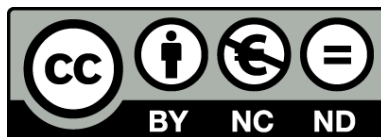




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

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.

2.2. Ancoratge de l'aminoàcid C-terminal al 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè.

L'ancoratge de l'aminoàcid C-terminal al 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè suposa l'esterificació d'un alcohol polimèric amb el grup carboxil d'un aminoàcid, reacció que es pot dur a terme en presència de DCC i un catalitzador com la DMAP. Com ja hem dit, a les síntesis dels pèptids 3 i 4 la Fmoc-glicina C-terminal es va ancorar al suport sòlid pel mètode descrit per Meienhofer i cols. (39), que consisteix a fer reaccionar la resina amb 1.5 vegades d'excés de Fmoc-aminoàcid en presència de quantitats equimolars, respecte a l'aminoàcid, de DCC i DMAP, 30min a 0°C i 5h a temperatura ambient.

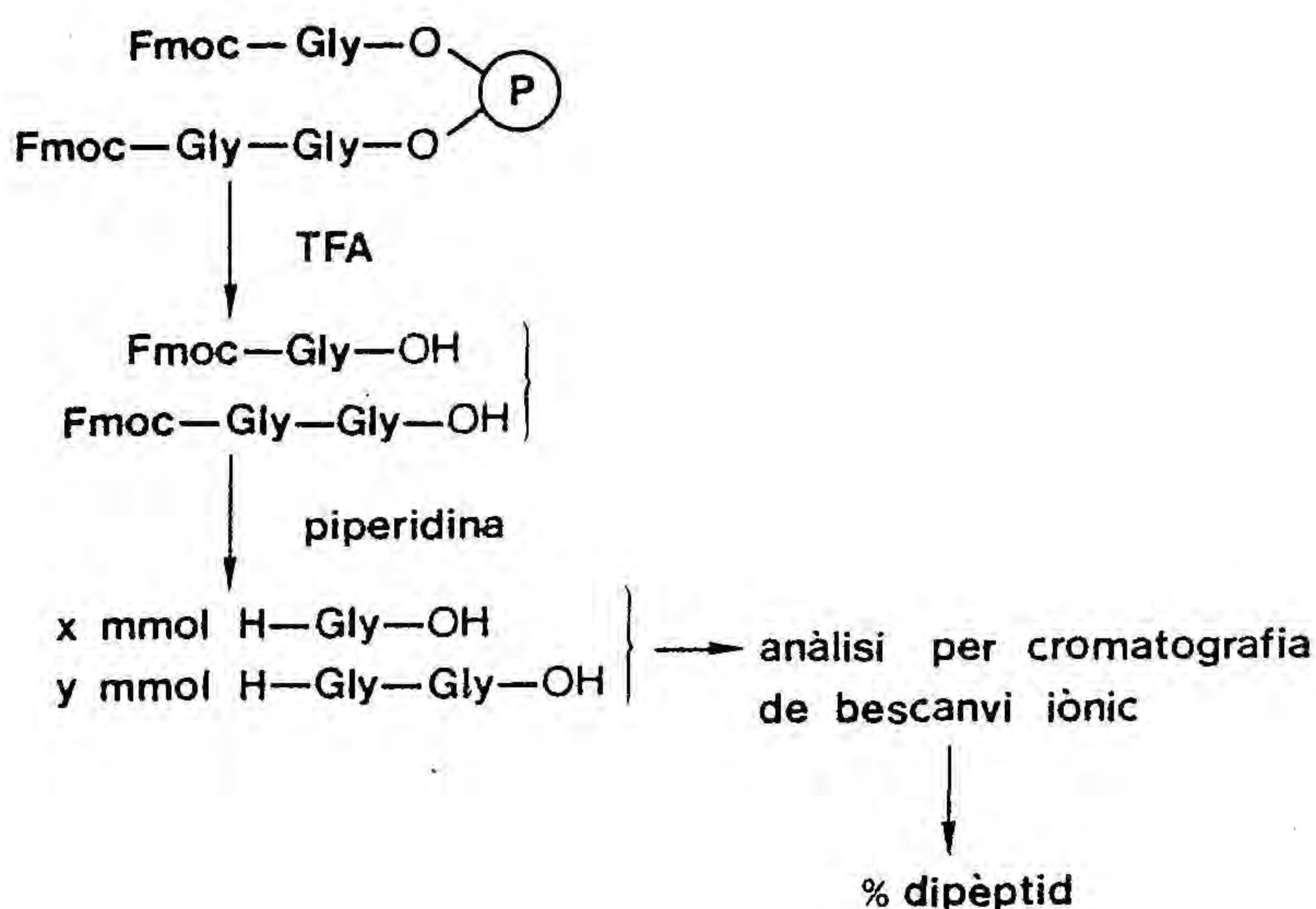
Un cop acabades les síntesis dels pèptids 3 i 4 va apareixer a la literatura un article on es posava de manifest que el grup protector Fmoc és làbil a la DMAP ($t_{1/2}$ de desprotecció: 85min, en una dissolució al 10% de DMAP en DMF) (148), fet que evidencia el perill de dur a terme esterificacions de Fmoc-aminoàcids catalitzades per 4-dimetilaminopiridina.

Tenint en compte que el temps emprat per a ancorar la Fmoc-glicina havia sigut relativament llarg, ens hem plantejat la possibilitat de que s'hagi produït una desprotecció parcial de les funcions α -amino, sobre les quals es pot engalzar el propi Fmoc-aminoàcid i al final del procés tindrem també dipèptids o tripèptids ancorats al suport sòlid. Això implica que un cop finalitzada la síntesi, obtindrem un cert percentatge de pèptids erronis que tenen un o dos residus de més de glicina, i que per tant són difícils de separar del pèptid que volem sintetitzar.

En primer lloc hem volgut comprovar si la Fmoc-glicil-resina emprada a la síntesi dels pèptids 3 i 4 contenia també dipeptidil-resina. Per tal de determinar la quantitat de pèptid formada, hem procedit a tractar una alíquota de Fmoc-glicil-resina que havíem separat al començament de les síntesis amb 55% de TFA en diclorometà, amb la qual cosa Fmoc-glicina i Fmoc-diglicina, si n'hi ha, passen al filtrat. El grup Fmoc d'aquests productes s'ha eliminat amb piperidina. És important recalcar que per a saber realment la quantitat de dipèptid formada durant l'ancorament de l'aminoàcid C-terminal, cal primer trencar l'enllaç amb la resina i després dur a terme la desprotecció del que passa al filtrat, i no a l'inrevés.

Si efectuem primer la desprotecció sobre el que hi ha ancorat al polímer, part del dipèptid pot, mitjançant aminòlisi intramolecular, donar una dicetopiperazina, de manera que la proporció de diglicina trobada seria menor que la que hi havia inicialment sobre el polímer.

La cromatografia de bescanvi iònic en un analitzador d'aminoàcids permet de separar i quantificar H-Gly-OH i H-Gly-Gly-OH, i per tant determinar el percentatge de dipèptid format durant l'acoblament si assumim que l'acidòlisi d'aminoacil-resina i de dipeptidil-resina tenen el mateix rendiment. Esquemàticament,



Per aquest procediment hem trobat un 9% de diglicina present a la Fmoc-glicil-resina preparada d'acord amb el mètode descrit per Meienhofer.

Els mateixos autors que han posat de manifest la labilitat del grup Fmoc a la DMAP, suggereixen com a alternativa esterificar hidroximetil-polímers amb un gran excés de l'anhídrid simètric del Fmoc-aminoàcid en presència de DMAP, per tal d'accelerar la reacció, però mai han detallat les condicions experimentals (excés de reactius, temps de reacció, etc). També han suggerit, i aquest és el mètode que empren normalment, substituir el Fmoc-aminoàcid per un Bpoc-aminoàcid, que és estable a la DMAP i compatible amb la resina 1. Malgrat que existeix aquesta alternativa, creiem que seria útil disposar d'un bon mètode per a ancorar Fmoc-aminoàcids a hidroximetilpolímers, objectiu que hem abordat a continuació. En aquest

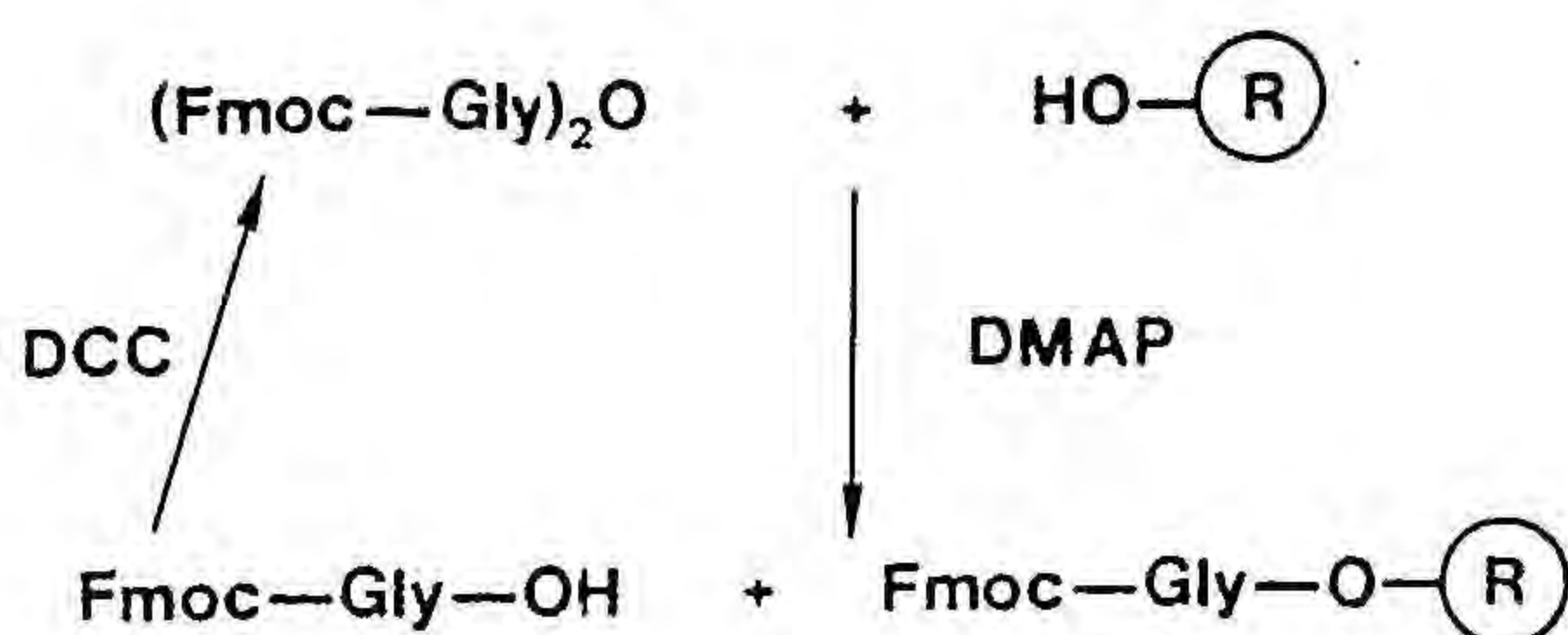
sentit, considerarem vàlid un protocol d'esterificació si dóna bon rendiment d'incorporació d'aminoàcid sobre la matriu polimèrica (de l'ordre del 50%, com a mínim) i si anul·la o minimitza el percentatge de diglicina.

El primer mètode que hem assajat consisteix a acilar els grups hidroxil polimèrics amb l'anhídrid simètric preformat de l'aminoàcid C-terminal en presència de DMAP, amb la idea de disminuir el temps de reacció i per tant l'extensió de la reacció secundària. Hem assajat també l'ús de carbonildiimidazole com a agent d'acoblament alternatiu a la DCC.

Per a dur a terme aquest estudi hem fet servir també Fmoc-glicina, ja que el mètode d'anàlisi per cromatografia de bescanvi iònic ja estava posat a punt.

2.2.1. Esterificació amb l'anhídrid simètric i 4-dimetilaminopiridina.

Els primers assaigs s'han dut a terme amb l'anhídrid simètric de la Fmoc-glicina en presència de DCC i DMAP. L'excés de DCC s'ha afegit amb la idea de reciclar el mol de Fmoc-aminoàcid alliberat per mol d'anhídrid després de la reacció d'acoblament.



A la següent taula es mostren els resultats obtinguts a cada experiment. A la primera columna s'indiquen els excessos molars de cada un dels reactius emprats respecte als grups hidroximetil del polímer, a la segona els temps de reacció, a la tercera els valors del grau de substitució f assolit (mmol/g Fmoc-gligil-resina, calculat a través de la desprotecció amb piperidina d'una alíquota) i, finalment, a la darrera columna s'indica el resultat de l'anàlisi per cromatografia de bescanvi iònic expressat com a %Gly₂/Gly present a la mostra. Tots els experiments s'han

duet a terme a temperatura ambient i sobre alíquotes d'aproximadament 50mg del lot de resina 1_{E-I}.

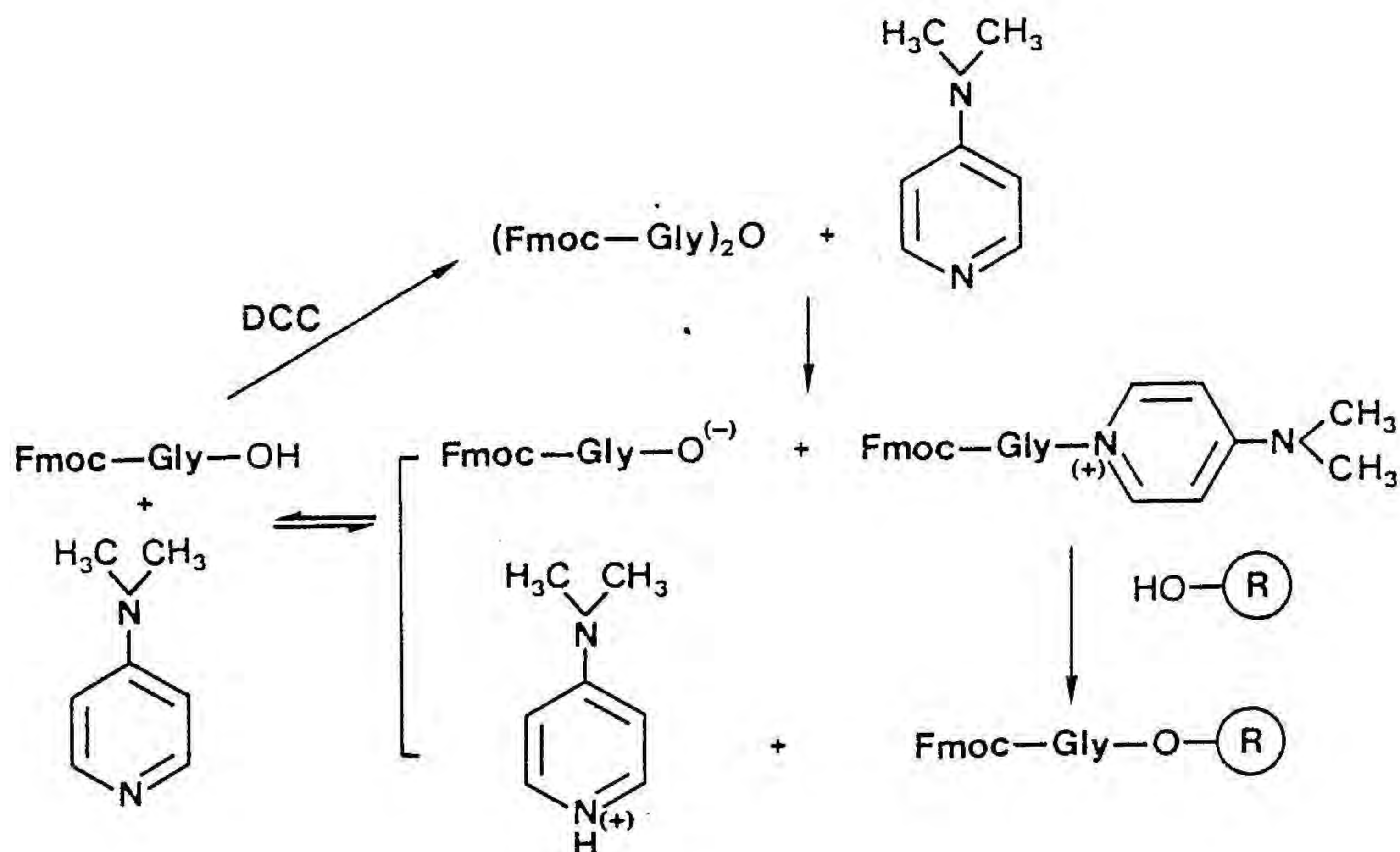
<u>(Fmoc-Gly)₂O + DCC + DMAP</u>			<u>t (min)</u>	<u>f</u>	<u>% Gly₂/Gly</u>
1	1	1	60	0.32	—*
1	1	2	60	0.19	—*
1.25	1.25	1.25	60	0.36	1.2
2.5	2.5	2.5	30	0.36	0.9

* no quantificat.

D'aquests resultats podem deduir, en primer lloc, que per a assolir graus de substitució correctes cal emprar un excés més gran d'aminoàcid en el mètode de l'anhídrid simètric que en el mètode descrit per Meienhofer, on amb 1.5 vegades d'excés d'aminoàcid, DCC i DMAP, arribem a f=0.38, mentre que amb 2 vegades d'excés d'aminoàcid (1 equivalent d'anhídrid) tan sols arribem a f=0.32. Tanmateix, en aquesta valoració no hem tingut en compte el temps de reacció. Es sorprenent que quan s'ha augmentat la quantitat de DMAP respecte als altres reactius hagi disminuït el grau de substitució. Augmentant l'excés d'anhídrid hem aconseguit, com és lògic, augmentar el grau de substitució, la qual cosa permet de disminuir el temps de reacció per a intentar minimitzar la formació de dipèptid. De tota manera, en duplicar l'excés de reactius (de 1.25 a 2.5eq) i reduir a la meitat el temps de reacció (de 60 a 30min) tan sols hem aconseguit disminuir l'extensió de la reacció secundària en un 0.3%. Tanmateix, cal fer notar que hem aconseguit baixar del 9% de diglicina obtingut a la primera síntesi a un 0.9%.

Segons aquests resultats hauriem de poder suprimir o minimitzar la formació de dipèptid emprant un gran excés d'anhídrid (5-10 vegades) i temps de reacció molt curts, però degut al cost tan elevat d'aquesta solució ens hem plantejat la possibilitat d'estudiar una modificació en les condicions d'esterificació consistent a suprimir la DCC que s'afegeix

per a reciclar el mol de Fmoc-aminoàcid alliberat per mol d'anhídrid. Aixó s'ha fet perquè una anàlisi més detallada del mecanisme de la reacció posa de manifest que, un cop ancorat l'aminoàcid, la DMAP forma una sal amb el Fmoc-aminoàcid que s'allibera, i probablement la DMAP protonada no ataca al grup Fmoc. Si s'afegeix DCC es desplaça l'equilibri, produint-se l'alliberament de la base que pot deprotegir les funcions α -amino.



Així doncs, s'ha efectuat una nova serie d'assaigs d'esterificació fent reaccionar amb lots d'uns 50mg de la mateixa resina 1_{E-I} un excés de (Fmoc-Gly)₂O i una quantitat equimolar de DMAP. Els resultats obtinguts es resumeixen a la següent taula:

<u>(Fmoc-Gly)₂O + DMAP</u>		<u>t(min)</u>	<u>f</u>	<u>%Gly₂/Gly</u>
1.25	1.25	60	0.17	1
2.5	2.5	30	0.22	0.7
2.5	2.5	30	0.19	0.4
2.5	2.5	120	0.19	—*

* no quantificable.

Quan comparem aquests resultats amb els de la taula anterior, el primer que cal destacar és que, emprant els mateixos excessos de reactius i temps de reacció, amb el nou mètode assajat s'obtenen valors de grau de substitució inferiors (s'ha de dir que a la petita escala a la qual treballem, 50mg de resina i reactius en 2-3mL de dissolvent, no és sorprenent que els rendiments no siguin exactament reproduïbles).

També es pot veure que la quantitat de dipèptid ha disminuït tot i que no hem aconseguit de suprimir-la totalment. De tota manera, cal dir que en aquesta sèrie d'experiments la línia de base dels cromatogrames ha sigut poc estable, la qual cosa ha dificultat un càlcul acurat de l'àrea dels pics.

Abans de donar per acabada la recerca de condicions d'esterificació, hem decidit intentar repetir l'experiment que ha conduït a millors resultats però amb una quantitat més gran de resina (500mg) per tal de veure si es reproduïen els resultats. D'altra banda, amb dos lots de 150mg de resina hem fet un últim intent d'amillorar les condicions d'esterificació, mantenint el mateix excés d'anhídrid però disminuint la quantitat de DMAP a un 10% de la d'anhídrid. Els resultats obtinguts són els següents:

<u>mg resina</u>	<u>(Fmoc-Gly)₂O + DMAP</u>		<u>t(min)</u>	<u>f</u>	<u>%Gly₂/Gly</u>
500	2.5	2.5	30	0.33	0.6
150	2.5	0.25	30	0.25	0.8
150	2.5	0.25	60	0.40	1.1

El primer experiment, d'extrapolació a una escala més gran, ha resultat molt positiu, ja que ha augmentat el grau de substitució mantenint-se la quantitat de dipèptid formada. Ara bé, la disminució de la proporció de DMAP no amillora els resultats anteriors, i, com era d'esperar, a temps més llargs de reacció el grau de substitució és més elevat però també ho és el percentatge de dipèptid format.

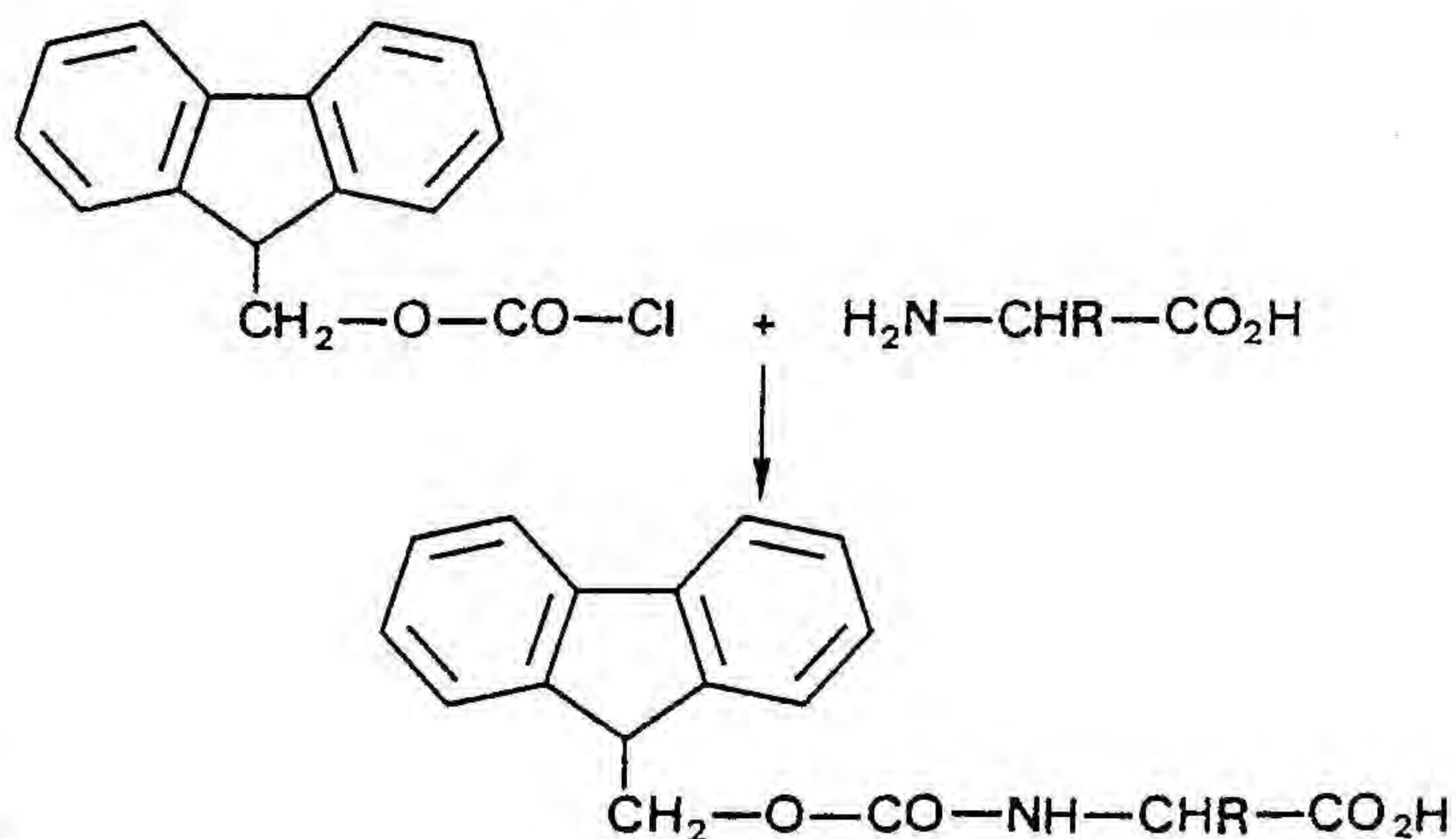
En el transcurs d'aquests darrers assaigs ens varem plantejar la possibilitat de que una part del dipèptid que trobavem pogués provenir de la Fmoc-glicina comercial que feiem servir. Després de tractar amb piperidina una mostra d'un dels lots de Fmoc-Gly-OH emprats, l'anàlisi per cromatografia de bescanvi iònic ha posat de manifest la presència d'un 0.7% de diglicina. Si bé és cert que aquest últim resultat fa que les quantitats de diglicina que apareixen a les taules anteriors tinguin essencialment un valor comparatiu, també evidencia que encara que possiblement no s'hagi suprimit del tot la reacció secundària, s'ha aconseguit reduir-la molt considerablement a valors reals inferiors als que s'indiquen. Tot i que aquest mètode no és generalitzable a tots els aminoàcids, perquè és conegut que la DMAP pot produir racemització de l'aminoàcid que s'ancora tant en processos d'esterificació (149) com de formació de l'enllaç amida (150, 151), és vàlid per a la síntesi de segments peptídics protegits, que convé que tinguin glicina o prolina (que racemitza difícilment) com a aminoàcid C-terminal per tal d'evitar epimerització en el procés d'engalament de segments.

Amb posterioritat a aquest treball i per a obviar a aquests problemes, Albericio i Barany (152) han proposat un mètode diferent per a obtenir Fmoc-aminoàcids ancorats a resines a través d'un enllaç d'ester 4-alcoxibenzílic, sintetitzant en primer lloc l'àcid Fmoc-aminoaciloximetilfenoxiacètic ($\text{Fmoc-NH-CHR-CO-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-CH}_2\text{-COOH}$), i fent reaccionar a continuació aquest derivat amb aminometilpoliestirè ($\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-P}$). Per aquest mètode s'evita la formació de dipèptid i no hi ha racemització.

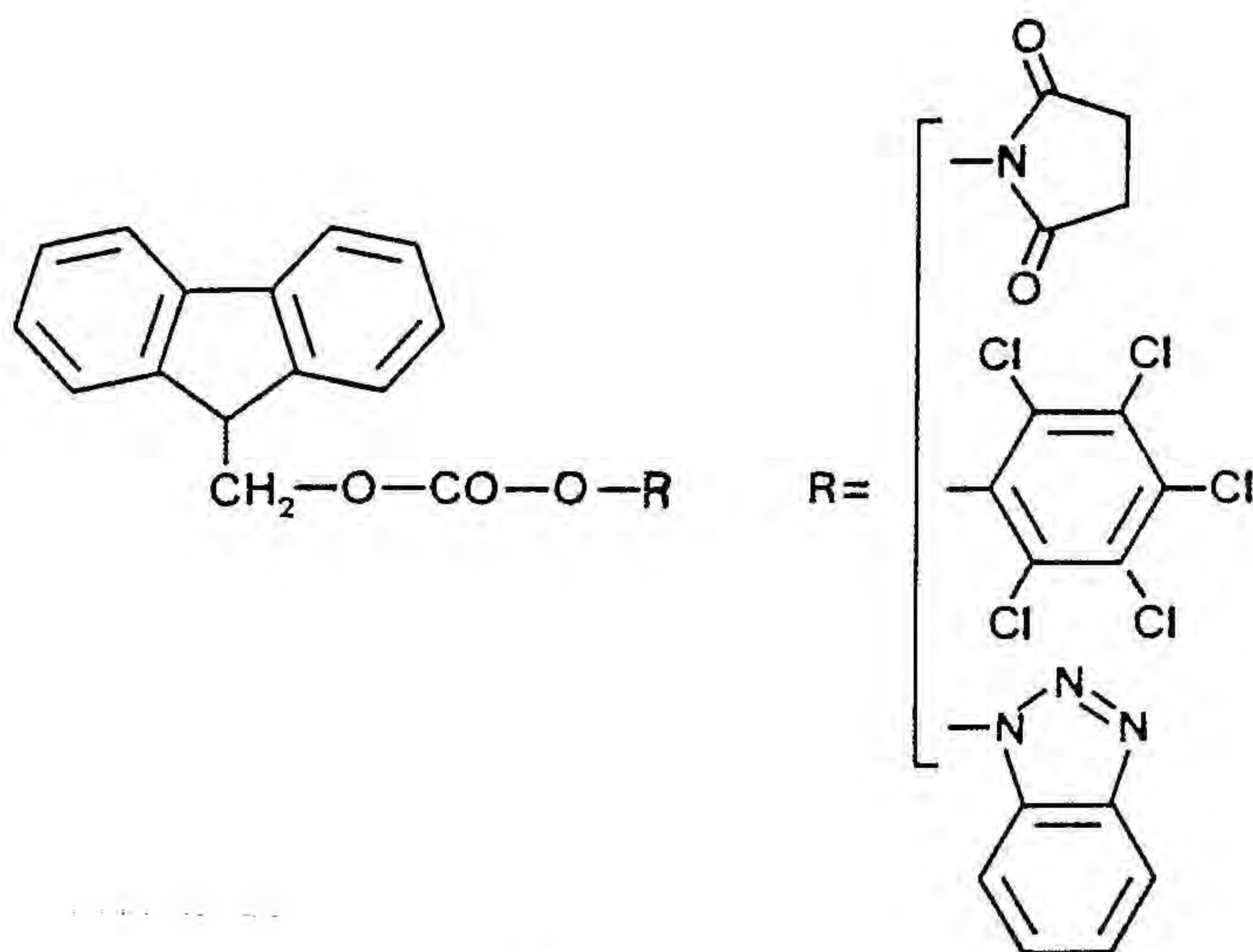
D'altra banda, en un treball dut a terme fora del nostre laboratori i amb una temàtica al marge del contingut d'aquesta Tesi, hem aconseguit ancorar Fmoc-Gly-OH a una resina 1 comercial amb DCC i HOBT (quantitats equimolars de tots els reactius), obtenint una Fmoc-glicil-resina amb rendiment correcte i exempta de dipèptid. Donada la naturalesa dels reactius que s'empren no creiem que aquest mètode produeixi racemització de l'aminoàcid que s'ancora.

Tornant al problema de la puresa dels Fmoc-aminoàcids, el mètode que es fa servir normalment per a la seva preparació és el descrit per Carpino i Han (22) i posteriorment, amb algunes modificacions, per

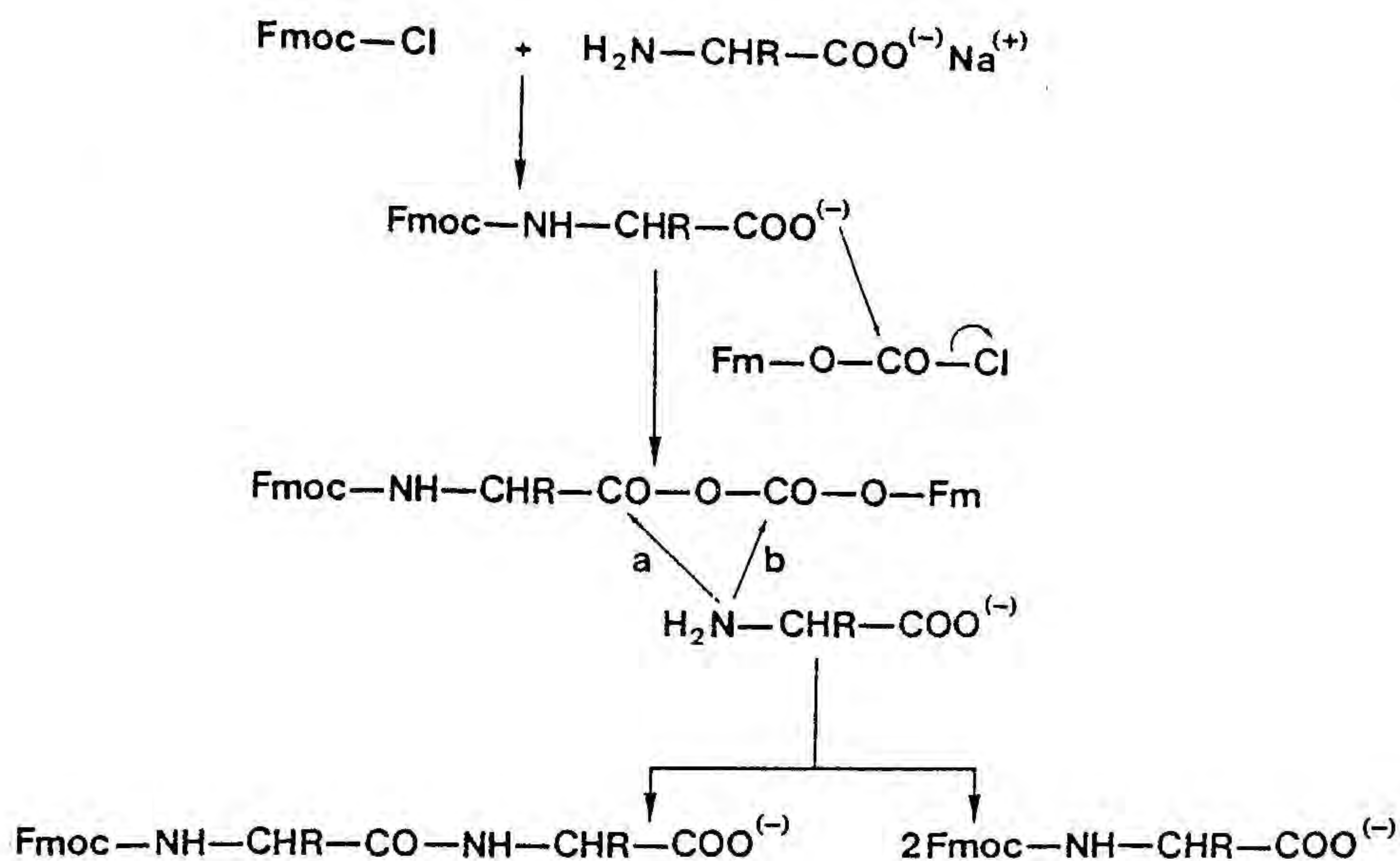
Meienhofer i cols. (105). La formació del carbamat s'efectua per reacció de l'aminoàcid amb cloroformiat de 9-fluorenilmetil (Fmoc-Cl)



L'any 1982, A. Paquet proposa alguns carbonats com a alternativa al Fmoc-Cl (153): carbonat de succinimidil i 9-fluorenilmetil, carbonat de pentaclorofenil i 9-fluorenilmetil, i carbonat de benzotriazol-1-il i 9-fluorenilmetil, i comenta que el seu ús podria suprimir la formació de dipèptid que pot tenir lloc amb el Fmoc-Cl, però no dóna cap dada experimental.



Més recentment, han aparegut altres articles (154 a 156) a la literatura que posen de manifest l'existència de Fmoc-dipèptids com a impuresa dels Fmoc-aminoàcids comercials o sintetitzats utilitzant Fmoc-Cl. La formació del dipèptid es pot explicar segons el següent esquema de reaccions, tenint en compte que la introducció del grup Fmoc amb Fmoc-Cl s'efectua en medi bàsic (10% Na₂CO₃ aquós i dioxan):



Aquesta hipòtesi ha estat confirmada per Goodman i cols. (156), que obtenen un 40% de dipèptid quan s'afegeix H-Leu-OtBu a una mescla de Fmoc-Leu-OH i Fmoc-Cl en les condicions de reacció que s'empren per a obtenir Fmoc-aminoàcids. Donada la manca d'un agent de condensació en el medi de reacció, la formació de dipèptid tan sols es pot explicar si s'ha produït activació del carboxil de la leucina tal com s'indica a la figura precedent.

L'alternativa al Fmoc-Cl que proposen Lapatsanis et al. (154) torna a ésser el carbonat de 9-fluorenilmetil i succinimidil, que segons els autors evita la formació de dipèptid i condueix a Fmoc-aminoàcids purs i amb bon rendiment.

Al Congrés Americà de Pèptids de 1983, Fuller et al. (157) proposen també l'ús del mateix reactiu per a evitar la formació d'oligopèptids a la síntesi de Fmoc-aminoàcids.

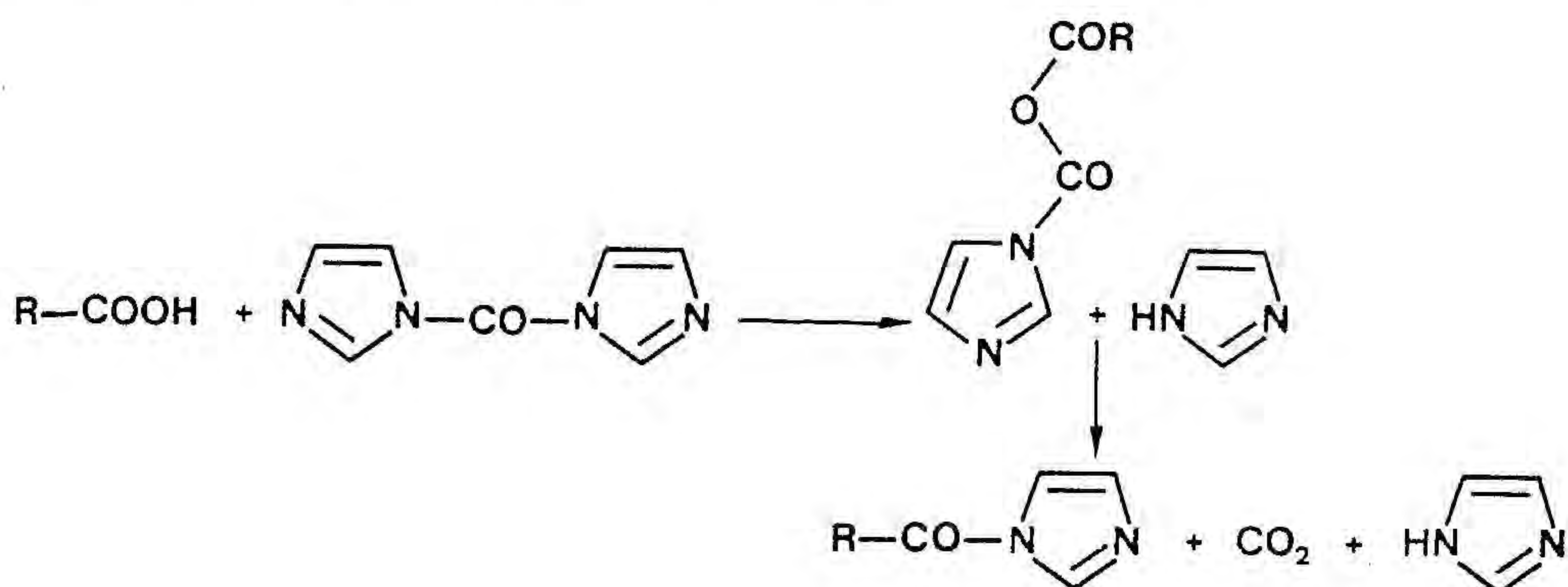
Gairebé simultàniament, Tessier et al. (155) proposen l'ús de Fmoc-N₃, reactiu que ja havia descrit el propi Carpino (22). Hem pogut comprovar per nosaltres mateixos que els Fmoc-aminoàcids sintetitzats per aquest mètode no contenen dipèptid.

Finalment, els resultats obtinguts per D.R.Bolin i J.Meienhofer (158), que també han estat treballant en aquest camp, indiquen que la supressió de la formació de dipèptid a la síntesi de Fmoc-aminoàcids s'aconsegueix amb Fmoc-N₃ i no amb carbonat de 9-fluorenilmetil i succinimidil,

de manera que el reactiu d'elecció per a introduir el grup Fmoc és l'azidoformiat de 9-fluorenilmetil.

2.2.2. Esterificació amb carbonildiimidazole.

El mecanisme d'actuació del carbonildiimidazole (CDI) com a reactiu d'acoblament d'àcids carboxílics ha estat descrit per Staab i cols. (159). A la primera etapa de la reacció es forma un anhidrid mixte i s'allibera imidazole. A la segona etapa, l'imidazole ataca l'anhidrid mixte, formant-se una azolida que és qui actua com a agent acilant.



El carbonildiimidazole es pot fer servir en síntesi de pèptids per a formar enllaços amida (160), i s'ha emprat per ancorar aminoàcids a hidroximetil-resines (126 i 161).

Per a dur a terme els assaigs d'ancoratge de Fmoc-glicina a la resina 1_{E-I} s'ha preparat una dissolució de Fmoc-Gly-OH i CDI (quantitats equimolars) en diclorometà/DMF 4/1, que s'ha agitat durant 10min a 0°C. Porcions d'aquesta dissolució, contenint un excés de 5 vegades d'ambdós reactius respecte als grups hidroximetil del polímer, s'han afegit a alíquotes de resina (~50mg) i s'han agitat a temperatura ambient durant temps diferents. Els resultats obtinguts es resumeixen a la següent taula:

<u>Fmoc-Gly-OH + CDI</u>		<u>t(h)</u>	<u>f</u>	<u>%Gly₂/Gly</u>
5	5	0.5	0.02	-*
5	5	3	0.05	-*
5	5	6	0.09	-*
5	5	12	0.37	2
5	5	24	0.32	3

* no quantificat.

El grau de substitució adequat per a dur a terme la síntesi d'un pèptid s'assoleix al cap de 12h, però la formació de dipèptid té lloc amb un percentatge més gran que emprant l'anhídrid simètric i DMAP.

