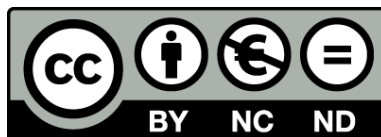




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Enrique Pedrosa Muller', with a long horizontal line underneath.

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.

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

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

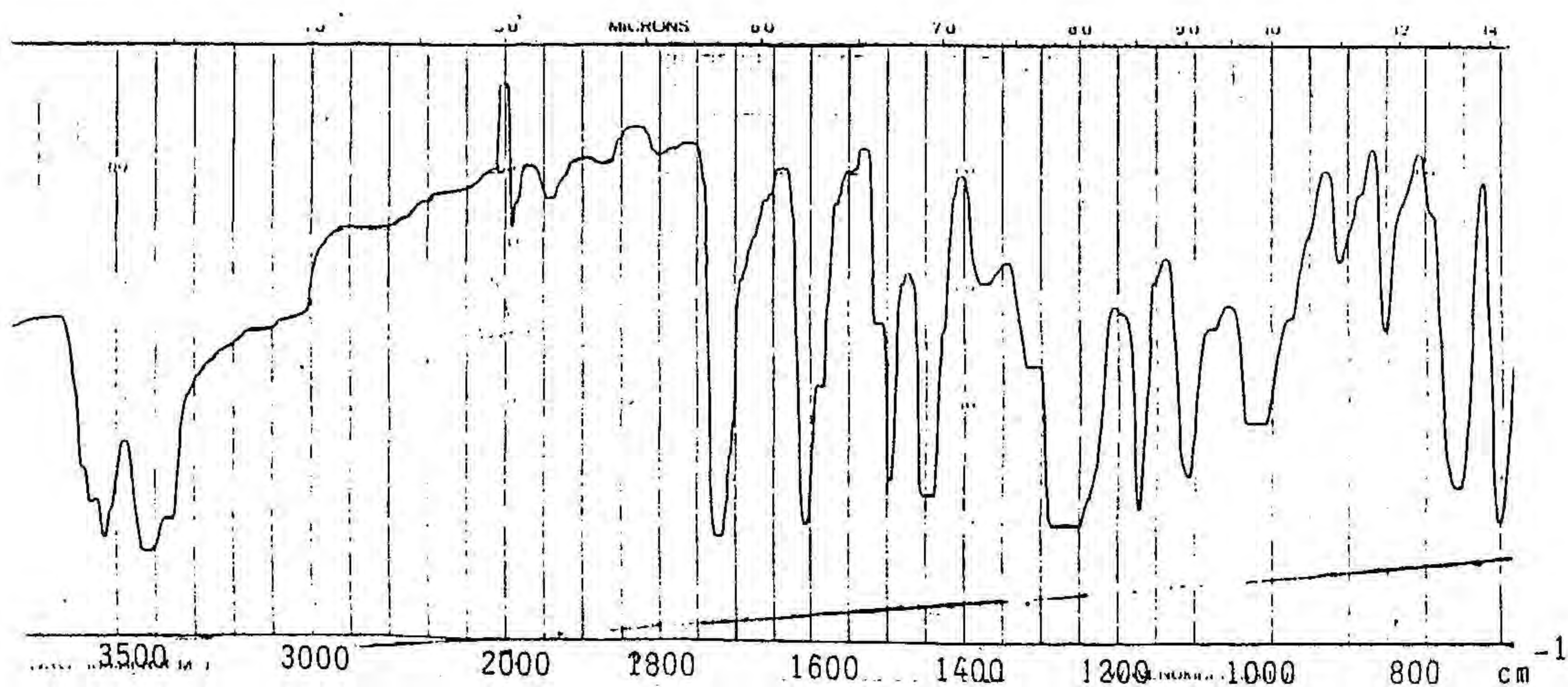
1.2.1. Síntesi del suport sòlid 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) 1 (23).

4-carboximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

A 45g de clorometilpoliestirè Bio-Rad (40.1mmol de Cl teòrics) en un baló de 1L, s'afegeixen 300mL de DMA, 15.70g (103mmol) de 4-hidroxibenzoat de metil i NaOMe en MeOH. El metòxid sòdic es prepara per addició de 45mL de metanol anhidre a 2.40g de sodi (104mmol), deixant reaccionar tot el sodi i eliminant una mica de metanol al rotavapor.

La suspensió s'agita mecànicament durant 24h a 80°C, procedint-se després a filtrar (en un embut amb placa filtrant) i rentar la resina amb 4x200mL de DMF, 2x200mL de dioxan, 4x200mL de diclorometà i 4x200 mL de metanol. Aquest procés de rentat es repeteix tres vegades més, comprovant-se que no queda residu en evaporar a sequedat els filtrats procedents dels darrers rentats. Després d'assecar a pes constant, s'obtenen 49g de polímer, l'anàlisi elemental del qual posa de manifest que tan sols es detecten traces de clor.

A continuació es mostra l'espectre infrarroig de la resina obtinguda.

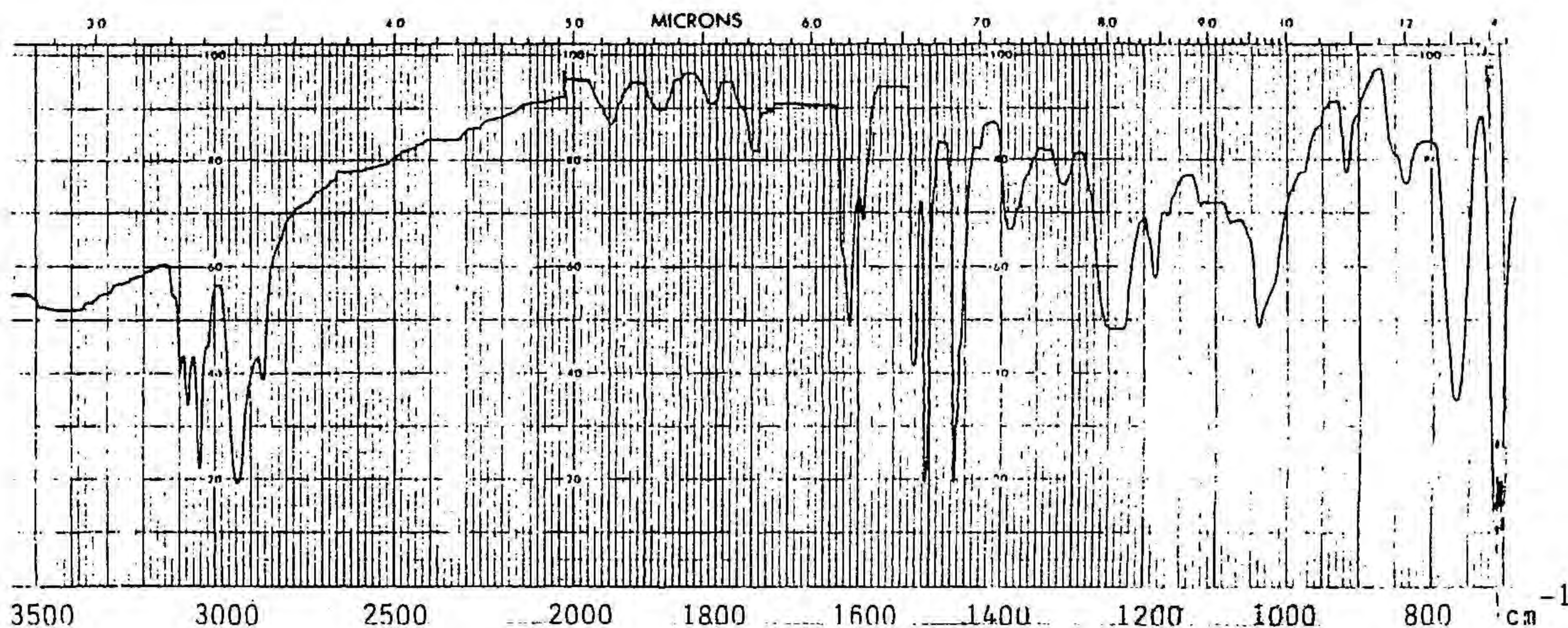


4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

En un baló de 1L equipat amb agitació mecànica es fan reaccionar 46.0g de 4-carboximetilfenoximetilpoliestirè amb 4.69g de LiAlH_4 en 700mL d'èter anhidre durant 6h a temperatura ambient. Cal anar amb compte perquè en aquest dissolvent el polímer té una gran tendència a agregar-se, dificultant l'accessibilitat de l'hidrur als centres reactius. Passat aquest temps la resina es filtra i es trasvassa a un vas de precipitats, on s'agita durant 65h amb 2L de dioxan/ H_2SO_4 1N 1/1 per tal de destruir tots els aluminats.

Després d'aquest tractament, la resina es filtra i es renta exhaustivament en un embut amb fritat: 1x300mL diclorometà, 1x150mL EtOH, 3x150mL EtOH/ H_2O 1/1, 1x150mL EtOH, 1x300mL diclorometà, 1x250mL dioxan/ H_2O 1/1, 2x200mL H_2O , 3x150mL EtOH/ H_2O 1/1, 1x150mL EtOH, 1x300mL diclorometà i 3x100mL MeOH. El procés global de rentats es repeteix tres vegades més, després de les quals es comprova que l'evaporació a sequedat dels darrers rentats no deixa residu.

S'obtenen 44.2g de resina 1 amb el següent espectre d'infrarroig:



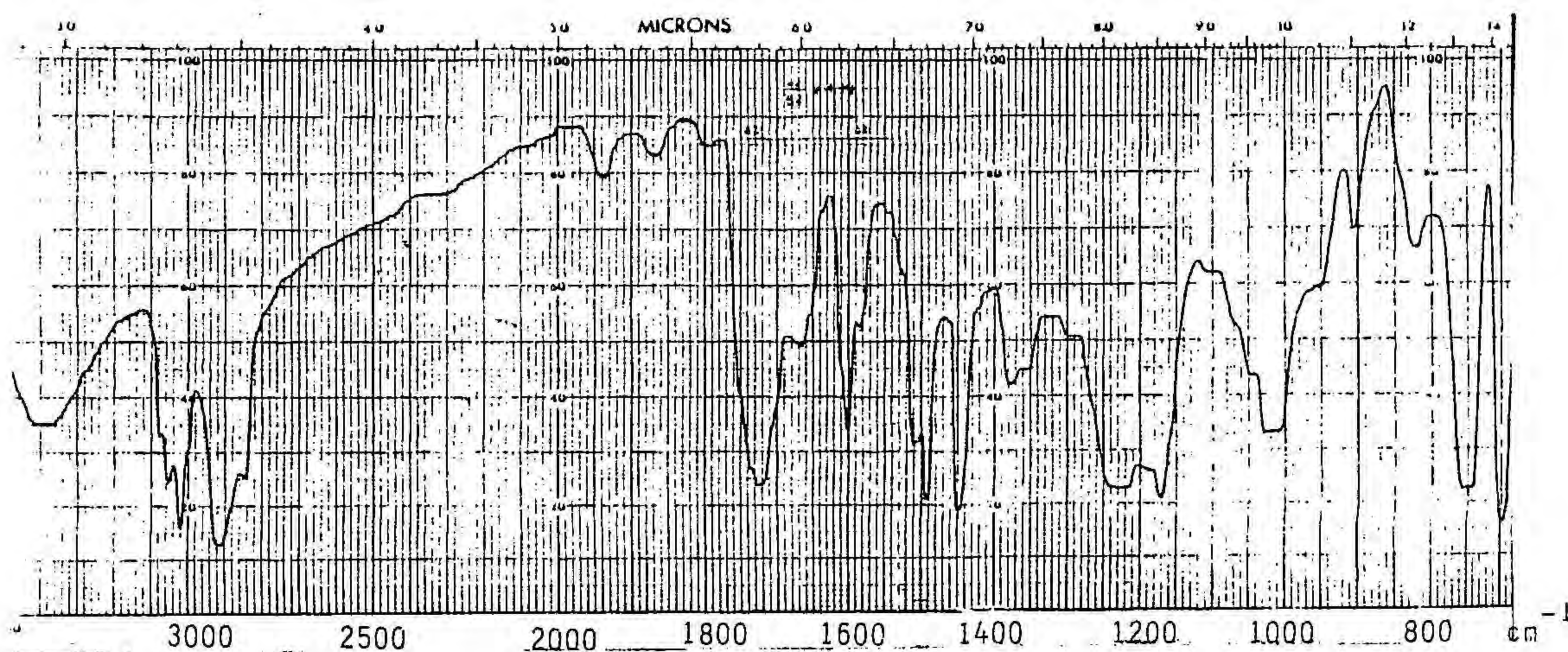
1.2.2. Ancorament de Fmoc-Gly-OH al suport sòlid 1.

Abans de procedir a ancorar l'aminoàcid a la matriu polimèrica es purifica una mica la Fmoc-glicina comercial rentant-la amb n-hexà fred

en una xeringa i controlant el procés per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 3/1). Es recupera el 98% del producte.

2.00g de resina 1 (aproximadament 1.4mmol de grups $-\text{OH}$) es suspèn en 25mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1. Després de refredar en un bany de gel s'afegeixen, successivament, quantitats equimolars (2.1mmol) de Fmoc-glicina (0.64g), DMAP (0.26g) i DCC (0.48g) dissoltes en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1. La suspensió s'agita 30min a 0°C i 5h a temperatura ambient. Passat aquest temps, la resina es filtra i renta (15-20mL de dissolvent per rentat): $3\times\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $3\times\text{DMF}$, $3\times\text{iPrOH}$, $3\times\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $3\times\text{DMF}$ i $3\times\text{iPrOH}$.

L'aminoacil-resina s'analitza per diferents mètodes, tal com s'ha indicat a la part teòrica, i per espectroscòpia infrarroja.



Abans de continuar la síntesi els grups $-\text{OH}$ que han quedat lliures es benzoïlen tal com hem descrit als protocols generals de síntesi (vegeu materials i mètodes 7.1).

9-fluorenilmetanol (112).

A una suspensió de 9.7g de NaH al 80% en 200mL d'èter etílic anhidre s'afegeixen 16.6g (0.1mmol) de fluorè (recristal·litzat d'etanol i ben sec) i 18mL de formiat d'etil destil·lat. La mescla s'escalfa a reflux durant 10h, passades les quals es refreda i s'hi afegeixen petits troços

de gel per a destruir l'excés d'hidrur. Després d'addicionar 200mL d'aigua, es separen les capes etèria i aquosa i aquesta es renta amb 150mL de *n*-hexà. La capa aquosa es filtra per tal d'eliminar un petit residu sòlid que resta en suspensió, i el filtrat s'acidifica amb 30mL d'àcid acètic glacial. Es separa un oli que s'extreu amb tres porcions de 100mL de diclorometà. Aquest extracte orgànic es renta un cop amb aigua i un altre amb una dissolució aquosa de NaHCO₃ 1M, s'asseca amb MgSO₄ i finalment s'elimina el dissolvent al rotavapor. El residu es dissol en 200mL de metanol i s'hi afegeixen, en petites porcions, cada 2-3min, 4g de NaBH₄, agitant-se després durant 2h a temperatura ambient. Passat aquest temps, l'addició de 600mL d'aigua i després 30mL d'AcOH provoca la formació d'un precipitat blanc molt voluminós, que encara s'agita durant 1.5h més. Després es filtra i renta, obtenint-se 14.9g de producte que es recristal·litza de hexà/CHCl₃ 1/1. S'obtenen 14.5g de 9-fluorenilmethanol (74% de rendiment), p.f. 99-102°C, lit. (112) 98.5-100.5°C. Mitjançant cromatografia en capa fina, emprant l'eluent CHCl₃/MeOH 3/1, es comprova que el producte obtingut (Rf=0.61) no conté impureses.

IR (KBr) 3250-3300, 1440, 1055, 1015, 755 i 740cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃) δ7.2-7.9 m, 8H (ar); 4.05 s, 3H (CHCH₂); 1.55 s, 1H (OH).

Cloroformiat de 9-fluorenilmethyl (22).

A una dissolució freda de fosgè al 20% en toluè (0.15mol) s'afegeix, lentament, amb agitació magnètica, una dissolució de 20g (0.10 mol) de 9-fluorenilmethanol en 150mL de dioxan. Els gasos que es puguin desprendre al llarg de la reacció es fan passar a un baló que conté CaCl₂ anhidre (per a evitar la humitat a la mescla de reacció) i després a una dissolució concentrada de NaOH. La dissolució de reactius en toluè/dioxan s'agita durant 4h a 0°C i 18h a temperatura ambient. L'excés de fosgè, el toluè i el dioxan s'eliminen fent el buit amb una trompa i mantenint l'agitació magnètica, escalfant el baló com a màxim fins a 30°C en un bany d'aigua. Un cop eliminat el dissolvent queda un oli que acaba solidificant.

El producte es recristal·litza d'èter anhidre. Per separar els cristalls de les aigües mares el millor és eliminar les aigües mares per succió amb una pipeta Pasteur mentre es manté el cristal·litzador en gel

(cal evitar que s'atemperi la dissolució etèria perquè el Fmoc-Cl és molt soluble en èter a temperatura ambient). Els cristalls es renten amb èter fred que s'elimina igualment per succió. Després de recristal·litzar el producte, s'obtenen 14.8g de Fmoc-Cl (56%) p.f. 62-63°C, lit. (22) 61.5-63°C.

IR (KBr) 1770, 1450, 1140, 825, 760 i 740 cm^{-1} .

^1H -RMN (CDCl_3) δ 7.1-7.8 m, 8H (ar); 4.5 m 3H (CHCH_2).

N-(9-fluorenilmetil)piperidina

0.52g de Fmoc-Cl i 15mL de piperidina (150mmol) s'agiten durant 40min a temperatura ambient. La mescla de reacció s'aboca sobre 250mL d'aigua freda, i el precipitat que es forma es filtra i renta amb aigua. S'obtenen 0.51g de Fmp (96%) de p.f. 119-120°C, lit.(22) 116-117°C.

Una petita mostra es recristal·litza de n-hexà i es caracteritza per anàlisi elemental: teòric per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}$ C 86.6, H 8.0 i N 5.3; trobat: C 85.9, H 8.0, N 5.3.

^1H -RMN (CDCl_3) δ 7.1-7.9 m, 8H (ar); 4.0 t, 1H (CH fluorè); 2.4-2.7 m, 6H (3 metilens units a N); 1.4-1.9 m, 6H.

EM: m/e 263, 178, 165, 99 i 98.

1.2.3. Síntesi del segment peptídic protegit 4.

1.2.3.A. Síntesi del pèptid.

Hem partit de 2.05g de Fmoc-glicil-resina (0.38mmol/g) amb els hidroxils residuals benzoilats.

Les quantitats de Fmoc-aminoàcid i DCC que s'empren a cada acoblament s'indiquen a continuació. A la part teòrica es donen les dades de mmol de Fmp que s'obtenen a cada etapa de desprotecció.

Fmoc-Pro-OH. S'efectua un primer acoblament amb un excés d'aminoàcid de 3 vegades, és a dir amb 2.16mmol (728mg) de Fmoc-prolina i 1.08mmol (246mg) de DCC. L'assaig de la fluorescamina dóna positiu. El segon acoblament es

fa igualment amb 3 vegades d'excés d'aminoàcid (1.5eq d'anhídrid). L'assaig de la fluorescamina és negatiu.

Fmoc-Arg(Tos)-OH. Primer acoblament: 4 vegades d'excés d'aminoàcid, la qual cosa implica fer l'anhídrid amb 2.96mmol d'aminoàcid (1.631g) i 1.63mmol de DCC (336mg). L'extensió de l'acoblament s'avalua per desprotecció d'una petita alíquota (4.7mg) de Fmoc-tripeptidil-resina.

Fmoc-Leu-OH. S'efectuen dos acoblaments, el primer amb 4 vegades d'excés d'aminoàcid (2.72mmol, 960mg) i 2 equivalents de DCC (1.7mmol, 351mg), i el segon amb 3 vegades d'excés d'aminoàcid (720mg de Fmoc-Leu-OH i 232mg de DCC). L'assaig de la fluorescamina dóna lleugerament positiu, però el de la ninhidrina és negatiu. No es repeteix acoblament.

Al final de la síntesi tenim 1.93g de Fmoc-tetrapeptidil-resina.

El primer tractament amb 55% de TFA en diclorometà s'efectua sobre el total de peptidil-resina de que disposem, 1.93g, obtenint-se 198µmol de pèptid (58% de rendiment). D'un segon tractament amb 55% TFA/diclorometà s'obtenen 2.6µmol més de producte. Es du a terme un tercer tractament amb 100% de TFA, que proporciona 1.1µmol de producte.

La resina procedent dels tres tractaments amb TFA es sotmet finalment a una acidòlisi amb HF anhidre en presència de 10% d'anisol. La descripció del protocol experimental es troba a l'apartat 1.3.2. S'obtenen 2.7µmol de pèptid desprotegit.

