



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Síntesi d'un pèptid terapèutic: Un estudi metodològic vers la producció a escala de planta pilot

Carolina Teruel Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi Doctoral
Programa de Doctorat en Química Orgànica

**SÍNTESI D'UN PÈPTID TERAPÈUTIC:
UN ESTUDI METODOLÒGIC VERS LA PRODUCCIÓ A
ESCALA DE PLANTA PILOT**

Carolina Teruel Sánchez

Dirigida i revisada per
Dr. Ernesto Nicolás Galindo i Dra. Marta Racamonde Villanueva

Departament de Química Inorgànica i Orgànica
Secció de Química Orgànica
Universitat de Barcelona
Setembre 2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



AGRAÏMENTS

El treball experimental d'aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzat entre febrer de 2019 i juliol de 2022 en el departament d'I+D d'Esteve Química S.A, sota la direcció del Dr. Ernesto Nicolás Galindo i la Dra. Marta Racamonde Villanueva.

M'agradaria donar les gràcies al Dr. Ernesto Nicolás Galindo per tot el temps invertit, l'ajuda incondicional i tot l'aprenentatge que m'emporto d'ell després de molts anys coincidint com professor i alumna. Muchas gracias por ser mi guía en la química durante todo este tiempo.

Agrair a la Dra. Marta Racamonde Villanueva tot el recolzament que m'ha donat aquests anys en l'empresa, per sempre rebrem amb un somriure i per tot el que he pogut aprendre d'ella del món de l'empresa. Espero poder seguir compartint molts més projectes amb tu.

M'agradaria també donar les gràcies al Dr. Martí Bartra Sanmartí i al Dr. Ramón Berenguer Maimó per confiar en mi i donar-me la oportunitat de realitzar la Tesi Doctoral en les instal·lacions d'Esteve Química, on mai m'ha faltat de res i menys el seu recolzament.

En especial, m'agradaria agrair a la meva companya i amiga, la Dra. Macarena Duran Corbera, per tots els coneixements que em va transmetre de la seva Tesi Doctoral, pel gran equip que vam fer treballant juntes i per fer-me el dia a dia més divertit i fàcil.

Al Dr. Jordi Redondo Giménez i al Dr. Noé Sánchez Nuñez, per resoldre tots els meus dubtes d'espectroscòpia i cromatografia sempre amb un somriure i ganes. Gràcies als dos per la vostra paciència, ajudar-me i ensenyar-me tantes coses. Agrair també al Dr. Jordi Garcia Gómez i al Dr. Jaume Farràs Soler, pels consells durant la Tesi i la confiança que han dipositat en mi.

Agrair de tot cor a la Cora Montesdeoca per l'ajuda en la caracterització per ^1H -RMN dels compostos en aquesta Tesi Doctoral i a la Paula Cairó per l'ajuda en l'anàlisi dels compostos per masses. Treballar amb gent com vosaltres és una sort!

No em puc sentir més afortunada pel recolzament que he sentit durant aquest temps per la meva família, en especial el de la meva mare, que gràcies als seus consells i hores de teràpia fa que torni a creure en mi i que em senti capaç de poder fer-ho. Gracias mama, sin ti hubiera sido mucho más difícil. Agrair enormement al meu pare per tot el que fa per ajudar-me a complir els meus somnis, i al meu germà, cosins, tiets i avis. Us estimo molt i sou la sort de la meva vida.

A la meva amiga Júlia, que sempre ha estat allà per aconsellar-me en els moments en que més la necessitava. Gràcies cari per no dubtar mai de que ho acabaria aconseguint. A la Bartol, per ser la meva amiga incondicional que sempre tindrà. I als meus amics de la uni, Carmeta, Sergio, Marta, Matas, Laia, Natalia, Alexia, Dídac, Toni i Saul, per seguir al meu costat després de tots aquests anys i per fer sempre que la química sigui més divertida quan la compartim.

I com no, gràcies als meus companys d'Esteve. Estic feliç de treballar en un lloc en que més que companys som una família. Gràcies al Marc Silvestre, al Fran Abenza, a l'Amando i al Victor, que han aportat el seu gra de sorra en aquesta Tesi. I en especial agrair a la Susana, a la Cris, a la Noelia, a la Claudia, a l'Ana Palomero i al Sebas, pels seus consells i recolzament, però sobretot, per tot l'amor que ens donem dia a dia i per saber que dins de la feina puc comptar amb amics.

ABREVIACIONS I ACRÒNIMS

A

aa	Aminoàcid
AcOEt	Acetat d'etil
ADC	Conjugats de fàrmacs-anticossos (Antibody drug conjugates)
ADN	Àcid desoxirribonucleic
AM	Aigües mares
4-AMP	4-(Aminometil)piperidina
anh	Anhidre
AOP	Hexafluorofosfat de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfoni
API	Ingredient farmacèutic actiu (Active pharmaceutical ingredient)

B

Boc	<i>terc</i> -Butiloxicarbonil
BOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfoni
Bzl	Benzil

C

CP	Control de procés
2-CTC	Clorur de 2-clorotritil

D

δ	Desplaçament químic
DBF	Dibenzofulvè
DBU	1,8-Diazabicycle[5.4.0]undec-7-è
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometà
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DKP	Dicetopiperazina
DIOP	Ftalat de diisooctil
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO- d_6	Dimetilsulfòxid semideuterat

E

EDC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDT	1,2-Etanditiol
eq	equivalents

F

f	Funcionalització de la resina
FDA	Administració d'aliments i medicaments d'Estats Units (United States food and drugs administration)
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
FM-AMP	<i>N</i> -(9-fluorenilmetil)-6-aminometilpiperidina
FM-pip	<i>N</i> -(9-fluorenilmetil)piperidina
FM-TAEA	<i>N</i> -(9-fluorenilmetil)tris(2-aminoetil)amina
FT	Fexapotide Triflutat

G

GP	Grup protector
-----------	----------------

H

HATU	Hexafluorofosfat d' <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluroni
HBP	Hiperplàsia benigna de pròstata
HBTU	Hexafluorofosfat d' <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluroni
HEPA	Capturador de partícules d'alta eficiència (High efficiency particle arrester)
HOAt	7-Aza-1-hidroxibenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HP-API	Ingredient farmacèutic actiu altament potent (High potential - active pharmaceutical ingredient)
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució (High-performance liquid chromatography)
HPLC-MS	Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectròmetre de masses (High-performance liquid chromatography– mass spectrometry)

I

IPA	Isopropanol
------------	-------------

M

2-MeTHF	2-Metiltetrahidrofurà
MS	Espectrometria de masses (Mass spectrometry)
<i>m/z</i>	Relació massa/càrrega

N

n.d	No detectat
NMM	N-metilmorfolina

O

OEL	Límit d'exposició ocupacional (Occupational exposure limit)
OSu	Èster de succinimida

P

Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofurà-5-sulfonil
PDE-5	Fosfodiesterasa 5
PEG	Polietilenglicol
PM	Pes molecular
PS	Poliestirè
PyAOP	Hexafluorofosfat de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfoni
PyBOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfoni

R

RMN	Ressonància magnètica nuclear
-----	-------------------------------

S

sat	Saturada
SMBioCom	Metodologia sintètica aplicada a compostos bioactius (Synthetic methodology applied to bioactive compounds)
SPPS	Síntesi de pèptids en fase sòlida (Solid-phase peptide synthesis)
SPS	Síntesi de pèptids en solució (Solution-phase peptide synthesis)

T

ta	Temperatura ambient
TATU	Tetrafluoroborat d'O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluroni
TAEA	Tris(2-aminoetil)amina
^t Bu	terc-Butil
TBME	terc-Butil metil èter
TBTU	Tetrafluoroborat d'O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluroni
TEA	Trietilamina
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofurà
TIPS	Triisopropilsilà

ABREVIACIONS I ACRÒNIMS

Trt	Tritil
TURP	Resecció transuretral de la pròstata (Transurethral resection of the prostate)

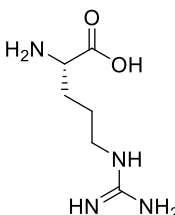
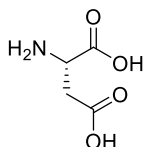
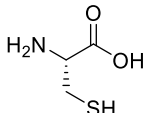
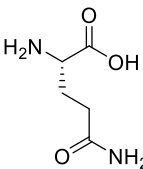
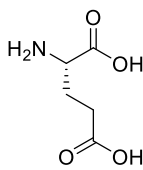
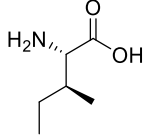
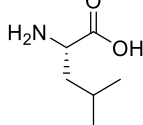
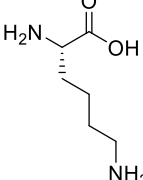
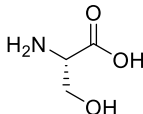
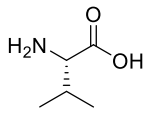
U

UV	Ultraviolat
UB	Universitat de Barcelona

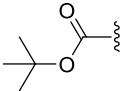
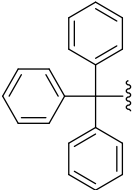
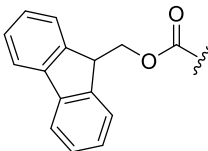
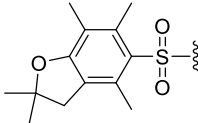
V

Vis	Visible
------------	---------

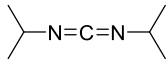
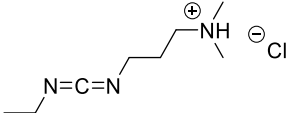
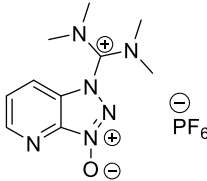
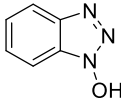
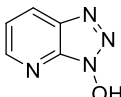
ESTRUCTURES DELS AMINOÀCIDS

Aminoàcid (aa)	Codi del residu	Estructura
L-Arginina	Arg	
L-Àcid aspàrtic	Asp	
L-Cisteïna	Cys	
L-Glutamina	Gln	
L-Àcid glutàmic	Glu	
L-Isoleucina	Ile	
L-Leucina	Leu	
L-Lisina	Lys	
L-Serina	Ser	
L-Valina	Val	

GRUPS PROTECTORS

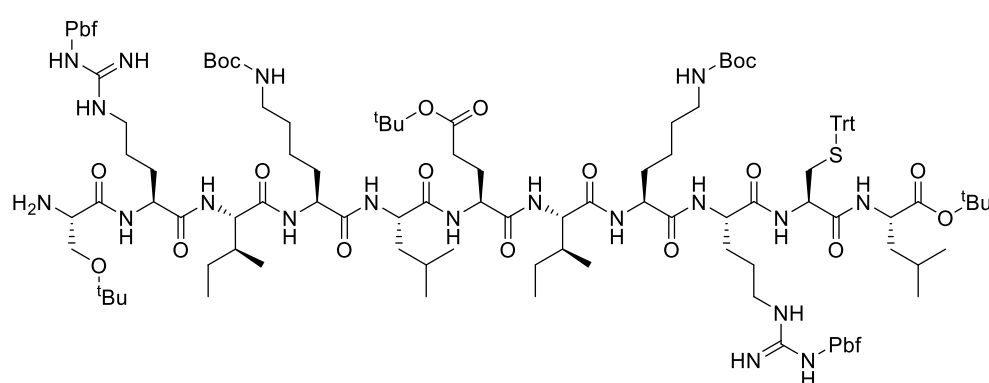
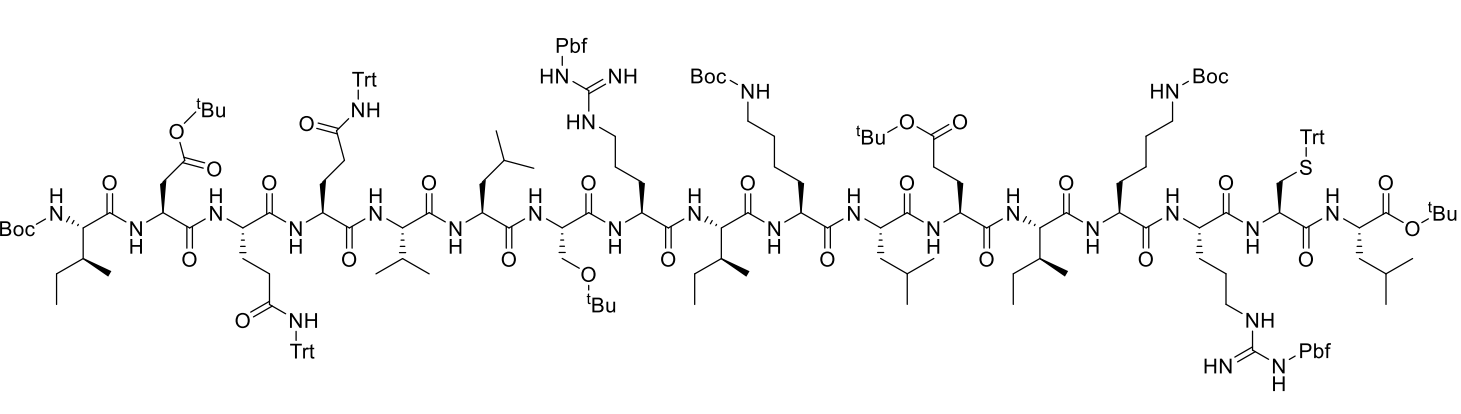
Grup protector	Simbol	Estructura
terc-Butiloxicarbonil	Boc	
terc-Butil	^tBu	
Tritil	Trt	
9-Fluorenilmetoxicarbonil	Fmoc	
2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofurà-5-sulfonil	Pbf	

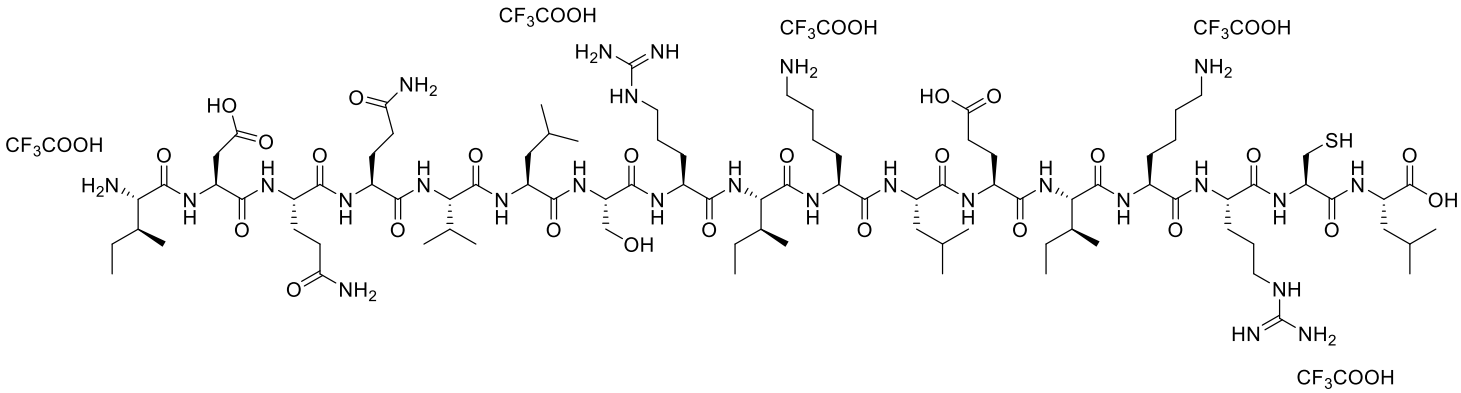
AGENTS D'ACOBLAMENT I ADDITIUS

Agent d'acoblament o additiu	Simbol	Estructura
<i>N,N'</i>-Diisopropilcarbodiimida	DIC	
Clorur de <i>N</i>-etil-<i>N'</i>-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	EDC·HCl	
Hexafluorofosfat d'<i>O</i>-(7-azabenzotriazol-1-il)-<i>N,N,N',N'</i>-tetrametiluroni	HATU	
1-Hidroxibenzotriazol	HOBT	
7-Aza-1-hidroxibenzotriazol	HOAt	

INTERMEDIS I PRODUCTE FINAL

Codi	Estructura
6997	
6998	
7005	
7411	
7003	

Codi	Estructura
7004	 Chemical structure of compound 7004, a long-chain peptide derivative. The structure features a central backbone with various side chains, including a Pbf-protected amine (HN=NH), a Boc-protected amine (Boc-NH), a tert-butyl ester (tBu-O-C(=O)), a Trt-protected thiol (Trt-S), and a tert-butyl ester (tBu-O-C(=O)). The molecule is highly branched and contains multiple amide bonds.
7006	 Chemical structure of compound 7006, a long-chain peptide derivative. The structure features a central backbone with various side chains, including a Pbf-protected amine (HN=NH), a Boc-protected amine (Boc-NH), a tert-butyl ester (tBu-O-C(=O)), a Trt-protected thiol (Trt-S), and a tert-butyl ester (tBu-O-C(=O)). The molecule is highly branched and contains multiple amide bonds.

Codi	Estructura
6664 (Fexapotide Triflutat)	 The chemical structure of Fexapotide Triflutat is a complex peptide derivative. It features a long chain of amino acid residues linked by amide bonds. The structure includes several side chains, including a trifluoroacetyl group (CF₃COOH) at the N-terminus, a hydroxyl group (OH), a carboxylic acid group (COOH), a thiol group (SH), and a guanidino group (HN=C(NH₂)NH₂). The peptide chain is terminated by a trifluoroacetyl group (CF₃COOH) at the C-terminus. The structure is shown in a detailed, skeletal representation with stereochemistry indicated by wedges and dashes.

ÍNDIX

Identificació i reflex en els objectius de desenvolupament sostenible (ODS).....	1
Consideracions generals	3
1. Introducció	9
1.1. Pèptids terapèutics	10
1.1.1. Avantatges i inconvenients	10
1.1.2. Situació actual dels pèptids com a fàrmacs	11
1.1.3. Fexapotide triflutat	15
1.1.4. Producció de FT	16
1.2. Obtenció de FT a Esteve Química: Antecedents	18
2. Objectius	21
3. Capítol 1: Introducció a la síntesi de pèptids en fase sòlida	25
3.1. Estratègia lineal	25
3.1.1. El concepte	25
3.1.2. Resines	27
3.1.2.1. Suports sòlids	27
3.1.2.2. Funcionalització de la resina	28
3.1.3. Estratègies de protecció	29
3.1.4. Agents d'acoblament	31
3.1.4.1. Carbodiimides	31
3.1.4.2. Sals de fosfoni i d'uroni	33
3.1.4.3. Reaccions secundàries	35
3.1.5. Escissió del pèptid de la resina i desprotecció global	37
3.2. Estratègia convergent	37
3.3. Aplicació de la SPPS a la síntesi de FT	39
3.3.1. Producció de pèptids a escala industrial	39
3.3.2. Estratègia sintètica estudiada per la síntesi del FT	40
4. Capítol 2: Síntesi de 7005 i 7411 en fase sòlida	47
4.1. Precedents ⁵⁹	47
4.1.1. Reactor per a la síntesi en fase sòlida	47
4.1.2. Incorporació del primer aminoàcid a la resina	48
4.1.3. Quantificació del grup Fmoc per UV-Vis	49
4.1.4. Eliminació del grup Fmoc	49
4.1.5. Acoblament d'aminoàcids	50

4.1.5.1.	Test de ninhidrina	50
4.1.6.	Rentats de la resina.....	50
4.1.7.	Escissió del pèptid de la resina	51
4.2.	Síntesi preliminar dels pèptids 7411 i 7005	51
4.2.1.	Síntesi de 7411_UB-19146	52
4.2.2.	Síntesi de 7005_UB-19166	55
4.3.	Optimització dels protocols sintètics de 7005 i 7411	58
4.3.1.	Optimització dels equivalents de reactius	59
4.3.1.1.	Síntesi de 7411_UB-21531	59
4.3.1.2.	Síntesi de 7005_UB-19182	60
4.3.2.	Disseny de nous reactors.....	61
4.3.2.1.	Sistemes duals d'agitació/filtració	61
4.3.2.2.	SPPS utilitzant els sistemes duals d'agitació/filtració	65
4.3.2.2.1.	Síntesi de 7005	65
4.3.2.2.2.	Síntesi de 7411	66
4.3.3.	Monitorització de les reaccions en SPPS.....	70
4.3.3.1.	Desenvolupament d'un mètode d'HPLC pel seguiment de la síntesi de 7411	71
4.3.3.1.1.	Síntesi de 7411_UB-21550	71
4.3.3.1.2.	Síntesi de 7411_UB-21578	77
4.3.3.1.3.	Síntesi de 7411_UB-23401	81
4.3.3.2.	RMN com a eina alternativa a l'HPLC pel seguiment de les reaccions en fase sòlida: síntesi de 7005.....	84
4.3.3.2.1.	Síntesi de 7005_UB-23417	84
4.3.4.	Caracterització d'impureses	105
4.3.4.1.	Acoblament de Fmoc-Glu('Bu)-OH en la síntesi de 7411_UB-21550	105
4.3.4.1.1.	Impuresa a 9,8 min (H-Arg(Pbf)-OH)	105
4.3.4.1.2.	Impuresa a 21,1 min (Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH).....	107
4.3.4.1.3.	Impuresa a 22,9 min (DIOP)	110
4.3.4.2.	Impuresa detectada per ¹ H-RMN en la síntesi de 7005_UB-23417	111
4.3.5.	Optimització dels rentats de la resina	114
4.3.5.1.	Síntesi de 7411_UB-21578	115
4.3.5.2.	Síntesi de 7411_UB-23401	118
4.3.5.3.	Substitució del rentat d'IPA per DMF	120
4.3.5.4.	Síntesi de 7005_UB-23441	123
4.3.6.	Optimització de les precipitacions	125
4.3.6.1.	Estudis previs	125
4.3.6.2.	Assajos amb 7005	125

4.3.6.2.1.	Assajos de precipitació de 7005_UB-19182	125
4.3.6.2.2.	Assajos de neutralització del cru.....	128
4.3.6.2.3.	Assajos de precipitació de 7005_UB-21510	129
4.3.6.2.4.	Assajos de precipitació de 7005_UB-23441	131
4.3.6.3.	Assajos amb 7411	132
4.3.6.3.1.	Assajos de precipitació de 7411_UB-21531	132
4.3.6.3.2.	Assajos de precipitació de 7411_UB-21550	134
4.3.6.3.3.	Assajos de precipitació de 7411_UB-21578	135
4.3.6.3.4.	Assajos de precipitació de 7411_UB-23401	136
4.3.7.	Escalat.....	138
4.3.7.1.	Reactor	138
4.3.7.2.	Síntesi de 7005_UB-23475	140
4.3.7.3.	Síntesi de 7411_UB-23492	142
4.4.	Conclusions	144
5.	Capítol 3: Síntesi de FT per acoblament de fragments en solució	149
5.1.	Síntesi del dipèptid protegit 6997	149
5.1.1.	Precedents ⁵⁹	149
5.1.2.	Síntesi preliminar de 6997	150
5.1.3.	Assajos d'obtenció de 6997	151
5.1.3.1.	Utilitzant DCM com a dissolvent.....	151
5.1.3.2.	Utilitzant EtOH com a dissolvent i NMM com a base	152
5.1.3.3.	Optimització dels equivalents i del tractament del cru	153
5.2.	Síntesi de 6998.....	154
5.2.1.	Precedents ⁵⁹	154
5.2.2.	Síntesi preliminar de 6998.....	155
5.2.3.	Estudi de diferents bases	156
5.2.3.1.	DBU	156
5.2.3.2.	4-AMP	159
5.2.3.3.	TAEA	166
5.2.3.4.	4-AMP EN PRESENCIA DE CO ₂	169
5.2.4.	Escalat de la síntesi de 6998 sense aïllar 6997	173
5.3.	Síntesi de 7003.....	176
5.3.1.	Precedents ⁵⁹	176
5.3.2.	Síntesi preliminar de 7003.....	177
5.3.3.	Altres proves d'obtenció de 7003	178
5.3.4.	Assajos de purificació de 7003.....	179
5.3.5.	Escalat.....	182

5.4.	Síntesi de 7004.....	183
5.4.1.	Precedents ⁵⁹	183
5.4.2.	Síntesi preliminar de 7004.....	183
5.4.2.1.	Proves de purificació de 7004	184
5.4.3.	Prova amb 4-AMP	185
5.4.4.	Proves amb piperidina.....	187
5.4.4.1.	Assajos de síntesi de 7004.....	188
5.4.4.2.	Proves del tractament del cru.....	188
5.4.4.2.1.	7004_UB-23461	189
5.4.4.2.2.	7004_UB-23465	190
5.4.4.2.3.	7004_UB-26910	191
5.4.4.2.4.	7004_UB-26918	192
5.4.5.	Escalat.....	192
5.5.	Síntesi de 7006.....	193
5.5.1.	Precedents ⁵⁹	193
5.5.2.	Síntesi preliminar de 7006	194
5.5.3.	Obtenció de 7006 a partir de diferents lots de 7004	195
5.5.3.1.	Proves de purificació de 7006	196
5.5.3.2.	Obtenció de 7006 a partir d'un lot de 7004 obtingut utilitzant 4-AMP	197
5.5.4.	Escalat.....	198
5.6.	Obtenció de FT a partir de 7006	199
5.6.1.	Precedents ⁵⁹	199
5.6.2.	Síntesi preliminar de 6664.....	200
5.6.3.	Eliminació dels grups protectors dels fragments peptídics 6998, 7411 i 7005 ..	202
5.6.4.	Proves per minimitzar la <i>terc</i> -butilació en la obtenció de 6664.....	206
5.6.4.1.	Estudi de diferents capturadors de carbocations	207
5.6.4.2.	Reducció del temps de tractament acidolític.....	210
5.6.4.3.	Efecte de la concentració de reactius	213
5.6.4.4.	Optimització	213
5.6.5.	Reproducció de les millors condicions acidolítiques i quantificació per ¹ H-RMN	214
5.7.	Conclusions.....	219
6.	Observacions finals.....	221
7.	Referències	223
8.	Part experimental	233
8.1.	Materials	233

8.1.1.	Dissolvents i reactius	233
8.2.	Instrumentació	235
8.2.1.	Instrumentació general	235
8.2.2.	Instrumentació per manipular sòlids HP-APIs	236
8.3.	Cromatografia	237
8.3.1.	Cromatografia d'alta resolució (HPLC)	237
8.3.2.	Cromatografia d'alta resolució acoblat a detector de masses (HPLC-MS)	238
8.3.3.	Mètodes analítics	238
8.3.4.	Expressió dels resultats d'HPLC	240
8.4.	Part experimental: Capítol 2	243
8.4.1.	Procediments generals	243
8.4.1.1.	Reactors	243
8.4.1.2.	Incorporació del primer aminoàcid a la resina	244
8.4.1.3.	Quantificació del grup Fmoc per UV-Vis	244
8.4.1.4.	Eliminació del grup Fmoc	245
8.4.1.5.	Acoblament de Fmoc-aminoàcid	245
8.4.1.5.1.	Test de ninhidrina	245
8.4.1.5.2.	HPLC i ¹ H-RMN	246
8.4.1.6.	Escissió del pèptid de la resina	247
8.4.2.	Protocols sintètics	248
8.4.2.1.	Protocols incorporació del primer aminoàcid a la resina	248
8.4.2.2.	Protocols eliminació del grup Fmoc	249
8.4.2.3.	Protocols acoblament de Fmoc-aa	250
8.4.2.4.	Protocols escissió del pèptid de la resina	251
8.4.3.	Síntesi de 7005	252
8.4.3.1.	Procediment general	252
8.4.3.2.	Síntesi de 7005_UB-19166	252
8.4.3.2.1.	Precipitació	253
8.4.3.3.	Síntesi de 7005_UB-19182	254
8.4.3.3.1.	Proves de precipitació	255
8.4.3.4.	Síntesi de 7005_UB-21510	261
8.4.3.4.1.	Proves de neutralització del cru	262
8.4.3.4.1.1.	Neutralització del TFA en una dissolució de DCM	262
8.4.3.4.1.2.	Neutralització del TFA del cru 7005_UB-21510	263
8.4.3.4.2.	Precipitació	263
8.4.3.5.	Síntesi de 7005_UB-23417	264
8.4.3.6.	Síntesi de 7005_UB-23441	265

8.4.3.6.1.	Neutralització de tfa en el cru.....	267
8.4.3.6.2.	Quantificació de 7005 en el cru.....	267
8.4.3.6.3.	Precipitació	267
8.4.3.7.	Síntesi de 7005_UB-23475: major escala.....	269
8.4.3.7.1.	Neutralització del tfa en el cru	270
8.4.3.7.2.	Quantificació de 7005 en el cru.....	270
8.4.3.7.3.	Precipitació	270
8.4.4.	Caracterització de 7005 (lot UB-23475-P3-01)	274
8.4.4.1.	Espectrometria de masses	274
8.4.4.2.	Ressonància magnètica nuclear	275
8.4.4.2.1.	Espectres de ¹ H-RMN	275
8.4.5.	Síntesi de 7411.....	278
8.4.5.1.	Procediment general	278
8.4.5.2.	Síntesi de 7411_UB-19146	278
8.4.5.3.	Síntesi de 7411_UB-21531	280
8.4.5.3.1.	Neutralització del cru	281
8.4.5.3.2.	Proves de precipitació	281
8.4.5.4.	Síntesi de 7411_UB-21550	285
8.4.5.4.1.	Neutralització del cru	287
8.4.5.4.2.	Quantificació de 7411 en el cru.....	287
8.4.5.4.3.	Precipitació	287
8.4.5.5.	Síntesi de 7411_UB-21578	288
8.4.5.5.1.	Neutralització del cru	289
8.4.5.5.2.	Quantificació de 7411 en el cru.....	289
8.4.5.5.3.	Precipitació	289
8.4.5.6.	Síntesi de 7411_UB-23401	290
8.4.5.6.1.	Neutralització del TFA del cru	292
8.4.5.6.2.	Quantificació de 7411 en el cru.....	292
8.4.5.6.3.	Precipitació	292
8.4.5.7.	Síntesi de 7411_UB-23492: major escala.....	293
8.4.5.7.1.	Neutralització del TFA del cru	294
8.4.5.7.2.	Quantificació de 7411 en el cru.....	294
8.4.5.7.3.	Precipitació	294
8.4.6.	Caracterització de 7411.....	296
8.4.6.1.	Espectrometria de masses	297
8.4.6.2.	Ressonància magnètica nuclear	298
8.4.6.2.1.	Espectres de ¹ H-RMN	298
8.5.	Part experimental: Capítol 3.....	305

8.5.1.	Síntesi de 6997.....	305
8.5.1.1.	Procediment general	305
8.5.1.2.	Síntesi de 6997_QF-15382	305
8.5.1.2.1.	Proves de solubilitat	306
8.5.1.3.	Síntesi de 6997_QF-15386	307
8.5.1.4.	Síntesi de 6997_QF-15392	307
8.5.1.5.	Síntesi de 6997_QF-15395	308
8.5.1.6.	Síntesi de 6997_UB-19101	309
8.5.1.7.	Síntesi de 6997_UB-19115	309
8.5.1.8.	Síntesi de 6997_UB-19141	310
8.5.1.9.	Síntesi de 6997_UB-23467	310
8.5.2.	Síntesi de 6998.....	312
8.5.2.1.	Procediment general	312
8.5.2.2.	Síntesi de 6998_QF-15388	312
8.5.2.3.	Síntesi de 6998_UB-19103	313
8.5.2.4.	Síntesi de 6998_UB-19105	313
8.5.2.5.	Síntesi de 6998_UB-19106	314
8.5.2.6.	Síntesi de 6998_UB-19109	315
8.5.2.7.	Síntesi de 6998_UB-19112	316
8.5.2.8.	Síntesi de 6998_UB-19119	317
8.5.2.9.	Síntesi de 6998_UB-19130	318
8.5.2.10.	Síntesi de 6998_UB-19132	319
8.5.2.11.	Síntesi de 6998_UB-19134	320
8.5.2.12.	Síntesi de 6998_UB-19135	321
8.5.2.13.	Síntesi de 6998_UB-19144	322
8.5.2.14.	Síntesi de 6998_UB-23469: major escala.....	323
8.5.3.	Caracterització de 6998.....	325
8.5.3.1.	Espectrometria de masses	325
8.5.3.2.	Ressonància magnètica nuclear	326
8.5.3.2.1.	Espectres de ¹ H-RMN	326
8.5.4.	Síntesi de 7003.....	328
8.5.4.1.	Procediment general	328
8.5.4.2.	Síntesi de 7003_UB-21599	328
8.5.4.2.1.	Proves de purificació	329
8.5.4.3.	Síntesi de 7003_UB-23428	330
8.5.4.3.1.	Proves de purificació	330
8.5.4.3.2.	Purificació	331
8.5.4.4.	Síntesi de 7003_UB-23456	332

8.5.4.4.1.	Purificació	332
8.5.4.5.	Síntesi de 7003_UB-23457	333
8.5.4.5.1.	Purificació	333
8.5.4.6.	Síntesi de 7003_UB-26908	334
8.5.4.6.1.	Purificació	335
8.5.4.7.	Síntesi de 7003_UB-26927: major escala.....	335
8.5.4.7.1.	Purificació	336
8.5.5.	Caracterització de 7003.....	337
8.5.5.1.	Espectrometria de masses	338
8.5.5.2.	Ressonància magnètica nuclear	339
8.5.5.2.1.	Espectres de ¹ H-RMN	339
8.5.6.	Síntesi de 7004.....	342
8.5.6.1.	Procediment general	342
8.5.6.2.	Síntesi de 7004_UB-23431	342
8.5.6.2.1.	Proves de purificació	343
8.5.6.3.	Síntesi de 7004_UB-23453	344
8.5.6.4.	Síntesi de 7004_UB-23461	344
8.5.6.5.	Síntesi de 7004_UB-23465	347
8.5.6.6.	Síntesi de 7004_UB-26910	349
8.5.6.7.	Síntesi de 7004_UB-26918	352
8.5.6.8.	Síntesi de 7004_UB-26929: major escala.....	353
8.5.7.	Caracterització de 7004.....	354
8.5.7.1.	Espectrometria de masses	355
8.5.7.2.	Ressonància magnètica nuclear	356
8.5.7.2.1.	Espectres de ¹ H-RMN	356
8.5.8.	Síntesi de 7006.....	359
8.5.8.1.	Procediment general	359
8.5.8.2.	Síntesi de 7006_UB-26904	359
8.5.8.3.	Síntesi de 7006_UB-26906	361
8.5.8.4.	Síntesi de 7006_UB-26914	361
8.5.8.5.	Síntesi de 7006_UB-26915	362
8.5.8.6.	Síntesi de 7006_UB-26920	362
8.5.8.7.	Síntesi de 7006_UB-26930	363
8.5.8.8.	Síntesi de 7006_UB-26931	364
8.5.8.9.	Síntesi de 7006_UB-26932: major escala.....	364
8.5.9.	Caracterització de 7006.....	366
8.5.9.1.	Espectrometria de masses	367
8.5.9.2.	Ressonància magnètica nuclear	368

8.5.9.2.1.	Espectres de ^1H -RMN	368
8.5.10.	Síntesi de 6664.....	371
8.5.10.1.	Procediment general	371
8.5.10.2.	Síntesi de 6664_UB-26917	371
8.5.10.3.	Eliminació dels grups protectors dels intermedis	372
8.5.10.3.1.	Eliminació dels grups protectors de 6998	372
8.5.10.3.2.	Eliminació dels grups protectors de 7005	373
8.5.10.3.3.	Eliminació dels grups protectors de 7411	373
8.5.10.4.	Síntesi de 6664_UB-26923	373
8.5.10.5.	Síntesi de 6664_UB-26924	373
8.5.10.6.	Síntesi de 6664_UB-26935	374
8.5.10.7.	Síntesi de 6664_UB-26938	377
8.5.10.8.	Síntesi de 6664_UB-26940	378
8.5.10.9.	Síntesi de 6664_UB-26941	378
8.5.10.10.	Síntesi de 6664_UB-26944	379
8.5.10.11.	Síntesi de 6664_UB-26948	382
8.5.11.	Caracterització de 6664 (lot UB-26948).....	383
8.5.11.1.	Espectrometria de masses	384
8.5.11.2.	Ressonància magnètica nuclear	385
8.5.11.2.1.	Espectres de ^1H -RMN	385
8.5.12.	Càlculs	388
8.5.12.1.	Càlcul per a la quantificació del TFA (lot 6664_UB-26948-01).....	388
8.5.12.2.	Càlcul per a la quantificació de dissolvents residuals i de la base lliure de 6664 (Lot UB-26948-01).....	389
8.5.12.3.	Càlcul per a la quantificació de la impuresa $BL_{tBu-6664}$ mitjançant deconvolució de senyals de ^1H -RMN (Lot UB-26948-01).....	390
8.5.12.4.	Càlcul per a la riquesa de 6664 i per a la quantificació del trifluoroacetat de la impuresa <i>terc</i> -butilada (Lot UB-26948-01)	391
9.	ANNEX	395
	Índex de figures.....	402
	Índex d'esquemes	411
	Índex de taules	413

IDENTIFICACIÓ I REFLEX EN ELS OBJECTIUS DE DESENVOLUPAMENT SOSTENIBLE (ODS)

L'objectiu principal de la present Tesi Doctoral ha estat contribuir a desenvolupar un procés que fos escalable a un entorn industrial, per a produir un nou pèptid terapèutic anomenat Fexapotide Triflutat (**FT**). Aquest fàrmac està indicat pel tractament d'hiperplàsia de pròstata benigna, una malaltia que afecta freqüentment a homes de mitjana edat i ancians, i pel tractament del càncer de pròstata de grau 1. El **FT** té una efectivitat significativa vers aquestes malalties i, a més, s'administra via injectable, un mètode menys tòxic respecte els tractaments coneguts fins ara pel tractament del càncer i amb un mínim d'efectes secundaris. D'acord amb els objectius de desenvolupament sostenible (ODS), el treball realitzat en aquesta Tesi Doctoral té una relació directa amb l'objectiu de **salut i benestar**, ja que, a més d'estar dirigit a malalties amb un índex d'afectació en humans molt important, el **FT** pot tenir un enorme impacte pel que fa a la millora de la qualitat de vida de les persones i a la reducció de la mortalitat per càncer de pròstata.

CONSIDERACIONS GENERALS

La present Tesi Doctoral s'ha realitzat en les instal·lacions d'Esteve Química i en aquesta memòria es fa ús d'expressions específiques utilitzades a l'empresa, com per exemple per referir-se a accions del procediment experimental o aspectes de sòlids i dissolucions, entre d'altres. Donat que aquests termes poden no ser coneguts, en aquest apartat es defineix el seu significat i les consideracions generals que s'han de conèixer per poder entendre el present treball amb facilitat.

Interpretació dels codis dels lots

Codi del pèptid:

- El codi de cada pèptid està format per quatre dígit assignats per l'empresa i s'indica com a prefix en un lot de síntesi. Exemple: lot **7005_UB-21510**, on **7005** correspon al codi del pèptid.

Codi dels lots de síntesi:

- El codi per a cada lot de síntesi es va assignar seguint el procediment de nomenclatura redactat en els procediments de treball de l'empresa. Aquesta nomenclatura consisteix en cinc dígit que són inequívocs, ja que indica el diari de laboratori (els tres primers dígit) i la pàgina de la llibreta de laboratori on es comença a descriure la síntesi (els dos últims dígit). En els lots de síntesi anomenats en aquesta Tesi Doctoral, a aquests 5 dígit se'ls hi afegeix el prefix QF o UB. El prefix QF indica que la prova està descrita en un diari de laboratori que pertany a personal del màster en Química Fina (QF), i el prefix UB fa referència a un diari de laboratori de personal de la Universitat de Barcelona (UB). En alguns casos, es pot afegir el codi del pèptid davant del codi dels lots de síntesi per tal de fer referència a la molècula que es sintetitza.

A continuació es mostra un exemple real pel codi d'un lot de síntesi obtingut en aquesta Tesi: lot **7005_UB-21510**, on **7005**: és el codi del pèptid; **UB** vol dir que el treball experimental descrit a la llibreta de laboratori s'ha fet per personal de la UB; **215** és el número de la llibreta de laboratori; **10** és el número de pàgina de la llibreta de laboratori on es comença a escriure la síntesi.

Si es requereix, per tal de diferenciar per un mateix lot de síntesi un canvi en les condicions experimentals o la divisió del cru per dur a terme proves de precipitació, s'addiciona al codi del lot el sufix 'Pn' (n =1, 2, 3,) al final del codi de síntesi, on 'n' identifica el número de prova. Exemple: **7005_UB-21510-P1**, on **P1** és la fracció de cru amb el que s'ha fet la Prova 1.

- Codi dels sòlids obtinguts:

El lot final és un sòlid si no s'indica el contrari. Per identificar un lot com a lot final, s'afegeix al codi del lot el sufix '0n' (n =1, 2, 3,), on 'n' identifica al sòlid (la numeració és seqüencial en funció de l'ordre d'obtenció del sòlid a partir d'un cru). Exemple: **7005_UB-21510-P1-01**, on **01** es refereix al primer sòlid obtingut en la Prova 1.

Vocabulari:

Addicionar: Acció d'afegir un reactiu, material de partida o dissolvent de manera progressiva, durant un temps en concret (des de minuts a hores).

Agitació magnètica: Agitació que es duu a terme amb un nucli magnètic i una placa magnètica. La placa magnètica té diferents nivells d'agitacions (del 0 a 1200 rpm) i es pot controlar la temperatura.

Agitació mecànica: Agitació que es duu a terme a través d'un motor que permet diferents nivells d'agitacions (del 0 a 1200 rpm). Aquest motor està adequat per acoblar-li les pales d'agitació que es desitgen. En aquesta tesi s'utilitza majoritàriament pales de tefló abatibles i petites.

Arrossegament amb un dissolvent: Canvi de dissolvent del cru de reacció, en un reactor, a través de la repetició dels processos d'addicionar el dissolvent desitjat i concentrar a pressió reduïda la mescla de dissolvents fins a un determinat volum. Habitualment, la mescla resultant s'analitza per ^1H -RMN per quantificar la proporció de dissolvents final.

Carregar: Acció d'afegir un reactiu, material de partida o dissolvent d'una sola vegada.

Cru de reacció: Es refereix a la dissolució que s'obté després de la reacció i abans de la precipitació.

Criostat: La temperatura de la reacció es controla mitjançant un aparell criostàtic connectat a la camisa del reactor. Els aparells criostàtics que s'han utilitzat són de dos tipus:

- **Criostat de H_2O :** El sistema refrigerant utilitza aigua, per tant, el rang de temperatura de treball per aquest criostat és de 3 °C a 90 °C.
- **Criostat d'IPA o EtOH:** El sistema refrigerant utilitza isopropanol (IPA) o EtOH, per tant, el rang de temperatura de treball per aquest criostat és de -20 °C a 20 °C.

Concentrar a pressió reduïda: La concentració a pressió reduïda es refereix a l'evaporació d'una part del dissolvent del cru amb l'aplicació de buit i temperatura. Si es vol controlar el volum del dissolvent que es vol evaporar, aquest volum s'ha de marcar prèviament en el recipient que es vol utilitzar. En el present treball s'utilitzen generalment dues maneres per concentrar el cru a pressió reduïda:

- **Baló i rotavapor:** Un baló de la mida desitjada s'omple amb acetona fins al volum de dissolvent al que es vol concentrar el cru i es marca el volum amb un retolador. A continuació, l'acetona s'elimina a residus i es carrega el cru en el baló prèviament marcat. Finalment, el dissolvent del cru es concentra en el rotavapor de manera controlada fins al volum desitjat.
- **Reactor i buit:** Es carrega acetona al reactor fins al volum de dissolvent al que es vol concentrar, es marca amb un retolador i es descarrega el dissolvent per carregar el cru. El dissolvent del cru es concentra en el reactor amb un muntatge de destil·lació al buit, amb la temperatura externa del reactor controlada fins que el dissolvent arriba al volum marcat.

Control de la temperatura externa dels reactors amb camisa externa: Els reactors de 50 mL a 2 L estan dissenyats amb una camisa externa per tal de connectar el criostat. En aquest treball

es menciona la temperatura externa a la temperatura que es programa el criostat. En casos puntuals, la temperatura interna de la reacció es mesura amb una sonda de temperatura.

Control de temperatura en balons sense camisa externa: Els balons de fons rodó no tenen camisa externa. Per tant, en aquest cas el baló s'introdueix en un bany d'aigua connectat a un criostat per controlar la temperatura.

Conversió (%): Mesura l'avanç de la reacció a partir del quocient entre l'àrea cromatogràfica del producte de partida i la suma de les àrees cromatogràfiques del producte de partida i del producte final multiplicat per 100.

Eliminar el dissolvent: Eliminació del dissolvent a pressió reduïda fins obtenir el sòlid. Si no s'indica el contrari, el dissolvent s'elimina en el rotavapor fins a sequedat.

Escala de síntesi: L'escala de treball en la indústria se sol donar en grams de material o producte de partida utilitzat. En aquesta Tesi s'expressa l'escala en grams quan el producte de partida és un producte obtingut en passos previs durant la síntesi. En les síntesis en que s'utilitza un material de partida comercial (resina o aminoàcid), l'escala de reacció s'expressa en mmols, ja que se suposa que el producte és pur.

Filtrar: Filtració d'una suspensió amb embut de forma alemanya i paper de filtre.

Filtrar a pressió reduïda: Filtració d'una suspensió amb l'aplicació de buit utilitzant matràs de Kitasato i embut de Büchner.

Filtracions lentes: Aquelles filtracions a pressió reduïda en que el drenatge és discontinu (gota a gota).

Filtracions ràpides: Aquelles filtracions a pressió reduïda en que el drenatge és continu.

Filtre Nutsche: Equips dissenyats per als processos de separació sòlid líquid, mitjançant la filtració a pressió, en plantes pilot i unitats de producció.

Rampa de temperatura: Els aparells criostatics utilitzats permeten programar rampes de temperatura i, per tant, refredar o escalfar en el temps que es desitja.

Rendiment (%): Quocient entre els grams de sòlid obtinguts i els grams teòrics de producte desitjat en el cru de reacció multiplicat per 100. A la indústria, el rendiment obtingut ha d'estar dintre d'un rang establert per tal de tenir controlats els costos del procés. És un paràmetre a tenir en compte per estimar la viabilitat de les rutes sintètiques o precipitacions proposades.

Oli: Fase líquida que no és miscible amb el dissolvent.

Puresa cromatogràfica (%): Quocient entre l'àrea cromatogràfica del pic principal i la suma d'àrees de tots els pics del cromatograma multiplicat per 100.

Quantificació del producte desitjat per ¹H-RMN en el cru de reacció: La quantificació del producte obtingut en el cru de reacció es duu a terme a partir del següent procediment: es mesura el volum de dissolució del cru (en mL) i se separa una alíquota de volum conegut per evaporar el dissolvent a pressió reduïda. Aquest residu s'asseca en el dessecador de buit fins a pes constant, es pesa i s'afegeix una quantitat coneguda de patró d'àcid maleic. La mescla de sòlids

es dissol en el dissolvent semideuterat que es desitja i es duu a terme un anàlisi per ^1H -RMN. En l'espectre obtingut es quantifica el producte en l'alíquota analitzada a partir de les integracions dels senyals de producte i d'àcid maleic, dels pesos coneguts i dels pesos moleculars, i s'obté un valor de riquesa (%). Conseqüentment, es poden extrapolar els grams de producte que es troben dissolts en la dissolució del cru.

Sembrar: Acció de carregar una quantitat petita de producte al cru de reacció per afavorir la precipitació.

Sistema dissolvent/antidissolvent: Per precipitar un producte es busca un dissolvent en el qual sigui soluble aquest producte, i un dissolvent en el qual la substància no sigui soluble (antidissolvent). Buscant els dissolvents adequats i les proporcions d'aquests adients es pot aconseguir que el producte desitjat precipiti directament del cru de reacció (sense aïllar el sòlid) de forma controlada.

Sòlid que diposita: És el sòlid que sedimenta al fons del reactor al parar l'agitació degut a la forma en la que ha precipitat. És un sòlid que prové d'una suspensió fluida i generalment proporciona bones filtracions (filtracions ràpides).

Sòlid gomós: És el sòlid de textura gomosa que tendeix a enganxar-se per les parets del reactor. No diposita al parar l'agitació i generalment proporcionen filtracions lentes.

Suspensió densa: És el sòlid que precipita però no diposita al parar l'agitació, però a diferència del sòlid gomós, la textura és densa i les partícules queden en suspensió. Generalment proporcionen filtracions lentes.

Volum: mL/g. Es refereix als mL que s'afegeixen d'un dissolvent o dissolució respecte els grams de substància. En les síntesis, els volums són els mL dissolvent / g de reactiu limitant carregats, en canvi, en les precipitacions, els volums es refereixen als mL dissolvent / g teòrics de producte obtingut.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

Els pèptids constitueixen un grup de biomolècules de gran importància pel que fa a la diversitat de funcions biològiques en les que intervenen, el que els converteix en objectius molt rellevants en la recerca de nous fàrmacs. A aquest interès contribueixen la seva enorme variabilitat estructural i la seva fàcil accessibilitat sintètica degut a la disponibilitat de metodologies molt eficients per abordar la preparació d'aquestes biomolècules. Aquests fets s'entenen molt bé si s'analitzen els seus trets estructurals.

Es denominen oligopèptids si estan formats per uns pocs aminoàcids (menys de 20-25), i polipèptids si la composició en aminoàcids és superior (de 25 a 50), anomenant-se proteïnes si contenen més de 50-100 aminoàcids.¹ Hi ha 20 aminoàcids naturals que es poden combinar en una immensa varietat de molècules peptídiques que poden donar lloc a una gran diversitat d'activitats biològiques. Tant els pèptids naturals com les proteïnes es sintetitzen en els éssers vius a partir de la transcripció de l'àcid desoxirribonucleic (ADN), desenvolupant funcions vitals en quasi tots els processos bioquímics en els que participen.

Els pèptids naturals tenen propietats biològiques molt rellevants. Així, poden actuar com a neurotransmissors, neuromoduladors i hormones en la transducció del senyal moderada pel receptor, a més de participar en la funcionalitat del sistema nerviós central i perifèric, en processos immunològics, en el sistema cardiovascular i en l'intestí.² Per altra banda, els avanços en les àrees com la biologia o la biofísica molecular han demostrat que la interacció dels pèptids amb altres biomolècules pot influir en diversos processos bioquímics com l'aprenentatge, la memòria, la resposta a l'estrès, el dolor, l'addició, la conducta alimentària, la conducta sexual, la reproducció, la resposta immune, el control tèrmic, la funció renal, o la funció cardiovascular, entre d'altres.³ En aquest sentit, els pèptids poden actuar com fàrmacs agonistes, potenciant l'activitat cel·lular, o antagonistes, bloquejant l'activitat cel·lular per interacció amb els receptors de la superfície cel·lular que modulen la funció d'aquesta i, en definitiva, el comportament del ésser viu (**Figura 1**).

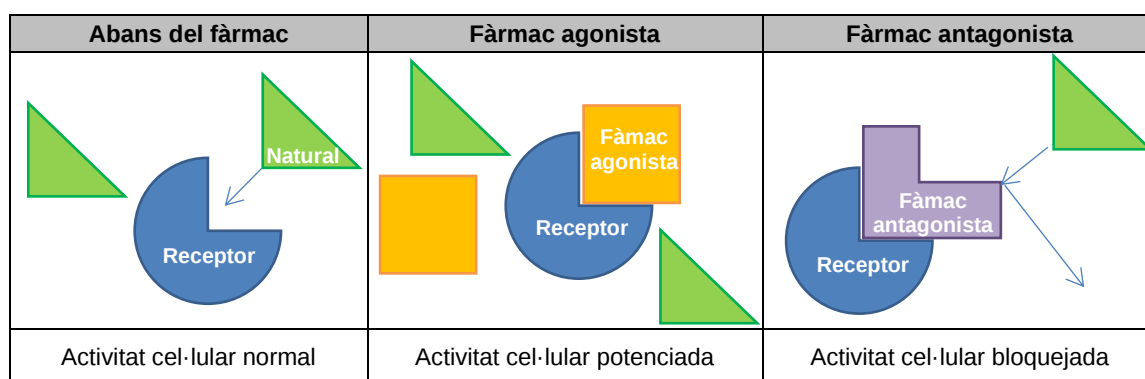


Figura 1. Funció dels fàrmacs agonistes i antagonistes.

L'alta selectivitat dels pèptids en unir-se a receptors específics de la superfície cel·lular per desencadenar una gran diversitat de respostes intracel·lulars, es pot traduir en uns perfils excel·lents de seguretat, tolerabilitat i eficàcia en humans des d'un punt de vista terapèutic. Aquestes propietats els ha convertit en un dels objectius prioritaris de la comunitat farmacèutica per desenvolupar noves molècules bioactives.⁴

1.1. PÈPTIDS TERAPÈUTICS

1.1.1. AVANTATGES I INCONVENIENTS

Tradicionalment, els fàrmacs de baix pes molecular ($PM < 500$ Da), coneguts com “molècules petites”, han predominat en el tractament de les malalties humanes, encara que en les últimes dècades els productes biològics de pes molecular elevat ($PM > 5000$ Da) han anat agafant força en el mercat gràcies als avanços en la biotecnologia, al permetre sintetitzar productes com proteïnes terapèutiques, anticossos o gens. Els pèptids terapèutics, definits com a compostos que contenen menys de 50-100 aminoàcids, es troben en la frontera entre els mons divergents de les molècules petites tradicionals i les macromolècules d'origen biològic, presentant diferents avantatges i inconvenients en comparació a cada grup de fàrmacs (**Figura 2**).^{1,5}

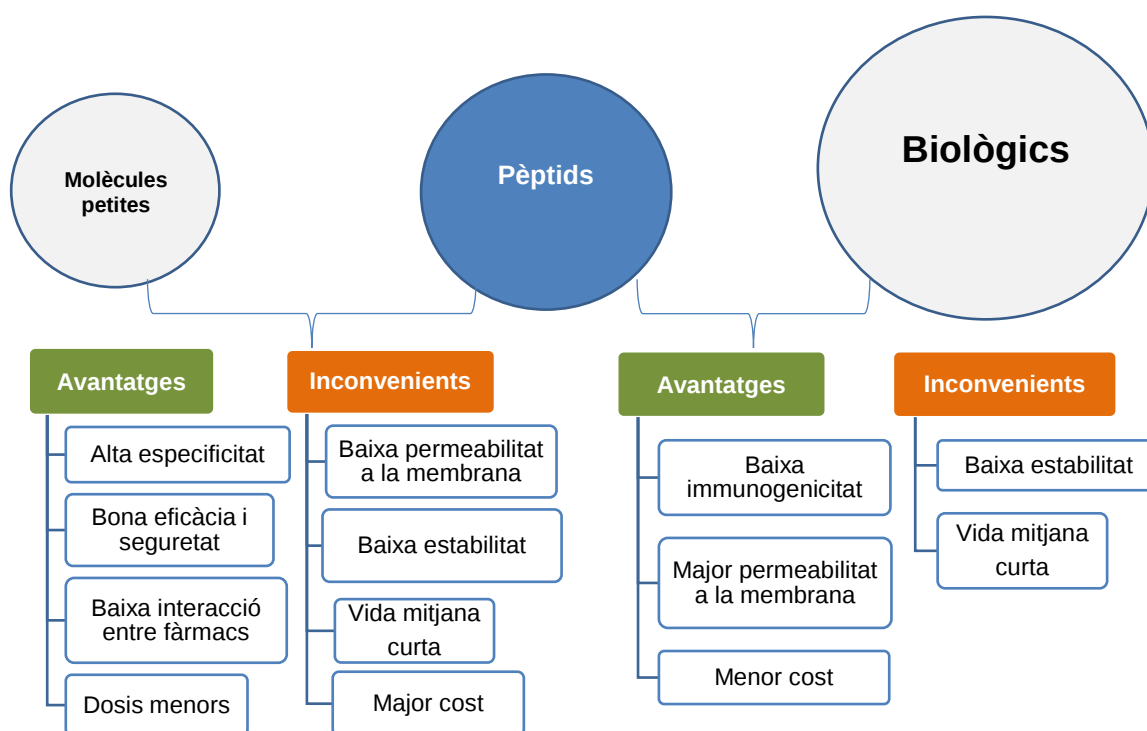


Figura 2. Avantatges i inconvenients dels pèptids terapèutics en comparació amb els fàrmacs de molècules petites i en comparació amb els productes biològics.⁵

Un dels principals avantatges dels pèptids terapèutics respecte a les molècules petites és la major especificitat a receptors de la superfície cel·lular, degut a presentar una mida major i una estructura química amb més grups funcionals que permeten una millor interacció. Aquest fet es tradueix en una major eficàcia i una major seguretat pel pacient respecte a les molècules petites, ja que la potència d'acció és més alta i es redueixen els efectes secundaris.

Habitualment, es prefereix lliurar els fàrmacs per via oral a causa de la seva naturalesa no invasiva i segura, el que proporciona una millor satisfacció del pacient. Les molècules petites presenten aquest avantatge respecte als pèptids, ja que la seva mida més petita els hi permet una millor capacitat de penetració a la membrana cel·lular.⁶ Tanmateix, la mida petita de les molècules tradicionals impedeix inhibir de manera eficaç interaccions on estiguin implicades superfícies grans, com ara les interaccions proteïna-proteïna, que els pèptids sí que són capaços d'inhibir.⁷

Com a conseqüència, la majoria dels fàrmacs peptídics es lliuren per vies parenterals com la via intravenosa, subcutània o intramuscular. Aquest fet es degut a la baixa biodisponibilitat oral dels pèptids a causa de la baixa permeabilitat a la membrana cel·lular que presenten, propietat crítica que comporta l'aplicació terapèutica a objectius extracel·lulars. A més, els pèptids tenen una baixa estabilitat metabòlica, i conseqüentment una vida mitjana curta, ja que són degradats fàcilment per una gran varietat d'enzims proteolítics presents en el sistema digestiu i en el plasma sanguini.⁸

La inestabilitat proteolítica dels pèptids i la ràpida eliminació és un inconvenient farmacocinètic, però presenta l'avantatge respecte les molècules petites de no acumular-se als teixits ni als òrgans, i, per tant, poques vegades s'observen interaccions entre fàrmacs.⁹

Els pèptids tenen costos de producció i de venda majors que les molècules petites.¹⁰ No obstant, la dosi dels pèptids terapèutics és menor ja que els pèptids solen ser agonistes del receptor i amb petites quantitats de fàrmac ja és suficient per estimular el receptor desitjat.^{3,11}

En comparació amb els productes biològics, els pèptids tenen més baixa estabilitat metabòlica i, en conseqüència, una vida mitjana més curta. A causa de la manca d'estructura terciària dels pèptids, els enllaços amida es troben més exposats i els fa més sensibles a la degradació per les peptidases.¹² Tanmateix, els pèptids presenten més baixa immunogenicitat, millor permeabilitat de membrana i els costos de producció són menors, en comparació amb els productes biològics.^{4,13}

Tot i els avantatges que presenten els pèptids terapèutics, millorar la biodisponibilitat d'aquests ha estat un gran repte en els darrers anys.^{14,15} Noves tecnologies emergents pel lliurament oral de pèptids i proteïnes com liposomes, nanopartícules de lípids sòlids, sistema de lliurament de fàrmacs autonanoemulsionants i el lliurament dirigit, han portat a nous fàrmacs peptídics al mercat.¹⁵

1.1.2. SITUACIÓ ACTUAL DELS PÈPTIDS COM A FÀRMACS

El descobriment i desenvolupament de fàrmacs és una activitat multifactorial que implica tant al sector públic com al privat, i el que és més important, a la salut del pacients, que és el que ens representa a tots com a societat.

El procés de desenvolupament del fàrmac comprèn totes les activitats implicades en la transformació d'un compost candidat a fàrmac (el producte final de la fase de descobriment) a un producte aprovat per les autoritats reguladores corresponents per a la seva comercialització (**Figura 3**).¹⁶ Aquest procés es divideix en el desenvolupament preclínic i el clínic. El desenvolupament preclínic inclou els estudis farmacocinètics i toxicològics a curt termini, la síntesi a gran escala per obtenir un producte pur, i els estudis farmacològics de formulació. En aquesta investigació es determinen les possibles dosis i nivells de toxicitat. El desenvolupament clínic es compon de tres fases:

Fase I: Estudis primaris sobre un grup petit de voluntaris sans on es determina la farmacocinètica i s'obté informació sobre la seguretat del fàrmac.

Fase II: Estudi amb un grup més gran de candidats malalts on es determina l'eficàcia terapèutica de l'ingredient farmacèutic actiu (API) així com dades addicionals per valorar la seguretat i la dosi.

Fase III: Estudi a pacients a gran escala realitzat simultàniament a diferents hospitals que permet determinar l'eficàcia estadística del fàrmac i permet obtenir informació més precisa sobre la dosi, la freqüència i la duració del tractament.

Finalment, les dades obtingudes són revisades per les autoritats sanitàries i el fàrmac s'aprova per la seva comercialització. En aquest punt, la fase IV entra en acció ja que el fàrmac és vigilat després de la seva aprovació (farmacovigilància).



Figura 3. Fases de desenvolupament d'un nou fàrmac.

En els últims 7 anys (2016 – 2022), l'administració d'aliments i medicaments d'Estats Units (FDA) ha aprovat un total de 315 fàrmacs nous per a la seva comercialització. D'aquests, 32 són pèptids o molècules que els contenen, el que representa al voltant d'un 10 % del nombre total de fàrmacs (**Figura 4**).¹⁷⁻²³ En aquest sentit, el 2021 va ser el millor any pel que fa a pèptids terapèutics, ja que la FDA va autoritzar un total de 50 fàrmacs, dels quals 10 eren peptídics, el que representa un 20 % del nombre total de medicaments aprovats.²²

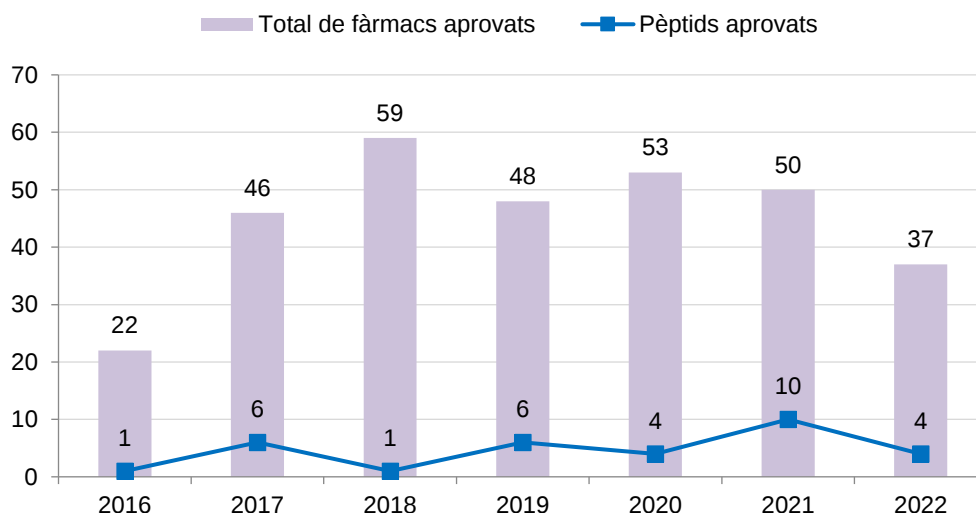


Figura 4. Total de fàrmacs i pèptids nous aprovats per la FDA en els últims 7 anys.

Els pèptids o molècules que contenen pèptids aprovats per la FDA entre els anys 2018 i 2022 es mostren en la **Taula 1**.²⁴⁻²⁸ En aquesta taula també s'informa de la indicació mèdica i del tipus d'estructura química per mostrar la gran diversitat estructural d'aquestes molècules. Així, els pèptids autoritzats durant aquests darrers anys inclouen pèptids petits de menys de 10 aminoàcids (Pepaxto®, Bylvay®, Pylarify® i Korsuva®), pèptids de mida mitjana d'entre 10 i 25 aminoàcids (Scenesse®) i pèptids grans de més de 25 aminoàcids (Zegalogue® i Mounjaro®). També inclouen pèptids cíclics units mitjançant enllaços amida (Vyleesi® i Lupkynis®) o per ponts disulfur (Imcivree®, Voxzogo® i Terlivaz®), pèptids que contenen radionúclids (Lutathera®, [⁶⁸Ga]-DOTATOC, Detectnet®, [⁶⁸Ga]-PSMA-11 i Pluvicto®), pèptids en conjugats fàrmacs-anticossos

(ADC)ⁱ (PADCEV[®], Polivy[®], Enhertu[®], Blenrep[®], TIVDAK[®] i Zynlonta[®]) i pèptids pegilats (PEGilació)ⁱⁱ (Empaveli[®]).

Els pèptids han guanyat importància com a espaiadors bifuncionals en els ADC's a causa de la seva estabilitat plasmàtica superior i el seu mecanisme d'alliberament controlat de càrrega útil, com és el cas dels ADC's aprovats per la FDA Zynlonta[®] i Enhertu[®]. Per altra banda, els pèptids també es troben en els ADC's com a agents citotòxics, com és el cas de Blenrep[®], i en el cas dels ADC's PADCEV[®], Polivy[®] i TIVDAK[®], els pèptids duen a terme tant el paper d'espaiadors bifuncionals com d'agents citotòxics.

Des d'un punt de vista mèdic, hi ha pèptids que es poden utilitzar com a agents terapèutics, diagnòstics o teragnòstics, essent més freqüent el seu us en teràpies d'oncologia, metabolisme i endocrinologia. Tanmateix, troben també aplicacions terapèutiques en les afeccions cardiovasculars, la gastroenterologia, les malalties òssies, la dermatologia i la disfunció sexual.

Taula 1. Resum dels pèptids aprovats per la FDA entre els anys 2018 i 2021.

Any	Ingredient actiu (Nom comercial)	Indicació	Tipus	Via
2018	[¹⁷⁷ Lu]-DOTATATE (Lutathera [®])	Teragnòstic de tumors neuroendocrins	Heptapèptid cíclic amb pont disulfur	Intravenosa
2019	[⁶⁸ Ga]-DOTATOC	Diagnòstic de tumors neuroendocrins	Heptapèptid cíclic amb pont disulfur	Intravenosa
2019	Afamelanotide (Scenese [®])	Exposició a la llum sense dolor (pacients amb protoporfíria eritropoètica)	Pèptid lineal de 13 aa	Subcutània
2019	Bremelanotide (Vyleesi [®])	Tractament del desig sexual hipoactiu	Heptapèptid cíclic	Subcutània
2019	Enfortumab Vedotin- Ejfv (PADCEV [®])	Tractament del càncer de bufeta i de les vies urinàries	ADC amb pèptids com a agent citotòxic i espaiador bifuncional	Intravenosa
2019	Polatuzumab Vedotin- Piiq (Polivy [®])	Tractament del limfoma difús de cèl·lules B grans	ADC amb pèptids com a agent citotòxic i espaiador bifuncional	Intravenosa
2019	Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki (Enhertu [®])	Tractament del càncer de mama HER2-positiu	ADC amb un pèptid com espaiador bifuncional	Intravenosa
2020	Setmelanotide (Imcivree [®])	Tractament de la obesitat genètica	Octapèptid cíclic amb pont disulfur	Subcutània
2020	[⁶⁸ Cu]-DOTATATE (Detectnet [®])	Diagnòstic de tumors neuroendocrins	Heptapèptid cíclic amb pont disulfur	Intravenosa
2020	[⁶⁸ Ga]-PSMA-11	Diagnòstic de càncer de pròstata	Dipèptid enllaçat amb urea	Intravenosa

ⁱ Els conjugats de fàrmacs-anticossos (ADC) són agents de tractament contra el càncer que consisteixen en un anticòs monoclonal altament selectiu a un antigen associat a un tumor, un agent quimioterapèutic citotòxic potent i un espaiador bifuncional que enllaça les dues parts i és estable en circulació, però allibera l'agent citotòxic en la cèl·lula desitjada.

ⁱⁱ La PEGilació és un procés mitjançant el qual les cadenes de polietilenglicol (PEG) es conjuguen amb proteïnes, pèptids o qualsevol altre tipus de molècula, per canviar les propietats físiques i químiques de la molècula terapèutica, i millorar d'aquesta manera el comportament farmacocinètic del fàrmac.

Any	Ingredient actiu (Nom comercial)	Indicació	Tipus	Via
2020	Belantamab mafodotin-blmf (Blenrep®)	Tractament de mieloma múltiple resistent o refractari	ADC amb un pèptid com agent citotòxic	Intravenosa
2021	Vosoritide (Voxzogo®)	Augmentar el creixement en nens amb acondroplàsia	Pèptid de 39 aa amb un pont disulfur	Subcutània
2021	Melphalan flufenamide (Pepaxto®)	Tractament del mieloma múltiple i amiloïdosi primària	Dipèptid èster etílic	Intravenosa
2021	Voclosporin (Lupkynis®)	Tractament de la nefritis lúpica	Pèptid cíclic d'11 aa	Oral
2021	Pegcetacoplan (Empaveli®)	Tractament de la hemoglobinúria paroxística nocturna	Dues còpies pètid cíclic de 13 aa	Subcutània
2021	Dasiglucagon (Zegalogue®)	Tractament de la hipoglucèmia severa en pacients amb diabetis	Pèptid linial de 29 aa	Subcutània
2021	Piflufolastat-F ¹⁸ (Pylarify®)	Diagnòstic de càncer de pròstata	Dipèptid enllaçat amb urea	Intravenosa
2021	Difelikefalin (Korsuva®)	Tractament de la picor crònica a la pell associada a malaltia renal crònica	Tetrapèptid linial	Intravenosa
2021	Odevixibat (Bylvay®)	Tractament de la picor crònica a la pell en pacients amb colestasi intrahepàtica familiar progressiva	Dipèptid amb N- terminal acilat	Oral
2021	Tisotumab vedotin-tftv (TIVDAK®)	Tractament del càncer cervical recurrent o metastàtic	ADC amb pèptids com a agent citotòxic i espaiador bifuncional	Intravenosa
2021	Loncastumab tesirine-lpyl (Zynlonta®)	Tractament del limfoma de cèl·lules B grans en recaiguda o refractari	ADC amb un pèptid com espaiador bifuncional	Intravenosa
2022	Gadopiclenol (Elucirem®)	Detecció de lesions amb vascularització anormal al sistema nerviós central i al cos	Tres grups d'àcid ionitzable 2,3- dihidroxiopropil(amino)- 5-oxopentanoic	Intravenosa
2022	Tirzepatide (Mounjaro®)	Tractament de la diabetis tipus 2 i el control de l'obesitat	Pèptid de 39 aa amb una cadena lateral que conté un àcid gras	Subcutània
2022	Lutetium [¹⁷⁷ Lu] vipivotide tetraxetan (Pluvicto®)	Tractament del càncer de pròstata	Dipèptid enllaçat amb urea	Intravenosa
2022	Terlipressin (Terlivaz®)	Tractament del síndrome hepatorenal amb una ràpida reducció de la funció renal	Pèptid cíclic de 12 aa unit per un pont disulfur	Intravenosa

A part dels medicaments aprovats per la FDA, cal remarcar que més de 170 pèptids estan en desenvolupament clínic actiu i molts més en estudis preclínics.⁵

1.1.3. FEXAPOTIDE TRIFLUTAT

El Fexapotide Triflutat (**FT**) és un nou pèptid terapèutic amb propietats pro-apoptòtiques selectives que ha superat les etapes de desenvolupament preclínic i clínic, i es troba en avaluació per tal de ser aprovat per les autoritats reguladores. L'estructura química d'aquest pèptid es mostra en la **Figura 5**:

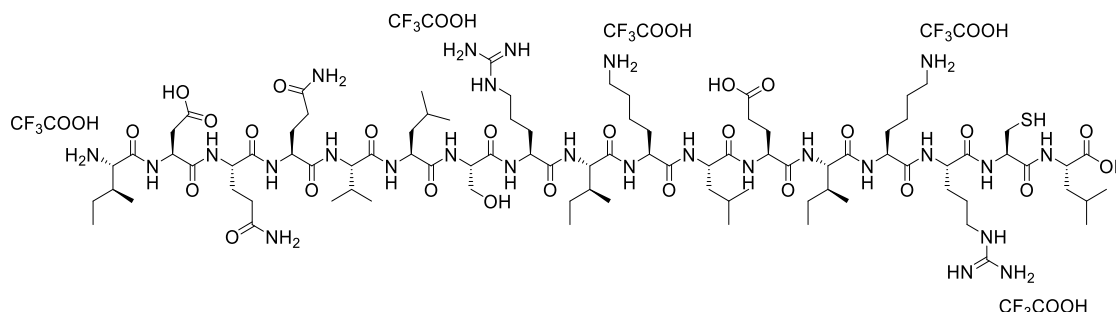


Figura 5. Estructura química del **FT**.

El **FT** està indicat pel tractament de la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP), que és un engrandiment no maligne de la pròstata, caracteritzat per un augment del nombre de cèl·lules epitelials i estromals en la zona de transició que envolta la uretra.^{29,30} L'HBP és una condició freqüent en homes de mitjana edat i ancians, i es presenta en l'autòpsia del 50 % d'homes de 51-60 anys i en un 90 % en homes de més de 80 anys.³¹ Els principals símptomes d'aquesta malaltia solen ser símptomes molestos del tracte urinari inferior com nictúria, micció freqüent, esforç per orinar, flux feble d'orina, buidament incomplet de la bufeta, urgència i/o incontinència.³² L'HBP és una malaltia progressiva amb símptomes que solen empitjorar amb el temps i, sense tractament, pot provocar complicacions importants com retenció urinària aguda i infecció del tracte urinari.³³

Els tractaments actuals per a l'HBP varien segons la gravetat dels símptomes i de les molèsties del pacient, i van des de l'espera amb vigilància a tractaments terapèutics amb bloquejadors adrenèrgics (alfabloquejadors)³⁴, inhibidors de la fosfodiesterasa 5 (PDE-5)³⁵ i inhibidors de la 5-alfa-reductasa.³⁶ Les intervencions quirúrgiques es consideren pels pacients d'HBP amb complicacions i símptomes greus, on les opcions farmacològiques han fracassat o no són adequades. En aquest sentit, la resecció transuretral de la pròstata (TURP) és la intervenció quirúrgica més comú que ha demostrat millores significants en els símptomes i de llarga durada.³⁷

No obstant, els fàrmacs actualment aprovats pel tractament d'HBP presenten diversos efectes secundaris inacceptables que provoquen la suspensió dels tractaments a alguns pacients. Per altra banda, les intervencions quirúrgiques requereixen d'hospitalització i poden tenir riscos i complicacions. Així, nous tractaments i tecnologies es troben en desenvolupament per tal d'oferir al pacient un tractament eficaç sense anestèsia general, amb temps de recuperació curt i un bon perfil de seguretat.³⁸

El **FT** és administrat mitjançant una injecció directament en la zona afectada de la pròstata, induint la pèrdua focal de les cèl·lules en el teixit afectat a través de l'apoptosi, la qual cosa provoca una contracció de la pròstata no regressiva i una millora dels símptomes tant a curt com a llarg termini.^{33,39,40}

Els estudis preclínic en animals van indicar que l'administració de **FT** disminueix la mida de la pròstata de 72 h a 12 mesos després de la injecció. A més a més, no es va detectar el fàrmac en el plasma de cap pacient en cap interval de temps.³³

Els estudis clínics de fase I/II es van dur a terme amb pacients d'HBP d'entre 45-75 anys. El primer estudi va consistir en injectar als pacients dosis de 2,5 mg, 5,0 mg i 10 mg de **FT** i avaluar la millora dels símptomes als 90 dies. En el segon estudi la dosi va oscil·lar de 2,5 mg a 0,125 mg i el temps es va augmentar a 180 dies. En aquest estudi es va concloure que els pacients que rebien **FT** en comparació amb els placebo presentaven millores en els símptomes.^{33,39}

Els estudis de fase III van consistir en comparar una única injecció intraprostàtica de 2,5 mg de **FT** amb la injecció placebo en 995 pacients. Els canvis en la gravetat dels símptomes a llarg termini (del 2009 al 2017) es van avaluar, i a un subgrup de 344 pacients es va repetir la injecció de **FT** entre 12 i 50 mesos després del seu primer tractament.⁴⁰

En els resultats dels assajos de seguretat i eficàcia a llarg termini del **FT**, administrant al pacient injeccions úniques i repetides, no es van identificar problemes de seguretat importants ni efectes secundaris, excepte dels típics que eren atribuïbles al procediment transrectal.^{41,40} Per tant, el **FT** es pot considerar com a un producte segur i eficaç per a l'HBP, que només requereix d'uns minuts per injectar-se i no necessita la hospitalització ni anestèsia o analgèsics.

Per altra banda, estudis amb dosis de 2,5 mg i 15 mg per determinar la seguretat i l'eficàcia del **FT** pel tractament de càncer de pròstata de grau 1, van mostrar una millora significativa després de 4 anys de seguiment, no es van detectar efectes secundaris greus relacionats amb el fàrmac i la injecció de **FT** va ser ben tolerada.⁴² Respecte els tractaments de càncer de pròstata que es coneixen fins ara, la teràpia de **FT** injectable permet tractar la malaltia des de l'inici amb un mètode menys tòxic i amb un mínim risc d'efectes secundaris.

En l'any 2002, l'empresa Nymox Pharmaceutical Corporation va presentar una patent per l'aplicació de pèptids efectius per l'eliminació o destrucció de cèl·lules, com ara les de tumors benignes o malignes en humans.⁴³ Un d'aquests pèptids descrits en la patent és el **FT**, i després de superar els estudis de seguretat i eficàcia d'aquest fàrmac, que s'han dut a terme durant aquests últims anys, en l'any 2022 Nymox ha sol·licitat a la FDA l'aprovació de la seva comercialització als Estats Units.

1.1.4. PRODUCCIÓ DE FT

S'han desenvolupat diferents mètodes per obtenir pèptids terapèutics donada la gran diversitat estructural dels mateixos. Així, s'han descrit fins ara diverses aproximacions per tal d'accedir al producte desitjat:

1. Síntesi química en solució⁴⁴ i síntesi en fase sòlida.⁴⁵
2. Extracció de fonts naturals.^{46,47}
3. Tecnologia d'ADN recombinant.^{11,48}
4. Producció en sistemes d'expressió lliure de cèl·lules.⁴⁹
5. Producció en animals transgènics i plantes.^{50,51}
6. Síntesi enzimàtica.^{52,53}
7. Fermentació.⁵⁴
8. Semisíntesi.^{55,56}

Habitualment, la mida del pèptid determina la tecnologia més adequada per a la seva producció. Així, la tecnologia de l'ADN recombinant és especialment adequada per pèptids i proteïnes grans, la síntesi química és una tecnologia viable per a la producció de pèptids de mida petita i mitjana, i la enzimàtica gairebé no s'ha aplicat a pèptids superiors de 10 residus. Aquesta diversitat metodològica es pot concretar en dues estratègies generals per preparar un pèptid: la síntesi química o l'aplicació de mètodes biològics. Aquestes estratègies generals es poden aplicar de manera exclusiva o combinada, depenent de la complexitat i dificultat per preparar el pèptid.⁵⁷

La síntesi química és el mètode preferit per a la preparació industrial de pèptids de mida petita i mitjana, ja que aquest enfoc permet la possible incorporació d'aminoàcids no naturals o sondes sintètiques a la cadena peptídica i ofereix accés a una diversitat química molt més amplia que els derivats peptídics obtinguts amb tecnologia recombinant. A més a més, la producció química de pèptids a gran escala és més fàcil i ràpida en comparació amb els enfoc biològics.⁵⁸

Actualment es coneixen dues metodologies per tal de sintetitzar químicament pèptids terapèutics: la síntesi de pèptids en solució (SPS) i la síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS). La SPS es basa en sintetitzar la cadena peptídica a partir de reaccions que es desenvolupen en una dissolució homogènia; la SPPS consisteix en unir el primer aminoàcid de la cadena peptídica desitjada a un suport polimèric sòlid i insoluble, i a continuació addicionar de forma seqüencial els aminoàcids fins obtenir el pèptid desitjat (veure *apartat 3.1*, Capítol 1). L'estratègia coneguda com a síntesi convergent combina les dues anteriors per tal de superar inconvenients que presenta la SPPS (veure *apartat 3.2*, Capítol 1).

El grup d'investigació *Synthetic Methodology Applied to Bioactive Compounds* (SMBioCom) de la Universitat de Barcelona (UB), amb la col·laboració de l'empresa Esteve Química, va iniciar en 2017 una línia d'investigació que tenia com a objectiu el desenvolupament d'una metodologia sintètica basada en la SPPS per a la preparació del **FT** a escala industrial.

Abans d'iniciar una síntesi a gran escala s'han d'assajar diferents estratègies possibles per a la síntesi del pèptid desitjat a escala de laboratori. En el cas concret del **FT**, es van assajar 3 estratègies a escala de laboratori en una Tesi Doctoral que va constituir el primer treball en el marc de la col·laboració abans esmentada.⁵⁹ A partir d'aquests resultats s'ha desenvolupat la present Tesi Doctoral, en la qual s'ha estudiat l'escalat de la ruta sintètica que es va considerar més prometedora.

És important tenir en compte que el **FT** és classificat a Esteve Química com a API altament potent (HP-API). Un HP-API és un compost que provoca una resposta farmacològica o biològica a una dosi molt baixa i, a l'empresa, és definit com l'API que té un límit d'exposició ocupacional (OEL) menor a 10 µg/m³ (**Figura 6**). L'OEL és una dosi que és poc probable que provoqui un efecte advers a un treballador adult sa, si està exposat per inhalació a aquesta dosi o per sota, durant 8 h al dia durant tota la vida laboral.

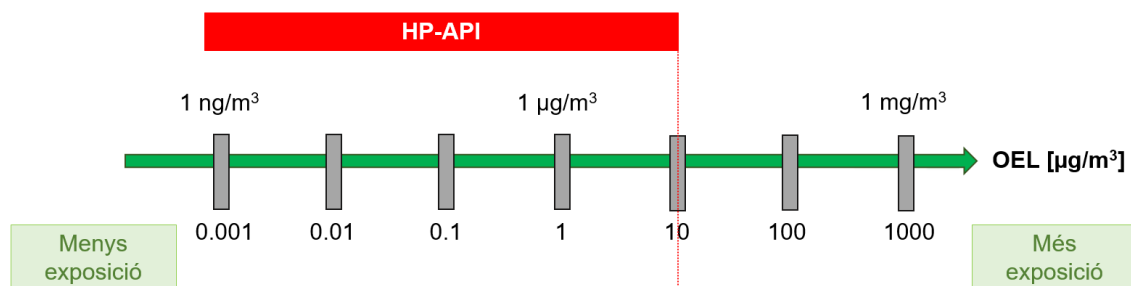


Figura 6. Rang OEL en que es treballa a Esteve Química (1 mg/m^3 - 1 ng/m^3) i OEL per a un producte HP-API.

Actualment, es desconeix el OEL del **FT** ja que falten dades de toxicologia del fàrmac, però tenint en compte que els pèptids amb aplicació terapèutica acostumen a estar en el rang de OEL d'1-10 $\mu\text{g/m}^3$ i que el **FT** és un pèptid antineoplàstic amb capacitat d'estimular la apoptosi cel·lular, l'empresa va decidir tractar el **FT** com a HP-API. Treballar amb aquest tipus d'API suposa treballar en un aïllador d'alta contenció que protegeix al treballador de la seva exposició.

1.2. OBTENCIÓ DE FT A ESTEVE QUÍMICA: ANTECEDENTS

Fins a la data, Esteve Química ha centrat les seves investigacions i produccions en fàrmacs de molècules petites, molècules orgàniques que es sintetitzen mitjançant la química en solució i que actualment són la majoria dels productes farmacèutics comercialitzats. No obstant, en els darrers anys els pèptids terapèutics han anat agafant força en el mercat i l'empresa, junt amb la col·laboració de la UB, va decidir iniciar una línia d'investigació per a desenvolupar metodologies amb l'objectiu d'arribar a produir-los i comercialitzar-los. Amb aquest propòsit, el **FT** va ser el pèptid escollit per a dur a terme els estudis preliminars al laboratori i el posterior escalat per portar la producció a la planta pilot d'un pèptid per primera vegada en les instal·lacions d'Esteve Química.

Com a inici d'aquesta col·laboració, la Tesi Doctoral de Macarena Duran⁵⁹ es va focalitzar en donar els primers passos a escala de laboratori vers el desenvolupament d'una estratègia sintètica robusta i escalable per a la síntesi de **FT** a escala de planta pilot. En aquest treball es van estudiar tres enfocaments diferents per la preparació d'aquest fàrmac, la síntesi del pèptid en fase sòlida mitjançant una estratègia lineal i dues estratègies convergents que combinen la SPPS i la SPS.

L'estratègia lineal va revelar potencials inconvenients com, per exemple, la dificultat de completar els acoblaments dels aminoàcids. El **FT** és un pèptid de mida mitjana amb diversos aminoàcids β -ramificats i aminoàcids trifuncionals que generalment estan protegits amb grups voluminosos que dificulten els acoblaments. Aquesta primera aproximació sintètica va resultar ineficient i molt costosa pel gran nombre de reacoblaments que es van necessitar, per la qual cosa es va descartar.

Com a alternativa a la síntesi lineal es va considerar l'aproximació convergent. Es va dividir la cadena de **FT** en 4 fragments peptídics que consistien en un dipèptid, un tetrapèptid, un pentapèptid i un hexapèptid. El primer es va sintetitzar en solució i els altres 3 fragments peptídics

es van preparar per SPPS. Posteriorment, els fragments obtinguts es van condensar en solució fins obtenir el pèptid desitjat.

L'estratègia convergent va demostrar ser prometedora a la escala de laboratori, ja que el pèptid desitjat es va obtenir amb una puresa cromatogràfica més elevada (40 %) que la que va resultar de la síntesi lineal (6 %). La síntesi dels fragments protegits per SPPS amb elevades pureses i la fàcil monitorització de l'acoblament de fragments en solució podrien explicar aquests bons resultats.

Des d'un punt de vista de producció industrial, els requeriments reglamentaris en termes de caracterització d'estructures, processos de fabricació i impureses que sorgeixen del procés sintètic, exigeix que el número d'intermedis sigui el menor possible. En aquest sentit, cal mencionar que la preparació d'un pèptid protegit en fase sòlida es considera un pas sintètic en el context industrial. Per aquesta raó, en la segona aproximació convergent per sintetitzar el **FT**, es va decidir reduir el número d'intermedis fusionant el tetrapèptid i el pentapèptid en un nonapèptid.

Aquesta estratègia va proporcionar els millors resultats de puresa cromatogràfica del **FT** (entre 50-70 %) en comparació a la primera estratègia convergent (40 %), i es va considerar adequada per l'empresa en termes de producció i cost.

Els estudis precedents van demostrar que l'estratègia convergent era potencialment adequada per la preparació de **FT** i es van obtenir 17 mg del pèptid desitjat en la prova que va mostrar el millor resultat de puresa cromatogràfica (70 %). Ara es tractava amb la present Tesi Doctoral de profunditzar en l'estudi d'aquesta estratègia per tal d'adaptar-la a un procés escalable que, en últim terme, es pogués portar a planta pilot.

2. OBJECTIUS

En la Tesi Doctoral precedent⁵⁹ es va proposar una estratègia sintètica per preparar **FT** i es va estudiar la seva viabilitat. Com a resultat d'aquest treball es van obtenir unes condicions de síntesi adequades a escala de laboratori mitjançant l'aproximació de la fase sòlida. L'objectiu de la present Tesi Doctoral ha estat continuar aquest projecte amb la recerca de condicions experimentals adients per l'escalat del procés, prenent com a base les establertes a escala de laboratori. Especial atenció s'ha posat en el desenvolupament de mètodes analítics pel seguiment de les reaccions en fase sòlida i per determinar la puresa dels intermedis de reacció, d'acord amb l'establert per les autoritats reguladores pel desenvolupament d'un fàrmac a escala industrial.

CAPÍTOL 1:

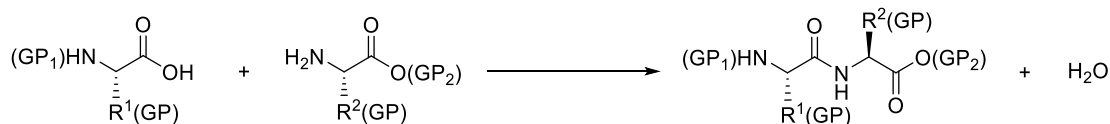
***INTRODUCCIÓ A LA SÍNTESI DE PÈPTIDS EN
FASE SÒLIDA***

3. CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ A LA SÍNTESI DE PÈPTIDS EN FASE SÒLIDA

3.1. ESTRATÈGIA LINEAL

3.1.1. EL CONCEPTE

Des d'un punt de vista sintètic, l'estructura d'un pèptid o d'una proteïna es construeix mitjançant reaccions de condensació (deshidratació) entre grups α -carboxílic i grups α -amino d'aminoàcids per formar els enllaços amida de la cadena peptídica (enllaç peptídic). A l'**Esquema 1** es mostra com a exemple la formació d'un dipèptid. Com es pot observar, la formació de l'enllaç peptídic requereix la protecció prèvia de la resta de grups funcionals dels aminoàcids per tal d'evitar reaccions secundàries.⁶⁰ En general, els grups funcionals que es protegeixen en els aminoàcids són el grup α -amino (GP₁) i el grup α -carboxílic (GP₂) que no participen en la formació de l'enllaç amida, i els grups funcionals de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals (GP).

GP₁ = grup protector α -amino

R = cadenes laterals

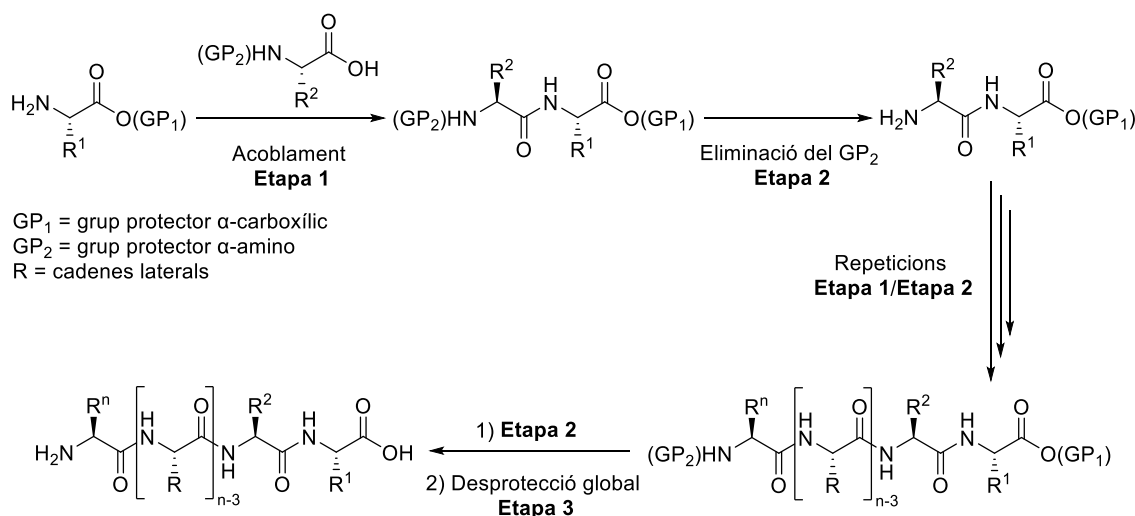
Enllaç peptídic

GP₂ = grup protector α -carboxílic

GP = grups protectors cadenes laterals

Esquema 1. Formació de l'enllaç amida entre dos aminoàcids (s'especifica l'estereoquímica donat que els aminoàcids es consideren naturals proteinogènics).

Aquesta estratègia va ser aplicada per primera vegada a l'any 1901 per Emil Fischer en la síntesi del dipèptid glicil-glicina, i no va ser fins a l'any 1953 quan du Vigneaud va descriure la preparació d'un altre pèptid, l'oxitocina, una hormona natural de 10 aminoàcids.⁴⁴ La síntesi d'aquests pèptids es va portar a terme mitjançant processos convencionals en solució. L'estratègia global de la síntesi de pèptids en solució (SPS) es mostra a l'**Esquema 2**.

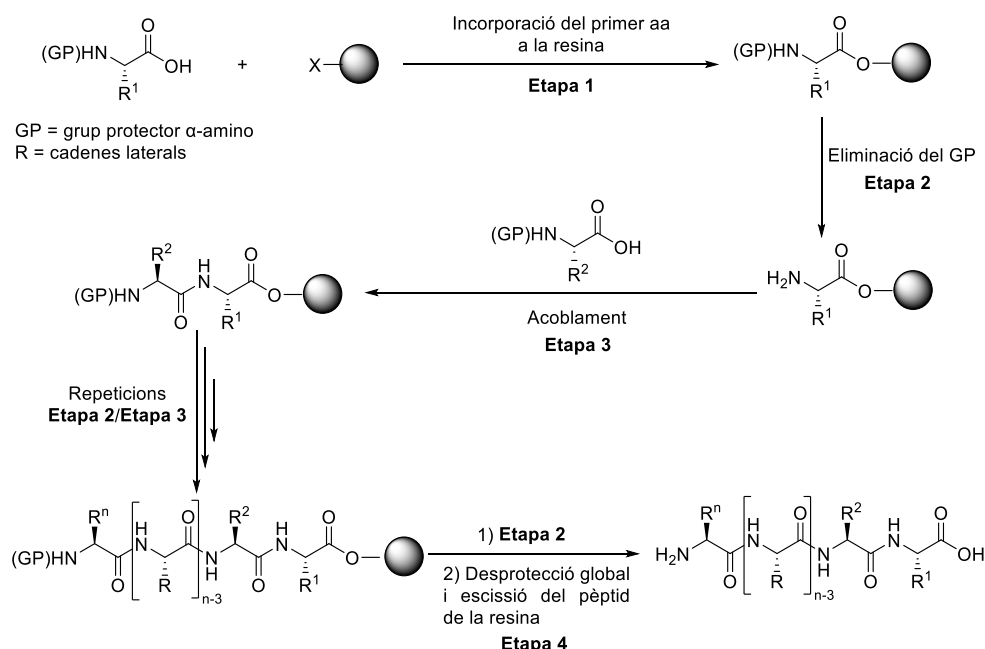


Esquema 2. Estratègia general de la síntesi de pèptids en solució.

En el primer pas de la síntesi (**Etapa 1**) es duu a terme la formació de l'enllaç amida entre el grup α -carboxílic del segon aminoàcid amb el grup α -amino del primer aminoàcid (es considera com a primer aminoàcid el de l'extrem carboxílic de la cadena i com a aminoàcid 'n' el de l'extrem amino de la mateixa). A continuació, el grup protector de l'extrem α -amino del dipèptid s'elimina (**Etapa 2**) i s'inicia un cicle de repeticions de les etapes 1 i 2 fins a obtenir la seqüència d'aminoàcids desitjada, que finalment es desprotegeix (grups protectors dels extrems de la cadena peptídica i de les cadenes laterals) per donar lloc al pèptid desitjat (**Etapa 3**).

Generalment, en una SPS es poden obtenir, segons la mida de la cadena peptídica, molts intermedis que cal purificar i caracteritzar abans de continuar la síntesi per tal de controlar la puresa en cada pas. Això sol comportar llargs períodes de temps i rendiments globals baixos a causa d'un nombre d'etapes de purificació que pot ser elevat. Aquest problema es va solucionar amb el desenvolupament de la síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS). El protocol que es mostra a l'**Esquema 2** va seguir sent vàlid però transformant el grup protector GP₁ en un suport polimèric insoluble.

La SPPS va ser introduïda per Bruce Merrifield en 1963 i va permetre sintetitzar pèptids d'una manera més eficient que la síntesi en solució.⁴⁵ Aquesta estratègia consisteix en unir covalentment el primer aminoàcid de la cadena peptídica desitjada a un suport polimèric insoluble, sobre el qual es fa créixer la cadena peptídica. El fet de desenvolupar la síntesi en fase sòlida permet l'ús d'excès de reactius per completar les reaccions ja que es poden eliminar per filtració, de la mateixa manera que s'eliminen els subproductes procedents dels reactius i de l'eliminació de grups protectors temporals (veure **Esquema 4**, apartat 3.1.3). Un cop completada la seqüència peptídica desitjada, es desprotegeix totalment la cadena peptídica amb l'alliberació simultània de la mateixa. L'estratègia convencional de SPPS es mostra a l'**Esquema 3**.



Esquema 3. Estratègia general de la síntesi de pèptids en fase sòlida.

En el primer pas de la SPPS (**Etapa 1**), el primer aminoàcid convenientment protegit s'uneix al suport sòlid mitjançant un enllaç èster en l'estratègia convencional. A continuació, el grup protector de l'extrem α -amino s'elimina (**Etapa 2**) per acoblar el següent aminoàcid α -amino

protegit i formar l'enllaç amida desitjat (**Etapa 3**). El procediment de cicles repetitius de reaccions d'eliminació del grup protector de l'extrem α -amino i l'acoblament d'aminoàcid es duu a terme fins a completar la seqüència desitjada. A continuació, es realitza la desprotecció global de la cadena peptídica i l'escissió de l'enllaç pèptid-resina per obtenir el producte final (**Etapa 4**).

Des que Merrifield va descriure l'estratègia de la fase sòlida, s'han desenvolupat diferents aproximacions per unir la cadena peptídica a la resina (grup α -amino de l'aminoàcid, grup funcional de la cadena lateral de l'aminoàcid o enllaç amida de l'esquelet peptídic) que permeten obtenir diferents tipus de pèptids, com pèptids modificats en qualsevol dels extrems de la cadena o pèptids cíclics.^{61,62,63}

3.1.2. RESINES

En el context de la SPPS, una resina es pot considerar formada per dues parts: un suport sòlid o polímer que pugui ser solvatat (inflat) eficientment pel dissolvent orgànic que s'utilitza en la síntesi, i la funcionalització del mateix (centres reactius) que pot ser modificada a voluntat mitjançant un espaiador bifuncional per assolir uns objectius sintètics concrets. Per tal de dur amb èxit la SPPS, s'ha d'escollir adequadament el suport sòlid i la seva funcionalització, segons l'estratègia sintètica que es desitja aplicar.^{64,65} En aquest sentit, es prefereixen en general funcionalitzacions no molt elevades (< 1 mmols/g) per tal d'evitar problemes estèrics durant la síntesi.

3.1.2.1. SUPORTS SÒLIDS

El suport polimèric es considera el nucli de la SPPS, i ha de presentar unes propietats fonamentals com:⁶⁶

- Ha de ser estable a l'agitació mecànica, a variacions de temperatures, als dissolvents i a les condicions utilitzades durant la síntesi.
- Els punts actius han de ser accessibles mitjançant un bon inflament de la resina en el dissolvent.
- La mida i la forma de les partícules de la resina han de ser homogènies i adequades per a la fàcil manipulació i la ràpida filtració durant la síntesi.

S'han desenvolupat una gran varietat de resines compatibles per a la SPPS.⁶⁷ Segons el suport polimèric utilitzat, les més comuns es poden classificar en tres grups: (1) resines de poliestirè (PS), (2) resines de polietilenglicol-poliestirè (PEG-PS) i (3) resines de polietilenglicol (PEG).

1. Resines de poliestirè (PS): La resina de PS és el suport polimèric clàssic utilitzat en la SPPS degut als adequats nivells de funcionalització que es poden assolir i a les seves bones propietats d'inflament en dissolvents poc polars com diclorometà (DCM) o toluè, essent també compatibles amb altres dissolvents més polars com *N,N*-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurà (THF) o dioxà.⁴⁵ Des d'un punt de vista estructural, una resina PS (com la resina de Merrifield) consisteix en poliestirè amb un 1 % de reticulació amb 1,4-divinilbenzè per insolubilitzar el polímer, funcionalitzat amb grups clorometil (**Figura 7, A**).
2. Resines de polietilenglicol-poliestirè (PEG-PS): Aquestes resines contenen un cos hidrofòbic de PS amb cadenes hidròfiles de PEG. El seu caràcter amfifílic permet assolir

bons inflaments amb dissolvents de diferents polaritats, inclòs l'aigua. Un exemple és la resina TentaGel® (**Figura 7, B**), desenvolupada per Rapp i Bayer,⁶⁸ que consisteix en una matriu de PS amb un percentatge de reticulació baix i en la qual s'empelta aproximadament un 50-70% de PEG en pes.

3. Resines de polietilenglicol (PEG): Les resines hidròfiles basades en PEG són molt estables químicament ja que estan constituïdes principalment per enllaços tipus èter. La funcionalització d'aquests polímers és de tipus aminometil, per la qual cosa cal introduir la funcionalització adequada per a la síntesi mitjançant un espaïador bifuncional. La resina ChemMatrix® (**Figura 7, C**), desenvolupada per Albericio i col·laboradors,⁶⁹ posseeix una estabilitat mecànica més elevada que les altres resines basades en PEG degut a estar altament reticulada. Aquest suport presenta una bona solvatació amb la major part de dissolvents i ha demostrat molt bons resultats amb síntesis de pèptids llargs i amb tendència a formar agregats.

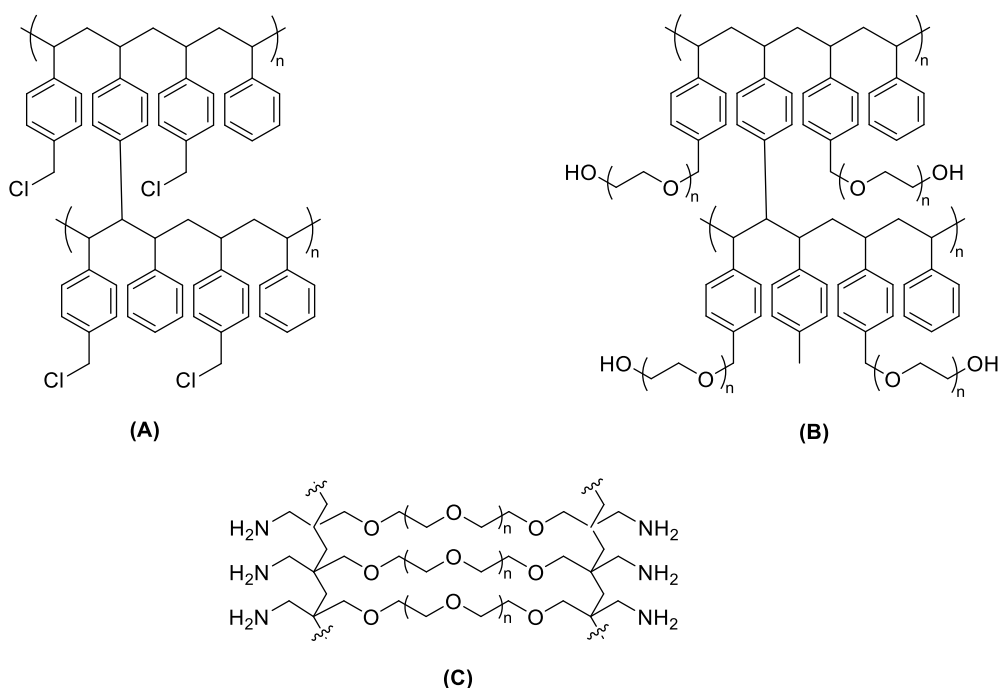


Figura 7. Estructures de les resines **(A)** Merrifield **(B)** TentaGel® i **(C)** ChemMatrix®.

3.1.2.2. FUNCIONALITZACIÓ DE LA RESINA

La funcionalització de la resina es defineix com els centres reactius del suport sòlid que enllacen temporalment la cadena peptídica en creixement a la resina. El tipus d'enllaç format entre el pèptid i la resina determina les condicions específiques per l'alliberació del pèptid de la resina (la majoria en condicions àcides) i la funcionalització de l'extrem carboxílic que es desitja (amida per exemple).^{70,71}

El primer aminoàcid es pot unir directament a resines comercials ja funcionalitzades, com són la resina clorur de 2-clorotritil (2-CTC)⁷² (**Figura 8, A**), per a la síntesi de pèptids convencionals, o la resina Rink amida⁷³ (**Figura 8, B**), per a pèptids carboxiamida. La resina 2-CTC permet escindir el pèptid de la resina utilitzant unes condicions àcides més suaus (1 % d'àcid trifluoroacètic (TFA))

en DCM) que les utilitzades per l'alliberament del pèptid en la resina Rink amida (10 % de TFA en DCM).

Per altra banda, la funcionalització de la resina es pot modificar amb la utilització d'un espaiador bifuncional, és a dir, una molècula bifuncional que s'incorpora a la resina per modificar la funcionalització de la mateixa. Un exemple és l'espaiador bifuncional de Sheppard⁷⁴ (**Figura 8, C**), que s'uneix permanentment al suport polimèric a través d'un enllaç amida estable per donar a la resina la funcionalització adequada per unir la cadena peptídica mitjançant un enllaç èster molt làbil a les condicions àcides (1 % de TFA en DCM).

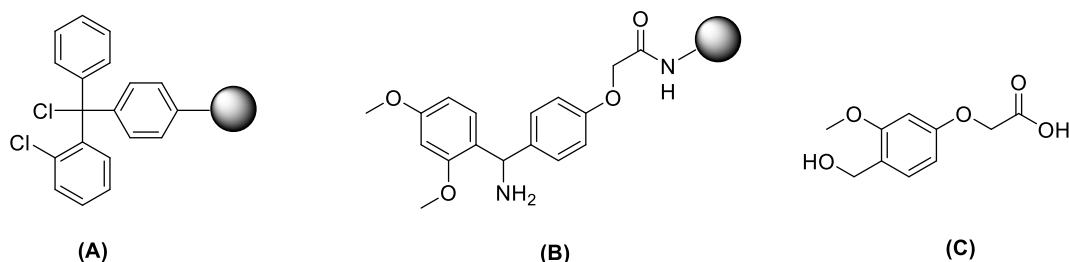
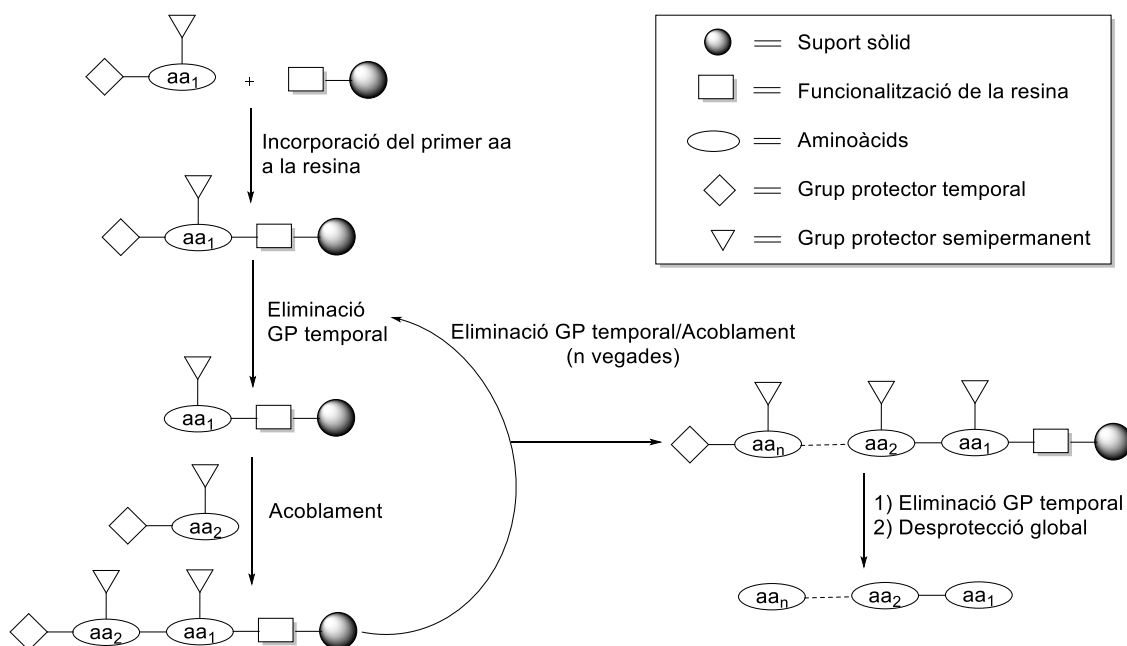


Figura 8. (A) Resina 2-CTC (B) Resina Rink amida i (C) Espaiador bifuncional de Sheppard.

3.1.3. ESTRATÈGIES DE PROTECCIÓ

Tal i com s'ha introduït anteriorment, els aminoàcids presenten una gran varietat de grups funcionals en la seva estructura que han d'estar convenientment protegits si no estan involucrats en la formació de l'enllaç amida per a evitar reaccions no desitjades. En SPPS s'utilitzen dos tipus de protecció, els grups protectors temporals i els semipermanents (**Esquema 4**).⁶⁴ El grup protector de la funció α -amino és un grup protector temporal ja que s'elimina en fase sòlida abans de la formació de l'enllaç peptídic. Tanmateix, els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals han de tenir un caràcter semipermanent, ja que han de ser estables a les condicions utilitzades per a construir la cadena peptídica però s'han de poder eliminar en l'etapa final de la síntesi on s'allibera el pèptid de la resina. En aquest sentit, actualment existeixen dos estratègies de protecció en SPPS: les anomenades estratègia Boc/Bzl i estratègia Fmoc/^tBu (**Figura 9**).



Esquema 4. Diferents tipus de protecció en la SPPS.

En l'estratègia de protecció Boc/Bzl, el grup *tert*-butiloxycarbonil (Boc) s'utilitza com a grup protector temporal de la funció α -amino, sent làbil en condicions àcides suaus (25-50 % de TFA en DCM). Els grups del tipus benzil (Bzl) s'utilitzen com a protectors semipermanents dels grups funcionals de les cadenes laterals, i s'eliminen al final de la síntesi amb condicions àcides fortes com l'àcid fluorhídric (HF). Donat que els dos grups s'eliminen en condicions àcides, no es pot considerar una estratègia totalment ortogonal.⁷⁵

L'estratègia de protecció Fmoc/^tBu consisteix en utilitzar el grup 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) com a grup protector temporal de la funció α -amino, làbil en condicions bàsiques (20 % de piperidina en DMF). Les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals estan protegides amb grups del tipus *tert*-butil com Boc, *tert*-butil (^tBu) o tritil (Trt), làbils a les condicions àcides utilitzades per a alliberar la cadena peptídica de la resina (5-95 % de TFA en DCM). En aquest cas, el grup protector temporal i els grups protectors semipermanents es consideren ortogonals al eliminar-se en condicions bàsiques i àcides, respectivament.⁷⁶ L'ús de l'estratègia Fmoc és preferida a l'estratègia Boc/Bzl a l'utilitzar condicions de desprotecció més suaus, ja que l'ús de HF requereix de material especial per la seva reactivitat i perillositat.

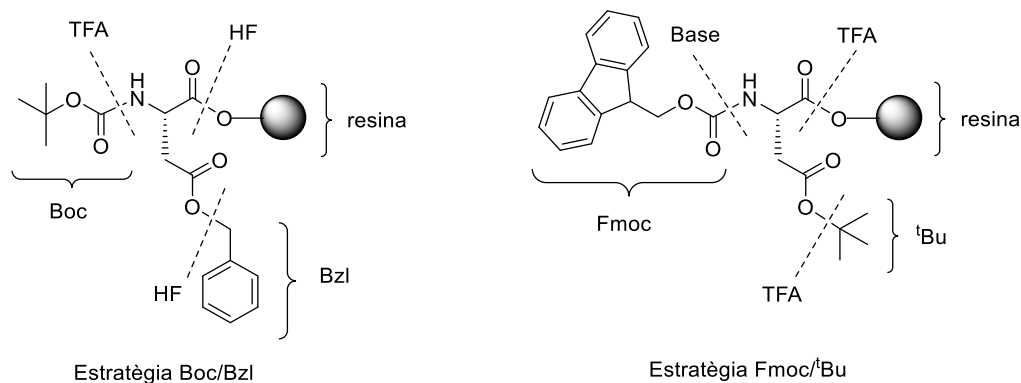
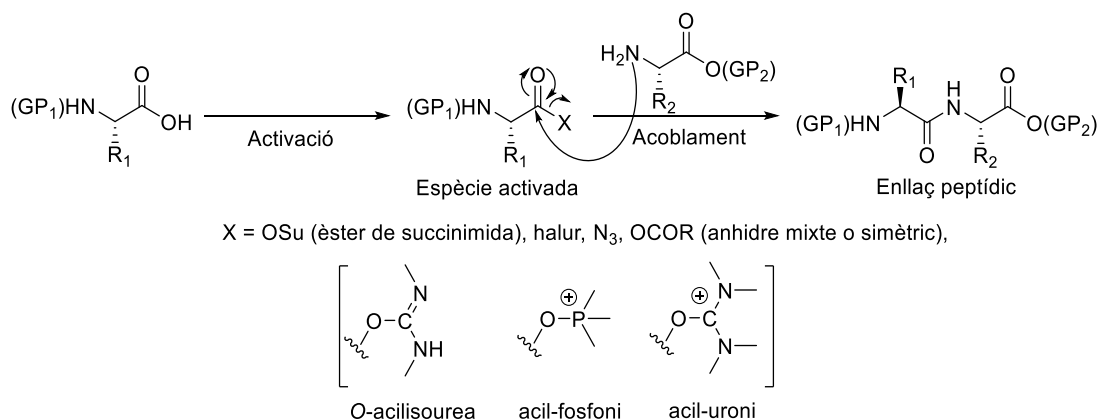


Figura 9. Estratègies de protecció en SPPS.

3.1.4. AGENTS D'ACOBLEMENT

En el context de química de pèptids, la formació de l'enllaç amida es duu terme a través d'una reacció d'acoblament. Des d'un punt de vista mecanístic, la reacció consisteix en l'atac nucleòfil del grup α -amino terminal de la cadena peptídica en creixement al grup α -carboxílic de l'aminoàcid que es vol acoblar, prèviament activat amb un agent d'acoblament que permet portar a terme el procés en condicions suaus, és a dir, a temperatura ambient (**Esquema 5**).⁷⁷ La forma activada de l'aminoàcid pot ser un èster actiu estable (èsters de succinimida), un compost d'estabilitat intermèdia que pot ser aïllat o no (halur d'acil, azida o anhidre mixte o simètric), o un èster actiu que no pot ser aïllat per la seva alta reactivitat (O-acilisourea, acil-fosfoni o acil-uroni).



Esquema 5. Formació de l'enllaç peptídic.

A continuació, es descriuen alguns exemples dels agents d'acoblament més utilitzats per a la formació de l'enllaç peptídic.

3.1.4.1. CARBODIIMIDES

L'ús de la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) per la formació de pèptids i altres enllaços amida va ser reportada per Sheehan i Hess en 1955.⁷⁸ Des de llavors, les carbodiimides s'han considerat una classe de compostos extremadament importants per la preparació eficient d'enllaços amida, èsters i anhídrids d'àcid a partir d'àcids carboxílics. S'han estudiat moltes carbodiimides com agents d'acoblament però només algunes s'utilitzen de forma rutinària a escala industrial degut a la seva disponibilitat, cost, aïllament i consideracions ambientals. Aquest grup el formen la DCC, la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC)⁷⁹ i el clorur de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida⁸⁰ (EDC·HCl) (**Figura 10**).

La primera consideració per seleccionar la carbodiimida està en funció del tractament del cru desitjat, ja que la manera d'eliminar el subproducte d'urea generat varia considerablement. La diisopropilurea és considerablement soluble en DCM i en conseqüència, la DIC és una de les més emprades en SPPS ja que el seu subproducte es pot eliminar a través de rentats de la resina. Tanmateix, la DCC és més útil per reaccions en solució ja que el subproducte (diciclohexilurea) és insoluble en la majoria dels dissolvents orgànics i es pot separar del cru de reacció per filtració. No obstant, la carbodiimida més utilitzada per la formació d'enllaços amida en solució és la EDC·HCl, ja que el subproducte de reacció és soluble en aigua i es pot eliminar fàcilment mitjançant extraccions en medi àcid aquós.⁸¹

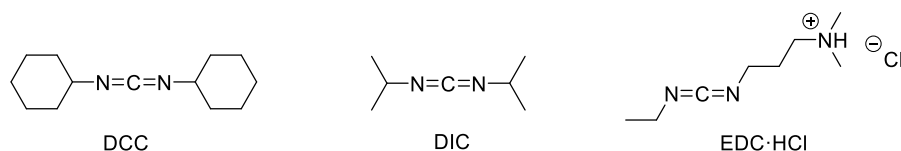
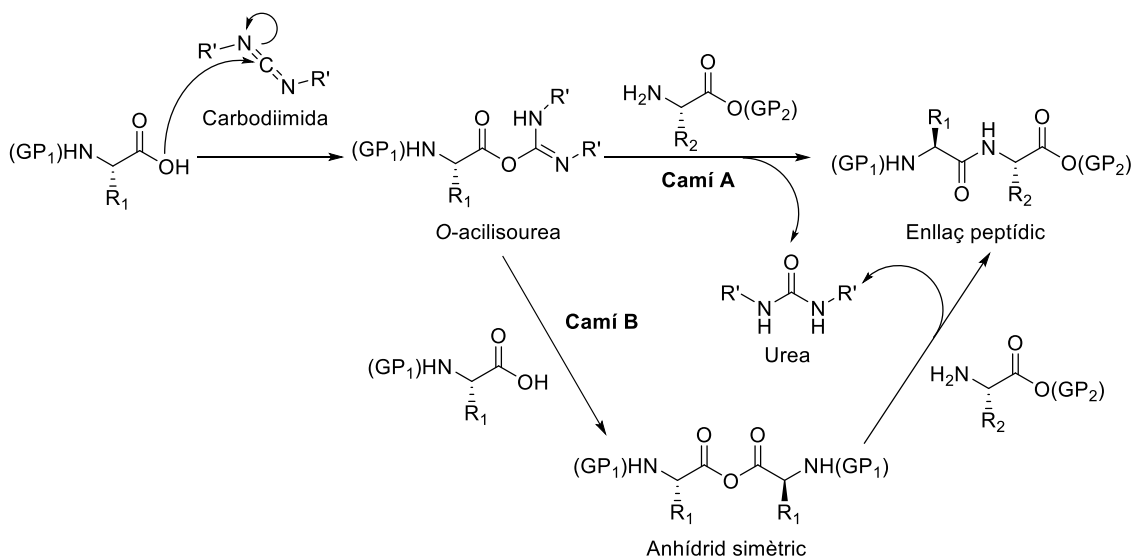


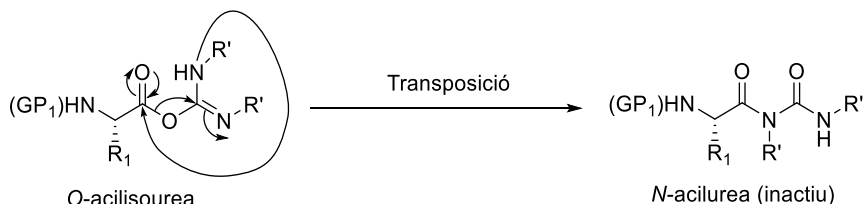
Figura 10. Alguns exemples de carbodiimida.

El mecanisme de formació de l'enllaç peptídic mitjançant l'activació de l'àcid carboxílic amb una carbodiimida es mostra en l'**Esquema 6**. En una primera etapa, el grup α -carboxílic de l'aminoàcid reacciona amb la carbodiimida per a donar l'èster actiu *O*-acilisourea, el qual és atacat pel grup α -amino de l'altre aminoàcid per formar l'enllaç peptídic desitjat i, com a subproducte de reacció, la urea corresponent de la carbodiimida utilitzada (**Esquema 6, camí A**). Per altra banda, l'intermedi *O*-acilisourea pot reaccionar amb l'excés d'aminoàcid per donar un anhídrid simètric que també pot evolucionar vers la formació de l'enllaç peptídic (**Esquema 6, camí B**).



Esquema 6. Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic per activació amb carbodiimida.

L'intermedi *O*-acilisourea pot provocar reaccions secundàries no desitjades com la racemització de l'aminoàcid (veure **Esquema 10, apartat 3.1.4.3**), o la transposició de *O*-acilisourea a *N*-acilurea, procés irreversible que consumeix aminoàcid i no condueix a l'enllaç peptídic desitjat (**Esquema 7**).

Esquema 7. Formació de *N*-acilurea.

Per tal de minimitzar la formació de *N*-acilurea i la racemització s'utilitzen els anomenats additius d'acoblament, essent els exemples més rellevants 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)⁸² i 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt)⁸³ (**Figura 11**).

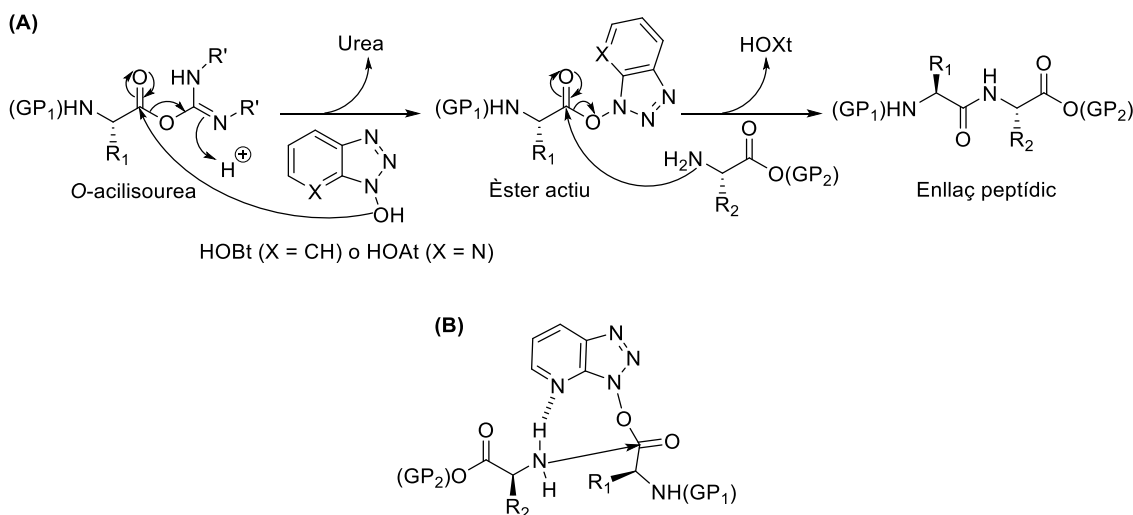


Figura 11. Additius més comuns utilitzats en els acoblaments amb carbodiimides.

Aquests additius reaccionen amb *O*-acilisourea per donar els corresponents èsters actius d'HOXt (

Esquema 8, A), més estables i menys propensos a la racemització en comparació amb l'*O*-acilisourea, i suficientment reactius per formar l'enllaç peptídic. A continuació, l'èster actiu reacciona amb el grup α -amino de l'altre aminoàcid per donar l'enllaç amida desitjat. En el cas de l'HOAt, la reacció és més eficient a l'afavorir-se l'apropament de reactius per un efecte anquimèric (

Esquema 8, B).⁸⁴



Esquema 8. (A) Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic amb carbodiimides en presència d'additius; **(B)** Apropament de reactius per l'efecte anquimèric en el cas de l'HOAt.

3.1.4.2. SALS DE FOSFONI I D'URONI

Existeixen altres agents d'acoblament alternatius a les carbodiimides que s'utilitzen habitualment en SPPS, com són les sals de fosfoni i d'uroni (amidini). Aquests agents d'acoblament són derivats d'HOBt o HOAt, i són més reactius que les carbodiimides (**Figura 12**).⁸⁴ La primera sal de fosfoni d'HOBt descrita va ser l'hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfoni (BOP),⁸⁵ però el seu ús es va limitar a causa de la toxicitat d'un dels subproductes que es forma en la reacció d'acoblament (hexametilfosforamida). Això va portar a desenvolupar el derivat hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfoni (PyBOP)⁸⁶ que produeix el subproducte benigne òxid de tris(pirrolidin-1-il)fosfina, tanmateix, aquest reactiu és relativament car i no es troben exemples industrials. Les sals de fosfoni basades en HOAt, com l'hexafluorofosfat de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfoni (AOP) i l'hexafluorofosfat de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfoni (PyAOP),^{87,88} van demostrar ser més reactives que les basades en HOBt. Una sèrie alternativa de reactius d'acoblament molt utilitzats en SPPS

són les sals d'uroni, les quals contenen un grup carbocatiònic en comptes del grup fosfoni. Exemples basats en HOBt són l'hexafluorofosfat d'O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluroni (HBTU) i el tetrafluoroborat d'O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluroni (TBTU),^{89,90} i els corresponents hexafluorofosfat d'O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluroni (HATU) i tetrafluoroborat d'O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluroni (TATU)⁹¹ com a derivats d'HOAt.

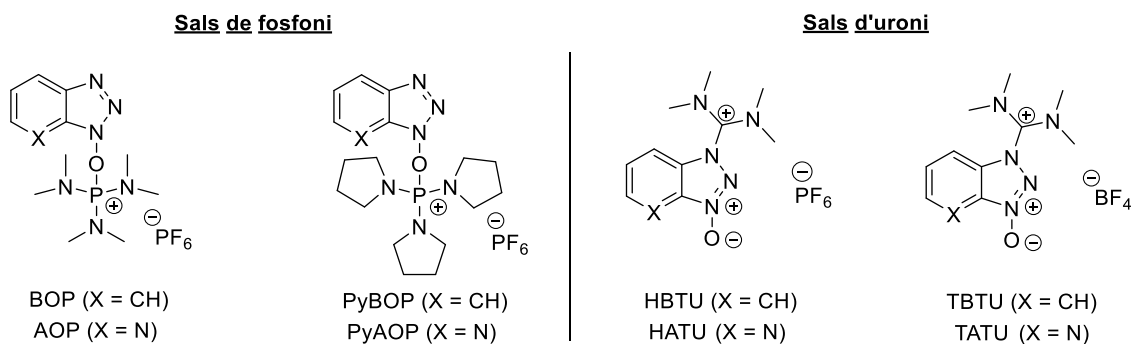
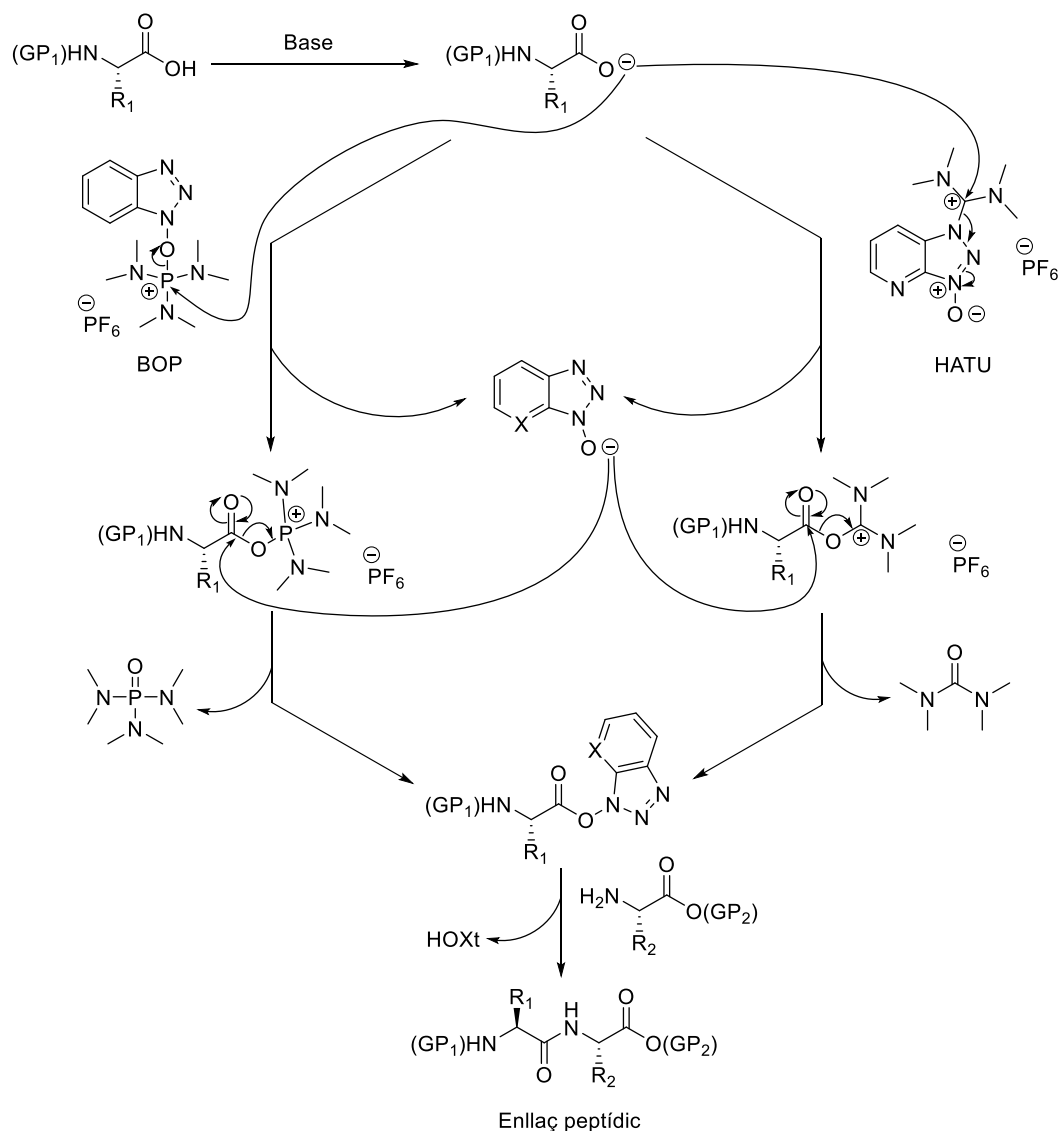


Figura 12. Reactius d'acoblament basats en HOBt i HOAt.

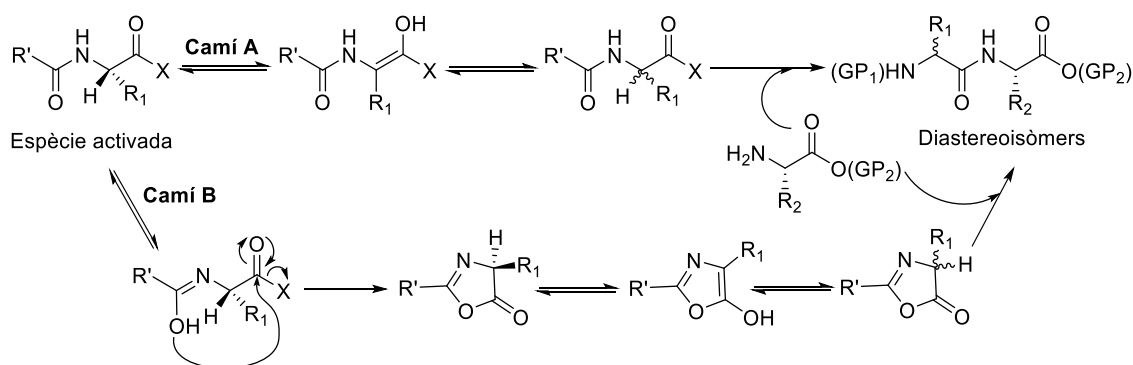
Aquestes sals reaccionen amb el carboxilat dels aminoàcids, per la qual cosa és necessari l'ús d'una base, normalment una amina terciària no nucleòfila (**Esquema 9**). Les sals de fosfoni i d'uroni són molt reactives inclús a temperatures baixes, formant èsters actius d'HOXt que reaccionen amb el grup α -amino per donar l'enllaç peptídic desitjat. Els subproductes obtinguts en aquest cas són hexametilfosforamida en el cas de les sals de fosfoni, i *N,N,N',N'*-tetrametilurea en el de les sals d'uroni.



Esquema 9. Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic utilitzant sals de fosfoni i d'uronis.