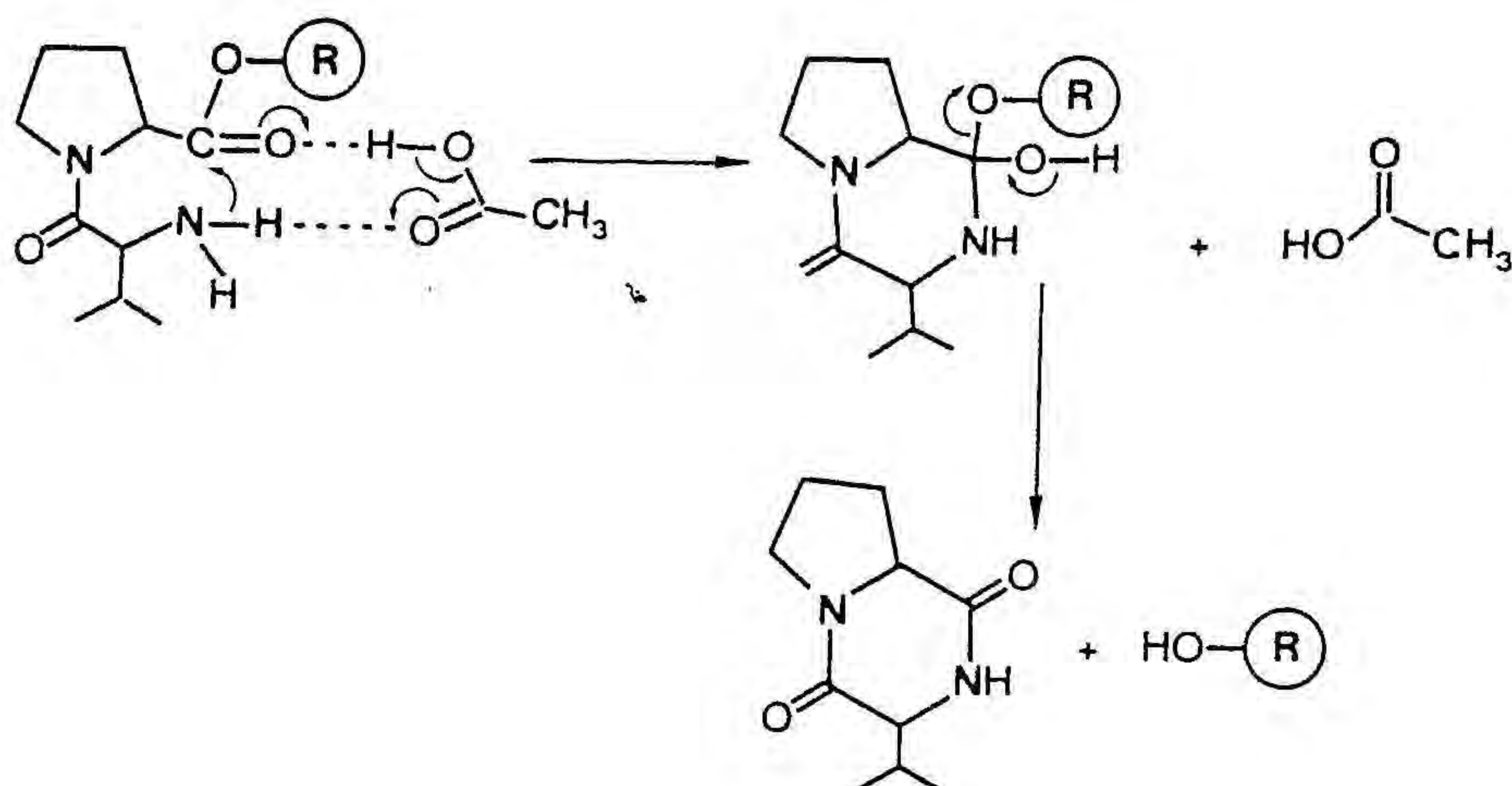
Tot i que és evident que aquest no és el millor mètode per a ancorar un Fmoc-aminoàcid a una hidroximetil-resina, hem intentat indagar si l'imidazole alliberat durant els processos d'activació i acoblament de l'àcid carboxílic desprotegeix el Fmoc-aminoàcid. Per a estudiar l'estabilitat del Fmoc enfront de l'imidazole s'han agitat a temperatura ambient en diclorometà/DMF 4/1 quantitats equimolars de Fmoc-glicina i imidazole, durant períodes de temps variables. L'anàlisi qualitativa per cromatografia en capa fina ja ha indicat la presència de glicina lliure al cap de 30min de reacció, i el màxim de concentració s'ha detectat a les 3h. La quantificació de la glicina present en la mescla per cromatografia de bescanvi iònic permet de comprovar les observacions de la cromatografia en capa fina. Aquests resultats mostren clarament que l'imidazole reacciona amb el grup Fmoc alliberant l'amina, la qual cosa provoca la formació de dipèptid en el transcurs de l'acoblament.

2.3. Estudi de la reacció de formació de dicetopiperazines.

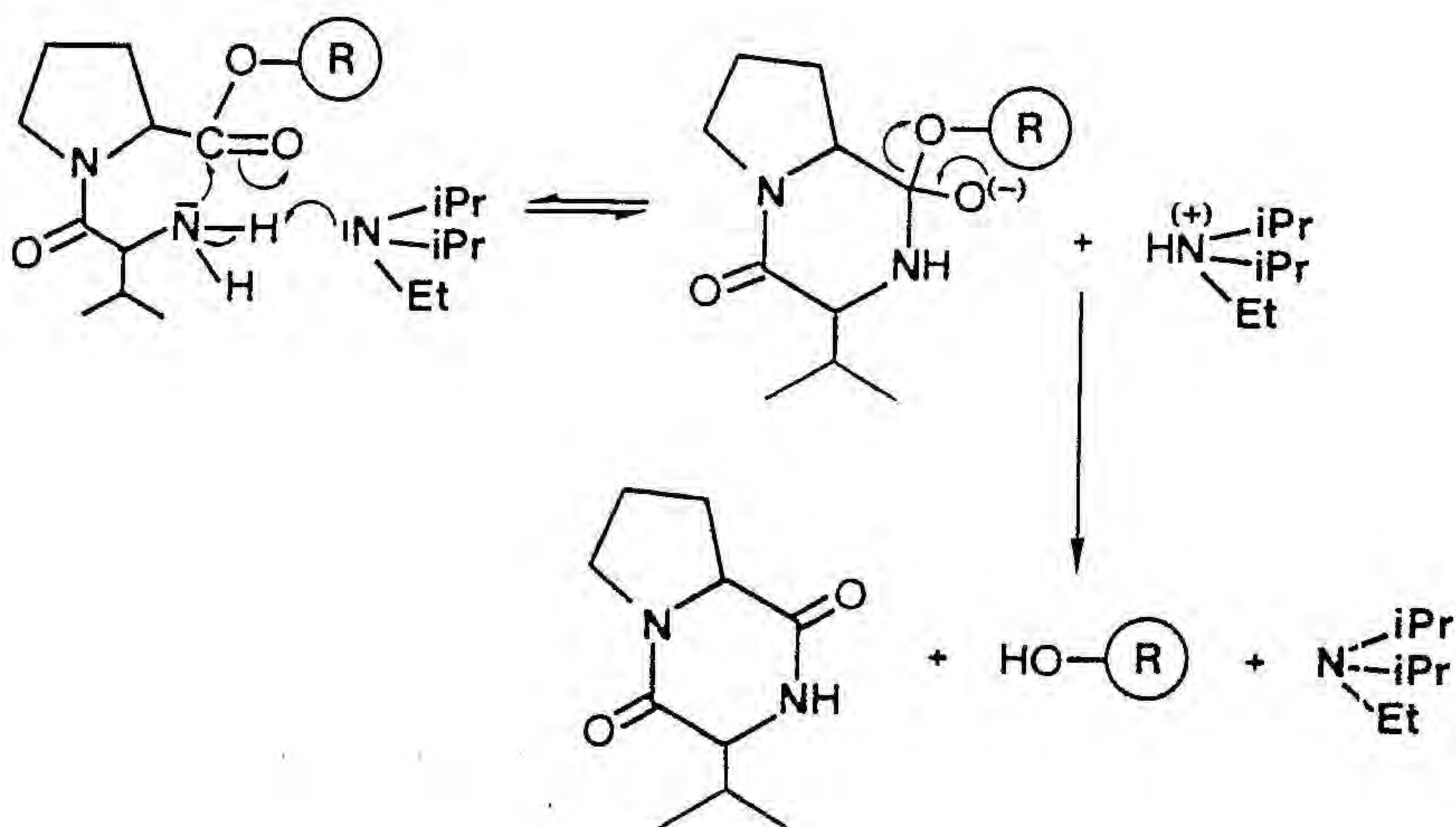
Tal com hem anat comentant al llarg de la Memòria (vegeu, sobretot, 1.2.3.A) a la síntesi de pèptids en fase sòlida es pot produir una reacció secundària que condueix a la formació d'un dipèptid cíclic o

dicetopiperazina (162, 163). La reacció té lloc en el cicle d'incorporació del tercer aminoàcid i consisteix en una aminòlisi intramolecular que provoca la pèrdua dels dos primers aminoàcids. Ja hem assenyalat que la seva velocitat de formació depen molt de la seqüència; seqüències com D-Val-L-Pro (114), L-Pro-L-Pro (114, 162 i 164) i L-Ala-L-Pro (162) donen molt fàcilment la reacció secundària, i, en general, la presència a l'extrem C-terminal de glicina i, sobretot, prolina i N-metilaminoàcids afavoreix la formació de dicetopiperazines. Hem dit també que el mecanisme proposat inicialment (114) es basa en que la reacció està catalitzada per àcids i per tant pot tenir lloc en el transcurs de la síntesi durant la incorporació del tercer aminoàcid.

A continuació s'indica el mecanisme proposat (114) per la formació d'una dicetopiperazina, en aquest cas ciclo(-Val-Pro), catalitzada per àcid acètic:



Al nostre laboratori s'ha estudiat la cinètica de formació de dicetopiperazines sobre diverses resines, observant-se que en alguns cassos la catàlisi bàsica és prou important com per esperar pèrdues de dipèptid a l'etapa, prèvia a l'engalzament del tercer aminoàcid, que suposa la neutralització amb EDIA de la funció α -amino que ha estat protegida amb un àcid (165) (vegeu figura pàgina següent):



Dins de l'esquema de síntesi convencional que utilitza Boc-aminoàcids es pot obviar a aquest problema de diferents maneres:

- un cop ancorat l'aminoàcid C-terminal al polímer, engalzar-hi el dipèptid corresponent al segon i tercer aminoàcids, corrent el risc d'epimerització del dipèptid durant l'acoblament
- si volem incorporar un aminoàcid rera l'altre, emprant el mètode de Suzuki que consisteix a neutralitzar in situ l'hidroclorur de la dipeptidil-resina amb la sal de N-metilmorfolini de l'aminoàcid N^α-protegit en presència de DCC (166).

Fent servir el grup protector Fmoc continua essent possible aplicar la primera d'aquestes alternatives, però, donat que la desprotecció es fa en medi bàsic, l'amina queda lliure ja de bon començament i per tant no es pot aplicar el mètode de Suzuki.

Amb aquests precedents i, sobretot, després de la pèrdua de grau de substitució que s'ha produït a la síntesi del pèptid 4, ens hem proposat de:

- comprovar que efectivament es forma una dicetopiperazina
- veure quines són les condicions que més afavoreixen aquesta reacció secundària sobre aquesta resina
- mirar d'evitar o minimitzar la formació de dipèptids cíclics amb la nostra metodologia de síntesi.

Per a dur a terme aquest estudi hem sintetitzat Fmoc-D-Val-L-Pro-resina, ja que és conegut (114) que aquest dipèptid forma fàcilment la dicetopiperazina i és per tant un model útil.

2.3.1. Síntesi de Fmoc-D-Val-L-Pro-O-CH₂-C₆H₄-O-CH₂- $\textcircled{\text{P}}$.

En primer lloc ha calgut preparar Fmoc-D-Val-OH, producte no comercial que s'ha obtingut fent reaccionar D-valina amb Fmoc-Cl.

L'ancorament de l'aminoàcid C-terminal, Fmoc-L-Pro-OH a la resina 1_{E-I} s'ha dut a terme amb l'anhidrid simètric de l'aminoàcid en presència de quantitats equimolars de DCC i DMAP. La desprotecció d'una alíquota ha posat de manifest que hem assolit un grau de substitució de 0.65mmol/g Fmoc-Pro-resina, de manera que hem procedit a benzoïlar els grups hidroxil que hagin quedat lliures sobre la resina. El segon aminoàcid, Fmoc-D-Val-OH, s'ha ancorat amb bon rendiment després de dos acoblaments amb l'anhidrid simètric preformat, l'extensió dels quals s'ha controlat per l'assaig del cloranil (167) que permet de detectar petites quantitats d'amines secundaries sobre el polímer.

2.3.2. Cinètiques de formació de dicetopiperazines.

Per tal de saber en quin moment de la síntesi es produeix l'aminòlisi intramolecular, s'ha efectuat l'estudi cinètic de formació de dicetopiperazines (DKP) en les diferents condicions de la síntesi, que van des de la desprotecció del segon aminoàcid fins a la incorporació del tercer, és a dir:

- condicions de desprotecció, 50% piperidina/DMF
- presència d'àcids carboxílics, amb un model com l'àcid acètic i un aminoàcid concret (Fmoc-L-Pro-OH)
- efecte de la base que s'afegeix durant l'acoblament (EDIA)
- influència dels dos dissolvents més emprats a la síntesi, CH₂Cl₂ i DMF.

L'experiment ha consistit a suspendre una quantitat determinada de dipèptid-resina amb el reactiu que es vol assajar en cada cas. Passat un temps determinat s'ha filtrat la mostra, s'ha afegit una quantitat coneguda d'estearat de n-butil que actua com a patró intern i s'ha analitzat el filtrat per cromatografia de gasos. A partir de les àrees dels pics

del cromatograma corresponents a la dicetopiperazina i al patró intern, s'han calculat els mg formats de dicetopiperazina.

El factor de resposta relativa (RWR) s'ha determinat amb una mostra patró de ciclo(-D-Val-L-Pro) prèviament sintetitzada.

En la primera cinètica hem volgut calcular la velocitat de formació de la DKP en condicions de desprotecció, és a dir, 50% piperidina/DMF. Hem triat la DMF en comptes del diclorometà, que fem servir habitualment a la síntesi, per a evitar la presència d'hidroclorur de piperidini als filtrats que dificultaria l'anàlisi de la mostra per cromatografia de gasos.

La comparació del resultat obtingut en aquest experiment (vegeu més endavant) amb els valors de constants de velocitat de ciclació sobre d'altres resines determinats en estudis fets al nostre laboratori (165), ha posat de manifest que aquesta cinètica és extremadament ràpida, de manera que en el procés d'eliminació del grup Fmoc, i especialment amb seqüències favorables, ja hi pot haver pèrdues importants per formació de DKP. Estudis posteriors efectuats sobre la resina clorometilada i l' α -(4-clorometilfenilacetamido)benzilcopolí(estirè-1%-divinilbenzè) han posat de manifest que 50% de piperidina en DMF és el reactiu assajat que més afavoreix la formació de dicetopiperazines, essent la cinètica de 5 a 6 vegades més ràpida que per les condicions més favorables per a la formació de DKP trobades anteriorment (129).

A la llum d'aquest resultat, queda clar que per estudiar la formació de DKP en condicions diferents a les de desprotecció, és impossible mantenir la totalitat de les cadenes de dipèptid ancorades sobre la resina abans de començar l'estudi cinètic. Per a dur a terme els altres estudis cinètics, hem efectuat en primer lloc una desprotecció curta, de 30s, amb 20% piperidina/DMF. Amb aquestes condicions més suaus, tot i que la desprotecció de la funció α -amino no sigui quantitativa, és d'esperar que no es formi una quantitat de DKP excessiva. A més a més, tant aquesta quantitat de DKP com l'extensió de la desprotecció es poden determinar sobre els filtrats procedents del tractament, i saber per tant el grau de substitució de la H-D-Val-L-Pro-resina sobre la qual es comença l'estudi cinètic.

La representació del logaritme neperià del cocient entre la diferència (mg de DKP teòrics, ancorats a l'inici del tractament sobre la resina - mg de DKP acumulats en cada un dels temps parcials de tractament)

i els mg de DKP teòrics enfront del temps, ha donat una recta de pendent k , valor de la constant aparent de velocitat de primer ordre.

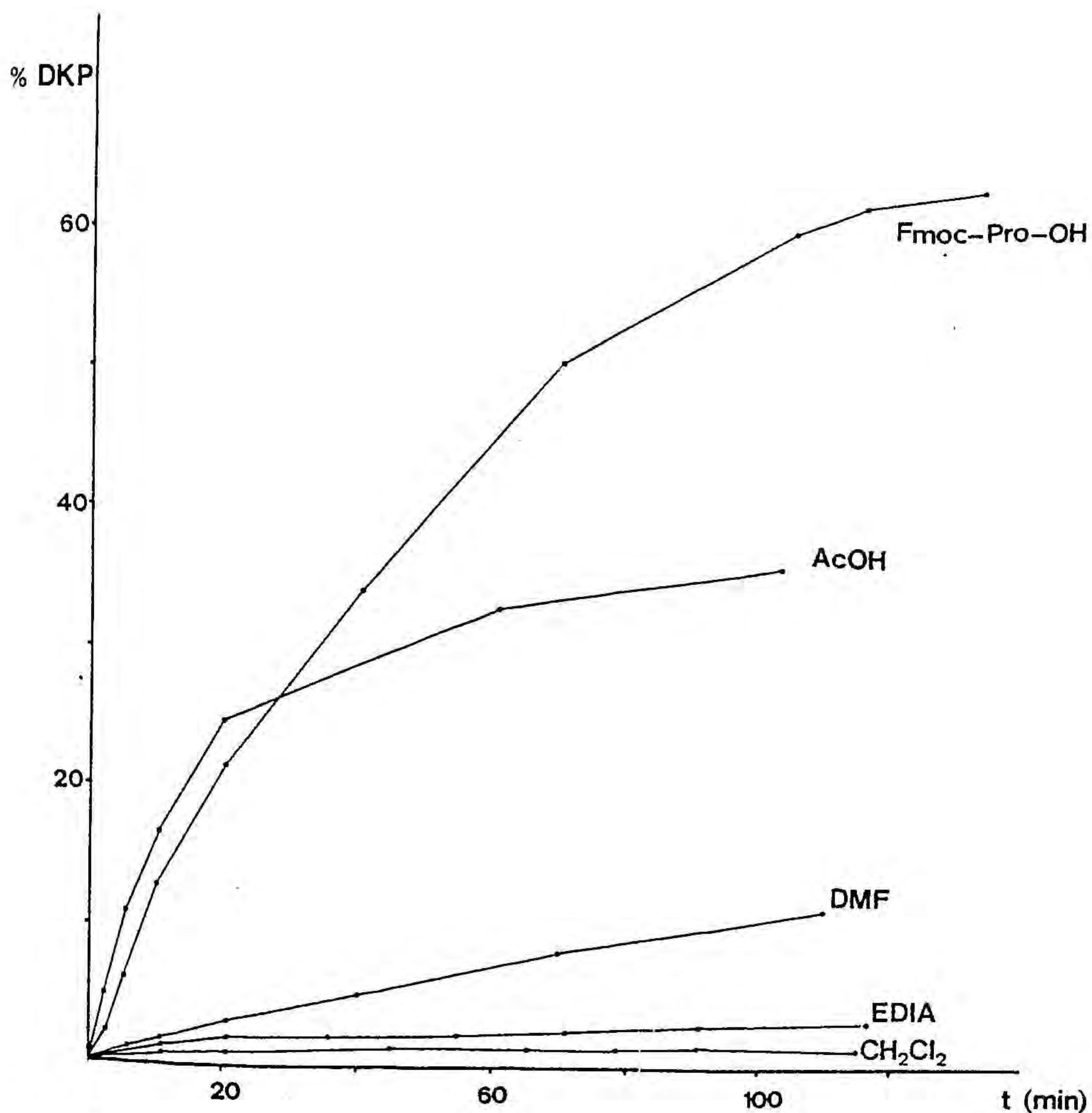
A la següent taula es resumeixen les dades obtingudes als estudis cinètics. S'indica la constant aparent de velocitat k , el coeficient de regressió r i la relació de les constants de velocitat respecte a la constant de velocitat més baixa, la obtinguda en el tractament amb diclorometà.

<u>Reactiu</u>	<u>$k(\text{min}^{-1})$</u>	<u>r</u>	<u>$k/k_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$</u>
50% piperidina/DMF	$8.7 \cdot 10^{-1}$	0.998	9300
0.05M AcOH/ CH_2Cl_2	$2.2 \cdot 10^{-2}$	0.993	230
0.1M Fmoc-L-Pro-OH/ CH_2Cl_2	$2.1 \cdot 10^{-2}$	0.996	220
0.1M EDIA/ CH_2Cl_2	$2.3 \cdot 10^{-4}$	0.996	2.4
DMF	$2.1 \cdot 10^{-3}$	0.996	22
CH_2Cl_2	$9.4 \cdot 10^{-5}$	0.998	1

A la pàgina següent es mostra la representació gràfica respecte al temps del percentatge de DKP format en un temps determinat respecte a la quantitat teòrica màxima de DKP, per tots aquests reactius excepte 50% piperidina/DMF.

El primer que es pot deduir de les dades de la taula és que la piperidina és, amb molta diferència, el reactiu que més afavoreix la formació de dicetopiperazines. Pel que fa a l'altre base assajada, EDIA, queda clar que la seva utilització durant la síntesi no representa cap problema significatiu, probablement a causa de que és una base més feble i a que s'empra en una concentració (0.1M) molt inferior a la de 50% de piperidina (5.1M).

La cinètica de formació de dicetopiperazines amb catàlisi àcida és molt semblant en els dos cassos estudiats (AcOH i Fmoc-L-Pro-OH), i el



valor de k trobat s'acosta molt al descrit per la ciclació de H-D-Val-L-Pro-O-CH₂-**(P)** (165). D'això es dedueix que la reacció secundària només serà un problema greu durant l'etapa d'acoblament del tercer aminoàcid quan la seqüència del dipèptid l'afavoreixi.

Finalment, veiem que l'aminòlisi intramolecular està més afavorida en DMF que en diclorometà.

A la vista d'aquests resultats, i donat que no és possible d'eludir l'ús de la piperidina o de bases molt semblants en síntesi, cal efectuar un estudi una mica més a fons de la reacció de desprotecció, per tal de veure si disminuint el temps de reacció i/o la concentració de base, és possible de reduir l'extensió de la reacció secundària mantenint la desprotecció quantitativa.

2.3.3. Estudi cinètic de la labilitat del grup Fmoc a diferents condicions de desprotecció, i influència d'aquestes en la formació de dicetopiperazines.

L'estudi de la cinètica de la reacció de desprotecció s'ha efectuat amb piperidina/DMF i piperidina/diclorometà. Per les dissolucions de piperidina en diclorometà s'han assajat concentracions per sobre i per sota del valor habitualment emprat en síntesi (50%), mentre que de piperidina/DMF tan sols s'han assajat les dues concentracions emprades en síntesi, 50% i 20%. El temps de desprotecció s'ha mesurat suspent una petita quantitat de Fmoc-dipeptidil-resina en la dissolució de piperidina dins d'una cubeta d'UV, i enregistrant l'absorció a 301nm produïda per la Fmp formada. De les corbes obtingudes s'han deduit els valors dels temps corresponents a un 50% ($t_{1/2}$) i a un 95% de desprotecció ($t_{0.95}$), que s'indiquen a la següent taula. Val a dir que en realitat el que mesurem no és el temps de desprotecció, sino la suma dels temps de desprotecció i formació de l'adducte de N-(9-fluorenilmetil)piperidina.

<u>Dissolvent</u>	<u>% piperidina</u>	<u>$t_{1/2}$ (s)</u>	<u>$t_{0.95}$ (s)</u>
CH ₂ Cl ₂	70	13	65
CH ₂ Cl ₂	60	15	105
CH ₂ Cl ₂	50	20	225
CH ₂ Cl ₂	40	36	360
CH ₂ Cl ₂	30	50	540
CH ₂ Cl ₂	20	90	840
DMF	50	6	33
DMF	20	10	68

El primer que podem deduir de les dades que es ressenyen a la taula és que a les dues concentracions assajades de piperidina en DMF la desprotecció és molt més ràpida que en diclorometà. Encara que per optimitzar al màxim les condicions de desprotecció hauriem de determinar les constants de velocitat de formació de DKP per cada una de les condicions que apareixen a la taula anterior, o fins i tot per d'altres, podem dir que les concentracions més baixes de piperidina en diclorometà no semblen adequades perquè una reducció a la meitat de la concentració de piperidina suposa més del doble de temps de desprotecció (comparem $t_{0.95}$ per 40 i 20% de piperidina/ CH_2Cl_2). Si bé a concentracions elevades de piperidina/ CH_2Cl_2 el temps de desprotecció es redueix considerablement, no és suficientment ràpid comparat amb les desproteccions en DMF ($t_{0.95}$ és aproximadament igual en 70% de piperidina/diclorometà que en 20% de piperidina/DMF), augmentant segurament amb la concentració de piperidina el risc de formació de DKP.

A la vista d'aquests resultats, s'ha ampliat l'estudi de la cinètica de formació de dicetopiperazines en condicions de desprotecció a 50% piperidina/ CH_2Cl_2 i 20% piperidina/DMF. Els resultats obtinguts per a aquests reactius s'indiquen a continuació, juntament amb els corresponents a 50% piperidina/DMF.

<u>Reactiu</u>	<u>$k(\text{min}^{-1})$</u>	<u>r</u>	<u>$k/k_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$</u>
20% piperidina/DMF	$9.8 \cdot 10^{-1}$	0.941	10000
50% piperidina/DMF	$8.7 \cdot 10^{-1}$	0.998	9300
50% piperidina/ CH_2Cl_2	$7.5 \cdot 10^{-1}$	0.974	8000

El primer que constatem és que la velocitat de formació de dicetopiperazines és molt ràpida en els tres cassos i que, a més, les constants de velocitat són bastant semblants. En aquest sentit és sorprenent que el valor de k més alt correspongui a la concentració més baixa de piperidina en DMF. Val a dir que l'error experimental que afecta aquests valors de k tan elevats és segurament força superior al corresponent a cinètiques més lentes.

Arribat aquest punt, hem de concloure que el dipèptid model emprat, D-Val-L-Pro, no és el més idoni per definir amb precisió les constants de velocitat de formació de dicetopiperazines i d'aquestes constants deduir el reactiu de desprotecció més adequat. Es a dir, en les tres condicions assajades i en el temps que considerem necessari per a estar segurs de que la desprotecció és quantitativa, de l'ordre de $10t_{0.95}$, es produeix la pèrdua total d'aquest dipèptid per aminòlisi intramolecular. Malgrat tot, comparant les perdues de dicetopiperazina que tenen lloc en el temps mig de desprotecció i en el temps necessari per a desprotegir el 95% d'amines, veiem que el menor % de DKP es forma amb 50% de piperidina en DMF, ja que encara que la constant de velocitat en aquestes condicions és intermèdia entre les altres dues, la desprotecció és la més ràpida.

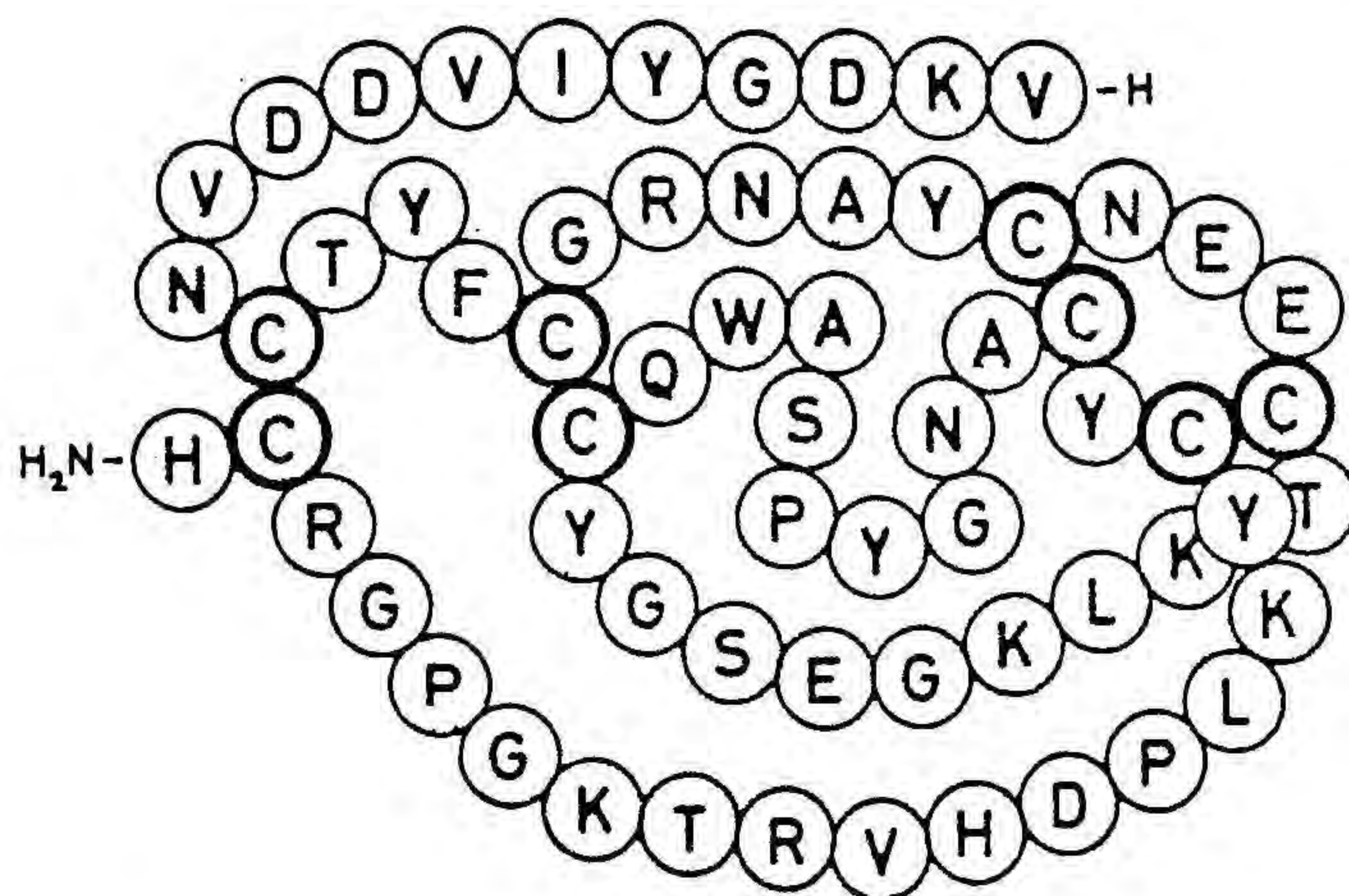
<u>Reactiu</u>	<u>$10t_{0.95}$(s)</u>	<u>%DKP</u>	<u>$t_{0.95}$(s)</u>	<u>%DKP</u>	<u>$t_{1/2}$(s)</u>	<u>%DKP</u>
50%piperidina/DMF	680	100	68	67	10	15
50%piperidina/DMF	330	99	33	38	6	8
50%piperidina/ CH_2Cl_2	2250	100	225	94	20	25

D'aquestes dades podem deduir que, en principi, les condicions que provoquen menys ciclació intramolecular i que per tant són més aconsellables per a dur a terme la desprotecció de Fmoc-dipeptidil-resina són 50% de piperidina en DMF durant 5min. De tota manera, normalment és difícil que ens haguem d'enfrontar amb una seqüència que dongui tan fàcilment la reacció secundària de formació de dicetopiperazines.

3. SÍNTESI DELS SEGMENTS PEPTÍDICS PROTEGITS 32-34
I 35-43 DE LA TOXINA II DE L'ESCORPÍ AaH.

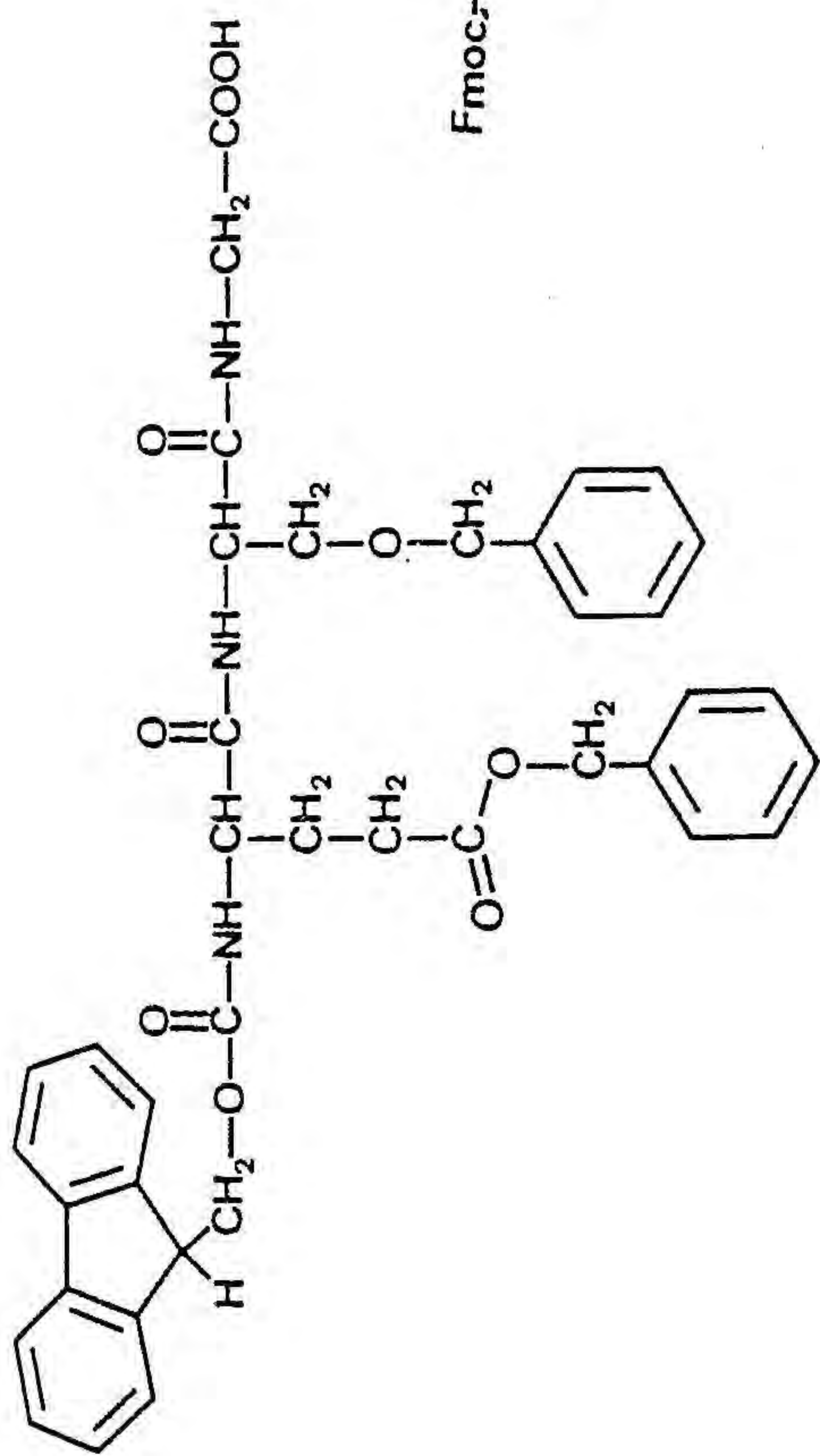
3.1. Introducció.

El darrer objectiu d'aquesta Tesi ha sigut aplicar la metodologia de síntesi amb Fmoc-aminoàcids a la síntesi de dos segments peptídics protegits de la toxina II de l'escorpí *Androctonus australis* Hector (168). Aquesta toxina és un polipèptid bàsic d'una sola cadena de seixanta-quatre aminoàcids reticulada amb quatre ponts disulfur i amidada en el seu extrem C-terminal. Igual que les altres toxines d'escorpí actua sobre el canal de sodi de les membranes excitable de les cèlules nervioses, retardant el procés d'inactivació (169). A continuació es mostra l'estructura covalent de la toxina, indicant-se els punts de reticulació per formació de ponts disulfur que uneixen els aminoàcids 12-63, 16-36, 22-46 i 26-48 (170).

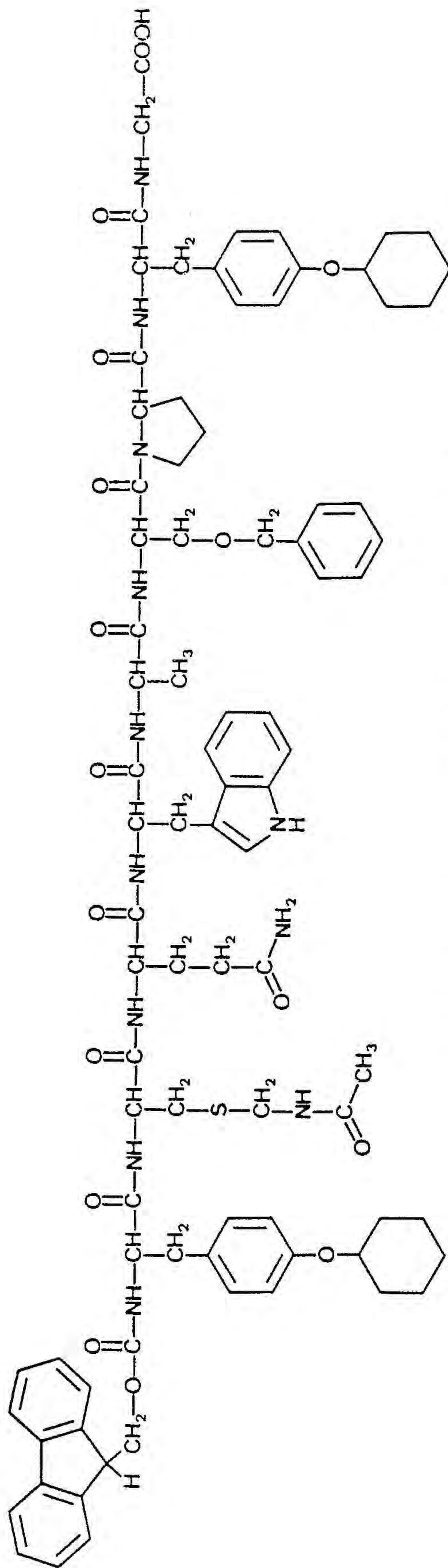


S'ha considerat que la síntesi d'aquesta toxina és una bona prova per la metodologia de síntesi convergent de polipèptids en fase sòlida, tant pel que fa a la síntesi i purificació dels segments peptídics protegits com a l'engalament dels segments sobre un suport sòlid. La seqüència de la toxina s'ha dividit en vuit segments peptídics, amb glicina o prolina en posició C-terminal (excepte el segment corresponent a la seqüència C-terminal del polipèptid), per cada un dels quals s'ha dissenyat cuidadosament la tàctica de síntesi: tipus de funcionalització de la matriu polimèrica, grups protectors de les funcions α -amino i de les cadenes laterals.

Els segments peptídics protegits que ens proposem sintetitzar corresponen a les seqüències 32-34 i 35-43 de la toxina i tenen la següent estructura:



Fmoc-Glu-Ser-Gly-OH 7
 Bzl Bzl



Fmoc-Tyr-Cys-Gln-Trp-Ala-Ser-Pro-Tyr-Gly-OH 8
 cHex AcM Bzl cHex

3.1.1. Disseny de la síntesi.

La síntesi dels segments peptídics protegits 7 i 8 s'ha dut a terme sobre el suport sòlid 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estiré-1%-divinilbenzè) emprant algun dels lots de resina 1 obtinguts amb posterioritat a la síntesi dels segments peptídics 3 i 4 i que ja indicarem en cada cas.

Les funcions α -amino dels aminoàcids s'han protegit, com ja hem indicat, amb el grup Fmoc.

Els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals són els que s'indiquen a continuació:

Acid glutàmic

El grup γ -carboxil de l'àcid glutàmic s'ha protegit en forma de benzil ester, d'acord amb la metodologia clàssica de síntesi de pèptids en fase sòlida (171).

Serina

El grup hidroxil de la cadena lateral de la serina s'ha protegit com a benzil èter, de la mateixa manera que per la síntesi dels segments 1-6 del LHRH 3 i 4 (vegeu 1.1.1).

Tirosina

La toxina II de l'escorpí AaH conté set residus de tirosina. Aixó fa que el grup protector 2,6-diclorobenzil que varem emprar per a la síntesi del LHRH no sigui adequat en aquest cas, ja que si a l'etapa d'acidòlisi amb HF podem tenir per cada residu de tirosina un 5% de transposició del grup 2,6-diclorobenzil a la posició 3 de l'anell benzènic (vegeu 1.1.1), el crú peptídic de toxina pot arribar a tenir un 35% de producte incorrecte, que contingui com a mínim una tirosina alquilada.

Posteriorment al grup 2,6-diclorobenzil, s'ha descrit l'ús del grup protector ciclohexil per la tirosina (172), amb el qual hi ha menys del 0.5% de transposició en el tractament amb HF. A la síntesi dels segments peptídics protegits de la toxina hem emprat el grup ciclohexil per a protegir l'hidroxil fenòlic de la tirosina.

Cisteïna

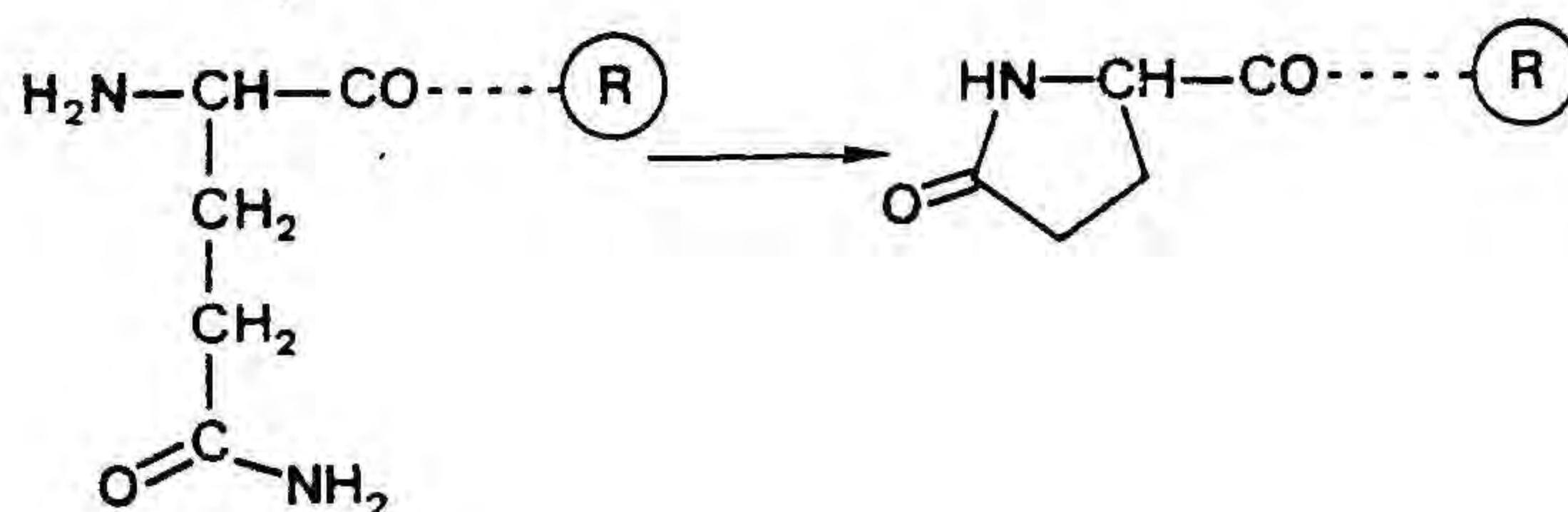
El grup tiol de la cadena lateral de la cisteïna s'ha protegit amb el grup acetamidometil (173), que és làbil a acetat de mercuri^{II}. Els

resultats descrits inicialment a la literatura mostraven l'estabilitat d'aquest grup protector a l'àcid fluorhídric anhidre durant 1h a 0°C (174), la qual cosa el diferencia de tots els altres grups protectors i permet la formació de ponts disulfur independentment i amb posterioritat a la desprotecció dels demés aminoàcids. Més recentment, altres autors han trobat que després de l'acidòlisi amb HF anhidre un cert percentatge de pèptid contenia grups tiol no protegits, que es podrien haver alliberat durant el tractament amb HF (175).

