



# Treball Final de Grau

**Synthesis of tripeptides for chelating metals involved in the aggregation of the  $\beta$ -amyloid peptide responsible for Alzheimer disease.**

**Síntesi de tripèptids quelants de metalls involucrats en l'agregació del pèptid  $\beta$ -amiloide responsable de la malaltia de l'Alzheimer.**

Maria del Mar Codina Francès

*Juny 2014*



Aquesta obra esta subjecta a la llicència de:  
Reconeixement–NoComercial–SenseObraDerivada



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>



*No consideris mai l'estudi com una obligació, sinó com una oportunitat per penetrar en el meravellós món del saber.*

Albert Einstein



**REPORT**





# CONTENTS

<b>1. SUMMARY</b>	5
<b>2. RESUM</b>	7
<b>3. INTRODUCTION</b>	9
3.1. Background	9
3.2. Solid phase peptide synthesis	10
3.2.1. Historical background	10
3.2.2. Solid supports	11
3.2.3. Synthetic strategy	12
3.2.4. Activation methods	14
3.2.5. Cleavage from the resin	15
3.3. Determination of chelating agents	16
3.3.1. UV-Visible spectroscopy	16
3.3.2. Fluorescence	16
3.3.3. Circular dichroism	17
<b>4. OBJECTIVES</b>	18
<b>5. RESULTATS I DISCUSIÓ</b>	19
5.1. Síntesi en fase sòlida dels pèptids HAH, HAHY, HHW, HWH	19
5.1.1. Elecció de l'estratègia de síntesi	19
5.1.2. El suport polimèric	19
5.1.3. Grups protectors per els aminoàcids trifuncionals	20
5.1.4. Unió del primer aminoàcid	20
5.1.5. Construcció de la cadena peptídica	21
5.1.6. Eliminació dels grups protectors i alliberament del pèptid de la resina	21
5.2. Síntesi en fase sòlida del pèptid HK(C)H	21
5.2.1. Síntesi de l'intermedi 3-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona	21
5.2.2. Síntesi de <i>N</i> <sup>α</sup> -Fmoc- <i>N</i> <sup>ε</sup> -(cumarin-3-ilcarbonil)- <i>L</i> -lisina	22

5.3. Avaluació de la capacitat quelant del pèptid HAHY	22
5.3.1. Espectroscòpia UV-Visible	22
5.3.2. Espectroscòpia fluorescència	23
5.3.3. Dicroisme circular	24
<b>6. EXPERIMENTAL</b>	27
6.1. Materials i mètodes	27
6.1.1. Reactius i dissolvents	27
6.1.2. Instrumentació	28
6.1.2.2. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear	28
6.1.2.1. Espectròmetre de Masses Exactes (ESI-MS)	29
6.1.3. Cromatografia	29
6.1.3.1. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	29
6.1.3.2. Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses	29
6.1.3.3. Cromatografia en capa prima (CCF)	29
6.1.4. Mètodes analítics	30
6.1.4.1. Determinació de l'acoblament a la resina per quantificació de grups Fmoc	30
6.1.4.2. Assaig qualitatiu de ninhidrina	31
6.1.5. Avaluació de la capacitat quelant del pèptid HAHY	31
6.1.5.1. Espectroscòpia UV-Vis	32
6.1.5.3. Dicroisme circular	32
6.2. Procediments sintètics	33
6.2.1. Preparació de N $\epsilon$ -Fmoc-(cumarin-3-ilcarbonil)-L-lisina	33
6.2.1.1. Preparació de 3-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona	33
6.2.1.2. Síntesi del N $\alpha$ -N $\epsilon$ -Fmoc-(cumarin-3-ilcarbonil)-L-lisina	34
6.2.1. Síntesi en fase sòlida	34
6.2.1.1. Acondicionament de la resina	34
6.2.1.2. Acoblament del primer aminoàcid	34
6.2.1.3. Bloqueig dels centres reactius de la resina	35
6.2.1.4. Elongació de la cadena peptídica amb HOBt/DIC	35
6.2.1.5. Elongació de la cadena peptídica amb Oxyma/DIC	35

---

6.2.1.6. Desancoratge de la cadena peptídica de la resina	35
6.2.2. HAH	36
6.2.3. HWH	36
6.2.4. HK(C)H	37
6.2.5. HAHY	38
6.2.6. HHW	38
<b>7. CONCLUSIONS</b>	39
<b>8. REFERENCES AND NOTES</b>	41
<b>9. ACRONYMS</b>	43
<b>ANNEXES</b>	45
Annex 1: Espectres RMN del pèptid HAH	47
A1.1. <sup>1</sup> H-RMN	47
A1.2. <sup>13</sup> C-RMN	47
A1.3. TOCSY	48
A1.4. HMBC	48
A1.5. HSQC	49
Annex 2: Altres espectres del pèptid HAH	51
A2.1. HPLC	51
A2.1. EM-ES	51
Annex 3: Espectres <sup>1</sup> H-RMN	53
A3.1. HAHY	53
A3.2. HK(C)H	53
A3.3. HHW	54
A3.4. HWH	54



## 1. SUMMARY

This work has been done in collaboration with the Bioinorganic Chemistry group of Inorganic Chemistry Department. This group is interested in chelating oligopeptides (about 3 or 4 amino acids) for metal ions such as copper and zinc, potential theranostic agents for Alzheimer disease.<sup>1</sup> Thereby we have synthesized peptides that contain at least two histidine residues (as metal-binding groups) and one natural or non-natural fluorescent amino acid (for detection purposes).

We have used as fluorescent amino acids: tryptophan (W), tyrosine (T) and the non-natural amino acid *N*<sup>ε</sup>-(coumarin-3-ylcarbonyl)-*L*-Lysine (K(C)). The latter has been prepared in solution by reaction of 1*H*-benzotriazole with 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylic acid to yield 3-(1*H*-benzotriazol-1-ylcarbonyl)-2*H*-chromen-2-one (52-60%) and the subsequent transformation of this intermediate to the final product by reaction with Fmoc-*L*-Lys-OH under basic condition (60-85% yield). It has been characterized by proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR).

The synthesized peptides have been: histidine-alanine-histidine (HAH), histidine-alanine-histidine-tyrosine (HAHY), histidine-histidine-tryptophan (HHW), histidine-lysine(coumarin)-histidine (HK(C)H) and histidine-tryptophan-histidine (HWH) (Figure 1). HAH is the only one that hasn't any fluorophore, but it has used as a blank to determine if fluorescent amino acid chelates the metal.

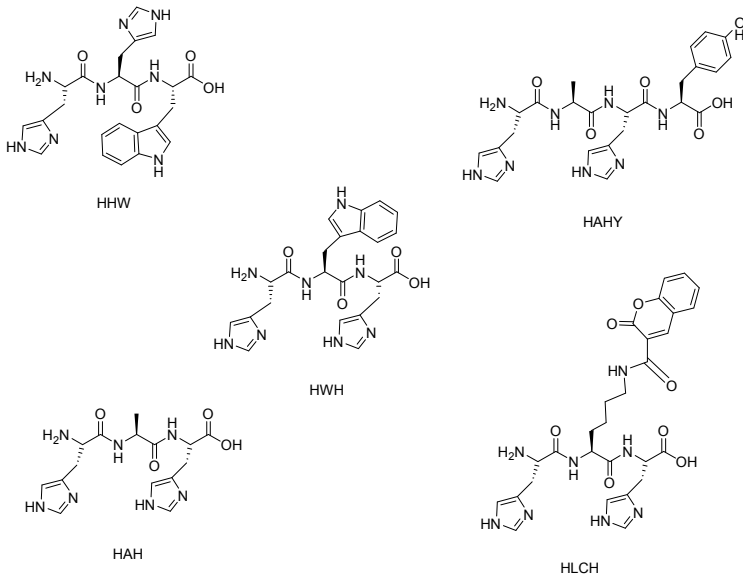


Figure 1

The solid-phase peptide methodology has been chosen for the synthesis of the peptides. The solid support has been 2-chlorotrityl chloride resin and all the synthesis have been carried out from the C to de N-terminal of the chain. The coupling of the first amino acid to the resin has been done in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) as solvent (52-67%). Amino acids have been protected at de N terminal with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), which is labile to piperidine. As the coupling agent has been used *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) together with *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) or ethyl cyano(hydroxyimino)acetate (oxyma) as additives. The cleavage of the peptide from the resin has been carried out by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) in the presence of 5% triisopropylsilane (TIPS) as a scavenger. Under these conditions the peptides have been obtained in general with high yields (83-89%) and purity (> 90%). The characterization of the products has been carried out using different NMR techniques ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , TOCSY, HSQC, HMBC), electrospray mass spectrometry (ESI-MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC).

Finally the binding capacity of peptide HAHY to copper (II) has been evaluated by UV-Visible spectroscopy, fluorescence and circular dichroism under physiological conditions (pH 7,4). It has been demonstrated that this peptides has chelating properties.

## 2. RESUM

Aquest treball s'ha dut a terme en col·laboració amb el grup de Química Bioinorgànica del departament de Química Inorgànica. Aquest grup de recerca està interessat en oligopèptids (3-4 aminoàcids) amb funció quelant sobre metalls com el coure o el zinc, amb potencial utilitzat com a agents teranòstics de la malaltia de l'Alzheimer (AD).<sup>1</sup> En el marc d'aquest projecte s'han sintetitzat pèptids amb dos histidines (com a grups d'unió amb el metall) i un aminoàcid fluorescent, natural o no (per a poder detectar-lo).

Com a aminoàcids fluorescents s'han utilitzat: el triptòfan (W), la tirosina (T) i l'aminoàcid no natural *N*<sup>ε</sup>-(cumarin-3-ilcarbonil)-*L*-Lisina (K(C)). Aquest últim s'ha obtingut en solució per reacció de 1*H*-benzotriazol amb àcid 3-(2*H*-cromen-2-ona)carboxílic (cumarina) per obtenir 3-(1*H*-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona (52-60%) i la posterior transformació d'aquest derivat en el producte desitjat amb Fmoc-*L*-Lisina-OH en medi bàsic (60-85%). S'ha caracteritzat el producte per ressonància magnètica nuclear del protó (<sup>1</sup>H-RMN).

Els pèptids sintetitzats han estat: histidina-alanina-histidina (HAH), histidina-alanina-histidina-tirosina (HAHY), histidina-histidina-triptòfan (HHW), histidina-lisina(cumarina)-histidina (HK(C)H) i histidina-triptòfan-histidina (HWH) (Figura 1). HAH és l'únic que no té cap fluoròfor, però s'utilitza com a blanc per determinar si l'Aa fluorescent s'uneix amb el metall.

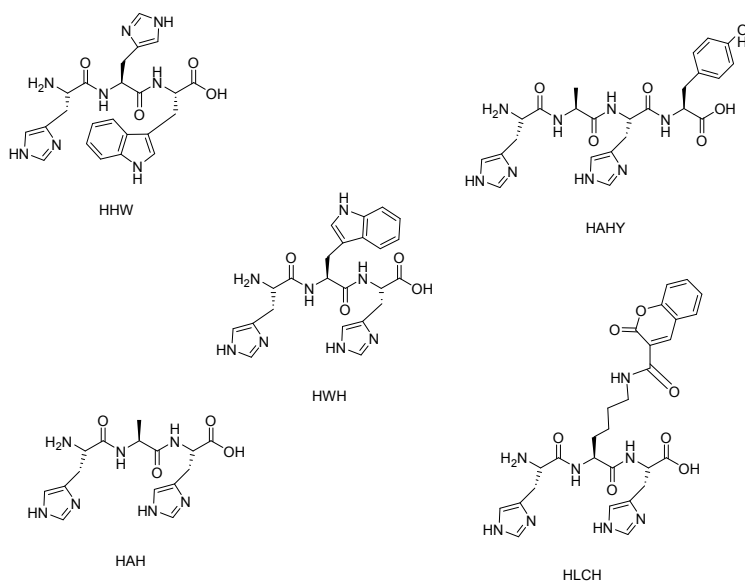


Figura 1

L'estratègia seguida per a la formació d'aquests oligopèptids ha estat la síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS). El suport polimèric utilitzat ha estat 2-clorotritil (CFC) i la unió amb el primer aminoàcid s'ha fet per l'extrem carboxil en presència de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) i *N,N*-dimetilformamida (DMF) com a solvent (52-67%). Per tant l'extrem amino s'ha protegit amb el grup 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), làbil a la piperidina. Com a agent acoblant s'ha fet servir *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) en presència de *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) o 2-ciano-2-hidroxiiminoacetat d'etil (oxyma) com a additiu. El pèptid s'ha alliberat de la resina per tractament amb àcid trifluoroacètic (TFA) en presència d'un 5% de triisopropilsilà (TIPS) com a captador de carbocacions. En aquests condicions els pèptids s'han obtingut amb elevats rendiments (83-89%) i puresa (>90%). La caracterització d'aquests s'ha fet mitjançant diferents RMN ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, TOCSY, HSQC, HMBC), espectrometria de masses exactes amb electroesprai (ESI-MS) i cromatografia analítica d'alta resolució (HPLC).

També s'ha avaluat la capacitat quelant del pèptid HAHY sobre l'ió coure (II) mitjançant espectroscòpia UV-Visible, fluorescència i dicroisme circular en condicions fisiològiques (pH 7,4). S'ha posat de manifest que aquests pèptids compleixen una funció quelant sobre aquests metalls, és a dir, són capaços de formar complexos amb el coure (II).