1.2.3.B. Purificació del pèptid 4.

79.2µmol de crú peptídic es pre-purifiquen, en primer lloc, a través d'una columna oberta empaquetada amb 12g de gel de sílice 60 eluint amb CHCl₃/MeOH/AcOH 70/20/5. Un cop identificat el producte que correspon al pèptid 4 (vegeu part teòrica) el total de fraccions que contenen el pèptid es purifiquen per cromatografia líquida preparativa d'alta eficàcia en un aparell Waters Prep-LC/System 500 a través de gel de sílice 60.

L'elució s'efectua a 200mL/min amb tres eluents de polaritat creixent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\underline{i}\text{PrOH}/\text{AcOH}$ 88/1.5/0.5 (3400mL), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\underline{i}\text{PrOH}/\text{AcOH}$ 88/10/5 (2600mL) i $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 88/10/5 (2000mL). El dissolvent més polar és el que elueix el producte desitjat, que s'acaba de purificar per filtració molecular sobre sephadex LH-20 (18g de gel, columna de 100x1cm) eluint amb metanol a 6mL/h. Finalment, s'obtenen 28 μmol de pèptid 4 purificat (35% de rendiment).

20 μmol del crú peptídic procedent de l'acidòlisi amb TFA es sotmeten, en primer lloc, a una cromatografia de filtració molecular sobre Sephadex LH-20 (18g de gel empaquetats en una columna de 100x1cm). El producte s'elueix amb metanol a 6mL/h. Les fraccions que contenen el pèptid s'ajunten i evaporen a sequedat, i es cromatografien a través d'una columna Lobar de gel de sílice 60 (mida A) eluint amb $\text{CHCl}_3/\underline{i}\text{PrOH}/\text{AcOH}$ 88/5/2 a 120mL/h. El producte es recromatografia en les mateixes condicions per a donar 4.6 μmol de pèptid 4 pur (23% de rendiment).

L'anàlisi de les diferents fraccions recullides a les cromatografies líquides s'efectua per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 70/20/5, $R_f = 0.55$).

1.2.4. Síntesi del segment peptídic protegit 3.

1.2.4.A. Síntesi del pèptid.

Abans de procedir a l'engalzament dels aminoàcids sobre la Fmoc-glicil-resina (vegeu 1.2.2) es purifica una mica la Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH comercial reproduint part del protocol de síntesi dels Fmoc-aminoàcids. El producte (1g) es dissol en 15mL de dioxan, s'afegeixen 10mL de dissolució aquosa al 10% de Na_2CO_3 i 80mL d'aigua i es refreda. La suspensió s'extreu amb èter (3x50mL), i la capa aquosa s'acidifica amb HCl conc. fins a pH=2. Després de deixar-la unes hores a la nevera, es separa el precipitat format, es renta i s'asseca. Aquest producte és el que s'empra a la síntesi.

Intents de purificar la Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH per rentat del sòlid amb n-hexà, i per cromatografia en columna sobre gel de sílice eluint amb hexà/cloroform no condueixen a un producte més pur.

Partim de 1,86g de Fmoc-glicil-resina benzoilada amb un grau de substitució de 0.33mmol/g.

A la part teòrica es consignen els mmol de Fmp que s'han quantificat a cada etapa de desprotecció. A continuació s'indiquen les quantitats de Fmoc-aminoàcid i DCC emprades a cada acoblament.

Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH. Primer acoblament: 1.86mmol de tirosina (1.044g) i 1.02 mmol de DCC (211mg). Segon acoblament: 1.24mmol de Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH (696mg) i 0.68mmol de DCC (140mg). Després d'aquest acoblament l'assaig de la fluorescamina dóna encara lleugerament positiu, de manera que abans de desprotegir amb piperidina s'aceten els grups amino residuals amb anhidrid acètic i EDIA. Després de l'acetilació l'assaig dóna negatiu.

Fmoc-Ser(Bzl)-OH. Es du a terme un acoblament amb cinc vegades d'excés d'aminoàcid (2.9mmol, 1.21g) i 2.5 equivalents de DCC (1.6mmol, 330mg). En aquest cas, l'equivalent d'EDIA s'afegeix des del començament de l'acoblament. L'assaig de la fluorescamina dóna negatiu. Per a bloquejar els grups hidroxil que poden haver quedat lliures si hi ha hagut formació de dicetopiperazines s'efectua una acetilació amb anhidrid acètic i piridina.

Fmoc-Trp-OH. Primer acoblament: 1.74mmol d'aminoàcid (741mg) i 0.96mmol de DCC (198mg). Segon acoblament: 1.16mmol d'aminoàcid (494mg) i 0.64mmol de DCC (132mg). Després del segon acoblament l'assaig de la fluorescamina és negatiu.

Fmoc-His(Tos)-OH. Primer acoblament: 1.74mmol d'aminoàcid (926mg) i 0.96mmol de DCC (198mg). Segon acoblament: 1.16mmol d'histidina protegida (617mg) i 0.64mmol de DCC (132mg). Després del segon acoblament, l'assaig de la fluorescamina dóna lleugerament positiu, de manera que es procedeix a acetilar amb anhidrid acètic i EDIA.

Glp. Els acoblaments s'efectuen amb un excés d'aminoàcid i DCC més gran, donat el gran increment de Fmp detectat en l'etapa prèvia de desprotecció (vegeu part teòrica). Primer acoblament: 2.43mmol de Glp (314mg) i 1.34mmol de DCC (276mg). Segon acoblament: 1.62mmol de Glp (209mg) i 0.89mmol de DCC (184mg). Després d'aquests dos acoblaments, l'assaig de la fluorescamina és clarament positiu. Decidim dur a terme un tercer acoblament però sense preformar l'anhídrid simètric, directament amb 2.43mmol d'aminoàcid (314mg) i 2.67mmol de DCC (551mg). Aquest mètode implica substituir les etapes 10 i 11 del protocol general de síntesi per:

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
10	Glp, 10min, no filtrar
11	DCC, 60min

Després d'aquest intent l'assaig de la fluorescamina és negatiu.

2.306g de peptidil-resina es tracten amb 55% de TFA/diclorometà en presència de 2% de β -mercaptoetanol durant 1h a temperatura ambient. La resina es filtra i renta amb diclorometà. Els filtrats s'evaporen a sequedat i s'ajunten amb el filtrat procedent d'un darrer rentat de la resina amb metanol. Obtenim 325 μ mol de pèptid (56% de rendiment). S'efectua una segona acidòlisi amb 30% de TFA/diclorometà i 1% de β -mercaptoetanol per a intentar amillorar el rendiment d'aquesta etapa. En aquest cas s'ajunten directament els filtrats procedents de l'acidòlisi i els rentats amb diclorometà i metanol. S'obtenen 9.6 μ mol de pèptid (1.7% de rendiment).

1.2.4.B. Purificació del pèptid 3.

Les cromatografies d'aquest pèptid es segueixen per mesura de l'absorbància a 280nm (màxim d'absorció de tirosina i triptofan) de l'eluit, a més a més de per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 10/10/1, $R_f=0.43$).

En primer lloc, el crú peptídic (275 μ mol) es sotmet a una filtració molecular sobre Sephadex LH-20 (18g de gel, 100x1cm) eluint amb metanol a 6mL/h. La totalitat del producte es cromatografia en cinc vegades. Les fraccions desitjades s'ajunten i evaporen i s'apliquen a un cartutx de gel de sílice 60 d'un sistema de cromatografia líquida preparativa d'alta eficàcia (Waters). El pèptid s'elueix amb CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 57/40/3 a 200mL/min. Finalment el producte es recromatografia sobre Sephadex LH-20 en les mateixes condicions inicials. S'obtenen 98 μ mol de pèptid purificat (36% de rendiment).

1.3. Síntesi del LHRH.

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

1.3.1.A. Síntesi d' α -aminobenzilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

Benzoilpoliestirè.

En un reactor de 5 boques proveït d'agitació mecànica i entrada de nitrogen, es suspenen 12g de poliestirè rentat en 125mL de nitrobenzè. Es refreda en un bany de gel i aigua i s'afegeixen 4mL de clorur de benzoil (34mmol) dissolts en 10mL de nitrobenzè gota a gota. A continuació, s'afegeixen 9.1g de AlCl₃ (68mmol) en petites porcions mirant de que agafi el mínim d'humitat possible. Acabada l'addició dels reactius, es deixa reaccionar la mescla amb agitació durant 2h a 4-8°C (sense que es produeixi congelació del dissolvent). La reacció es segueix per espectroscòpia infrarroja (aparició d'una banda de carbonil a 1675cm⁻¹). Passades les dues hores, a la mescla de reacció s'afegeixen 100mL d'aigua i s'agita 5min més per tal de destruir l'excés de AlCl₃. La resina es filtra i renta amb nitrobenzè (3x60mL), EtOH/H₂O 1/1 (4x180mL), EtOH (4x90mL) i CH₂Cl₂ (4x60mL), i s'asseca fent el buit.

α -(N-formil)-aminobenzilpoliestirè.

El benzoilpoliestirè es suspen en 130mL de nitrobenzé i s'afegeixen 35g de formiat amònic, 43mL de formamida i 54mL d'àcid fórmic al 85%. La suspensió s'escalfa a 170-180°C, amb agitació mecànica, i a partir de les dues primeres hores es va afegint àcid fórmic a mesura que es comprova que va destil.lant (el reactor està equipat amb un Dean-Stark). El progrés de la reacció de Leuckart es pot anar seguint per espectroscòpia infrarroja, apareix una banda de carbonil (grup formil) a 1700cm^{-1} i va desapareixent la de 1675cm^{-1} . Quan la banda de 1700cm^{-1} és clarament més intensa que la de 1675cm^{-1} , la reacció s'atura, es deixa refredar la suspensió fins a temperatura ambient i es filtra i renta la resina amb EtOH/H₂O 1/1 (4x180mL), EtOH (4x90mL) i diclorometá (4x60mL). La resina s'asseca fent el buit.

Hydroclorur d' α -aminobenzilpoliestiré.

En un reactor proveït d'agitació magnètica es suspen la resina obtinguda en el pas anterior en etanol, i s'hi afegeixen 25mL de HCl 12N. La mescla es deixa a reflux (escalfant a 110-120°C) durant 2h. Després de deixar refredar a temperatura ambient, la resina es renta amb etanol fins que els filtrats donen negatiu l'assaig de clorurs (amb AgNO₃). La resina benzhidrilamina, en forma d'hydroclorur, s'asseca a pes constant. Per espectroscòpia infrarroja s'observa disminució de la banda de carbonil respecte a les de 1600 i 1500cm^{-1} .

El grau de substitució es determina per valoració espectrofotomètrica amb àcid pícric (mètode de Gisin).

1.3.1.B. Estabilitat del grup protector Fmoc a l' α -aminobenzilpoliestirè.

Síntesi de l'ester metílic de la Fmoc-glicina

i) S'afegeixen 75mL de MeOH/HCl 3.5N recentment preparat a 5g de glicina

recristal·litzada i es deixa 3h agitant a temperatura ambient. La mescla de reacció s'evapora a sequedat i s'acaba d'eliminar l'aigua formada per addició de benzè anhidre i evaporant l'azeòtrop. L'esterificació es repeteix dues vegades més, després de les quals ja no s'observa glicina per cromatografia en capa fina. El producte es recristal·litzava amb *n*-hexà/èter/metanol 1/1/1 i s'obtenen uns cristalls de p.f. 178-180°C, amb $R_f=0.04$ ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 3/1, revelat amb ninhidrina). El rendiment és del 93%. IR (KBr) 3000, 1760 i 1580cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , DSS) 4.9 s, 2H (CH_2 Gly) i 3.8 s, 3H (OMe).

ii) Una dissolució de 0.5g de Fmoc-Cl (1.93mmol) en 10mL d'èter anhidre s'addiciona lentament a 0.24g de HCl·H-Gly-OMe (1.90mmol) en 60mL d'èter anhidre i 0.5mL de piridina (6.22mmol) refredats en un bany de gel. Al cap d'una hora es detura la reacció i es filtra el precipitat d'hidroclorur de piridini. La dissolució resultant es renta amb NaHCO_3 0.5M (2x15mL), aigua (3x10mL), àcid cítric 0.5M (2x10mL) i aigua (2x10mL). La capa orgànica s'asseca amb MgSO_4 i s'evapora a sequedat, obtenint-se una mescla de dos productes dels quals el majoritari és 9-fluorenilmetanol (70% per $^1\text{H-RMN}$). Per recristal·lització en *n*-hexà/èter 1/1 s'obtenen 51mg del producte minoritari, que s'identifica com a carbonat de bis-(9-fluorenilmetil), p.f. 143°C.

IR (KBr) 3000, 1750, 1425, 1255 i 750cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 7-7.9 m, 16H (H ar.) i 4-4.7 m, 6H.

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ 155.2 (carbonil); 143.3 i 141.3 (C quaternaris aromàtics); 127.9, 127.2, 125.2 i 120.1 (altres C aromàtics); 70.0 (CH) i 46.9 (CH_2).

EM: m/e 418 (detectat), 240, 165, 139, 115, 98, 87 i 74.

Anàlisi elemental: calc. per $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_3$: C 83.2, H 5.3. Trobada: C 82.1, H 5.3.

Com a alternativa a aquest mètode de síntesi, que intenta la protecció del grup α -amino alliberant la base in situ, s'intenta la mateixa reacció alliberant prèviament la base amb dietamina:

Es suspen 1.0g d'hidroclorur de glicinat de metil (7.97mmol) en 8mL de cloroform i a continuació s'afegeix una quantitat equimolar (0.82mL) de dietilamina. Al cap d'una hora es filtra l'hidroclorur de dietilamoni i de la

dissolució, que s'evapora a pressió reduïda (100mmHg) s'obtenen 0.54g (77%) de glicinat de metil.

1.58g de Fmoc-Cl (6.11mmol) dissolts en 30mL d'èter anhidre s'afegeixen a una suspensió de 0.54g de glicinat de metil (6.11mmol) en 70mL d'èter i 0.69mL de piridina (6.22mmol). Acabada l'addició, la mescla de reacció es deixa 1h més a 0°C i una altra hora a temperatura ambient. Per cromatografia en capa fina s'observa que resta glicinat de metil sense reaccionar, per aixó s'afegeixen 1.07g (4.12mmol) més de Fmoc-Cl i es manté la reacció 1h més a temperatura ambient. Es separa l'hidroclorur de piridini format per filtració, la dissolució s'evapora a sequedat i s'obtenen 0.95g d'una mescla que conté majoritariament Fmoc-Gly-OMe acompanyat d'impureses de difícil separació.

Esterificació de Fmoc-Gly-OH.

0.147g de Fmoc-Gly-OH comercial (0.441mmol) s'esterifiquen amb 5mL de MeOH/HCl 3.5N durant 3h, procedint després a evaporar a sequedat i eliminar l'aigua formada mitjançant addició de benzè anhidre i evaporació de l'azeòtrop. Aquest procés es repeteix tres vegades, donant 0.153g de Fmoc-Gly-OMe que, després d'ésser rentats amb *n*-hexà a reflux, es recristal·litzen d'èter isopropílic, obtenint-se 112mg (73% de rendiment) de producte de p.f. 103°C i Rf=0.75 (CHCl₃/EtOH 3/1) i 0.63 (CHCl₃/EtOH 9/1). IR (KBr) 3300, 1720, 1560, 1450, 1255 i 1060cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ7.2-8 m, 8H (ar.); 5.2 s, 1H; 4.1 d, 2H; 3.8 s, 3H (OMe). UV (CH₂Cl₂) 301nm, ε=7100; 290nm, ε=5900; 267nm, ε=21500.

Estudi de l'estabilitat de Fmoc-Gly-OMe a l'α-aminobenzilpoliestirè.

En primer lloc, cal obtenir la base lliure a partir de l'hidroclorur de la resina benzhidrilamina. Es segueix el següent programa:

4xCH₂Cl₂ (2min), 4x 5% EDIA/CH₂Cl₂ (5min) i 4xCH₂Cl₂ (2min).

51mg de Fmoc-Gly-OMe (0.16mmol) es dissolen en diclorometá, enrasant a 5mL, i d'aquesta dissolució separem 0.35mL per tal de coneixer la quantitat d'amines a temps zero mitjançant l'assaig de la ninhidrina.

La resta de la dissolució s'afegeix a una quantitat equimolar d' α -amino-bezil-resina (161mg de $f=0.85\text{mmol NH}_2/\text{g}$ resina) i la suspensió s'agita durant 48h. En el transcurs de la reacció i a temps de 2, 4, 6, 9, 24, 32 i 48h s'analitza la dissolució per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 3/1) revelant amb el reactiu de la ninhidrina. Passades les 48h es filtra i renta la resina i dels filtrats, enrasats a un volum de 50mL amb diclorometà, es separen alíquotes de 1.0mL per a dur a terme l'assaig quantitatiu de la ninhidrina (131).

Preparació del reactiu de la ninhidrina.

Es dissolen 200mg de ninhidrina i 30mg d'hidridantina en 7.5mL de 2-metoxietanol exempt de peròxids i s'afegeixen 2.5mL de tampó acetat sòdic 4M de pH=5.6 passant-hi nitrogen per a evitar l'oxidació de la ninhidrina per l'aire. El tampó es prepara a partir de 27.2g d'acetat sòdic trihidratat dissolts en 30mL d'aigua prèviament bullida i 5mL d'àcid acètic, afegint aigua fins a 50mL.

Assaig de la ninhidrina.

1mL de la dissolució problema en CH_2Cl_2 (en el cas de la mostra apartada inicialment, es prenen alíquotes de 0.1mL que s'evaporen a sequedat i posteriorment es dissolen en 1mL de diclorometà) i 1mL del reactiu de la ninhidrina s'agiten bé durant 10s i es mantenen 15min exactes en un bany de silicona a 100°C . La dissolució es refreda en gel durant 10min i s'hi afegeixen 5mL d'etanol/aigua 1/1, s'agita durant 30s i tot seguit es fa la mesura de l'absorbància a 570nm.

El patró de glicinat de metil es prepara dissolent 17.7mg (0.141mmol) de l'hidroclorur de glicinat de metil en 1mL d'aigua.

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

En primer lloc s'ha d'obtenir la base, lliure a partir de l'hidroclorur de l' α -aminobenzilpoliestirè, tal com s'ha descrit a l'apartat anterior (rentats amb CH_2Cl_2 , tractament amb 5% EDIA en diclorometà i més rentats amb diclorometà i amb DMF).

47 μmol de pèptid 4 dissolts en 4mL de DMF i 47 μmol (6.5mg) d'HOBt en 1mL de DMF s'afegeixen a 177mg d' α -aminobenzilpoliestirè (de $f=0.84$ mmol/g) i la mescla s'agita a 0°C durant 10min. Després d'afegir 47 μmol de DCC (9.7mg) en 1mL de DMF la reacció continua 2h a 0°C i 46h a temperatura ambient. La Fmoc-tetrapeptidil-resina es filtra i renta amb 4xDMF, 4x CH_2Cl_2 , 4xMeOH, 2xDMF, 2x CH_2Cl_2 i 2xMeOH.

