarem, és molt menys laboriós preparar la resina 1 pel mètode de síntesi en un sol pas. Tanmateix, cal esmentar que la resina comercial ha d'ésser rentada abans de fer-la servir, ja que presenta una banda a l'infrarroig en la zona del carbonil i que desapareix després dels rentats. Un cop neta, la resina té el mateix espectre d'infrarroig que les sintetitzades per nosaltres.

Una vegada finalitzada aquesta part del treball va apareixer a la literatura un article de Merrifield i col.laboradors (144) on es posen de manifest els problemes que pot presentar la síntesi del 4-hidroximetil-fenoximetilpoliestirè pel mètode directe descrit per Wang (23), i es proposa una modificació d'aquest mètode per a obtenir un polímer de millor qualitat.

Aquests autors han descrit les reaccions secundàries competitives que poden tenir lloc durant la reacció de la resina clorometilada amb l'alcohol 4-hidroxibenzílic i metòxid sòdic, que esquemàticament s'indiquen a continuació:



Diverses raons els fan pensar que els polímers sintetitzats pel mètode de Wang en un sol pas són de mala qualitat, i que es formen en quantitats apreciables alguns dels subproductes assenyalats a l'esquema anterior. La resina que ells obtenen per aquest mètode té un 10% de grups

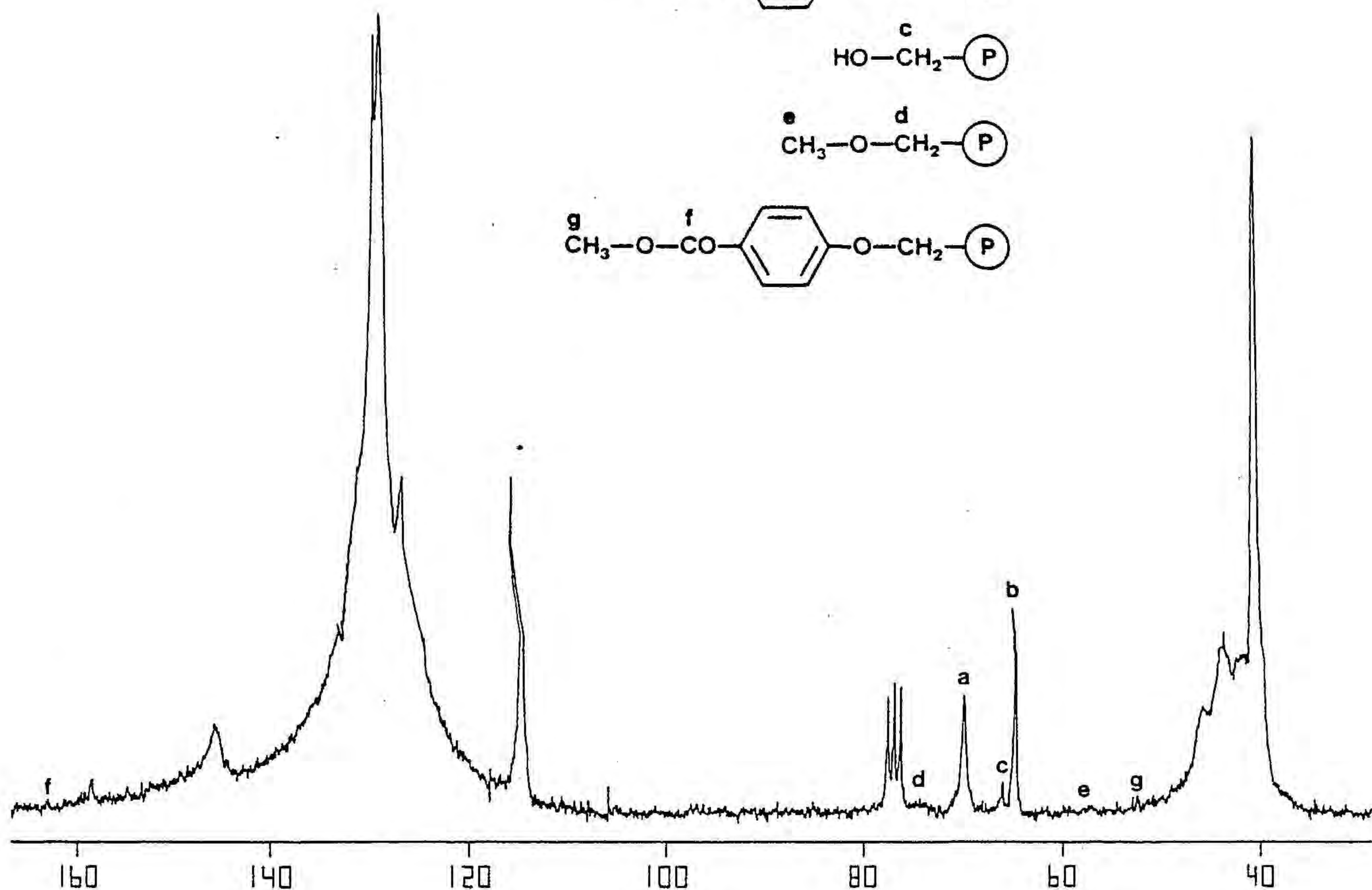
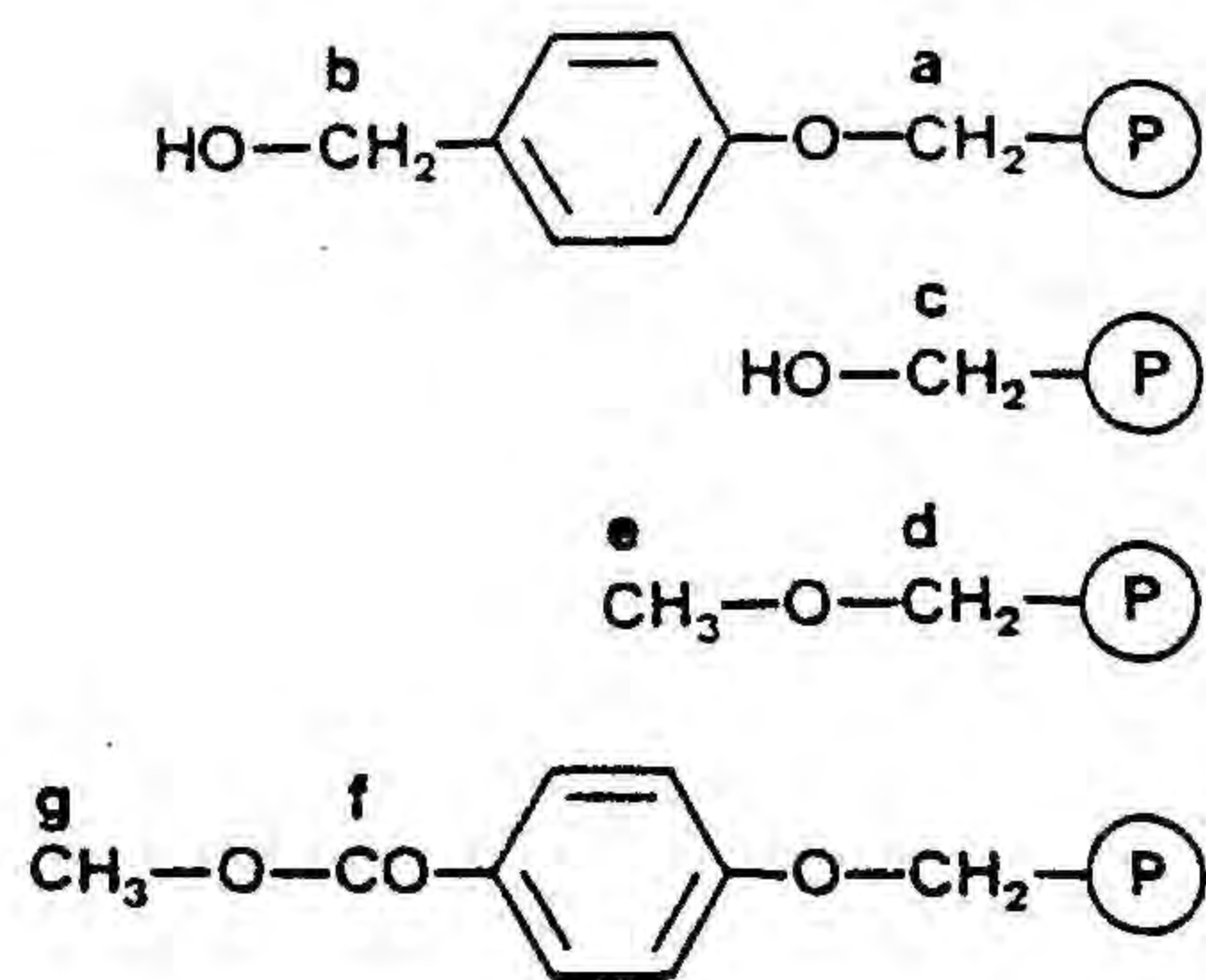
clorometil és acolorida, i els rendiments d'esterificació d'un aminoàcid i d'acidòlisi de l'aminoacil-resina són febles (39 i 65% respectivament).