## 3. INTRODUCTION

### 3.1. BACKGROUND

Alzheimer's disease (AD) is a slowly progressive neurological lethal disorder, in which neurodegeneration is believed to progress for 20 to 30 years before clinical onset. The predominant symptoms are impairment in cognition and profound memory loss. AD mainly affects the middle to old aged people and approximately one of every four people over 85 years suffers it. For instance, the number of people suffering from AD was estimated to 35,6 million and this number is expected to triplicate during the next three decades, to reach a value of about 115 million by 2050.

One of the pathogenic processes associated with AD involves the formation of peptide  $\beta$ -amyloid peptide aggregates and the production of oxidative stress. The  $\beta$ -amyloid (figure 3.1) is produced through sequential cleavage of the Amyloid Precursor Protein (APP) by  $\beta$ -secretases, and metals such as copper or zinc catalyze the aggregation process in the brain. Thus, one of the goals in research on AD is to evaluate the performance of chelating agents to reduce the level of these metals.<sup>2</sup>

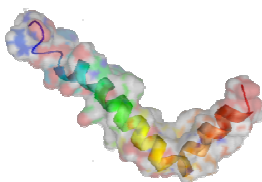


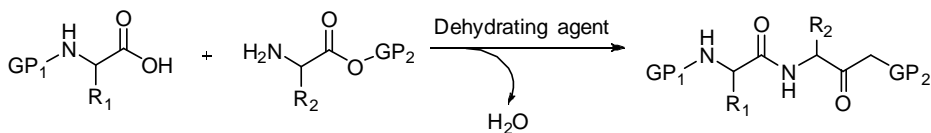
Figure 3.1. Secondary structure of  $\beta$ -amyloid peptide

In collaboration with the Bioinorganic Chemistry group, lead by Dr. Patrick Gamez, the SMBioCom group (synthetic methodologies applied to bioactive products) lead by Dr. Jordi Garcia, has initiated a research line focused on the study of novel peptides with potential chelating properties on Cu (II) or Zn(II). The goal of this project is to synthesize small peptides containing histidine residues as chelating agents and an amino acid (natural or not) as a fluorescent probe for detection proposes, in order to study in a further step the ability of these

peptides to complex the metals above mentioned. In physiological conditions the final goal of this project is to use the best candidates in biological studies.

### 3.2. SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS<sup>3</sup>

Peptides are short chains of amino acid monomers linked by amide bonds. From a chemical point of view, this covalent bond is formed between the  $\alpha$ -carboxyl group of one amino acid and the  $\alpha$ -amino group of another with the concomitant loss of a molecule of water by using a suitable dehydrating agent. The coupling between both amino acids requires protections (GP) for all functional groups that could interfere with the process (scheme 3.1).

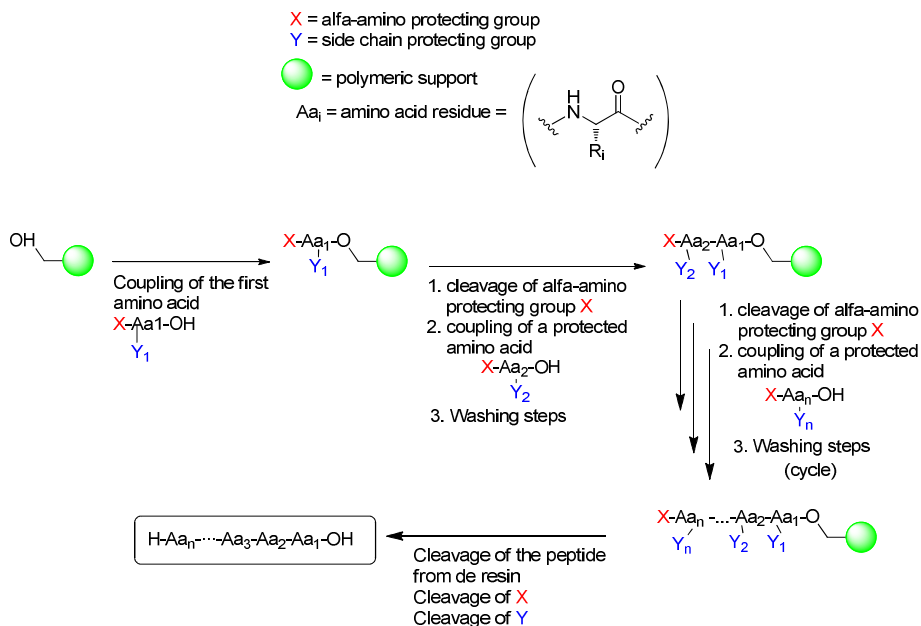


Scheme 3.1. Peptide bond formation

One of the most straight forward strategies to obtain peptides in the laboratory is the solid-phase methodology.

#### 3.2.1. Historical background

Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) is the most common methodology for preparing peptides in the laboratory. It can be defined as the process in which a peptide is constructed by the successive addition of the protected amino acids constituting its sequence, covalently anchored via their C-terminal to an insoluble polymer. In solid peptide synthesis (scheme 3.2) an  $\alpha$ -amino protected amino acid is bound to a solid phase material forming a covalent bond between the  $\alpha$ -carboxyl group and the resin. Then the  $\alpha$ -amino group is deprotected and reacted with  $\alpha$ -carboxyl group of the next  $\alpha$ -amino protected amino acid. This cycle is repeated to form the desired peptide chain. After all reactions, the synthesized peptide is cleaved from the resin.



Scheme 3.2. Solid phase peptide synthesis

The fact of having the growing chain bound to an insoluble support makes it possible to eliminate the excess of reagents and by-products by simple filtration. Washing steps with appropriate solvents insure the complete elimination of reagents, by-products, etc.

The process was originally developed in the 1960s by Robert Bruce Merrifield, who described the first solid phase peptide synthesis in 1963. He was awarded for this reason with Nobel Prize in Chemistry in 1984. Since its introduction over 50 years ago, SPPS has been significantly optimized and each improvement has helped SPPS to become the robust technique that it is today.

### 3.2.2. Solid support

The use of a solid support in chemical synthesis implies that reactions are carried out on the surface of the support, but in this case the reaction also occurs within these particles, therefore this term better describes the insolubility of the polymer. For being an efficient solid support it must be physically stable and allow the rapid filtration of liquids (solvents containing reagents or by-products), it must be inert to all reagents and solvents used during SPPS, it must swell extensively in the solvents used to allow reagents to penetrate and it must be amenable to

adequate functionalization, namely the solid support must be derivatized (or functionalized) to allow for incorporation of the  $\alpha$ -carboxyl group of the first amino acid.

There are a lot of types of resins, but the most commonly used in SPPS is polystyrene crosslinked with 1% divinylbenzene. A higher level of crosslinking would reduce the swelling whereas a decrease would cause a considerable loss of mechanical stability in the swollen state. This resin is versatile and it is quite useful due to its maximal swelling in DCM (a solvent commonly used in SPPS). The initial support used by R. Bruce Merrifield was polystyrene crosslinked 2%.

In this project we utilized 2-chlorotrityl chloride resin (CTC, Barlos) obtained from beaded polystyrene crosslinked with 1% divinylbenzene (figure 3.3). This polymeric support is perhaps one of the most useful for the synthesis of carboxyl terminal peptides. It can be used for the preparation of both protected and non protected peptides. Moreover, it minimizes the formation of Diketopiperazines (DKP), one of the most important side reactions in peptide synthesis, and minimizes racemization during the incorporation of the first amino acid.

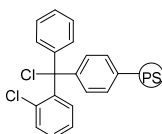


Figure 3.3. CTC resin

### 3.2.3. Synthetic strategy

It's very important to choose an adequate combination of protecting groups and the functionalization of the solid support to achieve a successful synthesis. The strategies used generally are limited to a Boc/benzyl (*tert*-butoxycarbonyl group for protection of  $\alpha$ -amino acid, benzyl like groups for side chain of trifunctional amino acids) or a Fmoc/*t*Bu (9-fluorenylmethyloxycarbonyl for  $\alpha$ -amino protection and *tert*-butyl like protecting groups for side chains of trifunctional amino acids) based scheme. The main characteristics of the two general approaches are outlined in the table (table 3.1), and the figure 3.4 shows an example comparing the two synthetic strategies using tyrosine such as amino acid and CTC resin.

Topic	Fmoc/tBu	Boc/Bzl
Lability	Base / weak acid	Weak acid / strong acid
N-terminal protection	Orthogonal	Both acid labile
TFA treatment	Final cleavage from the resin	Repetitive cleavage on the resin
HF treatment	None	Final cleavage from the resin
Scale	Any scale	Limited scale
Final cleavage	Possible in SPPS vessel	Special equipment
Synthetic steps	Deblock, wash, couple, wash	Additional neutralization step

Table 3.1. Main characteristics of the two general approaches

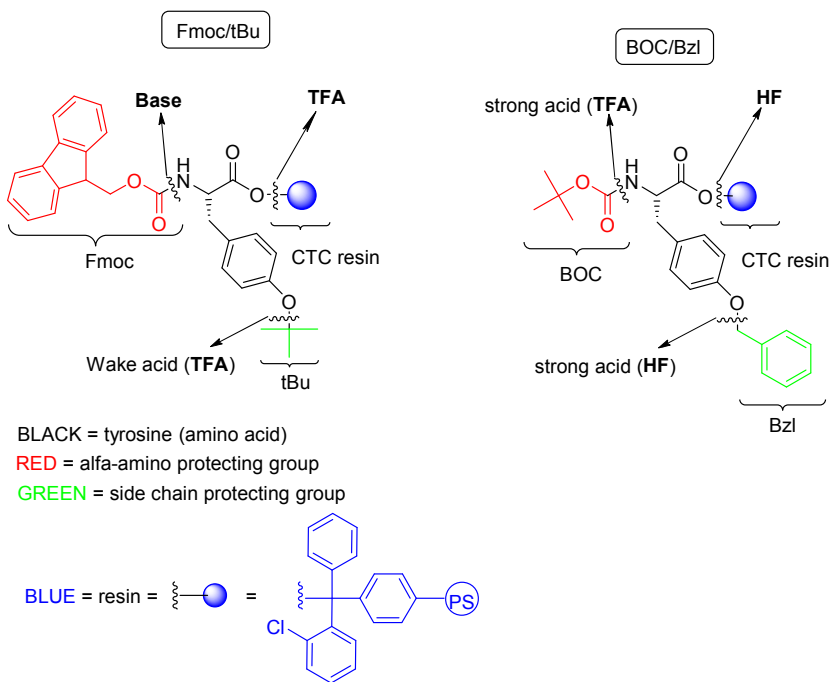


Figure 3.4. Comparison of the two synthetic strategies

In this project we utilized the Fmoc/tBu synthetic strategy because it requires milder conditions than Boc/Bzl method (it isn't necessary to use HF for the cleavage from the resin).

### 3.2.4. Activation methods

The low reactivity of the carboxylic group in an amino acid limits the efficacy of the general coupling reaction in an SPPS. Therefore it is usually activated for speeding up the reaction forming the *O*-acylisourea. The most common activating agents are carbodiimides (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCC, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide, DIC). They have been used from the first days of the solid phase technique and are still popular today. But the activation by carbodiimides presents several drawbacks: the coupling of the activated species is not particularly rapid, therefore can occur the racemization of the activated species (*a*) or the formation of *N*-acylurea (*b*) (figure 3.6). These problems can usually be avoided by introduction of additives to the reaction mixture, such as *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) or ethyl cyano(hydroxyimino)acetate (oxyma).

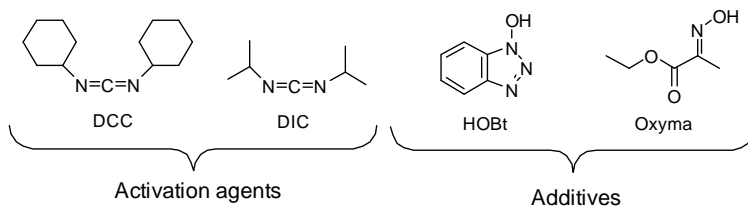


Figure 3.5.