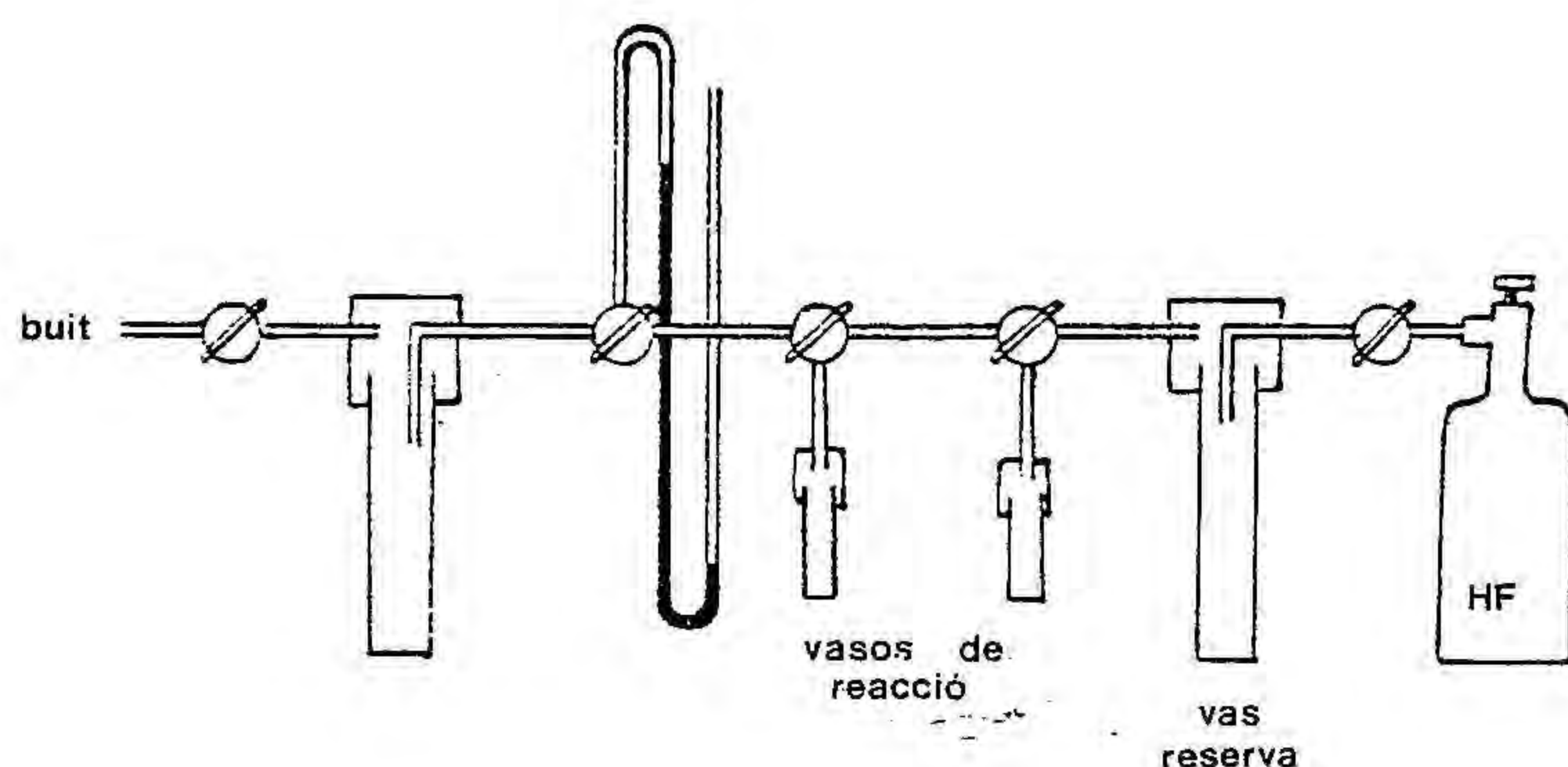
Els grups amino polimèrics que no han reaccionat es bloquegen mitjançant dues acetilacions successives amb 0.12mL d'anhídrid acètic (1.27 mmol) i 0.20mL d'EDIA (1.14mmol) en DMF en les mateixes condicions descrites en els protocols generals de síntesi (vegeu materials i mètodes, 7.3). L'assaig de la ninhidrina efectuat sobre una alíquota de resina dóna negatiu.

L'extrem amino-terminal de la Fmoc-peptidil-resina s'allibera per tractament amb 50% de piperidina en diclorometà. La quantificació de la Fmp formada en aquesta etapa mostra que tenim 9.8 μmol de pèptid ancorats al polímer (21% de rendiment).

24.6 μmol de pèptid protegit 3 s'ancoren a la H-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-resina per reacció amb 24.6 μmol de DCC (5.1mg) i HOBt (3.3mg) en les mateixes condicions que les descrites per l'ancorament del pèptid 4 a la resina benzhidrilamina. Després del primer acoblament l'assaig de la ninhidrina dóna negatiu.

1.3.2. Obtenció del crú peptídic. Purificació del LHRH.

198mg de peptidil-resina es tracten amb 5mL de HF anhidre en presència de 0.5mL d'anisol durant 1h a 0°C en un aparell de teflon i Kel-F l'esquema del qual s'indica a continuació.



La peptidil-resina i l'anisol s'introdueixen en un dels dos vasos de reacció, amb un nucli magnètic. L'àcid fluorhídric anhidre es condensa, en primer lloc, en el vas reserva, i després es destil·la la quantitat necessària al vas de reacció (refredat amb un bany d'acetona/CO₂). Quan s'acaba aquesta destil·lació, es sumergeix el vas de reacció en aigua/gel i es deixa reaccionar la peptidil-resina amb HF-anisol durant 1h a 0°C amb agitació magnètica eficaç. Passat aquest temps, es torna a refredar el vas amb acetona i neu carbònica i es procedeix després a eliminar el HF retirant el bany i fent el buit amb una trompa d'aigua i sense deixar d'agitar (per a evitar que saltin la resina i la dissolució amb el pèptid lliure). Quan s'ha eliminat totalment el HF, la resina es trasvassa a una xeringa de 50mL proveïda de freat rentant el vas de reacció amb èter (3 vegades), AcOH 96% (3 vegades) i aigua (3 vegades). S'ajunten els filtrats procedents dels tractaments amb àcid i aigua (la fase etèria conté anisol i subproductes de la reacció no peptídics), es dilueixen amb més aigua i es liofilitzen. El liofilitzat es redissol en aigua i es torna a liofilitzar. S'obtenen 5.54µmol de crú peptídic (59% de rendiment).

2.47 μmol de crú peptídic es cromatografiem a través de Sephadex G-15 (columna de 150x1.2cm) eluint amb AcONH_4 0.1M pH=8.5 a 24mL/h. Les fraccions recollides s'analitzen per mesura de l'absorció a l'ultraviolat a 230 i 280nm (vegeu cromatograma a la part teòrica) i per HPLC analítica (Lichrosorb C_{18} , Merck; eluent: 20% CH_3CN /fosfat de trietilamoni 0.05M pH=3.0; flux: 2mL/min; detecció a 280nm).

Les fraccions que contenen el producte desitjat (68% de rendiment) s'ajunten i liofilitzen, i es sotmeten a una cromatografia de bescanvi catiònic sobre carboximetilcel.lulosa CM-52 Whatman (25x1.2cm), eluint el pèptid amb un gradient linial d'acetat amònic: tampó A: conductivitat 4mS, pH=5.10; tampó B: conductivitat 12mS, pH=6.30. Les fraccions eluides s'analitzen com ja hem indicat. El rendiment d'aquesta cromatografia és del 90%.

Finalment, el pèptid es dessala mitjançant filtració molecular sobre Bio-Gel P-2 (100x1.2cm) eluint amb AcOH 0.1M a 33mL/h (rendiment 92%). El rendiment global de la purificació és del 56%.

1.4. Síntesi dels segments peptídics protegits Glp-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-NH-NH₂ 5 i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH-NH₂ 6.

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

4-(fenoxicarboniloximetil)fenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè).

4.97g de 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè (0.75mmol de HO-polímer) es suspenen en 50mL de diclorometà. En primer lloc s'afegeixen 3.1mL de piridina (3.8mmol), la suspensió es refreda en un bany de gel i s'afegeixen 4.7mL de cloroformiat de fenil (3.8mmol). La mescla es deixa reaccionar, amb agitació magnètica, durant una nit a 4°C, evitant la humitat. Posteriorment es filtra i es renta amb 4xH₂O freda, 4xdioxan/H₂O 1/1, 4xMeOH, 4xCH₂Cl₂ i 4xDMF.

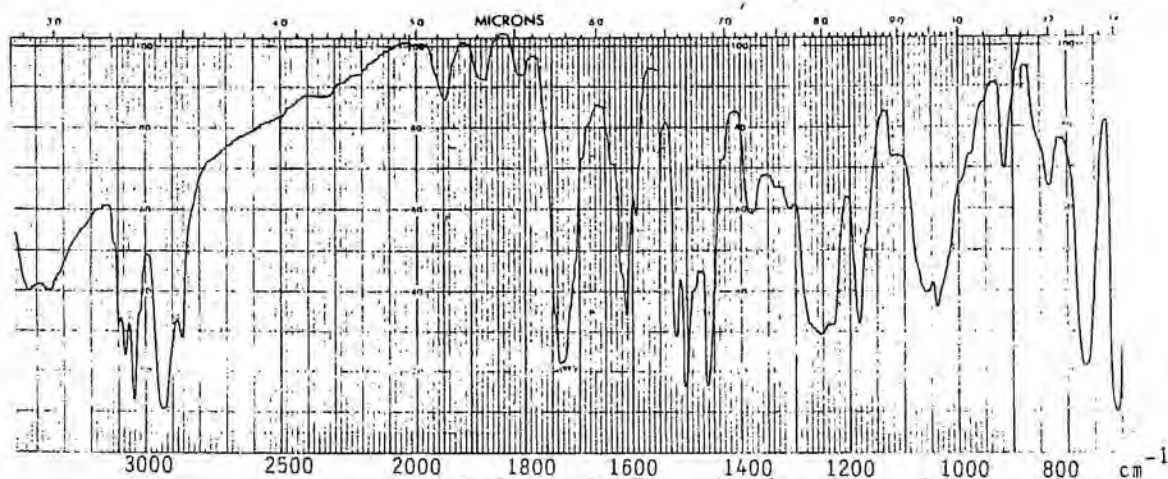
Preparació d'hidrazina anhidre (209).

6g d'hidrat d'hidrazina 100% i 6.4g de lleties de NaOH s'escalfen, en un baló de 50mL conecat a un muntatge de destil.lació (material Clearfit), durant 2h en un bany de silicona a 113°C. Passat aquest temps, la temperatura del bany s'eleva progressivament fins a 155°C, temperatura a la qual comença a destil.lar la hidrazina anhidre (p.e. 113-113.5°C, Handbook 113.5°C). S'obtenen 2.09g d'hidrazina (54% de rendiment).

4-carbazoiloximetilfenoximetilpoliestirè.

La totalitat de resina procedent del pas anterior, humida de DMF, es trasvassa a un baló i es suspen en 45mL de DMF. S'afegeixen 4mL d'hidrazina anhidre (126mmol, de l'ordre de 35 vegades d'excés) i es deixa reaccionar, amb agitació, durant 8h a temperatura ambient. Finalment, la resina 2 es filtra i renta amb 4xDMF, 3xH₂O, 3xdioxan/aigua 1/1, 4xEtOH, 4xCH₂Cl₂ i 4xMeOH. Els filtrats procedents dels últims rentats s'evaporen a sequedat i es comprova que no deixen residu.

S'efectua l'anàlisi elemental d'una mostra de polímer, obtenint-se un contingut en N de 1.82%, la qual cosa implica un grau de substitució de 0.65mmol/g. L'espectre d'infrarroig de la resina obtinguda es mostra a continuació.



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

La purificació de Fmoc-glicina, prèvia a la reacció d'engal·lament a la matriu polimèrica, és la mateixa que pels pèptids 3 i 4.

Partim de 3.99g de resina 2, amb un grau de substitució de 0.65mmol/g (calculat per anàlisi elemental de N). L'acoblament s'efectua amb 7.8mmol de Fmoc-Gly-OH (2.32g) i 4.3mmol de DCC (885mg), preformant l'anhídrid simètric i seguint el mateix protocol que pels altres aminoàcids.

Abans de bloquejar els grups NH-NH_2 que hagin pogut quedar lliures, la desprotecció d'una alíquota mostra que hem assolit un grau de substitució de 0.60mmol/g Fmoc-Gly-resina (rendiment d'acoblament pràcticament quantitatiu). Malgrat aquest rendiment, l'assaig de la fluorescamina és positiu, de manera que abans de continuar la síntesi cal acetilar. Es fan dos lots de Fmoc-glicil-resina (2.19g i 2.25g) per a continuar la síntesi dels pèptids 5 i 6 respectivament.

Abans de començar la síntesi del segment peptídic protegit 6 s'intenta bloquejar els grups $-\text{NH-NH}_2$ polimèrics lliures mitjançant quatre acetilacions, tres amb Ac_2O i EDIA, tal com es descriu als protocols generals de síntesi, i una amb AcOH/DCC . En aquesta acetilació es substitueixen les etapes 3 i 4 del protocol amb $\text{Ac}_2\text{O/EDIA}$ per

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
3	AcOH (13.4mmol, 0.8mL), 2min, no filtrar
4	DCC (14.8mmol, 3.05g), 20min.

Després de les quatre acetilacions, l'assaig de la fluorescamina segueix essent positiu, però el de la ninhidrina és negatiu. Tal com hem indicat a la part teòrica, el control de la síntesi del pèptid 6 s'efectua mitjançant l'assaig de la ninhidrina i desprotecció d'una alíquota de Fmoc-peptidil-resina abans d'efectuar la desprotecció del total a cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid.

En el cas de la síntesi del pèptid 5 s'intenta una primera acetilació amb Ac_2O i EDIA que dóna el mateix resultat que les anteriors, i una segona acetilació amb Ac_2O , afegint juntament amb l'EDIA (etapa 4) DMAP en quantitat equimolar respecte a l'anhídrid. Després d'aquest intent, l'assaig de la fluorescamina dóna negatiu.

1.4.3. Síntesi del segment peptídic protegit 6.

1.4.3.A. Síntesi del pèptid.

Partim de 2.19g de Fmoc-aminoacil-resina amb un grau de substitució de 0.49mmol/g Fmoc-Gly-resina. Aquest valor del grau de substitució és el que s'obté en efectuar la desprotecció total, i és inferior al que s'ha trobat en desprotegir una alíquota. Els resultats de cada etapa de desprotecció s'indiquen a la part teòrica.

Fmoc-Pro-OH. El primer acoblament s'efectua amb tres vegades d'excés de Fmoc-prolina (3.63mmol, 1.218g) i 1.99mmol de DCC (410mg). L'assaig de la ninhidrina dóna negatiu, però la desprotecció d'una alíquota dóna un grau de substitució inferior a l'esperat. En el dubte, repetim acoblament amb dos vegades d'excés d'aminoàcid (1.19mmol, 804mg) i 1.31mmol de DCC (271mg). Es reproduïxen els resultats obtinguts després del primer acoblament, és a dir, assaig de la ninhidrina negatiu i grau de substitució baix, de manera que abans d'incorporar el tercer aminoàcid es procedeix a acetilar amb Ac_2O i EDIA per a bloquejar possibles grups reactius sobre el polímer.

Fmoc-Arg(Tos)-OH. En un sol acoblament amb tres vegades d'excés d'aminoàcid (sobre el grau de substitució actual) s'obté assaig negatiu de la ninhidrina. S'empren, doncs, 2.30mmol de Fmoc-aminoàcid (1.27g) i 1.26mmol de DCC (261mg).

Fmoc-Leu-OH. Les quantitats molars d'aminoàcid i DCC emprades en el primer acoblament de Fmoc-Leucina són les mateixes que per l'arginina, la qual cosa implica formar l'anhídrid amb 812mg de Fmoc-Leu-OH i 261mg de DCC. No cal repetir acoblament, ja que l'assaig de la ninhidrina és negatiu.

La totalitat de peptidil-resina (2.31g) es tracta amb 55% de TFA en diclorometà. La reacció té lloc amb un rendiment del 75%, i s'obtenen 372 μ mol de pèptid 6 brut.

Un segon tractament amb TFA en les mateixes condicions desen- cora tan sols 6.7 μ mol de pèptid. Un tercer tractament amb 100% de TFA separa de la matriu polimèrica 0.7 μ mol de pèptid.

En aquest cas, igual que per al pèptid 4, el protocol de ren- tats no és exactament el mateix que el que hem descrit com a general, ja que després del primer tractament no hi ha rentats amb DMA, i després dels altres dos, es substitueixen per rentats amb metanol.

Finalment, després d'aquests tractaments amb TFA, la resina resultant es sotmet a una acidòlisi amb HF anhidre en presència de 10% d'anisol (vegeu descripció del procés a 1.3.2). S'obtenen 14 μ mol de pèptid desprotegit.

1.4.3.B. Purificació del pèptid 6.

Del crú peptídic obtingut després dels tres tractaments amb TFA se'n fan dues meitats, cadascuna de les quals es sotmet a una pre-pu- rificació o rentat a través d'una columna oberta empaquetada amb 11g de gel de sílice 60, eluint amb $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 70/20/5. Després d'analitzar l'eluit per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 3/1), s'ajunten totes les fraccions que contenen producte. Amb 1/20 part del total es fa un primer tanteig de purificació per cromatografia sobre gel de sílice 60 amb una columna Lobar comercial (mida A) eluint amb $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 85/5/2. Després de varies recromatografies es logra aïllar un producte que es caracteritza com al pèptid desitjat.

D'altra banda, amb una altra 1/20 part del crú peptídic es fa un assaig de purificació per filtració molecular sobre Sephadex LH-20 (columna de 100x1cm) eluint amb metanol a 6mL/h. D'aquesta cromatografia s'obté pràcticament un sol pic.

4/10 del crú peptídic (ca. 140 μ mol) es cromatografien a través d'una columna Lobar de gel de sílice 60 (mida B) eluint amb CHCl₃/MeOH/AcOH 80/10/2 a 240mL/h. Les fraccions que contenen el producte desitjat s'ajunten i es recromatografien en les mateixes condicions. El mateix es du a terme amb la resta de crú peptídic.

La totalitat de producte procedent de les etapes de purificació anteriors s'aplica a un cartutx de gel de sílice 60 d'un aparell de cromatografia líquida preparativa i s'elueix amb CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 87/10/3. Una de les fraccions recollides presenta una anàlisi d'aminoàcids correcta (vegeu, com sempre, tant els cromatogrames com les anàlisis d'aminoàcids a la part teòrica) i pràcticament taca única per cromatografia en capa fina (CHCl₃/EtOH 3/1). Finalment, la totalitat de pèptid es recromatografia en les mateixes condicions que les dues primeres etapes. El perfil d'elució presenta pràcticament un sol pic, pur per cromatografia en capa fina. S'obtenen 25 μ mol de producte, que corresponen a un 7% de rendiment de purificació.

1.4.4. Síntesi del segment peptídic protegit 5.

1.4.4.A. Síntesi del pèptid.

Abans de començar a engalzar els aminoàcids sobre la Fmoc-glicil-resina es purifica la Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH comercial tal com hem descrit a l'apartat 1.2.4.A de la part experimental.

Partim de 2.35g de Fmoc-Gly-NH-NH-CO-O-C₆H₄-O-CH₂- \textcircled{P} amb un grau de substitució de 0.48mmol/g Fmoc-Gly-resina.

A la part teòrica s'han indicat i discutit les quantificacions de la Fmp formada a cada etapa de desprotecció.

Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH. Amb la intenció d'evitar la reacció secundària que ha tingut lloc en el curs de la incorporació del segon aminoàcid a la síntesi del pèptid 6, la Fmoc-Tyr(Dcbzl)-OH s'acobla en un excés de quatre vegades d'aminoàcid (4.52mmol, 2.539g) preformant l'anhídrid amb 2.48mmol de DCC (512mg) i afegint a la glicil-resina 1eq d'EDIA al mateix temps que l'anhídrid. Després d'aquest acoblament l'assaig de la fluorescamina és lleugerament positiu però el de ninhidrina és negatiu. S'obté assaig de la fluorescamina negatiu després d'acetilar amb Ac_2O i EDIA.

Fmoc-Ser(Bzl)-OH. Un sol acoblament amb 3 vegades d'excés d'aminoàcid sobre les amines que queden ancorades al polímer és suficient per a tenir un assaig de la fluorescamina negatiu. S'empren 0.90mmol de serina (377mg) i 0.50mmol de DCC (102mg).

Fmoc-Trp-OH. En aquest cas també cal un sol acoblament amb el mateix excés d'aminoàcid per a tenir assaig d'amines negatiu (fluorescamina). S'empren 0.90mmol de Fmoc-triptofan (385mg) i 0.50 mmol de DCC (102mg).

Fmoc-His(Tos)-OH. El primer acoblament s'efectua amb 0.85mmol d'aminoàcid (452mg) i 0.47mmol de DCC (93mg). El segon, amb 0.57mmol d'aminoàcid (301mg) i 0.31mmol de DCC (64mg). Després d'aquest acoblament l'assaig de la fluorescamina és negatiu.

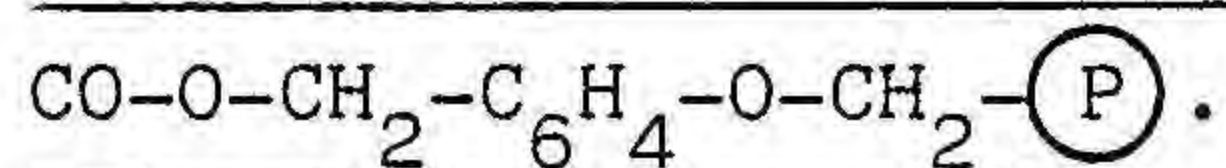
Glp-OH. Els excessos d'aminoàcid es calculen en base al grau de substitució determinat en l'etapa prèvia de desprotecció. El primer acoblament es du a terme amb 1.20mmol de Glp-OH (155mg) i 0.66mmol de DCC (136mg). En el segon acoblament es pre-forma l'anhídrid amb 0.80mmol d'aminoàcid (103mg) i 0.44mmol de DCC (91mg). Com que l'assaig de la fluorescamina és encara clarament positiu, s'efectua un tercer acoblament però sense preformar l'anhídrid, amb quantitats equimolars (0.40mmol) de Glp-OH (154mg) i DCC (272mg) tal com s'ha descrit per a la síntesi del pèptid 3 (vegeu 1.2.4.A de la part experimental). L'assaig de la fluorescamina després d'aquest tercer acoblament dona negatiu.