3.1.4.3. REACCIONS SECUNDÀRIES

L'inconvenient que presenta la metodologia de l'activació de l'àcid carboxílic amb agents d'acoblament és la potencial racemització de l'aminoàcid que es vol acoblar, especialment si l'agent d'acoblament requereix l'ús d'una base. Aquest procés té lloc a partir de la forma activada de l'aminoàcid, i es pot donar a través de dos mecanismes diferents: l'enolització de l'espècie activada (**Esquema 10, Camí A**) o la formació d'una 5(4H)-oxazolona (**Esquema 10, Camí B**).^{77,92}



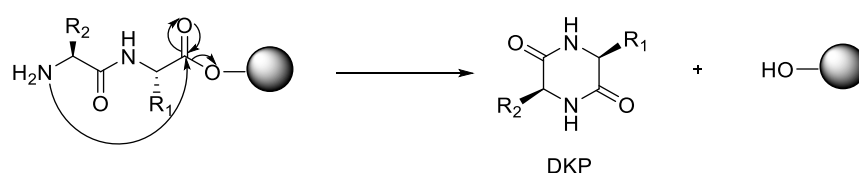
Esquema 10. Mecanismes de racemització mitjançant l'enolització directa (**Camí A**) i la formació d'una 5(4H)-oxazolona (**Camí B**).

Per tal de minimitzar la racemització de l'aminoàcid, un factor crucial és el tipus de protecció de la funció α -amino de l'aminoàcid que es vol acoblar. Els grups carbamat ($R' = O$ -alquil o O -aril), com el grup Fmoc o el grup Boc, disminueixen la formació d'oxazolones en comparació als grups amida ($R' =$ alquil o aril), com és el cas de l'activació d'un fragment peptídic protegit per a la condensació amb un altre fragment peptídic (veure *apartat* 3.2).^{93,94} Altres factors claus per la minimització de la racemització són l'ús de dissolvents no polars, temperatures baixes de reacció i la utilització de bases estèricament impedides (com la N,N -diisopropiletilamina (DIPEA)).⁹⁵

Alguns aminoàcids, com la cisteïna (present en el pèptid d'interès **FT**), tenen una tendència relativament alta a racemitzar-se mitjançant diversos mecanismes.⁹⁶ En el cas de la cisteïna, la susceptibilitat a la racemització durant l'activació de l'aminoàcid s'atribueix al mecanisme d'enolització directe, procés que està afavorit per l'estabilització de l'anió resultant per l'efecte inductiu que exerceix l'àtom de sofre de la cadena lateral.⁹⁷ Així doncs, l'absència o la reducció de la quantitat de base pot reduir significativament la racemització d'aquest aminoàcid.^{96,98}

La racemització de la cisteïna a través de l'enolització de l'aminoàcid també pot tenir lloc quan està unit directament al suport polimèric com a primer aminoàcid mitjançant un enllaç èster. L'efecte inductiu d'aquest grup funcional promou l'abstracció de l'àtom d'hidrogen en α i la conseqüent racemització de l'aminoàcid; per contra, la racemització és pràcticament inexistent quan la cisteïna ocupa una posició interna a la cadena peptídica (enllaç amida).⁹⁹

A banda de la racemització, una de les reaccions secundàries més comuns que es pot produir durant l'etapa d'acoblament és la formació d'una dicetopiperazina (DKP). Aquesta reacció té lloc a l'eliminar el grup protector temporal del segon aminoàcid acoblat a la resina, i consisteix en una aminòlisi intramolecular on el grup amino lliure ataca l'enllaç èster que uneix el dipèptid amb el suport polimèric, alliberant la DKP corresponent amb la conseqüent pèrdua de cadenes peptídiques (**Esquema 11**).

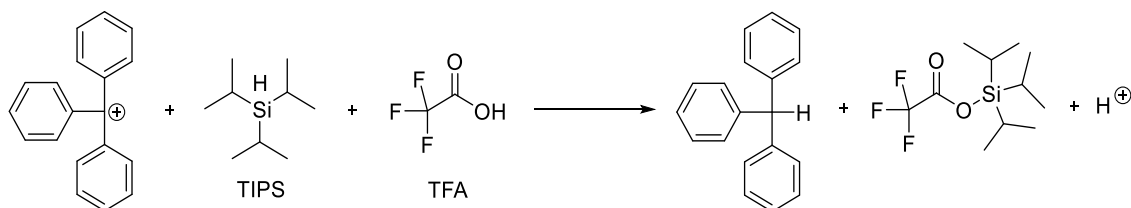


Esquema 11. Formació d'una DKP.

3.1.5. ESCISSIÓ DEL PÈPTID DE LA RESINA I DESPROTECCIÓ GLOBAL

Tal i com s'ha mencionat anteriorment (*apartat 3.1.3*), l'estratègia Boc/Bzl utilitza HF per l'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals i per l'escissió del pèptid de la resina.¹⁰⁰ Donat que aquest àcid és molt tòxic i corrosiu, s'ha de manipular en sistemes especials de tefló o Kel-F tancats ja que és incompatible amb l'ús de material de vidre.¹⁰¹ L'estratègia Boc/Bzl resulta molt adequada per tal de dur a terme una síntesi a escala de laboratori, però l'escalat d'aquesta metodologia a nivell industrial eleva considerablement el cost econòmic i els riscos. No obstant, l'estratègia Fmoc/'Bu permet l'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals i l'alliberament del pèptid de la resina amb TFA, molt més fàcil de manipular que l'HF.

Durant l'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals es generen carbocations altament reactius que poden reincorporar-se a la cadena peptídica donant lloc a subproductes que dificulten la purificació del cru. Per tal de prevenir o minimitzar aquestes reaccions secundàries, s'utilitzen capturadors de carbocations durant la desprotecció final de la cadena peptídica. Un dels capturadors de carbocations habitualment utilitzats és l'1,2-etanditiol (EDT), que també evita la formació de ponts disulfur en pèptids que contenen cisteïna degut al seu caràcter reductor. El triisopropilsilà (TIPS) és un altre capturador de carbocations molt efectiu, especialment quan es tracta de carbocations Trt relativament estables. Aquest capturador actua com a reductor mitjançant una transferència d'hidrur al carbocatió (**Esquema 12**).

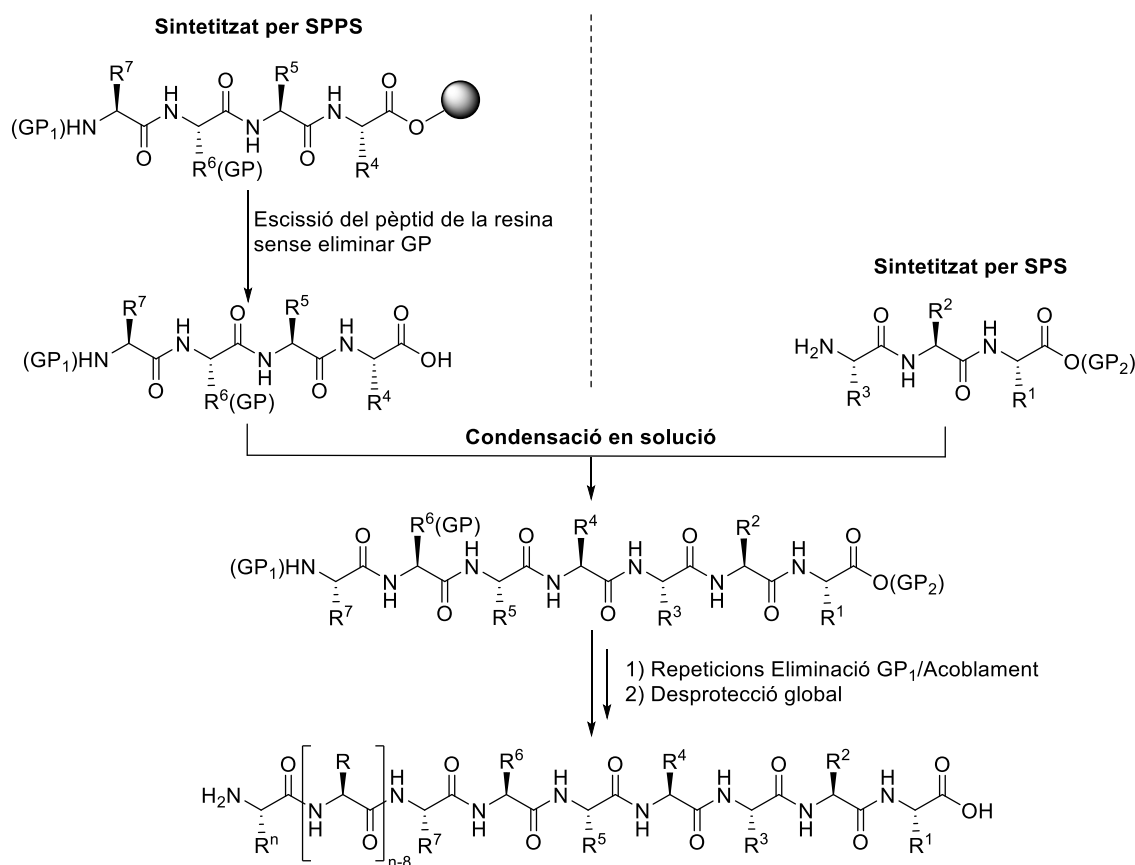


Esquema 12. Capturació del carbocatió Trt per TIPS en medi àcid.¹⁰²

3.2. ESTRATÈGIA CONVERGENT

L'estratègia lineal per a la síntesi de pèptids llargs en fase sòlida pot comportar problemes a l'hora d'incorporar els aminoàcids a partir d'un determinat moment, a causa de l'establiment d'interaccions intercadena facilitades per la proximitat de les cadenes peptídiques, o pel plegament de les mateixes degut a interaccions intracadena que dificulten l'accessibilitat dels reactius. Aquests efectes estèrics provoquen acoblaments incomplets donant lloc als anomenats pèptids de delació, impureses que poden ser molt difícils de separar del pèptid desitjat al final de la síntesi. Per resoldre aquests problemes, la síntesi convergent va emergir com estratègia alternativa. L'

Esquema 13 mostra aquesta estratègia exemplificada amb l'obtenció d'un pèptid per acoblament de dos fragments peptídics.



Esquema 13. Estratègia general de la síntesi convergent de pèptids en fase sòlida.

Aquesta estratègia es basa en combinar les metodologies de SPS i SPPS, de tal manera que es sintetitzen fragments peptídics protegits més curts en fase sòlida i, a continuació, els fragments es condensen seqüencialment en solució per completar la cadena peptídica.

Per preparar fragments peptídics protegits per SPPS s'han de seleccionar unes condicions que permetin dur a terme l'escissió del pèptid de la resina deixant inalterats els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals.¹⁰³ Aquesta ortogonalitat s'aconsegueix amb l'ús de resines amb funcionalitzacions que permeten escindir el pèptid de la resina amb unes condicions àcides molt suaus, com la resina 2-CTC o l'espaiador de Sheppard (*apartat 3.1.2.2*).

El fragment peptídic de l'extrem carboxílic es sintetitza habitualment en solució, per tal d'obtenir el fragment amb aquest grup protegit. Cal senyalar que aquest grup protector (GP₂) i el grup protector de l'extrem α -amino de la resta de fragments (GP₁) han de ser ortogonals per tal de completar amb èxit la seqüència peptídica desitjada.

La condensació dels fragments peptídics se sol dur a terme en solució amb bons rendiments sense la necessitat d'utilitzar grans excessos de reactius.^{104,105} A l'estratègia convergent, la selecció de fragments peptídics és crucial i s'han de tenir en compte les següents consideracions:

- La solubilitat dels fragments peptídics ha de ser l'adequada per dur a terme les reaccions de condensació.
- És preferible que el residu de l'extrem α -carboxílic sigui poc propens a l'epimerització (*apartat 3.1.4.3*), com els residus de Gly o Pro. Si no és possible utilitzar un d'aquests

aminoàcids, l'epimerització es pot reduir amb l'elecció curosa de reactius d'acoblament i condicions experimentals.⁶⁰

- L'aïllament i purificació dels fragments peptídics protegits inicials i els que s'obtenen durant la condensació dels fragments, es realitzen mitjançant precipitació en comptes de l'ús de tècniques cromatogràfiques degut a la baixa solubilitat dels productes.
- En general, es prefereixen fragments peptídics de no més de 5 aminoàcids, però la longitud de la cadena pot ser superior si l'accessibilitat sintètica en fase sòlida del pèptid protegit no planteja problemes.

3.3. APLICACIÓ DE LA SPPS A LA SÍNTESI DE FT

3.3.1. PRODUCCIÓ DE PÈPTIDS A ESCALA INDUSTRIAL

Amb l'interès creixent dels pèptids en la indústria farmacèutica, l'obtenció d'aquests productes a escala del quilogram està esdevenint habitual. Per tal de portar la síntesi d'un pèptid a escala de producció cal desenvolupar un procés eficient, ràpid, econòmic i segur, a més de complir amb els requeriments de les autoritats reguladores.¹⁰⁶

La SPS és la primera opció a l'hora de produir pèptids curts a gran escala pel principal avantatge de l'ús de matèries primeres menys costoses que en SPPS. Actualment, són molts els pèptids comercials que es fabriquen mitjançant aquesta metodologia.⁵⁸ No obstant, es necessita un temps llarg i un gran esforç per desenvolupar els procediments de SPS. És per això que aquesta metodologia habitualment no es considera en les fases inicials del desenvolupament d'un pèptid terapèutic, degut a la necessitat de disposar del producte en el mínim temps possible per avaluar el seu potencial.

El no aïllament dels intermedis i els cicles repetitius converteixen la metodologia SPPS en un procés més fàcil, ràpid i menys laboriós que la SPS. Tanmateix, la manca d'intermedis aïllables no permet un control de puresa tan exhaustiu com en SPS, en contra del que demanden les autoritats reguladores per a un pèptid sintètic que es vol comercialitzar. A més a més, la dificultat per monitoritzar el procés sintètic a escala industrial és molt problemàtica al trobar-se el pèptid unit a un suport polimèric. Tot i això, la SPPS s'està aplicant per a la producció de fàrmacs peptídics comercials, essent crucial en els primers passos de la investigació clínica i toxicològica, quan l'obtenció del producte ha de ser ràpida per poder confirmar la viabilitat i continuar endavant amb el desenvolupament del producte.¹⁰⁷ En canvi, un cop el producte avança més allà de la Fase 2 del desenvolupament clínic, és a dir, quan es defineix la dosi en humans, s'ha d'implementar una estratègia d'escalat.¹⁰⁸

En l'escalat de la SPPS s'han de tenir en compte diferents consideracions per qüestions econòmiques i mediambientals. El requeriment de temps de reacció llargs, un excés molt elevat de reactius i molts cicles de rentats, obliga a optimitzar l'eficiència del procés per reduir l'excés de reactius i dissolvents que s'utilitzen sovint a escala de laboratori. En aquest sentit, la utilització de reactius d'acoblament que evitin la racemització dels aminoàcids, i la tria de materials de partida econòmics, eficients i que generin un mínim de subproductes són alguns des aspectes que cal considerar.

Per a la producció de pèptids llargs a escala comercial, l'estratègia més prometedora és l'estratègia convergent.^{108,109} En comparació amb la SPS, aquesta estratègia permet disminuir les etapes de purificació i aïllament al preparar fragments curts per SPPS. Per altra banda, l'estratègia convergent permet dur a terme l'escalat de la SPPS de manera més econòmica sintetitzant fragments peptídics curts, i els rendiments i pureses solen ser majors a causa de que l'estratègia permet tenir un millor control de la puresa cromatogràfica dels intermedis.

3.3.2. ESTRATÈGIA SINTÈTICA ESTUDIADA PER LA SÍNTESI DEL FT

Es va triar una estratègia convergent per a la síntesi de **FT**, que combinava la química en fase sòlida per a preparar els fragments peptídics, i la química en solució per a preparar el fragment més curt (un dipèptid) i per portar a terme l'acoblament dels fragments peptídics. Aquests fragments es van preparar utilitzant l'estratègia Fmoc/^tBu (**Figura 9**, apartat 3.1.3), ja que requeria unes condicions més suaus per l'eliminació del grup protector de l'extrem α-amino (piperidina) i els grups protectors de les cadenes laterals (TFA), en comparació a les requerides per l'estratègia Boc/Bzl (TFA i HF respectivament).

Tots els aminoàcids protegits utilitzats com a material de partida per a la síntesi del **FT** van ser comercials (**Figura 13**). L'aminoàcid Boc-Ile-OH va ser l'únic aminoàcid amb la funció α-amino protegida amb un grup protector Boc, degut a que és l'aminoàcid de l'extrem amino de la cadena peptídica del **FT**. Per tant, aquest grup protector s'eliminava en la última etapa de síntesi amb la resta dels grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals (veure **Esquema 15**).

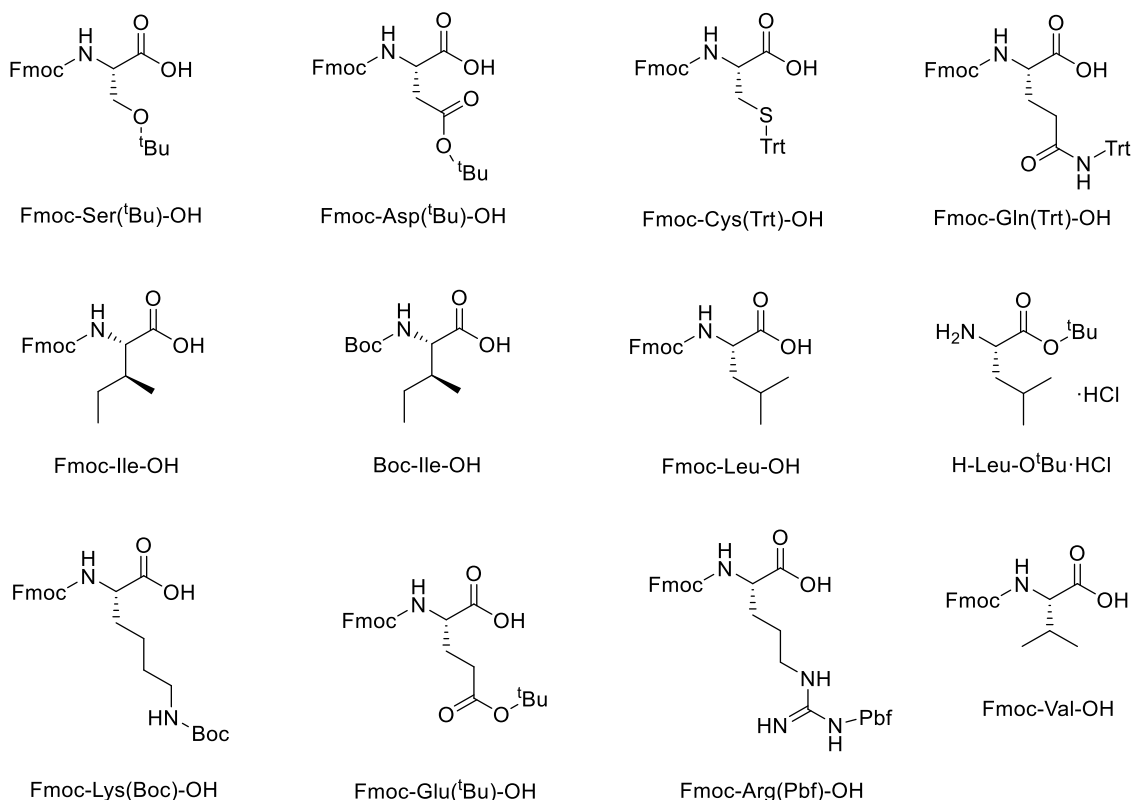
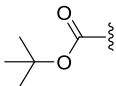
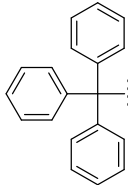
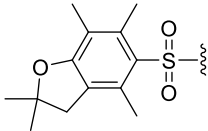


Figura 13. Aminoàcids comercials utilitzats com a material de partida en la síntesi del **FT**.

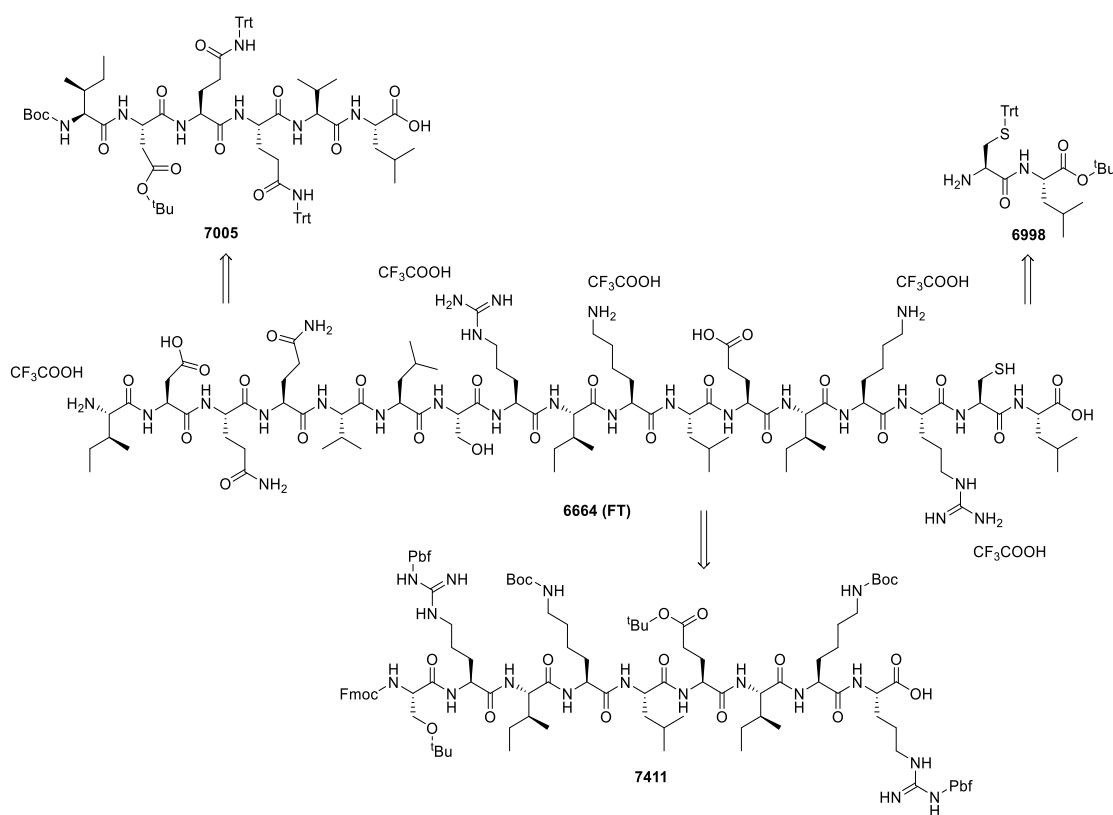
Tal com es mostra a la **Figura 13** i es recull a la **Taula 2**, els grups protectors de les cadenes laterals van ser el grup Boc per Lys, el grup ^tBu per Glu, Ser i Asp, el grup Trt per Gln i Cys, i el grup 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurà-5-sulfonyl (Pbf) per Arg.

Taula 2. Grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals utilitzats en la síntesi de FT.

Grup protector	Boc	^t Bu	Trt	Pbf
				
Residu protegit	Lys	Glu Ser Asp	Gln Cys	Arg

Tal i com s'ha mencionat en els antecedents, l'aproximació convergent per a la preparació de **FT** que es va proposar es va considerar potencialment adequada per l'empresa en termes de producció i cost. Aquesta estratègia consisteix en dividir el **FT (6664ⁱⁱⁱ)** en 3 fragments peptídics: el dipèptid **6998**, l'hexapèptid **7005** i el nonapèptid **7411**, tots ells protegits convenientment (

Esquema 14).



ⁱⁱⁱ Els codis numèrics que apareixen a partir d'ara són els proposats per l'empresa per anomenar els pèptids.

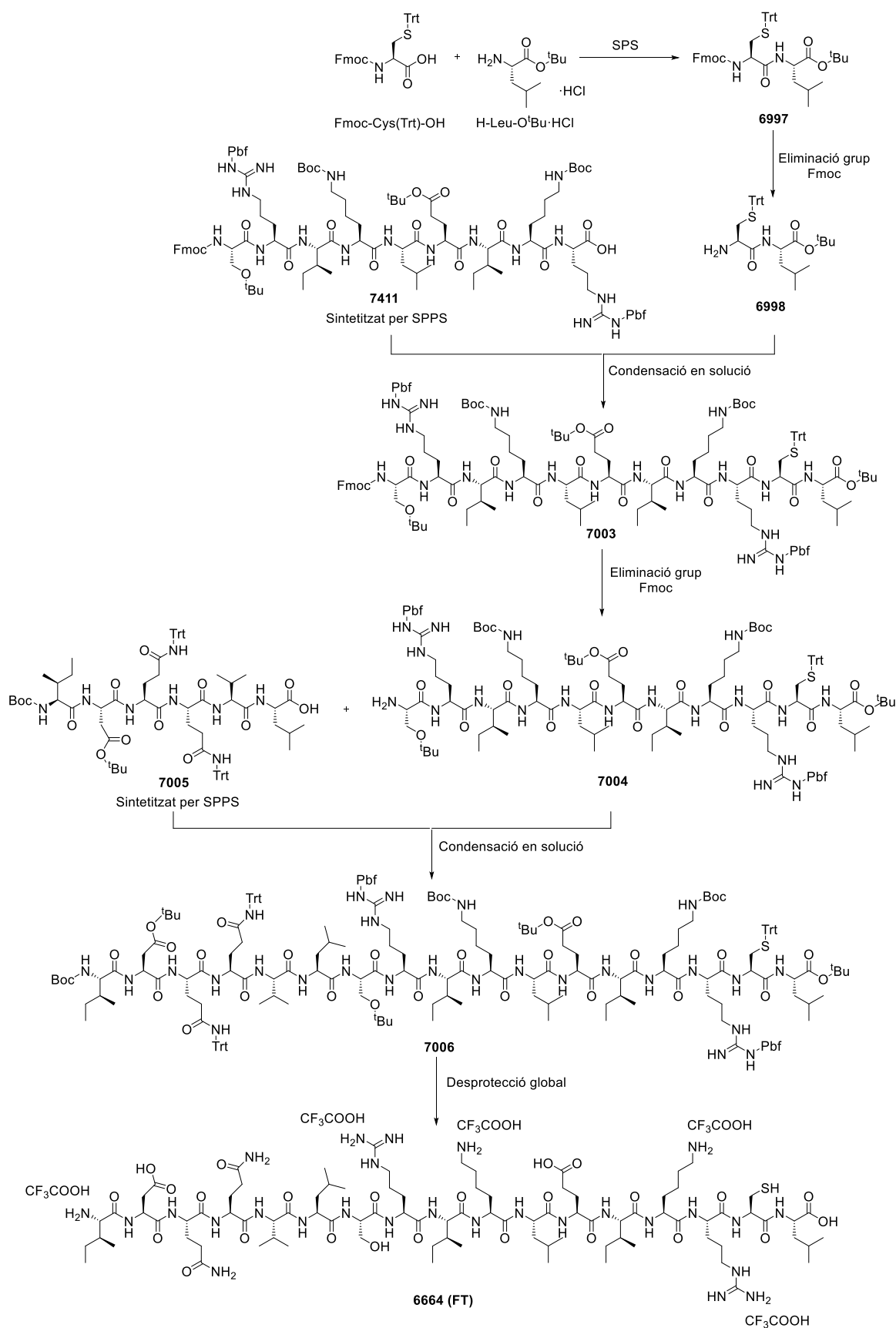
Esquema 14. Estratègia convergent proposada per a la síntesi de **FT**.

D'acord amb l'

Esquema 14, la ruta sintètica que es mostra a l'**Esquema 15** va ser la proposada per a la síntesi de **FT**. Tal com ja s'ha dit abans, el dipèptid **6998** es sintetitza en solució, i els fragments peptídics **7005** (6 aminoàcids) i **7411** (9 aminoàcids) es sintetitzen en fase sòlida. La condensació en solució d'aquests pèptids protegits dona lloc al pèptid totalment protegit (**7006**) que, en l'última etapa del procés, es desprotegeix per obtenir **FT (6664)**.

Pel disseny d'aquesta estratègia es van tenir en compte les següents consideracions:

- Donat que el fragment de l'extrem carboxílic del **FT** és el primer de la seqüència sintètica, el grup α -carboxílic del primer residu d'aminoàcid d'aquest fragment havia d'estar protegit per a evitar reaccions secundàries durant les condensacions en solució. Per aquesta raó, el primer fragment havia de preparar-se en solució. Es va decidir que fos un dipèptid ja que es requeria un únic acoblament d'aminoàcids i, per tant, es minimitzava el nombre d'etapes sintètiques en aquestes condicions.
- Els fragments sintetitzats per SPPS no devien contenir aminoàcids potencialment racemitzables com la cisteïna o la histidina a l'extrem carboxílic de la cadena (*apartat 3.1.4.3*). Aquesta va ser una altra raó per preparar un dipèptid com a fragment de l'extrem carboxílic de la cadena de **FT**, ja que contenia el residu de Cys a l'extrem amino.
- En aquesta estratègia es va considerar un fragment de 9 aminoàcids. En un principi, la primera aproximació convergent que es va plantejar contemplava 4 fragments (2, 4, 5 i 6 aminoàcids). No obstant, amb la intenció de reduir el nombre d'intermedis de síntesi per requeriments industrials, es va assajar amb èxit la síntesi lineal del fragment de 9 aminoàcids corresponent als fragments de 4 i 5 de la primera aproximació convergent.



Esquema 15. Síntesi convergent de FT.

Els resultats obtinguts a la present Tesi Doctoral s'han distribuït a la memòria en dos capítols:

Un capítol titulat “Síntesi de **7005** i **7411** en fase sòlida” on es descriu l’optimització de les síntesis dels fragments peptídics **7005** i **7411** en fase sòlida per tal de portar el procés a escala de planta pilot, i l’escalat dels mateixos utilitzant les noves condicions de síntesi. En aquest capítol també s’explica el desenvolupament de nous reactors per a la síntesi en fase sòlida, i de mètodes analítics per a la monitorització de les reaccions en fase sòlida per assegurar la qualitat del producte final.

I d’un altre capítol titulat “Síntesi de **FT** per acoblament de fragments en solució” on es descriuen les diferents condicions de reacció assajades tenint en compte el context industrial per l’obtenció en solució dels fragments peptídics **6997**, **7003** i **7006**, i les desproteccions corresponents per donar **6998**, **7004** i **FT (6664)** respectivament.

CAPÍTOL 2:

SÍNTESI DE 7005 I 7411 EN FASE SÒLIDA

4. CAPÍTOL 2: SÍNTESI DE 7005 I 7411 EN FASE SÒLIDA

4.1. PRECEDENTS⁵⁹

En les investigacions realitzades anteriorment a la present Tesi Doctoral^{59,110} es van dur a terme diversos assajos per a la síntesi en fase sòlida dels pèptids protegits **7005** i **7411**. Els resultats d'aquest treball preliminar van definir unes condicions experimentals inicials per sintetitzar els fragments peptídics del **FT** a escala multigram en la present Tesi. Aquestes condicions de partida es descriuen en els apartats següents.

4.1.1. REACTOR PER A LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

El reactor per a dur a terme la SPPS ha de disposar d'un sistema de filtració per poder separar la resina (producte de la reacció) de la dissolució (reactius i subproductes solubles) d'una manera pràctica, ja que la filtració es repeteix nombroses vegades al llarg de la síntesi. L'empresa no disposava de reactors adequats per dur a terme la síntesi en fase sòlida pel fet que Esteve Química es dedica majoritàriament a la fabricació d'APIs de molècules petites, que es sintetitzen mitjançant la química en solució. Per aquesta raó, es va dissenyar de forma conjunta (universitat-empresa) un reactor adient per a dur a terme la SPPS a una escala inicial adequada (reactor 1, **Figura 14**).

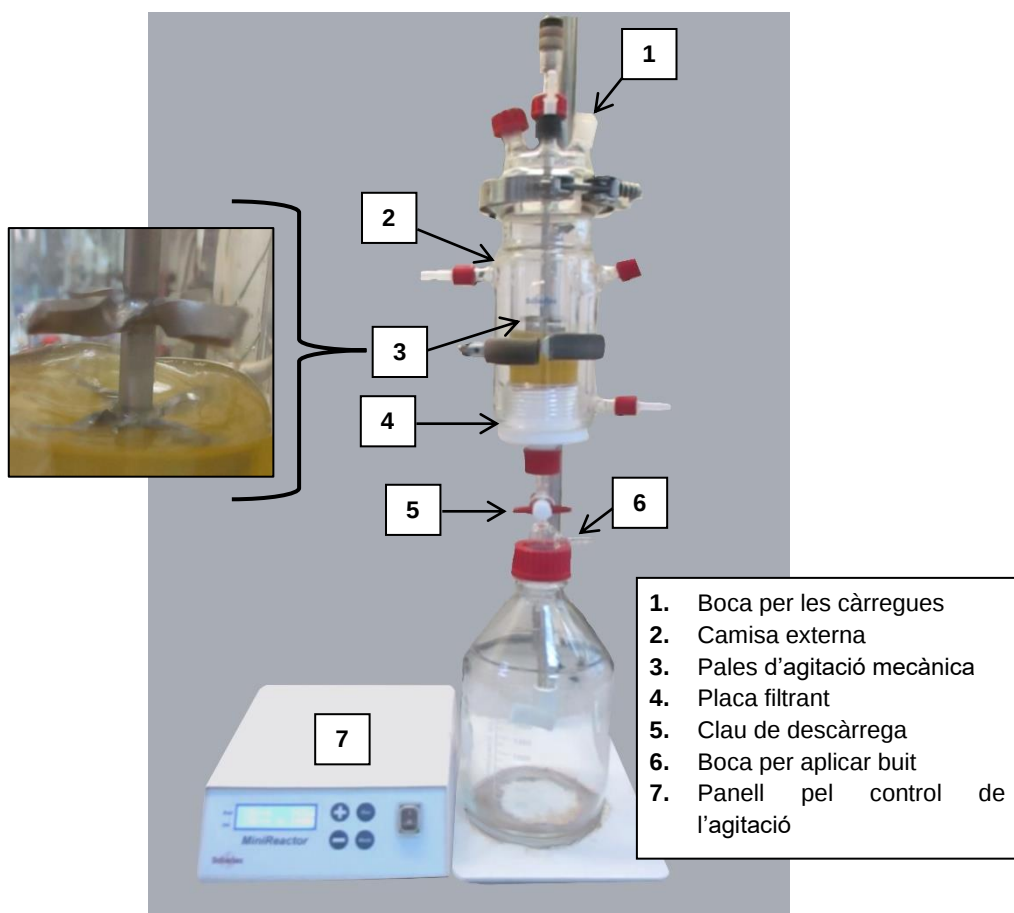


Figura 14. Reactor utilitzat per la SPPS (reactor 1).

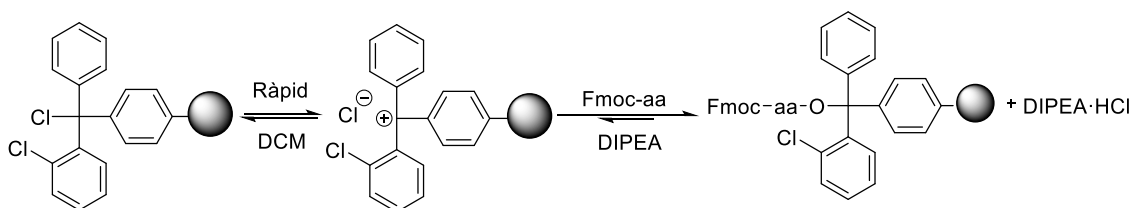
El reactor 1 és de vidre amb un volum de 150 mL i disposa de tres boques per dur a terme les càrregues (1), una camisa externa pel control de la temperatura (2), una clau de descàrrega (5) per a l'eliminació dels dissolvents i reactius solubles mitjançant la succió de buit (6), un disc filtrador de vidre porós que s'enrosca al cos del reactor (4), i un agitador mecànic acoblat a una barra Hastelloy (aliatge de níquel, molibdè, cobalt i crom) cilíndrica. Aquesta barra té quatre nivells de quatre pales per nivell, inclinades en el seu extrem (3). La velocitat d'agitació es controla amb un panell digital (7).

Per tal de definir l'escala màxima de resina en que es pot dur a terme la SPPS en el reactor 1, es va tenir en compte el volum més gran de dissolvent que s'utilitza al llarg de la síntesi. Segons els protocols utilitzats en aquesta Tesi Doctoral, aquest volum correspon a l'utilitzat en la reacció d'escissió del pèptid de la resina (15 mL de dissolució d'1 % de TFA en DCM per gram de resina). Tenint en compte que el reactor 1 té una capacitat de 150 mL i l'inflament de la resina amb DCM, l'escala màxima a la que es pot treballar en aquest reactor és de 10 g de resina.

4.1.2. INCORPORACIÓ DEL PRIMER AMINOÀCID A LA RESINA

La resina comercial 2-CTC ($f = 1,40$ mmols/g, **Figura 8 A**, apartat 3.1.2.2) va ser el suport polimèric utilitzat per a dur a terme la síntesi en fase sòlida dels fragments peptídics protegits **7411** i **7005**. Aquesta resina va ser escollida ja que es desitjava obtenir fragments peptídics convencionals, és a dir, amb l'extrem carboxílic, i pels principals avantatges que presenta:^{72,111}

1. Permet l'escissió del pèptid de la resina en condicions àcides suaus (1 % de TFA en DCM) sense la pèrdua dels grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals.
2. Minimitza la racemització durant la incorporació del primer aminoàcid ja que l'esterificació no necessita l'activació prèvia de l'aminoàcid. En síntesi de pèptids utilitzant resines amb funcionalització del tipus alcoxibenzílic, l'acoblament del primer aminoàcid a la resina necessita l'activació del grup carboxílic, procés que es porta a terme mitjançant la catàlisi d'una base.¹¹² En canvi, en l'acoblament a la resina 2-CTC es forma l'enllaç èster entre el grup 2-clorotritil de la resina i el grup carboxílic de l'aminoàcid protegit a través d'una reacció de substitució nucleòfila unimolecular (SN_1), assistida per una base no nucleòfila com la DIPEA (**Esquema 16**).



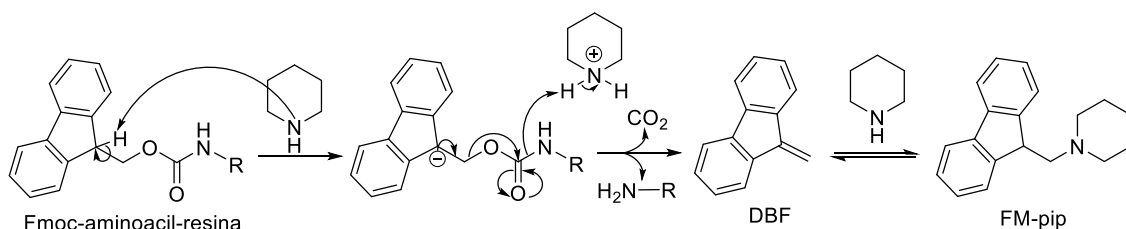
Esquema 16. Reacció d'incorporació del primer aminoàcid a la resina 2-CTC.

3. Evita la formació de DKP's (**Esquema 11**, apartat 3.1.4.3) degut a l'impediment estèric que provoca el grup clorotritil.^{113,114}
4. L'enllaç èster és en general molt estable a les condicions experimentals utilitzades per l'acoblament dels aminoàcids.

Un cop el primer aminoàcid és acoblat a la resina, els centres reactius que romanen a la resina s'eliminen amb MeOH per tal d'assegurar la correcta incorporació dels següents aminoàcids en l'ordre adequat de la seqüència (capat de la resina).

4.1.3. QUANTIFICACIÓ DEL GRUP FMOC PER UV-VIS

La quantitat d'aminoàcid incorporat a la resina en el primer pas de la síntesi s'ha de conèixer per tal de determinar la quantitat de reactius que s'han d'afegir en els següents passos de la síntesi, així com el rendiment final de la mateixa. Per tal de determinar aquesta dada, el grup Fmoc de l'aminoàcid incorporat a la resina es quantifica per espectroscòpia ultraviolat-visible (UV-Vis), a partir de la mesura de l'absorbància del subproducte *N*-(9-fluorenilmetil)piperidina (FM-pip), en el seu màxim d'absorció a 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, **Esquema 17**). Aquest subproducte s'obté al desportegir el grup α -amino per tractament de la resina amb piperidina (20 % en DMF),¹¹⁵ procés que inicialment transcorre a través d'un mecanisme de β -eliminació per donar com a subproductes CO_2 i dibenzofulvè (DBF). La posterior reacció del DBF amb piperidina proporciona l'adducte abans esmentat mitjançant una reacció tipus Michael. La nova funcionalització de la resina es calcula segons s'indica a l'*apartat 8.4.1.3* (part experimental).



Esquema 17. Mecanisme d'eliminació del grup Fmoc amb piperidina.

4.1.4. ELIMINACIÓ DEL GRUP FMOC

En l'estudi de Màster dut a terme anteriorment a la present Tesi Doctoral,¹¹⁰ la reacció d'eliminació del grup protector Fmoc va ser estudiada per tal d'optimitzar el número de tractaments de piperidina (**Taula 3**). La peptidil-resina va ser tractada amb una dissolució de 20 % de piperidina en DMF (10 mL dissolució/g de resina) durant 5 min. Passat aquest temps, l'excés de piperidina, els subproductes de reacció solubles i el dissolvent es van filtrar, es van recollir en un baló i es van analitzar per cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses (HPLC-MS). En el cromatograma d'HPLC del filtrat es va observar un pic amb una relació massa/càrrega (m/z) corresponent a l'adducte FM-pip amb una alçada de 977 mAU.

Taula 3. Alçada del pic de FM-pip en els cromatogrames d'HPLC dels diferents tractaments de la resina amb piperidina.

Tractament 20 % piperidina en DMF	Temps de reacció	Alçada del pic de FM-pip (265 nm)
1r	5 min	977 mAU
2n	2 min	14 mAU
3r	5 min	0 mAU

Es van dur a terme dos tractaments més de piperidina en DMF (2 min i 5 min), i els filtrats es van analitzar per HPLC. En el tercer rentat ja no es va observar el pic cromatogràfic de FM-pip i, per tant, indicava que la reacció ja havia finalitzat. Amb aquests resultats, es va concloure que 2 tractaments de 5 min i 2 min eren suficients per l'eliminació total del grup Fmoc, essent aquestes les condicions que es van utilitzar per desprotegir els grups α -amino en fase sòlida en la present Tesi Doctoral.

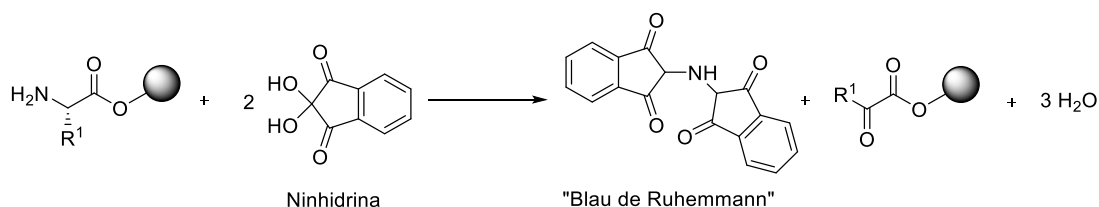
4.1.5. ACOBLAMENT D'AMINOÀCIDS

Les reaccions d'acoblament es van dur a terme utilitzant l'agent d'acoblament DIC en presència de l'additiu HOBT per minimitzar reaccions secundàries com l'epimerització o la formació de *N*-acilurea (apartat 3.1.4.1 i 3.1.4.3); a més, són reactius molt assequibles econòmicament. El mecanisme de formació de l'enllaç peptídic en aquestes condicions es mostra en l'

Esquema 8 A de l'apartat 3.1.4.1. El subproducte de la reacció *N,N*-diisopropilurea i HOBT es poden separar de la resina fàcilment per filtració al ser solubles en els dissolvents orgànics utilitzats en la síntesi.

4.1.5.1. TEST DE NINHIDRINA

La monitorització dels acoblaments en les síntesis preliminars de **7005** i **7411** es va dur a terme amb el test de ninhidrina. Aquest test, anomenat també test de Kaiser,¹¹⁶ és un test colorimètric qualitatiu que posa de manifest la presència o l'absència d'amines primàries lliures, i que es pot realitzar en fase sòlida per tal d'obtenir informació sobre la reacció d'acoblament. El test es basa en la reacció de les amines primàries lliures que es troben a la peptidil-resina amb el reactiu de ninhidrina per a la obtenció d'un producte blau intens anomenat "blau de Ruhemann" (**Esquema 18**):



Esquema 18. Reacció de les amines lliures de la resina peptídica amb el reactiu de ninhidrina.

La persistència del color groc inicial indica un test negatiu, és a dir, es considera que l'acoblament és complet. Tanmateix, el color blau indica un test positiu, és a dir, la presència de grups α -amino lliures i, conseqüentment, un acoblament incomplet de l'aminoàcid. Un test positiu a les 3-4 h de reacció va portar al reacoblament de l'aminoàcid en condicions similars, procés que es va repetir tantes vegades com va ser necessari fins obtenir un test negatiu.

4.1.6. RENTATS DE LA RESINA

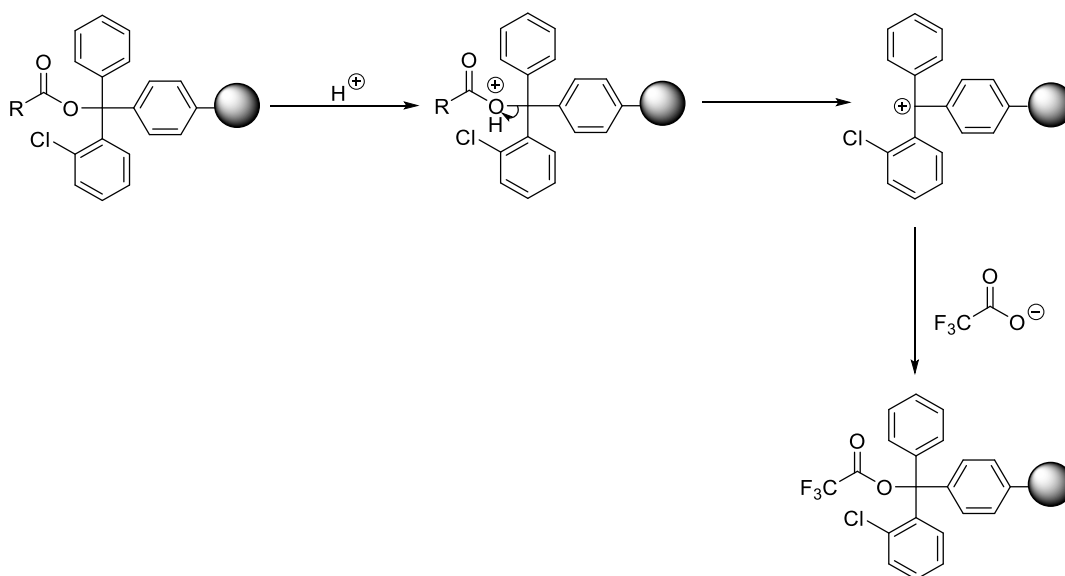
En els estudis precedents, es va desenvolupar un protocol per rentar la resina i assegurar l'eliminació dels subproductes solubles i l'excés de reactius després de la reacció d'incorporació del primer aminoàcid, de les reaccions d'eliminació de grup Fmoc i de les reaccions d'acoblament de Fmoc-aminoàcids. Aquest protocol consisteix en 2 rentats de 5 min de cada dissolvent (DMF, DCM, IPA, DCM i DMF), utilitzant 10 mL de dissolvent per gram de resina per a cada rentat.

Es va escollir aquesta seqüència de rentats per tal d'afavorir la dissolució de reactius i subproductes tenint en compte el diferent inflament de la resina en aquests dissolvents, la qual cosa facilita l'alliberament de reactius i subproductes de la trama polimèrica.

L'elongació de la cadena peptídica es porta a terme mitjançant cicles repetitius d'eliminació del grup Fmoc i acoblament del següent Fmoc-aminoàcid. A causa de l'alta sensibilitat de la resina 2-CTC als ambients àcids, les cadenes peptídiques es poden perdre prematurament. Depenent de la longitud de la cadena, la síntesi en fase sòlida d'un fragment peptídic pot durar dies, pel que es recomana deixar la peptidil-resina durant la nit sense el grup protector Fmoc de l'extrem α -amino de la cadena peptídica. Aquests grups amino lliures poden neutralitzar les possibles traces d'àcid ambientals i minimitzar la pèrdua prematura de les cadenes peptídiques. També es recomana que abans de deixar la síntesi per un llarg període de temps, l'últim rentat de la resina sigui de DMF per evitar les traces àcides que pot contenir el DCM.

4.1.7. ESCISSIÓ DEL PÈPTID DE LA RESINA

L'escissió del pèptid de la resina 2-CTC (**Esquema 19**) es va dur a terme amb 3 tractaments d'una dissolució d'1 % de TFA en DCM (15 mL dissolució/g de resina).



Esquema 19. Mecanisme de l'escissió del pèptid de la resina amb tractament àcid.

En els estudis precedents, la precipitació dels fragments peptídics **7005** i **7411** es va dur a terme al laboratori de la UB, descarregant el cru de reacció sobre un gran volum d'Et₂O. A l'empresa, al no treballar amb aquest èter per qüestions de seguretat, es va utilitzar *terc*-butil metil èter (TBME), un èter compatible amb els requeriments de la indústria.

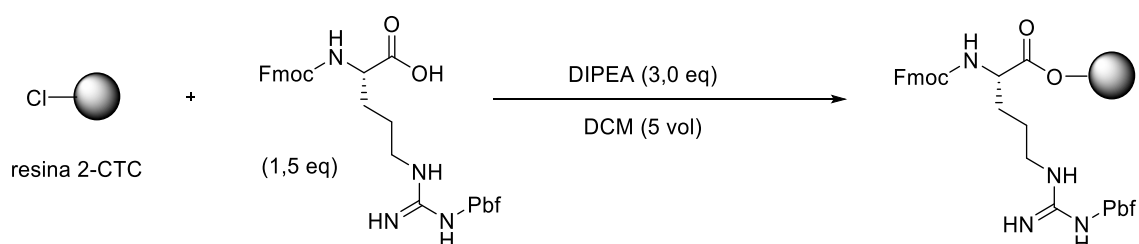
4.2. SÍNTESI PRELIMINAR DELS PÈPTIDS 7411 I 7005

L'escala màxima de treball que es va dur a terme en els estudis precedents utilitzant les condicions descrites en l'apartat anterior va ser de 7,0 mmols (5,0 g de resina 2-CTC). En l'assaig de **7411** es va obtenir un rendiment de 58 % i una puresa cromatogràfica del producte desitjat de 93 %. Per a la síntesi de **7005**, el rendiment de reacció va ser de 79 % i el producte desitjat es va obtenir amb una puresa cromatogràfica del 91 %. En aquesta Tesi Doctoral es va realitzar una

síntesi preliminar dels pèptids protegits **7005** i **7411** a una escala de treball superior a la utilitzada en els estudis precedents però emprant les mateixes condicions per a obtenir els pèptids a escala de laboratori (*apartat 4.1*).

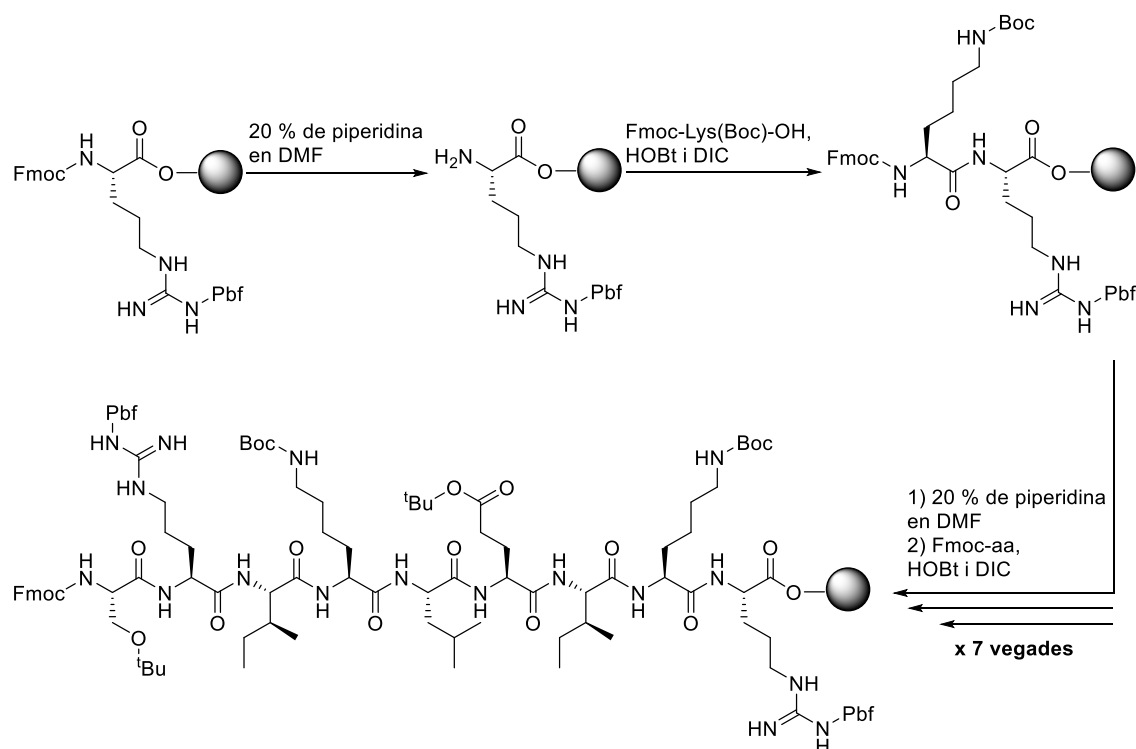
4.2.1. SÍNTESI DE 7411_UB-19146

El primer assaig de síntesi en fase sòlida de **7411** (**7411_UB-19146**) es va dur a terme en el reactor 1 (**Figura 14**, *apartat 4.1.1*) a l'escala de 9,5 mmols (6,8 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid protegit Fmoc-Arg(Pbf)-OH es va incorporar a la resina utilitzant DIPEA en DCM (**Esquema 20**). Després d'1,5 h de reacció, es va afegir MeOH (0,8 mL/g de resina) per tal de bloquejar els centres reactius de la resina que havien quedat sense reaccionar i la mescla es va agitar durant 1 h més (capat de la resina). La funcionalització trobada per quantificació de grups Fmoc va ser de 0,42 mmols/g (*apartat 4.1.3*) i els rentats de la resina es van dur a terme seguint la seqüència de dissolvents descrita a l'*apartat 4.1.6*.



Esquema 20. Incorporació de l'aminoàcid Fmoc-Arg(Pbf)-OH a la resina 2-CTC.

L'elongació de la cadena peptídica de **7411** es resumeix en l'**Esquema 21**. Les reaccions d'eliminació del grup Fmoc es van dur a terme amb 2 tractaments de 20 % de piperidina en DMF (10 mL dissolució/g de resina) de 5 min i 2 min (*apartat 4.1.4*). Les reaccions d'acoblament es van realitzar utilitzant els aminoàcids protegits amb el sistema estàndard d'acoblament DIC/HOBt (*apartat 4.1.5*), i es van monitoritzar amb el test de ninhidrina (*apartat 4.1.5.1*).



Esquema 21. Elongació de la cadena peptídica del fragment 7411.

En la **Taula 4** es mostren els equivalents (eq) de reactius que es van utilitzar per a cada acoblament. L'aminoàcid es va reacoblar quan es va creure convenient en les etapes on el test de ninhidrina indicava que la reacció no havia finalitzat.

Taula 4. Condicions d'acoblament dels aminoàcids en la síntesi de 7411_UB-19146.

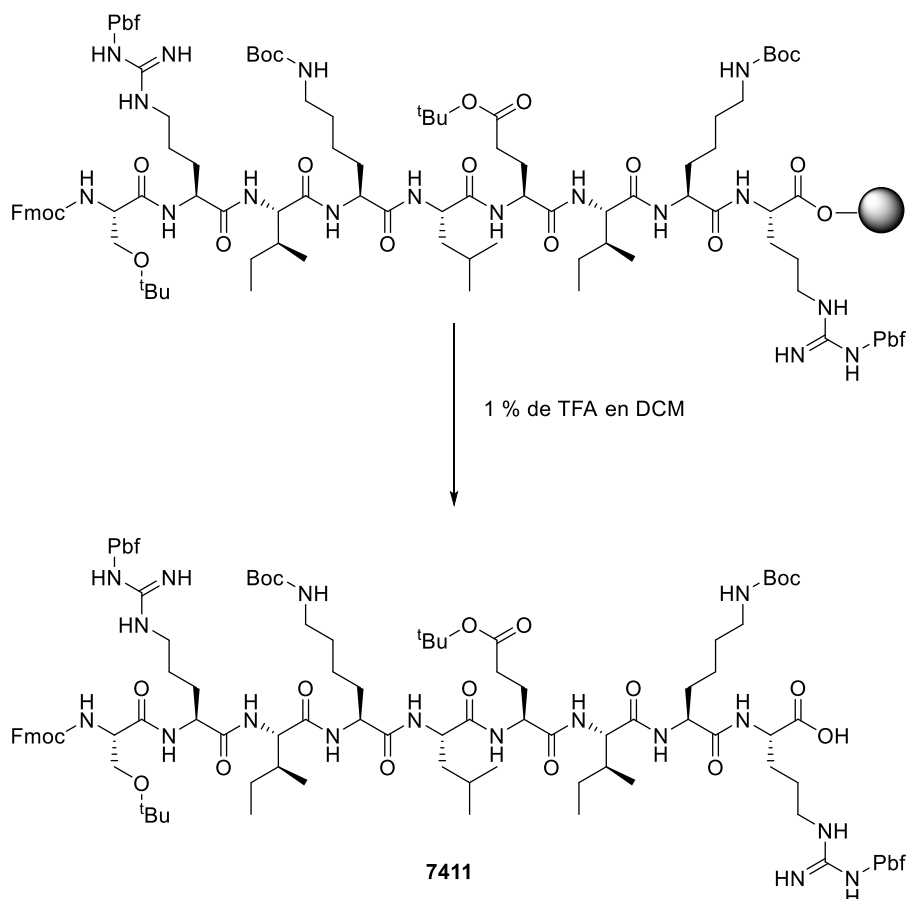
Etapa	Aminoàcid	Eq de Fmoc-aa, HOBt i DIC	Temps de reacció (h)
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3,0	3,0
3	Fmoc-Ile-OH	3,0	6,0
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	3,0	4,0
5	Fmoc-Leu-OH	3,0 + 3,0*	4,0 + 1,0*
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3,0 + 3,0*	4,0 + 1,0*
7	Fmoc-Ile-OH	4,0 + 3,0*	2,5 + 3,0*
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	4,0 + 3,0* + 3,0*	4,0 + 2,0* + 4,0*
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	5,0	3,0

(*) Reacoblament

Els reacoblaments es van dur a terme en les etapes 5, 6, 7 i 8. En l'etapa 7, la quantitat de reactius es va augmentar a 4 eq donat que en l'etapa anterior es va haver de reacoblar amb 3 eq; es va provar d'escurçar el temps de reacció però va ser necessari un nou reacoblament. En

l'etapa 8 va ser necessari fins a 2 reacoblaments per a obtenir una ninhidrina negativa. La darrera etapa es va dur a terme amb 5 eq inicials de reactius i la reacció d'acoblament va finalitzar sense la necessitat de reacoblar.

L'escissió del pèptid de la resina (**Esquema 22**) es va dur a terme amb 3 tractaments de la peptidil-resina amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM (15 mL dissolució/g de resina) de 5 min cadascun (*apartat 4.1.7*).



Esquema 22. Escissió del pèptid de la resina per obtenir **7411**.

Cada dissolució del tractament àcid es va descarregar del reactor 1 a un baló amb TBME (4 vol respecte el DCM) que contenia 1 eq de trietilamina (TEA), respecte el TFA, per neutralitzar el filtrat. Es va observar la precipitació d'un sòlid molt fi, la filtració del qual va ser tant lenta (més de 4 h) que es va haver d'aturar el procés i concentrar el cru a pressió reduïda fins a un volum més petit. La suspensió resultant es va poder filtrar, obtenint-se el sòlid **7411_UB-19146-01** (rendiment del 40 %, calculat respecte la funcionalització trobada després de l'acoblament del primer aminoàcid) amb una puresa cromatogràfica de **7411** (23,8 min) del 94,0 % (**Figura 15**).

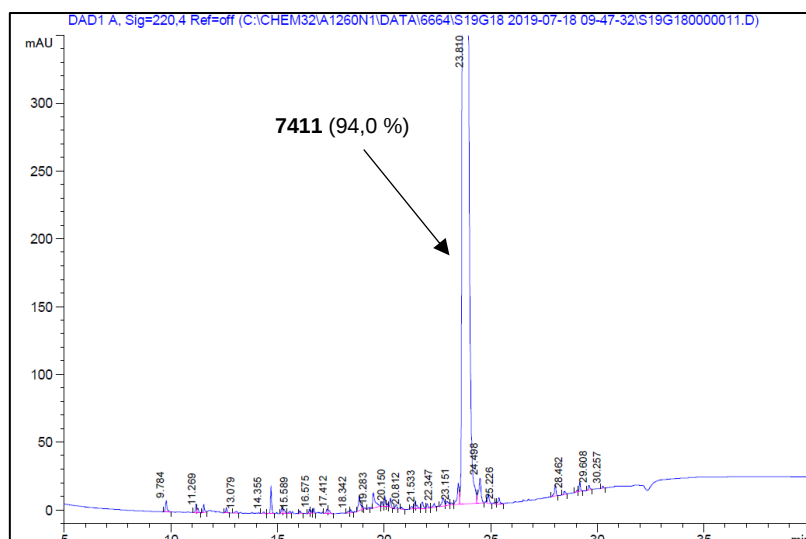
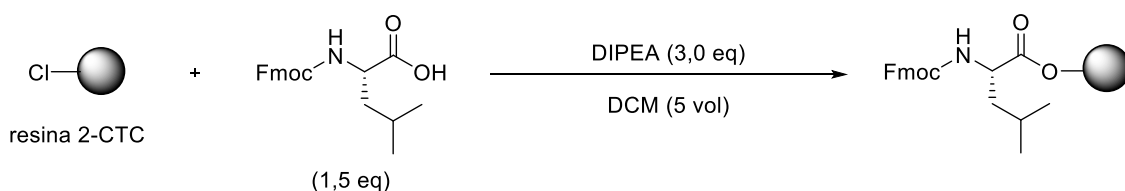


Figura 15. Cromatograma de 7411_UB-19146-01. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

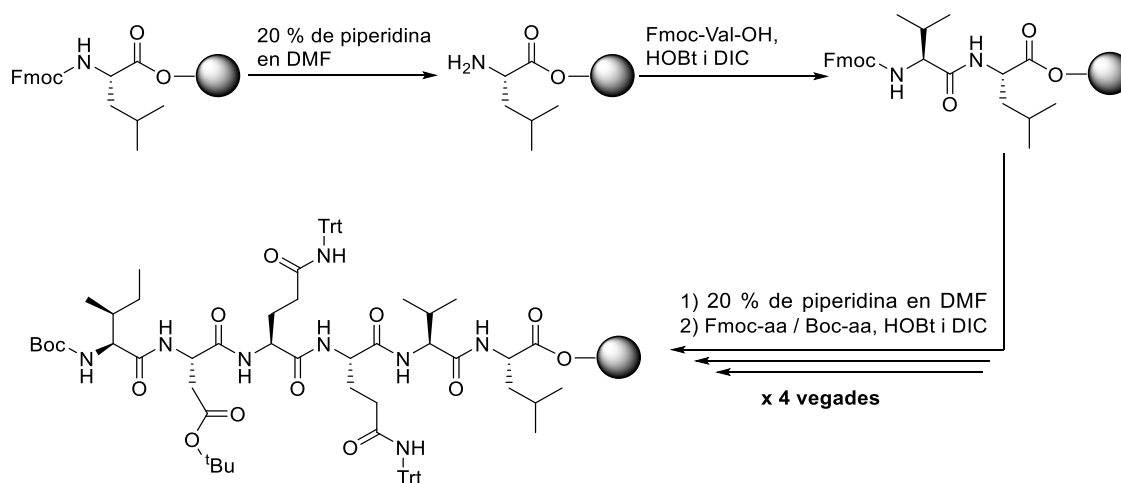
4.2.2. SÍNTESI DE 7005_UB-19166

La primera síntesi en fase sòlida de **7005** (**7005_UB-19166**) es va dur a terme en el reactor 1 (**Figura 14**, *apartat 4.1.1*) a escala de 14,4 mmols (10,3 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Leu-OH es va incorporar a la resina utilitzant DIPEA en DCM (**Esquema 23**). Després d'1,5 h de reacció, es va dur a terme el capat de la resina amb MeOH (0,8 mL/g de resina) i la mescla es va agitar durant 1 h més. La funcionalització de l'aminoàcid-resina va ser de 0,71 mmols/g (*apartat 4.1.3*) i els rentats de la resina es van dur a terme seguint la seqüència de dissolvents descrita a l'*apartat 4.1.6*.



Esquema 23. Incorporació de l'aminoàcid Fmoc-Leu-OH a la resina 2-CTC.

L'elongació de la cadena peptídica de **7005** es resumeix en l'**Esquema 24**. L'eliminació del grup Fmoc es va dur a terme amb 2 tractaments de 20 % de piperidina en DMF (10 mL dissolució/g de resina) de 5 min i 2 min (*apartat 4.1.4*). L'acoblament dels aminoàcids es va realitzar amb el sistema estàndard DIC/HOBt (*apartat 4.1.5*) i es va monitoritzar amb el test de ninhidrina (*apartat 4.1.5.1*).



Esquema 24. Elongació de la cadena peptídica del fragment 7005.

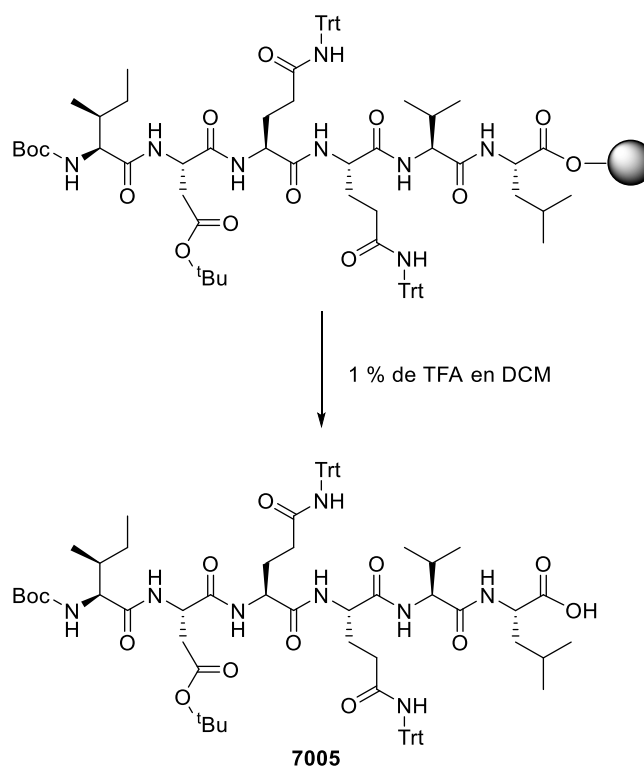
En la **Taula 5** es mostren els eq de reactius que es van utilitzar per a cada acoblament. En el cas de l'últim aminoàcid (Etapa 6, Boc-Ile-OH), el test de ninhidrina va indicar que la reacció encara no havia finalitzat a les 5 h, i es va reacoblar utilitzant 3 eq de reactius.

Taula 5. Condicions d'acoblament d'aminoàcids en la síntesi de 7005_UB-19166.

Etapa	Aminoàcid	Eq de Fmoc-aa, HOBT i DIC	Temps de reacció (h)
2	Fmoc-Val-OH	3,0	3,0
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	3,0	3,0
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	3,0	3,0
5	Fmoc-Asp(tBu)-OH	3,0	3,0
6	Boc-Ile-OH	3,0 + 3,0*	5,0 + 1,0*

(*) Reacoblament

L'escissió del peptíde de la resina (**Esquema 25**) es va dur a terme amb 3 tractaments de la peptidil-resina amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM (15 mL dissolució/g de resina) de 5 min cadascun (*apartat 4.1.7*).



Esquema 25. Escissió del pèptid de la resina per obtenir **7005**.

Les 3 dissolucions àcides del cru en DCM es van descarregar del reactor 1 a un baló que contenia TEA (1 eq respecte el TFA) en DCM (2 vol). Donat que en la primera síntesi de **7411** va precipitar un sòlid que va donar molts problemes en la filtració, es van voler assajar unes noves condicions per la precipitació del pèptid descrites a la literatura.¹²² Així, es va canviar el dissolvent del cru de DCM per EtOH (4 vol) i, a continuació, es va addicionar H₂O (2 vol) gota a gota. El sòlid obtingut no dipositava al parar l'agitació, la filtració de la suspensió va ser molt lenta i les aigües mares (AM) es van haver de tornar a filtrar per recuperar producte. Finalment, es va obtenir el sòlid **7005_UB-19166-01** (rendiment del 81 %, calculat respecte la funcionalització trobada després de l'acoblament del primer aminoàcid) amb una puresa cromatogràfica de **7005** (22,7 min) de 93,7 % (**Figura 16**).

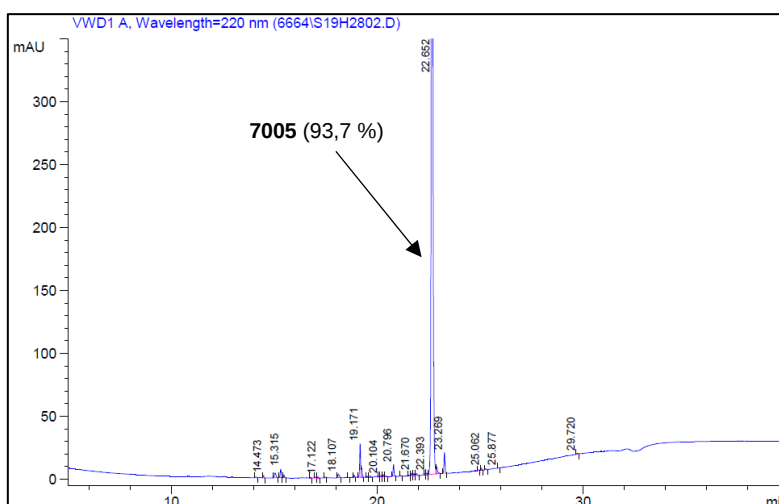


Figura 16. Cromatograma de **7005_UB-19166-01**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

4.3. OPTIMITZACIÓ DELS PROTOCOLS SINTÈTICS DE 7005 I 7411

Els resultats obtinguts per a la síntesi de **7005** i **7411** en termes de rendiment i puresa cromatogràfica van ser semblants als obtinguts en els estudis precedents⁵⁹ utilitzant les mateixes condicions experimentals. Prenent com a base aquests resultats, i amb la finalitat d'obtenir un procés per a la síntesi de **7005** i **7411** escalable, eficient, econòmic i que permeti assegurar la qualitat del producte final, es va proposar en aquesta Tesi Doctoral avançar en la consecució dels següents objectius:

- Optimitzar els equivalents de reactius per tal d'evitar els reacoblaments d'aminoàcids.
- Dissenyar nous reactors per a la SPPS.
- Desenvolupar mètodes per a la monitorització de les reaccions en fase sòlida.
- Optimitzar el protocol de rentats de la resina.
- Millorar la manera de precipitar els fragments peptídics després del tractament acidolític per tal de disposar d'un procés ràpid que doni un bon rendiment i una puresa cromatogràfica que estigui d'acord amb els requeriments de qualitat.
- Escalar la síntesi dels fragments peptídics.

4.3.1. OPTIMITZACIÓ DELS EQUIVALENTS DE REACTIUS

En les primeres síntesis en fase sòlida dels fragments peptídics **7411** i **7005**, el reacoblament de l'aminoàcid es va dur a terme en les etapes d'acoblament en que el test de ninhidrina indicava que la reacció no havia finalitzat, és a dir, passat un temps mínim de 2,5 h de reacció. En el cas de la síntesi de **7005**, només l'últim aminoàcid de la cadena peptídica (Boc-Ile-OH) es va haver de reacoblar, però en el cas de la síntesi de **7411**, es van haver de reacoblar els aminoàcids Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH i Fmoc-Arg(Pbf)-OH, requerint l'últim dos reacoblaments per a obtenir un test de ninhidrina negatiu.

A escala de laboratori, habitualment s'utilitzen 3 eq de reactius (Fmoc-aa, HOBt i DIC) i, pels acoblaments que triguen més de 2 h en finalitzar, es prefereix reacoblar que allargar el temps de reacció. En canvi, en un context industrial, els reacoblaments d'aminoàcid impliquen una gran despesa de reactius i sobretot de dissolvents per rentar la resina, pel que és preferible fer un únic acoblament emprant temps de reacció més llargs de l'habitual o càrregues inicials amb més equivalents.

Per aquesta raó, en les següents síntesis de **7411** i **7005** es van voler evitar els reacoblaments carregant més equivalents de reactius (4 eq i 5 eq) dels habituals (3 eq) en les etapes d'acoblament en que s'havia vist que trigaven més en finalitzar i el temps de reacció es va allargar fins a obtenir un test de ninhidrina que indicava que la reacció s'havia completat.

4.3.1.1. SÍNTESI DE 7411_UB-21531

Una nova síntesi de **7411** (**7411_UB-21531**) es va dur a terme en el reactor 1 (**Figura 14**, *apartat 4.1.1*) a una escala de 6,9 mmols (4,9 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Arg(Pbf)-OH es va incorporar a la resina amb les condicions ja descrites (*apartat 4.2.1*). La quantificació del grup Fmoc per UV-Vis (*apartat 4.1.3*) va donar un valor de 0,51 mmols/g. Les condicions d'eliminació del grup Fmoc i d'acoblament d'aminoàcids van ser similars a les descrites per **7411_UB-19146** (*apartat 4.2.1*), excepte pel que fa al nombre d'equivalents de reactius. En la **Taula 6** es mostren els equivalents de reactius que es van utilitzar per a cada acoblament i el temps que va trigar la reacció en donar un test de ninhidrina negatiu.

Taula 6. Acoblament d'aminoàcids en la síntesi **7411_UB-21531** utilitzant el reactor 1.

Etap	Aminoàcid	Eq de Fmoc-aa, HOBt i DIC	Temps de reacció (h)
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3,0	1,5
3	Fmoc-Ile-OH	4,0	2,0
4	Fmoc-Glu('Bu)-OH	4,0	2,0
5	Fmoc-Leu-OH	4,0	3,5
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4,0	2,5
7	Fmoc-Ile-OH	4,0	2,5
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	5,0	3,0
9	Fmoc-Ser('Bu)-OH	5,0	3,5

En aquesta síntesi es van emprar 4 eq de reactius a partir de l'acoblament de Fmoc-Ile-OH (etapa 3) i 5 eq de reactius en l'acoblament dels dos últims aminoàcids de la cadena peptídica de **7411** (etapes 8 i 9). L'augment d'equivalents en les etapes d'acoblament va permetre obtenir la cadena peptídica desitjada sense la necessitat de reacoblar cap aminoàcid.

L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM (15 mL dissolució/g de resina) i les dissolucions obtingudes del tractament àcid es van descarregar del reactor 1 directament a una ampolla. El cru acidolític es va analitzar per HPLC, resultant una puresa cromatogràfica del 83,8 %, i es va dividir en diferents fraccions per fer assajos de precipitació (veure apartat 4.3.6.3.1).

4.3.1.2. SÍNTESI DE 7005_UB-19182

Una nova síntesi en fase sòlida de **7005 (7005_UB-19182)** es va dur a terme en el reactor 1 (**Figura 14**, apartat 4.1.1) a una escala de 14,1 mmols (10,1 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Leu-OH es va incorporar a la resina utilitzant les mateixes condicions que les descrites en les primeres síntesis (apartat 4.2.2) i la funcionalització final va ser de 0,86 mmols/g (apartat 4.1.3).

En aquesta síntesi es va seguir el mateix criteri que per a la síntesi de **7411_UB-21531**, és a dir, incrementar el nombre d'equivalents de reactius i allargar els temps de reacció per evitar els reacoblaments. Les condicions d'acoblament d'aminoàcid que es van utilitzar es resumeixen en la **Taula 7**.

Taula 7. Acoblament d'aminoàcids en la síntesi **7005_UB-19182** utilitzant el reactor 1.

Etap	Aminoàcid	Eq de Fmoc-aa, HOBT i DIC	Temps de reacció (h)
2	Fmoc-Val-OH	3,0	3,0
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	3,0	3,0
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	3,0	3,0
5	Fmoc-Asp('Bu)-OH	3,0	3,0
6	Boc-Ile-OH	4,0	6,0

Tenint en compte el resultat obtingut per **7005_UB-19166** (apartat 4.2.2), en aquesta síntesi es van utilitzar 4 eq de reactius per l'acoblament de l'últim aminoàcid (Boc-Ile-OH) i es va allargar el temps de reacció. La ninhidrina va indicar que la reacció havia finalitzat a les 6 h, obtenint-se la cadena peptídica desitjada sense la necessitat de realitzar cap reacoblament d'aminoàcid.

L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme amb condicions similars a les emprades a l'assaig precedent i utilitzant TEA per la neutralització del cru acidolític (apartat 4.2.2), obtenint-se **7005** amb una puresa cromatogràfica del 90,7 %. Aquest cru es va dividir per fer assajos de precipitació (veure apartat 4.3.6.2.1).

Un cop els equivalents de reactius per a la síntesi en fase sòlida dels pèptids d'interès en el reactor 1 s'havia optimitzat, i els reacoblaments s'havien evitat, es va continuar amb altres objectius de la present Tesi Doctoral.

4.3.2. DISSENY DE NOUS REACTORS

Un dels objectius principals d'aquesta Tesi Doctoral va ser dissenyar reactors alternatius al reactor 1 (**Figura 14**, apartat 4.1.1), un reactor que és molt útil per a la síntesi de pèptids en fase sòlida, però d'elevat preu i de temps d'entrega molt llarg. A causa de no poder disposar de més equips com el reactor 1 per poder fer síntesis en paral·lel, i de la seva capacitat màxima de 150 mL que limita l'escala de treball a 10 g de resina, un dels reptes principals va ser dissenyar reactors més assequibles i adequats a l'escala desitjada.

4.3.2.1. SISTEMES DUALS D'AGITACIÓ/FILTRACIÓ

Els reactors que s'utilitzen al departament d'I+D d'Esteve Química estan dissenyats per dur a terme síntesi en solució a escala de laboratori. Un exemple de reactor de 250 mL utilitzat habitualment per síntesi en solució es mostra en la **Figura 17** (reactor 2). Aquest tipus de reactors tenen dues parts independents: la primera consisteix en el cos encamisat (1) amb un tub de descàrrega (2) i una clau de descàrrega (3) i, la segona part consisteix en la tapa amb tres boques en els laterals (4) i una boca central per aplicar la guia per l'agitació mecànica (5).

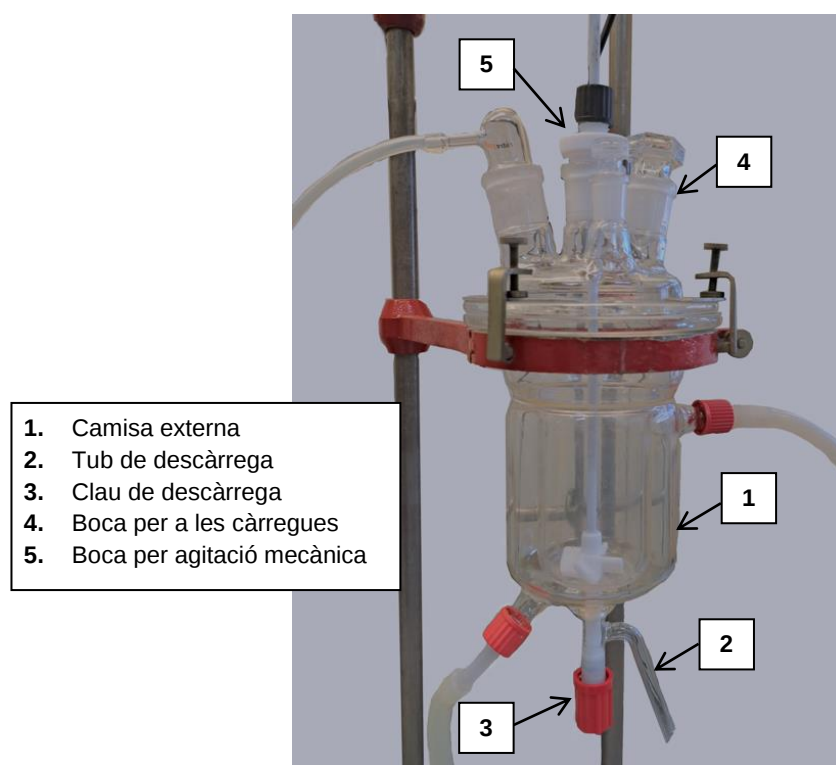


Figura 17. Reactor convencional de 250 mL utilitzat a l'empresa per síntesi en solució (reactor 2).

En aquest reactor no es pot dur a terme SPPS ja que no disposa d'un sistema de filtració per separar la resina del dissolvent. S'hauria doncs de descarregar tot el cru de reacció (resina + dissolvent) pel tub de descàrrega i filtrar-lo en un sistema d'embut de Büchner i matràs de Kitasato per tal de separar la resina del dissolvent. Després, la resina s'hauria de tornar a carregar al reactor i repetir aquest procediment totes les vegades que s'ha de filtrar al llarg de la síntesi. Aquesta tasca és molt laboriosa i no és factible en un context de síntesi a gran escala. Per tant, era necessari tenir un sistema de filtració que permetés eliminar els dissolvents i deixar la resina en el reactor.

Com a solució, es van dissenyar els sistemes duals d'agitació/filtració que es mostren a la **Figura 18**. Aquests sistemes consisteixen en una vareta de Hastelloy buida per dins a la qual es pot acoblar un filtre porós mitjançant un sistema de rosca. Les pales es troben soldades al cos del filtre porós o a la vareta, per tal de donar l'agitació mecànica a aquest sistema. L'agitador A (**Figura 18, A**) consisteix en un únic nivell d'agitació amb tres pales inclinades en el seu extrem. L'agitador B (**Figura 18, B**) consisteix en 3 nivells d'agitació amb dues pales cada un, inclinades en el seu extrem.

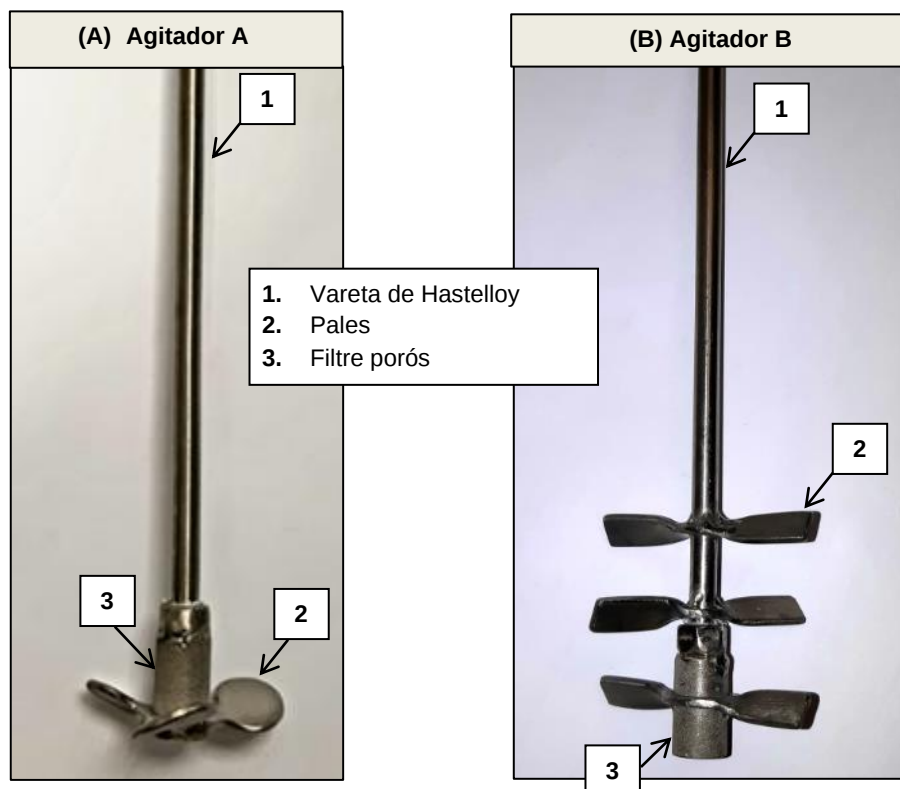


Figura 18. (A) Sistema dual d'agitació/filtració amb un nivell d'agitació de 3 pales (agitador A). (B) Sistema dual d'agitació/filtració amb 3 nivells d'agitació de dues pales cada un (agitador B).

El filtre porós (2 μm de porositat) és un filtre metàl·lic que s'utilitza habitualment per l'entrada de les fases mòbils en els instruments d'HPLC i té una distribució uniforme dels porus i un disseny anti-obstrucció (**Figura 19**).¹¹⁷ Aquest filtre és el punt clau d'aquests sistemes duals d'agitació ja que permet separar la resina dels dissolvents mitjançant el sistema de buit que es descriu a continuació.



Figura 19. Filtre porós utilitzat en els sistemes d'agitació/filtració.

Les pales dissenyades d'agitació/filtració són compatibles amb els reactors convencionals de l'empresa, com per exemple el de la **Figura 20**, on l'agitador A es troba en el reactor 2 amb la resina després de dur a terme una filtració.



Figura 20. Reactor 2 amb l'agitador A i la resina després de la filtració.

El sistema dual d'agitació/filtració dissenyat funciona a través d'un sistema de buit connectat a l'extrem superior de la vareta de Hastelloy, tal i com es mostra en la **Figura 21**. El buit s'aplica a través de la boca (5) del baló col·lector (6) connectat a la vareta per un tub (4), de tal manera que el dissolvent que es troba en el reactor (1) passa al baló col·lector a través del filtre porós i de la vareta de Hastelloy de l'agitador A (2). El baló col·lector es buida per la clau de descàrrega (7). Per poder agitar, l'extrem superior de la vareta de Hastelloy s'acobla l'agitador mecànic (3) a través d'un forat que permet la connexió de la vareta al motor pel control de gir del tub. Per a simplificar, al sistema format pel reactor 2 i l'agitador A s'anomenarà reactor 2A, i reactor 2B quan s'utilitzi el reactor 2 amb l'agitador B.

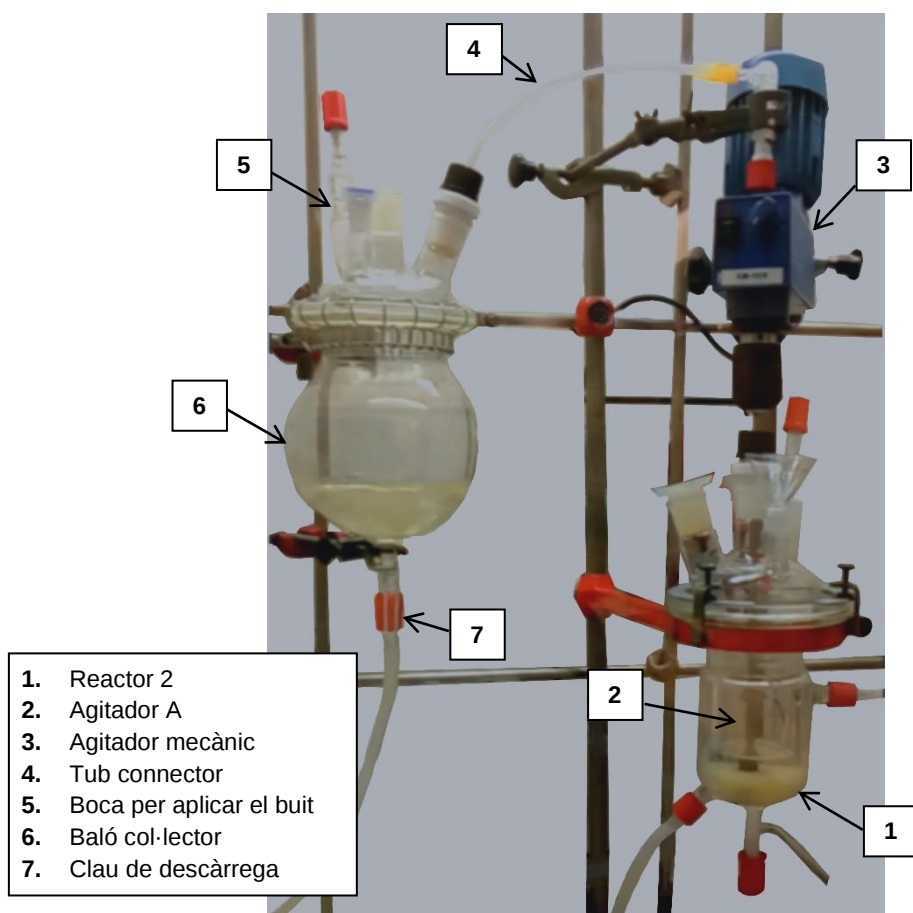


Figura 21. Muntatge del reactor SPPS utilitzant el reactor 2 i l'agitador A (reactor 2A).

L'avantatge principal del sistema dual d'agitació/filtració respecte el reactor 1, és la seva adaptabilitat als reactors convencionals de l'empresa per a dur a terme reaccions en solució, amb el conseqüent estalvi econòmic que suposa no necessitar un reactor alternatiu per SPPS. A més a més, a l'empresa es disposa de reactors amb diferents mides (250 mL, 500 mL, 1 L), el que permet incrementar enormement l'escala de treball.

Els sistemes duals d'agitació/filtració es poden utilitzar durant la construcció de la cadena peptídica tal com s'ha comentat abans sempre que es requereixi filtrar. Tanmateix, l'etapa d'escissió del pèptid de la resina mereix un tractament diferencial. Durant la SPPS, la filtració separa de la peptidil-resina la fase líquida no desitjada, amb els subproductes provinents dels grups protectors i excés de reactius. En l'etapa d'escissió del pèptid de la resina, el producte desitjat passa al dissolvent, essent l'únic moment en que la fase líquida és la d'interès. En aquest cas, per tal d'evitar que el producte es contaminés o precipités durant el procés, la solució peptídica no es va portar al baló col·lector; la solució es va extreure amb cura per la sortida de descàrrega del reactor aprofitant que la resina flota en DCM. Aquest procediment es van dur a terme amb totes les solucions procedents dels tractaments àcids i dels rentats finals de la resina amb DCM. En l'últim rentat, el romanent de DCM i la resina es van descarregar a un vas de precipitats i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda per recuperar el màxim de cru peptídic.

El filtre GFD®Lab Nutsche (veure **Figura 71**, apartat 4.3.7.1), una versió més petita d'un filtre assecador de producció, es va utilitzar com a reactor per dur a terme l'escalat de la síntesi de pèptids en fase sòlida, tal i com es descriu més endavant en l'apartat 4.3.7.

4.3.2.2. SPPS UTILITZANT ELS SISTEMES DUALS D'AGITACIÓ/FILTRACIÓ

Per tal d'assajar els sistemes duals d'agitació/filtració, es van sintetitzar els fragments peptídics **7005** i **7411** utilitzant els reactors 2A i 2B (*apartat 4.3.2.1*). Així doncs, l'agitador A es va utilitzar per sintetitzar **7005** (**7005_UB-21510**) i **7411** (**7411_UB-21550** i **7411_UB-21578**). L'agitador B només es va fer servir per sintetitzar un lot de **7411** (**7411_UB-23401**).

4.3.2.2.1. SÍNTESI DE 7005

La síntesi en fase sòlida de **7005_UB-21510** es va dur a terme utilitzant el reactor 2A a una escala de 13,2 mmols (9,4 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Leu-OH es va incorporar a la resina utilitzant les mateixes condicions que les descrites en la síntesi d'aquest pèptid amb el reactor 1 (*apartats 4.2.2 i 4.3.1.2*). La funcionalització final va ser de 0,69 mmols/g (*apartat 4.1.3*), molt semblant a l'assolida en la síntesi de **7005_UB-19166** (0,71, **Taula 8**) amb el reactor 1. Es va considerar que la funcionalització obtinguda era coherent si es té en compte la reproductibilitat de resultats per l'acoblament del primer aminoàcid que dona la resina 2-CTC.

Taula 8. Comparació de les funcionalitzacions obtingudes per l'acoblament del primer aminoàcid en les síntesis de **7005**.

Lot	Reactor	Grams de resina (g)	Funcionalització (mmols/g)
UB-19166	Reactor 1	10,3	0,71
UB-19182	Reactor 1	10,1	0,86
UB-21510	Reactor 2A	9,4	0,69

La desprotecció del grup α -amino i l'acoblament dels aminoàcids es va fer seguint les condicions descrites per la síntesi del lot **7005_UB-19182** (*apartat 4.3.1.2*). Les reaccions d'acoblament van finalitzar en 1,5-6,0 h sense la necessitat de dur a terme reacoblaments, tal com es va assolir amb el reactor 1. L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme en condicions similars a les ja descrites, obtenint-se un cru acidolític amb una puresa cromatogràfica del 91,0 % i perfil cromatogràfic molt semblants als que va donar el lot **7005_UB-19182** (**Taula 9**). Aquests resultats van posar de manifest que el reactor 2A amb un sistema dual d'agitació/filtració era potencialment útil per a la SPPS.

Taula 9. Comparació de les síntesis de **7005** utilitzant diferents reactors.

Lot	Reactor	Reaccions d'acoblament		% 7005 per HPLC (cru)
		Reacoblaments	Temps (h)	
UB-19182	Reactor 1	No	3,0 – 6,0	90,7
UB-21510	Reactor 2A	No	1,5 – 6,0	91,0

El cru acidolític de **7005_UB-21510** es va utilitzar per dur a terme proves de neutralització i precipitació (*veure apartat 4.3.6.2.3*).

4.3.2.2.2. SÍNTESI DE 7411

Les síntesis en fase sòlida dels lots **7411_UB-21550** i **7411_UB-21578** es van dur a terme utilitzant el reactor 2A a les escales de 7,8 i 7,3 mmols (5,6 i 5,2 g de resina 2-CTC respectivament), i la síntesi de **7411_UB-23401** es va realitzar a escala de 8,4 mmols (6,0 g de resina) utilitzant el reactor 2B.

L'aminoàcid comercial Fmoc-Arg(Pbf)-OH es va incorporar a la resina amb les condicions ja descrites per a la síntesi d'aquest pèptid amb el reactor 1 (*apartat 4.2.1 i apartat 4.3.1.1*). Es van determinar funcionalitzacions (*apartat 4.1.3*) pels acoblaments fets amb els reactors 2A i 2B molt semblants a les obtingudes en les síntesis de **7411** que es van dur a terme en el reactor 1 (**Taula 10**).

Taula 10. Comparació de les funcionalitzacions obtingudes per l'acoblament del primer aminoàcid en les síntesis de **7411**.

Lot	Reactor	Grams de resina (g)	Funcionalització (mmols/g)
UB-19146	Reactor 1	6,8	0,42
UB-21531	Reactor 1	4,9	0,51
UB-21550	Reactor 2A	5,6	0,48
UB-21578	Reactor 2A	5,2	0,49
UB-23401	Reactor 2B	6,0	0,41

Per tant, malgrat els resultats són una mica millors amb el reactor 2A que amb el reactor 2B, sembla que hi ha poca influència en el resultat amb el tipus d'agitació.

L'eliminació del grup Fmoc i l'acoblament dels aminoàcids es va realitzar d'acord amb les condicions descrites per a la síntesi del lot **7411_UB-21531** (*apartat 4.3.1.1*). Tanmateix, no es va poder evitar el reacoblament d'alguns aminoàcids (**Taula 11**).

Taula 11. Comparació de les reaccions d'acoblament en les síntesis de **7411** utilitzant el reactor 1, el reactor 2A i el reactor 2B.

Etapla	Aminoàcid acoblat	UB-21531 (reactor 1)		UB-21550 (reactor 2A)		UB-21578 (reactor 2A)		UB-23401 (reactor 2B)	
		Eq reactius	Temps de reacció (h)	Eq reactius	Temps de reacció (h)	Eq reactius	Temps de reacció (h)	Eq reactius	Temps de reacció (h)
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3,0	1,5	3,0	4,0	3,0	2,5	3,0	4,0
3	Fmoc-Ile-OH	4,0	2,0	4,0	3,0	4,0 + 3,0*	5,0 + 1,5*	3,0 + 1,0* + 3,0* + 4,0*	6,0 + 4,0* + 5,0* + 4,0*
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	4,0	2,0	4,0 + 3,0*	6,0 + 4,0*	4,0	4,0	4,0	6,0
5	Fmoc-Leu-OH	4,0	3,5	4,0	4,0	4,0	2,0	4,0	5,0
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4,0	2,5	4,0 + 3,0*	6,0 + 4,0*	4,0	3,0	4,0	5,0
7	Fmoc-Ile-OH	4,0	2,5	5,0	4,5	4,0	3,0	4,0	6,0
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	5,0	3,0	5,0	2,5	4,0	2,0	4,0	5,0
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	5,0	3,5	5,0	5,0	4,0	3,0	4,0	5,0

(*) Reacoblament

En la síntesi del lot **7411_UB-21550**, el test de ninhidrina seguia indicant que la reacció no havia finalitzat a les 6 h de reacció en les etapes 4 i 6. Per tant, es van reacoblar els aminoàcids i a les 4 h la ninhidrina indicava que la reacció havia finalitzat. A partir de l'acoblament de Fmoc-Ile-OH en l'etapa 7 es van utilitzar 5 eq de reactius sense la necessitat de reacoblar. La resta d'etapes d'acoblament van acabar en 2,5-5,0 h, és a dir, el temps es va allargar en alguns casos respecte a la síntesi amb el reactor 1 (**7411_UB-21531**).

En la síntesi del lot **7411_UB-21578**, la ninhidrina va indicar que la reacció no havia finalitzat a les 5 h de reacció en l'etapa 3, pel que es va dur a terme el reacoblament de l'aminoàcid (1,5 h). Els altres acoblaments van finalitzar en 2,5–4,0 h. En aquest cas, es va poder reduir el nombre d'equivalents en les etapes 8 i 9 respecte la síntesi en el reactor 1 (*apartat 4.3.1.1*).

Finalment, en la síntesi del lot **7411_UB-23401**, en la tercera etapa es van carregar per error 3 eq de reactius, en comptes de 4 eq, i la reacció encara no havia finalitzat a les 6 h. Es va decidir en aquell moment estudiar el reacoblament amb 1, 3 i 4 eq de reactius, realitzant escissions d'alíquotes de la peptidil-resina després de cada reacoblament per tal de seguir per HPLC l'evolució dels productes de partida (*veure apartat 4.3.3.1.3*). Després dels reacoblaments, la ninhidrina seguia indicant que la reacció no havia finalitzat, i es va decidir seguir amb la síntesi duent a terme el seguiment de les reaccions per HPLC (*veure apartat 4.3.3.1*). Aquestes etapes d'acoblament van finalitzar a les 4,0 h de reacció, ja que el producte de partida s'observava amb una àrea menor a un 2,0 % per HPLC.

Resumint pel que fa als acoblaments d'aminoàcids, al comparar els resultats que van donar els lots de **7411** utilitzant el reactor 2A (**UB-21550** i **UB-21578**), amb els resultats emprant el reactor 1 (**UB-21531**), es pot comprovar que els reacoblaments no es van poder evitar en algunes etapes amb el reactor 2A, ja que la utilització dels mateixos equivalents de reactius no va ser suficient per dur a terme els acoblaments abans de 6 h. En les altres etapes, les reaccions van finalitzar a temps molt semblants als de la síntesi en el reactor 1 (**Taula 12**). Per altra banda, es va poder reduir el nombre d'equivalents en les dos darreres etapes de síntesi pels lots **7411_UB-21578** i **7411_UB-23401**, fets als reactors 2A i 2B respectivament.

L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme en condicions similars a les ja descrites, obtenint-se crus amb les pureses cromatogràfiques que es mostren en la **Taula 12**. A efectes comparatius, els perfils cromatogràfics dels crus finals dels lots de **7411** obtinguts amb els reactors 1 i 2 es mostren en la **Figura 22**.

Taula 12. Comparació de les síntesis de **7411** utilitzant diferents reactors.

Lot	Reactor	Reaccions d'acoblament		% 7411 per HPLC (cru)
		Temps (h)	Reacoblaments	
UB-21531	Reactor 1	1,5 – 3,5	No	83,8
UB-21550	Reactor 2A	2,5 – 5,0	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH Fmoc-Lys(Boc)-OH	83,4
UB-21578	Reactor 2A	2,5 – 4,0	Fmoc-Ile-OH	92,4
UB-23401	Reactor 2B	4,0 – 6,0	Fmoc-Ile-OH x3	78,5

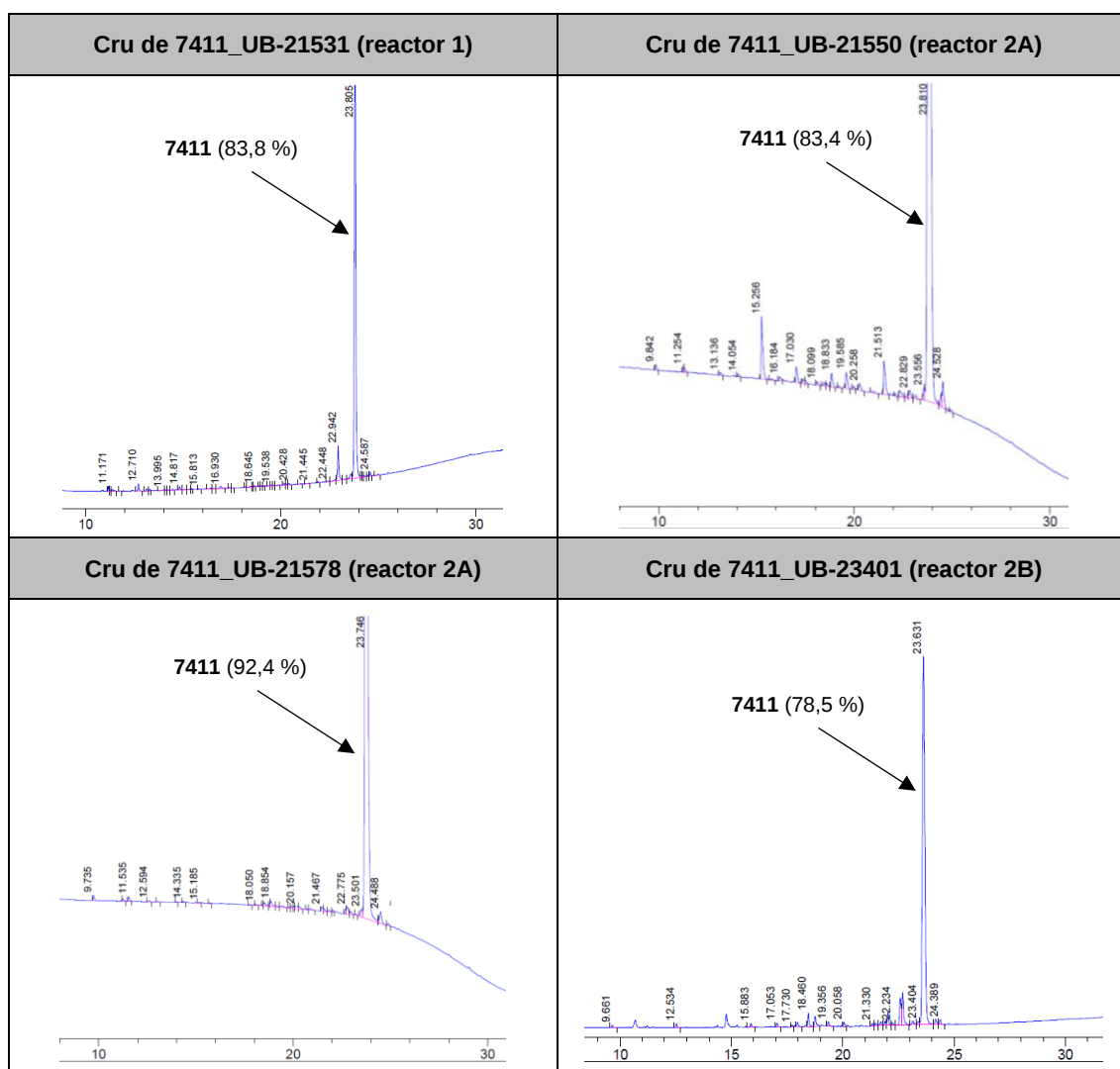


Figura 22. Comparació dels perfils cromatogràfics dels crus dels lots de **7411** obtinguts utilitzant diferents reactors.

La impuresa majoritària del cru de **7411_UB-21531** va eluir a 22,9 min i amb un 5,3 % d'àrea cromatogràfica. Es va poder elucidar la seva estructura i es va comprovar que era una impuresa aliena al procés de síntesi (*veure apartat 4.3.4.1*). Aquesta impuresa es va poder eliminar durant el procés de precipitació del cru (*veure apartat 4.3.6.3.1*).

El cru de **7411_UB-21550** no es va analitzar immediatament i es va deixar en nevera durant uns dies. A l'analitzar-lo passat aquest temps es van detectar com a subproductes majoritaris el pèptid desprotegit a l'extrem α -amino (21,5 min, 1,9 %) i DBF (15,3 min, 3,2 %). La causa d'aquesta desprotecció prematura roman fins ara sense explicació.

El cromatograma del cru de **7411_UB-21578** va mostrar al pèptid amb una alta puresa, atribuint-se la impuresa majoritària (24,5 min, 1,3 %) al pèptid **7411** més un residu d'arginina (*veure apartat 4.3.4.1.2*).

La puresa cromatogràfica del pèptid obtingut en el cru de **7411_UB-23401** va ser la menor dels quatre lots (78,5 %). El fet d'allargar considerablement la segona etapa degut als quatre intents d'acoblament de Fmoc-Ile-OH podria ser la causa d'aquest resultat. Per tal de confirmar aquesta

suposició, és a dir, l'efecte del reacoblament en la puresa cromatogràfica, es van fer alguns assajos amb la peptidil-resina, tal com es descriu a l'*apartat 4.3.3.1.3*.

Malauradament, per falta de temps i per prioritzar altres línies d'investigació, no es va fer una nova síntesi amb el reactor 2B per poder tenir més informació sobre la idoneïtat d'aquest reactor. Tanmateix, el resultat preliminar assolit amb aquest reactor és prometedor, tal com es va comprovar en la síntesi de **7411**.

4.3.3. MONITORITZACIÓ DE LES REACCIONS EN SPPS

Durant el procés sintètic d'un principi actiu és necessari l'anàlisi de les matèries primeres i dels intermedis generats per assegurar la qualitat del producte final. Així, es realitzen controls de les mescles de reacció per monitoritzar la seva evolució. El control de procés (CP) consisteix en l'anàlisi d'una alíquota del cru de reacció en un moment determinat del procés sintètic per tal de controlar l'estat de la reacció. L'anàlisi del CP permet decidir si es continua amb el procés o s'ha de prendre alguna mesura, tal com allargar el temps de reacció o afegir més reactius. La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i la ressonància magnètica nuclear de protó (^1H -RMN) són tècniques d'anàlisi utilitzades habitualment en el control de reaccions en solució.

La monitorització de la reacció d'acoblament d'aminoàcids en SPPS es realitza habitualment mitjançant un test *off-line* de ninhidrina (*apartat 4.1.5.1*) que posa de relleu la presència de grups amino lliures a la resina i, per tant, indica si l'acoblament és complert o no. Tanmateix, el test de ninhidrina presenta limitacions importants com la reactivitat amb altres amines que no són grups amino lliures de la resina, la baixa eficàcia que es troba amb proteïnes d'alt pes molecular per impediment estèric i l'alta toxicitat del KCN utilitzat en la barreja.¹¹⁸ Malgrat els inconvenients que presenta i que la informació que proporciona és qualitativa, aquest mètode és la tècnica més àmpliament utilitzada actualment per monitoritzar la reacció d'acoblament. Per altra banda, no es coneix fins el moment un mètode quantitatiu per a obtenir informació més precisa de qualsevol procés sintètic en SPPS.

Un dels principals desavantatges de la síntesi en fase sòlida és la manca d'intermedis aïllables, el que no permet un control de puresa tan exhaustiu com en la síntesi en solució. Al trobar-se la cadena peptídica en creixement unida al suport polimèric durant la síntesi, habitualment no es monitoritza la puresa cromatogràfica dels intermedis peptídics, si no que s'avalua la puresa del peptid final una vegada s'ha escindit de la resina. No poder assegurar la qualitat del producte fins finalitzar la síntesi resulta un gran inconvenient a escala industrial per no poder demostrar si la síntesi està funcionant correctament i, per tant, si el peptid final compleix amb els requeriments de les autoritats reguladores. En cas contrari, la síntesi hauria suposat una gran despesa econòmica en reactius, dissolvents, temps i recursos.

Per aquesta raó, en aquesta Tesi Doctoral s'ha desenvolupat un mètode pel seguiment de les reaccions en fase sòlida, que consisteix en dur a terme el tractament acidolític d'una alíquota de la peptidil-resina en un moment determinat de la síntesi que es consideri oportú, i analitzar el cru resultant per HPLC i/o ^1H -RMN. Aquesta alternativa permet monitoritzar les reaccions d'acoblament d'una manera quantitativa, a més d'identificar possibles impureses que s'hagin format durant el procés sintètic, així com conèixer si l'eliminació del grup Fmoc ha estat completa, processos que no es controlaven fins ara.

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid d'una alíquota de resina es va proposar utilitzar el muntatge de la **Figura 23**, que consisteix en una xeringa de polipropilè amb un disc de filtre de polietilè adaptada a un sistema per aplicar buit i un matràs aforat per recollir els filtrats. L'agitació es realitza manualment amb una vareta de tefló.



Figura 23. Muntatge per dur a terme l'escissió del pèptid d'una alíquota de resina (mg).

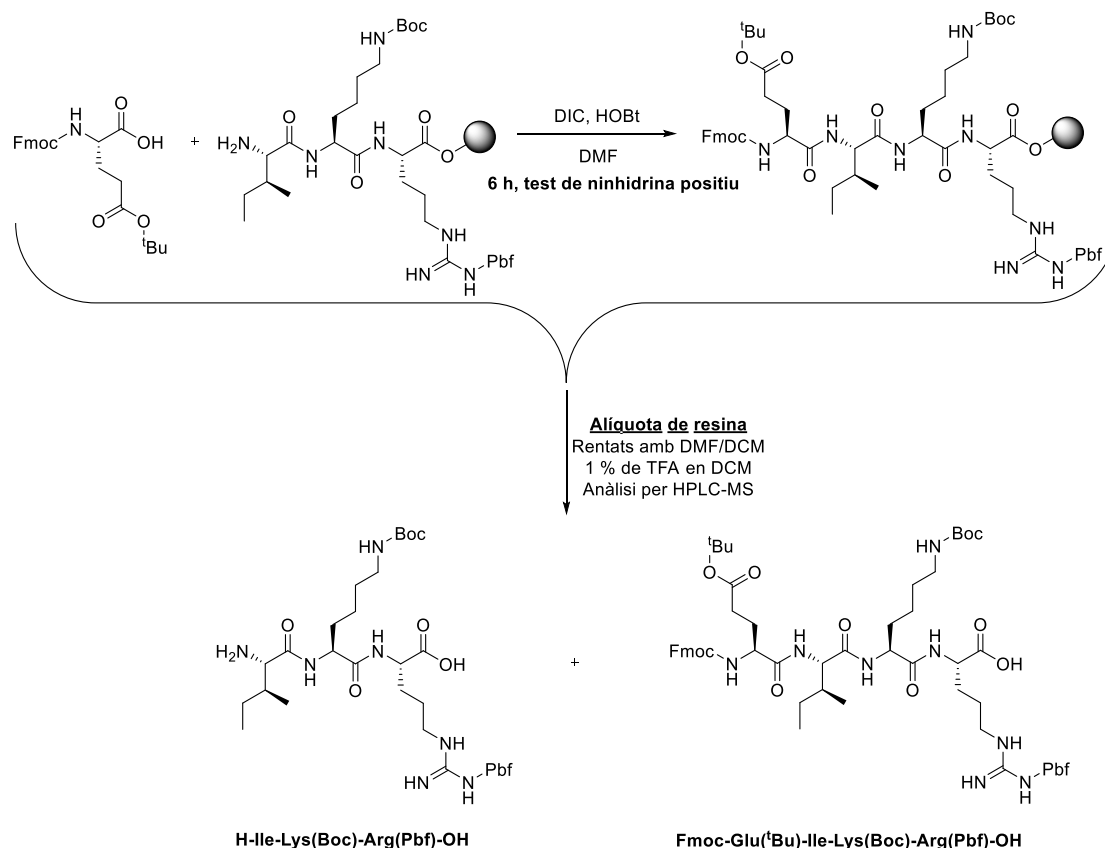
4.3.3.1. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE D'HPLC PEL SEGUIMENT DE LA SÍNTESI DE 7411

Es va escollir el pèptid **7411** per assajar el seguiment de la síntesi mitjançant l'anàlisi dels crús de reacció per HPLC-MS pels problemes que es van trobar en determinats acoblaments d'aminoàcids. A més, **7411** és un pèptid idoni per analitzar mitjançant HPLC donat que el primer aminoàcid que s'acobla a la resina (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) té un grup protector molt bon cromòfor que permet seguir fàcilment amb aquesta tècnica analítica el creixement de la cadena peptídica.

4.3.3.1.1. SÍNTESI DE 7411_UB-21550

En la síntesi de **7411_UB-21550** que es va dur a terme en el reactor 2A amb les condicions descrites en l'*apartat 4.3.2.2.2*, el test de ninhidrina va indicar que la reacció encara no havia finalitzat a les 6 h en l'acoblament corresponent al quart aminoàcid (Fmoc-Glu(^tBu)-OH) (**Esquema 26**). Per aquesta raó, es va voler aplicar el mètode de monitorització en aquest punt de la reacció i avaluar el percentatge d'àrea per HPLC de producte de partida que quedava sense reaccionar. Així doncs, una alíquota de resina es va mostrejar del cru de reacció i es va transvasar a la xeringa acoblada a un col·lector de filtrats. La resina es va rentar, es va substituir el col·lector pel matràs aforat (**Figura 23**, *apartat 4.3.3*) i la resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM. La solució resultant del tractament àcid es va recollir en el matràs, es va diluir amb DMF de qualitat HPLC i es va analitzar per HPLC-MS. Donat que el test de ninhidrina indicava que la reacció no havia finalitzat, els valors de *m/z* que s'esperaven trobar en el cru eren els corresponents al tripèptid de partida (H-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH) i al tetrapèptid resultant de l'acoblament (Fmoc-Glu(^tBu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH).

L'anàlisi d'HPLC-MS del cru obtingut (**Figura 24**) va permetre identificar els pics corresponents al producte de partida (13,1 min) amb un 0,2 %, i al producte desitjat (19,6 min), amb una puresa cromatogràfica del 74,5 %, indicant que la reacció havia pràcticament finalitzat. A més a més, en l'anàlisi del cru es van detectar tres productes amb temps de retenció de 9,8 min (6,5 %), 21,1 min (1,5 %) i 22,9 min (12,3 %) amb m/z de 427,20, 1583,78 i 391,29, respectivament. Aquestes impureses es van assignar a l'aminoàcid d'arginina (H-Arg(Pbf)-OH), a un pentapèptid amb dos residus d'arginina (Fmoc-Glu(^tBu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH) i al plastificant ftalat de diisooctil (DIOP), respectivament. La identitat d'aquests productes es va establir tal com es descriu a l'apartat 4.3.4.



Esquema 26. Acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Glu(^tBu)-OH) en la síntesi de **7411_UB-21550**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per HPLC-MS a les 6 h de reacció.

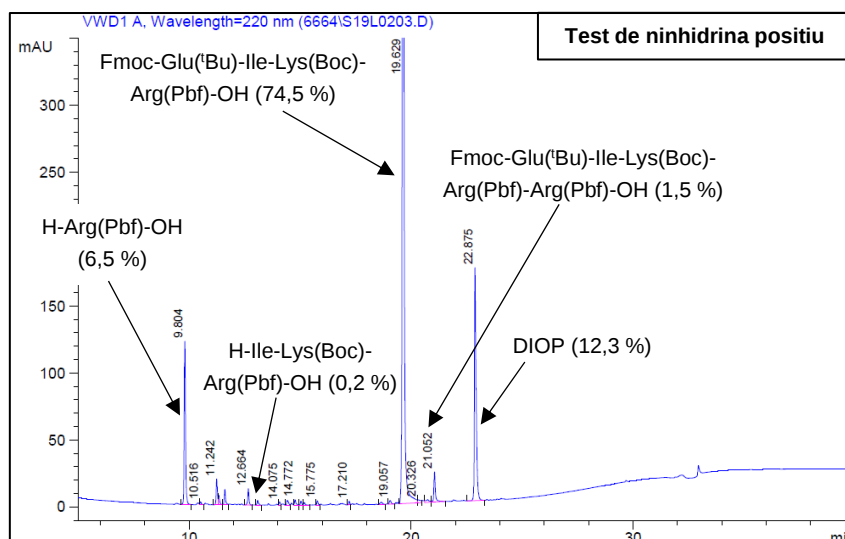


Figura 24. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina a les 6 h d'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Glu(^tBu)-OH) en la síntesi de **7411_UB-21550**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

A diferència del test de ninhidrina, l'anàlisi del cru per HPLC va permetre detectar el producte de partida i el producte final de la reacció, encara que els percentatges són orientatius degut als diferents factors de resposta dels productes. En qualsevol cas, era una clara evidència de que la reacció s'estava desenvolupant correctament i que el producte desitjat s'estava formant. A més, es van poder identificar algunes impureses que es van formar al llarg del procés.

Per tal d'assolir un test de ninhidrina negatiu i avaluar l'efecte del reacoblament en la puresa cromatogràfica del producte final, es va dur a terme el reacoblament de Fmoc-Glu(^tBu)-OH utilitzant 3 eq de reactius. A les 4 h de reacció, el test de ninhidrina va indicar que la reacció havia finalitzat i es va dur a terme l'anàlisi d'una alíquota de la peptidil-resina. El cromatograma obtingut es mostra en la **Figura 25**.

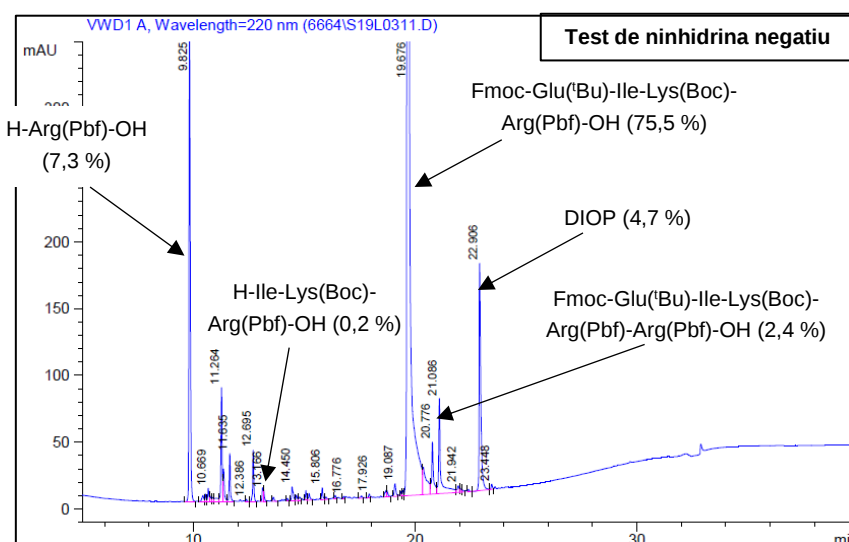


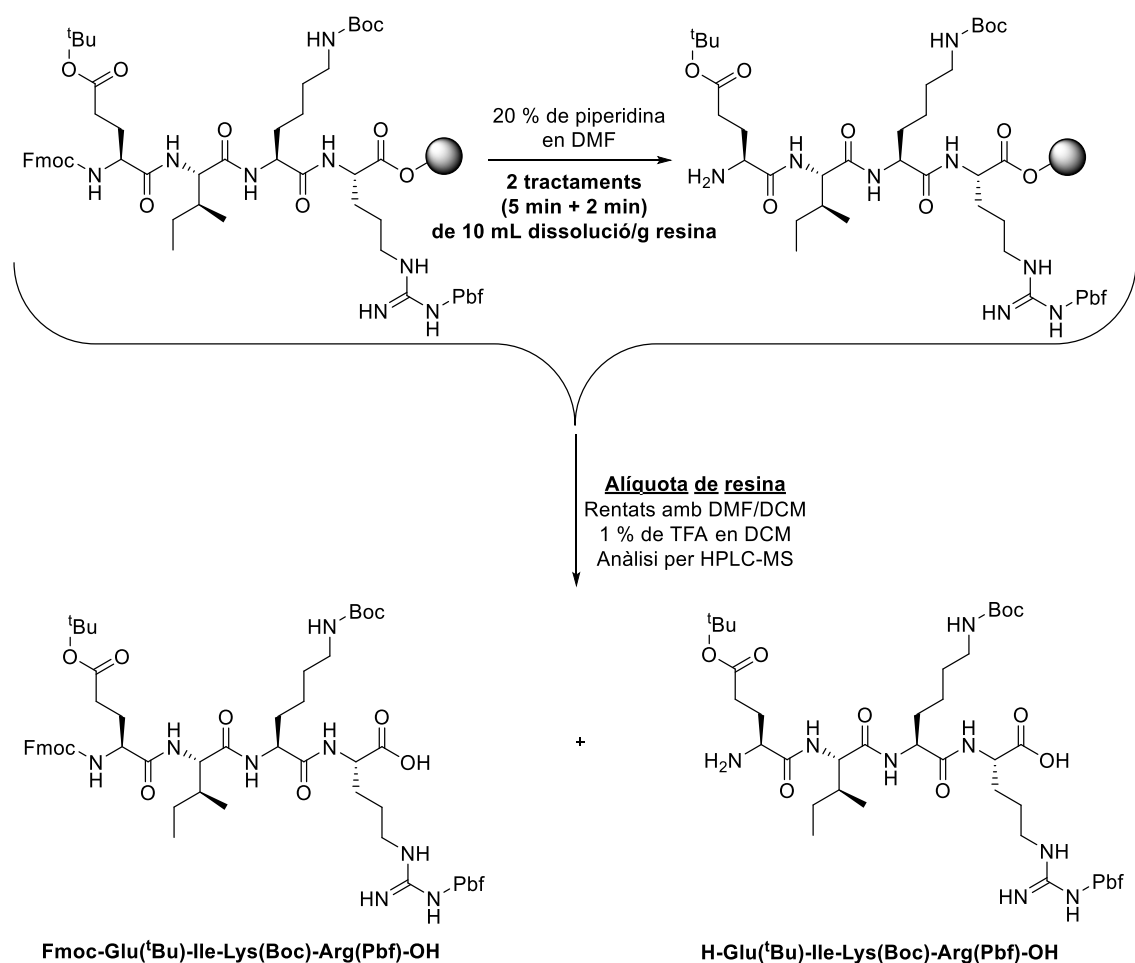
Figura 25. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Glu(^tBu)-OH en la síntesi de **7411_UB-21550**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

En el cromatograma es va poder observar el producte de la reacció (Fmoc-Glu(^tBu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 19,7 min), amb una puresa cromatogràfica de 75,5 %, acompanyat de les tres

impureses abans esmentades. El DIOP es va detectar en un percentatge menor (4,7 %) que l'obtingut abans del reacoblament (12,3 %), però la puresa cromatogràfica del producte desitjat no va variar significativament ja que altres impureses desconegudes havien augmentat. Tanmateix, el percentatge d'àrea del producte de partida (H-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 13,2 min) va ser del 0,18 %, molt semblant a l'obtingut abans del reacoblament (0,20 %). El fet que el test de ninhidrina indiqués que la reacció havia finalitzat es pot explicar si la quantitat de producte de partida es propera al nivell de detecció de la ninhidrina, el qual s'estima d'un 99 %, un altre argument a favor de la tècnica cromatogràfica per concloure si realment roman producte de partida.

La síntesi de **7411_UB-21550** es va continuar amb l'etapa d'eliminació del grup Fmoc del tetrapèptid ancorat a la resina (**Esquema 27**). Per tal de comprovar si la reacció havia finalitzat, es va dur a terme l'anàlisi de la peptidil-resina després de dos tractaments amb piperidina.

L'anàlisi d'HPLC-MS del cru obtingut (**Figura 26**) va mostrar un pic majoritari corresponent al tetrapèptid desitjat (H-Glu(^tBu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 14,7 min), i va confirmar que la conversió havia estat quantitativa per l'absència de producte de partida. Com era d'esperar, el pic de la impuresa corresponent al pentapèptid amb l'extrem α -amino protegit amb el grup Fmoc no es va detectar; tanmateix, les impureses a 9,8 min (H-Arg(Pbf)-OH) i 22,8 min (DIOP) si que es van observar novament al cromatograma.



Esquema 27. Eliminació del grup Fmoc del residu d'àcid glutàmic en la síntesi de **7411_UB-21550**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per HPLC després del tractament amb piperidina.

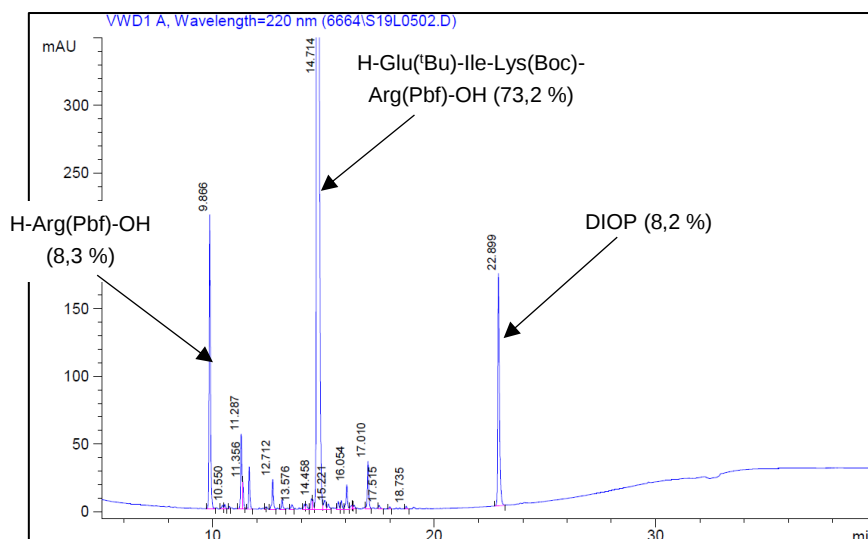


Figura 26. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de tetrapeptidil-resina després del tractament amb piperidina en la síntesi de **7411_UB-21550**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Amb aquests resultats es va poder concloure que els dos tractaments de piperidina són suficients per portar a terme l'eliminació del grup Fmoc i que el mètode de seguiment per HPLC pot ser molt útil també en aquest cas, no solament per confirmar que la reacció ha tingut lloc com s'esperava, sinó també per comprovar la qualitat del producte de la reacció.

La **Taula 13** recull els resultats obtinguts per HPLC-MS en el seguiment dels acoblaments posteriors al quart aminoàcid, en comparació amb el test de ninhidrina. Tal i com s'observa en els resultats, el test de ninhidrina va ser negatiu quan encara s'observava producte de partida per HPLC, el que posa de manifest el límit de detecció del test. Aquests romanents de reactius constitueixen un risc potencial ja que poden incidir negativament en la puresa del producte final dificultant la purificació del mateix. En aquest sentit, s'hauria d'establir un límit per HPLC de producte de partida de cada etapa de síntesi per sota del qual no es compromet la puresa cromatogràfica del producte final i, per tant, es compleixin les especificacions de puresa establertes per les entitats reguladores. Al final de la síntesi caldrà fer una anàlisi de les impureses presents i avaluar la necessitat d'utilitzar agents d'acoblament més eficients. Per altra banda, les reaccions d'eliminació del grup Fmoc es van seguir per HPLC i no es va detectar (n.d) producte de partida després dels dos rentats amb piperidina en cap de les etapes, el que indicava que el tractament era eficient per tal d'obtenir una conversió quantitativa.

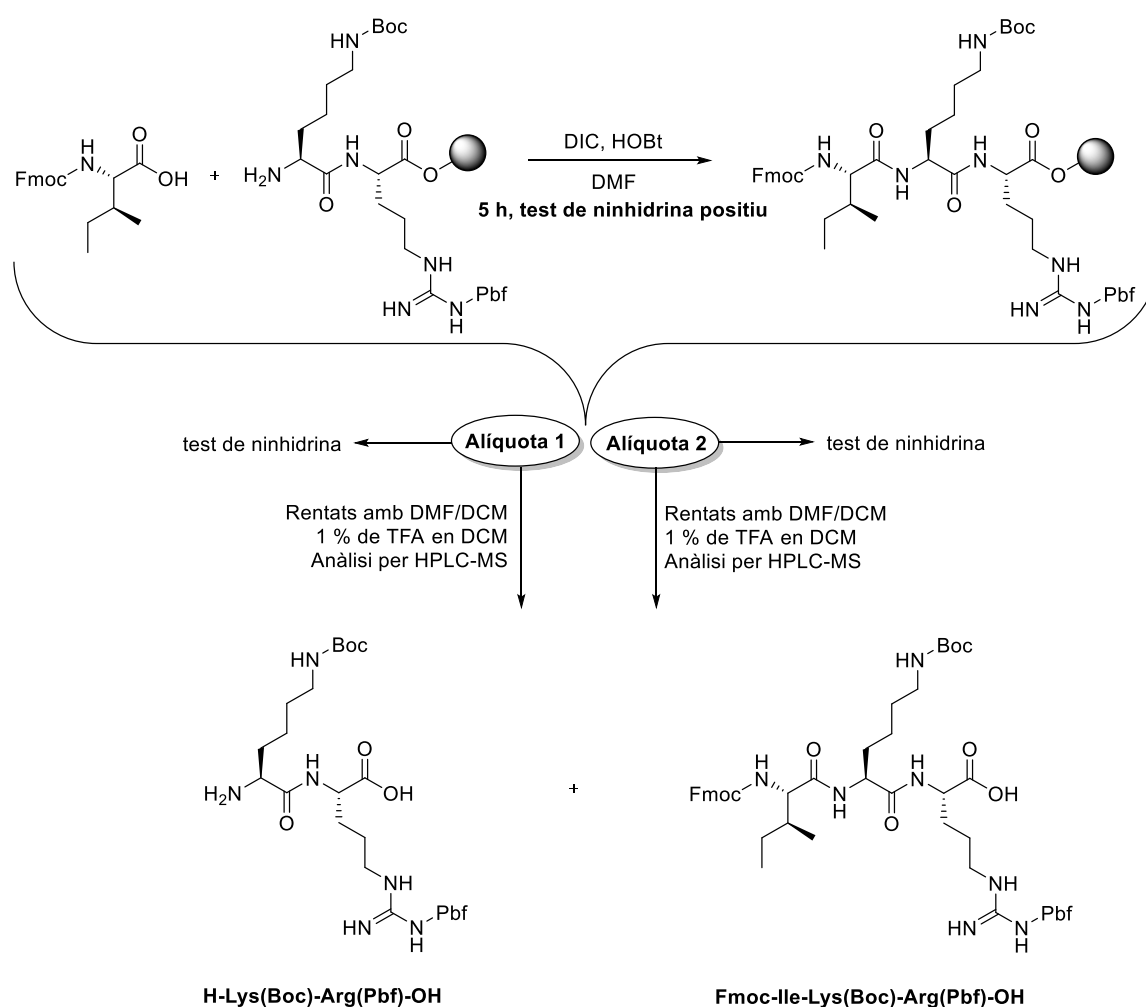
Pel que fa a les tres impureses abans esmentades (**Figura 24**), l'arginina protegida a la seva cadena lateral i l'agent plastificant DIOP es van detectar al cromatograma del cru del nonapèptid desitjat. En relació a la impuresa del pentapèptid amb dos residus d'arginina, en el cromatograma de l'acoblament de l'últim aminoàcid de la cadena de **7411** (Fmoc-Ser('Bu)-OH) es va observar una impuresa corresponent a un decapeptid amb dos residus d'arginina, resultant de l'acoblament successiu de la resta d'aminoàcids de la cadena al pentapèptid.