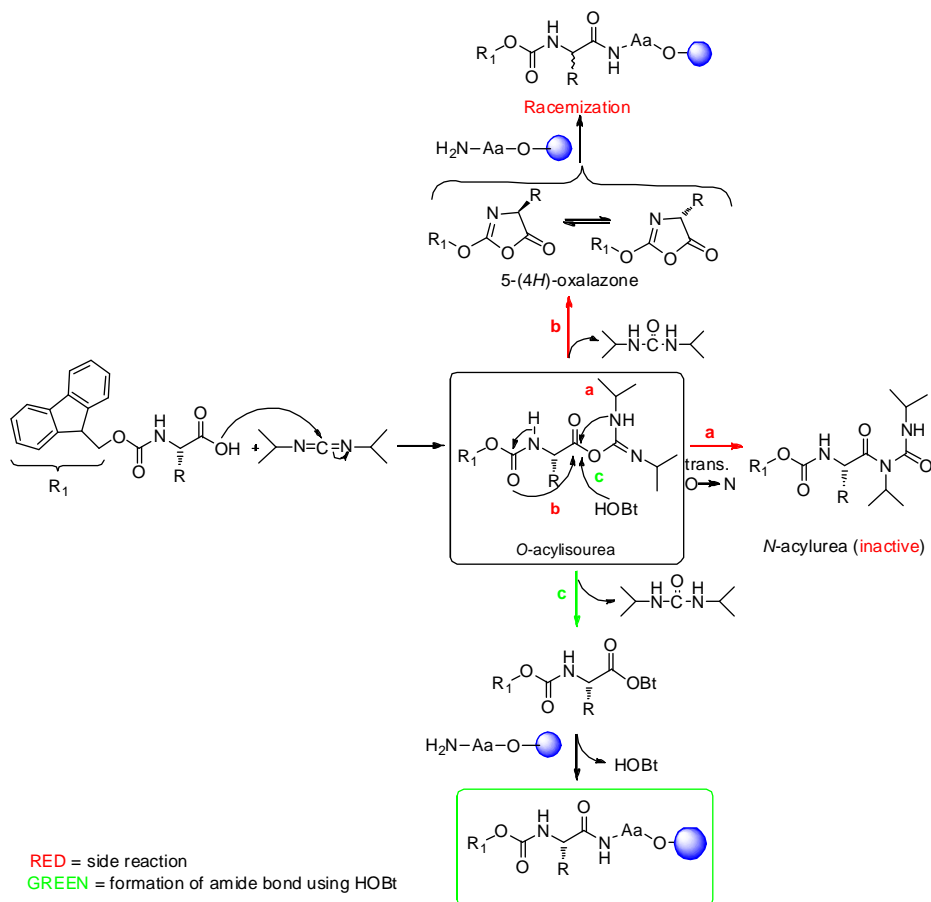


Figure 3.6.  $\alpha$ -carboxyl group activation with DIC and HOBT as an additive, and side reactions.

In this work DIC has been used as the coupling agent together with HOBT or oxyma as additives.

### 3.2.5. Cleavage from the resin

TFA and HF are the typical reagents to perform the final cleavage of the peptide from the resin together with the removal of the side chain protecting groups in Fmoc/tBu and Boc/Bzl strategies, respectively.

During the reaction highly reactive carbocations are generated and it is necessary to trap them to avoid undesired reactions with sensitive amino acids such as cysteine, methionine, serine, threonine, tryptophan and tyrosine. This effect is obtained by the addition of scavengers to the acid such as triisopropylsilane (TIPS).

In this work, the cleavage of the peptide from the resin has been carried out by treatment with TFA in the presence of 5 % TIPS as a scavenger.

### **3.3. DETERMINATION OF CHELATING AGENTS**

A lot of techniques are used to determinate the formation of complexes. In this work we have used three techniques for evaluate the binding capacity of the peptide HAHY to copper (II): UV-Visible spectroscopy, fluorescence and circular dichroism.

#### **3.3.1. UV-Visible spectroscopy**

Ultraviolet-visible spectroscopy refers to absorption spectroscopy in the ultraviolet-visible spectral region of molecules containing  $\pi$ -electrons or non-bonding electrons (n-electrons) that can be excited. In this region of the electromagnetic spectrum, molecules can absorb the energy to undergo electronic transitions from the ground state to the excited state (figure 3.4, 1). The more easily excited the electrons the longer the wavelength of light it can absorb.

This technique is complementary to fluorescence in that fluorescence deals with transitions from the excited state to the ground.

#### **3.3.2. Fluorescence**

Fluorescent is a physical phenomenon in which certain substances called fluorophores, which are excited previously by UV-Visible absorption (1), emit electromagnetic radiation in a wavelength greater (3), after excited state lifetime (2). When fluorophores interact with other molecules decreases the fluorescence intensity without changing the emission spectrum. This attenuation is called quenching and it can be divided in two types: dynamic quenching, when the deactivation occurs because of collisions between molecules, and static quenching, that occurs when the molecules form a complex.



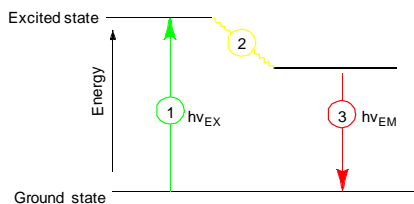


Figure 3.7. Diagram illustrating the processes involved in the creation of an excited electronic state by UV-Visible absorption and subsequent emission of fluorescence.

The Stern-Volmer equation allows us to explore the kinetics of a photophysical intermolecular deactivation process, such as quenching. In general, this process can be represented by a simple equation (equation 3.1.)

$$\frac{I_o}{I} = 1 + k_{SV} [Q]$$

Equation 3.1. Stern-Volmer equation.

Where  $I_o$  is the intensity without a quencher,  $I$  is the intensity with a quencher,  $k_{SV}$  is the Stern-Volmer constant and  $[Q]$  is the concentration of the quencher.

With this equation we can determinate if quenching effect occurs or not.

### 3.3.3. Circular dichroism

Circular dichroism (CD) is a spectroscopic propriety uniquely sensitive to the conformation molecules. The experimentally measured parameter in CD is the difference in absorbance for left and right handed circularly polarised light. To show a CD signal the chromophore must be either inherently chiral (asymmetric) or must be located in an asymmetric environment.

We use this technique because the interaction between the chromophore and other substances introduces perturbations leading to optical activity.

## 4. OBJECTIVES

- Synthesis a few small oligopeptides (3-4 amino acids) containing histidine residues as chelating agents and a fluorescent amino acid (natural or not) for the detection proposes.
- Synthesis the non-natural fluorescent amino acid  $N^{\alpha}$ -(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)- $N^{\epsilon}$ -(coumarin-3-ylcarbonyl)-L-Lysine (K(C)) by 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic.
- Evaluation of the binding capacity of one of the peptides that have been synthesized to chelate peptide HAHY to copper (II) by UV-Visible spectroscopy, fluorescence and circular dichroism under physiological conditions (pH 7,4).

## 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 5.1. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DELS PÈPTIDS HAH, HAHY, HHW, HWH

El plantejament de la síntesi en fase sòlida d'un pèptid requereix la consideració de diferents variables:<sup>4</sup>

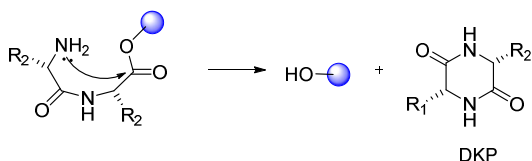
1. Elecció de l'estratègia de síntesi: Fmoc/tBu o Boc/Bzl, tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior.
2. Suport polimèric a utilitzar.
3. Elecció de grups protectors per els aminoàcids trifuncionals.
4. Naturalesa de la unió i mètode d'acoblament del primer aminoàcid a la resina.
5. Mètode de formació de l'enllaç peptídic: reactius d'acoblament, additius i condicions de la reacció.
6. Eliminació de grups protectors i alliberament del pèptid de la resina.

#### 5.1.1. Elecció de l'estratègia de síntesi

Per a la síntesis d'aquests pèptids s'ha utilitzat l'estratègia Fmoc, perquè requereix condicions més suaus (evita la utilització de HF). Totes les síntesis s'han realitzat manualment.

#### 5.1.2. Suport polimèric

El suport polimèric utilitzat ha estat la resina 2-clorotritil (CTC) perquè minimitza la racemització durant l'acoblament del primer aminoàcid i la formació de 2,5-dicetopiperazines (DKP's). La formació de DKP és una reacció secundària molt important en química Fmoc i es produeix quan es desprotegeix el segon aminoàcid, en medi àcid per atac intramolecular de l'extrem  $\alpha$ -amino a l'enllaç entre la resina i la cadena peptídica, obtenint-se un dipèptid cíclic. Per tant, aquesta reacció no desitjada provoca la pèrdua de cadenes peptídiques unides al suport polimèric (esquema 5.1). El grup tritil és suficientment voluminós com per evitar aquest atac intramolecular.



Esquema 5.1. Formació de DKP's

### 5.1.3. Grups protectors per els aminoàcids trifuncionals

Com ja s'ha dit a la introducció, els aminoàcids amb grups funcionals en les seves cadenes laterals, han de estar protegits perquè no es duguin a terme reaccions secundàries no desitjades. La histidina, tirosina i triptòfan han sigut els aminoàcids trifuncionals utilitzats en aquest treball i, per tant, han estat protegits amb els grups tritil (trt), *tert*-butyl (tBu) i *tert*-butoxicarbonil (Boc), respectivament (Figura.5.1).

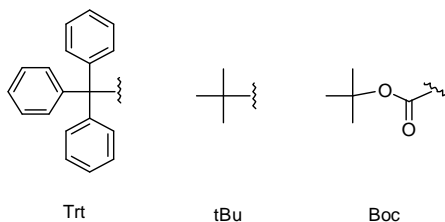
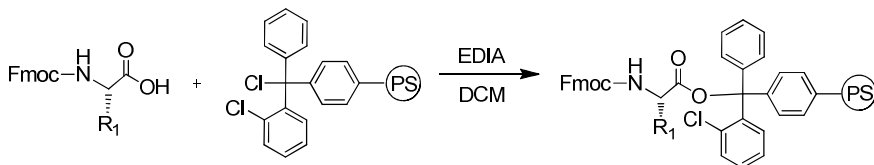


Figura 5.1. Grups protectors de cadenes laterals dels aminoàcids utilitzats en aquest treball

### 5.1.4. Unió del primer aminoàcid

La unió del primer aminoàcid a la resina CTC es fa en presència de *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA) i utilitzant diclorometà (DCM) com a dissolvent (apartats 6.2.1.1 i 6.2.1.2). Posteriorment es realitza un bloqueig dels centres actius que queden a la resina amb MeOH seguint el procediment descrit en l'apartat 6.2.1.3.



Esquema 5.2. Acoblament del primer aminoàcid

La histidina ha estat el primer aminoàcid acoblat a la resina en tots els pèptids amb rendiments del 52 al 67 % determinats a partir de la quantificació de grups Fmoc (apartat 6.1.4.1). La funcionalització de la resina CTC va ser de 1,6 mmols/g.

### 5.1.5. Construcció de la cadena peptídica lineal

Per a la construcció del pèptid s'ha utilitzat *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) com a agent d'acoblament i *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) i 2-ciano-2-hidroxiiminoacetat d'etil (oxyma) com a additius, seguint els protocols descrits als apartats 6.2.1.4 i 6.2.1.5. El mecanisme de reacció s'ha mostrat anteriorment en la figura 3.6 de l'apartat 3.2.4 de la introducció.

En un principi es va començar a treballar amb HOBt però aquest additiu s'ha acabat substituint per l'oxyma ja que el HOBt s'ha deixat de fabricar per ser explosiu. En tots els casos s'han utilitzat 3 equivalents de reactius en relació al nombre d'equivalents de centres reactius en la mesura per cicle d'acoblament, essent dos els cicles utilitzats per tal d'assegurar un rendiment quantitatiu. La quantificació de grups Fmoc al final de la síntesi ha donat rendiments d'incorporació de cadenes peptídiques d'entre 83 i 89% (apartat 6.1.4.1). Aquests rendiments s'han determinat prenent com a referència el nivell d'incorporació del primer aminoàcid.

### 5.1.6. Eliminació dels grups protectors i alliberament del pèptid de la resina.

L'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids i l'alliberament del pèptid de la resina s'han realitzat per tractament amb àcid trifluoroacètic (TFA) 95 % en presència d'un 5% de triisopropilsilà (TIPS) com a captador de carbocacions.

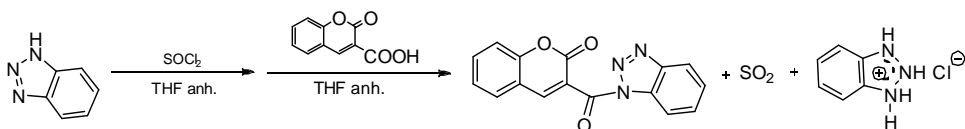
## 5.2. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DEL PÈPTID HK(C)H

Per sintetitzar aquest pèptid ha estat necessari preparar el derivat de lisina adient. La síntesi d'aquest derivat s'ha fet en dos passos. Primer s'ha sintetitzat l'intermedi 3-(1*H*-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona i després aquest s'ha fet reaccionar amb Fmoc-*L*-Lys-OH comercial per obtenir l'aminoàcid no natural *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-(cumarin-3-ilcarbonil)-*L*-lisina.

### 5.2.1. Síntesi de l'intermedi 3-(1*H*-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona

La síntesi de 3-(1*H*-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona (esquema 5.3, c) s'ha fet a partir de la reacció entre 1*H*-benzotriazol (esquema 5.3, a) i l'àcid 3-(2*H*-cromen-2-ona)carboxílic (esquema 5.3, b) en presència de SOCl<sub>2</sub> en excés i THF anhidre com a

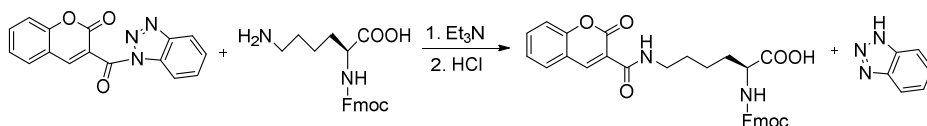
dissolvent (apartat 6.2.1.1) a temperatura ambient. Els rendiments obtinguts per a aquesta síntesi han estat moderats (52 i 60 %).