Glutamina

La cadena lateral de la glutamina no s'ha protegit, tot i que alguns autors protegeixen el grup carboxamido de la glutamina per tal d'evitar reaccions secundàries durant la síntesi del pèptid (deshidratació a nitril, formació d'àcid piroglutàmic) (176 a 178). La no protecció de la glutamina implica engalzar-la a la cadena peptídica en creixement per un mètode diferent de l'habitual, ja que en presència de carbodiimides es produeix deshidratació de la carboxamida de la cadena lateral a nitril (3). Inicialment, la glutamina protegida només a la seva funció α -amino s'acoblava a la resta de la cadena en forma d'ester actiu de p-nitrofenil (179); actualment, es du a terme l'acoblament de la glutamina amb DCC i HOBT (68, 180), és a dir com a ester actiu d'HOBT, sense que tingui lloc la reacció secundària de deshidratació. Un cop ancorada la glutamina, la resta d'aminoàcids de la cadena peptídica es pot incorporar sense haver de prendre cap precaució especial.

Pel que fa a l'altre reacció secundària, la formació d'àcid piroglutàmic, pot tenir lloc en el següent cicle d'incorporació d'un aminoàcid; una ciclació intramolecular pot conduir a cadenes peptídiques truncades que contenen àcid piroglutàmic en posició N-terminal (181).



Aquesta reacció secundària està catalitzada per la presència d'àcids febles (àcids carboxílics, HOBT), però no per bases (182), de manera

que en la metodologia de síntesi amb Fmoc-aminoàcids tan sols pot tenir lloc durant l'acoblament del següent residu, però no en l'etapa de desprotecció de la funció α -amino. En qualsevol cas, l'acoblament del següent aminoàcid en forma d'anhídrid simètric preformat ha de minimitzar aquesta reacció secundària.

Triptofan

Igual que per la síntesi dels segments 1-6 del LHRH, hem emprat Fmoc-triptofan sense protegir el nitrogen de l'anell indòlic (vegeu 1.1.1).

3.1.2. Obtenció dels Fmoc-aminoàcids.

Tots els Fmoc-aminoàcids, excepte cisteïna i tirosina, s'han adquirit de cases comercials (Bachem, UCB). Abans de fer-los servir s'ha controlat la seva puresa per cromatografia an capa fina i/o HPLC, i quan ha sigut necessari s'ha procedit a la seva purificació. Aquesta s'ha efectuat o bé simplement per recristal·lització del producte comercial, o bé per cromatografia líquida preparativa d'alta eficàcia, o bé per reproducció de la part del protocol de síntesi que té per objectiu l'aïllament dels Fmoc-aminoàcids. En aquest darrer cas, el producte s'ha dissolt o suspès en 10% Na_2CO_3 aquós i dioxan, s'ha extret amb èter, i a continuació la fase aquosa s'ha acidificat fins a pH=2. La filtració del precipitat o l'extracció amb AcOEt ha proporcionat el producte desitjat.

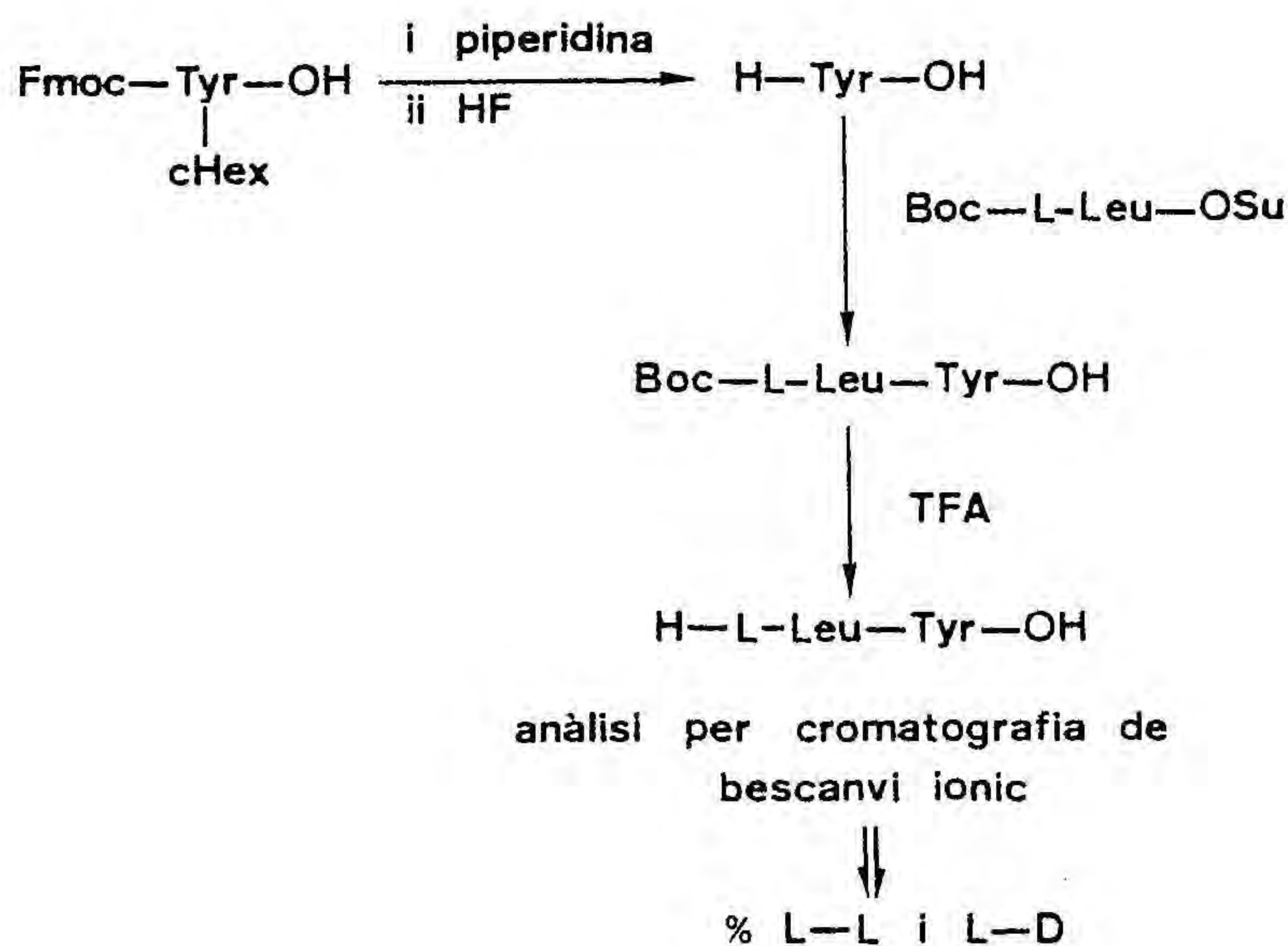
Pel que fa a Fmoc-Tyr(cHex)-OH i Fmoc-Cys(Acm)-OH, s'han obtingut al nostre laboratori pels següents procediments:

Fmoc-Tyr(cHex)-OH

En primer lloc s'ha sintetitzat H-Tyr(cHex)-OH, d'acord amb el mètode ja descrit (95,172). El grup Fmoc es pot introduir amb Fmoc-Cl (183) o amb Fmoc-N₃. Qualsevol dels dos procediments permet d'obtenir el producte pur i amb bon rendiment.

En sintetitzar per primera vegada Fmoc-Tyr(cHex)-OH s'ha dut a terme el control de la puresa òptica del producte. Per aixó, tirosina desprotegida obtinguda per eliminació dels grups Fmoc i ciclohexil de

Fmoc-Tyr(cHex)-OH, s'ha fet reaccionar amb el succinimido ester de la Boc-L-leucina. El dipèptid format Boc-Leu-Tyr-OH s'ha tractat amb TFA, i el pèptid resultant (H-Leu-Tyr-OH) s'ha injectat a una columna de bescanvi iònic d'un analitzador d'aminoàcids, en condicions que permeten de separar el pèptid desitjat, H-L-Leu-L-Tyr-OH del possible diastereòmer H-L-Leu-D-Tyr-OH (184, 185).



Els factors de resposta colorimètrica a la reacció amb ninhidrina dels dos pèptids s'havien determinat prèviament, injectant una mostra que contenia els dos pèptids sintetitzats per reacció de DL-tirosina amb Boc-L-Leu-OSu i posterior acidòlisi amb TFA. Els resultats obtinguts han mostrat que la Fmoc-Tyr(cHex)-OH era òpticament pura, amb un contingut en isòmer D inferior al 0.2%, de manera que podem concloure que ni el mètode d'introducció del grup Fmoc ni la seva eliminació comporten racemització del carboni α dels aminoàcids.

Fmoc-Cys(Acm)-OH

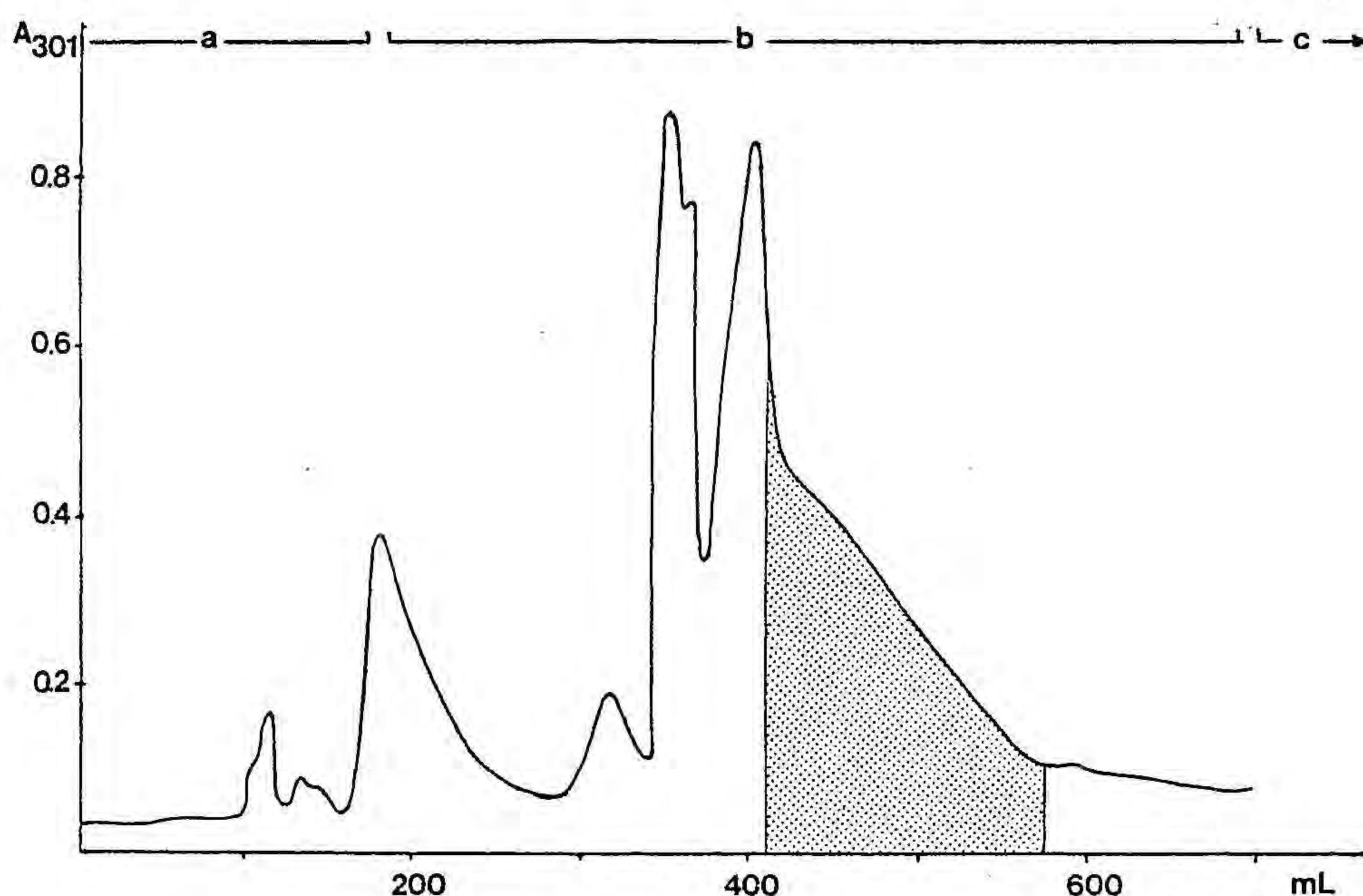
La síntesi de Fmoc-Cys(Acm)-OH ha plantejat alguns problemes. La H-Cys(Acm)-OH s'ha obtingut a partir de Boc-Cys(Acm)-OH per tractament amb HCl/dioxan 4N i alliberament de la base per cromatografia de bescanvi iònic sobre Dowex 1X-8 en forma d'acetat (el producte que s'elueix dóna negatiu l'assaig de clorurs).

El primer intent d'introducció del grup Fmoc amb Fmoc-Cl ha

conduit a una mescla complexa de reacció, observant-se que, a diferència del que succeeix a la síntesi d'altres Fmoc-aminoàcids, al llarg de la reacció el pH va disminuint.

Un segon intent de reacció de H-Cys(Acm)-OH amb Fmoc-Cl, controlant que el pH de la reacció es mantingui a 9 per addició de carbonat sòdic, ha conduit a un producte de reacció que continua estant molt impurificat.

La purificació del producte als dos intents de síntesi amb Fmoc-Cl s'ha aconseguit per cromatografia líquida sobre columnes de gel de sílice Lobar (Merck), eluint amb CHCl_3 i $\text{CHCl}_3/\underline{i}\text{PrOH}/\text{AcOH}$ 88/10/2 a 2mL/min, i posterior cristallització del producte en hexà/ CHCl_3 .



Perfil cromatogràfic de la purificació de Fmoc-Cys(Acm)-OH sobre gel de sílice. a) elució amb CHCl_3 ; b) elució amb $\text{CHCl}_3/\underline{i}\text{PrOH}/\text{AcOH}$ 88/10/2; c) elució amb $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 88/10/2.

La síntesi de Fmoc-Cys(Acm)-OH amb Fmoc-N₃, controlant el pH al llarg de la reacció ha donat una mescla de reacció molt més neta, de la qual s'ha obtingut simplement per cristallització el producte desitjat, més pur i amb molt millor rendiment que en els assaigs anteriors. En un article posterior a aquests intents de síntesi, Kisfaludy i Schön han

indicat haver obtingut Fmoc-Cys(Acm)-OH com a producte amorfe, però no han descrit la seva síntesi (47).

3.1.3. Consideracions generals sobre la metodologia de síntesi dels pèptids 7 i 8.

L'aminoàcid C-terminal, glicina en els dos pèptids, s'ha ancorat al 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) per un procediment diferent a l'emprat a la síntesi dels pèptids 3 i 4. El mètode utilitzat s'indica a la síntesi de cada pèptid en concret, essent l'objectiu comú la minimització de formació de dipèptid (vegeu 2.2.1).

A tots dos cassos s'ha controlat la quantitat de diglicina formada en el procés d'esterificació, tractant una alíquota de Fmoc-glicil-resina amb TFA, efectuant la desprotecció amb piperidina del filtrat un cop evaporat a sequedat i determinant la proporció Gly₂/Gly per cromatografia de bescanvi iònic en un analitzador d'aminoàcids. Per tenir una idea de la quantitat de diglicina que queda ancorada al polímer sobre el qual efectuem la síntesi, una segona alíquota de Fmoc-glicil-resina s'ha tractat en primer lloc amb piperidina, a continuació amb TFA, i s'ha analitzat el percentatge de Gly₂ al filtrat. Aquestes condicions són més pròximes a les de la síntesi, on primerament s'efectua la desprotecció amb piperidina, tractament amb el qual una part de Gly₂ es pot desencorar del polímer en forma de dicetopiperazina.

Pel que fa al protocol de cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid, no s'han introduït modificacions substancials respecte al mètode emprat a la síntesi dels segments del LHRH. La desprotecció de les funcions α-amino s'ha dut a terme amb 50% de piperidina en diclorometà durant 30min, quantificant a cada cicle la Fmp formada, i els acoblaments amb l'anhídrid simètric preformat de l'aminoàcid. Tan sols hi ha dues excepcions a aquest protocol general, l'acoblament de Fmoc-glutamina, que s'efectua activant l'aminoàcid amb DCC i HOBT (vegeu 3.1.1), i el cicle d'incorporació del tercer aminoàcid. En aquest cas particular, per tal d'evitar o minimitzar

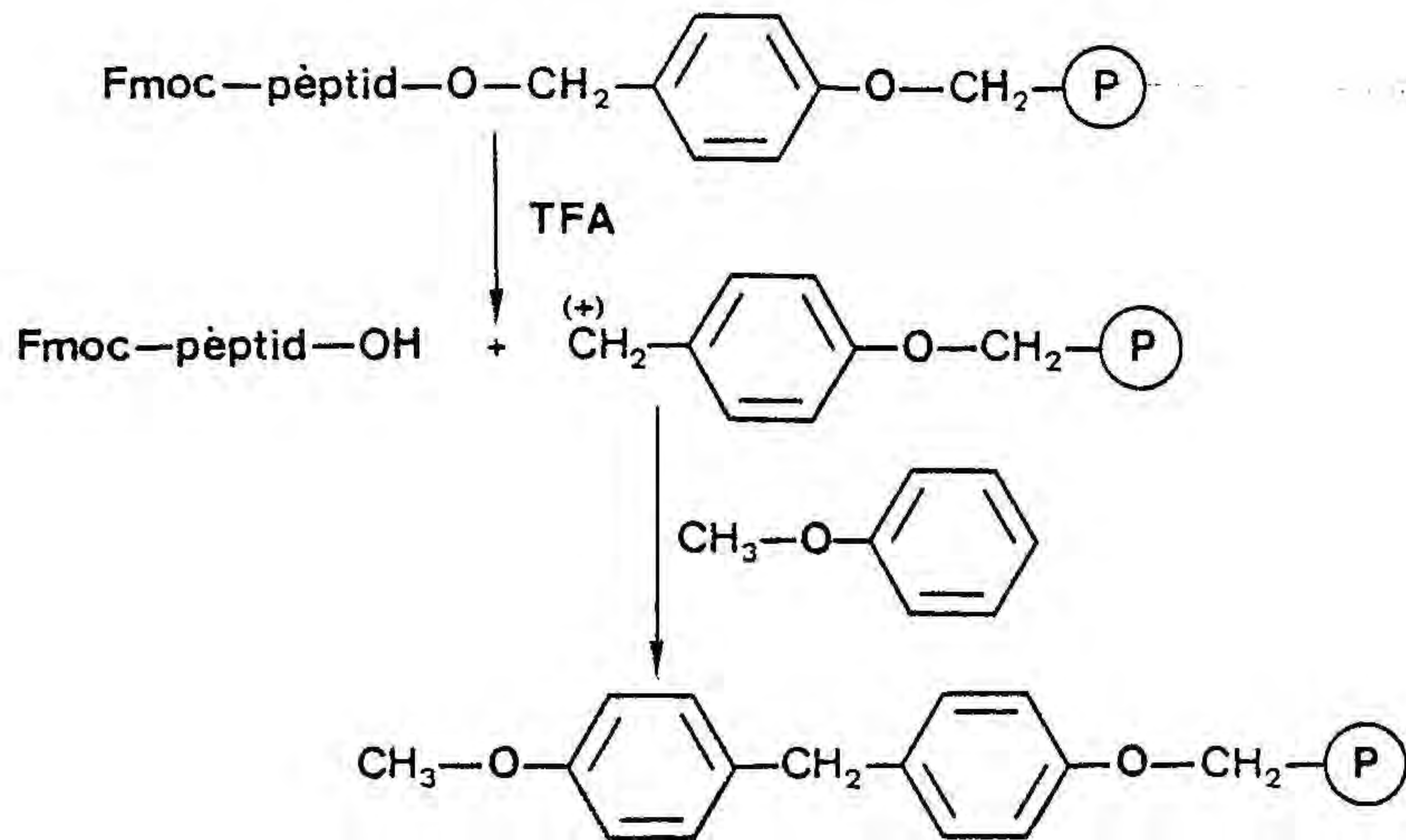
la formació de dicetopiperazines, s'ha desprotegit la funció α -amino de la dipeptidil-resina amb 50% de piperidina en DMF durant 5min. En els rentats que segueixen a aquest tractament, s'ha deixat la resina en contacte amb els dissolvents tan sols el temps estrictament necessari. L'acoblament del tercer aminoàcid s'ha efectuat amb un excés més gran d'anhídrid que l'habitual, afegint l'EDIA des del començament, amb la idea de que l'acilació sigui el més ràpida possible i d'evitar la possible catàlisi àcida deguda a l'àcid carboxílic alliberat durant l'acoblament, ja que, com hem vist (2.3.2), la formació de dicetopiperazines és unes 100 vegades més ràpida en presència d'àcids carboxílics que amb EDIA. Finalment, abans d'efectuar la desprotecció corresponent al cicle d'incorporació del quart aminoàcid, s'han bloquejat els possibles grups hidroxil alliberats per formació de dicetopiperazina mitjançant acetilació amb anhídrid acètic i piperidina.

L'avaluació de l'extensió dels acoblaments s'ha dut a terme amb els assaigs de la ninhidrina i/o fluorescamina, i el del cloranil en el cas de que l'aminoàcid s'acobli sobre prolina. Hem intentat també posar a punt l'assaig quantitatiu de la ninhidrina (186), per a poder mesurar la quantitat de grups amino lliures ancorats al polímer després d'un acoblament.

Després de cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid, s'ha separat una alíquota de Fmoc-peptidil-resina, que posteriorment s'ha tractat amb TFA i analitzat per cromatografia líquida d'alta eficàcia. Aixó ens ha permès d'efectuar un control a posteriori del progrés de la síntesi, ja que si en una determinada etapa es produís un problema greu, cal esperar que sigui més senzill detectar-lo en analitzar una seqüència més curta que no quan s'analitza el producte final un cop incorporats tots els aminoàcids.

Un cop acabada la síntesi i sobre lots reduïts en comptes de sobre la totalitat de peptidil-resina, s'ha efectuat un tractament amb 55% d'àcid trifluoroacètic en diclorometà per desencorar el segment peptídic protegit de la matriu polimèrica. S'ha afegit de 0.5 a 1% d'anisol (respecte al volum total de reactiu) perquè actui com a captador dels cations

benzílics polimèrics, de manera que l'anisol estigui en un excés de 20 vegades respecte als centres reactius.



Aquests carbocations podrien alquilar les cadenes laterals d'algun aminoàcid (tirosina, triptofan) que per tant quedaria covalentment lligat al polímer i provocaria una disminució del rendiment de l'acidòlisi. En el tractament del pèptid que conté triptofan, 8, s'ha afegit β -mercaptoetanol com a antioxidant, un 2% (en volum) respecte al total del reactiu emprat a l'acidòlisi.

Per a purificar aquests pèptids protegits, requeriment essencial de la síntesi convergent de polipèptids, hem intentat trobar noves condicions, més resolutives i que condueixin al producte pur amb millor rendiment que les emprades a la purificació dels segments peptídics protegits del LHRH. A la discussió dels resultats obtinguts a la síntesi del LHRH (1.5), ja hem assenyalat els inconvenients i les limitacions derivats de l'ús de gel de sílice com a suport cromatogràfic en la purificació dels segments protegits. Així mateix, hem destacat la necessitat de trobar millors condicions d'anàlisi d'aquests pèptids. En aquest sentit, hem volgut assajar la cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase reversa tant per analitzar com per purificar els segments peptídics protegits. Si bé aquesta no és una idea nova, hi ha molt pocs treballs on s'utilitzi l'HPLC en fase reversa per l'anàlisi o la purificació de pèptids hidrofòbics (187 a 191), i els sistemes descrits estan aplicats, sobretot, a pèptids protegits petits (di- i tripèptids) o a pèptids parcialment protegits.

Els perfils d'elució de les cromatografies, tant analítiques com preparatives, s'han obtingut a partir del registre continu de l'absorbància o transmitància a 301nm de l'eluit a la sortida de la columna, màxim d'absorció del grup Fmoc i que pràcticament no presenta interferència amb altres dissolvents (DMF, DMA).

3.2. Síntesi del segment peptídic protegit Fmoc-Glu(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-OH 7.

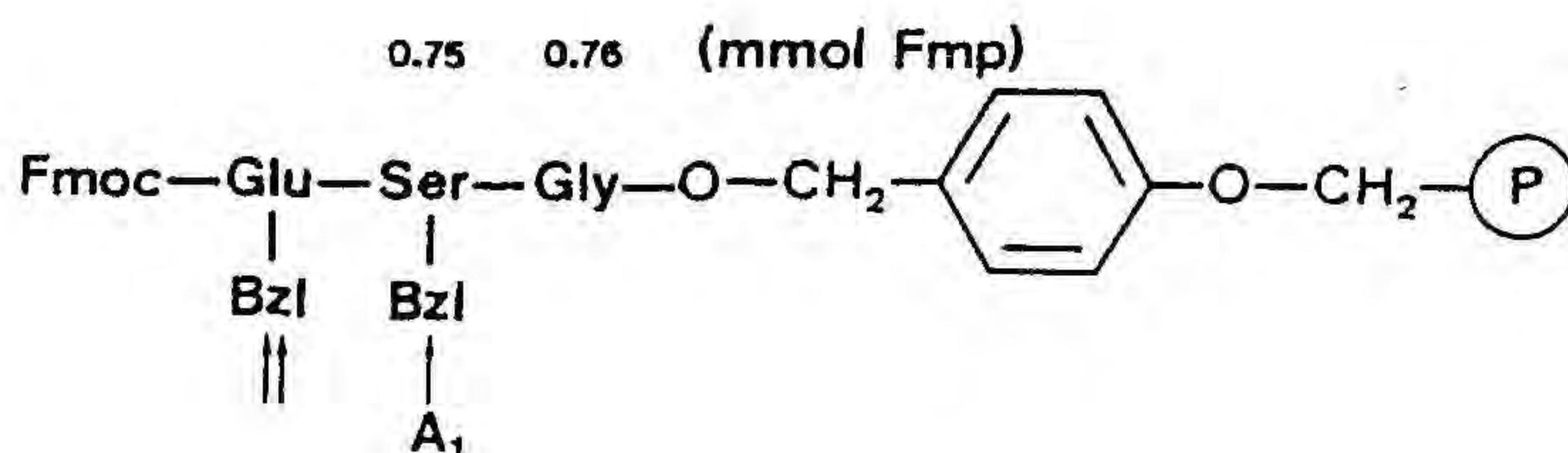
3.2.1. Síntesi del pèptid.

Hem partit de 7.64g del lot de 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè que hem anomenat 1_{A-III'} (vegeu 2.1.2 i part experimental). L'ancorament del primer aminoàcid s'ha efectuat amb un excés de 2.5 vegades de (Fmoc-Gly)₂O respecte als grups hidroximetil del polímer i una quantitat equimolar de DMAP, durant 30min a temperatura ambient.

La desprotecció d'una alíquota de Fmoc-glicil-resina ha posat de manifest que hem aconseguit un grau de substitució de 0.11mmol/g Fmoc-Gly-resina, de manera que el rendiment d'esterificació ha sigut de l'ordre del 25%. Aixó ens ha obligat a efectuar la síntesi amb una gran quantitat de Fmoc-glicil-resina (7.6g). La quantitat de diglicina que s'ha detectat per cromatografia de bescanvi iònic és de l'ordre del 0.5%, part de la qual prové ja de la Fmoc-glicina de partida (vegeu 2.2.1).

Abans de continuar la síntesi s'ha procedit a bloquejar els grups hidroximetil polimèrics lliures mitjançant doble tractament amb clorur de benzoil i piridina.

En el següent esquema s'indica el progrés de la síntesi:



Cada ↑ indica que s'ha efectuat un acoblament de l'aminoàcid assenyalat, i A₁ acetilació amb Ac₂O i EDIA. Els mmol de Fmp obtinguts a les desproteccions totals, indicats al damunt de cada residu, no posen de manifest cap anomalia a la síntesi.

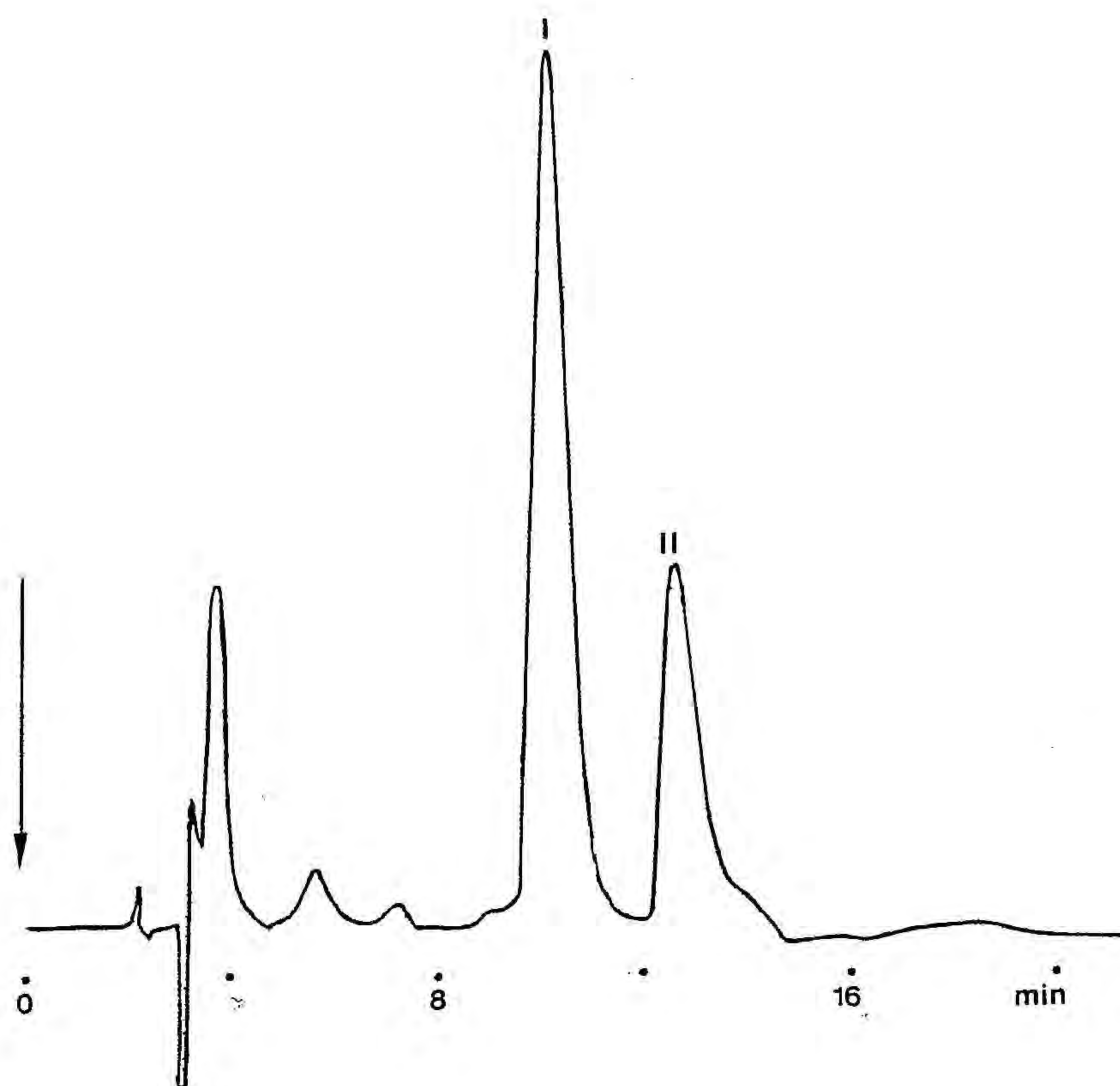
La desprotecció d'una alíquota de Fmoc-tripeptidil-resina ha donat un valor de 0.10mmol/g Fmoc-pèptid-resina, que corregit per l'augment de pes de la resina produït a la síntesi correspon a 0.11mmol/g Fmoc-Gly-resina, que coincideix amb el valor inicial de grau de substitució, de manera que no sembla que s'hagi produït l'aminòlisi intramolecular que conduiria a la formació d'una dicetopiperazina.

En aquesta síntesi hem intentat controlar l'extensió dels acoblaments, començant pel de serina sobre glicina, mitjançant l'assaig quantitatiu de la ninhidrina (186). A tots els assaigs efectuats s'han obtingut resultats contradictoris: qualitativament, l'assaig era pràcticament negatiu, a l'igual que l'assaig de la fluorescamina realitzat en paral·lel, però la determinació de l'absorbància a 570nm posava de manifest la presència d'entre 4 i 24% d'amines lliures. En enregistrar l'espectre desde 620 a 510nm, s'ha confirmat que el valor mesurat d'absorbància es devia tan sols a la turbidesa de la dissolució. D'altra banda, sembla que el grup Fmoc és parcialment làbil en les condicions en les quals s'efectua l'assaig. Així doncs, l'assaig quantitatiu de la ninhidrina no és compatible amb Fmoc-aminoàcids.

La hidròlisi de la Fmoc-tripeptidil-resina amb àcid propiònic i HCl 12N 1/1 durant 48h a 110°C ha donat per la peptidil-resina un grau de substitució de 0.09mmol pèptid/g Fmoc-pèptid-resina, amb una composició en aminoàcids: Ser 0.43, Glu 1.15 i Gly 0.85. El valor baix que s'ha obtingut per la serina és normal donat que aquest aminoàcid es destrueix amb temps d'hidròlisi llargs. El de l'àcid glutàmic és anormalment alt, i no concorda, com veurem més endavant, amb el resultat de l'anàlisi de cap dels crús peptídics obtinguts després d'acidòlisi amb TFA.

Com ja hem indicat (3.1.2), l'acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina amb 55% TFA/CH₂Cl₂ + 1% d'anisol s'ha efectuat sobre petits lots en comptes de sobre el total de peptidil-resina.

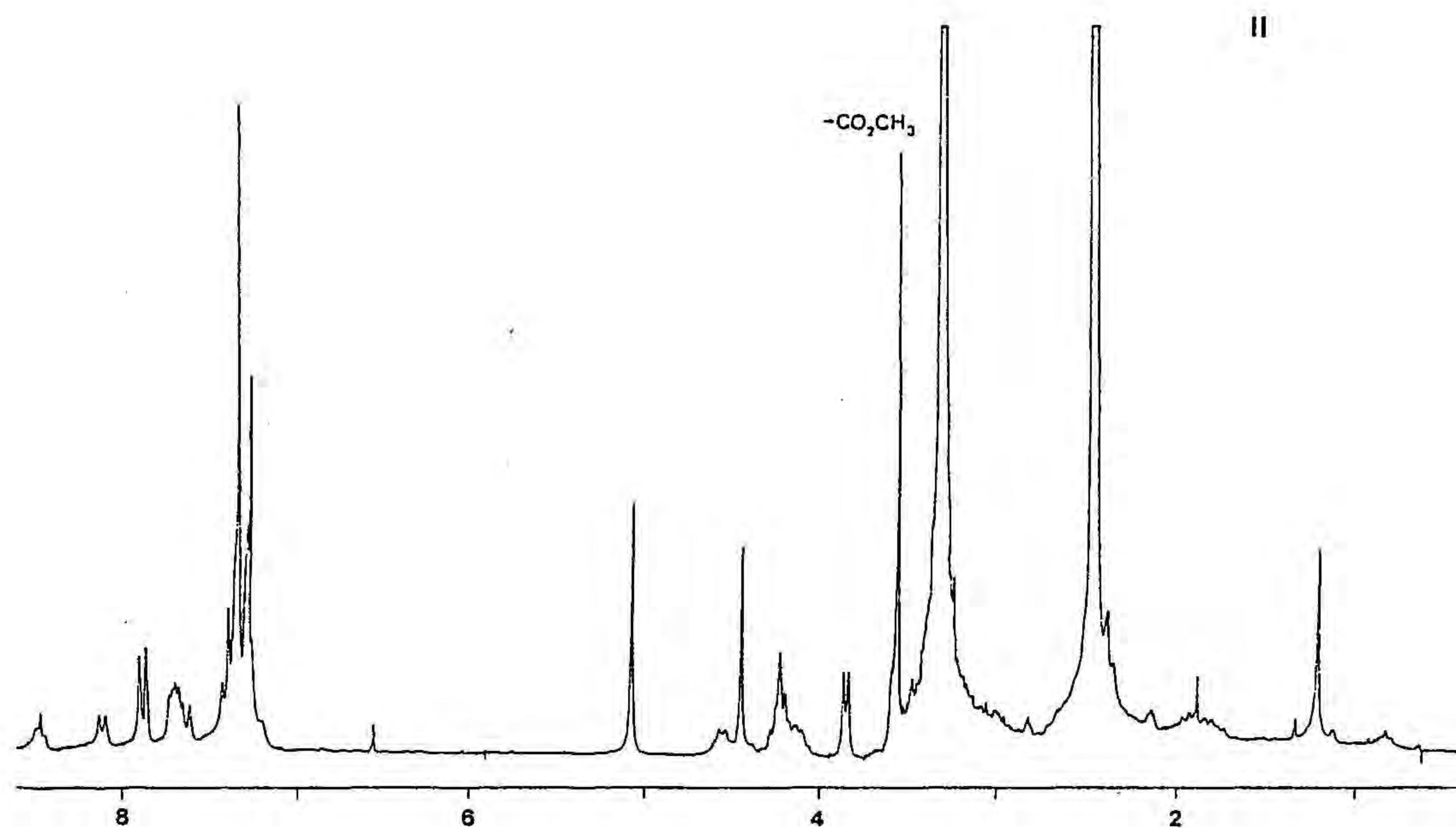
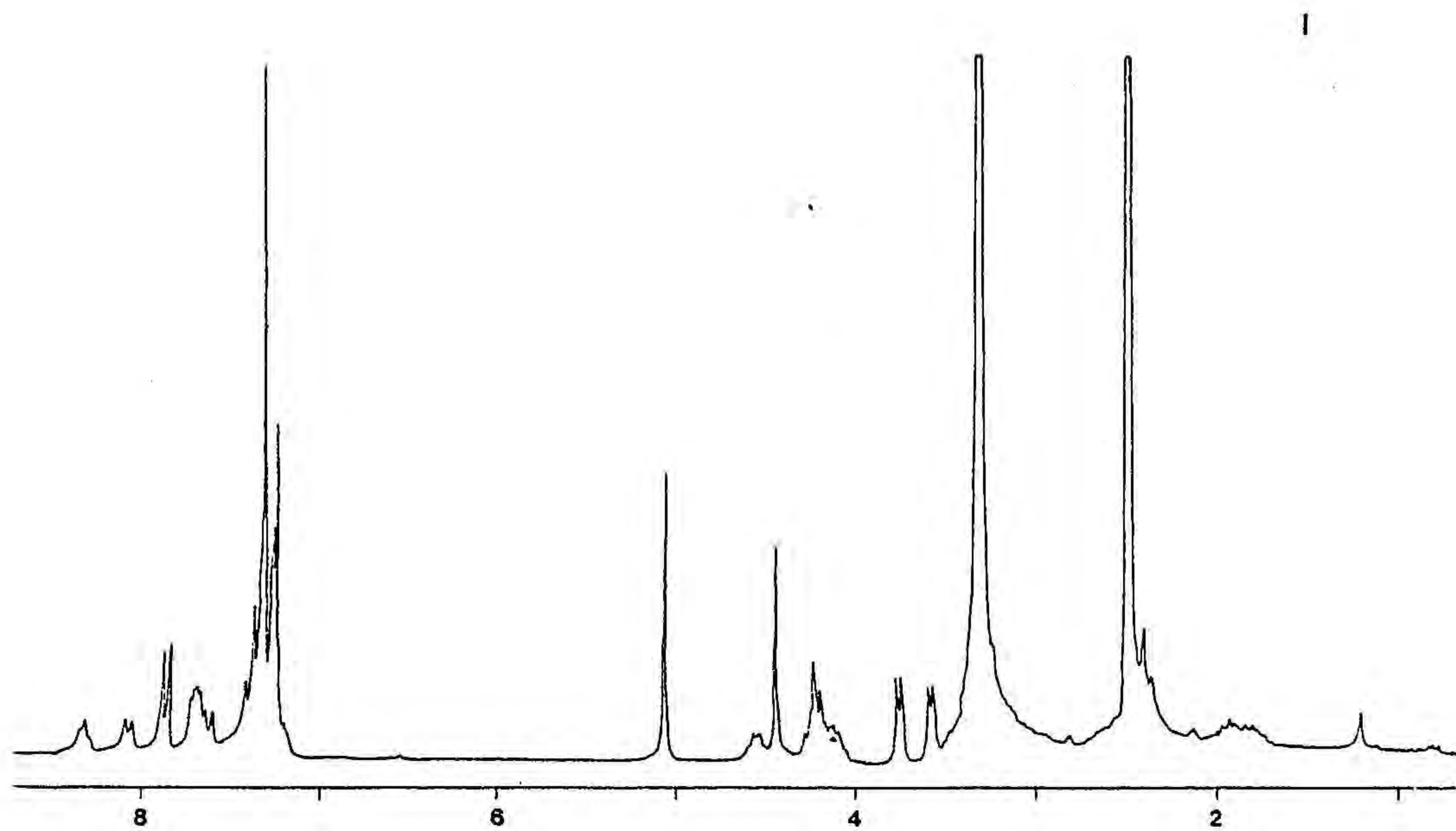
El crú peptídic procedent del primer tractament amb TFA d'una part de peptidil-resina (1.2g) s'ha analitzat per cromatografia en capa fina (cromatoplaques de gel de sílice, eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 73/25/2), posant-se de manifest la presència de dos productes majoritaris i alguna petita impuresa addicional. L'anàlisi per HPLC en fase reversa (Rad-Pak C_{18} , eluent $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{TFA}$ 75/25, flux 1.5mL/min) ha mostrat la presència d'un pic majoritari i un altre producte important, I i II, respectivament, al cromatograma.



Col·lectant una petita quantitat d'aquestes dues fraccions, s'ha pogut efectuar l'anàlisi d'aminoàcids dels dos productes, posant-se de manifest que tots dos presenten el mateix contingut en aminoàcids:

	<u>I</u>	<u>II</u>
Ser	0.92	0.92
Glu	1.01	1.01
Gly	1.08	1.07

Com que la detecció a l'HPLC s'ha fet a 301nm, aixó implica que la impuresa, sigui la que sigui, és conseqüència d'alguna reacció secundària a l'extrem C-terminal del pèptid, o a les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals. Per tal d'esbrinar la naturalesa del producte secundari, i saber quin dels dos pics correspon al pèptid desitjat, s'ha dut a terme una petita cromatografia semi-preparativa en les mateixes condicions, injectant unes quantes vegades la mateixa mostra i col·lectant el producte corresponent als dos pics. Dels dos productes s'han enregistrat els espectres de ^1H -RMN a 200MHz (DMSO-d_6), que es mostren a continuació:



Als espectres es pot observar que els dos pèptids contenen els dos grups benzil protectors de les cadenes laterals de serina i àcid glutàmic (δCH_2 4.46 i 5.08, respectivament), però a l'espectre del pèptid II apareix un senyal a δ 3.58 que permet de concloure que el pèptid II és l'ester metílic del pèptid desijat I.