Taula 13. Seguiment de les reaccions d'acoblament i eliminació del grup Fmoc en la síntesi de 7411_UB-21550.

Etapla	Producte final	Test ninhidrina	HPLC		
			Temps retenció producte final (min)	% Producte final	% Producte de partida
Acoblament Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	Negatiu	20,5	74,7	0,5
Eliminació grup Fmoc	H-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	-	15,3	53,8	n.d
Acoblament Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	Positiu	21,2	73,5	1,5
Recoblament Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	Negatiu	21,2	72,2	1,0
Eliminació grup Fmoc	H-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	-	16,8	74,3	n.d
Acoblament Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	Negatiu	22,0	78,2	2,6
Eliminació grup Fmoc	H-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	-	17,1	78,4	n.d
Acoblament Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	Negatiu	22,5	83,0	0,3
Eliminació grup Fmoc	H-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	-	18,9	76,0	n.d
Acoblament Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	7411	Negatiu	23,8	83,6	1,1

4.3.3.1.2. SÍNTESI DE 7411_UB-21578

En la síntesi de **7411_UB-21578** que es va dur a terme en el reactor 2A (*apartat 4.3.2.2.2*), el test de ninhidrina va indicar que la reacció encara no havia finalitzat a les 5 h de reacció en l'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (**Esquema 28**), motiu pel qual es va voler avaluar per HPLC la composició del cru de reacció. A diferència del que es va fer per **7411_UB-21550**, en aquest cas es van prendre dues alíquotes de diferents parts de la resina per tal de comprovar la uniformitat del resultat de l'anàlisi, i cada alíquota es va dividir en dues fraccions. Una fracció es va analitzar amb ninhidrina i l'altra fracció es va tractar amb TFA en les condicions ja descrites. La dissolució resultant d'aquest tractament es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 27**).



Esquema 28. Acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) en la síntesi de **7411_UB-21578**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per HPLC a les 5 h de reacció.

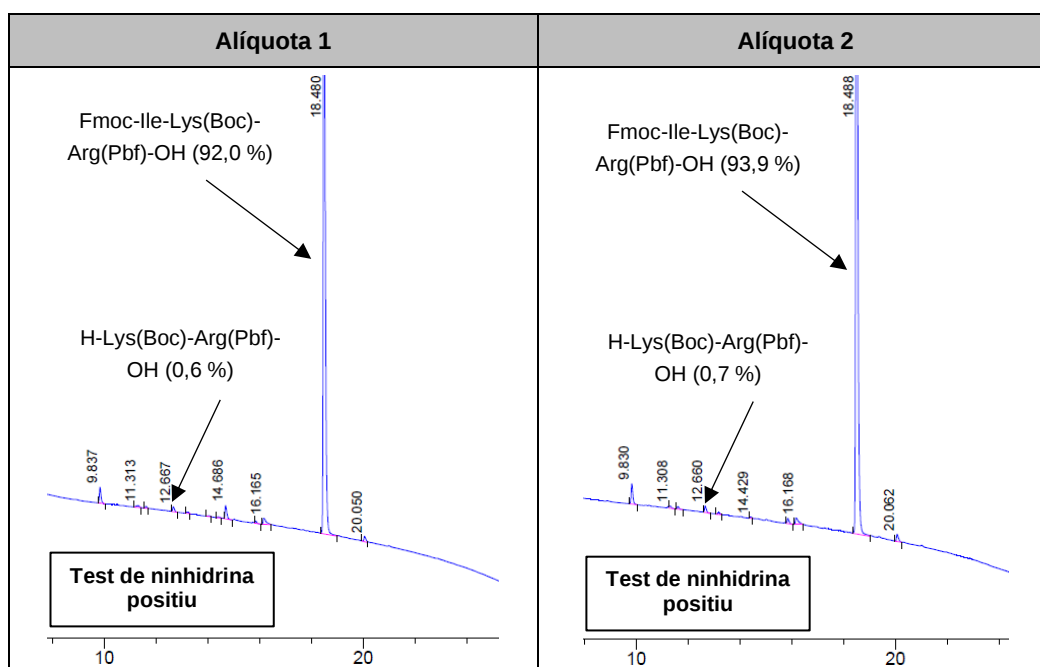


Figura 27. Comparació dels cromatogrames dels crús acidolítics de les dues mostres de peptidil-resina després de l'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) en la síntesi de **7411_UB-21578**.

Els test de ninhidrina de les dues alíquotes van indicar que la reacció no havia finalitzat i els anàlisis d'HPLC dels crús acidolítics de les dues alíquotes de resina van mostrar perfils cromatogràfics similars, amb percentatges de 0,6 % i 0,7 % de producte de partida (H-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 12,7 min), i pureses cromatogràfiques del 92,0 % i 93,9 % de producte final (Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 18,5 min). Aquests resultats van confirmar que el mètode d'anàlisi per HPLC dels crús de reacció era reproducible pel que fa a la presa de mostra.

En els cromatogrames dels crús acidolítics (**Figura 27**) també es va detectar la impuresa H-Arg(Pbf)-OH (9,8 min) al voltant del 2 % i la impuresa corresponent al tetrapèptid amb dos residus d'arginina (Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH, 20,1 min) en un 0,8 %. El DIOP ja no es va detectar degut a les mesures que es van prendre un cop determinada la seva estructura i provenença (veure *apartat 4.3.4.1.3*).

Com que la reacció encara no havia finalitzat, es va dur a terme el reacoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH). A les 1,5 h de reacció, el test de ninhidrina va ser negatiu i el cru acidolític d'una alíquota de peptidil-resina es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 28**). En aquest cas es va prendre una alíquota únicament.

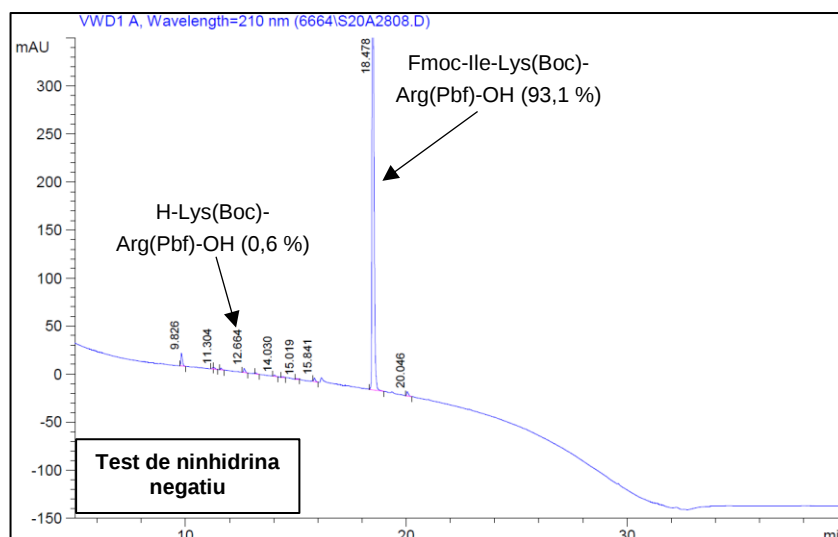


Figura 28. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Ile-OH en la síntesi de **7411_UB-21578**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Com ja s'havia comprovat en resultats anteriors, reacoblar no va ser suficient per consumir el producte de partida malgrat el resultat negatiu del test de la ninhidrina. La puresa cromatogràfica del producte principal després del reacoblament es va mantenir (93,0 % (mitjana de les dues alíquotes) i 93,1 %). Els resultats d'HPLC van ser consistents mostrant resultats molt similars, tanmateix, la ninhidrina va donar un resultat inesperat i la informació complementària provinent de l'anàlisi per HPLC va ajudar a determinar l'abast de la reacció.

La síntesi de **7411_UB-21578** es va continuar fins a completar el fragment peptídic, amb els tests de ninhidrina negatius per tots els acoblaments encara que en la majoria dels casos s'observava producte de partida per HPLC (**Taula 14**). En aquesta síntesi també es va dur l'anàlisi d'HPLC després de l'eliminació del grup Fmoc i en cap cas es va detectar producte de partida en el cromatograma corresponent al cru acidolític, el que indicava reaccions quantitatives utilitzant els tractaments de piperidina.

Taula 14. Seguiment de les reaccions d'acoblament en la síntesi de 7411_UB-21578.

Etapla	Aminoàcid acoblat (eq)	Producte final	Temps reacció (h)	Test ninhidrina	HPLC		
					Temps de retenció producte final (min)	% Producte final	% Producte de partida
1	Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1,5)	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	2,5	-	16,2	98,6	-
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,0)	Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	5,0	Negatiu	17,7	94,9	2,1
3	Fmoc-Ile-OH (4,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	1,5	Positiu	18,5	92,9*	0,7*
3*	Fmoc-Ile-OH (3,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	4,0	Negatiu	18,5	93,2	0,6
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH (4,0)	Fmoc-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	2,0	Negatiu	19,6	92,8	n.d
5	Fmoc-Leu-OH (4,0)	Fmoc-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	3,0	Negatiu	20,5	88,2	0,1
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH (4,0)	Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	3,0	Negatiu	21,2	87,1	0,5
7	Fmoc-Ile-OH (4,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	2,0	Negatiu	22,0	88,1	0,8
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4,0)	Fmoc-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	3,0	Negatiu	22,5	86,9	0,5
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH (4,0)	7411	2,5	Negatiu	23,8	87,7	1,3

(*) Reacoblament

4.3.3.1.3. SÍNTESI DE 7411_UB-23401

La síntesi de **7411_UB-23401** es va dur a terme en el reactor 2B amb les condicions que s'han descrit en l'apartat 4.3.2.2.2. Malauradament, en l'etapa d'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) es van carregar per error 3 eq de reactius en comptes de 4 eq, i el test de ninhidrina va indicar que la reacció encara no havia finalitzat a les 6 h. Es va analitzar el cru de reacció per HPLC, determinant-se un 1,3 % de producte de partida sense reaccionar (H-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 12,6 min) (**Figura 29**).

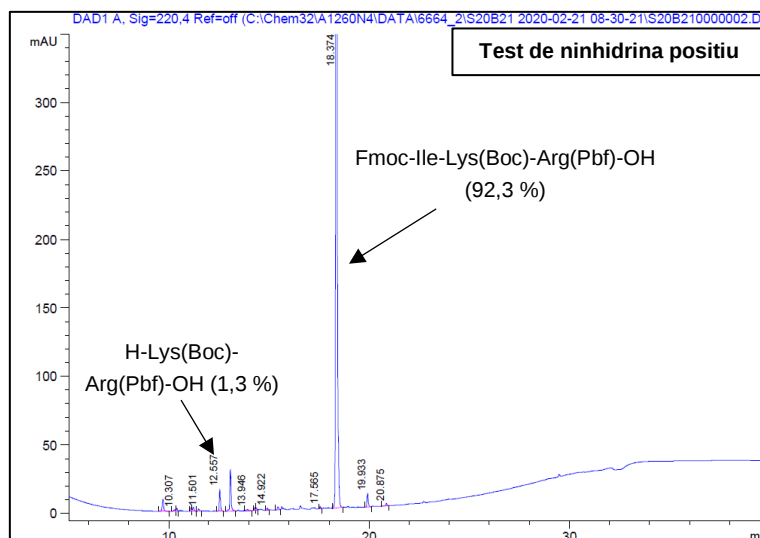


Figura 29. Cromatograma del cru acidolític de la mostra de peptidil-resina a les 6 h d'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) en la síntesi de **7411_UB-23401**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

En aquest punt, es va decidir aprofitar aquesta síntesi per avaluar per HPLC la disminució de producte de partida i l'impacte en la puresa cromatogràfica del producte final al dur a terme reacoblaments amb 1, 3 i 4 equivalents de reactius. El perfil cromatogràfic obtingut al reacoblar amb 1 eq de reactius (**Figura 30**) va ser molt semblant a l'inicial (**Figura 29**), indicant que aquest reacoblament no va tenir gairebé efecte pel que fa al dipèptid de partida romanent. Es va observar un resultat molt semblant després de tractar la resina amb 3 eq de reactius (**Figura 31, A**), i una lleu disminució del producte de partida (0,7 %) respecte l'observat inicialment (1,3 %) després d'intentar reacoblar amb 4 eq de reactius (**Figura 31, B**). Tanmateix, la puresa cromatogràfica del producte final es va veure notablement afectada amb una disminució al 84,0 % degut a l'aparició de noves impureses en el cru.

Una vegada més, l'anàlisi dels crus van mostrar que la utilització d'excessos de reactius no era suficient per consumir el producte de partida i reduïa la puresa cromatogràfica del producte final. Tenint sempre present que el factor de resposta influeix en els resultats per HPLC, es va decidir prescindir dels reacoblaments tot i que el test de ninhidrina indiqués que la reacció no havia finalitzat (**Taula 15**). Així, a l'observar per HPLC una disminució del producte de partida a percentatges inferiors del 2,2 % a les 5-6 h, la reacció d'acoblament es va donar per finalitzada i es va seguir amb la següent etapa. Tal com mostra la **Taula 15** els pèptids de delació i les noves impureses desconegudes generades van fer disminuir la puresa cromatogràfica de l'intermedi peptídica a mesura que avançava l'elongació de la cadena peptídica, obtenint-se un cru acidolític de **7411** amb una puresa cromatogràfica més baixa (73,0 %) de les que s'havien observat en altres síntesis (al voltant del 85 %). Aquests resultats van fer desestimar la utilització d'aquest lot

en els assajos d'acoblament de fragments en solució. Es desconeix la raó per la qual no va ser possible aconseguir un rendiment quantitatiu a l'acoblament del tercer aminoàcid.

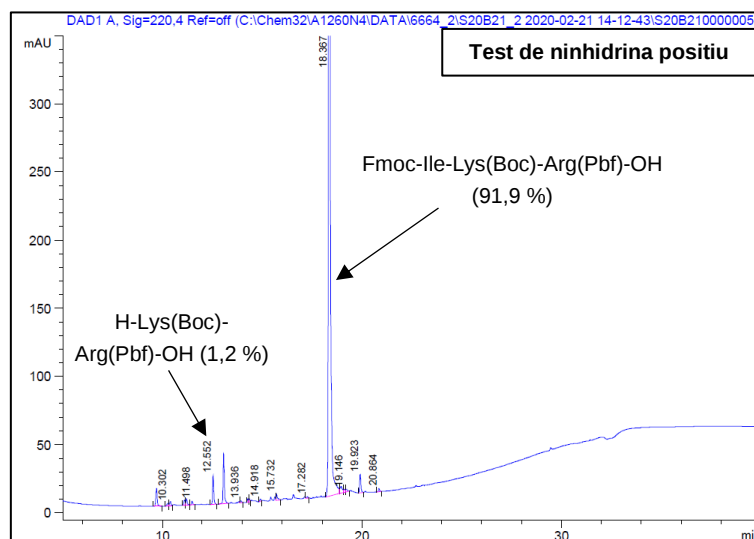


Figura 30. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Ile-OH utilitzant 1 eq de reactius en la síntesi de **7411_UB-23401**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

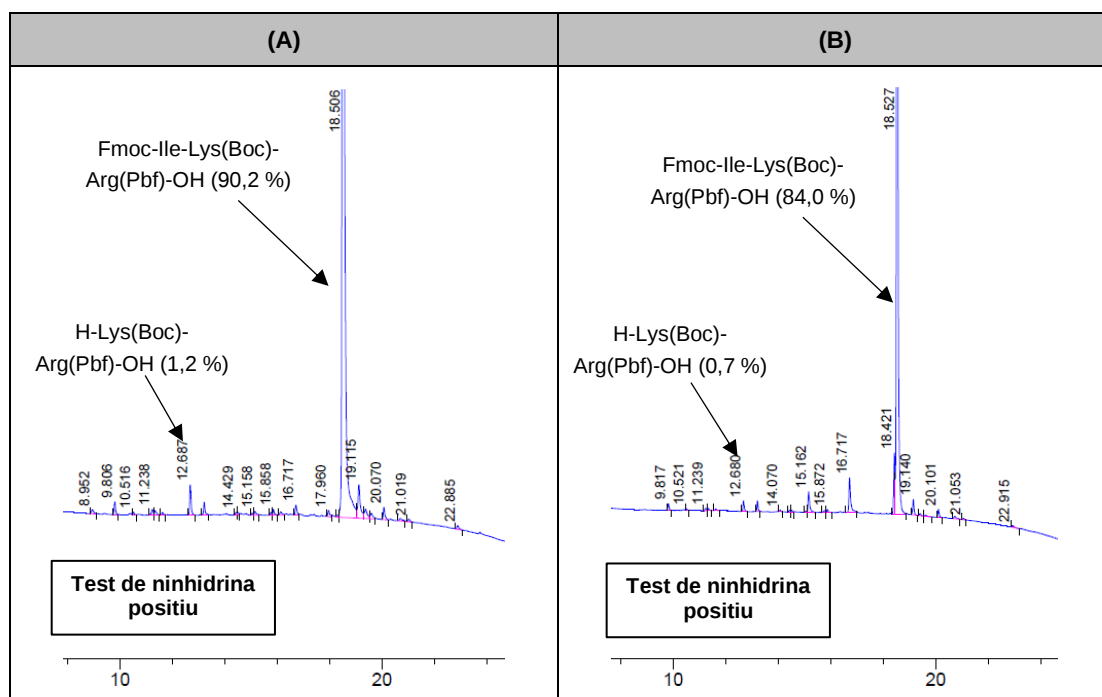


Figura 31. Comparació dels cromatogrames dels crus acidolítics de les dues mostres de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Ile-OH utilitzant (A) 3 eq i (B) 4 eq de reactius en la síntesi de **7411_UB-23401**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Taula 15. Seguiment de les reaccions d'acoblament en la síntesi de 7411_UB-23401.

Etapla	Aminoàcid acoblat (eq)	Producte final	Temps reacció (h)	Test ninhidrina	HPLC		
					Temps de retenció producte final (min)	% Producte final	% Producte de partida
1	Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1,5)	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1,5	-	16,1	99,3	-
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,0)	Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	4,0	Negatiu	17,4	95,0	1,0
3	Fmoc-Ile-OH (3,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	6,0	Positiu	18,4	92,3	1,3
3*	Fmoc-Ile-OH (1,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	4,0	Positiu	18,4	91,9	1,2
3*	Fmoc-Ile-OH (3,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	5,0	Positiu	18,5	90,2	1,2
3*	Fmoc-Ile-OH (4,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	4,0	Positiu	18,5	84,0	0,7
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH (4,0)	Fmoc-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	6,0	Positiu	19,6	85,7	0,4
5	Fmoc-Leu-OH (4,0)	Fmoc-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	5,0	Positiu	20,5	85,2	0,3
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH (4,0)	Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	5,0	-	21,0	78,9	2,1
7	Fmoc-Ile-OH (4,0)	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	6,0	-	21,8	76,2	2,2
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4,0)	Fmoc-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH	5,0	-	22,5	67,6	0,2
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH (4,0)	7411	5,0	-	23,8	73,0	0,4

(*) Reacoblament

4.3.3.2. RMN COM A EINA ALTERNATIVA A L'HPLC PEL SEGUIMENT DE LES REACCIONS EN FASE SÒLIDA: SÍNTESI DE 7005

En l'anterior apartat s'ha descrit el desenvolupament d'una metodologia alternativa pel seguiment de les reaccions en fase sòlida per HPLC en la síntesi de **7411**. Aquesta tècnica va ser molt útil en aquest cas ja que el primer aminoàcid incorporat a la resina, l'arginina, té com a grup protector un molt bon cromòfor (Pbf), fet que facilita el seguiment per UV-Vis de totes les etapes sintètiques posteriors. En canvi, els dos primers aminoàcids de **7005** que s'acoblen a la resina (leucina i valina) són bifuncionals i no contenen grups cromòfors, dificultant per tant la detecció per HPLC dels intermedis resultants de l'eliminació del grup Fmoc abans d'acoblar el següent aminoàcid. Per aquesta raó, es va desenvolupar un mètode per seguir els dos primers acoblaments per ^1H -RMN i, a partir de l'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH), amb un grup cromòfor a la cadena lateral, es van seguir les reaccions per ^1H -RMN i HPLC per poder comparar les dues metodologies analítiques.

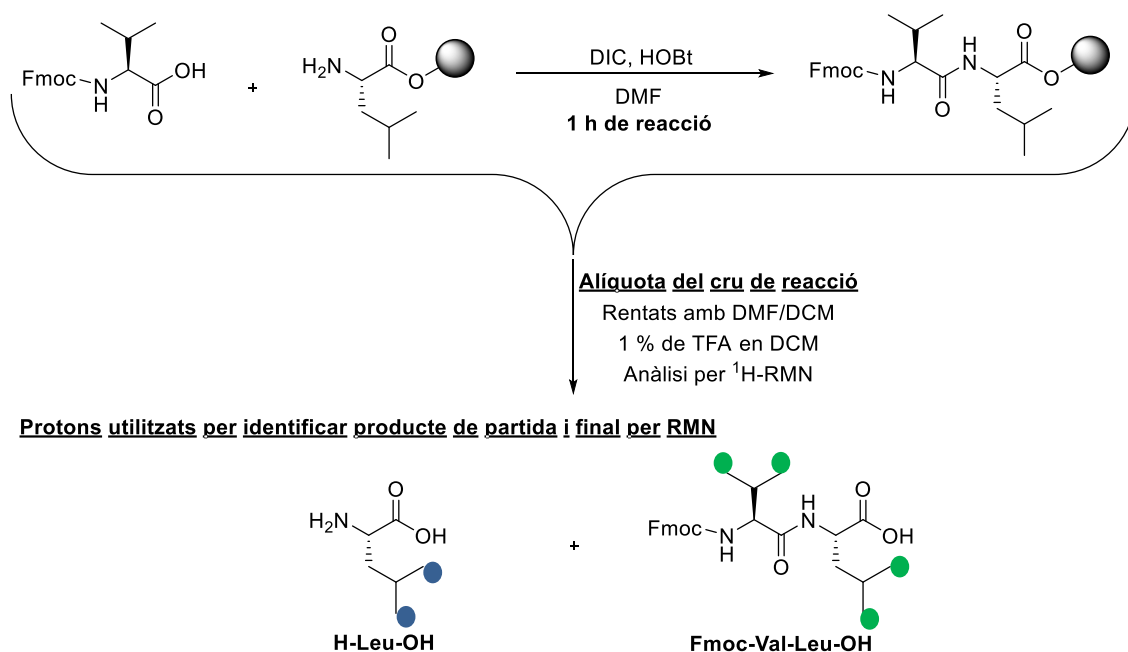
A diferència de l'HPLC, el ^1H -RMN permet quantificar directament mitjançant la integració de senyals a l'espectre, és a dir, sense la necessitat de determinar factors de resposta com és el cas de l'HPLC. Per exemple, en relació a l'acoblament d'un aminoàcid, calia doncs buscar senyals del producte de partida i del producte final ben resoltes per poder determinar la relació entre els dos productes per integració dels senyals corresponents. Per tant, es van dur a terme tractaments acidolítics d'alíquotes i els crús obtinguts es van analitzar per ^1H -RMN.

4.3.3.2.1. SÍNTESI DE 7005_UB-23417

Es va realitzar una nova síntesi de **7005 (7005_UB-23417)** a escala d'1,4 mmols (1,0 g de resina 2-CTC), utilitzant el muntatge amb xeringa de la **Figura 23** (*apartat 4.3.3*) per tal d'assajar el seguiment de les reaccions d'acoblament i eliminació del grup Fmoc per ^1H -RMN.

L'aminoàcid comercial Fmoc-Leu-OH es va incorporar a la resina utilitzant les mateixes condicions que les ja descrites a l'*apartat 4.2.2*, i amb una funcionalització final de 0,49 mmols/g (*apartat 4.1.3*). L'eliminació del grup Fmoc i l'acoblament dels aminoàcids es van dur a terme en les condicions habituals (*apartats 4.1.4 i 4.1.5*, respectivament).

La primera reacció que es va monitoritzar per ^1H -RMN va ser l'acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Val-OH) a l'aminoàcid leucina incorporat a la resina (**Esquema 29**). Passada 1 h de reacció, el test de ninhidrina va indicar que l'acoblament havia finalitzat. Per tant, es va prendre una alíquota de resina i es va transvasar a la xeringa acoblada a un col·lector de filtrats. La resina es va rentar, es va substituir el col·lector per un baló de 10 mL i la resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda i el residu resultant es va dissoldre en MeOD per tal de dur a terme el primer control de procés (CP1). Prèviament, abans d'iniciar la reacció d'acoblament s'havia realitzat el mateix procediment per l'anàlisi d'una alíquota d'aminoàcid-resina (CP0). Els espectres de ^1H -RMN que es van obtenir es mostren en la **Figura 32**. En l'espectre del producte de partida (H-Leu-OH, CP0) es va observar un triplet aparent que resulta de dos doblets solapats (1,02 ppm i 1,00 ppm), corresponents als protons dels dos grups metil diastereotòpics del grup isopropil de la cadena lateral de la leucina, acoblats amb el protó del grup metí de la mateixa cadena. A l'espectre d' ^1H -RMN de CP1 no es van observar els senyals del producte de partida, però van aparèixer 4 doblets que integraven 3 protons cadascun, corresponents als grups metil de les cadenes laterals dels residus de leucina i valina del producte de reacció (Fmoc-Leu-Val-OH).



Esquema 29. Acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Val-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN.

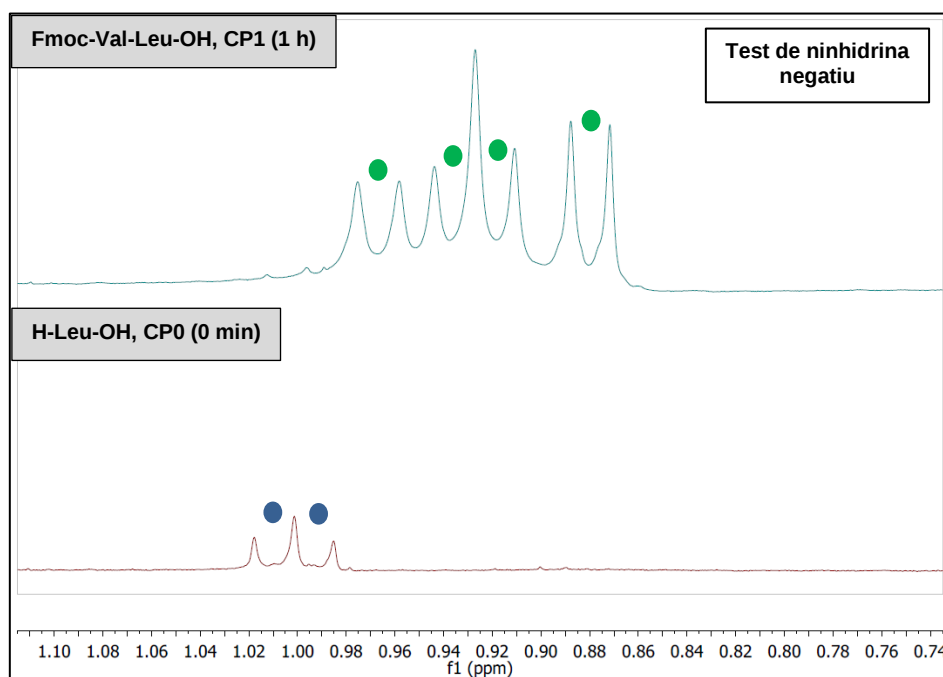
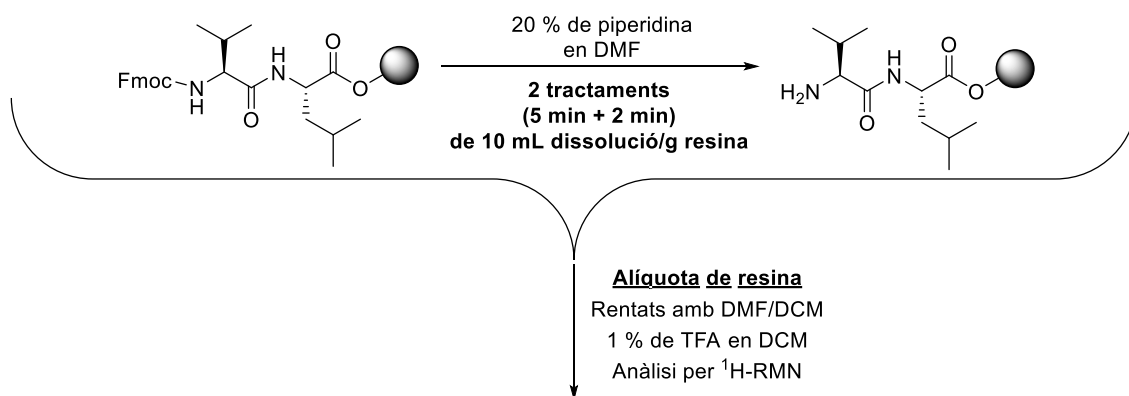
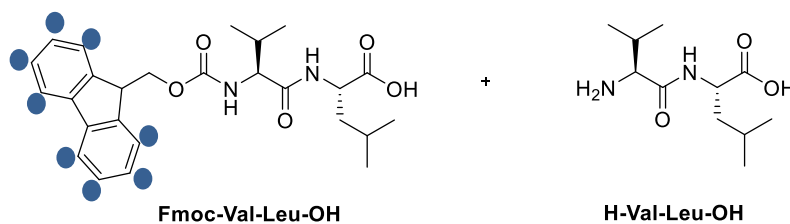


Figura 32. Part de la regió alifàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar els crus acidolítics de mostres de dipeptidil-resina abans (CP0) i després (CP1) d'acoblar el segon aminoàcid (Fmoc-Val-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**.

L'eliminació del grup Fmoc de la cadena peptídica es va monitoritzar prenent una alíquota de peptidil-resina després de tractar-la amb piperidina seguint el protocol abans esmentat per la desprotecció del residu de leucina (**Esquema 30**). El cru acidolític es va analitzar per ^1H -RMN en MeOD (CP1) i els senyals de l'espectre es van comparar amb les corresponents al cru acidolític del producte de partida (CP0) (**Figura 33**).



Protons utilitzats per identificar el producte de partida per RMN



Esquema 30. Eliminació del grup Fmoc del residu de valina en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN després del tractament amb piperidina.

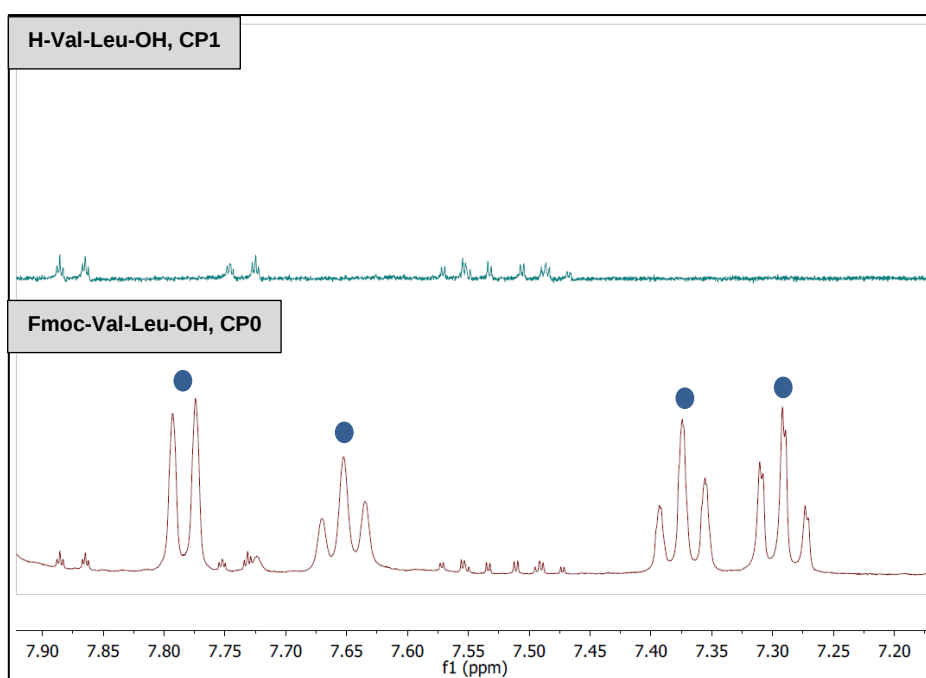
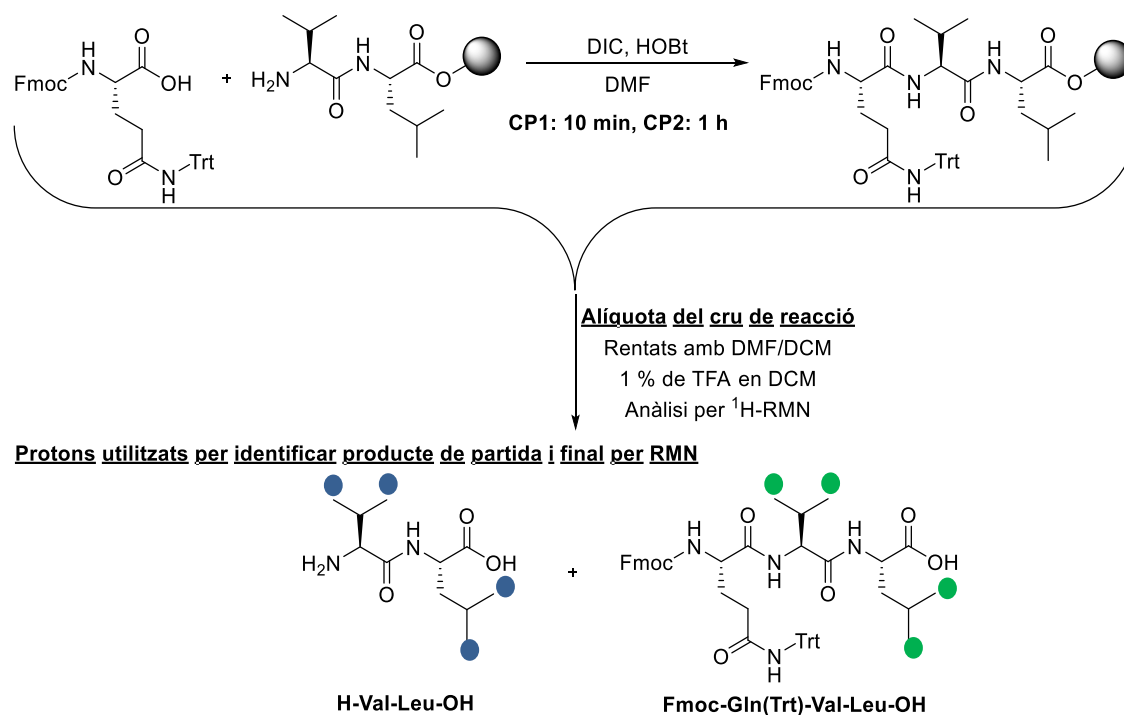


Figura 33. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar els crus acidolítics de mostres de dipeptidil-resina abans (CP0) i després del tractament amb piperidina (CP1) per eliminar el grup Fmoc del residu de valina en la síntesi de **7005_UB-23417**.

Els senyals dels protons aromàtics del grup Fmoc (7,85-7,25 ppm) no es van observar en el CP1, indicant que la reacció havia sigut quantitativa. No obstant, en la zona aromàtica de CP0 es van observar un grup de senyals que no corresponien als senyals del grup Fmoc, indicant la presència d'una altra espècie que no s'eliminava de la peptidil-resina amb els tractaments amb

piperidina. Aquesta impuresa va resultar ser HOBt, l'estructura de la qual va ser elucidada tal com s'explica a l'apartat 4.3.4.2.

En l'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH), es va dur a terme un control per ^1H -RMN als 10 min de reacció (CP1) quan la ninhidrina encara era positiva, i a 1 h de reacció (CP2) quan la ninhidrina ja era negativa (**Esquema 31**). En aquest cas es van comparar les regions alifàtiques dels espectres de les tres mostres (**Figura 34**). En la regió alifàtica del CP0 es va observar un doblet a 1,05 ppm, corresponent als protons d'un dels grups metil del grup isopropil del producte de partida (H-Val-Leu-OH), que es va reduir notablement als 10 min. Al quedar aquest senyal aïllat d'altres senyals que es van formant a mesura que s'obté el producte final, es va comparar amb el doblet aïllat a 0,85 ppm que correspon als protons d'un dels grups metil del grup isopropil del producte final (Fmoc-Gln(Trt)-Val-Leu-OH). La relació molar entre el producte de partida i final als 10 min de reacció va ser de 0,1:1. Després d'1 h de reacció, el producte de partida ja no es va detectar per ^1H -RMN, d'acord amb el resultat observat amb el test de ninhidrina.



Esquema 31. Acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN de les dues mostres recollides a temps diferents.

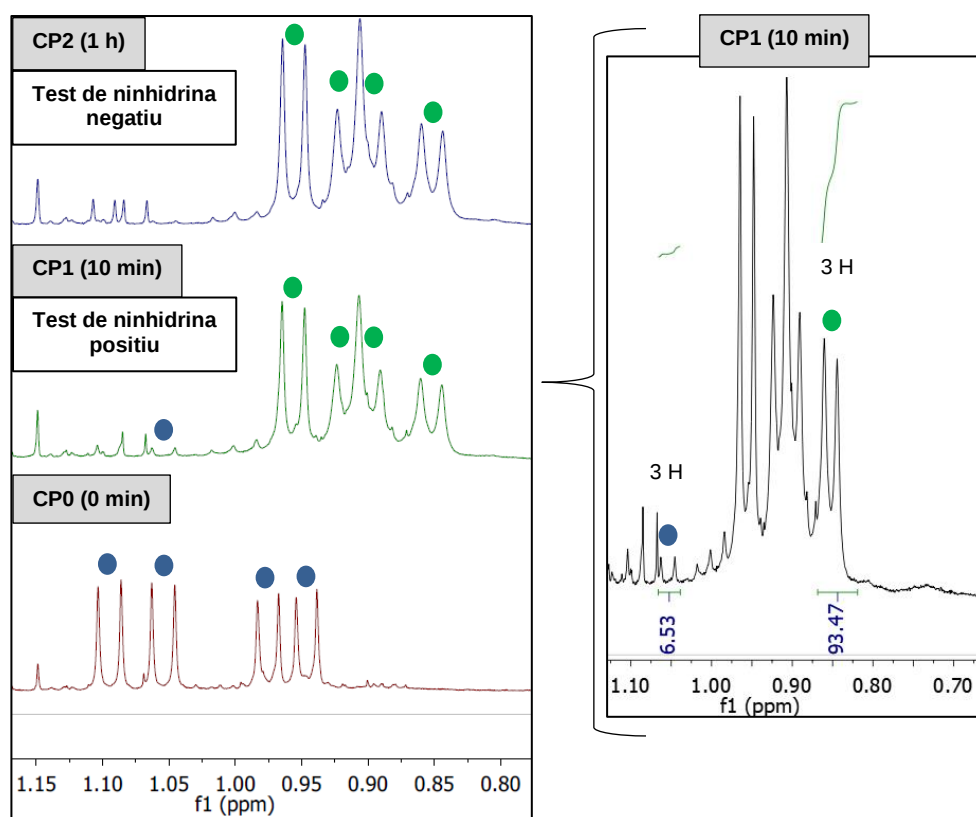


Figura 34. Regió alifàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar els crus acidolítics de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP0), als 10 min d'acoblament (CP1) i a 1 h d'acoblament (CP2) en la síntesi de **7005_UB-23417**. Es destaca una ampliació de l'espectre de CP1.

Un cop finalitzada la reacció d'acoblament del tercer aminoàcid, es va dur a terme l'anàlisi d'HPLC del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina (**Figura 35**). A l'incorporar l'aminoàcid protegit Fmoc-Gln(Trt)-OH amb un grup protector cromòfor (Trt) a la cadena peptídica, el producte de reacció Fmoc-Gln(Trt)-Val-Leu-OH es va poder detectar amb claredat (20,7 min, 94,8 %), acompanyat d'una impuresa majoritària (3,5 %) corresponent a un tetrapèptid amb dos residus de leucina (Fmoc-Gln(Trt)-Val-Leu-Leu-OH, 21,5 min). Aquest resultat està relacionat al que es va obtenir amb **7411** (**Figura 24**, apartat 4.3.3.1.1), és a dir, la possibilitat de doble acoblament del primer aminoàcid (arginina en aquest cas) quan s'utilitza una resina tipus 2-CTC. El percentatge de producte de partida (H-Val-Leu-OH) no es va poder determinar ja que el dipèptid no té grups cromòfors.

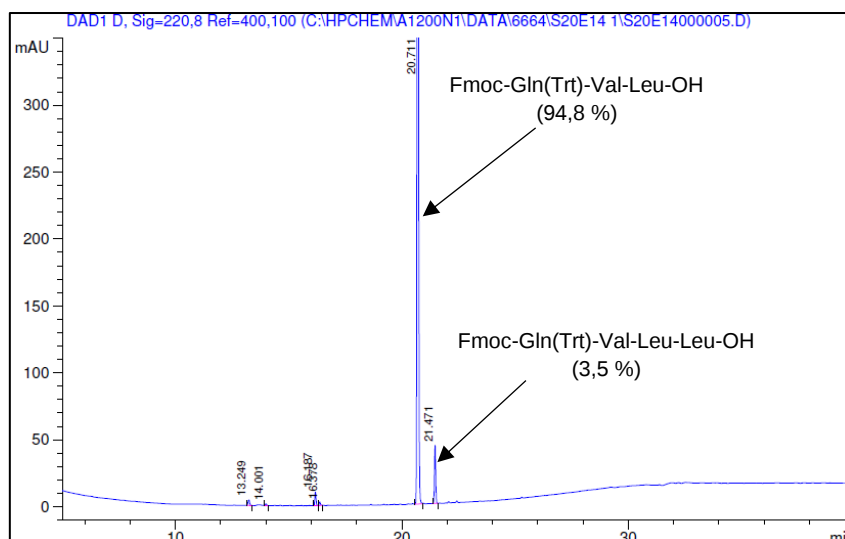
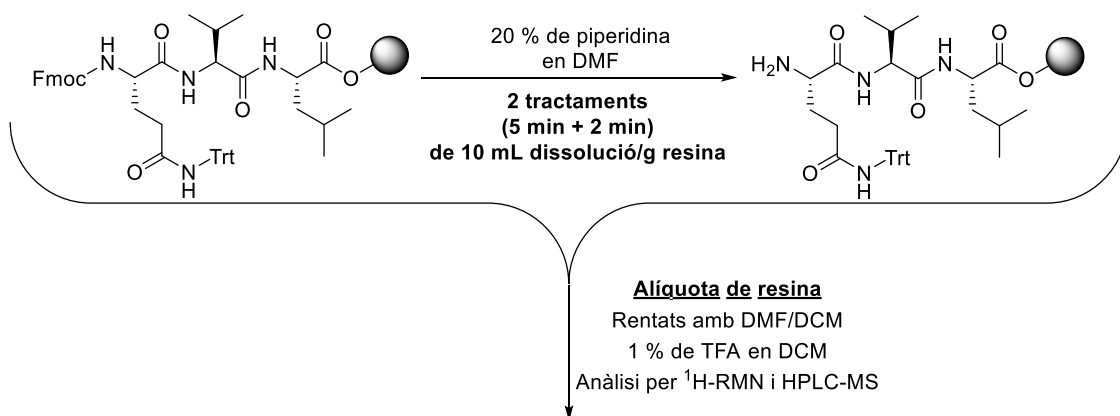
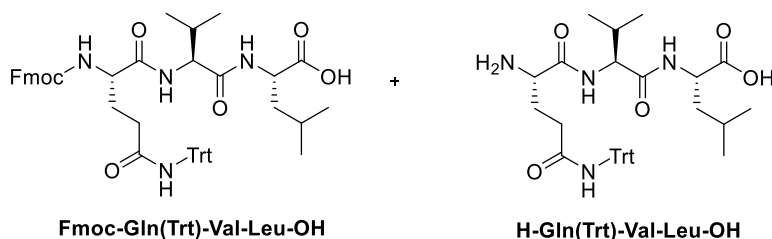


Figura 35. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després d'acoblar el tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Continuant amb el seguiment de la síntesi, es va dur a terme l'anàlisi per ^1H -RMN (**Figura 36**) i HPLC-MS (**Figura 37**) del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després del tractament amb piperidina per eliminar el grup Fmoc del residu de Gln (**Esquema 32**). Tant l'espectre d' ^1H -RMN com l'anàlisi d'HPLC no van mostrar producte de partida, indicant que la desprotecció va ser completa. En la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN del CP0 es van observar dos doblets aparents a 7,75-7,80 ppm i 7,62-7,68 ppm, i dos triplets aparents a 7,33-7,40 ppm i 7,25-7,30 ppm, característics del grup fluorenil del producte de partida (Fmoc-Gln(Trt)-Val-Leu-OH). Tanmateix, aquests senyals no es van observar a l'espectre del CP1. En l'anàlisi per HPLC es va detectar el producte desitjat (H-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 14,9 min) amb una puresa cromatogràfica del 93,1 %, acompanyat de la impuresa majoritària (3,6 %) corresponent al tetrapèptid amb dos residus de leucina i l'extrem α -amino desprotegit (H-Gln(Trt)-Val-Leu-Leu-OH, 15,9 min). Aquesta impuresa es va seguir observant en els següents acoblaments, i per tant, ja no es torna a comentar fins a l'obtenció de **7005**.



Protons utilitzats per identificar el producte de partida per RMN



Esquema 32. Eliminació del grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN i HPLC després del tractament amb piperidina.

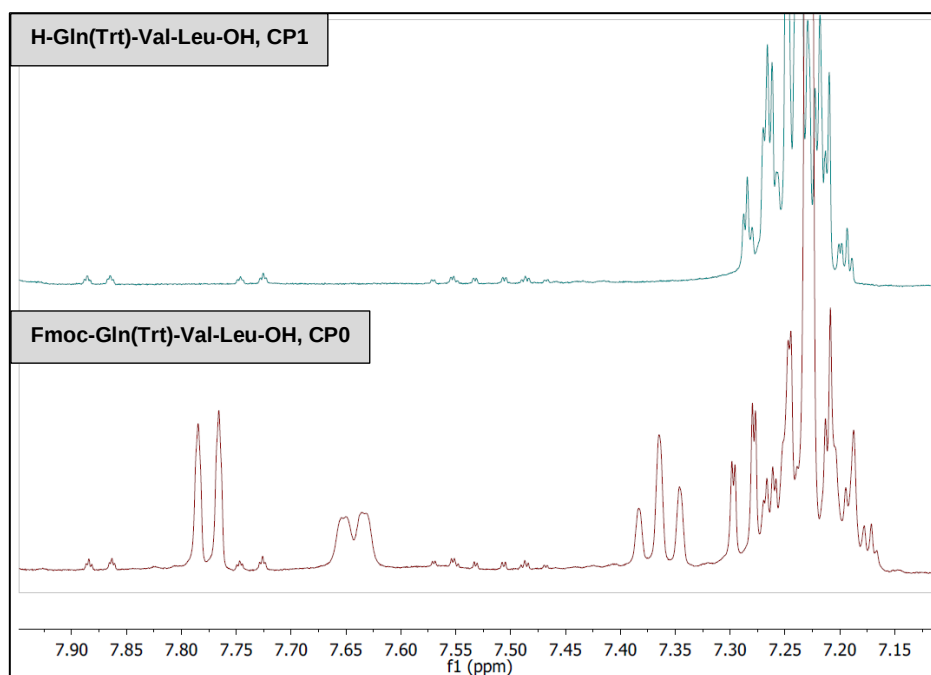


Figura 36. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans (CP0) i després del tractament amb piperidina (CP1) per eliminar el grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de **7005_UB-23417**.

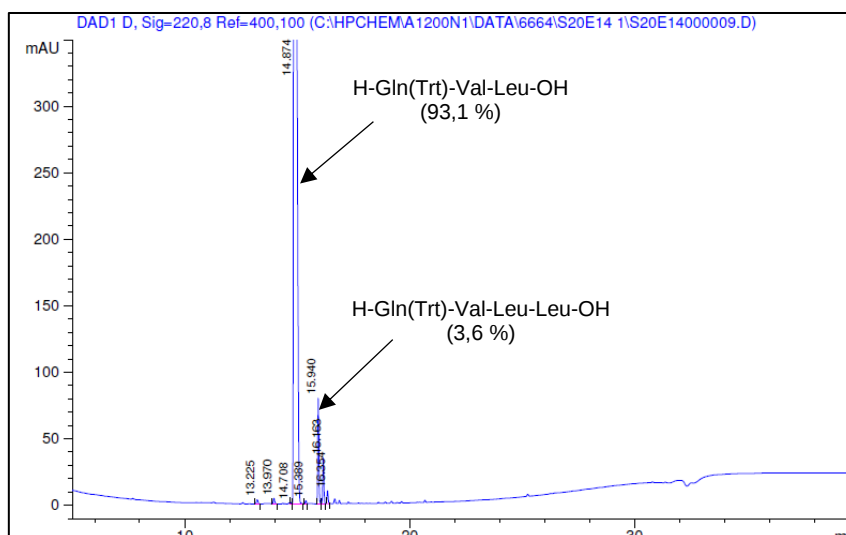
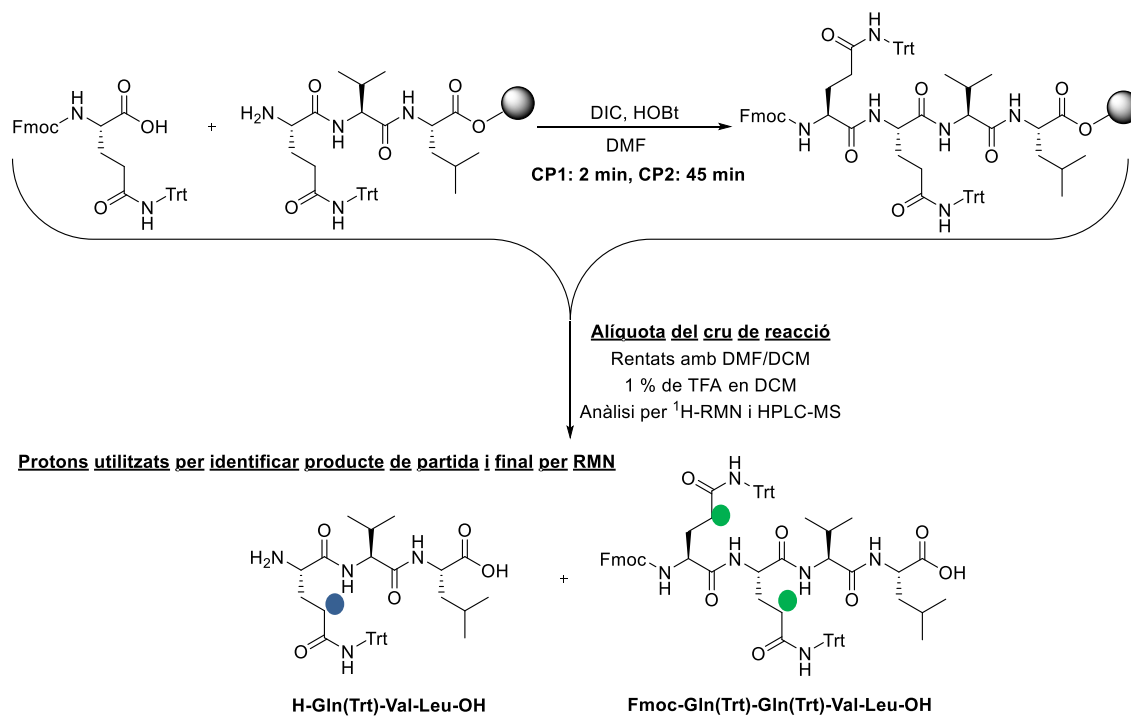


Figura 37. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de tripeptidil-resina després del tractament amb piperidina en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Donat que l'acoblament del tercer aminoàcid va ser pràcticament complet als 10 min de reacció, per acoblar el quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) es van reduir els temps pel seguiment de la reacció i poder comparar les anàlisis d'HPLC i el de ^1H -RMN. Així, es van prendre mostres de resina als 2 min (CP1) i als 45 min (CP2), amb tests de ninhidrina positiu i negatiu respectivament (**Esquema 33**). El cru acidolític resultants es van analitzar per ^1H -RMN (**Figura 38**) i per HPLC (**Figura 39** i **Figura 40**).

En la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMM del producte de partida (H-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, CP0) es va observar un triplet aparent a 2,55 ppm, corresponent als dos protons del grup metilè adjacent al grup carboxílic de la cadena lateral del residu d'aminoàcid de glutamina. Aquest senyal es va poder assignar per la seva multiplicitat, ja que és l'únic grup metilè de la cadena peptídica que s'acobla amb dos protons, i té un desplaçament químic (δ) compatible al de protons propers a un grup carboxilat. Als 2 min de reacció va aparèixer un multiplet a 2,30-2,50 ppm (CP1), i als 45 min (CP2) el triplet ja no es va detectar, observant-se únicament el multiplet abans esmentat amb un clar augment de la seva àrea. Aquest multiplet correspon als dos grups metilè adjacents als grups carboxílics de les dues cadenes laterals dels dos residus de glutamina del producte final (Fmoc-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH). La relació molar entre el producte de partida i el producte final als 2 min de reacció va ser d'1:0,4 respectivament.



Esquema 33. Protocol de seguiment per ^1H -RMN i HPLC-MS de l'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**.

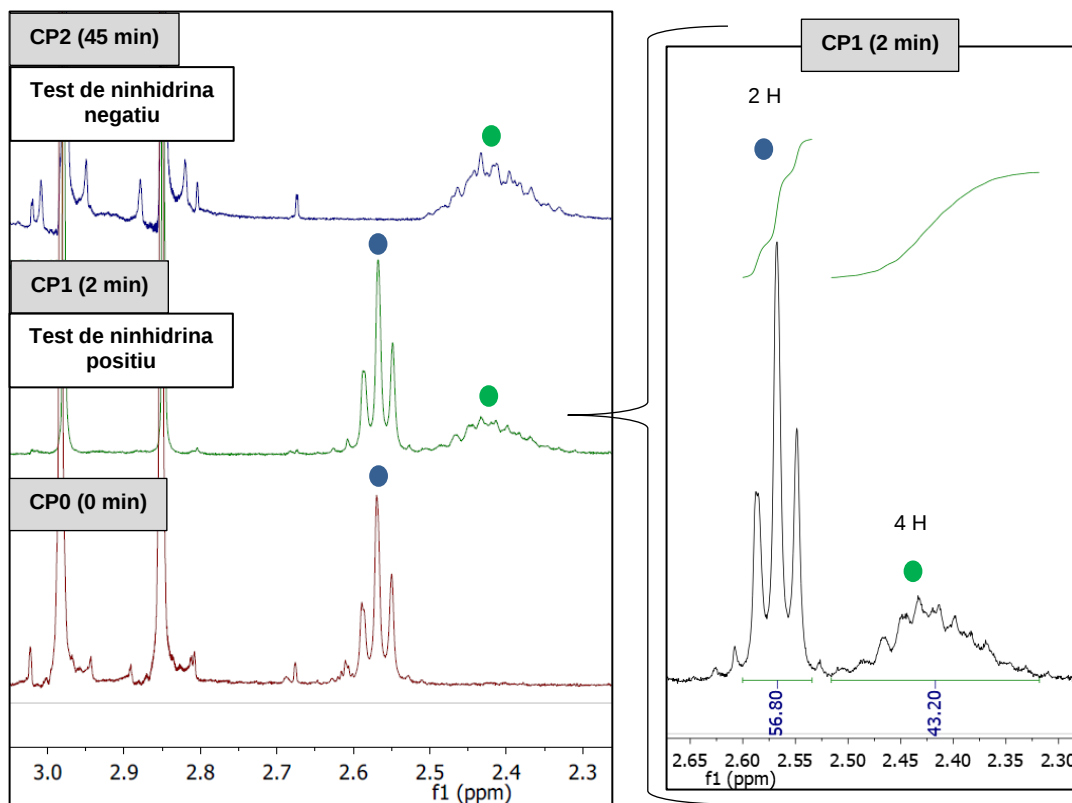


Figura 38. Regió alifàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'anàlitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP0), als 2 min d'acoblament (CP1) i als 45 min d'acoblament (CP2) en la síntesi de **7005_UB-23417**. Es destaca una ampliació de l'espectre de CP1.

Respecte les anàlisis d'HPLC, es va observar clarament en el cru dels 2 min de reacció (**Figura 39**) la presència del producte de partida (H-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 15,0 min) i del producte final (Fmoc-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 23,4 min). No obstant, els valors de les integracions d'àrees cromatogràfiques revelen una proporció entre els dos productes diferent a la determinada per RMN, de tal manera que el producte final seria el majoritari per HPLC. Aquest resultat s'explicaria pel fet que el tetrapèptid té un grup Fmoc i dos grups protectors tritil, a diferència del tripèptid, que no té grup Fmoc i solament un grup tritil. Cal esperar doncs un coeficient d'extinció molar superior pel producte final. Respecte l'anàlisi d'HPLC del cru als 45 min (**Figura 40**), no es va detectar producte inicial, el mateix resultat que es va obtenir per RMN i amb el test de ninhidrina.

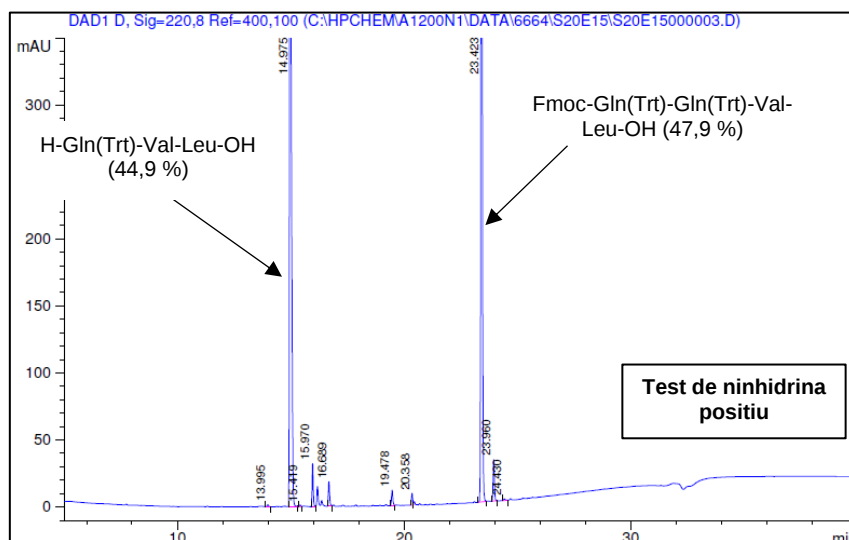


Figura 39. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda als 2 min d'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP1) en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

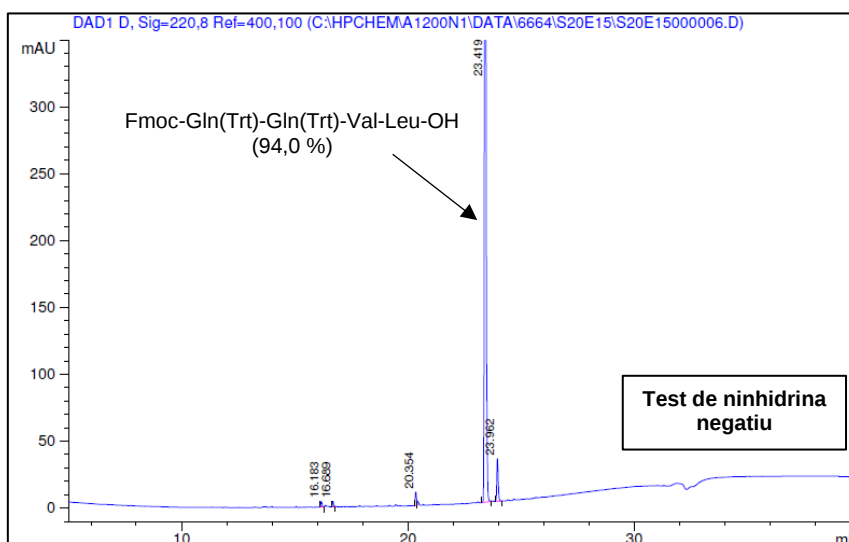
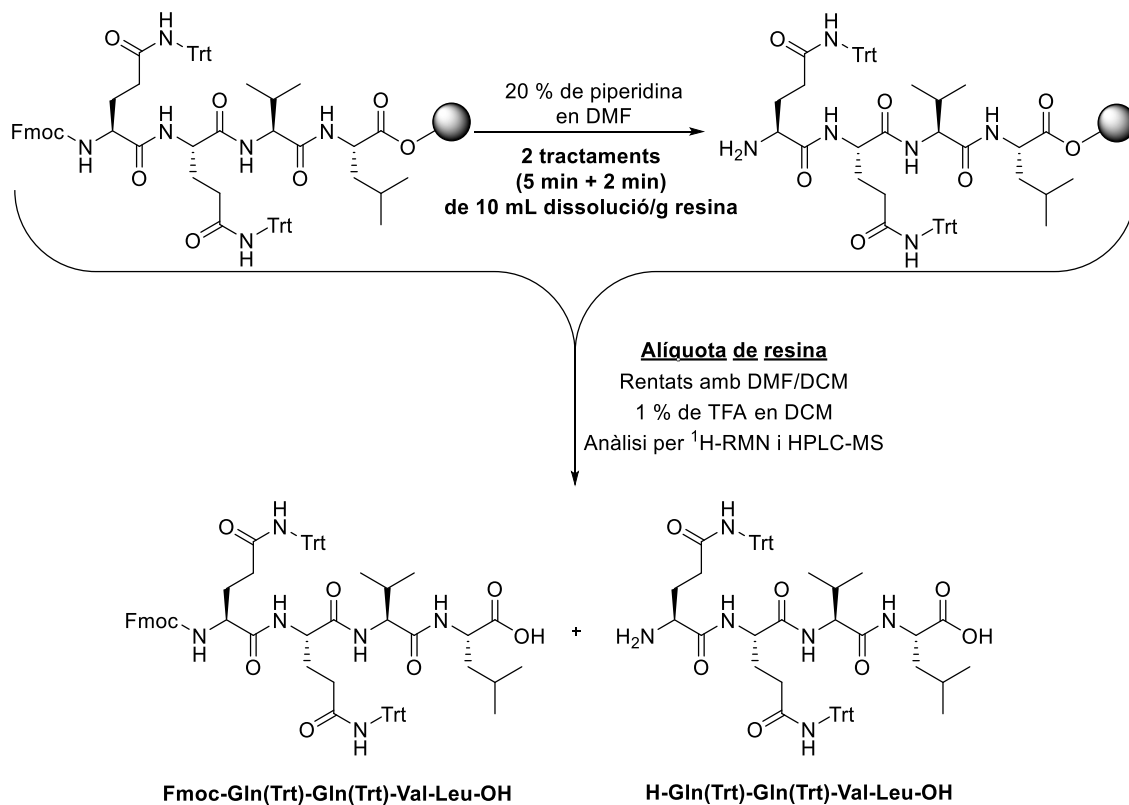


Figura 40. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina als 45 min d'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP2) en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Una vegada acoblat el quart aminoàcid, es va tractar la tetrapeptidil-resina amb piperidina per eliminar el grup Fmoc de l'extrem α -amino de la cadena peptídica i es va prendre una alíquota de resina (

Esquema 34). El cru resultant del tractament acidolític d'aquesta alíquota es va analitzar per ^1H -RMN (veure annex **Figura A1**) i per HPLC (**Figura 41**) seguint un protocol similar al ja descrit en aquest apartat. L'absència dels senyals aromàtics corresponents al grup Fmoc a l'espectre d' ^1H -RMN, i l'absència del pic cromatogràfic corresponent al producte de partida a l'anàlisi d'HPLC van indicar que la desprotecció del residu de glutamina havia estat completa utilitzant les condicions experimental habituals.



Esquema 34. Eliminació del grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN i HPLC després del tractament amb piperidina.

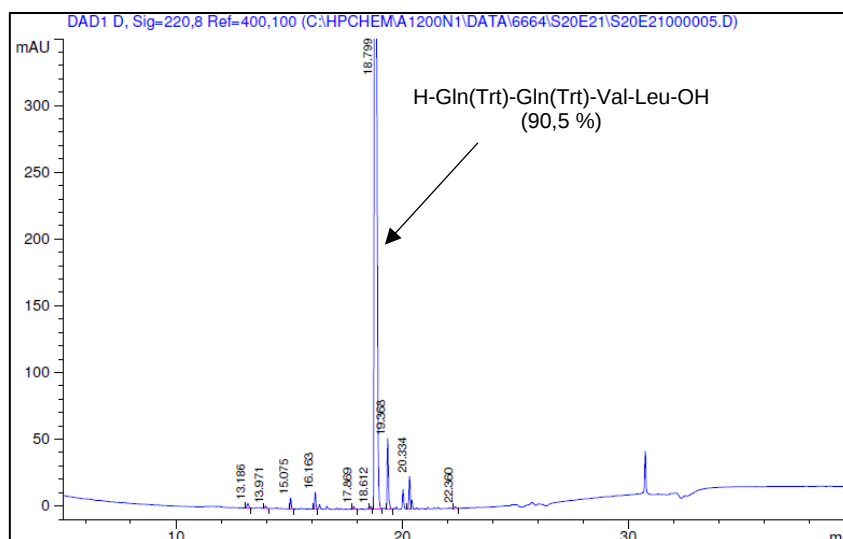
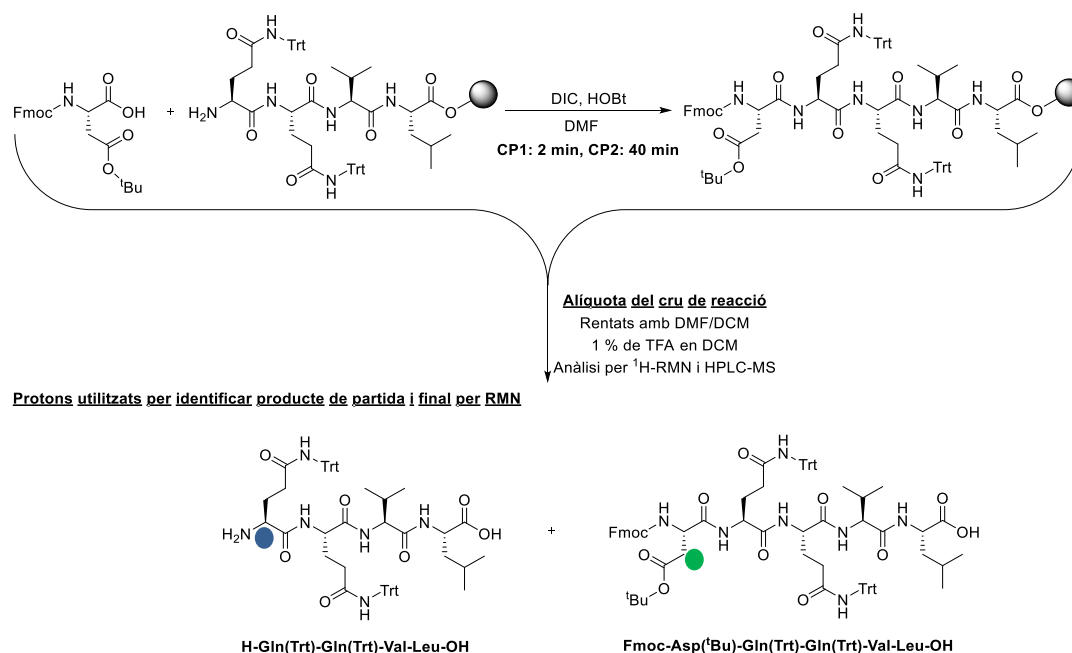


Figura 41. Cromatograma del cru acidolític d'una alíquota de tetrapeptidil-resina obtinguda després del tractament amb piperidina en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

El seguiment de l'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp('Bu)-OH) es va dur a terme als 2 min de reacció i als 40 min de reacció (**Esquema 35**), amb un test de ninhidrina positiu per als dos temps de reacció. A la **Figura 42** es mostra part de la zona alifàtica dels espectres dels crus acidolítics de mostres preses abans (CP0), als 2 min (CP1) i als 40 min (CP2) de l'acoblament. A l'espectre del ^1H -RMM del CP0 es va observar un triplet aparent a 3,75 ppm, és a dir, en la zona dels protons α dels residus d'aminoàcid. Per la multiplicitat del senyal pot correspondre a qualsevol dels protons α dels residus de l'aminoàcid glutamina o al protó α del residu de leucina. Aquest senyal va evolucionar amb el temps fins a pràcticament desaparèixer a l'espectre del CP2. Per altra banda, es va observar clarament l'aparició de dos doblets a 2,75 ppm i a 2,54 ppm, desplaçament químic compatible amb els dos protons diastereotòpics β del grup metilè de la cadena lateral del residu d'àcid aspàrtic incorporat a la cadena peptídica, és a dir, la part AB del sistema ABX típic de la cadena lateral de l'àcid aspàrtic. El senyal aïllat per identificar el producte final (Fmoc-Asp('Bu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH) va ser el doblet a 2,75 ppm, corresponent a un dels protons diastereotòpics, i es va comparar amb el triplet a 3,75 ppm del producte de partida (H-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH).



Esquema 35. Acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(^tBu)-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN i HPLC de dues mostres de resina recollides a diferents temps.

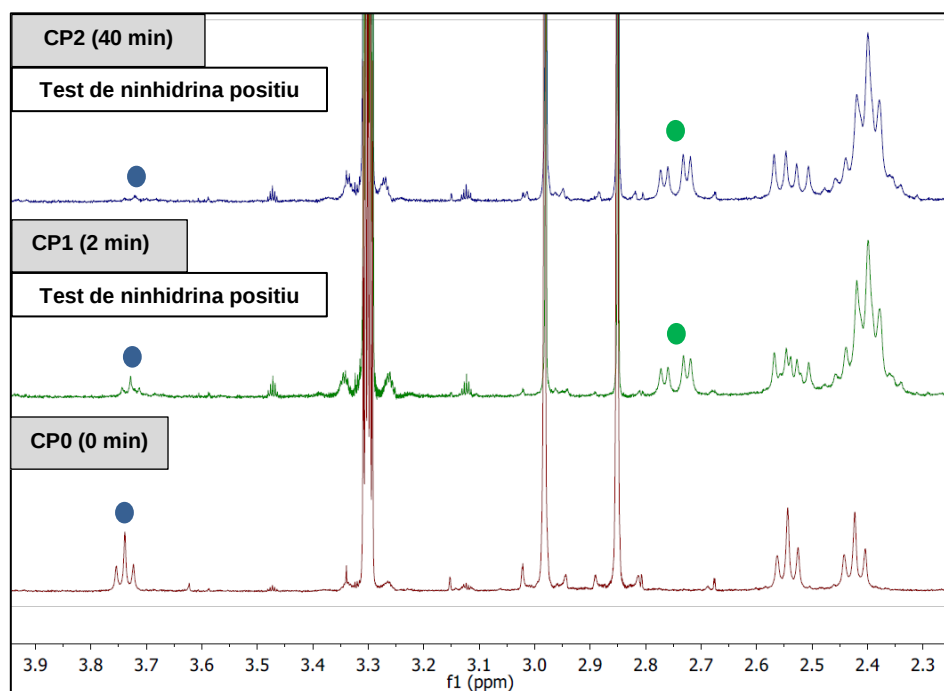


Figura 42. Part de la zona alifàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'anàlitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(^tBu)-OH) (CP0), als 2 min d'acoblament (CP1) i als 40 min d'acoblament (CP2) en la síntesi de **7005_UB-23417**.

La comparació de les àrees d'aquests dos senyals a l'espectre de CP1 va donar una relació molar producte de partida/producte final de 0,2:1 (**Figura 43**). En aquest mateix punt de la reacció, l'anàlisi d'HPLC del cru (**Figura 44**) va mostrar un 81,4 % del producte final (Fmoc-Asp(^tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 24,5 min) i un romanent del 8,6 % de producte de partida (H-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 18,9 min) sense reaccionar. De la mateixa manera que va

succeir a l'acoblament del quart aminoàcid, la proporció de producte final va ser major per HPLC que per RMN, resultat atribuïble a un factor de resposta del producte final superior al del producte inicial.

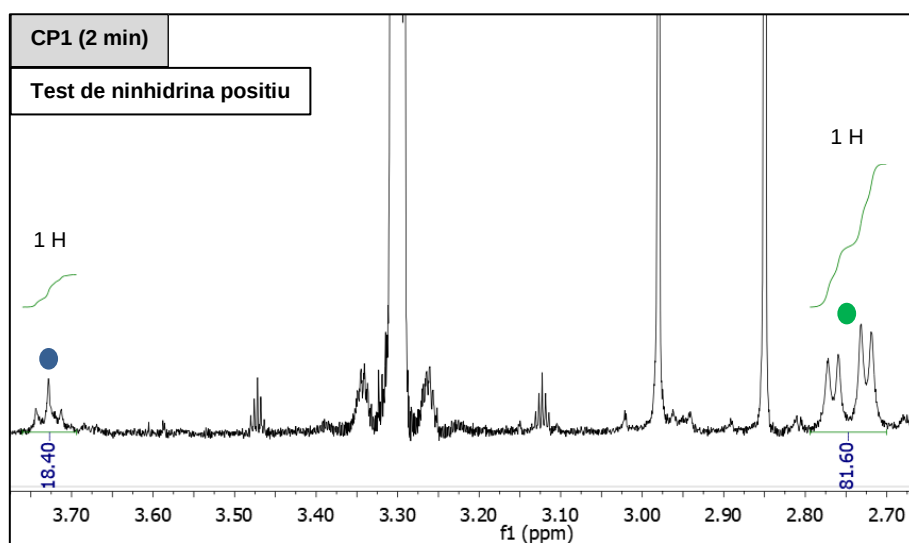


Figura 43. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (MeOD) obtingut a l'analitzar el cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina als 2 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(t Bu)-OH) (CP1) en la síntesi de **7005_UB-23417**.

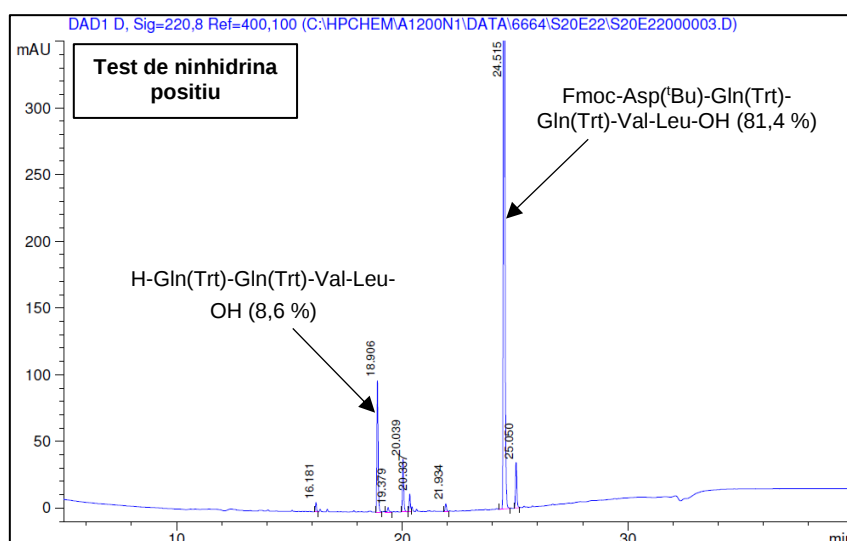


Figura 44. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda als 2 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(t Bu)-OH) (CP1) en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Als 40 min de reacció (CP2), el test de ninhidrina seguia indicant que la reacció no havia finalitzat i la relació molar producte de partida/producte final obtinguda per RMN en aquest punt va ser de 0,04:1 (**Figura 45**). En aquest mateix punt de la reacció, l'anàlisi d'HPLC del cru acidolític va mostrar que quedava un 0,1 % de producte de partida (H-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 18,9 min) sense reaccionar (**Figura 46**).

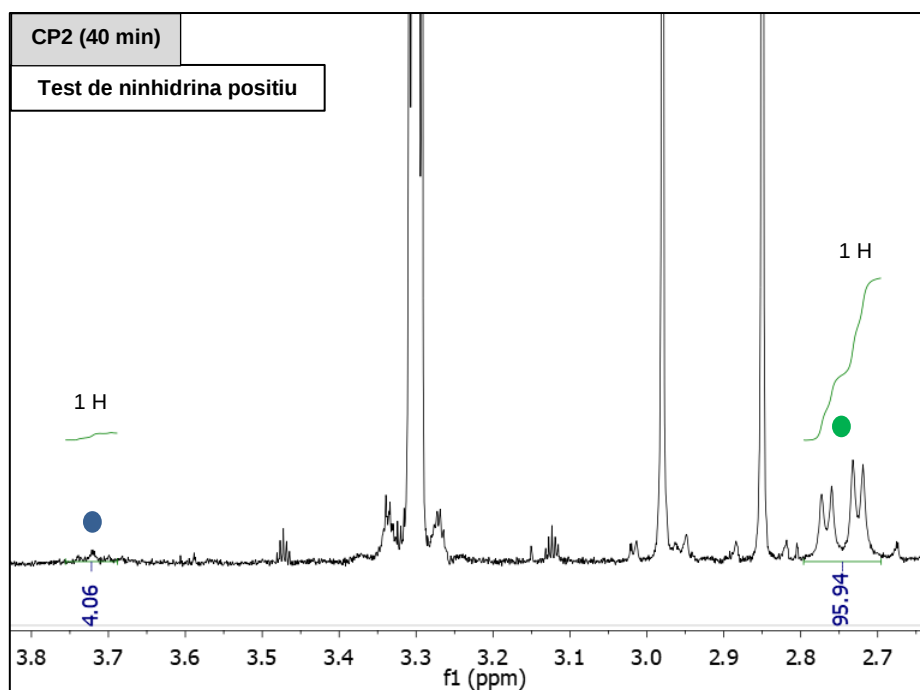


Figura 45. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (MeOD) obtingut a l'analitzar el cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina als 40 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp('Bu)-OH) (CP1) en la síntesi de **7005_UB-23417**.

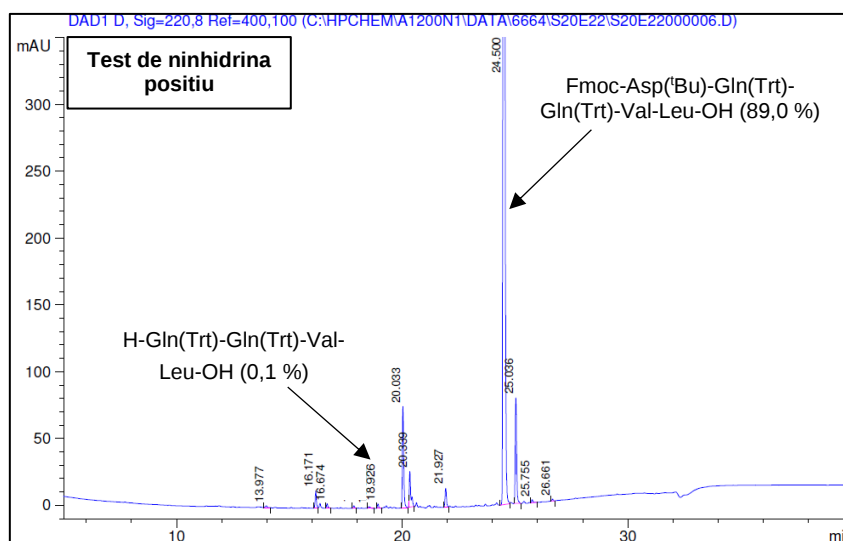
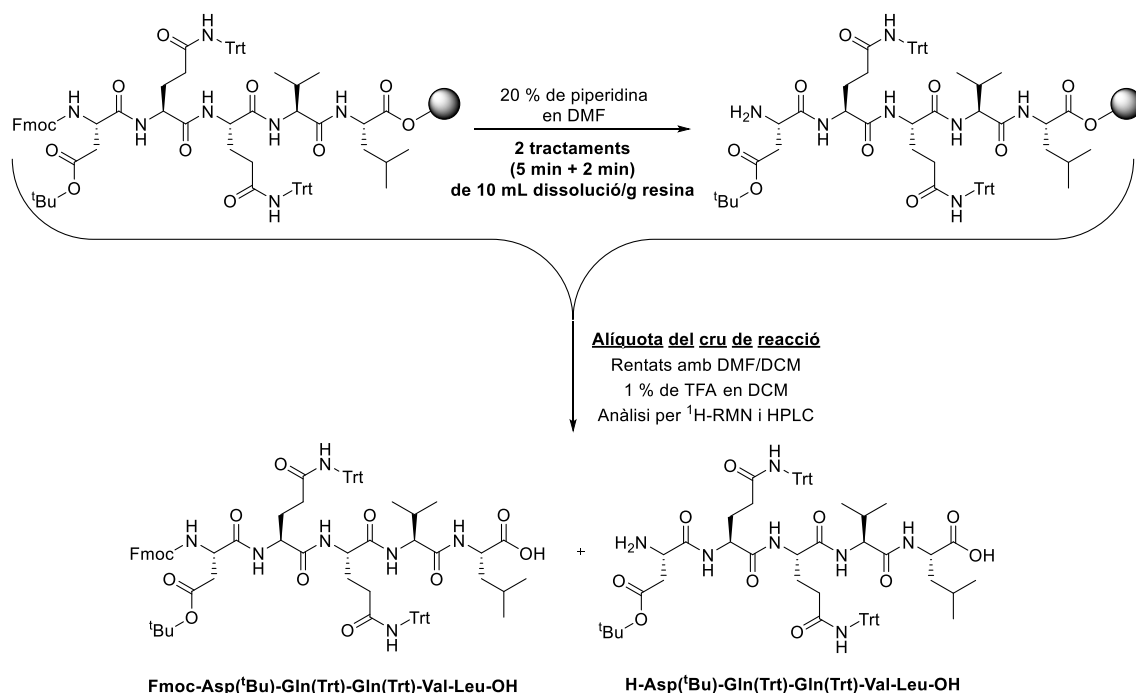


Figura 46. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda als 40 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp('Bu)-OH) (CP1) en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Malgrat detectar-se encara producte per ^1H -RMN, es va decidir seguir endavant amb la síntesi de **7005** ja que l'objectiu era desenvolupar un mètode de seguiment de les reaccions, no obtenir un producte d'elevada puresa, objectiu que es comentarà més endavant. Tal com s'ha descrit fins ara per la desprotecció del grup α -amino de la cadena peptídica, l'eliminació del grup Fmoc de la pentapeptidil-resina es va portar a terme sense cap problema amb les condicions experimentals estàndard (**Esquema 36**), és a dir, no es va observar producte de partida a l'espectre de ^1H -RMN (veure en annex **Figura A2**) ni a l'anàlisi d'HPLC (**Figura 47**).



Esquema 36. Eliminació del grup Fmoc del residu d'àcid aspàrtic en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN i HPLC després del tractament amb piperidina.

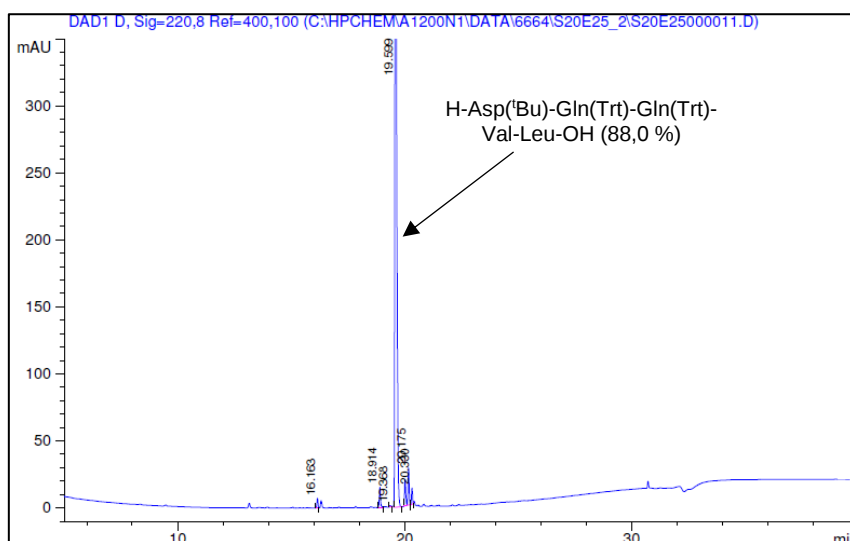
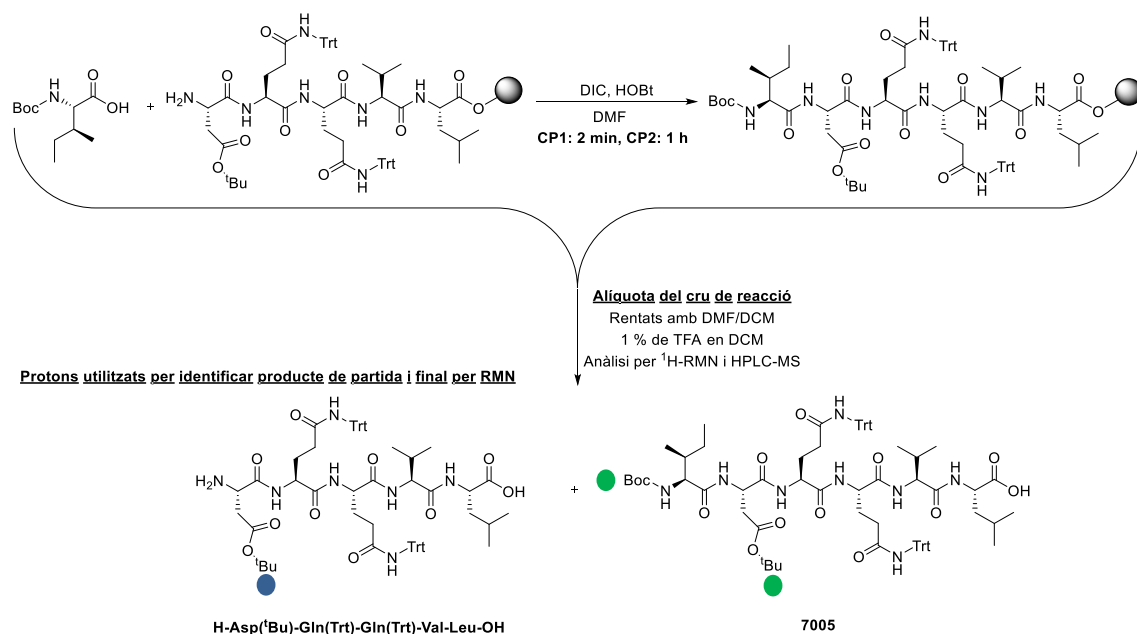


Figura 47. Cromatograma del cru acidolític d'una alíquota de pentapeptidil-resina obtinguda després del tractament amb piperidina en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

En l'acoblament del sisè i últim aminoàcid de la cadena peptídica de **7005** (Boc-Ile-OH), es van prendre mostres de la resina als 2 min de reacció (CP1) i a 1 h de reacció (CP2) (**Esquema 37**). En els dos casos els tests de ninhidrina van ser positius. Es va seguir el protocol habitual de presa de mostres, els crus acidolítics corresponents es van analitzar per ^1H -RMN i HPLC, i els resultats es van comparar amb els obtinguts abans d'acoblar. Tal com es mostra a la **Figura 48**, a l'espectre del ^1H -RMN del CP0 es va observar un singlet entre 1,45 ppm i 1,46 ppm corresponent als protons del grup ^tBu de la cadena lateral del residu d'àcid aspàrtic del pentapeptid de partida (H-Asp(^tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH). Aquest singlet va disminuir al llarg de la reacció d'acoblament, mentre que es va observar l'aparició d'un singlet a 1,40 ppm

(CP1 i CP2), corresponent als protons del grup ^tBu de la cadena lateral del residu d'àcid aspàrtic i del grup Boc de l'últim aminoàcid acoblat a la cadena peptídica, és a dir, els dos singlets de ^tBu del producte final (**7005**) coincideixen a l'espectre.



Esquema 37. Acoblament del sisè aminoàcid (Boc-Ile-OH) en la síntesi de **7005_UB-23417**. Protocol experimental per l'anàlisi per ¹H-RMN de mostres recollides a dos temps diferents.

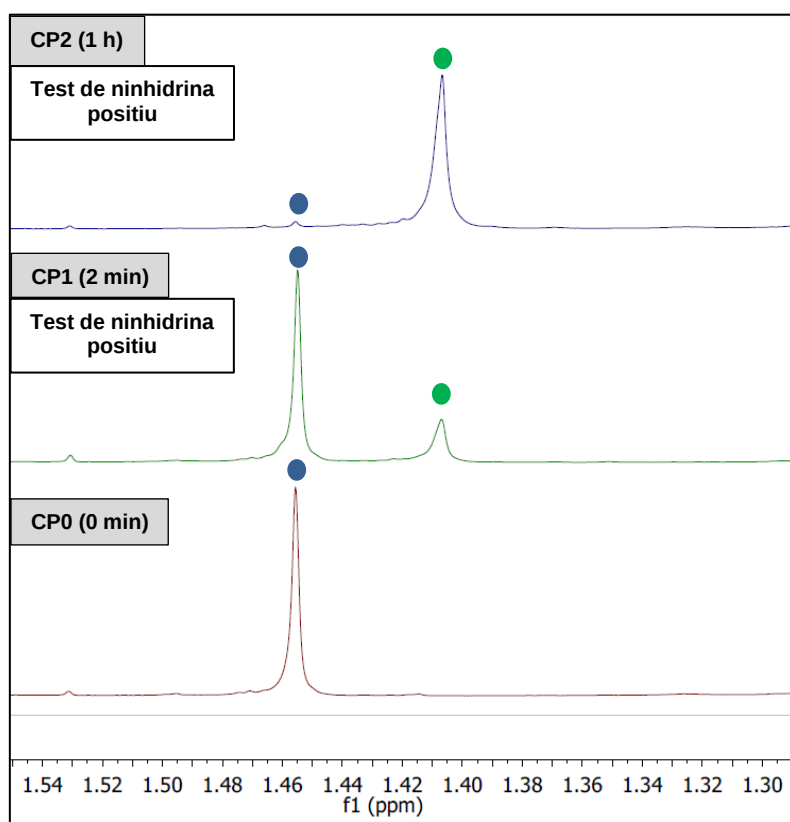


Figura 48. Part de la zona alifàtica dels espectres de ¹H-RMN (MeOD) obtinguts a l'anàlitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP0), als 2 min d'acoblament (CP1) i a 1 h d'acoblament (CP2) en la síntesi de **7005_UB-23417**.

La comparació de les integracions d'aquests dos singlets a l'espectre de CP1 va donar una relació molar entre producte de partida/producte final d'1:0,2 (**Figura 49**). En aquest mateix punt de la reacció, l'anàlisi d'HPLC del cru (**Figura 50**) va donar un 70,8 % de producte de partida (H-Asp(^tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH, 16,6 min) i un 13,3 % de producte final (**7005**, 24,4 min). Aquest valor s'aproxima més al ¹H-RMN en aquest cas concret ja que no s'espera una diferència important de coeficients d'extinció molar entre el producte de partida i el producte final.

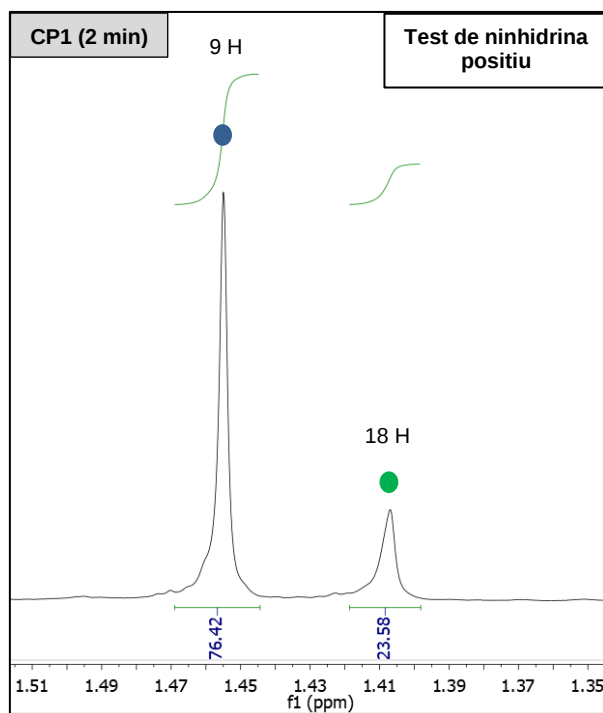


Figura 49. Part de la regió alifàtica de l'espectre de ¹H-RMN (MeOD) del cru de reacció obtingut després de l'escissió als 2 min de reacció d'acoblament del 6è sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP1).

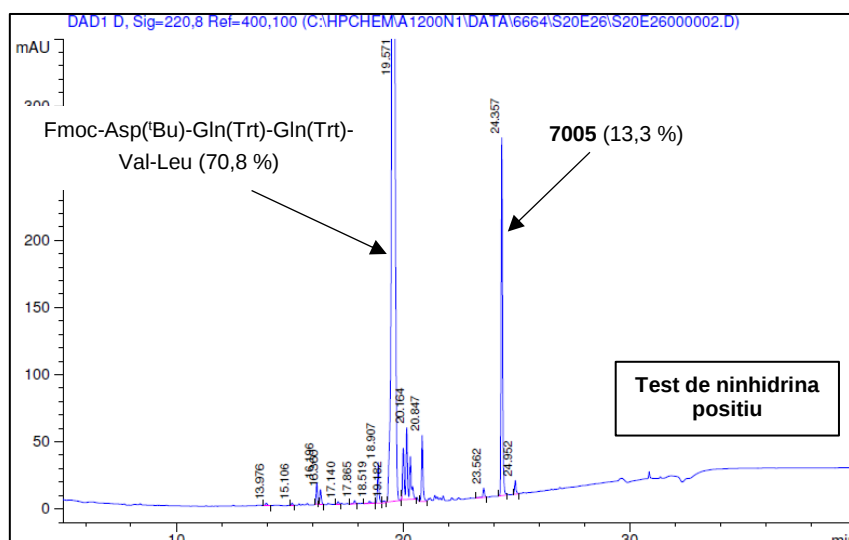


Figura 50. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra obtinguda als 2 min d'acoblament del sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP1) en la síntesi de **7005_UB-23417**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Després d'1 h de reacció (CP2), el test de ninhidrina seguia indicant que la reacció no havia finalitzat. Com es pot veure en l'ampliació de la zona alifàtica de l'espectre de ¹H-RMN del CP2

(Figura 51), encara es detectava el singlet entre 1,45-1,46 ppm, corresponent al producte de partida, amb una relació molar entre producte de partida/producte final de 0,04:1. L'anàlisi d'HPLC del cru acidolític va revelar un 3,5 % de producte de partida sense reaccionar (Figura 52).

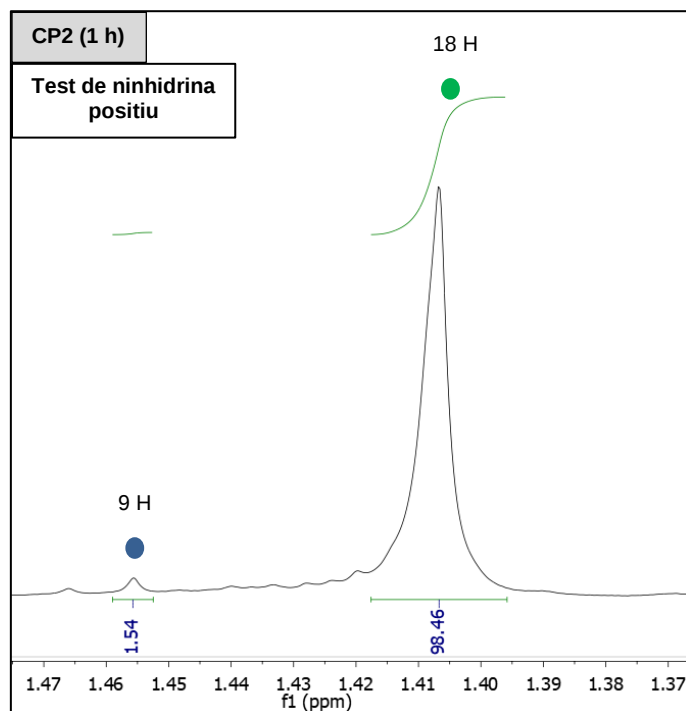


Figura 51. Part de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (MeOD) del cru de reacció obtingut després de l'escissió als 60 min de reacció d'acoblament del sisè aminoàcid (CP2).

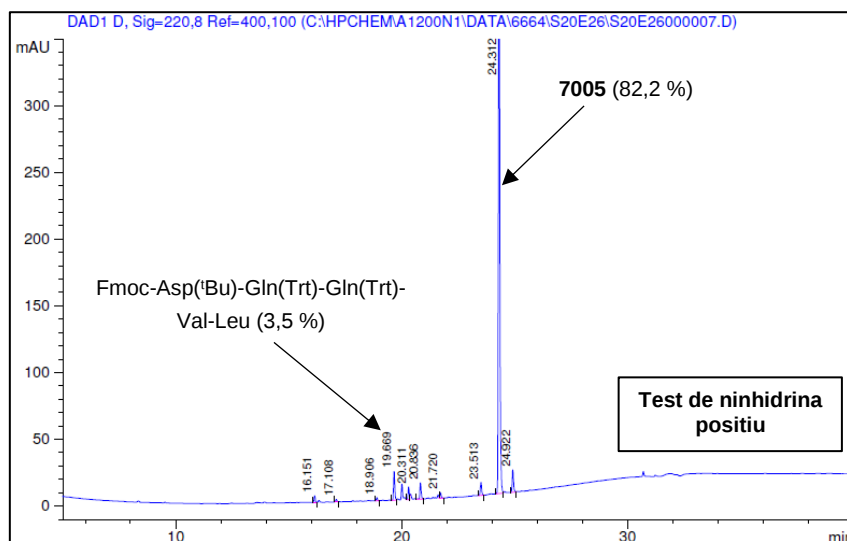


Figura 52. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda després d'1 h d'acoblament del sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Com a conclusió, s'han pogut seguir les reaccions d'acoblament i desprotecció dels diferents aminoàcids de la cadena peptídica de 7005 mitjançant el test de ninhidrina, ^1H -RMN i HPLC-MS i els resultats obtinguts s'han comparat, tal com es mostra en la Taula 16. Els resultats dels tests

de ninhidrina van ser coherents amb els de ^1H -RMN i HPLC, ja que les 3 tècniques analítiques van revelar acoblaments/desproteccions complets/tes. Com s'esperava, la quantificació per integració dels senyals de ^1H -RMN va donar millors resultats que la integració d'àrees de pics d'HPLC, degut a l'afectació que té en la detecció per UV-Vis la presència o no de cromòfors a la cadena peptídica. Per contra, l'instrument RMN utilitzat en aquest treball té un límit de detecció al voltant de l'1 %, proporcionant per tant una sensibilitat més baixa que l'assolida amb la tècnica d'HPLC. La metodologia de seguiment de les reaccions en fase sòlida que s'ha desenvolupat en aquesta Tesi Doctoral ha demostrat ser molt útil en el cas del pèptid **7005**, i sense cap dubte pot ser aplicada a altres casos per analitzar la construcció de la cadena peptídica. No obstant, l'anàlisi per ^1H -RMN serà factible sempre i quan es puguin identificar i caracteritzar senyals aïllades que facilitin la quantificació de reactius i productes, és a dir, la longitud de la cadena peptídica podria dificultar a partir d'un determinat moment aquest anàlisi degut a la complexitat de l'espectre. Pel que fa a l'HPLC-MS, la presència o no de cromòfors, així com en número i la varietat dels mateixos, poden dificultar la quantificació de reactius i productes, però resulta una eina indispensable per a la detecció i caracterització d'impureses.

Taula 16. Comparació dels resultats obtinguts per test de ninhidrina, ¹H-RMN i HPLC en el seguiment de les reaccions d'acoblament i eliminació del grup Fmoc en la síntesi de **7005_UB-23417**.

Etapla	Producte final	Test ninhidrina (temps de reacció)	¹ H-RMN	HPLC		
			Relació molar producte de partida/producte final	Temps retenció producte final (min)	% Producte final	% Producte de partida
Acoblament Fmoc-Val-OH	Fmoc-Val-Leu-OH	Negatiu (1 h)	0:1	-	-	-
Eliminació grup Fmoc	H-Val-Leu-OH	-	0:1	-	-	-
Acoblament Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Gln(Trt)-Val-Leu-OH	Positiu (10 min)	0,1:1	-	-	-
		Negatiu (1 h)	0:1	20,7	94,8	-
Eliminació grup Fmoc	H-Gln(Trt)-Val-Leu-OH	-	0:1	14,9	91,1	n.d
Acoblament Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH	Positiu (2 min)	1:0,4	23,4	47,9	44,3
		Negatiu (45 min)	0:1	23,4	94,0	n.d
Eliminació grup Fmoc	H-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH	-	0:1	18,8	90,5	n.d
Acoblament Fmoc-Asp(^t Bu)-OH	Fmoc-Asp(^t Bu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH	Positiu (2 min)	0,2:1	24,5	81,4	8,6
		Positiu (40 min)	0,04:1	24,5	89,0	0,1
Eliminació grup Fmoc	H-Asp(^t Bu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Val-Leu-OH	-	0:1	19,6	88,0	n.d
Acoblament Boc-Ile-OH	7005	Positiu (2 min)	1:0,2	24,4	13,3	70,8
		Positiu (1 h)	0,04:1	24,3	82,2	3,5

4.3.4. CARACTERITZACIÓ D'IMPURESES

Durant l'estudi per a desenvolupar un mètode pel seguiment de la síntesi en fase sòlida dels fragments peptídics **7411** i **7005**, es van dur a terme tractaments acidolítics d'alíquotes de resina i els crus resultants es van analitzar per HPLC-MS i/o ^1H -RMN. Aquests experiments van donar informació sobre el desenvolupament de la síntesi dels fragments peptídics, posant de relleu la formació de subproductes en algunes etapes del procés. A continuació es descriu la caracterització de les impureses que es van considerar més importants.

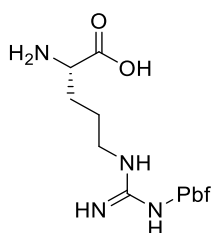
4.3.4.1. ACOBLAMENT DE FMOC-GLU('BU)-OH EN LA SÍNTESI DE 7411_UB-21550

La primera vegada que es va dur a terme el tractament acidolític d'una alíquota de resina pel seguiment de la reacció va ser en l'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Glu('Bu)-OH) en la síntesi de **7411_UB-21550**. En l'anàlisi per HPLC del cru acidolític a les 6 h de reacció (**Figura 24**, apartat 4.3.3.1.1) es van detectar tres impureses a temps de retenció 9,8 min (6,5 %), 21,1 min (1,5 %) i 22,9 min (12,3 %). Aquestes impureses van ser elucidades a través d'HPLC-MS tal i com es descriu en els següents apartats.

4.3.4.1.1. IMPURESA A 9,8 MIN (H-ARG(Pbf)-OH)

L'espectre de masses exactes de la impuresa a 9,8 min va donar un pic molecular $[M+H]$ amb m/z de 427,2008. Aquesta impuresa es va detectar en els crus acidolítics del nonapèptid **7411** dels lots **UB-21550**, **UB-21578** i **UB-23401** (**Figura 22**, apartat 4.3.2.2.2), però amb un percentatge minoritari en tots els casos (0,2-0,3 %); en el cru de **7411_UB-21531** no es va detectar. Es va voler conèixer la estructura d'aquesta impuresa encara que no impactava significativament en la puresa cromatogràfica del producte final, però si s'observava en percentatges majoritaris durant la síntesi.

Un valor de m/z de 427,2008 per $[M+H]$ era compatible amb l'aminoàcid protegit H-Arg(Pbf)-OH, el primer residu de la cadena peptídica de **7411** (**Figura 53**).



m/z 426,1937

Figura 53. Estructura de l'aminoàcid H-Arg(Pbf)-OH.

Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, en la síntesi de **7411_UB-21578** es va analitzar per HPLC el cru acidolític d'una mostra d'aminoàcid-resina després d'eliminar el grup Fmoc de l'aminoàcid Fmoc-Arg(Pbf)-OH acoblat a la resina 2-CTC. L'anàlisi del cru va mostrar un pic majoritari a 9,7 min, la qual cosa confirmava la hipòtesi (**Figura 54**).

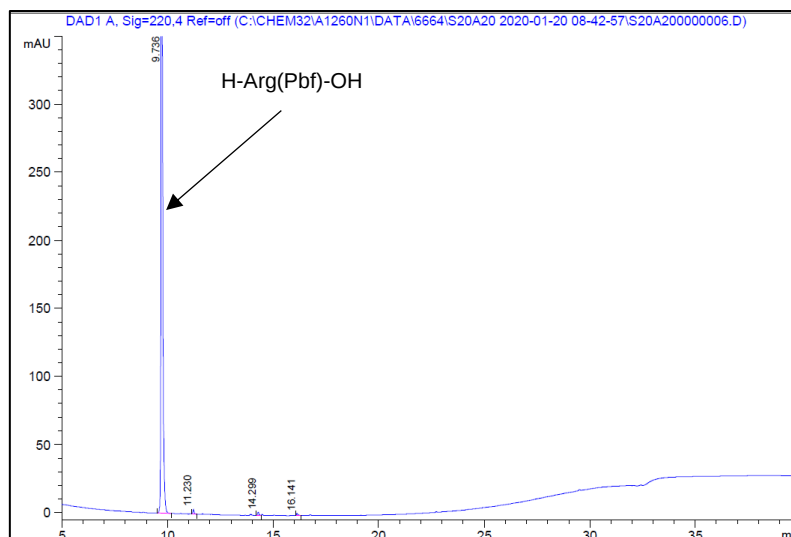


Figura 54. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra d'aminoàcid-resina després d'eliminar el grup Fmoc de l'aminoàcid Fmoc-Arg(Pbf)-OH acoblat a la resina 2-CTC en la síntesi de **7411_UB-21578**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Per tal de disposar d'alguna evidència sobre l'origen de la impuresa H-Arg(Pbf)-OH, es va prendre una mostra després de portar a terme el segon acoblament (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de **7411_UB-21578**. El cru acidolític corresponent es va analitzar per HPLC (**Figura 55**), detectant-se el producte de partida (H-Arg(Pbf)-OH, 9,8 min) amb un 2,1 %. Cal remarcar que els tests de ninhidrina dels acoblaments on les anàlisis d'HPLC van mostrar la presència de H-Arg(Pbf)-OH van ser negatius en tots els casos i no hi ha una explicació plausible per a la presència d'aquest aminoàcid als crus acidolítics, llevat que la raó fos la hipòtesi que es planteja en l'**Esquema 39** (veure apartat 4.3.4.1.3).

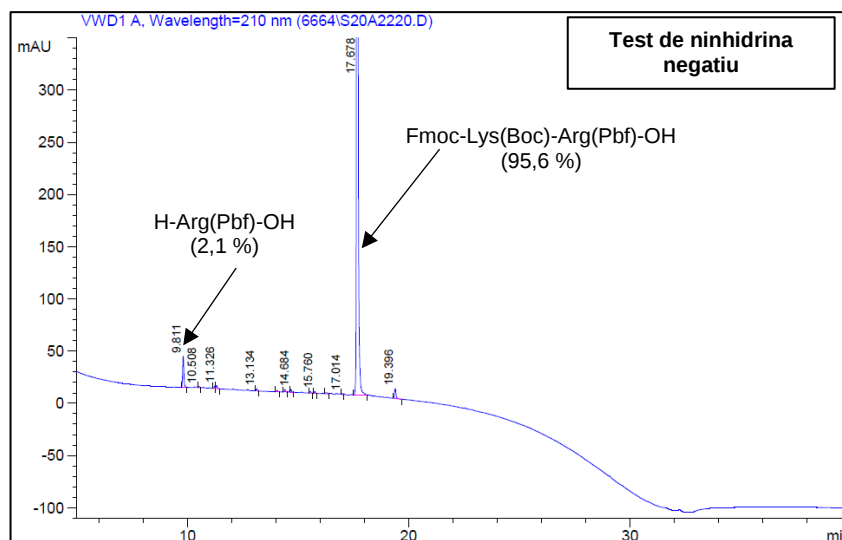


Figura 55. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de dipeptidil-resina presa una vegada l'acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) va donar un test de ninhidrina negatiu en la síntesi de **7411_UB-21578**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

4.3.4.1.2. IMPURESA A 21,1 MIN (Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH)

En l'espectre de masses exactes de la impuresa a 21,1 min es va observar el pic molecular $[M+H]$ amb m/z de 1583,7849. La impuresa va evolucionar al llarg de la síntesi, ja que va ser sensible a la piperidina utilitzada per a eliminar els grups Fmoc, i a les condicions experimentals utilitzades per acoblar els aminoàcids. Així, en cada cicle de desprotecció/acoblament, es van detectar les impureses relacionades.

El valor de m/z era compatible amb el tetrapèptid esperat com a producte final més un residu d'arginina, molt probablement com a segon aminoàcid de la cadena peptídica (**Figura 56**).

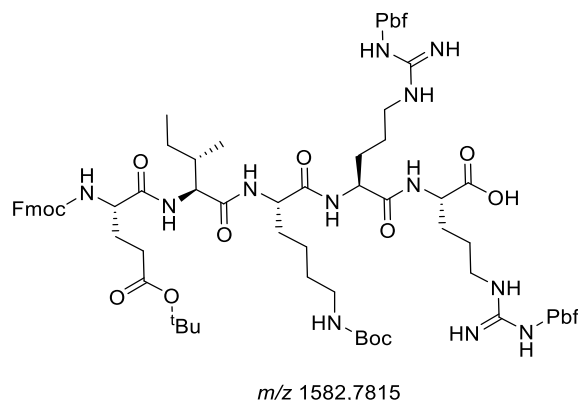


Figura 56. Estructura de la impuresa Fmoc-Glu(^tBu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH.

Per tal d'esbrinar en quin punt de la síntesi es formava aquesta impuresa, es va aprofitar la síntesi de **7411_UB-23401** per fer un seguiment per HPLC en les primeres etapes. Tant en el cru acidolític de l'aminoacil-resina després l'acoblament del primer aminoàcid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) com en el cru acidolític després de l'eliminació del grup Fmoc de l'aminoàcid ancorat en la resina, no es va detectar per HPLC la formació de dipèptid d'arginines. En canvi, un cop finalitzat l'acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH), l'anàlisi per HPLC-MS del cru acidolític (**Figura 57**) va mostrar una impuresa a 19,1 min. L'espectre de masses d'aquesta impuresa mostrava el pic base a m/z 1285,6040, massa compatible amb el pèptid Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH (**Figura 58**). Si s'allarga aquesta cadena amb un residu de leucina (tercer aminoàcid) i un residu d'àcid glutàmic (quart aminoàcid), s'arriba a un fragment protegit amb la mateixa massa de la impuresa de 21,1 min trobada en la síntesi de **7411_UB-21550**, la qual cosa confirma la identitat d'aquesta impuresa. Molt probablement aquest acoblament no desitjat d'arginina està relacionat amb la impuresa que es va observar a 9,8 min en la síntesi de **7411_UB-21550** (H-Arg(Pbf)-OH, veure apartat 4.3.4.1.1).

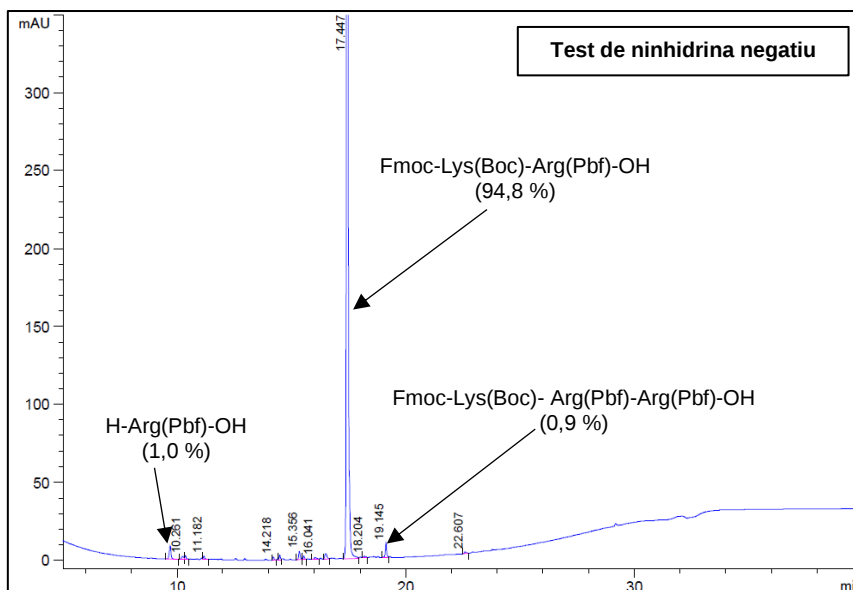


Figura 57. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra presa una vegada es va acoblar el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de **7411_UB-23401**. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

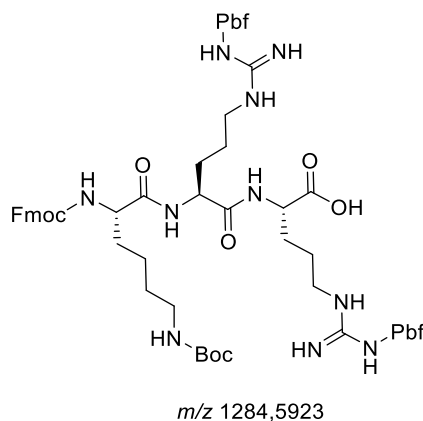
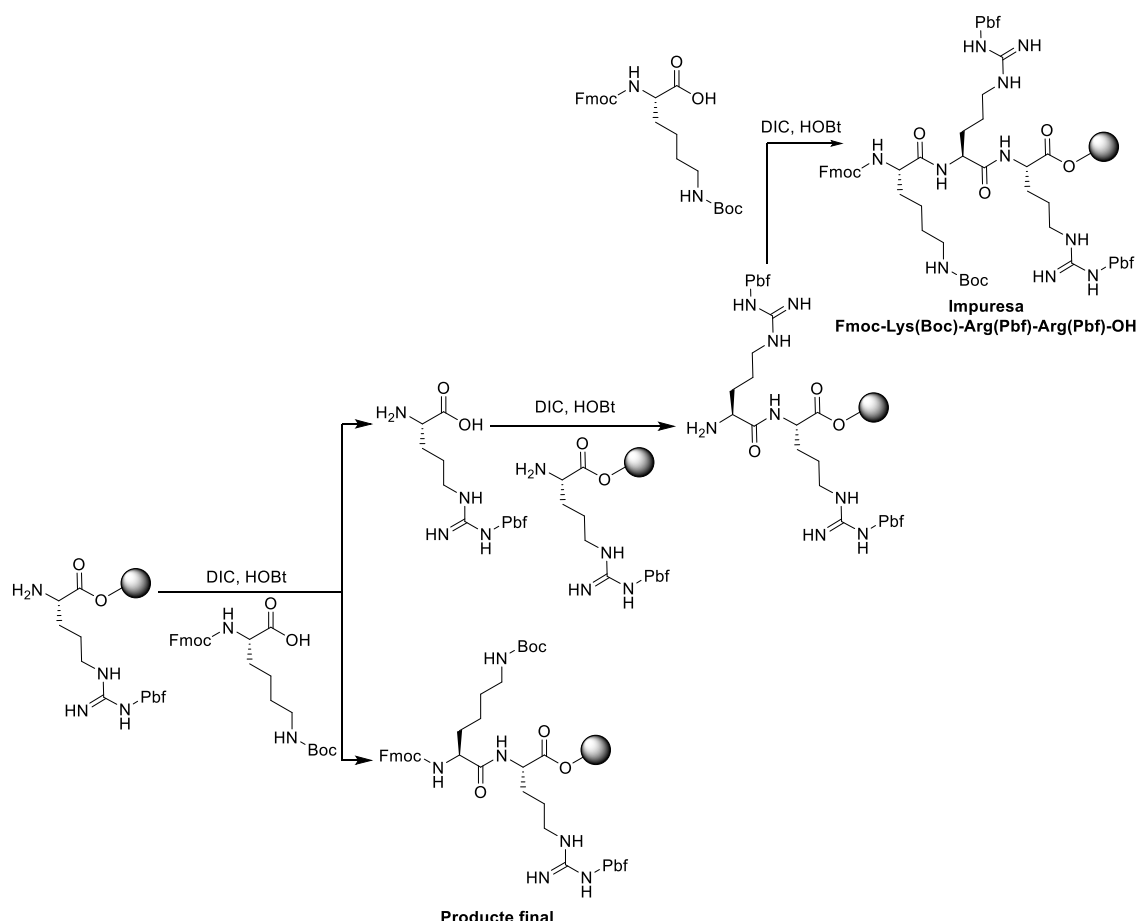


Figura 58. Estructura de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH.

Pel que s'ha comentat en aquest apartat i en l'anterior, sembla ser que la formació de subproductes té a veure amb l'alliberament prematur de la resina del primer aminoàcid acoblat (H-Arg(Pbf)-OH). En aquest sentit, s'ha descrit a la literatura que un dels problemes de la síntesi de pèptids utilitzant la resina 2-CTC és l'especial labilitat de l'enllaç èster entre la resina i el primer aminoàcid de la seqüència peptídica a les condicions àcides.¹¹⁹ L'estabilitat d'aquest enllaç es veu reforçada per la incorporació posterior d'aminoàcids mitjançant efectes inductius de la cadena peptídica sobre l'enllaç èster. Tanmateix, la utilització d'HOBt en els acoblaments compromet l'estabilitat d'aquest l'enllaç degut al caràcter lleugerament àcid de l'additiu. Així, durant l'acoblament del segon aminoàcid part del primer aminoàcid ja acoblat es podria escindir de la resina per aquest motiu, de tal manera que l'aminoàcid alliberat podria reacoblar-se al primer aminoàcid ja acoblat a la resina. El mecanisme d'aquest procés prenent com a exemple la síntesi de **7411** es mostra en l'**Esquema 38**.



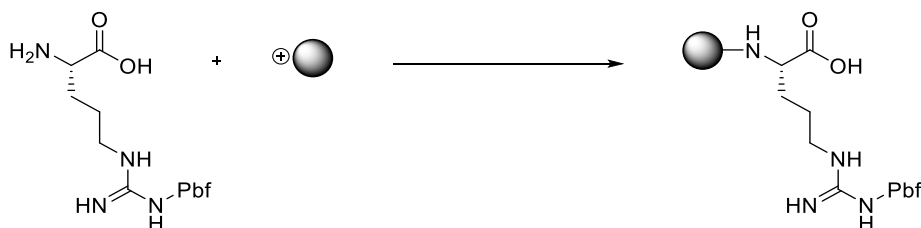
Esquema 38. Mecanisme proposat per la formació de la impuresa Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH en presència de DIC i HOBT com a conseqüència de l'escissió prematura de l'aminoàcid arginina acoblat a la resina.

Per tal de minimitzar l'escissió prematura de l'enllaç èster entre el primer aminoàcid de la seqüència peptídica i la resina 2-CTC, s'ha proposat, per exemple, l'ús de l'additiu K-Oxyma, ja que al ser una sal potàssica, no té el caràcter àcid de la OxymaPure, un dels additius més rellevants alternatius a l'HOBT.¹²⁰

Des d'un punt de vista d'economia de procés, la K-Oxima és menys assequible que l'HOBT. En aquest sentit cal dir que, tal com s'ha dit abans, l'estabilitat de l'enllaç èster entre la cadena peptídica i la resina millora a partir de la incorporació del segon aminoàcid a la resina 2-CTC. Per tant, es podria utilitzar el sistema DIC/HOBT pels acoblaments de la resta d'aminoàcids de la cadena peptídica. Cal dir també que des de fa temps l'HOBT es comercialitza monohidratat per augmentar la seva estabilitat, fet que permet un ús més segur del reactiu.

Així doncs, sembla clar que part de l'arginina es desancora prematurament de la resina per formar la impuresa Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH. Aquest aminoàcid es podria tornar a unir a la resina segons el mecanisme que es proposa a l'**Esquema 39**, al ser l'àtom d nitrogen més nucleòfil. Aquest mecanisme explicaria la presència d'un 2,1 % de H-Arg(Pbf)-OH al cru acidolític després de l'acoblament del segon aminoàcid en la síntesi de **7411_UB-21578 (Figura 55, apartat 4.3.4.1.1)**, encara que el test de ninhidrina indicava prèviament que la reacció havia finalitzat. Per altra banda, la presència de H-Arg(Pbf)-OH a l'anàlisi d'HPLC que es va realitzar

després del quart acoblament en la síntesi de **7411_UB-21550** (**Figura 24**, apartat 4.3.3.1.1) es podria explicar per l'alliberament parcial en condicions acidolítiques de l'aminoàcid reacoblat.



Esquema 39. Mecanisme proposat per la formació de la impuresa H-Arg(Pbf)-OH durant l'acoblament del segon aminoàcid (veure **Esquema 38**).

4.3.4.1.3. IMPURESA A 22,9 MIN (DIOP)

L'espectre de masses exactes de la impuresa a 22,9 min va donar un pic molecular $[M+H]$ amb m/z de 391,2892. Aquesta impuresa no va evolucionar durant la síntesi, és a dir, va ser estable als tractaments amb piperidina per desprotegir els grups α -amino, i als reactius per acoblar els diferents aminoàcids. Aquesta impuresa ja s'havia observat en el cru acidolític de **7411_UB-21531** amb un 5,3 % (**Figura 22**, apartat 4.3.2.2.2), per tant, tenia impacte en la puresa cromatogràfica del producte final i era important conèixer la seva estructura per tal d'evitar la seva formació.

Donat que la impuresa no semblava ser peptídica i era molt hidrofòbica segons el seu temps de retenció, es va plantejar la possibilitat de que fos una contaminació aliena a la síntesi. Així, tenint en compte que el tractament acidolític es feia en xeringues de polipropilè, que les mostres d'HPLC es preparaven utilitzant pipetes Pasteur del mateix material i que el DCM s'emmagatzemava en recipients de plàstic, es va cercar informació en un document que tractava sobre diferents additius del plàstic, i es va trobar com a possible estructura l'agent plastificant ftalat de diisooctil (DIOP, **Figura 59**).

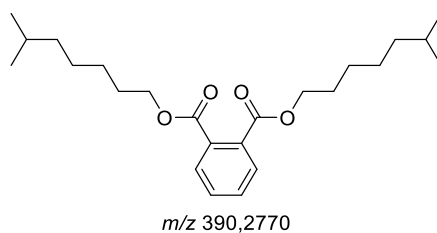


Figura 59. Estructura del ftalat de diisooctil, contaminant trobat a la síntesi de **7411** en els lots **UB-21531** i **UB-21550**.

Un cop trobada una possible estructura, es va decidir iniciar una investigació per tal de determinar d'on provenia la impuresa que es va detectar en el cru de reacció. Així, una alíquota de resina 2-CTC es va rentar en una xeringa amb DCM, el rentat es va recollir en el matràs i es va analitzar per HPLC (**Figura 60**). Com es pot comprovar a la figura, en l'anàlisi d'HPLC es va detectar el pic corresponent al DIOP (22,9 min).

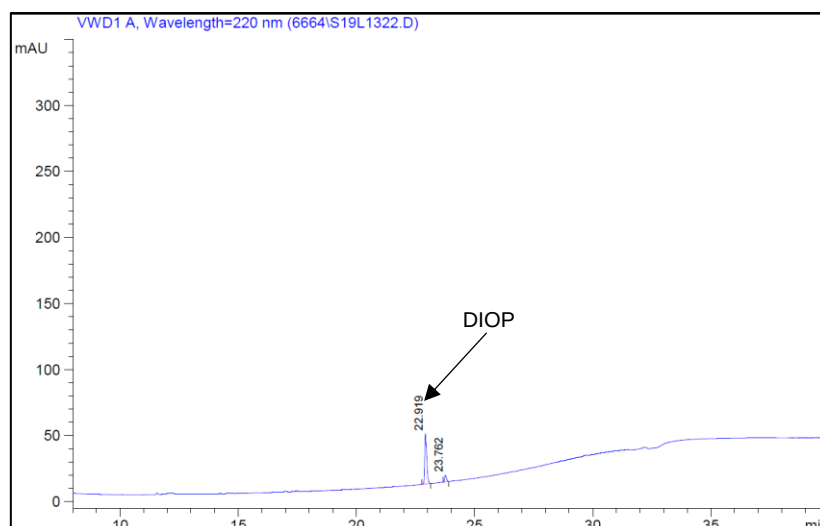


Figura 60. Cromatograma del rentat de la resina 2-CTC amb DCM. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

Per tal de comprovar si l'additiu provenia del DCM, es va prendre una mostra del dissolvent de la garrafa amb una cànula d'acer inoxidable i es va dur a terme un anàlisi d'HPLC, però no es va observar la impuresa (**Figura 61, A**). No obstant, es va detectar DIOP (22,9 min) en una mostra de DCM presa de la mateixa garrafa amb un dispensador de plàstic (**Figura 61, B**), el qual s'havia utilitzat per la presa de DCM durant les síntesis de **7411**, confirmant d'aquesta manera que la impuresa provenia del dispensador, motiu pel qual es va retirar aquest material.

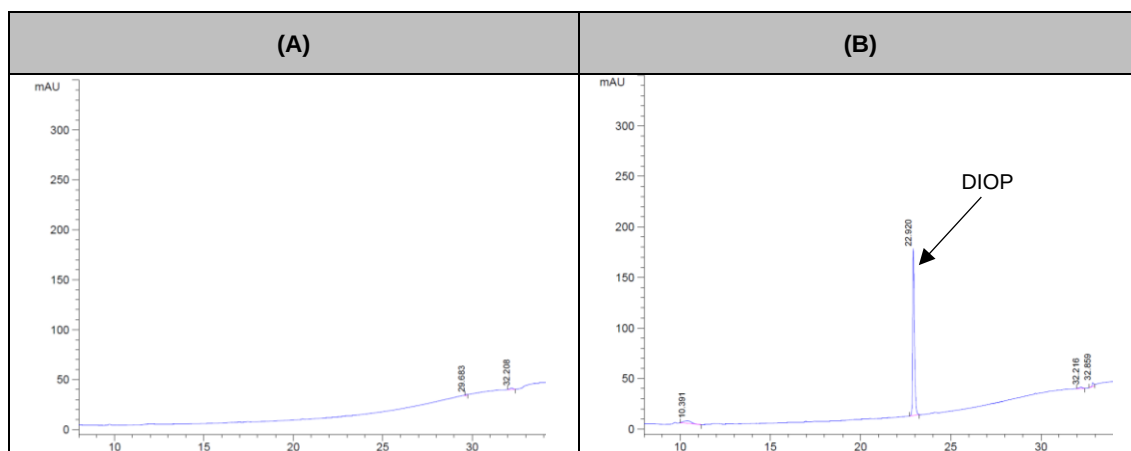


Figura 61. Cromatograma del DCM (A) pres amb una cànula d'acer inoxidable i (B) pres amb el dispensador de plàstic de la mateixa garrafa. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).

4.3.4.2. IMPURESA DETECTADA PER ^1H -RMN EN LA SÍNTESI DE 7005_UB-23417

A l'iniciar el seguiment de síntesi de **7005_UB-23417** per ^1H -RMN, es van observar uns multiplets a la zona aromàtica de l'espectre que es mantenien al llarg de la síntesi i no corresponien als senyals del grup Fmoc (**Figura 33, apartat 4.3.3.2.1**). La multiplicitat dels senyals van fer pensar en que probablement fos HOBt. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, es va dur a terme l'espectre de ^1H -RMN de l'HOBt (**Figura 62, A**) i es va comparar amb els espectres de ^1H -RMN del cru acidolític després de l'acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Val-OH) a la resina abans dels rentats (**Figura 62, B**) i després dels rentats (**Figura 62, C**). Els senyals aromàtics de l'HOBt van

coincidir amb els senyals aromàtics minoritaris que es van observar als dos crus, ben visibles al no solapar-se amb cap senyal del grup Fmoc.

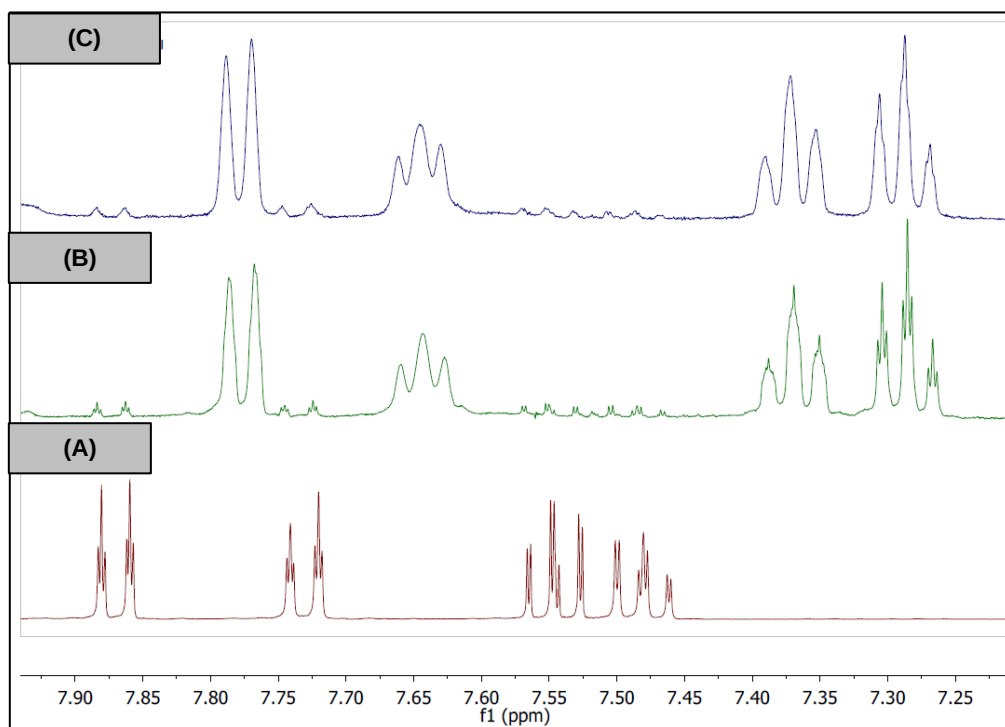
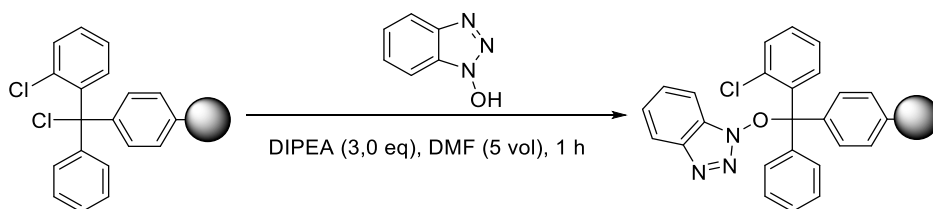


Figura 62. Regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (MeOD) del cru acidolític d'una mostra de dipeptidil-resina després d'acoblar Fmoc-Val-OH (segon aminoàcid) en la síntesi de **7005_UB-23417**, abans de rentar (B) i després de rentar (C), comparats amb l'espectre de ^1H -RMN de l'HOBt (A).