2.21g de peptidil-resina es tracten amb 55% de TFA/CH₂Cl₂ en presència d'un 2% de β-mercaptoetanol durant 1h a temperatura ambient. Després de la reacció els rentats amb DMA són substituïts per rentats amb metanol. La reacció té lloc amb un rendiment del 54% i s'obtenen 120μmol de pèptid. Un segon assaig per desencorar pèptid de la resina amb 30% de TFA en diclorometà en presència de 1% de β-mercaptoetanol allibera un 0.5% més de pèptid.

1.4.4.B. Purificació del pèptid 5.

120μmol de crú peptídic es cromatografien en primer lloc sobre Sephadex LH-20, eluint amb 10% DMA/MeOH a 7.5mL/h, en lots de 12, 48 i 60μmol de producte. El total de fraccions que contenen el producte es cromatografien i recromatografien sobre gel de sílice 60 en un aparell de cromatografia líquida d'alta eficàcia preparatiu, eluint amb CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ en diferents proporcions seguint l'esquema de cromatografies indicat a la part teòrica (pàg. 68). Al final, s'arriben a separar tres fraccions A, B i C que contenen, respectivament, 3, 4.2 i 17μmol de pèptid. Les diferents fraccions obtingudes s'analitzen per cromatografia en capa fina eluint amb CHCl₃/MeOH/AcOH 40/15/1, revelant amb el reactiu d'Ehrlich (126).

1.4.5. Estudi de la reacció secundària que té lloc sobre la H-Gly-NH-NH-



Hidroclorur del glicinat d'etil.

S'obté per reacció de glicina amb etanol absolut saturat amb clorur d'hidrogen segons el procediment de Curtius i Göbel (210). La glicina es dissol, escalfant, en HCl/EtOH i mantenint el pas de HCl gas. Un cop s'ha dissolt totalment es passa HCl gas durant 5min més i es deixa refredar.

S'afegeix èter i precipiten agulles d'hidroclorur de glicinat d'etil, p.f. 146°C, lit. (211) 145°C. La reacció és pràcticament quantitativa.

Fenoxicarbonilglicinat d'etil.

6.0g d'hidroclorur de glicinat d'etil (43mmol) es suspenen en 30mL de CHCl_3 i es refreden en un bany de gel. S'afegeixen 4.5mL de dietilamina (43mmol) i s'agita fins a obtenir una dissolució clara. En afegir 60mL d'èter apareix un precipitat blanc d'hidroclorur de dietilamoni que es separa per filtració. El líquid groc que en resulta s'evapora a sequedat i s'obté un oli que es dissol en 12mL de CHCl_3 , refredant la dissolució en un bany de gel. A la dissolució, freda, s'afegeixen 2.75mL (21mmol) de cloroformiat de fenil en 6mL de CHCl_3 i es deixa amb agitació mecànica a temperatura ambient durant 4h. La dissolució es renta amb HCl 2N (3x30mL), H_2O (3x30mL) i NaOH 0.1N (3x20mL) i s'asseca amb Na_2SO_4 . En eliminar el dissolvent s'obtenen 2.9g (63%) d'un oli, que s'empra per a la reacció següent, en el qual no es detecten impureses per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 40/15/1, $R_f=0.67$) ni a l'espectre de ^1H -RMN. Al cap d'uns dies, l'oli comença a cristal·litzar. Els cristalls, rentats amb n-hexà, donen un p.f. de 35-36°C.

IR (KBr): 3400, 1750, 1540, 1500, 1210, 1000 i 980cm^{-1} .

^1H -RMN (CDCl_3): δ 7.25 m, 5H (ar.); 4.2 q, 2H (CH_2 etil); 4.1 d, 2H (CH_2 Gly) i 1.27 t, 3H (CH_3).

EM: m/e 223, 178, 150, 102, 94, 77, 66 i 65.

Anàlisi elemental: calc. per $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: C 59.2, H 5.9, N 6.3. Trobada: C 59.4, H 5.9, N 6.3.

3,6-dioxo-1,2,4-triazina.

A 1g de fenoxicarbonilglicinat d'etil (oli) s'afegeixen 0.24mL d'hidrat d'hidrazina al 100% en 10mL d'etanol al 70%. La mescla de reacció es manté a reflux durant 3h, passades les quals es deixa refredar i comencen a apareixer uns cristalls blancs. La cristal·lització acaba al congelador. Els cristalls es filtren i renten amb EtOH i èter, obtenint-se

240mg de 3,6-dioxo-1,2,4-triazina (46% de rendiment) p.f. 195-198°C, lit. (135) 195-196°C, taca única per cromatografia en capa fina (n-BuOH/AcOH/H₂O 4/1/1, Rf=0.29).

IR (KBr): 3315, 3290, 1790, 1740, 1650, 1460, 1320, 1230, 1170, 1100, 1045, 950 i 710cm⁻¹.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ7.9 s, 1H; 4.6 s, 2H; 3.8 s, 2H.

EM: m/e 115, 87, 58, 43, 30 i 28.

Anàlisi elemental: calc. per C₃H₅N₃O₂: C 31.3, H 4.4, N 36.5. Trobada: C 31.6, H 4.3, N 36.3.

Cromatografia de gasos.

Com que la 3,6-dioxo-1,2,4-triazina no és prou volàtil, es prepara el seu derivat trimetilsililat amb (N,O-bis-trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA): 6mg de la triazina s'escalfen en un vial amb 0.5mL de BSTFA i 1mL d'acetonitril a 70°C durant 15min. Una alíquota de 1-2µL de la dissolució resultant que conté un excés de reactiu s'injecta directament al cromatògraf de gasos.

Condicions de cromatografia: columna de vidre de 2mx5mm reblida amb 2% OV-17, 1% OV-110 en Gas-Chrom Q (100-200); flux:60mL/min. Programa de temperatures: 120 a 190°C a 5°C/min. Apareixen tres pics que creiem que poden correspondre als tres possibles derivats sililats (mono- di- i tri-TMS derivats) de la 3,6-dioxo-1,2,4-triazina, amb temps de retenció de 9, 10.2 i 11.8min respectivament.

Cromatografia líquida d'alta eficàcia.

Columna: Rad-Pak C₁₈; eluent: H₂O; flux: 1mL/min; detecció: 225nm. S'injecten 2µL d'una dissolució de 2mg de 3,6-dioxo-1,2,4-triazina en 300µL d'aigua a 1AUFS. Temps de retenció: 4.5min.

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

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

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

2.1.1.A. Síntesi de clorometilpoliestirè.

Les quantitats de clorometil metil èter i SnCl_4 es calculen segons la següent fórmula:

$$\text{xg poliestirè} \cdot \frac{0.0005 \text{ mol SnCl}_4}{\text{g resina}} \cdot \frac{260.5 \text{ g}}{\text{mol SnCl}_4} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{2.21 \text{ g}} = \text{mL SnCl}_4$$

$$\text{xg poliestirè} \cdot \frac{0.025 \text{ mol ClCH}_2\text{OCH}_3}{\text{g resina}} \cdot \frac{80.5 \text{ g}}{\text{mol ClCH}_2\text{OCH}_3} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{1.08 \text{ g}} = \text{mL ClCH}_2\text{OCH}_3$$

Una suspensió de poliestirè en CHCl_3 (10-12mL de CHCl_3 /g resina) s'agita durant 1h a 25°C en condicions anhidres. La suspensió es refreda en un bany de gel i s'afegeixen, gota a gota, la mescla de SnCl_4 i $\text{ClCH}_2\text{OCH}_3$ (donat el caràcter higroscòpic del SnCl_4 , és convenient d'obrir l'ampolla sota la làmpara d'infrarroig) per tal de que s'hidrolitzi el mínim possible). Acabada l'addició, es deixa 30min més agitant a 0°C i immediatament després la resina es filtra i renta. Per cada 10g de resina, s'empra un volum de 150mL de dissolvent a cada etapa de rentat: dioxan/aigua 3/1, dioxan/HCl 3N 3/1, dioxan/aigua 3/1, dioxan/HCl 3N 3/1, aigua (fins que l'assaig de clorurs dels filtrats dona negatiu), metanol, diclorometà i metanol.

2.1.1.B. Anàlisi del clorometilpoliestirè.

Mètode de Volhard.

Protocol per mostres amb $f \approx 0.5 \text{ mmol Cl/g resina}$.

Una mostra de ca. 50mg de resina en un baló de 10mL es suspen en 2mL de piridina bidestil.lada (sobre KOH i ninhidrina) i es posa a reflux

durant 2h. La suspensió s'aboca en un erlenmeyer i s'afegeixen 50mL d'AcOH al 20%, 5mL de HNO_3 conc. (prèviament bullit), 25mL de AgNO_3 0.02N, 3ml de toluè i 3 gotes de dissolució saturada de $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$. L'excés de Ag^+ es valora amb KSCN 0.1N.

Protocol per mostres amb $f \approx 0.01-0.02$ mmol Cl/g resina.

Una mostra de ca. 100mg de resina en un baló de 25mL es posa a reflux amb 2mL de piridina durant 2h. Es deixa refredar i al baló s'afegeixen: 1mL d'AcOH al 20%, 3mL de HNO_3 conc., 1mL de toluè i 3 gotes d'indicador ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$). L'excés de Ag^+ es valora amb KSCN 0.0005N.

Cada determinació es fa com a mínim per duplicat (amb dues mostres diferents de la resina a analitzar). Abans de cada sessió es determina el factor de la dissolució de KSCN, valorant amb AgNO_3 .

Ancoratge de Boc-ProOCs.

Boc-ProOCs.

Les quantitats de Boc-Pro-OH i Cs_2CO_3 es calculen sobre la base de que fem servir ca. 100mg de resina. Una dissolució de Boc-prolina (1.3 vegades d'excés respecte als grups clorometil presents) en EtOH/ H_2O 3/1 (mínim volum necessari per a poder sumergir-hi bé l'electrode) es neutralitza a pH=7.0 amb una dissolució aquosa de Cs_2CO_3 1.5N. La dissolució s'evapora a sequedat i s'afegeix benzè per a acabar d'eliminar l'aigua al rotavapor. El sòlid s'asseca durant una nit en un dessecador amb P_2O_5 i s'empra al pas següent.

Ancoratge de Boc-ProOCs a $\text{Cl-CH}_2-\text{(P)}$.

En el mateix baló on hi ha el Boc-ProOCs es pesen 100mg de clorometilpoliestirè, s'afegeix DMF (mínim volum possible) i la suspensió s'agita a 50°C durant una nit. La resina es filtra i renta amb 4xDMF, 4xDMF/ H_2O 9/1, 4xDMF, 4x CH_2Cl_2 , 4xEtOH, 3x CH_2Cl_2 , 3xEtOH i 3xMeOH.

Sobre una alíquota de Boc-Pro-resina (15-20mg) ben seca es determina el grau de substitució per valoració espectrofotomètrica amb

àcid pícric (mètode de Gisin, materials i mètodes, 5.2). Prèviament cal desprotegir el grup α -amino per tractament amb TFA segons el programa:

<u>Etapa</u>	<u>Reactiu</u>
1	2 x CH ₂ Cl ₂
2	1 x 30% TFA/CH ₂ Cl ₂ 2min
3	1 x 30% TFA/CH ₂ Cl ₂ 30min
4	4 x CH ₂ Cl ₂
5	4 x 5% EDIA/CH ₂ Cl ₂
6	correspon a l'etapa 3 del protocol donat per l'assaig de Gisin.

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

Síntesi de la resina 1_{A-II}: mètode de Wang (23).

5.1g de Cl-CH₂- $\textcircled{\text{P}}$ (lot II, ~4.6mmol) es suspenen en 150mL de DMA i s'afegeixen 0.74g d'alcohol 4-hidroxibenzílic (5.9mmol, Merck) i NaOMe (6.1mmol, dissolució metanòlica preparada a partir de 0.14g de sodi). La suspensió es manté durant 24h a 80°C amb agitació magnètica. Un cop acabada la reacció, la resina es filtra i renta amb 3xDMF, 5xdioxan, 3xCH₂Cl₂ i 5xMeOH (40mL/rentat).

Comparació del lot 1_{E-I} amb 1_{A-II} i 1_{Bachem}.

Ancoratge de Fmoc-glicina.

Partim d'una mostra de 100mg de cada lot de resina, i suposem $f=0.7$. L'anhídrid simètric (Fmoc-Gly)₂O es prepara a partir d'un excés de 2.5 vegades d'aminoàcid respecte als grups -OH polimèrics (0.175mmol, 52mg) i 0.088mmol de DCC (18mg) tal com hem descrit a materials i mètodes 7.2.b. Es filtra la diciclohexilurea i el filtrat s'afegeix a la resina, juntament

amb 0.088mmol de DMAP (11mg) i 0.088mmol de DCC (18mg) dissolts també en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1, fins a un volum total de 3.5-4mL. La mescla es deixa reaccionar 60min a temperatura ambient, i a continuació el polímer es filtra i renta amb $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1, $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$, $3 \times \text{DMF}$, $3 \times \text{iPrOH}$, $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$, $3 \times \text{DMF}$, $3 \times \text{iPrOH}$ i $3 \times \text{MeOH}$.

Determinació del grau de substitució de la Fmoc-glicil-resina. Alíquotes de ~20mg es desprotegeixen amb 50% de piperidina en diclorometà i es quantifica la Fmp formada (Ammol) tal com es descriu a materials i mètodes 7.2.a.

Rendiment d'acidòlisi amb TFA. Sobre una mostra diferent de Fmoc-glicil-resina s'efectua un tractament amb 55% de TFA en diclorometà (materials i mètodes, 7.5, rentant amb MeOH en comptes de amb DMA). El filtrat procedent d'aquest tractament, un cop evaporat a sequedat i ben eliminat el TFA es tracta amb 50% de piperidina en CH_2Cl_2 durant 30min, i es torna a evaporar a sequedat. La mostra es dissol en diclorometà, s'enrasa a 100mL amb el mateix dissolvent i es quantifica la Fmp formada (Bmmol). D'altra banda, l'alíquota de resina prèviament tractada amb TFA es desprotegeix també amb piperidina i es quantifica la Fmp formada (Cmmol).

Síntesi de la resina 1_{A-VI}: mètode de Merrifield (144).

Purificació de l'alcohol 4-hidroxibenzílic.

2,5g d'alcohol 4-hidroxibenzílic es posen a reflux amb 225mL de cloroform i s'afegeix un petit volum de metanol fins que s'observa la formació de partícules sòlides de color vermellós en suspensió en una dissolució transparent. Es filtra en calent, i es deixa cristal·litzar. S'obté un producte de p.f. 114-115°C, táca única per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{iPrOH}/\text{AcOH}$ 90/5/10, $R_f=0.26$). El rendiment de la cristal·lització és del 53% si es parteix de producte Merck i 29% si es parteix de producte Fluka. Cal conservar el producte en absència de llum, sota atmosfera de nitrogen i en fred, i fer-lo servir el més aviat possible.

Preparació de NaOMe.

Es tallen petits trocets de sodi, en atmosfera de nitrogen, i es guarden en hexà anhidre. En un baló es pesa la quantitat necessària (prèviament s'aixuga amb un paper de filtre), s'equipa amb un refrigerant i un tub de clorur càlcic i es refreda. S'afegeix metanol anhidre per dalt del refrigerant, es deixa reaccionar el sodi i s'evapora a sequedat en el rotavapor de neu carbònica fent el buit amb trompa d'aigua però intercalant entre la trompa i el rotavapor una torre de dessecació amb KOH. El sòlid que s'obté s'asseca en un dessedador amb P_2O_5 .

Síntesi de la resina 1_{A-VI}.

A 8.05g de $Cl-CH_2-(P)$ (lot VI) s'afegeixen 30mL de DMA. Una suspensió de NaOMe (16.4mmol) en 20mL de DMA (sonicada per tal de tenir una suspensió de partícules fines) es barreja poc a poc i amb agitació amb una dissolució de 16.4mmol (2.04g) d'alcohol 4-hidroxibenzílic en DMA, i la mescla s'afegeix a la suspensió de clorometilpoliestirè en DMA (el volum total de DMA és de 80mL). La mescla de reacció, que agafa gairebé immediatament un color blau fosc, s'agita durant 24h a 50°C. Passat aquest temps, la resina es filtra i renta amb 4xdioxan, 6xdioxan/aigua 1/1, 4xdioxan, 4xmetanol, 3xDMF, 3x CH_2Cl_2 , 3xdioxan, 3xdioxan/aigua 1/1, 3xdioxan, 3x CH_2Cl_2 i 3xmetanol.

Ancoratge de Fmoc-glicina. Determinació del grau de substitució i del rendiment d'acidòlisi amb TFA. Una alíquota de ~40mg de resina es fa reaccionar amb quantitats equimolars de $(Fmoc-Gly)_2O$, DCC i DMAP (5 vegades d'excés respecte als grups hidroxil polimèrics) durant 24h a temperatura ambient, en el mínim de volum possible de diclorometà/DMF 4/1. La resina es filtra i renta amb 3x CH_2Cl_2 , 3xDMF, 3xiPrOH, 3x CH_2Cl_2 , 3xDMF, 3xiPrOH i 3xMeOH, i s'asseca a pes constant. Es separen dues alíquotes de Fmoc-glicil-resina (ca. 20mg), i amb una d'elles es determina el grau de substitució (i per tant s'estima el rendiment de la reacció d'ancoratge d'aminoàcid) i amb l'altra el rendiment de la reacció d'acidòlisi de l'enllaç aminoàcid-resina tal com hem descrit per a la resina 1_{A-II}.

A la següent taula s'indiquen els resultats obtinguts a les diferents síntesis de resina 1 pel mètode de Merrifield, així com les petites variacions experimentals introduïdes en cada cas.

Denominació de la resina <u>1</u> obtinguda	Quantitat de ClCH ₂ P ^(a) de partida	Observacions del mètode de síntesi ^(b)	Anàlisi de les resines <u>1</u>		Fmoc-Gly-resina <u>1</u>	
			%Cl (f)	¹³ C-RMN	f	Rendiment
			Anàlisi elemental Volhard		(mmol/g) acidòlisi	
¹ A-III	9g	III+AHBzl*+DMA, NaOMe en MeOH.	No es detecta Cl	Poc funcionalitzada	0.28	92%
¹ A-III'	-	idem.	-	idem.	0.29	83%
¹ A-V	9.7g	V+AHBzl*+DMA, NaOMe en MeOH	-	0.3% (0.007)	-	-
¹ A-I	0.3g	I+DMA, +(AHBzl*+NaOMe Fluka)	-	2.8% (0.78)	-	-
¹ A-VI	8g	VI+DMA, +(AHBzl*+NaOMe en DMA)	1.5% (0.42)	0.2% (0.006)	0.32	97%
¹ A-VI'	-	¹ A-VI+AHBzl+DMA, +NaOMe en DMA	1.2% (0.33)	0.1% (0.003)	0.34	-

(a) Recordeu que la denominació del clorometilpoliestirè de partida està indicada en la de la resina 1 que s'obté (vegeu pàgina 84)

(b) Excepte quan s'indica el contrari, s'ha emprat NaOMe sinteïtzat per nosaltres. En alguna assigs s'ha fet servir la dissolució metanòlica, en d'altres s'ha eliminat el metanol i el NaOMe s'ha suspès en DMA.

* AHBzl = alcohol 4-hidroxibenzílic.

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

Preparació de la mostra per a l'anàlisi de la proporció Gly₂/Gly.

Una alíquota de 15-20mg de Fmoc-glicil-resina es tracta amb 55% de TFA en diclorometà. Els filtrats s'evaporen a sequedat i el residu es tracta amb 50% de piperidina en diclorometà durant 30min i es torna a evaporar a sequedat. El residu es dissol en tampó citrat de pH=2.2, enrasant a 10mL. Alíquotes d'aquesta dissolució s'injecten a l'analitzador d'aminoàcids (Beckman 119C o 120C) eluint amb tampó citrat 0.2N pH=3.5 a 60mL/h i a 55°C.

	<u>Gly</u>	<u>Gly₂</u>
Temps d'elució (min)	74	162
Constant colorimètrica (mmol/unitats àrea)	10.50	7.48

Tampó citrat 0.2N, pH=2.2. Per a prepara 1L de tampó es dissolen en aigua 19.6g de citrat sòdic dihidrat, 16.5mL de HCl conc., 5mL de tioglicol, 2mL de dissolució de BRIJ-35 (50g d'alcohol polioxietilèlaurílic en 50mL d'aigua) i 0.1mL d'àcid caprílic, enrasant a un volum final de 1L.