Esquema 5.3. Síntesi de la 3-(1*H*-benzotriazol-1-ilcarbonyl)-2-cromen-2-ona

### 5.2.2. Síntesi de *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-(cumarin-3-ilcarbonyl)-*L*-lisina

Per tal de sintetitzar l'aminoàcid no natural *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-(cumarin-3-ilcarbonyl)-*L*-lisina s'ha fet reaccionar l'intermedi 3-(1*H*-benzotriazol-1-ilcarbonyl)-2-cromen-2-ona amb l'aminoàcid Fmoc-*L*-Lys-OH en presència de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) i utilitzant MeCN-H<sub>2</sub>O (2:1) com a dissolvent (apartat 6.2.1.2). Els rendiments obtinguts per a aquesta síntesi han estat del 60 – 85 %.



Esquema 5.4. Síntesi de *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-(cumarin-3-ilcarbonyl)-*L*-lisina

## 5.3. AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT QUELANT DEL PÈPTID HAHY

Tots els experiments realitzats per avaluar la capacitat quelant del pèptid s'han fet a pH fisiològic (pH 7,4) utilitzant una dissolució tampó d'àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperaziniletansulfònic (HEPES) i en H<sub>2</sub>O Mili-Q®.

### 5.3.1. Espectroscopia UV-Visible

El coure (II) és un metall de transició paramagnètic amb 9 electrons a l'orbital d, per tant té com a mínim transicions d-d permeses per spin i absorbeix radiació UV-Visible. S'han realitzat dos espectres (apartat 6.1.5.1) mesurant l'absorbància d'una dissolució de HAHY en funció de la longituds d'ona (de 200 nm a 900 nm), en un cas mantenint la concentració de pèptid de 0,4mM constant i variant la concentració de Cu (II) (A), i en l'altre modificant la concentració de HAHY sense variar la de 2mM de Cu (II) (B). De l'experiment B no s'han pogut extreure

evidències concloents, però de l'experiment A (figura 5.2) s'han obtingut els següents espectres, indicant-se en la llegenda d'aquest la relació Cu(II):HAHY:

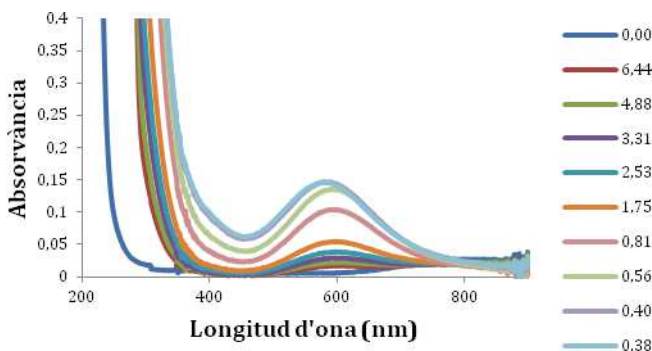


Figura 5.2. Espectre UV-Visible de l'experiment A.

La zona de més interès d'aquests espectres es troba entre 550 nm i 650 nm. És la zona d'absorció del coure, que es corrobora amb el fet que a concentració nul·la de Cu (II) (línia 0,00 de la figura 5.1.) no s'observa cap màxim d'absorbància i sí que es veu a mesura que es va augmentant la concentració de Cu (II). Tot i així això no vol dir que formi un complex amb el coure, ja que aquesta absorbància podria ser deguda a les transicions d-d que presenta l'ió Cu (II). El fet que corrobora la formació del complex és que el màxim d'aquesta absorbància es veu modificada a mesura que s'augmenta la concentració de Cu (II), de tal manera que el màxim es va desplaçant a longituds d'ona més petites. Per tant augmenta l'energia de transició d-d pel fet que el seu desdoblament de camp augmenta afectat per l'enllaç que es forma entre el Cu (II) i el HAHY.

### 5.3.2. Espectroscopia de fluorescència

S'han realitzat uns espectres de fluorescència del (figura 5.3) a concentració constant de 7  $\mu\text{M}$  de pèptid mentre i diferents quantitats d'una dissolució de 100  $\mu\text{M}$  de Cu (II), de manera que s'ha anat variant la relació HAHY:Cu (II) (apartat 6.1.5.2.). S'ha utilitzat l'equació de Stern-Volmer per a analitzar aquest experiment (figura 5.4), representant el quocient entre la intensitat mesurada de HAHY sense Cu (II) i les intensitats mesurades de HAHY amb Cu (II), respecte la concentració de Cu (II) afegida a la longitud d'ona de 306 nm (màxim d'intensitat de fluorescència).

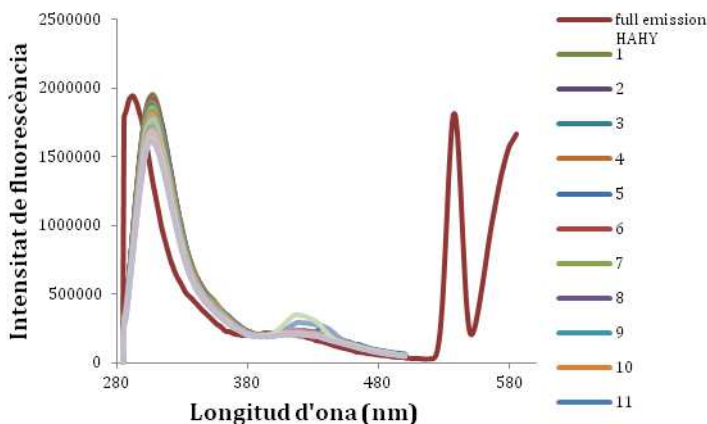


Figura 5.3. Fluorescència de HAHY afegint-hi Cu (II)

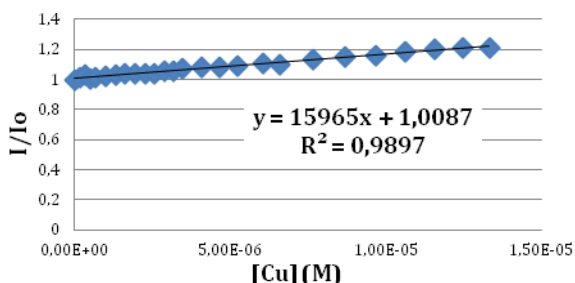


Figura 5.4. Representació de l'equació de Stern Volmer.

Com la tirosina és una substància fluoròfora s'ha pogut estudiar el pèptid per fluorescència. En la figura 5.3 es pot observar com ha anat disminuint la fluorescència de la tirosina a mesura que s'ha anat afegint una dissolució de Cu (II). Aquest fet confirma que el pèptid i el coure interaccionen, fet que es pot confirmar amb la equació de Stern-Volmer (SV), que tot i que la constant de Stern-Volmer ( $k_{sv}$ ) és petita (pendent de la recta), existeix i pren un valor de 15969  $\text{dm}^3/\text{mol}$ . Tot i així no es pot determinar si aquest *quenching* és estàtic o dinàmic.

### 5.3.3. Dicroisme circular

S'ha mesurat la desviació de la llum polaritzada en una dissolució de concentració constant 0,076 mM de pèptid mentre s'ha anat afegint una dissolució de Cu (II) 2,5 mM (apartat 6.1.5.3.). Els resultats obtinguts es representen en la figura 5.5.



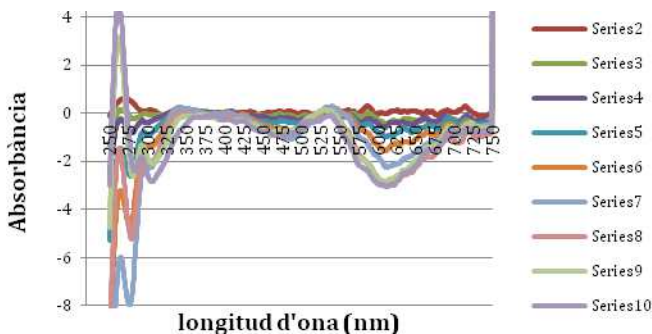


Figura 5.5. Espectres de diroisme circular de HAHY amb diferents quantitats de Cu (II)

El Cu(II) és una substància que no absorbeix en diroisme circular ja que és aquiral, però en aquest cas sí que absorbeix, perquè el Cu(II) interacciona amb pèptid HAHY i el complex resultant és quiral. Per això en el gràfic representat en la figura 5.3 s'ha pogut observar com el màxim que correspon a la banda d-d del coure a la longitud d'ona de 620 nm es modifica mentre s'ha anat modificant la concentració de Cu (II) També es pot observar una altra banda a 306 nm corresponent a la tirosina, com que el màxim també es modifica mentre se li ha anat afegint Cu(II), corrobora la interacció entre les dues espècies perquè sinó fos així el màxim no hauria d'augmentar al no variar la concentració de tirosina. Aquesta tècnica doncs permet confirmar de nou que el pèptid forma un complex amb el Cu (II).



## 6. EXPERIMENTAL

### 6.1. MATERIALS I MÈTODES

#### 6.1.1. Reactius i dissolvents

Marca	Productes
Acros	1 <i>H</i> -benzotriazol, SOCl <sub>2</sub> ,
Aldrich	TIPS, Et <sub>3</sub> N, Ac <sub>2</sub> O, piperidina, HOBT, Et <sub>2</sub> O, DIPEA
Fisher scientific	MeCN (HPLC), TFA
Fluka	ACN
Iris Biotech	Fmoc- <i>L</i> -Ala-OH, Fmoc- <i>L</i> -His(trt)-OH, Fmoc- <i>L</i> -Trp(Boc)-OH, oxyrna, resina CTC
Jescuder	MgSO <sub>4</sub> anhidre, NaCl
Novabiochem®	Fmoc- <i>L</i> -Lys-OH, Fmoc- <i>L</i> -Tyr(tBu)-OH
Panreac	Piridina
Scharlau	Acetona, AcOEt, DCM, HCl, hexà, MeOH,
Specialist des solvants	DMF
TCI	DIC, DIP

- L'aigua Milli-Q® s'obté per filtració a través d'un sistema de Mili-Q-Plus (Millipore) de 0,45 µm de porus (resistència superior a 18 MΩcm<sup>-1</sup>).
- El DCM anhidre s'obté portant-lo a reflux sobre hidrur de calci (CaH<sub>2</sub>) i destil·lant-lo sota atmosfera de N<sub>2</sub>

- El THF anhidre s'obté portant-lo a reflux sobre una mescla de Na i benzofenona i destil·lant-lo sota atmosfera de N<sub>2</sub>.

### 6.1.2. Instrumentació

Instrument	Marca	Model
Balança analítica	Mettler	Toledo AB254
Balança analítica	Mettler	PJ360
Centrífuga	Hettich	Rotofix 32A
Espectrofluorímetre	HORIBA	NanoLog™
Espectrofotòmetre	NorthStar Scientific	UVIKON-XS
Espectròmetre de Masses Exactes (ESI-MS)	Agilent	LC/MSD-TOF
Espectropolarímetre	Jacso	J-815
Espectroscòpia UV-Vis	Varian	Cary 100
Liofilitzador	LABCONCO	
RMN	Varian	Mercury 400 MHz
RMN	Bruker	Avance III 600 MHz
Rotavapor	BUCHI	R-200
Sistema de filtració	Millipore	Millo-Q-Plus
Ultrasons	JP SELECTA S.A.	Ultrasons 2,6 L

#### 6.1.2.1. Espectròmetre de Masses Exactes (ESI-MS)

La tècnica d'ionització utilitzada és l'electrosprai (ESI-MS). Les condicions del espectròmetre són: voltatge capil·lar, 4 KV (positiu), 3,5 KV (negatiu); fragmentor, 215 V; temperatura del gas, 325 °C; gas nebulitzador, N<sub>2</sub> amb pressió 15 psi; gas assecat, N<sub>2</sub> amb flux

7.0 L/min. La introducció de la mostra s'introdueix a la font a través d'un sistema de bombeig HPLC Agilent 1100 mitjançant un flux de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  de  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$  1:1.

#### 6.1.2.2. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear

En els espectres de  $^1\text{H}$  els desplaçaments químics ( $\delta$ ) s'indiquen en ppm, utilitzant el tetrametilsilà (TMS) com a estàndard intern pel calibratge. Les constants d'acoblament (J) s'indiquen en Hz.

En els espectres  $^{13}\text{C}$  els desplaçaments químics ( $\delta$ ) s'indiquen en ppm., utilitzant el dissolvent deuterat com a estàndard intern pel calibratge.

### 6.1.3. Cromatografia

#### 6.1.3.1. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

Sistema Shimadzu constituït per una bomba quaternària LC-20AD, un injector automàtic SIL-10ADvp, un detector de doble longitud d'ona variable SPD-20A i un desgasificador en línia DGU-20A5.

S'utilitza una columna de fase inversa C18 subministrada per Phenomenex® de 250x4mm. Els eluents que s'utilitzen són  $\text{H}_2\text{O}$  amb 0,045 % de TFA i MeCN amb 0,036 % de TFA. S'empren diferents gradients de MeCN en 20min (HAHY, HLCH, HHW) i 30min (HAH, HWH) a un flux de 1 mL/min i doble detecció ( $\lambda$ ) de 220 nm i 280 nm. Les injeccions són de 1 $\mu\text{L}$  (HAH), 2 $\mu\text{L}$  (HAHY, HHW, HWH) i 5 $\mu\text{L}$  (HK(C)H).