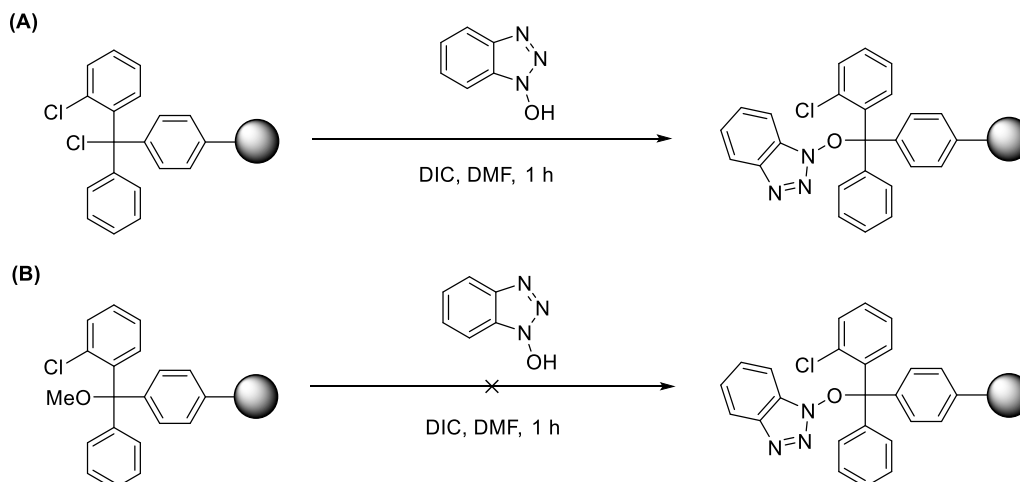
Es va determinar per integració d'àrees de senyals de la impuresa, per comparació amb d'altres del grup Fmoc, la presència d'un 7,9 % d'additiu abans dels rentats i d'un 5,6 % després dels rentats. Aquestes dades feien pensar que l'HOBt estava unit a la resina d'alguna manera, ja que els rentats no aconseguien eliminar l'additiu. Per tal d'esbrinar si, per exemple, l'HOBt es podia acoblar covalentment a la resina 2-CTC, la resina es va tractar amb l'additiu reproduint les condicions d'incorporació del primer aminoàcid a la resina (**Esquema 40**). A continuació, la resina es va rentar per tal d'eliminar l'excés d'HOBt, i es va dur a terme el tractament acidolític d'una alíquota. L'anàlisi per ^1H -RMN del cru resultant va mostrar clarament la presència d'HOBt, el que demostrava que l'HOBt es podia unir a la resina.



Esquema 40. Incorporació de l'HOBt a la resina 2-CTC.

La primera hipòtesi que es va plantejar va ser que la resina no estigués ben capada i que, per tant, l'HOBt s'enllacés als centres reactius lliures de la resina. Per tal de comprovar-ho, la resina 2-CTC es va tractar amb les condicions d'acoblament (3 eq d'HOBt i DIC en DMF) però sense la presència d'aminoàcid, per tal de veure si l'HOBt s'enllaçava a la resina sense capar (**Esquema**

41, A), i el resultat es va comparar amb l'obtingut amb una resina prèviament tractada amb MeOH i DIPEA durant 5 h (**Esquema 41, B**). Passada l'hora de reacció, es va realitzar el tractament àcid de les resines i els crus corresponents es van analitzar per ^1H -RMN. Es va observar HOBT en el cru acidolític de la mostra de resina obtinguda utilitzant resina 2-CTC sense tractar, en canvi, no es va observar quan es va utilitzar resina 2-CTC tractada.



Esquema 41. Tractament amb HOBT i DIC de la resina 2-CTC sense capar (**A**) i amb una resina tractada prèviament durant 5 h amb MeOH i DIPEA (**B**).

Aquests resultats van fer pensar que un mal capat de la resina podia portar a l'acoblament de l'HOBT a la mateixa. Per tal de comprovar-ho, es va dur a terme una nova síntesi de **7005** (**7005_UB-23441**) on es van realitzar modificacions en l'etapa del capat. Així doncs, es va afegir l'excés habitual de MeOH (0,8 mL/g resina), però en aquest cas es va afegir més DIPEA (0,2 eq) i el temps de la reacció es va augmentar a 2 h. La síntesi es va dur a terme amb el procediment que es descriu més endavant (*veure apartat 4.3.5.4*) fins a obtenir el pèptid **7005**. La presència d'HOBT al llarg de la síntesi es va avaluar mitjançant l'anàlisi de tractaments acidolítics d'alíquotes de resina després de l'eliminació del grup Fmoc del dipèptid (**Figura 63, A**), del tripèptid (**Figura 63, B**), del tetrapèptid (**Figura 63, C**) i del pentapèptid (**Figura 63, D**). Sorprenentment, els senyals d'HOBT es van detectar en tres dels espectres obtinguts.

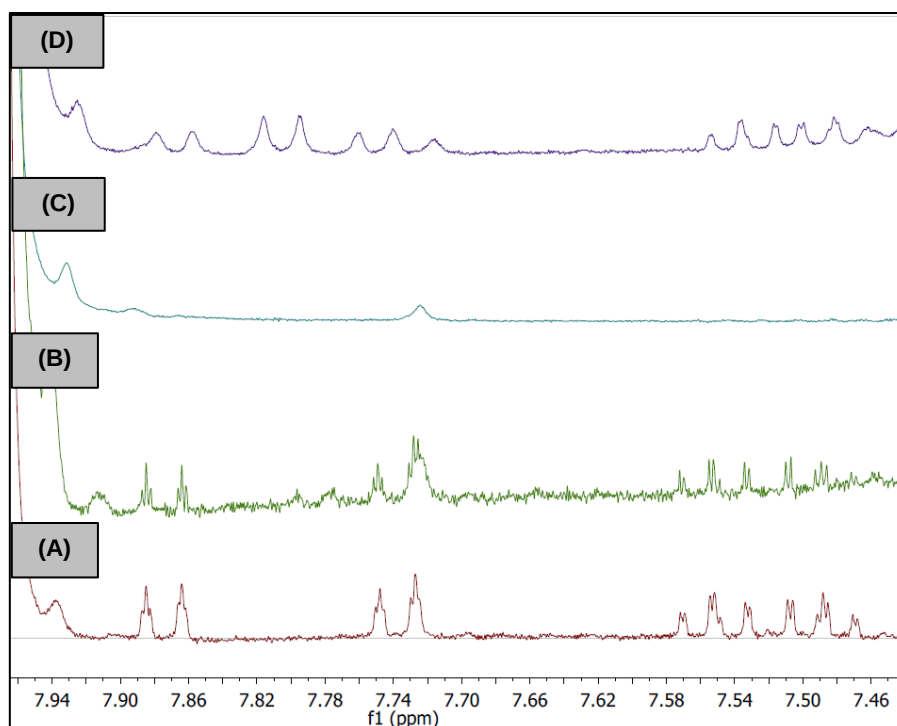
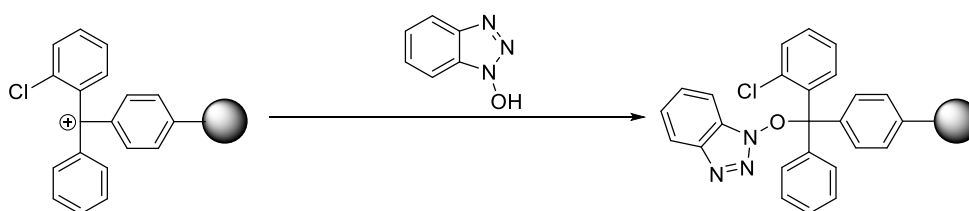


Figura 63. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) dels crús acidolitics d'una alíquota de resina després de l'eliminació del grup Fmoc del dipèptid (A), del tripèptid (B), del tetrapèptid (C) i del pentapèptid (D) en la síntesi de 7005_UB-23441.

No es va poder determinar la causa exacte de la incorporació d'HOBt a la resina, ja que el capat molt probablement havia estat complert a l'utilitzar-se més DIPEA de l'habitual i deixar-se la reacció fins a 2 h. Donat que l'HOBt té un caràcter àcid, una possible explicació podria ser que l'additiu provoqués una pèrdua prematura de les cadenes peptídiques, deixant centres reactius en la resina on podria enllaçar-se l'HOBt (**Esquema 42**).



Esquema 42. Incorporació d'HOBt a una peptidil-resina.

Aquesta hipòtesi va quedar pendent de confirmar, per exemple, amb la quantificació de cadenes peptídiques i HOBt abans i després de tractar la peptidil-resina amb HOBt. En qualsevol cas, cal tenir present la possible presència de l'additiu al producte final, l'eliminació del qual no hauria de portar cap problema aprofitant la gran insolubilitat d'un pèptid protegit.

4.3.5. OPTIMITZACIÓ DELS RENTATS DE LA RESINA

El rentat de la resina es porta a terme utilitzant una seqüència de dissolvents que es pot repetir moltes vegades al llarg de la síntesi en fase sòlida depenent de la longitud de la cadena peptídica, és a dir, després de l'acoblament de l'aminoàcid i després de l'eliminació del grup Fmoc. En estudis precedents a aquesta Tesi es va desenvolupar un protocol que consisteix en dos rentats

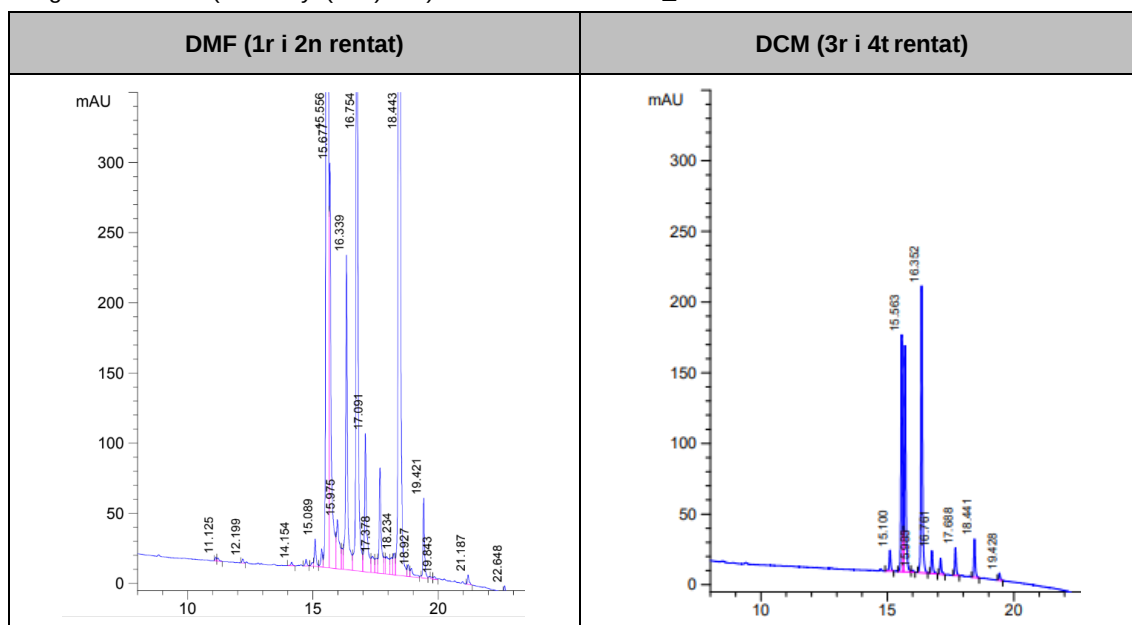
de 5 min amb DMF, DCM, IPA, DCM i DMF, per aquest ordre, utilitzant-se 10 mL de dissolvent per gram de resina en cada rentat (*apartat 4.1.6*). A part de l'eficàcia que pot tenir cada dissolvent de solubilitzar reactius i subproductes, la diferent polaritat dels mateixos provoca en la resina un diferent grau d'inflament, facilitant d'aquesta manera l'eliminació de productes adsorbits en la trama polimèrica.

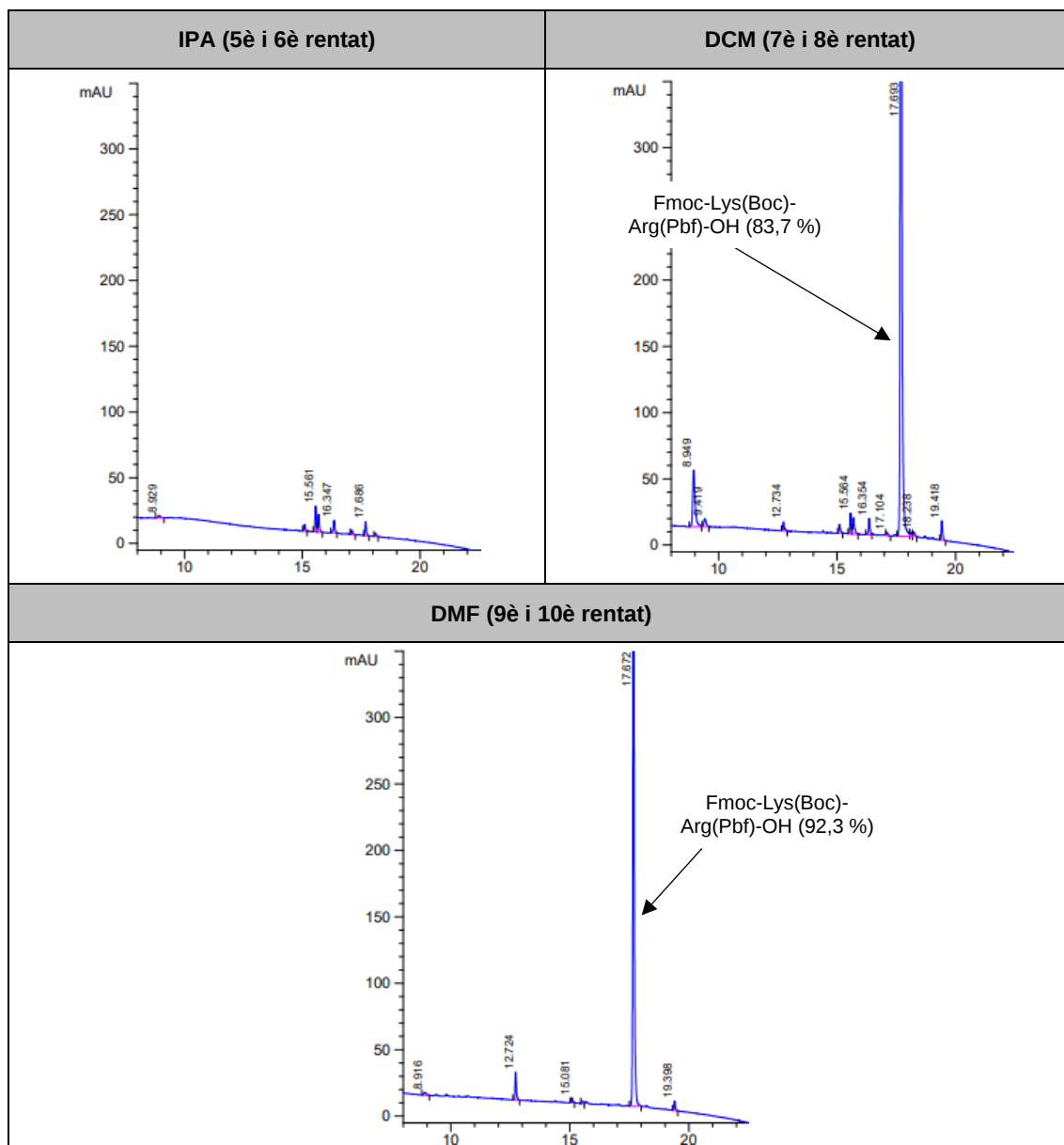
El protocol de rentats abans mencionat es va desenvolupar al laboratori. No obstant, la present Tesi Doctoral s'ha dut a terme a l'empresa utilitzant escales de treball més grans i, per tant, aquest protocol suposava una despesa de dissolvents molt elevada. Per exemple, per a la síntesi de **7411** a escala de 10 g de resina 2-CTC, el consum total aproximat de dissolvents en els rentats de la resina és d'uns 17 L, ja que per cada seqüència de rentats s'utilitza 1 L de dissolvents (100 mL x 2 rentats x 5 dissolvents), i pel nonapèptid aquesta seqüència es repeteix fins a 17 vegades durant la síntesi (9 etapes d'acoblament i 8 etapes de desprotecció, tenint en compte que el grup protector de l'extrem amino no s'elimina). Calia doncs optimitzar el volum dels rentats per minimitzar costos, amb la idea d'emprar escales més grans de 10 g de resina en un futur. Per reduir els volums de dissolvent, es va estudiar l'eficàcia dels rentats mitjançant l'anàlisi per HPLC d'aquests rentats.

4.3.5.1. SÍNTESI DE 7411_UB-21578

La síntesi de **7411_UB-21578** es va dur a terme en el reactor 2A tal com es descriu en l'*apartat 4.3.2.2.2*. Es va decidir realitzar el seguiment per HPLC dels rentats de la resina després d'acoblar el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH), analitzant les dissolucions obtingudes després dels dos rentats amb 10 mL de cada dissolvent per gram de resina (**Taula 17**).

Taula 17. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes en els rentats després d'acoblar a la resina el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de **7411_UB-21578**.



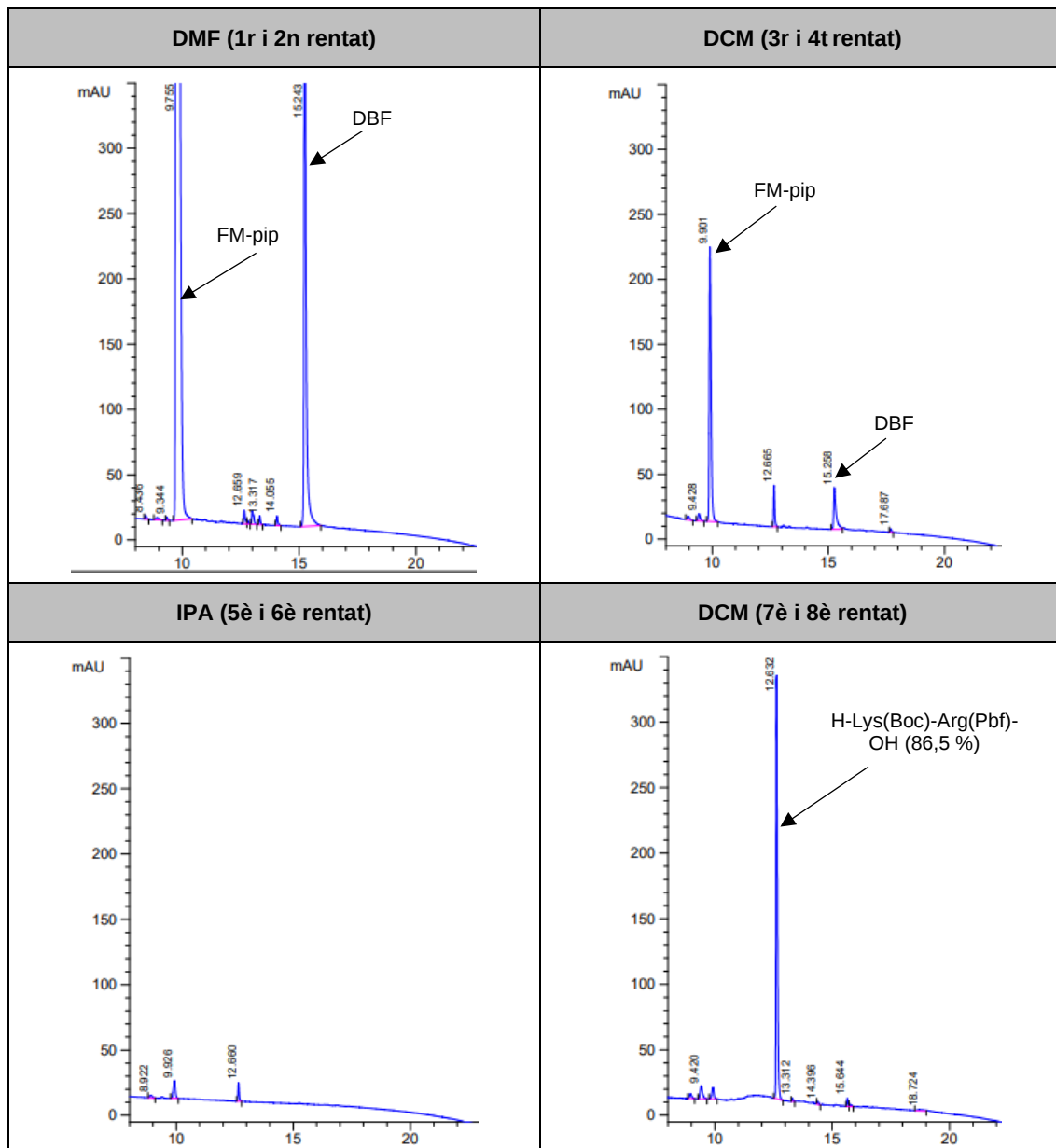


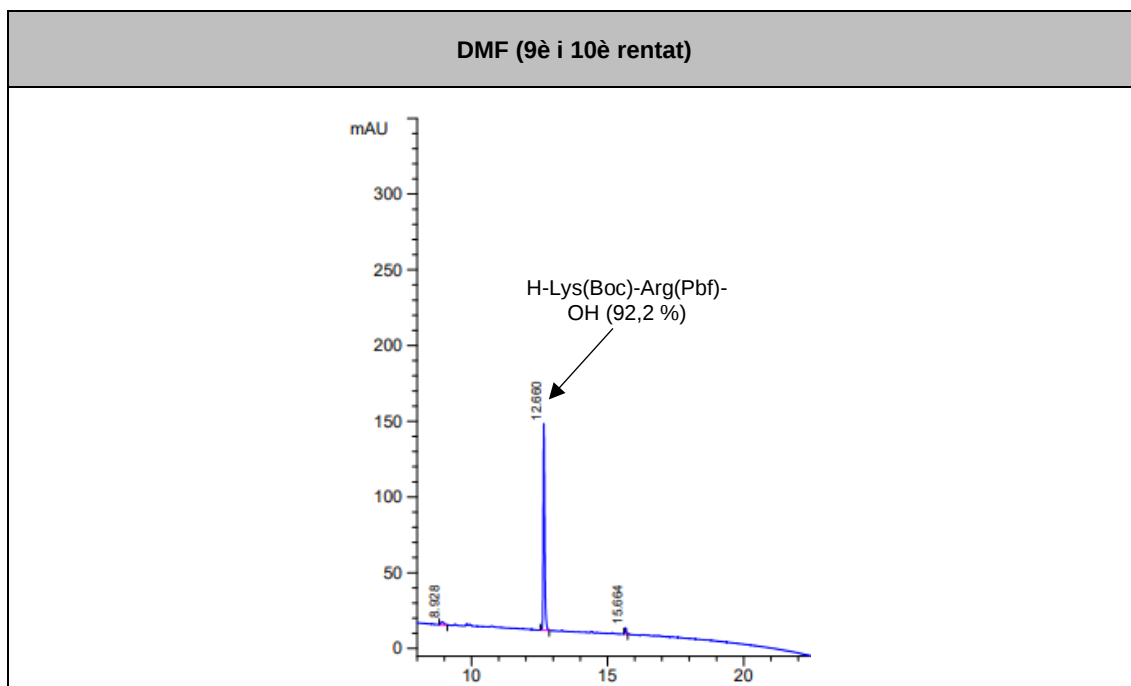
Com es pot observar a la **Taula 17**, els cromatogrames dels dos primers rentats (DMF i DCM) tenen els perfils cromatogràfics més complexos o, dit d'altra manera, són els rentats més eficients. D'altra banda, en la dissolució obtinguda dels 3r i 4t rentats de DCM es detecten només tres pics cromatogràfics majoritaris que coincideixen en temps de retenció amb els que s'havien observat en els rentats de DMF (15,6 min, 15,9 min i 16,4 min). Tanmateix, l'anàlisi de l'IPA és molt més senzill, el que indicava que els dos primers rentats havien rentat la resina correctament. Donat que la resina s'encongeix molt amb IPA, es van dur a terme dos rentats més amb DCM i DMF per tornar-la a inflar i arribar a les condicions inicials de la següent etapa de síntesi. Els cromatogrames dels rentats d'aquests dissolvents van mostrar un pic a 17,7 min amb una puresa cromatogràfica molt elevada. El valor del pic molecular $[M+H]$ de m/z 877,4170 va indicar que es tractava del producte de la reacció (Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH). Aquesta pèrdua prematura de cadenes peptídiques va sorprendre ja que als cromatogrames dels dos primers rentats amb DMF i DCM pràcticament no es va detectar aquest dipèptid. No hi ha una explicació clara per aquest resultat, a no ser que el considerable inflament amb DCM de la resina rentada amb IPA sigui un

procés exotèrmic que afecti a l'estabilitat de l'enllaç èster amb la resina. Aquest mateix fenomen es va observar en els rentats després del tractament amb piperidina per eliminar el grup Fmoc.

El seguiment dels rentats per HPLC es va continuar després d'eliminar del grup Fmoc de la dipeptidil-resina. Els cromatogrames de les dissolucions obtingudes després de rentar dues vegades amb 10 mL de cada dissolvent per gram de resina es presenten a la **Taula 18**.

Taula 18. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes en els rentats després d'eliminar el grup Fmoc en la síntesi de **7411_UB-21578**.





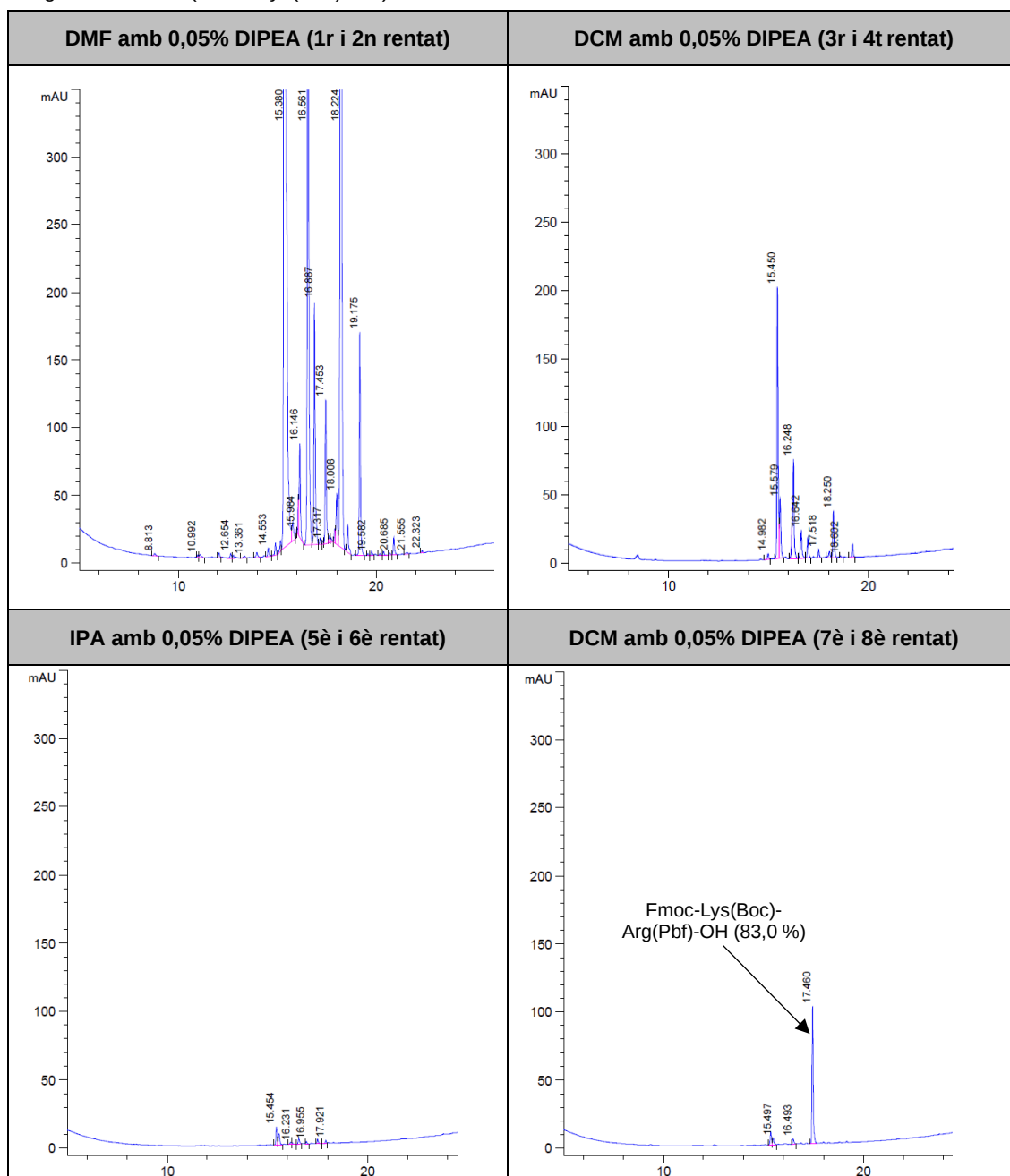
Tal com mostra la **Taula 18**, els cromatogrames dels dos primers rentats amb DMF i DCM revelen que aquests rentats són suficients per eliminar els subproductes de la degradació del grup Fmoc (DBF, 15,2 min; i FM-pip, 9,8 min). En canvi, de la mateixa manera que es va observar en els rentats que es van fer després de l'acoblament, els cromatogrames dels rentats amb DCM i DMF posteriors al rentat amb IPA van mostrar un pic a 12,6 min amb una m/z de 655,3622, corresponent al producte de reacció H-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH. Sembla doncs que l'escissió prematura del pèptid estava relacionada amb el rentat amb IPA i els rentats posteriors amb DCM i DMF.

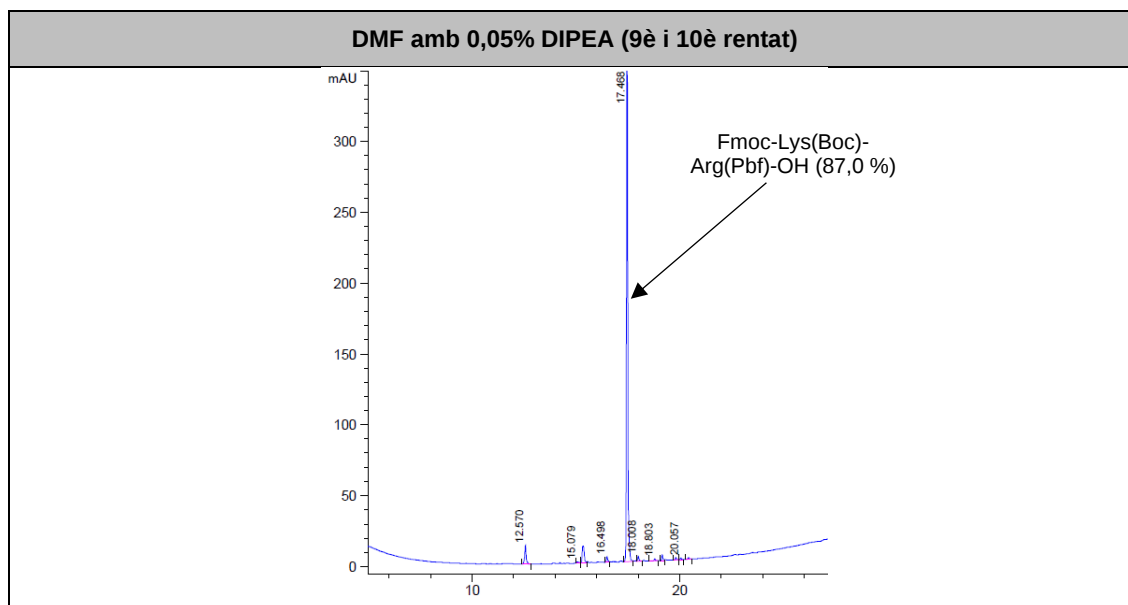
Per tal d'avaluar l'impacte en el rendiment que suposava la pèrdua de cadenes peptídiques durant els rentats, es va quantificar per ^1H -RMN el dipèptid H-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH resultant dels dos rentats de DCM després dels rentats amb IPA utilitzant un patró intern d'àcid maleic. Es va determinar un total de 10 mg de producte, és a dir, un 0,3 % de dipèptid respecte a la quantitat teòrica acoblada a la resina. La pèrdua de producte en els rentats no era molt significativa encara que podia influir lleument en el rendiment si se suposava que en tots els rentats de DCM de la síntesi es perdia la mateixa quantitat (aproximadament un 3 % menys de rendiment). No obstant, la pèrdua de cadenes peptídiques va indicar que els rentats no estaven dissenyats de manera adequada.

4.3.5.2. SÍNTESI DE 7411_UB-23401

L'anàlisi cromatogràfic dels rentats de la resina per tal d'optimitzar els volums de dissolvent va posar de manifest un problema greu de les resines CTC, la pèrdua prematura de cadenes peptídiques. Així doncs, es va decidir analitzar els rentats després de l'acoblament del segon aminoàcid en la síntesi d'un lot diferent de **7411 (7411_UB-23401, apartat 4.3.2.2.2)**. En aquest cas, els rentats es van dur a terme amb un 0,05 % de DIPEA en cada dissolvent per esbrinar si les possibles traces d'àcid en el DCM eren responsables de la pèrdua de cadenes peptídiques. Els cromatogrames d'HPLC de les dissolucions resultants dels rentats es mostren en la **Taula 19**.

Taula 19. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes en els rentats després d'acoblar a la resina el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de **7411_UB-23401**.





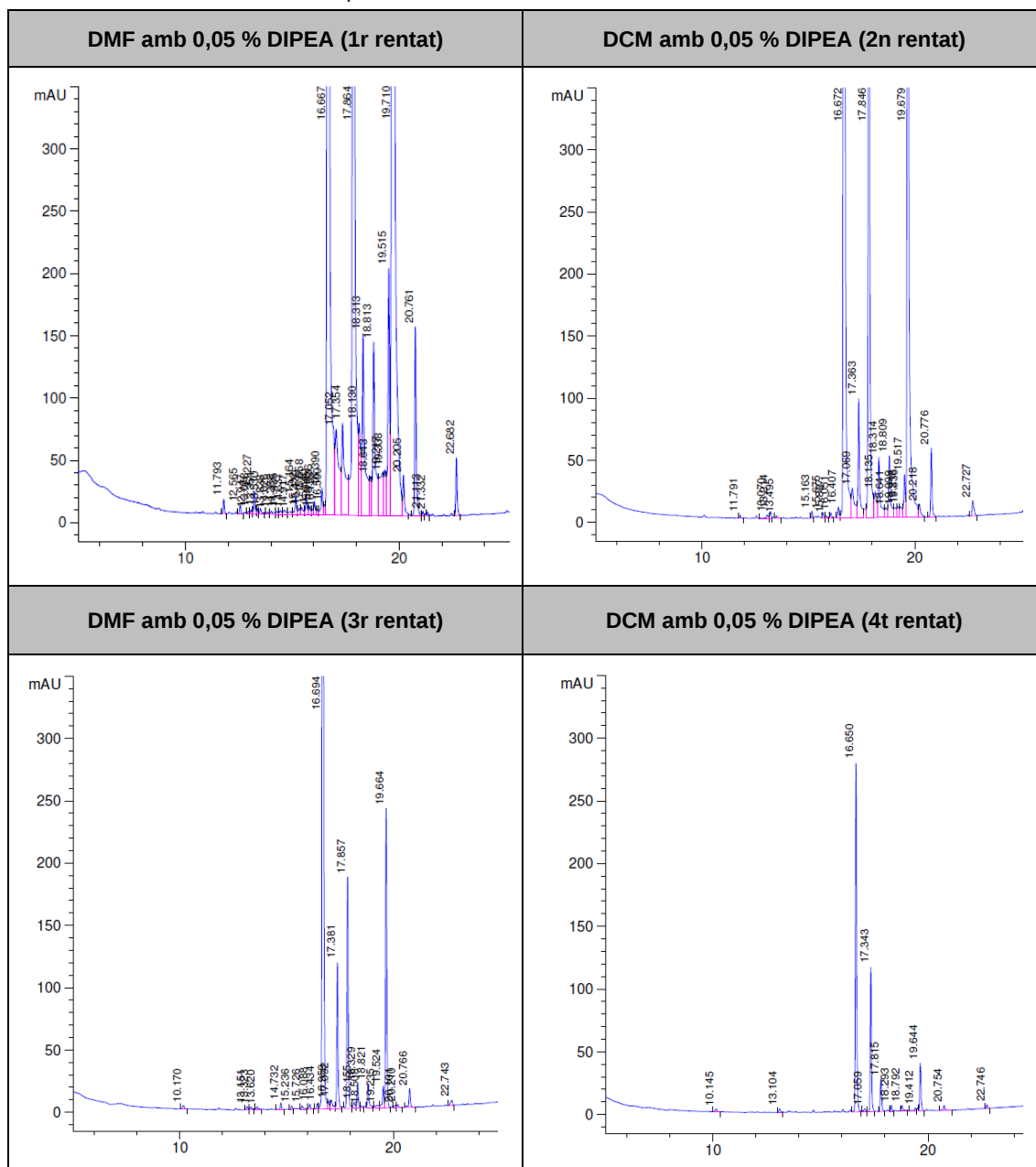
Tal com es pot observar en la **Taula 19**, no es va poder evitar la pèrdua de cadenes peptídiques amb la utilització de DIPEA en els dissolvents de rentat, ja que en els 7è i 8è rentats de DCM i en els 9è i 10è rentats de DMF es va observar el pic corresponent al producte de reacció (Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH, 17,5 min).

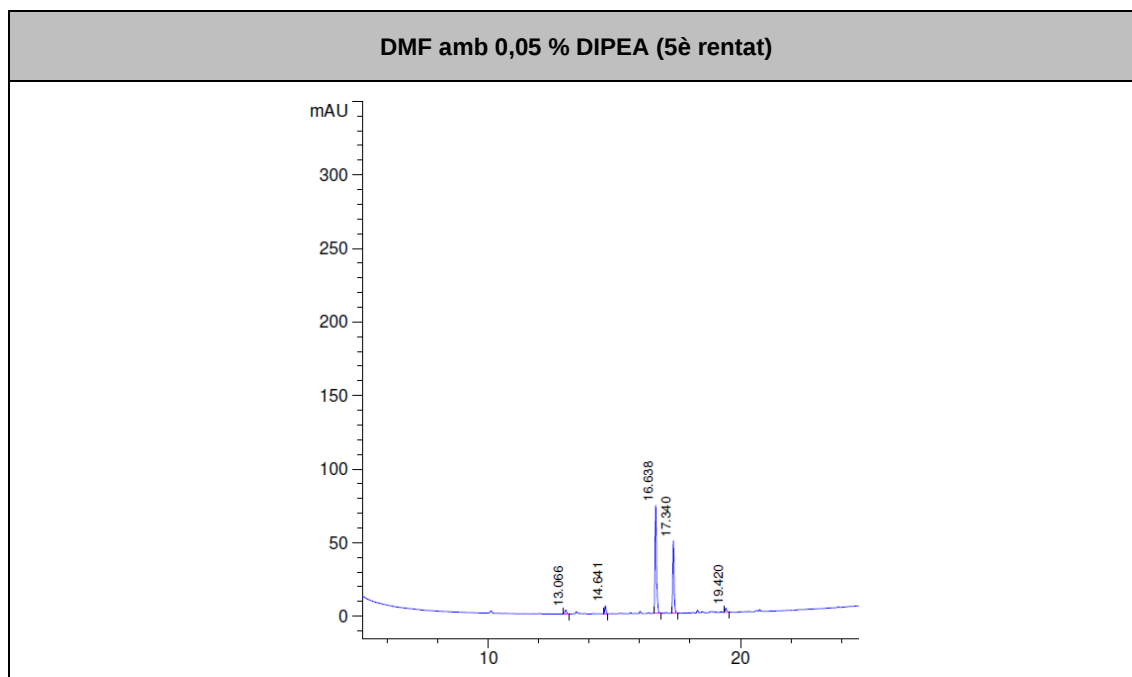
4.3.5.3. SUBSTITUCIÓ DEL RENTAT D'IPA PER DMF

En els estudis precedents⁵⁹ no s'havia observat la pèrdua de cadenes peptídiques en els rentats de la resina, en canvi, al voler reduir la despesa de dissolvents en aquesta Tesi Doctoral aquest fenomen es va observar. Encara que l'objectiu principal era optimitzar els rentats de la resina, la pèrdua de cadena peptídiques es va voler solucionar ja que podria impactar en el rendiment de la síntesi. Els resultats obtinguts fins al moment indicaven que la seqüència de rentats IPA-DCM-DMF podia ser la responsable de la pèrdua de cadenes peptídiques. Per a obtenir informació al respecte, es van analitzar els rentats després del segon acoblament en una nova síntesi. En aquest cas concret, solament es va arribar al segon acoblament i no es va continuar la síntesi de **7411**.

En aquest cas, en la seqüència de rentats es va substituir l'IPA per un nou rentat de 10 mL de DMF per gram de resina, i es va portar a terme un únic rentat en cada etapa de la seqüència, és a dir, es va reduir el nombre de rentats a la meitat. Per compensar aquesta reducció de rentats, es van augmentar a 10 min el segon (DCM) i el tercer (DMF). A més a més, tots els dissolvents contenien un 0,05% de DIPEA per tal d'evitar les possibles traces àcides. Les anàlisis d'HPLC de les dissolucions resultants dels rentats es mostren en la **Taula 20**.

Taula 20. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes amb la nova seqüència de rentats després d'acoblar a la resina el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH); un rentat a cada etapa de la seqüència de dissolvents i substitució d'IPA per DMF.





Amb la nova seqüència de rentats, en els dos últims de DCM i DMF no es va detectar producte derivat de l'escissió prematura (Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH) per HPLC-MS, indicant que l'IPA estava d'alguna forma relacionat amb la pèrdua de cadenes peptídiques. A més a més, es va demostrar que la nova seqüència de rentats amb reducció del volum global de dissolvent era efectiva pel que es va observar en l'últim rentat amb DMF. Per tal d'acabar de confirmar que els rentats amb IPA eren els responsables de la pèrdua de cadenes peptídiques, es va utilitzar la seqüència de dissolvents que es mostra en la **Taula 21** després de dur a terme la seqüència de rentats que es presenta a la **Taula 21**, i la dissolució obtinguda després dels rentats es va analitzar per HPLC-MS i es va determinar l'àrea del pic corresponent a Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH (Fmoc-dipeptid).

Taula 21. Àrees de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH en els cromatograms de cada rentat utilitzant una seqüència de dissolvents que inclou tractaments amb IPA en diferents temps.

Dissolvent	IPA	DCM	DMF	IPA	DCM	DMF	IPA	DCM	DMF
Temps (min)	5	5	5	15	5	5	30	5	5
Àrea Fmoc-dipeptid (mAU)	9	597	67	34	566	169	31	508	237

Com es pot comprovar a la **Taula 21**, les anàlisis dels dos rentats de DCM i DMF que es van fer just després d'un rentat amb IPA, van mostrar clarament la presència de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH. També es pot veure que les quantitats de peptid en els rentats amb DCM no depenen massa del temps del tractament previ amb IPA (500-600 mAU). En canvi, la tendència és clarament a l'alça amb el temps del tractament amb IPA (5 min, 15 min i 30 min) en els rentats posteriors amb DMF (67 mAU, 169 mAU i 237 mAU).

Per corroborar aquests resultats, es va utilitzar una seqüència similar de dissolvents, substituint IPA per MeOH (**Taula 22**).

Taula 22. Àrees de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH en els cromatogrames de cada rentat utilitzant una seqüència de dissolvents que inclou tractaments amb MeOH de diferents temps.

Dissolvent	MeOH	DCM	DMF	MeOH	DCM	DMF	MeOH	DCM	DMF
Temps (min)	5	5	5	15	5	5	30	5	5
Àrea dipeptid (mAU)	31	3882	2335	415	5728	2297	323	5775	2042

La pèrdua de cadenes peptídiques es va incrementar amb els rentats amb MeOH, ja que l'àrea cromatogràfica del producte Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH observada en els rentats de DCM i DMF posteriors, va ser considerablement major que l'àrea observada després dels rentats amb IPA (**Taula 21**). Tanmateix, les tendències de pèrdua de cadenes per DCM i DMF amb el temps de tractament amb MeOH van ser diferents. En qualsevol cas, els resultats indicaven que l'ús d'alcohols en els rentats d'una resina 2-CTC no són convenients.

Per tant, sembla que l'ús d'alcohols com a dissolvent propicia la pèrdua de cadenes peptídiques, però no s'ha trobat un mecanisme plausible que confirmi la hipòtesi. En aquest sentit, és molt improbable que l'IPA actuï com a reactiu provocant l'escissió del pèptid de la resina, ja que no es va detectar en cap moment la massa del dipèptid amb l'extrem carboxílic com a èster isopropílic. La única possible explicació és, com ja s'ha mencionat abans, que l'inflament amb DCM de la resina rentada amb IPA afecti a l'estabilitat de l'enllaç èster amb la resina al ser un procés exotèrmic. En qualsevol cas, l'IPA es va eliminar de la seqüència de rentats per tal d'evitar la pèrdua de producte en els rentats, i es va decidir utilitzar a partir d'aquell moment la seqüència que substitueix l'IPA per DMF amb un rentat per cada dissolvent (**Taula 20**). Amb aquesta nova seqüència s'aconseguia també un estalvi importat de dissolvents, molt convenient si es pretenia portar el procés a planta.

4.3.5.4. SÍNTESI DE 7005_UB-23441

Es va dur a terme una nova síntesi en fase sòlida de **7005 (7005_UB-23441)** amb l'objectiu d'assajar la seqüència de rentats que contemplava 5 rentats alternatius de DMF (3) i DCM (2) (**Taula 20**, apartat 4.3.5.3). Es va utilitzar el reactor 2A (**Figura 21**, apartat 4.3.2.1) a una escala de 15,4 mmols (11,0 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Leu-OH es va incorporar a la resina en condicions similars a les ja descrites en síntesis anteriors (apartat 4.2.2), però amb un tractament de 2 h amb MeOH (0,8 mL/g resina) i DIPEA (0,2 eq) per assegurar el capat de la resina (apartat 4.3.4.2). La quantificació de grups Fmoc (apartat 4.1.3) va proporcionar una funcionalització de 0,58 mmols/g.

La desprotecció dels grups α -amino prèvies als acoblaments d'aminoàcids es van dur a terme amb piperidina en les condicions habituals (apartat 4.1.4), comprovant-se la consecució de les mateixes per ^1H -RMN i HPLC (apartat 4.3.3.2). Les reaccions d'acoblament es van realitzar utilitzant 3 eq de Fmoc-aminoàcid, DIC i HOBT (apartat 4.1.5), excepte en l'acoblament de l'últim aminoàcid de la seqüència (Boc-Ile-OH), en el que es van emprar 4 eq de reactius (apartat 4.3.1.2). Les reaccions es van monitoritzar amb el test de ninhidrina (apartat 4.1.5.1), per ^1H -

RMN i per HPLC (*apartat 4.3.3.2*). Les 3 tècniques van indicar que els acoblaments eren complets a les 1,5 h i, per tant, no va ser necessari dur a terme cap reacoblament. L'escissió del pèptid de la resina es va assolir en les condicions ja emprades abans, és a dir, tres rentats de la peptidil-resina amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM (*apartat 4.1.7*). L'anàlisi del cru acidolític per HPLC va donar una puresa cromatogràfica de 93,1 % (**Figura 64, B**). Aquest resultat va ser molt semblant o inclús lleugerament millor a l'obtingut en el cru acidolític del lot **7005_UB-21510** (91,0 %, **Figura 64, A**), que s'havia dut a terme amb la seqüència de rentats proposada en els estudis precedents. Això indicava que la nova seqüència de rentats pràcticament no afectava a la qualitat del producte.

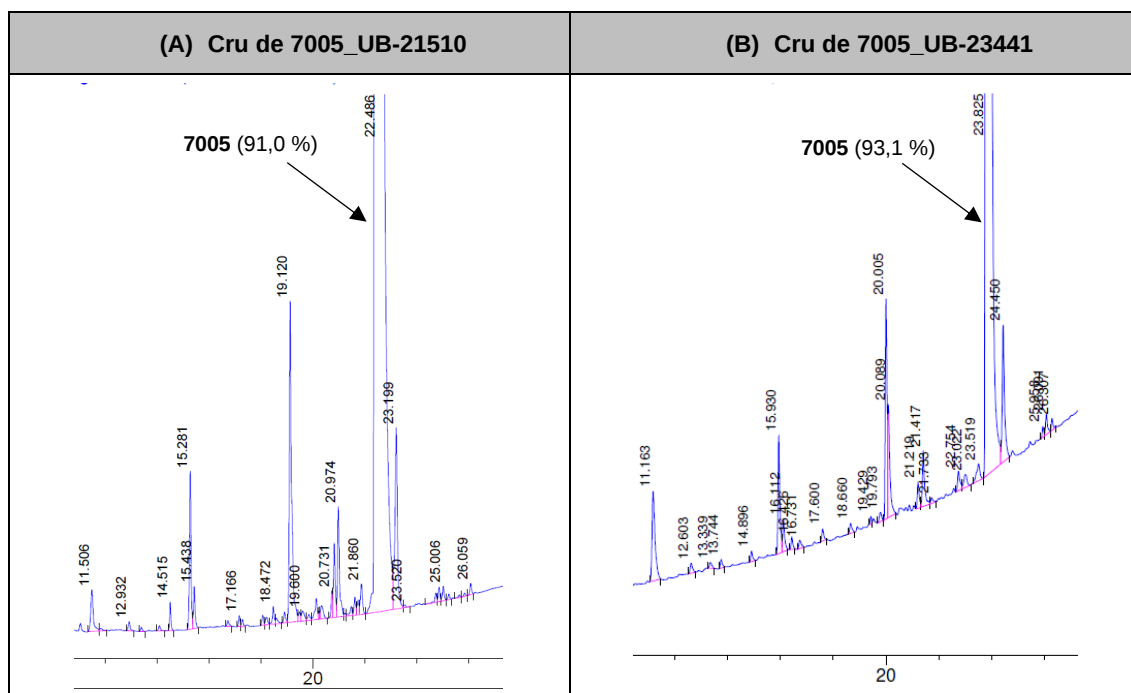


Figura 64. Comparació dels perfils dels cromatogrames dels crus acidolítics dels lots de **7005** obtinguts amb la seqüència de rentats proposada en els estudis precedents (**7005_UB-21510-cru, A**) i amb la nova seqüència de rentats proposada en aquesta Tesi (**7005_UB-23441-cru, B**).

Per tal d'avaluar el rendiment, es va quantificar per ^1H -RMN el producte **7005_UB-23441** present en el cru, determinant-se una quantitat de 9 g que suposava un rendiment d'aproximadament del 86 %, respecte la funcionalització obtinguda amb la incorporació del primer aminoàcid. Aquest resultat es va poder comparar amb els rendiments obtinguts en les altres síntesis, com per exemple l'obtingut en la síntesi de **7005_UB-19182-P9** (69 %, *veure apartat 4.3.6.2.1*), que encara que es va sintetitzar en un altre reactor, es va poder observar la millora del rendiment.

A continuació, el pèptid **7005** es va precipitar amb les condicions que es descriuen en l'*apartat d'optimització de les precipitacions (veure apartat 4.3.6.2.4)*, obtenint-se els sòlids **7005_UB-23441-P1-01** i **7005_UB-23441-P2-01** (96,2 % i 98,4 % de puresa cromatogràfica respectivament).

Com a conclusió, es va sintetitzar l'hexapèptid protegit **7005** utilitzant una nova seqüència de dissolvents pels rentats (DMF, DCM, DMF, DCM, DMF) i reduint el volum dels mateixos a la meitat. El rendiment (quantitat de pèptid present al cru acidolític final) i la puresa cromatogràfica del producte van ser similars als d'altres síntesis del mateix producte.

4.3.6. OPTIMITZACIÓ DE LES PRECIPITACIONS

Des d'una perspectiva industrial, l'aïllament dels productes sòlids habitualment es duu a terme a través d'un procés de precipitació. La precipitació controlada per purificar el cru és una metodologia preferible a la tècnica cromatogràfica per qüestions econòmiques. En el cas del pèptid **FT**, tant l'API com els seus intermedis són sòlids. Per tant, calia desenvolupar condicions experimentals adients per una precipitació controlada del producte, a fi d'obtenir una bona puresa cromatogràfica i poder realitzar una filtració ràpida del sòlid per poder portar el procés a gran escala.

Generalment, un sòlid que es disposa per gravetat al parar l'agitació sol filtrar-se de forma ràpida. En canvi, si al parar l'agitació la suspensió que s'obté és densa o un sòlid gomós, és a dir, un sòlid que no es disposa, la filtració acostuma a ser molt més lenta per l'obturació del filtre. Una filtració molt lenta en que el filtre s'obtura i el drenatge de les AM s'atura, sol ser molt problemàtica quan es vol escalar. En canvi, una filtració lenta en el laboratori però amb un drenatge continu i constant de les AM, podria funcionar bé a escala de planta pilot amb la utilització del filtre Nutsche, ja que s'espera que l'agitació permeti millorar el drenatge de les AM respecte la filtració al laboratori.

Per tal de desenvolupar un procés de precipitació controlada, és necessari reduir la solubilitat del producte en la dissolució afegint un antidissolvent o refredant la mescla. Cal tenir en compte que la velocitat d'addició de l'antidissolvent o el refredament influeix directament en la precipitació. En aquest context, les quantitats de dissolvents es mesuren en volums (mL de dissolvent/g de producte), per tant, és convenient conèixer els grams de producte al cru acidolític per tal d'optimitzar la precipitació i definir condicions.

4.3.6.1. ESTUDIS PREVIS

Les precipitacions dels fragments peptídics sintetitzats en fase sòlida en els estudis precedents⁵⁹ no van ser controlades, ja que el cru resultant del tractament acidolític de la resina es descarregava directament del reactor a un baló amb un gran volum d'antidissolvent. Així, en la primera síntesi de **7411** realitzada en la present Tesi (**7411_UB-19146**, apartat 4.2.1), es va dur a terme en aquestes condicions i es va observar la formació d'un sòlid molt fi que no es dipositava al fons del reactor al parar l'agitació. Aquest tipus de suspensió va proporcionar una filtració molt lenta i, per tant, aquest procés no era adequat per a l'obtenció dels fragments peptídics a escala industrial.

Per tal de disposar d'unes condicions per una filtració ràpida sense la necessitat de refiltrar les AM, en la primera síntesi de **7005** (**7005_UB-19166**, apartat 4.2.2), es van provar noves condicions de precipitació addicionant l'antidissolvent gradualment, però no va millorar el resultat.

Així doncs, un dels objectius d'aquesta Tesi Doctoral va ser optimitzar processos de precipitació per purificar els intermedis peptídics **7411** i **7005** per poder implementar-los a gran escala.

4.3.6.2. ASSAJOS AMB 7005

4.3.6.2.1. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE 7005_UB-19182

Les condicions de síntesi per l'obtenció del cru de **7005_UB-19182** es descriuen en l'apartat 4.3.1.2. El cru acidolític es va tractar amb TEA (1 eq) per tal de neutralitzar el TFA i poder concentrar el cru sense perillar la integritat dels grups protectors de les cadenes laterals dels

aminoàcids trifuncionals. Es va comprovar per ^1H -RMN que la sal de TEA resultant precipitava amb el producte final i, per tant, es va tenir en compte a l'hora d'estimar el rendiment.

Una alíquota del cru es va analitzar per HPLC (90,7 % de puresa cromatogràfica) i la resta del cru es va dividir en 9 fraccions per tal de realitzar diferents assajos de precipitació (**Taula 23**), el que suposava 1,6 g de **7005** teòrics per a cada prova (16,2 g teòrics de **7005** calculats a partir de la funcionalització obtinguda al quantificar els grups Fmoc després de la incorporació del primer aminoàcid a la resina). Els volums de dissolvents es van calcular a partir dels grams teòrics de **7005**. Per tant, els rendiments que es presenten a la **Taula 23** només van servir d'orientació per tal d'avaluar la recuperació de sòlid utilitzant diferents condicions de precipitació, ja que es va suposar un rendiment quantitatiu d'incorporació de cadenes peptídiques.

Taula 23. Proves de precipitació amb el cru de **7005_UB-19182**.

Prova	Dissolvent	Anti-dissolvent	Aspecte	Filtració	7005 % per HPLC	sal de TEA % pes per ^1H -RMN	% Rend. ^a
cru	-				90,7	-	-
P1	EtOH (3 vol)	H ₂ O (2 vol)	Sòlid gomós	Molt lenta	92,2	44	53
P2 ^b	EtOH (3 vol)	H ₂ O (2 vol)	Sòlid gomós	Molt lenta	93,9	10	68
P3	DCM (10 vol)	Heptà (40 vol)	Sòlid gomós	Ràpida	93,9	45	76
P4	DCM (10 vol)	TBME (50 vol)	Sòlid que diposita	Ràpida	97,3	11	50
P5 ^d	DCM (10 vol)	TBME (50 vol) ^c	Suspensió densa	Sequedat	93,9	n.d	56
P6	DCM (10 vol)	TBME (50 vol)	Suspensió densa	Lenta	96,9	2	78
P7	DCM (10 vol)	TBME (40 vol) ^{c,e}	Sòlid que diposita	Ràpida	98,7	8	69
P8 ^d	DCM (10 vol)	TBME (30 vol) ^{c,e}	Sòlid que diposita	Ràpida	99,2	n.d	50
P9 ^f	DCM (10 vol)	TBME (50 vol) ^c	Sòlid que diposita	Ràpida	98,2	n.d	69

(a) El rendiment es va calcular a partir del quocient entre els grams reals de cru acidolític sense sal de TEA i els grams teòrics. Per exemple, en el cas de la prova 1: $1,5 \text{ g obtinguts} \times (100-44)/1,6 \text{ g teòrics} = 53 \%$

(b) Precipitació inversa: el dissolvent s'addiciona sobre l'antidissolvent.

(c) Es sembla amb **7005_UB-19182-P4-01**.

(d) Prèviament a la precipitació s'elimina la sal TFA-TEA amb rentats d'àcid cítric al 2,5 % a pH 2.

(e) Agitació a 40 °C durant 1 h i rampa per refredar a 5 °C en 7 h.

(f) Prèviament a la precipitació s'elimina la sal TFA-TEA amb rentats de NaH₂PO₄/H₃PO₄ a pH 3.

En les proves 1 i 2, es va canviar de dissolvent DCM del cru per EtOH, i el cru resultant es va concentrar fins a 3 volums. En la prova 1, la H₂O es va afegir lentament al cru de reacció, i en la prova 2 el cru de reacció es va afegir lentament a H₂O (precipitació inversa). En les dues proves, el sòlid va precipitar ràpidament i es van obtenir sòlids gomosos que no dipositaven al fons del reactor al parar l'agitació. La filtració de les dues suspensions va ser molt lenta i aquestes condicions de precipitació es van descartar. Es van obtenir els sòlids **7005_UB-19182-P1-01** (rendiment del 53 %) i **7005_UB-19182-P2-01** (rendiment del 68 %).

En la prova 3, la solució del cru en DCM es va concentrar a 10 volums, i l'heptà es va addicionar lentament fins que a 40 volums. Es va observar la formació d'un oli groc que dipositava al fons del reactor. La suspensió es va deixar en agitació 12 h i l'oli es va disgregar per formar un sòlid gomós. La filtració va ser ràpida però una part del sòlid es va quedar enganxada en les parets del reactor, pel que aquestes condicions de precipitació també es van descartar. El sòlid **7005_UB-19182-P3-01** es va obtenir amb un rendiment del 76 %.

En la prova 4, el TBME es va addicionar lentament al cru fins a arribar a una relació DCM/TBME d'1:5. La dissolució resultant es va deixar en agitació 12 h i es va observar la formació d'un sòlid que dipositava al parar l'agitació. La filtració de la suspensió va ser ràpida i la millora en la puresa cromatogràfica de **7005** en el sòlid obtingut (**7005_UB-19182-P4-01**) va ser significativa (97,3 %), en comparació a la del cru inicial (90,7 %).

En la prova 5, es van voler reproduir les condicions de precipitació de la prova 4, però en aquest cas es va eliminar prèviament la TEA, ja que es detectava sempre per ¹H-RMN al producte final. Malauradament, la precipitació que va tenir lloc a la prova 4 no es va reproduir, ja que als 10 volums de TBME es va formar una suspensió densa que no va donar lloc a cap sòlid dipositat després de parar l'agitació. El TBME es va acabar d'addicionar fins als 50 volums i la suspensió es va deixar en agitació 12 h. Al tenir la suspensió el mateix aspecte, es va sembrar però no va dipositar cap sòlid i aquestes condicions també es van descartar eliminant el dissolvent fins a sequedat i obtenint el sòlid **7005_UB-19182-P5-01**.

Es va pensar que els rentats d'àcid cítric per eliminar la base havien pogut interferir en la precipitació del producte desitjat. Per tant, en la prova 6 no es va fer aquest tractament àcid previ i es van reproduir exactament les condicions de precipitació de la prova 4. El sòlid va precipitar durant les 12 h d'agitació, però en aquest cas el sòlid no es va dipositar al parar l'agitació i va formar una suspensió densa. La filtració no va ser tan ràpida com en la prova 4, però la puresa cromatogràfica del sòlid obtingut (96,9 %) va millorar respecte l'obtinguda en el cru inicial (90,7 %). El rendiment pel sòlid obtingut (78 %, **7005_UB-19182-P6-01**) va ser dels millors trobats fins al moment.

Per tal de millorar la forma del sòlid, en la prova 7 es van afegir 40 volums de TBME lentament, en comptes de 50 volums com en les proves 5 i 6, i la dissolució es va sembrar. A les 12 h d'agitació s'havia tornat a formar la suspensió densa i es va escalfar a 40 °C durant 1 h per tal de millorar la forma del sòlid. Es va programar una rampa per refredar a 5 °C en 7 h i la forma del sòlid va millorar, dipositant-se al fons del recipient al parar l'agitació. La filtració va ser ràpida i el sòlid **7005_UB-19182-P7-01** es va obtenir amb una molt bona puresa cromatogràfica (98,7 %) i un rendiment acceptable (69 %).

En la prova 8, la sal TFA·TEA es va eliminar del cru amb el mateix tractament que en la prova 5 i es va dur a terme un procediment de precipitació molt semblant, amb la diferència que es va

pujar la temperatura a 35 °C un cop s'havien afegit 10 vol de TBME. Es va formar una suspensió densa i es van addicionar 20 volums de TBME més. La suspensió es va escalfar a 40 °C, es va sembrar i es va refredar a 5 °C en 7 h. El sòlid **7005_UB-19182-P8-01** es va dipositar al parar l'agitació i la filtració va ser ràpida però es va obtenir un rendiment més baix que en altres proves (50 %), el que significava que 30 vol de TBME no eren suficients per precipitar tot el producte. Tanmateix, la seva puresa va ser la millor de les obtingudes en les proves (99,2%).

En la prova 9, es va eliminar la base amb rentats d'una dissolució tampó de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ de pH 3, ja que en els estudis precedents a la present Tesi⁵⁹ s'havia comprovat que l'àcid cítric podia formar impureses amb els fragments peptídics. Es van afegir 10 volums de TBME, la dissolució es va sembrar i al pujar la temperatura a 35 °C es va formar una suspensió densa. El TBME es va acabar d'addicionar fins els 50 volums a 35 °C i el sòlid es va dipositar al parar l'agitació. La filtració va ser ràpida i la puresa cromatogràfica del sòlid obtingut (**7005_UB-19182-P9-01**) va ser molt bona (98,2 %), així com un rendiment acceptable en comparació a les altres proves (69 %).

Per tant, dels assajos de precipitació amb **7005** es pot concloure que, en general, s'aconseguia purificar el producte addicionant lentament TBME com a l'antidissolvent (50 vol) al cru de DCM concentrat (10 vol). Tenint en compte la puresa cromatogràfica, el rendiment i la velocitat de filtració de les suspensions, els millors resultats es van obtenir en les proves 7 i 9, és a dir, utilitzant entre 40 i 50 volums de TBME amb sembra, agitant a 40 °C durant 1 h i refredant amb rampa de 5 °C en 7 h.

4.3.6.2.2. ASSAJOS DE NEUTRALITZACIÓ DEL CRU

En les proves de precipitació de **7005_UB-19182** descrites a l'apartat anterior, es va dur a terme l'addició de TEA al cru acidolític per a neutralitzar el TFA, però es va veure per ^1H -RMN que la sal resultant precipitava amb el producte final. Aquesta sal es va poder eliminar amb rentats d'àcid cítric o una dissolució tampó de fosfats a pH 3, però això suposava un pas addicional en el procés sintètic. Per aquesta raó, es va voler substituir la TEA per una altra base que no fos orgànica per neutralitzar el cru acidolític.

Per tal d'avaluar si la sal s'eliminava de la fase orgànica, es va seguir en aquest cas l'anió trifluoroacetat per ^{19}F -RMN en lloc de la TEA per ^1H -RMN, ja que el senyal de ^{19}F corresponent a aquest anió surt com a singlet a - 78 ppm. Aquest singlet no es va poder quantificar a causa de la falta d'un patró, però es va poder determinar per a tots els crus la relació senyal soroll (S/N) pel singlet a -78 ppm.

Amb l'objecte de trobar un procés de neutralització òptim, es van dur a terme dos assajos amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM sense la presència de pèptid. En el primer assaig, la dissolució àcida orgànica es va rentar amb una dissolució aquosa de NaHCO_3 0,13 M, les fases es van separar i es van analitzar per ^{19}F -RMN. A partir de la relació senyal/soroll del singlet del TFA es va poder determinar que la majoria d'àcid havia passat a la fase aquosa com a trifluoroacetat, demostrant que el rentat de la fase orgànica amb aquesta base havia sigut efectiu però no suficient per eliminar tot el TFA de la fase orgànica. En el segon assaig, la dissolució d'1 % de TFA en DCM es va tractar amb NaHCO_3 sòlid (5 eq), la suspensió es va agitar durant 1 h i es va filtrar. La dissolució i el sòlid resultants es van analitzar per ^{19}F -RMN, detectant-se trifluoroacetat majoritàriament en el sòlid. Aquesta metodologia també va semblar adequada per la neutralització del cru ja que permetia separar la sal mitjançant una filtració, però calia fer més tractaments amb la base.

La utilització de NaHCO_3 per neutralitzar el TFA semblava adient, per tant, es va assajar amb el lot **7005_UB-21510**.

4.3.6.2.3. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE 7005_UB-21510

Les condicions de síntesi per l'obtenció del cru de **7005_UB-21510** es descriuen a l'*apartat 4.3.2.2.1*. El cru acidolític (91,0 % de puresa cromatogràfica per HPLC, **Figura 65**) es va dividir en dues parts per tal d'assajar les metodologies de neutralització descrites a l'*apartat anterior* i avaluar si la precipitació de **7005** era adequada en termes de filtració, rendiment i puresa del producte final.

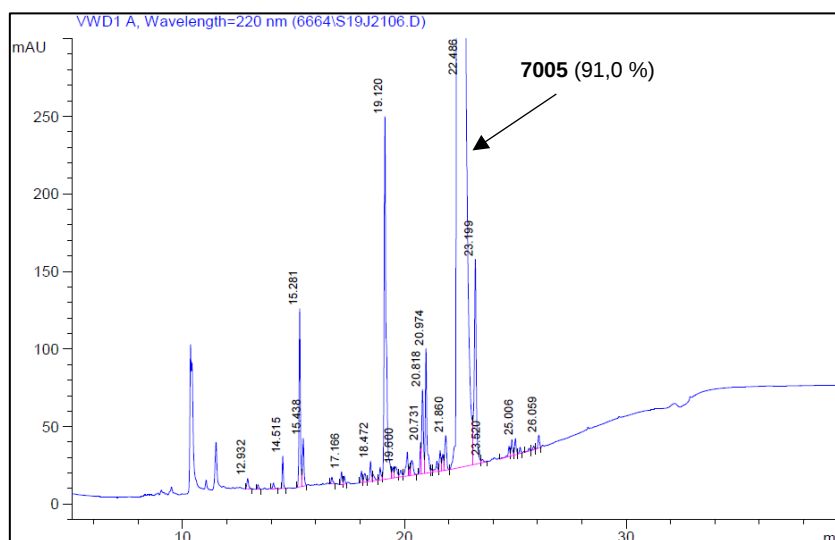


Figura 65. Cromatograma acidolític de **7005_UB-21510**. (Mètode A, *apartat 8.3.3*).

Per intentar eliminar tot el TFA de la fase orgànica, la primera part de cru es va neutralitzar rentant amb una dissolució aquosa saturada (sat) de NaHCO_3 , no detectant-se per ^{19}F -RMN el senyal de TFA en la fase orgànica després del rentat. Per contra, les extraccions van donar problemes al formar-se emulsions a la interfase, pel que es van haver de dur a terme contra extraccions de la fase aquosa per tenir una separació de fases sense emulsió.

La precipitació del producte de la primera fracció (2,8 g teòrics de **7005** calculats a partir de la funcionalització obtinguda al quantificar els grups Fmoc després de la incorporació del primer aminoàcid a la resina) es va dur a terme amb el procediment desenvolupat amb les proves de precipitació descrites a l'*apartat 4.3.6.2.1*, és a dir, eliminant DCM del cru fins a 10 volums i addicionant lentament TBME. A l'arribar a 30 vol d'antidissolvent, la dissolució es va sembrar i es va escalfar a 35 °C, observant-se un enterboliment de la dissolució. Es va acabar d'addicionar TBME fins a 50 vol i es va deixar en agitació a 25 °C durant 12 h. Es va observar la formació d'una suspensió densa i el sòlid no va dipositar al parar l'agitació. Es va programar una rampa de temperatura per refredar a 5 °C en 2 h i el sòlid es va dipositar al parar l'agitació. La filtració va ser ràpida i el sòlid resultant (**7005_UB-21510-P1-01**) va mostrar un rendiment molt baix (29 %), respecte els grams teòrics esperats. Es van plantejar dues hipòtesis per a explicar aquests resultats, un rendiment de síntesi baix o la pèrdua de producte al formar-se emulsions en els rentats de la fase orgànica per eliminar el TFA. Per contra, l'anàlisi del producte per HPLC va donar una puresa cromatogràfica de **7005** molt bona (98,2 %, **Figura 66, A**).

Per tal d'evitar la formació d'emulsions, la segona part del cru es va neutralitzar amb una dissolució aquosa de NaHCO_3 0,13 M, és a dir, menys concentrada que la utilitzada a l'assaig anterior, però es van tornar a formar emulsions. Donat que encara es detectava TFA en la fase orgànica, es va tractar amb NaHCO_3 sòlid (5 eq) fins a gairebé no observar-se el senyal de TFA per ^{19}F -RMN.

La precipitació de **7005** en la segona fracció (8,5 g teòrics de **7005** calculats a partir de la funcionalització obtinguda al quantificar els grups Fmoc després de la incorporació del primer aminoàcid a la resina) es va realitzar amb el mateix procediment que es va emprar en la primera fracció. En aquest cas, després d'addicionar TBME i escalfar a 35 °C el sòlid va precipitar i es va dipositar al parar l'agitació. La filtració va ser ràpida i el sòlid **7005_UB-21510-P2-01** es va obtenir amb una puresa cromatogràfica de 98,8 % (**Figura 66, B**) però amb un rendiment baix (40 %) respecte els grams teòrics que s'esperaven obtenir. Respecte els rendiments observats en aquesta síntesi (al voltant d'un 35 % de mitjana entre les dues fraccions), comparat amb els rendiments observats en les proves de precipitació del primer lot (**7005_UB-19182-P9-01**, apartat 4.3.6.2.1, rendiment de 69 %), un baix rendiment de síntesi podria explicar aquest resultat com ja s'ha dit abans. No cal descartar però que el procediment de neutralització hagués afectat al rendiment en el cas de la segona fracció. Per tal d'aclarir quin era el motiu del baix rendiment, a partir de la següent síntesi de **7005** es va quantificar per ^1H -RMN el cru de reacció i així es van poder avaluar les condicions de precipitació independentment de si en la síntesi havia ocorregut la pèrdua no desitjada de cadenes peptídiques.

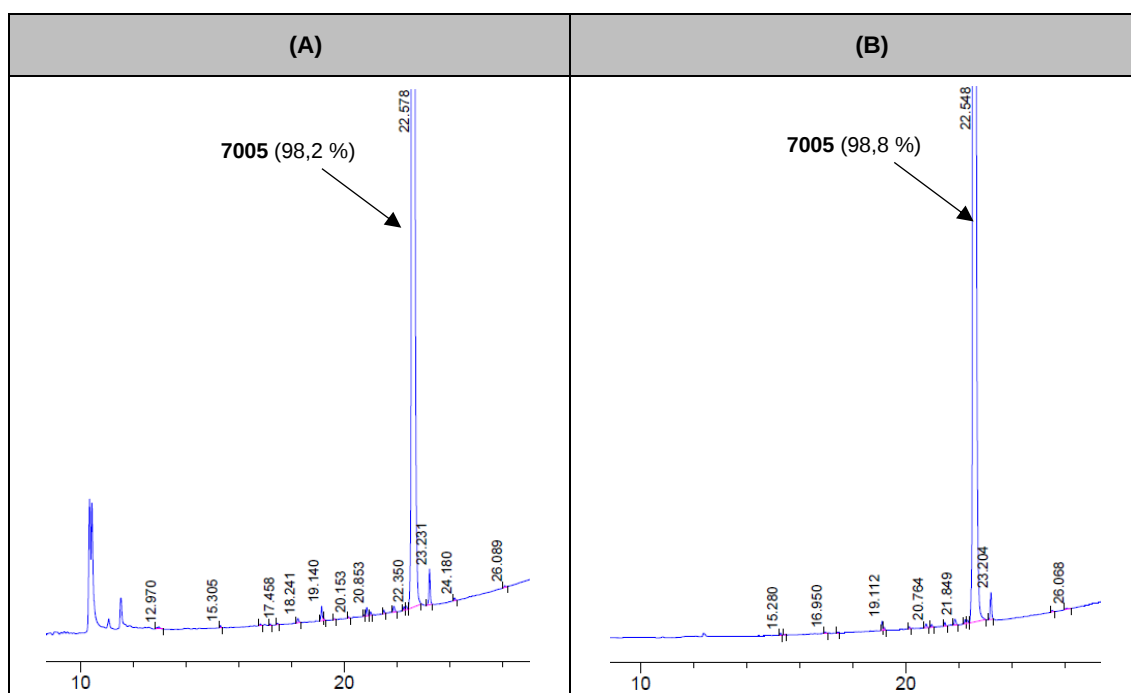


Figura 66. Cromatogrames dels sòlids (A) **7005_UB-21510-P1-01** i (B) **7005_UB-21510-P2-01** obtinguts utilitzant diferents mètodes de neutralització del cru acidolític.

En qualsevol cas, la puresa cromatogràfica de **7005** en els sòlids obtinguts (al voltant de 98,5 %) va ser major que l'observada en el cru (91,0 %), és a dir, la precipitació es va mostrar eficaç en la purificació del producte mitjançant filtracions ràpides, un resultat positiu pel que fa a la potencial implementació del procés a escales més grans. Pel que fa a la neutralització del cru acidolític, la utilització de NaHCO_3 sòlid va resultar ser més eficaç ja que els rentats amb aquesta base donava lloc a la formació d'emulsions que complicaven el procés.

4.3.6.2.4. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE 7005_UB-23441

Les condicions que es van utilitzar per a obtenir el cru de **7005_UB-23441** es descriuen a l'*apartat* 4.3.5.4. La puresa cromatogràfica del producte al cru acidolític va ser del 93,1 % (**Figura 64, B**).

En aquesta prova, el cru acidolític es va intentar neutralitzar amb NaHCO_3 sòlid (5 eq), però no es va poder eliminar completament el TFA de la dissolució després de 3 tractaments amb base. En aquesta síntesi, es va quantificar **7005** en el cru per ^1H -RMN utilitzant un patró d'àcid maleic, determinant-se 9 g de producte. La quantitat teòrica de producte que s'esperava obtenir va ser de 10,5 g, determinada a partir de la funcionalització de la resina una vegada incorporat el primer aminoàcid. Aquest valor va donar un rendiment de síntesi d'aproximadament 86 %. A partir dels grams determinats per ^1H -RMN, es van calcular els volums i els rendiments que es descriuen a continuació.

La precipitació del producte es va dur a terme seguint el procediment descrit per la prova 9 en la precipitació de **7005_UB-19182** (*apartat* 4.3.6.2.1). En aquest cas, la sembra es va redissoldre i el sòlid no va precipitar, pel que es va afegir més TBME fins arribar a una relació de DCM/TBME d'1:8. Encara i així, aquesta proporció d'antidissolvent no va ser suficient com per a que precipités el producte en aquesta síntesi, resultat diferent del que s'havia vist en les proves anteriors (*apartats* 4.3.6.2.1 i 4.3.6.2.3). Per tant, la dissolució del cru de **7005_UB-23441** es va dividir en 2 fraccions per fer diferents proves de precipitació.

Es va detectar DMF per ^1H -RMN al cru acidolític, pel que es va pensar que podria ser el motiu de que **7005** no precipités correctament. Així doncs, el dissolvent de la primera fracció del cru (3 g de **7005**) es va canviar a DCM altra vegada i es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb H_2O per tal d'eliminar la DMF del cru. Les separacions de fases van ser dificultoses per la formació d'un precipitat en la interfase i la fase orgànica obtinguda va presentar el mateix contingut de DMF a l'analitzar-la per ^1H -RMN, indicant que les extraccions no havien sigut efectives. Com que el pèptid no precipitava en les condicions de DCM/TBME, es va addicionar H_2O a la fase orgànica i es va formar un precipitat gomós. La filtració de la suspensió va ser lenta però es va obtenir el sòlid **7005_UB-23441-P1-01** amb una puresa cromatogràfica de 96,2 %. El rendiment va ser molt baix (27 %), detectant-se pèrdua de producte en les AM (0,4 g). Encara i així, faltaven uns 1,5 g de **7005** respecte el que s'havia quantificat per ^1H -RMN per a completar el balanç de masses, que probablement s'havien perdut en els rentats de la fase orgànica.

Al ser un resultat insatisfactori per la filtració lenta, es va decidir intentar reproduir les condicions de precipitació de **7411_UB-21510-01** (*apartat* 4.3.6.2.3) amb la segona fracció del cru de **7005_UB-23441** (6 g de **7005**). Així, el cru es va neutralitzar amb rentats de dissolució aquosa sat de NaHCO_3 , aconseguint-se eliminar el TFA malgrat la formació d'emulsions a la interfase. A continuació, el producte es va poder precipitar utilitzant les condicions descrites en **7005_UB-19182-P9** (*apartat* 4.3.6.2.1), obtenint-se un sòlid que va dipositar al parar l'agitació. La filtració va ser ràpida i el sòlid **7005_UB-23441-P2-01** es va obtenir amb una puresa cromatogràfica de 98,4 %. El rendiment va ser també baix (28 %) però en aquest cas es van quantificar 2,7 g de producte en les AM sense precipitar, el que indicava que la precipitació no estava sent efectiva. Per tant, al reproduir les condicions de neutralització de la prova **7411_UB-21510-01**, es va aconseguir la precipitació del producte desitjat encara que amb un rendiment baix, el que indicava que probablement el procés de neutralització tenia efecte en la precipitació.

A la **Taula 24** es comparen les proves de precipitació que s'han descrit fins el moment per **7005**. En general, es va poder observar que la manera en que es neutralitzava el cru afectava significativament al rendiment. El millor resultat es va obtenir amb el lot **7005_UB-19182-P9**, on es va neutralitzar amb TEA. En canvi, no hi va haver precipitació utilitzant les mateixes condicions però neutralitzant prèviament del cru acidolític amb NaHCO_3 sòlid (**7005_UB-23441**). Quan es va utilitzar una dissolució aquosa sat de NaHCO_3 (**UB-21510-P1**, **UB-21510-P2** i **UB-23441-P2**), hi va haver precipitació però amb un molt rendiment baix.

Taula 24. Proves de precipitació amb els crus de **7005**.

Lot	Neutralització del cru	Precipitació	Aspecte	Filtració	% 7005 per HPLC (sòlid)	% Rend.
UB-19182-P9	TEA	DCM/TBME (1:5)	Sòlid que diposita	Ràpida	98,2	69 ^a
UB-21510-P1	Extraccions amb NaHCO_3 sat	DCM/TBME (1:5)	Sòlid que diposita	Ràpida	98,2	29 ^a
UB-21510-P2	Extraccions amb NaHCO_3 (0,13 M) + NaHCO_3 sòlid	DCM/TBME (1:5)	Sòlid que diposita	Ràpida	98,8	40 ^a
UB-23441	NaHCO_3 sòlid	DCM/TBME (1:5)	No precipita	-	-	-
UB-23441-P1	Extraccions amb H_2O	H_2O	Sòlid gomós	Lenta	96,2	27 ^b
UB-23441-P2	Extraccions amb NaHCO_3 (sat)	DCM/TBME (1:5)	Sòlid que diposita	Ràpida	98,4	28 ^b

(a) *Calculat a partir de la funcionalització de la resina després d'acoblar el primer aminoàcid.*

(b) *Calculat a partir de la quantificació per ^1H -RMN de **7005** en el cru.*

4.3.6.3. ASSAJOS AMB 7411

4.3.6.3.1. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE 7411_UB-21531

L'obtenció de **7411_UB-21531** es descriu a l'*apartat 4.3.1.1*. El cru acidolític es va tractar dues vegades amb NaHCO_3 sòlid (5 eq) per eliminar el TFA. L'anàlisi de la dissolució obtinguda per ^{19}F -RMN va determinar que el primer tractament amb NaHCO_3 va ser efectiu, reduint el contingut de TFA en la dissolució (relació S/N de l'anió de trifluoroacetat més baixa que la inicial). No obstant, el segon tractament amb base no va mostrar tants bons resultats ja que se seguia detectant una relació de S/N molt semblant a l'obtinguda després del primer tractament. Per aquesta raó, les neutralitzacions del cru en les síntesis de **7411** posteriors es van dur a terme amb un únic tractament de NaHCO_3 sòlid (5 eq), i al no observar-se la pèrdua d'integritat dels grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals, es va considerar com un bon tractament per a la neutralització del cru.

La solució resultant es va dividir en 5 fraccions per tal de dur a terme proves de precipitació (**Taula 25**). Una alíquota del cru es va analitzar per HPLC, mostrant una puresa cromatogràfica de 83,8 %. Com que en aquell moment encara no s'havia desenvolupat un mètode de quantificació de producte per ^1H -RMN, els rendiments es van determinar tenint en compte els

grams teòrics de pèptid que s'haurien d'obtenir a partir de la funcionalització de la resina després d'acoblar el primer aminoàcid, i el volum de dissolvent resultant del tractament acidolític (7,9 g teòrics de **7411** en 550 mL de DCM). Els grams teòrics de **7411** en cada fracció es van determinar a partir dels grams teòrics totals. Cal tenir present que encara s'utilitzava IPA en el protocol de rentats i, per tant, molt probablement es van perdre cadenes peptídiques durant aquests rentats en cada etapa de la síntesi, contribuint aquest fet a l'obtenció de rendiments baixos (*apartat 4.3.5.3*).

Taula 25. Proves de precipitació amb el cru de **7411_UB-21531**.

Prova	Dissolvent	Anti-dissolvent	Aspecte	Filtració	% 7411 per HPLC (sòlid)	% Rend.
cru	-				83,8	
P1	DCM (75 vol)	H ₂ O (125 vol)	Sòlid gomós	Molt lenta	69,5	27
P2	DCM (10 vol)	TBME (100 vol)	Oli groc	Decantació	-	-
P2-cont	Oli groc	H ₂ O (50 vol)	Sòlid gomós	Molt lenta	87,1	18
P3	DCM (40 vol)	TBME (200 vol)*	Oli groc	Decantació	-	-
P3-cont	Oli groc	H ₂ O (160 vol)	Sòlid gomós	Molt lenta	93,3	36
P4	DCM (10 vol)	IPA (40 vol)	Sòlid que diposita	Ràpida (passa a les AM)	97,4	21
P4-cont	IPA (10 vol)	Heptà (10 vol)	Sòlid que diposita	Ràpida	94,3	14
P5	IPA (3,5 vol)	H ₂ O (0,5 vol)	Sòlid gomós	Lenta	96,2	21

(*) Es sembla amb **7411_UB-21531-P2-01**

En la prova 1, es va dur a terme un rentat amb 125 volums d'H₂O d'una fracció del cru (1,6 g teòrics de **7411**) per tal d'eliminar les traces de sal que podrien haver quedat dissoltes en el DCM després de la neutralització del cru. Inesperadament, el pèptid va precipitar en forma de sòlid gomós i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. La filtració va ser molt lenta i el sòlid **7411_UB-21531-P1-01** es va obtenir amb una puresa cromatogràfica pobre (69,5 %) degut a la presència de DIOP (26 %) en el producte obtingut.

En la prova 2, una fracció de solució del cru en DCM (1,6 g teòrics de **7411**) es va concentrar fins a 10 vol i es va addicionar lentament TBME (60 vol). Després de 12 h d'agitació no es va observar precipitat i es va addicionar més TBME (40 vol). Un oli groc va dipositar al fons del reactor, es va decantar la solució i es va precipitar amb l'addició d'H₂O (50 vol). El sòlid obtingut tenia aspecte gomós i la filtració a pressió reduïda va ser molt lenta, però el sòlid **7411_UB-21531-P2-01** es va obtenir amb una puresa cromatogràfica superior a la de la prova 1 (87,1 % vs 69,5 %), ja que el DIOP es va quedar a les AM de TBME.

Amb la prova 3 es va voler tornar a provar TBME com antidissolvent, però amb una relació diferent de volums entre el dissolvent i l'antidissolvent. Es va eliminar dissolvent d'una fracció del cru (0,9 g teòrics de **7411**) fins a 40 volums de DCM. A continuació, el TBME es va addicionar lentament fins a arribar a 120 volums i el cru es va sembrar amb el sòlid **7411_UB-21531-P2-01** per afavorir la precipitació. La sembra no es va redissoldre en 12 h però no va precipitar cap sòlid i, a l'addicionar més TBME (80 vol), un oli groc va dipositar al fons del reactor. El dissolvent de la reacció es va canviar a TBME, la solució es va decantar de l'oli resultant, i es va precipitar amb l'addició d'H₂O (160 vol). La filtració va ser lenta però el sòlid **7411_UB-21531-P3-01** es va obtenir amb una puresa cromatogràfica significativament superior a la del cru original (93,3 % vs 83,8 %).

L'IPA es va utilitzar com a antidissolvent a la prova 4. Una fracció de la solució de cru en DCM (0,9 g teòrics de **7411**) es va concentrar fins a 10 volums i l'IPA es va addicionar lentament fins a 40 volums. Va precipitar un sòlid que es va dipositar al parar l'agitació i, després de 48 h, la suspensió es va filtrar. La filtració va ser ràpida però va passar sòlid a les AM i es va obtenir molt poca quantitat del sòlid **7411_UB-21531-P4-01**, encara que amb una puresa cromatogràfica elevada (97,4 %). Les AM es van recuperar, el dissolvent es va canviar a IPA, i es va concentrar a 10 volums. Al no dipositar-se al parar l'agitació el sòlid que es va formar, es va addicionar heptà (10 vol) i el sòlid va dipositar al parar l'agitació. La filtració de la suspensió va ser ràpida però la puresa cromatogràfica del sòlid obtingut (**7411_UB-21531-P4-02**) va ser més baixa (94,3 %) que utilitzant IPA com antidissolvent.

Com es va veure en la prova 4, l'IPA va ser un bon candidat per utilitzar com a antidissolvent ja que el **7411** precipitava amb una puresa cromatogràfica major que la observada en el cru, encara que amb un rendiment baix. Per aquesta raó, en la prova 5, el dissolvent d'una fracció del cru en DCM (2,9 g teòrics de **7411**) es va canviar per IPA, es va concentrar a 3,5 volums i la dissolució va passar a ser una suspensió densa. Al no dipositar el sòlid al parar l'agitació, es van afegir 0,5 volums d'H₂O i va precipitar un sòlid gomós (**7411_UB-21531-P5-01**). Al donar aquest sòlid una filtració lenta, es va concloure que la H₂O no era adequada per precipitar el producte en un context de planta pilot. Tanmateix, utilitzant IPA com a antidissolvent (**7411_UB-21531-P4-01**), la puresa cromatogràfica del sòlid obtingut millorava significativament i la filtració era ràpida, encara que s'hauria d'optimitzar el volum d'IPA per obtenir un bon rendiment.

4.3.6.3.2. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE 7411_UB-21550

El cru de **7411_UB-21550**, l'obtenció del qual es descriu a l'*apartat 4.3.2.2.2* (83,4 % de puresa cromatogràfica), es va tractar una vegada amb 5 eq de NaHCO₃ sòlid per eliminar el TFA. Abans de dur a terme els assajos de precipitació amb aquest cru, es va quantificar el pèptid per ¹H-RMN utilitzant un patró d'àcid maleic. Es va determinar un contingut d'aproximadament de 2,9 g de **7411** en el cru, el que representa un rendiment de síntesi del 35 % respecte els 8,2 g teòrics de producte que s'haurien d'obtenir respecte la funcionalització de la resina després d'acoblar el primer aminoàcid. Amb aquesta dada es va poder comprovar que els rendiments obtinguts en les proves anteriors fetes amb el lot **7411_UB-21531** (*apartat 4.3.6.3.1*) eren baixos perquè probablement es perdien cadenes peptídiques durant la síntesi, no perquè la precipitació no fos bona. Per les noves proves que es descriuen a continuació amb el lot **7411_UB-21550**, es van calcular els volums de dissolvent i els rendiments respecte els 2,9 g de **7411** determinats per ¹H-RMN.

La solució del cru en DCM es va concentrar fins a 10 volums i es van addicionar 20 vol d'IPA. Es va concentrar a 10 vol per dur a terme un canvi de dissolvent a IPA, i es va observar una suspensió densa que es va deixar en agitació 12 h. La suspensió es va filtrar tot i que el sòlid no es va dipositar al parar l'agitació; el procés va ser lent però en aquest cas el sòlid va quedar totalment retintut al filtre. El sòlid **7411_UB-21550-01** es va obtenir amb un rendiment de 65 % (respecte els grams de **7411** quantificats per ^1H -RMN) i el producte es va detectar a les AM, indicant que no tot havia precipitat. La puresa cromatogràfica de **7411** va ser del 87,6 % (**Figura 67, B**), lleugerament superior a la del cru original (83,4 %, **Figura 67, A**). Cal senyalar que aquestes pureses cromatogràfiques haurien estat superiors si no fos per la pèrdua inesperada de grups Fmoc que es va detectar a l'anàlisi cromatogràfic, probablement causada per deixar en nevera durant uns dies la solució del cru.

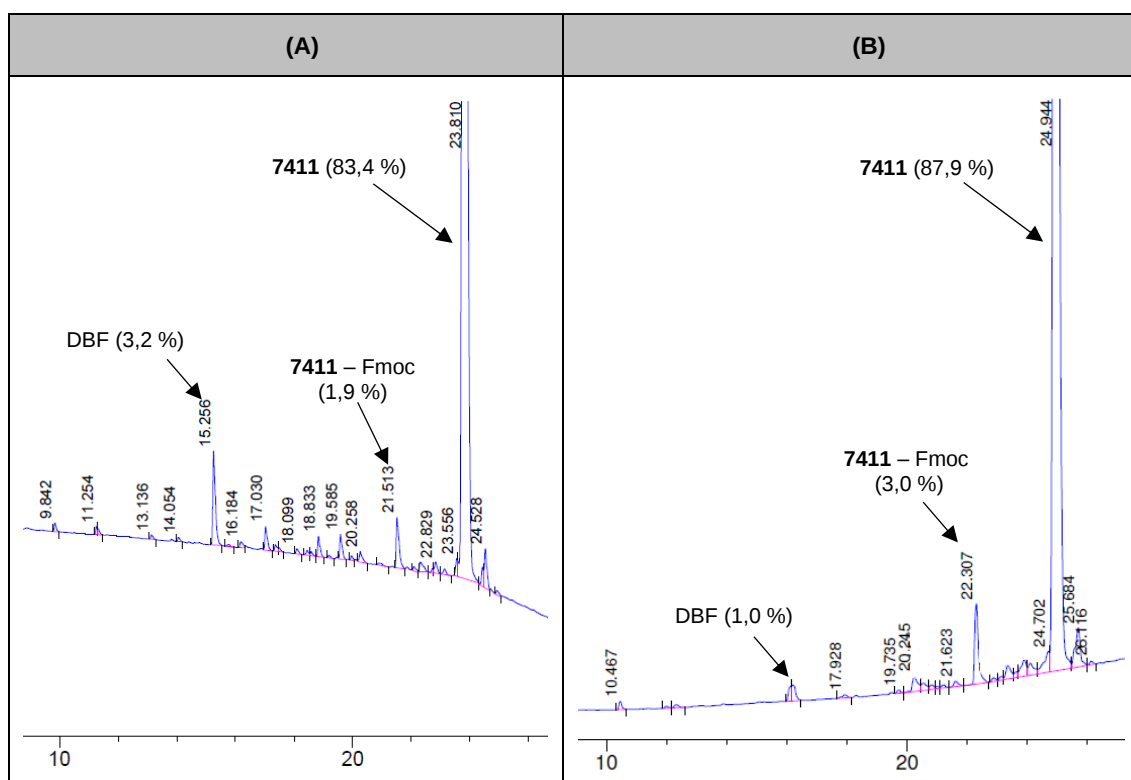


Figura 67. Comparació dels perfils cromatogràfics del cru acidolític de **7411_UB-21550 (A)** i el sòlid obtingut **7411_UB-21550-01 (B)**.

4.3.6.3.3. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE **7411_UB-21578**

Les condicions d'obtenció de **7411_UB-21578** es descriuen en l'apartat 4.3.2.2.2 (92,4 % de puresa cromatogràfica, **Figura 68, A**) i la dissolució del cru es va tractar amb NaHCO_3 sòlid (5 eq) per eliminar el TFA. Abans de dur a terme els assajos de precipitació, es va quantificar el contingut de **7411** per ^1H -RMN amb un patró d'àcid maleic, resultant aproximadament 4,4 g de producte. Aquest valor va servir com a referència per concentrar el cru als volums desitjats i dur a terme la precipitació. El rendiment de síntesi va ser de 56 % respecte els 7,9 g teòrics de **7411** que s'esperaven a partir de la funcionalització de la resina una vegada es va acoblar el primer aminoàcid.

Donat que es volia augmentar el rendiment en la precipitació respecte la prova **7411_UB-21550-01** descrita a l'apartat anterior, el cru dissolt en DCM es va concentrar fins a 20 vol i es va carregar amb 20 vol d'IPA. Al concentrar la solució resultant a 20 vol per dur a terme arrossegaments amb

IPA, va precipitar un sòlid que no va dipositar al parar l'agitació. Es van carregar 10 vol més d'IPA, la mescla es va tornar a concentrar, aquest cop a 10 vol, i la suspensió es va deixar en agitació 12 h. La suspensió obtinguda era densa i la filtració va ser lenta, obtenint-se el sòlid **7411_UB-21578-01** amb un 76 % de rendiment, millorat respecte la prova anterior (65 % per **7411_UB-21550-01**). La puresa cromatogràfica en el sòlid va ser del 97,3 % (**Figura 68, B**), millorada respecte el cru acidolític inicial (92,4 %).

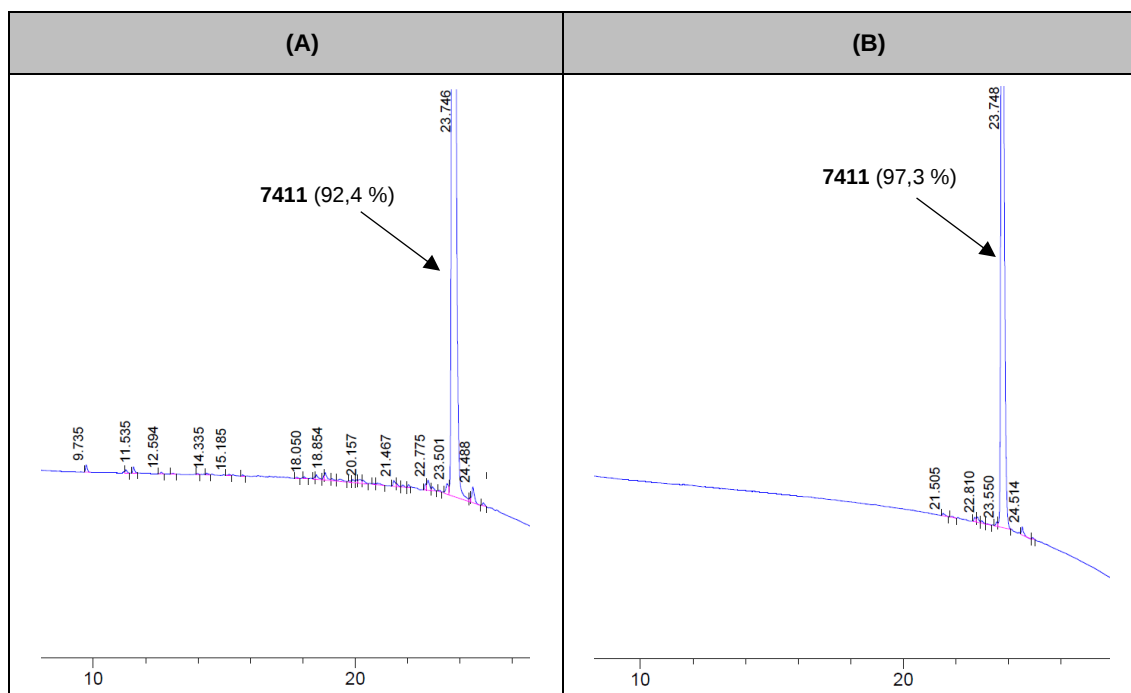


Figura 68. Comparació dels perfils cromatogràfics del cru acidolític de **7411_UB-21578 (A)** i el sòlid obtingut **7411_UB-21578-01 (B)**.

4.3.6.3.4. ASSAJOS DE PRECIPITACIÓ DE **7411_UB-23401**

Les condicions d'obtenció de **7411_UB-23401** es descriuen en l'*apartat 4.3.2.2.2* (78,5 % de puresa cromatogràfica, **Figura 69, A**) i la dissolució del cru es va tractar amb NaHCO₃ sòlid (5 eq) per eliminar el TFA. De la mateixa manera que es va fer amb **7411_UB-21578**, es va quantificar per ¹H-RMN amb un patró d'àcid maleic per tenir una referència a l'hora de concentrar el cru als volums desitjats i dur a terme la precipitació. L'anàlisi del cru per ¹H-RMN va donar aproximadament 5,6 g de **7411** (79 % de rendiment de síntesi, calculat a partir de la funcionalització trobada després de l'acoblament del primer aminoàcid a la resina). La precipitació es va dur a terme amb el mateix procediment que l'utilitzat per **7411_UB-21550-01**, obtenint-se el sòlid **7411_UB-21578-01** un rendiment de 77 % (calculat a partir de la quantificació de producte per ¹H-RMN) i amb una puresa cromatogràfica de 80,0 % (**Figura 69, B**).

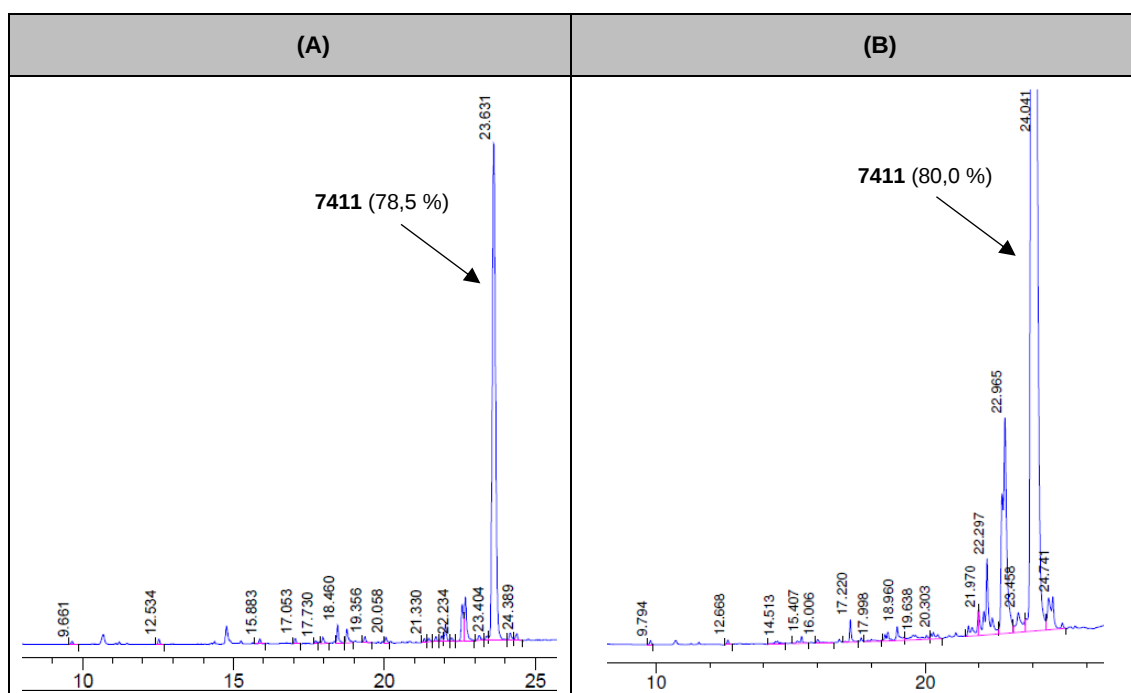


Figura 69. Comparació dels perfils cromatogràfics del cru acidolític de **7411_UB-23401** (A) i el sòlid obtingut **7411_UB-23401-01** (B).

La **Taula 26** resumeix els resultats de les precipitacions que es van dur a terme amb els diferents lots obtinguts de **7411**. El canvi de dissolvent a IPA va permetre obtenir rendiments precipitació acceptables i la puresa cromatogràfica del producte va millorar respecte a la del cru de reacció.

Taula 26. Proves de precipitació amb els crus de **7411**.

Lot	Precipitació	Sòlid	Filtració	% 7411 per HPLC (sòlid)	% Rend.
UB-21531-P4	DCM/IPA (10:40)	Sòlid que diposita	Ràpida (passa a les AM)	97,4	21 ^a
UB-21550	DCM/IPA (10:20) Concentració a 10 vol	Suspensió densa	Lenta	87,6	65 ^b
UB-21578	DCM/IPA (20:20) Concentració a 20 vol			97,3	76 ^b
UB-23401	Addició de 10 vol d'IPA Concentració a 10 vol			80,0	77 ^b

(a) *Calculat a partir de la funcionalització de la resina després d'acoblar el primer aminoàcid.*

(b) *Calculat a partir de la quantificació per ¹H-RMN de **7411** en el cru.*

Tal i com s'ha mencionat a l'inici d'aquest apartat, les filtracions realitzades als darrers assajos poden arribar a ser viables en un procés a planta, encara que caldria millorar el mètode amb l'addició d'una sembra o el refredament controlat de la suspensió per afavorir la precipitació. Cal dir també que en aquests assajos s'aconseguia purificar el cru de reacció malgrat no dipositar-se el sòlid al fons del reactor.

Així doncs, es va desenvolupar un procés adequat per a precipitar **7411** a partir del canvi de dissolvent del cru acidolític de DCM a IPA. Aquest procés era factible per dur-lo a terme a gran

escala ja que el canvi de dissolvent es va dur a terme en el reactor. S'ha de tenir en compte que prèviament al procés de precipitació, es va tractar el cru amb NaHCO_3 sòlid per neutralitzar el TFA i evitar d'aquesta manera la pèrdua de grups protectors. A més a més, amb aquesta precipitació, es va observar un augment de la puresa cromatogràfica del sòlid respecte a la obtinguda en el cru de reacció i es van aconseguir bons rendiments de procés, especialment en les proves **7411_UB-21578** i **7411_UB-23401**.

En els assajos de precipitació de **7005** (apartat 4.3.6.2) es va trobar un procés de precipitació adequat que consistia en la concentració del cru acidolític a 10 vol de DCM i la posterior addició de 50 vol de TBME (**7005_UB-19182-P9**). Aquest protocol va proporcionar una filtració ràpida, la purificació del producte desitjat respecte el cru acidolític inicial, i un rendiment de precipitació acceptable. No obstant, quan es va utilitzar NaHCO_3 sòlid pel procés de neutralització (**7005_UB-23441**), el producte no va precipitar en les condicions proposades (10:50 vol de DCM/TBME) i es van haver de fer rentats aquosos amb la dissolució de NaHCO_3 per eliminar l'excés de TFA detectat per ^1H -RMN. Després d'aquest rentat va precipitar el cru de **7005** amb les condicions de precipitació abans esmentades, encara que aquest tractament de neutralització no era convenient per la formació d'emulsions en la separació de fases.

4.3.7. ESCALAT

Un cop els protocols sintètics per accedir als fragments protegits **7005** i **7411** van ser estudiats exhaustivament pel que fa a condicions experimentals (nombre d'equivalents de reactius, rentat de la resina i precipitació del cru acidolític), i es va desenvolupar un mètode pel seguiment de les reaccions en fase sòlida, es va dur a terme l'estudi de l'escalat dels processos.

4.3.7.1. REACTOR

Els filtres assecadors de Nutsche s'utilitzen en plantes pilot i unitats de producció per tal de dur a terme processos que requereixen el rentat, l'aïllament i l'assecat del sòlid. El GFD®Lab és un filtre assecador de Nutsche amb agitació, que permet dur a terme processos com la filtració de suspensions, el rentat de productes i l'assecat al buit a escala de laboratori. És una versió en miniatura d'un filtre assecador de producció, les parts del qual es descriuen a l'esquema general de la **Figura 70**. Al disposar de sistemes d'agitació i de filtració, aquest tipus de filtre va ser una bona opció per utilitzar-lo com a reactor per dur a terme l'escalat de la síntesi de pèptids en fase sòlida.

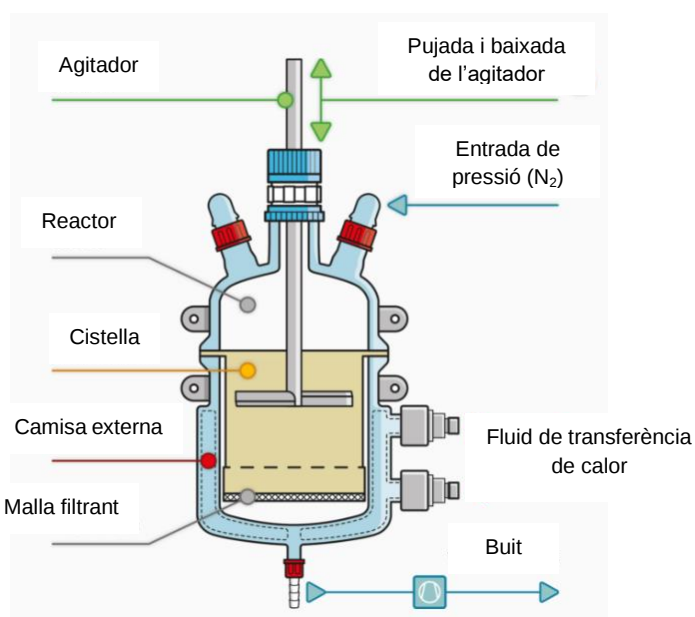


Figura 70. Parts del GFD®Lab Nutsche utilitzat per a l'escalat de la SPPS.

Concretament, es va triar el filtre Nutsche GFD®Lab model 050 series (**Figura 71**), disponible a l'empresa, per dur a terme l'escalat de la síntesi en fase sòlida en aquesta Tesi Doctoral. Aquest filtre consisteix en una cistella de polipropilè de capacitat de 2 L amb una malla filtrant de 20 µm (3), un reactor amb 4 boques per dur a terme les càrregues (1), una camisa externa pel control de la temperatura (4), un agitador mecànic acoblat a una barra de tefló amb un nivell de dos pales de tefló (2), una clau de descàrrega i una ampolla amb una boca on s'aplica el buit (no apareix a la figura).

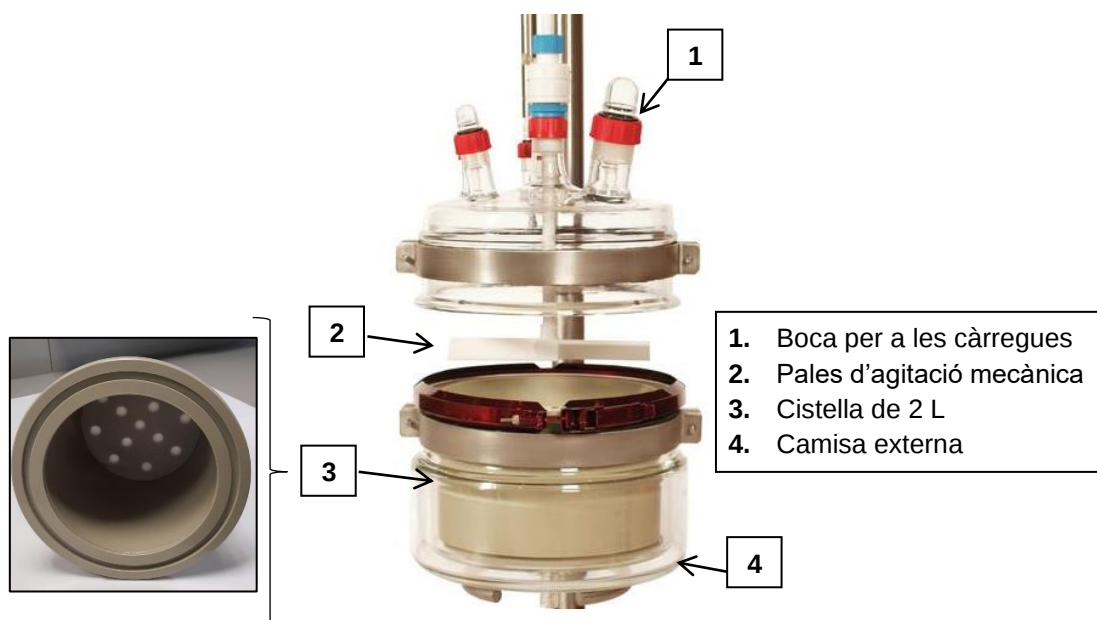


Figura 71. Filtre Nutsche GFD®Lab model 050 series utilitzat com a reactor per a l'escalat de la SPPS.

Per tal de convertir el filtre Nutsche en un reactor per poder dur a terme la SPPS, la cistella es va modificar i es va posar una junta de pressió a l'exterior per tal de crear estanqueïtat dins de la cistella i, d'aquesta manera, evitar que la dissolució passés a través de la malla filtrant mentre es duia a terme la síntesi (**Figura 72, A**). Per altra banda, es van fabricar dos nivells més d'agitació,

amb dues pales cadascun, per tal d'assegurar la correcta agitació de les suspensions (**Figura 72, B**).

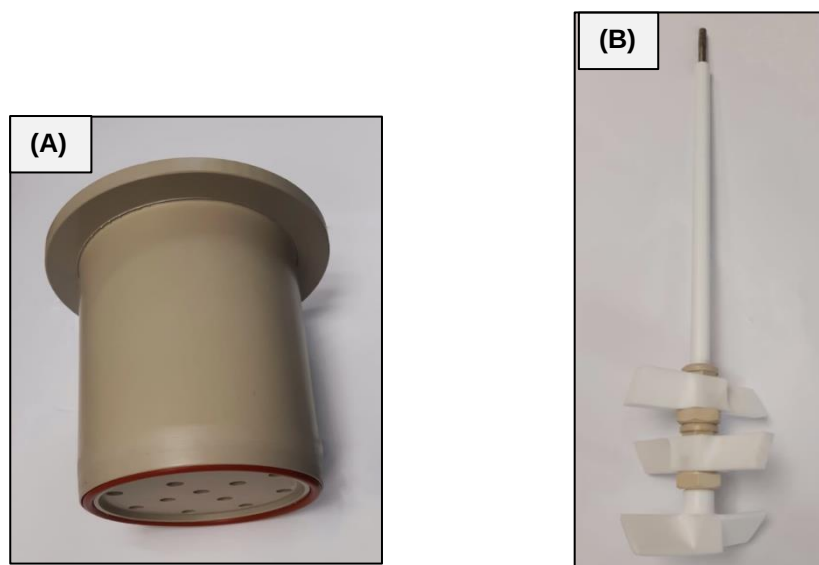


Figura 72. (A) Cistella del filtre Nutsche adaptada amb junta de pressió per a l'escalat de la SPPS; (B) Barra d'agitació utilitzada en el Nutsche per a l'escalat de la SPPS.

4.3.7.2. SÍNTESI DE 7005_UB-23475

L'escalat de la síntesi en fase sòlida de **7005 (7005_UB-23475)** es va dur a terme en el filtre Nutsche de la **Figura 71** (*apartat 4.3.7.1*), a escala de 58,1 mmols (41,5 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Leu-OH es va incorporar a la resina utilitzant les mateixes condicions que les descrites en les primeres síntesis (*apartat 4.2.2*), però deixant 2 h la reacció de capat per tal d'assegurar que no quedin centres reactius a la resina que puguin reaccionar amb l'HOBt (*apartat 4.3.4.2*). El grup Fmoc es va quantificar per UV-Vis (*apartat 4.1.3*) i la funcionalització trobada va ser de 0,59 mmols/g, un valor una mica més baix que l'observat en les síntesis de **7005** amb altres reactors (al voltant de 0,75 mmols/g, *apartat 4.3.2.2.1*).

Les reaccions d'eliminació del grup Fmoc es van dur a terme amb 2 tractaments d'una dissolució de 20 % de piperidina en DMF, però el nombre d'equivalents de piperidina es va reduir fins a 6 mL dissolució/g de resina (22 eq), en comptes d'utilitzar 10 mL de dissolució/g de resina (44 eq) com s'havia utilitzat fins el moment (*apartat 4.1.4*). Cal mencionar que, la piperidina és una substància controlada pel seu ús en la preparació de substàncies narcòtiques i per la generació de grans quantitats de residus tòxics,¹¹⁵ per aquesta raó, disminuir el seu consum suposava una reducció econòmica important en el procés. Es va utilitzar HPLC i ¹H-RMN per comprovar si la reacció havia finalitzat, no detectant-se material de partida en cap cas després dels 2 tractaments de 5 min cadascun, indicant que, probablement, els equivalents de piperidina encara es podien reduir més.

Les reaccions d'acoblament es van realitzar utilitzant 3 eq de Fmoc-aminoàcid, DIC i HOBt en totes les etapes (*apartat 4.1.5*), excepte en l'etapa de l'acoblament de l'últim aminoàcid de la seqüència (Boc-Ile-OH), en la que es van carregar 4 eq de reactius (*apartat 4.3.1.2*). Les reaccions es van monitoritzar cada 1,5 h amb el test de ninhidrina (*apartat 4.1.5.1*), i per anàlisi d'HPLC i ¹H-RMN (*apartat 4.3.3.2*). Les 3 tècniques de seguiment van indicar que les reaccions d'acoblament van finalitzar en aquest temps, excepte per l'acoblament de l'últim aminoàcid, on

la ninhidrina va ser positiva però no es va observar material de partida per HPLC i ^1H -RMN. La reacció es va deixar fins a 5 h però el test de ninhidrina seguia essent positiu. Aquest resultat demostra que la possibilitat de seguir les reaccions en fase sòlida mitjançant mètodes alternatius a la ninhidrina com l'HPLC o ^1H -RMN pot estalviar temps i quantitats importants de reactius i dissolvents si s'hagués decidit reacoblar.

En aquesta síntesi, els rentats de la resina es van dur a terme seguint la seqüència de dissolvents descrita a la **Taula 20** de l'*apartat 4.3.5.3*, però en aquest cas utilitzant 6 mL de dissolvent/g de resina per tal d'evitar malgastar dissolvents. Amb aquesta reducció de volums es va aconseguir un estalvi econòmic important i no es va observar durant la síntesi l'aparició de cap impuresa no habitual en el perfil cromatogràfic del cru.

Els volums utilitzats de la dissolució d'1 % de TFA en DCM per l'escissió del pèptid de la resina també es van reduir de 15 mL/g de resina a 12 mL de dissolució/g de resina i es va comprovar que tot el pèptid s'havia desancorat de la resina. El cru obtingut es va analitzar per HPLC, detectant-se **7005** amb una puresa cromatogràfica del 88,8 % i la quantificació per ^1H -RMN del **7005** en el cru acidolític va permetre determinar 31,6 g de **7005**. La quantitat teòrica de producte que s'esperava obtenir va ser de 41,5 g, determinada a partir de la funcionalització de la resina una vegada incorporat el primer aminoàcid. Aquest valor va donar un rendiment de síntesi d'aproximadament 76 %. La neutralització del cru es va dur a terme amb el mateix procediment que es va utilitzar per **7005_UB-23441** (*apartat 4.3.6.2.4*) i, encara que els rentats de NaHCO_3 sòlid no van ser efectius per eliminar completament el TFA del cru, es va intentar precipitar amb DCM/TBME (10:50). Com en el cas de la síntesi **7005_UB-23441**, no es va poder aconseguir un precipitat en aquestes condicions malgrat semblar, canviar el dissolvent a TBME o aplicar rampes de temperatura.

Al no tenir el cru el mateix comportament en la precipitació que l'observat pels lots **7005_UB-19182** i **7411_UB-21510** (*apartats 4.3.6.2.1 i 4.3.6.2.3*), i tenint en compte que la diferència amb els lots **7005_UB-23441** i **7005_UB-23475** va ser la neutralització del cru, es va plantejar la possibilitat d'un alt contingut de TFA en aquests dos crus. Per tant, es va dur a terme un ^{19}F -RMN de la dissolució del lot **7005_UB-23475** on no va precipitar el pèptid, detectant-se un senyal molt intens a -79 ppm. Donat que aquesta senyal podria correspondre al TFA romanent no neutralitzat amb la base o a l'anió trifluoroacetat, es van dur a terme arrossegaments de DCM del cru per eliminar el TFA però es va seguir detectant una quantitat similar per ^{19}F -RMN. Degut a que el TFA hauria de disminuir amb els arrossegaments per la seva volatilitat, es va concloure que el senyal que es detectava per ^{19}F -RMN corresponia a l'anió trifluoroacetat que havia quedat dissolt al cru. Així, una fracció del cru es va precipitar amb heptà i el sòlid obtingut es va analitzar per ^{19}F -RMN, detectant-se un senyal intens a -79 ppm. Aquest resultat confirmava la hipòtesi de que el senyal de fluor corresponia al trifluoroacetat sòdic, insoluble en heptà.

La presència de trifluoroacetat sòdic en la solució del cru en DCM podria explicar la no precipitació d'aquest cru en les condicions optimitzades a l'interferir la sal en aquest procés. Cal recordar que el cru del lot **7005_UB-23441** es va neutralitzar amb NaHCO_3 sòlid i no va precipitar; tanmateix, quan es van dur a terme amb el mateix lot extraccions amb solució aquosa de la base, la sal sòdica va ser extreta a la fase aquosa i el pèptid va precipitar amb les condicions optimitzades. Per tant, es van fer extraccions aquoses però es van formar emulsions que obligaven a utilitzar grans volums de dissolvent.

Arribat a aquest punt, es va decidir precipitar el pèptid amb H₂O en la resta del cru (aproximadament 28 g de **7005** en el cru quantificats per ¹H-RMN), tal i com es va fer pel lot **7005_UB-23441-P1-01** (apartat 4.3.6.2.4), ja que dur a terme extraccions amb formació d'emulsions a escala més gran, requeria la utilització de grans volums de dissolvent i es van observar rendiments baixos. Així, es va dur a terme el canvi del dissolvent del cru a H₂O i el pèptid va precipitar, obtenint-se un sòlid gomós. La suspensió es va poder filtrar relativament ràpid amb la utilització del filtre Nutsche, però aquesta precipitació no va aconseguir millorar la puresa cromatogràfica que s'havia aconseguit en altres proves amb la utilització de TBME com antidissolvent (al voltant del 98 %). No es van obtenir doncs els resultats esperats al reproduir el procés que es va utilitzar pels lots **7005_UB-19182** i **7411_UB-21510** (apartats 4.3.6.2.1 i 4.3.6.2.3), però el pèptid **7005** es va obtenir a major escala de l'habitual (28,2 g de **7005_UB-23475-P3-01**) amb un rendiment de 76 % (determinat a partir de la funcionalització de la resina una vegada incorporat el primer aminoàcid) i una puresa cromatogràfica de 95,5 % (Figura 73).

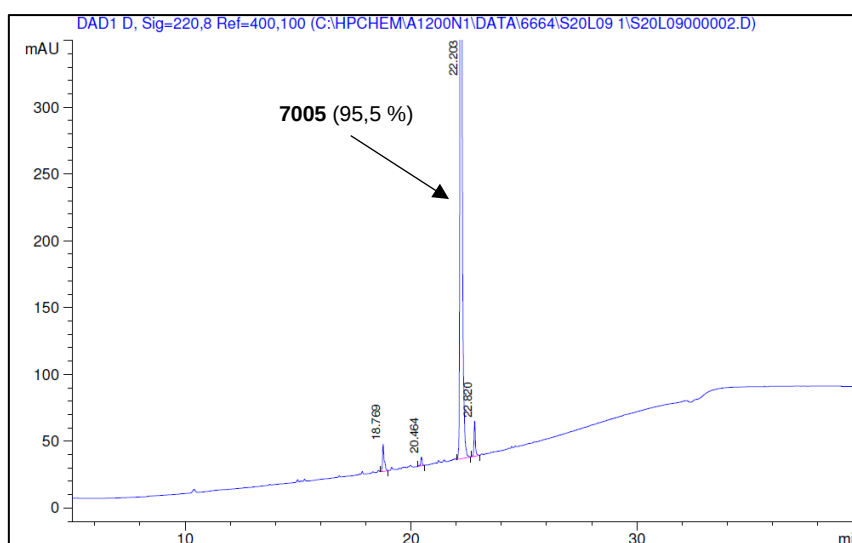


Figura 73. Cromatograma de **7005_UB-23475-P3-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

4.3.7.3. SÍNTESI DE 7411_UB-23492

L'escalat de la síntesi en fase sòlida de **7411** (**7411_UB-23492**) es va dur a terme en el mateix filtre Nutsche que es va utilitzar per **7005** (Figura 71, apartat 4.3.7.1) i l'escala de treball va ser de 59,6 mmols (42,6 g de resina 2-CTC). L'aminoàcid comercial Fmoc-Arg(Pbf)-OH es va incorporar a la resina utilitzant les mateixes condicions que les descrites per **7005** a l'apartat anterior, resultant una funcionalització de 0,40 mmols/g per quantificació de grups Fmoc (apartat 4.1.3), molt semblant als valors que s'havien obtingut en altres síntesis de **7411** amb altres reactors (al voltant de 0,45 mmols/g, apartat 4.3.2.2.2).

Les condicions experimentals que es van utilitzar per eliminar els grups Fmoc durant l'escalat de la síntesi de **7005**, es van prendre com a referència per intentar millorar-les en la síntesi de **7411**. Així, els equivalents de piperidina es van anar reduint tal i com es mostra en la Taula 27. De la mateixa manera que es va fer per **7005**, es van utilitzar 2 rentats de 6 mL de 20 % de piperidina en DMF/g de resina en la desprotecció del primer i segon residus d'aminoàcid (Arg i Lys respectivament). A partir de l'eliminació del grup Fmoc del tercer residu (Ile) i fins al sisè residu (Lys), es va dur a terme un únic tractament de 6 mL de solució bàsica/g de resina i el temps de reacció es va augmentar a 10 min. Finalment, es van emprar 4 mL de solució bàsica/g de resina

(15 eq) i 2 mL de solució bàsica/g de resina (7 eq) durant 15 min per desprotegir els residus setè (Ile) i el vuitè (Arg), respectivament. En cap cas es va detectar producte de partida per HPLC i ^1H -RMN, indicant que un tractament de 15 min amb 7 eq de piperidina serien suficients per tal de dur a terme l'eliminació del grup Fmoc.

Taula 27. Condicions d'eliminació del grup Fmoc en la síntesi del **7411_UB-23492**.

Eta pa	Intermedi peptíd ic	Eq piperidina	Temps del tractament (min)
1	Fmoc-Arg(Pbf)-Resina	22 + 22	5
2	Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	22 + 22	5
3	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	22	10
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	22	10
5	Fmoc-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	22	10
6	Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	22	10
7	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	15	15
8	Fmoc-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(^t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	7	15

La disminució en quantitats de reactiu i dissolvent que es va aconseguir en la síntesi de **7411** suposa un estalvi econòmic molt important, i probablement aquesta etapa es podria seguir optimitzant reduint el volum de solució de piperidina. Cal tenir en compte però que, en general, la longitud de la cadena i la seqüència d'aminoàcids poden tenir una influència clau en la desprotecció de l'extrem amino. Això posa en evidència altra vegada la importància de disposar de mètodes de seguiment com l'HPLC i el ^1H -RMN per determinar si les condicions de desprotecció utilitzades han estat efectives.

Les reaccions d'acoblament d'aminoàcids es van realitzar utilitzant 5 eq de Fmoc-aminoàcid, DIC i HOBt (*apartat 4.1.5*) en la majoria d'etapes, ja que durant l'estudi d'aquesta síntesi es van detectar etapes conflictives que van requerir reacoblar l'aminoàcid. Les reaccions es van monitoritzar amb el test de ninhidrina (*apartat 4.1.5.1*) i per l'anàlisi d'HPLC (*apartat 4.3.3.1*) i ^1H -RMN (comparant els espectres de producte de partida i producte final), indicant els tres mètodes d'anàlisi que les reaccions d'acoblament havien finalitzat a les 1,5 h. Per tant, es va aconseguir dur a terme l'escalat de la síntesi de **7411** sense la necessitat de reacoblar cap aminoàcid.

Els rentats de la resina es van dur a terme seguint la seqüència de dissolvents que es mostra a la **Taula 20** de l'*apartat 4.3.5.3*, però utilitzant 6 mL de dissolvent/g de resina com es va fer en l'escalat de **7005**. L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM (12 mL de dissolució/g de resina), obtenint-se un cru amb una puresa cromatogràfica del 89,3 %.

El cru es va tractar amb NaHCO_3 sòlid (5 eq) i amb la quantificació del producte en el cru per ^1H -RMN es van calcular 42 g de **7411** aproximadament (86 % de rendiment de síntesi). La precipitació es va dur a terme amb arrossegaments amb IPA, utilitzant el mateix procediment que es va emprar en els lots **7411_UB-21578** i **7411_UB-23401** (*apartats 4.3.6.3.3* i *4.3.6.3.4*) i es van obtenir 37 g de **7411_UB-23492** (74 % de rendiment calculat a partir de la funcionalització

després d'acoblar el primer aminoàcid a la resina) amb una puresa cromatogràfica del 96,5 % (**Figura 74**), millorada respecte el cru de reacció.

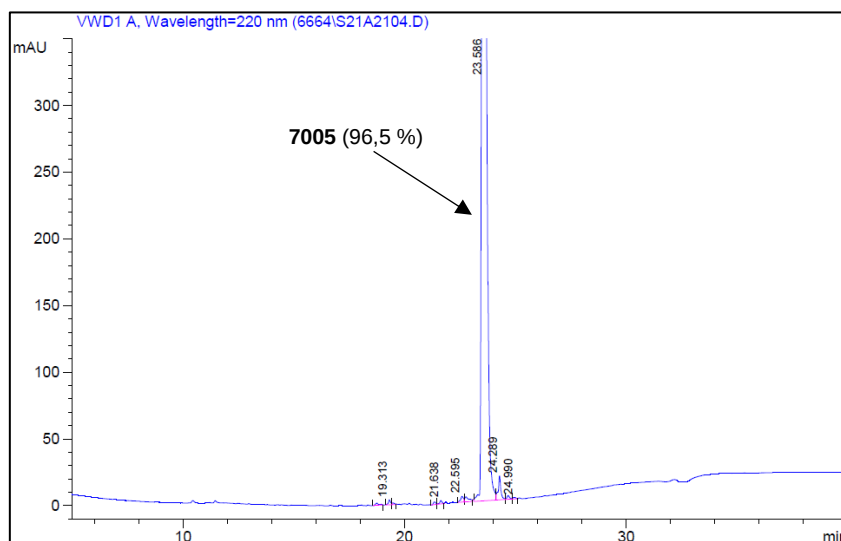


Figura 74. Cromatograma de **7411_UB-23492-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

4.4. CONCLUSIONS

- S'ha dut a terme l'escalat de la síntesi dels fragments peptídics protegits **7005** i **7411** fins a utilitzar 58 mmols (42 g) de resina 2-CTC inicial, fent ús d'un filtre Nutsche GFD®Lab model 050 series amb agitació mecànica, adaptat per a la síntesi en fase sòlida. En aquestes condicions, s'han aconseguit rendiments d'acoblament quantitatius amb 3 eq de reactius (Fmoc-aminoàcid, DIC i HOBt) sense la necessitat de reacoblar, o amb 4 o 5 eq de reactius per les etapes que es van considerar més conflictives segons els estudis preliminars. La desprotecció de l'extrem amino de la cadena peptídica s'ha portat a terme amb tractaments de 20 % de piperidina en DMF, aconseguint-se reduir la quantitat de base fins a 7 eq (44 eq inicials) en la última etapa d'eliminació del grup Fmoc en la síntesi de **7411**. Per l'acondicionament de la resina en cada etapa, s'ha utilitzat el nou protocol de rentats que ha permès reduir el volum de cada dissolvent a 6 mL per gram de resina, respecte 10 mL/g de resina que s'utilitzaven en els estudis precedents. La desprotecció final de la cadena peptídica s'ha portat a terme amb una solució d'1 % de TFA en DCM, aconseguint-se reduir el volum d'aquesta solució fins a 12 mL/g de resina (15 mL/g inicials). Les millores metodològiques que es van assolir amb aquest estudi, descrites en el següent paràgraf, han permès obtenir 28 g de **7005** (76 % de rendiment) i 37 g de **7411** (74 % de rendiment), amb pureses cromatogràfiques del 95,5 % i 96,5 % respectivament.

La síntesi en fase sòlida de **7005** i **7411** es va aprofitar per desenvolupar millores metodològiques a diferents nivells respecte els protocols inicials. A continuació es descriuen els resultats més importants:

- S'han dissenyat dos models de pales de funció dual (agitació i filtració) que permeten dur a terme síntesis en fase sòlida en reactors convencionals utilitzats en Esteve Química per a la síntesi en solució. Els resultats obtinguts utilitzant aquests sistemes duals han

estat satisfactoris pel que fa a rendiments i pureses cromatogràfiques, pel que la seva potencial utilització en altres síntesis és prometedora.

- S'han desenvolupat mètodes basats en la utilització d'HPLC i ^1H -RMN, pel seguiment de les reaccions d'acoblament i d'eliminació del grup Fmoc en la síntesi dels fragments peptídics protegits **7005** i **7411**. Aquests mètodes han revelat la manca de fiabilitat del test de la ninhidrina, tal com s'ha posat de relleu per HPLC i ^1H -RMN.
- S'ha estudiat la purificació dels fragments peptídics protegits **7005** i **7411** mitjançant la precipitació del pèptid del cru acidolític. En aquest sentit, s'han trobat unes condicions prometedores (10:50 vol de DCM/TBME) per a la precipitació de **7005** a escala de 1,6 g teòrics de **7005** (98,2 % de puresa cromatogràfica final respecte a un 90,7 % de puresa cromatogràfica del cru acidolític); tanmateix, aquest resultat no s'ha pogut reproduir en els lots de síntesi en que s'ha utilitzat NaHCO_3 sòlid per neutralitzar el cru acidolític. Pel que fa a **7411**, s'han trobat unes condicions de precipitació (10:40 vol de DCM/IPA) a escala de 0,9 g teòrics de **7411**, que han permès assolir una puresa cromatogràfica final del 97,4 % respecte al 83,8 % de la puresa cromatogràfica del cru acidolític. Aquestes condicions de precipitació es van optimitzar per millorar el rendiment (canvi de dissolvent a IPA) i es van poder reproduir en els següents lots de **7411**, obtenint en la millor prova a escala de 4,4 g de **7411** (calculats a partir de la quantificació per ^1H -RMN) un rendiment en la precipitació de 76 % i una puresa cromatogràfica de 97,3 %.
- S'ha desenvolupat un nou protocol de rentats (per aquest ordre: DMF, DCM, DMF, DCM i DFM), que redueix a la meitat el consum de dissolvents allargant el temps del rentat. En aquest sentit, s'ha comprovat que la utilització d'alcohols com l'IPA per rentar pot provocar la pèrdua prematura de cadenes peptídiques.