Tampó citrat 0.2N, pH=3.5. 196.1g de citrat sòdic dihidrat, 91mL de HCl conc. 50mL de tioglicol, 20mL de dissolució de BRIJ-35 i 1mL d'àcid caprílic es dissolen en aigua, enrasant fins a un volum de 10L.

Reactiu de la ninhidrina. Aquest reactiu es prepara fent passar tota l'estona corrent de nitrogen. 0.75L de 2-metoxietanol exempt de peròxids es barregen amb 0.25L de tampó citrat 4N. 15min més tard s'afegeixen a la dissolució 20g de ninhidrina. Al cap de 30min s'afegeixen 0.5-0.6g de SnCl₂. El bombolleig de nitrogen a través de la dissolució ha de continuar fins que la dissolució sigui transparent, i aleshores es procedeix a filtrar-la. Finalment, la dissolució es deixa reposar tot una nit abans de fer-la servir.

Tampó acetat 4N. 0.544g de NaAcO.3H₂O es dissolen en 400mL d'aigua, escalfant i amb agitació fins que es dissol totalment (però sense que bulli). S'afegeixen 100mL d'àcid acètic glacial, s'enrasa a 1L i s'ajusta el pH a 5.5 amb NaOH o AcOH.

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

Els assaigs d'esterificació entre Fmoc-glicina i 4-hidroximetil-fenoximetilpoliestirè es duen a terme amb mostres de ca. 50mg de resina 1_{E-I} . Els excessos que s'empren de (Fmoc-Gly) $_2$ O, DMAP i DCC estan calculats agafant com a base un valor de $f=0.7$ mmol grups -OH/g resina, i s'indiquen a la part teòrica juntament amb els temps de reacció.

L'anhídrid simètric de la Fmoc-glicina es prepara tal com s'ha descrit a materials i mètodes (7.2.b). La dissolució de (Fmoc-Gly) $_2$ O juntament amb la DMAP i la DCC (quan se n'hi posa) en un volum total de 2mL de CH $_2$ Cl $_2$ /DMF 4/1 es fa reaccionar amb els 50mg de resina durant el temps que s'indica en cada cas, i a continuació l'aminoacil-resina es filtra i renta amb 3xCH $_2$ Cl $_2$ /DMF 4/1, 3xCH $_2$ Cl $_2$, 3xDMF, 3xiPrOH, 3xCH $_2$ Cl $_2$, 3xDMF, 3xiPrOH i 2xMeOH. Sobre una alíquota de cada mostra es determina el grau de substitució per tractament amb 50% de piperidina en diclorometà i quantificació de la Fmp formada, i la proporció Gly $_2$ /Gly.

2.2.2. Esterificació amb carbonildiimidazole.

Fmoc-Gly-OH i CDI, ambdós en un excés de 5 vegades respecte als grups hidroxil de la resina, es deixen reaccionar en CH $_2$ Cl $_2$ /DMF 4/1 durant 10min a 0°C, per tal de preformar l'imidazolida (reactiu acilant). La dissolució que s'obté s'afegeix a 50-100mg de resina 1_{E-I} i es deixa reaccionar les hores que s'indica en cada cas a temperatura ambient amb agitació magnètica. La resina es filtra i renta amb el mateix programa de rentats descrit a l'apartat anterior, i a continuació es determina el grau de substitució de la Fmoc-glicil-resina obtinguda (per desprotecció d'una alíquota i quantificació de la Fmp formada) i la proporció Gly $_2$ /Gly.

Estudi de l'estabilitat del grup protector Fmoc enfront de l'imidazole.

Anàlisi per cromatografia en capa fina. 50mg de Fmoc-Gly-OH i 11.4mg d'imidazole es dissolen en 1mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1. A diferents temps es dipositen alíquotes de 10 i 20 μL de la dissolució en una cromatoplaca, i es cromatografien eluint amb $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 3/1.

$$R_f^{\text{H-Gly-OH}} = 0 \text{ (revelat amb ninhidrina)}$$

$$R_f^{\text{Fmoc-Gly-OH}} = 0.16$$

Anàlisi per cromatografia de bescanvi iònic. Es preparen dissolucions de 25mg de Fmoc-glicina en 2mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 4/1 i 10mg d'imidazole en 2mL de mateix dissolvent. Es barregen alíquotes d'aquestes dissolucions que continguin quantitats equimolars dels dos productes, i es deixen reaccionar durant un temps determinat. Passat aquest temps la mostra s'evapora a sequedat, el residu es dissol en tampó citrat pH=2.2 i s'injecta una alíquota a l'analitzador d'aminoàcids eluint amb tampó citrat de pH=3.5 a 60mL/h i a 55°C.

Temps de reacció (h)	1	3	6	12	24
% H-Gly-OH	0.3	1.6	0.1	0.1	0.1

2.3. Estudi de la reacció de formació de dicetopiperazines.

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

Fmoc-D-Val-OH.

0.82g (7.0mmol) de D-valina es suspenen en 7mL de dioxan exempt de peròxids, i s'afegeixen 15mL d'una dissolució aquosa al 10% de Na_2CO_3 . Es refreda en un bany de gel i s'afegeix una dissolució de 1.82g (7.0mmol) de Fmoc-Cl en 9mL de dioxan. Acabada l'addició, la mescla es deixa agitant 1h a 0°C i 5.5h a temperatura ambient. Per cromatografia en capa fina s'observa que la reacció encara no ha acabat (taca positiva al revelat amb ninhi-

drina de D-valina), de manera que s'afegeix un 10% més de Fmoc-Cl (0.18g) i es deixa agitant. 30min després d'aquesta segona addició ja no s'observa D-valina per cromatografia en capa fina i la mescla de reacció s'aboca en 220mL de gel i aigua. La dissolució aquosa s'extreu amb 3x40mL d'èter, i a la capa aquosa refredada en un bany de gel s'afegeix HCl conc. fins a arribar a pH=2.0 (~2mL). Aquesta dissolució es guarda a la nevera fins que apareixen uns cristalls que es filtren i redissolen en acetat d'etil. Les aigües mares s'extreuen amb 4x20mL d'acetat d'etil, i el total dels extractes orgànics es renta amb 3x40mL de HCl 0.1N i 3x45mL d'aigua. Finalment, s'asseca amb MgSO₄ i s'evapora a sequedat donant un sòlid (2.22g, rendiment del 94%) que es recristal·litza amb n-hexà/diclorometà, obtenint-se 1.98g de Fmoc-D-Val-OH (83% de rendiment), p.f. 144-145°C, lit, (39) 144-145°C, Rf=0.56 (CHCl₃/EtOH 3/1). $[\alpha]_D = +15.9$ (c 1, DMF), lit. (105): Fmoc-L-Val-OH $[\alpha]_D = -16.1$ (c 1, DMF).

Ancoratge de Fmoc-L-Pro-OH al polímer.

2.0g de resina 1_{E-I} (f≈0.7mmol OH/g resina) es renten amb CH₂Cl₂/DMF 4/1. Es prepara l'anhídrid simètric (Fmoc-Pro)₂O a partir de 1.18g de Fmoc-prolina (3.5mmol) i 360mg de DCC (1.73mmol). Després de filtrar la urea, la dissolució que conté l'anhídrid s'afegeix a la resina juntament amb 360mg més de DCC i una quantitat equimolar de DMAP (210mg) dissolts també en CH₂Cl₂/DMF 4/1. La suspensió s'agita 1h a temperatura ambient, i la Fmoc-prolil-resina es filtra i renta amb 3xCH₂Cl₂/DMF 4/1, 3xCH₂Cl₂, 3xDMF, 3xiPrOH, 3xCH₂Cl₂, 3xDMF, 3xiPrOH i 3xMeOH. La desprotecció d'una alíquota posa de manifest que s'ha assolit un grau de substitució de 0.65mmol/g Fmoc-Pro-resina.

Els grups hidroxil lliures es bloquegen per tractament amb clorur de benzoil i piridina (materials i mètodes 7.1)

Incorporació de Fmoc-D-Val-OH.

La síntesi es prossegueix amb 1.5g de Fmoc-L-Pro-resina. L'anhídrid simètric de Fmoc-D-valina es prepara a partir de 840mg d'aminoàcid (2.48mmol, 2.5eq) i 210mg de DCC (1.03mmol). El segon acoblament s'efectua amb 1.65mmol d'anhídrid (560mg de Fmoc-D-valina) i 170mg de DCC (0.81mmol). L'assaig del cloranil posa de manifest l'absència d'amines lliures.

2.3.2. Cinètiques de formació de dicetopiperazines.

Cinètica de ciclació amb piperidina.

A 60mg de Fmoc-D-Val-L-Pro-resina s'addiciona 1mL de la dissolució de piperidina l'efecte de la qual volem estudiar. S'agita un temps determinat i es filtra, recollint el filtrat. S'afegeix un altre mL de la mateixa dissolució i es repeteix el procés tantes vegades com mostres volem recollir.

Cinètica de ciclació amb altres reactius.

100mg de Fmoc-dipeptidil-resina es tracten durant 30s amb 20% de piperidina en DMF (1mL), rentant tot seguit i ràpidament amb DMF. Els filtrats s'enrasen a 50mL amb DMF, se n'agafa 1mL, es dilueix a 10mL amb diclorometà i d'aquesta dissolució es mesura l'absorbància a 301nm per tal de quantificar l'extensió de la desprotecció. En la dissolució mare de DMF també es determina la quantitat de DKP present, evaporant-la a sequedat i procedint igual que amb les altres mostres (vegeu més avall). Després del tractament amb piperidina es continua immediatament i tal com abans hem indicat (cinètica per la piperidina) l'estudi cinètic de la formació de dicetopiperazines amb cada un dels reactius.

Cromatografia de gasos.

A cadascun dels filtrats procedents d'aquests tractaments s'afegeix 1mL de dissolució de patró intern d'estearat de n-butil (54mg dissolts en 100mL d'acetona) i s'evapora a sequedat. Aquestes mostres es dissolen en 0.5mL d'acetona i 1µL d'aquesta dissolució s'injecta al cromatograf de gasos, en una columna de vidre Gas-Chrom Q (100-120) reblida amb 1% OV-210, 2% OV-17, a 220°C i amb un flux d'heli de 60mL/min.

Temps de retenció: estearat de n-butil: 2min 40s; ciclo(-D-Val-L-Pro-): 4min 30s.

Càlcul de RWR: es dissolen 399mg d'estearat de n-butil en 100mL d'acetona, i 28mg de ciclo(-D-Val-L-Pro-) en 5mL d'acetona. Injectant alíquotes de mescles de proporcions conegudes d'aquestes dues dissolucions i mesurant les àrees corresponents en els cromatogrames es pot determinar el factor de resposta relatiu RWR. Es preparen 3 mostres diferents, i per cada una d'elles s'efectuen de 6 a 8 determinacions.

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

3.1.2. Obtenció dels Fmoc-aminoàcids.

Fmoc-Glu(Bzl)-OH*

4.5g de producte comercial (Bachem) es renten amb HCl 0.1N, H₂O, Na₂CO₃ aquós al 10% i H₂O. La darrera fase aquosa s'acidifica amb HCl conc. fins a pH=2.0 i s'extreu amb AcOEt. Després de rentar amb aigua la dissolució d'acetat d'etil, el producte es precipita per addició de n-hexà. Es recuperen 3.8g de producte (84% de rendiment), taca única per cromatografia en capa fina (CHCl₃/MeOH 85/15, Rf=0.51), p.f. 70-71°C.

Fmoc-Ser(Bzl)-OH.

El producte comercial (Bachem) s'empra sense cap mena de purificació, ja que l'anàlisi per cromatografia en capa fina (CHCl₃/MeOH/AcOH 73/25/2, Rf=0.69 i CHCl₃/EtOH 3/1, Rf=0.33) i per HPLC (Lichrosorb C₁₈, eluent MeOH/H₂O+0.1%TFA, 1mL/min, detecció a 301nm, RT:9.1min) mostra que disposem d'un producte de puresa correcta, p.f. 117.5-119°C.

Fmoc-Trp-OH.

L'anàlisi per HPEC del producte comercial (Bachem) mostra la presència d'una petita quantitat d'impureses, de l'ordre del 2%. Lots de 2.50 i 2.44g de Fmoc-Trp-OH s'injecten a un cartutx de fase reversa (C₁₈) d'un aparell d'HPLC preparativa, eluint amb MeOH/H₂O+0.1% TFA 75/25 a 150mL/min. D'aquestes cromatografies es recupera un 94% de producte en forma d'oli una mica acolorit. Les fraccions que contenen el producte més impurificat es re-cromatografien en les mateixes condicions.

El producte es cristal·litza de MeOH/H₂O 3/1, obtenint-se un 66% de Fmoc-Trp-OH purificat, p.f. 185-187°C, lit. (22) 185-187°C i (105) 165-166°C; Rf=0.30 (CHCl₃/EtOH 3/1).

Intents d'aconseguir recuperar més Fmoc-Trp-OH per decoloració amb carbó actiu donen resultats pèssims tant des del punt de vista qualitatiu (no es purifica, com es comprova per cromatografia en capa fina) com quantitatiu (una bona part de producte queda adsorbida sobre el carbó actiu).

*Les purificacions de Fmoc-Glu(Bzl)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH i Fmoc-Gly-OH han estat realitzades per M.Tessier del Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Medecine d'Aix-Marsella, a qui agraim la seva col.laboració.

Fmoc-Gln-OH.

La Fmoc-glutamina comercial de que disposem (Bachem) és força impura tant per cromatografia en capa fina ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 73/25/2, $R_f=0.35$) com per HPLC analítica (utilitzant el mateix sistema que per Fmoc-Ser(Bzl)-OH, RT:3.5min). La insolubilitat del producte en la majoria de dissolvents no permet d'emprar com a mètode de purificació la reproducció de part del protocol de síntesi, i els rentats directament sobre el sòlid amb *n*-hexà, CHCl_3 i AcOEt no són selectius. El producte es purifica per recristal·lització en metanol/èter 2/1 (2.00g es dissolen en 500mL de metanol, a reflux i amb agitació magnètica, s'addicionen 250mL d'èter anhidre i es refreda). Recuperem un 56% de producte pur, p.f. 227-228°C, lit.(105)221-223°C.

Fmoc-Ala-OH.

4.5g de Fmoc-alanina comercial (Bachem) es renten amb HCl 0.1N, aigua i Na_2CO_3 al 10%. L'extracte amb Na_2CO_3 es renta amb AcOEt i s'acidifica, a 0°C, fins a pH=2.8 amb HCl conc. Es recupera pràcticament quantitativament tot el producte, que presenta una sola taca per cromatografia en capa fina ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3/1, $R_f=0.45$) i pràcticament un sol pic per HPLC analítica (Lichrosorb C_{18} , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 70/30/0.1, 1.5mL/min), p.f. 142-143°C, lit. (22) 144-145°C i (105) 143-144°C.

Fmoc-Pro-OH.

3g de producte comercial (UCB) s'han injectat a un cartutx de gel de sílice 60 d'un aparell d'HPLC preparativa Waters, eluint a 200mL/min amb 1.8L de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96/4 i 1.4L de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10. Les fraccions que contenen el producte s'ajunten i s'elimina el dissolvent. El sòlid resultant es renta amb HCl 0.1N, aigua i Na_2CO_3 al 10%. L'extracte amb carbonat sòdic es renta amb AcOEt i s'acidifica amb HCl conc. fins a pH=2. El precipitat que es forma es filtra, renta i asseca i es torna a sotmetre a tot el procés de rentats i precipitació, per acabar donant 2.2g de producte (73%) que presenta taca única per cromatografia en capa fina ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3/1, $R_f=0.64$), p.f. 110-111°C, lit. (105) 114-115°C.

Fmoc-Gly-OH.

El producte comercial (Bachem o UCB) s'ha purificat per cromatografia líquida preparativa sobre fase reversa (C_{18}) en un aparell preparatiu. Les quantitats injectades han oscil·lat entre 0.9 i 3g, emprant 2 cartutxos en serie quan s'ha treballat amb 3g de producte. L'eluent emprat ha sigut MeOH/H₂O/TFA 75/25/0.1 o 60/40/0.1, a un flux de 100mL/min. En algun cas ha sigut necessari repetir la cromatografia. Les fraccions col·lectades que contenen el producte desitjat s'han ajuntat i concentrat en el rotavapor fins que es comença a observar la formació de precipitat. La precipitació total s'aconsegueix refredant a 4°C. El producte, un cop filtrat i rentat, presenta una sola taca en cromatografia en capa fina (CH₂Cl₂/MeOH 3/1, Rf=0.35) i p.f. 170-171.5°C, lit. (105) 173-174°C i (22) 174-175°C.

Fmoc-Tyr(cHex)-OH.

8.817g de H-Tyr(cHex)-OH (33.5mmol) en 67mL de dissolució aquosa de Na₂CO₃ al 10%, es refreden en un bany de gel i s'afegeixen amb agitació 35mL de dioxan. A la suspensió s'addiciona lentament una dissolució de 8.650g de Fmoc-Cl (33.5mmol) en 50mL de dioxan. Acabada l'addició la mescla es deixa agitant 1h a 0°C i 15h a temperatura ambient. Passat aquest temps s'aboca sobre 1L d'aigua -gel i s'extreu amb 2x270mL d'èter. La capa aquosa s'acidifica a pH=2 amb HCl conc., refredant amb un bany de gel. El precipitat que es forma es redissol en acetat d'etil i es renta amb HCl 0.1N i aigua. La capa orgànica s'asseca amb MgSO₄ i s'evapora a sequedat, obtenint-se un oli que cristal·litza donant 12.8g (79% de rendiment) de producte. La recristal·lització en n-hexà/acetat d'etil 1/1 dóna 11.3g de Fmoc-Tyr(cHex)-OH pura (rendiment del 70%), p.f. 162°C, Rf=0.51 (CHCl₃/EtOH 3/1), i $[\alpha]_D = -21.6$ (c 1, DMF). IR (KBr): 3280, 2940, 2860, 1730, 1660, 1510 i 1450cm⁻¹.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 6.6-8 m, 12H (ar.); 3.9-4.4 m, 4H (CHCH₂ fluorè i C-H); 2.3-3.2 m 3H i 1-2 m, 10H.

Anàlisi elemental: calc. per C₂₉H₂₆O₅N: C 74.2, H 6.4, N 2.9. Trobada: C 74.2, H 6.5, N 3.1.

Determinació de la puresa òptica de Fmoc-Tyr(cHex)-OH.

Succinimido ester de la Boc-L-leucina.

A una dissolució de Boc-L-Leu-OH (0.5g, 2mmol) en tetrahidrofurà exempt de peròxids s'afegeixen 275mg de N-hidroxisuccinimida (2.4mmol), amb agitació magnètica i a 0°C, i 450mg (2.2mmol) de DCC fins a un volum total de 6.5mL de tetrahidrofurà. La mescla s'agita 18h entre 0 i 5°C. Passat aquest temps s'afegeixen 0.025mL d'àcid acètic i al cap de 15min es filtra la dicitclohexilurea formada. El filtrat s'evapora a sequedat sense que la temperatura del bany passi de 35°C, obtenint-se un sòlid blanc que es recristalitza d'èter diisopropílic. S'obtenen 465mg de Boc-L-Leu-OSu (68% de rendiment) de p.f. 115°C, lit. (212) 116°C, Rf=0.6 (acetona, revelat amb ninhidrina després de posar la placa en atmosfera de HCl).

Boc-L-Leu-Tyr-OH.

A una mostra de 19.9mg de Fmoc-L-Tyr(cHex)-OH (41mmol) s'afegeixen 5mL de 50% piperidina/CH₂Cl₂ i es deixa 30min a temperatura ambient, agitant de tant en tant. A continuació s'evapora a sequedat. Un cop desprotegida la funció α-amino es procedeix a la desprotecció de la cadena lateral: el sòlid s'introdueix en un vas de reacció de teflon amb 1.5mL d'anisol, s'afegeixen 15mL de HF i s'agita durant 30min a 0°C. Passat aquest temps s'evapora el HF, s'afegeix èter per a separar l'anisol en excés i els subproductes de la reacció, i el sòlid format es suspen en àcid acètic glacial i aigua. La liofilització d'aquesta suspensió dona tirosina totalment desprotegida. Aquest liofilitzat es suspen en 4mL d'aigua, s'agafa 1mL de dissolució (ca. 10μmol) i se li addicionen 0.06mL de tampó NaHCO₃/Na₂CO₃ de pH=8.8 i 0.06mL d'una dissolució de Boc-L-Leu-OSu (ca. 20μmol) en tetrahidrofurà. S'afegeix 1mL de mescla tampó/tetrahidrofurà 1/1 per tal de poder agitar bé la dissolució durant les 7h de reacció.