Després de molts intents de síntesi variant les proporcions dels reactius, la temperatura, la base i el temps de reacció, els autors arriben a la conclusió de que el millor mètode de síntesi consisteix a fer reaccionar clorometilpoliestirè amb 3 equivalents d'alcohol 4-hidroxibenzílic i metòxid sòdic durant 8h a 50°C. En aquestes condicions disminueix molt la reacció d'eliminació 1,6 de l'alcohol 4-hidroxibenzílic a quinona i, per tant, la seva polimerització; s'obté un producte no acolorit, que no conté clor, que es pot esterificar amb un rendiment del 98% i dóna un rendiment d'acidòlisi del 93%.

No hem analitzat cap dels nostres productes tant exhaustivament, però la resina  $1_{A-II}$ , sintetitzada pel mètode de Wang en un sol pas, presenta alguna diferència amb la sintetitzada pel grup de Merrifield pel mateix mètode: no és acolorida, el polímer conté tan sols traces no quantificables de clor, el rendiment d'esterificació (sense forçar condicions) és com a mínim del 68% i el d'acidòlisi és del 86%.

De tota manera, ens hem proposat sintetitzar la resina  $1$  pel mètode de Merrifield. Prèviament, ha sigut necessari purificar per cristallització l'alcohol 4-hidroxibenzílic comercial (molt acolorit i impur per cromatografia en capa fina), recuperant-se només un 53% o 29% de producte pur segons el seu origen (Merck o Fluka).

Hem dut a terme diferents intents de síntesi de la resina  $1$  pel nou mètode (vegeu part experimental). Dels polímers resultants s'ha determinat el contingut en clor per anàlisi elemental i pel mètode de Volhard, i s'ha enregistrat l'espectre de  $^{13}C$ -RMN en fase gel. A continuació es mostra l'espectre corresponent a la resina  $1_{E-I}$ .



A l'espectre es poden observar clarament els senyals, b i c, corresponents al carboni del grup hidroximetil tant de la resina 1 ( $\delta$  64.9) com de l'hidroximetilpoliestirè que la impurifica ( $\delta$  65.3), els dos senyals, d i e, del grup metoximetil a 74.6ppm ( $\text{CH}_2$ ) i 57.8ppm ( $\text{CH}_3$ ), i els dos senyals, f i g, petits, corresponents a l'ester metílic no reduït quantitativament a 50.9 ( $\text{CH}_3$ ) i 165.3 ( $-\text{CO}-$ ) ppm (recordem que en aquesta síntesi la resina 1 s'obté a partir de  $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{P}$ ).