La formació de l'ester es pot explicar perquè, després del tractament amb TFA s'ha procedit a rentar la resina amb diclorometà i metanol per tal d'extreure tot el pèptid separat de la matriu polimèrica. En evaporar a sequedat el filtrat, no s'ha eliminat totalment el TFA abans d'afegir el rentat amb metanol, de manera que el TFA ha catalitzat la formació de l'ester metílic.

Aquesta primera anàlisi ja ha posat de manifest la utilitat de l'HPLC per a controlar el grau de puresa dels productes, perquè és un mètode no destructiu que permet fàcilment de recuperar la mostra i analitzar-la per mètodes espectroscòpics.

Una segona acidòlisi sobre una altra porció de peptidil-resina, evitant el contacte de TFA i metanol, ha donat un crú peptídic que s'ha analitzat per HPLC en les condicions anteriors, posant-se de manifest que tan sols conté un producte amb el mateix temps de retenció del pèptid I, i que no conté l'ester metílic del pèptid (II), confirmant-se la hipòtesi sobre la formació d'aquest últim.

El rendiment de l'acidòlisi, calculat comparant la quantitat de pèptid que passa a la dissolució (determinada per l'absorció a 301nm5 amb el pèptid inicialment lligat a suport sòlid (en base als mmol de Fmp alliberats a la darrera etapa de desprotecció de la síntesi) ha sigut del 81%. El mateix rendiment, calculat en base a les anàlisis d'aminoàcids del pèptid en dissolució i de la peptidil-resina, és del 77%. La desprotecció d'una alíquota de resina després de l'acidòlisi ha posat de manifest que sobre la resina han quedat un 14% de grups Fmoc, la qual cosa implicaria un rendiment d'acidòlisi del 86%.

3.2.2. Purificació i caracterització del segment peptídic protegit 7.

Amb els crús peptídics procedents de l'acidòlisi de diferents lots de peptidil-resina s'han efectuat assaigs per tal de trobar les millors condicions per purificar el producte. A continuació fem un resum dels assaigs efectuats fins a arribar a les condicions de purificació definitives, que després comentarem amb més detall.

<u>Crú peptídic*</u>	<u>Assaig efectuat</u>
7-1	[- Filtració molecular sobre Sephadex LH-20 - Extracció amb dissolvents i precipitació
7-2	[- HPLC semi-preparativa - HPLC preparativa
7-3	[Purificació definitiva: - Extracció amb dissolvents i precipitació - HPLC semi-preparativa

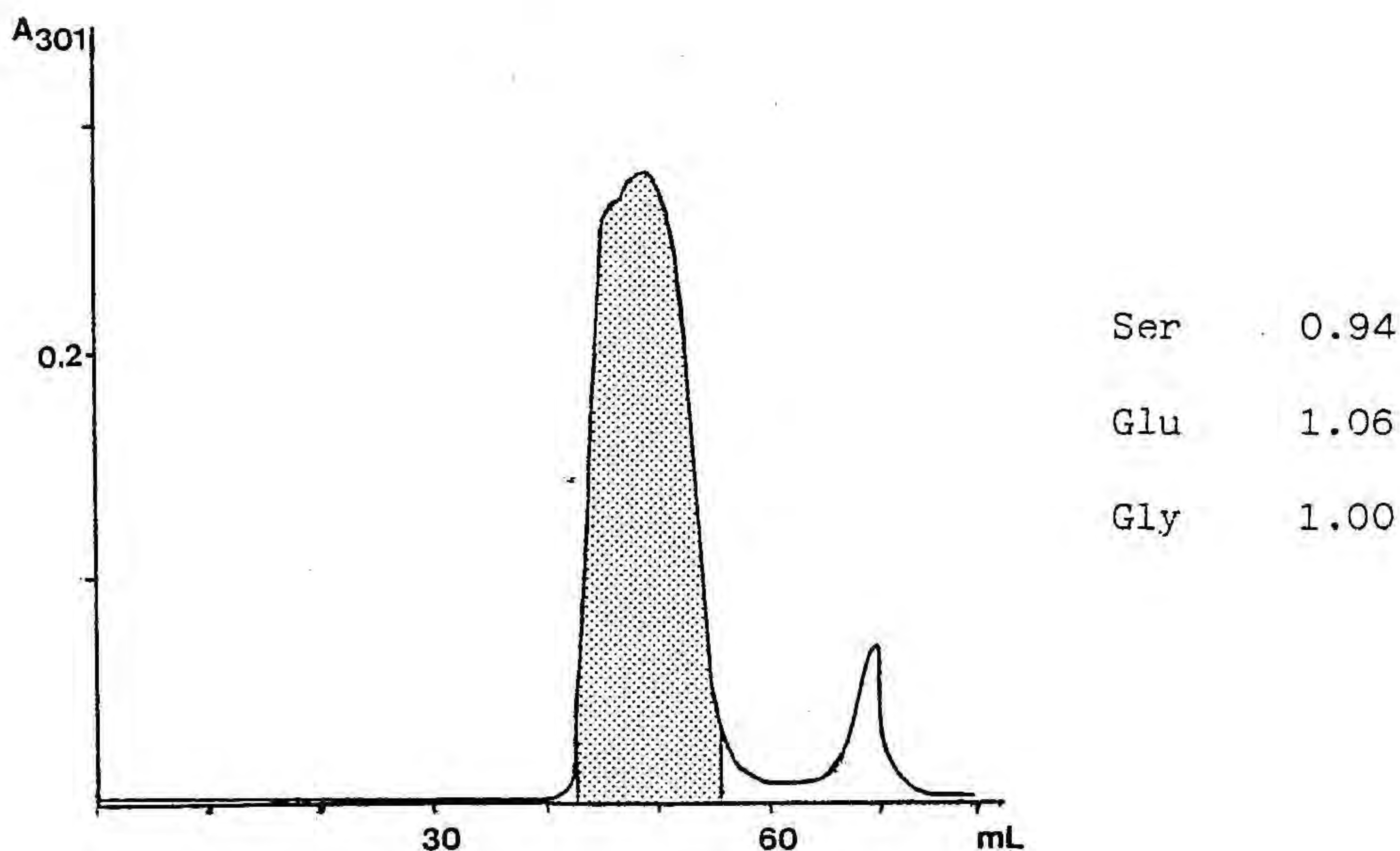
*La nomenclatura 7-1, 7-2 i 7-3 vol indicar que el crú peptídic correspon a l'acidòlisi d'un primer, segon o tercer lot de Fmoc-tripeptidil-resina.

3.2.2.A. Primers assaigs de purificació del pèptid 7.

Tal com ja hen indicat, els primers assaigs de purificació s'han dut a terme amb el crú peptídic procedent del primer tractament amb TFA, 7-1, mostra de la qual desconeixiem, en aquell moment, que contenia com a impuresa l'ester metílic del pèptid 7. D'aquest producte se n'han fet dos lots, amb cada un dels quals s'ha assajat un mètode diferent.

Filtració molecular sobre Sephadex LH-20.

Aprofitant la solubilitat del pèptid en mescles de diclorometà i metanol, s'ha intentat evitar a la cromatografia sobre Sephadex LH-20 l'ús de dissolvents com la DMF que presenten més problemes quan es volen eliminar del producte eluit. Així doncs, s'ha cromatografiat el pèptid sobre Sephadex LH-20 eluint amb 40% de diclorometà/MeOH, fent circular el dissolvent per la columna d'abaix a dalt, per a evitar, al menys parcialment, la formació de bombolles. S'ha obtingut un pic majoritari que conté tots els productes del crú peptídic (no separem, per tant, el pèptid del seu ester metílic), amb una anàlisi d'aminoàcids força correcta.

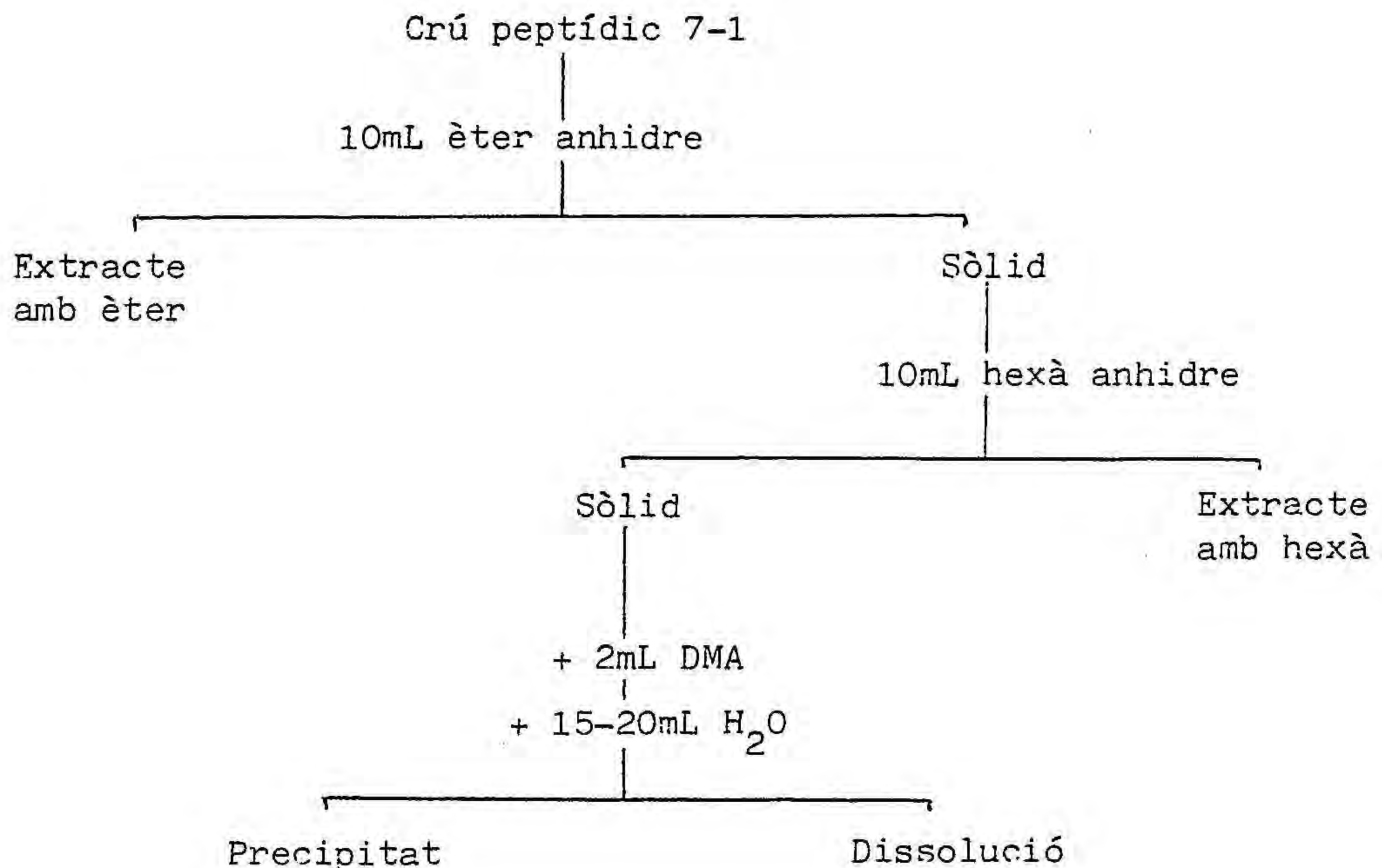


Tot i que no és evident que el Sephadex LH-20 tingui prou capacitat resolutiva com per separar un tripèptid d'impureses de talla diferent (dipèptids o aminoàcids), a la vista tant del cromatograma com de l'anàlisi d'aminoàcids no sembla que el crú peptídic contingui impureses importants de talla i composició en aminoàcids diferents. Aquesta conclusió es veu confirmada pels resultats de l'anàlisi del crú peptídic per cromatografia en capa fina i HPLC, on s'observen dos productes molt majoritaris, el pèptid i l'ester metílic.

Tractament amb dissolvents orgànics i precipitació.

Sobre l'altra meitat del crú peptídic 7-1, hem efectuat un intent de purificació del producte tractant-lo en primer lloc amb dissolvents orgànics en els quals el pèptid és pràcticament insoluble (èter, hexà), amb la idea de poder eliminar impureses no peptídiques o de solubilitat molt diferent. A continuació, el pèptid s'ha dissolt en dimetilacetamida (DMA) i s'ha precipitat per addició d'aigua (com a mínim quatre vegades més en volum) per a intentar eliminar impureses força polars.

Esquemàticament, el procés efectuat és el següent:



L'anàlisi per HPLC (Rad-Pak C₁₈; MeOH/H₂O+0.1%TFA 75/25, 1.5mL/min) mostra que el tractament amb èter, a més a més d'algunes impureses, també extreu una mica de pèptid (i ester), i que el precipitat conté la major part del pèptid i del seu ester metílic.

Comparant el producte obtingut per un o altre mètode es pot observar que l'anàlisi d'aminoàcids és pràcticament la mateixa, així com els cromatogrames d'HPLC analítica. La filtració molecular permet de recuperar una mica més de producte, però per extraccions i precipitació separem

més impureses. El fet de que puguem separar més impureses, juntament amb la senzillesa del mètode, ens porta a triar el mètode d'extraccions i precipitació per la primera etapa de la purificació definitiva del segment peptídic 7. Per tal de no perdre tant de pèptid en aquest procés (11%), es poden introduir dues modificacions:

- a) extreure primer amb hexà i després amb èter. Cal tenir en compte que el crú peptídic conté anisol, difícil d'eliminar simplement per evaporació, i que pot facilitar la dissolució del pèptid en el primer dissolvent emprat a les extraccions. Si aquest és més apolar, separarà menys pèptid i s'emportarà igualment l'ansol
- b) substituir l'extracte amb èter per una mescla d'èter i un petit percentatge d'hexà. Es tracta de disminuir una mica la polaritat del dissolvent per a intentar reduir la quantitat de pèptid que es dissol en aquesta segona extracció

3.2.2.B. Intent de purificació del pèptid 7 per HPLC.

Recerca de condicions de purificació per HPLC semi-preparativa en fase reversa.

Hem cregut convenient modificar les condicions d'HPLC que havíem emprat per analitzar el pèptid (MeOH/H₂O+0.1%TFA) per tal d'evitar problemes en evaporar el dissolvent després de la cromatografia, no necessàriament lligats a la formació d'ester metílic. La idea bàsica ha sigut eluir el pèptid amb acetonitril/aigua, afegint un petit percentatge d'un àcid carboxílic més feble que el TFA (0.5% d'àcid propiònic), ja que s'ha comprovat que aquests contribueixen a augmentar l'eficàcia del sistema cromatogràfic en comparació amb fases mòbils que només contenen aigua i modificador orgànic (192). D'altra banda, la presència d'àcids carboxílics a la fase mòbil fa que els pèptids s'elueixin a concentracions més elevades de modificador orgànic en les quals són més solubles. Per tal d'augmentar la solubilitat del pèptid i evitar la seva precipitació per efecte de càrrega (el pèptid és insoluble en CH₃CN/H₂O), s'ha afegit a la fase mòbil

una certa quantitat de DMF, que inicialment ha sigut del 30%.

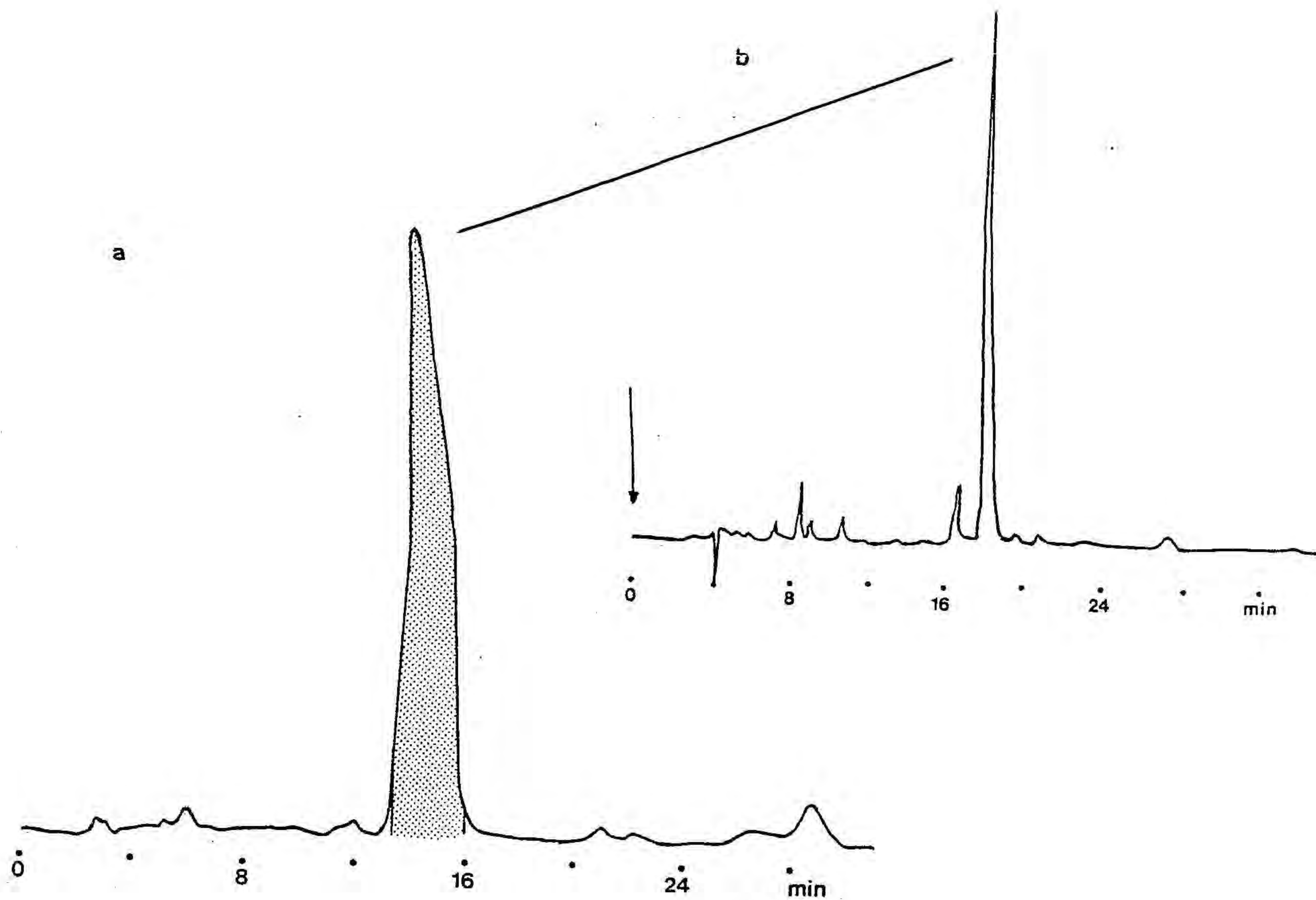
El primer tanteig s'ha efectuat a escala analítica amb una columna μ -Bondapak C₁₈ de 30x0.4cm, mantenint constants la quantitat de DMF i àcid propiònic i fent un gradient d'acetonitril-aigua (A: DMF/H₂O/àcid propiònic 30/70/0.5; B: DMF/CH₃CN/àcid propiònic 30/70/0.5). Per la cromatografia semi-preparativa hem cercat condicions isocràtiques d'elució que permeten un guany considerable de temps al no haver de tornar a les condicions inicials d'un gradient i reequilibrar la columna. Les condicions isocràtiques a les quals hem vist que es pot cromatografiar el pèptid (7-7-2) en aquest tanteig preliminar són DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/40.6/29.4/0.5, eluint a 1mL/min.

La segona etapa ha sigut l'extrapolació d'aquests resultats a condicions semi-preparatives, treballant amb una columna Ultrasphere-ODS de 25x1cm i partícules de 5 μ m. La injecció de 2.5mg (3.6 μ mol) de pèptid 7-2, eluint amb DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/40.6/29.4/0.5 a 4mL/min ha permès de col·lectar un producte que no és pur del tot ni per cromatografia en capa fina ni per HPLC analítica, però que presenta una bona anàlisi d'aminoàcids.

Ser 0.93

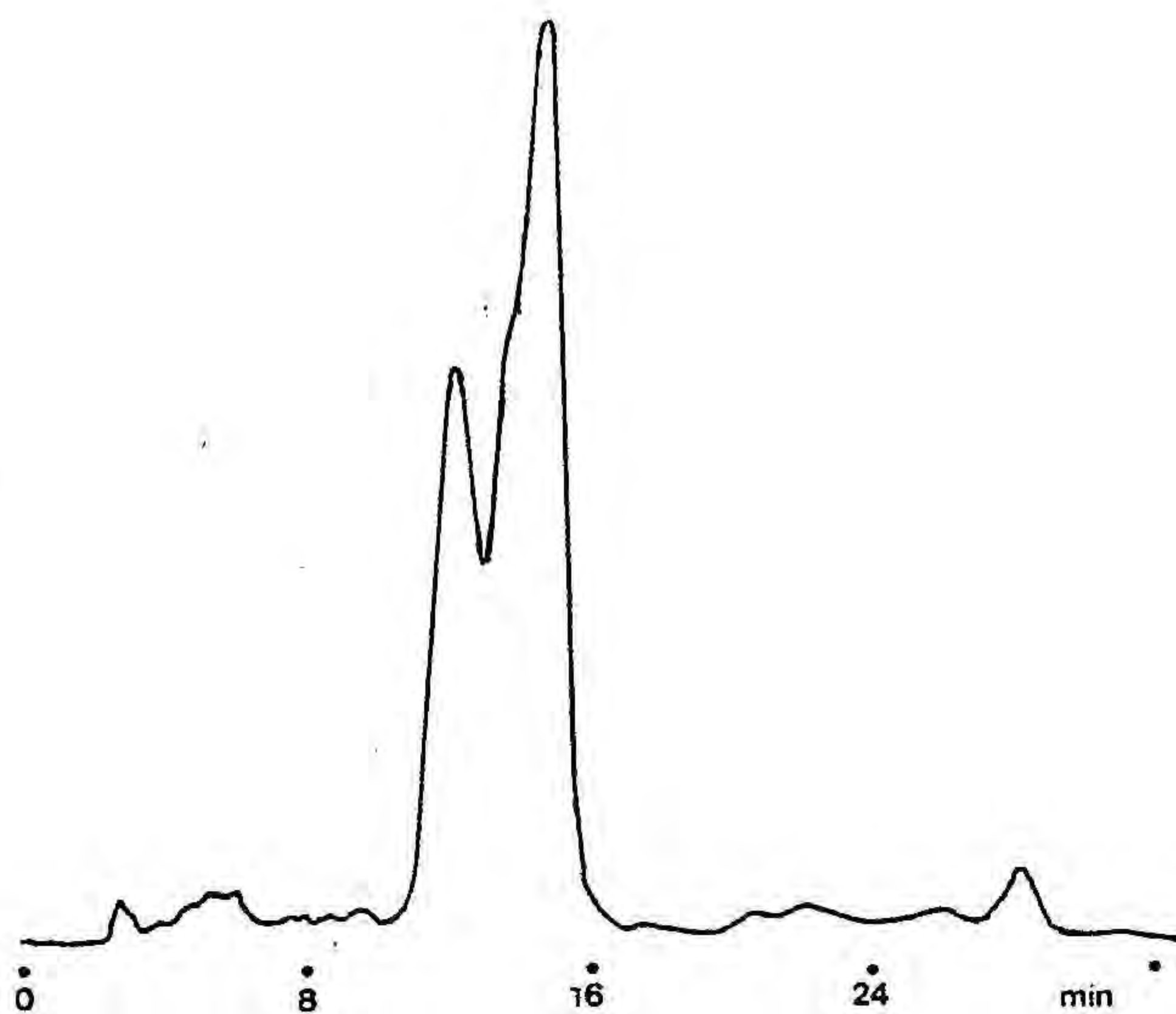
Glu 1.01

Gly 0.99



a: HPLC semi-preparativa del pèptid 7-2; DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/40.6/29.4/0.5, 4mL/min. b: HPLC analítica de la fracció col·lectada; DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 24.5/45.5/30/0.1, 3mL/min (Ultrasphere-ODS)

La injecció d'una quantitat més gran de mostra (5mg) condueix a un cromatograma totalment deformat:



DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/40.6/29.4/0.5, 4mL/min (Ultrasphere-ODS)

Per tal de trobar millors condicions cromatogràfiques, hem fet uns assaigs sobre la mateixa columna mantenint constant el percentatge d'aigua a 30% i el d'àcid propiònic a 0.1% i fent un gradient de DMF-CH₃CN des de 14% fins a 56% d'acetonitril, amb el producte col·lectat a l'assaig anterior en carregar 2.5mg de mostra. El resultat és que per la purificació per HPLC semi-preparativa les condicions que farem servir són: DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 24.5/45.5/30/0.1 a 3.5mL/min. (vegeu 3.2.2.C)

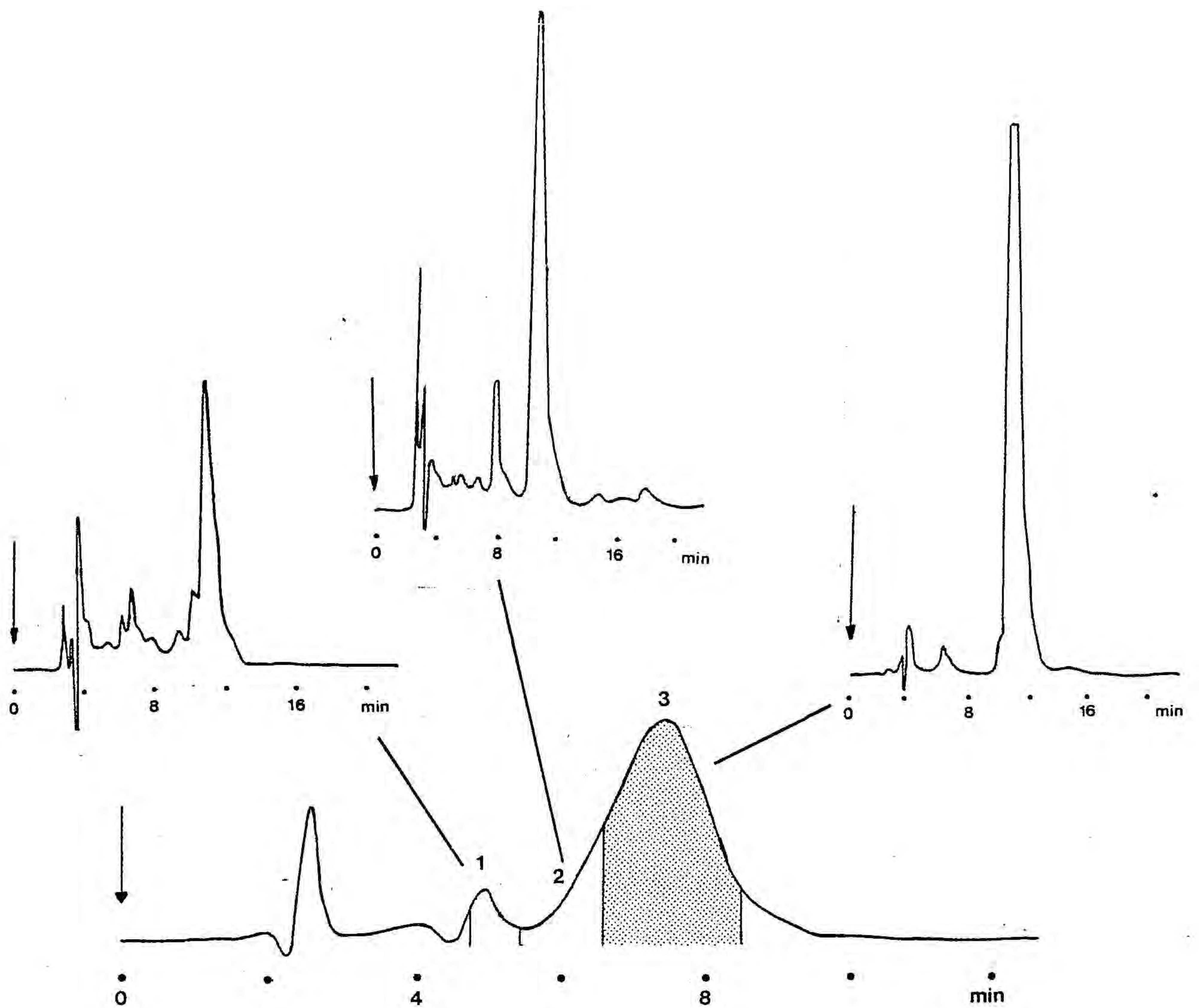
HPLC preparativa

Hem volgut assajar, finalment, la purificació del pèptid a una escala més gran, donat que a escala semi-preparativa cal efectuar moltes injeccions per a purificar una certa quantitat de producte.

54.4mg de pèptid 7-2 s'han injectat a un cartutx de C₁₈ de 28x5cm de l'aparell preparatiu Waters, eluint amb DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/40/30/0.5 a 200mL/min. El cromatograma obtingut es mostra a continuació, així com els cromatogrames d'HPLC analítica (μ -Bondapak C₁₈, DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/38.5/31.5/0.5, 1mL/min) de cada una de les fraccions recullides, que presenten les següents composicions en aminoàcids: (vegeu els cromatogrames a la pàgina següent)

	<u>Fracció 1</u>	<u>Fracció 2</u>	<u>Fracció 3</u>
Ser	0.84	0.95	1.00
Glu	1.01	1.06	1.04
Gly	0.99	0.98	0.96

El rendiment de la purificació ha sigut del 50%, però es podria amillarar intentant recuperar una mica més de producte de la fracció 2.



Cromatogrames d'HPLC preparativa del pèptid 7-2 i d'HPLC analítica de les diferents fraccions recollides.

Tot i que el sistema cromatogràfic a escala preparativa permet de purificar, en un sol cop, unes 25 vegades més de producte que a escala semi-preparativa, és menys resolutiu i dóna pitjor rendiment, de manera que per la purificació definitiva del tripèptid 7 hem fet servir el sistema cromatogràfic semi-preparatiu.

3.2.2.C. Purificació i caracterització del pèptid 7.

La purificació del crú peptídic 7-3, procedent de l'acidòlisi de 1.23g de Fmoc-tripeptidil-resina, s'ha efectuat en dues etapes:

- i) extracció amb dissolvents i precipitació
- ii) HPLC semi-preparativa

i) El crú peptídic s'ha tractat, en primer lloc, amb hexà i hexà/èter 1/4. El sòlid resultant s'ha dissolt en 4mL de DMA i s'ha precipitat per addició d'aigua. A l'esquema de la pàgina següent es resumeix aquest procés i es mostra, per cada fracció, el cromatograma d'HPLC analítica (Ultrasphere-ODS, DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 24.5/45.5/30/0.1, 3.5mL/min). Les anàlisis d'aminoàcids del crú peptídic i de les diferents fraccions obtingudes en aquesta etapa s'indiquen a continuació en forma de taula:

	<u>Crú peptídic 7-3</u>	<u>Extracte hexà</u>	<u>Extracte hexà/èter</u>	<u>Dissolució DMA/H₂O</u>	<u>Precipitat</u>
Ser	0.93	0.53	0.74	0.85	0.86
Glu	1.03	0.85	1.02	0.47	1.03
Gly	1.16	1.62	1.23	1.68	1.11

La major part de les fraccions separades mostren un contingut alt en glicina, principalment l'extracte amb hexà i la part soluble en DMA/H₂O. Aquesta darrera sembla que pugui contenir el dipèptid serina-glicina, per raó del seu baix contingut en àcid glutàmic.

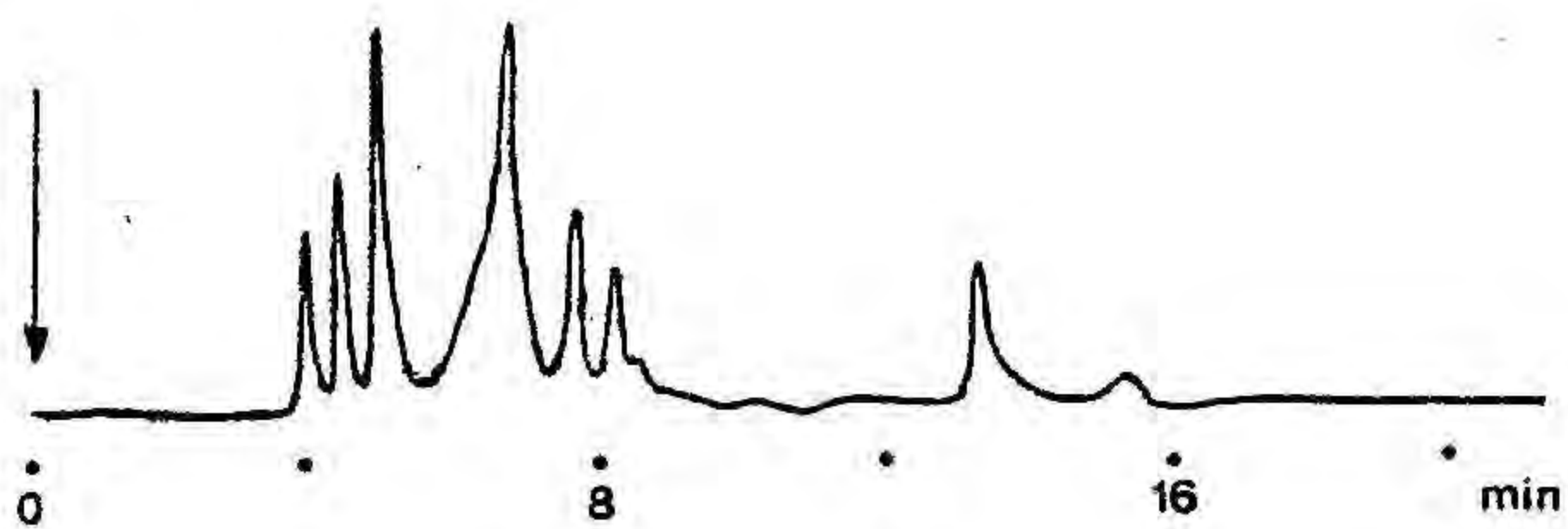
Crú peptídic 7-3 →
(conté anisol)

111mg; 85.8 μ mol

20mL hexà

Extracte amb hexà

↓ 7mg; 0.05 μ mol



Sòlid

20mL hexà/èter 1/4

Sòlid.

Extracte amb èter/hexà

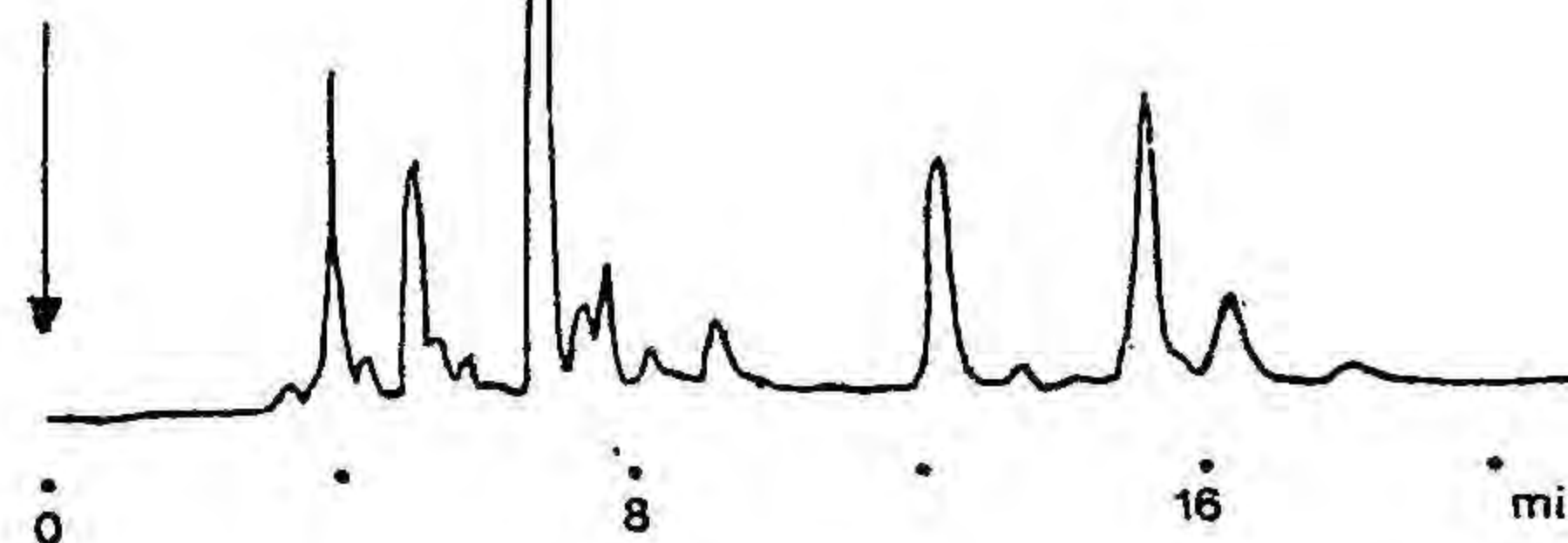
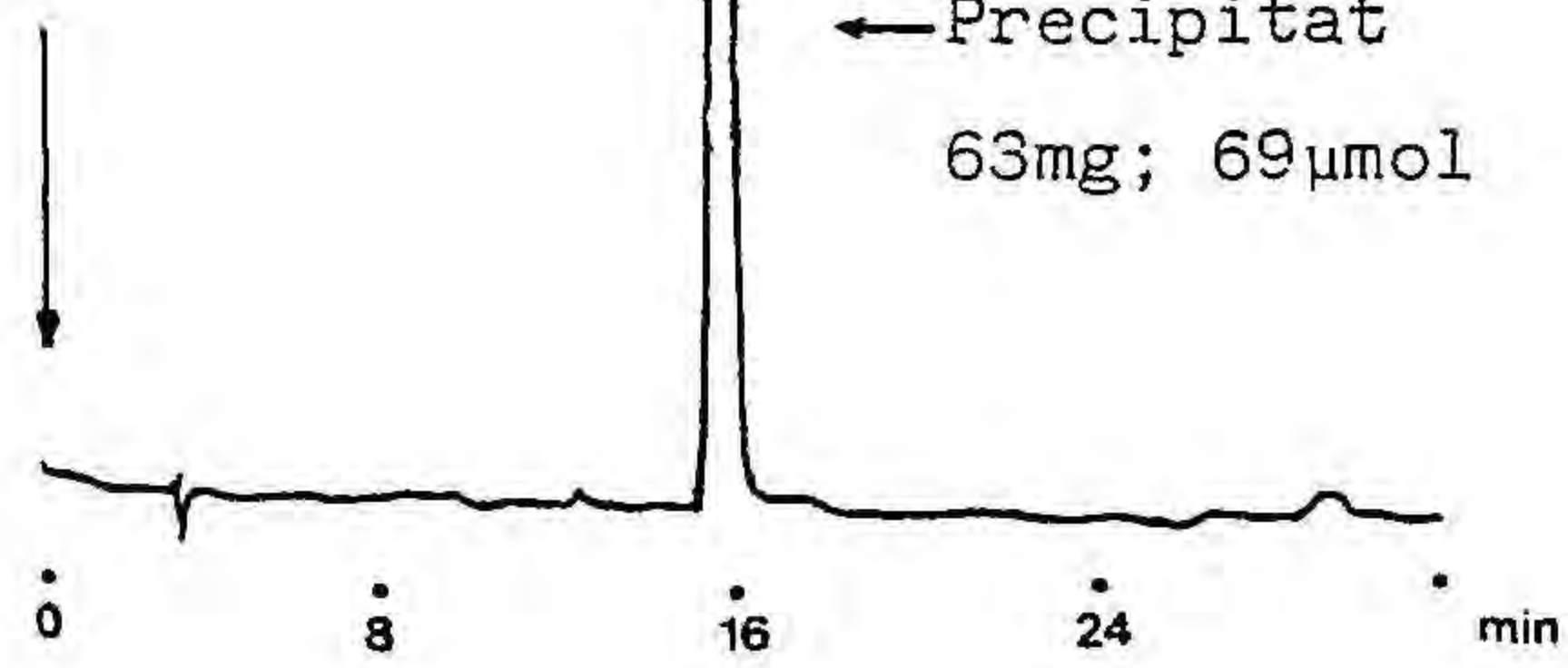
↓ 11mg; 2.7 μ mol

+ 4mL DMA

+ 16mL H₂O

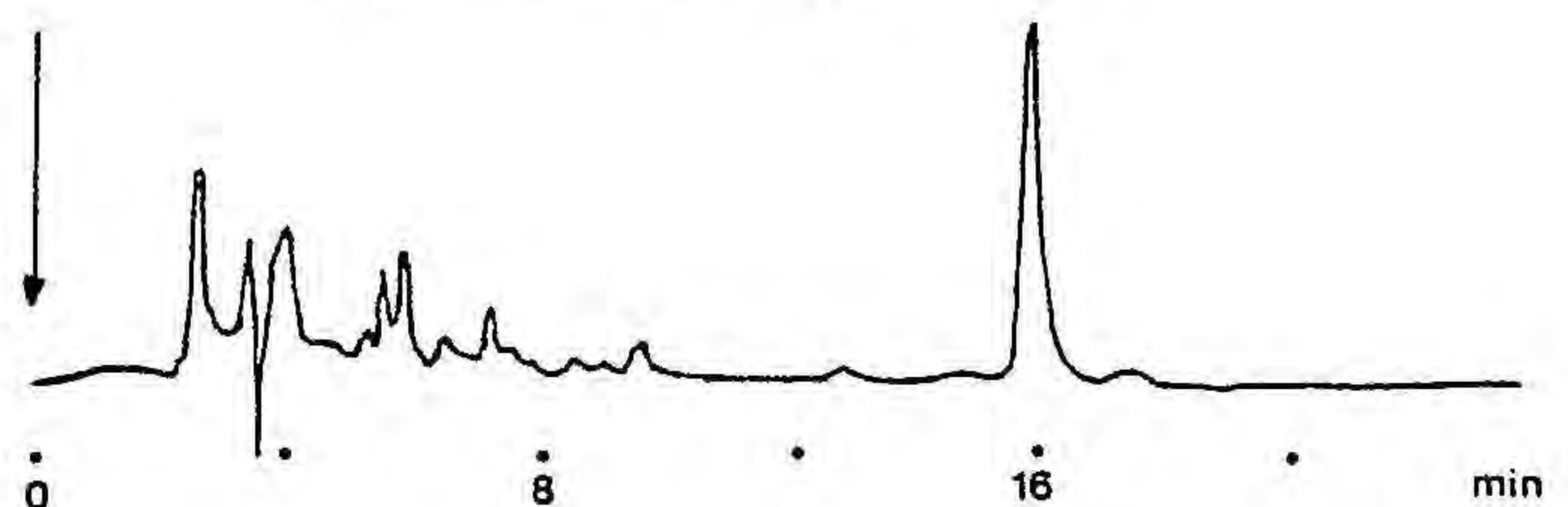
← Precipitat

63mg; 69 μ mol



Dissolució DMA/H₂O

↓ 5mg; 3.1 μ mol



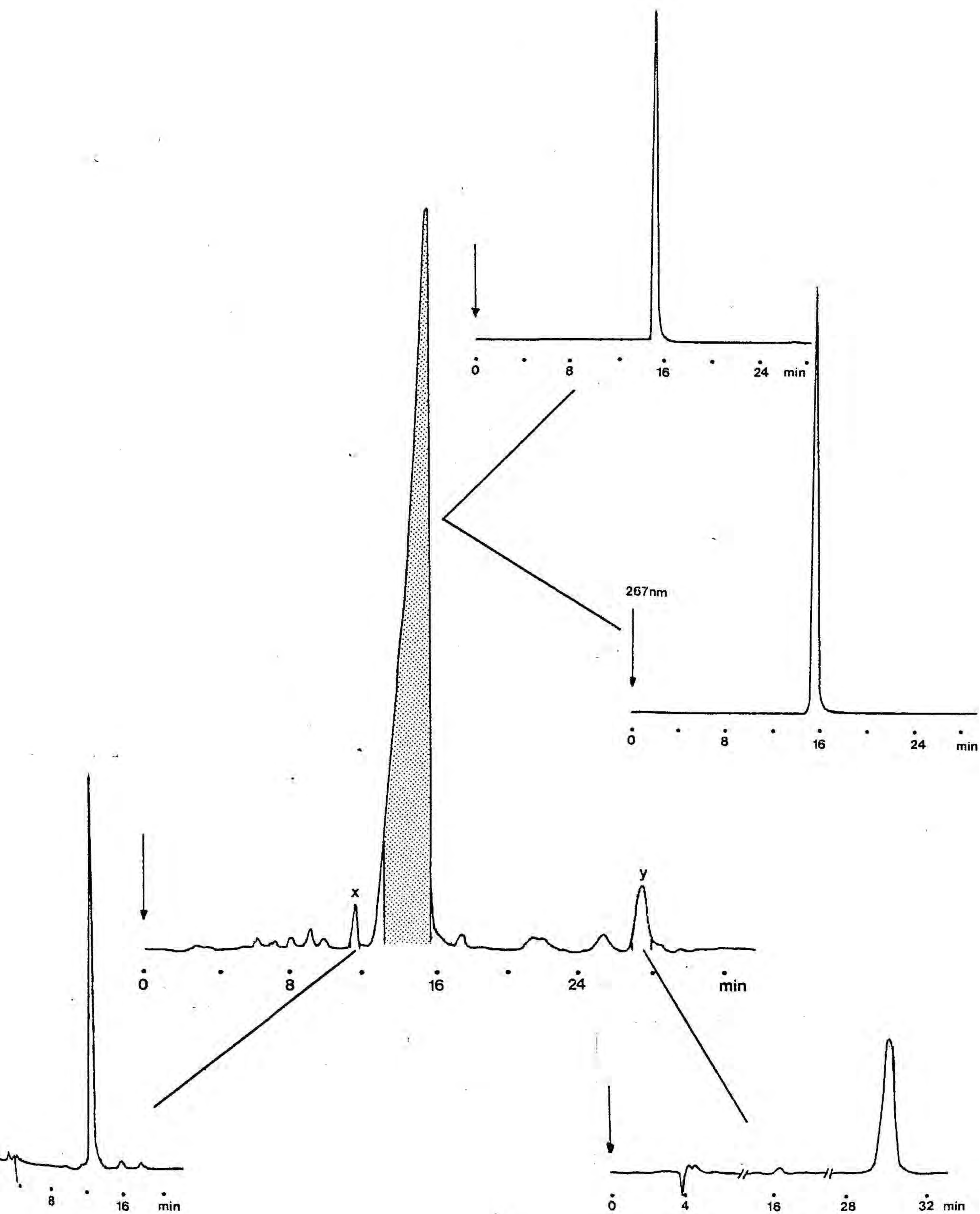
ii) La segona etapa de la purificació ha sigut la cromatografia semi-preparativa d'alta eficàcia en fase reversa del precipitat obtingut a l'etapa anterior. Fraccions de 2.2mg (3.12µmol) de pèptid dissolt en DMA (100µL) s'han carregat a una columna Ultrasphere-ODS i s'han eluit amb DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 24.5/45.5/30/0.1 a 3.5mL/min. El perfil cromatogràfic s'ha enregistrat mesurant l'absorbància de l'eluit a 304nm (en comptes de al màxim de 301nm) a causa de l'elevada quantitat de producte injectada.