CAPÍTOL 3:

SÍNTESI DE FT PER ACOBLAMENT DE FRAGMENTS EN SOLUCIÓ

5. CAPÍTOL 3: SÍNTESI DE FT PER ACOBLAMENT DE FRAGMENTS EN SOLUCIÓ

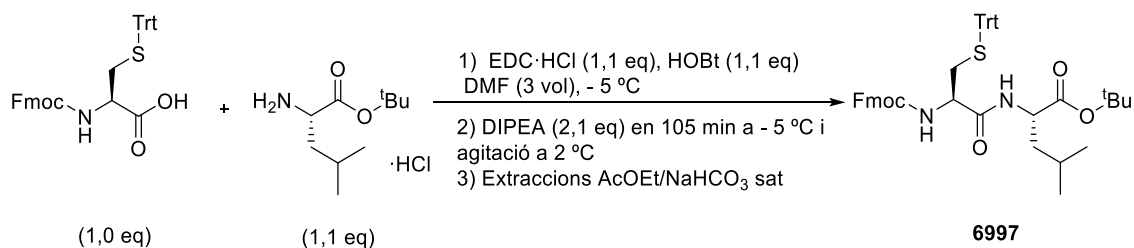
5.1. SÍNTESI DEL DIPÈPTID PROTEGIT 6997

5.1.1. PRECEDENTS⁵⁹

Per tal de formar la cadena peptídica de **FT** mitjançant l'estratègia convergent que es mostra a l'**Esquema 15** (apartat 3.3.2) calia sintetitzar primer en solució el dipèptid protegit **6997** a partir de l'acoblament en solució dels aminoàcids comercials Fmoc-Cys(Trt)-OH i H-Leu-O^tBu·HCl. En aquest sentit, el fet de voler industrialitzar el procés requeria la cerca d'unes condicions experimentals efectives, econòmiques i escalables. Tenint presents aquestes consideracions, les millors condicions que es van trobar en els estudis precedents per a la síntesi de **6997** es descriuen en l'**Esquema 43**. L'EDC (**Figura 10**, apartat 3.1.4.1) es va utilitzar com agent d'acoblament ja que, malgrat ser més car que altres carbodiimides, el subproducte de reacció es pot eliminar fàcilment mitjançant extraccions en medi aquós. L'HOBt es va emprar com additiu amb la finalitat d'evitar reaccions secundàries com la formació irreversible de *N*-acilurea o l'epimerització (

Esquema 8, apartat 3.1.4.1). Aquestes condicions experimentals es van prendre com a punt de partida per a la síntesi de **6997** en la present Tesi Doctoral. A continuació es descriu el protocol general que es va utilitzar en els estudis precedents (escala màxima de treball de 4,0 g de Fmoc-Cys(Trt)-OH).

Per tal de poder monitoritzar adequadament la reacció per HPLC a partir d'unes condicions cromatogràfiques ja desenvolupades pel grup d'investigació SMBioCom (**Mètode A**, apartat 8.3.3), l'aminoàcid amb major resposta a l'UV-Vis (Fmoc-Cys(Trt)-OH) es va utilitzar com a reactiu limitant de la reacció, i l'altre aminoàcid amb un lleuger excés (1,1 eq). Així, es podria detectar amb més claredat el consum del derivat de cisteïna. Va ser necessari utilitzar 2,1 eq de DIPEA ja que el derivat de leucina es trobava com a hidrocloreur. El fet d'addicionar la base lentament (105 min) a la mescla de reacció va proporcionar millors resultats en termes de conversió de reacció i puresa cromatogràfica. Un cop finalitzada l'addició de DIPEA, la reacció es va deixar en agitació a 2 °C fins a detectar per HPLC un percentatge d'àrea per Fmoc-Cys(Trt)-OH menor de 2 %. Degut a l'escala, l'agitació va ser magnètica.



Esquema 43. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi del dipèptid **6997**.

Una vegada finalitzada la reacció, es va afegir acetat d'etil (AcOEt) a la solució resultant i es van dur a terme rentats amb una dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % per eliminar la urea formada com a subproducte i l'excés de H-Leu-O^tBu. Es va rentar la fase orgànica amb una solució sat

de NaHCO₃ per neutralitzar el cru, i amb H₂O per eliminar la DMF. El dissolvent de la fase orgànica es va eliminar a pressió reduïda fins a obtenir el producte desitjat com a sòlid. El rendiment a aquesta escala va ser del 99 % i la puresa cromatogràfica del producte **6997** va ser de 96 %.

5.1.2. SÍNTESI PRELIMINAR DE 6997

La primera síntesi del dipèptid **6997** (**6997_QF-15382**) es va dur a terme seguint les condicions ja descrites (**Esquema 43**, *apartat 5.1.1*) a escala de 13,7 mmols (8,0 g) de Fmoc-Cys(Trt)-OH. La reacció es va monitoritzar per HPLC i, a les 2 h de reacció, l'àrea del pic cromatogràfic corresponent al material de partida Fmoc-Cys(Trt)-OH va ser d'un 1,6 %. El tractament del cru es va dur a terme tal i com es descriu en les condicions utilitzades en els estudis precedents (*apartat 5.1.1*) i les fases aquoses obtingudes es van analitzar per HPLC-MS, confirmant que els rentats amb solució aquosa d'àcid cítric al 5 % aconseguien eliminar del cru l'excés de H-Leu-O^tBu per protonació del grup α -amino i formació de la corresponent sal. A les fases aquoses també es va detectar HOBt i DIPEA (citrat).

El sòlid obtingut (**6997_QF-15382-01**, rendiment de 82 %) a l'eliminar el dissolvent a pressió reduïda es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 75**). Es va detectar un 92,8 % de **6997** (17,5 min), un 1,5 % de material de partida Fmoc-Cys(Trt)-OH (14,5 min), un 5 % de DBF (12,9 min) i un 0,2 % del dipèptid amb l'extrem α -amino desprotegit (**6998**, 13,9 min). Aquest resultat va posar de manifest la pèrdua prematura de grups Fmoc i un rendiment i puresa cromatogràfica de **6997** inferiors als reportats en els estudis precedents.

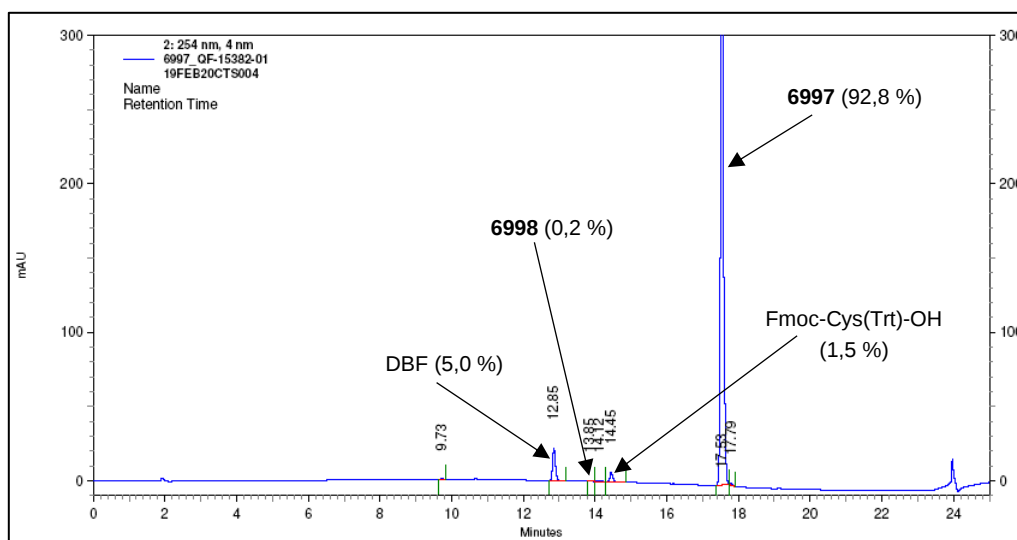


Figura 75. Cromatograma de **6997_QF-15382-01**. (Mètode B, *apartat 8.3.3*).

La pèrdua prematura del grup Fmoc és un problema relacionat amb l'estratègia convergent, on els pèptids protegits s'acoblen en solució.¹²¹ Aquest fenomen s'agreuja amb la presència d'amines com la DIPEA al medi de reacció. L'eliminació prematura del grup Fmoc es pot explicar pel comportament bàsic de la DIPEA, però al ser una amina terciària gens nucleòfila, no pot formar l'adducte corresponent amb DBF (FM-pip), tal com succeeix amb la piperidina (**Esquema 17**, *apartat 4.1.3*).

En aquesta ruta sintètica, l'eliminació prematura del grup Fmoc en el dipèptid **6997** no suposava un problema, ja que el següent pas de la síntesi era l'obtenció del dipèptid **6998**, desprotegit a la posició α -amino (veure **Esquema 45**, apartat 5.2.1). Aquest fet i la no disposició d'un procediment per a la precipitació de **6997**, ens va portar a enllaçar les dues etapes sintètiques sense aïllar l'intermedi **6997** (procés *one-pot*). Tanmateix, aquesta alternativa es va estudiar a una etapa més avançada del projecte, amb l'obtenció dels lots **6997_UB-23467** i **6998_UB-23469** (apartat 5.2.4). A continuació, es descriuen els diferents assajos de síntesi que es van fer per tal de millorar les condicions experimentals.

5.1.3. ASSAJOS D'OBTENCIÓ DE 6997

5.1.3.1. UTILITZANT DCM COM A DISSOLVENT

Es va dur a terme la síntesi d'un nou lot de **6997** (**6997_QF-15392**) on es van reproduir les condicions descrites en els precedents (**Esquema 43**, apartat 5.1.1) però utilitzant DCM (2,1 vol) com a dissolvent en lloc de DMF. D'aquesta manera no era necessari emprar AcOEt per poder realitzar els rentats àcids del cru.

La reacció es va dur a terme a escala de 13,3 mmols (7,8 g) de Fmoc-Cys(Trt)-OH i es va monitoritzar per HPLC. Es va detectar una disminució de la velocitat de reacció respecte a la prova amb DMF, ja que a les 45 h de reacció la conversió va ser del 95,5 %, menor que a les 2 h en el cas de la reacció amb DMF (98,3 % per **6997_QF-15382**, apartat 5.1.2). Per altra banda, durant els rentats amb la dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % va precipitar un sòlid que majoritàriament va resultar ser HOBt, tal com es va comprovar per HPLC-MS. Es va decidir doncs fer un canvi de dissolvent de la fase orgànica de DCM a AcOEt i es van dur a terme els rentats del cru amb àcid cítric satisfactòriament. El sòlid obtingut (**6997_QF-15392-01**, 53 % de rendiment) es va analitzar per HPLC (**Figura 76**) i el **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica de 73,0 % (17,6 min). La puresa cromatogràfica del producte obtingut va disminuir respecte la prova en DMF (92,8 %, **6997_QF-15382-01**, apartat 5.1.2) a causa de la presència d'un 20,8 % de DBF (12,95 min). Aquest resultat es pot explicar per l'augment del temps de reacció, fet que va afavorir la pèrdua prematura de grups Fmoc. El material de partida Fmoc-Cys(Trt)-OH (14,6 min) es va detectar en el sòlid obtingut en un 4,5 % i es va descartar doncs l'ús de DCM com a dissolvent.

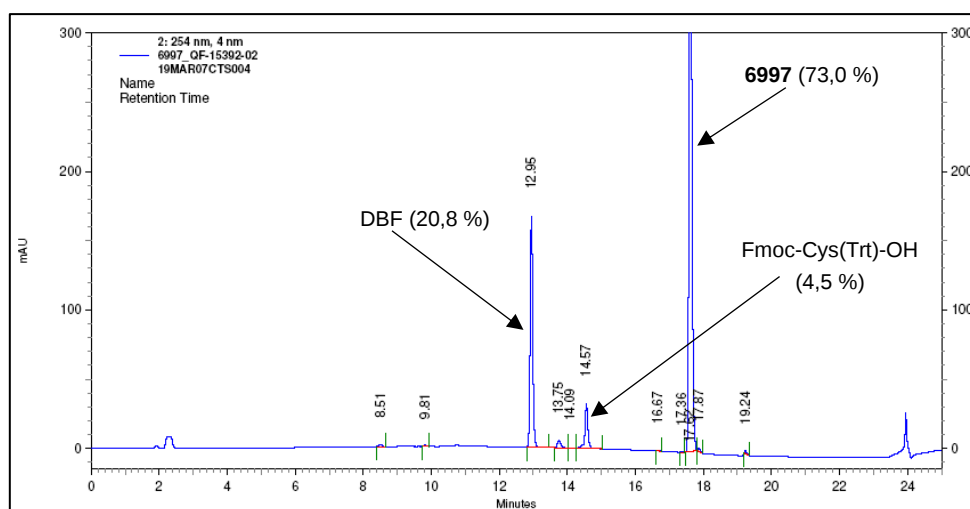
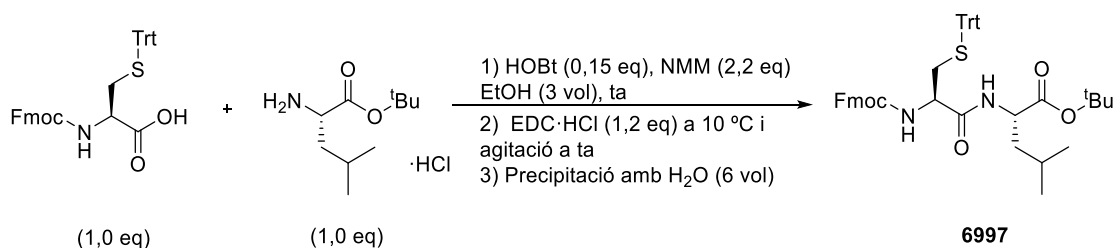


Figura 76. Cromatograma de **6997_QF-15392-01**. (Mètode B, apartat 8.3.3).

5.1.3.2. UTILITZANT EtOH COM A DISSOLVENT I NMM COM A BASE

En la literatura es descriu la formació de l'enllaç peptídic en solució amb l'agent d'acoblament EDC en presència de quantitats catalítiques d'HOBt i utilitzant com a base *N*-metilmorfolina (NMM) en EtOH com a dissolvent.¹²² Els autors proposen que emprant aquestes condicions l'aïllament dels productes es realitza generalment per filtració simple després d'addicionar H₂O al medi de reacció. Aquestes condicions es van reproduir en una nova síntesi de **6997** (**6997_QF-15386**) per tal d'intentar millorar les condicions provades fins al moment, a escala de 13,8 mmols (8,1 g) de Fmoc-Cys(Trt)-OH (**Esquema 44**) i utilitzant en aquest cas una relació equimolar dels dos aminoàcids tal com es descriu a la literatura. La reacció es va monitoritzar per HPLC i el pic cromatogràfic corresponent a Fmoc-Cys(Trt)-OH no es va detectar a les 2 h de reacció, el que indicava una conversió quantitativa.



Esquema 44. Condicions de reacció per a la síntesi del dipèptid **6997_QF-15386**.

La precipitació de **6997** es va realitzar amb l'addició d'H₂O (6 vol), però la filtració de la suspensió va ser lenta a causa del sòlid gomós que es va obtenir (**6997_QF-15386-01**, 75 % de rendiment). Aquest sòlid es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 77**), determinant-se una puresa cromatogràfica pel **6997** del 75,9 % (17,5 min). Una vegada més, la pèrdua prematura del grup Fmoc va tenir lloc ja que es va detectar un 12,4 % de DBF (12,9 min). Per tant, la puresa cromatogràfica del producte desitjat va disminuir respecte a la trobada a la síntesi de **6997_QF-15382-01** de l'assaig preliminar (92,8 %, *apartat 5.1.2*) a causa d'un percentatge superior de desprotecció prematura de l'extrem α -amino, i d'una impuresa (10,2 %, 16,3 min) amb una *m/z* de 635,82, la identitat de la qual no va poder ser elucidada. Aquest resultat i les dificultats que es va trobar durant la filtració del cru van fer desestimar aquestes condicions experimentals.

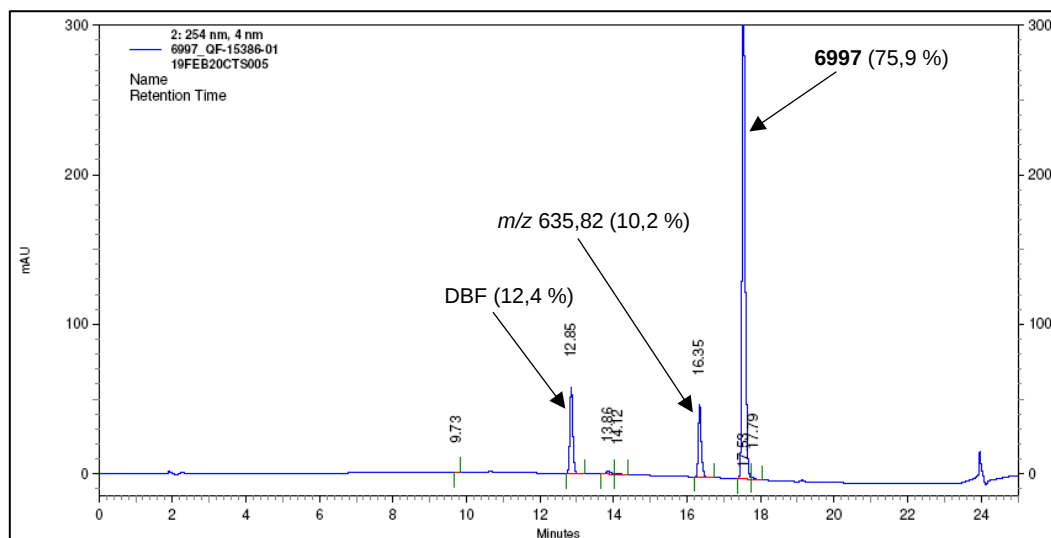


Figura 77. Cromatograma de **6997_QF-15386-01**. (Mètode B, *apartat 8.3.3*).

5.1.3.3. OPTIMITZACIÓ DELS EQUIVALENTS I DEL TRACTAMENT DEL CRU

Fins el moment, les condicions utilitzades en els estudis precedents per l'obtenció de **6997** (**Esquema 43**, *apartat 5.1.1*), assajades en la síntesi de **6997_QF-15382** (*apartat 5.1.2*), van donar els millors resultats. Per tant, amb aquestes condicions es van dur a terme dues síntesis més de **6997** (**Taula 28**) amb l'objectiu d'aconseguir una conversió de reacció quantitativa i no detectar material de partida (Fmoc-Cys(Trt)-OH) per HPLC.

Taula 28. Proves per l'obtenció del dipèptid **6997**.

Lot	Fmoc-Cys(Trt)-OH		% Conversió (1 h)	Temps (h)	% Rend.	% per HPLC (sòlid)	
	Mmols (g)	Relació molar				6997	DBF
QF-15395	25,61 (15,0)	1,1 eq de H-Leu-O ^t Bu·HCl	96,5	17	84	69,3	27,9
UB-19101	8,71 (5,1)	equimolar	98,0	2	67	95,0	2,3

La síntesi de **6997_QF-15395** es va realitzar amb les condicions proposades en els estudis precedents però amb un temps de reacció més llarg (17 h) per tal d'aconseguir la total conversió de Fmoc-Cys(Trt)-OH a **6997**. Encara i així, en el sòlid obtingut a les 17 h de reacció, es va observar l'aminoàcid de partida amb un 0,8 % (conversió del 99,2 %). El contingut de DBF en el sòlid **6997_QF-15395-01** va ser elevat (27,9 %) i va disminuir la puresa cromatogràfica de **6997** a 69,3 %. No obstant i com s'ha mencionat abans, aquest subproducte no presenta un problema en aquesta etapa ja que es forma i s'ha d'eliminar en el següent pas de la síntesi (*veure Esquema 45*, *apartat 5.2.1*).

En base a la conversió total assolida en la prova realitzada emprant EtOH amb una relació equimolar dels aminoàcids de partida (**6997_QF-15386**, *apartat 5.1.3.2*), es va provar aquesta relació de reactius en la síntesi de **6997_UB-19101** amb les condicions precedents. La conversió assolida després d'1 h de reacció (98,0 %) va millorar respecte la conversió obtinguda a la 1 h de reacció utilitzant un excés de H-Leu-O^tBu·HCl (96,5 %, lot **6997_QF-15395**). Per aquesta raó, es va mantenir una relació equimolar d'aminoàcids de partida en les posteriors preparacions de **6997**.

Es va aprofitar la prova **6997_UB-19101** per a assajar un mètode descrit a la literatura pel tractament del cru.¹²³ Es tractava de precipitar el producte amb H₂O (2 vol), redissoldre el sòlid obtingut en AcOEt, i realitzar rentats amb solució aquosa sat de NaHCO₃, solució aquosa sat de NaCl i solució aquosa d'àcid cítric al 5 %. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, obtenint-se el sòlid **6997_UB-19101-01** amb un rendiment del 67 % i una puresa cromatogràfica del 95,0 %. A l'obtenir un rendiment més baix que en la prova anterior (67 % vs 84%), es van mantenir les condicions d'aïllament descrites al procediment original (*apartat 5.1.1*).

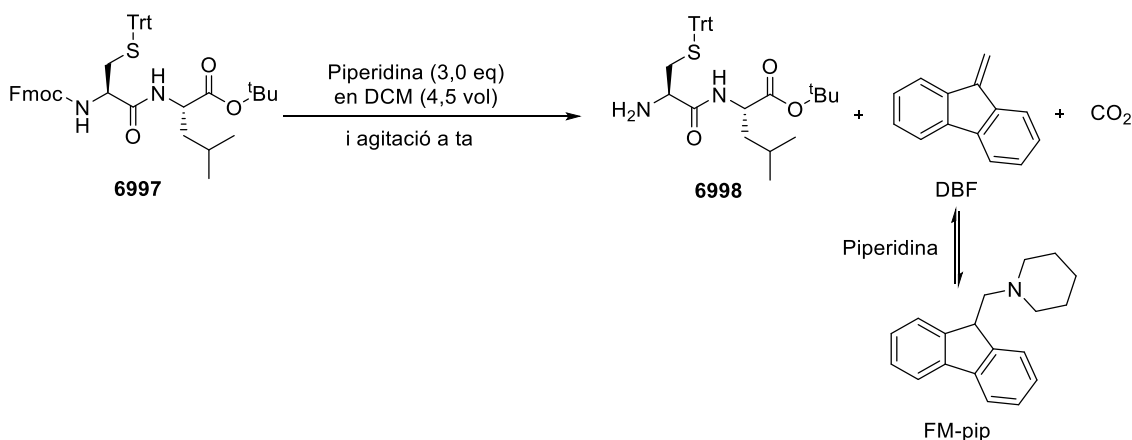
Es van realitzar altres síntesis de **6997** (**6997_UB-19115** i **6997_UB-19141**) per tal de disposar d'una quantitat elevada d'aquest dipèptid i poder seguir treballant amb la resta d'etapes d'obtenció de FT. Aquests assajos de síntesi de **6997** es van dur a terme amb les condicions de reacció descrites en els estudis precedents (**Esquema 43**, *apartat 5.1.1*), però utilitzant una relació equimolar entre els aminoàcids de partida, i agitació mecànica.

Les síntesis es van dur a terme a escala de 34,1 mmols (20,0 g) i 25,6 mmols (15,0 g) de Fmoc-Cys(Trt)-OH per **6997_UB-19115** i **6997_UB-19141**, respectivament. Després d'1 h de reacció, es va dur a terme el tractament del cru dels dos lots utilitzant les condicions descrites en els precedents (**Esquema 43**, *apartat 5.1.1*). En el sòlid obtingut en la primera síntesi (**6997_UB-19115-01**, 89 % de rendiment) es va detectar **6997** amb una puresa cromatogràfica del 93,2 %, acompanyat d'un 3,3 % de DBF. Els resultats de l'altre síntesi van ser similars, obtenint-se un sòlid (**6997_UB-19141-01**, 93 % de rendiment) amb una puresa cromatogràfica del producte **6997** (92,5 %) i un contingut de DBF (3,1 %) molt semblants a l'anterior. Donats els bons resultats, aquestes condicions van ser les utilitzades per a la obtenció de **6997** en la síntesi de **6998** sense aïllar el dipèptid α -amino protegit (*veure apartat 5.2.4*).

5.2. SÍNTESI DE 6998

5.2.1. PRECEDENTS⁵⁹

El següent pas en la ruta sintètica vers l'obtenció del FT (**Esquema 15**, *apartat 3.3.2*) va consistir en l'eliminació del grup Fmoc de l'extrem α -amino del dipèptid protegit **6997** per a obtenir **6998**. En estudis precedents, la reacció es va dur a terme a una escala de 0,8 g de **6997**, utilitzant una dissolució de 10 % de piperidina en DCM amb agitació magnètica (**Esquema 45**). El cru de reacció es va analitzar per HPLC a les 2 h de reacció i no es va detectar **6997**. El producte es va purificar per cromatografia en gel de sílice, obtenint-se amb un rendiment del 84 % i amb una puresa cromatogràfica de **6998** de 99 %. Aquestes condicions es van utilitzar com a condicions inicials de treball en la present Tesi Doctoral.



Esquema 45. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi de **6998** (s'ha plantejat un equilibri entre els dos subproductes per raons que es comentaran més endavant).

Com s'ha mencionat en l'anterior capítol (*apartat 4.3.7.2*), la piperidina és una substància controlada pel seu ús en la preparació de substàncies narcòtiques i per la generació de grans quantitats de residus tòxics.¹¹⁵ Tanmateix, els mètodes per desprotegir l'extrem α -amino de la cadena peptídica no han evolucionat gaire i des de la primera publicació d'Atherton *et al.*¹²⁴ al 1981, 20 % de piperidina en DMF segueix essent el protocol habitual utilitzat en SPPS mitjançant l'estratègia Fmoc. L'eliminació del grup Fmoc en fase sòlida emprant piperidina/DMF és molt útil degut a la baixa volatilitat d'aquests dissolvents que dificulten la seva eliminació en solució. A més, la formació reversible de l'adducte FM-pip a partir del DBF o la polimerització d'aquest

subproducte depenent de la concentració, converteixen en un repte trobar condicions adients per eliminar aquest grup protector en solució.¹²⁵

5.2.2. SÍNTESI PRELIMINAR DE 6998

Les condicions de reacció per l'obtenció de **6998** que es van proposar en els estudis precedents van ser prometedores a escala de laboratori, però la purificació per columna cromatogràfica era un inconvenient si es volia portar el procés a escala industrial. Per aquesta raó, es va voler aprofitar el primer assaig de síntesi de **6998** per intentar reemplaçar la purificació cromatogràfica per un procés que permetés eliminar els subproductes del cru mitjançant una precipitació.

La primera síntesi de **6998** (**6998_QF-15388**) es va dur a terme seguint les condicions utilitzades en els estudis precedents (**Esquema 45**, apartat 5.2.1), a escala d'1,5 g de **6997_QF-15382-01**. A les 3 h de reacció no es va detectar producte de partida per anàlisi d'HPLC i es va decidir tractar el cru de reacció seguint el procediment descrit en una patent,¹²⁶ on el grup Fmoc es va eliminar prèviament amb una dissolució del 10 % de piperidina en DCM. Així, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va triturar amb èter de petroli per tal d'eliminar els subproductes de reacció. En l'empresa no es disposava d'èter de petroli i, com a alternativa, es va suspendre el sòlid amb heptà (4 vol). Passats 30 min, la suspensió es va filtrar, el sòlid obtingut es va redissoldre amb AcOEt i la solució resultant es va rentar amb una solució aquosa 100 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH 6,2, una dissolució aquosa sat de NaHCO_3 i H_2O . El dissolvent de la fase orgànica es va eliminar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (**6998_QF-15388-01**, 76 % de rendiment) es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 78**). Els subproductes DBF (12,9 min) i FM-pip (6,2 min) es van detectar amb un 19,3 % i 70,7 % respectivament, el que indicava que el protocol utilitzat per eliminar els subproductes no havia sigut efectiu. Per altra banda, aquests subproductes van reduir la puresa cromatogràfica de **6998** a un 9,8 % (13,6 min), indicant que els seus factors de resposta són molt més elevats que el del producte desitjat. Es va decidir doncs seguir el tractament del cru per ^1H -RMN en les proves posteriors.

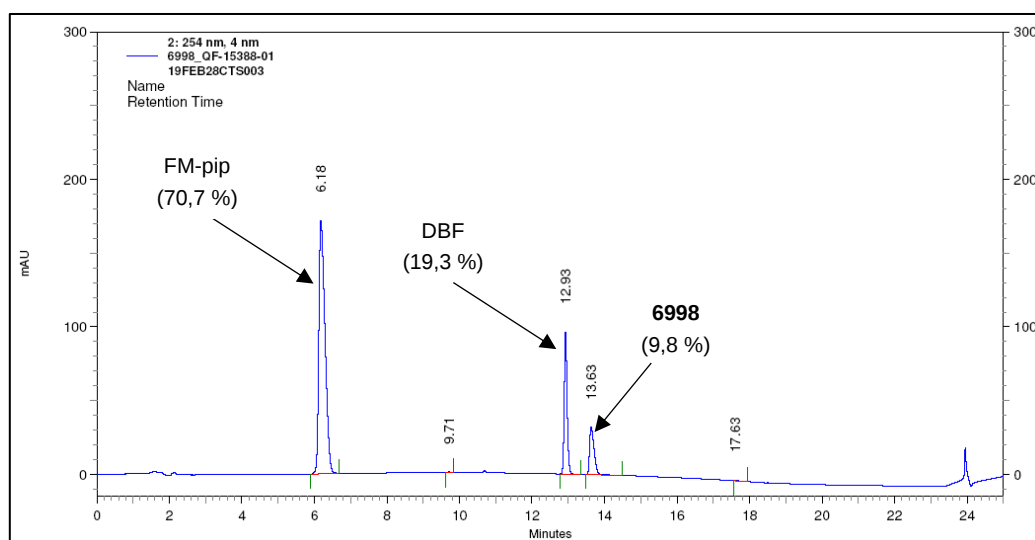


Figura 78. Cromatograma de **6998_QF-15388-01**. (Mètode B, apartat 8.3.3).

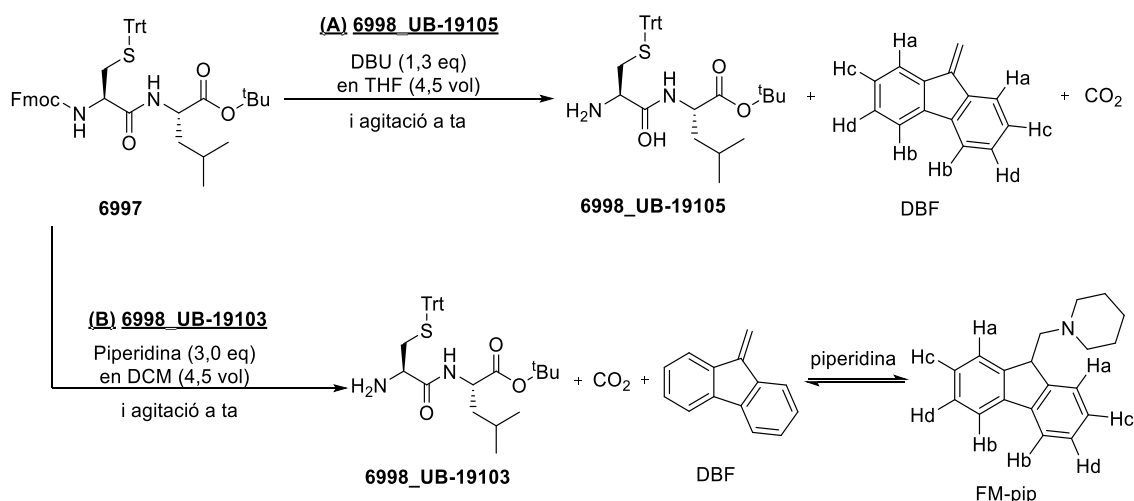
5.2.3. ESTUDI DE DIFERENTS BASES

Per tal d'aconseguir un tractament adequat del cru per separar els subproductes de reacció del producte desitjat, es va dur a terme un estudi amb diferents bases per eliminar el grup Fmoc de **6997**. En aquestes proves no es va estudiar la precipitació del dipèptid **6998**, si no que es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat i el sòlid es va tractar per intentar eliminar els subproductes resultants de l'eliminació del grup Fmoc. Aprofitant aquest estudi, es va desenvolupar un mètode d'anàlisi per ^1H -RMN per quantificar la relació molar entre els subproductes de reacció i el producte desitjat. Per portar a terme aquesta anàlisi, una alíquota de la solució del cru resultant del tractament del dipèptid amb base es va concentrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va dissoldre en dimetilsulfòxid semideuterat (DMSO-d_6).

5.2.3.1. DBU

En la literatura¹²⁵ es descriuen unes condicions d'eliminació del grup Fmoc en solució amb 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-è (DBU). La DBU és una base no nucleòfila i genera, per tant, DBF com a únic subproducte de reacció. Al ser una base forta (pK_a 13,5), podria promoure reaccions secundàries com l'epimerització de residus d'aminoàcid, però es va decidir provar-la amb **6998** per generar un únic subproducte i, d'aquesta manera, intentar facilitar la purificació del cru.

Així doncs, una nova síntesi de **6998** (**6998_UB-19105**) es va dur a terme a escala de 0,2 g de **6997_QF-15382-01** utilitzant una dissolució de 5 % de DBU en THF per desprotegir l'extrem α -amino del dipèptid (**Esquema 46, A**). Amb l'objecte de comparar els resultats de ^1H -RMN, es va dur a terme en paral·lel una altra síntesi de **6998** (**6998_UB-19103**, **Esquema 46, B**) a la mateixa escala i mateix producte de partida (0,2 g de **6997_QF-15382-01**), però utilitzant les condicions dels estudis precedents (**Esquema 45, apartat 5.2.1**). A les 2 h de reacció, el producte de partida **6997** no es va observar per HPLC en cap de les dues síntesis i el dissolvent del cru es va eliminar a pressió reduïda. No es va avaluar el rendiment dels sòlids obtinguts (**6998_UB-19105-01** i **6998_UB-19103-01**) però si es van analitzar per ^1H -RMN (**Figura 79**).



Esquema 46. Condiions de reacció per la síntesi de **(A) 6998_UB-19105** i **(B) 6998_UB-19103**.

Primerament, es va comparar la part aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN del sòlid obtingut amb la desprotecció amb piperidina (**6998_UB-19103-01**) amb la mateixa regió de l'espectre del sòlid utilitzat com a producte de partida (**6997_QF-15382-01**) i no es van observar senyals del grup

Fmoc en el cru de reacció, el que indicava que la conversió havia estat completa, tal com es va observar per HPLC (veure en annex **Figura A3**).

En l'espectre corresponent al sòlid obtingut amb DBU (**Figura 79, A**), es van observar dos doblets a 7,84 ppm i 7,89 ppm que corresponen a quatre àtoms d'hidrogen dels anells aromàtics de DBF (protons H_a i H_b , **Esquema 46, A**). Els altres quatre àtoms d'hidrogen aromàtics (protons H_c i H_d indicats a l'**Esquema 46, A**) surten com a triplets aparents entre 7,20 ppm i 7,45 ppm (un d'ells es pot veure clarament centrat al voltant de 7,40 ppm a l'espectre A).

A l'espectre del sòlid obtingut amb piperidina (**Figura 79, B**), es van observar dos doblets a 7,67 ppm i 7,86 ppm, corresponents a quatre àtoms d'hidrogen dels anells aromàtics de l'adducte de piperidina FM-pip (protons H_a i H_b indicats a l'**Esquema 46, B**). Aquest va ser clarament el subproducte majoritari de la reacció, encara que es van poder observar senyals molt menys intenses dels protons de DBF, com els senyals solapats amb el doblet a 7,86 ppm dels protons de l'anell aromàtic de l'adducte FM-pip. En aquest sentit, està descrit a la literatura que s'estableix un equilibri entre els dos subproductes de la reacció (DBF i FM-pip), el desplaçament del qual depèn de les condicions de reacció i la base utilitzada.¹²⁷ Aquest equilibri sembla ser molt lent, en aquest cas donat, ja que s'observen els dos subproductes amb senyals estrets i ben definits.

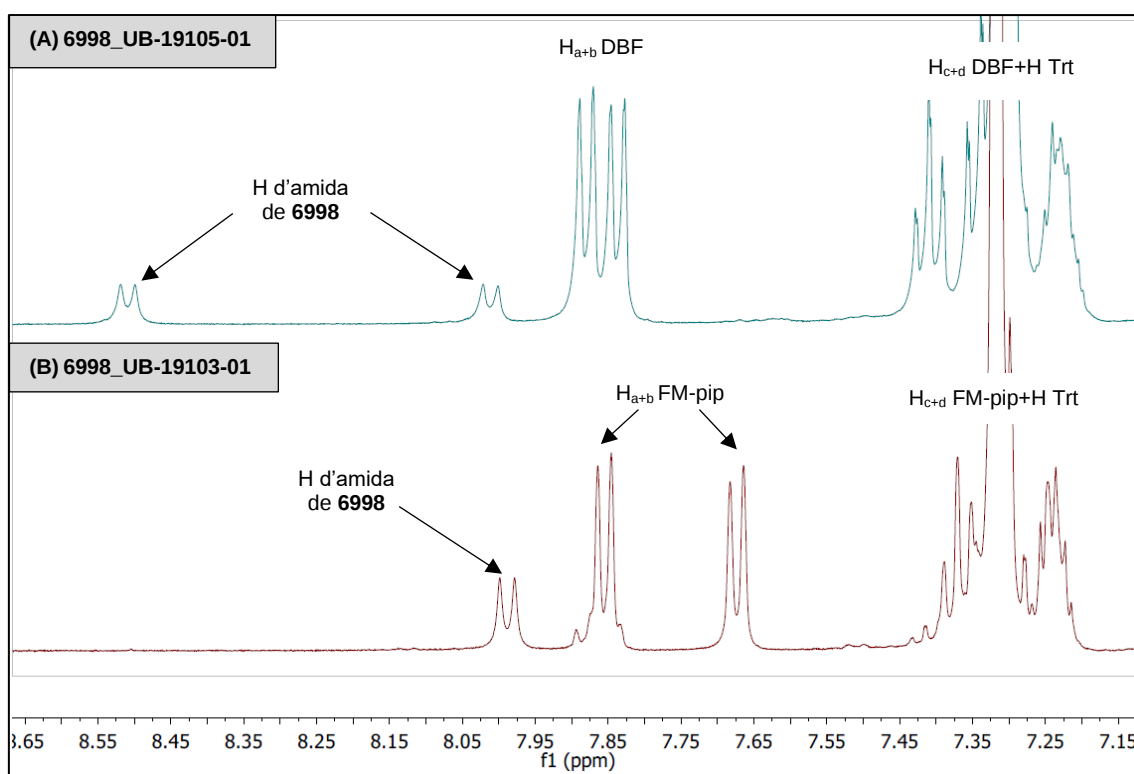


Figura 79. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN de (A) 6998_UB-19105-01 i (B) 6998_UB-19103-01.

També es va observar a l'espectre del cru resultant del tractament amb piperidina (**Figura 79, B**) un doblet a 7,99 ppm que es va assignar a l'àtom d'hidrogen de l'enllaç amida de 6998; en canvi, a l'espectre del cru resultant del tractament amb DBU (**Figura 79, A**) es van observar dos doblets a 8,51 ppm i 8,02 ppm. Aquest desdoblament dels senyals es va veure en altres regions a l'espectre de ^1H -RMN de 6998_UB-19105, com es pot veure clarament a la regió alifàtica pels senyals corresponents als dos grups metil diastereotòpics del grup isopropil (**Figura 80, A**), on

es detecten quatre doblets. No obstant, a l'espectre B (**Figura 80, B**), es van observar solament dos doblets a 0,81 ppm i 0,86 ppm per aquests grups metil.

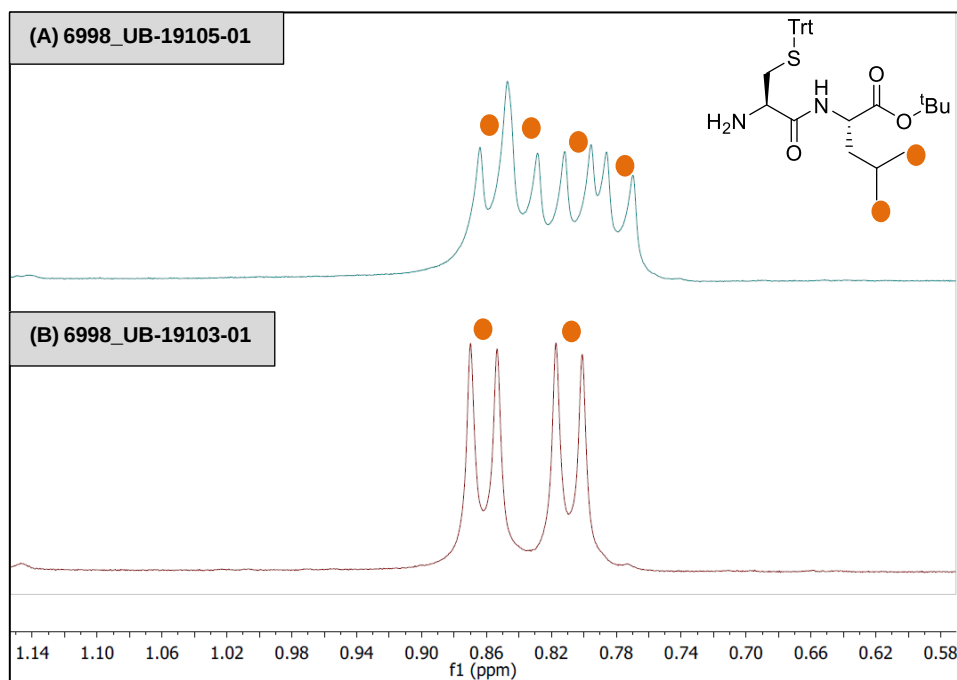


Figura 80. Part de la regió alifàtica dels espectres de ^1H -RMN de **(A) 6998_UB-19105-01** i **(B) 6998_UB-19103-01**.

Aquest resultat va permetre deduir que hi havien dos productes, molt probablement diastereoisòmers, en el sòlid obtingut al tractar **6997** amb DBU (**6998_UB-19105-01**). L'explicació més plausible per aquest fet seria l'epimerització del centre quiral d'un dels residus d'aminoàcid provocada per l'elevada basicitat de la DBU ($\text{pK}_a = 13,5$), essent molt probablement el residu de Cys l'afectat per la seva coneguda tendència a epimeritzar (*apartat 3.1.4.3*). Es va descartar doncs l'ús de la DBU per desprotegir l'extrem α -amino.

Per altra banda, es va seguir amb l'objectiu de trobar senyals de referència per poder determinar la relació molar entre **6998** i els dos subproductes de la reacció que resulten de la descomposició del grup Fmoc amb piperidina (**Figura 81**). El senyal triat per a quantificar el producte desitjat va ser el doblet corresponent al protó de l'amida que apareix a aproximadament 8,0 ppm, al que es va donar la integració d'un protó per utilitzar-lo com a referència. El doblet aïllat a 7,67 ppm es va escollir com a referència de l'adducte de piperidina (FM-pip), corresponent a dos dels protons del sistema aromàtic. Finalment, per a la quantificació de DBF es va considerar el singlet aïllat a 6,29 ppm, corresponent als dos àtoms d'hidrogen vinílics equivalents.

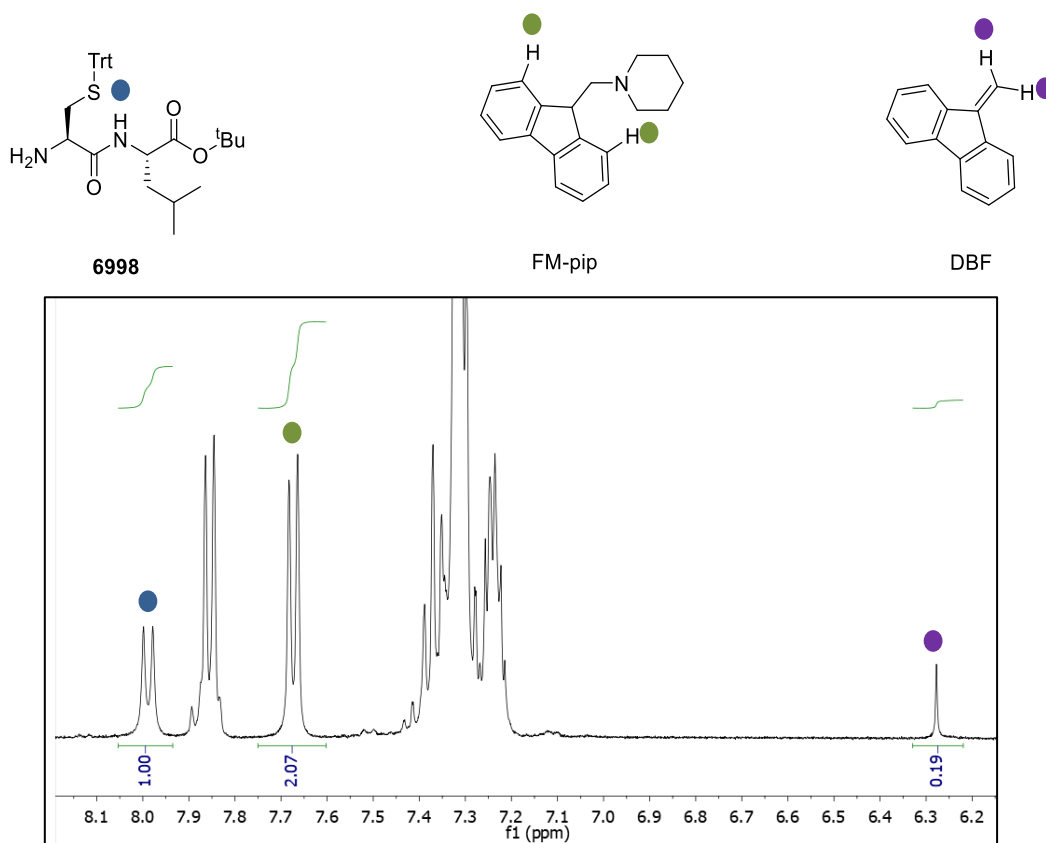


Figura 81. Assignació dels senyals aïllats del producte i dels subproductes a la zona aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN de **6998_UB-19103-01**.

Com es pot veure a la figura, la relació molar **6998**/FM-pip/DBF va ser d'1:1:0,1, o, expressat d'una altra forma, una relació **6998**/subproductes d'1:1,1, molt pròxima al resultat que es podia preveure, és a dir, una relació equimolar. Aquest mètode de quantificació va ser aplicat en l'estudi de l'obtenció de **6998** amb diferents bases, per tal d'avaluar l'efectivitat del tractament del cru per eliminar els subproductes.

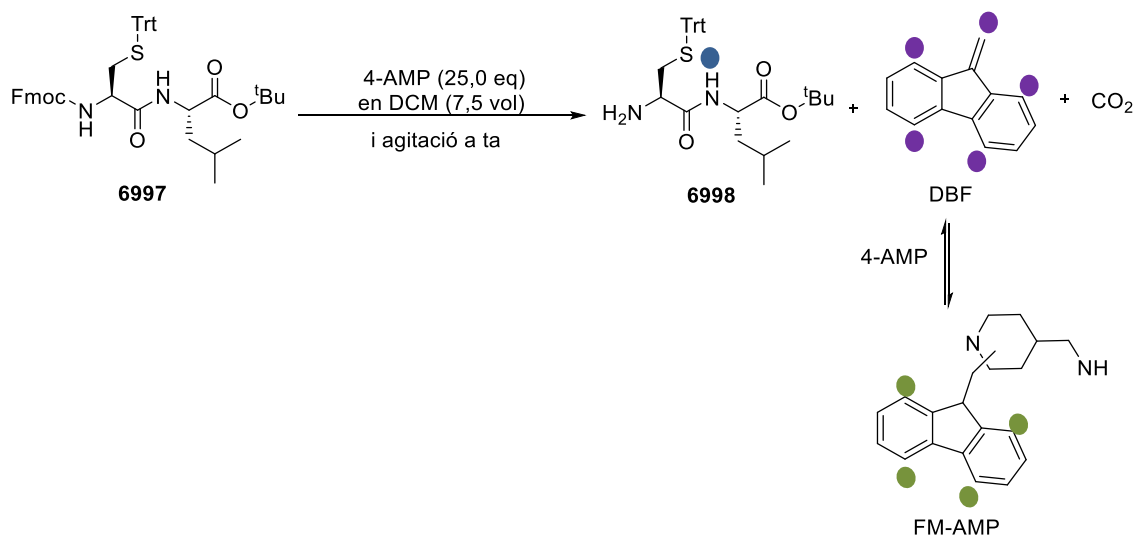
5.2.3.2. 4-AMP

Dels estudis preliminars que s'havien fet fins al moment, van sorgir dues consideracions que calia tenir en compte a l'hora de plantejar noves condicions per eliminar el grup Fmoc en solució, la utilització d'una base que no provoqués l'epimerització del dipèptid i la cerca d'unes condicions idònies de separació dels subproductes (adductes de DBF i/o DBF) del producte desitjat (**6998**). Aquest últim objectiu no s'havia assolit fins al moment.

A la literatura, s'ha descrit la utilització de 4-(aminometil)piperidina (4-AMP) com a base per desprotegir l'amina terminal així com a nucleòfil per transformar el DBF en el corresponent adducte de 4-AMP (FM-AMP).¹²⁸ L'avantatge d'aquesta base és que el corresponent adducte és soluble en una solució aquosa tampó de fosfats a pH 5,5 i, per tant, es pot separar del producte desitjat mitjançant rentats amb aquesta solució. L'excés de 4-AMP s'elimina prèviament del cru amb extraccions amb una dissolució aquosa sat de NaCl.

Aquest procediment es va aplicar en una nova síntesi de **6998** (**6998_UB-19106**), a partir de 0,2 g de **6997_QF-15382-01**, que es van tractar amb 25,0 eq de 4-AMP en DCM per donar **6998**. La reacció es va seguir per HPLC i als 15 min no es va observar el dipèptid protegit de partida **6997**.

A l'**Esquema 47** es mostra la reacció de desprotecció en les condicions abans esmentades. Com es pot veure, es va considerar la possibilitat de formació de dos adductes (amino i/o piperidido), tal com s'ha descrit a la literatura.¹²⁸



Esquema 47. Condicions de reacció per a la síntesi de **6998_UB-19106**.

Una alíquota del cru es va analitzar per ^1H -RMN als 30 min de reacció. A la regió aromàtica de l'espectre (**Figura 82, A**) es va observar un doblet aïllat a 7,67 ppm, corresponent a dos dels quatre àtoms d'hidrogen de l'adducte FM-AMP senyalats a l'**Esquema 47**. L'altre doblet a 7,85 ppm corresponent als altres dos àtoms d'hidrogen senyalats a l'esquema es troba solapat amb els senyals molt menys intensos de la resta de protons aromàtics del DBF que es destaquen al mateix esquema. L'assignació d'aquests dos doblets a protons aromàtics de la base es va fer en base als seus desplaçaments químics, no coincidents amb protons del grup Fmoc ni amb protons de DBF. A l'observar-se un únic joc de senyals per ^1H -RMN, semblava haver-se format un únic adducte, que podria ser qualsevol dels dos productes proposats. També es va detectar un singlet a 6,28 ppm corresponent als dos àtoms d'hidrogen vinílics del DBF. Per altra banda, només es va observar un doblet a 7,99 ppm que es va assignar a l'àtom d'hidrogen de l'amida de **6998**, el que indicava l'absència d'epimerització utilitzant 4-AMP com a base. La integració d'aquests senyals va permetre determinar una relació molar **6998**/FM-AMP/DBF d'1:0,86:0,27, tal com s'esperava ja que la relació **6998**/subproductes era d'1:1,1.

Per tal de cercar més informació sobre l'adducte format, es va analitzar la zona alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (**Figura 82, B**). Es va observar clarament un multiplet intens semblant a un doble quadruplet centrat a 0,92 ppm, que es va assignar als dos àtoms d'hidrogen axials units a les posicions 2 i 6 de l'anell piperidínic de la 4-AMP donat que s'havia utilitzat un gran excés de base en la reacció. Aquests senyals es van confirmar amb una anàlisi per ^1H -RMN del producte. Malauradament, semblava doncs que probablement el multiplet corresponent de l'adducte estigués sota el multiplet de la 4-AMP, i molt probablement aquest fos també el motiu de no poder-se identificar la resta de senyals de l'adducte a la zona alifàtica. Tanmateix, es van poder identificar clarament dos doblets a 0,81 ppm i 0,86 ppm, corresponents als dos grups metil diastereotòpics del residu de Leu de **6998**. Donat que l'objectiu principal era aconseguir eliminar els subproductes del cru peptídic, es va decidir continuar amb els assajos de purificació de **6998**.

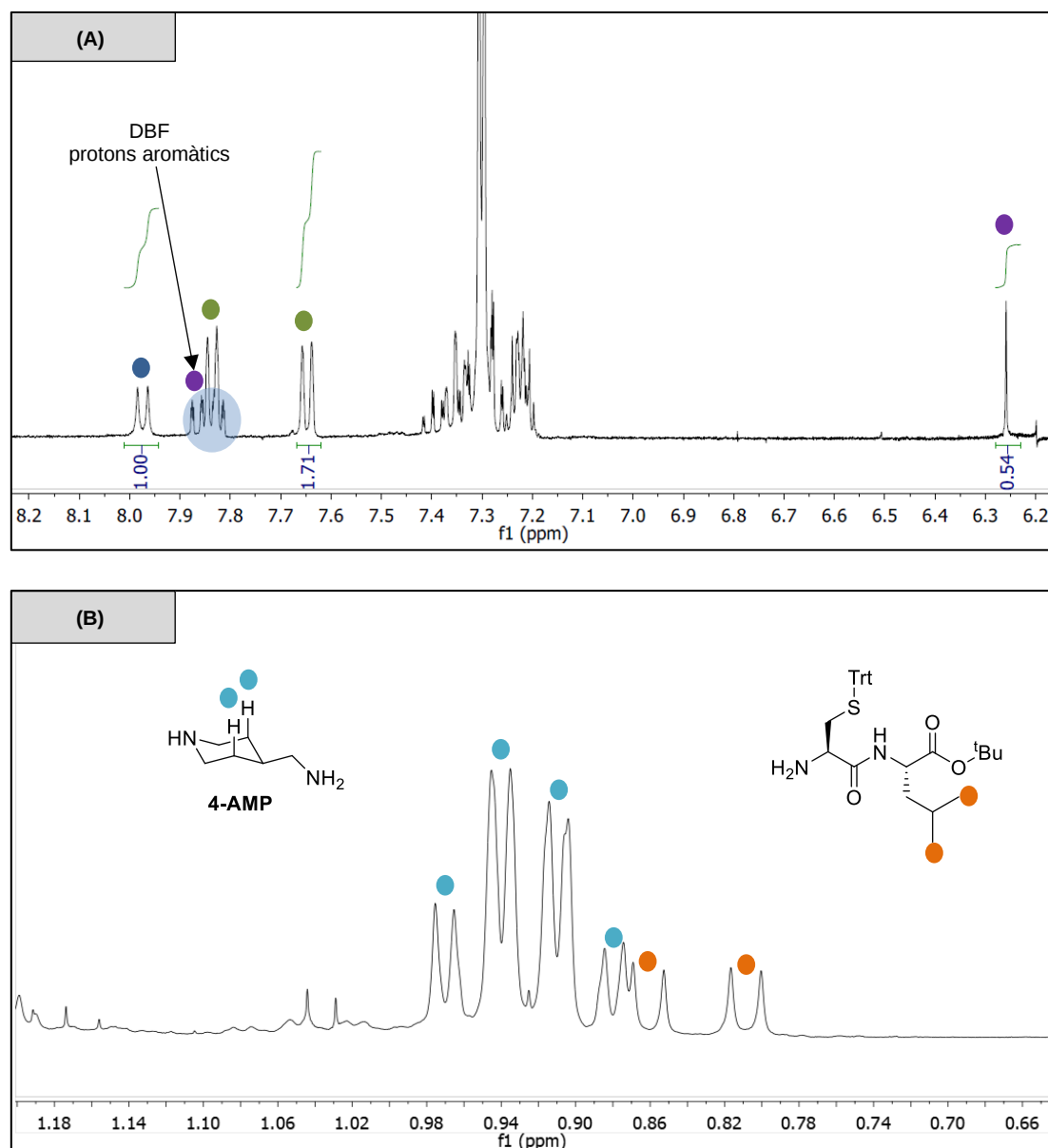


Figura 82. Regions aromàtica (A) i alifàtica (B) de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del cru de **6998_UB-19106**.

Per purificar **6998** es va seguir el protocol descrit per Carpino *et al.*¹²⁸, que consisteix en rentar el cru amb solució aquosa sat de NaCl i solució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 5,5 per eliminar la 4-AMP i l'adducte corresponent, respectivament. Així, el cru es va rentar dues vegades amb la solució sat de NaCl i es va analitzar la fase orgànica resultant (FO2) per ^1H -RMN per tal de comprovar si realment la 4-AMP s'havia eliminat. No es va observar el multiplet assignat a la 4-AMP en la zona alifàtica de l'espectre de la fase orgànica (**Figura 83, A**), el que semblava indicar que les dues extraccions havien sigut efectives. Sorprenentment, es va comprovar també que els senyals del DBF havien pràcticament desaparegut (**Figura 84**, comparar espectres **A** i **B**). Tenint en compte que la relació molar inicial **6998**/FM-AMP/DBF era d'1:0,86:0,27, aquest resultat va indicar que el DBF i possiblement part de l'adducte FM-AMP van passar a la fase aquosa al ser la relació molar final **6998**/subproductes d'1:0,7.

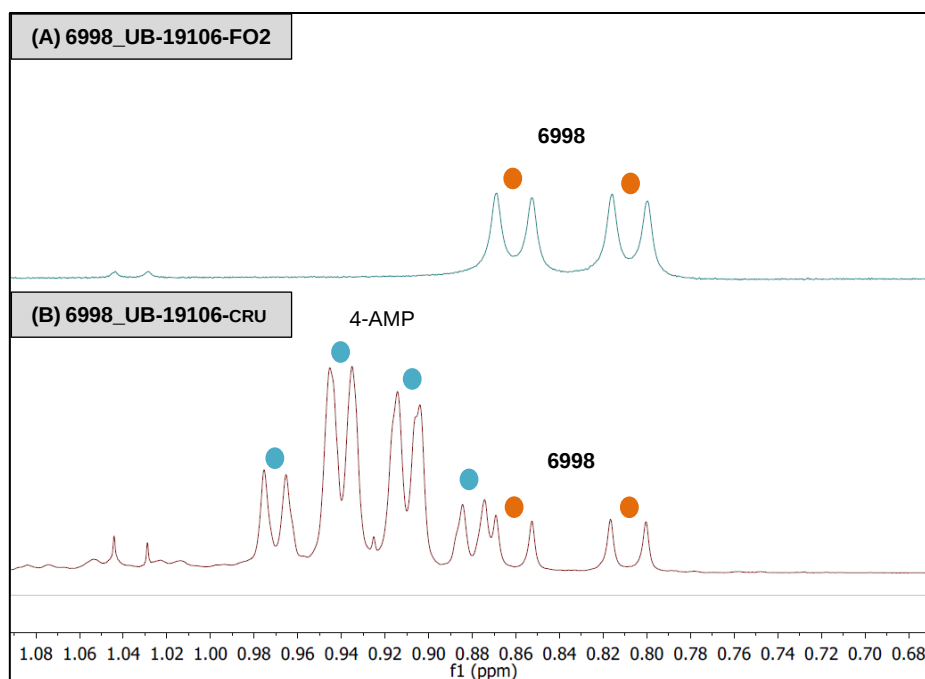


Figura 83. Comparació de part de la regió alifàtica dels espectres de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del cru inicial de **6998** (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa sat de NaCl (A).

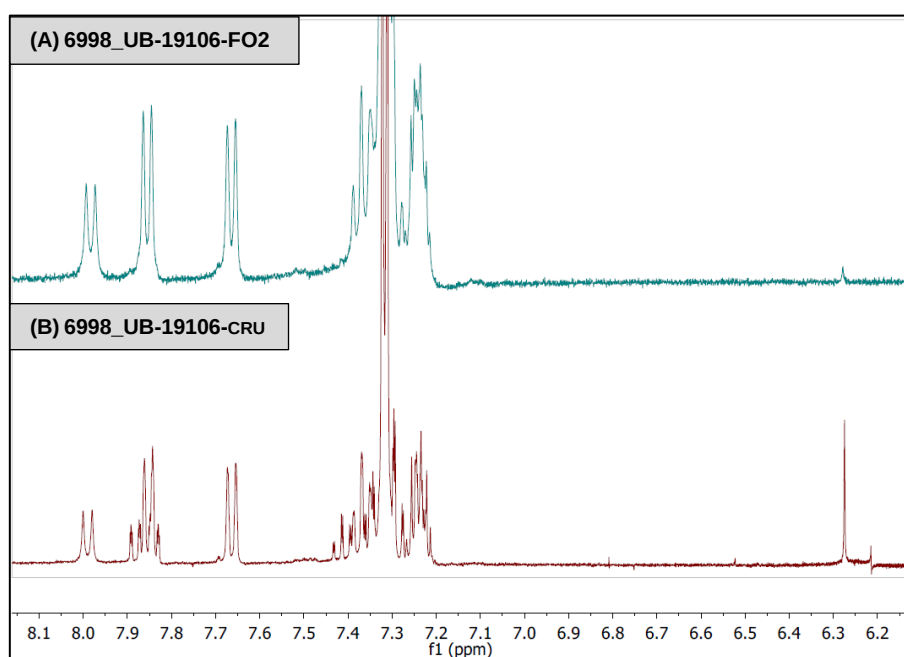


Figura 84. Comparació de la regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN del cru inicial de **6998** (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa sat de NaCl (A).

Els rentats amb una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 5,5 per eliminar l'adducte de la fase orgànica, van donar lloc a emulsions amb interfases poc clares que van complicar la separació de fases. L'adducte de FM-AMP encara s'observava en la fase orgànica per ^1H -RMN després de dues extraccions, pel que es va tornar a fer un nou tractament amb la dissolució tampó durant 12 h i després es van separar les fases amb dificultats per la formació d'emulsions. L'espectre de ^1H -RMN de la fase orgànica resultant (FO5) (**Figura 85, A**) encara mostrava adducte de FM-AMP, indicant que aquest procediment no era efectiu per **6998** (relació

d'1:0,39:0,07 de **6998**/FM-AMP/DBF). Per altra banda, es van tornar a observar senyals de DBF a l'espectre, resultat contradictori si es compara amb el que es va obtenir amb els rentats anteriors utilitzant la solució aquosa de NaCl (**Figura 85, B**), on el subproducte no es detectava (relació d'1:0,7 de **6998**/FM-AMP). Aquest fet semblava indicar que es restablia la posició de l'equilibri DBF/4-AMP després d'eliminar el DBF, equilibri que, segons es descriu a la literatura,¹²⁷ es recupera lentament (cal recordar que es va rentar durant 12 h).

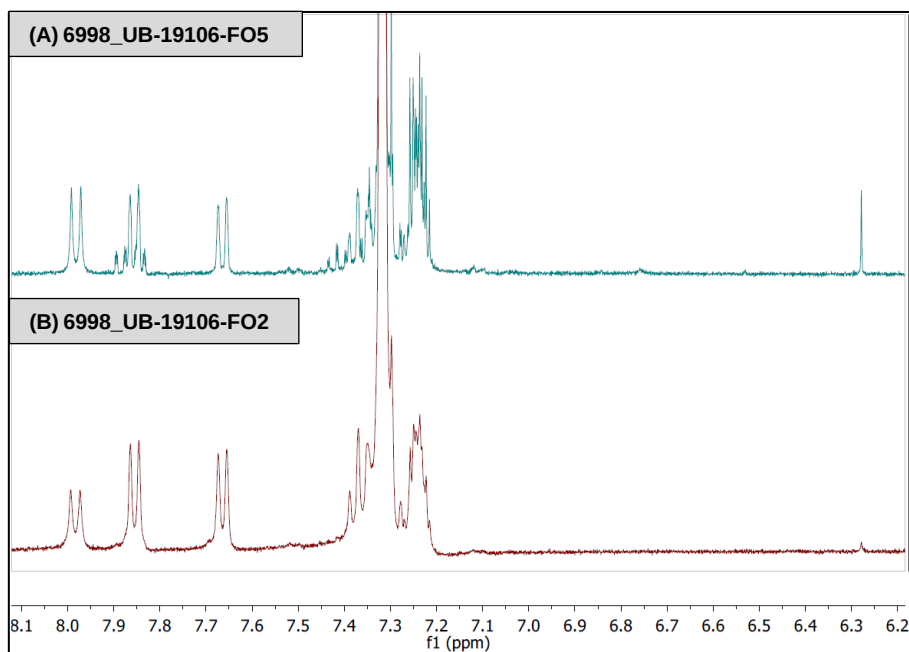


Figura 85. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de la fase orgànica després dels rentats amb NaCl (**B**) i de la fase orgànica després dels rentats amb la solució de fosfats de pH 5,5 (**A**).

Donat que l'eliminació de l'adducte no va ser eficient, es va canviar el dissolvent del cru a AcOEt i es van dur a terme extraccions amb la solució aquosa de fosfats de pH 5,5. L'anàlisi per ^1H -RMN de la fase orgànica obtinguda (FO6) (**Figura 86, A**) no va mostrar els senyals corresponents a l'adducte de FM-AMP en la zona aromàtica, el que indicava que en aquest cas les extraccions utilitzant AcOEt com a dissolvent orgànic havien sigut efectives. No obstant, encara es detectaven els senyals de DBF. Una vegada es va arribar a aquest punt, el dissolvent orgànic es va eliminar a pressió reduïda, obtenint-se el sòlid **6998_UB-19106-01**.

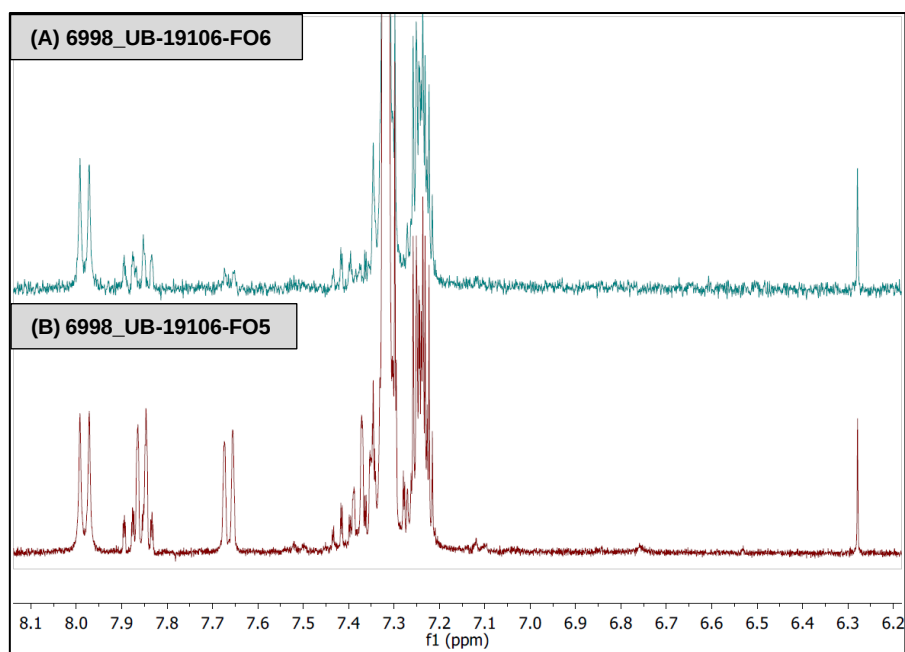
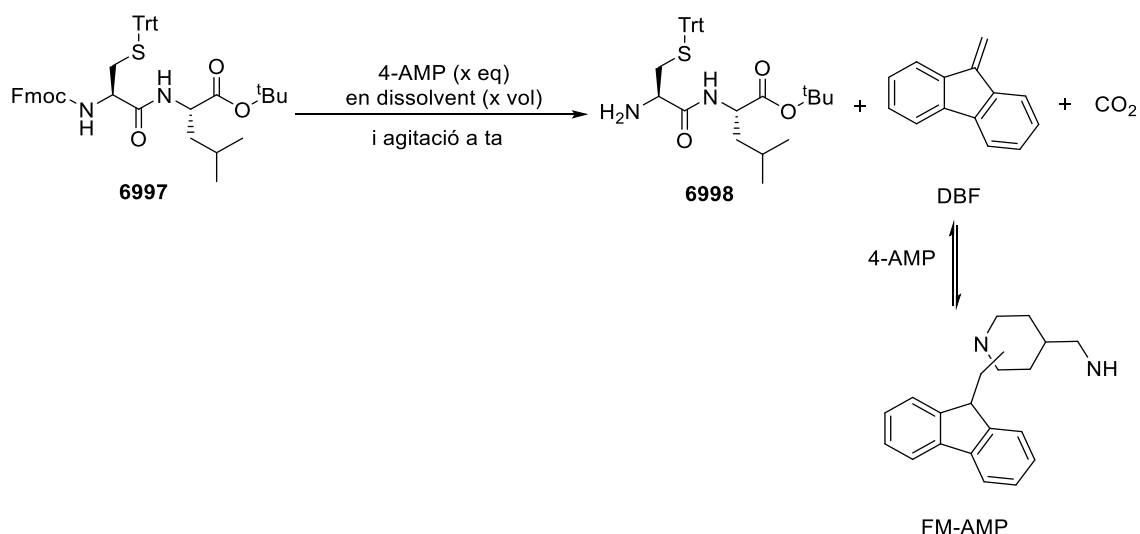


Figura 86. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa de tampó fosfats a pH 5,5 amb fase orgànica de DCM (**B**) i amb fase orgànica d'AcOEt (**A**).

Ja que la primera prova amb 4-AMP (**6998_UB-19106**) va donar resultats prometedors, es va tornar a assajar la reacció de desprotecció de **6998** modificant condicions experimentals com per exemple el dissolvent, el nombre d'equivalents o el temps de la reacció (**Esquema 48**, **Taula 29**), amb l'objectiu d'obtenir **6998** lliure de subproductes i amb un bon rendiment. L'escala de treball dels assajos va ser de 0,3 g de **6997_QF-15382-01** per la prova **6998_UB-19109**, d'1,0 g de **6997_QF-15395-01** per a la prova **6998_UB-19112** i de 2,0 g de **6997_UB-19115-01** per a la prova **6998_UB-19130**. Les reaccions es van monitoritzar per HPLC, no detectant-se material de partida als 10 min de reacció en cap dels assajos. Una vegada transcorregut el temps que es mostra a la **Taula 29**, es va dur a terme el tractament del cru de reacció tal com ja s'ha explicat i la eliminació dels subproductes es va seguir per ^1H -RMN.



Esquema 48. Assajos de la síntesi de **6998** utilitzant 4-AMP en diferents condicions experimentals.

Taula 29. Condicions de reacció per l'obtenció de **6998** amb 4-AMP com a base.

Lot	Condicions de reacció			Filtració	Relació molar ¹ H-RMN (6998/FM-AMP/DBF)	
	Dissolvent (vol)	4-AMP (eq)	t (min)		Abans extraccions ^a	Sòlid final
UB-19109	DCM (7,5)	25,2	30	No	1:0,81:0,19	1:0:0,04
UB-19112	DMF (7,4)	5,0	120	Sí ^b	1:0,15:0	1:0:0
UB-19130	MeCN (6,5)	5,0	120 ^c	Sí	1:0,3:0,06	1:0:0

(a) Extraccions amb solució aquosa sat de NaCl i una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 5,5.

(b) Abans de la filtració el cru es va transvasar a un baló amb MeCN (70 vol).

(c) Als 30 min de reacció, es refreda la temperatura externa a 5 °C.

La prova **UB-19109** es va dur a terme amb les mateixes condicions de reacció que la prova **UB-19106**, i com en l'assaig anterior es va veure que les extraccions no eren efectives en DCM, es va dur a terme el canvi de dissolvent de DCM a AcOEt per eliminar l'adducte FM-AMP del cru amb rentats de solució aquosa de fosfats a pH 5,5. L'adducte no es va detectar en la fase orgànica per ¹H-RMN després de quatre extraccions amb aquest tampó, indicant que el tractament del cru havia sigut efectiu utilitzant AcOEt, encara que es formessin emulsions en les interfases. Es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda i es va obtenir un sòlid (**6998_UB-19109-01**, rendiment 25 %), en presència de DBF, determinat per ¹H-RMN.

En la prova on es va utilitzar DMF com a dissolvent (**UB-19112**), els equivalents de 4-AMP es van reduir a 5 i el temps de reacció es va allargar a 120 min, ja que en les proves amb DCM (**UB-19106** i **UB-19109**) es va observar que la dissolució s'enterbolia als 30 min de reacció. La solució també es va enterbolir als 30 min amb DMF (**UB-19112**), esdevenint una suspensió densa. Al preparar una mostra per analitzar per HPLC, es va observar que el sòlid precipitava clarament en MeCN i formava un sòlid que dipositava al fons del matràs. Aquesta suspensió es va filtrar i el sòlid es va analitzar per HPLC-MS i ¹H-RMN, determinant-se la *m/z* de 293,41 corresponent a l'adducte FM-AMP i observant-se per ¹H-RMN els doblets de la zona aromàtica assignats a aquest adducte. Per aquesta raó, es va decidir transvasar tota la solució del cru a un baló amb MeCN (70 vol) per separar FM-AMP de **6998** per filtració. La solució resultant es va analitzar per ¹H-RMN, comprovant-se que no quedava DBF en la solució del cru i que s'havia aconseguit eliminar la major part de l'adducte de FM-AMP en la filtració. El dissolvent del cru es va canviar a AcOEt i es van realitzar els rentats ja comentats, aconseguint-se eliminar del cru el romanent de FM-AMP encara que es formaven emulsions en les interfases. El sòlid obtingut (**6998_UB-19112-03**, rendiment 86 %) va donar un espectre de ¹H-RMN lliure de subproductes (**Figura 87**).

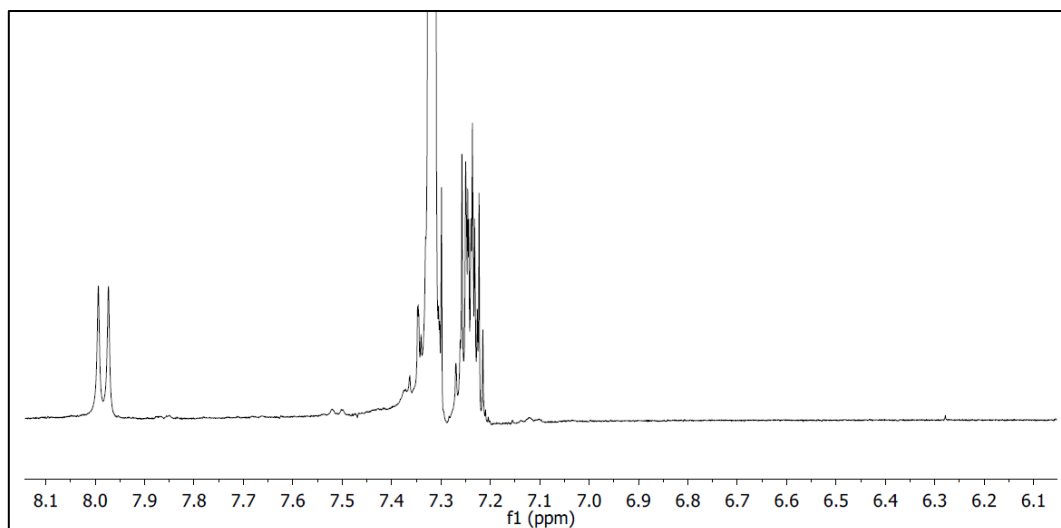


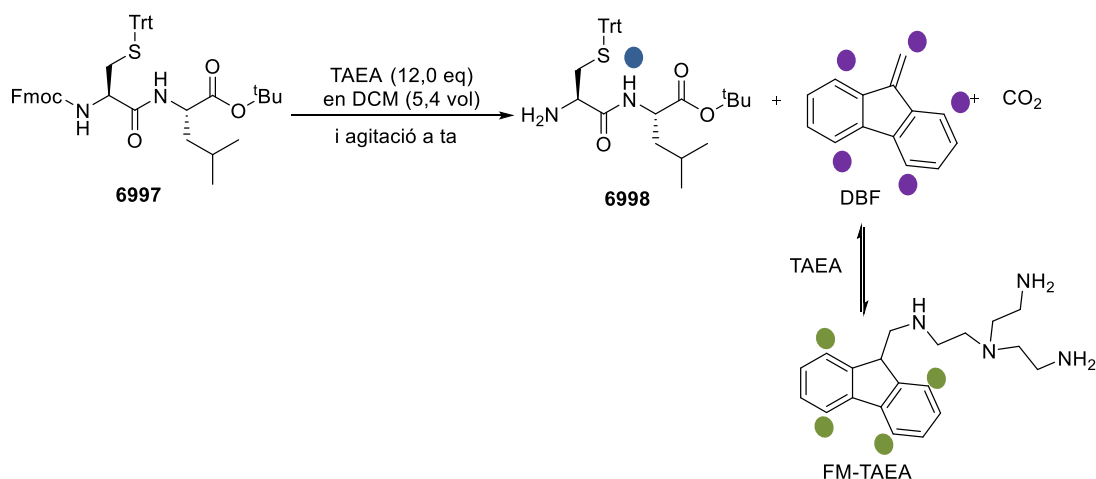
Figura 87. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **6998_UB-19112-03**.

En base als resultats obtinguts, es va dissenyar una prova emprant MeCN directament com a dissolvent (**UB-19130**) per a intentar afavorir la precipitació de l'adducte de FM-AMP, reduint els volums de dissolvent (6,5 vol) i la temperatura de la suspensió a 5 °C després de 30 min de reacció. A aquesta temperatura es va agitar la suspensió durant 1,5 h i es va filtrar, quedant-se retint part de l'adducte de FM-AMP i de DBF en el sòlid obtingut, tal com es va determinar per ^1H -RMN. Es va afegir AcOEt al cru i la dissolució resultant es va rentar amb solució aquosa sat de NaCl i solució tampó de fosfats de pH 5,5, aconseguint-se eliminar l'adducte de FM-AMP i el DBF romanents tot i la formació d'emulsions a l'interfase. El dissolvent orgànic es va eliminar a pressió reduïda per obtenir un sòlid sense subproductes (**6998_UB-19130-02**, rendiment 82 %).

Amb les proves **UB-19112** i **UB-19130** es va aconseguir obtenir el producte **6998** lliure dels subproductes (DBF i FM-AMP) i amb bons rendiments (per sobre del 80 %). L'inconvenient va ser la formació d'emulsions en els rentats amb la solució de fosfats a pH 5,5 que podrien portar problemes a l'hora d'escalar el procés.

5.2.3.3. TAEA

Els autors que descriuen l'ús de 4-AMP per a desprotegir el grup α -amino de l'extrem de la cadena peptídica, mencionen també que en alguns casos l'eliminació de l'adducte de FM-AMP podia ser poc eficient per la formació d'emulsions en els rentats. Per aquesta raó, es proposava com alternativa reemplaçar la 4-AMP per la base tris(2-aminoetil)amina (TAEA) per eliminar el grup protector Fmoc, donat que es podia extreure amb més facilitat el corresponent adducte de TAEA (FM-TAEA) seguint el mateix protocol de rentats que s'utilitzava per a la 4-AMP.¹²⁸ Així, es va dur a terme una nova prova (**6998_UB-19119**) a escala de 0,5 g de **6997_UB-19115-01** utilitzant 12 eq de TAEA i DCM com a dissolvent (**Esquema 49**). La reacció es va monitoritzar per HPLC i als 10 min de reacció no es va detectar producte de partida però es va deixar en agitació fins 2,5 h per tal d'assolir l'equilibri entre el DBF i el corresponent adducte.



Esquema 49. Condicions de reacció per a la síntesi de **6998_UB-19119**.

A les 2,5 h de reacció, una alíquota de la suspensió del cru es va analitzar per ¹H RMN. En la zona aromàtica de l'espectre (**Figura 88**), es va observar un doblet aïllat a 7,67 ppm corresponent a dos àtoms d'hidrogen dels anells aromàtics de l'adducte de TAEA senyalats a l'**Esquema 49**. L'altre doblet a 7,85 ppm corresponent als altres dos àtoms d'hidrogen de l'adducte de FM-TAEA es troba solapat amb els senyals de quatre protons aromàtics del DBF, també senyalats en el mateix esquema. També es va observar el singlet a 6,28 ppm corresponent als dos àtoms d'hidrogen vinílics del DBF i només es va observar un doblet a 7,99 ppm que es va assignar a l'àtom d'hidrogen de l'amida de **6998**, resultat que confirmava la integritat quiral del producte. Respecte al pèptid, es va determinar una relació molar de **6998**/FM-TAEA/DBF d'1:0,70:0,37, resultat que indica que l'equilibri està desplaçat vers la formació de l'adducte, tal com està descrit a la literatura.¹²⁷

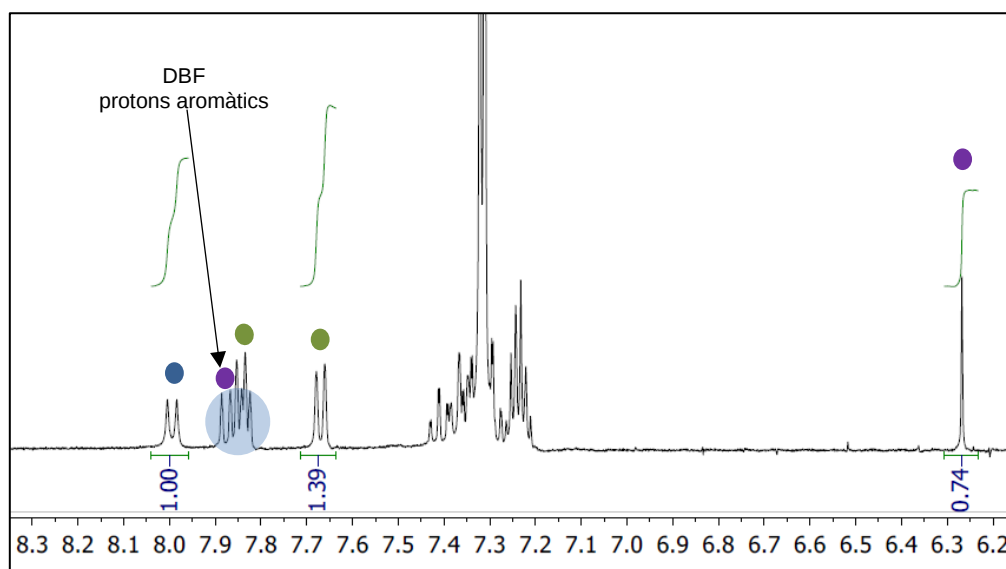


Figura 88. Zona aromàtica de l'espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) del cru de **6998_UB-19119**.

La suspensió densa del cru no es va poder filtrar a causa de la textura gomosa del sòlid, per tant, es va addicionar més DCM i es van dur a terme quatre rentats de la fase orgànica amb una solució aquosa sat de NaCl. A l'espectre de ¹H-RMN de la fase orgànica obtinguda (**Figura 89, A**) es va comprovar que els dos triplets aparents a 2,36 ppm i 2,55 ppm corresponents als grups

metilè de la TAEA havien desaparegut del cru inicial (**Figura 89, B**), demostrant l'eficàcia dels rentats amb NaCl. Els triplets aparents de la base es van confirmar per l'anàlisi per ^1H -RMN d'una mostra pura de la base.

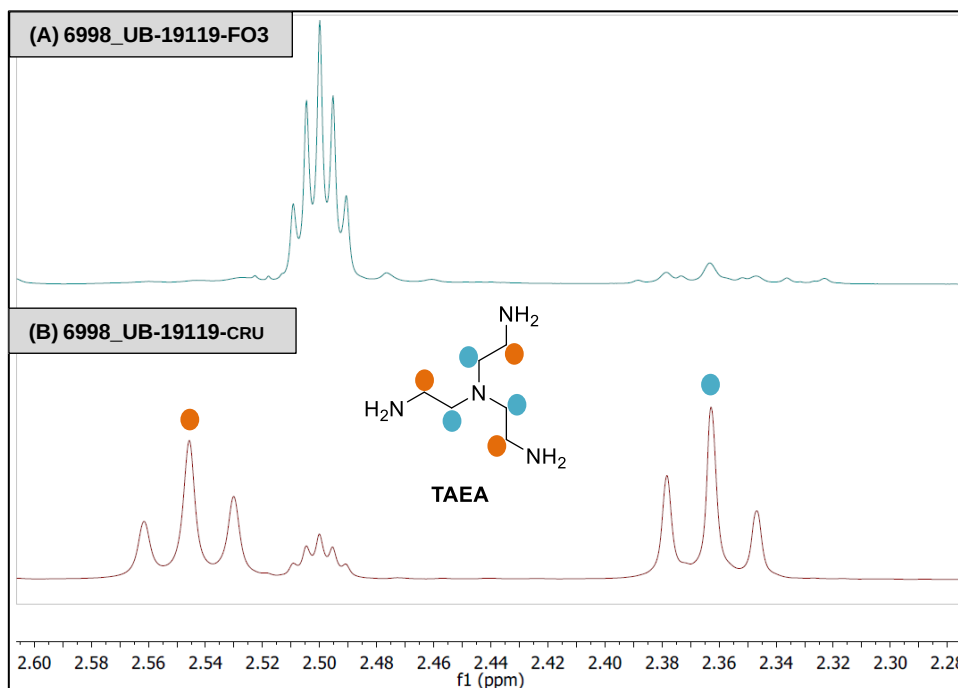


Figura 89 Comparació de regions alifàtiques dels espectres de ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) de la suspensió del cru de reacció (**B**) i de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa sat de NaCl (**A**).

Per tal d'eliminar del cru l'adducte de TAEA, la fase orgànica es va rentar amb la dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 de pH 5,5. Després de tres extraccions, ja no es va observar per ^1H -RMN l'adducte de TAEA en la fase orgànica obtinguda (**Figura 90, A**), indicant que els tractaments havien sigut efectius al comparar les regions aromàtiques amb la fase orgànica inicial (**Figura 90, B**). Per altra banda, amb la utilització de TAEA es van evitar la formació d'emulsions en les interfases, el que facilitava el tractament del cru de reacció. Tanmateix, se seguia detectant els senyals del DBF, el que no va permetre obtenir el producte **6998** pur (relació d'1:0,1 de **6998**/DBF). El dissolvent de la fase orgànica del cru es va eliminar a pressió reduïda per obtenir el sòlid **6998_UB-19119-01** (rendiment del 37 %). Aquest resultat va obligar a seguir amb la recerca de condicions experimentals adients per eliminar el DBF del cru de reacció.

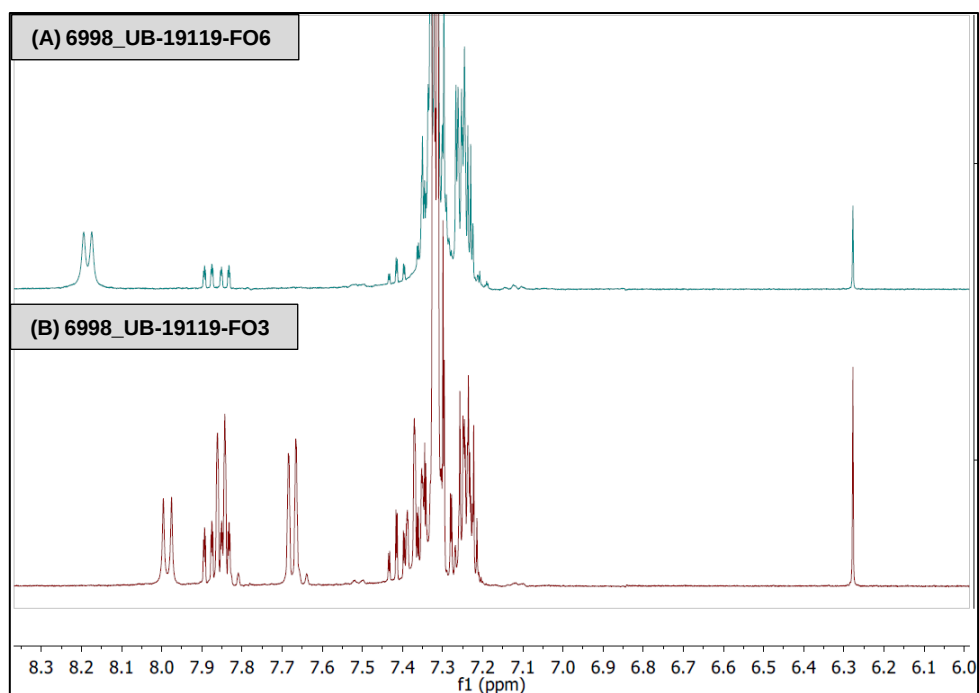


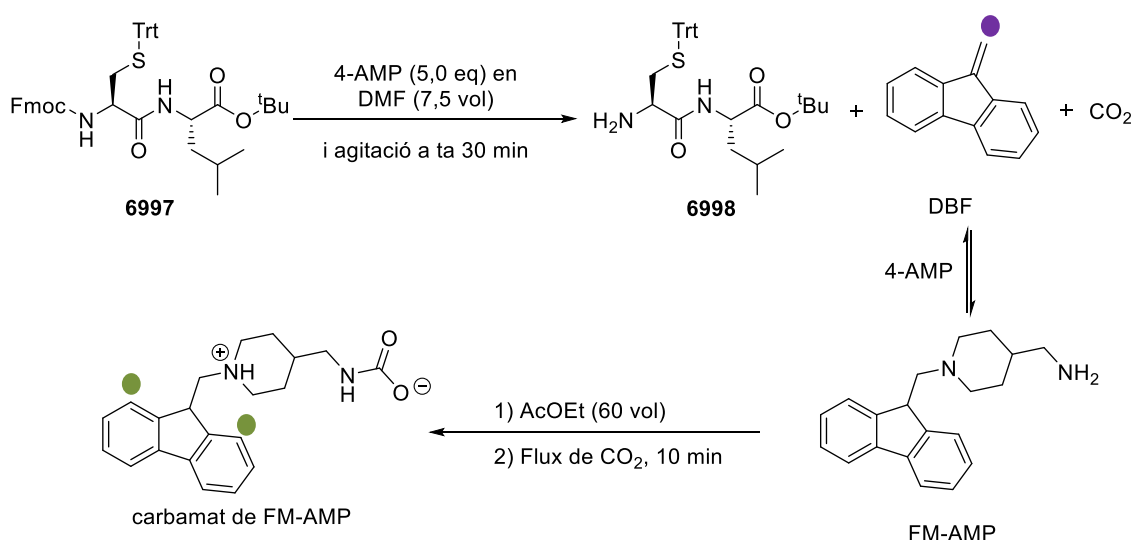
Figura 90. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de la fase orgànica després dels rentats amb NaCl **(B)** i de la fase orgànica després dels rentats amb tampó de fosfats de pH 5,5 **(A)**.

5.2.3.4. 4-AMP EN PRESENCIA DE CO_2

Es va trobar a la literatura una alternativa per eliminar els subproductes generats en la reacció d'eliminació del grup protector Fmoc en solució amb 4-AMP.¹²³ El mètode consisteix en utilitzar la base per desprotegir l'extrem α -amino del pèptid i, a continuació, borbollejar CO_2 gas al medi de reacció per precipitar l'adducte FM-AMP i separar-lo posteriorment per filtració.

Es va fer una prova inicial (**6998_UB-19132**) utilitzant 2,0 g del lot **6997_UB-19115-01**, en condicions similars a les abans esmentades (*apartat 5.2.3.2*), que consistien en desprotegir l'extrem α -amino de **6997** amb 4-AMP en DMF (**Esquema 50**). Als 10 min de reacció no es va observar producte de partida per HPLC i als 30 min es va afegir AcOEt (60 vol), moment en que es va introduir un flux constant de CO_2 al cru de reacció. La reacció amb CO_2 es va controlar mesurant la temperatura del medi de reacció al ser un procés exotèrmic. Així, l'addició del reactiu va comportar un augment de la temperatura de 20,3 °C a 25,4 °C en 3 min. Als 10 min, la temperatura tornava a ser molt semblant a la inicial (19,4 °C) i la reacció es va donar per finalitzada, aturant la introducció de CO_2 .

El producte que s'obté de la reacció entre FM-AMP i CO_2 depèn de les condicions experimentals que s'utilitzin. Així, en un medi anhidre (anh) es forma el carbamat per addició del CO_2 a l'adducte mitjançant un atac nucleòfil d'un dels àtoms de nitrogen.¹²⁹ En aquest cas es formaria un zwitterió, com per exemple el que es mostra a l'**Esquema 50** (carbamat de FM-AMP), encara que també es podria formar l'adducte de FM-AMP a través de l'enllaç amb l'amina primària de 4-AMP, tal i com s'ha mencionat anteriorment (**Esquema 47**, *apartat 5.2.3.2*). Tanmateix, si el carbamat no fos suficient estable es podria descompondre en presència de H_2O per donar un carbonat.¹³⁰ En el cas de la desprotecció de **6997**, no es va fer una caracterització exhaustiva del sòlid donat que l'objectiu principal era aconseguir eliminar els subproductes del cru peptídic.



Esquema 50. Condicions de reacció per a la síntesi i purificació de **6998_UB-19132**.

La suspensió resultant de la reacció amb CO₂ es va filtrar per analitzar per ¹H-RMN el sòlid (**6998_UB-19132-01**) i la solució (**6998_UB-19132-diss**). En la regió aromàtica de l'espectre de ¹H-RMN del sòlid (**Figura 91, B**), es va detectar un doblet a 7,67 ppm corresponent a dos àtoms d'hidrogen dels anells aromàtics del carbamat de FM-AMP, i un singlet a 6,28 ppm corresponent als dos àtoms d'hidrogen vinílics del DBF, amb una relació carbamat de FM-AMP/DBF d'1:0,2. En canvi, els senyals dels subproductes no es van detectar en la regió aromàtica de l'espectre de ¹H-RMN de la dissolució (**Figura 91, A**), indicant que la precipitació amb CO₂ havia estat eficient. El doblet a aproximadament 8,0 ppm corresponent a l'àtom d'hidrogen de l'amida de **6998** no es va poder observar amb claredat ja que va quedar solapat pel senyal de l'àtom d'hidrogen del grup formil de la DMF.

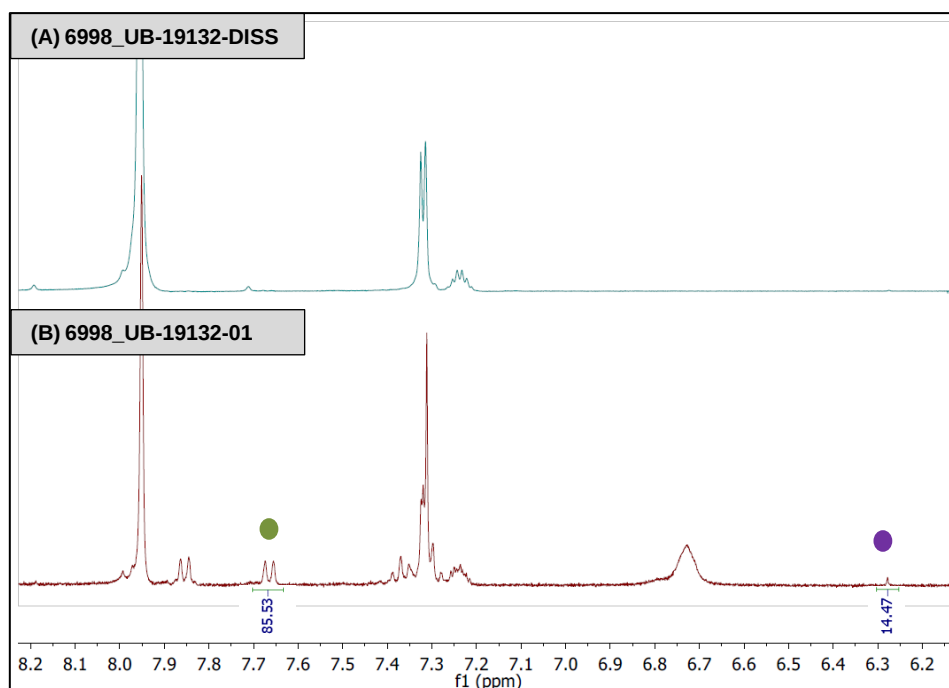


Figura 91. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de ¹H-RMN (DMSO-d₆) del sòlid **6998_UB-19132-01** (A) i de la dissolució **6998_UB-19132-diss** (B).

En la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN del sòlid (**Figura 92, B**) es va detectar un multiplet centrat a 0,94 ppm, probablement corresponent als dos àtoms d'hidrogen axials units als àtoms de carboni piperidínics 2 i 6 dels carbamats de la 4-AMP i de l'adducte FM-AMP (suposant la precipitació de la base i l'adducte en forma de carbamat). Un indicatiu que recolzaria aquesta hipòtesi és l'amplada de banda dels senyals del multiplet, clarament superior a la dels senyals de la 4-AMP lliure (**Figura 82, apartat 5.2.3.2**). També es van observar dos doblets a 0,81 ppm i 0,86 ppm corresponents als dos grups metil diastereotòpics del grup isopropil de **6998** que revelen que en el sòlid també va precipitar producte desitjat, essent les úniques senyals que es van detectar a la mateixa regió de l'espectre de ^1H -RMN de la dissolució (**Figura 92, A**). Aquests resultats es van confirmar amb l'anàlisi per HPLC-MS del sòlid **6998_UB-19132-01**, detectant-se majoritàriament la m/z de 4-AMP i FM-AMP. En canvi, en l'HPLC-MS de la solució només es va observar la m/z corresponent a **6998**.

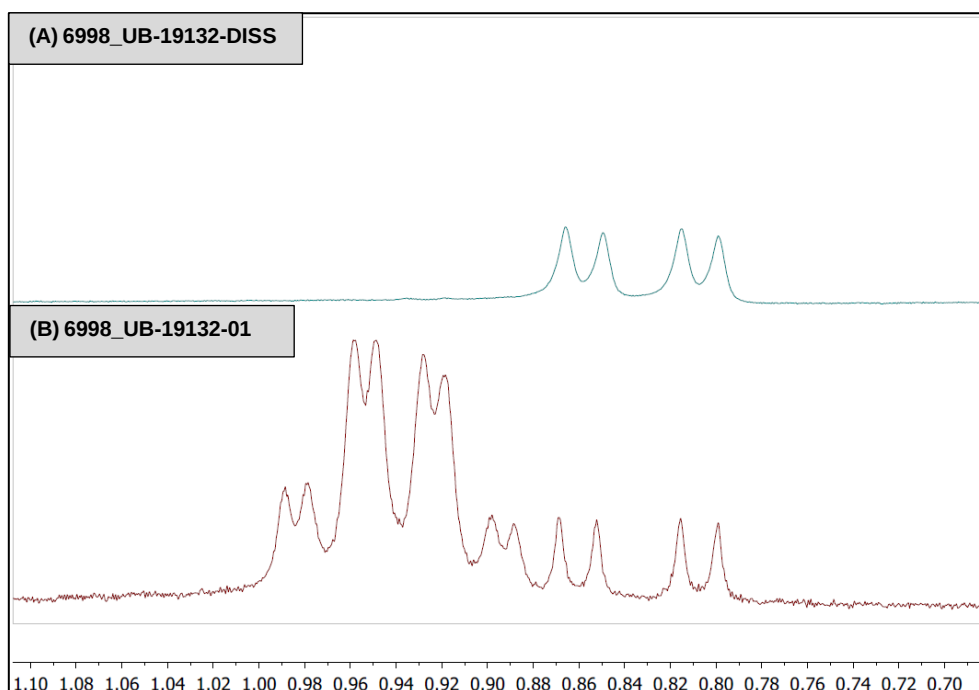
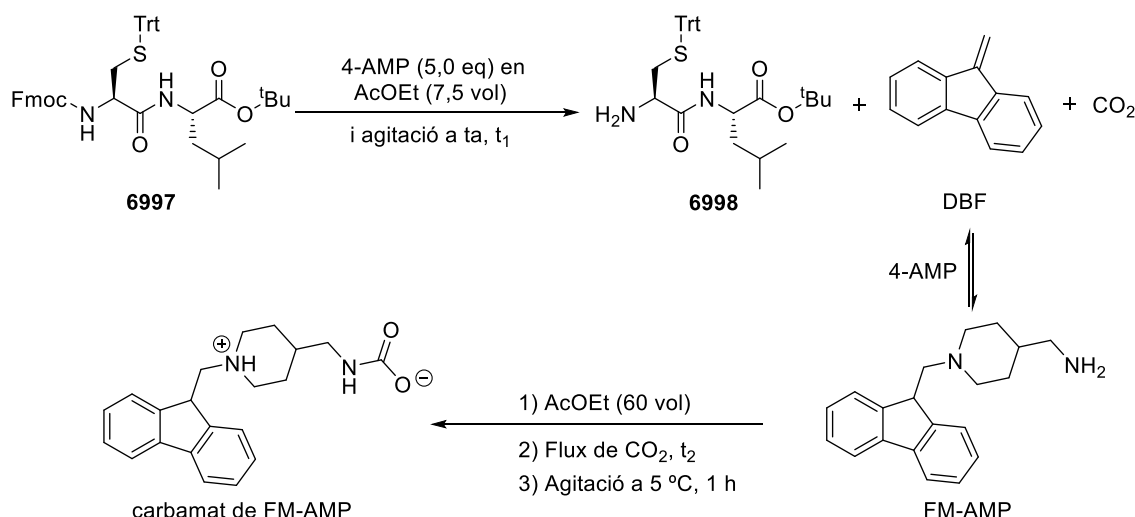


Figura 92. Comparació de les regions alifàtiques dels espectres de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del sòlid **6998_UB-19132-01 (B)** i de la dissolució **6998_UB-19132-diss (A)**.

Es va aconseguir doncs una solució de **6998** pur i es va obtenir el sòlid **6998_UB-19132-02** (rendiment del 67 %) una vegada es van eliminar els dissolvents de la solució mitjançant extraccions amb H_2O i eliminació a pressió reduïda. El sòlid es va analitzar per ^1H -RMN, no detectant-se cap altre producte que no fos el desitjat.

La primera prova utilitzant CO_2 va ser prometedora a l'obtenir el **6998** pur. Per tal d'intentar millorar el rendiment del procés, es van dur a terme les proves que es descriuen a continuació utilitzant AcOEt com a dissolvent i 5 eq de 4-AMP en tots els casos (**Esquema 51 i Taula 30**). El producte de partida utilitzat va ser **6997_UB-19115-01** en les dues primeres proves i **6997_UB-19141-01** en la prova **6998_UB-19144**, i les reaccions es van tenir en agitació el temps que indica la **Taula 30** (t_1). Es va addicionar AcOEt (60 vol) al cru i es va borbollejar CO_2 gas fins que la temperatura interna de la dissolució va tornar a ser com la inicial. Un cop obtinguda la suspensió de carbamat, la temperatura de la camisa es va baixar a 5 $^\circ\text{C}$ i es va agitar durant 1 h per tal d'afavorir la precipitació.



Esquema 51. Protocol dels assajos de síntesi de **6998** utilitzant 4-AMP com a base i CO_2 pel tractament posterior del cru.

Taula 30. Condicions de reacció per l'obtenció de **6998** utilitzant 4-AMP com a base i CO_2 pel tractament posterior del cru.

Lot	Condicions de reacció		Relació molar ^1H -RMN (6998/FM-AMP/DBF)		
	6997 (g)	t_1 (h)	Abans CO_2	t_2 CO_2 (min)	Sòlid final
UB-19134	2,0	0,5	(1:0,59:0,41)	15	(1:0:0,5) ^a
UB-19135	2,0	5,0	(1:0,99:0,01)	20	(1:0:0)
UB-19144	13,1	4,0	(1:1:0)	60	(1:0:0)

(a) Resultat de la dissolució després de la filtració.

En la prova **UB-19134** es van utilitzar condicions similars a les de la prova **UB_19132**, però emprant AcOEt en lloc de DMF com a dissolvent. Als 30 min de reacció es va determinar per ^1H -RMN un alt contingut de DBF en el cru (relació **6998**/FM-AMP/DBF d'1:0,59:0,41), però es va decidir iniciar la introducció d'un flux constant de CO_2 amb l'esperança de que es formés més adducte amb la precipitació del carbamat. A l'analitzar la solució obtinguda després de la filtració, es va constatar la desaparició de l'adducte de FM-AMP amb el tractament de CO_2 , però es va detectar la presència de DBF amb una relació molar **6998**/DBF d'1:0,5. Això indicava que la precipitació del carbamat no afavoria la desaparició de DBF vers la formació d'adducte, i que probablement s'hauria de deixar més temps la reacció abans del tractament amb CO_2 . No es va aïllar el cru com a sòlid a l'estar impurificat el producte amb DBF.

En base als resultats de la prova anterior, es va dur a terme la prova **UB-19135** en condicions similars però allargant el temps de reacció per intentar aconseguir l'assoliment de l'equilibri afavorit a la formació d'adducte. A les 5 h de reacció, l'anàlisi per ^1H -RMN va mostrar una proporció d'adducte molt baixa (relació de **6998**/FM-AMP/DBF d'1:0,99:0,01), pel que es va decidir tractar el cru amb CO_2 i a continuació eliminar el dissolvent a pressió reduïda. Es va obtenir el sòlid **6998_UB-19135-02** (87 % de rendiment) sense subproductes, tal com es va observar per anàlisi de ^1H -RMN.

Es va considerar el procediment emprat a la prova **UB-19135** una molt bona aproximació per la preparació de **6998**. Per altra banda i com ja s'ha mencionat anteriorment, s'havia plantejat a l'empresa que seria molt interessant poder preparar **6998** directament a partir dels aminoàcids protegits Fmoc-Cys(Trt)-OH i H-Leu-O^tBu sense aïllar l'intermedi **6997**, és a dir, un procés *one-pot*. Cal recordar que al final del tractament del cru en la obtenció de **6997** (*apartat 5.1.1*), el dipèptid protegit es trobava dissolt en AcOEt després de les extraccions, el que feia convenient que la reacció d'obtenció de **6998** es donés a terme amb aquest dissolvent. Per tant, es va fer una nova prova (**UB-19144**) augmentat l'escala a 13,1 g de **6997** i a les 4 h de reacció no es va detectar DBF per ¹H-RMN, i es va tractar la solució del cru amb CO₂. La solució del cru es va concentrar a 1 vol i es va precipitar amb l'addició d'H₂O (12 vol). El sòlid obtingut (**6998_UB-19144-02**, 97 % de rendiment) no contenia cap dels subproductes, tal com es va evidenciar per ¹H-RMN, donant el producte desitjat per HPLC una puresa cromatogràfica del 97,7 % (**Figura 93**).

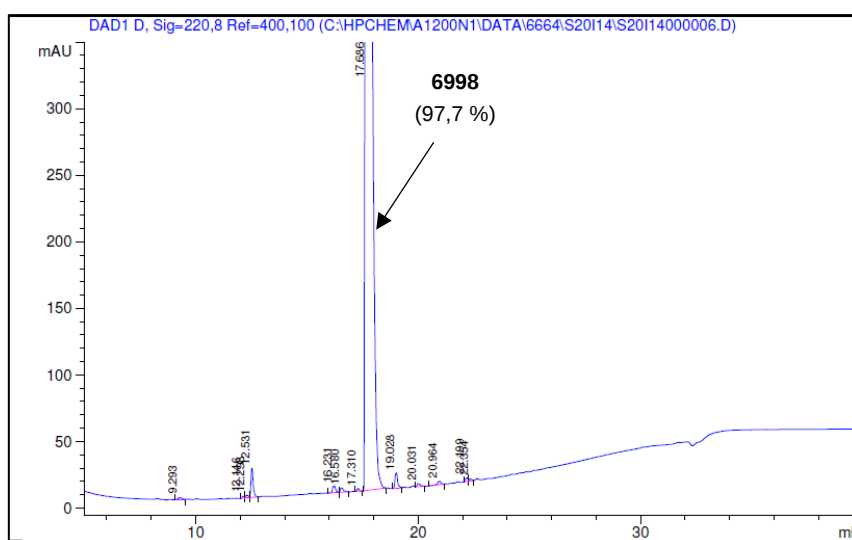


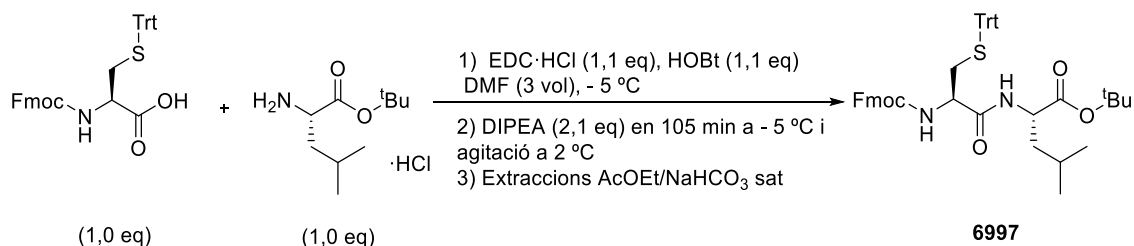
Figura 93. Cromatograma de **6998_UB-19144-02** (Mètode A, *apartat 8.3.3*).

En resum, la base 4-AMP es va utilitzar per l'eliminació del grup Fmoc i la reacció es va allargar fins observar una transformació del DBF a adducte de FM-AMP per obtenir el producte **6998** lliure de subproductes. El tractament del cru amb rentats de tampó de fosfats portava problemes ja que es formaven emulsions en la interfase (*apartat 5.2.3.2*). En canvi, amb la utilització de CO₂ es va poder precipitar l'adducte de FM-AMP amb en forma de carbamat i eliminar-lo posteriorment del cru mitjançant una filtració, procés molt comú a planta i que es pot dur a terme amb facilitat i un baix cost.

5.2.4. ESCALAT DE LA SÍNTESI DE **6998** SENSE AÏLLAR **6997**

Una vegada estudiats els processos d'obtenció de **6997** i **6998** per separat, es va estudiar l'aproximació de dur a terme les dues transformacions sense aïllar l'intermedi **6997** (procés *one-pot*).

Així doncs, un nou lot de **6997** (**6997_UB-23467**) es va preparar en un reactor de 250 mL amb agitació mecànica, a la escala de 37,7 mmols (22,1 g) de Fmoc-Cys(Trt)-OH i utilitzant les condicions de reacció dels estudis precedents (*apartat 5.1.1*) però amb una relació equimolar d'aminoàcids de partida (**Esquema 52**).



Esquema 52. Condicions de reacció utilitzades per la reacció d'obtenció del dipèptid **6997_UB-23467** (procés *one-pot*).

A diferència del que es va fer fins al moment, aquest lot no es va aïllar com a sòlid i es va utilitzar la dissolució per obtenir el dipèptid amb el grup α -amino desprotegit (**6998**) en el mateix reactor. La dissolució obtinguda abans de desprotegir amb piperidina (**6997_UB-23467-diss**) es va analitzar per HPLC per un mètode cromatogràfic diferent a l'utilitzat habitualment per l'anàlisi de **6997**, ja que en aquell moment la columna cromatogràfica corresponent no estava disponible (**Figura 94**). El producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 91,2 % (22,3 min), juntament amb un 2,8 % del subproducte DBF (14,7 min), un 1,4 % de **6998** (17,0 min) i un 2,7 % de Fmoc-Cys(Trt)-OH (18,8 min), una proporció més elevada de l'habitual per aquest aminoàcid, segurament degut a la longitud d'ona de detecció del mètode cromatogràfic (220 nm).

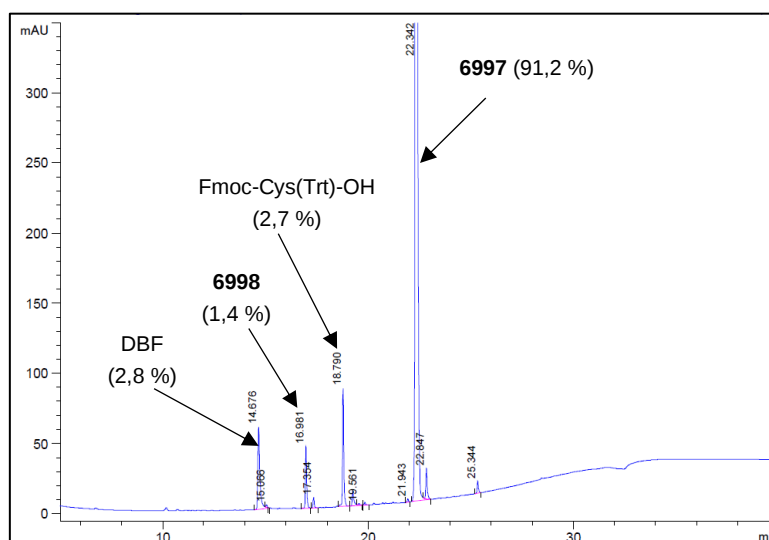
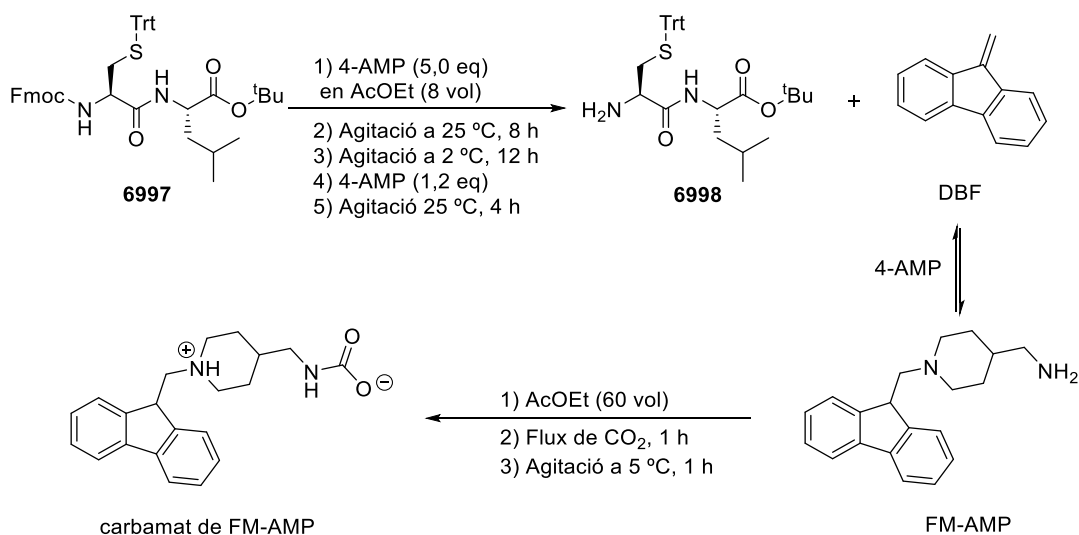


Figura 94. Cromatograma de **6997_UB-23467-diss**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Per a conèixer la quantitat de **6997** obtinguda en la dissolució, el producte es va quantificar per ¹H-RMN amb un patró d'àcid maleic, obtenint-se una riquesa del 16 %, el que representa una quantitat de 27,5 g de **6997** (rendiment aproximat de 97 %, valor en consonància amb els resultats obtinguts en les proves prèvies on s'aïllava el producte).

L'escalat de **6998** (**6998_UB-23469**) es va dur a terme seguint el procediment utilitzat en la síntesi **6998_UB-19144** (apartat 5.2.3.4) a partir de la dissolució de **6997_UB-23467** descrita anteriorment (reacció *one-pot*). Les condicions de reacció es descriuen en l'**Esquema 53**. Es van utilitzar 1,2 equivalents addicionals de base i el temps de reacció es va allargar, per tal d'afavorir la transformació de DBF en l'adducte corresponent.



Esquema 53. Condicions experimentals per l'obtenció a gran escala de **6998** (**6998_UB-23469**).

Transcorregudes 24 h, es va addicionar més AcOEt (60 vol) i es va introduir CO₂ a flux constant en la solució del cru de reacció durant 1 h. Després de deixar la suspensió 1 h addicional a baixa temperatura, es va filtrar i la solució obtinguda es va concentrar a 1 vol per precipitar després amb H₂O (12 vol). Es van recuperar 15,7 g de sòlid (**6998_UB-23469-02**, 84 % de rendiment) amb una puresa cromatogràfica de 99,9 % pel producte desitjat (**Figura 95**). L'anàlisi per ¹H-RMN va confirmar l'absència de subproductes al sòlid.

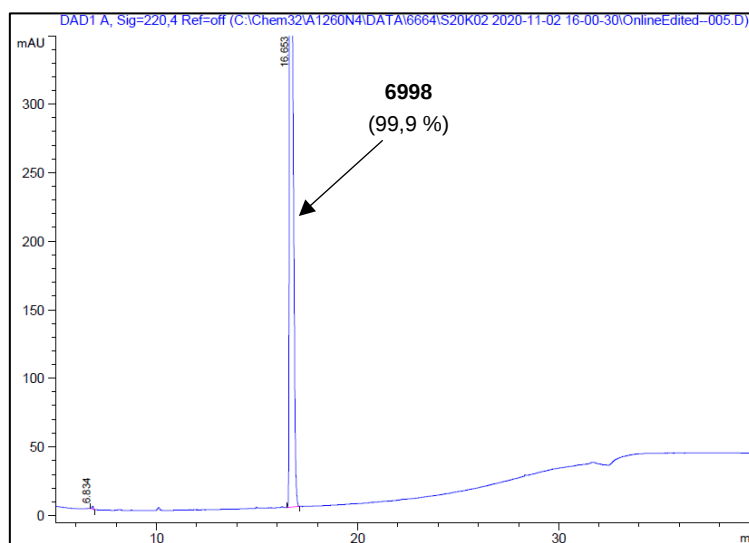


Figura 95. Cromatograma de **6998_UB-23469-02** (Mètode A, apartat 8.3.3).

Es pot concloure que la preparació de **6998** es pot fer seguint una estratègia *one-pot* que millora de manera considerable el procés descrit en els estudis precedents (*apartat 5.2.1*) i que permet un escalat del procés. Així, per una banda evita la precipitació de **6997** en H₂O, tediós i amb variabilitat de resultats i, per altra, evita l'aïllament final de **6998** per columna cromatogràfica, obtenint-se el producte desitjat amb un molt bon rendiment i puresa cromatogràfica excel·lent.

5.3. SÍNTESI DE 7003

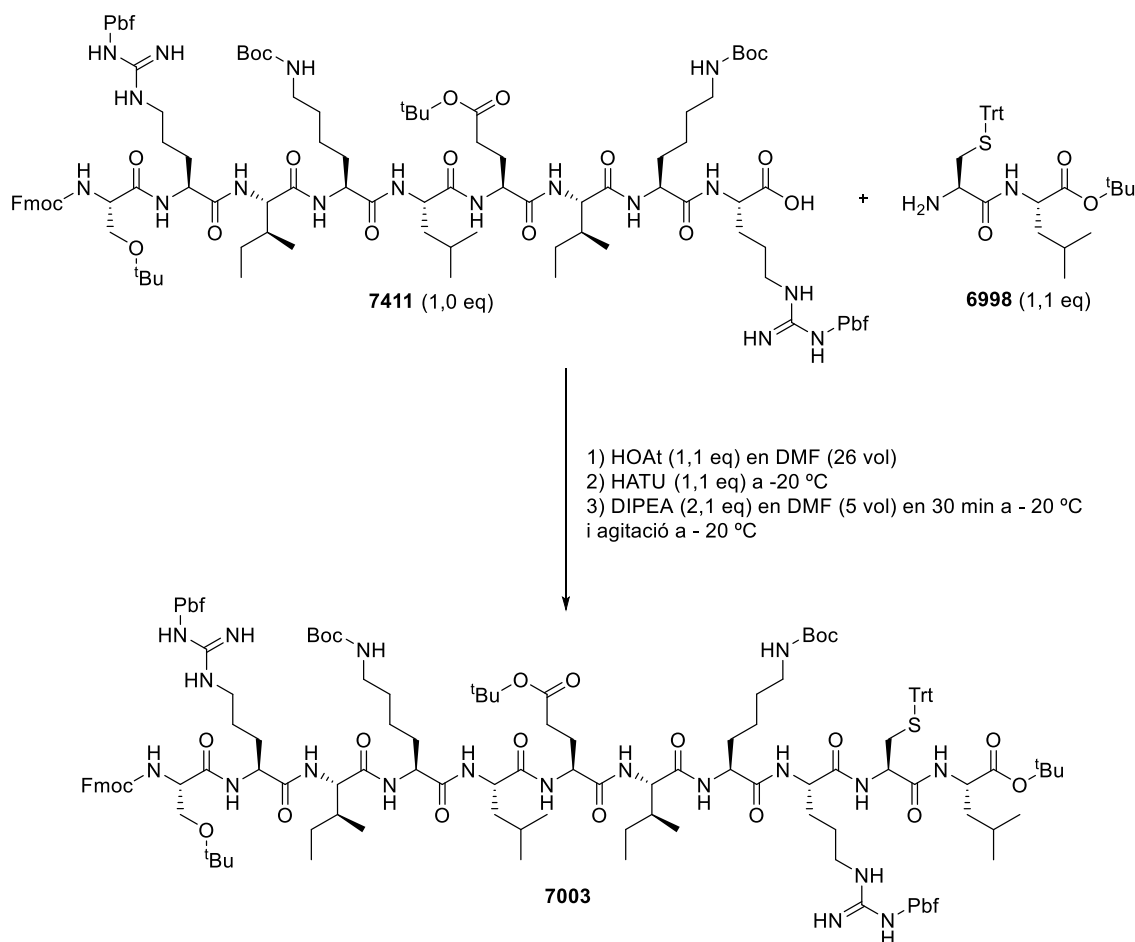
5.3.1. PRECEDENTS⁵⁹

El següent pas en la ruta sintètica per l'obtenció de FT (**Esquema 15**, *apartat 3.3.2*) va ser la síntesi de l'undecapèptid protegit **7003** per condensació en solució del nonapèptid **7411**, sintetitzat en en fase sòlida (*apartat 4.2.1*), amb el dipèptid amb l'extrem α -amino desprotegit **6998**, preparat en solució (*apartat 5.2*). En treballs precedents a aquesta Tesi Doctoral, es van voler traslladar les condicions experimentals utilitzades per a la síntesi del dipèptid **6997** a l'acoblament de fragments peptídics. Els resultats no van ser òptims en termes de velocitat de reacció i puresa cromatogràfica, pel que va ser necessari utilitzar agents d'acoblament més efectius com HATU (**Esquema 9**, *apartat 3.1.4.2*). És important remarcar que es va detectar epimerització per HPLC amb EDC·HCl i HATU durant l'acoblament en solució. En aquest sentit, cal recordar que, com s'ha mencionat en el primer capítol (*apartat 3.1.4.3*), el risc d'epimerització és més gran quan s'acoblen dos fragments peptídics que quan s'acoba un aminoàcid a la cadena peptídica. Amb el propòsit de minimitzar aquesta reacció secundària, l'HOBt es va substituir per l'HOAt, additiu més eficient (

Esquema 8, *apartat 3.1.4.1*), i l'addició de DIPEA es va fer a - 20 °C.

El protocol que es va desenvolupar en aquest estudi preliminar pel tractament del cru de reacció a escala de laboratori, va consistir en precipitar **7003** amb H₂O per eliminar l'excés de reactius i sals, i rentar del sòlid amb Et₂O per eliminar l'excés del fragment peptídic **6998**. Es va arribar a una escala de treball de 0,9 g de **7411**, amb un rendiment del 87 % i una puresa cromatogràfica del producte desitjat del 93 %.

L'**Esquema 54** mostra les millors condicions experimentals que es van trobar per a la síntesi de **7003**, condicions que van ser les inicials en la present Tesi Doctoral. El procediment general va consistir en addicionar una solució de DIPEA (2,1 eq) en DMF en 30 min, sobre una solució agitada magnèticament del dipèptid amb l'extrem α -amino desprotegit (**6998**, 1,1 eq), el nonapèptid protegit (**7411**, 1,0 eq), l'agent d'acoblament HATU (1,1 eq) i l'additiu HOAt (1,1 eq) en DMF a -20 °C.



Esquema 54. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi del fragment peptídic protegit **7003**.

5.3.2. SÍNTESI PRELIMINAR DE **7003**

La primera síntesi de l'undecapèptid protegit **7003** (**7003_UB-21599**) es va dur a terme amb les condicions descrites a l'apartat anterior, a escala d'1,0 g de **7411**, però utilitzant agitació mecànica a partir d'ara. Com a productes de partida es va utilitzar el sòlid **7411_UB-21578-01**, amb una puresa cromatogràfica del 97,3 %, i una combinació dels sòlids **6998_UB-19132-02** i **6998_UB-19135-02**, amb una puresa cromatogràfica mitjana del 97,8 %.

La reacció es va monitoritzar per HPLC, detectant-se a les 2 h de reacció únicament un 0,2 % de **7411**. La precipitació es va portar a terme addicionant H₂O (240 vol) en 30 min a 5 °C, i la filtració de la suspensió resultant va ser ràpida. El sòlid obtingut (**7003_UB-21599-01**, 91 % de rendiment) es va analitzar per HPLC (**Figura 96**), resultant una puresa cromatogràfica de **7003** del 89,0 % (30,8 min). Juntament amb **7003** es va detectar l'excés del dipèptid **6998** (18,4 min, 4,1 %), però l'anàlisi no va mostrar cap evidència de **7411**, confirmant la conversió quantitativa.

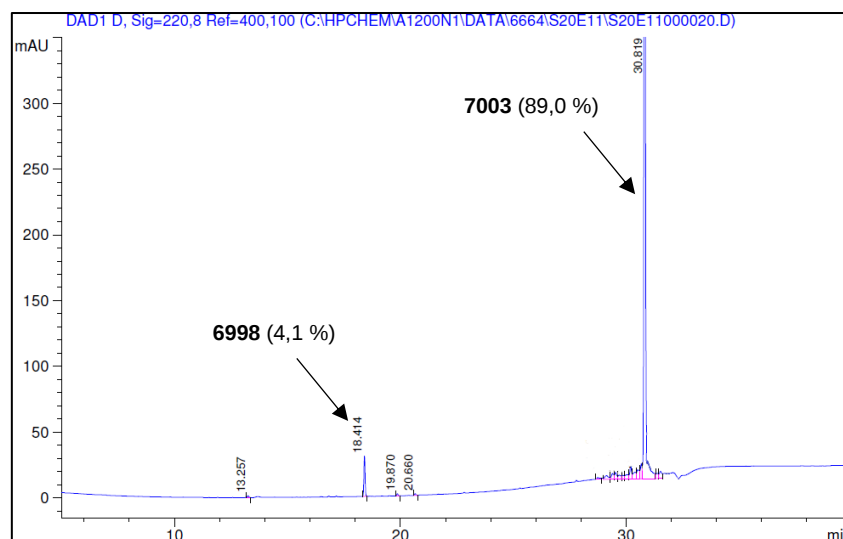


Figura 96. Cromatograma de 7003_UB-21599-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Per eliminar l'excés de **6998** es va haver de desenvolupar un procés de purificació (veure apartat 5.3.4), alternatiu a l'utilitzat en els precedents, ja que el Et₂O, d'ús habitual a escala de laboratori, és un dissolvent que no utilitza l'empresa per qüestions de seguretat.

5.3.3. ALTRES PROVES D'OBTENCIÓ DE 7003

Donat els bons resultats que es van obtenir en la síntesi preliminar de **7003** (apartat 5.3.2), es van preparar nous lots de **7003** (**7003_UB-23428**, **7003_UB-23456**, **7003_UB-23457** i **7003_UB-26908**) utilitzant condicions experimentals similars, però reduint la quantitat d'aigua emprada per precipitar el cru (240 vol emprats en la síntesi preliminar) per disposar de major volum en el reactor i, d'aquesta manera, poder augmentar l'escala (**Taula 31**). Les proves es van monitoritzar per HPLC fins a no detectar nonapèptid protegit a les 3 h de reacció. En la prova **UB-23428**, amb 50 vol d'H₂O es va aconseguir la precipitació completa de **7003** ja que no es va detectar producte en les AM, resultat confirmat en les dues proves següents. La prova **UB-26908** va donar resultats satisfactoris amb 40 vol d'antidissolvent.

Taula 31. Proves per a la obtenció de 7003.

Lot	7411		Volums H ₂ O (mL/g)	% Rendiment
	lot	g		
UB-23428	UB-21578-01	2,0	50	97
UB-23456	UB-21550-01	1,6	50	86
UB-23457	UB-23401-01	2,0	50	91
UB-26908	UB-23492-01	5,0	40	94

Els sòlids obtinguts (**7003_UB-23428-01**, **7003_UB-23456-01**, **7003_UB-23457-01** i **7003_UB-26908-01**) es van analitzar per HPLC i les pureses cromatogràfiques obtingudes per **7003** es van comparar amb les pureses cromatogràfiques dels productes de partida (**Taula 32**). Els lots **UB-23428**, **UB-23456** i **UB-23457** es van sintetitzar amb el mateix lot de **6998**, però els lots de **7411** eren diferents, pel que es va poder comprovar que com més impur era el lot de **7411** que

s'utilitzava, més impur era el **7003** obtingut. El mateix efecte es va observar amb la puresa cromatogràfica del producte de partida **6998**, tal com es pot comprovar si es comparen els resultats de les proves **UB-23428** i **UB-26908**, malgrat que les diferències entre les pureses dels lots de **6998** són poc significatives. Aquests resultats semblaven indicar que, com era previsible, la puresa dels productes de partida afectaven la puresa final de **7003** del sòlid obtingut.

Taula 32. Comparació de les pureses cromatogràfiques obtingudes per **7003** a partir de diferents lots de productes de partida.

Lot	7411		6998		% per HPLC (sòlid)	
	lot	% per HPLC	lot	% per HPLC	7003	6998
UB-21599	UB-21578-01	97,3	UB-19132-35	97,8	89,0	4,1
UB-23428	UB-21578-01	97,3	UB-19144-02	97,7	91,8	2,0
UB-23456	UB-21550-01	87,6	UB-19144-02	97,7	88,2	2,5
UB-23457	UB-23401-01	80,0	UB-19144-02	97,7	79,7	2,0
UB-26908	UB-23492-01	96,7	UB-23469-02	99,9	96,4	1,4

5.3.4. ASSAJOS DE PURIFICACIÓ DE 7003

Amb l'objectiu de trobar un dissolvent en el que l'undecapèptid protegit **7003** fos insoluble i el dipèptid protegit **6998** soluble per poder separar-los mitjançant una filtració, es van dur a terme les proves de purificació que es mostren en la **Taula 33**. El sòlid obtingut en la síntesi preliminar (**7003_UB-21599-01**, apartat 5.3.2) es va dividir en 12 mostres de 50 mg, es van suspendre en dissolvents diferents (10 vol) i les mescleres resultants es van sotmetre a agitació magnètica durant 10 min. Les proves on es van observar suspensions es van filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va analitzar per HPLC per poder avaluar l'eficàcia de la filtració i la puresa cromatogràfica de **7003** i **6998** en el sòlid obtingut.