La mostra patró es prepara per reacció de 10mg (10μmol) de DL-tirosina en 1mL de mescla tampó/tetrahidrofurà 1/1, 0.06mL de tampó NaHCO₃/Na₂CO₃ de pH=8.8 i 0.06mL de dissolució de Boc-L-Leu-OSu (ca. 20 mol) en tetrahidrofurà durant 7h.

El control de la reacció es du a terme a tots dos cassos per cromatografia en capa fina, eluint amb acetona i revelant amb ninhidrina.

Preparació de mostres per a l'anàlisi.

Després de les 7h de reacció, la mostra s'evapora a sequedat i l'oli que s'obté es tracta amb TFA durant 30min i es torna a evaporar a sequedat. L'oli resultant es dissol en tampó citrat de pH=2.2 i s'enrasa a 2mL. 1mL d'aquesta dissolució (5µmol) s'injecta a l'analitzador d'aminoàcids (B.119C), eluint amb una mescla de tampó citrat 0.2N pH=4.25 amb 1.5% d'alcohol benzílic i 2% de n-propanol a 60mL/min i 55°C.

Resultats obtinguts:

	<u>Mostra</u>			
	<u>Patró</u>		<u>Problema</u>	
	<u>L-D</u>	<u>L-L</u>	<u>L-D</u>	<u>L-L</u>
Temps d'elució (min)	144	235	146	239
Area	198	226	0.31	185

Agafant la relació entre les àrees dels dos diastereoisòmers L-D i L-L de la mostra patró s'obté un valor de resposta relativa de 0.88. Aplicant aquest valor al nostre problema podem estimar, com a màxim detectable, un 0.2% de diastereoisòmer L-D.

Tampó citrat 0.2N, pH=4.25. Per a preparar 1L de tampó es dissolen en aigua 19.6g de citrat sòdic dihidrat, 7mL de HCl conc., 5mL de tioglicol, 2mL de dissolució de BRIJ-35 i 0.1mL d'àcid caprílic, enrasant a un volum final de 1L.

Fmoc-Cys(Acm)-OH.

H-Cys(Acm)-OH.

20.0g de Boc-Cys(Acm)-OH (68mmol) s'afegeixen a 250mL de dissolució 4N de HCl en dioxan. Gairebé immediatament es forma un precipitat (hidroclorur d'acetamidometilcisteïna), i la suspensió es deixa agitant 1h a temperatura ambient. Es filtra el precipitat, i s'ajunta amb el sòlid que s'obté en evaporar a sequedat les aigües mares.

300g de resina bescanviadora d'anions Dowex 1X-8 (100-200mesh) en forma de clorur (clorur de trimetilbenzilamoni) empaquetats en una columna

de 4.5cm de diàmetre, es tracten amb NaOH 1N fins a aconseguir assaig de clorurs negatiu (35L). La resina, en forma d'hidròxid, es tracta amb aigua fins que el pH de l'eluit és inferior a 9 (2L), i a continuació s'hi passa AcOH 1N fins que el pH de l'eluit és inferior a 2 (2L). Finalment, la resina, en forma d'acetat, es renta amb aigua fins que l'eluit té pH superior a 4.8 (3-4L) (flux:9mL/min).

La totalitat d'hidroclorur d'acetamidometilcisteïna es carrega a la columna de DOWEX 1X-8 en forma d'acetat i s'elueix amb aigua. La presència de la base lliure H-Cys(Acm)-OH en l'eluit es comprova dipositant en una cromatoplaca un petit volum de l'eluit i revelant amb ninhidrina. Les fraccions que contenen el producte s'evaporen a sequedat. S'obtenen 13.06g de producte (87% de rendiment), que s'elueixen en un volum de 800mL. L'assaig de clorurs de l'eluit després d'aquests 800mL és encara negatiu.

Fmoc-Cys(Acm)-OH a partir de Fmoc-Cl.

3.156g de S-acetamidometilcisteïna (16.46mmol) es dissolen en 35mL de Na₂CO₃ aquós al 10%, es refreda en un bany de gel i s'afegeixen 15mL de dioxan. Lentament i amb agitació, s'addiciona una dissolució de 4.68g de Fmoc-Cl (18.11mmol) en 30mL de dioxan. La suspensió s'agita 1h a 0°C i després a temperatura ambient. El progrés de la reacció es segueix per cromatografia en capa fina (CHCl₃/EtOH 3/1) i controlant el pH. Quan aquest baixa per sota de 9 s'afegeix més dissolució de Na₂CO₃ al 10%. Al llarg de la reacció cal afegir-ne varies vegades. Després de 5h, com que per cromatografia en capa fina encara s'observa H-Cys(Acm)-OH sense reaccionar, s'afegeixen 0.85g més de Fmoc-Cl (3.3mmol) però ni tan sols així s'aconsegueix consumir totalment la cisteïna de partida. Temps total de reacció: 8h.

La mescla de reacció s'aboca sobre 600mL d'aigua i gel, i s'extreu amb 3x125mL d'èter. La capa aquosa s'acidifica amb HCl conc. a pH=2. Després d'unes hores a la nevera, es pot filtrar el precipitat format. Aquest producte conté la totalitat de Fmoc-Cys(Acm)-OH formada, 5.53g molt impurificats. Aquest crú es cromatografia en 6 lots de ca. 0.9g; columna de gel de sílice Lobar mida B; eluent: 190mL de CHCl₃, 500mL de CHCl₃/iPrOH/AcOH 88/10/2 i 300mL de CHCl₃/MeOH/AcOH 88/10/2; flux: 115mL/h. Recuperem 2.03g de Fmoc-Cys(Acm)-OH (34% de rendiment) que s'acaben de purificar per cristallització amb n-hexà i cloroform.

Azidoformiat de 9-fluorenilmetil (Fmoc-N₃).

A una dissolució freda de 4.6g de NaN₃ (71mmol) en 20mL d'aigua s'afegeix una dissolució de 12.0g de Fmoc-Cl (46mmol) en 25mL d'acetona, formant-se un precipitat blanc gairebé immediatament. La suspensió s'agita 2h en un bany de gel i 2h a temperatura ambient (cal afegir una mica més d'aigua per a poder agitar bé) i a continuació el precipitat es filtra i renta amb aigua. S'obtenen 11.94g de Fmoc-N₃ (97% de rendiment) de p.f. 84-85°C, lit. (22) 83-85°C. La recristal.lització en n-hexà proporciona 7.60g de producte (rendiment del 64%), amb Rf=0.63 (CHCl₃/n-hexà 9/1).

IR (KBr): 2200, 2120, 1720, 1450, 1380, 1250, 1240 i 1230cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃): δ7.1-7.8 m, 8H (ar.); 4.1-4.6 m, 3H.

Fmoc-Cys(Acm)-OH a partir de Fmoc-N₃.

A una dissolució refreda en un bany de gel de 5.5g (28.6mmol) de H-Cys(Acm)-OH en 60mL de Na₂CO₃ aquós al 10% s'afegeixen, amb agitació, 35mL de dioxan i, gota a gota, una dissolució de 7.6g de Fmoc-N₃ (28.6mmol) en 45mL de dioxan. Acabada l'addició la suspensió s'agita 1h a 0°C i 48h a temperatura ambient, i durant aquest temps es controla el pH, mantenint-lo a 9 per addició de dissolució de Na₂CO₃ quan és necessari. Passades les 48h (encara s'observa a la cromatografia en capa fina una molt petita taca de producte que reacciona amb ninhidrina), la mescla de reacció s'aboca sobre 800mL d'aigua i gel i s'extreu amb 3x200mL d'èter. La capa aquosa es refreda en un bany de gel i s'acidifica amb HCl conc. fins a pH=2. Després d'unes hores a la nevera, el precipitat (que ja es comença a formar en acidificar) es redisol directament en acetat d'etil i aquesta dissolució s'ajunta amb l'extracte de les aigües mares amb 3x150mL d'acetat d'etil. El total de fases orgàniques es renta amb 2x200mL de HCl 0.1N i 2x200mL d'aigua, s'asseca amb MgSO₄ i s'evapora a sequedat. S'obtenen 9.48g de Fmoc-Cys(Acm)-OH (80% de rendiment) pràcticament taca única per cromatografia en capa fina (CHCl₃/MeOH/AcOH 73/25/2, Rf=0.41; CHCl₃/EtOH 3/1, Rf=0.1). Aquest producte es recristal.litza de n-hexà -acetat d'etil, obtenint-se 8.1g de Fmoc-Cys(Acm)-OH pura (68% de rendiment), p.f. 147-148°C; [α]_D = -44 (c 1, DMF).

IR (KBr): 3320, 3060, 2940, 1730, 1700, 1530 i 1370cm⁻¹.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ7-8 m, 8H (ar.); 4-4.5 m, 5H; 2.8-3.1 m, 2H i 2 s, 3H (CH₃).

Anàlisi elemental: calc. per C₂₁H₂₂O₅N₂S: C 60.8, H 5.4, N 6.8, S 7.7. Trobada: C 60.8, H 5.4, N 6.8, S 8.0.

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

3.2.1. Síntesi del pèptid.

Ancoratge de Fmoc-glicina a la resina.

A 7.64g de 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè 1_{A-III'} (suposem $f=0.40\text{mmol OH/g resina}$) secs s'afegeix el filtrat procedent de preparar (Fmoc-Gly)₂O a partir de 4.54g de Fmoc-glicina (15.28mmol) i 1.73g de DCC (8.40mmol), i una dissolució de 932mg (7.64mmol) de DMAP. La suspensió s'agita durant 30min a temperatura ambient, i la Fmoc-glicil-resina es filtra i renta amb 3xCH₂Cl₂, 3xDMF, 3xiPrOH, 3xCH₂Cl₂, 3xDMF, 3xiPrOH i 3xMeOH. La desprotecció d'una alíquota de Fmoc-aminoacil-resina (seca) mostra que hem aconseguit un gra de substitució de 0.11mmol/g Fmoc-Gly-resina.

Els grups hidroxil polimèrics que han quedat lliures es bloquegen per benzoilació amb clorur de benzoil i piridina (materials i mètodes 7.1).

Fmoc-Ser(Bzl)-OH. S'efectua un acoblament, formant l'anhídrid simètric amb 2.28mmol de serina (951mg) i 1.26mmol de DCC (259mg). S'intenta avaluar, sense èxit, l'extensió de l'acoblament pel mètode de la ninhidrina quantitativa (materials i mètodes 5.2). L'assaig de la fluorescamina és pràcticament negatiu. Abans d'ancorar el següent aminoàcid, com a mesura de seguratat s'efectua una acetilació amb Ac₂O i EDIA.

Fmoc-Glu(Bzl)-OH. Pel primer acoblament es prepara l'anhídrid simètric a partir de 3.75mmol d'aminàcid (1.72mg, 5 vegades d'excés respecte als grups amino lliures) i 2.07mmol de DCC (426mg). Tant l'assaig de la fluorescamina com el de la ninhidrina són positius, de manera que es repeteix acoblament, aquesta vegada amb 1.5mmol de Fmoc-Glu(Bzl)-OH (698mg) i 0.83mmol de DCC (170mg). Tot i que els dos assaigs són encara lleugerament positius, donem per acabada la síntesi, ja que, en principi, ha d'ésser més fàcil separar el Fmoc-tripèptid del dipèptid H-Ser(Bzl)-Gly-OH que de Ac-Ser(Bzl)-Gly-OH.

La desprotecció d'una alíquota al final de la síntesi dóna un valor de $f=0.10\text{mmol/g Fmoc-pèptid-resina}$. La hidròlisi de la peptidil-resina permet de quantificar 0.09mmol pèptid/g Fmoc-pèptid-resina.

El primer tractament amb 55% de TFA en diclorometà s'efectua sobre 1.28g de Fmoc-tripeptidil-resina en presència d'anisol (29 mL de 55% TFA/CH₂Cl₂ + 0.28mL d'anisol). El rentat final amb DMA es substitueix per rentats amb metanol. S'obté una mescla del tripèptid desitjat 7 i del seu ester metílic. En els tractaments posteriors s'evita el contacte TFA-metanol i no s'obté l'ester metílic. Els rentats amb DMA poden, en aquest cas (donada la solubilitat del pèptid), ésser substituïts per rentats amb diclorometà. Les proporcions de reactius són les mateixes. El rendiment de la reacció és del 81%.

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

Filtració molecular sobre Sephadex LH-20.

37.3µmol de crú peptídic procedent del primer tractament amb TFA (7-1) (mescla de pèptid i ester metílic) es cromatografien a través d'una columna de 100x1cm empaquetada amb Sephadex LH-20 (18g de gel) eluint amb CH₂Cl₂/MeOH 2/3. L'única manera d'evitar una mica la formació de bombolles d'aire és fer circular el dissolvent d'abaix a dalt. Flux: 10mL/h Es recupera gairebé quantitativament el producte.

Tractament amb dissolvents orgànics i precipitació.

Sobre 56mg de crú peptídic 7-1 (conté 34.6µmol de pèptid) s'ha efectuat un assaig de purificació per extracció amb dissolvents orgànics i precipitació, d'acord amb l'esquema indicat a la pàgina 133. El procés experimental és bàsicament el mateix que es descriu en el proper apartat. Les quantitats de producte separades a cada fracció són les següents:

Extracte amb éter:	16.4mg, 2µmol de material peptídic
Extracte amb <u>n</u> -hexá:	1mg, 0.002µmol de material peptídic
Dissolució DMA/H ₂ O:	8mg, 2.5µmol de material peptídic
Precipitat:	33mg, 29.6µmol de material peptídic.

3.2.2.C. Purificació del pèptid 7.

Extracció amb dissolvents i precipitació.

El total de crú peptídic 7-3 (111mg, 85.8µmol de pèptid), procedent de l'acidòlisi de 1.23g de Fmoc-tripeptidil-resina amb 29mL de 55% TFA/CH₂Cl₂ i 0.28mL d'anisol, es tracta en primer lloc amb 20mL de n-hexà anhidre, sonicant durant 40s. Es decanta el sobrenadant per succió amb una pipeta Pasteur, es renta el sòlid amb 5mL més de n-hexà i es torna a decantar el dissolvent, ajuntant-lo amb l'extracte anterior. La dissolució de n-hexà es filtra amb el sistema Swinney a través d'un filtre Millipore FH, per no arrossegar gens de sòlid amb la fase orgànica. El sòlid obtingut es tracta amb 15mL de n-hexà/éter 2/8, sonicant durant 40s. El dissolvent es decanta, i el residu sòlid es renta amb 5mL de n-hexà, filtrant la dissolució resultant d'ajuntar els dos sobrenadants a través del mateix filtre ja emprat. El sòlid resultant es dissol en 4mL de DMA (que prèviament han passat pel filtre fet servir anteriorment per tal de dissoldre el possible pèptid retinut) i s'afegeixen 20mL d'aigua, formant-se un precipitat gelatinós. Després de deixar-ho un dia a la nevera, el sòlid es filtra a través d'un filtre Millipore GSWP de 0.22µm, s'asseca, es redissol en CH₂Cl₂/MeOH 1/1, s'elimina el dissolvent i es torna a assecar bé. Les quantitats de producte obtingudes s'indiquen a l'esquema de la part teòrica (pàgina 140).

HPLC semi-preparativa.

El precipitat obtingut a l'etapa anterior (63mg, 69µmol) es cromatografia a través d'una columna Ultrasphere-ODS, eluint amb DMF/CH₃CN/H₂O/àcid propiònic 24.5/45.5/30/0.1 a 3.5mL/min. El pèptid es dissol en DMA, es filtra amb l'ajuda del sistema Swinney a través d'un filtre Millipore FH, i s'ajunta amb la DMA que es fa servir per acabar de netejar el sistema de filtració donant un volum final de 2mL. S'injecten fraccions de 100µL (3.15mg, 3.12µmol). S'obtenen 64.1µmol de pèptid pur, així com 0.3µmol del producte corresponent a l'anomenada fracció x (vegeu cromatograma a la pàgina 142) i 0.2µmol de producte en la fracció y. El rendiment global de la purificació és del 75%.

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

3.3.1. Síntesi del pèptid.

Ancoratge de Fmoc-glicina a la resina.

Es prepara l'anhídrid simètric (Fmoc-Gly)₂O a partir de 5.20g de Fmoc-glicina (17.5mmol) i 1.99g de DCC (9.6mmol). A 5.74g de 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè 1_{A-II} (f=0.61mmol OH/g resina) s'afegeixen 8.75mmol de (Fmoc-Gly)₂O (2.5 vegades d'excés respecte als grups hidroximetil polimèrics) i 107mg de DMAP (0.875mmol, 10% respecte a l'anhídrid) dissolts en el mateix dissolvent (CH₂Cl₂/DMF 4/1). El volum total de dissolvent emprat és de 100mL. La suspensió s'agita 1h a temperatura ambient, i passat aquest temps l'aminoacil-resina es filtra i renta amb 3xCH₂Cl₂, 3xDMF, 3xiPrOH, 3xCH₂Cl₂, 3xDMF, 3xiPrOH i 3xMeOH. Una alíquota (seca) de Fmoc-glicil-resina es desprotegeix, posant de manifest que hem assolit un grau de substitució de 0.33mmol/g Fmoc-Gly-resina.

Els grups hidroxil que han quedat lliures es bloquegen per tractament amb clorur de benzoil i piridina. La síntesi es continua amb 5.80g de Fmoc-glicil-resina benzoilada.

Fmoc-Tyr(cHex)-OH. Un acoblament amb 5.64mmol de tirosina (2.73g, 3 vegades d'excés respecte als grups amino de la glicina) i 3.10mmol de DCC (639mg) dóna assaig de fluorescamina dubtós, però assaig de la ninhidrina negatiu. Abans d'ancorar el següent aminoàcid, s'acetila amb Ac₂O i EDIA.

Fmoc-Pro-OH. S'efectua un acoblament preformant l'anhídrid a partir de 9.4mmol de Fmoc-prolina (3.16g, 5 vegades d'excés) i 5.17mmol de DCC (1.06g). L'avaluació de l'extensió de l'acoblament dóna el mateix resultat que per l'acoblament anterior. L'acetilació amb Ac₂O i piridina bloqueja tant els possibles grups hidroxil com amino lliures.

Fmoc-Ser(Bzl)-OH. Després d'un acoblament amb 5.64mmol de Fmoc-Ser(Bzl)-OH (2.35g) i 3.10mmol de DCC (639mg) l'assaig del cloranil és clarament negatiu.

Tanmateix, com que el mètode no és tan sensible com els altres, s'acetila amb Ac_2O i EDIA.

Fmoc-Ala-OH. Primer acoblament: 5.64mmol de Fmoc-Ala-OH (1.75g) i 3.10mmol de DCC (639mg). L'assaig de la ninhidrina és lleugerament positiu. Segon acoblament: 3.76mmol d'aminoàcid (1.60g) i 2.07mmol de DCC (426mg). L'assaig de la ninhidrina és clarament negatiu.

Fmoc-Trp-OH. En el primer acoblament s'empren 2.40g de triptofan (5.64mmol) i 639mg de DCC (3.10mmol); en el segon, 1.60g d'aminoàcid (3.76mmol) i 426mg de DCC (2.07mmol). Assaig de la ninhidrina clarament negatiu.

Fmoc-Gln-OH. A diferència dels altres residus, no s'ancora a través de l'anhidrid simètric preformat, sino acilant amb l'ester actiu d'HOBt (vegeu materials i mètodes, 7.2.b). Pel primer acoblament s'empren 2.07g de Fmoc-glutamina (5.64mmol), 761mg d'HOBt (5.64mmol) i 1.28g de DCC (6.20mmol). En el segon acoblament es forma l'ester actiu a partir de 1.38g de Fmoc-Gln-OH (3.76mmol), 508mg d'HOBt (3.76mmol) i 852mg de DCC (4.14mmol). L'assaig de la ninhidrina després del segon acoblament és negatiu.

Fmoc-Cys(Acm)-OH. Primer acoblament: 2.32g d'aminoàcid (5.64mmol) i 639mg de DCC; ninhidrina lleugerament positiva. Segon acoblament: 1.55g de cisteïna (3.76mmol) i 426mg de DCC. L'assaig de la ninhidrina és clarament negatiu.

Fmoc-Tyr(cHex)-OH. S'empren 2.73g d'aminoàcid i 639mg de DCC per a preformar l'anhidrid pel primer acoblament. Cal un segon acoblament, amb 1.82g de Fmoc-Tyr(cHex)-OH i 426mg de DCC per a tenir assaig de la ninhidrina negatiu.

La desprotecció d'una alíquota al final de la síntesi dona un valor de $f=0.24\text{mmol/g}$ Fmoc-nonapeptidil-resina. La hidròlisi de la peptidil-resina permet de quantificar 0.20mmol de pèptid/g Fmoc-pèptid-resina.