A la figura de la pàgina següent es mostra el perfil cromatogràfic d'una de les injeccions efectuades, juntament amb els cromatogrames d'HPLC analítica, en les mateixes condicions, de les diferents fraccions recullides. Els cromatogrames d'HPLC analítica s'han enregistrat a 301nm, excepte un dels dos que es presenten del pèptid purificat, pel qual s'ha efectuat la detecció a 267nm.

A continuació s'indiquen les anàlisis d'aminoàcids del pèptid purificat i de les altres fraccions col·lectades, x i y (vegeu cromatograma)

	<u>Pèptid pur</u>	<u>Fracció x</u>	<u>Fracció y</u>
Ser	0.88	0.63	0.65
Glu	1.01	0.90	1.09
Gly	1.11	1.47	1.25

Després d'aquesta etapa s'han obtingut 64.1µmol de producte purificat. El rendiment global de la purificació, en base a les anàlisis d'aminoàcids, ha sigut del 75%.



Cromatograma d'HPLC semi-preparativa del pèptid 7-3 (precipitat) i cromatogrames d'HPLC analítica de les fraccions col·lectades.

El producte purificat presenta, com ja hem vist, un sol pic per HPLC analítica i una anàlisi d'aminoàcids correcta.

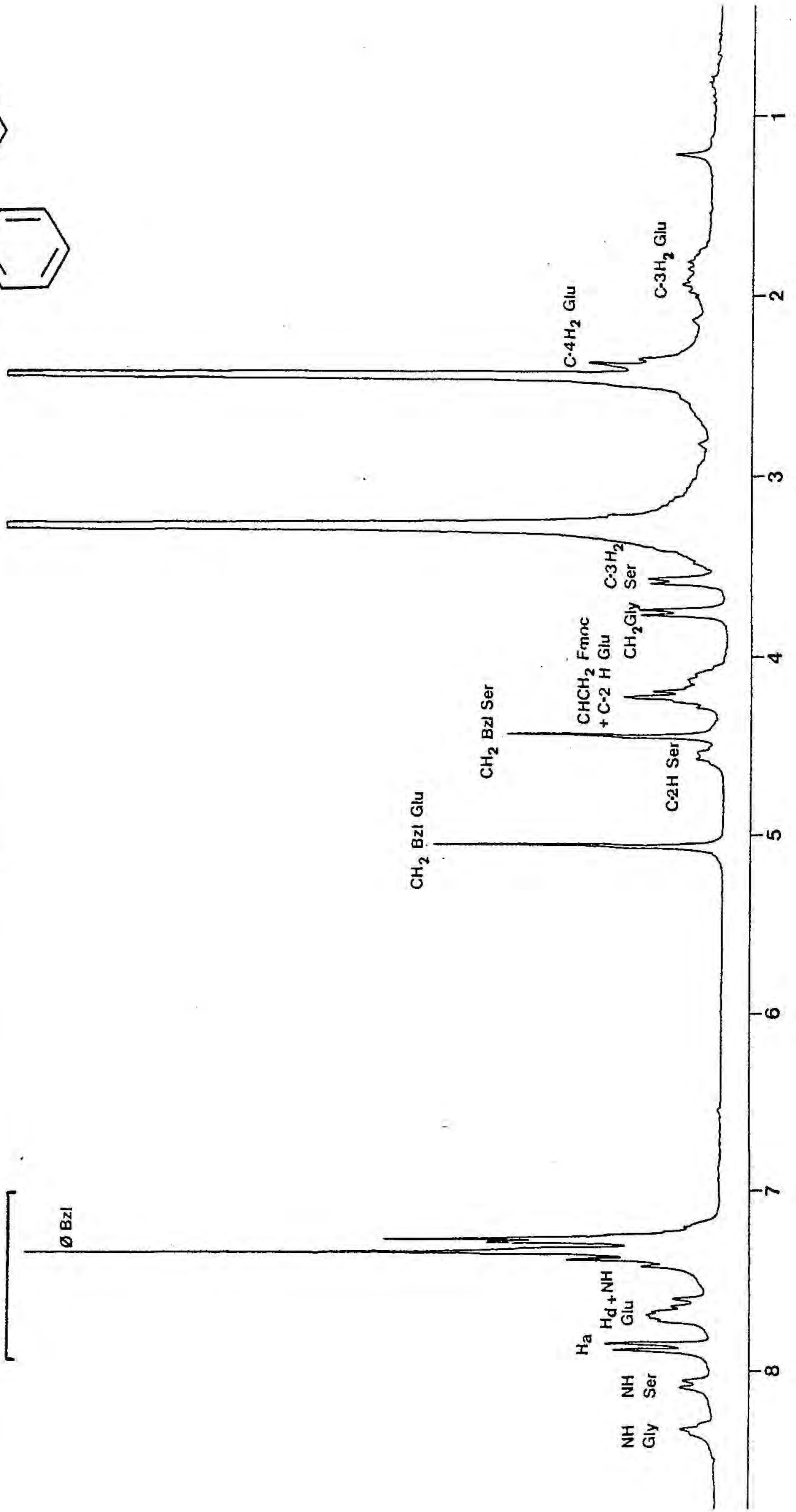
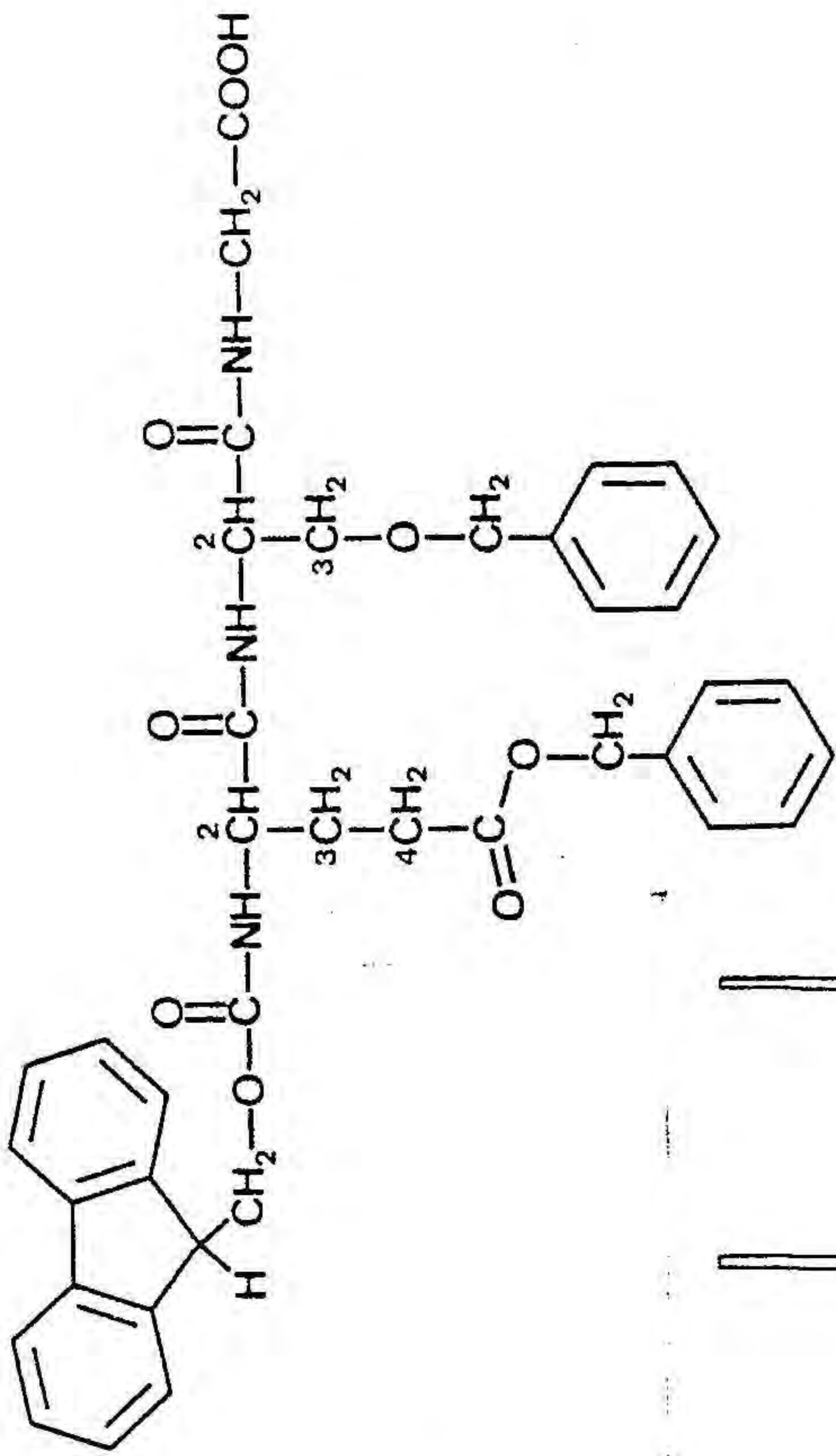
El pèptid s'ha analitzat també per cromatografia en capa fina sobre cromatoplaques de gel de sílice, donant una sola taca amb $R_f=0.60$, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 73/25/2.

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

$$[\alpha]_D = 2.6 \pm 0.3 \text{ (c } 0.89, \text{ DMA)}$$

S'ha enregistrat l'espectre de ^1H -RMN del pèptid 7 a 200MHz (DMSO-d_6), fent les assignacions per comparació amb els espectres de cada un dels Fmoc-aminoàcids enregistrats en les mateixes condicions i amb les dades descrites a la literatura (193), i mitjançant experiments de doble ressonància. Vegeu l'espectre a la pàgina següent.

<u>Senyal</u>	<u>Assignació</u>
8.27ppm, t	NH Gly
8.10ppm, d	NH Ser
7-8ppm, m	8H aromàtics Fmoc+NH Glu+5H fenils 7.8-7.9 Ha fluorè 7.6-7.7 Hd fluorè+NH Glu 7.4 Hb fluorè 7.2-7.3 Hc fluorè (vegeu espectre)
7.35ppm, s	H aromàtics dels grups benzil
5.08ppm, s	CH_2 benzil Glu
4.58ppm, m	C-2 H Ser
4.46ppm, s	CH_2 benzil Ser
4.25ppm, m	CHCH_2 Fmoc+C-2 H Glu
3.72ppm, d	CH_2 Gly
3.59ppm, d	C-3 H_2 Ser
~2.3ppm, m	C-4 H_2 Glu
~1.9ppm, m	C-3 H_2 Glu



3.3. Síntesi del segment peptídic protegit Fmoc-Tyr(cHex)-Cys(Acm)-Gln-Trp- -Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH 8.

3.3.1. Síntesi del pèptid.

Per a dur a terme aquesta síntesi s'ha partit del lot de 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè 1_{A-II}, sintetitzat a partir de clorometilpoliestirè pel mètode de Wang en un sol pas.

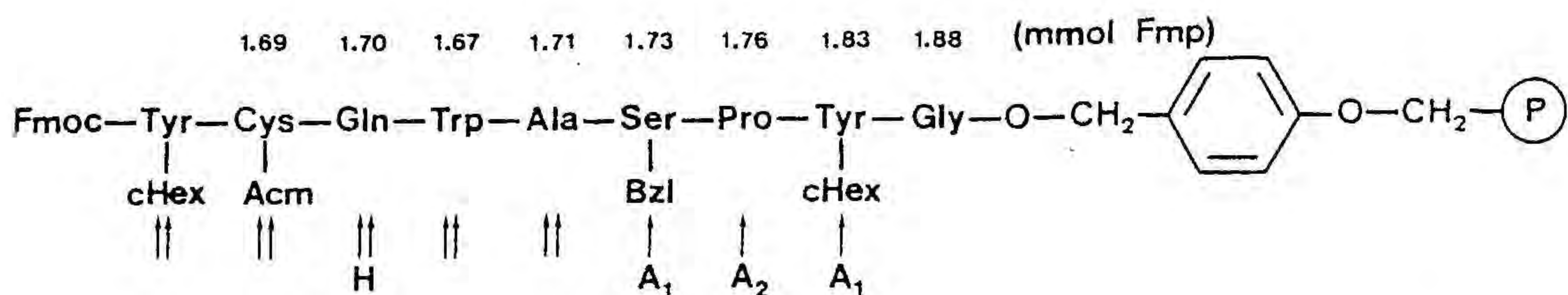
Vist el mal rendiment d'ancorament de l'aminoàcid C-terminal que hem tingut a la síntesi del segment peptídic 7, hem decidit emprar un altre mètode d'esterificació encara que pugui comportar una mica més de formació de diglicina. Així, la Fmoc-glicina s'ha ancorat a la resina 1_{A-II} com a anhídrid simètric en 2.5 vegades d'excés respecte als grups hidroximetil polimèrics i en presència de 0.25eq de DMAP, durant 1h a temperatura ambient.

La desprotecció d'una alíquota i quantificació de la Fmp formada mostren que hem assolit un grau de substitució de 0.33mmol/g Fmoc-Gly-resina, la qual cosa significa un rendiment d'acoblament de l'ordre del 63%.

La quantitat de diglicina formada durant l'esterificació, determinada a partir del tractament d'una alíquota de Fmoc-glicil-resina amb TFA i desprotecció amb piperidina del filtrat, s'ha avaluat en un 0.72%. Invertint l'ordre dels tractaments (primer piperidina i després acidòlisi amb TFA), trobem un 0.42% de diglicina. En aquest cas s'ha determinat també el contingut en diglicina de la Fmoc-glicina emprada, que era de l'ordre del 0.5%. Suposant que la cinètica d'acoblament de Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Gly-Gly-OH a la resina sigui la mateixa, la quantitat de diglicina formada durant l'esterificació seria només de l'ordre del 0.2%.

Els grups hidroxil de la resina que no han sigut esterificats s'han bloquejat per tractament amb clorur de benzoil i piridina, de la mateixa manera que a la síntesi del pèptid 7.

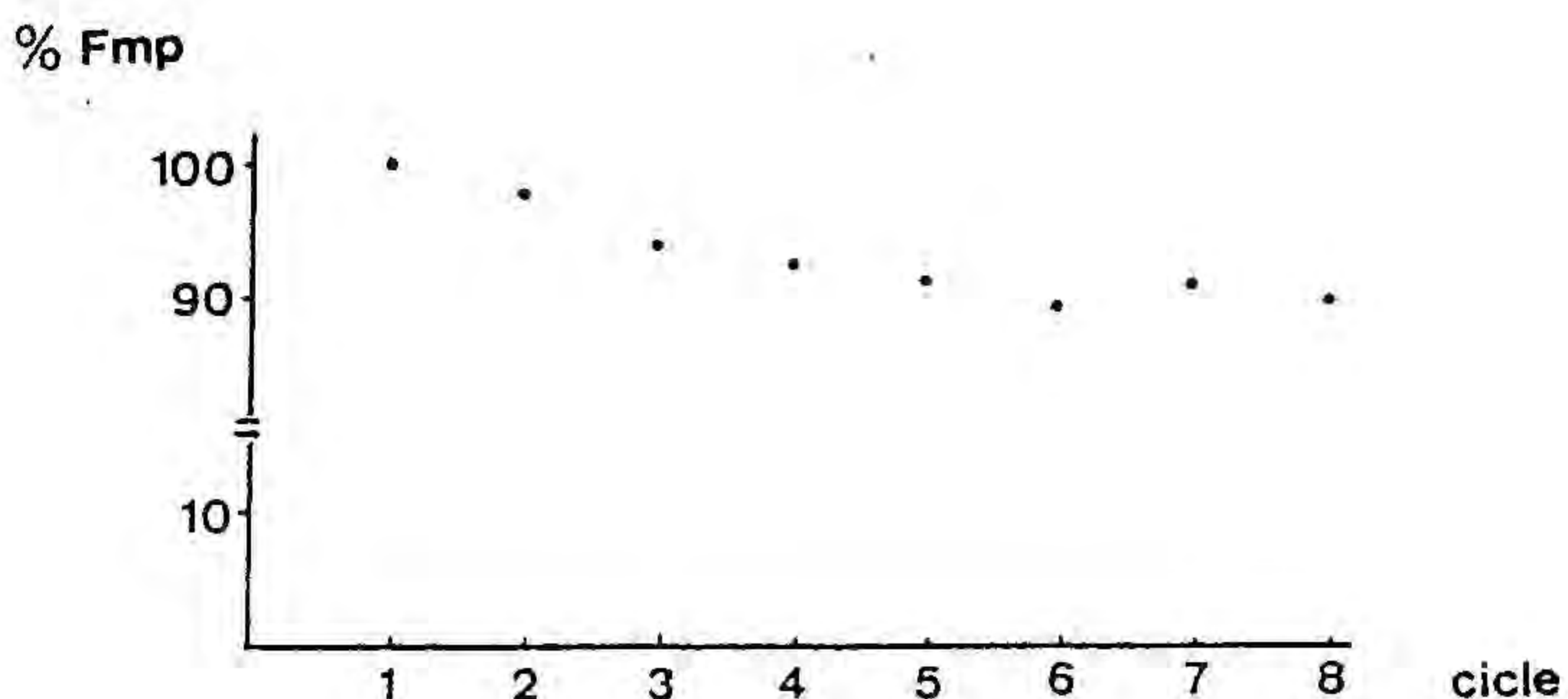
El progrés de la síntesi, a partir de Fmoc-glicil-resina (5.80g); es resumeix al següent esquema, on cada † indica un acoblament, A acetilació i H acoblament amb DCC i HOBT. Els números al damunt de cada residu corresponen als mmol de Fmp trobats a cada etapa de desprotecció.



L'assaig d'amines lliures sobre el polímer després del primer acoblament dels primers aminoàcids (tirosina, prolina i serina) ha sigut molt lleugerament positiu, de manera que en aquest estadi de la síntesi hem decidit acetilar, en comptes de repetir acoblament, abans de passar al següent cicle d'incorporació d'un aminoàcid, perquè a l'hora de purificar no ha d'ésser difícil separar acetil-pèptids curts del Fmoc-nonapèptid. En els següents residus, però, hem preferit repetir acoblament. A₁ indica que l'acetilació s'ha efectuat amb anhídrid acètic i etildiisopropilamina.

La desprotecció del segon aminoàcid i acoblament del tercer s'han dut a terme tal com hem indicat a la introducció del capítol (3.1.2) en condicions que intenten minimitzar la formació de dicetopiperazines. Abans de començar el cicle d'incorporació del quart aminoàcid, s'han bloquejat els possibles grups hidroxil alliberats sobre la resina per tractament amb anhídrid acètic i piridina (A).

Els mmol de Fmp quantificats a cada etapa de desprotecció no posen de manifest cap pèrdua important de grau de substitució, essent la més gran la que ha tingut lloc en passar de di- a tripèptid, fet que pot ésser degut a la formació de dicetopiperazina però en molt petita extensió (4%). El progrés de la síntesi es pot també resumir a la següent gràfica. La representació del percentatge de Fmp formada a cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid (considerant 100% el valor inicial) ens mostra que, tret de possibles pèptids a deleció formats al llarg de la síntesi, el rendiment total ha sigut del 90%, la qual cosa suposa un rendiment mig d'incorporació de cada aminoàcid del 98.8%.

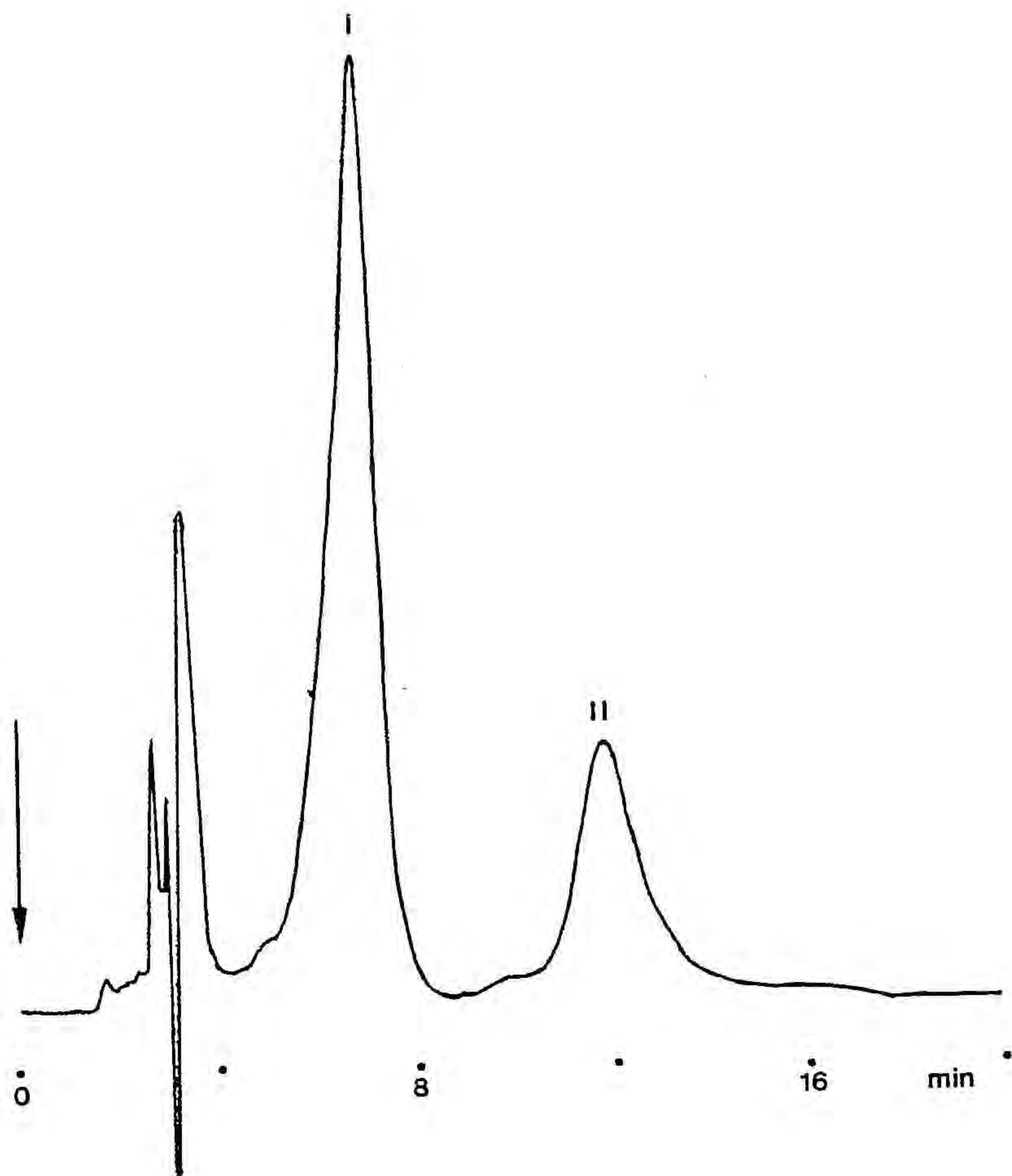


La desprotecció d'una alíquota al final de la síntesi ha donat un grau de substitució de 0.24mmol/g Fmoc-pèptid-resina, valor concordant amb l'esperat (0.23 mmol/g) a partir del grau de substitució inicial i el guany de pes degut al pèptid ancorat al polímer.

La hidròlisi amb HCl 12N/àcid propiònic 1/1 d'una alíquota de peptidil-resina ha donat un valor del grau de substitució de 0.20mmol/g Fmoc-pèptid-resina, i una composició en aminoàcids: Ser 0.45, Glu 1.00, Pro 1.19 (mal integrada), Gly 0.98, Ala 1.02, Cys 0.71 i Tyr 2.41. Una vegada més, el valor baix de la serina és normal després de les 48h d'hidròlisi; la prolina dóna un valor molt alt, poc fiable a la vista del cromatograma, on s'observa la presència d'alguna impuresa solapada amb el pic de la prolina. Els pèptids que contenen cisteïna protegida amb el grup Acm normalment donen contingut baix en cisteïna, de manera que 0.71 és un valor que entra dins de l'esperat. Pel que fa a la tirosina, el valor és sorprenentment alt. Tot i que podríem pensar que després del darrer acoblament ha quedat aminoàcid no covalentment lligat al polímer, cap de les hidròlisis dels crús peptídics obtinguts després d'acidòlisi amb TFA ha donat un valor tan alt en tirosina, sino que, com veurem, els valors de tirosina que es troben després d'hidròlisi amb HCl 6N durant 20h són en general molt baixos. Evidentment, en la hidròlisi àcida, la glutamina es transforma en àcid glutàmic.

Igual que hem fet pel pèptid 7, l'acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina no s'ha efectuat sobre la totalitat del producte sino sobre lots petits. En aquest cas, s'han dut a terme tractaments amb 55% de TFA en diclorometà en presència de 1% d'anisol i 2% de β -mercaptoetanol.

El primer lot de Fmoc-pèptid-resina tractat amb TFA ha presentat el mateix problema que el pèptid 7 pel que fa a la formació d'ester, que en aquell moment encara ignoràvem. Així, abans d'eliminar totalment el TFA, s'han afegit al crú peptídic els filtrats procedents de rentar la resina amb metanol. Aquest crú peptídic s'ha analitzat per cromatografia en capa fina (cromatoplaques de gel de sílice, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 73/25/2), observant-se la presència de dues taques importants i altres més petites. L'anàlisi per HPLC (Rad-Pak C_{18} , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20, 1.5mL/min) també ha posat de manifest dos productes majoritaris:



Una vegada coneguda la composició del crú peptídic 7-1, i pensant que el segon pic podria ésser l'ester metílic del pèptid 8, s'ha efectuat l'acidòlisi d'un segon lot de Fmoc-nonapèptid-resina, evitant el contacte TFA-metanol. L'anàlisi d'aquest crú peptídic per HPLC (en les mateixes condicions que hem emprat abans) permet d'observar la presència d'un sol pic majoritari amb el mateix temps de retenció que el producte I del crú peptídic anterior, resultat que concorda amb l'anàlisi per cromatografia en capa fina (revelat: reactiu de l'hipoclorit i reactiu d'Ehrlich).

El rendiment de l'acidòlisi, determinat per comparació de la quantitat de pèptid desencorada del polímer (mesurant l'absorció del pèptid a 301nm) amb el pèptid ancorat a la matriu polimèrica (determinat a partir dels mmol de Fmp alliberats a la darrera etapa de desprotecció de la síntesi) ha sigut del 78%. El mateix càlcul, basat en les dades que proporciona l'anàlisi d'aminoàcids de la peptidil-resina i del pèptid que passa a la dissolució, dóna un rendiment del 72%. El tractament amb piperidina d'una

alíquota de resina després de l'acidòlisi amb TFA ha mostrat que sobre la resina queden encara un 20% de grups Fmoc, la qual cosa implica un rendiment del 80%.

3.3.2. Purificació i caracterització del segment peptídic protegit 8.

Els assaigs per trobar el millor mètode per a purificar el segment peptídic protegit 8 s'han dut a terme amb lots de crú peptídic que no contenen com a impuresa l'ester metílic del pèptid. Abans de passar a descriure'ls detalladament, fem un resum dels assaigs efectuats amb els diferents lots de crú peptídic.

<u>Crú peptídic*</u>	<u>Assaig efectuat</u>
8-2	<ul style="list-style-type: none"> - Filtració molecular sobre Sephadex LH-60 - Filtració molecular sobre Sephadex LH-20 - Extracció amb dissolvents i precipitació
8-3	<ul style="list-style-type: none"> [HPLC semi-preparativa. Control de l'estabilitat del producte. Capacitat de càrrega.
8-4	<ul style="list-style-type: none"> [Purificació definitiva: <ul style="list-style-type: none"> - Extracció amb dissolvents i precipitació - HPLC semi-preparativa

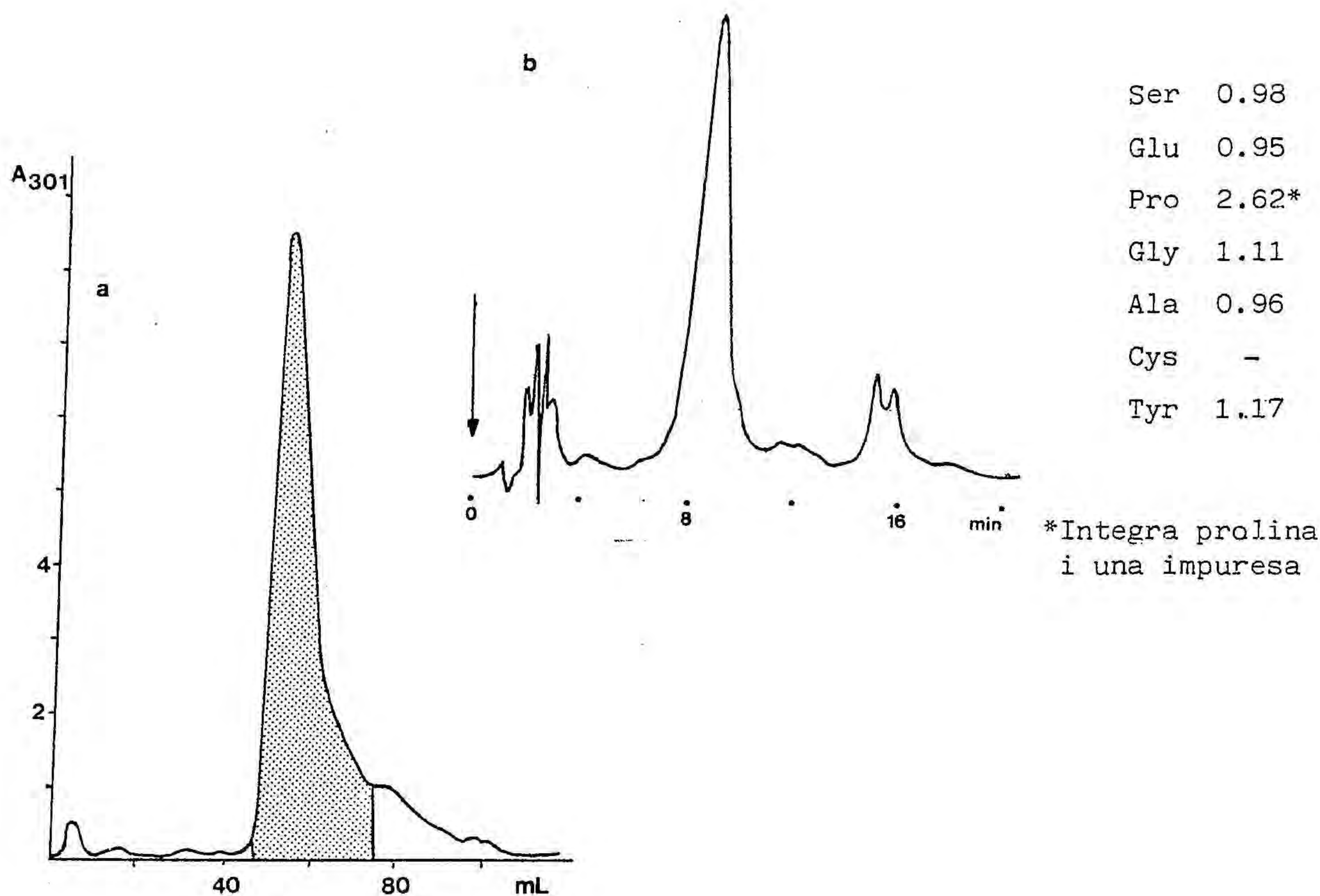
*La nomenclatura 8-2, 8-3 i 8-4 vol indicar que els crús peptídics provenen de l'acidòlisi de diferents lots de Fmoc-nona-peptidil-resina (segon, tercer o quart).

3.3.2.A. Primers assaigs de purificació del pèptid 8.

El crú peptídic 8-2 ens ha servit per buscar les millors condicions per la primera etapa de la purificació del pèptid. Així, ens hem proposat comparar els resultats que s'obtenen per filtració molecular amb els que proporciona l'extracció amb dissolvents i precipitació. Pel que fa a la filtració molecular, hem volgut assajar i comparar la filtració sobre Sephadex LH-20 i sobre Sephadex LH-60. El Sephadex LH-20, en principi adequat per la purificació de pèptids protegits amb pes molecular fins a 2500-3000, prové de la hidroxipropilació de Sephadex G-25, emprat per purificar pèptids lliures de pes molecular inferior a 5000; el Sephadex LH-60 es prepara a partir de Sephadex G-50, emprat per la filtració molecular de pèptids no protegits de pes molecular inferior a 30000 (194). Tot això, en principi, pot fer pensar que el Sephadex LH-60 no ha de ser útil per la purificació de pèptids de talla com la del pèptid 8 (pes molecular 1620), però d'una banda s'ha descrit l'ús de Sephadex G-50 per separar pèptids protegits de pesos moleculars entre 1500 i 5600, eluint amb hexametilfosforamida i un 5% d'aigua (195), i d'altra banda el mateix grup de treball ha descrit l'aplicació de Sephadex LH-60 a la purificació de pèptids protegits amb pesos moleculars entre 1800 i 5900 (196). Amb aquests precedents, hem decidit assajar els dos tipus de Sephadex, LH-20 i LH-60, compatibles amb l'ús de dissolvents orgànics.

Filtració molecular sobre Sephadex LH-60.

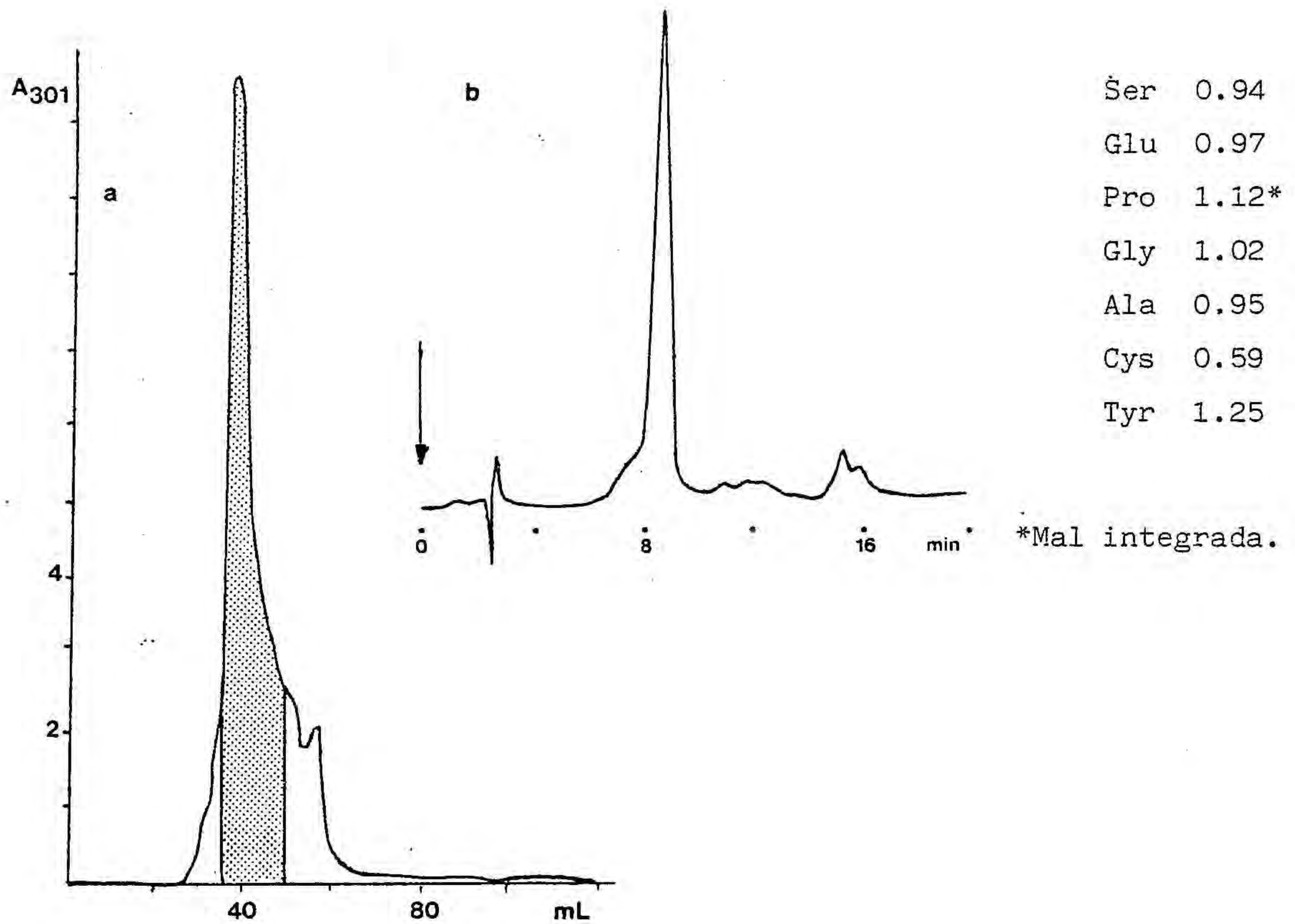
1/3 del crú peptídic 8-2 s'ha cromatografiat a través de Sephadex LH-60, eluint amb 10% de DMA en metanol a 6mL/h. El producte col·lectat amb un rendiment de purificació del 70% (corresponent a la zona senyalada del cromatograma), continua essent pràcticament tan impur com el crú peptídic tant per HPLC analítica (μ -Bondapak C₁₈; eluent MeOH/H₂O, amb gradient de 78% a 88% de metanol en 7min; 1.5mL/min) com per anàlisi d'aminoàcids. A continuació s'indiquen el perfil de la cromatografia de filtració molecular, l'HPLC analítica del pèptid col·lectat i la seva anàlisi d'aminoàcids:



a: filtració molecular sobre Sephadex LH-60. b: HPLC analítica.

Filtració molecular sobre Sephadex LH-20.