Taula 33. Assajos de purificació de **7003_UB-21599-01**.

Prova	Dissolvent (10 vol)	Aspecte	Filtració	% per HPLC (sòlid)	
				7003	6998
7003_UB-21599-01				89,0	4,1
P1	DCM	Dissolució	-	-	-
P2	Acetona	Suspensió	Ràpida	95,3	n.d
P3	MeOH	Suspensió	Ràpida	95,3	0,16
P4	EtOH	Suspensió	Lenta	95,3	0,13
P5	TBME	Suspensió	Lenta	95,3	0,44
P6	Toluè	Dissolució	-	-	-
P7	Heptà	Suspensió	Ràpida	93,5	2,12
P8	2-MeTHF	Dissolució	-	-	-

Prova	Dissolvent (10 vol)	Aspecte	Filtració	% per HPLC (sòlid)	
				7003	6998
P9	IPA	Suspensió	Ràpida	94,8	0,31
P10	CPME	Dissolució	-	-	-
P11	AcOEt	Dissolució	-	-	-
P12	MeCN	Suspensió	Ràpida	95,4	n.d

Els millors resultats van ser per la prova 2 (acetona) i la prova 12 (MeCN) ja que, a part de ser les filtracions ràpides, **6998** no es va detectar per HPLC en el sòlid resultant i no es van formar impureses desconegudes en el procés de purificació, pel que la puresa cromatogràfica de **7003** respecte el sòlid **7003_UB-21599-01** va augmentar.

Per poder avaluar el rendiment, es van realitzar noves proves de purificació amb els sòlids de **7003** obtinguts al precipitar amb H₂O (*apartat 5.3.3*).

Així, una part del sòlid **7003_UB-23428-01** (99 mg) es va tractar amb acetona (10 vol), la suspensió es va deixar en agitació 1 h a temperatura ambient (ta) i es va filtrar. El sòlid obtingut (**7003_UB-23428-02**, 72 % de rendiment) es va analitzar per HPLC (**Figura 97, A**), resultant una puresa cromatogràfica del producte **7003** del 95,0 %, sense detectar-se **6998**. El mateix procediment utilitzant MeCN (10 vol) va donar un sòlid (**7003_UB-23428-03**, 82 % de rendiment) amb una puresa cromatogràfica per **7003** del 94,7 % (**Figura 97, B**). Com es pot comprovar al cromatograma corresponent, **6998** tampoc es va detectar en aquest cas.

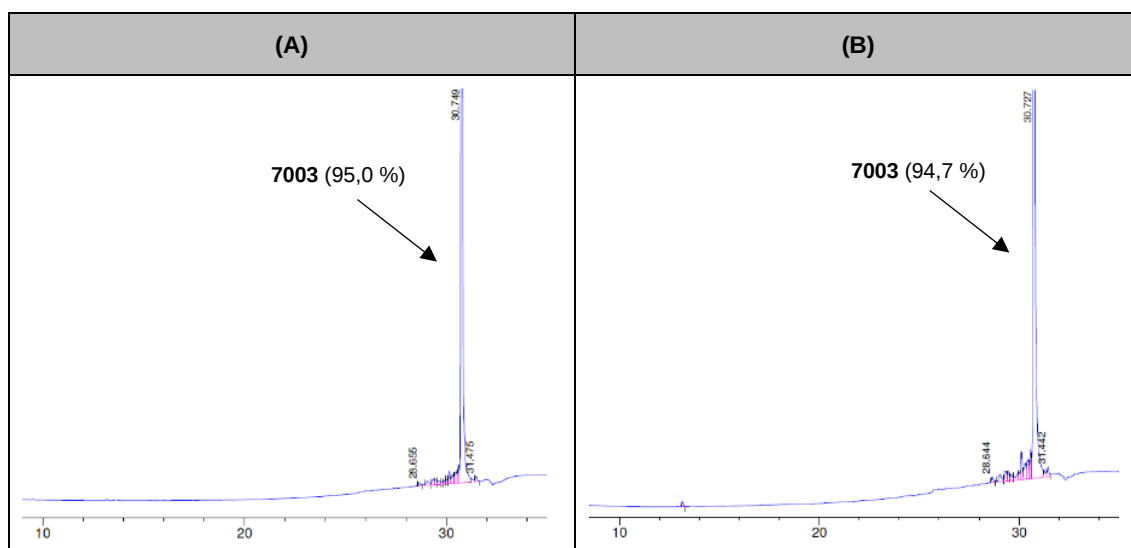


Figura 97. Cromatogrames d'HPLC de **(A) 7003_UB-23428-02** precipitat amb acetona i **(B) 7003_UB-23428-03** precipitat amb MeCN (**Mètode A**, *apartat 8.3.3*).

Les dues proves van mostrar als cromatogrames corresponents perfils d'impureses similars. Tanmateix, el millor rendiment i la filtració més ràpida de la suspensió es van donar amb la prova on es va utilitzar MeCN com a dissolvent. Per aquesta raó, aquest dissolvent va ser triat per

purificar el que quedava de **7003_UB-23428-01** i la resta de lots de **7003** que es van obtenir (Taula 34).

Taula 34. Purificació de l'undecapèptid protegit **7003** per suspensió del sòlid amb MeCN.

Lot	g de 7003	Filtració	% per HPLC (sòlid)		% Rendiment
			7003	6998	
UB-23428	2,0	Ràpida	95,1	n.d	89
UB-23456	1,6	Ràpida	91,8	0,1	89
UB-23457	2,2	Ràpida	83,4	0,06	92
UB-26908	5,7	Ràpida	98,1	n.d	89

La **Figura 98** mostra els cromatogrames dels quatre sòlids després de precipitar amb MeCN (**7003_UB-23428-04**, **7003_UB-23456-02**, **7003_UB-23457-02** i **7003_UB-26908-02**). La purificació per tractament del sòlid amb aquest dissolvent va permetre reduir el producte de partida **6998** per sota del 0,1 % o eliminar-lo, assolint rendiments molt satisfactoris en totes les proves. Malgrat això, aquest tractament no va eliminar altres impureses detectades en els sòlids més impurs de **7003** abans de rentar-lo amb MeCN (**Taula 32**).

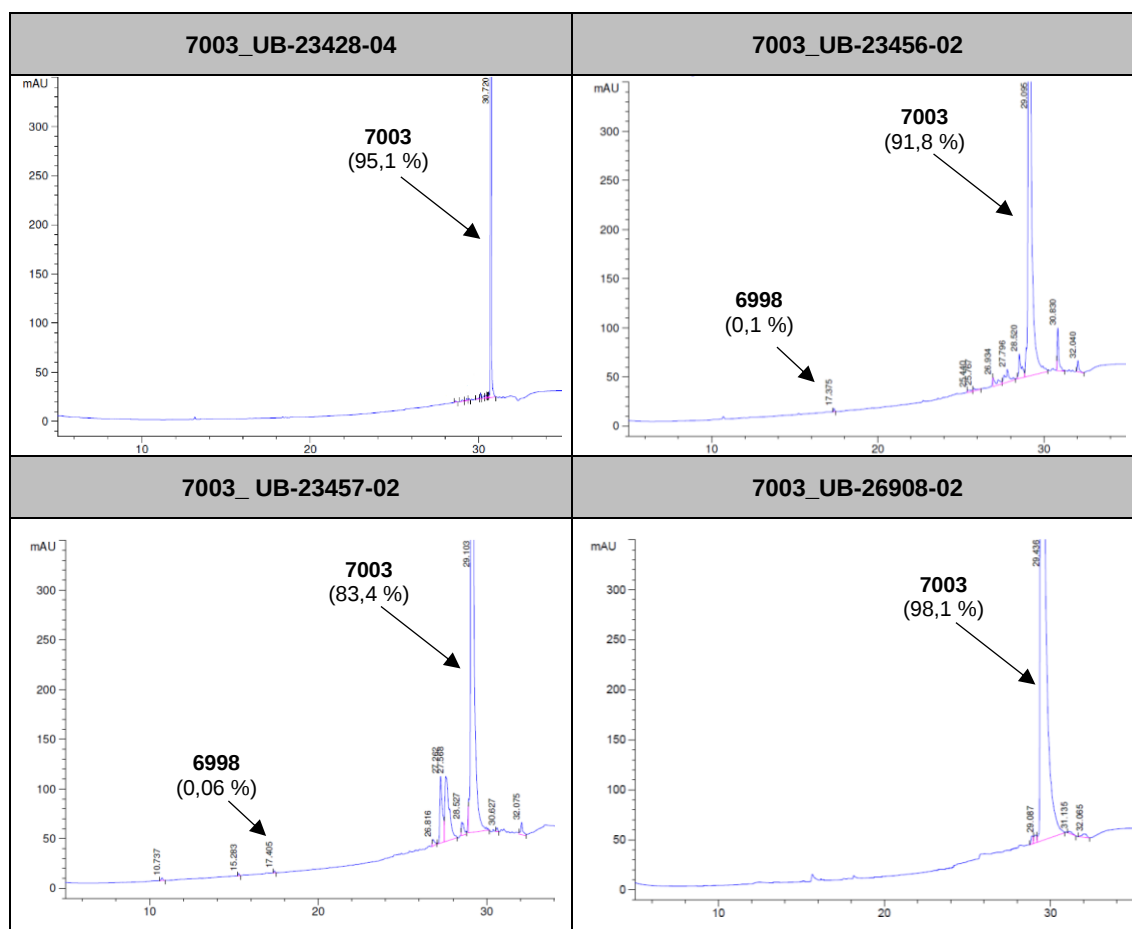


Figura 98. Comparació dels perfils cromatogràfics dels sòlids de **7003** obtinguts després del tractament amb MeCN (**Mètode A**, apartat 8.3.3).

5.3.5. ESCALAT

L'escalat de **7003** (**7003_UB-26927**) es va dur a terme en un reactor de 2 L amb clau de descàrrega i agitació mecànica, a una escala de 23,4 g de producte de partida **7411** i utilitzant les condicions de reacció dels precedents (**Esquema 54**, apartat 5.3.1). L'anàlisi d'HPLC del cru de reacció a les 4 h va revelar la desaparició del producte de partida **7411**. La precipitació del nonapèptid protegit **7003** es va dur a terme amb l'addició d'H₂O (40 vol) a la solució del cru en 30 min a 5 °C. La filtració va ser ràpida, obtenint-se un sòlid (29,3 g de **7003_UB-26927-01**, rendiment del 101 %) amb una puresa cromatogràfica pel **7003** de 83,4 % i un 6,7 % de material de partida **6998** (**Figura 99, A**).

La purificació de **7003_UB-26927-01** es va dur a terme suspent el sòlid en MeCN (10 vol) i deixant la mescla amb agitació mecànica durant 1,5 h. La suspensió resultant es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va analitzar per HPLC (24,3 g de **7003_UB-26927-02**, rendiment del 83 %). La puresa cromatogràfica per **7003** va augmentar notablement fins al 97,6 %, amb la presència d'un 0,2 % de **6998** (**Figura 99, B**).

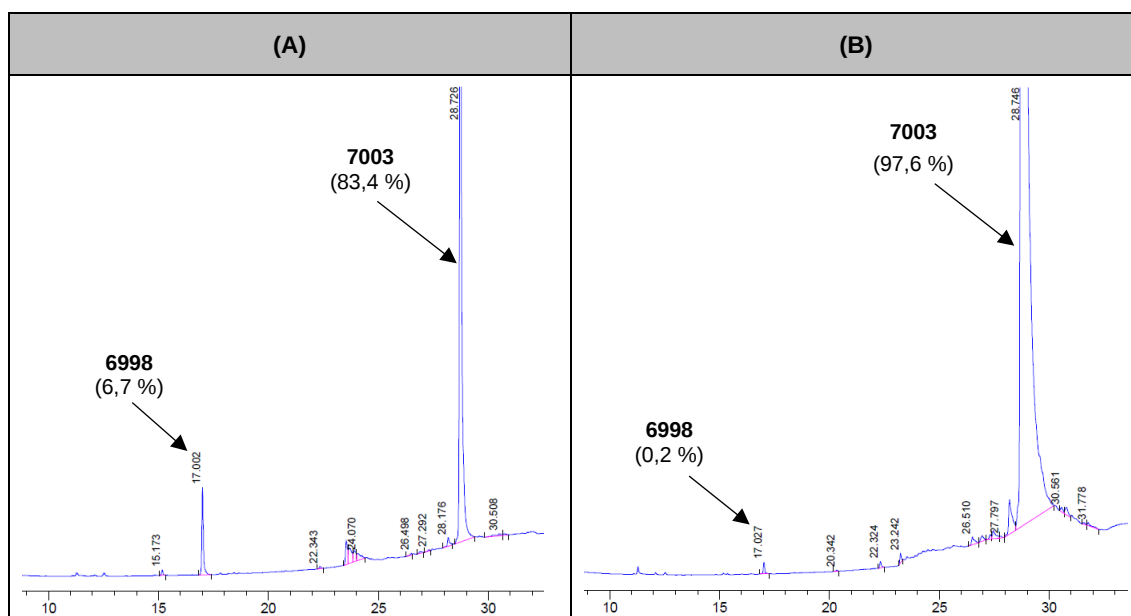


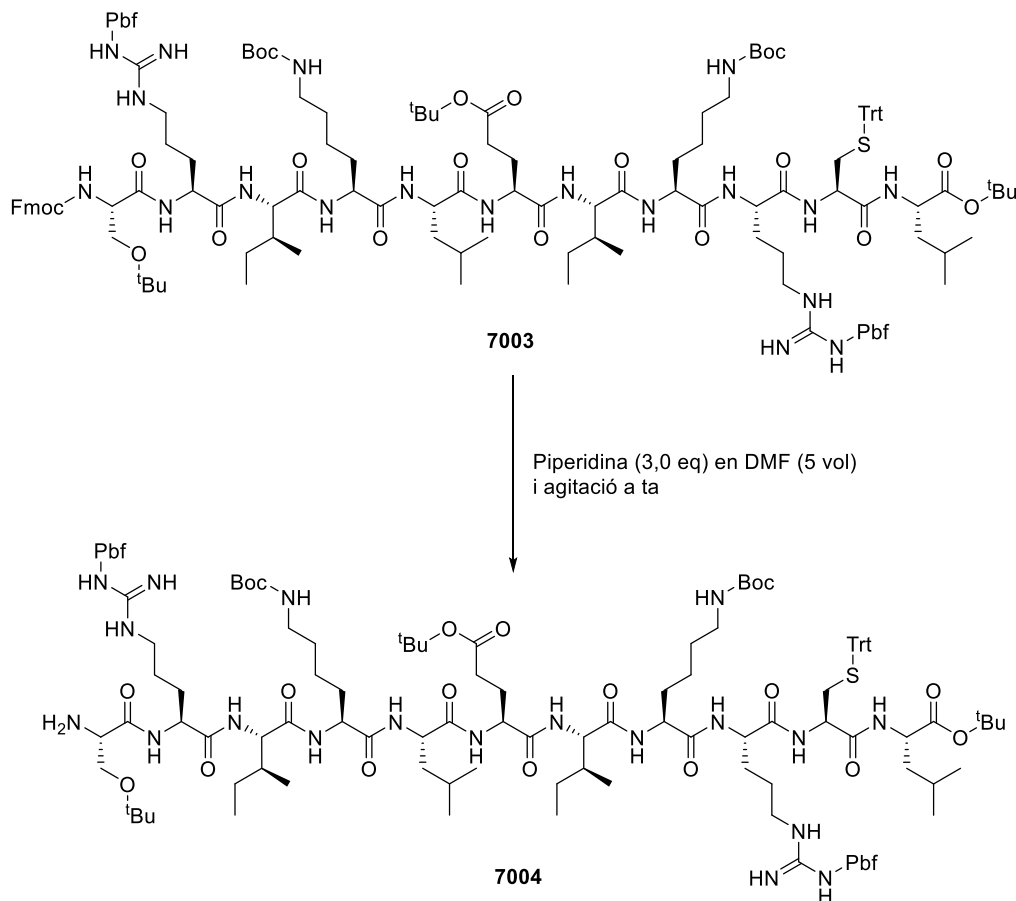
Figura 99. Anàlisi d'HPLC de (A) **7003_UB-26927-01** i (B) del sòlid obtingut **7003_UB-26927-02** després del tractament amb MeCN (**Mètode A**, apartat 8.3.3).

Per tant, la reducció de la quantitat de H₂O necessària per a la precipitació va permetre utilitzar un reactor adequat per l'escalat de la síntesi de l'undecapèptid protegit **7003**. Per altra banda, el rentat del sòlid amb MeCN va permetre eliminar l'excés de **6998** de partida amb un molt bon rendiment i excel·lent puresa cromatogràfica.

5.4. SÍNTESI DE 7004

5.4.1. PRECEDENTS⁵⁹

L'eliminació del grup protector de l'extrem α -amino de l'undecapèptid protegit **7003** per donar **7004** va ser el següent pas en la ruta sintètica per l'obtenció de **FT** (**Esquema 15**, apartat 3.3.2). En estudis previs a la realització d'aquesta Tesi, es va utilitzar una dissolució de 2 % de piperidina en DMF per portar a terme la desprotecció (**Esquema 55**).



Esquema 55. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi de **7004**.

Es va intentar precipitar **7004** amb H_2O , però la filtració de la suspensió resultant va ser molt lenta a l'obstruir-se el filtre degut al tipus de sòlid que es va obtenir. Es va optar per la centrifugació amb una centrífuga de laboratori com a alternativa, obtenint-se d'aquesta manera el sòlid desitjat. Els subproductes de la reacció, DBF i FM-pip, es van eliminar tractant el sòlid 6 vegades amb Et_2O . L'escala de treball a la que es va arribar utilitzant aquestes condicions va ser de 0,4 g de **7003**, i la puresa cromatogràfica del producte **7004** va ser del 94 % pel millor experiment amb un rendiment del 89 %.

5.4.2. SÍNTESI PRELIMINAR DE 7004

A la vista dels resultats obtinguts en l'obtenció de **7004** precedents a aquesta Tesi Doctoral, i tenint en compte que la centrifugació no es pot implementar a planta, l'objectiu va ser desenvolupar un procés de precipitació de **7004** utilitzant un antidissolvent adequat. Cal mencionar que la filtració d'una suspensió es pot realitzar a escala industrial amb un filtre Nutsche

que disposa de pales per disgregar la capa de sòlid que es forma durant la filtració i, d'aquesta manera, evitar l'obtenció del filtre per aconseguir un flux continu de filtració.

En la síntesi preliminar de **7004** (**7004_UB-23431**) es van reproduir les condicions descrites en els precedents (**Esquema 55**, apartat 5.4.1) a escala de 0,8 g de **7003_UB-23428-04**. Als 30 min de reacció ja no es va observar **7003** per HPLC i es va addicionar H₂O (100 vol) al cru durant 30 min a 5 °C per tal de precipitar el **7004**. La suspensió densa que es va obtenir no es va dipositar com a sòlid a l'aturar l'agitació i la filtració no va ser possible per l'obtenció del filtre. La H₂O de la suspensió del cru es va eliminar a pressió reduïda i es va addicionar una altra vegada H₂O (13 vol) a l'oli resultant, podent-se filtrar amb èxit la suspensió que es va formar. La puresa cromatogràfica del **7004** al sòlid obtingut (**7004_UB-23431-01**, rendiment del 60 %) va ser de 76,2 % (27,2 min, **Figura 100**). Els subproductes DBF i l'adducte FM-pip estaven presents en un 18,2 % i un 0,5 %, respectivament. Per a eliminar aquests subproductes es van assajar diferents dissolvents per tractar el sòlid.

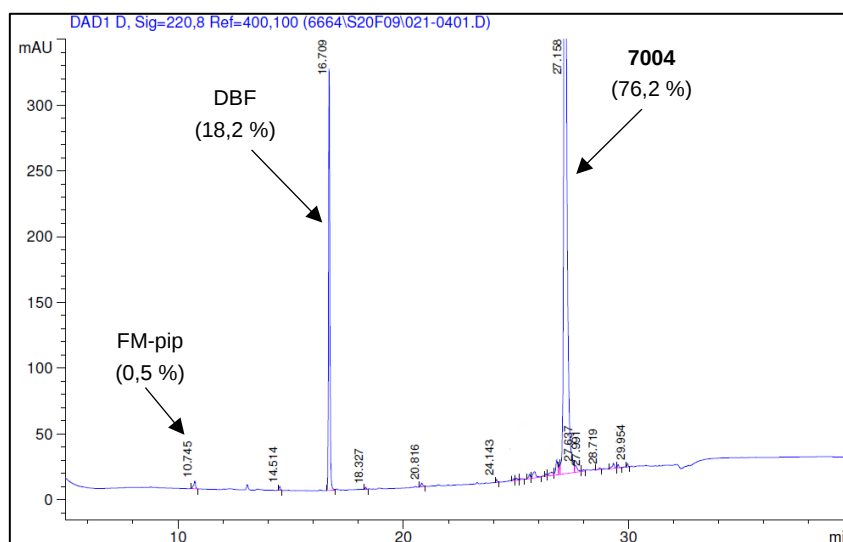


Figura 100. Cromatograma de **7004_UB-23431-01** obtingut per precipitació amb H₂O. (**Mètode A**, apartat 8.3.3).

5.4.2.1. PROVES DE PURIFICACIÓ DE 7004

L'objectiu va ser, com en altres estudis similars, aprofitar la gran insolubilitat de **7004** per eliminar els subproductes DBF i FM-pip per filtració. Amb aquest propòsit, es van dur a terme assajos amb els 8 dissolvents que es recullen a la **Taula 35** utilitzant el sòlid **7004_UB-23431-01**. Aquest sòlid (50 mg) es va tractar amb el dissolvent (10 vol), la mescla es va deixar 10 min amb agitació magnètica i es va filtrar si es va observar una suspensió. L'eficàcia de la filtració i els percentatges de **7004** i DBF en el sòlid es van avaluar. L'adducte de FM-pip es va observar en un percentatge menor a 0,1 % en totes les proves.

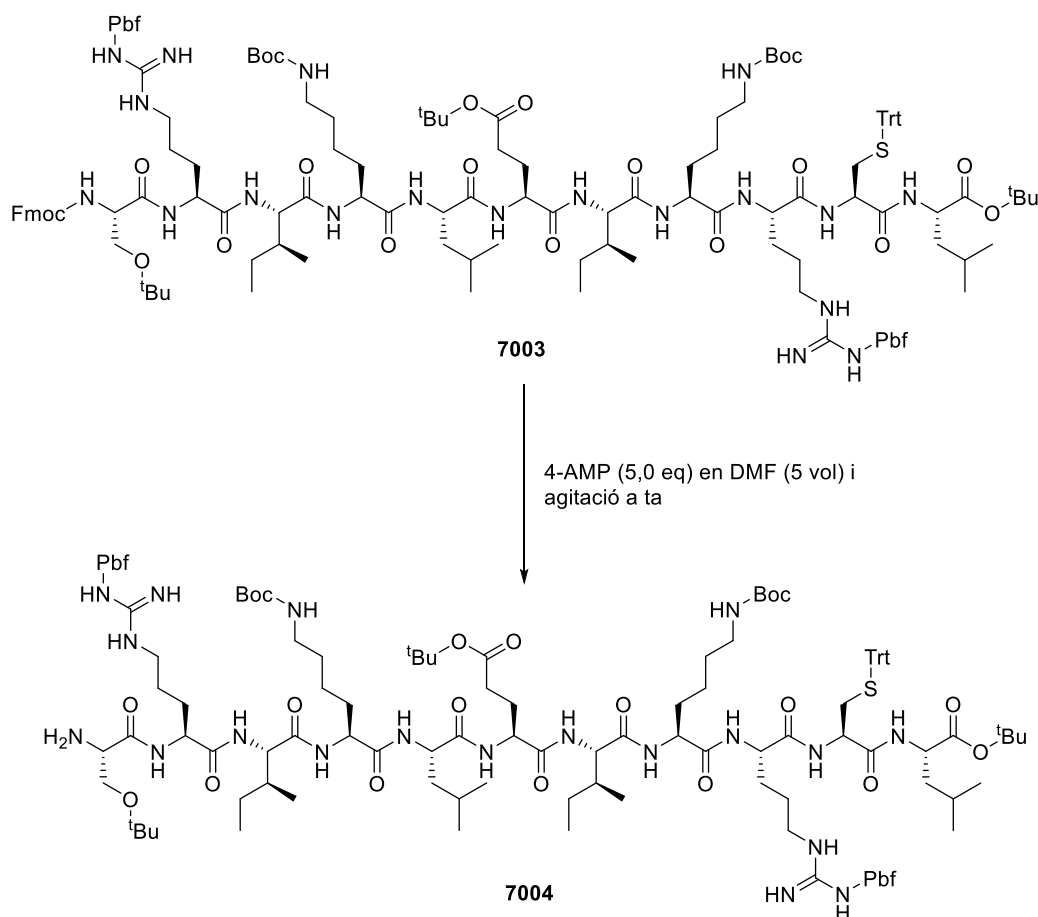
Taula 35. Proves de purificació de **7004_UB-23431-01**

Prova	Dissolvent (10 vol)	Aspecte	Filtració	% per HPLC (sòlid)	
				7004	DBF
7004_UB-23431-01				76,2	18,2
P1	Acetona	Sòlid gomós	Molt lenta	83,6	1,6
P2	MeOH	Suspensió densa	Lenta	93,2	0,3
P3	TBME	Sòlid que diposita	Ràpida	92,9	1,1
P4	Toluè	Dissolució	-	-	-
P5	Heptà	Sòlid que diposita	Ràpida	92,5	1,1
P6	2-MeTHF	Dissolució	-	-	-
P7	IPA	Suspensió densa	Lenta	93,5	1,0
P8	MeCN	Suspensió densa	Lenta	95,6	n.d

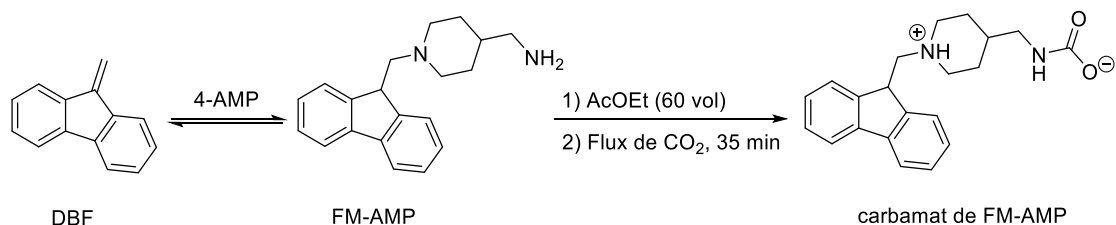
El millor resultat pel que fa a puresa cromatogràfica de **7004** es va obtenir amb MeCN (prova 8), aconseguint-se eliminar completament el DBF. La filtració va ser lenta però amb un flux continu d'AM, el que feia aquest procés potencialment útil a gran escala. El rendiment de la purificació no es va determinar per aquestes proves ja que l'objectiu inicial era millorar la puresa del producte, però sí es va avaluar en les proves de purificació que es van dur a terme posteriorment.

5.4.3. PROVA AMB 4-AMP

Per tal d'avaluar si es podien traslladar a l'obtenció de **7004** les condicions més favorables que es van trobar per eliminar el grup protector Fmoc del dipèptid protegit **6997** (apartat 5.2.3.4), es va dur a terme una prova d'obtenció de **7004 (7004_UB-23453)** utilitzant les condicions que es mostren a l'**Esquema 56**. El producte de partida va ser **7003_UB-23428-04** (0,4 g) i la desprotecció es va dur a terme amb 5 eq de 4-AMP en DMF. El seguiment del procés per HPLC va revelar un consum total de **7003** als 40 min de reacció.

Esquema 56. Condicions de reacció per a la síntesi de **7004_UB-23453**.

Es va deixar la mescla en agitació 4 h per afavorir la transformació de DBF en l'adducte de FM-AMP, es va afegir AcOEt (60 vol) i es va introduir CO₂ amb un flux continu durant 35 min. A l'**Esquema 57** es mostra el procés de formació del carbamat utilitzant un dels dos possibles adductes que es poden formar durant l'eliminació del grup Fmoc amb 4-AMP. Tal com va succeir en la desprotecció del dipèptid protegit **6998** (*apartat 5.2.3.4*), la temperatura interna de la suspensió va augmentar amb la formació del carbamat de 19,5 °C a un valor de 22,5 °C als 10 min.

Esquema 57. Condicions utilitzades per formar el carbamat de FM-AMP durant la purificació de **7004** (lot **7004_UB-23453**).

La suspensió es va agitar durant 1 h a 5 °C i el sòlid es va aïllar mitjançant una filtració lenta. L'anàlisi per HPLC-MS del sòlid obtingut (**7004_UB-23453-01**), va mostrar un 73,2 % de **7004** i un 25,1 % de l'adducte de FM-AMP (**Figura 101, A**), és a dir, l'adducte no es va poder separar del producte desitjat. Per altra banda, **7004** continuava impurificat a la solució (**7004_UB-23453-**

diss) amb DBF (4,8 %) i l'adducte (7,4 %), tal com va mostrar l'anàlisi per HPLC (**Figura 101, B**). Cal recordar que aquest objectiu es va assolir per **6998**, un pèptid molt menys hidrofòbic que **7004**.

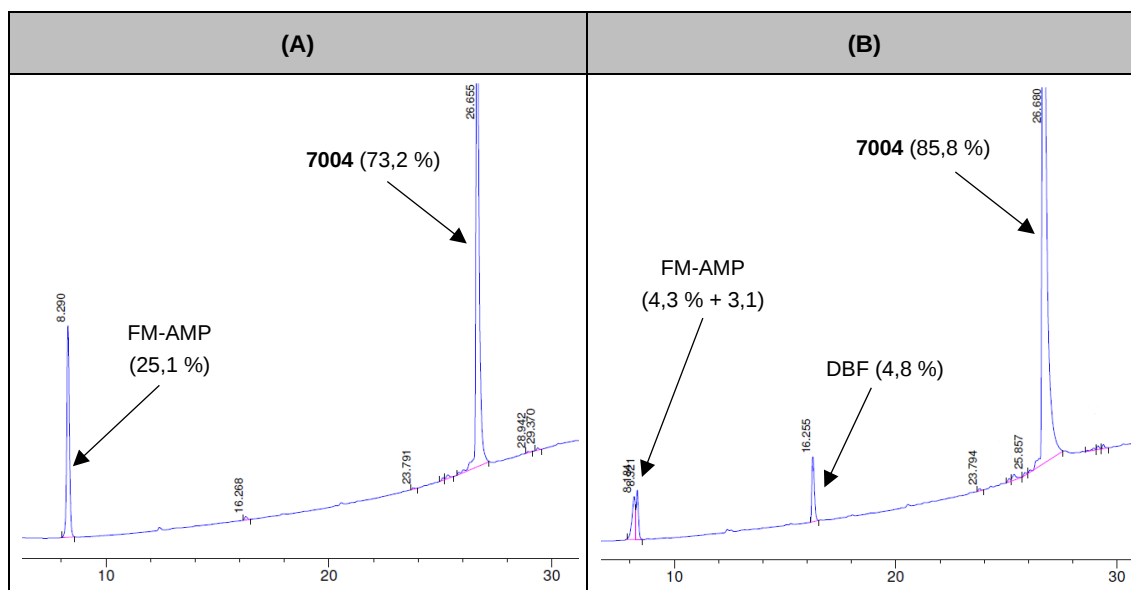


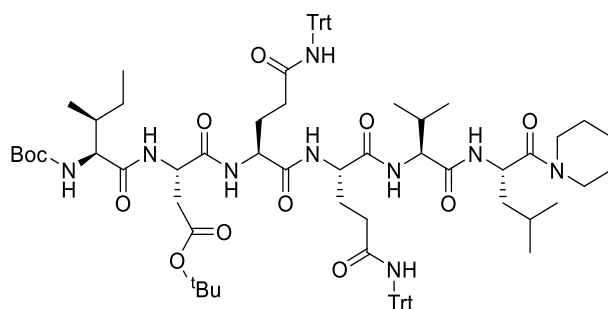
Figura 101. Cromatogrames de (A) **7004_UB-23453-01** i (B) **7004_UB-23453-diss** (Mètode A, apartat 8.3.3).

Donat que el tractament amb CO₂ no va resultar ser prou eficient a la hora de purificar **7004**, aquest procés es va descartar. En canvi, es podria seguir considerant l'ús de 4-AMP per portar a terme la desprotecció, fent un tractament posterior del cru de reacció amb MeCN per eliminar els subproductes, com s'havia comprovat amb les proves de purificació del cru de reacció procedent del tractament de **7003** amb piperidina (*apartat 5.4.2.1*). Tanmateix, en aquell moment no es disposava d'un proveïdor industrial de 4-AMP i la seva recerca suposava cert temps, per això es va decidir tornar a considerar la piperidina per continuar l'estudi de l'obtenció de **7004**.

5.4.4. PROVES AMB PIPERIDINA

La combinació de l'ús de piperidina per l'eliminació del grup Fmoc amb el tractament posterior amb MeCN per eliminar el subproducte DBF semblava un protocol potencialment útil. No obstant, en estudis precedents a aquesta Tesi es va detectar un subproducte al cru de la reacció d'acoblament de l'undecapèptid protegit **7004** amb l'hexapèptid protegit **7005** per a obtenir el precursor protegit de **FT** (**7006**). Malgrat que la seva formació es va atribuir a la piperidina, es va decidir continuar utilitzant aquesta base per desprotegir l'extrem α -amino del pèptid, i estudiar més endavant aquesta reacció secundària per tal de minimitzar-la.

En estudis precedents a aquesta Tesi Doctoral,⁵⁹ es va detectar la formació d'un subproducte en la reacció d'acoblament entre els fragments peptídics protegits **7004** i **7005** per obtenir el **FT** protegit (**7006**). El resultat de l'anàlisi per HPLC-MS era compatible amb la proposta d'estructura que es mostra en la **Figura 102** (piperidida de **7005**). Aquest subproducte es podia haver format molt probablement durant l'activació de l'àcid carboxílic de l'extrem de la cadena de **7005**, per reacció amb piperidina romanent al sòlid de **7004** procedent de la desprotecció α -amino de **7003**.

Figura 102. Estructura de la piperidina de **7005**.

Aquesta impuresa es va detectar en diferents lots de síntesi de **7006**, assolint percentatges cromatogràfics que van arribar al 17 %. La identitat del subproducte es va confirmar per síntesi, fent reaccionar **7005** amb piperidina en les condicions experimentals que es van utilitzar per condensar els fragments protegits **7004** i **7005** (HATU i HOAt en DMF a -20 °C). La formació de la piperidina de **7005** no es va poder evitar en aquell moment, i es va voler en aquesta Tesi desenvolupar un procediment per preparar **7006** que solucionés el problema.

5.4.4.1. ASSAJOS DE SÍNTESI DE **7004**

Els assajos de síntesi de **7004** que es van dur a terme amb piperidina per a la desprotecció del grup α -amino es mostren a la **Taula 36**. Com es pot veure a la taula, en aquest estudi es van aprofitar lots del producte de partida amb diferents pureses cromatogràfiques. Per intentar evitar la reacció secundària descrita a l'apartat anterior, el nombre d'equivalents de piperidina es va reduir de 3,2 a 1,2 eq, aconseguint-se una desprotecció completa en 1 h malgrat la reducció d'equivalents.

Taula 36. Proves per l'obtenció de **7004** amb piperidina

Lot	7003			Condicions de reacció i resultats				
	g	Lot	% per HPLC	Eq de base	Temps (h)	% per HPLC (cru)		
						7004	FM-pip	DBF
UB-23461	1,0	UB-23456-02	91,8	3,3	3	68,0	14,0	11,7
UB-23465	1,5	UB-23457-02	83,4	3,2	2	65,4	7,9	11,1
UB-26910	1,0	UB-26908-02	98,1	1,2	2	78,7	7,2	11,8
UB-26918	3,0	UB-26908-02	98,1	1,2	1	71,9	2,1	20,9

A continuació es descriuen les condicions emprades per purificar aquests crus de reacció.

5.4.4.2. PROVES DEL TRACTAMENT DEL CRU

A continuació es detallen les proves de precipitació que es van realitzar amb els diferents lots de **7004** obtinguts per tal de trobar les millors condicions per a obtenir un rendiment òptim de precipitació, una bona filtració i l'eliminació dels subproductes. Per assolir aquest objectiu, cadascun dels crus de reacció de **7004** (**UB-23461**, **UB-23465** i **UB-26910**) es van dividir per dur a terme diferents assajos de precipitació i un cop es va definir un procés de precipitació i purificació, es va aplicar al lot **7004_UB-26918**.

5.4.4.2.1. 7004_UB-23461

La **Taula 37** recull les proves de precipitació que es van fer amb el cru en DMF del lot **7004_UB-23461**. Per prevenir la formació de la piperidina de **7005** es va rentar el cru de **7004** amb solució aquosa de NaH_2PO_4 a pH 3 per eliminar la piperidina. Per eliminar els subproductes de reacció DBF i FM-pip es va rentar amb MeCN ja que s'havia comprovat en assajos anteriors que eren solubles en aquest dissolvent i en canvi el **7004** no, el que permetia aïllar el pèptid per filtració (apartat 5.4.2.1).

Taula 37. Proves de precipitació amb el cru del lot **7004_UB-23461**.

Prova	Dissolvent	Anti-dissolvent A	Anti-dissolvent B	Filtració	% Rendiment precipitació	% per HPLC (sòlid)		
						7004	FM-pip	DBF
cru	-					68,0	14,0	11,7
P1 ^a	AcOEt (20 vol)	NaH ₂ PO ₄ (20 vol)	MeCN (100 vol)	Ràpida	51	91,3	n.d	n.d
P2 ^b	2-MeTHF (7 vol)	NaH ₂ PO ₄ (20 vol)	MeCN (80 vol)	Molt lenta	7	95,5	n.d	n.d
P3 ^a	AcOEt (3 vol)	NaH ₂ PO ₄ (20 vol)	MeCN (33 vol)	Ràpida	41	85,7	n.d	n.d
P4	DMF (7 vol)	NaH ₂ PO ₄ (7 vol)	MeCN (13 vol)	Ràpida	91	85,5	4,4	1,3
P5	DMF (7 vol)	MeCN (13 vol)	NaH ₂ PO ₄ (13 vol)	Lenta	84	91,7	0,4	0,6

(a) Un rentat amb solució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3.

(b) Dos rentats amb solució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3.

La fase orgànica va ser AcOEt en la prova 1, però al segon rentat amb la solució aquosa de NaH_2PO_4 a pH 3 un sòlid va precipitar i no es va poder dur a terme la separació de fases. Per tant, l'AcOEt es va eliminar a pressió reduïda, la suspensió aquosa resultant es va carregar de nou al reactor i es va afegir MeCN per a eliminar els subproductes de reacció. La filtració va ser ràpida i el sòlid obtingut (**7004_UB-23461-P1-01**, rendiment del 51 %) va presentar una puresa cromatogràfica de 91,3 % per **7004**. No es van detectar subproductes a l'anàlisi per HPLC.

En la prova 2 es va utilitzar 2-MeTHF com a fase orgànica per tal d'intentar afavorir la solubilitat del pèptid i dur a terme separacions de fase efectives. La primera va ser satisfactòria amb aquest dissolvent orgànic, però en el segon rentat amb la solució de fosfats a pH 3 es va haver d'afegir més volums de 2-MeTHF per tal de que el producte no precipités i les fases es poguessin separar adequadament. La fase orgànica es va concentrar fins a 4 volums i es va addicionar MeCN a la solució del cru en 2-MeTHF per comprovar si aquest dissolvent podia servir com a antidissolvent per precipitar el producte desitjat. Un sòlid va precipitar i la filtració de la suspensió va ser lenta a causa de la textura del sòlid obtingut. Novament no es van detectar subproductes per HPLC, però el rendiment va ser molt baix (**7004_UB-23461-P2-01**, rendiment del 7 %), encara que amb una puresa cromatogràfica del 95,5 % per **7004**.

Donat que en la prova 1 un sòlid va precipitar al segon rentat amb la solució de NaH_2PO_4 , en la prova 3 es va decidir dur a terme només un rentat amb més quantitat d'AcOEt per poder separar correctament les fases. La fase orgànica resultant del rentat es va concentrar fins a 3 vol i el MeCN es va addicionar lentament per a la precipitació de **7004**. La filtració va ser ràpida i el

rendiment es va millorar respecte a la prova 2 (41 % vs 7 %) encara que va seguir sent baix. No es van detectar els subproductes de reacció per HPLC al sòlid obtingut (**7004_UB-23461-P3-01**), però es va observar una impuresa a 27,4 min (5,4 %), la qual es desconeixia la seva estructura, que va fer disminuir la puresa cromatogràfica al 85,7 %.

Degut a que els rentats d'AcOEt i 2-MeTHF amb solució aquosa de NaH_2PO_4 no van donar bons resultats, la prova 4 va consistir en addicionar aquesta solució directament a la solució del cru en DMF per precipitar el sòlid i esperant que la piperidina quedés protonada en la solució. Es va obtenir una suspensió i es va addicionar MeCN per eliminar els subproductes de reacció. La filtració va ser ràpida i el rendiment molt elevat (91 %), essent el millor de les proves dutes a terme fins el moment. No obstant, l'eliminació dels subproductes de reacció no va ser completa en el sòlid obtingut (**7004_UB-23461-P4-01**).

En la prova 5 es va decidir canviar l'ordre d'antidissolvents. Així, es va addicionar MeCN a la solució del cru i es va enterbolir, però no va precipitar cap sòlid. Aquest resultat va indicar que aquest dissolvent no era útil per precipitar el producte desitjat directament de la solució del cru en DMF. Tanmateix, va precipitar sòlid amb l'addició de la solució de fosfats a pH 3 i la suspensió es va agitar durant 2 h per a extreure la piperidina del sòlid. La filtració va ser lenta i el sòlid obtingut (**7004_UB-23461-P5-01**, rendiment del 84 %) va donar una puresa cromatogràfica del 91,7 % per **7004** amb un bon rendiment. En aquest cas, l'eliminació de subproductes de reacció va ser més eficient que la assolida amb la prova 4, però no es van eliminar totalment.

Per tal de disposar d'un mètode per determinar la presència de traces de piperidina en **7004**, es va analitzar per ^1H -RMN el sòlid obtingut en la prova 5. Es volia trobar un senyal aïllat de piperidina de la resta de senyals que permetés localitzar-la, per tant, es va addicionar piperidina al sòlid i es va dur a terme un altre anàlisi per ^1H -RMN. Malauradament, els senyals de la piperidina van quedar solapats per els del pèptid **7004** i no va ser possible desenvolupar un mètode per ^1H -RMN per la determinació de piperidina en els sòlids de **7004** obtinguts. Caldria doncs trobar un mètode adient per determinar piperidina en **7004** com podria ser la cromatografia de gasos, però en aquesta Tesi Doctoral no es va dur a terme per falta de temps. Així doncs, per tal de saber si quedava piperidina romanent en el sòlid, es va transformar **7004** en **7006** i es va determinar per HPLC-MS si el subproducte de piperidina de **7005** es formava o no.

5.4.4.2.2. 7004_UB-23465

Encara que s'havien obtinguts resultats prometedors en la prova 5 descrita en l'apartat anterior (lot **7004_UB-23461**), les precipitacions i purificacions es van seguir estudiant amb el cru de **7004_UB-23465** (**Taula 38**) amb l'objectiu d'obtenir un bon rendiment i no detectar subproductes en el sòlid obtingut. El procediment seguit per precipitar el producte amb els antidissolvents A y B va ser similar al comentat en l'apartat anterior.

Taula 38. Proves del tractament del cru de reacció de **7004_UB-23465**.

Prova	Dissolvent	Anti-dissolvent A	Anti-dissolvent B	Filtració	% Rendiment	% per HPLC (sòlid)		
						7004	FM-pip	DBF
cru	-					65,4	11,1	7,9
P1	DMF (6,5 vol)	NaH ₂ PO ₄ (6,5 vol)	MeCN (65 vol)	Ràpida	14	77,8	n.d	n.d
P2	DMF (6,5 vol)	MeCN (13 vol)	NaH ₂ PO ₄ (6,5 vol)	Lenta	90	80,9	0,4	0,8

El sòlid de la prova 1 es va precipitar directament amb la solució de fosfats a pH 3, i a la suspensió resultant es va afegir MeCN per eliminar els subproductes del cru. Aquesta prova va donar un rendiment baix de precipitació (**7004_UB-23465-P1-01**, rendiment del 14 %), molt probablement per l'excés de volums de MeCN utilitzats. En canvi, en la prova 2 es va addicionar primer el MeCN, reduint considerablement els volums respecte la prova 1, i el sòlid es va precipitar posteriorment amb NaH₂PO₄. En aquest últim cas, el rendiment va millorar molt significativament (**7004_UB-23465-P2-01**, rendiment del 90 %) i la proporció de subproductes de reacció al sòlid va ser molt petita. Els resultats de la prova 2 van ser prometedors, però la filtració era lenta i es van dur a terme més proves de precipitació amb un altra lot de síntesi.

5.4.4.2.3. 7004_UB-26910

Les proves amb el cru **7004_UB-26910** van consistir en precipitar el pèptid utilitzant com antidissolvents H₂O, TBME, MeCN o la dissolució de NaH₂PO₄ a pH 3 (**Taula 39**). El TBME i el MeCN es van utilitzar com antidissolvents ja que s'esperava que el producte precipites i els subproductes es quedessin dissolts en les AM. En el cas de la prova 1 i 4, el sòlid obtingut després de la primera filtració, es va suspendre en MeCN per tal d'eliminar els subproductes.

Taula 39. Proves del tractament del cru de reacció de **7004_UB-26910**.

Prova	Anti-dissolvent	Filtració	Supensió	Filtració	% Rendiment	% per HPLC (sòlid)		
						7004	FM-pip	DBF
cru	-					78,7	7,2	11,8
P1	H ₂ O (4,4 vol)	Lenta	MeCN (10 vol)	Ràpida	76	97,9	0,1	0,1
P2	TBME (31 vol)	Ràpida	-	-	26	87,8	1,0	9,5
P3	MeCN (22 vol)	Ràpida	-	-	9	84,5	0,2	1,8
P4	NaH ₂ PO ₄ (4,4 vol)	Lenta	MeCN (10 vol)	Ràpida	80	95,9	0,2	0,9

Malgrat la filtració va ser ràpida quan es va precipitar amb TBME i MeCN, els rendiments van ser baixos (26 % per **7004_UB-26910-P2-01** i 9 % per **7004_UB-26910-P3-01**), especialment amb el segon dissolvent. Aquests resultats van portar a descartar TBME i MeCN per a precipitar **7004**.

Els rendiments en les proves 1 i 4 van ser bons, encara que la filtració va ser lenta. Els sòlids obtinguts (**7004_UB-26910-P1-01** i **7004_UB-26910-P4-01**) en aquestes proves es van suspendre en MeCN durant 5 h per eliminar els subproductes. Els rendiments van ser acceptables (76 % per **7004_UB-26910-P1-02** i 80 % per **7004_UB-26910-P4-02**), i es va reduir considerablement la proporció de subproductes de reacció.

Finalment, les condicions de precipitació que es van triar van ser les utilitzades en la prova 4 (**7004_UB-26910-P4**), ja que el rendiment era acceptable i la puresa cromatogràfica del producte molt elevada. A més, es precipitava amb la solució de fosfats per eliminar la piperidina del sòlid i els rentats amb MeCN reduïa notablement el contingut de subproductes. Encara que la primera filtració va ser lenta, el flux d'AM va ser constant, indicant que el filtre no s'obturava i que, en principi, no hauria d'haver problema en filtrar la suspensió en un filtre Nutsche de planta. Per tant, les condicions de la prova 4 es van reproduir amb el lot **7004_UB-26918**.

5.4.4.2.4. 7004_UB-26918

El fragment peptídic **7004** es va precipitar amb la solució aquosa de NaH_2PO_4 a pH 3 (5 vol), la suspensió es va filtrar i el sòlid resultant es va suspendre en MeCN (10 vol). Es va obtenir el sòlid **7004_UB-26918-02** amb un rendiment global del 99 % i amb una puresa cromatogràfica de 95,9 % pel producte desitjat, i sense productes de reacció.

5.4.5. ESCALAT

L'escalat de **7004** (**7004_UB-26929**) es va realitzar a partir del lot **7003_UB-26927-02** (23 g), en un reactor de 500 mL. Es va utilitzar piperidina (1,2 eq) en DMF (5 vol), i a les 2 h de reacció no es va detectar material de partida per HPLC. El producte es va precipitar amb una solució de NaH_2PO_4 a pH 3,0 (5 vol) a 5 °C, i es va filtrar lentament per a obtenir 23,4 g de **7004_UB-26929-01**, amb una puresa cromatogràfica de 76,8 % per **7004**, juntament amb un 16 % de DBF i un 4 % de l'adducte corresponent. Per tal d'eliminar aquests subproductes, es va suspendre el sòlid amb MeCN (10 vol) i la mescla es va agitar durant 2 h. La filtració va ser ràpida, obtenint-se 19,1 g de **7004_UB-26929-02** (rendiment global de 79 %) amb una puresa cromatogràfica per **7004** de 94,7 % (**Figura 103**). Pel que fa als subproductes, es van detectar un 1,0 % de DBF (15,3 min) i un 0,2 % del seu adducte FM-pip (9,6 min).

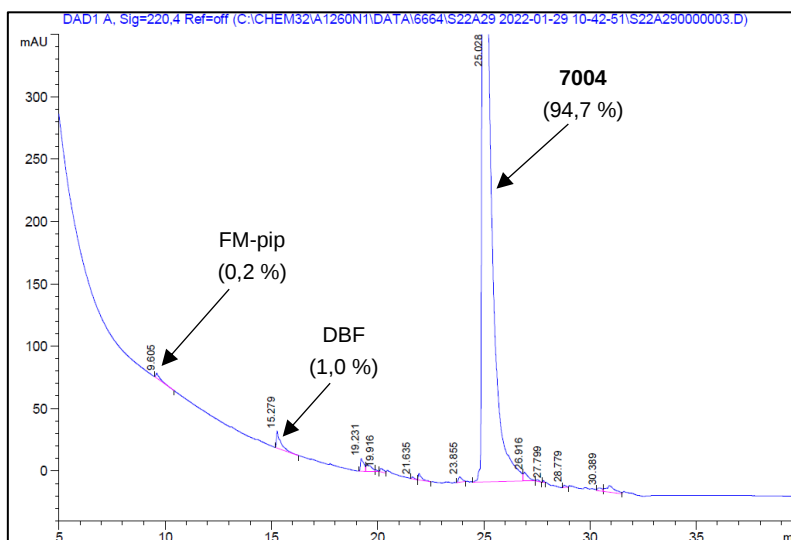


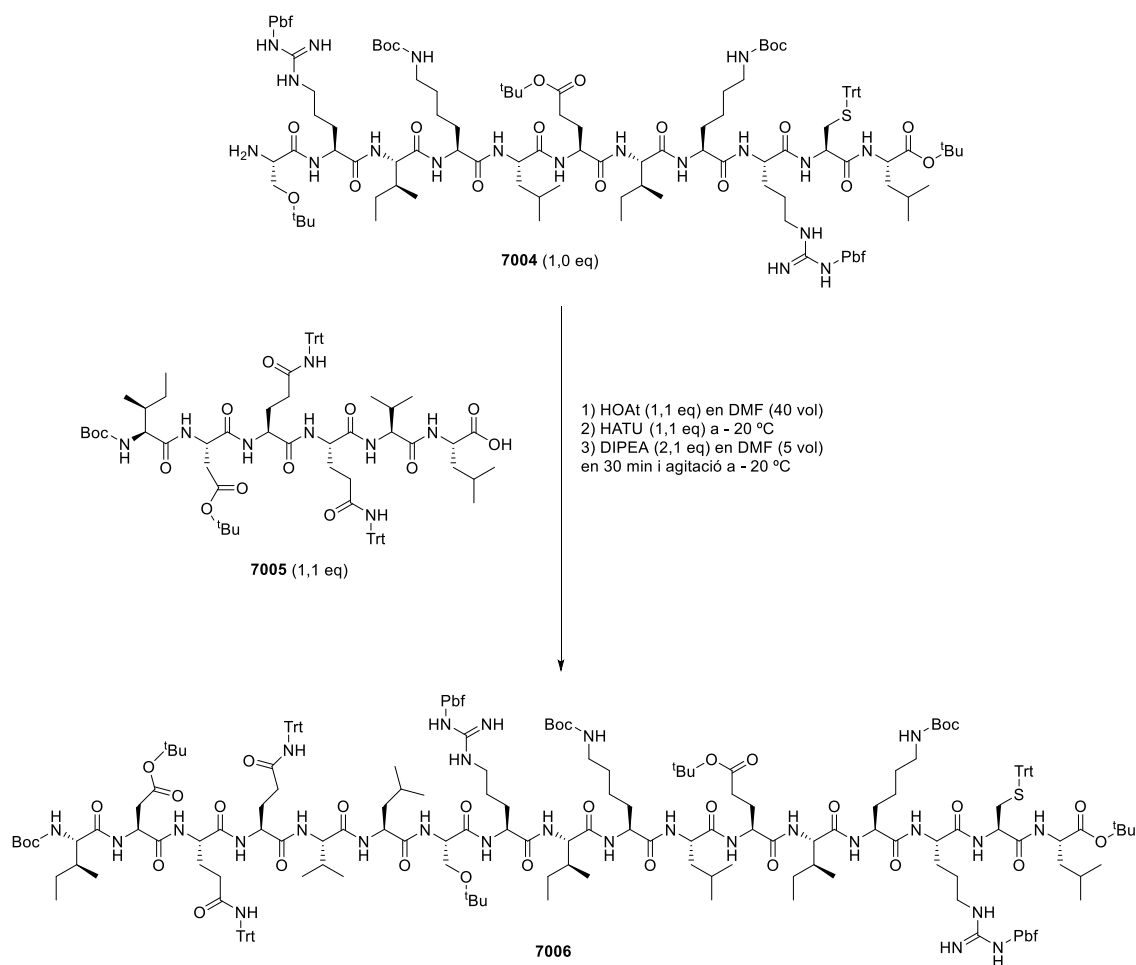
Figura 103. Cromatograma de **7004_UB-26929-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

5.5. SÍNTESI DE 7006

5.5.1. PRECEDENTS⁵⁹

El següent pas de la ruta sintètica per a la obtenció de **FT** (**Esquema 15**, *apartat 3.3.2*) va consistir en acoblar l'hexapèptid **7005** amb l'undecapèptid **7004** per obtenir el **7006**, el pèptid totalment protegit amb la seqüència de **FT**. Aquest pèptid (**6664**) és considerat a Esteve Química com a HP-API (*apartat 1.2*) i, tal i com es descriu en els procediments de l'empresa, el precursor d'una substància HP-API, com és el cas de **7006**, també s'ha de tractar (o manipular) com a tal. Treballar amb APIs que tenen una gran potència i citotoxicitat presenta diversos reptes per a les empreses farmacèutiques, com ara la manipulació, la contenció i el cost. A l'empresa hi ha un laboratori especialitzat per a treballar únicament amb productes HP-APIs; per tant, la manipulació de **7006** i les reaccions en les que aquest producte estava present, es van dur a terme en un aïllador d'alta contenció que protegeix de la exposició (*veure apartat 8.2.2*). Cal destacar que la toxicitat d'una substància HP-API és extrema quan el producte es troba en estat sòlid i, per tant, mai s'ha d'estar en contacte amb aquest sòlid en aquestes condicions i s'ha de treballar seguint els protocols de seguretat dissenyats.

Les condicions utilitzades per la síntesi de l'undecapèptid **7003** (**Esquema 54**, *apartat 5.3.1*) van ser les que es van fer servir en els estudis precedents a aquesta Tesi per a l'obtenció de **7006** (**Esquema 58**). El procediment general va consistir en addicionar DIPEA (2,1 eq) en DMF durant 30 min a una solució en DMF de **7004** (1,0 eq), **7005** (1,1 eq), l'agent d'acoblament HATU (1,1 eq) i l'additiu HOAt (1,1 eq) a -20 °C i amb agitació magnètica. L'escala màxima de treball a la que es va arribar amb aquestes condicions de reacció va ser de 0,2 g de **7004**.



Esquema 58. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi del **FT** protegit **7006**.

El producte **7006** es va precipitar del cru de reacció amb H₂O per eliminar l'excés de reactius i sals, la suspensió resultant es va centrifugar en una centrífuga de laboratori i el sòlid obtingut es va liofilitzar. El rendiment de reacció va ser de 86 %, però la puresa cromatogràfica del producte va ser baixa (54 %) degut a l'alt percentatge de subproducte de piperidida de **7005** (14 %) que s'havia format (**Figura 102**, apartat 5.4.4). Per tal d'eliminar el subproducte, el sòlid de **7006** es va suspendre en EtOH (3,2 vol) a 40 °C durant 4 h, reduint-se la impuresa a un valor inferior a l'1 %. Tanmateix, els rendiments d'aquesta etapa de purificació van ser molt baixos (al voltant del 15 %), però la puresa cromatogràfica de **7006** va ser millorada (69 %).

5.5.2. SÍNTESI PRELIMINAR DE 7006

La primera síntesi del precursor de **FT** (**7006_UB-26904**) es va dur a terme amb les condicions proposades en els estudis precedents (**Esquema 58**, apartat 5.5.1), a escala de 0,3 g de **7004**. Els lots de productes de partida utilitzats van ser el **7004_UB-23465-P2-01** i el **7005_UB-23475-P3-01**. La reacció es va monitoritzar per HPLC i a les 3 h de reacció no es va observar el producte de partida **7004** al cromatograma. L'heptadecapèptid protegit **7006** es va precipitar amb H₂O (73 vol), el sòlid va ser aïllat per filtració (**7006_UB-26904-01**, rendiment del 85 %) i es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 104**, A).

Encara que es va utilitzar com a producte de partida un sòlid de **7004** el qual s'havia precipitat amb solució de NaH_2PO_4 a pH 3, la piperidida de **7005** es va detectar en un 2,8 % (23,7 min) en el sòlid de **7006** precipitat amb H_2O , però aquest percentatge era molt menor a l'observat als precedents (14 %). Per altra banda, l'hexapèptid **7005** es va utilitzar en excés però no es va detectar aquest producte de partida al sòlid obtingut, el que podria indicar que s'havia transformat completament a la piperidida corresponent.

El sòlid **7006_UB-26904-01**, procedent de la precipitació amb H_2O , es va suspendre en EtOH (3,2 vol) a 40 °C per tal d'eliminar la piperidida de **7005** tal i com es descriu en els precedents. Es va obtenir el sòlid **7006_UB-26904-02** (rendiment 67 %) i l'anàlisi per HPLC-MS (**Figura 104, B**) va constatar un augment de la puresa cromatogràfica de **7006** (32,4 min) fins a 81,9 % i una disminució de piperidida de **7005** (23,7 min) fins a l'1,7 %. En comparació al que es va assolir als estudis precedents, en aquesta purificació no es va aconseguir reduir la impuresa de piperidida a un percentatge d'àrea menor a l'1 % però es va obtenir millor rendiment (15 % vs 67 %).

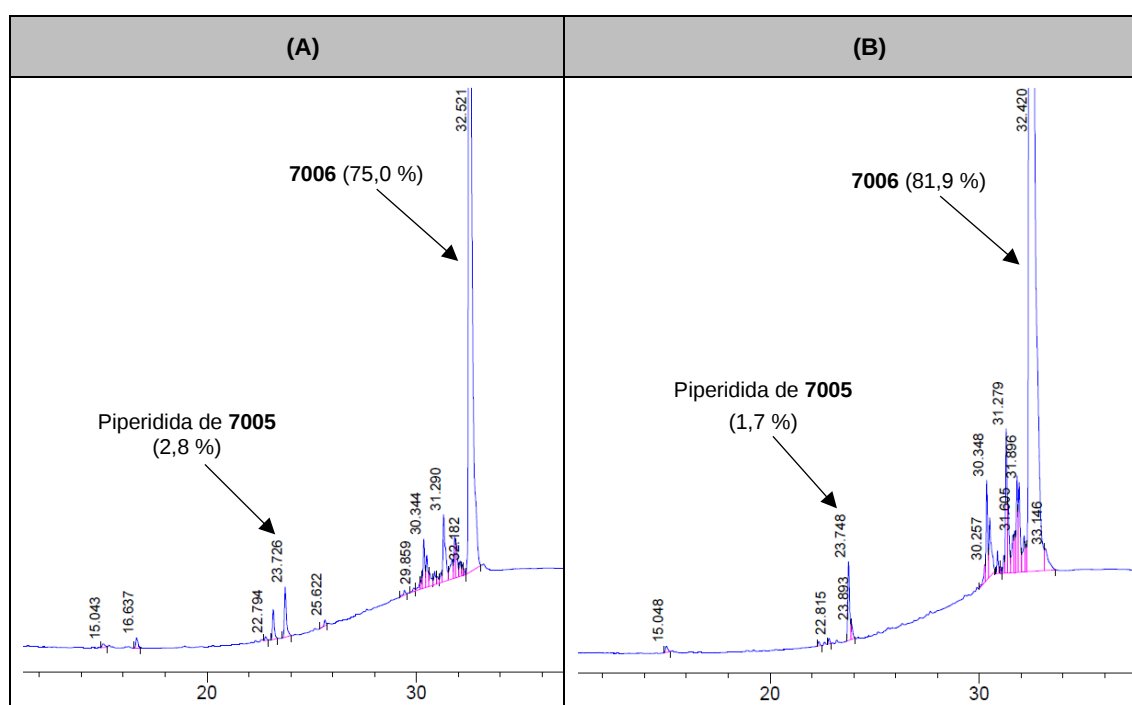


Figura 104. Cromatogrames del lot **7006_UB-26904**. **(A)** sòlid precipitat amb aigua, **(B)** sòlid rentat amb EtOH. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Malgrat les precaucions que es van prendre en el tractament del cru de **7004** per reduir les traces de piperidina, aquest resultat mostrava que no van ser prou efectives ja que se seguia detectant la piperidida de **7005** en el sòlid resultant. La seva eliminació posterior seguint el procediment de purificació amb EtOH ja establert tampoc va proporcionar resultats satisfactoris, per aquesta raó, es va seguir estudiant el procés per reduir la formació d'aquesta impuresa.

5.5.3. OBTENCIÓ DE **7006** A PARTIR DE DIFERENTS LOTS DE **7004**

Les noves proves per a la obtenció de **7006** (**7006_UB-26906**, **7006_UB-26914**, **7006_UB-26915** i **7006_UB-26920**) es van dur a terme amb les condicions descrites en els precedents (**Esquema 58, apartat 5.5.1**), utilitzant com a productes de partida el lot **7005_UB-23475-P3-01** i diferents lots de **7004** per a avaluar com variava la formació de la piperidida de **7005** en funció dels

equivalents emprats en la preparació de **7004** (Taula 40). Els sòlids d'aquests lots de **7004** es van obtenir per precipitació amb la solució de NaH_2PO_4 a pH 3 per intentar eliminar l'excés de piperidina. Les reaccions de formació de **7006** es van monitoritzar per HPLC i, un cop ja no es va observar producte de partida **7004**, es va addicionar H_2O (70 vol) a 5 °C, les suspensions obtingudes es van filtrar a pressió reduïda i es va avaluar el rendiment de tots els sòlids obtinguts (79 % per **7006_UB-26906-01**, 98 % per **7006_UB-26914-01**, 84 % per **7006_UB-26915-01** i 99 % per **7006_UB-26920-01**), essent satisfactoris en tots els casos. En la Taula 40 també es mostra la síntesi preliminar de **7006** (**UB-26904**) per tal de comparar els resultats.

Taula 40. Proves per l'obtenció de **7006** a partir de diferents lots de **7004**.

Lot	7004			Obtenció de 7006			% per HPLC (sòlid)	
	Lot	Eq piperidina	% per HPLC	g de 7004	Temps (h)	% (Rend.)	Piperidida de 7005	7006
UB-26904	UB-23465-P2-01	3,2	80,9	0,4	3	85	2,8	75,0
UB-26906	UB-23461-P4-01	3,3	85,5	0,1	3	79	1,2	80,3
UB-26914	UB-26910-P1-02	1,2	97,9	0,2	5	98	2,4	86,4
UB-26915	UB-26910-P4-02	1,2	95,9	0,2	5	84	1,8	87,0
UB-26920	UB-26918-02	1,2	94,7	1,8	3	99	0,7	89,2

La piperidida de **7005** es va detectar en tots els sòlids amb un 2,8 % com a màxim. No es va observar cap relació entre la quantitat obtinguda d'impuresa i els equivalents de piperidina que es van utilitzar per l'obtenció de **7004**. Per exemple, el sòlid **7006_UB-26906-01** (3,3 eq de piperidina) va donar un 1,2 % d'impuresa, mentre que el percentatge de subproducte pel sòlid **7006_UB-26914-01** (1,2 eq de piperidina) va ser del 2,4 %. Finalment, cal mencionar que la puresa cromatogràfica de **7006** va ser menor pels sòlids **7006_UB-26904-01** i **7006_UB-26906-01**, ja que provenien de lots de **7004** més impurs.

Aquest resultat era totalment contradictori ja que malgrat no poder quantificar el romanent de piperidina present als lots de **7004**, s'esperava una certa correlació amb la quantitat de piperidina emprada a la seva preparació. El no poder relacionar aquestes dades deixava molt incert l'origen d'aquest impuresa.

5.5.3.1. PROVES DE PURIFICACIÓ DE 7006

La Taula 41 mostra les proves de purificació que es van dur a terme amb l'objectiu de trobar un dissolvent en el que **7006** fos insoluble i la piperidida de **7005** soluble per poder separar per filtració la impuresa. Els dissolvents es van triar segons l'experiència que es tenia sobre la solubilitat d'alguns fragments peptídics i descartant l'etanol anteriorment considerat en algunes proves. En aquests assajos es va utilitzar una barreja dels sòlids **7006_UB-26914-01** i **7006_UB-26915-01**. Cap dels dissolvents utilitzats en les proves de purificació va donar una suspensió filtrable, pel que no es va aconseguir purificar **7006**.

Taula 41. Proves per la purificació de **7006**

Prova	Dissolvent (6 vol)	Aspecte
P1	Acetona	Diss. completa
P2	MeOH	Diss. tèrbola
P3	IPA	Diss. completa
P4	MeCN	Diss. tèrbola

5.5.3.2. OBTENCIÓ DE **7006** A PARTIR D'UN LOT DE **7004** OBTINGUT UTILITZANT 4-AMP

Al no poder correlacionar la quantitat de piperidida de **7005** amb la piperidina residual present als sòlids de **7004**, es va pensar en fer servir un lot de **7004** preparat utilitzant un altre base.

Així doncs, es va dur a terme una nova síntesi de **7006** (**7006_UB-26931**) a partir del lot **7004_UB-23453-03**, que s'havia obtingut utilitzant la base 4-AMP en comptes de piperidina durant les proves de desenvolupament d'un mètode per l'obtenció de **7004**. Paral·lelament a aquesta síntesi, es va realitzar una altra síntesi de **7006** (**7006_UB-26930**) a partir del lot **7004_UB-26929-02**, que s'havia obtingut al tractar **7003** amb 1,2 eq de piperidina. El lot del producte de partida **7005** per a les dues síntesi va ser el mateix, **7005_UB-23475-P3-01**, per poder comparar els dos experiments. Les reaccions es van dur a terme amb les condicions dels precedents (**Esquema 58**, apartat 5.5.1), i a les 5 h es va addicionar H₂O (40 vol) per a la precipitació de **7006**.

Es va obtenir el sòlid **7006_UB-26931-01** però no es va determinar el rendiment ja que l'escala de treball era molt petita (40 mg de **7004**) i no era la finalitat de la prova. El sòlid es va analitzar per HPLC (**Figura 105, A**), detectant-se **7006** (32,2 min) amb una puresa cromatogràfica del 89,7 %. La impuresa no es va detectar, pel que es va confirmar que la piperidida de **7005** es formava a causa de la piperidina romanent en el sòlid de **7004**. En canvi, l'anàlisi del sòlid **7006_UB-26930-01** (**Figura 105, B**) va mostrar la impuresa amb un 3,7 % (24,0 min), reduint la puresa cromatogràfica del **7006** a 85,3 %.

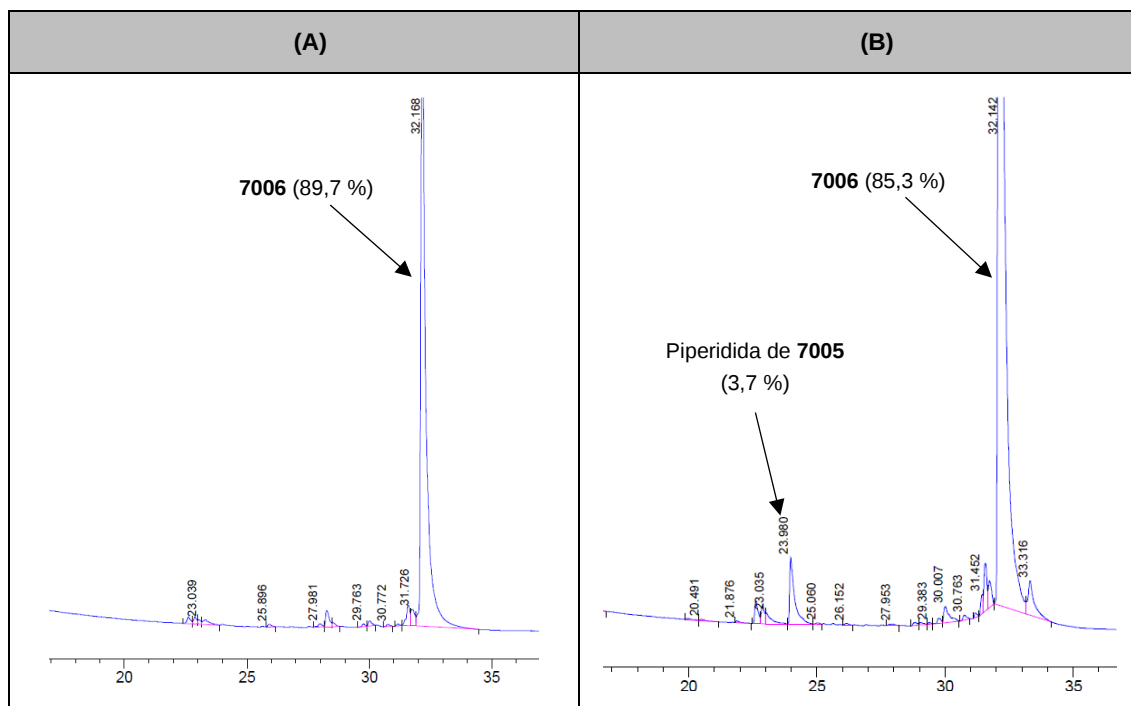


Figura 105. Cromatogrames dels sòlids precipitats amb H₂O de (A) 7006_UB-26931 i (B) 7006_UB-26930. (Mètode A, apartat 8.3.3).

No es va aconseguir doncs evitar la formació de la piperidida de **7005**, encara que es va reduir la seva presència respecte al valor que es va arribar en els estudis anteriors (14 %). Malgrat aquest resultat, es va decidir continuar per avaluar l'impacte que tenia aquesta impuresa en la puresa cromatogràfica del producte final **6664**. Per tal d'evitar la formació de la piperidida de **7005**, s'hauria d'optimitzar un procés per la obtenció de **7004** utilitzant, per exemple, 4-AMP, que es va descartar en el seu moment per manca de disponibilitat d'aquest reactiu i que posteriorment no es va poder fer per manca de temps.

5.5.4. ESCALAT

L'escalat de la síntesi de **7006** (**7006_UB-26932**) es va dur a terme en un reactor de 2 L i agitació mecànica, a escala de 18 g de **7004_UB-26929-02** i utilitzant les condicions inicials (**Esquema 58**, apartat 5.5.1). El producte de partida **7004** no es va detectar per HPLC a les 3 h de reacció i el cru es va precipitar amb H₂O (40 vol) a 5 °C. La suspensió es va poder descarregar pel tub de descàrrega del reactor amb dificultat ja que el sòlid obturava la sortida a causa de la seva textura. La suspensió es va filtrar en 2 h i el sòlid obtingut (26,2 g de **7006_UB-26932-01**, rendiment del 94 %) es va analitzar per HPLC, resultant una puresa cromatogràfica del 81,8 % pel producte desitjat, acompanyat d'un 7,7 % de la piperidida de **7005** (**Figura 106**).

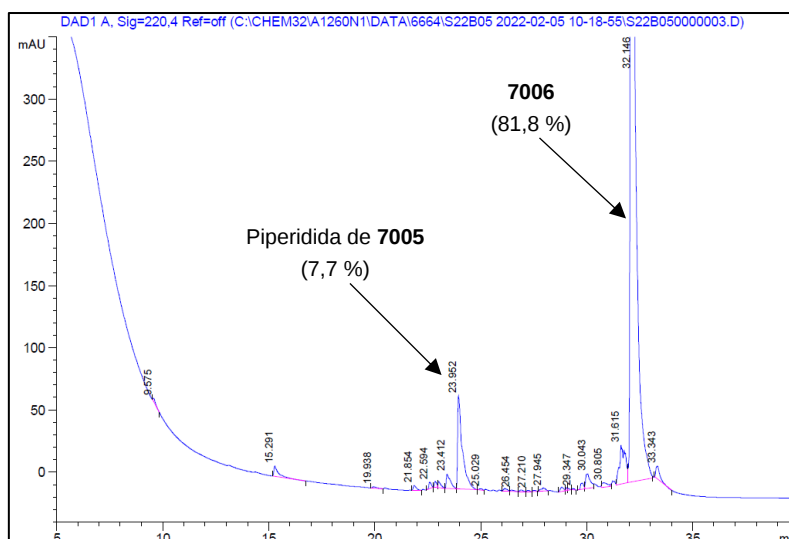


Figura 106. Cromatograma de 7006_UB-26932-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

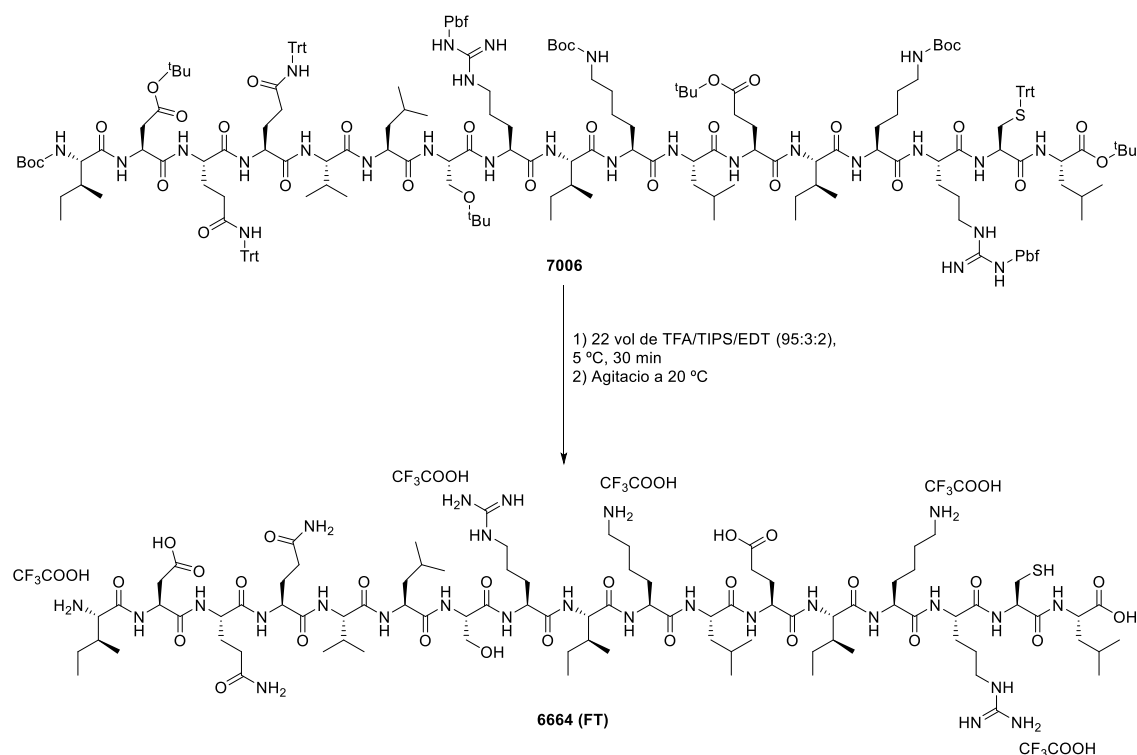
Per tant, es va poder comprovar que la font de la impuresa és la piperidina però no es va trobar una metodologia adient per tal de minimitzar la seva formació. De totes maneres, malgrat treballar a l'aïllador i les limitacions que suposava, es van poder obtenir més de 26 g de FT totalment protegit amb una bona puresa cromatogràfica.

5.6. OBTENCIÓ DE FT A PARTIR DE 7006

5.6.1. PRECEDENTS⁵⁹

El pas sintètic final per aconseguir el producte desitjat FT (6664) va consistir en eliminar tots els grups protectors de la cadena (cadena lateral, extrem α -carboxílic i extrem α -amino) amb un tractament àcid de 7006 (Esquema 15, apartat 3.3.2).

Tal com s'ha comentat per la resta d'etapes del procés sintètic, el punt de partida en la present Tesi Doctoral per portar a terme la desprotecció total de 7006 van ser les condicions experimentals derivades en els estudis precedents (Esquema 59). El producte de partida es va carregar a 22 volums de TFA amb TIPS i EDT (95:3:2) a 5 °C. El TIPS va ser utilitzat com a captador de carbocations generats durant l'eliminació dels grups protectors per tal d'evitar reaccions no desitjades amb la cadena peptídica, i l'EDT com a reductor per evitar la formació de ponts disulfur.



Esquema 59. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la obtenció de **FT (6664)**.

La solució acidolítica es va agitar durant 30 min i, a continuació, la temperatura externa es va pujar a 20 °C i la mescla es va agitar durant 3,5 h. Finalment, es va addicionar TBME (100 vol) a 3 °C per a precipitar el producte desitjat. L'escala màxima que es va assolir amb aquestes condicions de reacció en aquests treballs precedents va ser de 0,2 g de **7006** utilitzant els lots de producte de partida més purs disponibles. El rendiment va ser de 84 % i la puresa cromatogràfica de **6664** va ser del 71 %.

En els tres sòlids de **6664** que es van obtenir, es va detectar la formació d'una impuresa al voltant del 7 % amb una m/z que corresponia a **6664** més un grup $t\text{Bu}$. En la literatura es descriu que aquesta impuresa es pot formar a causa de la *terc*-butilació del residu de cisteïna després de la desprotecció global d'una cadena peptídica preparada mitjançant l'estratègia Fmoc/ $t\text{Bu}$.¹³¹ També s'ha descrit que el TBME es pot comportar com a agent alquilant provocant la reacció no desitjada de *terc*-butilació durant la precipitació del pèptid, especialment en presència de residus susceptibles a l'alquilació com Trp, Tyr, Cys o Met.¹³² Per a la precipitació de **6664** es va utilitzar TBME ja que és l'èter preferit a escala industrial per qüestions de seguretat. Per tant, calia trobar unes condicions acidolítiques que minimitzessin aquesta reacció secundària.

5.6.2. SÍNTESI PRELIMINAR DE 6664

Per tal d'evitar la formació de la impuresa *terc*-butilada de **6664** (**$t\text{Bu}$ -6664**), es va voler reemplaçar el TBME per un èter exempt de grups $t\text{Bu}$, com per exemple el 2-MeTHF.

La primera síntesi de **6664** (**6664_UB-26917**) es va dur a terme seguint les condicions inicials (**Esquema 59**, *apartat 5.6.1*) a escala de 0,3 g de **7006**, però precipitant el producte amb 2-MeTHF. El lot utilitzat va ser una barreja dels lots **7006_UB-26914-01** i **7006_UB-26915-01**. En aquest cas no es va obtenir una solució al final del tractament acidolític tal i com es descriu amb TBME, sinó que es va observar una suspensió al llarg de la reacció, pel que es va allargar el

temps del tractament per tal d'aconseguir la desaparició d'aquesta suspensió. A les 7 h encara quedava sòlid en el cru i la suspensió es va filtrar per analitzar el sòlid per ^1H -RMN. L'espectre obtingut va mostrar simplement un conjunt de senyals en la zona aromàtica i un singlet a 5,62 ppm (**Figura 107**), que es va poder determinar que corresponien al trifenilmetà mitjançant experiments de ^{13}C i NOESY- ^1D (veure en annex **Figura A4** i **Figura A5**).

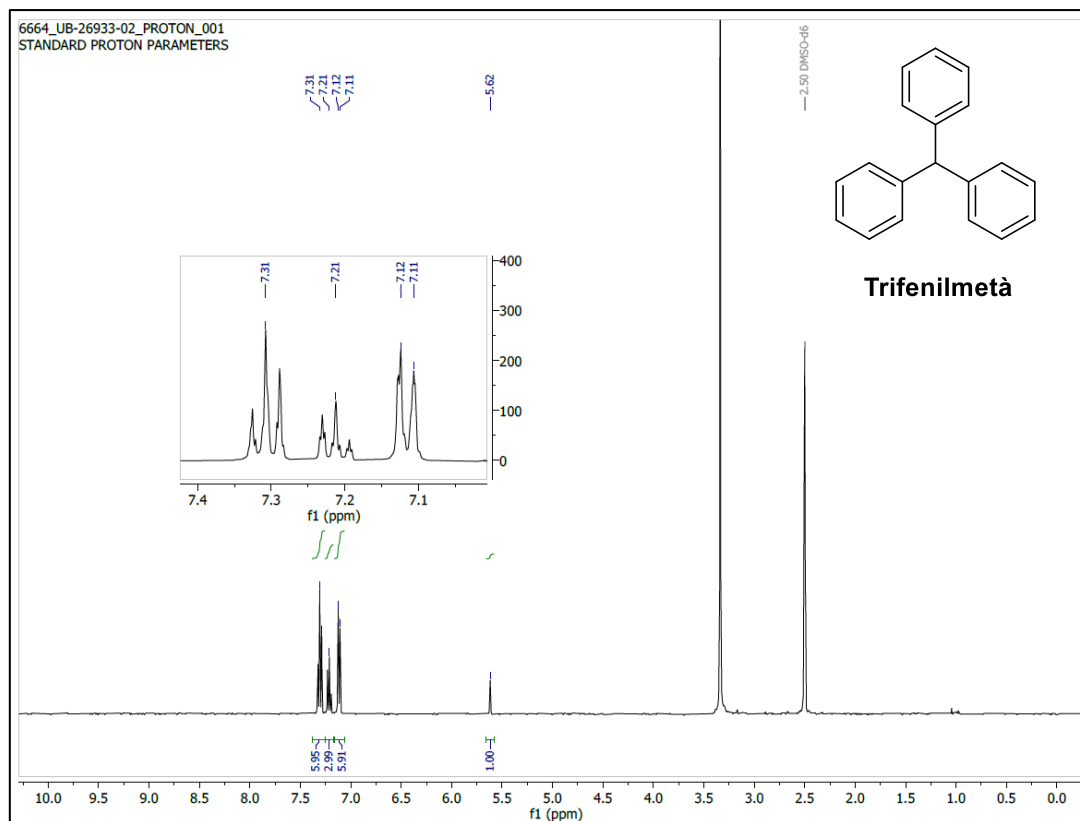


Figura 107. Espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del sòlid format en la síntesi de **6664_UB-26917**.

La hipòtesi més probable que explicaria la formació d'aquest compost seria la reacció del reductor TIPS amb els carbocations tritil generats en la desprotecció de Cys i Gln. Al ser un subproducte de reacció no desitjat, es va poder eliminar per filtració i, seguidament, es va intentar precipitar el producte desitjat amb 2-MeTHF. Es va addicionar aquest dissolvent (120 vol) a la dissolució del cru a 3 °C i el sòlid obtingut (**6664_UB-26917-01**, rendiment del 48 %) es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 108, A**). La puresa cromatogràfica del **6664** (18,1 min) va ser del 76,7 % i la impuresa **^tBu -6664** (21,6 min) es va detectar en un 8,4 %, el que indicava que el TBME utilitzat per precipitar el producte no era el responsable de la *terc*-butilació.

Aparentment, el tractament acidolític que es va dur a terme hauria d'haver sigut suficient per l'eliminació de tots els grups protectors pel gran excés de TFA que es va utilitzar. Per tal d'esbrinar si l'eliminació dels grups ^tBu de **7006** no havia estat quantitativa, es va dur a terme un segon tractament àcid al sòlid **6664_UB-26917-01** amb les condicions inicials (**Esquema 59, apartat 5.6.1**). A diferència del primer tractament, no es va observar precipitat i a les 4 h es va addicionar 2-MeTHF (60 vol). No es va avaluar el rendiment del sòlid obtingut (**6664_UB-26917-02**) però es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 108, B**) i es va determinar una puresa cromatogràfica per **6664** (19,8 min) del 68,0 %, inferior a l'obtinguda en el primer tractament a conseqüència de la formació de noves impureses. Malgrat que la impuresa **^tBu -6664** (23,5 min)

es va poder reduir a un 6,6 %, la generació de noves impureses a l'últim pas va descartar l'opció del segon tractament.

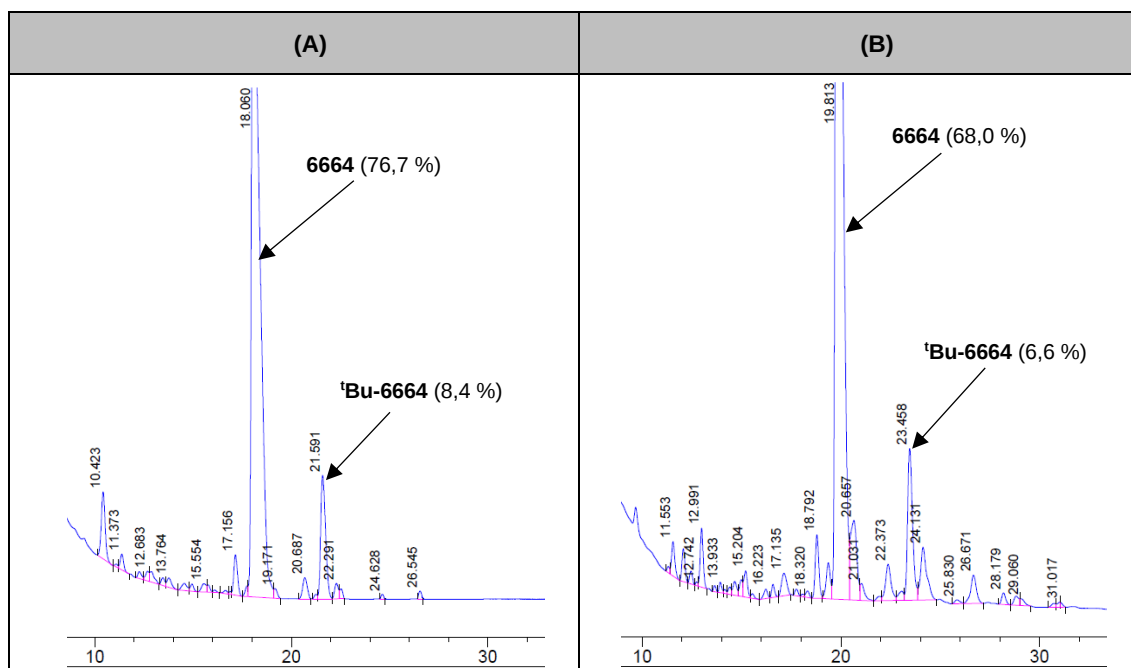
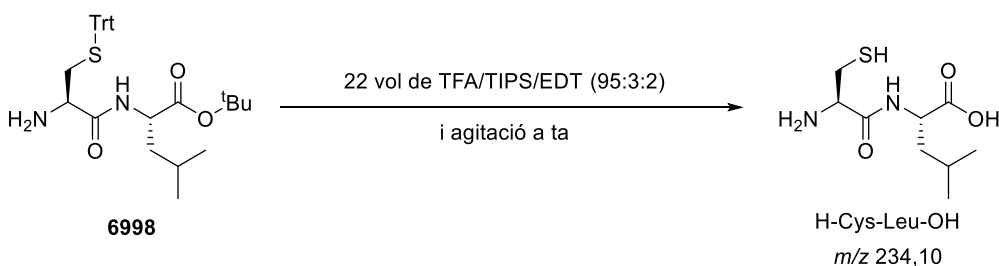


Figura 108. Cromatograma de (A) 6664_UB-26917-01 i (B) 6664_UB-26917-02. (Mètode C, apartat 8.3.3).

5.6.3. ELIMINACIÓ DELS GRUPS PROTECTORS DELS FRAGMENTS PEPTÍDICIS 6998, 7411 I 7005

Per tal de confirmar si la impuresa **tBu-6664** es formava a causa de la *terc*-butilació del residu de cisteïna durant la desprotecció global de la cadena peptídica,¹³¹ es van desprotegir els intermedis **6998** (dipèptid amb un residu de Cys), **7411** i **7005**. Els crús acidolítics resultants es van analitzar per HPLC-MS per veure si en algun dels fragments es detectava la presència del fragment peptídic desprotegit amb un grup protector *terc*-butil.

Per eliminar els grups protectors del dipèptid **6998**, el sòlid es va tractar amb una solució de TFA/TIPS/EDT (95:5:2) i la mescla es va agitar durant 7 h (**Esquema 60**). A l'afegir 2-MeTHF (40 vol) no va precipitar cap sòlid i la solució resultant es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 109**). La *m/z* de 235,1 corresponent a **6998** totalment desprotegit (H-Cys-Leu-OH) es va detectar a 4,3 min. La massa de la impuresa *terc*-butilada de **6998** desprotegit (*m/z* 291,2) també es va detectar (12,4 min) amb un percentatge de 5,3 % respecte el producte desitjat (94,7 %), la qual cosa demostrava que la impuresa no desitjada es formava en el dipèptid.



Esquema 60. Condicions de reacció per a la eliminació dels grups protectors de **6998**.

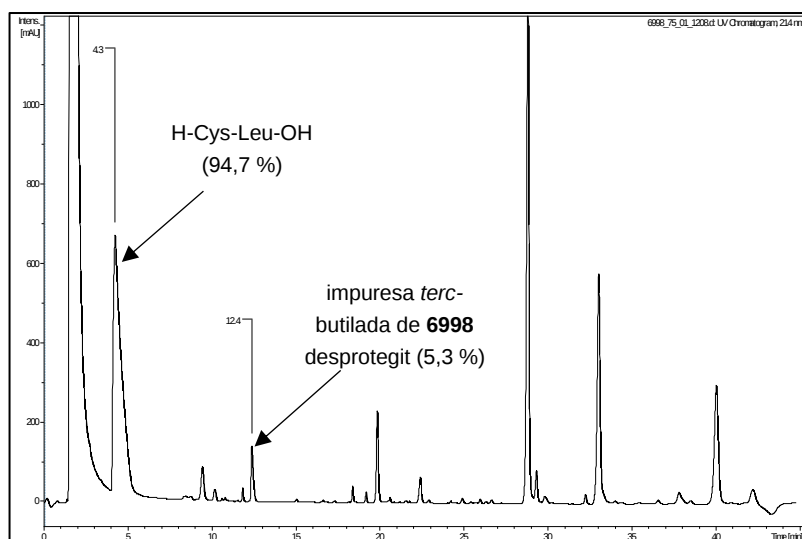


Figura 109. Cromatograma del cru acidolític després de la desprotecció total de **6998** (Mètode A, apartat 8.3.3).

En principi, hi haurien dues hipòtesis compatibles amb l'estructura de **^tBu-6998** desprotegit (**Figura 110**), una correspondria al dipèptid amb el grup ^tBu a l'extrem α -carboxil (H-Cys-Leu-O^tBu), és a dir, una eliminació parcial d'aquest grup, i l'altra correspondria al dipèptid amb Cys *terc*-butilada (H-Cys(^tBu)-Leu-OH) procedent d'una reacció no desitjada, essent aquesta última la hipòtesi més probable.

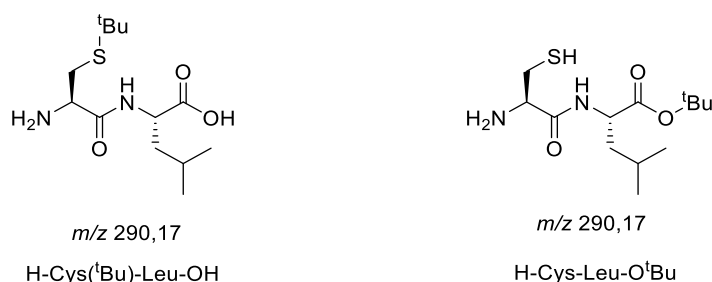
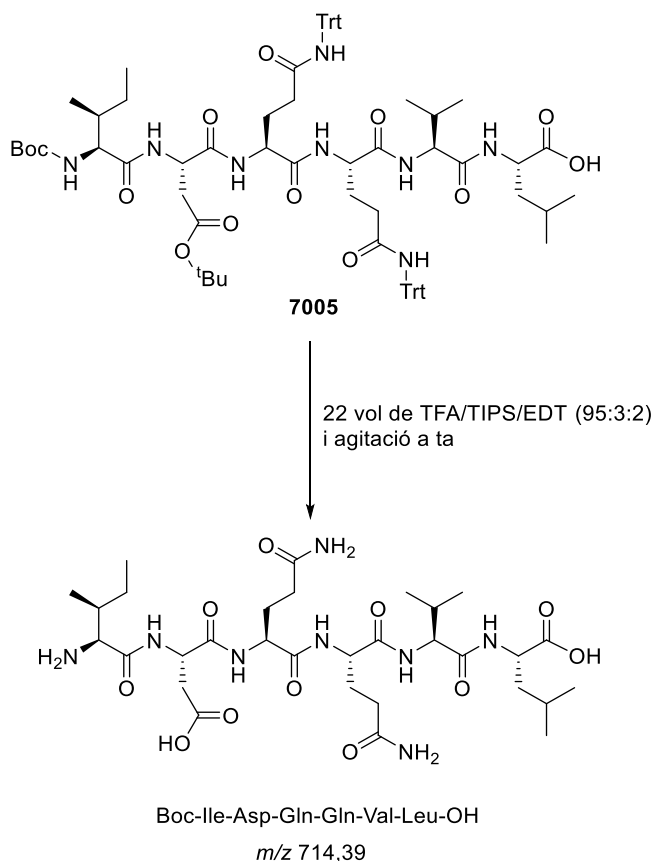


Figura 110. Possibles estructures amb *m/z* 290,2.

Per a la eliminació dels grups protectors de l'hexapèptid **7005**, el sòlid es va tractar amb les mateixes condicions que es van utilitzar pel dipèptid **6998** (**Esquema 61**). El cru de reacció es va precipitar amb 2-MeTHF (40 vol) i el sòlid obtingut es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 111**). Es va observar el pic cromatogràfic corresponent a **7005** totalment desprotegit (Boc-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-OH, *m/z* de 715,4) a 6,6 min i no es va detectar cap pic cromatogràfic que es pogués associar a una potencial impureza *terc*-butilada de **7005** desprotegit (*m/z* 771,0).



Esquema 61. Condicions de reacció per a la eliminació dels grups protectors de **7005**.

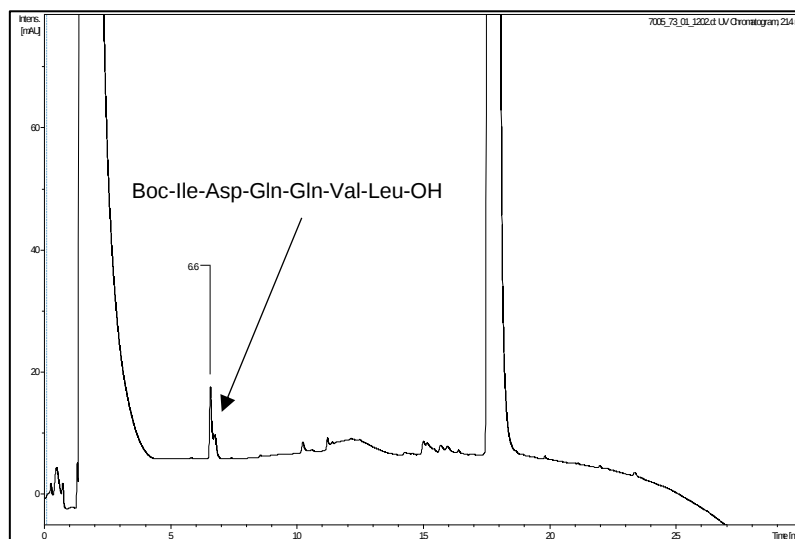
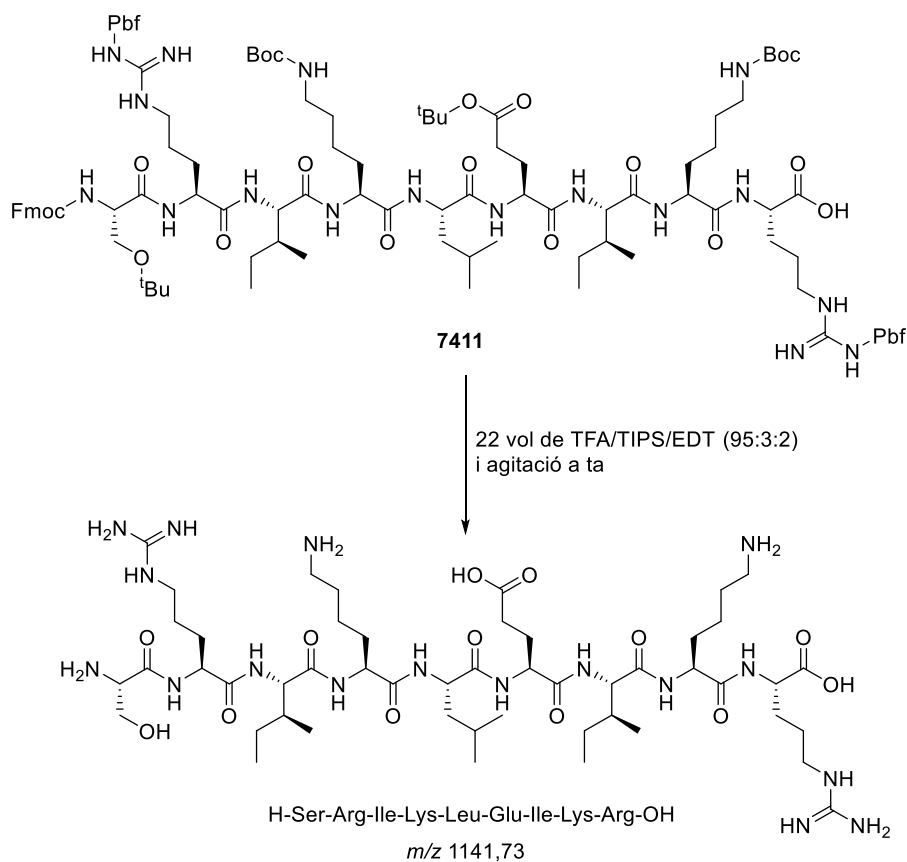


Figura 111. Cromatograma del cru acidolític després de la desprotecció total de **7005** (Mètode A, apartat 8.3.3).

Per últim, es va dur a terme la eliminació dels grups protectors del nonapèptid **7411** amb condicions similars a les descrites pels altres dos pèptids protegits (**Esquema 62**). El cru es va precipitar amb 2-MeTHF (40 vol) i el sòlid obtingut es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 112**). La m/z 1365,8, corresponent a **7411** totalment desprotegit (H-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-OH) es va detectar a 17,2 min, indicant que la desprotecció total del nonapèptid havia tingut

lloc. Tanmateix, la impuresa *terc*-butilada de **7411** desprotegit (m/z 1421,9) es va detectar a 18,2 min amb un percentatge molt minoritari (0,3 %) respecte el producte desitjat (99,7 %).



Esquema 62. Condicions de reacció per a la eliminació dels grups protectors de **7411**.

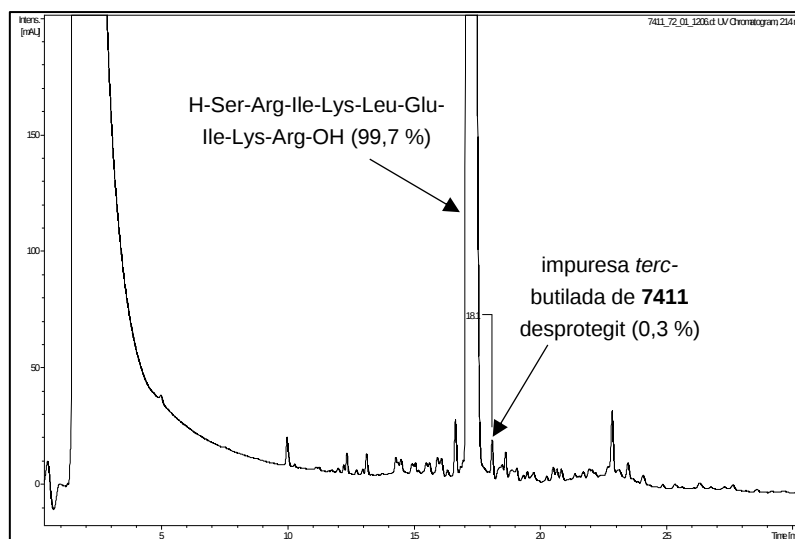


Figura 112. Cromatograma del cru acidolític després de la desprotecció total de **7411** (Mètode A, apartat 8.3.3).

En l'anàlisi dels crus dels tractaments acidolítics de **7005** i **7411**, la impuresa corresponent al pèptid desprotegit amb un grup *t*Bu es va detectar en una proporció molt baixa o no es va detectar, el que indicava que les condicions utilitzades per la desprotecció van ser adequades per a

eliminar els grups ^tBu. En canvi, en la desprotecció total del dipèptid **6998**, la impuresa ^tBu-**6664** es va detectar amb claredat, el que confirmava que el grup ^tBu es tornava a enllaçar al dipèptid a través de la cadena lateral de Cys. Calia doncs fer més assajos amb diferents condicions experimentals per tal de minimitzar aquesta reacció secundària.

5.6.4. PROVES PER MINIMITZAR LA *TERC*-BUTILACIÓ EN LA OBTENCIÓ DE **6664**

Per tal d'evitar la *terc*-butilació de **6664** (FT), es van dur a terme dues proves d'obtenció de **6664** (**6664_UB-26923** i **6664_UB-26924**) a partir de 0,2 g del lot **7006_UB-26920-01** (Taula 42), on es va pujar la proporció del captador de carbocations i es va baixar la proporció de TFA (90:6:3), respecte la prova inicial que es va fer per a obtenir el lot **6664_UB-26917** (apartat 5.6.2). Aquestes proves es van diferenciar pels dissolvents que es van utilitzar en la precipitació. Amb TBME es va obtenir un sòlid (**6664_UB-26924-01**) amb una quantitat d'impuresa *terc*-butilada (5,4 %) lleugerament major que contenia el sòlid precipitat amb 2-MeTHF (**6664_UB-26923-01**, 3,1 %), el que suggeria que el segon dissolvent era més adient per portar a terme la precipitació en la desprotecció. Per altra banda, si es comparen les dues proves en que es va utilitzar 2-MeTHF, es va reduir el percentatge de subproducte del 8,4 % a 3,1 %, a l'augmentar la proporció de captador de carbocations, tot mantenint-se un percentatge similar de producte desitjat, la qual cosa indicava que probablement, l'increment d'aquests reactius suposi la formació de més impureses.

Taula 42. Proves per l'obtenció de **6664** utilitzant diferents condicions acidolítiques.

Lot	Condicions experimentals			% per HPLC (sòlid)	
	Lot de 7006	(TFA:TIPS:EDT)	Precipitació	^t Bu- 6664	6664
UB-26917	UB-26914-01 + UB-26915-01	95:3:2	2-MeTHF	8,4	76,7
UB-26923	UB-26920-01	90:6:4	2-MeTHF	3,1	77,8
UB-26924	UB-26920-01	90:6:4	TBME	5,4	74,8

Les millors condicions trobades fins el moment per eliminar els grups protectors de **7006** van ser un tractament acidolític utilitzant una barreja de TFA/TIPS/EDT (90:6:4) i precipitació amb 2-MeTHF (**6664_UB-26923-01**). El següent pas va ser, a més de continuar amb la cerca de condicions experimentals que minimitzessin la formació de subproducte, intentar substituir l'EDT per un altre captador de carbocations per tal d'evitar l'olor desagradable i la toxicitat del primer, inconvenients que limiten la seva utilització a escala industrial.

Cal destacar que es va dur a terme una prova de solubilitat en 2-MeTHF del subproducte de trifenilmetà present al cru de **6664** descrit a l'apartat 5.6.2 (Figura 107), comprovant-se que era soluble en 10 volums de dissolvent. Per aquesta raó, en les proves que es descriuen a continuació, les suspensions observades resultants de la precipitació del subproducte trifenilmetà no es van filtrar, sinó que es va addicionar 2-MeTHF a la suspensió, per dissoldre el trifenilmetà i, a la vegada, precipitar el pèptid desitjat. D'aquesta manera, el subproducte s'eliminava a les AM durant la filtració del producte final.

5.6.4.1. ESTUDI DE DIFERENTS CAPTURADORS DE CARBOCATIONS

Es van fer diferents proves per obtenir **6664** variant el captador de carbocations (**Taula 43**). El producte de partida utilitzat va ser el provinent de l'escalat de **7006** (**7006_UB-26932-01**, puresa cromatogràfica de 81,8 %), i les proves es van realitzar a escala de 50 mg. Les reaccions es van dur a terme en 22 volums de mescla acidolítica, amb agitació a ta durant 5 h. El pèptid desitjat es va precipitar amb 2-MeTHF (20 vol), els sòlids obtinguts (**6664_UB-26935-P1-01**, **6664_UB-26935-P2-01**, **6664_UB-26935-P3-01**, **6664_UB-26935-P4-01**, **6664_UB-26935-P5-01** i **6664_UB-26935-P6-01**) es van analitzar per HPLC-MS i es van avaluar els percentatges d'impureses formades en cada reacció.

La prova que va mostrar una major puresa cromatogràfica per **6664** va ser la prova 3 (69,0 %), utilitzant la mescla de TFA/TIPS/1-octantiol (80:12:8). L'ús de captadors de carbocations alternatius i/o el canvi de proporció de reactius no va aconseguir millorar aquest resultat. En l'anàlisi per HPLC-MS del sòlid obtingut (**Figura 113**) es van detectar els pics corresponents a la impuresa de piperidida de **7005** desprotegit en un 1,6 % (11,3 min), una impuresa majoritària desconeguda amb m/z de 1100,2 en un 4,7 % (36,1 min) i la impuresa *terc*-butilada (23,6 min) en un 9,0 %. Cal mencionar que en aquesta prova no es van observar dos impureses a m/z 1068,1 i m/z 1138,2 que sí es van detectar com a impureses majoritàries en altres proves d'aquest estudi.

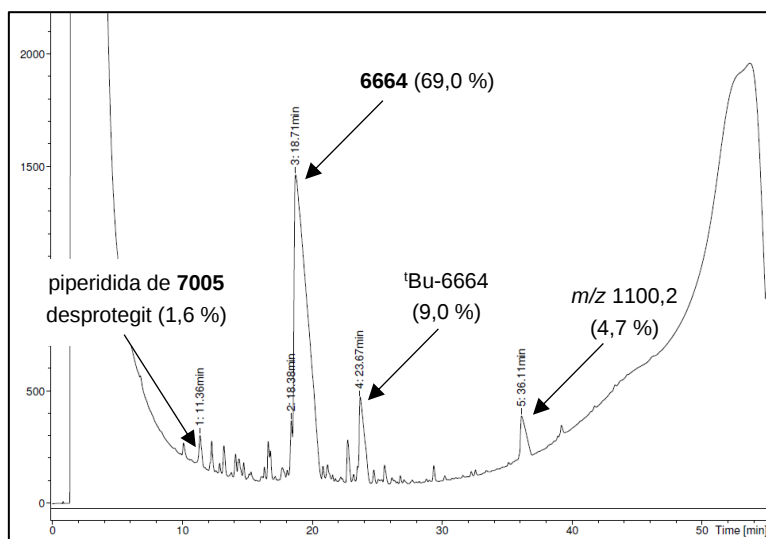


Figura 113. Cromatograma de **6664_UB-26935-P3-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Si es duu a terme una comparació dels perfils cromatogràfics dels sòlids obtinguts (**Taula 43**), es va observar que les tres impureses desconegudes abans mencionades depenien del captador o captadors de carbocations que es va utilitzar. Així, es va poder comprovar que les impureses amb m/z 1068,1 i m/z 1138,2 no es van formar amb l'ús d'1-octantiol com a captador de carbocations (**P3**, **P5** i **P6**), i la segona tampoc es va detectar quan es va utilitzar H₂O (**P4**). Tanmateix, aquestes impureses es van observar quan només es van fer servir TIPS o TES (**P1** i **P2**). Així, les proves que es van dur a terme amb 1-octantiol van presentar una major puresa cromatogràfica per **6664**, però es va detectar una altra impuresa desconeguda amb m/z 1100,2 quan a la resta de proves no es va observar.

La impuresa **'Bu-6664** va disminuir notablement amb la utilització de TES (2,6 %, **P2**) en comparació amb TIPS (14,5 %, **P1**). En canvi, altres impureses que no s'especifiquen a la taula i que elueixen al final del cromatograma es van observar amb un 2-4 % en **P2**, el que va fer que la puresa cromatogràfica de **6664** en aquesta prova (52,7 %), no fos molt millor que en **P1** (47,5 %). Les diferències no van ser significatives quan TES o TIPS es van utilitzar amb 1-octantiol (**P5** i **P6**). No obstant, l'ús d'H₂O amb TIPS va augmentar significativament la proporció de la impuresa *terc*-butilada (18,6 %, **P4**).

També es va avaluar el contingut de piperidina de **7005** desprotegit, impuresa que provenia del romanent de piperidina que quedava al sòlid de **7004**, la formació de la qual no s'havia pogut evitar (*apartat 5.4.4*). Aquesta impuresa es va detectar en totes les proves amb percentatges que van variar des d'un 1,2 % a un 4,4 %, suposant per tant un impacte significatiu en la puresa cromatogràfica de **6664**.

Taula 43. Resultats obtinguts en l'obtenció de **6664_UB-26935** utilitzant diferents mescles acidolítiques.

Prova (UB-26935)	Condicions reacció (22 vol, 5 h de reacció)	% per HPLC (sòlid)						
		piperidida de 7005 desprotegit	m/z 1068,1	6664	^t Bu-6664	Pbf-6664	m/z 1138,2	m/z 1100,2
P1	TFA/TIPS (90:10)	1,3	13,3	47,5	14,5	3,3	7,6	-
P2	TFA/TES (90:10)	4,4	7,0	52,7	2,6	2,1	7,6	-
P3	TFA/TIPS/1-octantíol (80:12:8)	1,6	-	69,0	9,0	-	-	4,7
P4	TFA/TIPS/H ₂ O (90:7,5:2,5)	1,2	5,5	58,2	18,6	2,3	-	-
P5	TFA/TES/1-octantíol (90:6:4)	2,0	-	62,9	7,2	-	-	5,2
P6	TFA/TIPS/1-octantíol (90:6:4)	2,7	-	62,4	8,9	-	-	6,9

Taula 44. Resultats obtinguts en l'obtenció de **6664_UB-26938** utilitzant diferents mescles acidolítiques.

Prova (UB-26938)	Condicions reacció (22 vol, 1 h de reacció)	% per HPLC (sòlid)							
		piperidida de 7005 desprotegit	m/z 1068,1	6664	^t Bu-6664		Pbf-6664	m/z 1138,2	m/z 1100,2
P1	TFA/TES (90:10)	2,0	5,8	60,8	3,7	5,7	1,8	2,0	-
P2	TFA/TES/1-octantíol (80:10:10)	3,3	-	67,8	5,4	5,4	0,3	-	1,0

5.6.4.2. REDUCCIÓ DEL TEMPS DE TRACTAMENT ACIDOLÍTIC

Es van fer dues proves d'obtenció de **6664** (**UB-26938-P1** i **UB-26938-P2**) on es va reduir el temps del tractament acidolític de 5 h (**Taula 43**) a 1 h (**Taula 44**) per tal d'avaluar si la puresa cromatogràfica del pèptid desitjat millorava. Les condicions triades a la **P2** van ser molt semblants a les que van donar millors resultats en l'estudi anterior (**P3** de la **Taula 43**), però utilitzant TES en comptes de TIPS per la disponibilitat del reactiu a l'empresa. Els resultats d'aquesta prova es va comparar amb el perfil cromatogràfic de la **P1** per tal de veure l'efecte de l'1-octantiol. Les reaccions es van dur a terme a escala de 50 mg de **7006_UB-26932-01** amb 22 volums de la mescla àcida a ta, i el pèptid final es va precipitar amb 2-MeTHF (20 vol). Els sòlids obtinguts (**6664_UB-26938-P1-01** i **6664_UB-26938-P2-01**) es van analitzar per HPLC-MS i es van avaluar les impureses formades en cada tractament.

El tractament amb TFA/TES (90:10) (**P1**) va donar una puresa cromatogràfica per **6664** més baixa (60,8 %) que l'obtinguda en la **P2** (67,8 %), confirmant que amb l'ús d'1-octantiol es reduïen les impureses totals.

Al reduir el temps de reacció a 1 h amb la utilització de TFA/TES (**P1**), es va observar que la puresa cromatogràfica del producte desitjat millorava respecte l'obtinguda a les 5 h amb les mateixes condicions (52,7 %, **P2** de la **Taula 43**). La proporció de la impuresa de m/z 1138,2 va ser menor, però es van observar dos pics cromatogràfics amb la mateixa m/z de **^tBu-6664** (**Figura 114**), i amb un major percentatge global (12,4 %) que l'únic pic d'aquesta impuresa observat a les 5 h (2,6 %, **P2** de **Taula 43**). Cal dir que la impuresa amb m/z de **^tBu-6664** que eluïa abans (3,7 %) no es detectava a les 5 h de reacció, el que indicava que 1 h era un temps insuficient per portar a terme la desprotecció total del pèptid.

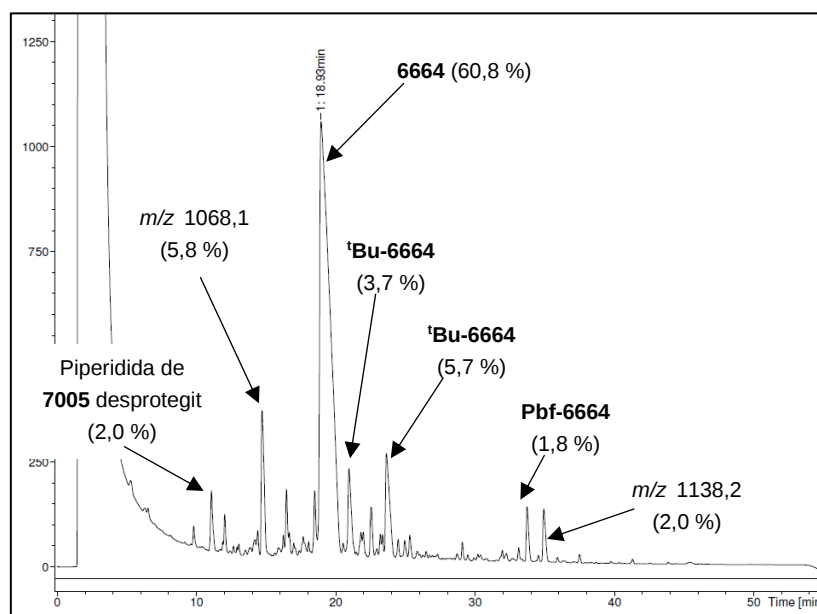


Figura 114. Cromatograma del cru acidolític de **6664_UB-26938-P1-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

La prova que es va realitzar utilitzant TFA/TES/1-octantiol (80:10:10) (**P2** de la **Taula 44**) va donar un sòlid amb una puresa cromatogràfica pel **6664** del 67,8 %, molt semblant a la obtinguda a les 5 h en unes condicions experimentals molt semblants (69,0 %, **P3** de **Taula 43**). La impuresa de m/z 1100,16 va disminuir en comparació amb la prova de 5 h (de 4,7 % a 1,0 %). En canvi, es

tornaven a detectar els dos pics cromatogràfics amb la m/z de la impuresa **^tBu-6664** (10,8 % global), essent superior al percentatge que es va detectar a les 5 h (9,0 %, **P3** de **Taula 43**). Això podria estar indicant que l'eliminació d'un dels grups ^tBu de **7006** no era encara quantitativa després d'1 h de reacció, tal com s'ha suggerit per justificar un resultat similar en la prova **P1** (**Taula 44**), però a mesura que evoluciona la desprotecció s'estava formant el subproducte de reacció corresponent a la *terc*-butilació del residu de Cys. Tanmateix, quan es va utilitzar TFA/TES (90:10) la proporció del teòric subproducte de **^tBu-6664** va disminuir a les 5 h (2,6 %, **P2** de la **Taula 43**) respecte a la determinada a 1 h (5,7 %, **P1** de la **Taula 44**), un temps insuficient com ja s'ha dit per desprotegir totalment el pèptid.

Per tal de cercar més informació sobre els dos subproductes amb la mateixa m/z que **^tBu-6664**, es va decidir fer una nova prova d'obtenció de **6664 (6664_UB-26941)** i treure CP's per l'anàlisi del cru per HPLC-MS a diferents temps de reacció (**Taula 45**). La reacció es va dur a terme a escala de 50 mg de **7006_UB-26932-01** utilitzant TFA/TES/1-octantíol (80:10:10), la mescla en que s'havien observat millors resultats fins el moment. En aquesta prova, es van utilitzar 12 volums de mescla en comptes de 22, per tant, la reacció es va dur a terme més concentrada per tal de que la reacció fos més ràpida. El pèptid es va precipitar amb 2-MeTHF (20 vol) a les 4,5 h de tractament acidolític. En els cromatogrames obtinguts a diferents temps de reacció, es van tornar a observar els dos pics cromatogràfics amb la m/z de impuresa **^tBu-6664**. El pic que eluïa abans va aparèixer amb una proporció del 15,6 % a l'anàlisi del cru de les 0,5 h de reacció, però ja no es va detectar a les 2,5 h. En canvi, el pic cromatogràfic de **^tBu-6664** que eluïa després es va observar en un 3,0 % a les 0,5 h, proporció que es va incrementar al 6,4 % a les 1,5 h fins a arribar al 8,1 % al sòlid precipitat. Aquest resultat confirmava la hipòtesi plantejada al paràgraf anterior, és a dir, a mesura que evoluciona la desprotecció es formava el subproducte de reacció corresponent a la *terc*-butilació del residu de Cys. Cal destacar també que transcorregudes 1,5 h el grup protector Pbf de Lys ja s'havia eliminat. Així doncs, s'havia de deixar la reacció el temps necessari per la desprotecció de tots els grups protectors però tenint en compte que la potencial alquilació de la cisteïna augmentava amb el temps. Pel que fa a la puresa cromatogràfica del producte desitjat, la millor es va observar entre 1,5 h i 2,5 h de reacció ja que la majoria de grups protectors havien sigut eliminats i la impuresa desconeguda de m/z 1100,2 es va detectar en menor proporció que a les 4,5 h de reacció. La piperidida de l'hexapèptid **7005** desprotegit (3,3-5,9 %) es va mantenir pràcticament constant al llarg de la reacció.

Taula 45. Resultats del tractament acidolític a diferents temps en l'obtenció de **6664_UB-26941**.

Lot	Condicions reacció (12 vol)	Temps (h)	% per HPLC						
			Piperidida de 7005 desprotegit	6664	^t Bu-6664		Pbf-6664		m/z 1100,2
UB-26941	TFA/TES/1-octantíol (80:10:10)	0,5	4,7	28,0	15,6	3,0	6,1	7,8	-
		1,5	5,8	63,6	2,3	6,4	-	-	1,8
		2,5	5,9	64,0	-	6,7	-	-	3,3
		3,5	5,9	62,3	-	6,9	-	-	4,3
		4,5	5,9	60,6	-	6,9	-	-	5,2
		sòlid	3,3	66,9	-	8,1	-	-	5,1

Taula 46. Comparació de síntesis de **6664** utilitzant diferents concentracions de reactius.

Lot	Condicions reacció	Volums (g/mL)	% per HPLC (sòlid)						
			Piperidida de 7005 desprotegit	6664	^t Bu-6664		Pbf-6664		m/z 1100,2
UB-26940	TFA/TES/1-octantíol (80:10:10), 1 h	40	2,2	56,5	15,8	3,9	1,2	1,2	0,5
UB-26938 ^a		22	3,3	67,8	5,4	5,4	0,3	-	1,0
UB-26941 ^b		12	5,8	63,6	2,3	6,4	-	-	1,8

(a) Resultat de la prova **P2** (Taula 44).

(b) Resultat de l'anàlisi del cru a les 1,5 h de reacció (Taula 45).

5.6.4.3. EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE REACTIUS

En la línia d'analitzar l'efecte de la concentració en la formació de les dues impureses **¹Bu-6664**, es va dur a terme una nova síntesi de **6664 (6664_UB-26940)**, tractant 30 mg de **7006_UB-26932-01** amb 40 volums de TFA/TES/1-octanol (80:10:10) durant 1 h, i el pèptid desitjat es va precipitar amb 2-MeTHF (20 vol).

Si es comparen les proves que es van dur a terme amb TFA/TES/1-octanol (80:10:10) a diferents concentracions de reactius i el mateix temps de tractament acidolític (**Taula 46**), es va poder observar que el percentatge d'impuresa **¹Bu-6664** amb major temps de retenció disminuïa amb la dilució (**UB-26940**). En canvi, el percentatge d'impuresa amb menor temps de retenció augmentava. Aquests resultats confirmaven novament una possible relació entre els dos processos, encara que la disminució de la proporció de pèptid amb un grup protector **¹Bu** era més pronunciada que la formació de subproducte **¹Bu-6664** a l'augmentar la concentració. Cal tenir en compte que el residu de Cys està flanquejada pel residu de Lys a l'extrem α -amino i pel residu de Leu a l'extrem α -carboxil, ambdós protegits amb el grup **¹Bu**.

5.6.4.4. OPTIMITZACIÓ

Un cop es van assajar diferents condicions experimentals i analitzar les impureses majoritàries que es formaven durant el tractament acidolític de **7006** per donar **6664**, es va decidir optimitzar les condicions del procés en el que es va utilitzar la mescla de TFA/TES/1-octanol. Per acabar de definir la concentració, el temps de reacció i la proporció òptima d'àcid/capturador de carbocations que permetessin obtenir **6664** amb la millor puresa cromatogràfica, es van dur a terme les proves que es recullen a la **Taula 47** (lot **6664_UB-26944**) a escala de 100 mg de **7006_UB-26932-01**. Així, es van estudiar tres concentracions de reacció diferents (12 vol, 19 vol i 40 vol) i diferents proporcions de TFA/1-octanol deixant la concentració de TES constant al 10 %. A més, es van precipitar els sòlids d'alíquotes dels crus amb 2-MeTHF (20 vol) a 1 h, 2,5 h i 5 h de tractament acidolític, i els resultants es van analitzar per HPLC-MS. Cal destacar que en **P5** es va estudiar únicament el temps de 2,5 h i es va dur a terme un duplicat de la prova per assegurar que les proves i el mètode cromatogràfic eren robustos.

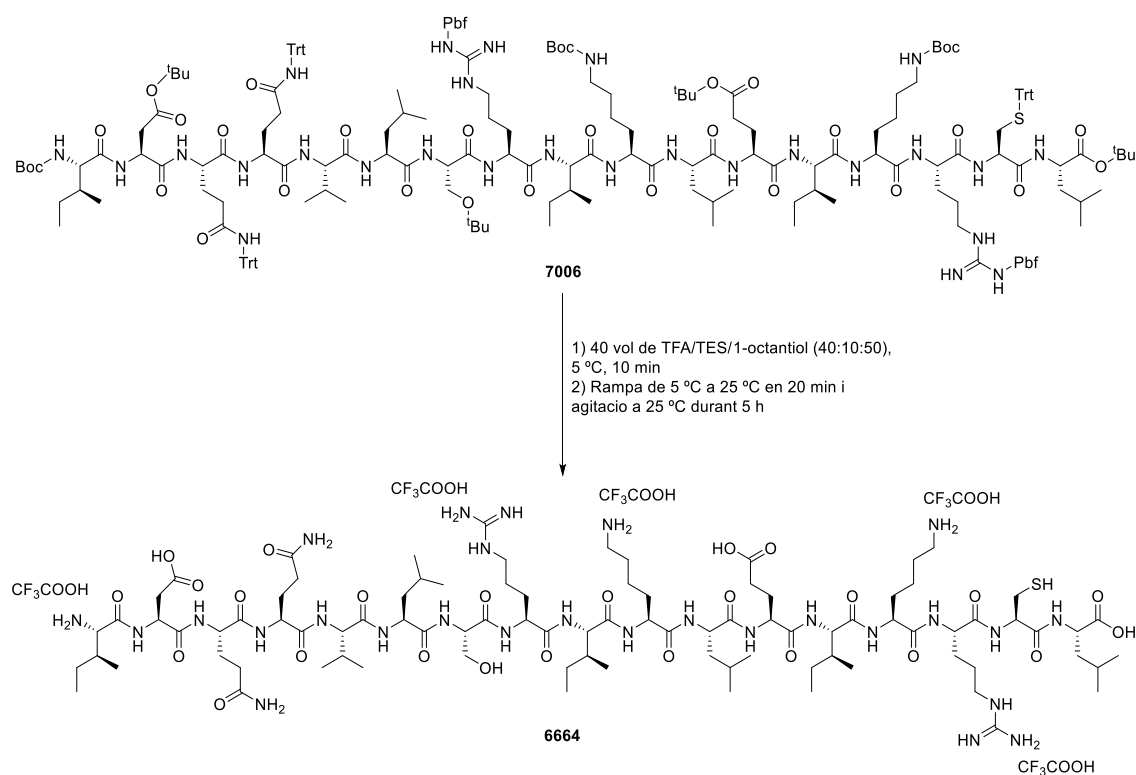
Taula 47. Proves per l'obtenció de **6664_UB-26944**.

Prova	Condicions reacció			% 6664 per HPLC (sòlid)
	TFA/TES/1-octanol	Volums (mL/g)	Temps (h)	
P1	40:10:50	40	1,0	37,0
			2,5	53,3
			5,0	71,7
P2	40:10:50	12	1,0	24,1
			2,5	62,9
			5,0	64,5
P3	80:10:10	40	1,0	59,8
			2,5	62,2
			5,0	63,4
P4	80:10:10	12	1,0	61,2
			2,5	58,8
			5,0	57,4
P5	60:10:30	19	2,5	72,0
			2,5	72,5

Els millors resultats de puresa cromatogràfica pel **6664** es van obtenir amb **P1** a les 5 h de reacció (71,7 %), i amb **P5** a les 2,5 h de reacció (72,0 %). Les condicions **P1** abans esmentades es van intentar reproduir a major escala a l'utilitzar-se una menor proporció de TFA.

5.6.5. REPRODUCCIÓ DE LES MILLORS CONDICIONS ACIDOLÍTIQUES I QUANTIFICACIÓ PER ¹H-RMN

Es van reproduir les condicions que es van utilitzar per a preparar el sòlid **6664_UB-26944-P1-01** en una nova síntesi de **6664** (**6664_UB-26948**) a escala d'1,0 g de **7006_UB-26932-01** (**Esquema 63**). El cru es va precipitar amb 2-MeTHF (80 vol) a 3 °C a les 5 h de tractament acidolític i es va filtrar. La filtració va ser lenta i el sòlid obtingut (0,4 g de **6664_UB-26948**, rendiment del 62 %) es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 115**). La puresa cromatogràfica del **6664** (18,6 min) va ser del 70,4 % i les impureses majoritàries que es van observar van ser la piperidida de **7005** desprotegit (10,4 min, 5,2 %) i **^tBu-6664** (23,0 min, 4,7 %).



Esquema 63. Condicions de reacció per a la desprotecció total de **7006** (lot **6664_UB-26948**).

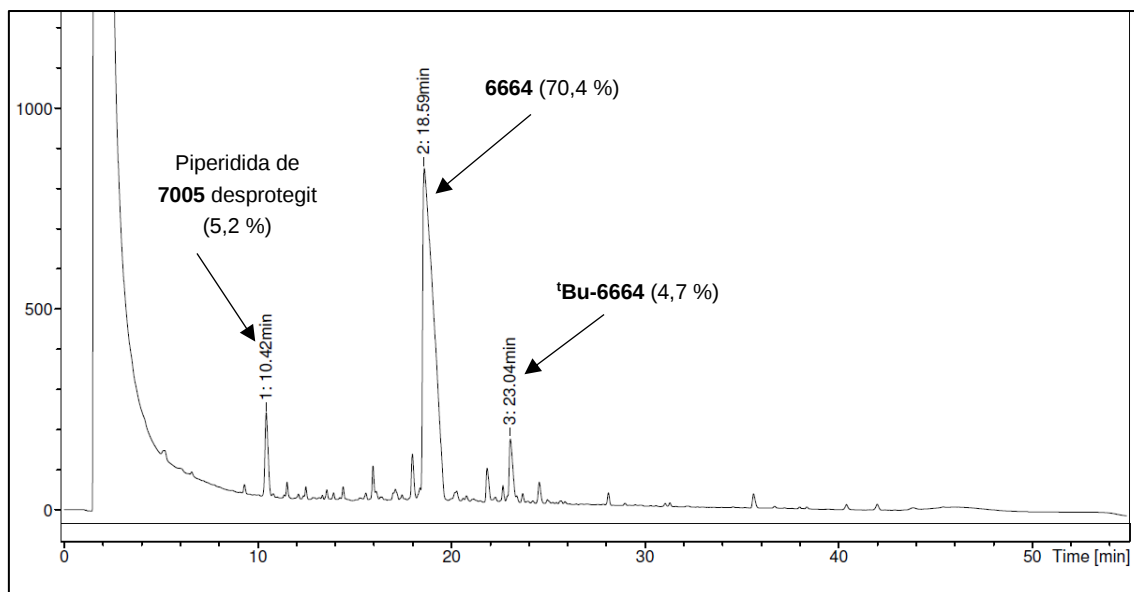


Figura 115. Cromatograma de **6664_UB-26948-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

El sòlid **6664_UB-26948-01** es va analitzar per ^1H -RMN per tal de disposar d'un valor més precís de la riquesa en pes de **6664**. Al precipitar el producte desitjat com a pentatrifluoroacetat (**Esquema 63**), es va utilitzar un patró de 5-fluoro-2-oxindol per quantificar l'anió trifluoroacetat per ^{19}F -RMN (**Figura 116**).