#### 6.1.3.2. Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses d'electrosprai [HPLC-MS(ES)]

Sistema Walters constituït per un mòdul de separació model 2695, un detector PDA Walters 2996 i un detector de masses Walters Micromass ZQ (ESI-MS).

La columna utilitzada és una C18 subministrada per Phenomenex® de 250x4 mm de tamany 5,15 $\pm$ 0,30 $\mu\text{m}$  de mida de partícula i 320 $\pm$ 40Å de porus. Els eluents que s'utilitzen són  $\text{H}_2\text{O}$  amb 0,045 % de TFA i MeCN amb 0,036 % de TFA.

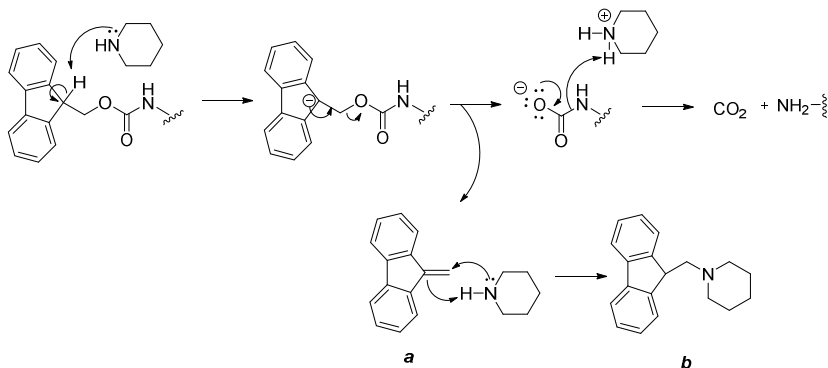
#### 6.1.3.3. Cromatografia en capa prima (CCF)

La cromatografia en capa prima es realitza sobre cromatofolis de gel de sílice 60 de la marca Merk. Per a revelar les capes primes s'utilitza llum UV. Com a fase mòbil es fa servir DCM:MeOH 9:1.

## 6.1.4. Mètodes analítics

### 6.1.4.1. Determinació de l'acoblament a la resina per quantificació de grups Fmoc

Aquest assaig permet saber la quantitat d'aminoàcid que s'acobra al suport polimèric. S'elimina el grup Fmoc amb la piperidina formant-se dibenzofulvè (esquema 6.1, a) i es mesura l'absorbància de l'adducte (esquema 6.1, b) que s'obté amb la piperidina.



Esquema 6.1. Mecanisme d'eliminació del grup Fmoc amb piperidina

Per realitzar l'assaig s'aplica el següent protocol: es tracta a la resina amb 20 % piperidina en DMF (5 mL, 5 x 10 min) i DMF (5 mL, 5 x 1 min). Aquests filtrats es recullen en un matràs de 100 mL i s'enrasa amb DCM. Es travessa una alíquota de 2 mL d'aquesta dissolució a un matràs de 100 mL i s'afegeixen 25 mL de 20 % de piperidina en DMF i 25 mL DMF tot enrasant amb DCM. Es realitza la determinació de l'absorbància d'aquesta dissolució entre 250-350 nm utilitzant unes cubetes de quars. Com a blanc de l'anàlisi espectrofotomètric es prepara en un matràs de 50 mL formada a partir de 12,5 mL de 20 % de piperidina en DMF i 12,5 mL DMF. Finalment s'enrasa amb DCM. Mitjançant la llei de Lambert-Beer (Equació 1) es determina la concentració de l'adducte (C) mesurant l'absorbància (A) a 301 nm ( $\lambda$ ), sabent que el coeficient d'extinció molar a aquesta longitud d'ona és  $7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\epsilon$ ) i que el camí òptic de la cubeta és de 1 cm (l). D'aquesta manera es pot conèixer la concentració de grups Fmoc a la resina i per tant el rendiment de l'acoblament de l'aminoàcid.

$$A = \epsilon * C * l$$

Equació 1

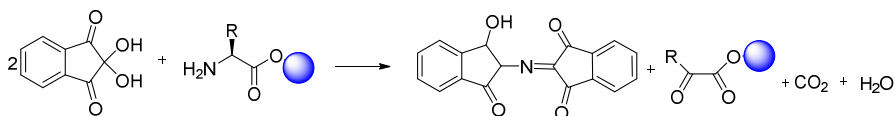
#### 6.1.4.1. Assaig qualitatiu de ninhidrina

L'assaig de ninhidrina o de Kaiser permet detectar de forma qualitativa la presència de grups amino primaris en una resina. Per dur a terme aquest assaig es necessiten dues dissolucions:

Reactiu A: Es prepara una dissolució de fenol (40 g) en etanol (EtOH) absolut (10 mL), en calent. De forma independent s'afegeixen 2 mL d'una solució de cianur de potassi (KCN) (65 mg en 100 mL de H<sub>2</sub>O) sobre piridina (100 mL) recent destil·lada sobre ninhidrina. Les dues dissolucions s'agiten per separat amb 4g de resina Amberlita MB- durant 45 min. Seguidament es filtres i es barregen els filtrats.

Reactiu B: Es prepara una dissolució de ninhidrina (2,5 g) en EtOH absolut (50 mL). La barreja resultant es manté protegida de la llum i sota atmosfera de N<sub>2</sub>.

El procediment a seguir en l'assaig de ninhidrina és el següent: es renta prèviament la peptidil-resina amb DCM per eliminar traces de DMF que poden quedar, ja que aquesta descomposa donant amines primàries, fet que alteraria el resultat del test. S'agafa una punta d'espàtula de peptidil-resina i s'introdueix en un tub on es torna a rentar amb MeOH i es decanta (fins a tres vegades). Seguidament s'afegeixen 6 gotes del reactiu A i 2 del reactiu B. El tub es calenta a 110 °C durant 3 min. Una coloració blava de la solució indica la presència d'amines primàries (assaig positiu), el que suggereix un baix percentatge d'incorporació d'aminoàcid; una coloració groguenca indica l'absència d'amines primàries (assaig negatiu) amb una incorporació d'aminoàcid a la cadena en creixement superior al 99,5 %. Es convenient realitzar un blanc paral·lel per comparar les coloracions.



Esquema 6.2. Reacció test ninhidrina

#### 6.1.5. Avaluació de la capacitat quelant del pèptid HAHY

S'avalua la capacitat quelant del pèptid HAHY mitjançant espectroscòpia UV-Visible, fluorescència i dicroisme circular. Amb els tres instruments es fan una sèrie de mesures on es va variant la relació HAHY:Cu (II). La dissolució de coure es prepara amb H<sub>2</sub>O Mili-Q® i la

dissolució de HAHY amb una dissolució tampó a pH 7,4 obtinguda a partir de l'àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperaziniletansulfònic (HEPES).

#### 6.1.5.1. Espectroscòpia UV-Vis

Es realitzen dos experiments: en el primer (A) es va variant la concentració de Cu (II) mantenint constant la del HAHY, en el segon (B) s'ha procedit a l'inrevés, variant la del HAHY i sense modificar la de Cu (II). En el B és necessari Cu (II) a cada mesura perquè no es modifiqui la seva concentració ja que varia amb la addició de L. Es mesura l'absorbància de 200 nm a 900 nm.

A: es prepara una dissolució 0,4 mM de pèptid (1,433 mg en 3ml de HEPES). L'altre dissolució necessària de Cu (II) de 40mM ja està preparada al laboratori. Per el blanc es fa servir una dissolució de HEPES de pH 7,4.

B: Es preparen dues dissolucions de Cu (II) a partir de la de 40 mM, una de 2 mM (0,25 mL Cu (II) 40 mM i 4,75 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q®) com a dissolució inicial, i l'altre de 6 mM (0,75 mL de Cu (II) 40 mM i 4,25 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q®). Aquesta última serveix per mantenir la concentració el Cu (II) 2 mM constant. Es prepara també una dissolució 4,8 mM de pèptid (17,202 mg en 3 mL HEPES). Per el blanc es fa servir H<sub>2</sub>O Milli-Q®.

#### 6.1.5.2. Espectrofluorímetre

Es mesura la variació de la fluorescència d'una dissolució 7 µM de pèptid mentre es va afegint una dissolució de Cu (II) 100 µM. Per mantenir la concentració de pèptid constant s'afegeix a la vegada una altre dissolució 21 µM d'aquest per contrarestar l'efecte de dilució al afegir el Cu (II). Es mesura la fluorescència de 258 nm a 500nm.

La dissolució 21 µM de pèptid s'obté a partir de la dissolució 4,8 mM (0,025 mL de dissolució 4,8 mM i 4,975 mL de HEPES), i la de 10µM de pèptid a partir de l'anterior (1 mL de dissolució 21 µM i 2 mL de HEPES). La dissolució 100 µM de Cu (II) es prepara a partir d'una de 40 mM de Cu (II) (25 µL de Cu (II) 40 mM i 9,975mL de H<sub>2</sub>O MiliQ®). Per el blanc es fa servir una dissolució de HEPES de pH 7,4.

#### 6.1.5.3. Dicroisme circular

Es mesura la desviació de la llum polaritzada en una dissolució de pèptid de concentració constant 0,076 mM mentre es va afegint Cu (II) 2,5 mM. Per mantenir constant la concentració de pèptid s'afegeix a la vegada una dissolució de pèptid 0,229 mM per contrarestar l'efecte de



dilució al afegir el Cu (II). Es fan tres mesures d'una mateixa mostra des de 220 nm fins a 750 nm.

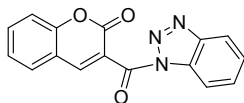
La dissolució 0,229 mM de pèptid s'obté a partir de 0,611 mg de pèptid i 1ml HEPES, i la de 0,076 mM a partir de l'anterior (0,3 mL de 0,375 mM i 0,6mL de HEPES). La dissolució de 2,5 mM Cu (II) es prepara a partir d'una de 40 mM de Cu (II) (0,323 mL de 40mM i 4,688 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q®). Per el blanc es fa servir una dissolució de HEPES de pH 7,4.

## 6.2. PROCEDIMENTS SINTÈTICS

### 6.2.1. Preparació de N<sup>α</sup>-N<sup>ε</sup>-Fmoc-(cumarin-3-ilcarbonil)-L-lisina

#### 6.2.1.1. Preparació de 3-(1H-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona

S'afegeix clorur de tionil (0,542 mL, 7,5 mmol) en un baló de 100mL proveït d'un nucli magnètic que conté 1H-benzotriazol (2,99 g, 25 mmol) i THF anhidre. Es tapa el baló amb un sèptum, se li acobla un globus de N<sub>2</sub> i la mescla de la reacció es manté a temperatura ambient i amb agitació durant 20 min. A continuació s'afegeix l'àcid 3-(2H-cromen-2-ona)carboxílic (cumarina, 950,75 mg, 5 mmol) i es deixa reaccionant durant 4 hores. Posteriorment es filtra la solució amb un filtre de plecs per separar-la de la sal formada i es preconcentra en el rotavapor. El precipitat obtingut es dissol amb AcOEt (150 mL) i es renta amb una dissolució saturada de MgCO<sub>3</sub> (3 x 50 mL) i amb una dissolució saturada de NaCl (50 mL). La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El precipitat obtingut es recristal·litza amb una barreja de DCM-hexà. S'obtenen 754 – 857 mb d'intermedi amb un rendiment del 52 – 60 %.

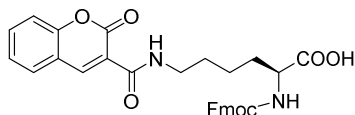


3-(1H-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona. **Rf** [DCM:MeOH, (9:1)] = 0.85; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.436 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.64-7.80 (m, 3H), 8.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H).

#### 6.2.1.2. Síntesi del N<sup>α</sup>-N<sup>ε</sup>-Fmoc-(cumarin-3-ilcarbonil)-L-lisina

S'afegeix el 3-(1H-benzotriazol-1-ilcarbonil)-2-cromen-2-ona (291 mg, 1 mmol) en un baló de 50 mL proveït d'un nucli magnètic que conté Fmoc-L-lisina-OH i Et<sub>3</sub>N (0,261 mL, 1,1 mmol) en MeCN:H<sub>2</sub>O (10 mL : 5 mL). La mescla de la reacció es manté a temperatura ambient i amb agitació magnètica durant una hora aproximadament (fins a la desaparició del derivat de

cumarina en CCF). Un cop finalitzada la reacció s'afegeix HCl 4N (1 mL) i es preconcentra el producte. El precipitat obtingut es suspèn en AcOEt (150 mL) i es renta amb HCl 4N (3 x 50 mL) i una dissolució saturada de NaCl (50 mL). La dissolució orgànica resultant es seca amb MgSO<sub>4</sub>, es filtra i es rotavapora. Finalment es cristal·litza el sòlid obtingut amb DCM-hexà. Es filtra amb un embut Büchner i es porta al dessecador. S'obtenen 325-470 mg del producte desitjat amb un rendiment del 60-85%.



N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -(cumarin-3-ilcarbonil)-L-lisina. *Rf* DCM:MeOH, (9:1)] = 0.23; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1.32-1.50 (m, 2H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.62-1.85 (m, 2H), 3.26-3.38 (m, 2H), 3.92-4.01 (m, 1H), 4.17-4.36 (m, 3H), 7.22-7.54 (m, 6H), 7.60-7.80 (m, 4H), 7.87 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 8.84 (s, 1H), 12.62 (s, 1H).