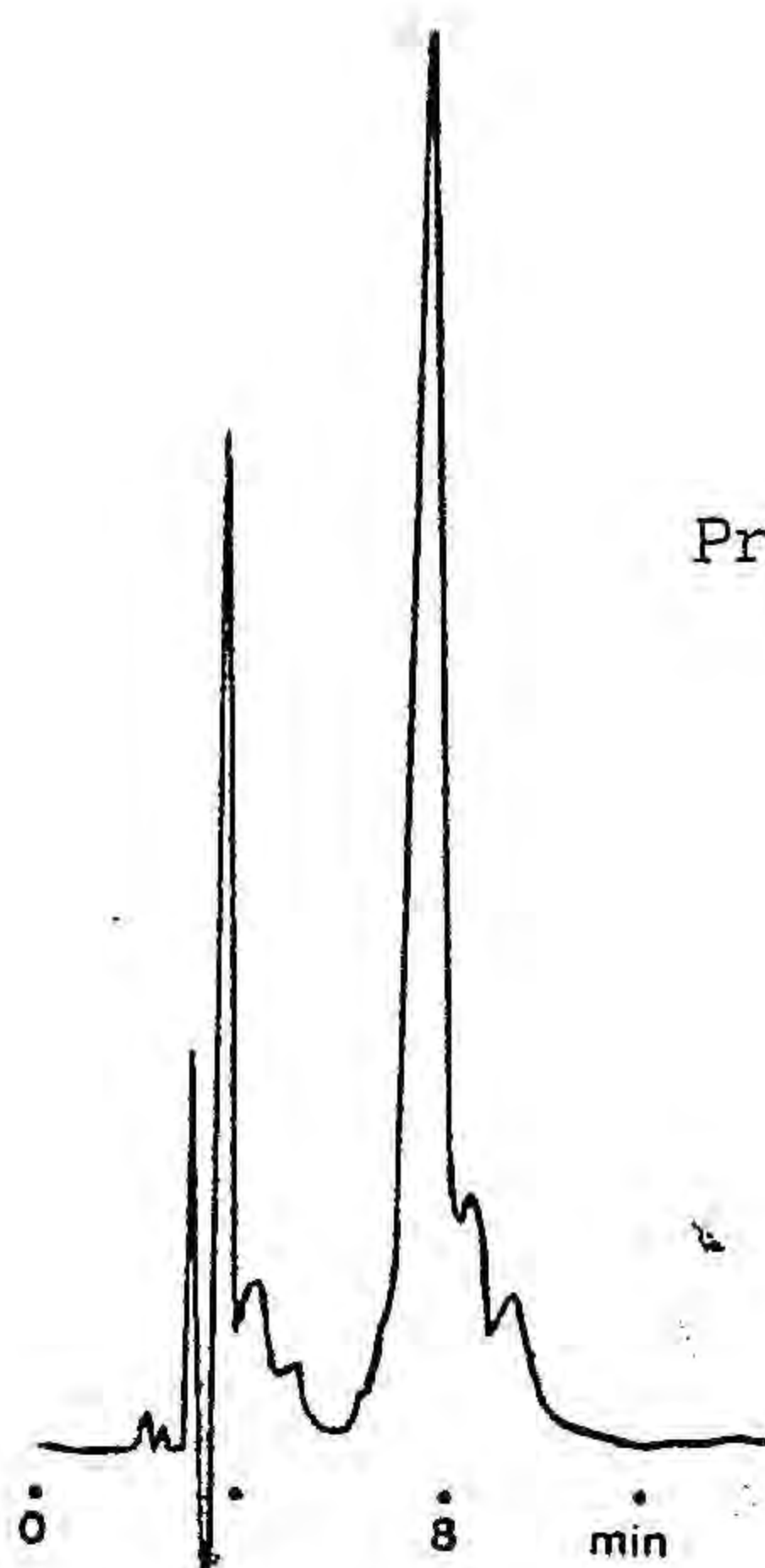
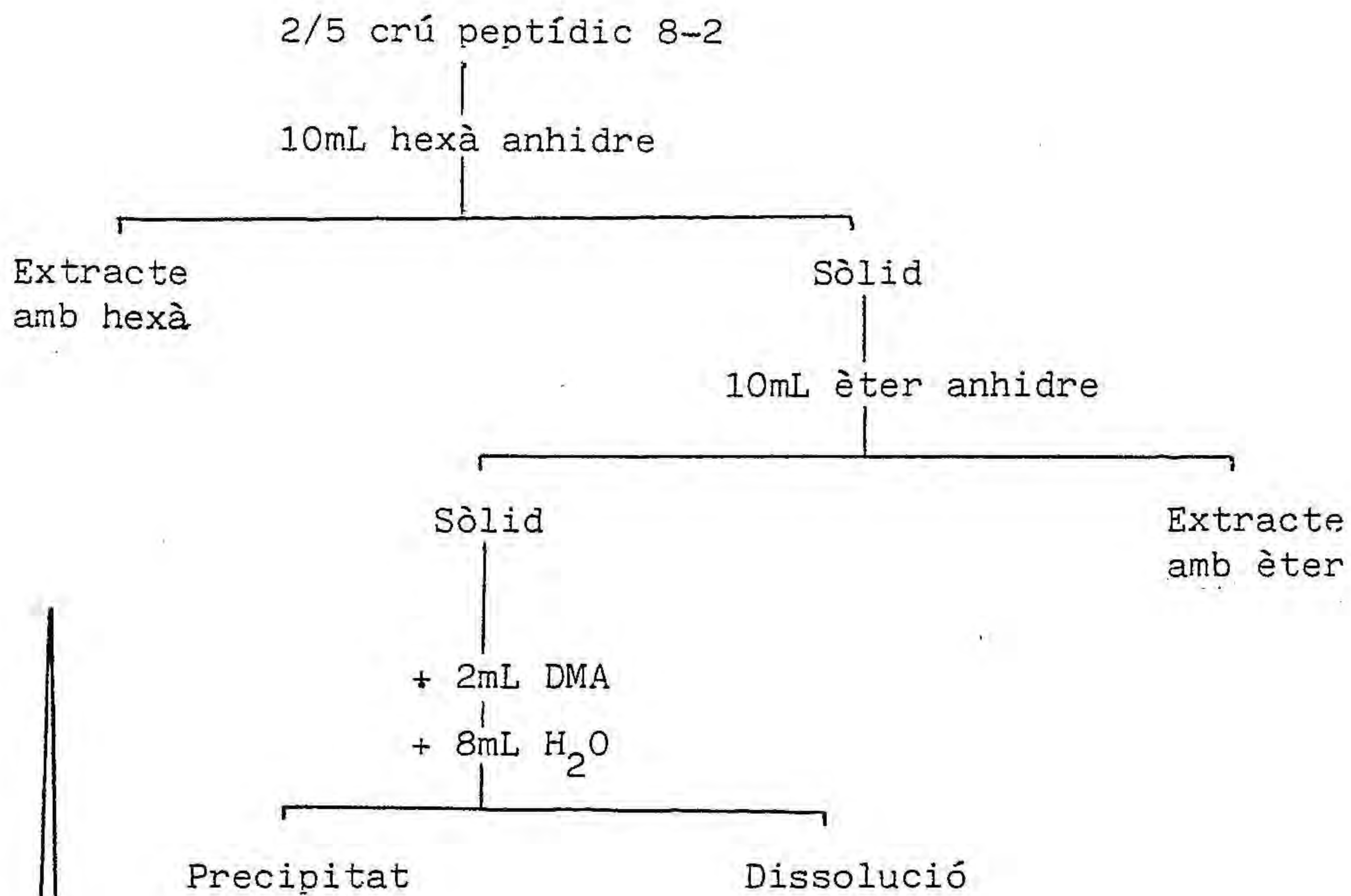
1/3 del crú peptídic 8-2 s'ha cromatografiat a través de Sephadex LH-20, eluint amb 10% de DMA en metanol. El producte procedent d'ajuntar les fraccions que contenen majoritàriament el pèptid (81% de rendiment de purificació) tampoc és gaire més pur que el crú peptídic 8-2, tal com es pot observar al cromatograma d'HPLC analítica (μ -Bondapak C_{18} ; eluent MeOH/H₂O, amb gradient del 78% al 88% de metanol en 7min; 1.5mL/min) i al resultat de l'anàlisi d'aminoàcids que es mostren a continuació juntament amb el perfil cromatogràfic de la filtració molecular.



a: Filtració molecular sobre Sephadex LH-20. b: HPLC analítica.

Extracció amb dissolvents i precipitació.

La resta del crú peptídic 8-2 s'ha sotmés, en primer lloc, a un tractament amb hexà i un altre amb èter anhidre. El sòlid resultant s'ha solubilitzat en DMA, i s'ha precipitat per addició d'aigua (quatre vegades més en volum). El pèptid precipitat constitueix un 73% del producte inicial. Esquemàticament, el procés s'indica a la pàgina següent:



HPLC analítica del precipitat.
 μ -Bondapak C₁₈; DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic
 30/52.5/17.5/0.5; 1mL/min.

La composició en aminoàcids del precipitat obtingut és la següent: Ser 1.01, Glu 1.02, Pro 0.56, Gly 1.05, Ala 0.92, Cys 0.58 i Tyr 1.36.

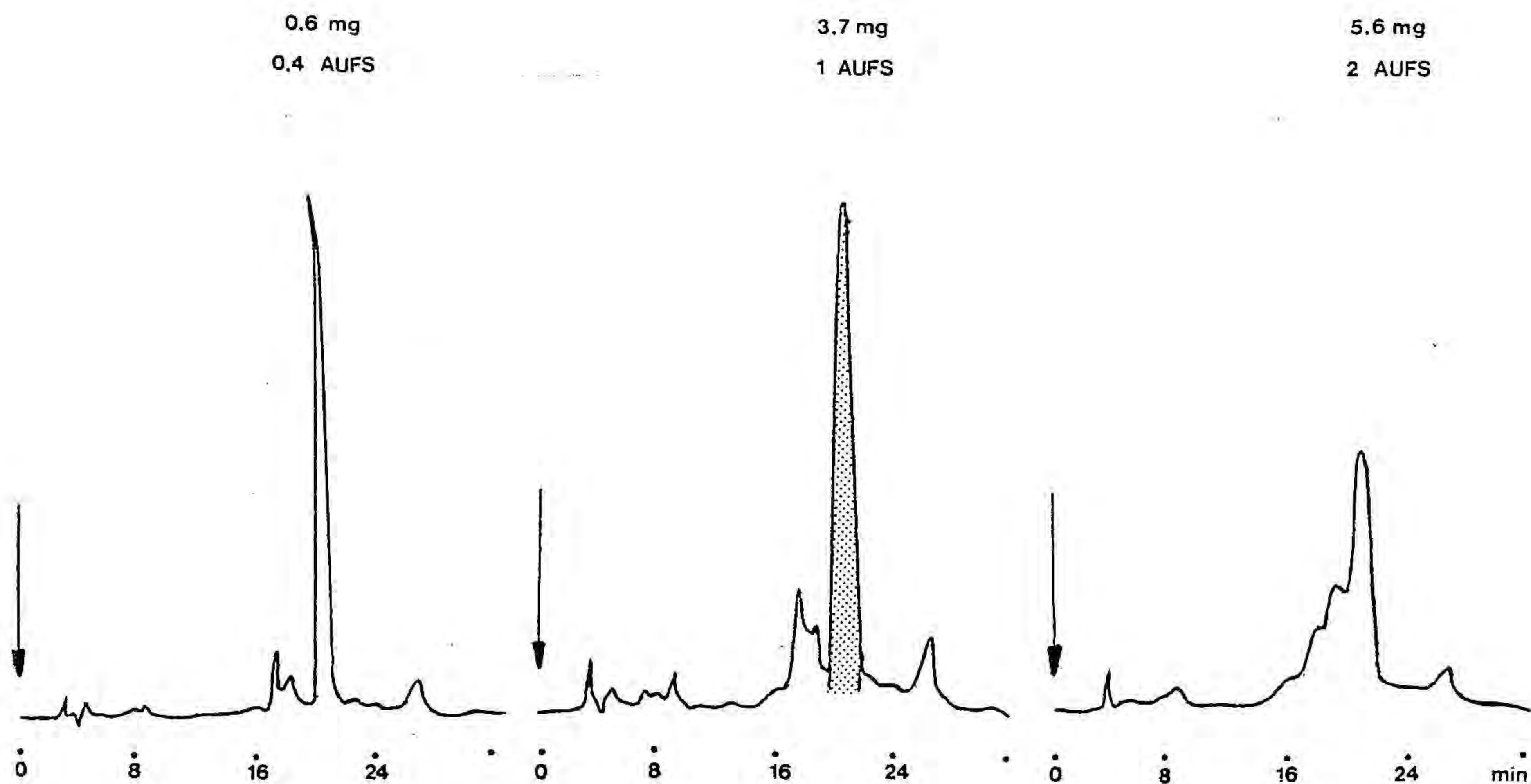
Com veurem més endavant (3.3.2.C), les fraccions diferents del precipitat final són quantitativament poc importants i no tenen una composició en aminoàcids definida.

Comparant els tres mètodes assajats, podem veure que el pitjor mètode de purificació és la filtració molecular sobre Sephadex LH-60. Segurament aquest pèptid és massa petit per poder-ne separar impureses de talla diferent amb aquest gel. L'elecció del millor mètode per la primera etapa de la purificació definitiva no és evident. El rendiment de la purificació per extracció amb dissolvents i precipitació és inferior al de la cromatografia sobre Sephadex LH-20, però tant per anàlisi d'aminoàcids com per HPLC analítica sembla que el producte que s'obté després d'extracció amb dissolvents i precipitació és més pur, la qual cosa el fa el mètode d'elecció, tenint en compte a més a més la senzillesa d'operacions que comporta.

3.3.2.B. Recerca de condicions de purificació per HPLC semi-preparativa en fase reversa.

Un cop triat el mètode per començar la purificació definitiva del pèptid 8, hem intentat posar a punt condicions de purificació per HPLC semi-preparativa en fase reversa. El primer tanteig s'ha efectuat sobre una columna μ -Bondapak C₁₈, amb el precipitat obtingut a la purificació de part del crú peptídic 8-2. Igual que pel pèptid 7, la idea ha sigut eluir el producte amb aigua-acetonitril en presència d'un 0.5% d'àcid propiònic i d'un 30% de DMF per solubilitzar el pèptid en carregar-ne una certa quantitat (el producte és insoluble en acetonitril-aigua). Les millors condicions isocràtiques d'elució han semblat ser DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.5.

El següent pas ha sigut un intent de purificació del pèptid emprant una columna semi-preparativa Ultrasphere-ODS. S'han injectat fraccions de 3.7mg del precipitat obtingut del crú peptídic 8-2, que s'han eluit amb DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.5 a 3mL/min. No ha sigut possible injectar més producte, ja que en carregar 5.6mg en comptes de 3.7 s'ha produït deformació total del perfil cromatogràfic, tal com es pot observar a continuació:



El producte procedent d'aquesta purificació ha presentat una anàlisi d'aminoàcids correcta (Ser 0.91, Glu 0.96, Pro 1.10, Gly 1.01, Ala 0.93, Cys 0.49 i Tyr 1.29), però posteriorment l'anàlisi per HPLC ha posat de manifest, en comptes del pic únic o majoritari esperat, una mescla de productes en la qual el pèptid desitjat era minoritari.

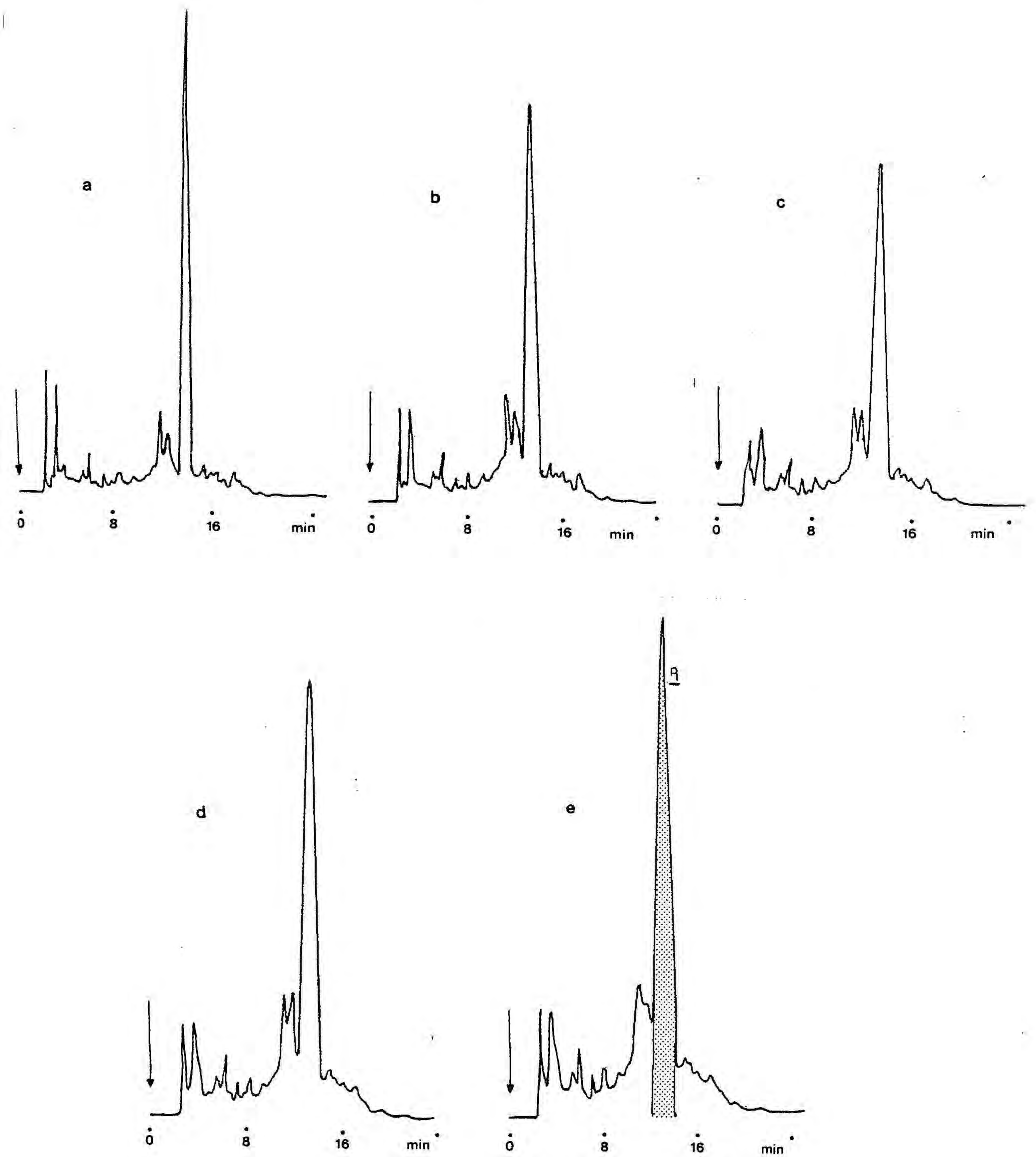
Davant de la possibilitat de que el pèptid es degradi en presència de l'eluent emprat o en el procés final d'evaporació, ha sigut necessari comprovar la seva estabilitat en aquestes condicions. Per aixó, una mostra del crú peptídic 8-3 s'ha posat en contacte amb la mescla DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.5 durant un temps determinat, s'ha evaporat a sequedat i s'ha analitzat per HPLC (Ultrasphere-ODS, DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.5, 3mL/min). Aquest procés s'ha repetit moltes vegades, posant-se de manifest que el producte és totalment estable a l'eluent i a les condicions d'evaporació d'aquest.

Capacitat de càrrega del sistema.

L'altre problema que s'ha posat de manifest a l'intent de purificació que acabem de descriure és la limitada capacitat de càrrega del sistema. Part d'aquesta limitació rau en el fet de que estem intentant purificar una mostra que conté majoritàriament el producte d'estructura correcta, però que conté també impureses que s'elueixen molt a prop del pèptid desitjat. En augmentar la quantitat de mostra que es carrega al sistema els pics s'eixamplen, de manera que el pèptid s'ajunta amb les impureses i es perd resolució. Tanmateix, aixó no explica la deformació del cromatograma que hem observat en passar d'injectar 3.7 a 5.6mg, i que pot ésser deguda a precipitació del producte a la columna per efecte de sobrecàrrega.

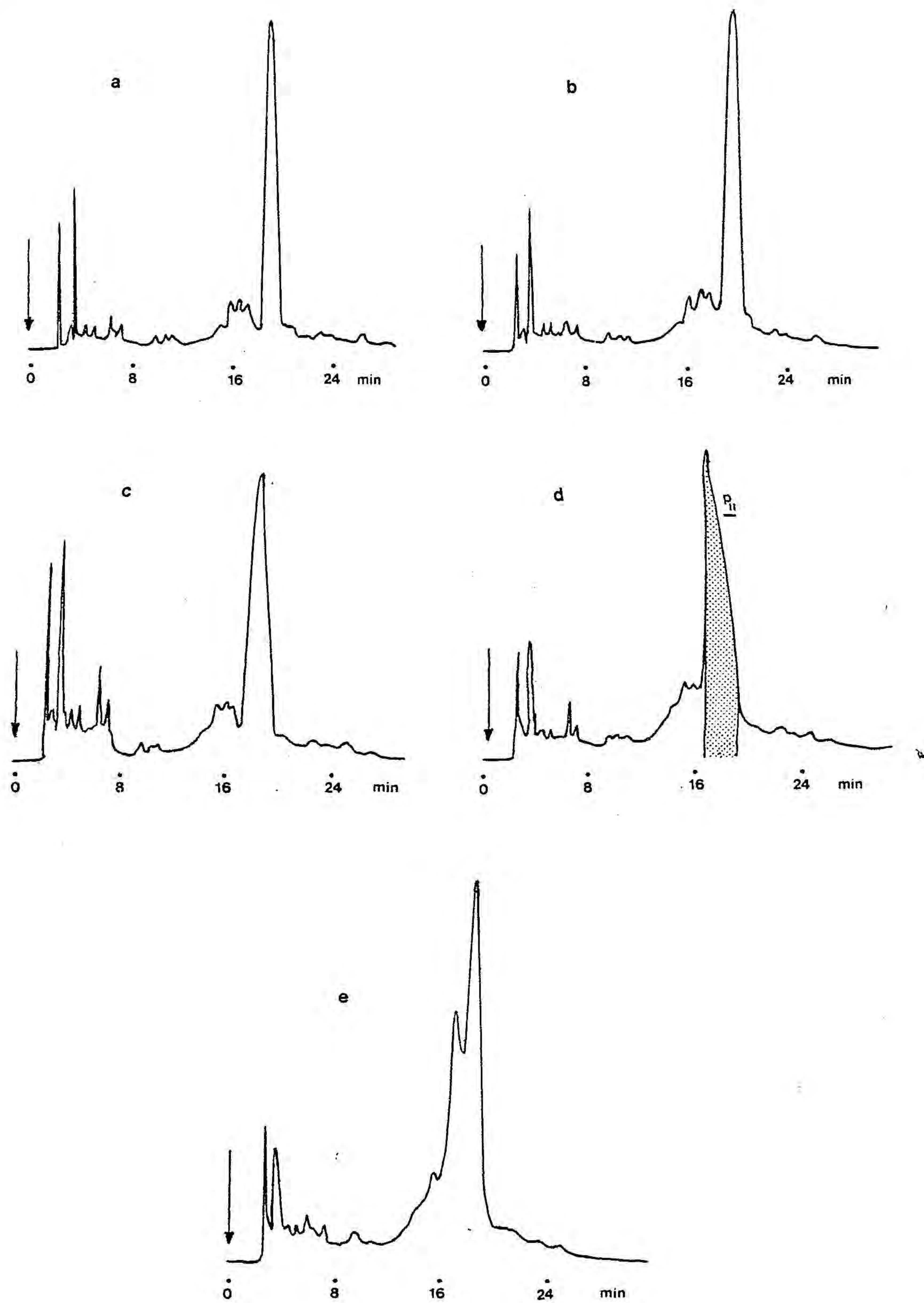
En qualsevol cas, ens hem plantejat la possibilitat d'assajar un nou eluent que permeti de carregar una mica més de producte a cada injecció. Després d'alguns tanteigs, l'eluent triat ha sigut la mescla DMF/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{àcid propiònic}$ 65/18/17/0.1, que bàsicament canvia respecte a l'anterior la proporció DMF/acetonitril. Per tal de comparar-lo amb el ja emprat a l'HPLC semi-preparativa, s'han injectat quantitats progressivament més grans de pèptid (8-3) en els dos sistemes, col·lectant cada vegada la fracció corresponent al producte desitjat. Posteriorment, les fraccions col·lectades s'han analitzat per HPLC.

A continuació es mostren els cromatogrames obtinguts en els assaigs de "scale-up" amb cada un dels dos eluents, sobre la mateixa columna Ultrasphere-ODS i a 4mL/min.



Eluent: DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.1. a:0.37mg, 0.4AUFS;
 b:1.11mg, 1AUFS; c:2.22mg, 2AUFS; d:2.96mg, 2AUFS; e:3.7mg, 2AUFS.

11

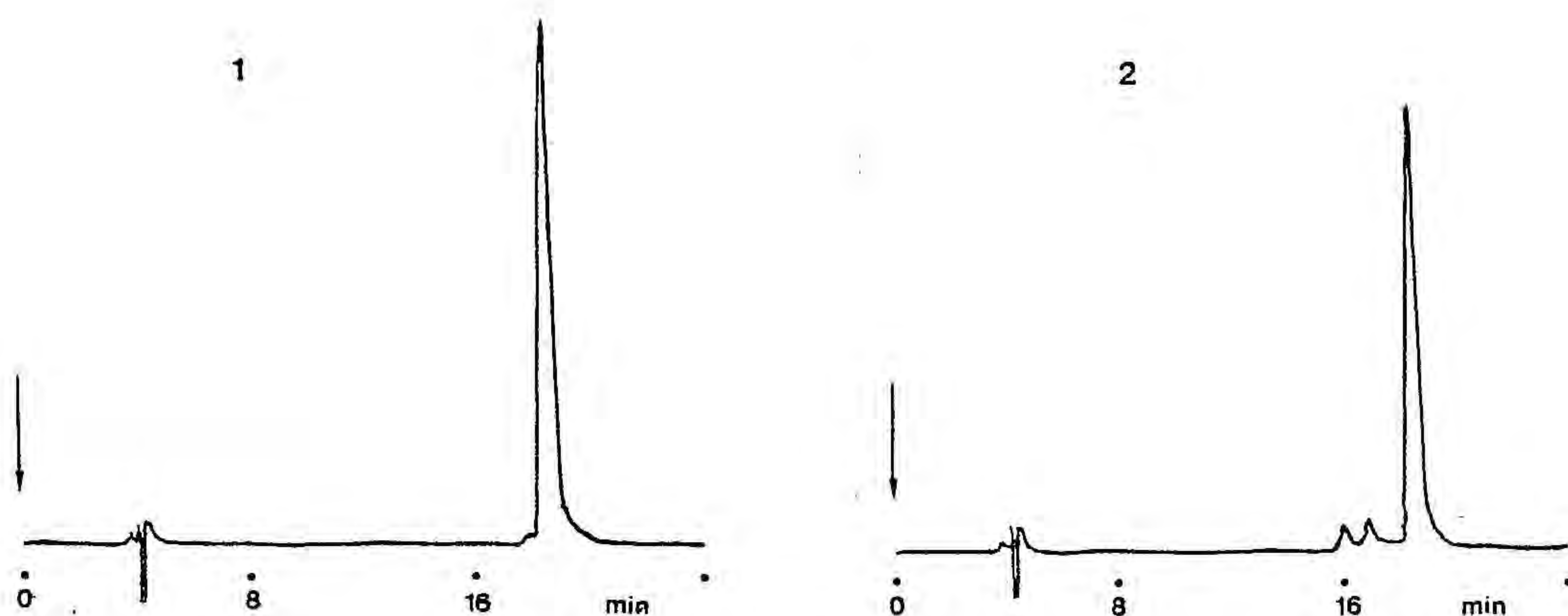


Eluent: DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 65/18/17/0.1. a:0.37mg, 0.4AUFS;
b:1.11mg, 1AUFS; c:2.22mg, 2AUFS; d:2.96mg, 2AUFS; e:3.7mg, 2AUFS.

El primer que es pot observar són les diferències en els temps de retenció i els perfils cromatogràfics en un o altre sistema, essent més gran el temps de retenció del pèptid en el sistema amb més DMF, II (18.5min), que en el sistema amb menys DMF, I (13.5min). Tot això vol dir que la DMF i l'acetonitril tenen propietats diferents pel que fa al poder d'elució i selectivitat, essent la DMF un modificador orgànic amb menys poder d'elució que l'acetonitril.

Podem observar també que a igualtat de càrrega el sistema més ric en DMF presenta pics més amples, de manera que en augmentar la càrrega el pic majoritari solapa més fàcilment amb els pics de les impureses. Emprant l'eluent I, menys ric en DMF, podem arribar a injectar 3.7mg de mostra sense observar una gran deformació del cromatograma. En canvi, amb l'eluent II, més ric en DMF, aquesta situació s'assoleix ja en injectar 2.96mg de mostra, mentre que en injectar 3.7mg el cromatograma s'ha deformat totalment.

Seguidament es mostren els cromatogrames corresponents l'anàlisi per HPLC (Ultrasphere-ODS, eluent I a 3mL/min) del producte col·lectat en cada serie quan tot just es comença a observar tendència a deformació del cromatograma, és a dir, dels productes p_I i p_{II} .



1: HPLC analítica de p_I . 2: HPLC analítica de p_{II} .

Es confirma doncs que l'eluent I amb menys contingut en DMF proporciona productes analíticament més purs amb una càrrega més elevada, de manera que és el que hem emprat per la purificació definitiva del pèptid.

3.3.2.C. Purificació i caracterització del pèptid 8.

El crú peptídic 8-4, procedent de l'acidòlisi de 500mg de Fmoc-nonapeptidil-resina, s'ha purificat en dues etapes:

i) extracció amb dissolvents i precipitació

ii) HPLC semi-preparativa.

i) El crú peptídic s'ha extret amb hexà anhidre, i seguidament amb èter anhidre. El residu sòlid resultant s'ha dissolt en DMA i el pèptid s'ha precipitat per addició d'aigua. A la pàgina següent es mostra l'esquema del procés que té lloc en aquesta primera etapa de purificació, juntament amb els cromatogrames d'HPLC analítica de cada fracció (Ultrasphere-ODS, DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.1, 4mL/min). A continuació s'indiquen les anàlisis d'aminoàcids del crú peptídic i de les diferents fraccions separades.

	<u>Crú peptídic</u>	<u>Extracte hexà</u>	<u>Extracte èter</u>	<u>Dissolució DMA/H₂O</u>	<u>Precipitat</u>
Ser	0.90	1.10	0.91	0.89	0.97
Glu	0.97	0.83	0.24	1.02	1.01
Pro	2.2 ^(a)	-	1.09	-	0.88
Gly	1.05	3.10	6.18 ^(b)	1.63	1.08
Ala	0.98	1.08	(b)	0.94	1.07
Cys	0.13	3.57	0.40	0.82	0.47
Tyr	1.06	-	0.05	1.70	0.21

(a) Integra una impuresa

(b) S'ajunta amb alanina, però és principalment glicina.

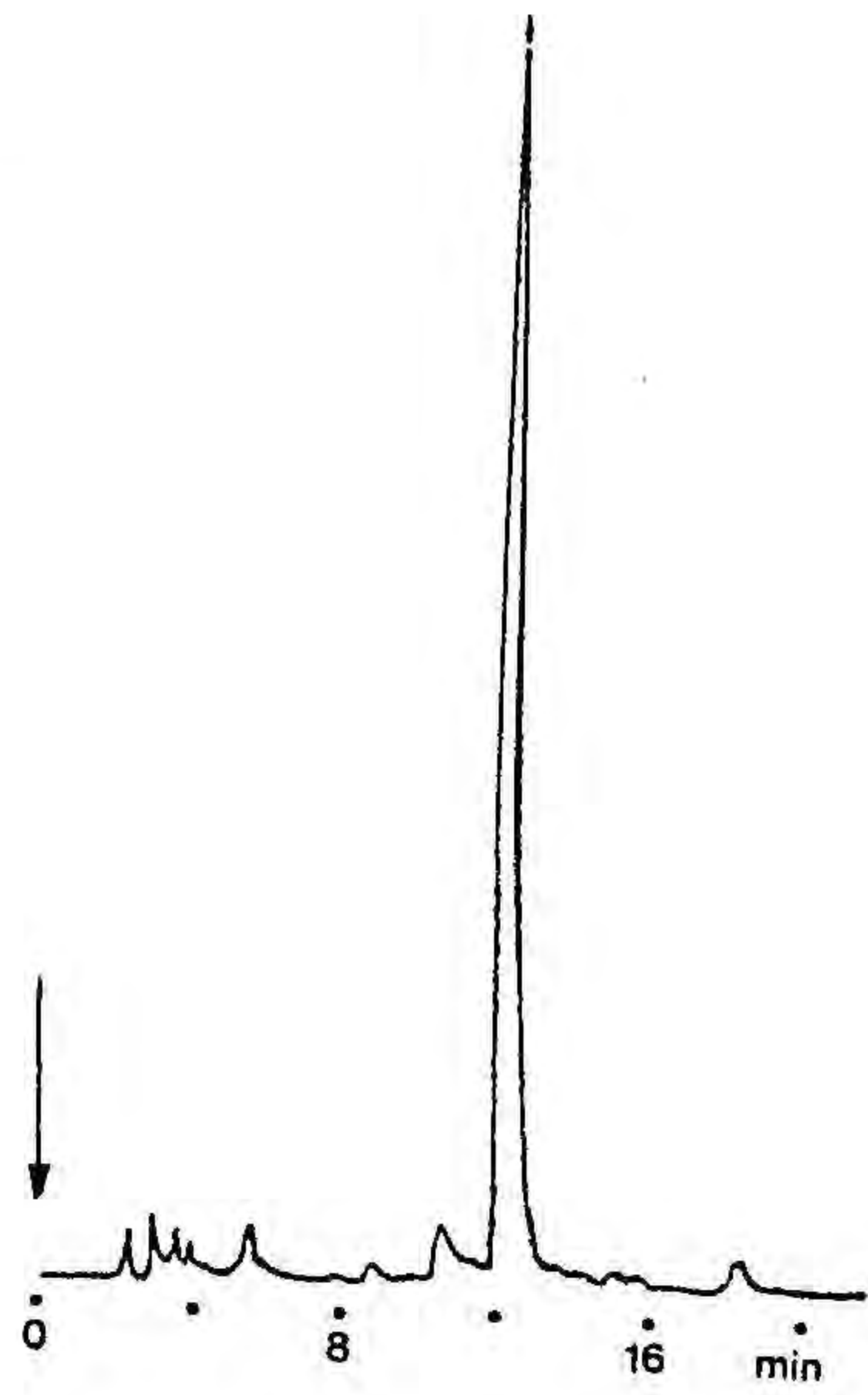
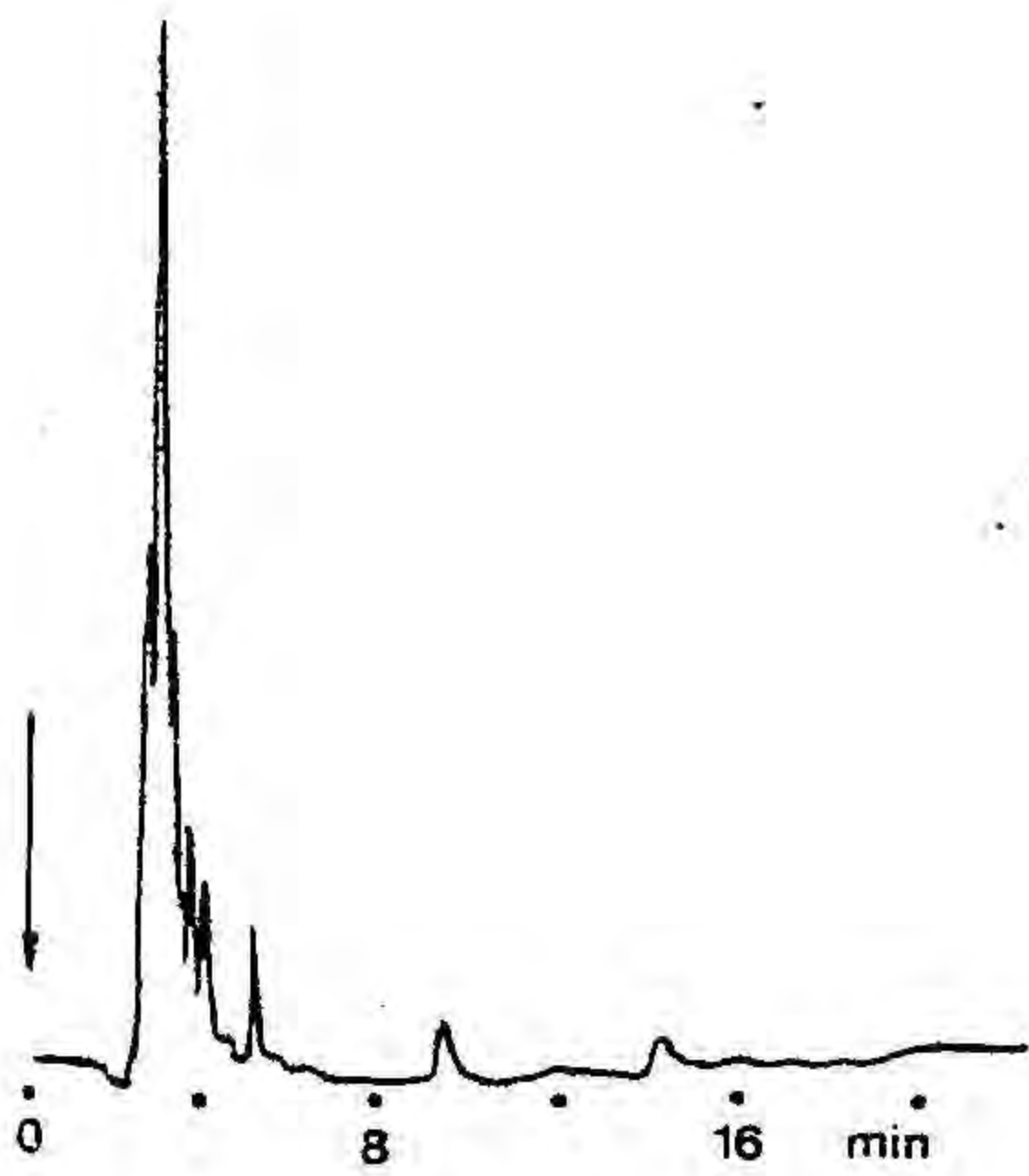
Crú peptídic 8-4 →
(conté anisol i
β-mercaptoetanol)

543mg; 72.2 μmol

20mL hexà

Extracte amb hexà

259mg; 0.04 μmol



Sòlid

20mL èter

Sòlid

+ 4mL DMA

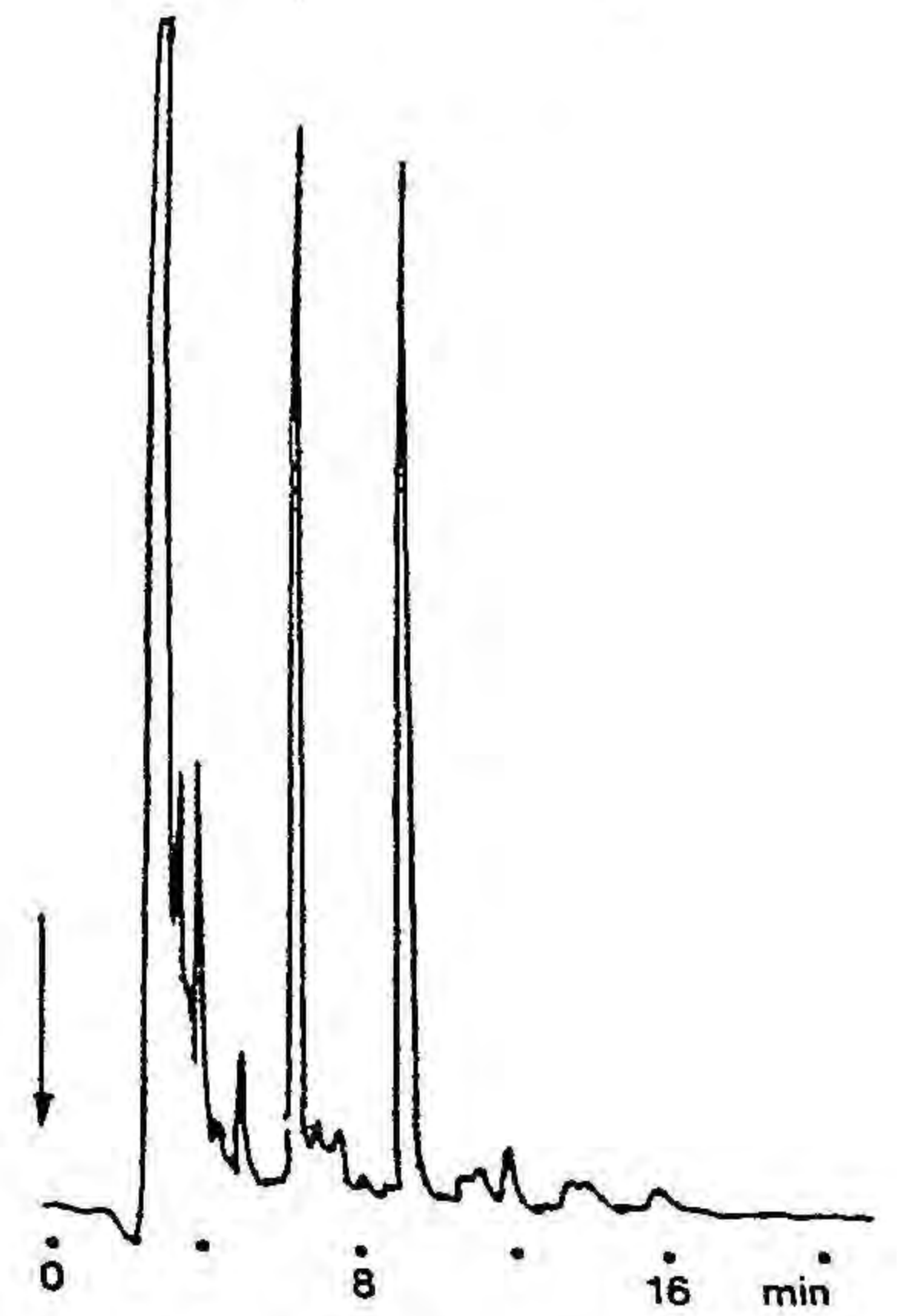
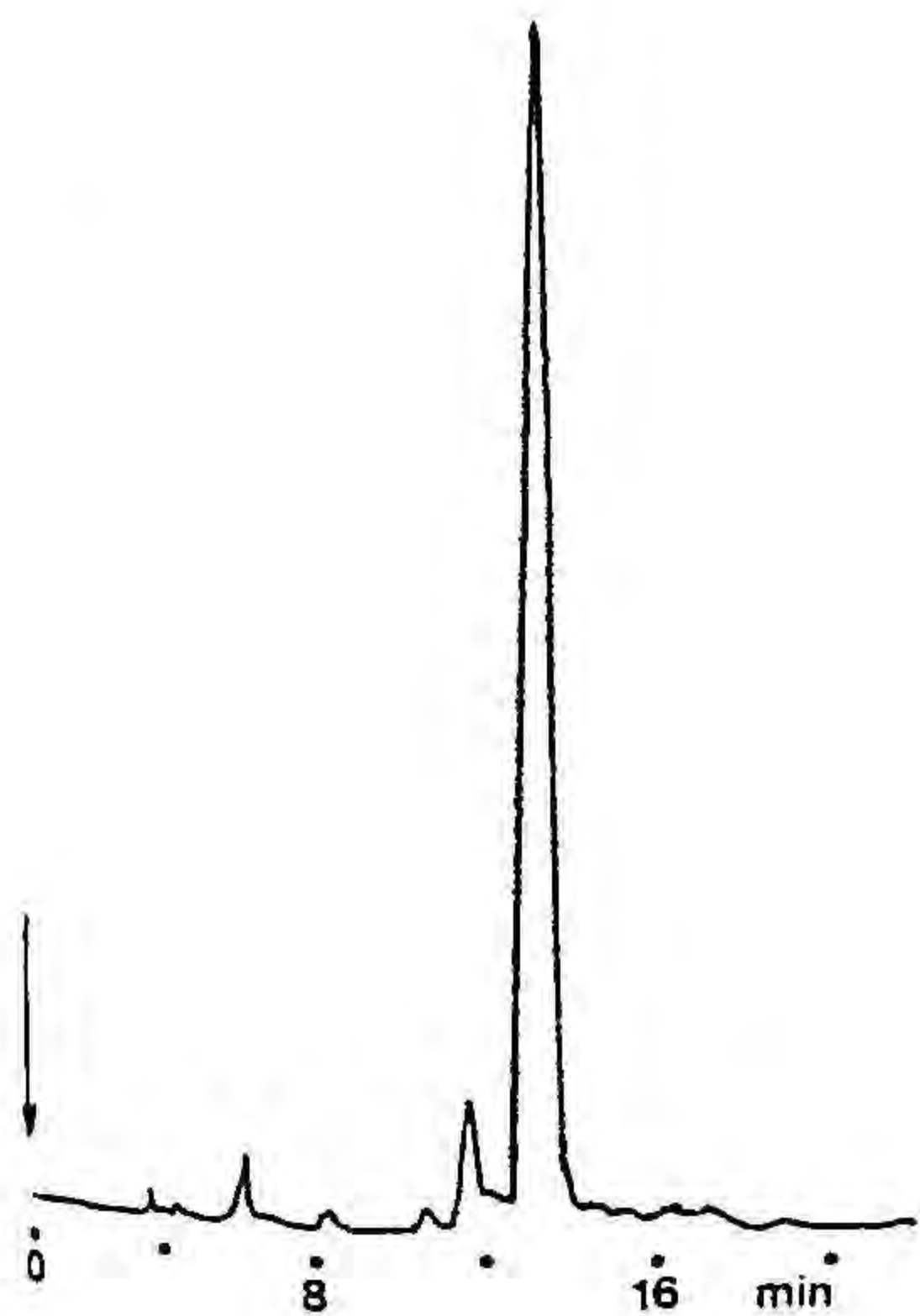
+ 20mL H₂O