La comparació dels senyals corresponents al grup hidroximetil b per diferents polímers dóna una indicació del grau de substitució de la resina, i la integració del senyal corresponent al metilè a unit a oxígen i poliestirè (tant de  $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{P}$  com de  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{P}$ ) comparada amb la del grup hidroximetil b permet de treure informació sobre el grau de polimerització n.

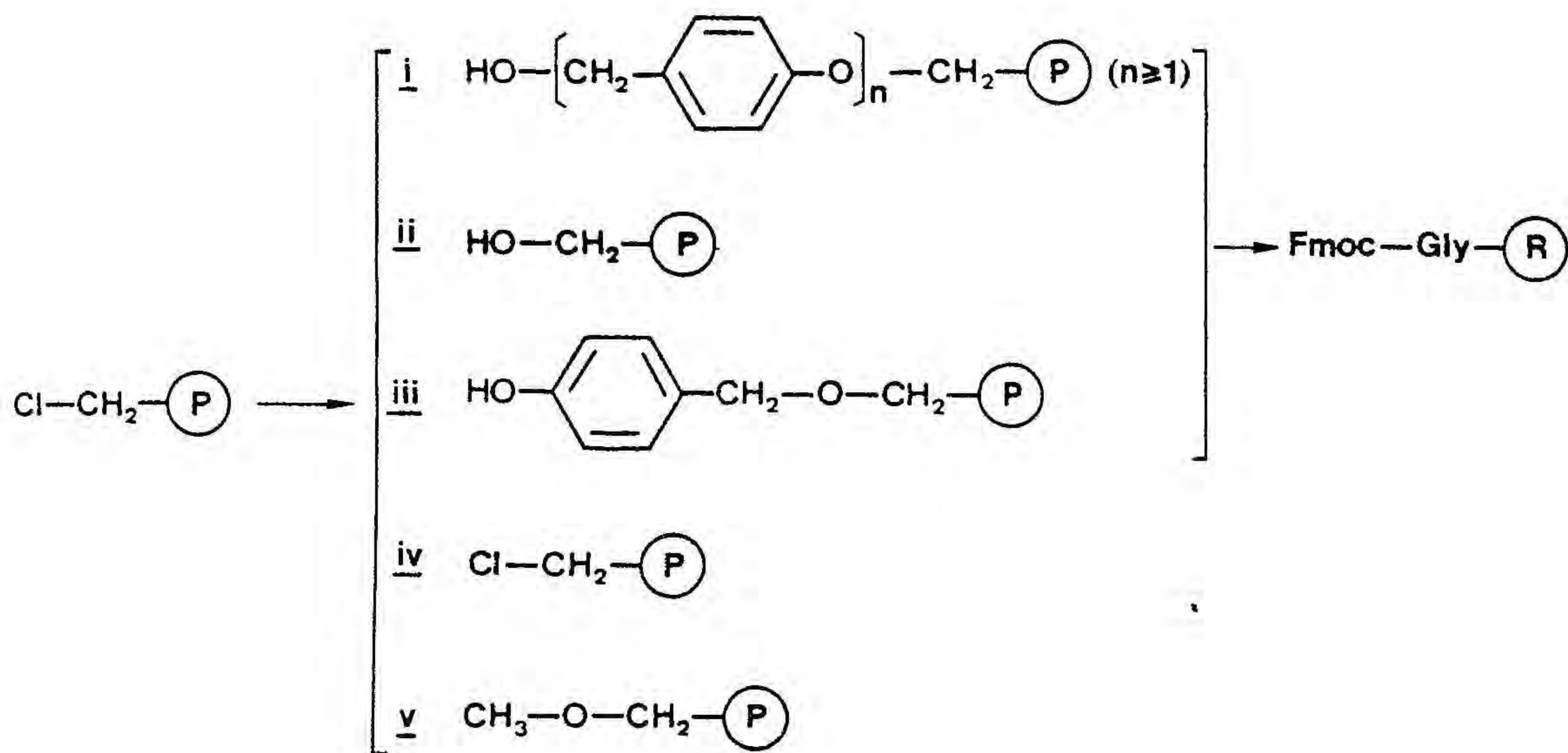
A una alíquota de cada un dels polímers sintetitzats s'ha ancorat un aminoàcid, determinant-se el grau de substitució i el rendiment de