### 6.2.1. Síntesi en fase sòlida

La síntesi en fase sòlida es realitza en xeringues de polipropilè de 20mL amb filtre de polietilè porós. L'agitació es fa manualment amb una vareta de tefló. La xeringa es col·loca en un sistema connectat al buit tal i com es mostra en la figura 6.3.

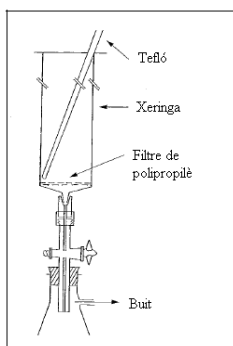


Figura 6.3. Muntatge per a la síntesi de pèptids en fase sòlida

#### 6.2.1.1. Acondicionament de la resina

Es segueix un protocol estàndard: la resina CTC (0,5 g, *f* = 1,6 mmol/g) s'introdueix en una xeringa de 20 mL i es renta amb DMF (10 mL 5 x 5 min) i DCM (10 mL 3 x 5min)

#### 6.2.1.2. Acoblament del primer aminoàcid

Consta de les següents etapes: en un vial es dissolen 1,5 eq de Fmoc-Aa-OH en 2mL DCM i 6,7 eq de DIPEA. La dissolució s'addiciona a la resina i s'agita manualment. Passats 10 min

s'introdueixen 3,3 eq DIPEA i la barreja es deixa reaccionar durant 1 h 30 min, sense deixar d'agitar esporàdicament. Passat aquest temps es renta la resina amb DCM (10 mL, 4 x 1 min), DMF (10 mL, 4 x 1 min) i DCM (10 mL, 4 x 1 min).

#### 6.2.1.3. *Bloqueig dels centres reactius de la resina*

Per tal de bloquejar els centres reactius de la resina sense reaccionar es tracta la resina amb: MeOH (10 mL, 1 x 10 min), rentar amb DCM (10 mL, 2 x 1 min).

#### 6.2.1.4. *Elongació de la cadena peptídica amb HOBt/DIC*

Primer es duu a terme la desprotecció del grup amino (eliminació del grup Fmoc) amb 20 % de piperidina en DMF (5 mL, 5 x 10 min) i es renta la resina amb DMF (5 mL, 5 x 1 min) i DCM (5 mL, 5 x 1 min). Després es procedeix a l'acoblament de l'aminoàcid utilitzant: Fmoc-Aa-OH (3 eq), HOBt (3 eq) i DIC (3 eq) en DMF (mínima quantitat perquè es pugui agitar). Es deixa reaccionar durant 1 h i es torna a repetir l'acoblament de l'aminoàcid utilitzant les mateixes quantitats de reactius. Finalment es renta amb DMF (10 mL, 3 x 1 min), DCM (10 mL, 3 x 1 min) i DMF (10 mL, 3 x 1 min).

#### 6.2.1.5. *Elongació de la cadena peptídica amb Oxyma/DIC*

Una vegada s'ha eliminat el grup Fmoc seguint el protocol descrit en l'apartat 6.2.1.4 es procedeix a l'acoblament de l'aminoàcid utilitzant: Fmoc-Aa-OH (3 eq), oxyma (3 eq) i DIC (3 eq) en DMF (mínima quantitat perquè la mescla es pugui agitar). Es deixa reaccionar durant 1 h amb agitació manual esporàdica i es torna a repetir l'acoblament de l'aminoàcid utilitzant les mateixes quantitats de reactius. Finalment es renta amb DMF (10 mL, 3 x 1 min), DCM (10 mL, 3 x 1 min) i DMF (10 mL, 3 x 1 min).

#### 6.2.1.6. *Desancoratge de la cadena peptídica de la resina*

Primerament es renta amb DMF (10 mL, 3 x 1 min) DCM (10 mL, 3 x 1 min) MeOH (10 mL, 1 x 1 min) i DCM (10 mL, 3 x 1 min). Es preparen 10 mL de 95% TFA i 5% de TIPS (4,75 mL de TFA i 0,25 mL de TIPS) i es suspen la resina en aquesta mescla. Es deixa reaccionar durant 1 h i els filtrats es recullen en un baló de 250 mL ple fins a la meitat de Et<sub>2</sub>O on precipita el pèptid. El pèptid es centrifuga i es decanta l' Et<sub>2</sub>O, es renta amb Et<sub>2</sub>O diverses vegades i es porta al dessecador.

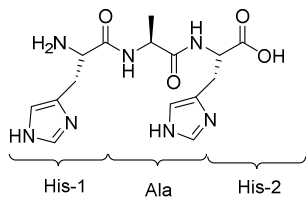
### 6.2.2. HAH

-Rendiment acoblament primer aminoàcid: 61 %

-Rendiment de la síntesi de la cadena peptídica prenent com a referència el nivell d'incorporació del primer aminoàcid: 81 %

-Quantitat de pèptid obtingut: 245 mg

-Puresa del pèptid: > 95 %



**EM-MS Alta Resolució:**  $m/z$  364.17  $[M+H]^+$ , calculat per  $C_{15}H_{22}N_7O_4$ : 364,18; **HPLC:**  $t_R$  = 3,730 min;  **$^1H$ -RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): His-1:  $\delta$  (ppm) 3.15-3.17 (m, 2H,  $C_\beta H_2$ ), 4.11-4.16 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H,  $C_\alpha H$ ), 7.37 (s, 1H, NH-CH-C ind), 8.77 (s, 1H, NH-CH-N ind); Ala:  $\delta$  (ppm) 1.25-1.28 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 4.28-4.36 (qd  $J$  = 7.4, 6.7 Hz, 1H,  $C_\alpha H$ ), 8.77-8.79 (d,  $J$  = 6.2 Hz, NH); His-2:  $\delta$  (ppm) 3.00-3.07 (dd,  $J$  = 15.3, 9.0 Hz, 1H,  $C_\beta H_a$ ) 3.14-3.21 (dd,  $J$  = 15.3, 5.1 Hz, 1H,  $C_\beta H_b$ ), 4.55-4.62 (ddd  $J$  = 9.2, 8.4, 5.6 Hz, 1H,  $C_\alpha H$ ), 7.37-7.38 (s, 1H, NH-CH-C ind), 8.72-8.74 (d,  $J$  = 7.9, 1H, NH), 8.94 (s, 1H, NH-CH-N ind).  **$^{13}C$  NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): His-1:  $\delta$  (ppm) 27.2 ( $C_\beta$ ), 51.8 ( $C_\alpha$ ), 118.2 (NH-CH-C ind), 128 (NH-CH-C ind), 134.3 (NH-CH-N ind), 167.9 (C=O); Ala:  $\delta$  (ppm) 18.2 ( $C_\beta$ ), 49.0 ( $C_\alpha$ ), 172.9 (C=O); His-2: 26.7 ( $C_\beta$ ), 51.7 ( $C_\alpha$ ), 117.5 (NH-CH-C ind), 130.1 (NH-CH-C ind), 135.0 (NH-CH-N ind), 172.2 (C=O).

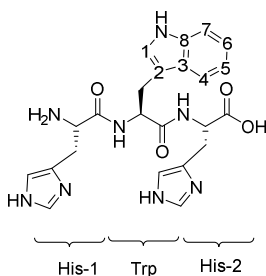
### 6.2.3. HWH

-Rendiment acoblament primer aminoàcid: 50 - 57 %

-Rendiment de la síntesi de la cadena peptídica prenent com a referència el nivell d'incorporació del primer aminoàcid: 80 - 83 %

-Quantitat de pèptid obtingut: 207 - 229 mg

-Puresa del pèptid: > 95 %



**EM-MS Alta Resolució:**  $m/z$  479.22  $[M+H]^+$ , calculat per  $C_{23}H_{27}N_8O_4$ : 479.21; **HPLC:**  $t_R = 11,206$  min;  **$^1H$ -RMN** (400MHz,  $DMSO-d_6$ ): His-1:  $\delta$  (ppm) 2.81-3.22 (2H,  $C_{\beta}H_2$ ) 4.56-4.59 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $C_{\alpha}H$ ) 7.23 (s, 1H, NH-CH-C ind) 8.54 (s, 1H, NH-CH-N ind); Trp:  $\delta$  (ppm) 2.81-3.22 (2H,  $C_{\beta}H_2$ ), 4.03-4.07 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H,  $C_{\alpha}H$ ), 6.95-6.98 (t,  $J = 6.95$  Hz,  $C_5$ ), 7.03-7.07 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $C_6H$ ) 7.17-7.16 (s, 1H,  $C_1H$ ), 7.31-7.32 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H,  $C_4H$ ), 7.62-7.64 (d,  $J = 7.6$  Hz,  $C_7H$ ) 8.74-8.76 (d,  $J = 8.75$  Hz, NaH); His-2:  $\delta$  (ppm) 2.81-3.22 (2H,  $C_{\beta}H_2$ ), 4.60-4.64 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $C_{\alpha}H$ ), 7.32 (s, 1H, NH-CH-C ind), 8.87 (s, 1H, NH-CH-N ind), 8.91-8.93 (d,  $J = 8.91$  Hz, 1H, NH).  **$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $DMSO-d_6$ ): His-1:  $\delta$  (ppm) 27.6 ( $C_{\beta}$ ), 51.9 ( $C_{\alpha}$ ), 117.8 (NH-CH-C ind), 128.8 (NH-CH-C ind), 135.2 (NH-CH-N ind), 168.2 (C=O); Trp:  $\delta$  (ppm) 28.0 ( $C_{\beta}$ ), 54.3 ( $C_{\alpha}$ ), 109.85 ( $C_2$ ), 118.8 ( $C_3$ ), 118.65 ( $C_4$ ), 118.6 ( $C_6$ ), 118.8 ( $C_5$ ), 121.4 ( $C_7$ ), 124.4 ( $C_3$ ), 127.6 ( $C_1$ ) 136.5 ( $C_8$ ) 172.1 (C=O); His-2: 26.8 ( $C_{\beta}$ ), 51.8 ( $C_{\alpha}$ ), 117.4 (NH-CH-C ind), 129.9 (NH-CH-C ind), 134.3 (NH-CH-N ind), 172.2 (C=O).

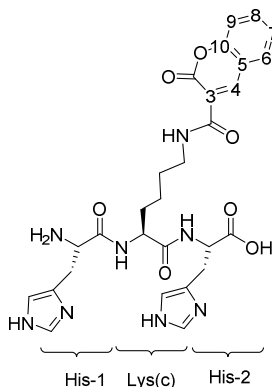
#### 6.2.4. HK(C)H

-Rendiment acoblament primer aminoàcid: 67 %

-Rendiment de la síntesi de la cadena peptídica prenent com a referència el nivell d'incorporació del primer aminoàcid: 88 %

-Quantitat de pèptid obtingut: 98 mg

-Puresa del pèptid: 96 %



**EM-MS Alta Resolució:**  $m/z$  592.9  $[M+H]^+$ , calculat per  $C_{28}H_{32}N_8O_7$ : 592.2; **HPLC:**  $t_R = 11,331$  min;  **$^1H$ -RMN** (400MHz,  $DMSO-d_6$ ): His-1:  $\delta$  (ppm) 3.15-3.16 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $C_{\beta}H_2$ ), 4.16-4.19 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H,  $C_{\alpha}H$ ), 7.35 (s, 1H, NH-CH-C ind), 8.70 (s, 1H, NH-CH-N ind); Lys(c):  $\delta$  (ppm) 1.39 (2H,  $C_{\beta}H_2$ ), 1.54 (2H,  $C_{\gamma}H_2$ ), 1.64 (2H,  $C_{\delta}H_2$ ), 3.31 (2H,  $C_5H_2$ ), 4.26-4.30 (td,  $J = 8.7, 7.8$  Hz, 1H,  $C_{\alpha}H$ ), 7.51-7.53 (d,  $J = 8.2$  Hz,  $C_9$ ), 7.74-7.78 (ddd,  $J = 8.8, 7.98, 1.0$  Hz  $C_8$ ), 7.75-7.79 (ddd,  $J = 8.2, 8.2, 1.44$  Hz,  $C_7$ ), 7.98-8.01 (dd,  $J = 7.91, 1.75$  Hz,  $C_6$ ), 8.73 (s, 1H,  $N_{\epsilon}H$ ), 8.7 (d,  $J = 6.20$  Hz, NaH); His-2:  $\delta$  (ppm) 3.01-3.07 (dd,  $J = 15.2, 8.7$  Hz, 1H,  $C_{\beta}H_2$ ) 3.15-3.21 (dd,  $J = 15.2, 6.2$  Hz, 1H,  $C_{\beta}H_2$ ), 4.57-4.63 (ddd  $J = 17, 6.5, 4.4$  Hz, 1H,  $C_{\alpha}H$ ), 7.38 (s, 1H, NH-CH-C ind), 8.77 (d,  $J = 7.89$ , 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH-CH-N ind).  **$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $DMSO-d_6$ ): His-1:  $\delta$  (ppm) 27.8 ( $C_{\beta}$ ), 51.8 ( $C_{\alpha}$ ), 118.2 (NH-CH-C ind), 128.1 (NH-CH-C ind), 135.0 (NH-CH-N ind), 167.9 (C=O); Lys(c):  $\delta$  (ppm) 23 ( $C_{\beta}H_2$ ) 29.1 ( $C_{\gamma}H_2$ ), 31.9 ( $C_{\delta}H_2$ ), 39.4 ( $C_5H_2$ ), 53.4 ( $C_{\alpha}H$ ), 60.9 ( $C_3$ ) 109.5 ( $C_5$ ) 116.6 ( $C_9$ ), 121.65 ( $C_8$ ), 130.7 ( $C_6$ ), 134.6 ( $C_7$ ), 147.8 ( $C_4$ ), 154.3 ( $C_2$ ), 161.52 (C=O ar.) 172.2 ( $C_{\alpha}$ =O); His-2:  $\delta$  (ppm) 26.6 ( $C_{\beta}$ ), 51.7 ( $C_{\alpha}$ ), 117.5 (NH-CH-C ind), 129.8 (NH-CH-C ind), 134.5 (NH-CH-N ind), 172.2 (C=O).