Extracte amb èter

50mg; 0.15 μmol

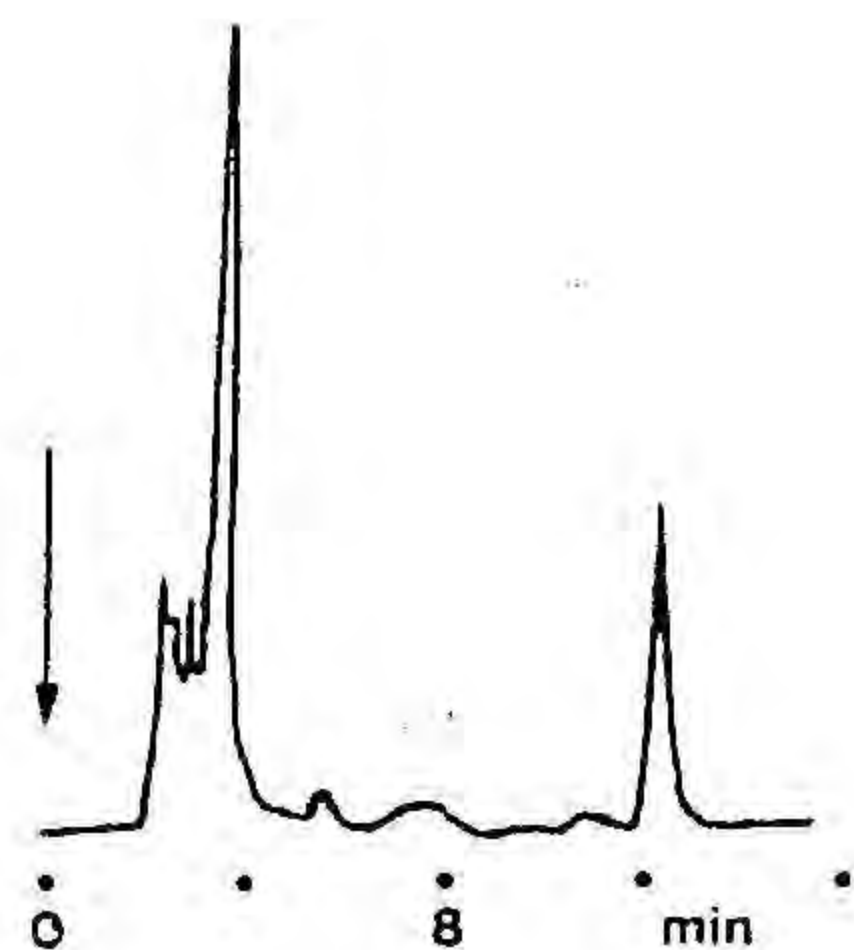
Precipitat

118mg; 56.3 μmol



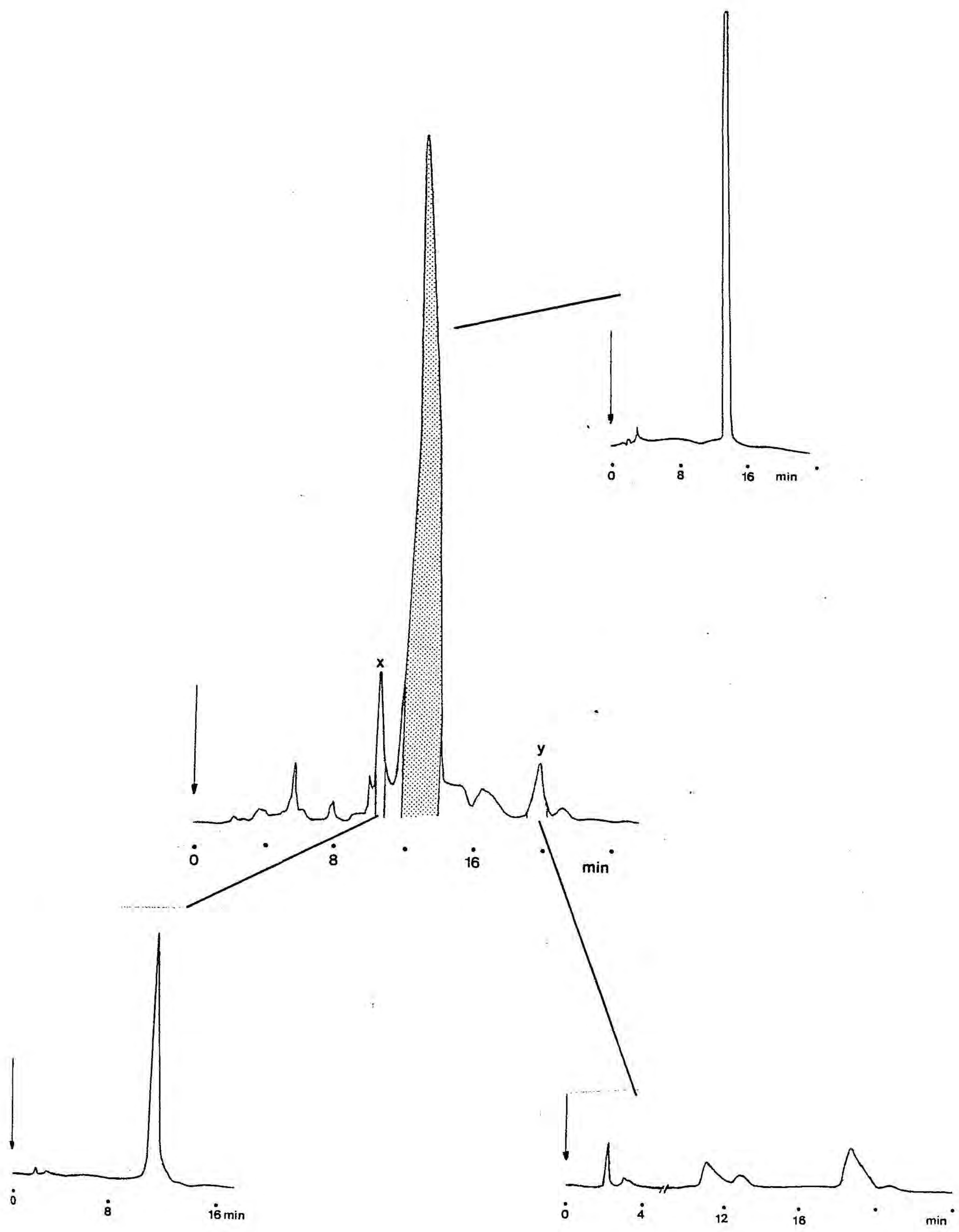
Dissolució DMA/H₂O

12mg; 3.4 μmol



La principal demostració de que amb tots aquests tractaments es purifica el producte la tenim en les anàlisis d'aminoàcids i, sobretot, en els cromatogrames d'HPLC analítica de les fraccions rebutjades, ja que si comparem els cromatogrames del crú peptídic i el precipitat observem ben poques diferències. S'observa clarament que amb les extraccions amb hexà i èter es separen mescles de productes que no contenen el pèptid desitjat però que tampoc contenen cap producte peptídic majoritari de composició en aminoàcids ben definida. La fracció soluble en DMA/aigua conté una mica de pèptid però, sobretot, al igual que els extractes, productes polars o de talla petita que queden poc retinguts en el cromatograma. La gran majoria de producte no peptídic present en el crú que prové de l'acidòlisi es separa amb el tractament amb hexà, i pràcticament tot el pèptid en el precipitat. El contingut en glicina de les fraccions impures és sorprenentment alt, així com el de cisteïna en l'extracte amb hexà que encara és més inexplicable.

ii) La segona etapa de la purificació ha sigut la cromatografia líquida semi-preparativa d'alta eficàcia en fase reversa, treballant amb una columna Ultrasphere-ODS i eluint amb DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 30/52.5/17.5/0.1 a 4mL/min. Juntament amb el cromatograma corresponent a una de les injeccions efectuades (de 3.5mg de mostra), a la pàgina següent es mostren els cromatogrames d'HPLC analítica (en les mateixes condicions) del producte purificat i de les dues impureses aïllades. A continuació s'indiquen les anàlisis d'aminoàcids de cada un d'aquests productes.



	<u>Pèptid purificat</u>	<u>Fracció x</u>	<u>Fracció y</u>
Ser	0.92	0.85	0.89
Glu	0.99	0.77	0.81
Pro	0.97	-	0.27
Gly	1.01	1.20	1.23
Ala	1.03	0.87	1.06
Cys	0.58	0.92	1.50
Tyr	1.63	1.25	1.00

Les anàlisis d'aminoàcids d'aquestes impureses no corresponen a cap seqüència truncada o a deleció del pèptid, sembla que els falti prolina però és difícil de dir perquè ha estat mal integrada.

Hem obtingut 36.1 μ mol de producte purificat, essent el rendiment global de la purificació (en base a les anàlisis d'aminoàcids) del 50%.

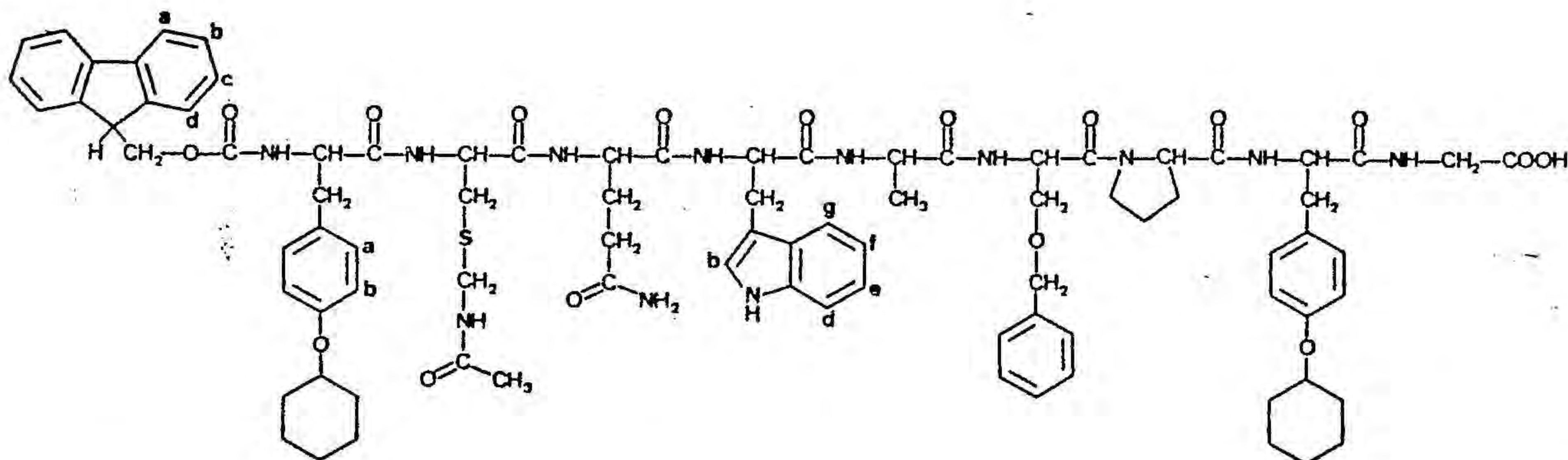
Com veiem el producte obtingut mostra un sol pic en HPLC analítica, i una composició en aminoàcids correcta. El valor de la tirosina s'ha determinat en dur a terme la hidròlisi del pèptid en presència de fenol, amb el mateix resultat si s'efectua amb HCl 12N/AcOH/fenol 2/1/1 com si s'empra HCl 6N i unes gotes de fenol. Hem intentat determinar el contingut en triptofan, tant per hidròlisi amb àcid metanosulfònic 4N com per hidròlisi amb àcid *p*-toluensulfònic 3N en presència de triptamina. Tan sols en aquest darrer assaig s'ha trobat triptofan, però els valors obtinguts són molt baixos i, sobretot, molt variables (de 0.17 a 0.47), posant de manifest que encara que aquests mètodes d'hidròlisi són útils per determinar triptofan en pèptids lliures, no ho són per pèptids protegits, que segurament en el transcurs de la hidròlisi donen carbocations que poden alquilar l'anell indòlic del triptofan.

El pèptid purificat s'ha analitzat per cromatografia en capa fina sobre cromatoplaques de gel de sílice, donant una sola taca amb $R_f=0.39$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 73/25/2).

El poder rotatori específic del pèptid s'ha determinat en DMA i a temperatura ambient, i ha donat un valor

$$[\alpha]_D = -38.6 \pm 2.4. (c 0.58, \text{DMA})$$

S'ha enregistrat l'espectre de ^1H -RMN del pèptid 8 pur, però la seva complexitat tan sols permet l'assignació inequívoca d'alguns dels senyals, que s'indiquen a la següent taula (DMSO- d_6):



<u>Senyal</u>	<u>Assignació</u>
8.6ppm, t	NH Acn Cys
8.1ppm, t	NH Gly
7.9ppm, d	Ha Fmoc (fluorè)
7.6ppm	Hd Fmoc (+Hg Trp)
7.3ppm, s	H aromàtics del grup benzil
6.7ppm, d	Hb Tyr
6.6-8ppm, m	Tots els H aromàtics
4.5ppm, s	CH ₂ benzil Ser
4.2ppm, m	CHCH ₂ Fmoc+algun(s) C-2 H
1.8ppm, s	CH ₃ Acn Cys
1.2ppm, d	CH ₃ Ala

3.4. Caracterització dels segments peptídics protegits 7 i 8 per espectrometria de masses mitjançant bombardeig amb àtoms ràpids (FAB).

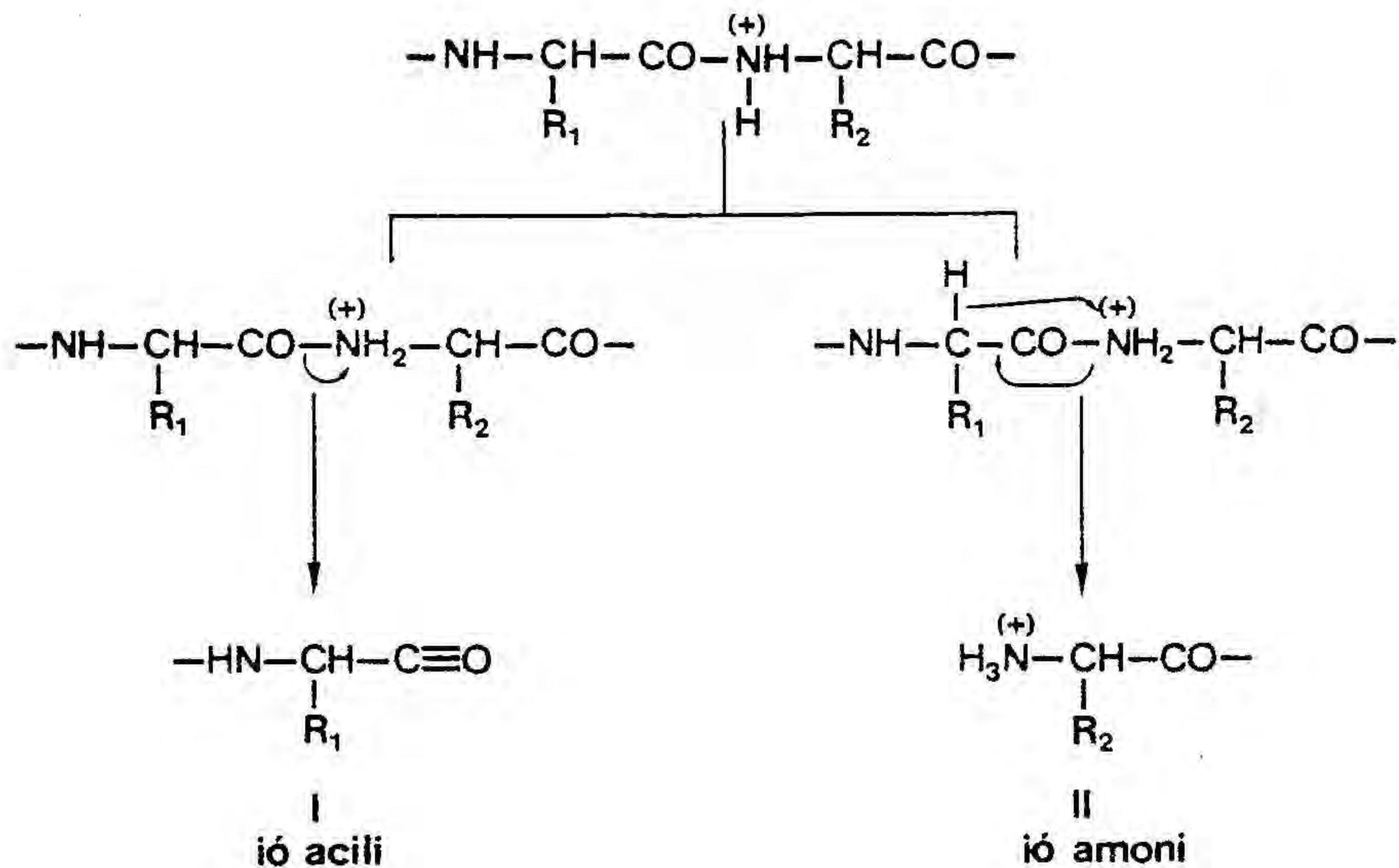
Així com la caracterització de pèptids lliures es basa molt fonamentalment en l'anàlisi d'aminoàcids d'hidrolitzats d'aquests pèptids, en el cas de segments peptídics protegits l'anàlisi d'aminoàcids és un criteri menys estricte. Cal tenir en compte que en el procés d'hidròlisi la desprotecció de les cadenes laterals dels aminoàcids no sempre és quantitativa, i que es poden produir reaccions secundàries (per exemple, alquilació d'algun residu) i descomposició d'algun aminoàcid. Tal com hem vist al llarg de la purificació del pèptid 8, els valors trobats pels residus de tirosina i cisteïna, i triptofan quan la hidròlisi no s'efectua amb HCl 6N, són molt poc reproduïbles.

D'altra banda, l'espectroscòpia de ^1H -RMN també presenta forces limitacions en l'anàlisi d'un pèptid d'una certa talla. Si bé aquesta tècnica pot permetre de detectar dins de l'espectre la presència o l'absència d'algun senyal molt destacat que posi de manifest una impuresa com un pèptid truncat o un pèptid a deleció, és difícil afirmar a partir d'un espectre que un pèptid és pur i conté tots els residus esperats. Així doncs, és necessari disposar d'alguna altra tècnica per a poder caracteritzar més inequívocament segments peptídics protegits.

Els darrers anys s'ha començat a posar a punt una nova tècnica d'espectrometria de masses, la ionització per bombardeig amb àtoms ràpids (FAB) que resulta particularment útil per a l'anàlisi de composts polars de pes molecular elevat sense derivatitzar la mostra (197, 198). El producte es dissol en un dissolvent polar i de baixa volatilitat (glicerol, tioglicerol), i les molècules són bombardejades amb àtoms de xenon o argon en un punt determinat de la font d'ions d'un espectròmetre de masses. En aquestes condicions, les molècules s'ionitzen i volatilitzen espontàniament a temperatura ambient, permetent l'enregistrament de l'espectre en un temps llarg (10-20min).

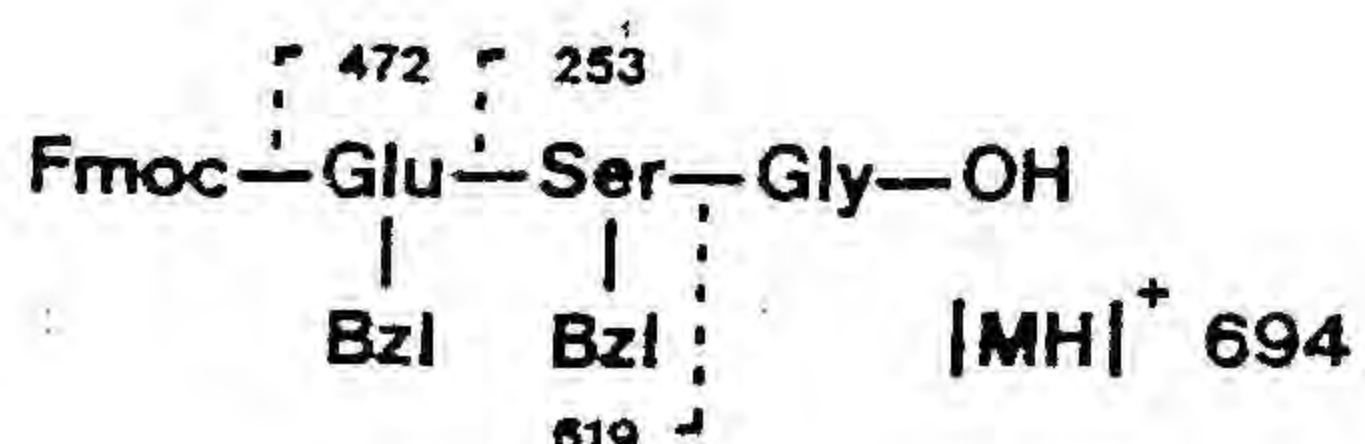
Aquesta tècnica s'ha aplicat principalment a l'elucidació estructural de pèptids lliures (199, 200), essent possible d'obtenir espectres d'ions positius i/o d'ions negatius per guany o pèrdua de protons. Ara bé, alguns autors han estudiat també per FAB pèptids menys polars i derivats de pèptids (200 a 202).

Els mecanismes proposats per la fragmentació de l'enllaç amida d'un pèptid lliure per a donar ions positius (ions acili i ions amoni) (199) són els següents:



S'han enregistrat els espectres de masses per bombardeig amb àtoms ràpids dels pèptids 7 i 8 (tan sols els d'ions positius), confirmant-se que els productes tenen l'estructura desitjada. En els dos cassos s'ha emprat com a matriu tioglicerol i ha sigut necessari afegir unes gotes de DMA per tal de facilitar la dissolució de la mostra.

A continuació es mostren els resultats obtinguts, indicant-se el pic molecular, a la part superior de l'estructura de cada pèptid els fragments amoni detectats, i a la part inferior els ions acili. En els dos cassos s'han detectat també cations que impliquen separació d'algun dels grups protectors del pèptid (200), que s'indiquen en forma de taula.



$$m/e \text{ 604} : 693 - \text{Bzl} + 2\text{H}$$

$$529 : 619 - \text{Bzl} + \text{H}$$

protegits amb diferents objectius: en primer lloc, és necessari avaluar la capacitat analítica de sistemes cromatogràfics que han de separar composts estructuralment molt semblants; en segon lloc, cal trobar més d'un sistema analític per a poder controlar la homogeneïtat dels pèptids. Cal, doncs, estudiar les variacions de retenció i selectivitat en diferents sistemes cromatogràfics. A més a més, posant de manifest el poder de resolució de determinats sistemes cromatogràfics, podrem tenir més confiança en els resultats obtinguts en abordar la purificació en condicions semblants.

A l'apartat 3.1.3, hem indicat que al llarg de les síntesis dels pèptids 7 i 8 hem anat separant alíquotes de peptidil-resina després de cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid protegit. Així, per tractament de cada una d'aquestes alíquotes amb 55% de TFA en diclorometà hem obtingut els segments corresponents a l'allargament aminoàcid a aminoàcid de la cadena peptídica. Aquestes mostres, i barreges d'aquests pèptids composades per nosaltres, són els elements de que hem disposat per a dur a terme aquest estudi. En primer lloc hem analitzat per separat cada un dels segments peptídics i, un cop conegut el seu comportament en un determinat sistema cromatogràfic, s'han cercat condicions en les quals es pogués aconseguir una bona separació de les barreges artificials, sense que aixó vulgui dir que es pretengués optimitzar al màxim cada separació. Les barreges que s'han compostat, I i II, contenen els segments corresponents a l'allargament seqüencial dels pèptids 7 i 8 respectivament i s'indiquen a continuació:

Barreja I

<u>Component</u>	<u>Estructura</u>
1	Fmoc-Gly-OH
2	Fmoc-Ser(Bzl)-Gly-OH
3	Fmoc-Glu(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-OH

Barreja II

<u>Component</u>	<u>Estructura</u>
1	Fmoc-Gly-OH
2	Fmoc-Tyr(cHex)-Gly-OH
3	Fmoc-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH
4	Fmoc-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH
5	Fmoc-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH
6	Fmoc-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH
7	Fmoc-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH
8	Fmoc-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH
9	Fmoc-Tyr(cHex)-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH

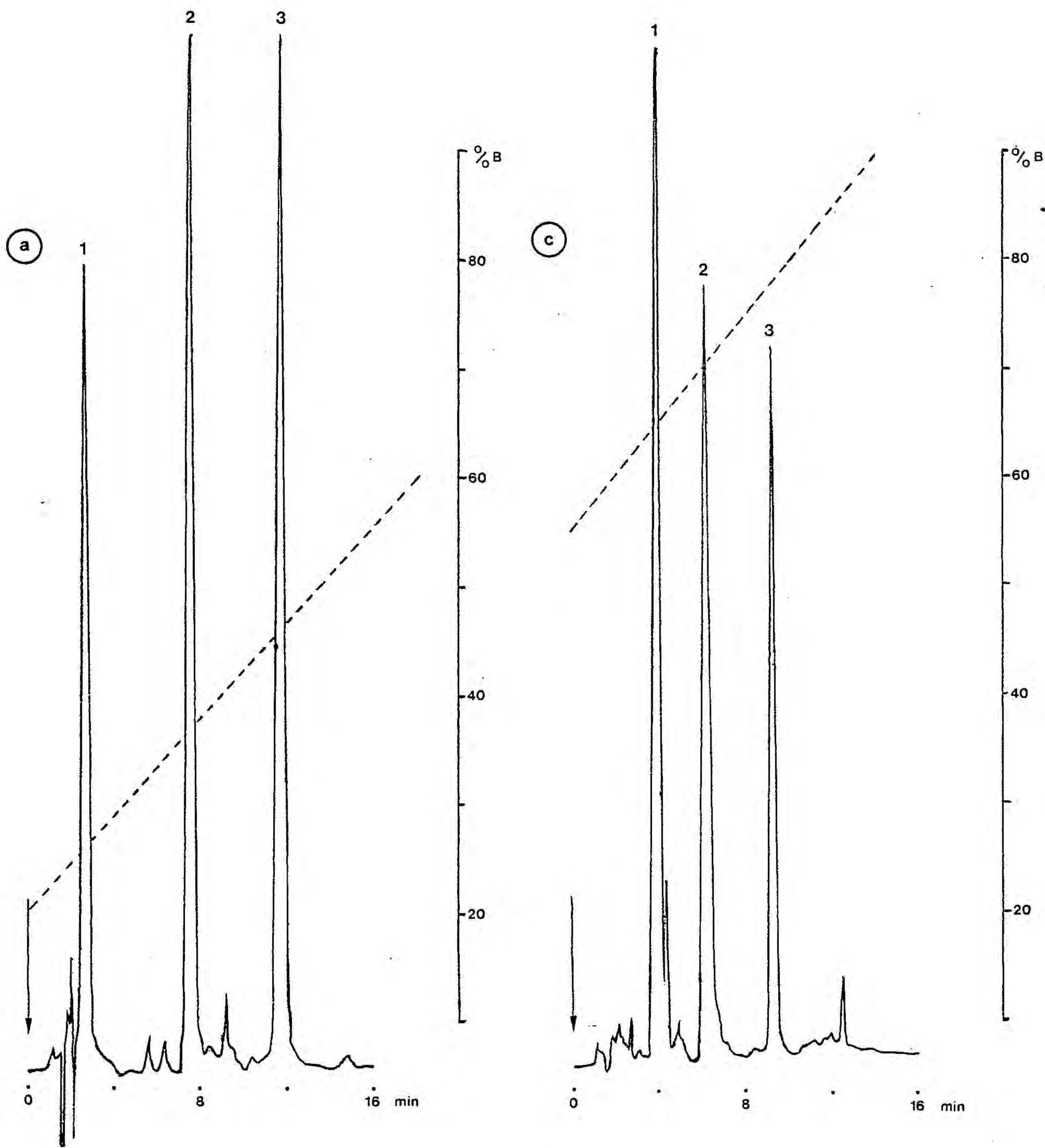
En els diferents sistemes cromatogràfics assajats s'han variat tant la fase estacionària com la fase mòbil. Com a fase estacionària hem assajat columnes de fase reversa d'octadecilsiloxà (C₁₈) i cianopropilsiloxà (CN). El modificador orgànic de la fase mòbil sempre ha sigut l'acetoneitril, en presència d'àcid propiònic en alguns cassos.

Hem anat veient al llarg d'aquest capítol que, en condicions isocràtiques d'elució, els nostres pèptids, igual que la majoria de polipèptids, tan sols es poden cromatografiar eficientment en un estret marge de concentracions de modificador orgànic diferent per cada producte, per sobre del qual els pèptids són ràpidament eluits i per sota del qual són fortament retinguts a la columna. Aquest comportament ha fet necessari l'ús de gradients de força creixent de la fase mòbil per a cromatografiar barreges de polipèptids de diferents hidrofibicitats relatives amb bones eficàcies i resolucions i en temps curts de cromatografia. En tots els cassos s'ha emprat un gradient d'elució linial, augmentant el percentatge de modificador orgànic en un 2.5% per minut. El valor inicial de %B (modificador orgànic) s'ha triat en cada cas de manera que el temps d'elució del compost menys retingut fos del mateix ordre per tots els sistemes cromatogràfics.

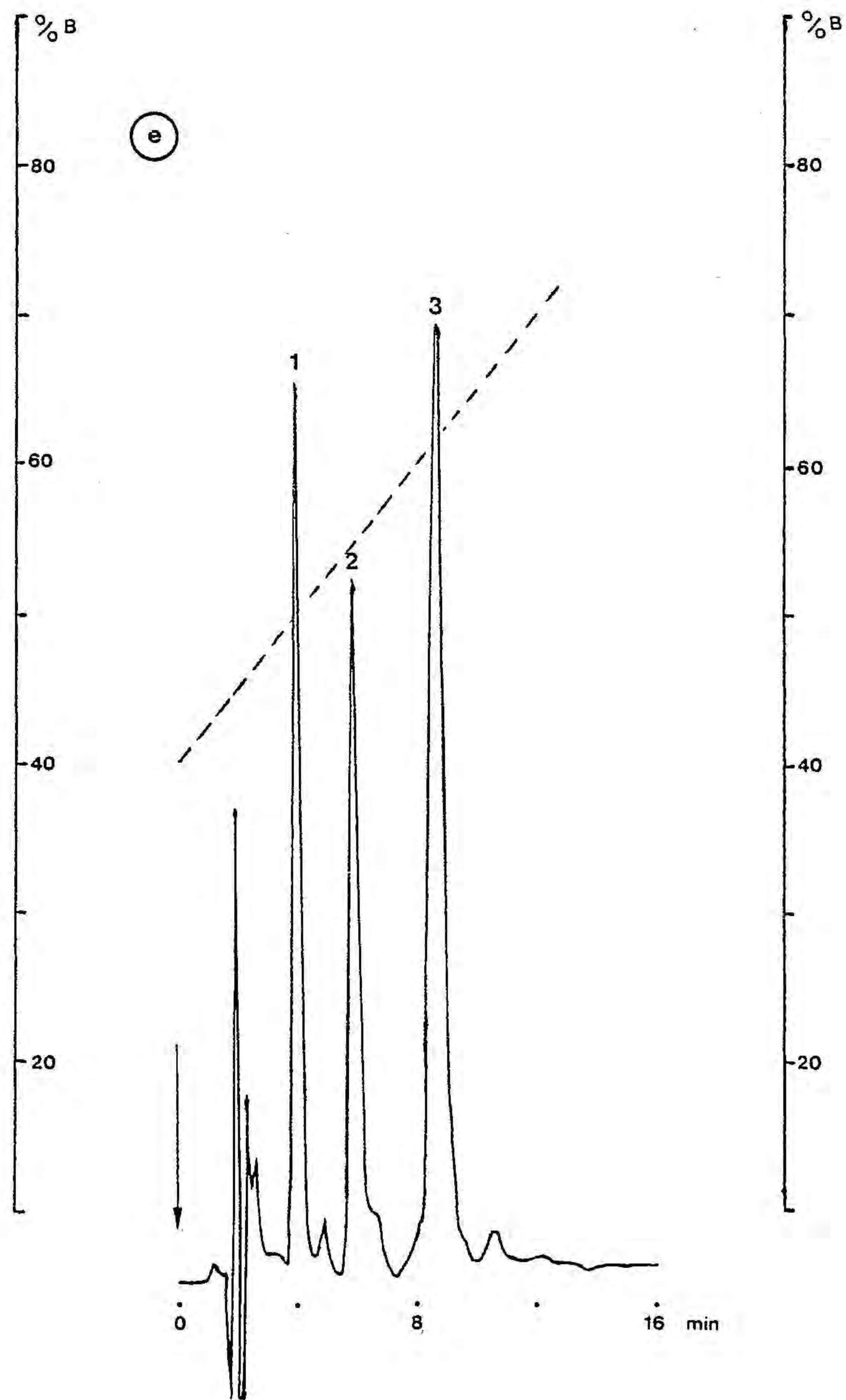
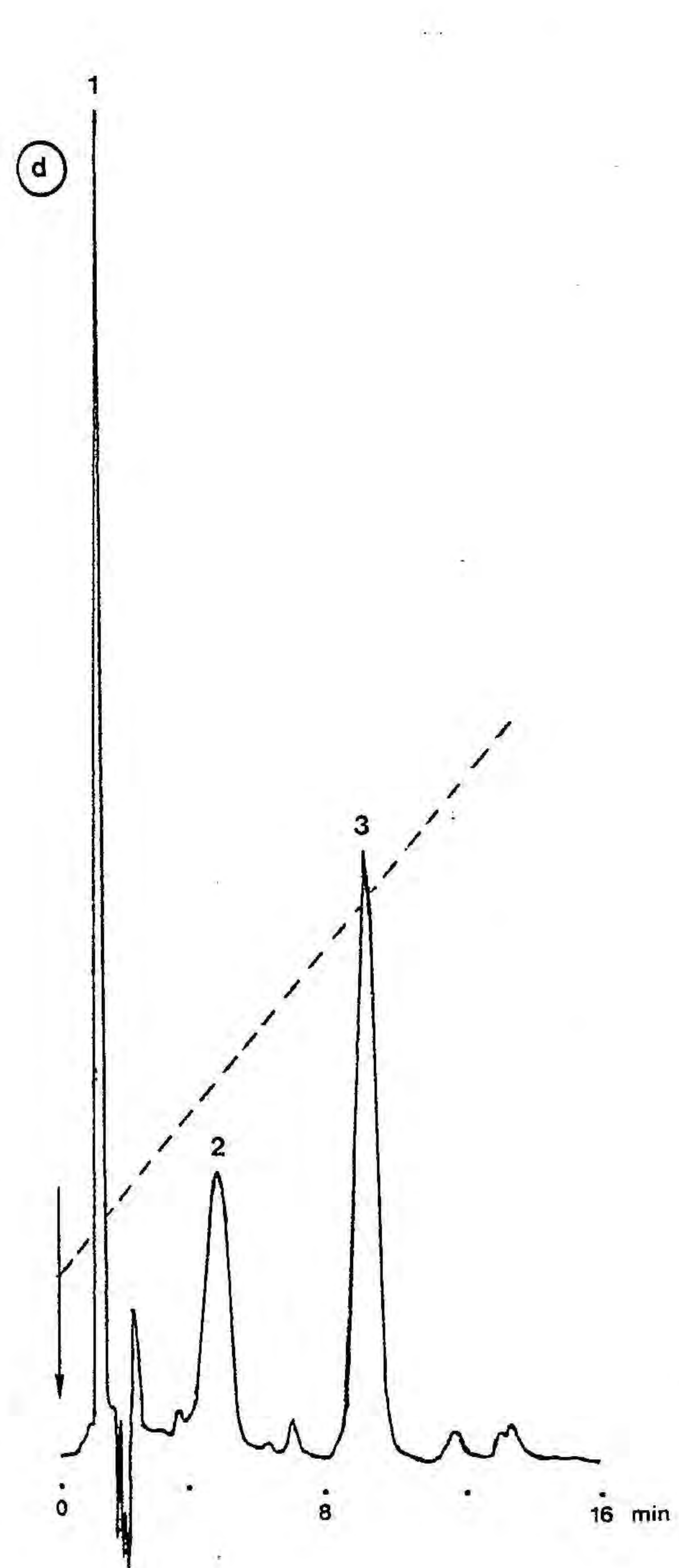
A la següent taula es resumeixen les condicions cromatogràfiques assajades. El flux ha sigut sempre de 2mL/min, i la detecció s'ha efectuat a 301nm.

Sistema	Columna	Fase mòbil		%B inicial
		A	B	
a	C ₁₈	H ₂ O	CH ₃ CN	20
b	C ₁₈	H ₂ O/0.5%àcid propiònic	CH ₃ CN/0.5%àcid propiònic	55
c	C ₁₈	H ₂ O/0.1%àcid propiònic	CH ₃ CN/0.1%àcid propiònic	55
d	CN	H ₂ O	CH ₃ CN	15
e	CN	H ₂ O/0.1%àcid propiònic	CH ₃ CN/0.1%àcid propiònic	40

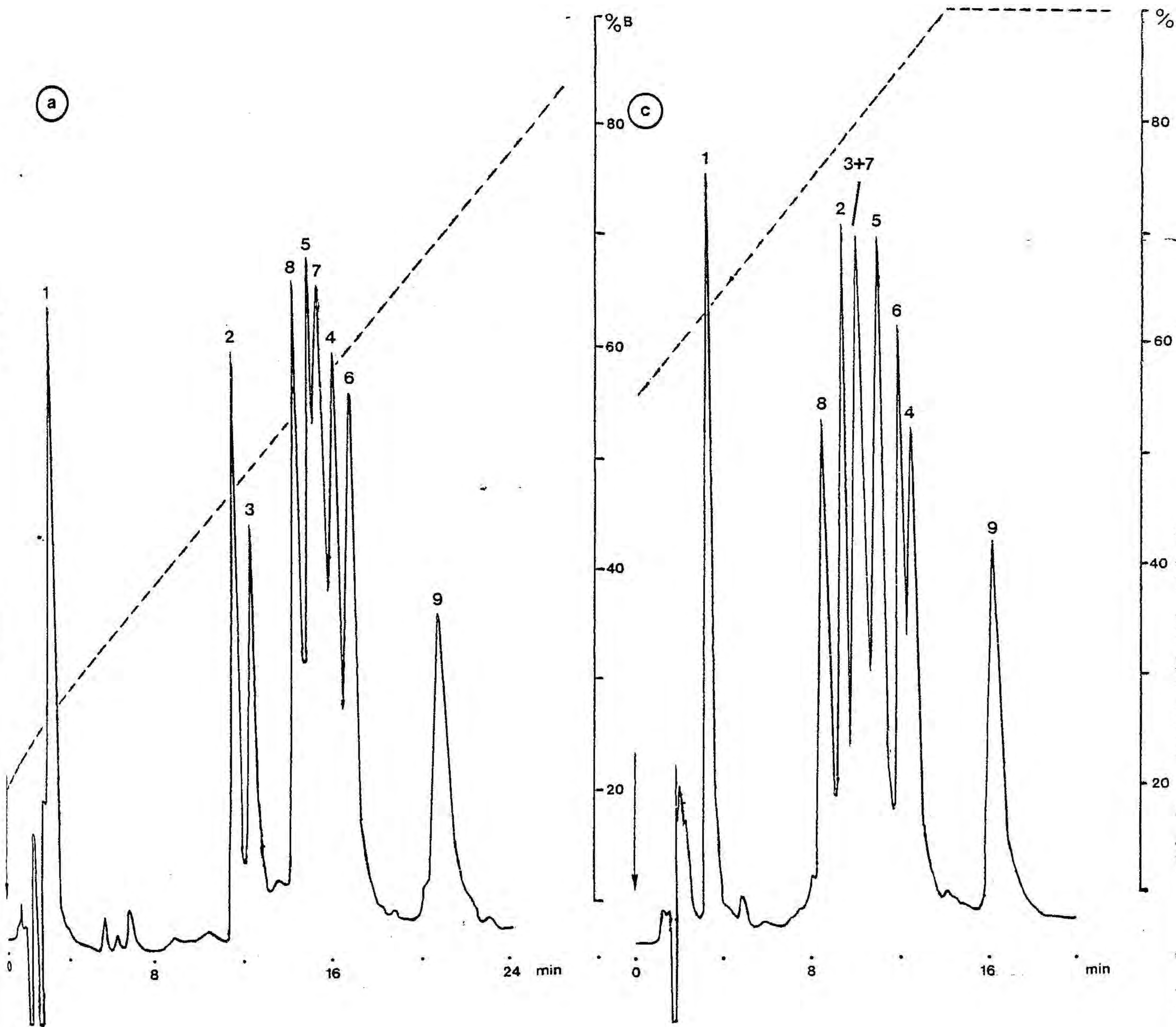
Els cromatogrames obtinguts per a cada una de les barreges , I i II, en les condicions a, c, d i e, es mostren a continuació. No s'inclouen els cromatogrames obtinguts amb el sistema b, que tan sols presenten lleugeres variacions de temps de retenció respecte a les condicions c, però la mateixa selectivitat. (Aquest fet es posa de manifest per la barreja II a la figura de la pàgina 176).