l'acidòlisi amb TFA. L'esterificació de la resina s'ha dut a terme amb Fmoc-glicina, en condicions en que es poden produir reaccions secundaries (vegeu 2.2.1) però que en principi donen bon rendiment (fent reaccionar quantitats equimolars de  $(\text{Fmoc-Gly})_2\text{O}$ , DCC i DMAP en un excés de cinc vegades respecte als grups hidroximetil polimèrics i durant 24h). El grau de substitució de la Fmoc-glicil-resina s'ha determinat per desprotecció d'una alíquota amb piperidina i quantificació de la Fmp formada. Sobre una segona alíquota s'ha efectuat un tractament amb TFA, per tal d'establir el rendiment d'acidòlisi com ja hem descrit en aquest mateix apartat.

Els resultats obtinguts en les determinacions del grau de substitució i del rendiment d'acidòlisi de les diferents Fmoc-glicil-resines s'indiquen a la part experimental, així com els resultats corresponents a les quantificacions del contingut en clor dels diferent polímers, tant per anàlisi elemental com pel mètode de Volhard. Pel que fa a les anàlisis de clor, els valors obtinguts per anàlisi elemental no lliguen amb les determinacions pel mètode de Volhard, i, excepte en un dels assaigs efectuats, el polímer sintetitzat sempre conté un cert percentatge de clor. L'anàlisi de les mostres per  $^{13}\text{C}$ -RMN posa de manifest que el mètode que condueix a resultats més fiables és el de Volhard, ja que graus de substitució com els que es troben per anàlisi elemental (0.33, 0.42) haurien de donar un senyal clar de grup clorometil a l'espectre, però aquest senyal no apareix.

Per a poder comparar les nostres resines amb les sintetitzades al laboratori de Merrifield i poder discernir la seva composició (vegeu esquema pàgina següent), els valors experimentals de que nosaltres disposem són: el grau de substitució del clorometilpoliestirè de partida,  $x$ , el grau de substitució de la Fmoc-glicil-resina (que prové de l'esterificació de les resines i, ii i iii),  $y$ , i el percentatge de clor, o expressat d'una altra manera, el grau de substitució de la resina iv.

D'altra banda, podem calcular a partir de  $x$  el grau de substitució teòric,  $x'$ , de la resina i que s'obtindria si el  $\text{ClCH}_2\text{-(P)}$  es transformés quantitativament en  $\text{HO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-CH}_2\text{-P}$ . Si considerem també que el rendiment d'esterificació és quantitatiu, es pot calcular a partir de  $y$  un grau de substitució  $y'$  que representa el grau de substitució conjunt de les resines i, ii i iii.



Graus de substitució

$$x(\text{exp}) \xrightarrow[\underline{1} \quad (n=1)]{\text{si només es formés}} x'(\text{calc})$$

$$y'(\text{calc}) \xleftarrow[\underline{ii} \quad \text{ii} \quad \text{iii.}]{\text{suposant esterificació quantitativa de } \underline{i},} y(\text{exp})$$

Els resultats obtinguts per Merrifield i col.laboradors posen de manifest que, sigui quin sigui el mètode de síntesi, el percentatge de iii és inferior al 1%. Considerant doncs que  $\%iii \cong 0$  i que amb TFA només es trenca l'enllaç  $\text{Fmoc-Gly-O}-(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{P} \quad (n \geq 1)$  i que ho fa quantitativament, podem calcular la composició (en %) de la resina que s'ha obtingut de la següent manera:

<u>i</u>	$\frac{y' \cdot \text{rdt TFA}}{x'} \cdot 100$
<u>ii</u>	$\frac{y' - (y' \cdot \text{rdt TFA})}{x'} \cdot 100$
<u>iii</u>	$\cong 0$
<u>iv</u>	valor experimental
<u>v</u>	$\left(\frac{x' - y'}{x'} \cdot 100\right) - \%iv$

Cal aclarir que en efectuar aquests càlculs no s'ha tingut en compte l'increment de pes que té lloc en passar d'una resina a l'altra. A més a més, donades les aproximacions que s'han fet, els valors calculats tenen un interès essencialment comparatiu.