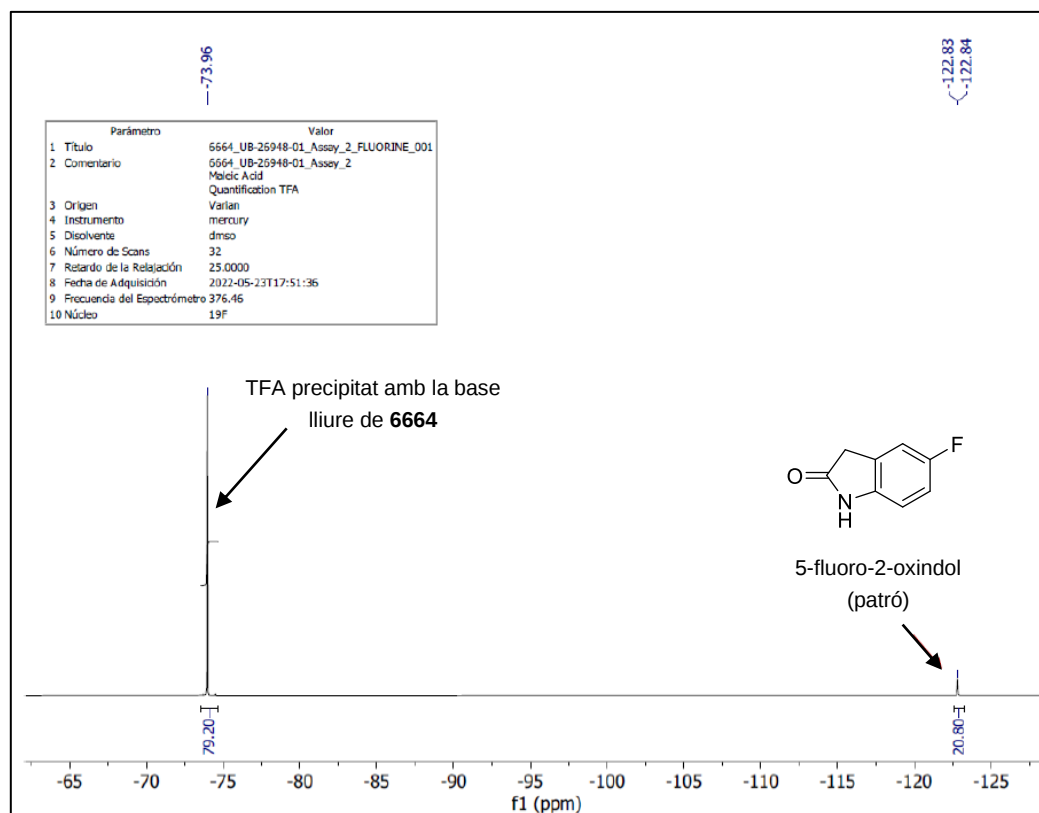


Figura 116. Espectre de ^{19}F -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) de **6664_UB-26948-01** amb el patró 5-fluoro-2-oxindol.

Per altra banda, l'heptadecapèptid protonat es va quantificar per ^1H -RMN utilitzant un patró d'àcid maleic (**Figura 117**). El doblet aïllat de protó d'amida a 8,6 ppm es va utilitzar com a senyal de

referència per a quantificar. Els dissolvents residuals 2-MeTHF i DMF també es van quantificar al sòlid utilitzant aquest patró. Les quantificacions per ^{19}F -RMN i ^1H -RMN van permetre determinar una relació molar base lliure de **6664**/trifluoroacetat d'1:4,4 (*apartat 8.5.12* de la part experimental), relació a partir de la qual es va calcular la riquesa de **6664** (veure **Taula 48**).

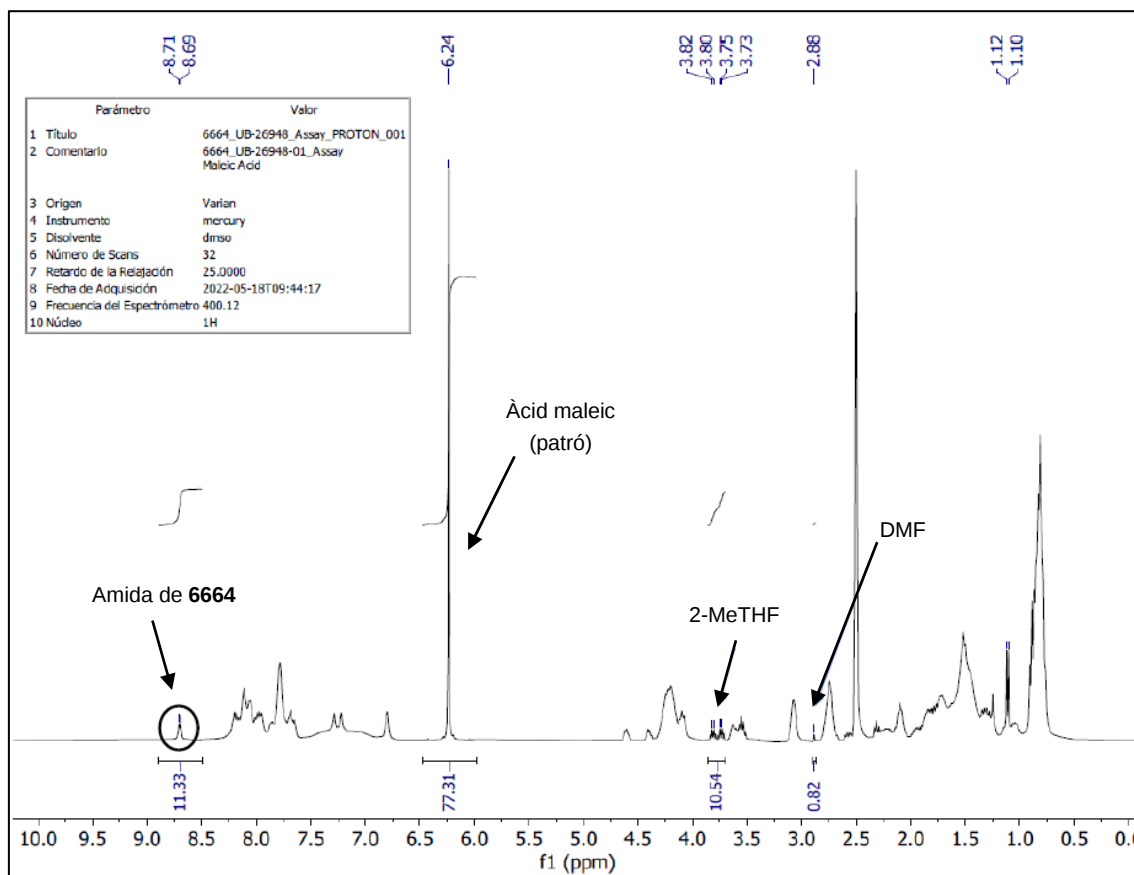


Figura 117. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de **6664_UB-26948-01** amb un patró d'àcid maleic.

Al ^1H -RMN de **6664_UB-26948-01** es va observar un singlet a 1,3 ppm amb una integració que semblava no correspondre a **6664** ni a cap dels dissolvents residuals. Per tant, es va sospitar que podia ser el senyal corresponent al grup ^tBu de la impuresa **^tBu -6664** detectada per HPLC amb un 4,7 %. Mitjançant experiments bidimensionals de (^1H - ^{13}C)-HSQC, es va poder confirmar que el senyal podria correspondre a un grup metil (**Figura 118**). A causa de la gran superposició de senyals a la zona, es va haver de dur a terme una deconvolució (procés matemàtic que desglossa un senyal complex en senyals individuals i calcula les seves àrees respectives) per tal de poder integrar aquesta senyal (**Figura 119**). La impuresa es va quantificar suposant que precipitava també com a trifluoroacetat i considerant la relació molar pèptid protonat/trifluoroacetat determinada per **6664** (**Taula 48**). Les quantificacions es van dur a terme per duplicat per confirmar que els resultats eren reproduïbles.

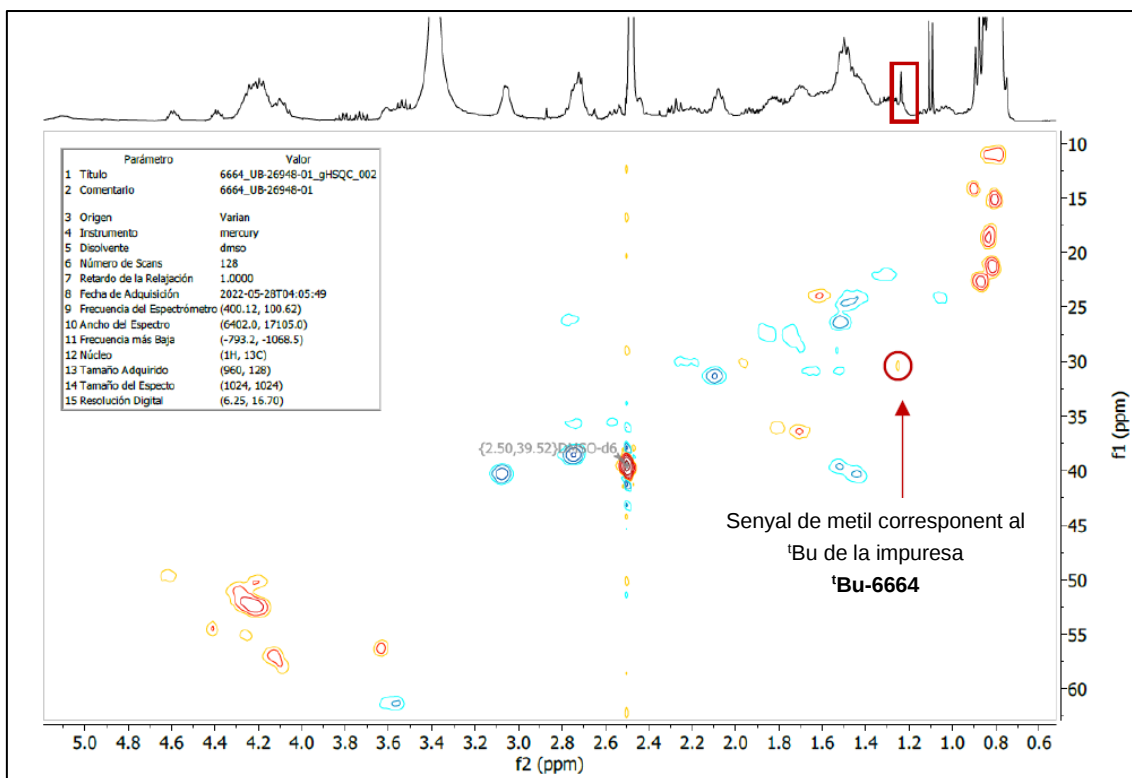


Figura 118. Regió alifàtica de l'espectre de (^1H , ^{13}C)-HSQC (DMSO- d_6) de 6664_UB-26948-01.

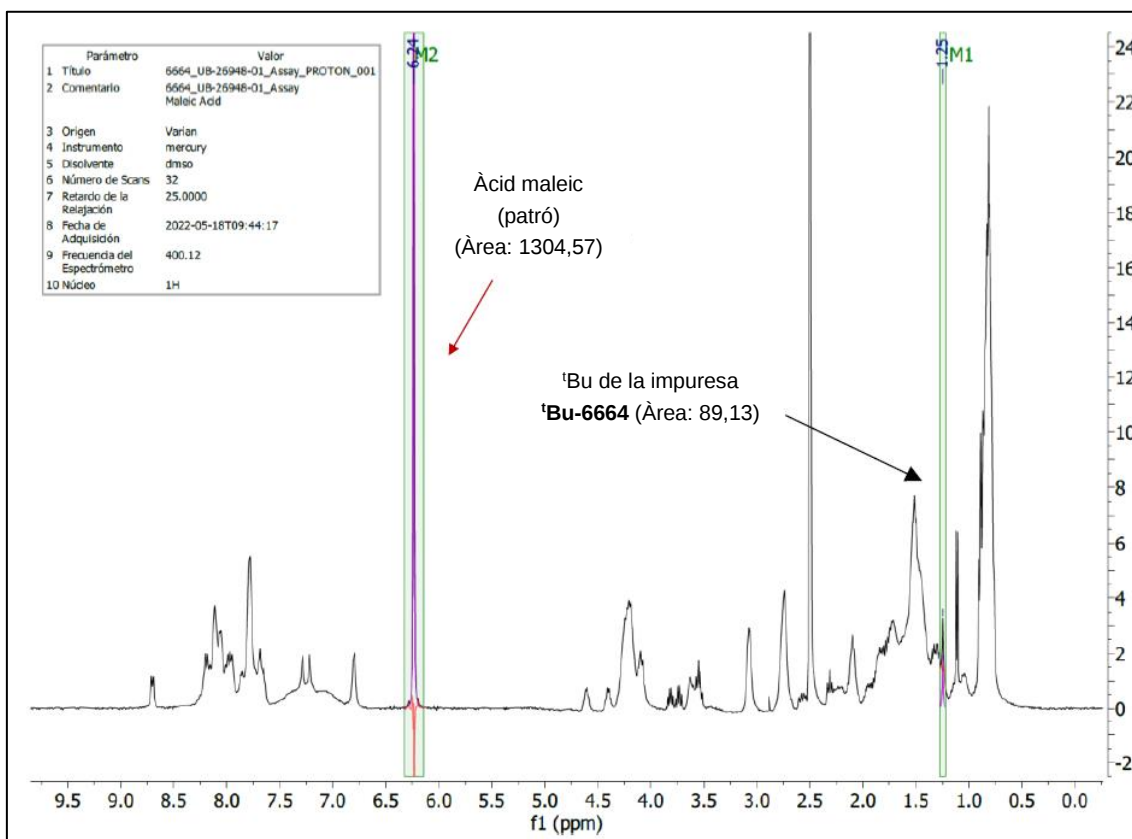


Figura 119. Deconvolució dels senyals per quantificar la impuresa ^1Bu -6664 a l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6664_UB-26948, utilitzant àcid maleic com a patró.

Taula 48. Quantificació per ^1H -RMN (%) de **6664**, **^tBu -6664** i dels dissolvents residuals, en **6664_UB-26948-01**.

Mostra	Dissolvents residuals		6664		^tBu -6664	
	2-MeTHF	DMF	Individual	Mitjana	Individual	Mitjana
1	1,4 %	< 0,1 %	91,4 %	92,2 %	4,8 %	4,7 %
2	1,4 %	< 0,1 %	92,9 %		4,5 %	

Aquests resultats van posar de manifest per **6664** una gran diferència entre la riquesa determinada per ^1H -RMN (92,2 %) i la determinada per HPLC (70,4 %), molt probablement degut a les diferències de factors de resposta cromatogràfics. En aquest sentit, cal esperar que els factors de resposta de **^tBu -6664** i **6664** siguin molt similars, el que explicaria els mateixos percentatges obtinguts per aquest dos productes per ^1H -RMN i per HPLC (4,7 %). La suma dels resultats obtinguts en la quantificació de **6664**, dissolvents residuals i **^tBu -6664** va resultar en un contingut del 98,4 %, deixant aproximadament un 2 % per impureses com per exemple la piperidida de **7005** desprotegit, no observada per ^1H -RMN molt probablement per estar sota el nivell de detecció de la tècnica. Cal destacar també el nombre de pics amb integracions menors que es detecten a l'HPLC (**Figura 115**), però amb una contribució global en massa molt petita segons els resultats de la quantificació per RMN.

En l'espectre de ^1H -RMN de **6664_UB-26948-01** (**Figura 120**), les integracions dels senyals corresponents a **6664** van sumar 150 protons. El nombre real de protons de la base lliure de **6664** són 163, i al descomptar els protons bescanviabls d'amina i hidroxils dels grups COOH, el nombre es reduïa a 151. Encara que la integració és aproximada a causa d'un gran solapament de senyals, el nombre de protons experimentals s'aproximava molt al real, confirmant que no s'observava per ^1H -RMN altres senyals que no fossin de dissolvents o de la impuresa *terc*-butilada (**^tBu -6664**).

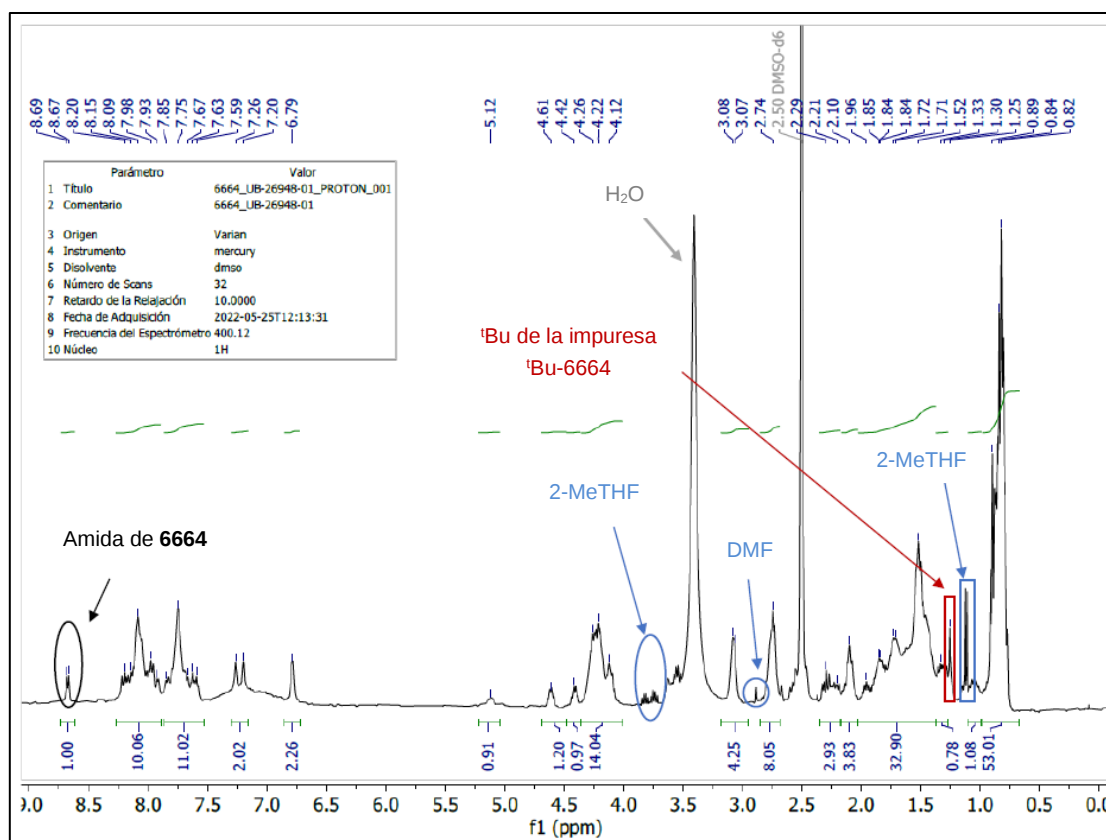


Figura 120. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6664_UB-26948-01.

El laboratori HP-API on s'estava treballant amb la síntesi de **6664** a partir de **7006** es va inhabilitar temporalment per obres, i van quedar 23 g de **7006_UB-26932-01** per a transformar a **FT (6664)**. La puresa determinada per RMN del sòlid corresponent al lot **6664_UB-26948-01** va ser bona (aproximadament del 92 %), però el rendiment d'aquest sòlid va ser baix (62 %). Per tant, abans d'escalar el procés quedaria pendent trobar unes bones condicions per precipitar i filtrar **6664** per a millorar aquest rendiment. Per altra banda, es podria explorar com a alternativa de procés d'obtenció de **6664** l'ús de les condicions de **6664_UB-26944-P5** (Taula 47, apartat 5.6.4.4), on es van assolir el millor resultat de puresa cromatogràfica pel producte desitjat.

5.7. CONCLUSIONS

- El dipèptid desprotegit a l'extrem α -amino **6998** es va obtenir en dues etapes tal com s'indica a continuació. En primer lloc es va preparar en un reactor de 250 mL el dipèptid totalment protegit **6997** a partir de la condensació en solució dels aminoàcids H-Leu-O^tBu·HCl i Fmoc-Cys(Trt)-OH en una relació equimolar i amb una escala de treball que va arribar a 37,7 mmols. Els millors resultats es van aconseguir utilitzant EDC·HCl i HOBt (1,1 eq de cada reactiu) dissolts en DMF (3 vol), i addicionant DIPEA (2,1 eq) en 105 min a -5 °C. A les 2 h de reacció es va canviar de dissolvent a AcOEt i la solució del cru es va rentar amb una solució aquosa d'àcid cítric al 5 %, una solució aquosa sat de NaHCO₃ i H₂O, resultant una solució de **6997** amb un 91,2 % de puresa cromatogràfica. Aquest producte es va utilitzar en la següent etapa sintètica sense aïllar el sòlid de la solució, pel que es va quantificar directament d'aquesta solució per ^1H -RMN, determinant-se 27 g de **6997** (97 % de rendiment). L'eliminació del grup Fmoc de **6997** es va realitzar en

un reactor de 500 mL per tractament amb 4-AMP (5 eq), i a les 20 h de reacció, es van afegir 1,2 eq de 4-AMP més i es va deixar en agitació durant 4 h. El producte es va purificar precipitant amb CO₂ el carbamat de l'adducte FM-AMP i el de 4-AMP en excés, i precipitant amb H₂O (12 vol) una vegada eliminat el dissolvent. Es van obtenir 15,7 g de **6998** d'una puresa cromatogràfica de 99,9 %, amb un rendiment dels dos passos de síntesi del 80 %. El producte es va caracteritzar per ¹H-RMN.

- L'undecapèptid totalment protegit **7003** es va obtenir per acoblament del nonapèptid **7411** (1,0 eq) amb el dipèptid **6998** (1,1 eq) en un reactor de 2 L i a una escala de 23,4 g de nonapèptid. La formació de l'enllaç amida es va portar a terme utilitzant HOAt i HATU (1,1 eq de cada reactiu) dissolts en DMF (26 vol), i addicionant en 30 min una solució de DIPEA (2,1 eq) en DMF (5 vol) a -20 °C. El fragment peptídic es va precipitar a les 4 h amb H₂O (40 vol), el sòlid obtingut es va suspendre en MeCN (10 vol) durant 1,5 h per eliminar excés de **6998** (0,2 % final), i el sòlid resultant es va filtrar, obtenint-se 24 g de **7003** amb un rendiment del 84 % i una puresa cromatogràfica del 97,6 %. L'eliminació del grup Fmoc de l'undecapèptid **7003** per a l'obtenció de **7004** es va dur a terme en un reactor de 500 mL i a escala de 23,0 g, utilitzant piperidina (1,2 eq) en DMF (5 vol) durant 2 h. El producte es va precipitar amb solució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 3 (5 vol) i el sòlid obtingut es va suspendre en MeCN (10 vol), obtenint-se 19 g de **7004** amb un rendiment del 79 % i una puresa cromatogràfica del 94,7 %. Entre les impureses presents al sòlid es van detectar un 1 % de DBF i un 0,2 % de l'adducte de FM-pip.
- L'obtenció de **FT** totalment protegit (**7006**) es va dur a terme per acoblament de l'undecapèptid protegit protegit **7004** (1,0 eq), amb l'hexapèptid protegit **7005** (1,1 eq), en un reactor de 2 L i a escala de 18 g d'undecapèptid, utilitzant condicions similars a les que es van fer servir en la síntesi de l'undecapèptid protegit **7003**. A les 3 h, el producte es va precipitar amb H₂O (40 vol), obtenint-se 26 g de **7006** amb un rendiment del 94 % i una puresa cromatogràfica del 81,8 %. Entre les impureses presents al sòlid es van detectar un 7,7 % de la piperidida de **7005**, molt probablement procedent de la reacció de **7005** amb piperidina romanent al sòlid de **7004** procedent de l'eliminació del grup Fmoc de **7003**.
- El producte final **FT** (**6664**) es va obtenir com a pentatrifluoroacetat per desprotecció total de **7006**. La reacció es va dur a terme en un reactor de 100 mL a escala d'1,0 g de **7006** utilitzant TFA/TES/1-octanol (40:10:50, 40 vol) durant 5 h i precipitació amb 2-MeTHF (80 vol), obtenint-se 0,4 g de producte desitjat amb una puresa cromatogràfica del 70,4 %, acompanyat d'un 5,2 % de piperidida de **7005** totalment desprotegit i un 4,7 % de **^tBu-6664** determinats per HPLC. La quantificació del producte al sòlid per ¹H-RMN va donar un 92,2 % de riquesa. A causa dels requisits de seguretat i la disponibilitat limitada del laboratori per manipular aquest tipus de productes (HP-API's), no es va poder augmentar l'escala de treball, quedant 23 g de precursor de **FT** per desprotegir.

6. OBSERVACIONS FINALS

En aquesta Tesi Doctoral s'ha avançat en l'escalat de la síntesi en fase sòlida del pèptid bioactiu **FT** mitjançant una estratègia convergent. Aquest projecte, fruit d'una col·laboració entre la Universitat de Barcelona i l'empresa Esteve Química, es va iniciar amb un treball de Tesi precedent desenvolupat a la Universitat de Barcelona, que va permetre posar a punt la metodologia a escala de laboratori (5 g de resina 2-CTC inicials). A la present Tesi, desenvolupada a les instal·lacions d'Esteve Química, s'han pogut preparar fragments peptídics protegits a una escala de 42 g de resina 2-CTC inicials, el que ha permès arribar fins a 26 g de heptadecapèptid bioactiu totalment protegit amb un excel·lent rendiment i una bona puresa cromatogràfica (0,2 g a escala de laboratori en els estudis precedents).

La quantitat de precursor obtinguda en aquesta Tesi suposa uns 18 g teòrics de pèptid bioactiu considerant una desprotecció quantitativa de la cadena peptídica. Malauradament, únicament es van poder transformar 3 g de precursor protegit de **FT** al pèptid d'interès **FT** per falta de temps i disponibilitat del laboratori de HP-APIs a l'empresa. Tenint en compte que la dosi de pèptid bioactiu són 2,5 mg, la quantitat obtinguda amb la ruta sintètica desenvolupada representaria una quantitat de 7200 vacunes. En aquest sentit, els resultats obtinguts des d'un punt de vista metodològic indiquen que amb aquesta ruta sintètica es podria augmentar l'escala sense massa dificultat fins a uns nivells de producció compatibles amb les exigències del mercat.

A dia d'avui, el **FT** encara no ha estat aprovat per la FDA ja que falten dades de seguretat a llarg termini del pèptid bioactiu. Per altra banda, durant el desenvolupament d'aquest projecte, els interessos logístics d'Esteve Química han anat canviant i actualment un dels objectius de l'empresa és treballar per a tercers, pel que molt probablement el pèptid bioactiu que s'ha estudiat en aquest projecte no es produeixi a les instal·lacions d'Esteve Química. No obstant això, s'han aportat a l'empresa els coneixements suficients per poder plantejar una estratègia adequada per dur a terme la síntesi en fase sòlida, no únicament de pèptids, sinó de qualsevol producte orgànic i el seu escalat, el que obre les portes a l'empresa a noves estratègies de síntesi per satisfer les necessitats dels clients.

7. REFERÈNCIES

1. Góngora-Benítez, M., Tulla-puche, J. & Albericio, F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. *Chem. Rev.* **114**, 901–926 (2014).
2. Sewald, N. & Jakubke, H. *Peptides: Chemistry and Biology*. (Wiley-VCH, 2009).
3. Hruby, V. J. Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 847–858 (2002).
4. Fosgerau, K. & Hoffmann, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discov. Today* **20**, 122–128 (2015).
5. Wang, L. *et al.* Therapeutic peptides: Current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 1-27 (2022).
6. Imai, K. & Takaoka, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 714–727 (2006).
7. Smith, M. C. & Gestwicki, J. E. Features of protein – protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity. *Expert Rev Mol Med* **14**, 1–20 (2012).
8. Hamman, J. H., Enslin, G. M. & Kotzé, A. F. Oral delivery of peptide drugs: Barriers and developments. *BioDrugs* **19**, 165–177 (2005).
9. Henninot, A., Collins, J. C. & Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem* **61**, 1382–1414 (2018).
10. Smith, A. J. New horizons in therapeutic antibody discovery: opportunities and challenges versus small-molecule therapeutics. *J Biomol Screen.* **20**, 437–453 (2015).
11. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatisky, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* **15**, 40–56 (2010).
12. Wang, J., Yadav, V., Parry, A., Tajiri, S. & Basit, A. W. Toward Oral Delivery of Biopharmaceuticals: An Assessment of the Gastrointestinal Stability of 17 Peptide Drugs. *Mol. Pharm* **12**, 966–973 (2015).
13. Davda, J. *et al.* Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics. *J ImmunoTher. Cancer* **7**, 1–9 (2019).
14. Renukuntla, J., Dutt, A., Patel, A., Boddu, S. H. S. & Mitra, A. K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* **447**, 75–93 (2013).
15. Abhishek & Kanugo, A. M. New and novel approaches for enhancing the oral absorption and bioavailability of protein and peptides therapeutics. *Ther Deliv.* **11**, 713–732 (2020).
16. Rang, H. P. & Hill, R. G. Chapter 14 - Drug development: introduction. *in Drug Discovery and Development*. 203-209 (Elsevier, 2012).
17. De La Torre, B. G. & Albericio, F. The pharmaceutical industry in 2016. An analysis of FDA drug approvals from a perspective of the molecule type. *Molecules* **22**, 1–6 (2017).
18. De La Torre, B. G. & Albericio, F. The pharmaceutical industry in 2017. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules* **23**, 1–8 (2018).
19. De la Torre, B. G. & Albericio, F. The pharmaceutical industry in 2018. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules* **24**, 1–12 (2019).
20. De la Torre, B. G. & Albericio, F. The Pharmaceutical Industry in 2019. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules* **25**, 1–13 (2020).

21. De la Torre, B. G. & Albericio, F. The Pharmaceutical Industry in 2020. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules* **26**, 1–14 (2021).
22. De la Torre, B. G. & Albericio, F. The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules* **27**, 1–15 (2022).
23. Torre, B. G. De & Albericio, F. The Pharmaceutical Industry in 2022: An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules* **28**, 1–13 (2023).
24. De la Torre, B. G. & Albericio, F. Peptide therapeutics 2.0. *Molecules* **25**, 1–3 (2020).
25. Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F. & de la Torre, B. G. 2019 FDA TIDES (Peptides and oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **13**, 1–16 (2020).
26. Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F. & de la Torre, B. G. 2020 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **14**, 1–14 (2021).
27. Al Shaer, D. Al, Musaimi, O. Al, Albericio, F. & Torre, B. G. De. 2021 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **27**, 1–15 (2022).
28. Al Musaimi, O., Al Shaer, D., Albericio, F. & de la Torre, B. G. 2022 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **16**, 1–10 (2023).
29. Ziada, A., Rosenblum, M. & Crawford, E. D. Benign prostatic hyperplasia: An overview. *Urology* **53**, 1–6 (1999).
30. Roehrborn, C. G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int. J. Impot. Res.* **20**, S11–S18 (2008).
31. Berry, S. J., Coffey, D. S., Walsh, P. C. & Ewing, L. L. The Development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol.* **132**, 474–479 (1984).
32. Chughtai, B. *et al.* Benign prostatic hyperplasia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 1–15 (2016).
33. Shore, N. NX-1207: A novel investigational drug for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 305–310 (2010).
34. Lepor, H. Alpha-blockers for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol. Clin. North Am.* **43**, 311–323 (2016).
35. Lythgoe, C. & McVary, K. T. The use of PDE-5 inhibitors in the treatment of lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia. *Curr. Urol. Rep.* **14**, 585–594 (2013).
36. Naslund, M. J. & Miner, M. A review of the clinical efficacy and safety of 5 α -reductase inhibitors for the enlarged prostate. *Clin. Ther.* **29**, 17–25 (2007).
37. AUA. AUA Guideline on the Management of Benign Prostatic Hyperplasia: Chapter 3: Results of the Treatment Outcomes Analyses. *J. Urol.* **170**, 1-86 (2003).
38. Miernik, A. & Gratzke, C. Current Treatment for Benign Prostatic Hyperplasia. *Dtsch Arztebl Int.* **117**, 843–854 (2020).
39. Shore, N. & Cowan, B. The potential for NX-1207 in benign prostatic hyperplasia: An update for clinicians. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2**, 377–383 (2011).
40. Shore, N., Tutrone, R. & Roehrborn, C. . Efficacy and safety of fexapotide triflutate in outpatient medical treatment of male lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia. *Ther. Adv. Urol.* **11**, 1–16 (2019).
41. Shore, N. *et al.* Fexapotide triflutate: results of long-term safety and efficacy trials of a novel injectable therapy for symptomatic prostate enlargement. *World J. Urol.* **36**, 801–809 (2018).

42. Shore, N. *et al.* Prospective evaluation of fexapotide trifluate injection treatment of Grade Group 1 prostate cancer: 4 - year results. *World J. Urol.* **38**, 3101-3111 (2020).
43. Averbach, P. A. & Gemmell, J. Peptides effective in the treatment of tumors and other conditions requiring the removal or destruction of cells. WO 2003/008444 (2007).
44. du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, Carleton W & Katsoyannis, P. G. The synthesis of Oxitocin. *J. Am. Chem. Soc.* **303**, 3115–3121 (1954).
45. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
46. Hipkiss, A. R. & Brownson, C. A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 747–753 (2000).
47. Tian, Y., Zhou, Y., Elliott, S., Aebersold, R. & Zhang, H. Solid-phase extraction of N-linked glycopeptides. *Nat. Protoc.* **2**, 334–339 (2007).
48. Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X. & Vulfson, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzym. Microb. Technol.* **18**, 162–183 (1996).
49. Katzen, F., Chang, G. & Kudlicki, W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* **23**, 150–156 (2005).
50. Carver, A. *et al.* Expression of human $\alpha 1$ antitrypsin in transgenic sheep. *Cytotechnology* **9**, 77–84 (1992).
51. Cunningham, C. & Porter, A. J. R. *Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds*. (Humana Press, 1998).
52. Feliu, J. A., de Mas, C. & López-Santín, J. Studies on papain action in the synthesis of Gly-Phe in two-liquid-phase media. *Enzym. Microb. Technol.* **17**, 882–887 (1995).
53. Kumar, D. & Bhalla, T. C. Microbial proteases in peptide synthesis: Approaches and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 726–736 (2005).
54. Sultan, S., Huma, N., Butt, M. S., Aleem, M. & Abbas, M. Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A Contemporary Perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 105–115 (2018).
55. Conibear, A. C., Watson, E. E., Payne, R. J. & Becker, C. F. W. Native chemical ligation in protein synthesis and semi-synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 9046–9068 (2018).
56. Hirasawa, S. *et al.* Facile and Efficient Chemoenzymatic Semisynthesis of Fc-Fusion Compounds for Half-Life Extension of Pharmaceutical Components. *Bioconjug. Chem.* **30**, 2323–2331 (2019).
57. Sampaio de Oliveira, K. B. *et al.* Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **13**, 367–390 (2020).
58. Zompra, A. A., Galanis, A. S., Werbitzky, O. & Albericio, F. Manufacturing peptides as active pharmaceutical ingredients. *Future Med. Chem.* **1**, 361–377 (2009).
59. Duran, M. Desenvolupament de processos per a la síntesi de pèptids d'interès terapèutic a escala industrial. (Tesi Doctoral - Universitat de Barcelona, 2021).
60. Bodanszky, M. *Principles of peptide synthesis*. (Springer-Verlag, Berlin, 1984).
61. Cherkupally, P. *et al.* Solid-phase peptide synthesis (SPPS), C-terminal vs. side-chain anchoring: A reality or a myth. *Amino Acids* **46**, 1827–1838 (2014).
62. Thieriet, N., Guibé, F. & Albericio, F. Solid-phase peptide synthesis in the reverse (N $\rightarrow$

- C) direction. *Org. Lett.* **2**, 1815–1817 (2000).
63. Alsina, J., Kates, S. A., Barany, G. & Albericio, F. Backbone amide linker strategies for the solid-phase synthesis of C-terminal modified peptides. *Methods Mol. Biol.* **298**, 195–208 (2005).
 64. Houen, G. *Peptide antibodies: Methods and protocols*. (Humana Press, 2015).
 65. Guillier, F., Orain, D. & Bradley, M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **100**, 2091–2157 (2000).
 66. Tulla-Puche, J. et al. Methods for the peptide synthesis and analysis. in *Peptide Chemistry and Drug Design*. 11-73 (John Wiley & Sons, Inc., 2015).
 67. Tulla-Puche, J. & Albericio, F. *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*. (Wiley-VCH, 2008).
 68. Bayer, E. & Rapp, W. Polystyrene-Immobilized PEG Chains. in *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry*. 325-345 (Springer Science+Business Media, 1992).
 69. García, F. et al. ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *J. Comb. Chem.* **8**, 213–220 (2006).
 70. Songster, M. & Barany, G. Handles for solid-phase peptides synthesis. *Methods Enzym.* **289**, 126–174 (1997).
 71. Gongora-Benitez, M., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. Handles for Fmoc solid-phase synthesis of protected peptides. *ACS Comb. Sci.* **15**, 217–228 (2013).
 72. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D. & Stavropoulos, G. 2-Chlorotriyl chloride resin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **37**, 513–520 (1991).
 73. Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **28**, 3787–3790 (1987).
 74. Sheppard, R. C. & Williams, B. J. Acid-labile resin linkage agents for use in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **20**, 451–454 (1982).
 75. Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*. (CRC Press, 2000).
 76. George B & Fernando A. A Three-Dimensional Orthogonal Protection Scheme for Solid-Phase Peptide Synthesis under Mild Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 4936–4942 (1985).
 77. El-Faham, A. & Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **111**, 6557–6602 (2011).
 78. Sheehan, J. C. & Hess, G. P. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1067–1068 (1955).
 79. Williams, A. & Ibrahim, I. T. Carbodiimide Chemistry: Recent Advances. *Chem. Rev.* **81**, 589–636 (1981).
 80. Carpino, L. A. & El-Faham, A. The Diisopropylcarbodiimide/ 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole System: Segment Coupling and Stepwise Peptide Assembly. *Tetrahedron Lett.* **55**, 6813–6830 (1999).
 81. Dunetz, J. R., Magano, J. & Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* **20**, 140–177 (2016).
 82. König, W. & Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen.

- Chem. Ber.* **103**, 788–798 (1970).
83. Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4397–4398 (1993).
 84. Valeur, E. & Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 606–631 (2009).
 85. Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G. & Selve, C. Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **16**, 1219–1222 (1975).
 86. Coste, J., Lenguyen, D. & Castro, B. PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetra* **31**, 205–208 (1990).
 87. Albericio, F., Bofill, J. M., El-Faham, A. & Kates, S. A. Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **63**, 9678–9683 (1998).
 88. Albericio, F. *et al.* On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **38**, 4853–4856 (1997).
 89. Dourtoglou, V., Ziegler, J. C. & Gross, B. L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron Lett.* **19**, 1269–1272 (1978).
 90. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. & Gillessen, D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **30**, 1927–1930 (1989).
 91. Carpino, L. A., El-Faham, A. & Albericio, F. Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Lett.* **35**, 2279–2282 (1994).
 92. Benoiton, N. L. 2-Alkoxy-5(4H)-oxazolones and the Enantiomerization of N-Alkoxycarbonylamino Acids. *BIOP* **40**, 245–254 (1996).
 93. McKay, F. C. & Albertson, N. F. New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4686–4950 (1957).
 94. Carpino, L. A. & Mansour, E. M. E. The 2-Methylsulfonyl-3-phenyl-1-prop-2-enyloxycarbonyl (Mspoc)Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **64**, 8399–8401 (1999).
 95. Carpino, L. A., Ionescu, D. & El-faham, A. Peptide Coupling in the Presence of Highly Hindered Tertiary Amines. *J. Org. Chem.* **61**, 2460–2465 (1996).
 96. Yang, Y. Peptide Racemization. in *Side Reactions in Peptide Synthesis*. 257–292 (Elsevier, 2016).
 97. Kovacs, J. & Hsieh, Y. Racemization mechanism of cysteine dipeptide active ester derivatives. *J. Org. Chem.* **47**, 4996–5002 (1982).
 98. Musiol, H. -J, Siedler, F., Quarzago, D. & Moroder, L. Redox-active bis-cysteinyl peptides. I. Synthesis of cyclic cystinyl peptides by conventional methods in solution and on solid supports. *Biopolymers* **34**, 1553–1562 (1994).
 99. Sieber, P. An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tetrahedron Lett.* **28**, 6147–6150 (1987).
 100. Stewart, J. M. Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* **289**, 29–44 (1997).
 101. Muttenthaler, M., Albericio, F. & Dawson, P. E. Methods, setup and safe handling for anhydrous hydrogen fluoride cleavage in Boc solid-phase peptide synthesis. *Nat. Protoc.* **10**, 1067–1083 (2015).

102. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. Lou & Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **30**, 2739–2742 (1989).
103. Borgia, J. A. & Fields, G. B. Chemical synthesis of proteins. *Trends Biotechnol.* **18**, 243–251 (2000).
104. Quibell, M., Johnson, T. & Packman, L. C. Synthesis of the 3-Repeat Region of Human Tau-2 by the Solid Phase Assembly of Backbone Amide-Protected Segments. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11656–11668 (1995).
105. Pedroso, E. *et al.* Convergent solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of protected segments on a hydroxymethylphenyloxymethyl resin using the base labile Fmoc alpha-amine protection. Model synthesis of LHRH. *Tetrahedron* **38**, 1183–1192 (1982).
106. Isidro-Llobet, A. *et al.* Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production. *J. Org. Chem.* **84**, 4615–4628 (2019).
107. Bruckdorfer, T., Marder, O. & Albericio, F. From Production of Peptides in Milligram Amounts for Research to Multi- Tons Quantities for Drugs of the Future. *Curr Pharm Biotechnol* **5**, 29–43 (2004).
108. Andersson, L. *et al.* Large-Scale Synthesis of Peptides. *Biopolymers* **55**, 227–250 (2000).
109. Bray, B. L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 587–593 (2003).
110. Teruel, C. Desenvolupament de mètodes analítics pel seguiment de les reaccions en síntesi de pèptids en fase sòlida. (Màster - Universitat Autònoma de Barcelona, 2018).
111. Barlos, K., Gatos, D. & Schäfer, W. Synthesis of Prothymosin α (ProT α)—a Protein Consisting of 109 Amino Acid Residues. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **30**, 590–593 (1991).
112. Colombo, R., Atherton, E., Sheppard, R. C. & Woolley, V. 4-Chloromethylphenoxyacetyl polystyrene and polyamide supports for solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **21**, 118–126 (1983).
113. Rovero, P., Viganò, S., Pegoraro, S. & Quartara, L. Synthesis of the bradykinin B1 antagonist [desArg10]HOE 140 on 2-chlorotrityl resin. *Lett. Pept. Sci.* **2**, 319–323 (1996).
114. Chiva, C., Vilaseca, M., Giralt, E. & Albericio, F. An HPLC-ESMS study on the solid-phase assembly of C-terminal proline peptides. *J. Pept. Sci.* **5**, 131–140 (1999).
115. Ralhan, K., Krishnakumar, V. G. & Gupta, S. Piperazine and DBU: a safer alternative for rapid and efficient Fmoc deprotection in solid phase peptide synthesis. *RSC Adv.* **5**, 104417–104425 (2015).
116. Kaiser, E., Colese, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595–598 (1970).
117. Alshanski, I. *et al.* Enhancing the Efficiency of the Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) Process by High Shear Mixing. *Org. Process Res. Dev.* **22**, 1318–1322 (2018).
118. Suzuki, R. & Konno, H. Stain Protocol for the Detection of N-Terminal Amino Groups during Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **22**, 3309–3312 (2020).
119. Yang, Y. Redundant Amino Acid Coupling Side Reactions. in *Side Reactions in Peptide Synthesis*. 235–256 (Elsevier, 2016).
120. Subirós-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A. & Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and

- HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. Eur.* **15**, 9394–9403 (2009).
121. Gilon, C., Dechantsreiter, M. A., Burkhart, F., Friedler, A. & Kessler, H. 10.1 Synthesis of N-Alkylated Peptides. in *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry. Vol. E 22c, 4th Edition Supplement* (Thieme Medical Publishers, 2004).
 122. Pu, Y. J. *et al.* A practical method for functionalized peptide or amide bond formation in aqueous ethanol media with EDC as activator. *Org. Process Res. Dev.* **13**, 310–314 (2009).
 123. Nishiuchi, Y. & Kimura, T. Processes for removing dibenzofulvene. WO 2010/016551 (2014).
 124. Atherton, E., Logan, C. J. & Sheppard, R. C. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for Solid-phase Synthesis using N-Fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on Polyamide Supports. Synthesis of Substance P and of Acyl Carrier Protein 65-74 Decapeptide. *J. Chem. Soc.* **1**, 538–546 (1981).
 125. Sheppeck, J. E., Kar, H. & Hong, H. A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. *Tetrahedron Lett.* **41**, 5329–5333 (2000).
 126. Shailubhai, K. *et al.* Ultra-pure agonists of guanylate cyclase C, method of making and using same. WO 2014/197720 (2014).
 127. Carpino, L. A., Mansour, E. M. E. & Knapczyk, J. Piperazino-Functionalized Silica Gel as a Deblocking-Scavenging Agent for the 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **48**, 666–669 (1983).
 128. Carpino, L. A. *et al.* Rapid, continuous solution-phase peptide synthesis: Application to peptides of pharmaceutical interest. *Org. Process Res. Dev.* **7**, 28–37 (2003).
 129. Belli Dell’Amico, D., Calderazzo, F., Labella, L., Marchetti, F. & Pampaloni, G. Converting Carbon Dioxide into Carbamate Derivatives. *Chem. Rev.* **103**, 3857–3897 (2003).
 130. Heldebrant, D. J., Jessop, P. G., Thomas, C. A., Eckert, C. A. & Liotta, C. L. The reaction of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) with carbon dioxide. *J. Org. Chem.* **70**, 5335–5338 (2005).
 131. Isidro-Ilobet, A., Álvarez, M. & Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **109**, 2455–2504 (2009).
 132. Yang, Y. Peptide Global Deprotection/Scavenger-Induced Side Reactions. in *Side Reactions in Peptide Synthesis*. 43–75 (Elsevier, 2016).
 133. Diamantis, N. & Banerji, U. Antibody-drug conjugates - An emerging class of cancer treatment. *Br. J. Cancer* **114**, 362–367 (2016).

PART EXPERIMENTAL

8. PART EXPERIMENTAL

8.1. MATERIALS

8.1.1. DISSOLVENTS I REACTIUS

Taula 49. Dissolvents i reactius utilitzats en aquesta Tesi.

Producte	Marca
Acetona	Cepsa
Àcid cítric	Jungbunzlauer
Àcid maleic	Sigma Aldrich
AcOEt	Ineos Oxide
Aminoàcids	Fondchem
4-AMP	Sigma Aldrich
CDCl ₃	VWR Chemicals
CO ₂ gas	Praxair / Nippon gases
DBU	Fluka
DCM	Kem-One
DIC	Thermo Scientific Chemicals
DIPEA	Alfa Aesar / Sigma Aldrich
DMF	Basf SE
DMF qualitat anàlisi	Scharlau
DMSO-d ₆	Euristop
EDC·HCl	Sigma Aldrich
EDT	Sigma Aldrich
EtOH	Ineos Chemical
HATU	Sigma Aldrich
Heptà	Cepsa
HOBt·H ₂ O	Sigma Aldrich
HOAt	TRC Canada
IPA	Novapex
MeCN	Imperial Chemical Corp.

Producte	Marca
MeCN qualitat anàlisi	Sigma Aldrich
MeOD	VWR Chemicals
MeOH	Sabic
2-MeTHF	Jiangsu Quingquan Chem
NaCl	Bras del Port
NaHCO ₃	Solvay
NaH ₂ PO ₄	Honeywell Fluka
Na ₂ SO ₄ anh	Scharlau
Resina 2-CTC	Irish-Biotech
1-octantiol	Merck
Piperidina	Sigma Aldrich
TAEA	Sigma Aldrich
TBME	Dor Chemicals
TES	Thermo Scientific Chemicals
TFA	Sigma Aldrich
TIPS	Sigma Aldrich
Toluè	Cepsa

8.2. INSTRUMENTACIÓ

8.2.1. INSTRUMENTACIÓ GENERAL

Taula 50. Instruments utilitzats en aquesta Tesi.

Instrument	Marca	Model
Aïllador HP-APIs	ProSys®	6001/166
Agitador magnètic	IKA	RET basic
Balança analítica amb precisió de 0,01 mg	Mettler Toledo	XP205 / XS603S / XPE205
Balança granatària	Mettler Toledo	XP40025
Bany d'ultrasons	Branson	2510
Cabina Safetech	Safetech®	ST1-1200 T
Criostat	Huber	Ministat 240
Dessecador	J.P. SELECTA®	Vacuo-Temp
HPLC	Hitachi Lachrom	Elite
	Agilent	1100/1200/1260 Series
HPLC-MS	Agilent	1200/1260 Series
Nutsche	GFD®Lab	050 series
Motor agitador mecànic	IKA	RW 20 digital
Reactors	Línealab	50 mL, 100 mL, 150 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L i 2 L
RMN	Varian Mercury	400 MHz
Rotavapor	BUCHI	R-200
Pales de tefló abatibles	BOLA	C377-04 / C377-10
QTOF	Bruker	MaXis Impact
Sistema de purificació de l'aigua	Millipore	Milli-Q Plus Water Purification
Trampa iònica	Agilent	6320
UV-Vis	Varian	Cary 100

8.2.2. INSTRUMENTACIÓ PER MANIPULAR SÒLIDS HP-APIs

El producte desitjat en la present Tesi Doctoral, **FT (6664)**, i el seu precursor, **FT protegit (7006)**, van ser considerats productes HP-APIs. Per aquesta raó, la manipulació d'aquests productes en estat sòlid es va dur a terme en l'aïllador ProSys® (**Figura 121**), una cabina tancada amb guants en la qual es treballa en un medi de contenció constant i intrínsecament segur que permet aïllar les substàncies HP-API en estat sòlid. El flux d'aire que passa a través de l'aïllador, desplaça per complet tot el volum intern de la càmera principal i es mesura en renovacions/h.



Figura 121. Aïllador ProSys®.

1. Càmera principal: Treballa a -100 Pa respecte la sala i l'atmosfera interior pot ser d'aire o de nitrogen, segons convingui.
2. Càmera airlock: Compartiment d'entrada de material i substàncies químiques, és un compartiment que fa de càmera intermèdia entre l'interior i l'exterior de l'aïllador.
3. Continuous liner: Espai per la sortida del material i residus des de l'interior de l'aïllador a l'exterior, de forma segura. Consisteix en un cilindre acoblat a una bossa de plàstic que tanca hermèticament amb una junta i unes pinces.
4. RTP (Rapid Transfer Port): Recipient cilíndric per la extracció segura de material i substàncies químiques.
5. Pantalla HMI (Human Machine Interface): Pantalla de control i comunicació de l'usuari amb l'aïllador.
6. LOP (Local Operator Control Panel): Panell de control local on s'ubiquen els indicadors diferencials de pressió.
7. Ventilador.

La cabina Safetech (**Figura 122**) és una cabina d'extracció amb un alt grau de contenció, dedicada a pesades o manipulacions de productes HP-APIs en petites quantitats de sòlid (≤ 10 g), dissolucions o suspensions. Es caracteritzen per disposar d'un flux d'aire laminar sense

turbulències, filtre captador de partícules d'alta eficiència (HEPA) de canvi segur, sistema de residus sòlids integrat, alarmes per assegurar el bon funcionament i base de granit per assegurar la precisió de la pesada.



Figura 122. Cabina Safetech®.

8.3. CROMATOGRAFIA

8.3.1. CROMATOGRAFIA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC)

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) es va dur a terme utilitzant diferents instruments:

- Sistema HPLC Hitachi Lachrom Elite que consta de bomba quaternària (L-2130) amb desgasificador en línia, injector de mostres automàtic (L-2200), forn per a columnes (L-2300), detector PDA-UV (L-2400) i software cromatogràfic (EZChrome).
- Sistema HPLC Agilent de la sèrie 1100 que consta de bomba quaternària (sèrie 1100) amb desgasificador en línia, injector de mostres automàtic (sèrie 1100), forn per a columnes (sèrie 1100), detector dual de longitud d'ona variable (sèrie 1100) i software cromatogràfic (OpenLAB).
- Sistema HPLC Agilent de la sèrie 1260 que consta de bomba quaternària (sèrie 1260) amb desgasificador en línia, injector de mostres automàtic (sèrie 1260), forn per a columnes (sèrie 1260), detector dual de longitud d'ona variable (sèrie 1260) i software cromatogràfic (OpenLAB).

8.3.2. CROMATOGRAFIA D'ALTA RESOLUCIÓ ACOBLAT A DETECTOR DE MASSES (HPLC-MS)

- La cromatografia líquida d'alta resolució acoblat a detector de masses es va dur a terme utilitzant un sistema HPLC Agilent de la sèrie 1200 que consta de bomba quaternària (sèrie 1200) amb desgasificador en línia, injector de mostres automàtic (sèrie 1200), forn per a columnes (sèrie 1200), detector PDA-UV (sèrie 1200), software cromatogràfic ChemStation i acoblat a una trampa iònica MSD 6320 Agilent amb software d'adquisició de masses LCMSD Control.
- La cromatografia líquida d'alta resolució acoblat a detector de masses d'alta resolució es va dur a terme utilitzant un sistema HPLC Agilent de la sèrie 1260 que consta de bomba quaternària (sèrie 1260) amb desgasificador en línia, injector de mostres automàtic (sèrie 1260), forn per a columnes (sèrie 1260), detector dual de longitud d'ona variable (sèrie 1260), software cromatogràfic Hystar i acoblat a un analitzador de masses d'alta resolució de la marca Bruker, model MaXis Impact HD QTOF amb software d'adquisició de masses otofControl.

8.3.3. MÈTODES ANALÍTICS

Taula 51. Condicions cromatogràfiques: **Mètode A.**

Columna	Aeris WIDEPORE C4 150 mm x 4,6 mm, 3,6 µm, 200 Å.																						
Fase mòbil	A: 0,036 % TFA en MeCN																						
	B: 0,045 % TFA en H ₂ O																						
Gradient																							
<table><tr><td>Temps (min)</td><td>% A</td><td>% B</td></tr><tr><td>Inicial</td><td>5,0</td><td>95,0</td></tr><tr><td>2,0</td><td>5,0</td><td>95,0</td></tr><tr><td>30,0</td><td>100,0</td><td>0,0</td></tr><tr><td>40,0</td><td>100,0</td><td>0,0</td></tr><tr><td>41,0</td><td>5,0</td><td>95,0</td></tr><tr><td>50,0</td><td>5,0</td><td>95,0</td></tr></table>			Temps (min)	% A	% B	Inicial	5,0	95,0	2,0	5,0	95,0	30,0	100,0	0,0	40,0	100,0	0,0	41,0	5,0	95,0	50,0	5,0	95,0
Temps (min)	% A	% B																					
Inicial	5,0	95,0																					
2,0	5,0	95,0																					
30,0	100,0	0,0																					
40,0	100,0	0,0																					
41,0	5,0	95,0																					
50,0	5,0	95,0																					
Cabal	1,0 mL/min																						
Volum d'injecció	10,0 µL																						
Temperatura columna	30 °C																						
Temperatura autosampler	20 °C																						
Longitud d'ona de detecció	220 nm																						
Diluent mostra	DMF																						

Taula 52. Condicions cromatogràfiques: **Mètode B.**

Columna	ACE C4 150 mm x 4.6 mm, 3.0 μm. 100 Å		
Fase mòbil	A: MeCN		
	B: 10 mM CH3COONH4 pH 3,1		
Gradient			
	Temps (min)	% A	% B
	Inicial	30,0	70,0
	2,0	30,0	70,0
	15,0	100,0	0,0
	20,0	100,0	0,0
	21,0	30,0	70,0
	25,0	30,0	70,0
Cabal	1,0 mL/min		
Volum d'injecció	5,0 μL		
Temperatura columna	25 °C		
Temperatura autosampler	20 °C		
Longitud d'ona de detecció	254 nm		
Diluent mostra	MeCN		

Taula 53. Condicions cromatogràfiques: **Mètode C.**

Columna	Aeris PEPTIDE XB-C18 150 mm x 3,0 mm, 2,6 µm, 100 Å																										
Fase mòbil	A: 0,036 % TFA en MeCN																										
	B: 0,045 % TFA en H ₂ O																										
Gradient																											
<table><tr><td>Temps (min)</td><td>% A</td><td>% B</td></tr><tr><td>Inicial</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr><tr><td>1,0</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr><tr><td>15,0</td><td>30,0</td><td>70,0</td></tr><tr><td>40,0</td><td>45,0</td><td>55,0</td></tr><tr><td>41,0</td><td>45,0</td><td>55,0</td></tr><tr><td>41,5</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr><tr><td>45,0</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr></table>				Temps (min)	% A	% B	Inicial	20,0	80,0	1,0	20,0	80,0	15,0	30,0	70,0	40,0	45,0	55,0	41,0	45,0	55,0	41,5	20,0	80,0	45,0	20,0	80,0
Temps (min)	% A	% B																									
Inicial	20,0	80,0																									
1,0	20,0	80,0																									
15,0	30,0	70,0																									
40,0	45,0	55,0																									
41,0	45,0	55,0																									
41,5	20,0	80,0																									
45,0	20,0	80,0																									
Cabal	0,4 mL/min																										
Volum d'injecció	10,0 µL																										
Temperatura columna	25 °C																										
Temperatura autosampler	20 °C																										
Longitud d'ona de detecció	210 nm																										
Diluent mostra	DMF																										

Taula 54. Condicions cromatogràfiques: **Mètode D.**

Columna	Aeris PEPTIDE XB-C18 150 mm x 3,0 mm, 2,6 μm, 100 Å																									
Fase mòbil	A: 0,036 % TFA en MeCN																									
	B: 0,045 % TFA en H ₂ O																									
Gradient																										
<table><tr><th>Temps (min)</th><th>% A</th><th>% B</th></tr><tr><td>Inicial</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr><tr><td>1,0</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr><tr><td>15,0</td><td>30,0</td><td>70,0</td></tr><tr><td>40,0</td><td>45,0</td><td>55,0</td></tr><tr><td>50,0</td><td>45,0</td><td>55,0</td></tr><tr><td>51,0</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr><tr><td>55,0</td><td>20,0</td><td>80,0</td></tr></table>			Temps (min)	% A	% B	Inicial	20,0	80,0	1,0	20,0	80,0	15,0	30,0	70,0	40,0	45,0	55,0	50,0	45,0	55,0	51,0	20,0	80,0	55,0	20,0	80,0
Temps (min)	% A	% B																								
Inicial	20,0	80,0																								
1,0	20,0	80,0																								
15,0	30,0	70,0																								
40,0	45,0	55,0																								
50,0	45,0	55,0																								
51,0	20,0	80,0																								
55,0	20,0	80,0																								
Cabal	0,4 mL/min																									
Volum d'injecció	10,0 μL																									
Temperatura columna	25 °C																									
Temperatura autosampler	20 °C																									
Longitud d'ona de detecció	210 nm																									
Diluent mostra	DMF																									

8.3.4. EXPRESSIÓ DELS RESULTATS D'HPLC

Els resultats de les anàlisis d'HPLC s'indiquen com a percentatges d'àrees de pics cromatogràfics.

Els cromatogrames que es mostren a la memòria de la Tesi estan enregistrats a una sensibilitat suficientment elevada com per poder apreciar les impureses a les figures (escala de 350 mAU). El pic principal en totes les anàlisis té una alçada de pic entre 500 mAU i 1800 mAU per assegurar que el pic principal no està saturat i, al mateix temps, que hi ha una bona sensibilitat per detectar les impureses. Respecte a l'escala d'abscisses, es dona una ampliació del cromatograma a partir dels 5 min per a evitar la fort absorció de la DMF al front del cromatograma, fins el final del gradient d'elució.

Els criteris d'integració que es van seguir per donar els resultats van consistir en integrar totes les impureses majors del 0,05 % i no integrar les impureses del cromatograma del blanc i de la DMF quan es va utilitzar com a dissolvent de la mostra.

PART EXPERIMENTAL:
CAPÍTOL 2

8.4. PART EXPERIMENTAL: CAPÍTOL 2

8.4.1. PROCEDIMENTS GENERALS

En el present apartat es descriuen els procediments experimentals generals que es van dur a terme per la SPPS en aquesta Tesi Doctoral. En apartats posteriors, es descriuen els diferents protocols que es van seguir per a la síntesi de cada fragment peptídic i es detallen els procediments utilitzats així com les quantitats de reactius utilitzades.

8.4.1.1. REACTORS

Els reactors en els que es va dur a terme la SPPS es mostren en la **Figura 123** i han estat descrits detalladament en el Capítol 2 (*apartats 4.1.1, 4.3.2.1 i 4.3.7.1*).

Reactor 1	Reactor 2	Filtre Nutsche
		
150 mL 10 g de resina	250 mL 16 g de resina	2 L 130 g de resina

Figura 123. Reactors per a la SPPS utilitzats en aquesta tesi.

En el reactor 2 es va introduir l'agitador A o l'agitador B (**Figura 124**) i es va utilitzar el muntatge descrit en l'*apartat 4.3.2.1 (Figura 21)*. Per a simplificar, al sistema format pel reactor 2 i l'agitador A s'anomena reactor 2A, i reactor 2B quan s'utilitza el reactor 2 amb l'agitador B.

Agitador A	Agitador B
	

Figura 124. Sistemes duals d'agitació/filtració amb un nivell d'agitació de 3 pales (agitador A) i 3 nivells d'agitació de dues pales cada un (agitador B).

El reactor adient per a dur a terme la SPPS es va triar segons l'escala a la que es desitjava dur a terme la síntesi. La capacitat màxima del reactor es va determinar a partir del volum màxim que s'utilitza en la síntesi. Aquest volum màxim s'arriba en l'etapa d'escissió del pèptid de la resina, on s'utilitzen 15 mL de dissolució d'1 % de TFA per gram de resina. El reactor 1, al tenir un volum de 150 mL, va ser utilitzat per a síntesis de 10 g que és la capacitat màxima a la que permet arribar. El reactor 2 és de 250 mL; la capacitat màxima per aquest muntatge és de 16 g de resina. El filtre Nutsche té una capacitat màxima de 130 g de resina al tenir un volum de 2 L; en aquesta tesi aquest reactor va ser utilitzat per a síntesi amb 40 g de resina.

8.4.1.2. INCORPORACIÓ DEL PRIMER AMINOÀCID A LA RESINA

Per a la reacció d'incorporació del primer aminoàcid a la resina, la resina 2-CTC es va introduir en el reactor SPPS desitjat i es va rentar diverses vegades amb DCM i DMF. La temperatura externa es va ajustar a 20 °C. Una dissolució de Fmoc-aminoàcid i DIPEA en DCM es va addicionar a la resina i la mescla de reacció es va agitar durant 1,5 h. A continuació, es va dur a terme la càrrega de MeOH a la reacció i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 o 2 h més, segons la síntesi. L'excés de reactius, els subproductes de reacció solubles i el dissolvent de la reacció es van descarregar mitjançant la succió de buit i l'aminoacil-resina resultant es va rentar diverses vegades seguint els protocols descrits per a cada síntesi. Una alíquota de resina es va assecar al dessecador de buit a 35 °C fins a pes constant per tal de quantificar el grup Fmoc i determinar la funcionalització de la resina.

8.4.1.3. QUANTIFICACIÓ DEL GRUP FMOC PER UV-VIS

Per a dur a terme la quantificació del grup Fmoc es va seguir el següent procediment. En un matràs aforat de 100 mL, una quantitat coneguda (uns 20 mg) de l'alíquota d'aminoacil-resina, prèviament asseada al dessecador fins a pes constant, es va pesar amb precisió i es va suspendre en una dissolució de 20 % de piperidina en DMF (uns 80 mL). La mostra es va preparar per duplicat i les suspensions es van introduir en el bany d'ultrasons durant 30 min. A continuació, les suspensions es van deixar reposar durant 15 min i es van enrasar amb la dissolució de 20 % de piperidina en DMF. L'absorbància (A) a 301 nm de les dissolucions resultants es va mesurar mitjançant un espectrofotòmetre UV-Vis i la concentració de l'adducte de FM-pip (c) es va determinar mitjançant la llei de Lambert-Beer (**Equació 1**):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Equació 1. Llei de Lambert-Beer, on ϵ és $7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 301 nm, c és la concentració de l'adducte FM-pip en $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ i l és la longitud de la cubeta (normalment 1 cm).

La concentració de l'adducte de FM-pip va proporcionar els mmols d'aminoàcid incorporats en l'alíquota de resina analitzada, i la funcionalització de la resina després de l'acoblament del primer aminoàcid es va determinar a partir del quocient entre aquests mmols d'aminoàcid i els g de resina pesats en cada matràs (**Equació 2**):

$$f = \frac{\text{mmols aa per UV} - \text{Vis}}{\text{g de resina pesats en el matràs}}$$

Equació 2. Fórmula pel càlcul de la funcionalització de la resina.

Els mmols totals d'aminoàcid incorporats a la resina en el primer pas de la síntesi es van poder calcular a través de la fórmula descrita a continuació (**Equació 3**):

$$mmols\ totals = g_{resina} \times f_{real} \frac{[1 + (f_{inicial} \times (\frac{M_{OMe} - M_{HCl}}{1000}))]}{[1 - (f_{real} \times (\frac{M_{aa_1} - M_{OMe}}{1000}))]}$$

Equació 3. Fórmula pel càlcul dels mmols totals d'aminoàcid incorporats en la resina, on g_{resina} són els grams de resina utilitzats per la síntesi, f_{real} és la funcionalització calculada en la *Equació 2*, $f_{inicial}$ és la funcionalització inicial de la resina (1,4 mmols/g), M_{aa_1} i M_{aa_1} són les masses molars de OMe i HCl (31,04 g/mol i 36,46 g/mol respectivament), i M_{aa_1} equival a la massa molecular del primer aminoàcid incorporat.

El coneixement dels mmols totals d'aminoàcid incorporat en el primer pas de la síntesi va permetre calcular les quantitats de reactius necessàries per a dur a terme els següents passos de la síntesi.

8.4.1.4. ELIMINACIÓ DEL GRUP FMOC

L'etapa d'eliminació del grup Fmoc es va dur a terme després de la reacció d'incorporació del primer aminoàcid a la resina i després de cada etapa d'acoblament de Fmoc-aminoàcid, excepte en l'últim aminoàcid acoblat a la cadena peptídica desitjada (si aquest disposa de grup Fmoc).

Per aquesta reacció, la temperatura externa es va ajustar a 25 °C i la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució de 20 % de piperidina en DMF. La mescla de reacció es va agitar durant el temps descrit en cada protocol. L'excés de reactius, els subproductes solubles i el dissolvent de la reacció es van eliminar mitjançant la succió de buit. En la majoria de síntesis, es va dur a terme un segon tractament de la peptidil-resina amb la dissolució de 20 % de piperidina en DMF. A continuació, la resina es va rentar seguint els protocols descrits per a cada síntesi. En les últimes síntesis, per a determinar si l'eliminació del grup Fmoc fou completa, es va posar a prova un mètode desenvolupat en aquesta Tesi Doctoral (*veure apartat 8.4.1.5.2*).

8.4.1.5. ACOBLAMENT DE FMOC-AMINOÀCID

En primer lloc, la peptidil-resina es va rentar amb DCM i DMF, i la temperatura externa es va refredar a 5 °C. En un reactor o baló a part, es va preparar una dissolució de Fmoc-aminoàcid i HOBT dissolts en la mínima quantitat de DMF. Aquesta dissolució es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar durant uns minuts. La DIC es va pesar en una xeringa i es va addicionar en 2 min al cru de reacció. La mescla es va agitar durant 15 min a 5 °C i, seguidament, es va programar una rampa per a pujar la temperatura externa a 25 °C en 20 min. Passades 1,5 h de reacció, una alíquota de resina es va mostrejar del cru de reacció i es va analitzar mitjançant el test de ninhidrina (*veure apartat 8.4.1.5.1*) o per HPLC i ¹H-RMN (*veure apartat 8.4.1.5.2*). A continuació, es detalla el procediment experimental que es va seguir per a determinar el final de les reaccions amb les diferents tècniques de seguiment utilitzades.

8.4.1.5.1. TEST DE NINHIDRINA

El test de ninhidrina, anomenat també test de Kaiser, és un test colorimètric qualitatiu que posa de manifest la presència o l'absència de amines primàries lliures.

Per dur a terme el test, es van preparar tres solucions:

- Solució A: 5 g de ninhidrina en 100 mL d'EtOH.
- Solució B: 80 g de fenol en 20 mL d'EtOH.
- Solució C: 2 mL de solució aquosa 0,0001 M de KCN en 98 mL de piridina.

Una petita alíquota de peptidil-resina es va introduir en un tub petit de vidre i es va rentar tres vegades amb MeOH amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur. L'alíquota es va tractar amb dues gotes de cada solució i es va escalfar en un bany de sorra a 100 °C durant 3 min. Una mostra de blanc es va dur a terme en paral·lel per comparar els colors. La persistència del color groc inicial va indicar un test negatiu, és a dir, l'absència de grups α -amino lliures i, per tant, la completa reacció d'acoblament. Pel contrari, un canvi de coloració de la dissolució groga a blava va indicar un test positiu, és a dir, la presència de grups α -amino lliures i, per tant, la incompleta reacció d'acoblament de l'aminoàcid (**Figura 125**).



Figura 125. Test de ninhidrina positiu (blau) i test de ninhidrina negatiu (groc).

8.4.1.5.2. HPLC i ^1H -RMN

Una alíquota de peptidil-resina (aproximadament uns 0,2 mL de resina + dissolució) es va introduir en la xeringa del muntatge que es mostra en la **Figura 126**. Aquest muntatge es va utilitzar per dur a terme l'escissió del pèptid de la resina a escala de mg de resina, i així doncs obtenir la cadena peptídica en dissolució i poder controlar l'estat de la reacció analitzant-la per HPLC o ^1H -RMN.



Figura 126. Muntatge per dur a terme l'escissió del pèptid de la resina a escala de mg de resina.

Primerament, l'alíquota de peptidil-resina es va rentar amb DMF (1 mL, 2 x 1 min), DCM (1 mL, 2 x 1 min), DMF (1 mL, 1 min) i DCM (1 mL, 2 x 1 min). Els dissolvents dels rentats es van filtrar mitjançant la succió de buit, es van recollir en el matràs i es van portar a residus. La peptidil-resina es va tractar amb 0,5 mL d'una dissolució d'1 % de TFA en DCM i la mescla es va agitar durant 1 min. Aquest tractament es va repetir dues vegades més. Les solucions resultants dels

tractaments àcids es van filtrar mitjançant la succió de buit i es van recollir en un baló. La dissolució del cru (50 µL) es va diluir en 2 mL de DMF qualitat HPLC i la mostra es va analitzar per HPLC o HPLC-MS. El dissolvent del cru es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat i el residu es va diluir amb MeOD o DMSO- d_6 per analitzar per 1H -RMN. Un cop les tècniques mencionades van indicar el final de la reacció, l'excés de reactius, els subproductes de reacció solubles i el dissolvent es van eliminar mitjançant la succió de buit. La peptidil-resina resultant es va rentar diverses vegades seguint els protocols descrits per a cada síntesi.

En el cas de les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid en que, passades unes hores de reacció (segons la síntesi i el criteri aplicat), les tècniques de seguiment indicaven que la reacció encara no havia finalitzat, el reacoblament del Fmoc-aminoàcid es va dur a terme. En aquest cas, el cru de reacció de l'acoblament es va descarregar mitjançant la succió de buit i es va eliminar a residus. La peptidil-resina resultant es va rentar diverses vegades seguint el protocol per a cada síntesi i l'etapa d'acoblament de Fmoc-aminoàcid es va repetir fins a que les tècniques de seguiment van indicar que la reacció havia finalitzat.

8.4.1.6. ESCISSIÓ DEL PÈPTID DE LA RESINA

El trencament de l'enllaç èster entre la resina i l'extrem carboxílic del pèptid desitjat es va dur a terme amb tractaments àcids de TFA de la peptidil-resina. Per aquesta etapa, la temperatura externa es va refredar a 5 °C i la peptidil-resina es va rentar diverses vegades amb DCM. Una dissolució d'1 % de TFA en DCM es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar durant 5 min. La dissolució del cru resultant es va filtrar mitjançant la succió de buit i es va recollir en un baló, un reactor o una ampolla d'1 L. El tractament àcid es va repetir dues vegades més. La resina resultant es va rentar amb DCM i el dissolvent dels rentats es van recollir en el mateix recipient que els tractaments àcids. A continuació, es va dur a terme l'etapa de precipitació del pèptid, procediment que es descriu a l'apartat que es dedica per a cada síntesi. Un cop el fragment peptídic desitjat es va aïllar, el sòlid obtingut es va assecar sota pressió reduïda al dessecador de buit i temperatura a 40 °C fins a pes constant.

8.4.2. PROTOCOLS SINTÈTICS

8.4.2.1. PROTOCOLS INCORPORACIÓ DEL PRIMER AMINOÀCID A LA RESINA

Els protocols que es van utilitzar per a la reacció d'incorporació del primer aminoàcid a la resina es descriuen en les taules que es mostren a continuació.

Taula 55. Incorporació del primer aminoàcid a la resina. **Protocol 1.**

Etapa	Condicions
Rentats ^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min), DMF (2 x 5 min) i DCM (2 x 5 min)
Acoblament	Fmoc-aa (1,5 eq) i DIPEA (3,0 eq) en DCM (1,5 h)
Capat	MeOH (0,8 mL/g resina) (1 h)
Rentats ^a	DCM (2 x 5 min), DMF (2 x 5 min), IPA (2 x 5 min), DCM (2 x 5 min) i MeOH (2 x 5 min)
Quantificació grup Fmoc	Alíquota de resina al dessecador de buit a 35 °C (mínim 3 h)
Rentats ^a	DCM (2 x 5 min) i DMF (2 x 5 min)

(a) 10 mL dissolvent/g de resina.

Taula 56. Incorporació del primer aminoàcid a la resina. **Protocol 2.**

Etapa	Condicions
Rentats ^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min), DMF (2 x 5 min) i DCM (2 x 5 min)
Acoblament	Fmoc-aa (1,5 eq) i DIPEA (3,0 eq) en DCM (1,5 h)
Capat ^b	MeOH (0,8 mL/g resina)
Rentats ^c	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)
Quantificació grup Fmoc	Alíquota de resina al dessecador de buit a 35 °C (mínim 3 h)
Rentats ^c	DMF (2 x 5 min)

(a) 10 mL dissolvent/g de resina.

(b) D'1 h a 2 h, segons la síntesi.

(c) 10 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

Taula 57. Incorporació del primer aminoàcid a la resina. **Protocol 3.**

Etap	Condicions
Rentats^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min), DMF (2 x 5 min) i DCM (2 x 5 min)
Acoblament	Fmoc-aa (1,5 eq) i DIPEA (3,0 eq) en DCM (1,5 h)
Capat^b	MeOH (0,8 mL/g resina) (2 h)
Rentats^a	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)
Quantificació grup Fmoc	Alíquota de resina al dessecador de buit a 35 °C (mínim 3 h)
Rentats^a	DMF (2 x 5 min)

(a) 6 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

8.4.2.2. PROTOCOLS ELIMINACIÓ DEL GRUP FMOC

Els protocols que es van utilitzar per a la reacció d'eliminació del grup Fmoc es descriuen en les taules que es mostren a continuació.

Taula 58. Eliminació del grup Fmoc. **Protocol 4.**

Etap	Condicions
Eliminació grup Fmoc^a	20 % piperidina en DMF (1 x 5 min, 1 x 2 min)
Rentats^b	DMF (2 x 5 min), DCM (2 x 5 min), IPA (2 x 5 min), DCM (2 x 5 min) i DMF (2 x 5 min)

(a) 10 mL dissolució/g de resina.

(b) 10 mL dissolvent/g de resina.

Taula 59. Eliminació del grup Fmoc. **Protocol 5.**

Etap	Condicions
Eliminació grup Fmoc^a	20 % piperidina en DMF (1 x 5 min, 1 x 2 min)
Rentats^b	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)
Control reacció	¹ H-RMN i HPLC
Rentats^b	DMF (2 x 5 min)

(a) 10 mL dissolució/g de resina.

(b) 10 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

Taula 60. Eliminació del grup Fmoc. **Protocol 6.**

Etap	Condicions
Eliminació grup Fmoc^a	20 % piperidina en DMF (1 x 5 min, 1 x 5 min)
Rentats^b	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)
Control reacció	¹ H-RMN i HPLC
Rentats^b	DMF (2 x 5 min)

(a) 6 mL dissolució/g de resina.

(b) 6 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

Taula 61. Eliminació del grup Fmoc. **Protocol 7.**

Etap	Condicions
Eliminació grup Fmoc^{a,b}	20 % piperidina en DMF
Rentats^c	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)
Control reacció	¹ H-RMN i HPLC
Rentats^c	DMF (2 x 5 min)

(a) De 2 mL a 6 mL dissolució/g de resina.

(b) D'1 a 2 tractaments d'1 min a 10 min.

(c) 6 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

8.4.2.3. PROTOCOLS ACOBLAMENT DE FMOC-AA

Els protocols que es van utilitzar per a la reacció d'acoblament de Fmoc-aminoàcid es descriuen en les taules que es mostren a continuació.

Taula 62. Acoblament de Fmoc-aminoàcid. **Protocol 8.**

Etap	Condicions
Rentats^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min) i DMF (2 x 5 min)
Acoblament^b	Fmoc-aa, HOBt i DIC, en DMF
Control reacció	Test de ninhidrina (cada 1,5 h)
Rentats^a	DMF (2 x 5 min), DCM (2 x 5 min), IPA (2 x 5 min), DCM (2 x 5 min) i DMF (2 x 5 min)

(a) 10 mL dissolvent/g de resina.

(b) De 3,00 a 5,00 eq.

Taula 63. Acoblament de Fmoc-aminoàcid. **Protocol 9.**

Etap	Condicions
Rentats^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min) i DMF (2 x 5 min)
Acoblament^b	Fmoc-aa, HOBt i DIC, en DMF
Control reacció	Test de ninhidrina, ¹ H-RMN i HPLC (cada 1,5 h)
Rentats^a	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)

(a) 10 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

(b) De 3,00 a 5,00 eq.

Taula 64. Acoblament de Fmoc-aminoàcid. **Protocol 10.**

Etap	Condicions
Rentats^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min) i DMF (2 x 5 min)
Acoblament^b	Fmoc-aa, HOBt i DIC, en DMF
Control reacció	Test de Ninhidrina, ¹ H-RMN i HPLC (cada 1,5 h)
Rentats^a	DCM (1 x 5 min), DMF (1 x 10 min), DCM (1 x 10 min), DMF (1 x 5 min), DCM (1 x 5 min)

(a) 6 mL dissolvent/g de resina. 0,05 % DIPEA en cada dissolvent.

(b) De 3,00 a 5,00 eq.

8.4.2.4. PROTOCOLS ESCISSIÓ DEL PÈPTID DE LA RESINA

Els protocols que es van utilitzar per a la reacció d'escissió del pèptid de la resina es descriuen en les taules que es mostren a continuació.

Taula 65. Escissió del pèptid de la resina. **Protocol 11.**

Etap	Condicions
Rentats^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min)
Escissió^b	1 % TFA en DCM (3 x 5 min)
Rentats^c	DCM (2 x 5 min)

(a) 10 mL dissolvent/g de resina.

(b) 15 mL dissolució/g de resina.

(c) 5 mL dissolvent/g de resina.

Taula 66. Escissió del pèptid de la resina. **Protocol 12.**

Etapa	Condicions
Rentats ^a	DCM (1 x 30 min i 1 x 5 min)
Escissió ^b	1 % TFA en DCM (3 x 5 min)
Rentats ^c	DCM (2 x 5 min)

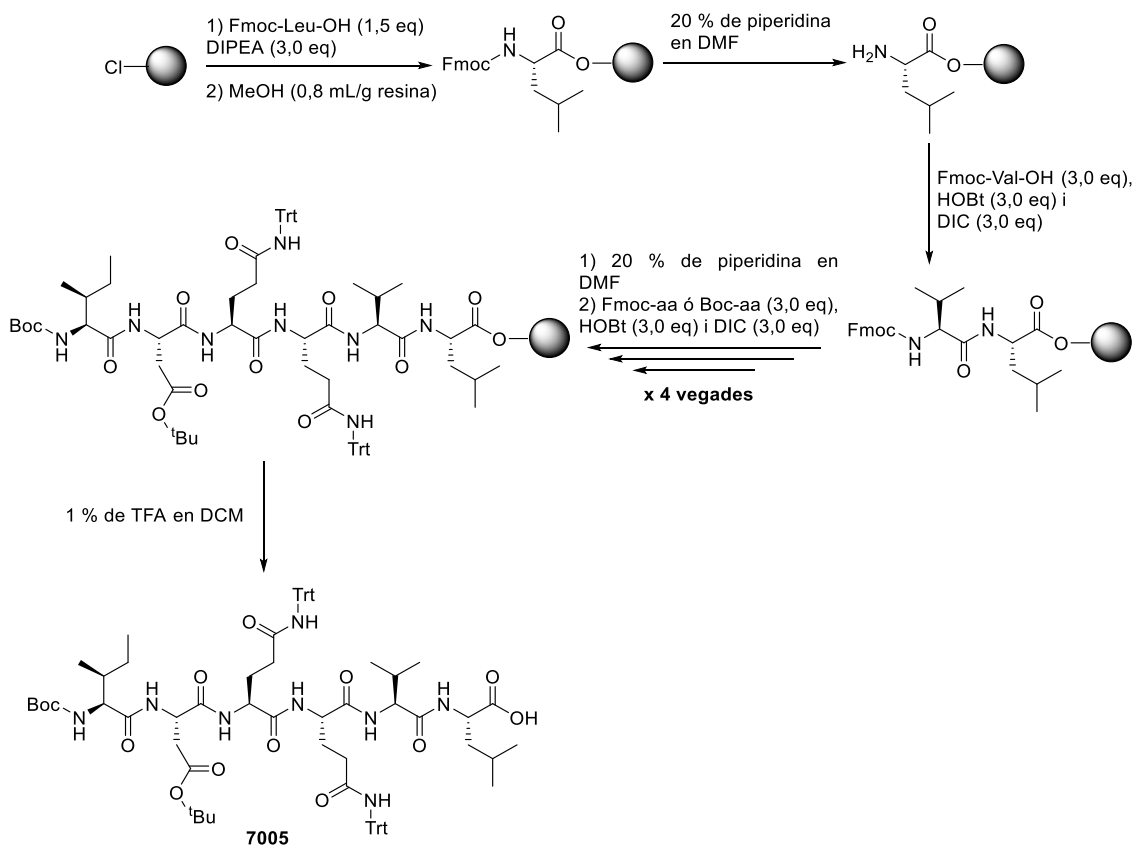
(a) 6 mL dissolvent/g de resina.

(b) 12 mL dissolució/g de resina.

(c) 5 mL dissolvent/g de resina.

8.4.3. SÍNTESI DE 7005

8.4.3.1. PROCEDIMENT GENERAL

Esquema 64. Síntesi en fase sòlida de l'hexapèptid **7005**.

8.4.3.2. SÍNTESI DE 7005_UB-19166

La resina 2-CTC (10,28 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 1 (**Figura 123, apartat 8.4.1.1**) i es va rentar seguint el **Protocol 1 (Taula 55, apartat 8.4.2.1)**. Per incorporar el primer aminoàcid a la resina, una dissolució de Fmoc-Leu-OH (7,76 g, 1,52 eq) i DIPEA (5,69 g, 3,05 eq) en DCM (37 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant

1,5 h. Passat aquest temps, el MeOH (5,56 g, 0,80 mL/g resina) es va carregar al cru de reacció i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Una alíquota d'aminoacil-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (*apartat 8.4.1.3*). La funcionalització trobada va ser de 0,71 mmols/g (**Equació 2**) i es van determinar un total de 9,43 mmols de Fmoc-Leu-OH (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, *apartat 8.4.2.2*) i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es va realitzar seguint el **Protocol 8** (**Taula 62**, *apartat 8.4.2.3*). En la **Taula 67** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid i els temps de les reaccions. En l'etapa 6, a les 5 h de reacció, el test de ninhidrina indicava que la reacció encara no havia finalitzat. Per aquesta raó, l'aminoàcid Boc-Ile-OH (etapa 6*) es va reacoblar i, en 1 h, el test de ninhidrina va ser negatiu.

Taula 67. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7005_UB-19166**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Val-OH	9,89	3,02	4,67	3,16	3,75	3,08	15	3,0
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	17,88	3,03	4,57	3,09	3,88	3,18	25	3,0
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	17,94	3,04	4,96	3,35	3,80	3,12	35	3,0
5	Fmoc-Asp(^t Bu)-OH	12,25	3,08	4,51	3,05	3,90	3,20	25	3,0
6	Boc-Ile-OH	6,87	3,08	4,55	3,08	3,72	3,05	25	5,0
6*	Boc-Ile-OH	6,82	3,05	4,55	3,08	3,87	3,18	25	1,0

(*) Reacoblament

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11** (**Taula 65**, *apartat 8.4.2.4*). Les solucions resultants dels tractaments de TFA i dels rentats de DCM es van recollir en un baló de 500 mL, que contenia TEA (5,97 g, 1,00 eq respecte el TFA) en DCM (30 mL). Un cop el pèptid es va obtenir en solució, es va procedir a la precipitació d'aquest, tal i com es descriu a continuació.

8.4.3.2.1. PRECIPITACIÓ

El cru de **7005** obtingut es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 60 mL. Per tal de dur a terme un canvi de dissolvent, es va carregar EtOH (40 mL) al cru i la mescla de dissolvents resultant es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 50 mL. El mateix procediment es va repetir una vegada més fins a no detectar el DCM per ¹H-RMN. El cru resultant (50 mL) es va transvasar a un reactor de vidre de 100 mL i es va agitar magnèticament a 600 rpm. A continuació, es va addicionar H₂O (30 mL) en 1,5 h, fins a obtenir una suspensió blanca. La mescla es va deixar en agitació a ta 12 h i, al parar l'agitació, el sòlid no dipositava i es va compactar en el reactor. Per diluir la suspensió, es va carregar EtOH (15 mL) i la mescla es va escalfar a 40 °C durant 1 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració molt lenta) i part del sòlid va passar a les AM. Les AM es van tornar a filtrar i el producte recuperat es va ajuntar amb el primer sòlid obtingut. El sòlid (10,34 g de **7005_UB-19166-01**) es va analitzar per HPLC

(Figura 127) i va mostrar un pic molt majoritari corresponent al **7005** amb un 93,7 % de puresa cromatogràfica (22,7 min).

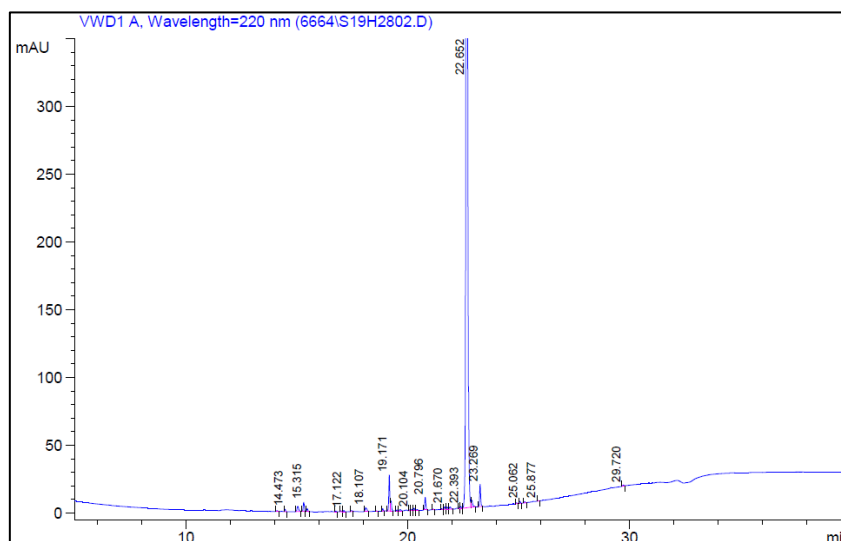


Figura 127. Cromatograma de **7005_UB-19166-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.3.3. SÍNTESI DE **7005_UB-19182**

La resina 2-CTC (10,07 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 1 (Figura 123, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (Taula 55, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Leu-OH (7,49 g, 1,50 eq) i DIPEA (5,52 g, 3,03 eq) en DCM (37 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, el MeOH (6,48 g, 0,80 mL/g resina) es va carregar al cru de reacció i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Una alíquota d'aminoàcid-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (apartat 8.4.1.3). La funcionalització trobada va ser de 0,86 mmols/g (Equació 2) i es van determinar un total d'11,93 mmols de Fmoc-Leu-OH (Equació 3) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es van realitzar seguint el **Protocol 4** (Taula 58, apartat 8.4.2.2) i el **Protocol 8** (Taula 62, apartat 8.4.2.3), respectivament. En la Taula 68 es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid i els temps de les reaccions. En aquesta síntesi no va ser necessari el reacoblament de cap aminoàcid.

Taula 68. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7005_UB-19182**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Val-OH	12,63	3,03	5,78	3,07	4,88	3,15	30	3,0
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	22,74	3,03	5,76	3,06	4,75	3,07	30	3,0
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	22,87	3,05	5,90	3,14	4,89	3,16	30	3,0
5	Fmoc-Asp(^t Bu)-OH	15,31	3,03	5,82	3,10	4,70	3,03	30	3,0
6	Boc-Ile-OH	11,45	4,03	7,61	4,05	6,43	4,15	30	6,0

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11** (Taula 65, apartat 8.4.2.4). Les solucions resultants dels tractaments de TFA i dels rentats de DCM es van recollir en una ampolla d'1 L que contenia TEA (7,00 g, 1,00 eq respecte el TFA) en DCM (30 mL). L'anàlisi per HPLC del cru acidolític (**Figura 128**) va mostrar una puresa cromatogràfica de **7005** del 90,7 % (22,5 min).

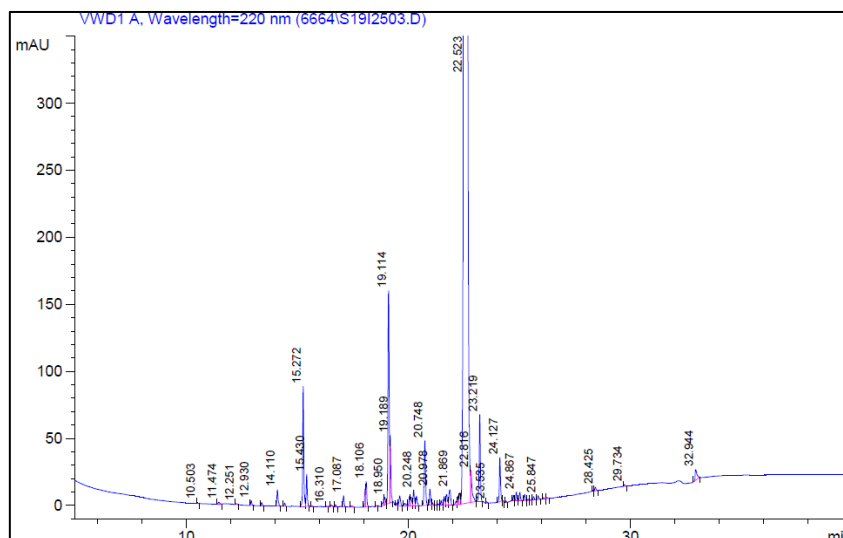


Figura 128. Cromatograma del cru acidolític de **7005_UB-19182**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

La dissolució del cru de **7005** obtinguda (830,13 g, 700 mL) es va dividir en diferents fraccions per tal de dur a terme les proves de precipitació que es descriuen a continuació.

8.4.3.3.1. PROVES DE PRECIPITACIÓ

Prova 1. Una fracció del cru de **7005** (89,03 g, 70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 7 mL. Per tal de dur a terme un canvi de dissolvent, es va carregar EtOH (5 mL) al cru i la mescla de dissolvents es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 6 mL. El mateix procediment es va repetir una vegada més fins a no detectar DCM per ^1H -RMN. El cru resultant (5 mL) es va transvasar a un baló de 50 mL per agitar-lo magnèticament a 600 rpm. La precipitació es va dur a terme amb l'addició d' H_2O (3,2 mL) gota a gota, fins a observar la precipitació d'un sòlid gomós. La suspensió es va agitar durant 2 h a ta i es va filtrar a pressió reduïda (filtració molt lenta). El sòlid obtingut (1,50 g de **7005_UB-19182-P1-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 129**) i es va detectar **7005** amb un 92,2 % de puresa cromatogràfica (22,6 min).

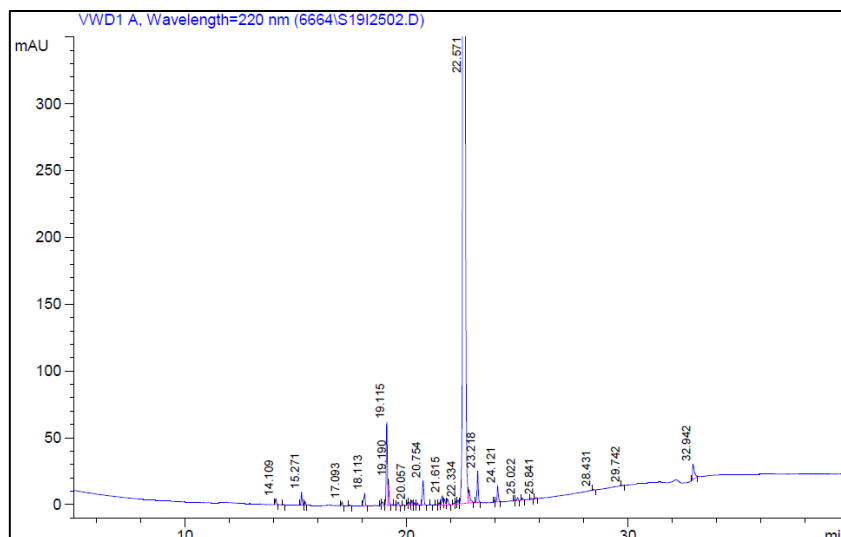


Figura 129. Cromatograma de **7005_UB-19182-P1-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 2. Una fracció del cru de **7005** (89,03 g, 70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 7 mL. Per tal de dur a terme un canvi de dissolvent, es va carregar EtOH (5 mL) al cru i la mescla de dissolvents es va concentrar a pressió reduïda fins a 6 mL. L'últim arrossegament d'EtOH es va repetir una vegada més fins a no detectar el DCM per ^1H -RMN. Es va carregar H_2O (3,2 mL) en un baló de 50 mL, es va agitar magnèticament a 600 rpm i la dissolució del cru de **7005** (5 mL) es va addicionar gota a gota. Al final de l'addició, es va observar la formació d'un sòlid gomós i la suspensió es va deixar en agitació durant 2 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració molt lenta) i el sòlid obtingut (1,24 g de **7005_UB-19182-P2-01**) es va analitzar per HPLC (Figura 130), detectant **7005** amb una puresa cromatogràfica del 93,9 % (22,6 min).

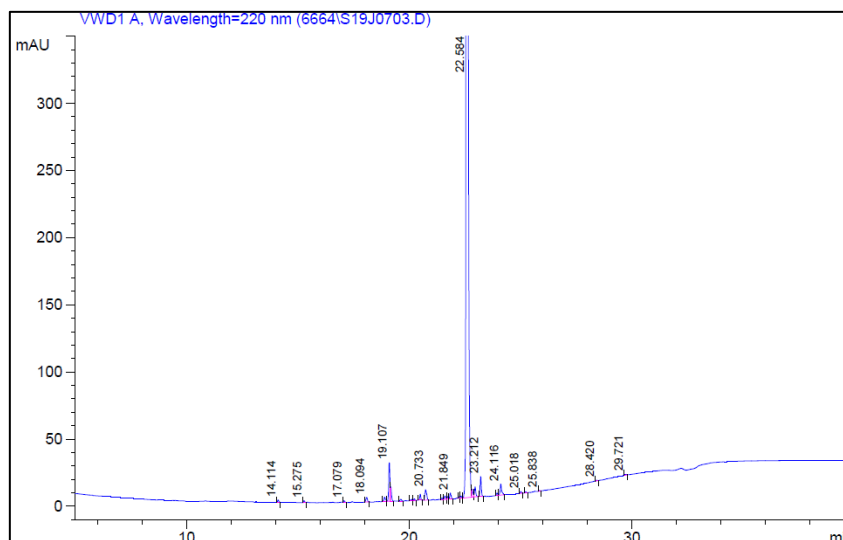


Figura 130. Cromatograma de **7005_UB-19182-P2-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 3. Una fracció del cru de **7005** (89,03 g, 70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. El cru es va agitar a 200 rpm i la precipitació del pèptid es va dur a terme amb l'addició d'heptà (64 mL) en 1,5 h. Un oli groc es va dipositar al fons del

reactor i la mescla resultant es va deixar en agitació durant 12 h. Passat aquest temps, es va observar un sòlid gomós que havia precipitat durant la nit i no dipositava al parar l'agitació. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida però el sòlid es queda enganxat al reactor) i el sòlid obtingut (2,24 g de **7005_UB-19182-P3-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 131**) mostrant **7005** amb una puresa cromatogràfica del 93,9 % (22,6 min).

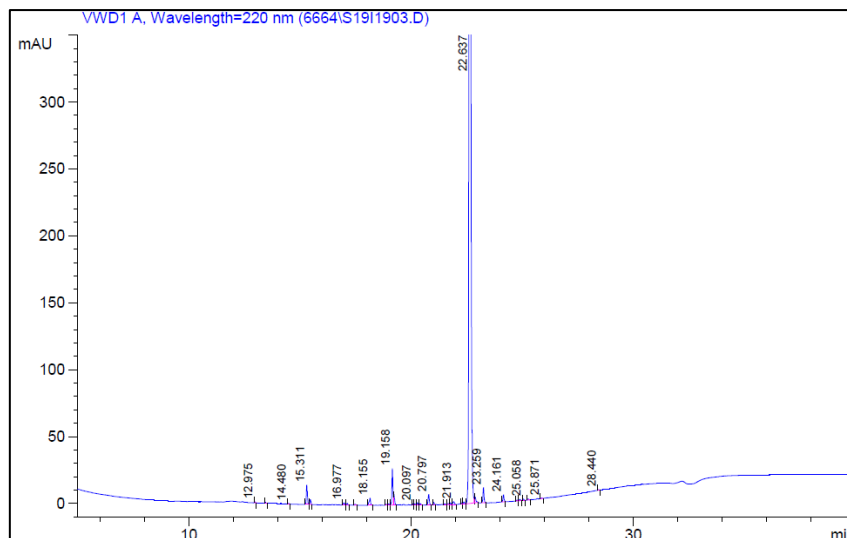


Figura 131. Cromatograma de **7005_UB-19182-P3-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 4. Una fracció del cru de **7005** (89,08 g, 70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. El cru es va agitar a 200 rpm i la precipitació del pèptid es va dur a terme amb l'addició de TBME (80 mL) en 2 h. Passat aquest temps, no es va observar la formació de cap precipitat i la dissolució resultant es va deixar en agitació 12 h més. Al dia següent, es va observar un sòlid que dipositava al parar l'agitació i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració molt bona). El sòlid obtingut (0,93 g de **7005_UB-19182-P4-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 132**) i **7005** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 97,3 % (22,6 min).

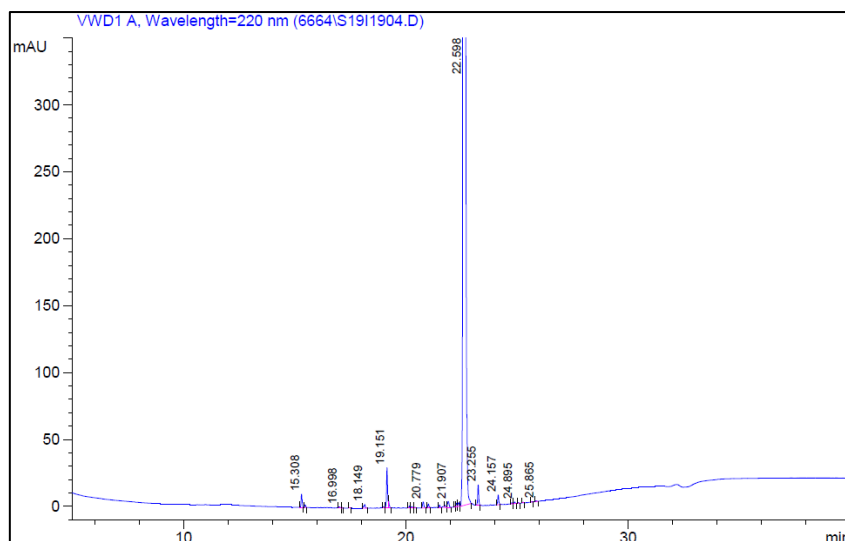


Figura 132. Cromatograma de **7005_UB-19182-P4-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 5. Una fracció del cru de **7005** (89,01 g, 70 mL) es va transvasar a un baló de 250 mL proveït de nucli magnètic i es va agitar a 600 rpm. Es va carregar H₂O (50 mL) al cru i la mescla resultant es va agitar durant 20 min, i a continuació, el contingut es va transvasar a un embut de decantació i les fases es van separar. La fase aquosa es va rentar amb DCM (30 mL), les fases orgàniques es van combinar i la dissolució resultant es va rentar amb H₂O (50 mL, 2 x 15 min). En l'anàlisi de la fase orgànica per ¹H-RMN es va detectar TEA i es va dur a terme un segon tractament del cru amb una dissolució de 2,5 % d'àcid cítric en H₂O ajustada a pH 2 (70 mL). La mescla es va agitar durant 15 min i les fases es van separar en un embut de decantació. La fase orgànica es va analitzar per ¹H-RMN i la TEA no es va detectar. La fase orgànica es va assecar amb MgSO₄ anh i la suspensió resultant es va filtrar. La dissolució obtinguda (100 mL) es va concentrar a pressió reduïda al rotavapor fins a 16 mL i es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. La dissolució es va agitar a 200 rpm i es va addicionar TBME (80 mL) en 3 h al cru de reacció. La dissolució completa va esdevenir una suspensió densa però no es va observar la formació de cap precipitat durant 12 h d'agitació. A continuació, es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-19182-P4-01** i, al no observar precipitat passades 12 h més, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (0,90 g de **7005_UB-19182-P5-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 133**) i es va detectar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 93,9 % (22,4 min).

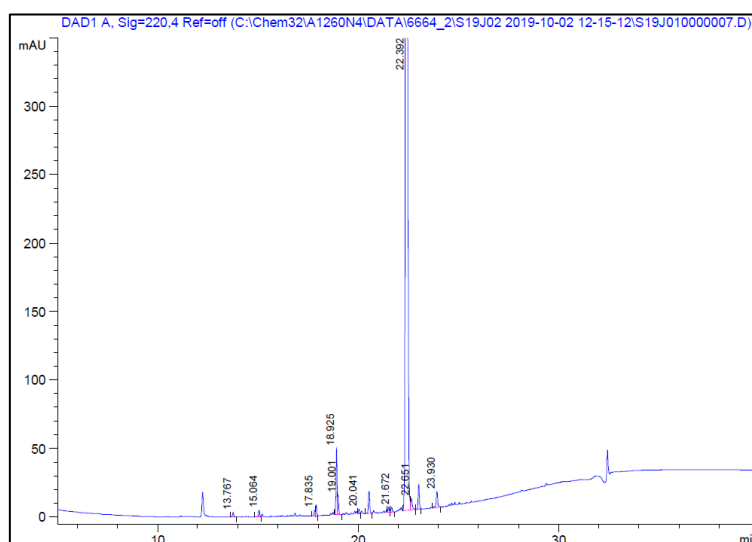


Figura 133. Cromatograma de **7005_UB-19182-P5-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 6. Una fracció del cru de **7005** (88,67 g, 70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL i es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. El cru es va agitar a 200 rpm i la precipitació del pèptid es va dur a terme amb l'addició de TBME (80 mL) en 2 h. Finalitzada l'addició, no es va observar cap canvi d'aspecte en la dissolució i es va deixar en agitació durant 12 h. Al dia següent, es va observar una suspensió densa que, al parar l'agitació, no dipositava al fons del reactor. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (1,29 g de **7005_UB-19182-P6-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 134**) detectant **7005** amb una puresa cromatogràfica del 96,9 % (22,4 min).

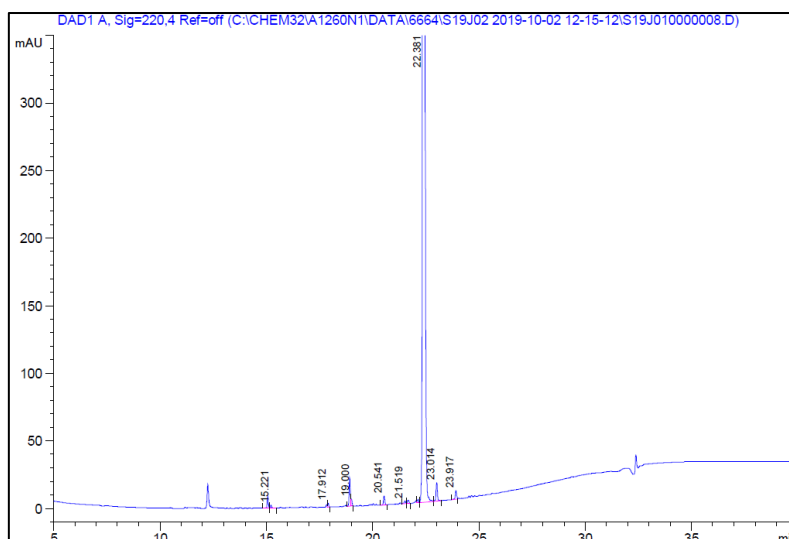


Figura 134. Cromatograma de **7005_UB-19182-P6-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 7. Una fracció del cru de **7005** (89,00 g, 70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL i es va transvasar a un reactor de 150 mL equipat amb agitació mecànica de pales de tefló abatibles. El cru es va agitar i la precipitació del pèptid es va dur a terme amb l'addició de TBME (64 mL) en 1,5 h. La dissolució resultant es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-19182-P4-01** i, a les 12 h d'agitació, es va observar la formació d'una suspensió densa. La forma del sòlid no va ser la desitjada i per afavorir-la, la suspensió es va escalfar a 40 °C i es va agitar durant 1 h. Es va programar una rampa per refredar fins a 5 °C en 7 h i al dia següent, es va observar un sòlid que dipositava lentament al parar l'agitació. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida) i el sòlid obtingut (**7005_UB-19182-P7-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 135**), detectant **7005** amb una puresa cromatogràfica del 98,7 % (22,6 min).

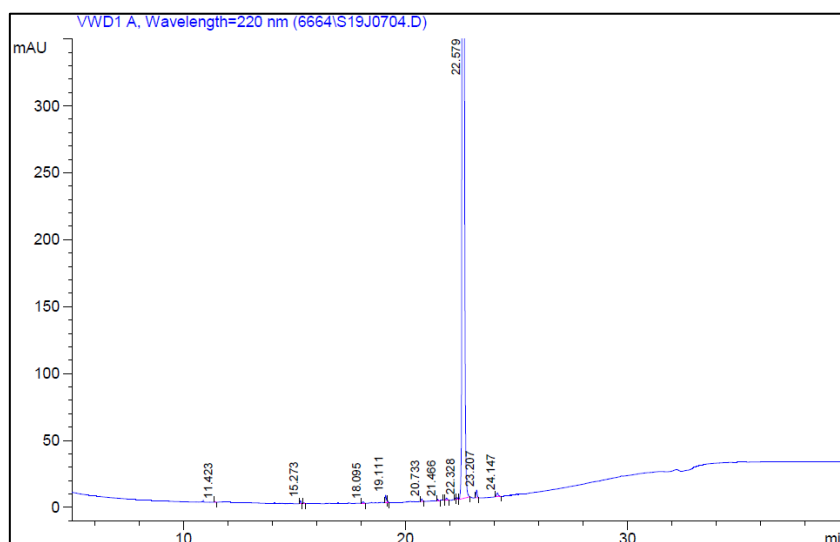


Figura 135. Cromatograma de **7005_UB-19182-P7-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 8. Una fracció del cru de **7005** (89,00 g, 70 mL) es va transvasar a un baló de 250 mL proveït de nucli magnètic. El cru es va agitar a 600 rpm i una dissolució de 2,5 % d'àcid cítric en H₂O ajustada a pH 2 (60 mL) es va carregar al cru. La mescla resultant es va agitar durant 30

min, les dues fases es van separar en un embut de decantació i la fase orgànica resultant es va rentar amb H₂O (50 mL, 1 x 15 min). La fase orgànica (70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL i es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. La dissolució es va agitar a 200 rpm i es va addicionar TBME (16 mL) en 20 min al cru de reacció. La temperatura externa es va pujar a 35 °C i es va formar una suspensió densa. Es va addicionar més TBME (32 mL) a la suspensió i la mescla es va deixar en agitació a 40 °C durant 1 h. La suspensió es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-19182-P4-01** i es va refredar fins a 5 °C amb una rampa de 7 h. El sòlid dipositava al parar l'agitació i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida), però es va obtenir poca quantitat de sòlid i les AM es van haver de refredar a 5 °C i tornar a filtrar. El sòlid obtingut (0,84 g de **7005_UB-19182-P8-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 136**) i es va detectar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 99,2 % (22,7 min).

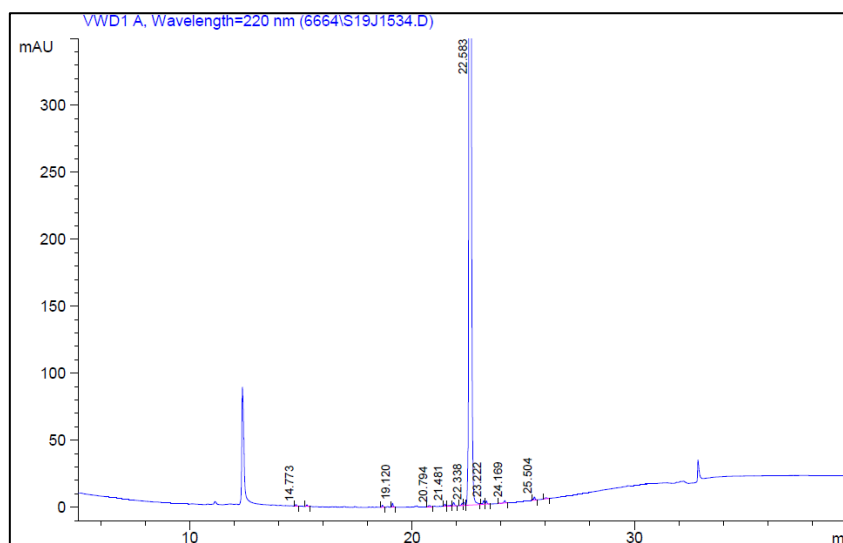


Figura 136. Cromatograma de **7005_UB-19182-P8-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 9. Una fracció del cru de **7005** (89,87 g, 70 mL) es va transvasar a un baló de 250 mL amb agitació magnètica. El cru es va agitar a 600 rpm, una dissolució tampó de NaH₂PO₄/H₃PO₄ a pH 3 (70 mL) es va carregar al cru i la mescla resultant es va agitar durant 15 min. Les dues fases es van separar amb èxit en un embut de decantació i el tractament es va repetir dues vegades més. A continuació, la fase orgànica resultant es va rentar amb H₂O (70 mL, 2 x 15 min) i es va assecar amb MgSO₄ anh i la suspensió resultant es va filtrar. La dissolució obtinguda (70 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL i es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. Es va addicionar TBME (16 mL) al cru de reacció en 20 min, la temperatura externa es va pujar a 35 °C i es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-19182-P4-01**. La dissolució va esdevenir tèrbola i es va addicionar més TBME (64 mL) al cru. Un sòlid va precipitar, es va dipositar al parar l'agitació, i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut (1,09 g de **7005_UB-19182-P9**) es va analitzar per HPLC (**Figura 137**) i es va detectar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 98,2 % (22,7 min)

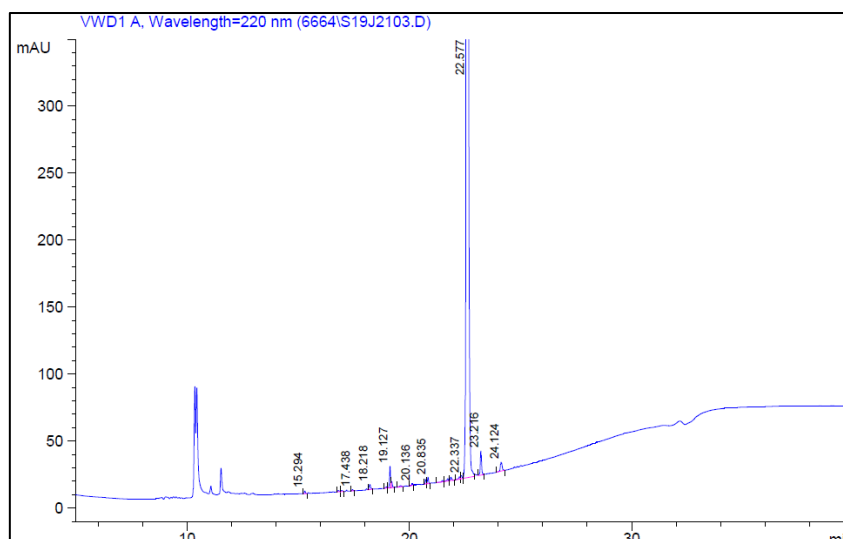


Figura 137. Cromatograma de 7005_UB-19182-P9-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.3.4. SÍNTESI DE 7005_UB-21510

La resina 2-CTC (9,41 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 2A (Figura 123, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (Taula 55, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Leu-OH (9,56 g, 2,05 eq) i DIPEA (5,20 g, 3,05 eq) en DCM (35 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, el MeOH (6,09 g, 0,80 mL/g resina) es va carregar al cru de reacció i la mescla resultant es va agitar durant 1 h. Una alíquota d'aminoacil-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (apartat 8.4.1.3). Es va determinar una funcionalització de 0,69 mmols/g (Equació 2) i un acoblament de 8,35 mmols d'aminoàcid a la resina (Equació 3). L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 4** (Taula 58, apartat 8.4.2.2) i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es va realitzar seguint el **Protocol 8** (Taula 62, apartat 8.4.2.3). En la Taula 69 es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les reaccions d'acoblament de Fmoc-aminoàcid i el temps de les reaccions. En aquesta síntesi no va ser necessari el reacoblament de cap aminoàcid.

Taula 69. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-21510.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Val-OH	8,59	2,97	4,14	3,17	3,79	3,52	25	1,5
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	15,78	3,03	4,11	3,15	3,45	3,21	25	3,0
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	15,79	3,03	3,97	3,04	3,35	3,11	25	6,0
5	Fmoc-Asp(^t Bu)-OH	10,67	3,04	4,37	3,35	3,39	3,15	25	3,0
6	Boc-Ile-OH	8,05	4,09	5,39	4,13	4,38	4,07	20	6,0

La peptidil-resina es va transvasar al reactor 1 per tal de dur a terme els tractaments àcids de l'etapa d'alliberació del pèptid de la resina. La peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1

% de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11 (Taula 65, apartat 8.4.2.4)** i les solucions resultants dels tractaments àcids i dels rentats es van recollir en una ampolla d'1 L. L'anàlisi per HPLC del cru acidolític (**Figura 138**) va mostrar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 91,0 % (22,5 min).

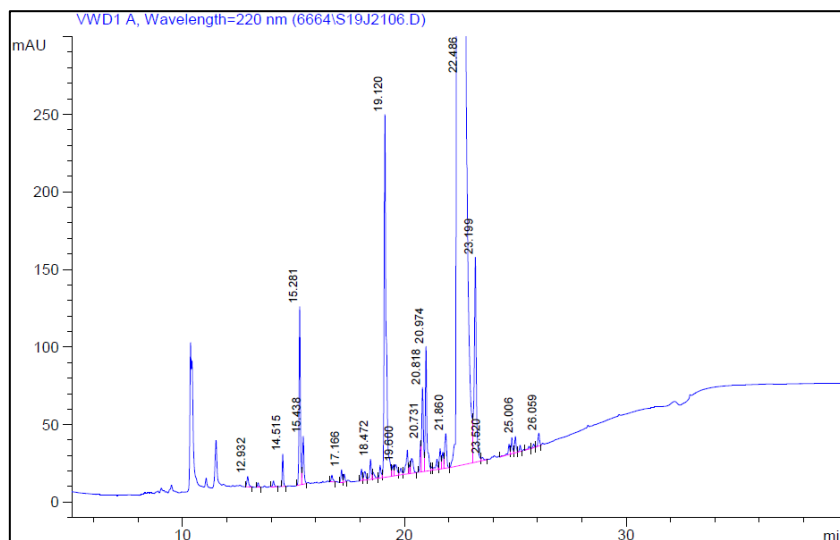


Figura 138. Cromatograma del cru acidolític de **7005_UB-21510**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

La neutralització del cru i la precipitació de **7005** es van dur a terme amb els procediments descrits en els següents apartats.

8.4.3.4.1. PROVES DE NEUTRALITZACIÓ DEL CRU

Per tal de trobar una metodologia per eliminar el TFA del cru de reacció, primerament es van dur a terme dues proves amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM sense la presència del pèptid. Quan es va trobar una metodologia adient per a neutralitzar el cru, el procediment es va assajar amb el cru de **7005_UB-21510**.

8.4.3.4.1.1. Neutralització del TFA en una dissolució de DCM

Prova 1. Una dissolució d'1 % de TFA en DCM (100 mL) es va carregar a un reactor de 250 mL i es va agitar magnèticament a 600 rpm. Una dissolució aquosa de NaHCO_3 0,13 M (100 mL) es va afegir al reactor i la mescla es va agitar durant 1 h. El contingut del reactor es va transvasar a un embut de decantació i les dues fases formades es van analitzar per ^{19}F -RMN, comprovant-se que la majoria del TFA es trobava en la fase aquosa. Per acabar d'extreure el TFA, es va dur a terme un tractament més de la fase orgànica amb la dissolució aquosa de NaHCO_3 0,13 N (100 mL, 15 min). La fase orgànica resultant es va analitzar per ^{19}F -RMN i es va observar un resultat similar al del primer tractament.

Prova 2. Una dissolució d'1 % de TFA en DCM (100 mL) es va carregar a un reactor de 250 mL i es va agitar magnèticament a 600 rpm. A continuació, es va addicionar NaHCO_3 (5,02 g) al reactor, la mescla es va agitar durant 1 h i la suspensió es va filtrar. La dissolució i el sòlid resultants es van analitzar per ^{19}F -RMN, detectant-se una quantitat de TFA a la dissolució molt baixa en comparació a la observada al sòlid. La dissolució es va tractar una vegada més amb NaHCO_3 (5,02 g) i les dues fases resultants es van analitzar per ^{19}F -RMN, no observant-se canvis significatius en el resultat.

8.4.3.4.1.2. Neutralització del TFA del cru 7005_UB-21510

La dissolució del cru **7005_UB-21510** (800 mL) es va dividir en dues fraccions.

7005_UB-21510-P1. Una fracció del cru de **7005** (200 mL) es va transvasar a un reactor de 0,5 L proveït d'agitador mecànic amb pales de tefló abatibles. Una dissolució aquosa sat de NaHCO_3 (200 mL) es va carregar al reactor i la mescla es va agitar a 200 rpm durant 15 min. La mescla es va transvasar a un embut de decantació i es va observar una emulsió en la interfase. La interfase i la fase aquosa es van separar de la fase orgànica i es van tractar amb H_2O (150 mL) i DCM (150 mL). L'emulsió es va redissoldre i les fases es van poder separar. Les dues fases orgàniques es van combinar i es van tornar a tractar amb dissolució aquosa sat de NaHCO_3 (150 mL) i el procediment per redissoldre l'emulsió formada a la interfase en la primera extracció es va repetir. Al no detectar-se senyal de TFA quan la fase orgànica resultant es va analitzar per ^{19}F -RMN, es va assecar amb MgSO_4 anh, es va filtrar i la dissolució resultant (**7005_UB-21510-P1**) es va precipitar com es detalla a l'apartat següent (*apartat 8.4.3.4.2*).

7005_UB-21510-P2. El cru restant de **7005** (600 mL) es va transvasar a un reactor de 2 L amb clau de descàrrega i agitador mecànic de pales de tefló abatibles. Una dissolució aquosa de NaHCO_3 0,13 M (600 mL) es va carregar al reactor i la mescla es va agitar a 200 rpm durant 15 min. Una emulsió es va observar a la interfase i va redissoldre amb una contra extracció de la fase aquosa tal com s'ha descrit per la fracció anterior (**7005_UB-21510-P1**). Donat que el senyal del TFA encara es detectava per ^{19}F -RMN a la fase orgànica, es va tractar amb NaHCO_3 (10,05 g) i la suspensió resultant es va agitar durant 2 h. A continuació, es va filtrar i la dissolució obtinguda es va analitzar per ^{19}F -RMN, detectant-se TFA a nivells molt baixos. La dissolució resultant (**7005_UB-21510-P2**) es va precipitar com es detalla a l'apartat següent (*apartat 8.4.3.4.2*).

8.4.3.4.2. PRECIPITACIÓ

7005_UB-21510-P1. La primera fracció del cru de **7005** neutralitzat (500 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 28 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 250 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, i es va agitar a 200 rpm. Tot seguit, es va addicionar TBME (84 mL) en 30 min, la dissolució resultant es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-19182-P4-01** i la temperatura externa es va pujar a 35 °C. La sembra no es va redissoldre i es va addicionar més TBME (56 mL) al cru de reacció a 35 °C, resultant una dissolució d'aspecte tèrbol. La temperatura externa es va baixar a 25 °C i es va deixar la mescla en agitació durant 12 h. Al dia següent, es va observar una suspensió densa d'un sòlid que no dipositava al parar l'agitació, i es va programar una rampa per refredar la suspensió de 25 °C a 5 °C en 2 h. A l'arribar a aquesta temperatura, es va observar que el sòlid dipositava al parar l'agitació, es va filtrar sense problemes i el sòlid obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (0,78 g de **7005_UB-21510-P1-01**). L'anàlisi per HPLC del sòlid (**Figura 139**) va mostrar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 98,2 % (22,6 min).

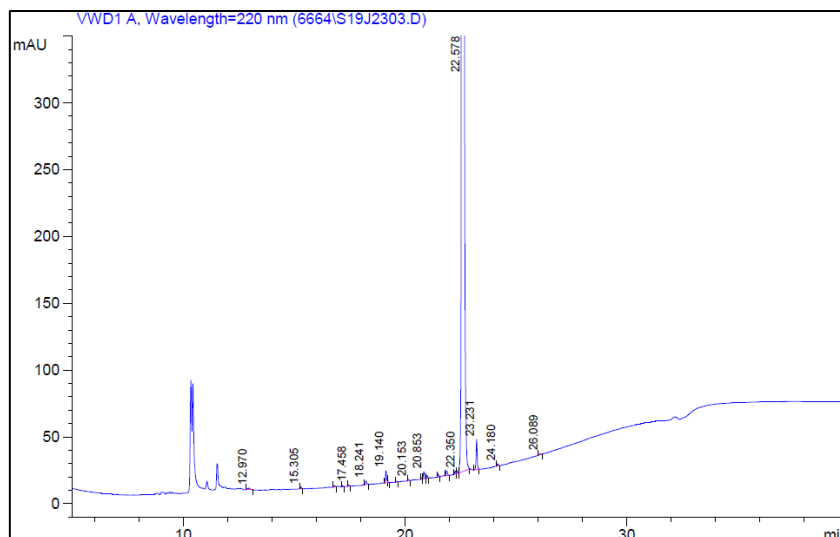


Figura 139. Cromatograma de **7005_UB-21510-P1-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

7005_UB-21510-P2. La segona fracció del cru de **7005** neutralitzat (1 L) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 85 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 500 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles. La solució es va agitar a 200 rpm i es va seguir mateix procediment que per **7005_UB-21510-P1**. En aquest cas, el pèptid va precipitar a 35 °C després d'addicionar TBME (425 mL) i de sembrar. El sòlid va dipositar al parar l'agitació i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida), obtenint-se un sòlid que es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (3,44 g de **7005_UB-21510-P2-01**). L'anàlisi per HPLC del sòlid (**Figura 140**) va mostrar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 98,8 % (22,5 min).

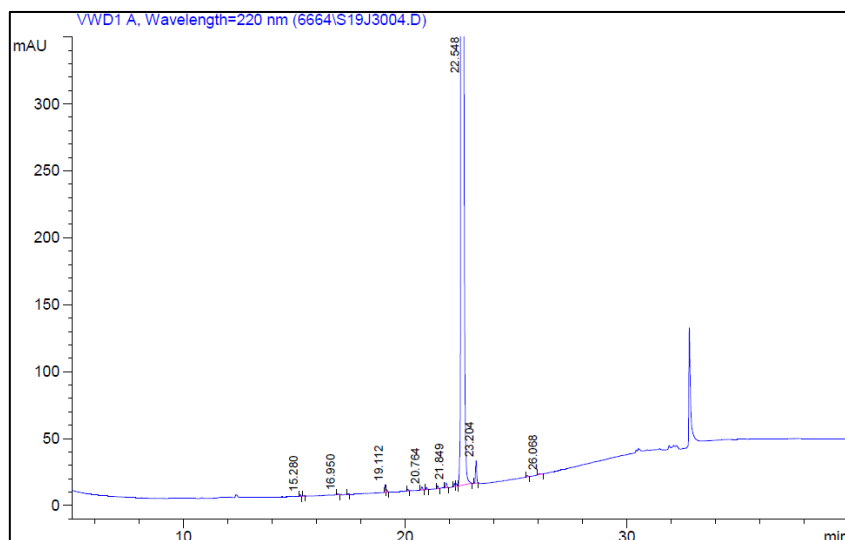


Figura 140. Cromatograma de **7005_UB-21510-P2-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.3.5. SÍNTESI DE **7005_UB-23417**

La resina 2-CTC (1,00 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en la xeringa del muntatge de la **Figura 126** (apartat 8.4.1.5.2) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Leu-OH (0,74 g, 1,49 eq) i DIPEA (0,54 g, 3,00 eq) en DCM (4 mL) es va carregar a la xeringa i la mescla de reacció es va agitar manualment amb una vareta de tefló

ocasionalment durant 1,5 h. Passat aquest temps, el MeOH (0,62 g, 0,80 mL/g resina) es va carregar al cru de reacció i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Una alíquota d'aminoacil-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (*apartat 8.4.1.3*). La funcionalització trobada va ser de 0,49 mmols/g (**Equació 2**) i es van determinar un total de 0,57 mmols d'aminoàcid (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es van realitzar seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, *apartat 8.4.2.2*) i el **Protocol 8** (**Taula 62**, *apartat 8.4.2.3*), respectivament. En la **Taula 70** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid. Als pocs minuts d'iniciar les reaccions d'acoblament (1-10 min), una alíquota de resina del cru de reacció es va tractar seguint el procediment descrit en l'*apartat 8.4.1.5.2* i es va analitzar per ^1H -RMN i HPLC. El test de ninhidrina d'una altra alíquota de resina (*apartat 8.4.1.5.1*) es va dur a terme paral·lelament per tal de comparar els resultats i determinar si la reacció havia finalitzat. Per altra banda, un cop es va tractar amb piperidina per eliminar del grup Fmoc, una alíquota de resina es va analitzar per ^1H -RMN i HPLC (*apartat 8.4.1.5.2*). Un cop passat el temps de reacció que s'indica a la taula, es va filtrar, la resina es va rentar, i es va dur a terme un test de ninhidrina per comprovar que totes les reaccions d'acoblament havien finalitzat.

Taula 70. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7005_UB-23417**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Val-OH	0,64	3,20	0,30	3,32	0,27	3,63	2	2,0
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	1,09	3,03	0,28	3,10	0,29	3,90	2	2,0
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	1,17	3,25	0,33	3,66	0,28	3,76	2	2,0
5	Fmoc-Asp(^t Bu)-OH	0,73	3,01	0,28	3,10	0,29	3,90	2	3,0
6	Boc-Ile-OH	0,56	4,11	0,36	3,99	0,34	4,57	2	2,0

En aquesta síntesi, l'etapa d'escissió del pèptid de la resina no es va dur a terme ja que la finalitat de la prova era desenvolupar un mètode de seguiment de les reaccions en SPPS.

8.4.3.6. SÍNTESI DE **7005_UB-23441**

La resina 2-CTC (11,01 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 2A (**Figura 123**, *apartat 8.4.1.1*) i es va rentar seguint el **Protocol 2** (**Taula 56**, *apartat 8.4.2.1*). Per incorporar el primer aminoàcid a la resina, una dissolució de Fmoc-Leu-OH (8,18 g, 1,50 eq) i DIPEA (6,12 g, 3,07 eq) en DCM (39 mL) es va carregar al reactor. La mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h i, passat aquest temps, es va carregar MeOH (7,11 g, 0,80 mL/g resina) i DIPEA (0,37 g, 0,19 eq) al cru de reacció. La mescla resultant es va seguir agitant durant 2 h i es va prendre una alíquota d'aminoacil-resina per tractar-la seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (*apartat 8.4.1.3*). La funcionalització trobada va ser de 0,58 mmols/g (**Equació 2**) i es van determinar un total de 7,74 mmols d'aminoàcid (**Equació 3**) acoblats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 5** (**Taula 59**, *apartat 8.4.2.2*), i l'anàlisi d'una alíquota de resina (procediment descrit en l'*apartat 8.4.1.5.2*)

al final de cada tractament de piperidina va permetre determinar si la reacció havia finalitzat per HPLC i/o ^1H -RMN. L'acoblament de la resta de Fmoc-aminoàcids es va realitzar seguint el **Protocol 9 (Taula 63, apartat 8.4.2.3)**, mostrant-se a la **Taula 71** les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les reaccions d'acoblament. Les reaccions d'acoblament es van monitoritzar cada 1,5 h mitjançant el test de ninhidrina (*apartat 8.4.1.5.1*) i les tècniques desenvolupades d'HPLC i ^1H -RMN (*apartat 8.4.1.5.2*). Els temps de reacció corresponen als que van indicar la finalització del procés pels resultats de les tres tècniques.

Taula 71. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7005_UB-23441**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Val-OH	7,99	2,95	3,93	3,22	3,14	3,12	16	1,5
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	14,89	3,06	3,78	3,10	3,15	3,13	22	1,5
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	14,57	2,99	3,75	3,07	3,12	3,10	22	1,5
5	Fmoc-Asp(^t Bu)-OH	10,01	3,05	3,85	3,16	3,20	3,18	23	1,5
6	Boc-Ile-OH	7,43	4,03	4,95	4,06	4,13	4,11	19	1,5

L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme en el reactor 2A. La peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11 (Taula 65, apartat 8.4.2.4)**. La flotació de la resina en DCM va permetre descarregar la solució àcida a una ampolla d'1 L pel tub de descàrrega del reactor, amb cura de que la resina no sortís del reactor. La resina es va rentar amb DCM (55 mL, 2 x 5 min), i en l'últim rentat, la resina i el dissolvent es van recollir en un vas de precipitats i la suspensió es va filtrar a baixa pressió utilitzant un embut Büchner. Les solucions resultants dels tractaments àcids i dels rentats es van recollir en la mateixa ampolla d'1 L. L'anàlisi per HPLC del sòlid (**Figura 141**) va mostrar **7005** amb una puresa cromatogràfica del 93,1 % (23,8 min).

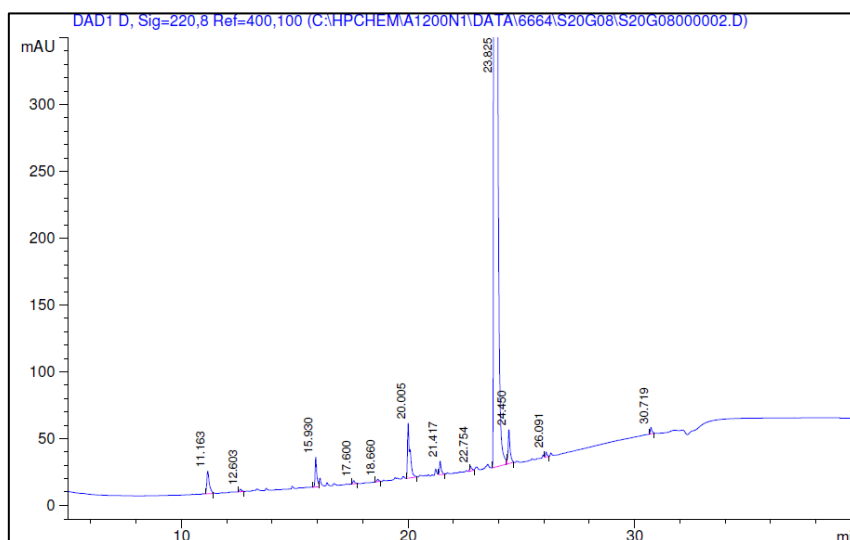


Figura 141. Cromatograma del cru acidolític de **7005_UB-23441**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

La neutralització del cru i la precipitació de **7005** es van dur a terme amb els procediments descrits en els següents apartats.