La primera acidòlisi de l'enllaç péptid-resina s'efectua sobre un lot de 746mg de Fmoc-nonapèptid-resina, amb 38mL de 55% TFA/ CH_2Cl_2 , 0.38mL d'anisol i 0.76mL de β -mercaptoetanol. El darrer rentat amb DMA es canvia per un rentat amb metanol, amb la qual cosa obtenim mescla de pèptid 8 i del seu ester metílic.

Les següents acidòlisis es duen a terme en les mateixes condicions, però evitant el contacte TFA-metanol o bé rentant amb DMA tal com s'indica als protocols generals de síntesi (7.5).

El rendiment d'aquesta etapa és del 78%.

3.3.2. Purificació del segment peptídic protegit 8.

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

Filtració molecular sobre Sephadex LH-60.

6-7g de gel, en suspensió amb 10% DMA/MeOH, s'empaqueten en una columna de 100x1cm. Es cromatografien 41.1µmol de crú peptídic 7-2, eluint amb 10% DMA/MeOH a 6mL/h. Rendiment de la purificació: 70%.

Filtració molecular sobre Sephadex LH-20.

41.1µmol de crú peptídic 7-2 es cromatografien a través de Sephadex LH-20 (18g de gel), eluint amb 10% DMA/MeOH a 6mL/h en una columna de 100x1cm. Rendiment de la purificació: 81%.

Extracció amb dissolvents orgànics i precipitació.

54.8µmol de crú peptídic 7-2 es tracten amb n-hexà anhidre, èter anhidre, i es precipiten amb aigua després d'haver sigut solubilitzats en DMA, tal com s'indica a l'esquema de la part teòrica de la pàgina 153. El protocol experimental és pràcticament el mateix que el que es descriu en el següent apartat. Les quantitats de producte separades a cada fracció són les següents:

Extracte amb <u>n</u> -hexà:	10mg, 0.062µmol de material peptídic
Extracte amb èter:	35mg, 0.087µmol de material peptídic
Dissolució DMA/H ₂ O:	13mg, 2.3µmol de material peptídic
Precipitat:	74mg, 39.5µmol de material peptídic.

3.3.2.C. Purificació del pèptid 8.

Extracció amb dissolvents i precipitació.

543mg de crú peptídic 8-4 (72.2 μmol de péptid) procedents de l'acidòlisi de 500mg de Fmoc-peptidil-resina amb 25mL de 55% TFA/ CH_2Cl_2 , 0.25mL d'anisol i 0.5mL de β -mercaptoetanol, es tracten amb 20mL de n-hexà anhidre, sonicant durant 60s. El sobrenadant es decanta per succió amb una pipeta Pasteur, es renta el sòlid amb 5mL més de n-hexà i es torna a decantar el dissolvent, ajuntant-lo amb l'extracte anterior. La dissolució es filtra amb el sistema Swinney a través d'un filtre Millipore FH. El sòlid obtingut es tracta amb 20mL d'èter anhidre, sonicant durant 90s. El dissolvent que es decanta, juntament amb 5mL més d'èter que es fan servir per a rentar el producte sòlid, es passen a través del mateix filtre Millipore ja emprat. El sòlid resultant es dissol en 4mL de DMA (DMA que ha passat pel sistema de filtració que abans hem fet servir, per tal de dissoldre el possible pèptid retintut) i s'afegeixen 20mL d'aigua, produint-se precipitació del pèptid. Després d'haver estat 3-4h a la nevera, el precipitat es filtra (filtre Millipore GSWP 0.22 μm) i es renta amb aigua. El pèptid precipitat s'asseca bé, i les aigües mares es liofilitzen. A la part teòrica s'indiquen les quantitats de producte separades a cada fracció, així com el seu contingut en aminoàcids i els cromatogrames d'HPLC analítica (pàgines 160-161). El rendiment d'aquesta etapa és del 78%.

HPLC semi-preparativa.

El precipitat obtingut a la primera etapa de purificació (118mg, 56.3 μmol) es cromatografia a través d'una columna Ultrasphere-ODS, eluint amb $\text{DMF}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{àcid propiònic}$ 30/52.5/17.5/0.1 a 4mL/min. El pèptid es dissol en DMA, es filtra amb l'ajuda del sistema Swinney a través d'un filtre Millipore FH, i s'ajunta amb la DMA que s'empra per a acabar de rentar el sistema de filtració, donant un volum final de 2.87mL. S'injecten fraccions de 90 μL (3.5mg, 1.67 μmol). S'obtenen 36.1 μmol de pèptid pur, així com 2.4 μmol del producte corresponent a la fracció anomenada x (vegeu cromatograma pàgina 163) i 1.2 μmol de producte en la fracció y. El rendiment d'aquesta etapa de purificació és del 64%, i el global de la purificació del 50%.

CONCLUSIONS.

1. S'ha dissenyat un nou mètode de síntesi en fase sòlida de segments peptídics protegits, utilitzant el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), làbil a les bases, com a protector temporal de les funcions α -amino, grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids làbils a l'àcid fluorhídric anhidre i un ancoratge pèptid-resina làbil a l'àcid trifluoroacètic.

Amb aquest esquema de protecció s'han sintetitzat sobre el 4-hidroximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) 1 els segments peptídics protegits Gln-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-OH 3 i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-OH 4 corresponents a les seqüències 1-6 i 7-10 de la luliberina (LHRH).

Al llarg de la síntesi s'ha constatat que el grup Fmoc s'elimina ràpidament i quantitativa per tractament amb piperidina, essent particularment útil la quantificació, per mesura de l'absorció a l'ultraviolat, de la N-(9-fluorenilmetil)piperidina formada a cada etapa de desprotecció per a controlar l'evolució de la síntesi i detectar reaccions secundàries que comporten variacions del grau de substitució sobre el polímer. Així, a la síntesi del pèptid 4 s'ha detectat, en el cicle d'incorporació del tercer aminoàcid, una pèrdua important del grau de substitució atribuïble a la formació d'una dicetopiperazina.

Els crús peptídics obtinguts per acidòlisi de les peptidil-resines s'han purificat combinant la filtració molecular sobre Sephadex LH-20 i la cromatografia líquida preparativa d'alta eficàcia sobre gel de sílice, posant-se de manifest les limitacions d'aquests sistemes cromatogràfics clàssicament emprats per a purificar segments peptídics protegits.

2. Per engalzament successiu dels segments peptídics 4 i 3 sobre l' α -aminobenzilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) i posterior acidòlisi amb àcid fluorhídric anhidre s'ha obtingut el LHRH.

L'acoblament del pèptid 4 sobre la resina ha tingut lloc amb baix rendiment, molt probablement per raó de la inaccessibilitat del pèptid a l'amina polimèrica estèricament impedida. Tanmateix, l'engalzament del pèptid 3 sobre la tetrapeptidil-resina ha sigut gairebé quantitatiu.

La purificació del crú peptídic de LHRH s'ha assolit per filtració molecular sobre Sephadex G-15, cromatografia de bescanvi catiònic sobre carboximetilcel.lulosa i una darrera filtració molecular sobre Bio-Gel P-2, obtenint-se el producte pràcticament ja pur després de la primera cromatografia.

3. Els pèptids protegits Glp-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Dcbzl)-Gly-NH-NH₂ 5 i Fmoc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH-NH₂ 6, potencialment útils per a dur a terme l'engalzament dels segments 1-6 i 7-10 de la luliberina pel mètode de l'azida, s'han sintetitzat sobre el 4-carbazoiloximetilfenoximetilcopoli(estirè-1%-divinilbenzè) 2.

A la síntesi d'ambdós segments s'ha produït una forta disminució del grau de substitució sobre la resina en el cicle d'incorporació del segon aminoàcid, sense que hagi sigut possible esbrinar per quin mecanisme ha tingut lloc.

Aquest fet que tant incideix en el rendiment de la síntesi, unit a les dificultats trobades a la purificació d'aquests pèptids, evidencia els greus inconvenients d'aquest mètode de síntesi de segments peptídics protegits en forma d'hidrazida C-terminal.

4. La clorometilació de poliestirè amb clorometil metil èter en presència de SnCl₄ no ha tingut lloc amb rendiments reproduïbles. El mètode d'anàlisi que ha conduït a resultats més coherents en la determinació del grau de substitució d'aquestes resines és el desplaçament del clor amb piridina i anàlisi de clorurs pel mètode de Volhard modificat. Des d'un punt de vista qualitatiu, l'espectroscòpia de ¹³C-RMN en fase gel suministra força informació perquè permet de detectar la presència de grups hidroximetil sobre la resina i d'avaluar, per comparació amb d'altres resines, l'extensió de la reacció de clorometilació.

Contràriament al descrit a la literatura, els dos mètodes de síntesi de 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè per reacció de clorometilpoliestirè amb alcohol 4-hidroxibenzílic i metòxid sòdic no han conduït, en les nostres mans, a resines de qualitat tant diferent. Essencialment, la resina obtinguda pel mètode de Merrifield té un percentatge menor d'hidroximetilpoliestirè, però la reacció sobre els grups clorometil no sempre és quantitativa.

Pel que fa al mètode d'anàlisi, és convenient, per cada nou lot d'aquestes resines, d'enregistrar l'espectre de ¹³C-RMN en fase gel, quantificar el clor residual, i ancorar un aminoàcid, determinant els rendiments d'acoblament i d'acidòlisi.

5. El mètode descrit inicialment per a ancorar Fmoc-aminoàcids al 4-hidroximetilfenoximetilpoliestirè, amb diciclohexilcarbodiimida i 4-dimetilaminopiridina, condueix a la formació de dipeptidil-resina (9% de diglicina en el nostre cas).

L'extensió d'aquesta reacció secundària es pot reduir a valors inferiors al 1%, tot mantenint un grau de substitució acceptable, emprant un excés important de l'anhídrid simètric del Fmoc-aminoàcid (2.5 vegades) en presència de 4-dimetilaminopiridina (≤ 2.5 equivalents), i en temps curts de reacció (30-60min).

L'alternativa d'utilitzar carbonildiimidazole com a agent d'acoblament permet d'assolir graus de substitució correctes, però no és aconsellable perquè els percentatges de dipèptid són força superiors als obtinguts en les condicions anteriors, havent-se comprovat que l'imidazole alliberat en la reacció d'esterificació desprotegeix els Fmoc-aminoàcids.

6. De l'estudi de les cinètiques d'aminòlisi intramolecular de $H-D-Val-L-Pro-O-CH_2-C_6H_4-O-CH_2-(P)$ per a donar una dicetopiperazina, es dedueix que, de les diferents condicions emprades a la síntesi de pèptids amb Fmoc-aminoàcids, la piperidina és el reactiu que més afavoreix la reacció de ciclació.

Tenint en compte que l'eliminació del grup Fmoc té lloc a velocitat diferent segons la concentració de piperidina i el dissolvent emprat (diclorometà o dimetilformamida), i estudiant les cinètiques de formació de dicetopiperazines en diferents condicions de desprotecció, s'ha deduit que el millor reactiu per a desprotegir quantitativament una Fmoc-dipeptidil-resina i minimitzant la reacció secundària, és 50% de piperidina en dimetilformamida durant 5 minuts.

7. S'han sintetitzat els segments peptídics protegits Fmoc-Glu(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-OH 7 i Fmoc-Tyr(cHex)-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(cHex)-Gly-OH 8, corresponents a les seqüències 32-34 i 35-43 de l'escorpí *Androctonus australis* Hector.

Els mètodes emprats per a ancorar l'aminoàcid C-terminal a la matriu polimèrica han reduït la formació de dipèptid a menys del 0.7%, i si s'ha format dicetopiperazina ha sigut en un percentatge inferior al 4%.

Ambdues síntesis han tingut lloc amb molt bon rendiment, que en el cas del nonapèptid suposa un rendiment mig del 98.8% a cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid.

Els rendiments d'acidòlisi de peptidil-resina han sigut també superiors als obtinguts a les síntesis anteriors. Després d'aquesta reacció cal evitar el contacte àcid trifluoroacètic-metanol, que en els primers tractaments va conduir, en una certa extensió, a la formació de l'ester metílic del pèptid desitjat.

8. La comparació entre la filtració molecular sobre gels de Sephadex compatibles amb dissolvents orgànics i la purificació dels crús peptídics per extraccions amb dissolvents orgànics seguida de precipitació amb aigua del producte solubilitzat en dimetilacetamida, ha mostrat que aquest darrer mètode és el més adequat per a abordar la purificació d'aquests segments peptídics protegits.

En la segona etapa de purificació d'aquests pèptids s'ha posat de manifest la gran utilitat de la cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase d'octadecilsiloxà a escala semi-preparativa per a purificar segments peptídics protegits. L'elució s'ha efectuat amb mescles de dimetilformamida, acetonitril, aigua i àcid propiònic la composició de les quals ha d'ésser curosament ajustada en cada cas. Condicions cromatogràfiques similars han donat també molts bons resultats en l'anàlisi dels productes.

9. Els pèptids 7 i 8, un cop purificats, s'han caracteritzat per anàlisi d'aminoàcids, ressonància magnètica nuclear de protó d'alt camp i espectrometria de masses mitjançant bombardeig amb àtoms ràpids.

Donades les dificultats de caracteritzar segments peptídics protegits per anàlisi d'aminoàcids, i la complexitat dels espectres de $^1\text{H-RMN}$, l'espectrometria de masses per bombardeig amb àtoms ràpids ha demostrat ésser una tècnica particularment útil, ja que no només s'han detectat els corresponents pics moleculars, sino també moltes de les fragmentacions dels enllaços amida, la qual cosa confirma l'estructura dels pèptids tant pel que fa a la seqüència d'aminoàcids com a la presència de tots els grups protectors.

10. El poder de resolució de diferents sistemes de cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase reversa s'ha posat de manifest en la separació del tripèptid 7 i del nonapèptid 8 de tots els seus precursors en la síntesi en fase sòlida, que difereixen entre si només en un aminoàcid.

Els rebliments d'octadecilsiloxà proporcionen, en el nostre cas, una major eficàcia i resolució que els de cianopropilsiloxà. Tanmateix, els extraordinaris canvis de selectivitat observats entre ambdues fases, depenents també de si la fase mòbil conté o no àcid propiònic, indiquen que qualsevol sistema pot ésser adequat per una separació específica i que, en tot cas, la homogeneïtat dels segments peptídics protegits ha de verificar-se en més d'un sistema cromatogràfic.

El factor determinant de la retenció cromatogràfica dels segments peptídics en fase reversa no és la seva longitud o la seva massa molecular, sino la menor o major hidrofobicitat global de la molècula. En aquest sentit, s'observa que els aminoàcids que tenen la cadena lateral protegida per un grup hidrofòbic són els que provoquen un augment més gran de la retenció respecte al precursor sintètic que no el conté.

REFERÈNCIES.

- (1) Els termes estratègia i tàctica han estat proposats per M.Bodanszky per a descriure el disseny d'engalament d'aminoàcids o segments peptídics per a la construcció d'un polipèptid, i la selecció de mètodes d'acoblament i grups protectors més adients per a la preparació de la molècula peptídica desitjada, respectivament.
- M.Bodanszky i M.A.Ondetti, "Peptide Synthesis", p. 161-172, Wiley-Interscience, New York (1966)
- M.Bodanszky, "Perspectives in Peptide Chemistry", p. 15-30, eds. A. Eberle, R.Geiger i T.Wieland, Karger, Basel (1981)
- (2) R.B.Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)
- (3) G.Barany i R.B.Merrifield, "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology", vol. 2, p. 1-184, eds. E.Gross i J.Meienhofer, Academic Press, New York (1979)
- (4) B.Gutte i R.B.Merrifield, J. Biol. Chem. 246, 1922 (1971)
- (5) J.J.Sharp, A.B.Robinson i M.D.Kamen, J. Am. Chem. Soc. 95, 6097 (1973)
- (6) C.H.Li i D.Yamashiro, J. Am. Chem. Soc. 92, 7608 (1970)
- (7) D.Yamashiro i C.H.Li, J. Am. Chem. Soc. 100, 5174 (1978)
- (8) A.Marglin i R.B.Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 88, 5051 (1966)
- (9) H.Aogayi, H.Yenozawa, N.Takahashi, T.Kato, N.Izumiya i C-C.Yang, Biochim. Biophys. Acta 263, 823 (1972)
- (10) F.M.Finn i K.Hofmann, "The Proteins", vol. 2, p. 106-256, eds. H. Neurath i R.L.Hill, Academic Press, New York (1976)
- (11) C-I.Niu, "Perspectives in Peptide Chemistry", p. 45-57, eds. A.Eberle, R.Geiger i T.Wieland, Karger, Basel (1981)
- (12) G.W.Kenner, R.Ramage i R.C.Sheppard, Tetrahedron 35, 2767 (1979)
- (13) I.J.Galpin, F.E.Hancock, B.K.Handa, A.G.Jackson, G.W.Kenner, R.Ramage i B.Singh, Tetrahedron 35, 2771 (1979)
- (14) K.Kawasaki, R.Camble, G.Dupuis, H.Romovacek, H.T.Storey, C.Yanaihara i K.Hofmann, J. Am. Chem. Soc. 95, 6815 (1973)
- (15) N.Fujii i H.Yajima, J.C.S. Perkin Trans. I, 789 (1981)
- (16) H.Yajima, Y.Kiso, Y.Okada i H.Watanabe, J.C.S. Chem. Comm., 106 (1974)
- (17) Protein Synthesis Group, Shangai Institute of Biochemistry, Scientia Sinica 18, 745 (1975)
- (18) H.Maruyama, R.Matsueda, E.Kitazawa, H.Takahagi i T.mukaiyama, Bull. Chem. Soc. Japan 49, 2259 (1976)

- (19) R.Camble i N.N.Petter, "Peptides 1976", Proc. of 14th European Peptide Symposium, p. 299-307, ed. A.Loffet, Editions de l'Université de Bruxelles, Bruxelles (1976)
- (20) F.Albericio, Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona (1981)
- (21) G.Barany i R.B.Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 99, 7363 (1977)
- (22) L.A.Carpino i G.Y.Han, J. Org. Chem. 37, 3404 (1972)
- (23) S-S.Wang, J. Am. Chem. Soc. 95, 1328 (1973)
- (24) S.Sakakibara, M.Shin, M.Fujino, Y.Shimonishi, S.Inove i N.Inukai, Bull. Chem. Soc. Japan 38, 1522 (1965)
- (25) J.Lenard i A.B.Robinson, J. Am. Chem. Soc. 89, 181 (1967)
- (26) S-S.Wang, C.C.Yang, I.D.Kulesha i R.B.Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 6, 103 (1974)
- (27) S-S.Wang i D.Kulesha, J. Org. Chem. 40, 1227 (1975)
- (28) J.K.Chang, M.Shimizu i S-S.Wang, J. Org. Chem. 41, 3255 (1976)
- (29) C.K.Ingold, "Structure and Mechanism in Organic Chemistry", 2nd ed., p. 1129-1131, Cornell University Press, Ithaca (1969)
- (30) L.A.Carpino i G.Y.Han, J. Am. Chem. Soc. 92, 5748 (1970)
- (31) R.A.More O'Ferrall i P.J.Warren, J.C.S. Chem. Comm., 483 (1975)
- (32) R.A.More O'Ferrall i S.Slae, J. Chem. Soc. (B), 260 (1970)
- (33) R.P.Kelly i R.A.More O'Ferrall, J.C.S. Perkin Trans II, 681 (1979)
- (34) F.Larkin i R.A.More O'Ferrall, Aust. J. Chem. 36, 1831 (1983)
- (35) R.A.More O'Ferrall, F.Larkin i P.Walsh, J.C.S. Perkin Trans II, 1573 (1982)
- (36) J.Meienhofer i C-D.Chang, "Peptides 1978", Proc. 15th European Peptide Symposium, p. 573-575, eds. I.Z.Siemion i G Kupryszewski, Wroclaw University Press, Wroclaw (1979)
- (37) E.Atherton, R.C.Sheppard i B.J.Williams, "Peptides 1978", Proc. 15th European Peptide Symposium, p. 207-210, eds. I.Z.Siemion i G. Kupryszewsky, Wroclaw University Press, Wroclaw (1979)
- (38) C-D.Chang i J.Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 11, 246 (1978)
- (39) J.Meienhofer, M.Waki, E.P.Heimer, T.J.Lambross, R.C.Makofske i C-D. Chang, Int. J. Peptide Protein Res. 13, 35 (1979)