A la taula de la pàgina següent s'indiquen les dades analítiques de la resina 1 sintetitzada al laboratori de Merrifield pel mètode de Wang en un sol pas (23) i pel seu mètode (144), i de les sintetitzades al nostre laboratori pels dos mètodes (tan sols s'indiquen els resultats de dos dels assaigs de síntesi efectuats per nosaltres pel mètode de Merrifield).



Denominació resina	Dades literatura		Dades nostre laboratori	
	Mètode Wang	Mètode Merrifield	Mètode Wang	Mètode Merrifield
	<sup>1</sup> A, W	<sup>1</sup> A, M	<sup>1</sup> A-II	<sup>1</sup> A-III
Color	groc	blanc	blanc	blanc
$\text{HO}-\left[\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}\right]_n-\text{CH}_2-\text{P}$	25%	92%	58%	68%
n	3.6	1.1	1.2-1.3 (a)	1.3-1.8 (a)
$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{P}$	14%	3%	9%	5%
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{P}$	0.6%	0.2%	(b)	(b)
$\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{P}$	10%	0%	~0%	0.2%
$\text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{P}$	50%	2%	33%	39%

(a) Determinat per <sup>13</sup>C-RMN  
(b) No determinat. A efectes de càlcul, l'hem considerat ≈ 0.

El primer que podem contrastar, i que ja hem assenyalat anteriorment, és que cap de les nostres resines és acolorida, a diferència de la que Merrifield i cols. obtenen pel mètode de Wang.

En segon lloc, nosaltres sempre obtenim percentatges de  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O})_n\text{CH}_2-\text{(P)}$  intermedis entre els que obté Merrifield per un o altre mètode, amb valors de  $n$  que a la resina  $1_{\text{A-II}}$  són clarament inferiors als de la resina  $1_{\text{A,W}}$ , i una mica superiors per les resines  $1_{\text{A-III}}$  i  $1_{\text{A-VI}}$  en relació a la  $1_{\text{A,M}}$ . Dit d'una altra manera, nosaltres obtenim un grau de polimerització més elevat quan emprem el mètode de Merrifield.

Pel que fa al percentatge d'hidroximetilpoliestirè present a la resina sintetitzada i que donaria lloc a una peptidil-resina no làbil al TFA, nosaltres també obtenim una mica més d'hidroximetilpoliestirè pel mètode de Wang que pel mètode de Merrifield, si bé entre els dos mètodes no trobem tanta diferència.

El que tampoc observem nosaltres és la diferència que troba Merrifield en el contingut en clor segons el mètode de síntesi. Quan hem emprat el mètode de Wang, hem obtingut un polímer que conté tan sols traces no quantificables de clor, mentre que per l'altre mètode en més d'un cas ens han quedat grups clorometil (vegeu part experimental).

Finalment, el contingut en grups metoximetil, que no haurien d'afectar la síntesi d'un pèptid, és similar per les tres resines que hem sintetitzat nosaltres, essent els nostres valors més pròxims als que es descriuen (144) pel mètode de Wang.

En resum, doncs, les resines sintetitzades per nosaltres pels dos mètodes no són tan diferents entre si com les sintetitzades per Merrifield. Pel mètode de Wang arribem a un percentatge menor de grups clorometil, però també obtenim una proporció més gran de grups hidroximetil. Pel que fa a les impureses de la resina 1 que poden afectar la bona marxa d'una síntesi, pel mètode de Merrifield obtenim un percentatge menor d'hidroximetilpoliestirè però la reacció sobre els grups clorometil no sempre és quantitativa.