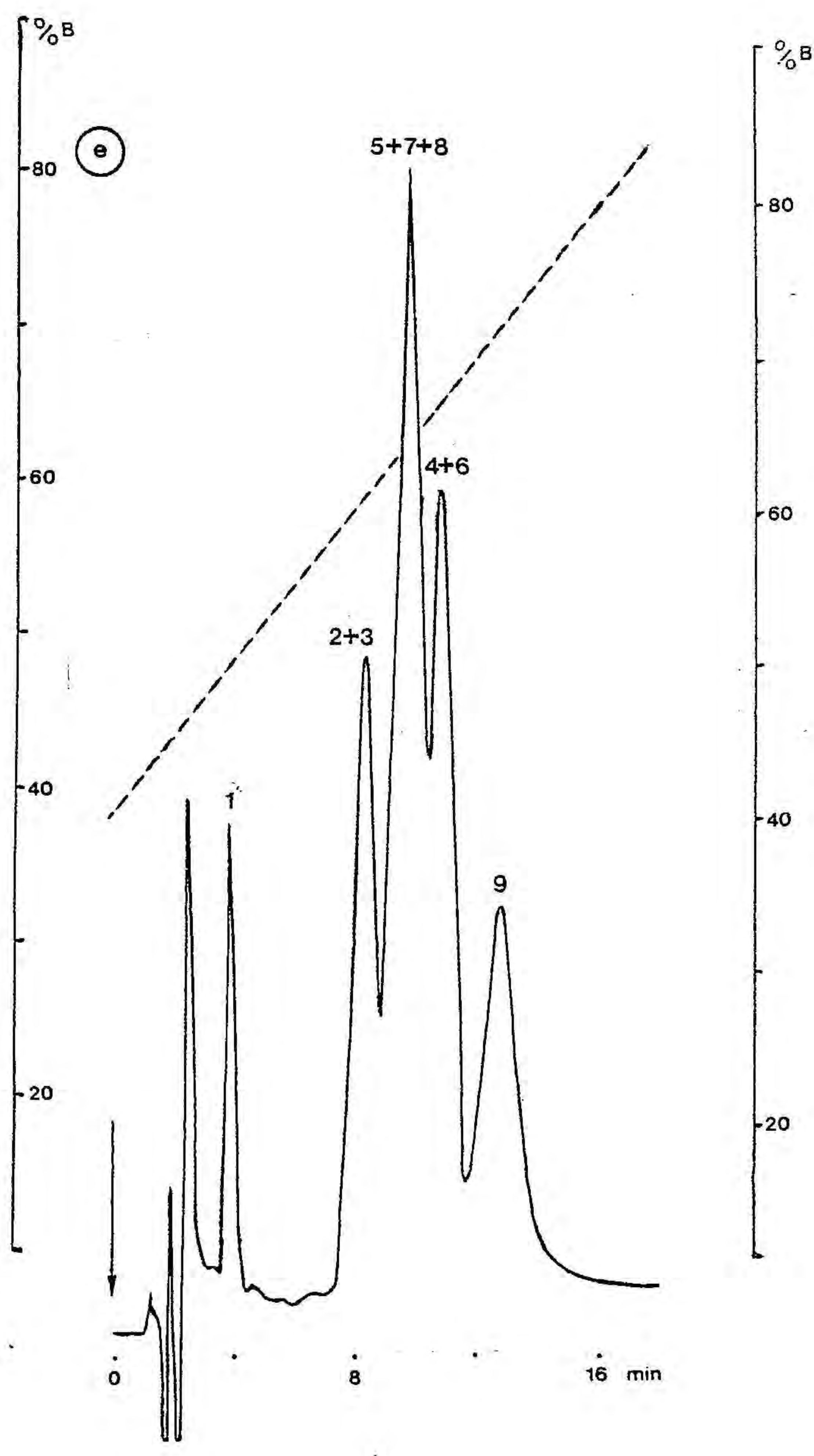
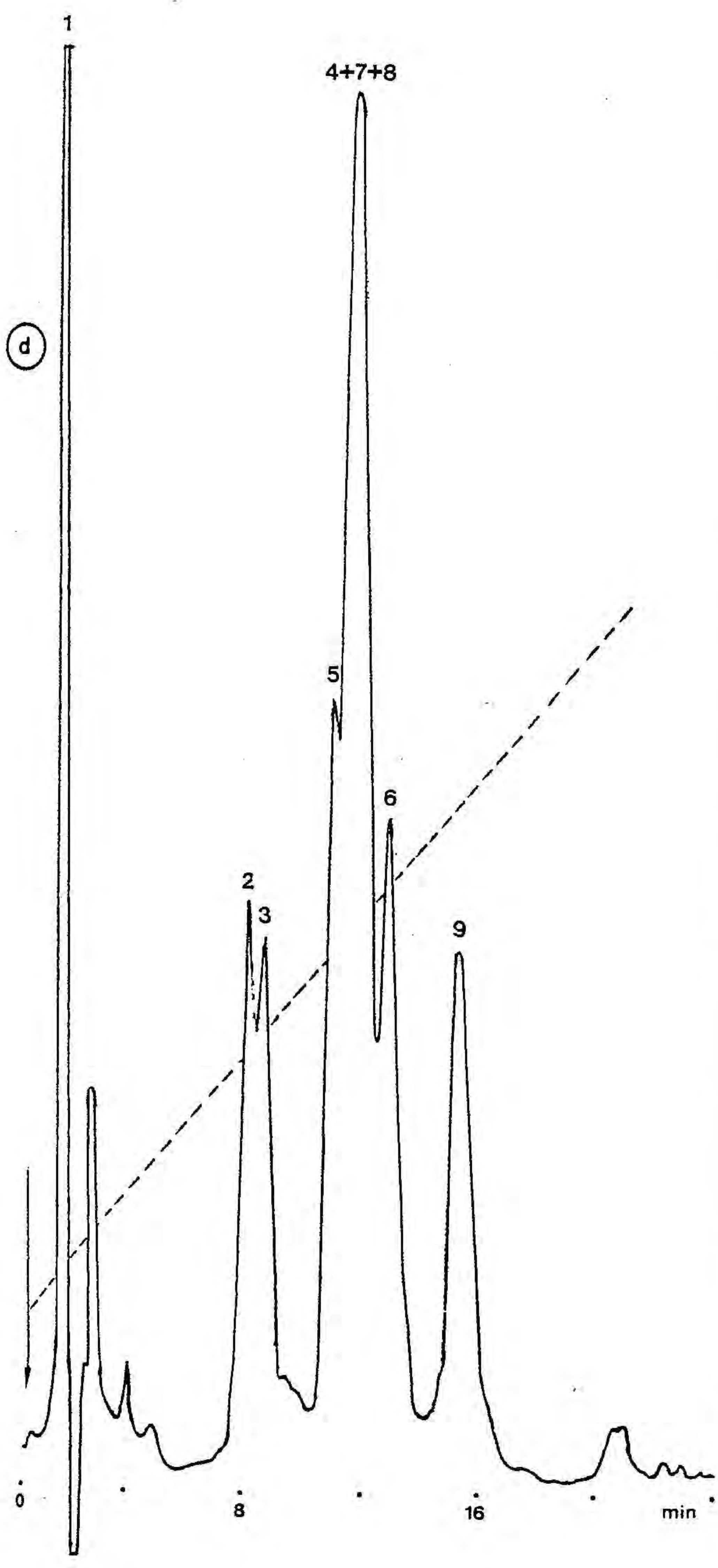
Cromatogrames de la barreja I en les condicions a i c (vegeu taula pàg. 171).



Cromatogrames de la barreja I en les condicions d i e (vegeu taula pàg. 171).

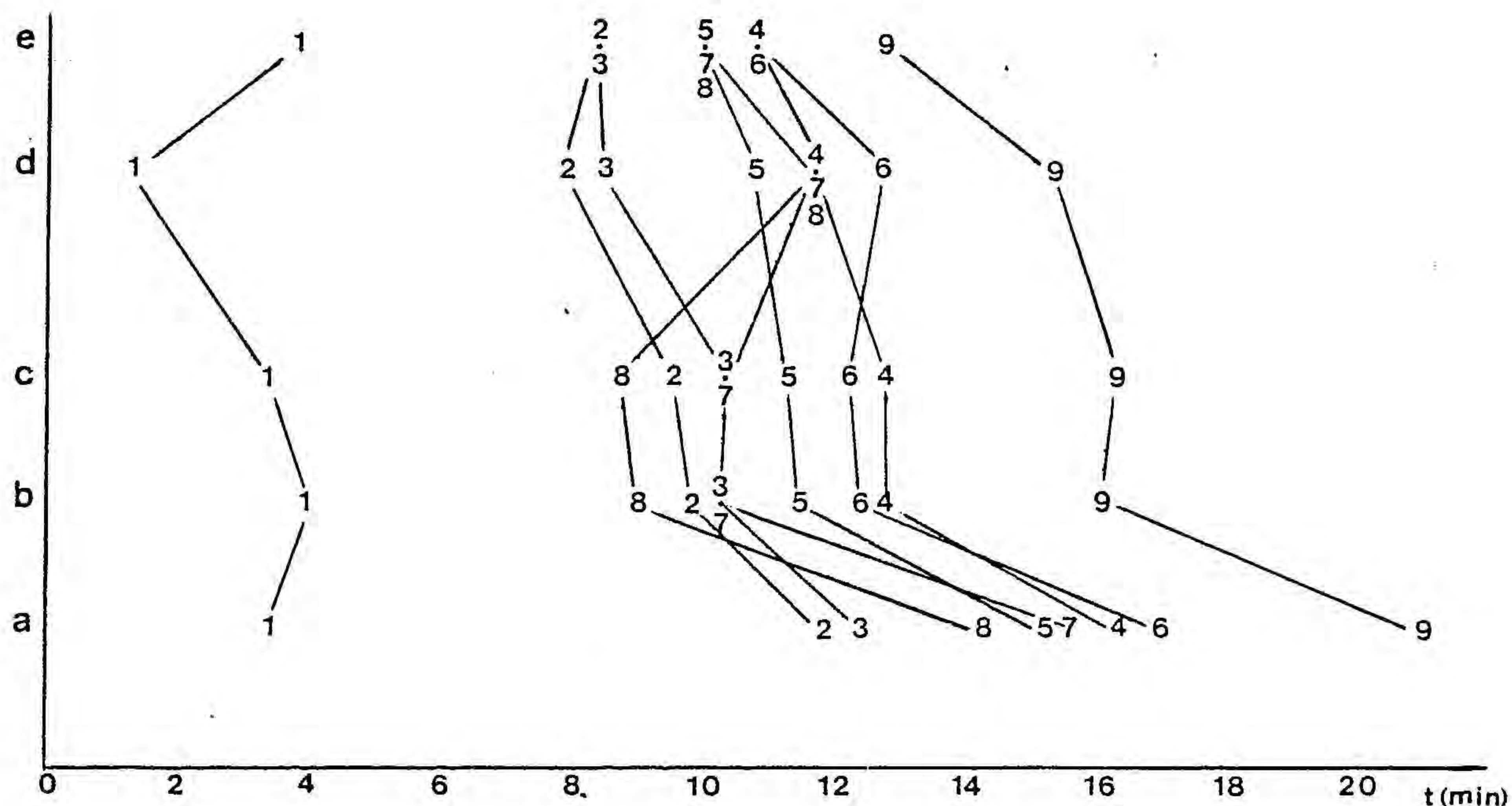


Cromatogrames de la barreja II en les condicions a i c (vegeu taula pàg. 171).



Cromatogrames de la barreja II en les condicions d i e (vegeu taula pàg. 171).

Al següent esquema s'han representat els temps de retenció del nonapèptid i dels seus precursors sintètics (barreja II) en les cinc condicions cromatogràfiques assajades. Tan sols es preten posar de manifest els ordres relatius d'elució en els diferents sistemes emprats, però no comparar els temps absoluts de retenció perquè en cada cas el gradient s'ha iniciat a una concentració diferent de modificador orgànic.



Si comparem, per cada una de les dues barreges, els cromatogrames efectuats sobre octadecilsiloxà o sobre cianopropilsiloxà amb la mateixa fase mòbil podem veure que, en conjunt, amb la fase reversa d'octadecilsiloxà s'aconsegueix una eficàcia més gran (pics més estrets) que amb la fase de cianopropilsiloxà, i que el poder de resolució entre pèptids estructuralment molt semblants és més gran.

Aixó no vol dir que la fase d'octadecilsiloxà sempre sigui preferible, ja que, per exemple, els segments peptídics 3 i 7 de la barreja II s'elueixen junts en la columna de C_{18} quan la fase mòbil conté àcid propiònic, mentre que sobre cianopropilsiloxà surten separats tant si la fase mòbil conté àcid com si no el conté. Així doncs, les notables diferències de selectivitat i retenció dels pèptids cromatografiats entre ambdós tipus de rebliment poden ésser de gran utilitat en cassos específics. Com era

de preveure, en la fase de cianopropilsiloxà, més polar que la d'octadecilsiloxà, els pèptids protegits s'elueixen amb proporcions més petites de modificador orgànic a la fase mòbil.

L'addició d'àcid propiònic a la fase mòbil produeix un augment de la retenció en qualsevol de les fases estacionàries, essent necessàries proporcions considerablement més elevades de modificador orgànic per a obtenir temps d'elució raonables. D'altra banda, en observar la figura de la pàgina 176 s'aprecia clarament que l'addició d'aquestes petites quantitats d'àcid provoca canvis substancials en els ordres d'elució. A tall d'exemple, podem destacar el comportament del pèptid de vuit residus Fmoc-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH, que queda molt poc retingut en fase C₁₈ quan hi ha àcid propiònic a la fase mòbil, eluint-se abans que pèptids molt més curts. Com ja hem esmentat, en la mateixa fase C₁₈ els pèptids 3 i 7 de la barreja II s'elueixen junts quan a la fase mòbil hi ha àcid propiònic, però separats quan no n'hi ha. L'efecte de l'àcid propiònic sobre la retenció i la selectivitat és pràcticament el mateix quan la concentració d'àcid varia del 0.1 al 0.5%.

En conjunt, doncs, cal destacar els enormes canvis de selectivitat observats tant entre els diferents rebliments com per un rebliment determinat en funció de la fase mòbil emprada. Aquest fet il·lustra que per a verificar la homogeneïtat d'un producte cal assajar diferents condicions cromatogràfiques.

Si bé de tots els sistemes cromatogràfics assajats l'únic que separa tots els components de la barreja és aquell que utilitza la fase C₁₈ i acetonitril/aigua com eluent, el sistema que sembla més indicat per a una utilització generalitzada és el que empra la fase C₁₈ i l'eluent acetomitril/aigua/àcid propiònic, ja que en general presenta eficàcies més elevades i permet, en la pràctica, d'assolir reproduïbilitat més fàcilment.

De tots els resultats que hem presentat, podem deduir que el pes molecular no és el factor determinant de la retenció dels pèptids protegits en els sistemes cromatogràfics estudiats.

Considerant que un pèptid petit no presenta estructures secundàries estabilitzades, podem estimar que la retenció del pèptid és la suma de les contribucions a la retenció de cada residu, factor relacionat amb la hidrofobicitat de les cadenes laterals dels aminoàcids.

En el conjunt de sistemes cromatogràfics estudiats podem distingir dos tipus diferents d'aminoàcids: aquells que en incorporar-se a la cadena peptídica provoquen retenció del pèptid i aquells que tenen un efecte contrari. Dins del primer grup, és a dir, el de residus hidrofòbics, i ordenats de més a menys efecte "retardador", tenim

Tyr(cHex) > Glu(Bzl) > Ser(Bzl) > Trp > Pro

mentre que dins del grup de residus que disminueixen la retenció del pèptid trobem (ordenats amb el mateix criteri)

Cys(Acm) > Ala > Gln

Dit d'una altra manera, els residus que provoquen un augment de la retenció més gran són els aminoàcids protegits amb grups hidrofòbics (cHex, Bzl), mentre que el grup protector polar (Acm) de la cisteïna produeix l'efecte contrari. Pel que fa als aminoàcids no protegits, els que produeixen menor retenció són els que tenen cadenes laterals petites (Ala) o hidrofíliques (Gln).

PART EXPERIMENTAL.

MATERIALS I MÈTODES.

1. Instrumentació.

Els punts de fusió, no corregits, s'han determinat en un aparell Buchi amb un capilar obert o en un microscopi Köfler.

Els espectres d'infrarroig s'han obtingut d'aparells Unicam SP 1100 i Perkin-Elmer models 457 i 681.

Les determinacions de poder rotatori específic s'han dut a terme en un polarímetre Perkin-Elmer 141.

Les mesures d'absorció a l'ultraviolat s'han efectuat en espectrofotòmetres Perkin-Elmer 124 i Lambda 5.

Els espectres de ^1H -RMN de 60MHz s'han enregistrat en aparells Perkin-Elmer R-12A i R-24B, mentre que els de ^1H -RMN de 200MHz i els de ^{13}C -RMN de 48MHz s'han obtingut en un aparell Varian XL-200.

Els espectres de masses s'han efectuat en un espectròmetre Hewlett-Packard 5930 A; els de bombardeig per àtoms ràpids (FAB) s'han realitzat al Centre de Spectrométrie de Masse de Lyon, França, del Service Central d'Analyse de C.N.R.S. amb un aparell ZAB-HF (VG).

Les anàlisis elementals s'han dut a terme a l'Institut de Química Orgànica Aplicada de Catalunya, amb un analitzador Perkin-Elmer 240.

La reacció amb àcid fluorhídric anhidre s'ha efectuat en un reactor de teflon i Kel-F de la casa Toho-Kasei (Tokio, Japó).

El contingut en aminoàcids i la proporció de diglicina respecte a glicina de les diferents mostres s'han determinat en autoanalitzadors Beckmann 119 i 120 C i Biotronic LC.

L'anàlisi per cromatografia de gasos s'ha efectuat amb un cromatògraf Carlo Erba Fractovap GT.

Les separacions cromatogràfiques a baixa pressió (filtració molecular, bescanvi iònic) s'han dut a terme amb una bomba peristàltica Gilson Minipuls II i un col·lector de fraccions LKB model Ultrorac 7000. Un detector ultraviolat Unicam SP 6000 de feix simple equipat amb una cubeta de 1mm ens ha permès d'obtenir el perfil cromatogràfic dels productes que es van eluint.

Per les cromatografies semi-preparatives s'ha treballat amb dos sistemes diferents. Quan hem fet servir columnes preempaquetades de vidre (vegeu més endavant), s'ha substituït la bomba peristàltica per una

bomba de pistó Mini-Pump (Milton Roy) proveïda d'un injector Valco CV-6-HPax amb un bucle de 5mL. Ara bé, quan s'han dut a terme cromatografies líquides d'alta eficàcia tant a nivell analític com semi-preparatiu (amb columnes d'acer o cartutxos de compressió radial), s'ha treballat amb un sistema Waters que consta d'un injector U6K, dues bombes models 6000 A i M-45, un programador de gradients 660 i un detector ultraviolat d'ona variable model 450, juntament amb un registrador de dos canals Omniscribe (Houston Instruments).

Les separacions per cromatografia líquida d'alta eficàcia a escala preparativa s'han efectuat en un aparell Waters PrepLC/System 500 amb refractòmetre incorporat.

2. Columnes de cromatografia líquida.

Per a les filtracions moleculars sobre gels compatibles amb dissolvents orgànics s'ha emprat Sephadex LH-20 (25-100 μ m) i Sephadex LH-60 (40-120 μ m), ambdós de la casa Pharmacia.

A escala analítica s'han emprat quatre tipus de columnes de fase reversa: μ -Bondapak C₁₈ (30x0.39cm), d'octadecilsiloxà amb partícules de 10 μ m de diàmetre (Waters); Hibar Lichrosorb RP-18 (25x0.4cm), de partícules d'octadecilsiloxà de 7 μ m (Merck), i dos cartutxos Rad-Pak C₁₈ i Rad-Pak CN (10x0.5cm) d'octadecilsiloxà i cianopropilsiloxà respectivament, amb partícules de 10 μ m (Waters). Aquestes dues columnes, a diferència de les primeres amb parets d'acer, tenen les parets de polietilè flexible que s'han de comprimir durant el seu ús, la qual cosa s'aconsegueix amb un mòdul de compressió hidràulica radial Waters model RCM 100.

Principalment en purificacions a escala semi-preparativa, però també a nivell analític, s'ha utilitzat una columna Ultrasphere-ODS (25x1cm) de partícules d'octadecilsiloxà de 5 μ m de diàmetre (Beckman). També a escala semi-preparativa, s'han utilitzat columnes de vidre comercials (Lobar, Merck) preempaquetades amb gel de sílica Lichroprep Si 60 de 40-63 μ m, de mida A (24x1cm) o B (31x2.5cm).

Per a les purificacions a escala preparativa s'han emprat cartutxos Waters de 30x5.7cm de parets de polietilè flexibles, PrepPak-500/sílica i PrepPak-500/C₁₈ farcits amb gel de sílice o octadecilsiloxà de 37-75µm.

Sempre que s'ha treballat amb el sistema d'HPLC Waters a nivell analític o semi-preparatiu, s'ha procedit a filtrar i desgassar els dissolvents abans d'emprar-los. Els dissolvents orgànics s'han filtrat amb filtres Millipore FH de 0.5µm de porus i l'aigua amb filtres Millipore AH de 0.45µm. Abans d'ésser cromatografiades, les mostres s'han filtrat amb l'ajuda d'un dispositiu Swinney Filter (Millipore) i filtres Millipore FH (0.5µm).

3. Dissolvents i reactius.

El diclorometà s'asseca sobre CaCl₂ i K₂CO₃, i es destil.la immediatament abans del seu ús.

La N,N-dimetilformamida es destil.la al buit en atmosfera de nitrogen sobre P₂O₅ i ninhidrina. El destil.lat es guarda sobre sedàs de 4Å i només es fa servir quan, després d'haver-hi fet passar N₂, l'assaig d'amines amb fluorodinitrobenzè (126) dóna negatiu.

La N,N-dimetilacetamida es destil.la al buit sobre CaH₂ i es guarda sobre sedàs de 4Å. Abans d'emprar-la es comprova que dóna negatiu l'assaig del fluorodinitrobenzè (126).

L'isopropanol s'asseca primer sobre CaCl₂ i després sobre BaO, i es destil.la sobre BaO.

El dioxan s'empra sempre exempt de peròxids, la qual cosa es pot aconseguir destil.lant-lo sobre KOH i guardant-lo sobre Na, o filtrant-lo a través d'alúmina (en aquest cas cal fer-lo servir immediatament).

La piperidina (Fluka, p.a.) es destil.la sobre NaOH en atmosfera de nitrogen i es redestil.la en atmosfera de nitrogen.

La piridina es destil.la i es guarda posteriorment sobre KOH. L'anhídrid acètic es destil.la sobre NaAcO anhidre. Pel que

fa a l'àcid acètic, o bé es glaça i destil·la en presència d'anhídrid acètic o bé s'empra reactiu analític.

L'àcid trifluoroacètic es destil·la abans d'emprar-lo.

La diciclohexilcarbodiimida es destil·la al buit sense columna Vigreux i sense refrigerar. Quan porta molta diciclohexilurea és convenient de fondre la DCC i filtrar la urea amb llana de vidre abans de destil·lar.

La 4-dimetilaminopiridina es recristal·litza de n-hexà.

Els dissolvents que s'empren per cromatografia líquida d'alta eficàcia analítica i semi-preparativa són grau HPLC excepte la DMF. L'aigua es purifica prèviament a través d'un sistema Millipore Milli-RQ.

Els Fmoc-aminoàcids, excepte Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-Tyr(cHex)-OH i Fmoc-Cys(Acm)-OH són comercials (Bachem o UCB). Abans d'emprar-los es comprova la seva homogeneïtat per cromatografia en capa fina o HPLC analítica. Quan és necessari es purifiquen per algun dels següents mètodes:

- recristal·lització
- extracció amb dissolvents (hexà, èter)
- reproducció d'una part del procés de síntesi: el producte es dissol en Na_2CO_3 aq al 10% (i si cal, dioxan) i s'extreu amb èter. La capa aquosa es refreda en un bany de gel i s'acidifica amb HCl conc. fins a pH=2 i el producte es separa per filtració. Si cal, es recristal·litza.

El poliestirè, copolimeritzat amb un 1% de divinilbenzè, és de la casa Bio-Rad (Bio-Beads SX-1). Abans de funcionalitzar-lo es renta exhaustivament segons el següent procediment (3): 200g de poliestirè s'agiten durant 30min amb 2x2L de benzè, metanol, DMF, dioxan/NaOH aq 2N 1/1, dioxan/aigua 1/1, dioxan/HCl aq 2N 1/1 i dioxan/aigua 1/1 a 70°C, eliminant el dissolvent de cada rentat per aspiració amb una vareta proveïda d'un frotat al seu extrem. Els darrers rentats s'efectuen en un embut frotat: 1x4L de metanol calent, benzè, metanol fred i diclorometà.

4. Cromatografia en capa fina.

Les cromatografies en capa fina s'han desenvolupat sobre plaques de gel de sílice 60 Merck (0.2mm) amb indicador de fluorescència.

Els diferents tipus de revelat emprats s'especifiquen a continuació:

Reactiu de la ninhidrina

Detecta amines primàries (coloració violeta) i secundàries (coloració groga).

Dissolució al 0.3% de ninhidrina en 10mL de γ -col.lidina, 33mL d'àcid acètic i 290mL d'etanol (203). La placa es ruixa amb aquesta dissolució i es manté durant 3min a l'estufa a 110°C. Alternativament es pot ruixar la placa amb una dissolució de ninhidrina al 0.2% en acetona i després escalfar (126, 204).

Reactiu de Pauly (126, 205)

Detecta anells fenòlics (Tyr) i imidazòlics (His) que puguin experimentar reacció de copulació, donant una coloració ataronjada.

Cal preparar tres dissolucions:

A: 9g d'àcid sulfanílic en 90mL HCl conc i 900mL d'aigua

B: NaNO_2 al 5% aquós

C: Na_2CO_3 al 10% aquós

Barrejar 5mL del reactiu A fred i 5mL del reactiu B fred i deixar-los durant 5min a la nevera. Afegir 10mL de reactiu C i ruixar la placa.

Reactiu de l'hipoclorit-tolidina (126, 206)

Detecta grups NH susceptibles de transformar-se en N-Cl (enllaços amida). Coloració blava-violeta, inestable.

La placa es manté durant 10-15min en atmosfera de clor (preparat per addició d'àcid a lleixiu comercial). S'asseca bé a l'estufa i es ruixa amb el reactiu preparat per barreja de 1g d'o-tolidina, 5g de KI, 30mL d'àcid acètic glacial i 970mL d'aigua.

Reactiu d'Ehrlich (126)

Específic pel triptofan, dóna coloració violeta-porpre.

Es prepara una dissolució de p-dimetilaminobenzaldehyd al 10% en HCl conc. La placa es ruixa, a la vitrina, amb una mescla 1/4 de la dissolució anterior i acetona.

5. Anàlisis sobre resina, d'aminoacil- i peptidil-resina.

5.1. Detecció d'amines lliures sobre un polímer. Avaluació de l'extensió dels acoblaments.

Assaig de la ninhidrina (amines primaries) (106)

Es preparen tres dissolucions:

A: 500mg de ninhidrina en 10mL d'etanol

B: 80g de fenol en 20mL d'etanol

C: mescla de 2mL de dissolució aquosa 1mM de cianur sòdic i 50mL de piri-
dina (destil.lada sobre ninhidrina)

A una alíquota de resina (3-5mg), ben rentada, en un petit tub d'assaig, s'afegeixen 3 gotes de cada un dels reactius A, B i C. S'escalfa durant 3min a 100°C i es deixa refredar. L'assaig és positiu (més de 1µmol d'amines/g polímer) quan s'observa coloració blava o blava-verdosa sobre la resina o en el sobrenadant.

Assaig de la fluorescamina (amines primaries)(107)

Una alíquota de resina (3-5mg) en una xeringa de 1mL es sotmet als següents tractaments (ca. 0.5mL): 5xCHCl₃, 5xEtOH, 5xCHCl₃, 5x5%EDIA en diclorometà, 5xCHCl₃, 5xEtOH i 5xCHCl₃. S'afegeixen unes gotes de dissolució de 5% d'EDIA en diclorometà per a mullar la resina i una punteta d'espatula de fluorescamina (Floram, Roche) en diclorometà i es deixa 10min.

A continuació es filtra i renta amb 5xCHCl₃, 5xEtOH i 5xCHCl₃. Un cop seca la resina, l'observació de fluorescència a 360nm indica assaig positiu (més de 0.6µmol d'amines/g polímer).

Assaig del cloranil (amines secundaries) (167)

A una alíquota de resina (3-5mg) en un petit tub d'assaig s'afegeixen 200 L d'acetona i 50 L d'una dissolució saturada de cloranil en toluè, i s'agita durant 5min a temperatura ambient. L'assaig és positiu quan la resina agafa coloració blava o verda (de 2 a 5µmol d'amina/g de polímer).

5.2. Detecció d'amines lliures sobre un polímer: quantificació.

Assaig de Gisin (111)

Una alíquota de resina pesada i seca (15-20mg) es tracta en una xeringa de 10mL amb una dissolució d'àcid pícric en diclorometà per a formar el picrat de les amines ancorades al polímer. Un cop ben eliminat l'àcid pícric en excés, el picrat que ha quedat ancorat iònicament al polímer es desplaça quantitativament amb un excés d'EDIA. La quantificació, per mesura de l'absorció a 358nm, del picrat d'EDIA que ha passat al filtrat dona els µmol de grups amino ancorats a la resina i, per tant, el seu grau de substitució.

A partir d'una mostra de resina amb els grups amino lliures, es segueix el següent programa d'operacions (ca. 2mL reactiu a cada etapa):

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
1	3xCH ₂ Cl ₂
2	3xDMF
3	3xCH ₂ Cl ₂
4	2x àcid pícric 0.01M en CH ₂ Cl ₂ 3 min
5	6xCH ₂ Cl ₂
6	4x 5%EDIA en CH ₂ Cl ₂
7	4xCH ₂ Cl ₂

Els filtrats procedents de les etapes 6 i 7 es recullen apart i s'enrasen amb etanol fins a un volum conegut. Per a efectuar la lectura de l'absorbància del picrat d'EDIA a 358nm (ε=14500) cal que la concentració d'etanol en la dissolució sigui superior al 80%.

Assaig de la ninhidrina quantitativa (186)

Es preparen les següents dissolucions:

A: 40g de fenol en 10mL d'etanol absolut, d'una banda, i 2mL de dissolució aquosa 0.01M de cianur potàssic en 100mL de piridina (destil·lada sobre ninhidrina) s'agiten per separat amb 4g de resina Amberlite mixed-bed MB-3 durant 45min. Un cop filtrades, les dues dissolucions es barregen per a donar el reactiu A.

B: 2.5g de ninhidrina en 50mL d'etanol absolut. El reactiu s'ha de guardar sota atmosfera de nitrogen a la nevera.

A una alíquota de resina (3-5mg) ben rentada, seca i pesada, en un petit tub d'assaig, s'afegeixen 100µL del reactiu A i 25µL del reactiu B.

Paral·lelament es prepara una mostra de referència (blanc) en un altre tub.

Els dos tubs s'escalfen en un bany de silicona a 100°C durant 8-10min i es refreden immediatament en aigua i gel. S'afegeix 1mL d'etanol al 60%.

El contingut del tub es filtra a través d'una xeringa de 1mL proveïda de fritat de polietilè porós, i el filtrat es recull en un aforat de 5mL. La resina es renta tres vegades amb 0.2mL de dissolució 0.5M de clorur de tetraetilamoni en diclorometà, els filtrats es recullen amb els precedents, i la dissolució s'acaba d'enrasar amb etanol al 60%. La mostra de referència es tracta de la mateixa manera sense que sigui necessari filtrar. Finalment, es mesura l'absorbància de la mostra problema a 570nm en relació a la de la mostra blanc (es pot agafar el valor general $\epsilon=15000$), d'on podem calcular, igual que a l'assaig de Gisin, la quantitat d'amines lliures presents per g de resina.

6. Preparació de mostres per a anàlisi d'aminoàcids.

Hidròlisi de pèptids.

A una mostra de pèptid (10-50nmol) introduïda en un tub de pyrex s'afegeix 1mL de HCl 12N que conté una quantitat coneguda, del mateix ordre que la de pèptid, d'un aminoàcid que no forma part de la seqüència i que actua com a referència interna, i 1mL d'aigua. La mostra es congela

i es deixa descongelar fent el buit per tal de desgasar-la. Després de repetir aquesta operació i sense deixar de fer buit es tanca el tub a la flama de soplet i s'introduïex a l'estufa a 110°C durant 20h. Passat aquest temps, s'obre el tub i s'evapora el HCl 6N. El residu sòlid (o una alíquota) es pot injectar a l'analitzador d'aminoàcids un cop dissolt en el tampó corresponent.

De vegades és convenient efectuar la hidròlisi en presència de fenol, que pot actuar com a captador de carbocations que es formen durant la hidròlisi i que podrien alquilar algun aminoàcid obtenint-se, per tant, una quantitat menor d'aquest residu. El procediment d'hidròlisi és exactament el mateix, substituint el HCl aquós 6N per una mescla HCl 12N/fenol/AcOH 2/1/1. Un cop acabada la hidròlisi, cal extreure el fenol amb cloroform abans d'evaporar. Alternativament, es pot simplement afegir al HCl 6N unes gotes de fenol, dur a terme la hidròlisi, extreure amb cloroform i evaporar.

Hidròlisi per a determinar triptofan.

El pèptid (10-50nmol) s'hidrolitza amb àcid metanosulfònic 4N (100-300µL) en un tub tancat durant 20h a 110°C. En comptes d'evaporar, s'afegeix un volum igual al d'àcid de NaOH 4N, amb la qual cosa la mostra queda en condicions d'ésser injectada a l'analitzador.

Alternativament, el pèptid (10-50nmol) es dissol en àcid p-toluensulfònic 3N (200µL), s'afegeixen 2mg de triptamina i s'escalfa en tub tancat a 110°C durant 20h. A la mostra s'afegeix NaOH 2N fins a pH=2.20, es centrifuga i es pot injectar a l'analitzador.

Hidròlisi de peptidil-resines.

Una alíquota pesada de peptidil-resina s'hidrolitza en un tub desgasat i tancat al buit amb HCl 12N/àcid propiònic 1/1 durant 48h a 110°C, en presència d'una referència interna. Abans d'evaporar a sequedat, cal separar la resina per filtració amb llana de vidre o per decantació després de centrifugar.

7. Protocols de síntesi.

Totes les operacions que impliquen filtració d'una matriu sòlida (excepte quan s'ha treballat a escala superior als 10g) s'han realitzat dins d'una xeringa de polipropilè proveïda d'una placa porosa (fritat) de polietilè. Les suspensions de resina s'agiten amb una vareta de teflon.

A continuació es descriuen les operacions que s'efectuen a cada pas de la síntesi. Mentre no s'indiqui el contrari, tots els tractaments són de 1.5-2min.

El mètode d'incorporació del primer aminoàcid no és universal i es descriu en cada cas.

7.1. Benzoilació dels grups hidroxil que queden lliures sobre el polímer després d'ancorar l'aminoàcid C-terminal.

La Fmoc-aminoacil-resina s'introdueix en un baló. Es suspen en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1 i s'afegeix clorur de benzoil (30 vegades d'excés respecte al total estimat de grups hidroxil lliures i piridina (33 vegades d'excés). La suspensió s'agita durant 30min en un bany de gel i 30min més a temperatura ambient. Passat aquest temps la resina es trasvassa a una xeringa de polipropilè proveïda amb un fritat de polietilè porós i es renta amb diclorometà, DMF i diclorometà (3rentats de cada). La resina, humida, es torna a trasvassar al mateix baló i es repeteix la benzoilació amb el mateix excés de reactius però en un temps total de 40min (20 a 0°C i 20 a temperatura ambient). Finalment, la resina es renta a la xeringa amb 3xdiclorometà, 3xDMF, 3xiPrOH, 3xdiclorometà, 3xDMF, 3xiPrOH i 3xMeOH, i s'asseca a pes constant.

7.2. Cicle d'incorporació d'un Fmoc-aminoàcid.

a) Desprotecció.

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
1	3 x CH ₂ Cl ₂
2	1 x piperidina/CH ₂ Cl ₂ 1/1 5min
3	1 x piperidina/CH ₂ Cl ₂ 1/1 25min
4	4 x CH ₂ Cl ₂
5	2 x DMF
6	1 x DMF
7	2 x dioxan/H ₂ O 2/1 5min
8	3 x DMF
9	3 x CH ₂ Cl ₂

Els filtrats procedents dels tractaments 2, 3, 4 i 5 es recullen apart i s'enrasen a un volum conegut amb diclorometà. La mesura de l'absorbància d'aquesta dissolució a 301nm dóna la quantitat de Fmp ($\epsilon = 7800$) formada durant la desprotecció i, per tant, la quantitat de Fmoc- o grups amino ancorats al polímer. Si partim d'una quantitat coneguda de resina podem determinar-ne, doncs, el grau de substitució.

Les dissolucions de piperidina en diclorometà s'han de preparar just abans de fer-les servir, ja que amb el temps es van formant uns cristalls d'hidroclorur de piperidini. En efecte, després de deixar unes quantes hores a temperatura ambient volums iguals de piperidina i diclorometà, s'han analitzat les agulles formades després d'haver-les filtrat i rentat amb diclorometà:

p.f. 250-251°C, lit. (207) 248.4-249.9°C

¹H-RMN (D₂O, DSS) δ 3 banda ampla 4H; 1.5 banda ampla 6H.

No s'observa senyal corresponent a grups clorometil: δ calc. 4.25,

δ exp (208) 5.7.

EM: m/e 85, 84, 70, 57, 56.

Aquestes dades indiquen que es forma hidroclorur de piperidini i no hidroclorur de N-clorometilpiperidini com s'hauria pogut esperar en

base al resultat obtingut per E.Duñach en fer reaccionar brucina amb clorur de benzil en diclorometà (208).

En el cas del cicle d'incorporació del tercer aminoàcid, el protocol de desprotecció de la dipeptidil-resina és una mica diferent:

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
2	1 x piperidina/DMF 1/1 1min
3	1 x piperidina/DMF 1/1 4min
4	2 x DMF
5	4 x CH ₂ Cl ₂
6	2 x DMF

S'efectua la lectura a l'ultraviolat (301nm) dels filtrats procedents dels tractaments 2, 3, 4 i 5. Les altres etapes (1 i 7-9) són les mateixes que quan la desprotecció s'efectua amb piperidina/diclorometà.

b) Acoblament.

i) Preparació de l'anhídrid simètric de l'aminoàcid que s'ha d'engalzar.

El Fmoc-aminoàcid (3 vegades d'excés respecte als grups Fmoc inicialment ancorats al polímer) es dissol en un petit vas de precipitats en el mínim volum de diclorometà/DMF 2/1, dissolvent primer el sòlid en DMF i afegint després el diclorometà necessari per a arribar a la proporció correcta. A aquesta dissolució, freda, s'afegeix una dissolució, freda també, de DCC en diclorometà/DMF 2/1 (1.65 equivalents). Després d'agitar durant 30min a 0°C mantenint el vas tapat amb parafilm per a evitar al màxim la humitat, es separa la urea per filtració a través d'una xeringa amb fritat, i es recull el filtrat directament sobre la resina per a efectuar l'etapa 10 del protocol d'acoblament. Es convenient que s'empri el mínim de dissolvent possible, però que mulli bé la resina.

ii) Protocol d'acoblament.

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
10	(Fmoc-aa) ₂ O 30min, no filtrar
11	1eq d'EDIA (volum necessari d'una dissolució al 5% d'EDIA en CH ₂ Cl ₂) 30min
12	3 x CH ₂ Cl ₂
13	3 x DMF
14	3 x <u>i</u> PrOH
15	3 x CH ₂ Cl ₂
16	3 x DMF
17	3 x <u>i</u> PrOH
18	3 x MeOH
19	Avaluació de l'extensió de l'acoblament.

Quan l'assaig dona positiu (queden grups amino lliures sobre el polímer), es repeteixen totes les etapes des de la 9 fins al final, preparant l'anhídrid simètric amb 2 vegades d'excés de Fmoc-aminoàcid (respecte al total de grups amino lliures inicial) i 1 equivalent de DCC. Si hi segueixen havent amines lliures sobre el polímer, cal repetir l'acoblament o bé bloquejar-les per acetilació.

iii) Incorporació del tercer aminoàcid.

Tan sols varien les etapes 10 i 11, que es converteixen en una sola: a la resina s'afegeix l'anhídrid simètric, preparat a partir de 5 vegades d'excés de Fmoc-aminoàcid i 2.5 equivalents de DCC, i l'equivalent d'EDIA des del començament de l'acoblament (60min).

iv) Preparació de l'ester d'HOBt de Fmoc-glutamina.

La Fmoc-glutamina (3 vegades d'excés respecte al total d'amines) es dissol en DMF, i s'afegeix una dissolució d'HOBt (quantitat equimolar) en DMF. La dissolució s'agita durant 10min a 0°C, s'afegeix una quantitat

equimolar (més el 10% d'excés) de DCC en diclorometà, i s'agita 10min més a 0°C. La mescla s'aboca, sense filtrar, sobre la resina per a efectuar l'acoblament.

v) Protocol d'acoblament.

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
10	Fmoc-aa-OBt, 120min
11-18	Coincideixen amb les etapes 12-19 del protocol per anhídrids simètrics.

De la mateixa manera que en el cas anterior, si cal repetir acoblament s'efectua exactament igual però amb 2 vegades d'excés de Fmoc-Fmoc-aa-OBt.

7.3. Bloqueig de grups amino lliures. Acetilació.

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
1	3 x CH ₂ Cl ₂
2	1 x DMF
3	Ac ₂ O (5eq*) en DMF, 10min, no filtrar
4	EDIA (5eq*) en DMF, 10min
5	3 x DMF
6	3 x CH ₂ Cl ₂
7	3 x <u>i</u> PrOH
8	3 x MeOH

*Aquest número d'equivalents es calcula sobre el total de grups amino (o Fmoc) que hi ha ancorats al polímer, de manera que en realitat és un excés enorme respecte als grups amino lliures residuals.

7.4. Bloqueig de grups hidroxil lliures després del cicle d'incorporació del tercer aminoàcid. Acetilació.

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
1	3 x CH ₂ Cl ₂
2	Ac ₂ O (6eq*) + piridina (6.6eq*) en CH ₂ Cl ₂ /DMF 4/1, 30min
3	3 x CH ₂ Cl ₂
4	3 x DMF
5	3 x <u>i</u> PrOH
6	3 x MeOH

*Aquest número d'equivalents es calcula igual que a l'apartat anterior, 7.3.

7.5. Acidòlisi de l'enllaç pèptid-resina.

L'acidòlisi s'efectua amb 55% de TFA en diclorometà en presència de 0.5-1% (en volum respecte a TFA/CH₂Cl₂) d'anisol com a captador de cations benzil polimèrics. La quantitat d'anisol ha de correspondre a 20 vegades d'excés respecte als possibles cations formats, que equivalen al pèptid ancorat al polímer, i és aquesta quantitat la que determina el volum total de TFA/CH₂Cl₂ (100-200 vegades més). Quan el pèptid conté triptofan cal afegir un 2% en volum de β-mercaptoetanol com a antioxidant.

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
1	3 x CH ₂ Cl ₂
2	TFA/CH ₂ Cl ₂ /anisol (β-mercaptoetanol)
3	4 x CH ₂ Cl ₂

La reacció s'efectua en una xeringa amb fritat. En primer lloc es recullen els filtrats procedents de les etapes 2 i 3 i s'evaporen a sequedat; després, si es vol rentar més la resina (3xDMA) s'afegeixen aquests filtrats i es torna a evaporar a sequedat (rotavapor de neu carbònica) sense escalfar a més de 30-35°C.

7.6. Preparació de mostres per a determinar la proporció Gly₂/Gly.

Després d'ancorar el primer aminoàcid (en els pèptids sintetitzats, glicina) a la matriu polimèrica, es separen dues alíquotes de Fmoc-aminoacil-resina (ca. 20mg) per a determinar el percentatge de dipèptid format durant la reacció d'acoblament (vegeu més amunt per al detall dels protocols a efectuar).

Una de les dues alíquotes es desprotegeix en primer lloc amb piperidina, i després d'aquest tractament es pot calcular el grau de substitució de la mostra i, aproximadament, el rendiment del primer acoblament. Posteriorment es tracta amb 55% de TFA/CH₂Cl₂ (sense anisol) i en els filtrats, evaporats a sequedat, s'analitza el contingut en glicina i diglicina.

Amb l'altra alíquota s'efectuen els mateixos tractaments però invertint l'ordre: primer acidòlisi de l'enllaç aminoàcid-resina i, després d'evaporar a sequedat els filtrats, eliminar el grup Fmoc en dissolució. Després de tornar a evaporar a sequedat, la mostra s'analitza. En aquest cas, abans d'efectuar la desprotecció convé eliminar molt bé el TFA, per tal d'evitar la formació de gran quantitat de sals (trifluoroacetat de piperidini) que poden dificultar l'anàlisi.