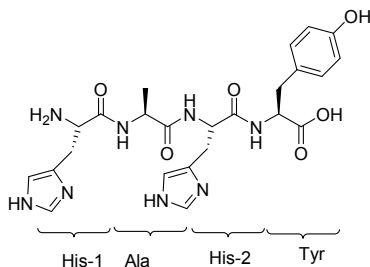
### 6.2.5. HAHY

-Rendiment acoblament primer aminoàcid: 52 %

-Rendiment de la síntesi de la cadena peptídica prenent com a referència el nivell d'incorporació del primer aminoàcid: 89 %

-Quantitat de peptid obtingut: 148 mg

-Puresa del peptid: 91 %



**EM-MS Alta Resolució:**  $m/z$  526.8  $[M+H]^+$ , calculat per  $C_{24}H_{31}N_8O_6$ : 527.2; **HPLC:**  $t_R$  = 9.046 min;  **$^1H$ -RMN** (400MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 1.21-1.23 (3H), 2.75-2.80 (1H), 2.92-3.15 (5H), 3.96-4.00 (1H), 4.22-4.29 (1H), 4.56-4.60 (td,  $J$  = 7.59, 6.89 Hz, 1H), 4.62-4.64 (td,  $J$  = 7.70, 7.49 Hz, 1H), 6.65-6.67 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.99-7.01 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.29-7.31 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 2H), 8.33-8.34 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.53-8.55 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 8-78-8.80 (3H).

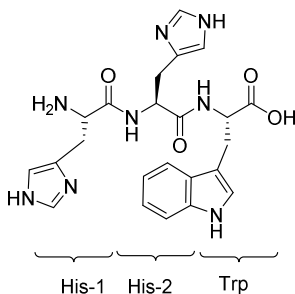
### 6.2.6. HHW

-Rendiment acoblament primer aminoàcid: 52-66 %

-Rendiment de la síntesi de la cadena peptídica prenent com a referència el nivell d'incorporació del primer aminoàcid: 84 - 88 %

-Quantitat de peptid obtingut: 154 - 157 mg

-Puresa del peptid: >95 %



**EM-MS Alta Resolució:**  $m/z$  478.9  $[M+H]^+$ , calculat per  $C_{23}H_{27}N_8O_4$ : 479.2; **HPLC:**  $t_R$  = 9.754 min;  **$^1H$ -RMN** (400MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.96-3.22 (5H), 4.08 (1s, 1H), 6.91-7.08 (dt,  $J$  = 15.2, 9.49 Hz, 2H), 7.16 (1s, 1H), 7.25-7.29 (d,  $J$  = 8.13 Hz, 1H), 7.33-7.35 (d,  $J$  = 7.68 Hz, 1H), 7.63-7.65 (d,  $J$  = 6.68 Hz, 1H), 8.61-8.63 (d,  $J$  = 7.68 Hz, 1H), 8.68 (1s, 2H), 8.97 (1s, 1H), 11.01 (1s, 1H).

## 7. CONCLUSIONS

1. Five novel peptides (HAH, HAHY, HHW, HK(C)H, HWH) with potential chelating properties on Cu (II) or Zn(II) have been synthesized on solid phase manually following the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. A chlorotriyl chloride resin, DIC/HOBt or DIC/Oxyma as coupling system and TFA/TIS (95:5) as the cocktail cleavage have used to carry out the synthesis. The yield has been 83-90 % and the peptides obtained have been high purity (> 90 %).

2. *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-(coumarin-3-ylcarbonyl)-*L*-lysine has been synthesized in two steps. The first step has consisted on preparing 3-(1*H*-benzotriazol-1-ylcarbonyl)-2-cromen-2-one by 52-60 % yield reaction of 1*H*-benzotriazole with 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylic acid. Subsequent reaction of this intermediate with Fmoc-*L*-Lys-OH afored the final product (60-85% yield).

3. The chelating properties of the peptide HAHY against Cu (II) have been demonstrated by three techniques: UV-Visible spectroscopy, fluorescence (Stern-Volmer constant,  $k_{SV} = 15969 \text{ dm}^3/\text{mol}$ ) and circular dichroism under physiological conditions (pH 7,4).





## 8. REFERENCES AND NOTES

1. Prince et al. *Alzheimer & Dementia* **2013**, 9, 63.
2. Faller et al. *Inorganic chemistry* **2013**, 52, 12196.
3. Montalbetti, C.; Falque, V.; *Amide bond formation and peptide coupling*, *Tetrahedron* (**2005**), 10827-10852.
4. Benoiton, N. L.; Ed., *Chemistry of Peptides Synthesis*, Taylor and Francis: Boca Ratón (2006).

Consulta general:

5. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149-54.
6. Doonan, S. *Peptides and Proteins*, 1st ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge (2002).
7. Hanson, J.R. *Organic Synthetic*; 1st ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge (2002).
8. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Spanish ed.; Elsevier Masson: Barcelona (2002).
9. Bruice, P.Y.; *Química Orgánica*. 5a ed.; Pearson-Prentice Hall: México (2008).
10. Pearson, A. J., Roush, W. R., *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups*. New York (1999).



## 9. ACRONYMS

Aa	residu d'aminoàcid
AcOEt	acetat d'etil
Ala (A)	alanina
Anh	anhidre
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Bzl	benzil
CCF	cromatografia de capa fina
CTC	resina 2-clorotritil
d	doblet
DC	dicroisme circular
DCC	<i>N,N'</i> -ciclohexylcarbodiimida
DCM	diclorometà
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
Et <sub>3</sub> N	trietilamina
eq	equivalent
f	funcionalització
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonil
HEPES	àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperaziniletansulfònic
His (H)	histidina
HCl	àcid clorhídric
HF	àcid fluorhídric

HMBC	heteronuclear multiple bon correlation
HOBt	hidroxibenzotriazol
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HPLC-MS	cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses
Hz	Herzt
K	lisina
m	multiplet
MeOH	metanol
oxyma	2-ciano-2-hidroxiiminoacetat d'etil
Rf	factor de retenció
RMN	ressonància magnètica nuclear
ps	poliestirè
s	singulet
SOCl <sub>2</sub>	clorur de tionil
SPPS	solid phase peptide synthesis
tBu	tert-butil
TFA	àcid trifluoroacètic
THF	tetrahidrofurà
TIPS	triisopropilsilà
TOCSY	total correlated spectroscopy
Trp (W)	triptòfan
Tyr (T)	tirosina
UV-Vis	ultravioleta visible
δ	desplaçament químic
λ	longitud d'ona

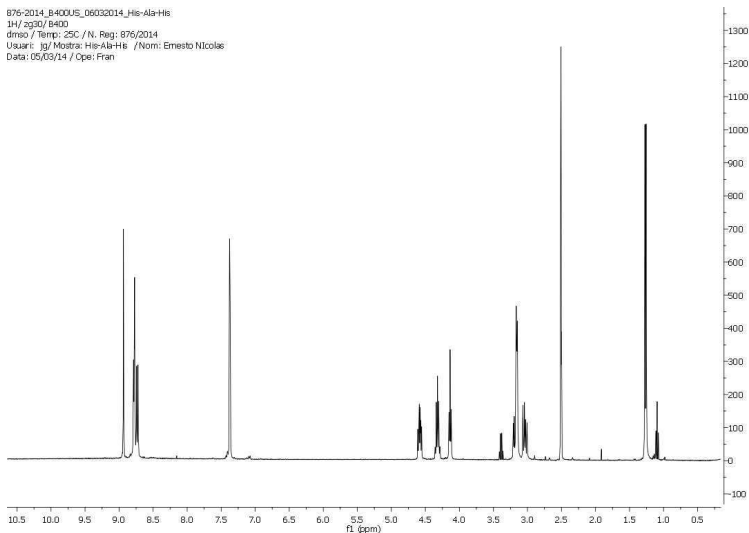
# APPENDICES



# ANNEX 1: ESPECTRES RMN DEL PÈPTID HAH

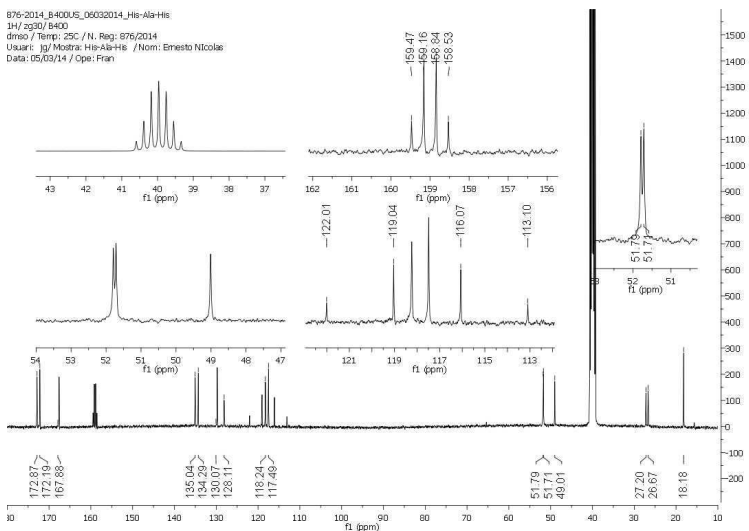
## A1.1. 1H-RMN

876-2014\_B-400US\_06032014\_His-Ala-His  
 1H/230/440  
 dms<sub>o</sub> / Temp: 25C / N. Reg: 876/2014  
 Usuari: jg / Mostra: His-Ala-His / Nom: Ernesto Nicolai  
 Data: 05/03/14 / Cpe: Fran



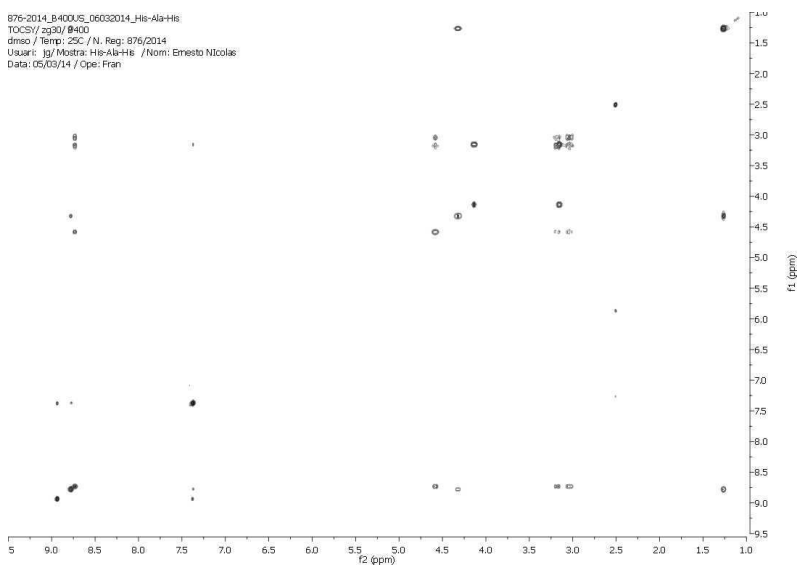
## A1.2. 13C-RMN

876-2014\_B-400US\_06032014\_His-Ala-His  
 1H/230/440  
 dms<sub>o</sub> / Temp: 25C / N. Reg: 876/2014  
 Usuari: jg / Mostra: His-Ala-His / Nom: Ernesto Nicolai  
 Data: 05/03/14 / Cpe: Fran



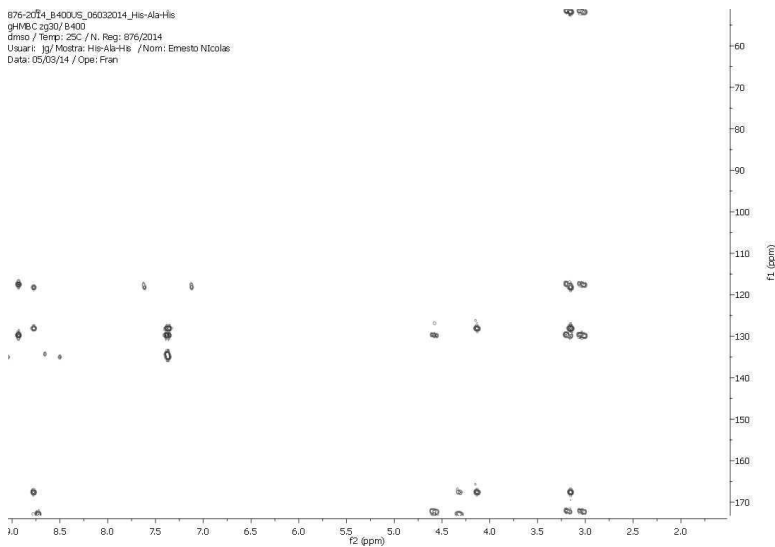
### A1.3. TOCSY

876-2014\_B-400US\_06032014\_His-Ala-His  
TOCSY: zg30 / B400  
dmsco / Temp: 25C / N. Reg: 876/2014  
Usuari: Jg/ Mostra: His-Ala-His / Nom: Ernesto Nicolas  
Data: 05/03/14 / Ope: Fran