- (40) C.D.Chang, A.M.Felix, M.H.Jimenez i J.Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 15, 485 (1980)
- (41) E.Atherton, H.Fox, D.Harkiss, C.J.Logan, R.C.Sheppard i B.J.Williams, J.C.S. Chem. Comm., 537 (1978)
- (42) E.Atherton, C.J.Logan i R.C.Sheppard, J.C.S. Perkin Trans. I, 538 (1981)
- (43) E.Atherton, M.Caviezel, H.Fox, D.Harkiss, H.Over i R.C.Sheppard, J.C.S. Perkin Trans. I, 65 (1983)
- (44) E.Brown, R.C.Sheppard i B.J.Williams, J.C.S. Perkin Trans I, 75 (1983)
- (45) R.Colombo, Int. J. Peptide Protein Res. 19, 71 (1982)
- (46) A.Bodanszky, M.Bodanszky, N.Chandramouli, J.Z.Kwli, J.Martinez i J.C.Tolle, J. Org. Chem. 45, 72 (1980)
- (47) L.Kisfaludy i I.Schön, Synthesis, 325 (1983)
- (48) M.Bodanszky, M.Bednarek, A.Bodanszky i J.C.Tolle, "Peptides 1980", Proc. 16th European Peptide Symposium, p. 93-98, ed. K.Brunfeldt, Scriptor, Copenhagen (1981)
- (49) M.Bodanszky, S.S.Deshmane i J.Martinez, J. Org. Chem. 44, 1622 (1979)
- (50) J.Martinez, J.C.Tolle i M.Bodanszky, J. Org. Chem. 44, 3596 (1979)
- (51) E.Atherton, C.Bury, R.C.Sheppard i B.J.Williams, Tetrahedron Lett., 3041 (1979)
- (52) L.A.Carpino i J.R.Williams, J.C.S. Chem. Comm., 450 (1978)
- (53) R.Arshady, E.Atherton i R.C.Sheppard, Tetrahedron Lett., 1521 (1979)
- (54) L.A.Carpino, E.M.E.Mansour, C.H.Cheng, J.R.Williams, R.McDonald, J.Knapczyk i M.Carman, J. Org. Chem. 48, 661 (1983)
- (55) L.A.Carpino, E.M.E.Mansour i J.Knapczyk, J. Org. Chem. 48, 666 (1983)
- (56) C.Gioeli i J.B.Chattopadhyaya, J.C.S. Chem. Comm., 672 (1982)
- (57) M.Bodanszky i M.A.Bednarek, Int. J. Peptide Protein Res. 20, 434 (1982)
- (58) H.Kessler i R.Siegmeier, Tetrahedron Lett. 24, 281 (1983)
- (59) M.A.Bednarek i M.Bodanszky, Int. J. Peptide Protein Res. 21, 196 (1983)
- (60) J.P.Tam, R.C.Dimarchi i R.B.Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 16, 412 (1980)
- (61) R.C.Sheppard i B.J.Williams, J.C.S. Chem. Comm., 587 (1982)

- (62) A.V.Schally, A.Arimura, Y.Baba, R.M.G.Nair, H.Matsuo, T.W.Redding, L.Debeljuk i W.F.White, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43, 393 (1971)
- (63) R.Burgus, M.Butcher, N.Ling, M.Monahan, J.Rivier, R.Fellows, M.Amoss, R.Blackwell, W.Vale i R.Guillemin, *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D, Paris* 273, 1611 (1971)
- (64) D.S.Kemp, "The Peptides; Analysis, Synthesis and Biology", vol. 1, p. 315-383, eds. E.Gross i J.Meienhofer, Academic Press, New York (1979)
- (65) E.Pedroso i E.Giralt, resultats no publicats.
- (66) P.G.Pietta i G.R.Marshall, *J.C.S. Chem. Comm.*, 650 (1970)
- (67) F.Weygand, D.Hoffmann i E.Wünsch, *Z. Naturforsch., Teil B* 21, 426 (1966)
- (68) W.König i R.Geiger, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970)
- (69) J.Honzl i J.Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 26, 2333 (1961)
- (70) G.S.Omenn i C.B.Anfinsen, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6571 (1968)
- (71) U.Ragnarsson, S.Karlsson i U.Hamberg, *Int. J. Peptide Protein Res.* 7, 307 (1975)
- (72) B.F.Gisin, S.Kobayashi i J.E.Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 115 (1977)
- (73) C.Birr i M.Wengert-Müller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18, 147 (1979)
- (74) Y.S.Klausner i M.Bodanszky, *Synthesis*, 549 (1974)
- (75) J.Meienhofer, "The Peptides; Analysis, Synthesis and Biology", vol. 1, p. 197-239, eds. E.Gross i J.Meienhofer, Academic Press, New York (1979)
- (76) R.Hirschmann, "Peptides 1969", p.138-144, ed. E.Scoffone, North Holland Publ., Amsterdam (1971)
- (77) I. Beacham, G.Dupuis, F.M.Finn, H.T.Storey, C.Yanaihara, N.Yanaihara i K.Hofmann, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 5526 (1971)
- (78) A.F.McKay, *Chem. Rev.* 51, 301 (1952)
- (79) R.Paul, G.W.Anderson i F.M.Callahan, *J. Org. Chem.* 26, 3347 (1961)
- (80) J.A.McLaren, W.E.Savidge i J.M.Swan, *Austral. J. Chem.* 11, 345 (1958)
- (81) S-S.Wang i R.B.Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 6488 (1969)
- (82) S-S.Wang, *J. Org. Chem.* 40, 1235 (1975)

- (83) S.Sakakibara i T.Fujii, Bull. Chem. Soc. Japan 42, 1466 (1969)
- (84) E.Siepmann i H.Zahn, Biochim. Biophys. Acta 82, 412 (1964)
- (85) A.R.Fletcher, J.H.Jones, W.I.Ramage i A.V.Stachulski, J.C.S. Perkin Trans. I, 2261 (1979)
- (86) International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Pure and Appl. Chem. 56, 595 (1984)
- (87) A.Fontana i C.Toniolo, "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products", vol. 33, p. 309-449, eds. W.Herz, H.Grisebach i G.W.Kirby, Springer-Verlag, New York (1976)
- (88) M.Bodanszky, Nature 175, 685 (1955)
- (89) G.Kupyszewsky, Roczn. Chem. 35, 595 (1961)
- (90) J.Pless i R.A.Boissonnas, Helv. Chim. Acta 46, 1609 (1963)
- (91) K.Hofmann, "Peptides 1969", p. 130-137, ed. E.Scoffone, North Holland Publ., Amsterdam (1971)
- (92) K.Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan 29, 486 (1956)
- (93) B.W.Erickson i R.B.Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 95, 3750 (1973)
- (94) D.Yamashiro i C.H.Li, J. Am. Chem. Soc. 95, 1310 (1973)
- (95) D.Andreu, Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona (1981)
- (96) J.Ramachandran i C.H.Li, J. Org. Chem. 27, 4006 (1962)
- (97) H.Hagenmaier i H.Frank, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973 (1972)
- (98) D.H.Rich i J.Singh, "The Peptides; Analysis, Synthesis and Biology", vol. 1, p. 242-261, eds. E.Gross i J.Meienhofer, Academic Press, New York, (1979)
- (99) M.Mikolajczyk i P.Kielbasaninski, Tetrahedron 37, 233 (1981)
- (100) D.F.DeTar i R.Silverstein, J. Am. Chem. Soc. 88, 1013 (1966)
- (101) D.F.DeTar, R.Silverstein i F.F.Rogers Jr., J. Am. Chem. Soc. 88, 1024 (1966)
- (102) H.S.Bates, J.H.Jones, W.I.Ramage i M.J.Witty, "Peptides 1980", Proc. 16th European Peptide Symposium, p. 185, ed. K.Brunfeldt, Scriptor, Copenhagen (1981)
- (103) R.B.Merrifield, A.R.Mitchell i J.E.Clarke, J. Org. Chem. 39, 660 (1974)

- (104) E.Atherton, M.Caviezel, H.Over i R.C.Sheppard, J.C.S. Chem. Comm., 819 (1977)
- (105) C.D.Chang, M.Waki, M.Ahmad, J.Meienhofer, E.O.Lundell i J.D.Haug, Int. J. Peptide Protein Res. 15, 59 (1980)
- (106) E.Kaiser, R.L.Colescott, C.D.Bossinger i P.I.Cook, Anal. Biochem. 34, 595 (1970)
- (107) A.M.Felix i M.H.Jimenez, Anal. Biochem. 52, 377 (1973)
- (108) W.Steglich i G.Höfle, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 8, 981 (1969)
- (109) E.F.V.Scriben, J. Chem. Soc. Rev., 129 (1983)
- (110) E.Haslam, Tetrahedron 36, 2409 (1980)
- (111) B.F.Gisin, Anal. Chim. Acta 58, 248 (1972)
- (112) L.A.Carpino, J. Org. Chem. 45, 4250 (1980)
- (113) A.Albert i E.P.Serjeant, "The Determination of Ionisation Constants", Chapman and Hall Ltd., London (1971)
- (114) B.F.Gisin i R.B.Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 94, 3102 (1972)
- (115) E.Atherton, R.C.Sheppard i J.D.Wade, J.C.S. Chem. Comm., 1060 (1983)
- (116) M.Tessier i J.Van Rieschoten, comunicació personal.
- (117) S.B.H.Kent, A.R.Mitchell, M.Engelhard i R.B.Merrifield, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 2180 (1979)
- (118) S.L.Manatt, D.Horowitz, R.Horowitz i R.P.Pinnell, Anal. Chem. 52, 1529 (1980)
- (119) E.Giralt, J.Rizo i E.Pedroso, Tetrahedron 40, 4141 (1984)
- (120) Sephadex LH-20 Technical Booklet, Pharmacia, Uppsala (1972)
- (121) Sephadex LH-60 Technical Booklet, Pharmacia, Uppsala (1976)
- (122) Enzacryl Gel Technical Data Sheet, Koch-Light Laboratories, Colnbrook, England
- (123) T.F.Gabriel, J.Michalewsky i J.Meienhofer, J. Chrom. 129, 287 (1976)
- (124) T.F.Gabriel, M.H.Jimenez, A.M.Felix, J.Michalewsky i J.Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 9, 129 (1977)
- (125) K.Schofield, M.R.Grimett i B.R.T.Keene, "Heteroaromatic Nitrogen Compounds. The Azoles", p. 184-192, Cambridge University Press, Cambridge (1976)

- (126) J.M.Stewart i J.D.Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H.Freeman and Co., San Francisco (1969)
- (127) R.A.Heacock i M.E.Mahon, J. Chrom. 17, 338 (1965)
- (128) R.C.Orlowski, R.Walter i D.Winkler, J. Org. Chem. 41, 3701 (1976)
- (129) R.Eritja, Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona (1983)
- (130) M.Matzner, R.P.Kurkijy i R.J.Cotter, Chem. Rev., 645 (1964)
- (131) S.Moore i W.H.Stein, J. Biol. Chem. 211, 907 (1954)
- (132) T.Fujii i S.Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan 47, 3146 (1974)
- (133) H.Rink i B.Riniker, Helv. Chim. Acta 57, 831 (1974)
- (134) F.S.Tjoeng, J.P.Tam i R.B.Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 14, 262 (1979)
- (135) J.Gante i W.Lautsch, Chem. Ber. 97, 994 (1964)
- (136) A.Lindenman, N.H.Khan i K.Hofmann, J. Am. Chem. Soc. 74, 476 (1952)
- (137) E.Giralt, F.Albericio, E.Pedroso, C.Granier i J.Van Rietschoten, Tetrahedron 38, 1193 (1982)
- (138) R.Arshady, G.W.Kenner i A.Ledwith, Makromol. Chem. 177, 2911 (1976)
- (139) K.W.Pepper, H.M.Paisley i M.A.Young, J. Chem. Soc., 4097 (1953)
- (140) R.B.Merrifield, Biochemistry 3, 1385 (1964)
- (141) R.S.Feinberg i R.B.Merrifield, Tetrahedron 30, 3209 (1974)
- (142) D.A.Skoog i D.M.West, "Fundamentos de Química Analítica", tomo 1, Reverté, Barcelona (1977)
- (143) A.I.Vogel, "Química Analítica Cuantitativa", vol. 1, p.360-365, Kaplusz, Buenos Aires (1960)
- (144) G-S.Lu, S.Mojsov, J.P.Tam i R.B.Merrifield, J. Org. Chem. 46, 3433 (1981)
- (145) W.T.Ford i T.Balakrishan, Macromolecules 14, 284 (1981)
- (146) W.T.Ford i S.A.Yacoub, J. Org. Chem. 46, 819 (1981)
- (147) B.F.Gisin, Helv. Chim. Acta 56, 1476 (1973)
- (148) E.Atherton, M.J.Gait, R.C.Sheppard i B.J.Williams, Bioorg. Chem. 8, 351 (1979)

- (149) E.Atherton, N.L.Benoiton, E.Brown, R.C.Sheppard i B.J.Williams, J.C.S. Chem. Comm., 336 (1981)
- (150) S-S.Wang, J.P.Tam, B.S.H.Wang i R.B.Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 18, 459 (1981)
- (151) J.R.Gamet, R.Jacquier i J.Verducci, Tetrahedron 40, 2001 (1984)
- (152) F.Albericio i G.Barany, Int. J. Peptide Protein Res. 23, 342 (1984)
- (153) A.Paquet, Can. J. Chem. 60, 976 (1982)
- (154) L.Lapatsanis, G.Milias, K.Froussios i M.Kolovos, Synthesis, 671 (1983)
- (155) M.Tessier, F.Albericio, E.Pedroso, A.Grandas, R.Eritja, E.Giralt, C.Granier i J.Van Rietschoten, Int. J. Peptide Protein Res. 22, 125 (1983)
- (156) G.F.Sigler, W.D.Fuller, N.C.Chatuverdi, M.Goodman i M.Verlander, Biopolymers 22, 2157 (1983)
- (157) W.D.Fuller, G.F.Sigler, N.C.Chatuverdi i M.S.Verlander, "Peptides, Structure and Function", Proc. 8th American Peptide Symposium, p. 79-82, eds. V.J.Hruby i D.H.Rich, Pierce Chemical Company, Illinois (1983)
- (158) D.R.Bolin i J.Meienhofer, comunicació personal.
- (159) H.A.Staab i G.Maleck, Chem. Ber. 99, 2955 (1966)
- (160) R.Paul i G.W.Anderson, J. Am. Chem. Soc. 82, 4596 (1960)
- (161) M.Bodanszky i J.T.Sheehan, Chem. Ind., 1597 (1966)
- (162) M.C.Khosla, R.R.Smeby i F.M.Bumpus, J. Am. Chem. Soc. 94, 4721 (1972)
- (163) M.Rothe i J.Mazánek, J. L. Ann. Chem., 439 (1974)
- (164) M.Rothe i J.Mazánek, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 11, 293 (1972)
- (165) E.Giralt, R.Eritja i E.Pedroso, Tetrahedron Lett., 3779 (1981)
- (166) K.Suzuki, K.Nitta i N.Endo, Chem. Pharm. Bull. 23, 222 (1975)
- (167) T.Christensen, Acta Chem. Scand. B 33, 763 (1979)
- (168) H.Rochat, C.Rochat, F.Sampieri, F.Miranda i S.Lissitzky, Eur. J. Biochem. 28, 381 (1972)
- (169) H.Rochat, P.Bernard i F.Couraud, "Advances in Cytopharmacology. Neurotoxins: Tools in Neurobiology", p. 325-344, eds. B.Cecarelli i F.Clementi, Raven Press, New York (1979)

- (170) C.Kopeyan, G.Martinez, S.Lissitzky, F.Miranda i H.Rochat, Eur. J. Biochem. 47, 483 (1974)
- (171) S.Guttman i R.A.Boissonas, Helv. Chim. Acta 41, 1852 (1958)
- (172) M.Engelhard i R.B.Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 100, 3559 (1978)
- (173) D.F.Veber, J.D.Milkowski, R.G.Denkewalter i R.Hirschmann, Tetrahedron Lett., 3057 (1968)
- (174) D.F.Veber, J.D.Milkowski, S.L.Varga, R.G.Denkewalter i R.Hirschmann, J. Am. Chem. Soc. 94, 5456 (1972)
- (175) J.Van Rietschoten, E.Pedroso i C.Granier, "Peptides", Proc. 5th American Peptide Symposium, p. 522-524, eds. M.Goodman i J.Meienhofer, J.Wiley and Sons, New York (1977)
- (176) S.R.Dickman i W.L.Wescott, J. Biol. Chem. 210, 481 (1954)
- (177) F.Weygand, W.Steglich, J.Bjarnason, R.Akhtar i N.Chytil, Chem. Ber. 101, 3623 (1968)
- (178) S.Sakakibara, Y.Shimonishi, Y.Kishida, M.Okada i H.Sugihara, Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2164 (1967)
- (179) M.Bodanszky i V.du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. 81, 5688 (1959)
- (180) S.Mojsov, A.R.Mitchell i R.B.Merrifield, J. Org. Chem. 45, 555 (1980)
- (181) B.E.Blömbäck, "Methods in Enzymology", vol. 11, p. 398-411", ed. C.H.W.Hirs, Academic Press, New York (1967)
- (182) R.D.Dimarchi, J.P.Tam, S.B.H.Kent i R.B.Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 19, 88 (1982)
- (183) E.Giralt, D.Andreu, R.Eritja, A.Grandas i E.Pedroso, An. Quim. 79, C, 390 (1983)
- (184) J.M.Manning i S.Moore, J. Biol. Chem. 243, 5591 (1968)
- (185) A.R.Mitchell, S.B.H.Kent, I.C.Chu i R.B.Merrifield, Anal. Chem. 50, 637 (1978)
- (186) V.K.Sarin, S.B.H.Kent, J.P.Tam i R.B.Merrifield, Anal. Biochem. 117, 147 (1981)
- (187) J.H.Knox i G.Szokan, J. Chrom. 171, 439 (1979)
- (188) F.Nachtmann, J. Chrom. 176, 391 (1979)
- (189) W.S.Hancock, C.A.Bishop, R.L.Prestidge, D.R.K.Harding i M.T.W.Hearn, Science 200, 1168 (1978)

- (190) C.Oliemann, D.Voskamp i M.Vrehage, "Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography", vol. 4, p. 1, ed. G.L.Hawk, Marcel Dekker, New York (1981)
- (191) F.Albericio, C.Granier, C.Labbé-Jullié, M.Seagar, F.Couraud i J.Van Rietschoten, *Tetrahedron* 40, 4313 (1984)
- (192) J.C.Amor, Tesi de Llicenciatura, Universitat de Barcelona (1984)
- (193) K.Wüthrich, "NMR in Biological Research: Peptides and Proteins", North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1976)
- (194) H.Determann, "Chromatographie sur Gel. Filtration, Pérmeation, Tamisage moleculaire (Manuel de Laboratoire)", Masson et Cie, Paris (1969)
- (195) I.J.Galpin, G.W.Kenner, S.R.Ohlsen i R.Ramage, *J. Chrom.* 106, 125 (1975)
- (196) I.J.Galpin, A.G.Jackson, G.W.Kenner, P.Noble i R.Ramage, *J. Chrom.* 147, 424 (1978)
- (197) M.Barber, R.S.Bordoli, R.D.Sedgwick i A.N.Tyler, *J.C.S. Chem. Comm.*, 325 (1981)
- (198) F.M.Devienne i J.C.Roustan, *Org. Mass Spectrom.* 17, 173 (1982)
- (199) H.Morris, M.Panico, M.Barber, R.S.Bordoli, R.D.Sedgwick i A.Tyler, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 101, 623 (1981)
- (200) W.A.Konig, M.Aydin, U.Schulze i M.Rinken, "Peptides 1982", *Proc. 17th European Peptide Symposium*, p. 423-429, eds. K.Bláha i P.Malon, Walter de Gruyter, Berlin (1983)
- (201) M.Rinken i W.A.König, "Peptides 1984", *Proc. 18th European Peptide Symposium*, p. 129-132, ed. U.Ragnarsson, Almquist and Wiksell Int., Stockholm (1984)
- (202) L.R.Phillips, O.Nishimura i B.A.Fraser, *Carbohydrate Res.* 132, 275 (1984)
- (203) E.Schiltz, K.D.Schnackerz i R.W.Gracy, *Anal. Biochem.* 79, 33 (1977)
- (204) A.R.Patton i P.Chism, *Anal. Chem.* 23, 1683 (1951)
- (205) H.G.Bray, W.V.Thorpe i K.White, *Biochem. J.* 46, 271 (1950)
- (206) F.Reindel i W.Hoppe, *Chem. Ber.* 87, 1103 (1954)
- (207) E.S.Cook i T.H.Rider, *J. Am. Chem. Soc.* 59, 1739 (1937)
- (208) E.Duñach, Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona (1981)

- (209) L.I.Smith i K.L.Howard, submitters, Organic Synthesis 24, 53 (1944)
- (210) Curtius i Göbel, J. Prakt. Chem. 37, 159 (1888)
- (211) Beilstein, II , 780
- (212) G.W.Anderson, J.E.Zimmerman i F.M.Callahan, J. Am. Chem. Soc. 86,
1839 (1964)