### A1.4. HMBC

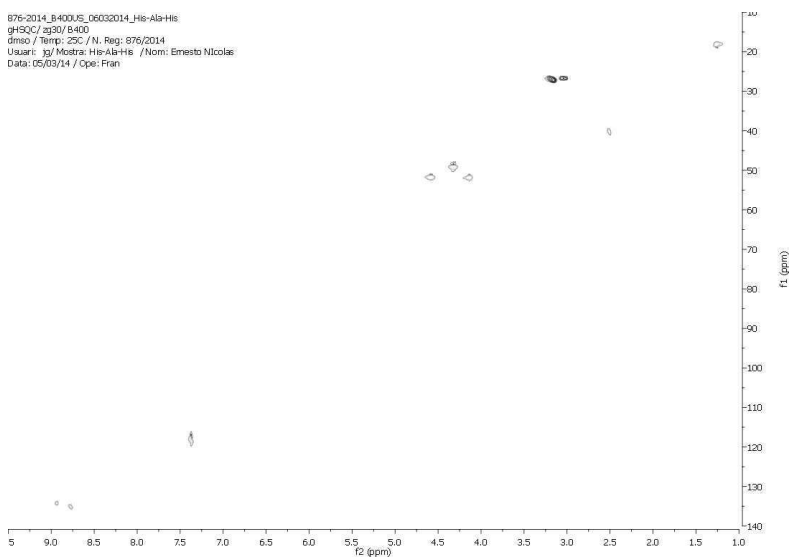
876-2014\_B-400US\_06032014\_His-Ala-His  
ghMBC zg30 / B400  
dmsco / Temp: 25C / N. Reg: 876/2014  
Usuari: Jg/ Mostra: His-Ala-His / Nom: Ernesto Nicolas  
Data: 05/03/14 / Ope: Fran





## A1.5. HSQC

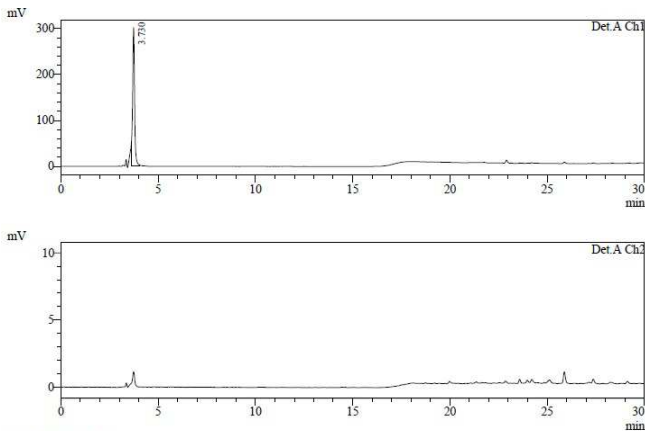
876-2014\_8-40005\_06032014\_His-Ala-His  
gh-HSQC / sp30 / 8400  
dmsio / Temp: 25C / N. Reg: 876/2014  
Usuari: j3 / Mostra: His-Ala-His / Nom: Ernesto Nicolas  
Data: 05/03/14 / Oper: Fran





# ANNEX 2: ALTRES ESPECTRES DEL PÈPTID HAH

## A2.1. HPLC



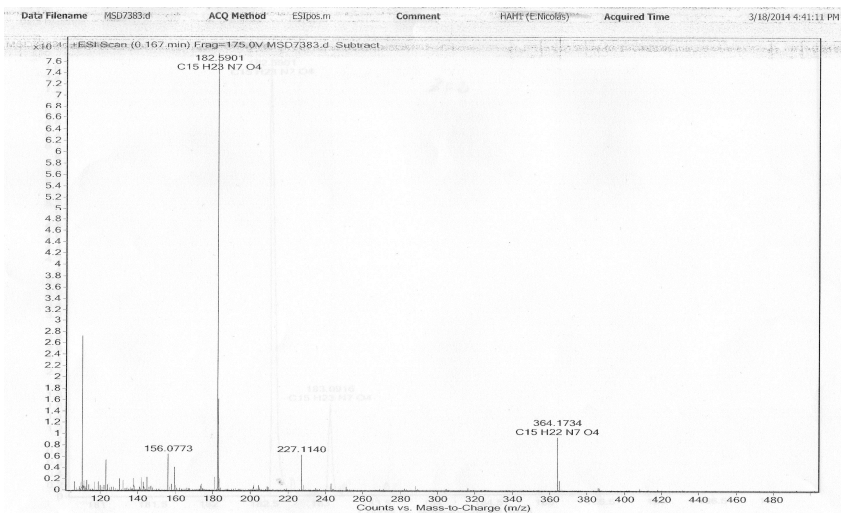
1 Det.A Ch1 / 220nm

2 Det.A Ch2 / 280nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.730	2101509	300697	100.000	100.000
Total		2101509	300697	100.000	100.000

## A2.2. EM-ES

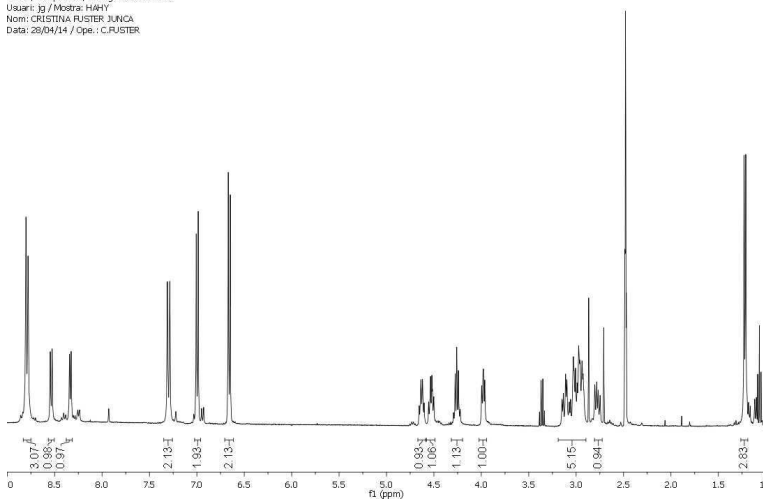




# ANNEX 3: ESPECTRES 1H-RMN

## A3.1. HAHY

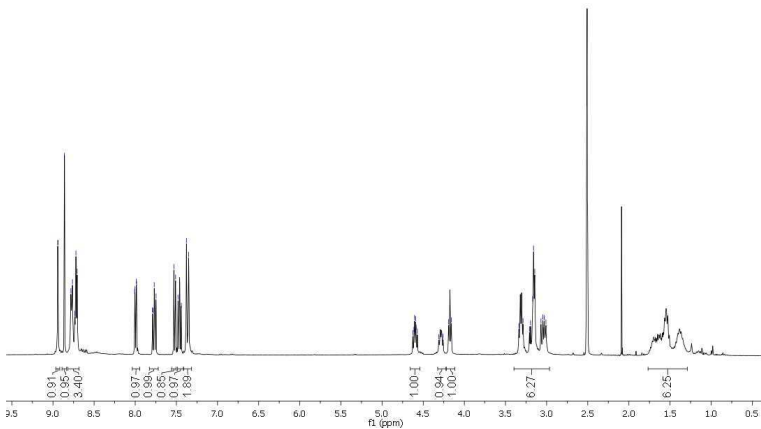
M400AQ\_28042014\_HAHYH1  
 H1 / Mercury-400Q  
 dmsd / Temp: 25C / N.Reg: X000000000  
 Usuari: jg / Mostra: HAHY  
 Nom: CRISTINA RUSTER JUNCA  
 Data: 26/04/14 / Ope.: C.RUSTER



## A3.2. HK(C)H

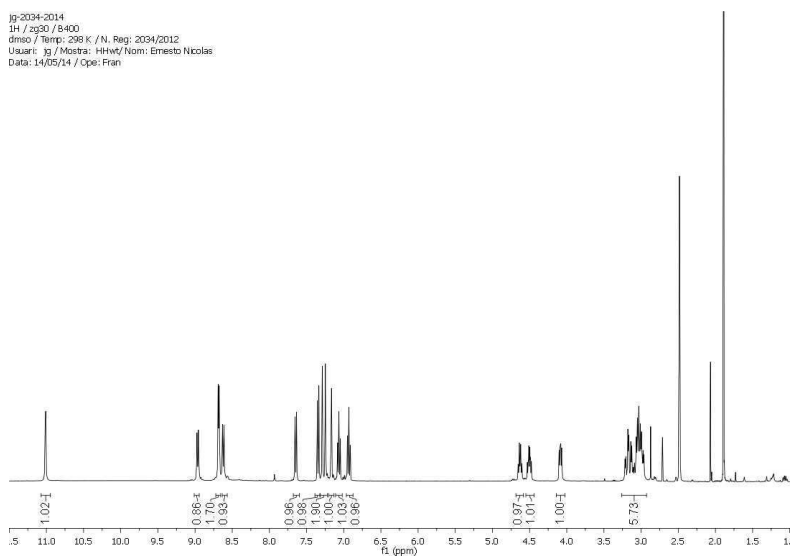
2161-0814-8-40915\_20052014\_HK(C)H1  
 H1 / Mercury-400Q  
 dmsd / Temp: 25C / N.Reg: 2101/2014  
 Usuari: jg / Mostra: HK-Lys-Cum-His / Nom: Ernesto Nicolas  
 Data: 27/05/14 / Ope.: NUR

4.43  
4.41  
4.41  
4.39  
4.37  
4.35  
4.33  
4.31  
4.29  
4.27  
4.25  
4.23  
4.21  
4.19  
4.17  
4.15  
4.13  
4.11  
4.09  
4.07  
4.05  
4.03  
4.01  
3.99  
3.97  
3.95  
3.93  
3.91  
3.89  
3.87  
3.85  
3.83  
3.81  
3.79  
3.77  
3.75  
3.73  
3.71  
3.69  
3.67  
3.65  
3.63  
3.61  
3.59  
3.57  
3.55  
3.53  
3.51  
3.49  
3.47  
3.45  
3.43  
3.41  
3.39  
3.37  
3.35  
3.33  
3.31  
3.29  
3.27  
3.25  
3.23  
3.21  
3.19  
3.17  
3.15  
3.13  
3.11  
3.09  
3.07  
3.05  
3.03  
3.01  
2.99  
2.97  
2.95  
2.93  
2.91  
2.89  
2.87  
2.85  
2.83  
2.81  
2.79  
2.77  
2.75  
2.73  
2.71  
2.69  
2.67  
2.65  
2.63  
2.61  
2.59  
2.57  
2.55  
2.53  
2.51  
2.49  
2.47  
2.45  
2.43  
2.41  
2.39  
2.37  
2.35  
2.33  
2.31  
2.29  
2.27  
2.25  
2.23  
2.21  
2.19  
2.17  
2.15  
2.13  
2.11  
2.09  
2.07  
2.05  
2.03  
2.01  
1.99  
1.97  
1.95  
1.93  
1.91  
1.89  
1.87  
1.85  
1.83  
1.81  
1.79  
1.77  
1.75  
1.73  
1.71  
1.69  
1.67  
1.65  
1.63  
1.61  
1.59  
1.57  
1.55  
1.53  
1.51  
1.49  
1.47  
1.45  
1.43  
1.41  
1.39  
1.37  
1.35  
1.33  
1.31  
1.29  
1.27  
1.25  
1.23  
1.21  
1.19  
1.17  
1.15  
1.13  
1.11  
1.09  
1.07  
1.05  
1.03  
1.01  
0.99  
0.97  
0.95  
0.93  
0.91  
0.89  
0.87  
0.85  
0.83  
0.81  
0.79  
0.77  
0.75  
0.73  
0.71  
0.69  
0.67  
0.65  
0.63  
0.61  
0.59  
0.57  
0.55  
0.53  
0.51  
0.49  
0.47  
0.45  
0.43  
0.41  
0.39  
0.37  
0.35  
0.33  
0.31  
0.29  
0.27  
0.25  
0.23  
0.21  
0.19  
0.17  
0.15  
0.13  
0.11  
0.09  
0.07  
0.05  
0.03  
0.01



## A3.3. HHW

Jg: 2034-2014  
 JH / Jg30 / 8400  
 dmsc / Temp: 298 K / N. Reg: 2034/2012  
 Usuari: Jg / Mostra: HHW / Nom: Ernesto Nicolas  
 Data: 14/05/14 / Cpe: Fran



## A4.4. HWH

MIDDAQ\_28042014\_JHMnaranja2abril-H1  
 H1 / Mercury-400Q  
 dmsc / Temp: 252 / N.Reg: 3000000400c  
 Usuari: Jg / Mostra: HWMnaranja2abril  
 Nom: CRISTINA RUSTER JUNCA  
 Data: 28/04/14 / Cpe.: C.RUSTER