8.4.3.6.1. NEUTRALITZACIÓ DE TFA EN EL CRU

La dissolució del cru de **7005** (600 mL) es va transvasar a un reactor d'1 L amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, es va carregar NaHCO_3 (25,06 g, 5,00 eq) al reactor i la mescla es va agitar durant 1,5 h a 300 rpm. La suspensió resultant es va filtrar, i el sòlid i la dissolució resultants es van analitzar per ^{19}F -RMN. El contingut de TFA detectat a la dissolució va ser alt i es va repetir dues vegades més el tractament amb NaHCO_3 . Encara que se seguia detectant TFA en la dissolució, es va decidir seguir endavant amb la quantificació de **7005** en el cru i la seva precipitació.

8.4.3.6.2. QUANTIFICACIÓ DE **7005** EN EL CRU

Per a conèixer la quantitat de pèptid obtinguda en la síntesi, el dissolvent d'una alíquota (5 mL) del cru de **7005_UB-23441** es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat en un baló prèviament tarat, i el residu obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (85 mg). Un patró de quantificació (àcid maleic, 8,33 mg) es va pesar junt el residu obtingut i la mescla dels dos sòlids es va diluir en DMSO-d_6 (800 μL). L'anàlisi per ^1H -RMN va determinar un 60 % de riquesa de **7005** en el cru, és a dir, 9 g de **7005** extrapolant a la dissolució total del cru (900 mL).

8.4.3.6.3. PRECIPITACIÓ

La dissolució del cru de **7005** (900 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 90 mL i el cru resultant es va transvasar a un reactor d'1 L equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles. La dissolució es va agitar a 200 rpm i es va addicionar TBME (360 mL) en 1 h. La dissolució resultant es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-21510-P2-01** i la temperatura externa es va portar a 35 °C. La sembra es va redissoldre i es va addicionar més TBME (90 mL) al cru de reacció a 35 °C. La dissolució es va tornar a sembrar amb el mateix sòlid i la sembra es va redissoldre una altra vegada. Un volum més de TBME (90 mL) es va addicionar al cru i la temperatura externa es va baixar a 25 °C. La dissolució es va tornar a sembrar i es va deixar en agitació durant 12 h. Al dia següent, al no observar-se la formació de cap precipitat, dos volums més de TBME (180 mL) es van addicionar al cru i el pèptid va seguir sense precipitar. Arribat a aquest punt, la dissolució de cru resultant (780 mL) es va dividir en dues fraccions per fer més assajos de precipitació.

7005_UB-23441-P1. Una tercera part del cru de **7005** (260 mL) es va transvasar a un reactor de 0,5 L proveït d'agitador mecànic amb pales de tefló abatibles i es va dur a terme un canvi del dissolvent del cru (de TBME/DCM a H_2O) a través d'arrossegaments amb H_2O . Un sòlid gomós va precipitar i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (0,84 g de **7005_UB-23441-P1-01**) i es va analitzar per HPLC (**Figura 142**), determinant-se un 96,2 % de puresa cromatogràfica de **7005** (23,8 min).

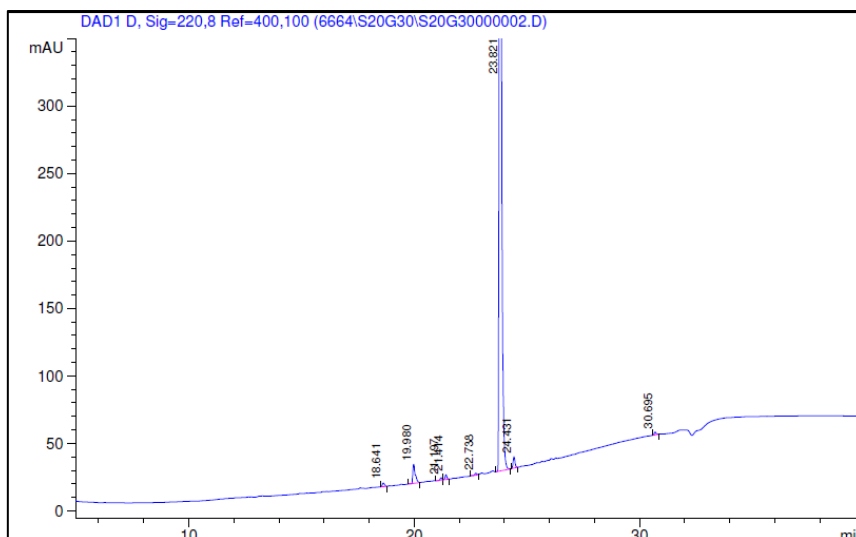


Figura 142. Cromatograma de 7005_UB-23441-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

7005_UB-23441-P2. Neutralització del cru: El cru restant de **7005** (520 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 40 mL, es van dur a terme arrossegaments amb DCM, i es va reproduir el procediment de neutralització del cru que es va utilitzar en la prova **7005_UB-21510-P1** (apartat 8.4.3.4.1.2). **Precipitació:** La fase orgànica resultant es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 30 mL i es va transvasar a un reactor de 250 mL proveït d'agitador mecànic amb pales de tefló abatibles. La dissolució es va agitar a 200 rpm i es va addicionar TBME (90 mL) a 25 °C en 30 min al cru de reacció. La dissolució es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-21510-02**, la dissolució va esdevenir tèrbola i es va addicionar més TBME (60 mL) al cru de reacció. Un precipitat que dipositava al parar l'agitació es va formar i la suspensió es va deixar en agitació 12 h. Al dia següent, la suspensió era densa i el sòlid dipositava molt lentament. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida), obtenint-se un sòlid que es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (1,66 g de **7005_UB-23441-P2-01**). L'anàlisi del sòlid per HPLC (**Figura 143**) va donar una puresa cromatogràfica de **7005** del 98,4 % (23,7 min).

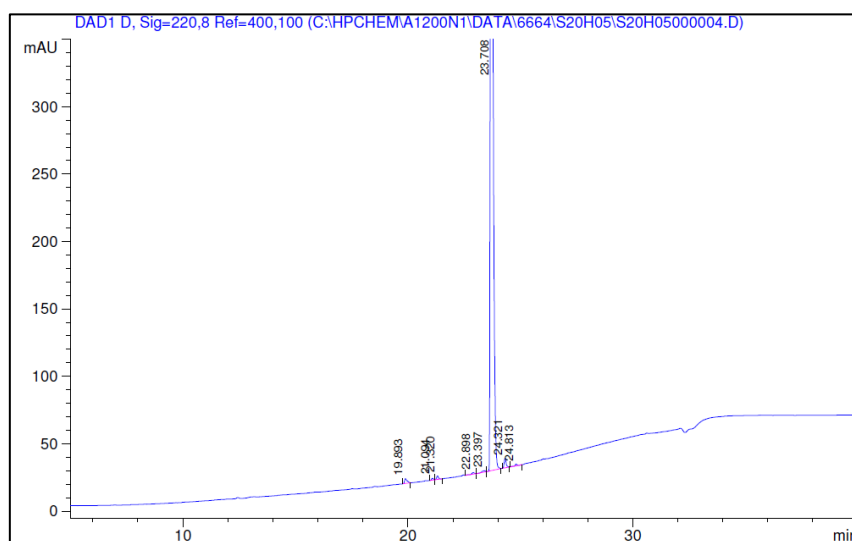


Figura 143. Cromatograma de 7005_UB-23441-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.3.7. SÍNTESI DE 7005_UB-23475: MAJOR ESCALA

La resina 2-CTC (41,45 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el Nutsche (**Figura 123**, *apartat 8.4.1.1*) i es va rentar seguint el **Protocol 3** (**Taula 57**, *apartat 8.4.2.1*). A continuació, una dissolució de Fmoc-Leu-OH (30,84 g, 1,50 eq) i DIPEA (22,77 g, 3,03 eq) en DCM (160 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 100 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar MeOH (27,64 g, 0,8 mL/g resina) al cru de reacció i la mescla resultant es va seguir agitant durant 2 h. Una alíquota d'aminoàcid-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (*apartat 8.4.1.3*), trobant-se una funcionalització de 0,59 mmols/g (**Equació 2**) i una quantitat total de 29,65 mmols d'aminoàcid (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va realitzar seguint el **Protocol 6** (**Taula 60**, *apartat 8.4.2.2*), i l'anàlisi d'una alíquota de resina per HPLC i/o ^1H -RMN (procediment descrit en l'*apartat 8.4.1.5.2*) després dels tractaments amb piperidina va permetre determinar si la reacció havia finalitzat. L'acoblament de la resta de Fmoc-aminoàcids es va dur a terme seguint el **Protocol 10** (**Taula 64**, *apartat 8.4.2.3*), a la **Taula 72** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les reaccions d'acoblament. Durant la reacció es va mostrejar una alíquota de resina cada 1,5 h i es va analitzar mitjançant el test de ninhidrina (*apartat 8.4.1.5.1*) i les tècniques desenvolupades d'HPLC i ^1H -RMN (*apartat 8.4.1.5.2*). El temps de reacció que es mostren a la taula van confirmar per les tres tècniques que la reacció havia finalitzat. No va ser necessari reacoblar cap aminoàcid.

Taula 72. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-23475.

Etap	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Val-OH	31,00	2,98	14,02	2,99	11,72	3,03	62	1,5
3	Fmoc-Gln(Trt)-OH	56,11	3,00	14,03	2,99	11,63	3,01	83	1,5
4	Fmoc-Gln(Trt)-OH	55,81	2,98	14,07	3,00	11,79	3,05	83	1,5
5	Fmoc-Asp('Bu)-OH	37,76	3,00	14,44	3,08	11,88	3,07	80	1,5
6	Boc-Ile-OH	28,49	4,02	18,88	4,03	15,70	4,06	70	1,5

L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme en el **Reactor 4**, tractant la peptidil-resina amb una dissolució d'1 % de TFA en DCM, tal i com es descriu en el **Protocol 12** (**Taula 66**, *apartat 8.4.2.4*). Les solucions resultants dels tractaments de TFA i dels rentats de DCM es van recollir en una ampolla de 2 L. L'anàlisi per HPLC del cru de **7005** (**Figura 144**) va mostrar una puresa cromatogràfica de **7005** del 88,8 % (22,1 min).

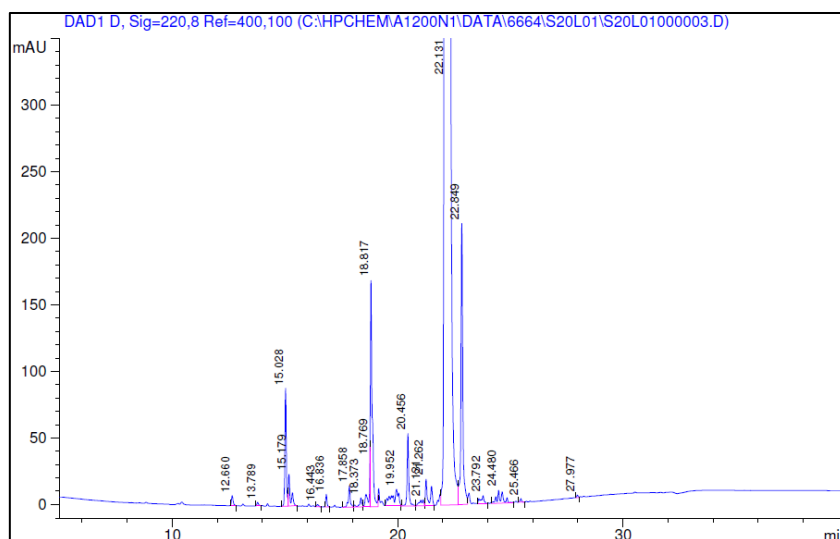


Figura 144. Cromatograma del cru acidolític de **7005_UB-23475**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

La neutralització del cru i la precipitació de **7005** es van dur a terme amb els procediments que es detallen a continuació.

8.4.3.7.1. NEUTRALITZACIÓ DEL TFA EN EL CRU

La neutralització del TFA del cru es va dur a terme amb el mateix procediment descrit per la neutralització del cru procedent en la síntesi de **7005_UB-23441** (apartat 8.4.3.6.1). Els rentats amb NaHCO_3 no van ser efectius per eliminar el TFA del cru de reacció i es va decidir continuar amb la quantificació de **7005** en el cru i la precipitació del pèptid.

8.4.3.7.2. QUANTIFICACIÓ DE **7005** EN EL CRU

Per a conèixer la quantitat de pèptid obtinguda en la síntesi es va seguir el mateix procediment descrit per la quantificació de **7005** en la síntesi de **7005_UB-23441** (apartat 8.4.3.6.2). La quantificació de **7005** per ^1H -RMN amb àcid maleic (riquesa del 70 %) va permetre determinar els grams aproximats de pèptid que es van obtenir en la síntesi (31 g).

8.4.3.7.3. PRECIPITACIÓ

Per a la precipitació de **7005** es va dur a terme el mateix procediment de precipitació que en la síntesi de **7005_UB-23441** (apartat 8.4.3.6.3). Tal com va succeir en el cas de **7005_UB-23441**, **7005** no va precipitar amb la proporció optimitzada de DCM/TBME (10:50). La sembra de **7005** amb el lot **7005_UB-21510-02** es va redissoldre passades 12 h i no es va observar cap canvi aparent en la dissolució. L'anàlisi de la dissolució per ^1H -RMN i ^{19}F -RMN (500 μL en 400 μL de CDCl_3) va mostrar un alt contingut de TFA. El cru es va concentrar a la meitat (800 mL) i es va addicionar TBME (950 mL) durant 1 h. La dissolució resultant es va sembrar amb **7005_UB-21510-02** i es va observar terbolesa. La temperatura externa es va baixar a 5 $^\circ\text{C}$ amb una rampa de 4 h i la dissolució es va deixar a 5 $^\circ\text{C}$ durant 12 h. Al dia següent la sembra no s'havia redissolt però el pèptid tampoc havia precipitat. Es va decidir doncs dividir el cru total (1353,80 g, 1800 mL) en fraccions per a trobar una precipitació adient per al pèptid.

7005_UB-23475-P1. Una fracció del cru de **7005** (80,72 g, 100 mL) es va transvasar a un reactor de 250 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles. A continuació, es va addicionar heptà (100 mL) en 30 min al cru de reacció i un sòlid va precipitar. La temperatura

externa es va baixar a 5 °C i es va mantenir en agitació durant 12 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va assecat en el dessecador de buit fins a pes constant (1,20 g de **7005_UB-23475-P1-01**). L'anàlisi per HPLC (**Figura 145**) del sòlid va mostrar una puresa cromatogràfica de **7005** del 94,8 % (22,2 min).

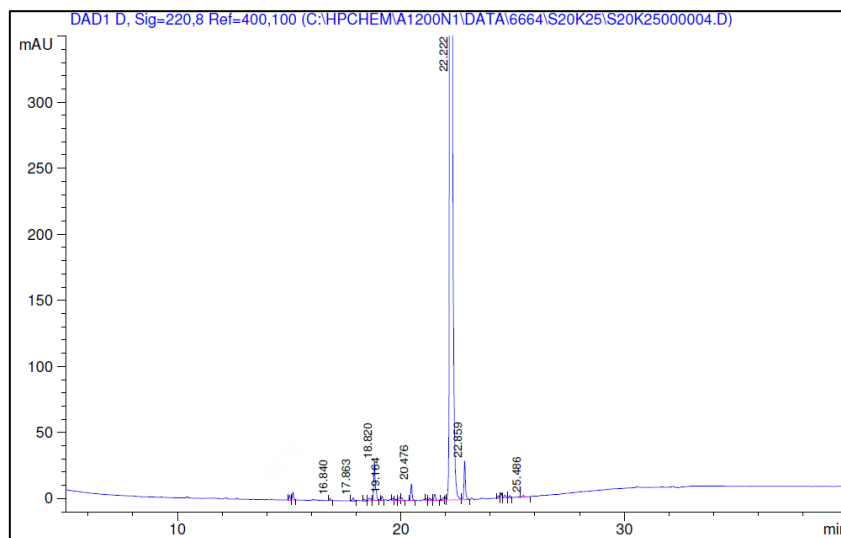


Figura 145. Cromatograma de **7005_UB-23475-P1-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Precipitació de les AM: Les AM tèrboles que es van obtenir després de la filtració, es van concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 40 mL, es va carregar més heptà (60 mL) al baló, i el cru resultant es va concentrar a pressió reduïda fins a 40 mL. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va assecat al dessecador de buit fins a pes constant (0,66 g de **7005_UB-23475-P1-02**). L'anàlisi per HPLC (**Figura 146**) va donar un 90,5 % de puresa cromatogràfica per **7005** (22,2 min).

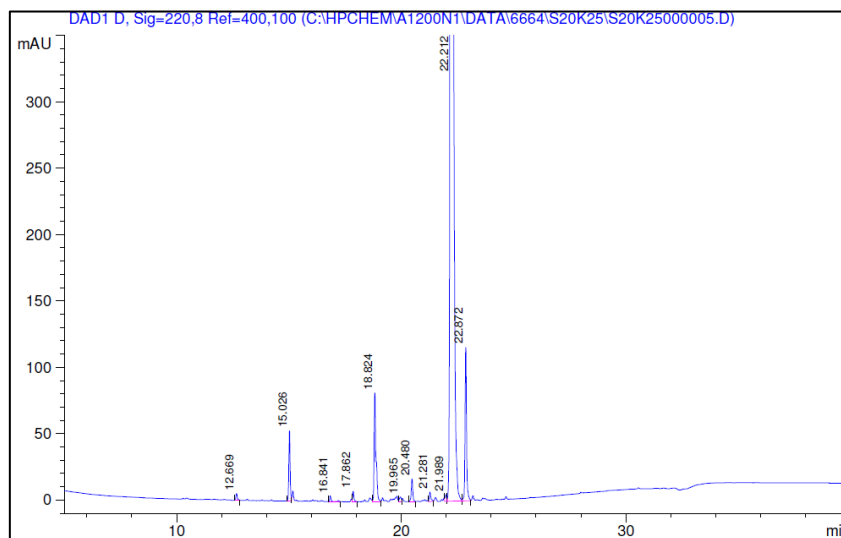


Figura 146. Cromatograma de **7005_UB-23475-P1-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

L'anàlisi per ^{19}F -RMN dels sòlids obtinguts (**7005_UB-23475-P1-01** i **7005_UB-23475-P1-02**) va mostrar un alt contingut de TFA i els sòlids es van redissoldre per tal de eliminar el TFA amb el procediment descrit a continuació.

Coevaporació del TFA amb DCM: Els sòlids **7005_UB-23475-P1-01** i **7005_UB-23475-P1-02** (1,80 g) es van carregar en un reactor de 250 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles. A continuació, es va agitar a 200 rpm, es va carregar DCM (90 mL) i la dissolució resultant es va concentrar a pressió reduïda en el reactor fins a 18 mL. Dos arrossegaments més amb DCM (90 mL x 2) es van dur a terme i el cru resultant es va analitzar per ^{19}F -RMN. Donat que el contingut de TFA no va baixar, la dissolució es va concentrar al reactor fins a 18 mL i es va addicionar heptà (90 mL) en 30 min. Un sòlid va precipitar i la temperatura externa es va baixar a 5 °C. Passada 1 h, la suspensió es va filtrar i el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (1,00 g de **7005_UB-23475-P1-03**). L'anàlisi del sòlid per ^{19}F -RMN va mostrar un alt contingut de TFA.

Eliminació de la sal de TFA: El sòlid **7005_UB-23475-P1-03** es va carregar a un baló proveït de nucli magnètic, es va suspendre amb H_2O (10 mL), es va deixar 12 h amb agitació a 300 rpm i la suspensió resultant es va filtrar a pressió reduïda. Després d'una lenta filtració es va obtenir un sòlid blanc que es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,51 g de **7005_UB-23475-P1-04**). L'anàlisi del sòlid per ^{19}F -RMN va mostrar un baix contingut de TFA.

Recristal·lització: El sòlid resultant del tractament amb H_2O (0,51 g de **7005_UB-23475-P1-04**) es va carregar a un reactor de 100 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, es va dissoldre en DCM (5 mL) amb agitació a 200 rpm, i es va addicionar TBME (25 mL) en 30 min. La dissolució resultant es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7005_UB-21510-02** i es va deixar en agitació 12 h. Al dia següent, es va observar un sòlid blanc que dipositava al parar l'agitació i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (0,66 g de **7005_UB-23475-P1-05**) i es va analitzar per HPLC (**Figura 147**), determinant-se un 97,5% de puresa cromatogràfica per **7005** (22,2 min).

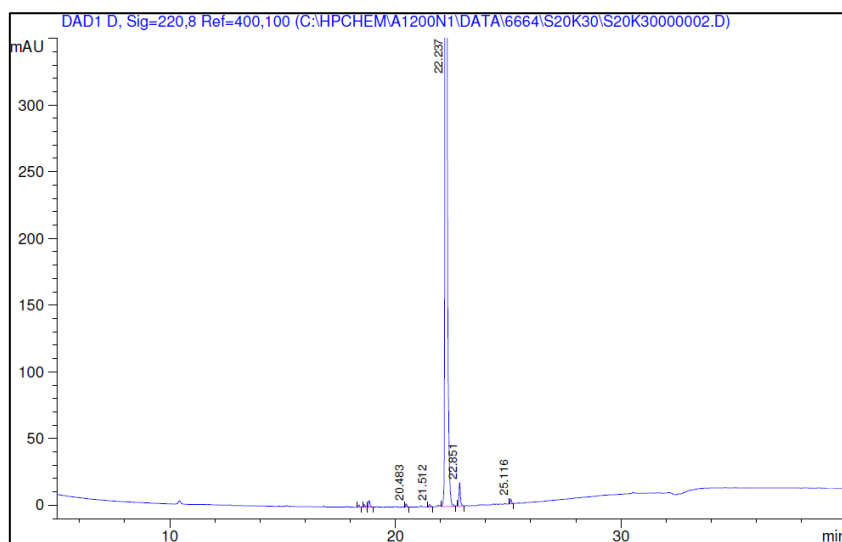


Figura 147. Cromatograma de **7005_UB-23475-P1-05**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

7005_UB-23475-P2. Una fracció del cru de **7005** (75,32 g, 100 mL) es va transvasar a un reactor de 250 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles i es va agitar a 200 rpm. A continuació, es va carregar H_2O (100 mL) al cru de reacció i un sòlid molt fi va precipitar. En la suspensió es van observar tres fases i el dissolvent del cru es va concentrar a la meitat del volum (100 mL). Es va carregar més H_2O (100 mL) al cru i el TBME es va acabar d'eliminar concentrant el cru una vegada més fins a 100 mL. La suspensió es va filtrar (filtració molt lenta) i es va obtenir

un sòlid que es va assecat en el dessecador de buit fins a pes constant (1,63 g de **7005_UB-23475-P2-01**) i es va analitzar per HPLC (**Figura 148**), determinant-se un 95,1 % de puresa cromatogràfica per **7005** (22,2 min).

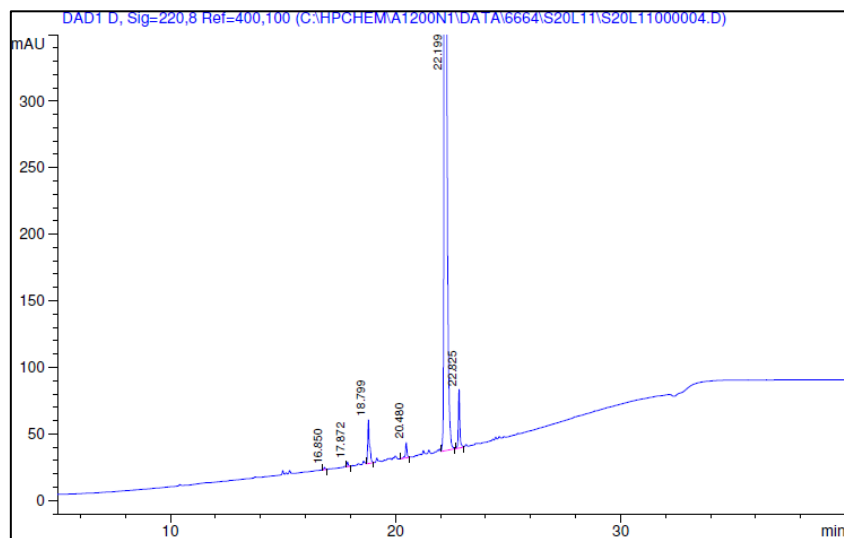


Figura 148. Cromatograma de **7005_UB-23475-P2-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

7005_UB-23475-P3. La resta del cru de **7005** que quedava sense precipitar (1197,76 g, 1600 mL) es va transvasar a un reactor de 2 L proveït d'agitador mecànic de pales de tefló abatibles, i es va agitar a 200 rpm. El pèptid es va precipitar amb arrossegaments d'H₂O (700 mL x 2) utilitzant el mateix procediment descrit a la prova 2 (**7005_UB-23475-P2**). La suspensió es va deixar agitant a 5 °C 12 h i es va filtrar a pressió reduïda en el filtre Nutsche. El sòlid obtingut es va assecat en el dessecador de buit fins a pes constant (28,23 g de **7005_UB-23475-P3-01**) i l'anàlisi per HPLC del sòlid (**Figura 149**) va donar una puresa cromatogràfica del 95,5 % per **7005** (22,2 min).

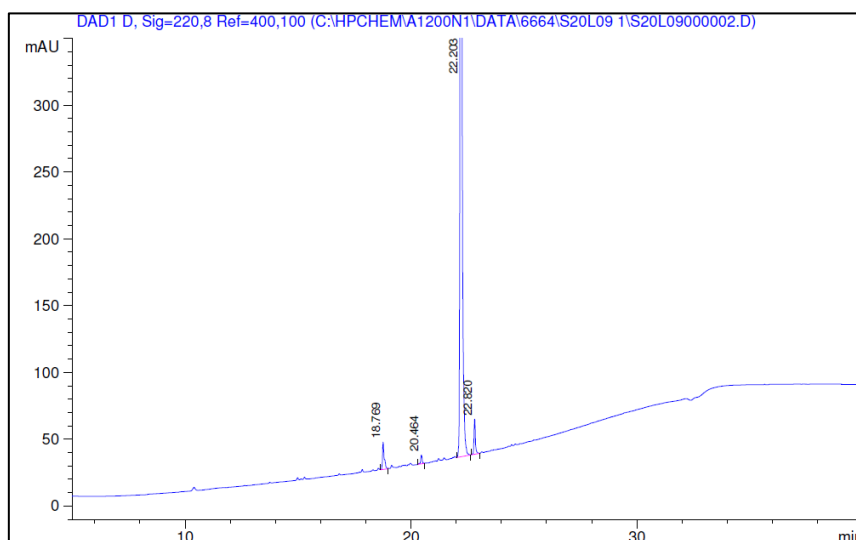
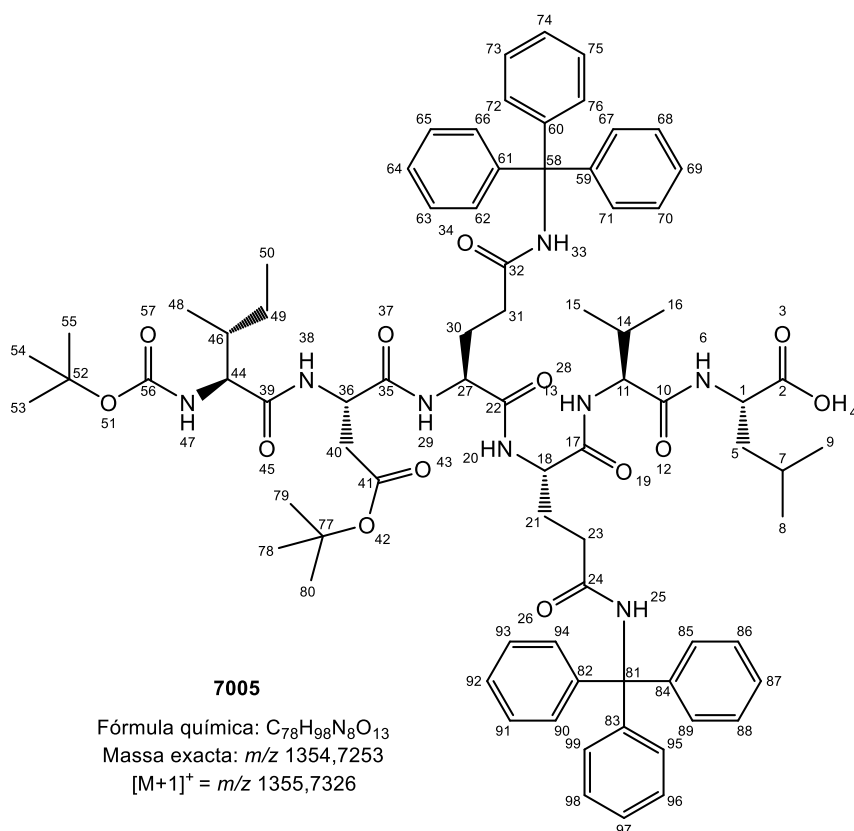


Figura 149. Cromatograma de **7005_UB-23475-P3-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.4. CARACTERITZACIÓ DE 7005 (LOT UB-23475-P3-01)



8.4.4.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

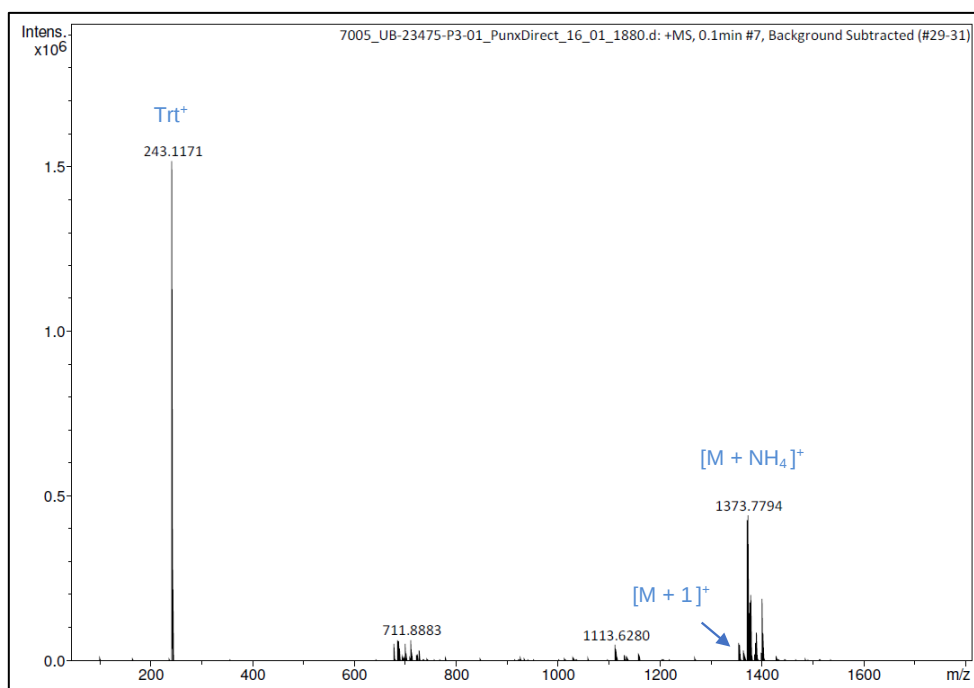


Figura 150. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7005_UB-23475-P3-01.

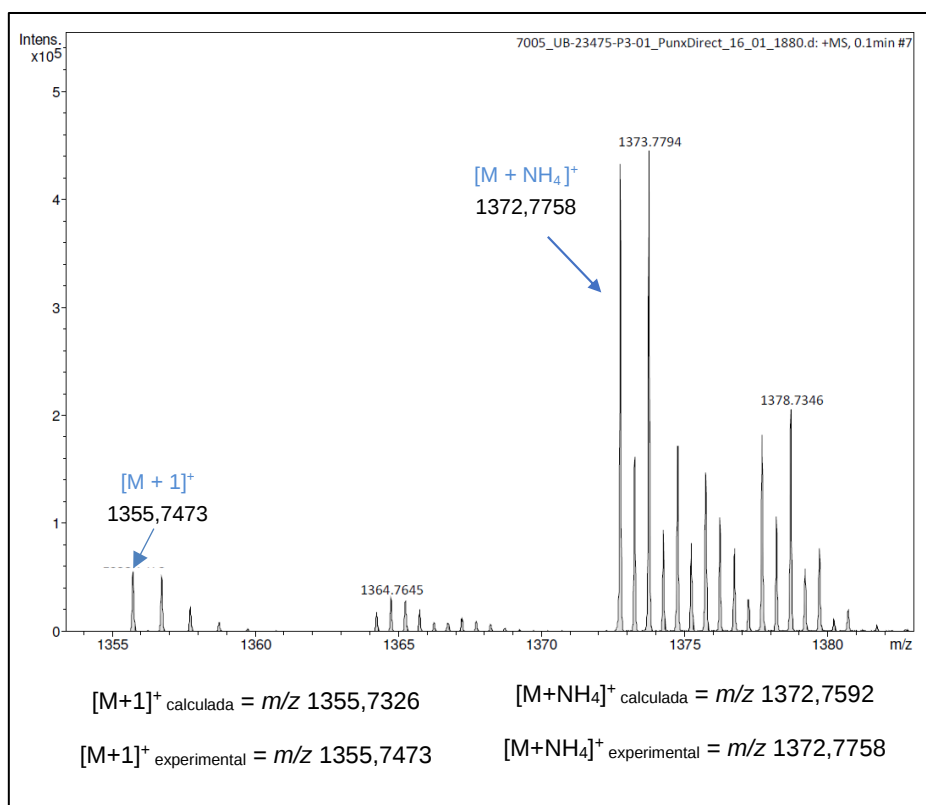


Figura 151. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de **7005_UB-23475-P3-01**.

8.4.4.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.4.4.2.1. ESPECTRES DE ¹H-RMN

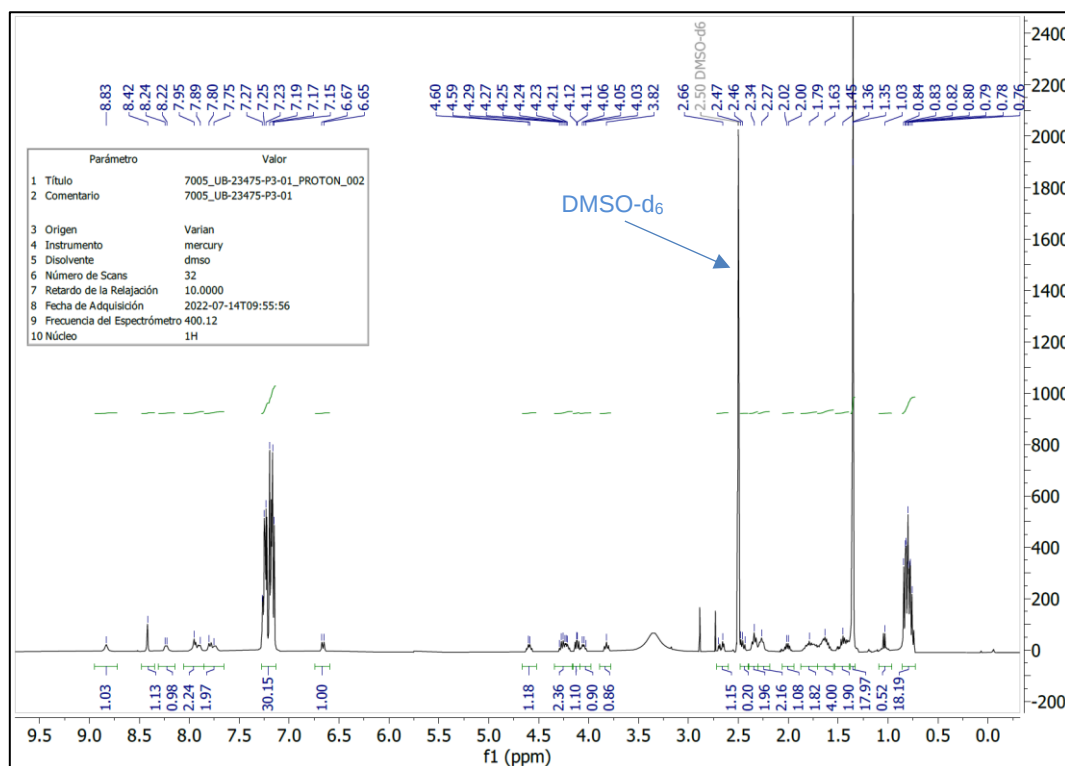


Figura 152. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **7005_UB-23475-P3-01**.

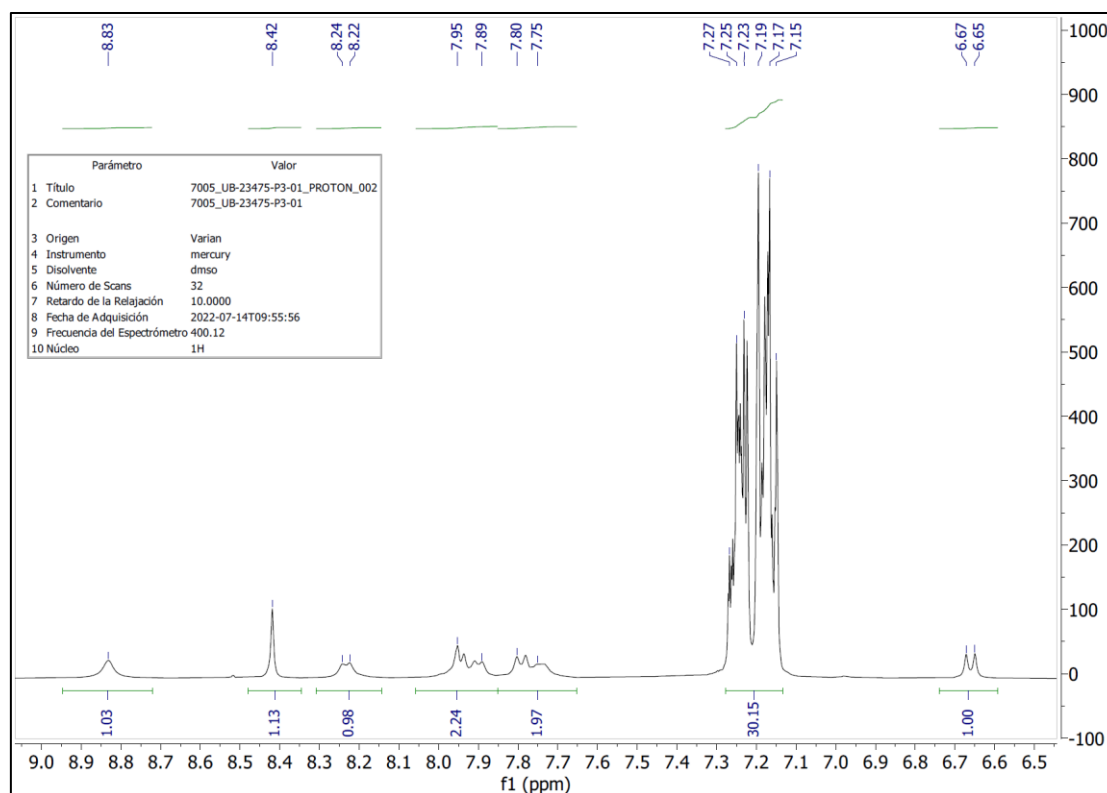


Figura 153. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de 7005_UB-23475-P3-01.

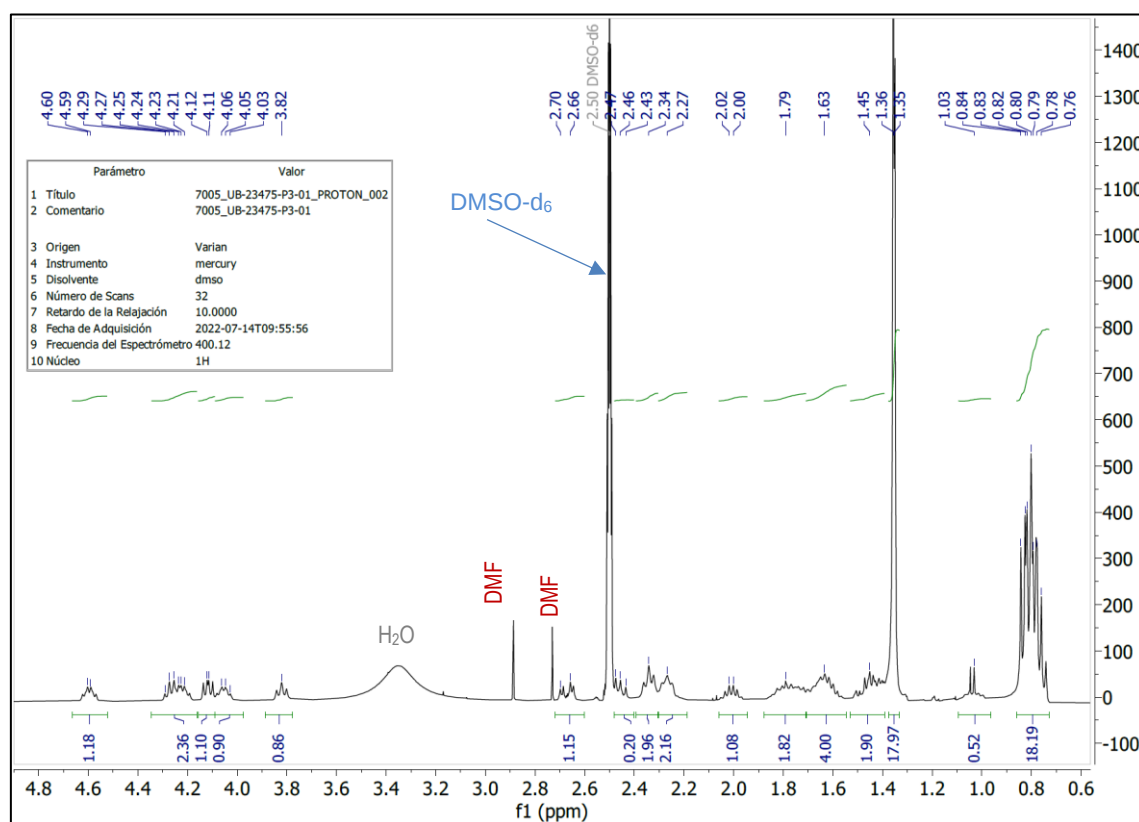


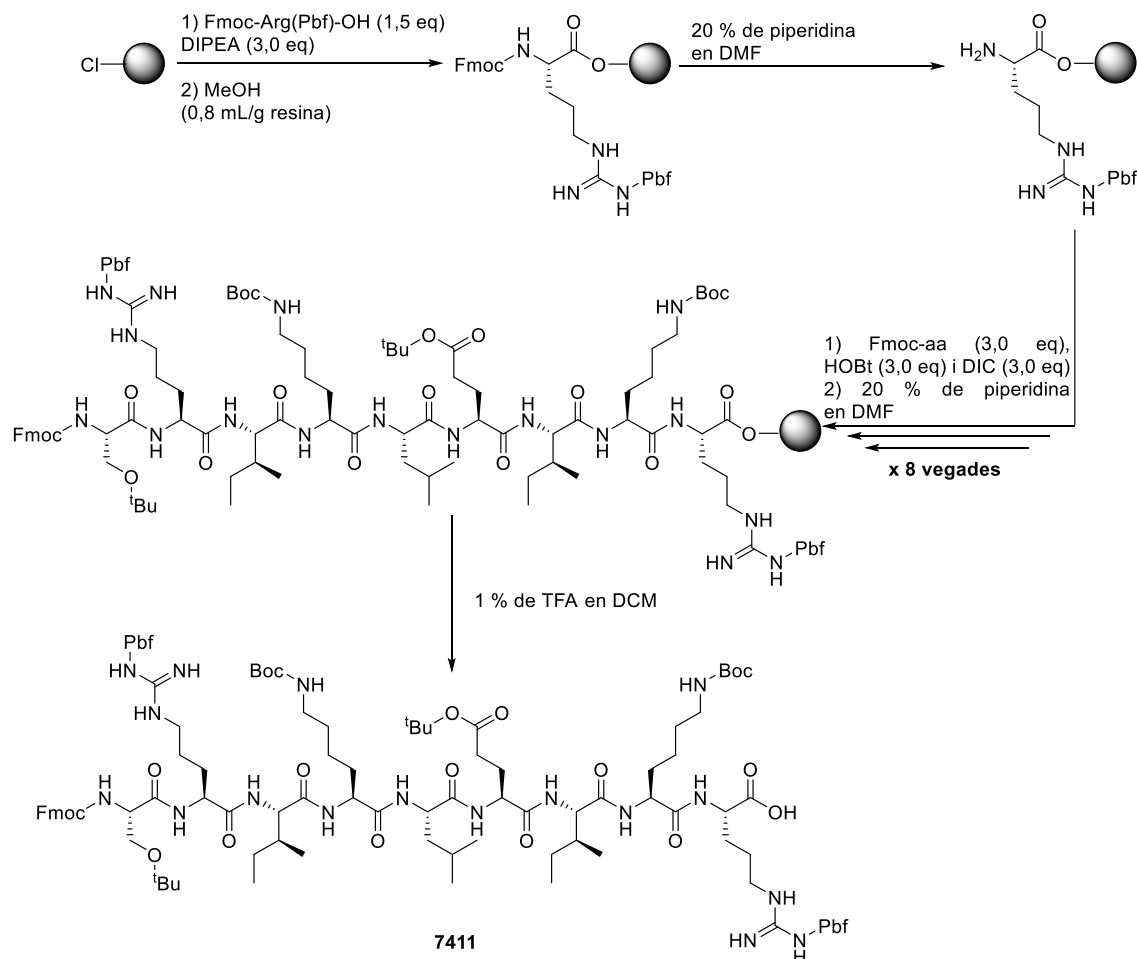
Figura 154. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de 7005_UB-23475-P3-01.

Taula 73. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO- d_6 de **7005_UB-23475-P3-01**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Constant d'acoblament (Hz)	Integral	ASSIGNACIÓ
8,83	s	-	1	H33+H25
8,42	s	-	1	
8,23	d	7,8	1	H38+H29+H20+H13+H6
7,94	d	6,6	2	
7,90	d	7,3		
7,79	d	8,8	2	
7,74	multiplet	-		
7,27-7,15	multiplet	-	30	H62+H63+H64+H65+H66+H67+H68 H69+H70+H71+H72+H73+H74+H75 H76+H85+H86+H87+H88+H89+H90+H91 H92+H93+H94+H95+H96+H97+H98+H99
6,66	d	8,6	1	H47
4,60	multiplet	-	1	H36
4,29 – 4,03	multiplet	-	4	H27+H18+H44+H1
3,82	t	8,1	1	H11
2,68	dd	5,1; 16,2	1	H40
2,46	dd	8,6; 16,2	1	H40'
2,34	t	8,2	2	H23/H31
2,27	t	8,2	2	H23/H31
2,01	octuplet	6,6	1	H14
1,79	multiplet	-	2	H21/H30
1,63	multiplet	-	4	H21/H30 H46+H7
1,45	multiplet	-	2	H5
1,40	multiplet	-	1	H49
1,36	s	-	18	H53+H54+H55+H78+H79+H80
1,35	s			
1,03	m	-	1	H49'
0,83	d	6,7	15	H48+H15+H16+H8+H9
0,82	d	7,7		
0,81	d	6,8	1,55	
0,79	d	8,2	2,08	
0,78	d	6,7	1,50	
0,76	t	7,5	3	H50

8.4.5. SÍNTESI DE 7411

8.4.5.1. PROCEDIMENT GENERAL



Esquema 65. Síntesi en fase sòlida del nonapèptid 7411.

8.4.5.2. SÍNTESI DE 7411_UB-19146

La resina 2-CTC (6,75 g) es va introduir en el reactor 1 (**Figura 123**, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1). A continuació, una dissolució de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (9,26 g, 1,51 eq) i DIPEA (3,74 g, 3,06 eq) en DCM (44 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar MeOH (4,33 g, 0,80 mL/g resina) al cru de reacció i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Una alíquota d'aminoàcid-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (**apartat 8.4.1.3**), trobant-se una funcionalització de 0,42 mmol/g (**Equació 2**) i es van calcular un total de 3,79 mmols de Fmoc-Arg(Pbf)-OH incorporats a la resina (**Equació 3**). L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, apartat 8.4.2.2) i l'acoblament de la resta de Fmoc-aminoàcids seguint el **Protocol 8** (**Taula 62**, apartat 8.4.2.3). En la **Taula 74** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid. Els tests de ninhidrina van ser negatius (**apartat 8.4.1.5.1**) pels temps de reacció que es donen a la taula i en les etapes on el test de ninhidrina seguia sent blau passades aproximadament 4 h de reacció, es va dur a terme el reacoblament del Fmoc-aminoàcid. El reacoblament va ser necessari en les etapes 5, 6, 7 i 8 (x 2).

Taula 74. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7411_UB-19146**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,44	3,00	1,81	3,06	1,52	3,11	15	3,0
3	Fmoc-Ile-OH	4,15	3,04	1,84	3,11	1,60	3,28	13	6,0
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	4,97	3,02	1,81	3,06	1,51	3,09	15	4,0
5	Fmoc-Leu-OH	4,14	3,03	1,84	3,11	1,49	3,05	13	4,0
5*	Fmoc-Leu-OH	4,20	3,07	1,82	3,07	1,53	3,13	13	1,0
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,55	3,06	1,85	3,12	1,49	3,05	15	4,0
6*	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,54	3,06	1,98	3,34	1,49	3,05	15	1,0
7	Fmoc-Ile-OH	5,56	4,07	2,44	4,12	2,09	4,28	15	2,5
7*	Fmoc-Ile-OH	4,17	3,05	1,83	3,09	1,55	3,18	15	3,0
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	10,13	4,04	2,45	4,14	2,08	4,26	15	4,0
8*	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	7,66	3,05	1,93	3,26	1,50	3,07	15	2,0
8*	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	7,55	3,01	1,87	3,16	1,60	3,28	15	4,0
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	7,50	5,06	3,03	5,12	2,46	5,04	15	3,0

(*) Reacoblament

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA, tal i com es descriu en el **Protocol 11 (Taula 65, apartat 8.4.2.4)**. Cada dissolució del cru resultant del tractament de TFA es va recollir en 1 baló d'1 L (en total 3 balons, un per cada tractament de TFA), que contenia TEA (1,99 g, 1,00 eq respecte el TFA) i TBME (600 mL) en cada un. La precipitació d'un sòlid gomós va ser instantània i la filtració a pressió reduïda de la suspensió va ser molt lenta. A les 4 h, la filtració es va haver d'aturar, el cru es va ajuntar en un únic baló i el dissolvent del cru es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 150 mL. La suspensió resultant es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida) i el sòlid obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (3,26 g de **7411_UB-19146-01**). L'anàlisi per HPLC del sòlid (**Figura 155**) va mostrar un 94,0 % de puresa cromatogràfica per **7411** (23,8 min).

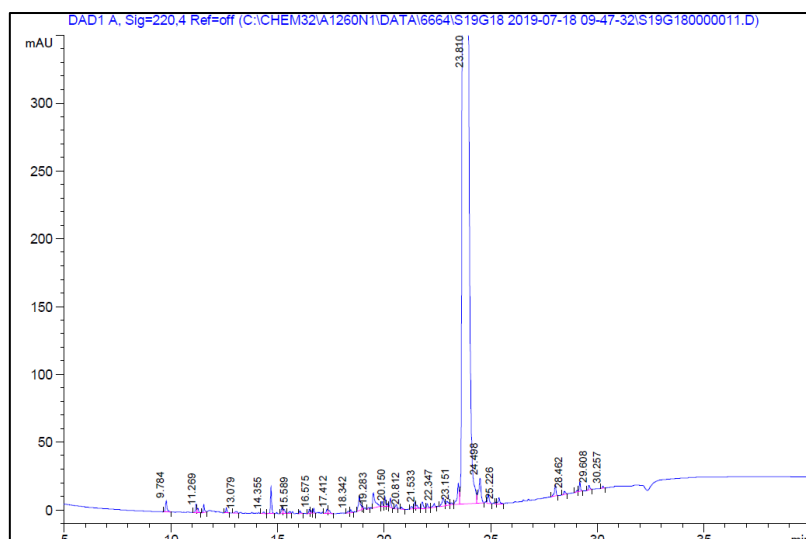


Figura 155. Cromatograma de 7411_UB-19146-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.5.3. SÍNTESI DE 7411_UB-21531

La resina 2-CTC (4,94 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 1 (**Figura 123**, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1). Per tal d'incorporar el primer aminoàcid, una dissolució de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (6,74 g, 1,50 eq) i DIPEA (2,82 g, 3,15 eq) en DCM (30 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar MeOH (3,14 g, 0,80 mL/g resina) al cru de reacció, la mescla resultant es va agitar durant 1 h, i una alíquota d'aminoàcid-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (*apartat 8.4.1.3*). La funcionalització resultant va ser de 0,51 mmols/g (**Equació 2**) amb una incorporació total de 3,61 mmols de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**Equació 3**) a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va realitzar seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, apartat 8.4.2.2) i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es va dur a terme seguint el **Protocol 8** (**Taula 62**, apartat 8.4.2.3). En la **Taula 75** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid. Els temps de reacció corresponen a tests de ninhidrina negatius (*apartat 8.4.1.5.1*). En aquesta síntesi no va ser necessari el reacoblament de cap Fmoc-aminoàcid.

Taula 75. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-21531.

Etap	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,21	2,99	1,73	3,04	1,52	3,24	10	1,5
3	Fmoc-Ile-OH	5,53	4,21	2,41	4,24	1,99	4,25	8	2,0
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	6,33	4,01	2,31	4,06	1,87	3,99	10	2,0
5	Fmoc-Leu-OH	5,28	4,02	2,37	4,17	1,89	4,03	8	3,5
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6,97	4,01	2,38	4,19	1,93	4,12	10	2,5
7	Fmoc-Ile-OH	5,28	4,02	2,59	4,56	1,87	3,99	8	2,5
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	11,95	4,96	3,04	5,35	2,45	5,23	20	3,0
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	7,14	5,02	2,91	5,12	2,45	5,23	10	3,5

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11** (Taula 65, apartat 8.4.2.4). Les solucions resultants dels tractaments de TFA i dels rentats de DCM es van recollir en una ampolla d'1 L (600 mL) i es va analitzar per HPLC (**Figura 156**), resultant una puresa cromatogràfica del 83,8 % per **7411** (23,8 min).

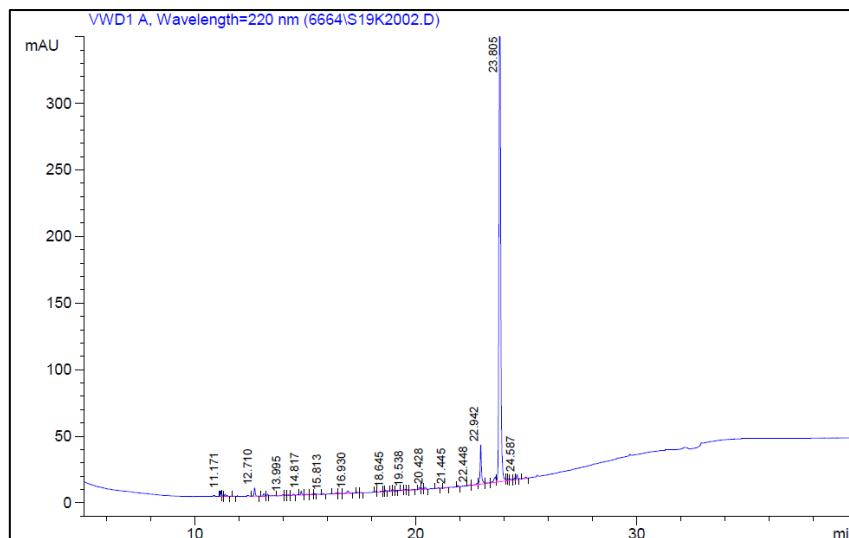


Figura 156. Cromatograma del cru acidolític de **7411_UB-21531**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

La dissolució del cru de **7411** es va neutralitzar i es va dividir en diferents fraccions per tal de dur a terme proves de precipitació, tal i com es descriu en el següent apartat.

8.4.5.3.1. NEUTRALITZACIÓ DEL CRU

El cru de **7411** es va transvasar a un reactor d'1 L amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, es va carregar al reactor NaHCO_3 (22,03 g, 5,15 eq respecte el TFA) i la mescla es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. La suspensió es va filtrar i la dissolució resultant es va analitzar per ^{19}F -RMN. Es va dur a terme un segon tractament de NaHCO_3 (21,52 g, 5,03 eq) però va demostrar per ^{19}F -RMN no ser efectiu.

8.4.5.3.2. PROVES DE PRECIPITACIÓ

Prova 1. Una fracció del cru de **7411** neutralitzat (120 mL) es va transvasar a un reactor de 250 mL amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles. El cru es va rentar amb H_2O (200 mL) i el pèptid va precipitar inesperadament. La filtració de la suspensió va resultar ser molt lenta i el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,43 g de **7411_UB-21531-P1-01**). L'anàlisi per HPLC (**Figura 157**) va mostrar **7411** amb una puresa cromatogràfica del 69,5 % (23,9 min), acompanyat d'un 26 % d'una impuresa desconeguda (22,9 min).

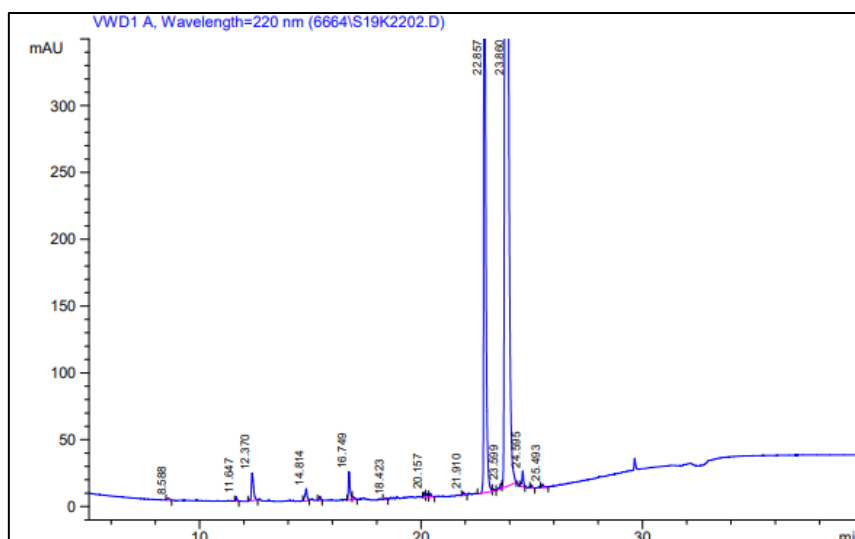


Figura 157. Cromatograma de 7411_UB-21531-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 2. Una fracció del cru de **7411** neutralitzat (120 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 16 mL. La solució resultant es va transvasar a un reactor de 150 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, i es va agitar a 200 rpm. A continuació, es va addicionar TBME (96 mL) al cru en 1,5 h i es va deixar en agitació 12 h. Passat aquest temps, no es va observar la formació de cap sòlid i es va afegir més TBME (64 mL) al cru. Un oli groc va dipositar al fons del reactor i la dissolució es van decantar. L'oli es va tornar a carregar al reactor, es va addicionar H₂O (80 mL) al cru en 30 min amb agitació vigorosa (300 rpm), i un sòlid gomós va precipitar. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta), el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,28 g de **7411_UB-21531-P2-01**) i l'anàlisi per HPLC d'aquest sòlid (**Figura 158**) va mostrar **7411** amb un 87,1 % de puresa cromatogràfica (23,9 min).

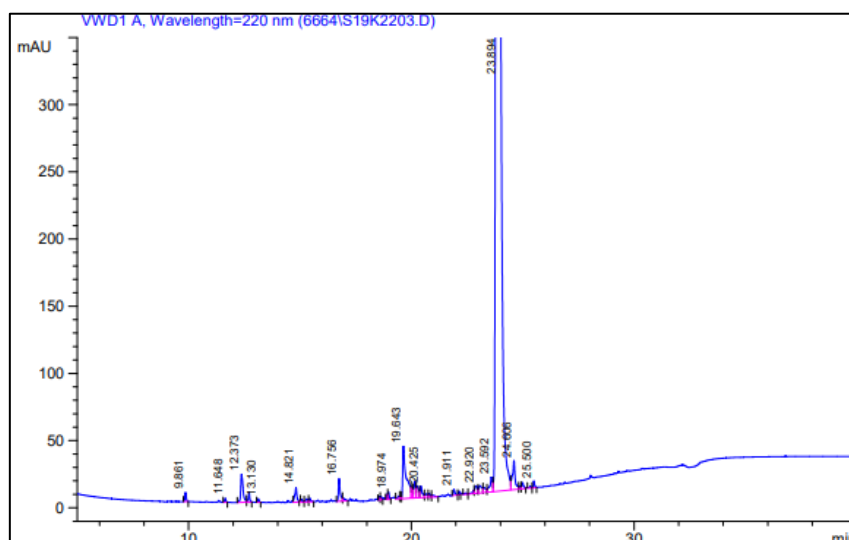


Figura 158. Cromatograma de 7411_UB-21531-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 3. Una fracció del cru de **7411** neutralitzat (72 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 37 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 250 mL proveït d'agitador mecànic amb pales de tefló abatibles i es va agitar a 200 rpm. A continuació, es va

addicionar al cru TBME (111 mL) en 2 h, la dissolució resultant es va sembrar amb una punta d'espàtula del sòlid **7411_UB-21531-P2-01** i es va deixar en agitació 12 h. Al dia següent, la sembra no s'havia redissolt i no es va observar la formació de cap sòlid. Es va addicionar més TBME (74 mL) al cru i la dissolució va esdevenir tèrbola. Passades 12 h, un oli groc va dipositar al fons del reactor i es va dur a terme un canvi del dissolvent del cru a TBME. L'oli obtingut no es va redissoldre i es va decantar per tractar-lo amb H₂O (150 mL). Va precipitar un sòlid en gomós i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,32 g de **7411_UB-21531-P3-01**) i es va analitzar per HPLC (**Figura 159**), resultant un 93,3 % de puresa cromatogràfica de **7411** (23,8 min).

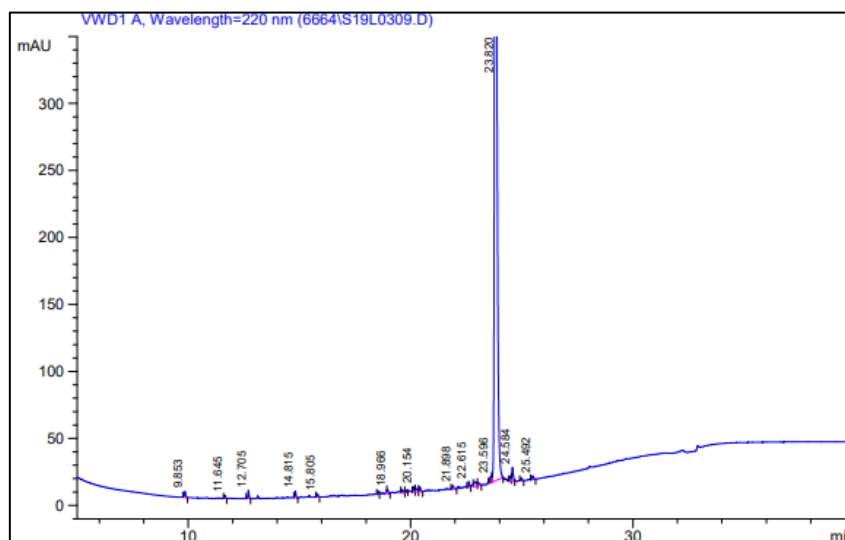


Figura 159. Cromatograma de **7411_UB-21531-P3-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 4. Una fracció del cru de **7411** neutralitzat (78 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 10 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 100 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, i es va agitar a 200 rpm. Es va addicionar IPA (30 mL) al cru en 1 h i la dissolució resultant es va deixar en agitació durant 12 h. Passat aquest temps, la dissolució era tèrbola i un volum més d'IPA (10 mL) es va addicionar gota a gota al cru de reacció. Un sòlid que dipositava al parar l'agitació va precipitar, la suspensió es va deixar en agitació a 80 rpm durant 48 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,19 g de **7411_UB-21531-P4-01**) i es va analitzar per HPLC (**Figura 160**), mostrant una puresa cromatogràfica del 97,4 % de **7411** (23,8 min).

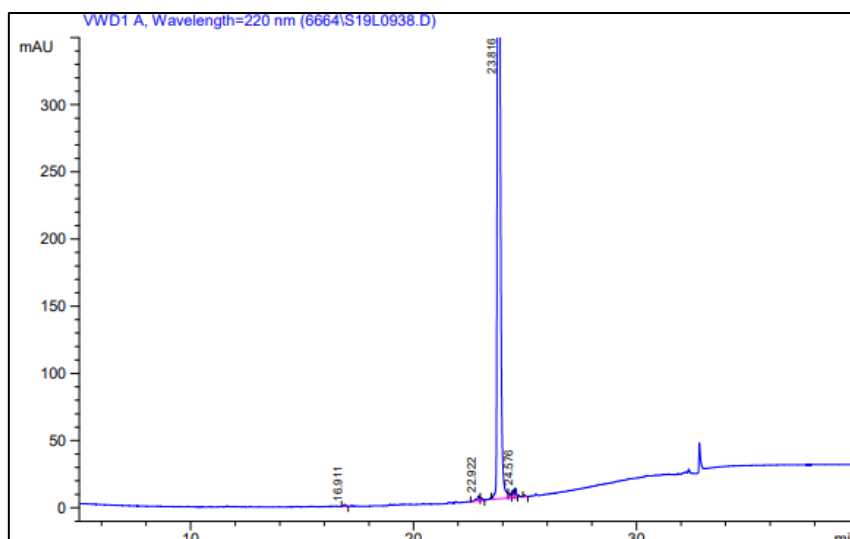


Figura 160. Cromatograma de **7411_UB-21531-P4-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Les AM tèrboles resultants es van carregar al reactor de 100 mL i es van concentrar a pressió reduïda fins a 10 mL. El dissolvent del cru es va canviar a IPA (30 mL x 2 arrossegaments) i un sòlid va precipitar. El dissolvent es va concentrar a pressió reduïda en el reactor fins a 10 mL i es va programar una rampa de 30 °C a 5 °C en 5 h. Al dia següent, es va observar una suspensió d'un sòlid que no dipositava al parar l'agitació. Es va addicionar heptà (10 mL) a la mescla per afavorir la precipitació i, al dia següent, el sòlid va dipositar al parar l'agitació. La suspensió es va filtrar i el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,10 g de **7411_UB-21531-P4-02**). L'anàlisi per HPLC (**Figura 161**) va mostrar un 94,3 % de puresa cromatogràfica de **7411** (23,7 min).

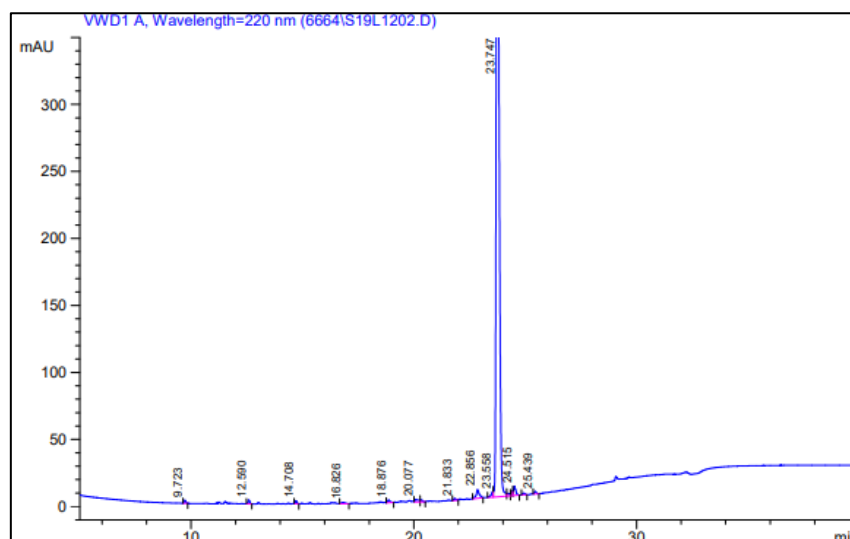


Figura 161. Cromatograma de **7411_UB-21531-P4-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 5. Una fracció del cru de **7411** neutralitzat (132 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 5 mL. El cru resultant es va transvasar a un reactor de 100 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles i es va agitar a 200 rpm. El dissolvent del cru es va canviar a IPA (20 mL x 2 arrossegaments) i es va concentrar en el reactor fins a 10 mL. Un sòlid que no dipositava al parar l'agitació es va formar, es va addicionar H₂O (2 mL) a la mescla per

afavorir la precipitació i el sòlid va adquirir una forma gomosa que va provocar una filtració molt lenta. El sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,60 g de **7411_UB-21531-P5-01**). L'anàlisi per HPLC (**Figura 162**) va mostrar una puresa cromatogràfica del 96,2 % per **7411** (23,8 min).

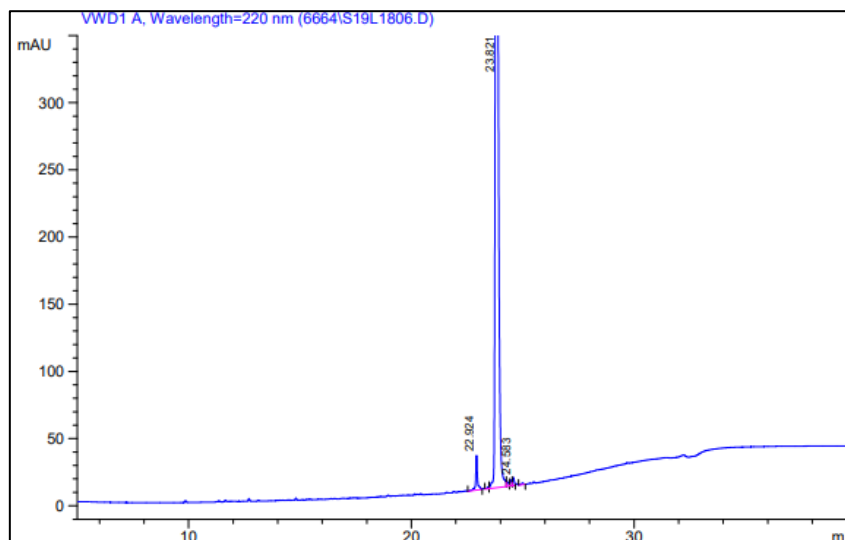


Figura 162. Cromatograma de **7411_UB-21531-P5-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.5.4. SÍNTESI DE **7411_UB-21550**

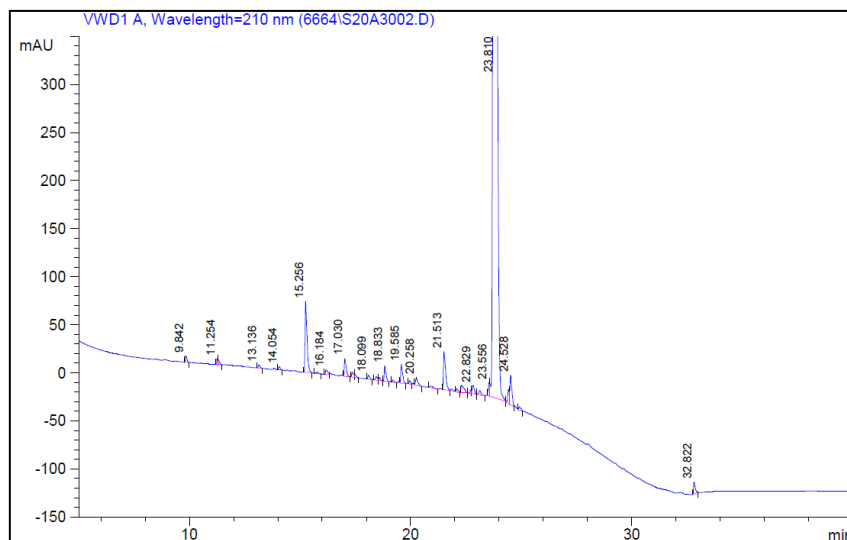
La resina 2-CTC (5,60 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 2A (**Figura 123**, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (7,66 g, 1,51 eq) i DIPEA (3,09 g, 3,05 eq) en DCM (30 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar MeOH (3,51 g, 0,80 mL/g resina) i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Una alíquota d'aminoàcid-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (apartat 8.4.1.3), resultant una funcionalització de 0,48 mmols/g (**Equació 2**) i un total de 3,74 mmols de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es van realitzar seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, apartat 8.4.2.2) i el **Protocol 8** (**Taula 62**, apartat 8.4.2.3), respectivament. En la **Taula 76** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les etapes d'acoblament de Fmoc-aminoàcid. Els temps de reacció corresponen a resultats negatius del test de ninhidrina (apartat 8.4.1.5.1). En les etapes en que el test de ninhidrina seguia sent blau passades aproximadament 6 h de reacció d'acoblament, es va dur a terme el reacoblament del Fmoc-aminoàcid. En aquesta síntesi, el reacoblament va ser necessari en les etapes 4 i 6.

Taula 76. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7411_UB-21550**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,40	2,99	1,88	3,19	1,48	3,05	8	4,0
3	Fmoc-Ile-OH	5,41	3,98	2,48	4,21	2,04	4,20	8	3,0
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	6,51	3,98	2,40	4,06	1,96	4,04	10	6,0
4*	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	4,94	3,02	2,72	4,61	1,64	3,38	10	4,0
5	Fmoc-Leu-OH	5,52	4,06	2,45	4,16	2,03	4,18	10	4,0
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	7,29	4,04	2,58	4,38	1,95	4,01	8	6,0
6*	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,50	3,05	1,88	3,19	1,79	3,68	8	4,0
7	Fmoc-Ile-OH	6,86	5,04	2,97	5,04	2,54	5,23	8	4,5
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	12,41	4,97	3,07	5,21	2,51	5,17	10	2,5
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	7,40	5,01	3,07	5,21	2,48	5,10	8	5,0

(*) Reacoblament

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA, tal i com es descriu en el **Protocol 11** (Taula 65, apartat 8.4.2.4). Les dissolucions àcides del cru es van descarregar pel tub de descàrrega de l'Agitador 1 a una ampolla d'1 L amb cura per evitar que la resina sortís del reactor. En l'últim rentat de DCM, la resina i el dissolvent es van descarregar del reactor a un vas de precipitats i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda utilitzant un embut Büchner. Les solucions resultants dels tractaments àcids i dels rentats es van recollir en la mateixa ampolla d'1 L. L'anàlisi per HPLC del cru de **7411** (Figura 163) va donar com a resultat una puresa cromatogràfica del 83,4 % pel producte **7411** (23,8 min).

Figura 163. Cromatograma del cru acidolític de **7411_UB-21550**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

La neutralització del TFA del cru, la quantificació de **7411** en el cru i la precipitació del pèptid es van dur a terme amb els procediments descrits en els següents apartats.

8.4.5.4.1. NEUTRALITZACIÓ DEL CRU

El cru de **7411** es va transvasar a un reactor d'1 L amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles. A continuació, es va carregar al reactor NaHCO_3 (20,23 g, 5,00 eq respecte el TFA) i la mescla es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i la dissolució resultant es va recollir en una ampolla d'1 L.

8.4.5.4.2. QUANTIFICACIÓ DE **7411** EN EL CRU

Per a conèixer la quantitat de pèptid obtinguda en la síntesi es va seguir el mateix procediment descrit per a la quantificació de **7005** en la síntesi de **7005_UB-23441** (apartat 8.4.3.6.2). La quantificació de **7411** per ^1H -RMN amb patró d'àcid maleic (riquesa del 70 %) va donar com a resultat 2,9 g de pèptid desitjat.

8.4.5.4.3. PRECIPITACIÓ

El cru de **7411** (600 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 30 mL i es va transvasar a un reactor de 150 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, i es va agitar a 200 rpm. A continuació, es va carregar IPA (60 mL) i la mescla de dissolvents resultant es va concentrar a pressió reduïda fins a 30 mL. Un sòlid va precipitar, però no dipositava al parar l'agitació i la suspensió es va deixar en agitació 12 h. A continuació, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (1,89 g de **7411_UB-21550-01**). L'anàlisi per HPLC (**Figura 164**) va mostrar un 87,6 % de puresa cromatogràfica pel **7411** (24,9 min) i un 3,1 % de **7411** sense el grup Fmoc.

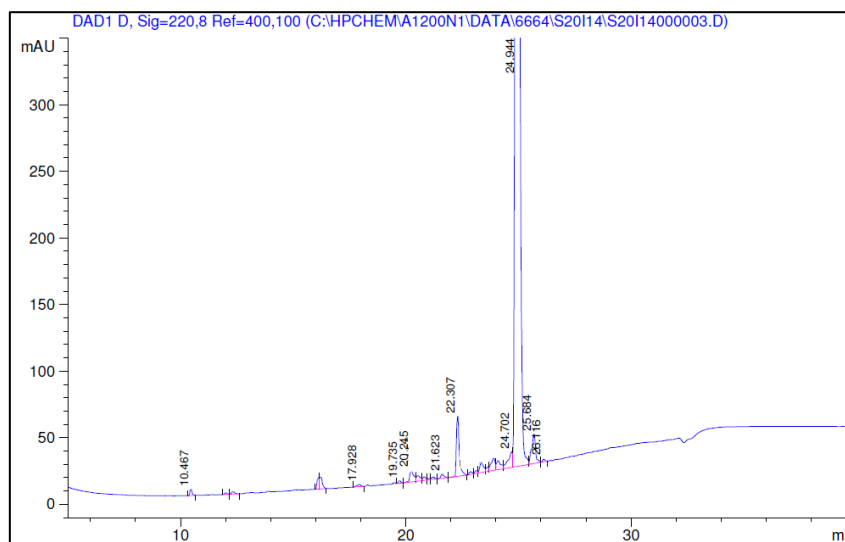


Figura 164. Cromatograma de **7411_UB-21550-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

El dissolvent de les AM resultants de la refiltració es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat i el residu obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (0,82 g de **7411_UB-21550-02**).

8.4.5.5. SÍNTESI DE 7411_UB-21578

La resina 2-CTC (5,19 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 2A (**Figura 123**, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (7,17 g, 1,52 eq) i DIPEA (2,85 g, 3,04 eq) en DCM (28 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar a la mescla de reacció MeOH (3,38 g, 0,80 mL/g resina) i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Una al·lquota d'aminoacil-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (apartat 8.4.1.3). Es va trobar una funcionalització de 0,49 mmols/g (**Equació 2**) i es van determinar un total de 3,62 mmols de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, apartat 8.4.2.2) i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid seguint el **Protocol 8** (**Taula 62**, apartat 8.4.2.3). En la **Taula 77** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les reaccions d'acoblament de Fmoc-aminoàcid. El test de ninhidrina va ser negatiu pels temps de reacció que es mostren a la taula (apartat 8.4.1.5.1). En aquesta síntesi es va reacoblar en l'etapa 3.

Taula 77. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-21578.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	5,31	3,06	1,76	3,11	1,57	3,36	8	2,5
3	Fmoc-Ile-OH	5,42	4,15	2,35	4,15	1,93	4,14	8	5,0
3*	Fmoc-Ile-OH	4,04	3,09	1,72	3,04	1,63	3,49	8	1,5
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	6,50	4,13	2,44	4,31	1,92	4,11	8	4,0
5	Fmoc-Leu-OH	5,34	4,09	2,60	4,59	1,95	4,18	8	2,0
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6,97	4,02	2,40	4,24	1,93	4,14	8	3,0
7	Fmoc-Ile-OH	5,31	4,06	2,40	4,24	2,03	4,35	8	3,0
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	9,56	3,98	2,32	4,10	2,03	4,35	10	2,0
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	5,90	4,16	2,37	4,19	1,92	4,11	10	3,0

(*) Reacoblament

El mètode desenvolupat pel seguiment de les reaccions en fase sòlida per HPLC es va posar en pràctica en aquesta síntesi (apartat 8.4.1.5.2). A més a més, els filtrats dels rentats de la resina es van analitzar per HPLC per avaluar la pèrdua de cadenes.

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11** (**Taula 65**, apartat 8.4.2.4), i les dissolucions àcides del cru es van descarregar amb cura pel tub de descàrrega de l'Agitador 1 a una ampolla d'1 L. En l'últim rentat de DCM, la resina i el dissolvent es van descarregar del reactor i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. Les dissolucions resultants dels tractaments àcids i dels rentats es van recollir en la mateixa ampolla d'1 L. L'anàlisi per HPLC (**Figura 165**) va mostrar un 92,4 % de puresa cromatogràfica pel **7411** (23,7 min).

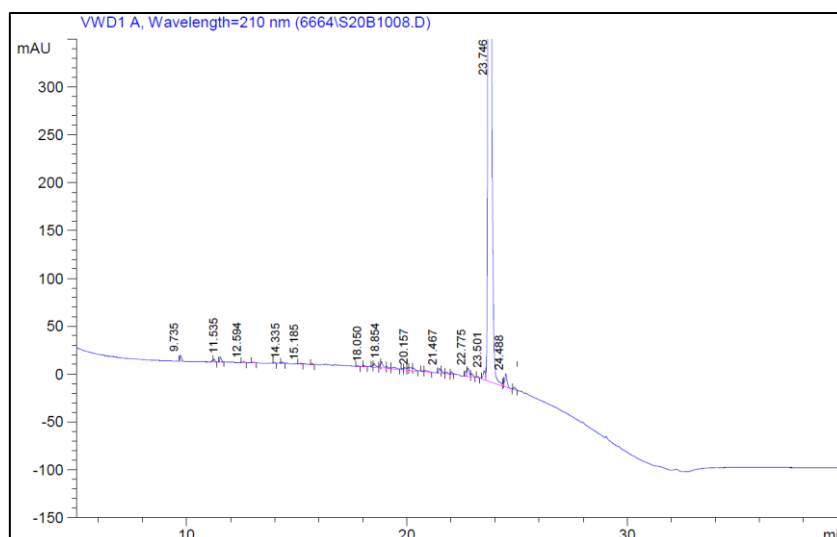


Figura 165. Cromatograma del cru acidolític de **7411_UB-21578**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.5.5.1. NEUTRALITZACIÓ DEL CRU

La neutralització del TFA del cru es va dur a terme amb el mateix procediment descrit en la neutralització del cru de la prova **7411_UB-21550** (apartat 8.4.5.4.1).

8.4.5.5.2. QUANTIFICACIÓ DE **7411** EN EL CRU

Per a conèixer la quantitat de peptid obtinguda en la síntesi, es va seguir el mateix procediment que en la quantificació de **7005** en la síntesi de **7005_UB-23441** (apartat 8.4.3.6.2). La quantificació de **7411** per ^1H -RMN amb patró d'àcid maleic va donar una riquesa del 82 % (4,4 g de **7411**).

8.4.5.5.3. PRECIPITACIÓ

El cru de **7411** (650 mL) es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 88 mL, es va transvasar a un reactor de 250 mL equipat amb agitador mecànic de pales de tefló abatibles, i es va agitar a 200 rpm. Es va carregar IPA (88 mL) i la mescla de dissolvents resultant es va concentrar a pressió reduïda en el reactor fins a 88 mL. Un sòlid blanc va precipitar i més IPA (44 mL) es va carregar a la suspensió. El cru es va tornar a concentrar fins a 44 mL i la suspensió densa resultant es va deixar en agitació 12 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut es va assecar en el dessecador de buit fins a pes constant (3,33 g de **7411_UB-21578-01**). L'anàlisi del sòlid per HPLC (Figura 166) va donar un 97,3 % de puresa cromatogràfica pel **7411** (23,7 min).

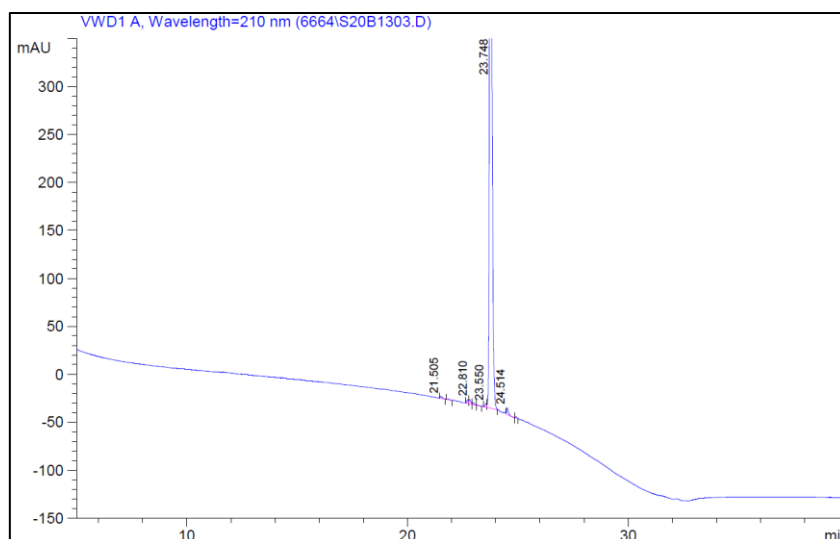


Figura 166. Cromatograma de **7411_UB-21578-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Per tal de quantificar el **7411** en les AM obtingudes, el dissolvent de les AM es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat i el residu obtingut es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant (1,27 g de **7411_UB-21578-02**). Una alíquota del residu obtingut (100,56 mg) es va pesar juntament amb un patró d'àcid maleic (12,44 mg) i la mescla de sòlids es va diluir en DMSO- d_6 (800 μ L). L'anàlisi per ^1H -RMN va determinar un 41 % de riquesa de **7411** en les AM, que extrapolant a la dissolució total de les AM, significaven 0,52 g de **7411** que no havien precipitat.

8.4.5.6. SÍNTESI DE **7411_UB-23401**

La resina 2-CTC (5,95 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el reactor 2B (**Figura 123**, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (8,15 g, 1,51 eq) i DIPEA (3,31 g, 3,08 eq) en DCM (32 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar al cru de reacció MeOH (3,90 g, 0,80 mL/g resina), i la mescla resultant es va seguir agitant durant 1 h. Els rentats de la resina de l'etapa d'incorporació del primer aminoàcid es van dur a terme amb la seqüència de dissolvents indicada en el **Protocol 1** (**Taula 55**, apartat 8.4.2.1) però afegint un 0,05 % de DIPEA en cada dissolvent, i els filtrats de cada rentat es van recollir en una ampolla per analitzar-los per HPLC-MS. Una alíquota d'aminoàcid-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (apartat 8.4.1.3), trobant-se una funcionalització de 0,41 mmols/g (**Equació 2**) i un total de 3,18 mmols de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 4** (**Taula 58**, apartat 8.4.2.2) i l'acoblament del següent Fmoc-aminoàcid es va realitzar seguint el **Protocol 8** (**Taula 62**, apartat 8.4.2.3). En la **Taula 78** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les reaccions d'acoblament dels Fmoc-aminoàcids. L'acoblament de l'aminoàcid Fmoc-Lys(Boc)-OH (etapa 2) va donar un test de ninhidrina negatiu (apartat 8.4.1.5.1) a les 4 h, però el test de ninhidrina va indicar que l'acoblament de l'aminoàcid Fmoc-Ile-OH (etapa 3) no havia finalitzat a les 6 h. Es van portar a terme 3 reacoblaments més però el test de ninhidrina seguia indicant que la reacció no havia finalitzat. Es va decidir doncs a partir de l'etapa 4 seguir les reaccions d'acoblament mitjançant les tècniques desenvolupades d'HPLC i ^1H -RMN (apartat 8.4.1.5.2).

Taula 78. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7411_UB-23401**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4,60	3,03	1,51	3,04	1,37	3,35	7	4,0
3	Fmoc-Ile-OH	3,59	3,13	1,54	3,10	1,51	3,69	7	6,0
3*	Fmoc-Ile-OH	1,27	0,92	1,00	2,01	0,61	1,49	8	4,0
3*	Fmoc-Ile-OH	3,44	2,49	1,60	3,22	1,34	3,27	12	5,0
3*	Fmoc-Ile-OH	4,61	3,34	2,06	4,15	1,72	4,20	10	4,0
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	5,56	4,03	2,01	4,05	1,68	4,10	10	6,0
5	Fmoc-Leu-OH	4,64	4,05	2,00	4,03	1,74	4,25	10	5,0
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6,09	4,01	2,03	4,09	1,82	4,45	10	5,0
7	Fmoc-Ile-OH	4,67	4,07	2,01	4,05	1,68	4,10	10	6,0
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	8,45	4,02	2,22	4,47	1,70	4,15	15	5,0
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	5,06	4,07	2,09	4,21	1,83	4,47	10	5,0

(*) Reacoblament

Els rentats de la resina de l'etapa 2 i l'etapa 3 es van dur a terme amb la seqüència de dissolvents indicada en el **Protocol 4 (Taula 58, apartat 8.4.2.2)** i en el **Protocol 8 (Taula 62, apartat 8.4.2.3)** però afegint un 0,05 % de DIPEA en cada dissolvent. Els filtrats de cada rentat es van recollir en una ampolla per analitzar-los per HPLC-MS.

Per tal de dur a terme l'escissió del pèptid de la resina, la peptidil-resina es va tractar amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 11 (Taula 65, apartat 8.4.2.4)**. Les dissolucions àcides del cru es van descarregar pel tub de descàrrega del **Reactor 3** a una ampolla d'1 L amb cura per evitar que la resina sortís del reactor. En l'últim rentat de DCM, la resina i el dissolvent es van descarregar del reactor i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda amb Büchner. Les dissolucions resultants dels tractaments àcids i dels rentats es van recollir en la mateixa ampolla d'1 L, i la dissolució final es va analitzar per HPLC (**Figura 167**), determinant-se un 78,5 % de puresa cromatogràfica per **7411** (23,6 min).

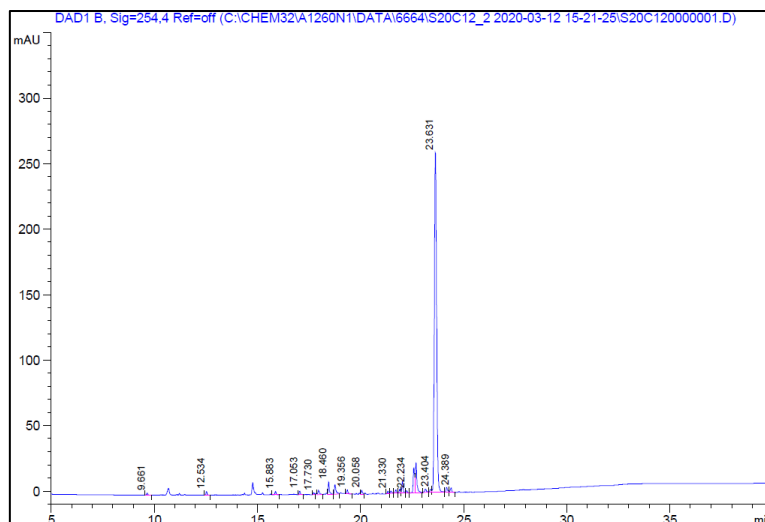


Figura 167. Cromatograma del cru acidolític de **7411_UB-23401**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.5.6.1. NEUTRALITZACIÓ DEL TFA DEL CRU

La neutralització del TFA del cru es va dur a terme seguint el procediment descrit per a la neutralització del cru del lot **7411_UB-21550** (apartat 8.4.5.4.1).

8.4.5.6.2. QUANTIFICACIÓ DE **7411** EN EL CRU

Per a conèixer la quantitat de pèptid obtinguda en la síntesi, es va seguir el mateix procediment descrit per a la quantificació de **7005** en la síntesi de **7005_UB-23441** (apartat 8.4.3.6.2). La quantificació de **7411** en aquesta prova per ^1H -RMN amb patró d'àcid maleic va donar com a resultat una riquesa del 60 %, corresponent a 5,6 g de **7411**.

8.4.5.6.3. PRECIPITACIÓ

Per a la precipitació de **7411** es va dur a terme el mateix procediment de precipitació que en la síntesi de **7411_UB-21578** (apartat 8.4.5.5.3). El sòlid obtingut (3,33 g de **7411_UB-23401-01**) es va analitzar per HPLC (Figura 168) i va donar un 80,0 % de puresa cromatogràfica per **7411**: (24,0 min).

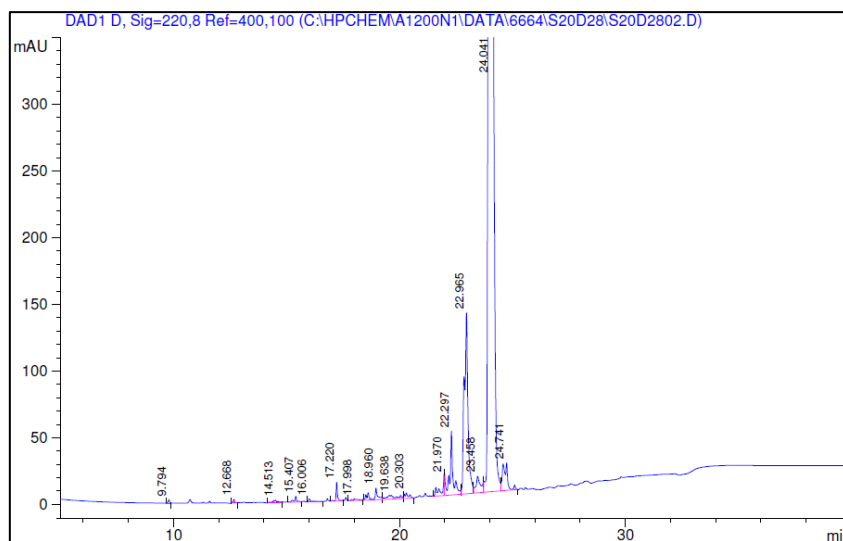


Figura 168. Cromatograma de **7411_UB-23401-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.4.5.7. SÍNTESI DE 7411_UB-23492: MAJOR ESCALA

La resina 2-CTC (42,57 g, 1,40 mmols/g) es va introduir en el Filtre Nutsche (**Figura 123**, apartat 8.4.1.1) i es va rentar seguint el **Protocol 3** (**Taula 57**, apartat 8.4.2.1). Una dissolució de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (58,08 g, 1,50 eq) i DIPEA (23,56 g, 3,06 eq) en DCM (226 mL) es va carregar al reactor i la mescla de reacció es va agitar a 100 rpm durant 1,5 h. Passat aquest temps, es va carregar al cru de reacció MeOH (27,19 g, 0,80 mL/g resina) i la mescla resultant es va seguir agitant durant 2 h. Una alíquota d'aminoacil-resina es va tractar seguint el procediment descrit per la quantificació del grup Fmoc (apartat 8.4.1.3), amb un resultat de 0,40 mmols/g per la funcionalització (**Equació 2**) i un total de 22,55 mmols de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**Equació 3**) incorporats a la resina. L'eliminació del grup protector Fmoc de l'aminoàcid acoblat es va dur a terme seguint el **Protocol 7** (**Taula 61**, apartat 8.4.2.2). Les quantitats de dissolució del 20 % de piperidina en DMF van ser variants al llarg de la síntesi per tal d'optimitzar aquesta etapa. En la **Taula 79** es mostren les quantitats de dissolució de 20 % de piperidina en DMF que es van utilitzar per les diferents etapes d'eliminació del grup Fmoc. El tractament acídic d'una alíquota de resina al final de cada tractament de piperidina (procediment descrit en l'apartat 8.4.1.5.2) va permetre determinar si la reacció havia finalitzat per HPLC i ^1H -RMN.

Taula 79. Tractaments de piperidina duts a terme en la síntesi de 7411_UB-23492.

Etapa	Cadena peptídica	Dissolució 20 % de piperidina en DMF	Temps (min)	nº Tractaments
1	Fmoc-Arg(Pbf)-Resina	6 mL / g resina	5	2
2	Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	6 mL / g resina	5	2
3	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	6 mL / g resina	10	1
4	Fmoc-Glu(t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	6 mL / g resina	10	1
5	Fmoc-Leu-Glu(t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	6 mL / g resina	10	1
6	Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Glu(t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	6 mL / g resina	10	1
7	Fmoc-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	4 mL / g resina	15	1
8	Fmoc-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Leu-Glu(t Bu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Resina	2 mL / g resina	15	1

L'acoblament de Fmoc-aminoàcid es va dur a terme seguint el **Protocol 10** (**Taula 64**, apartat 8.4.2.3). En la **Taula 80** es mostren les quantitats de reactius que es van utilitzar per a les reaccions d'acoblament dels diferents Fmoc-aminoàcids. Una alíquota de resina del cru de reacció es va mostrejar cada 1.5 h i es va analitzar mitjançant el test de ninhidrina (apartat 8.4.1.5.1) i les tècniques desenvolupades d'HPLC i ^1H -RMN (apartat 8.4.1.5.2). El temps de reacció correspon a resultats coincidents de les tres tècniques.

Taula 80. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de **7411_UB-23492**.

Etapla	Aminoàcid protegit			HOBt		DIC		DMF	temps reacció
	Codi	g	eq	g	eq	g	eq	mL	h
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	33,00	3,06	10,91	3,10	8,78	3,03	50	1,5
3	Fmoc-Ile-OH	42,03	5,17	17,91	5,09	14,97	5,16	62	1,5
4	Fmoc-Glu(^t Bu)-OH	39,61	4,05	14,12	4,01	11,90	4,10	58	1,5
5	Fmoc-Leu-OH	40,93	5,04	17,81	5,06	14,76	5,09	60	1,5
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	53,65	4,98	17,54	4,98	14,51	5,00	80	1,5
7	Fmoc-Ile-OH	40,51	4,99	17,52	4,98	14,45	4,98	60	1,5
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	74,30	4,98	17,61	5,00	14,47	4,99	110	1,5
9	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	43,89	4,98	17,53	4,98	14,44	4,98	66	1,5

L'escissió del pèptid de la resina es va dur a terme en el Filtre Nutsche, tractant la peptidil-resina amb una dissolució d'1 % de TFA tal i com es descriu en el **Protocol 12 (Taula 66, apartat 8.4.2.4)**. Les solucions resultants dels tractaments de TFA i dels rentats de DCM es van recollir en una ampolla de 2 L. L'anàlisi per HPLC del cru de **7411** va mostrar una puresa cromatogràfica del 89,3 %. La neutralització del cru i la precipitació de **7411** es van dur a terme amb els procediments descrits en els següents apartats.

8.4.5.7.1. NEUTRALITZACIÓ DEL TFA DEL CRU

La neutralització del TFA del cru es va dur a terme seguint el procediment descrit per a la neutralització del cru de la prova **7411_UB-21550 (apartat 8.4.5.4.1)**.

8.4.5.7.2. QUANTIFICACIÓ DE **7411** EN EL CRU

Per a conèixer la quantitat de pèptid obtinguda en la síntesi es va seguir el mateix procediment descrit per a la quantificació de **7005** en la síntesi de **7005_UB-23441 (apartat 8.4.3.6.2)**. La quantificació de **7411** en aquesta prova per ¹H-RMN amb patró d'àcid maleic (riquesa del 71 %) va permetre determinar una quantitat aproximada de 42 g de **7411**.

8.4.5.7.3. PRECIPITACIÓ

Per a la precipitació de **7411** es va dur a terme el mateix procediment que el utilitzat en la síntesi de **7411_UB-21578 (apartat 8.4.5.5.3)**. El sòlid obtingut (37,3 g de **7411_UB-23492-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 169**), resultant una puresa cromatogràfica del 96,7 % per **7411** (23,6 min).

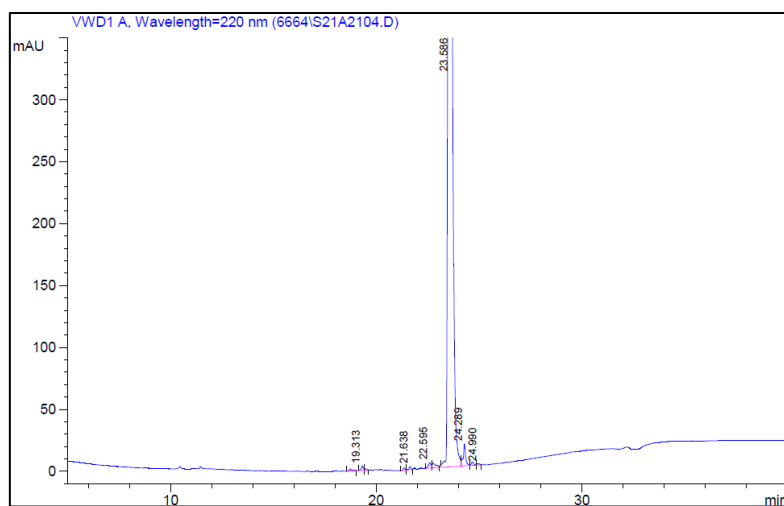
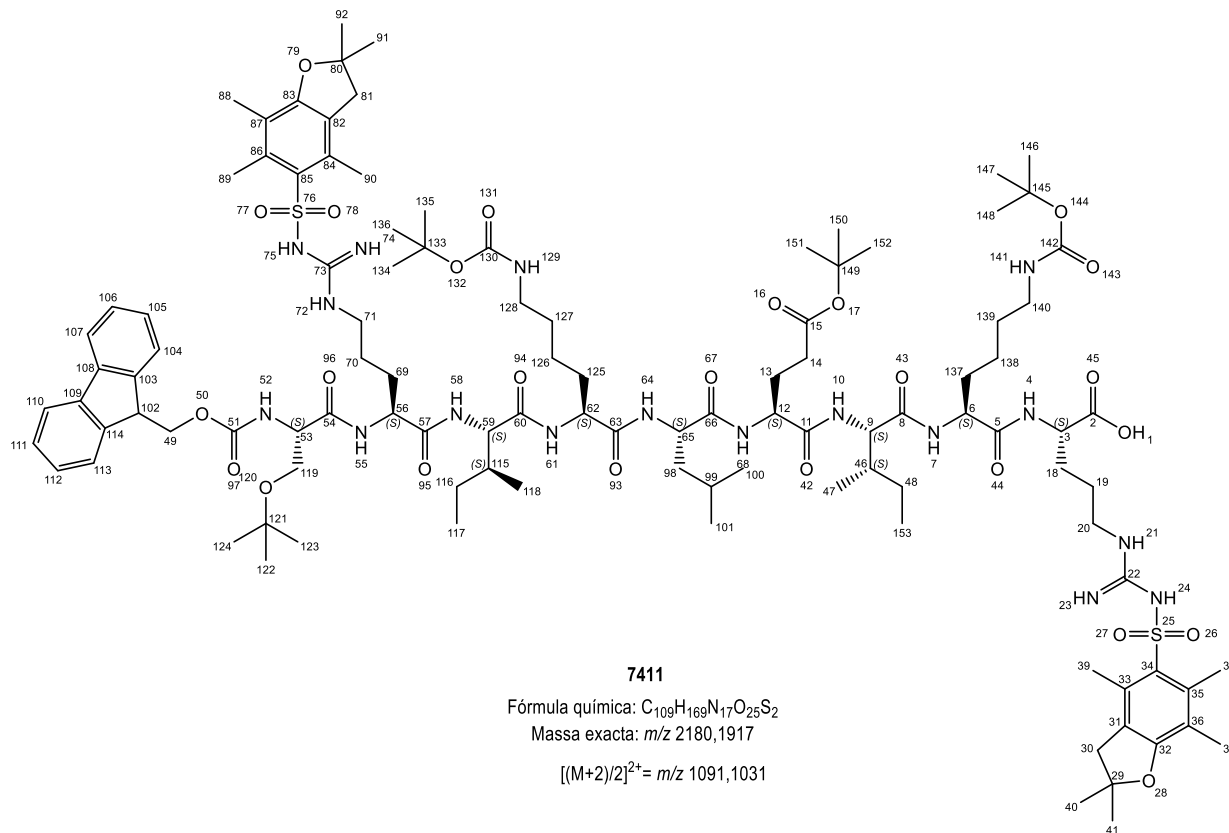
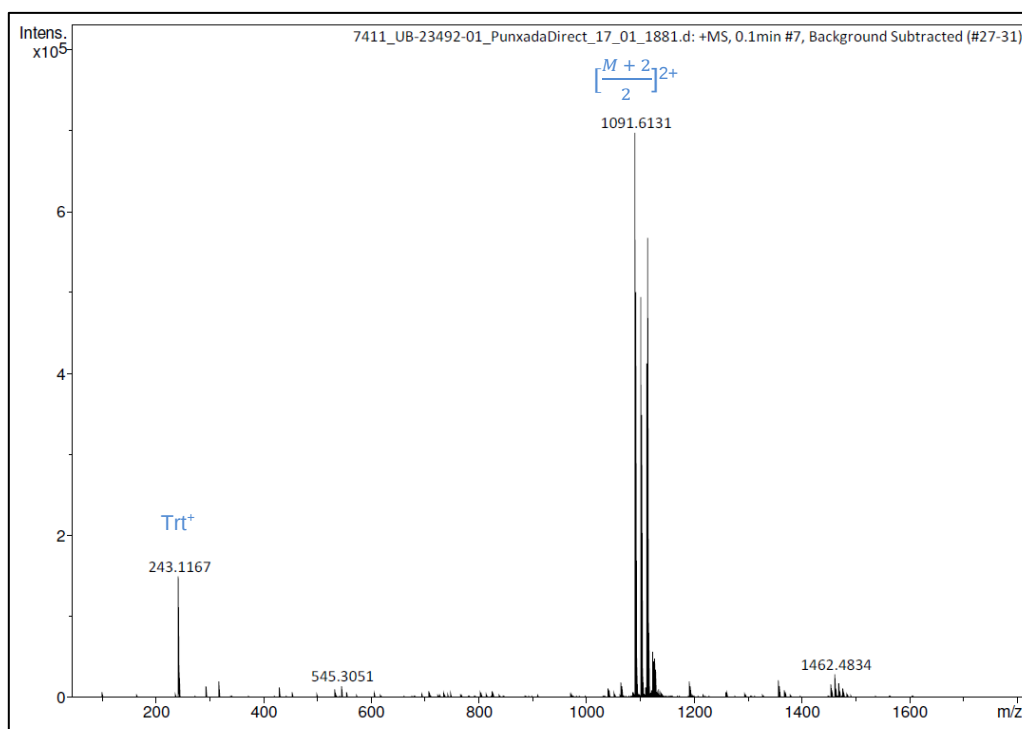
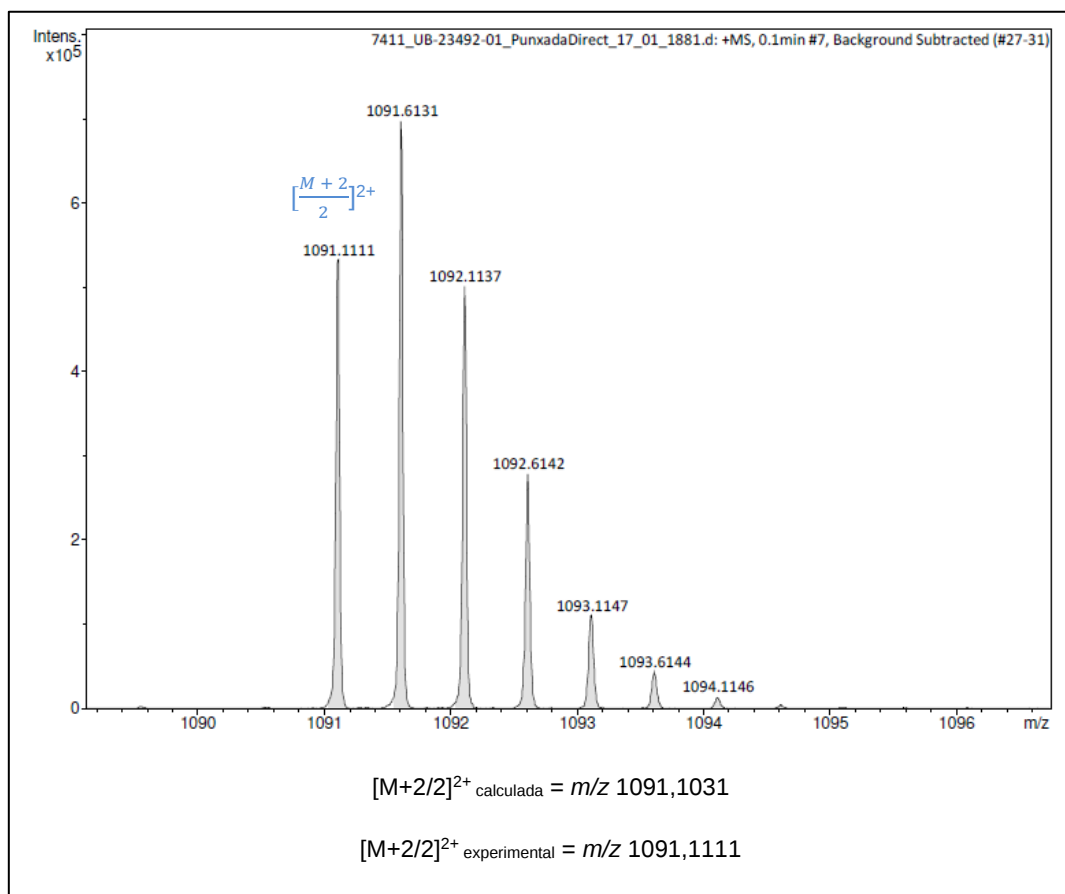


Figura 169. Cromatograma de 7411_UB-23492-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

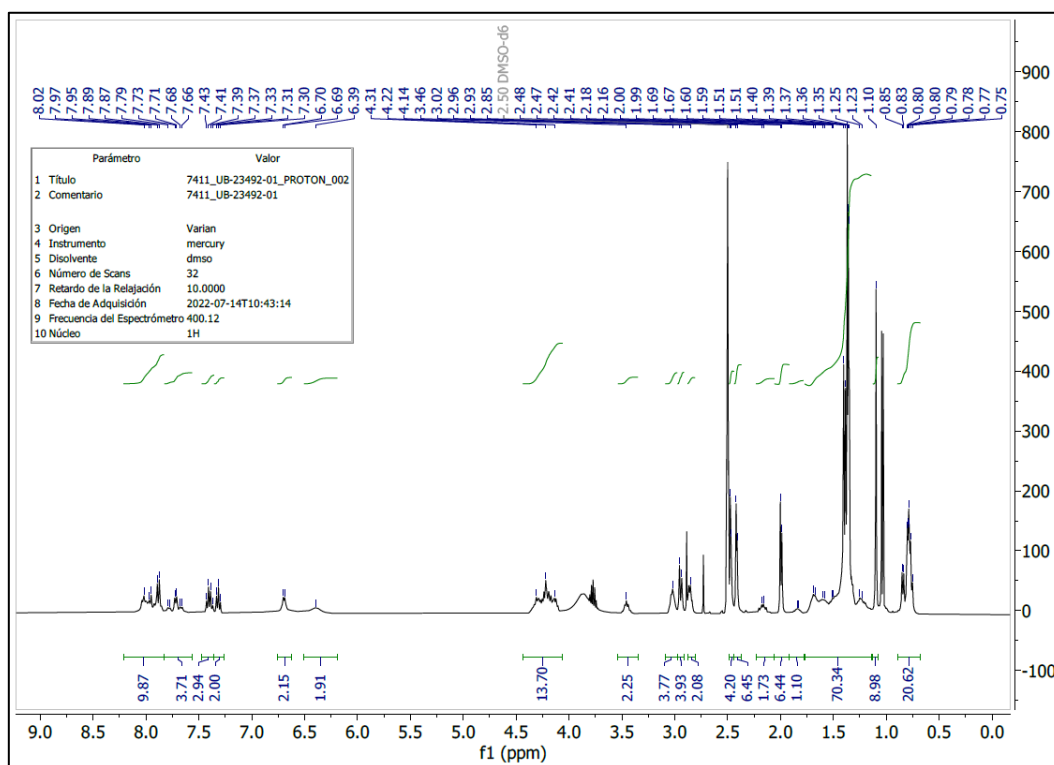
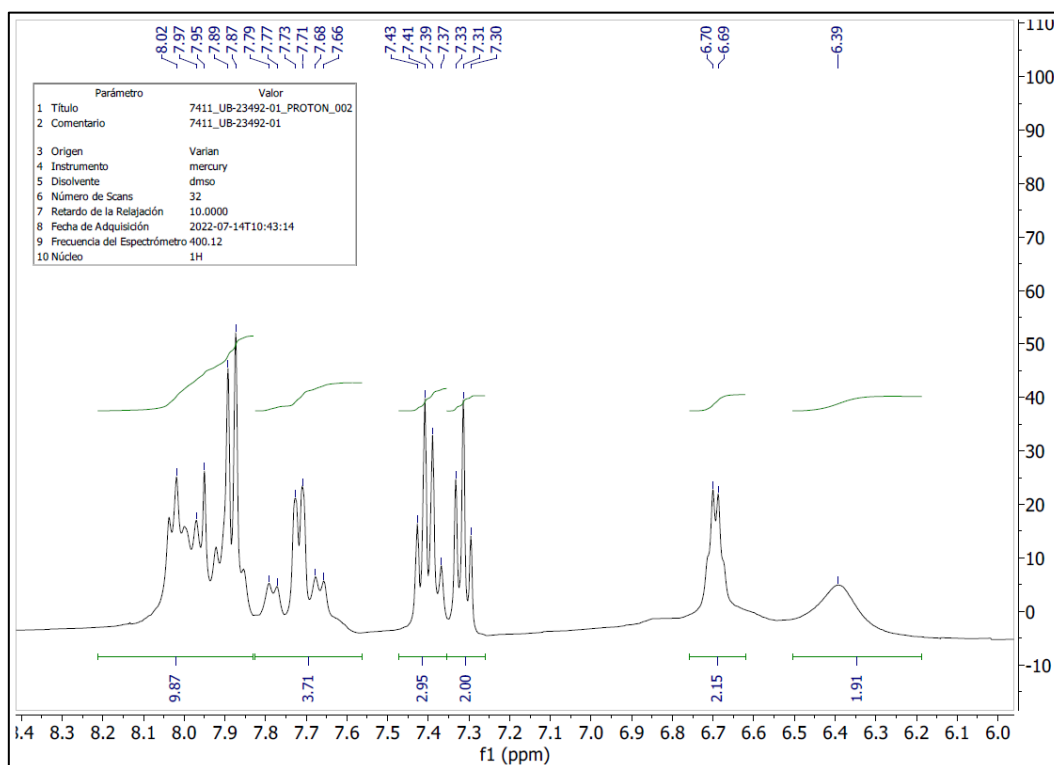
8.4.6. CARACTERITZACIÓ DE 7411



8.4.6.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

Figura 170. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de **7411_UB-23492-01**.Figura 171. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de **7411_UB-23492-01**.

8.4.6.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.4.6.2.1. ESPECTRES DE ^1H -RMNFigura 172. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 7411_UB-23492-01.Figura 173. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 7411_UB-23492-01.

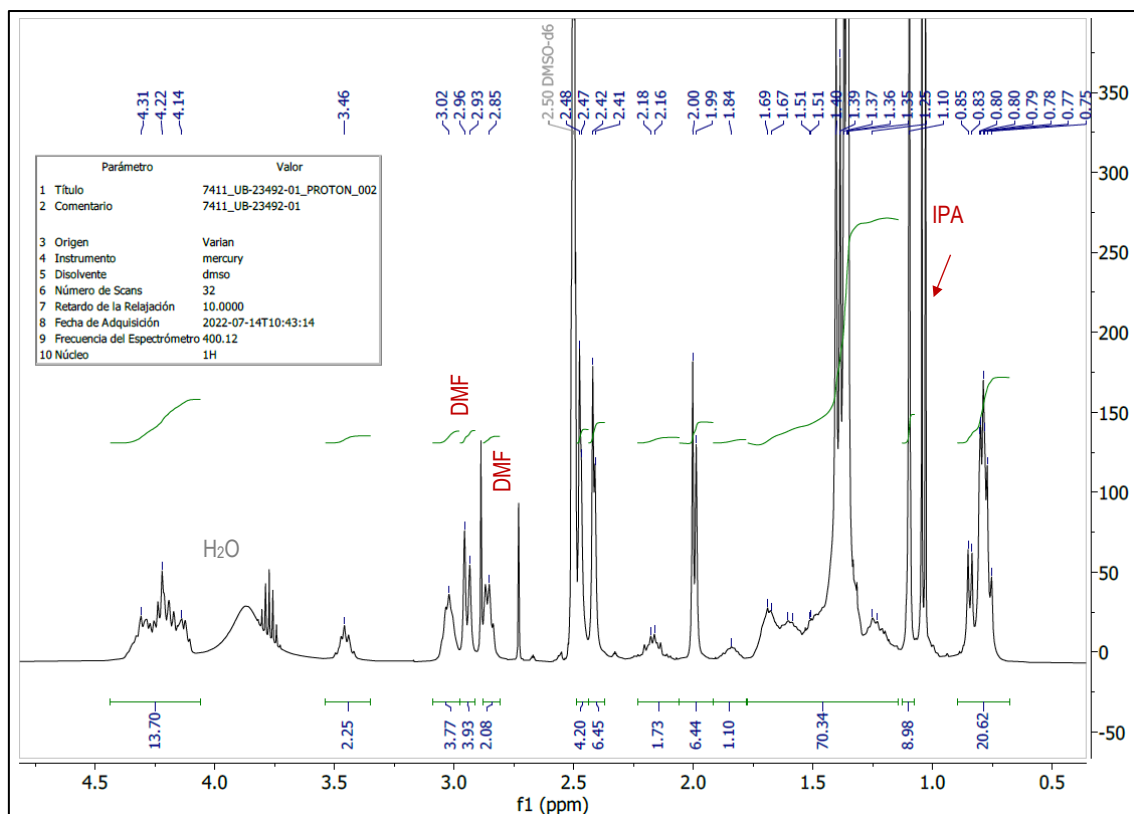


Figura 174. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **7411_UB-23492-01**.

Taula 81. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO-d_6 de **7411_UB-23492-01**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Constant d'acoblament (Hz)	Integral	REGIÓ	ASSIGNACIÓ
8,10 – 7,80	multiplet		8 (10)	NH Amides peptídiques	H4+H7+H10+H68 H64+H61+H58+H55
7,88	d	7,4	2 (10)	H _{aromàtic} Fmoc	H107+H110
7,78	d	8,1	1 (4)	NH Guanidina	H21 / H72 / H23 / H74 / H24 / H75
7,72	d	7,5	2 (4)	H _{aromàtic} Fmoc	H104+H113
7,67	d	8,1	1 (4)	NH Guanidina	H21 / H72 / H23 / H74 / H24 / H75
7,40	multiplet	-	3	H _{aromàtic} Fmoc	H105+H112

				NH Amides peptídiques	H52
7,31	t	-	2	H _{aromàtic} Fmoc	H106+H111
6,69	multiplet	-	2	NH Guanidina	H21 / H72 / H23 / H74 / H24 / H75
6,39	<i>broad signal</i>	-	2	NH Guanidina	
4,40 – 4,10	multiplet	-	14	CH Cadena peptídica	H3+H6+H9+H12+H65 H62+H59+H56+H53
				NH Carbamat	H129+H141
				CH ₂ i CH Fmoc	H49 (CH ₂) + H102 (CH)
3,46	multiplet	-	2	CH ₂	H119
3,02	multiplet	-	4	CH ₂	H71+H128+H14+H140+H20
2,94	d	8,9	4	CH ₂	
2,85	multiplet	-	2	CH ₂	
2,48	s	-	3	CH ₃ Pbf	H89+H38
2,47	s	-	3		
2,42	s	-	3	CH ₃ Pbf	H88+H37
2,41	s	-	3		
2,17	multiplet	-	2	CH ₂	H81+H30
2,00	s	-	3	CH ₃ Pbf	H90+H39
1,99	s	-	3		
1,84	multiplet	-	1	CH ₂	H81'/H30'
1,80 – 1,00	multiplet	-	28	CH ₂	H69+H70 H125+H126+H127 H137+H138+H139 H18+H19 H98 H13 H81'/H30'
				CH	H115+H99+H46
	multiplet	-	41	CH ₃ 'Bu	H151+H150+H152 H134+H135+H136 H146+H147+H148

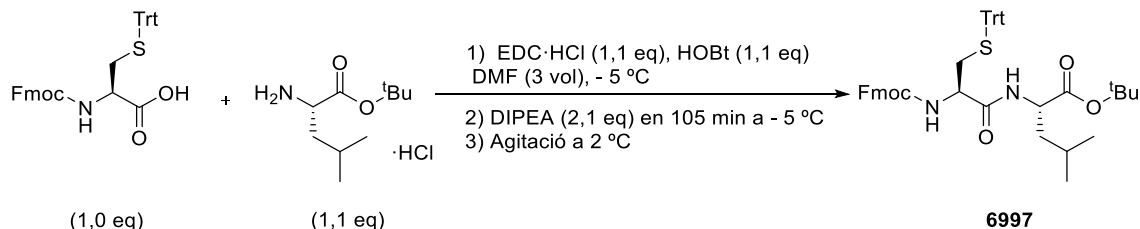
1,40 – 1,30				CH ₃	H91+H92+H40+H41
				CH ₂	H48'+H116'
1,10	s	-	9	CH ₃ ¹ Bu	H122+H123+H124
0,9 – 0,7	multiplet	-	20	CH ₃	H100+H101+H117+H118+H47+H153
				CH ₂	H48+H116

PART EXPERIMENTAL:
CAPÍTOL 3

8.5. PART EXPERIMENTAL: CAPÍTOL 3

8.5.1. SÍNTESI DE 6997

8.5.1.1. PROCEDIMENT GENERAL



Esquema 66. Condicions de reacció per a la síntesi del dipèptid **6997**.

En un reactor de volum adequat per a cada escala de síntesi, i proveït d'agitació magnètica o d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles, els aminoàcids Fmoc-Cys(Trt)-OH i H-Leu-O^tBu·HCl es van carregar i es van dissoldre en DMF. La mescla es va agitar fins a obtenir una dissolució completa i, a continuació, la temperatura externa es va refredar a – 5 °C. L'HOBT·H₂O i l'EDC·HCl es van carregar a la dissolució i, tot seguit, la DIPEA es va addicionar al cru en 105 min. Al finalitzar l'addició, la temperatura externa es va ajustar a 2 °C i la reacció es va monitoritzar per HPLC cada hora mitjançant l'anàlisi d'una alíquota del cru (0,2 mL del cru en 100 mL de MeCN), fins que el pic cromatogràfic corresponent a Fmoc-Cys(Trt)-OH es va detectar amb un percentatge d'àrea menor al 2,0 %. Un cop arribat a aquest punt, es va dur a terme el tractament del cru de reacció per obtenir el producte desitjat **6997** i el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit a 40 °C fins a pes constant. En els següents apartats, s'indiquen les quantitats utilitzades de reactius per a cada experiment, així com el tractament del cru de reacció dut a terme per a cada síntesi, els grams de producte obtinguts i la puresa cromatogràfica del producte desitjat.

8.5.1.2. SÍNTESI DE 6997_QF-15382

La reacció es va dur a terme en un reactor de 50 mL amb agitació magnètica a 800 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.1.1*). Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (7,99 g, 1,00 eq), H-Leu-O^tBu·HCl (3,39 g, 1,11 eq), HOBT·H₂O (2,33, 1,12 eq), EDC·HCl (3,04 g, 1,16 eq) i DIPEA (3,89 g, 2,21 eq), fent servir DMF (25 mL) com a dissolvent. A les 2 h de reacció, el cru es va transvasar a un reactor de 150 mL amb agitació magnètica, i es va carregar AcOEt (30 mL) i una dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % (15 mL). La mescla es va agitar a 800 rpm durant 15 min a ta i es va transvasar a un embut de decantació on les fases es van separar. La fase aquosa es va rentar amb AcOEt (30 mL, 1 x 10 min), i les fases orgàniques resultants es van combinar i es van rentar amb la dissolució d'àcid cítric al 5 % (30 mL, 1 x 10 min). La fase orgànica obtinguda es va rentar amb una dissolució aquosa sat de NaHCO₃ (30 mL, 1 x 10 min) i amb H₂O (30 mL, 2 x 10 min). La fase orgànica resultant es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent de la dissolució obtinguda es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (8,46 g de **6997_QF-15382-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 175**) i el producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 92,8 % (17,5 min), acompanyat d'un 5,0 % de DBF (12,9 min).

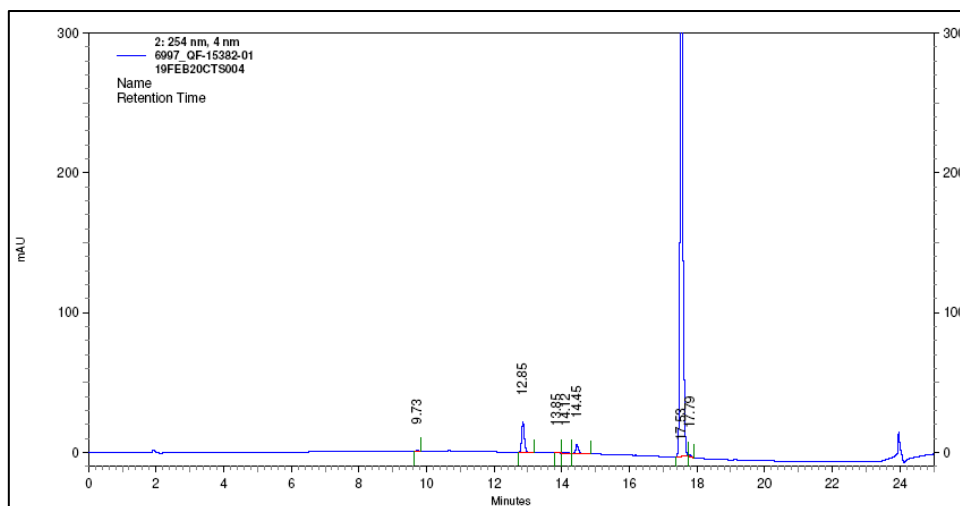


Figura 175. Cromatograma de **6997_QF-15382-01**. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.1.2.1. PROVES DE SOLUBILITAT

Les proves de solubilitat de **6997** es van realitzar amb 10 dissolvents diferents utilitzant el sòlid **6997_QF-15382-01** (50 mg) en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica (**Taula 82**). Primerament, es va afegir 1 volum del dissolvent (50 µL) al sòlid amb una micropipeta de 10-100 µL, i la mescla es va agitar durant 5 min. Les proves on el sòlid es va dissoldre es van retirar i en les proves on no s'observava una dissolució completa es van afegir 3 volums més de dissolvent (150 µL). Les proves que van donar una mescla semblant a una suspensió (H₂O i heptà), es van escalfar ajustant la temperatura externa a 40 °C i es va afegir més dissolvent.

Taula 82. Proves de solubilitat del sòlid **6997_QF-15382-01**

Dissolvent	Volum afegit (µL)	Aspecte	Volum afegit (µL)	Aspecte	Volum afegit (µL)	Aspecte
H ₂ O	50	Suspensió	150	Suspensió	500	Suspensió
Acetona	50	Dissolució	-	-	-	-
MeOH	50	Dissolució	-	-	-	-
EtOH	50	Dissolució	-	-	-	-
MTBE	50	Sòlid gomós	150	Dissolució	-	-
toluè	50	Dissolució	-	-	-	-
heptà	50	Suspensió	150	Suspensió	50	Dissolució
THF	50	Sòlid gomós	150	Dissolució	-	-
IPA	50	Sòlid gomós	150	Dissolució	-	-
MeCN	50	Dissolució	-	-	-	-

8.5.1.3. SÍNTESI DE 6997_QF-15386

En un baló de 250 mL proveït d'agitació magnètica es van carregar H-Leu-O^tBu·HCl (3,05 g, 1,00 eq), Fmoc-Cys(Trt)-OH (8,12 g, 1,02 eq), i HOBt·H₂O (0,30, 0,14 eq). Es van dissoldre en EtOH (25 mL), la mescla resultant es va agitar a 800 rpm i es va carregar NMM (3,12 g, 2,26 eq). La temperatura externa es va refredar a 10 °C, es va carregar EDC·HCl (3,14 g, 1,20 eq) a la dissolució i a continuació, la suspensió es va deixar agitant durant 3 h a ta. Passat aquest temps, es va addicionar H₂O (45 mL) al cru en 30 min i es va formar un sòlid gomós. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (7,84 g de **6997_QF-15386-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 176**). El producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 75,9 % (17,5 min), juntament amb un 12,4 % de DBF (12,9 min) i un 10,2 % d'una impuresa desconeguda a temps de retenció 16,4 min

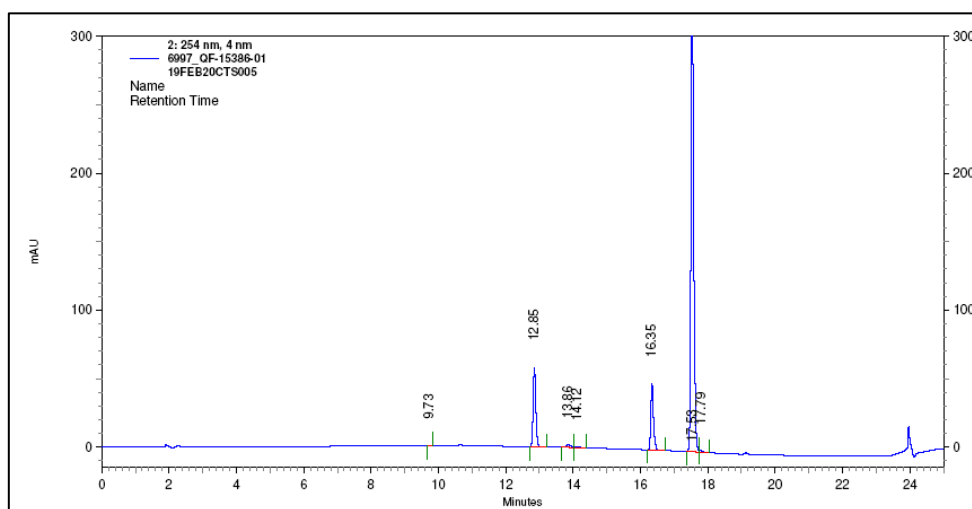


Figura 176. Cromatograma de **6997_QF-15386-01**. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.1.4. SÍNTESI DE 6997_QF-15392

La reacció es va dur a terme en un reactor de 50 mL amb agitació magnètica a 800 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.1.1*), fent servir DCM com a dissolvent. Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (7,80 g, 1,00 eq), H-Leu-O^tBu·HCl (3,30 g, 1,11 eq), HOBt·H₂O (2,24 g, 1,10 eq), EDC·HCl (2,81 g, 1,10 eq) i DIPEA (3,70 g, 2,15 eq), utilitzant DCM (18 mL) com a dissolvent. A les 45 h de reacció, una dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % (10 mL) es va carregar al cru i la mescla es va agitar durant 15 min. Les fases es van separar en un embut de decantació i la fase orgànica es va tornar a rentar amb la dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % (12 mL, 1 x 15 min). Un sòlid va precipitar en la fase aquosa i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut es va analitzar per HPLC-MS, detectant-se un pic cromatogràfic majoritari que corresponia a la massa de l'HOBt. Un cop separat el sòlid, les fases es van separar i el dissolvent de la fase orgànica es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid resultant es va tractar amb AcOEt (10 mL), la suspensió que es va obtenir es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid resultant es va analitzar per HPLC-MS (HOBt·H₂O majoritàriament). La dissolució d'AcOEt es va tractar amb una dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % (6 mL, 2 x 15 min), amb una dissolució aquosa sat de NaHCO₃ (6 mL, 1 x 15 min) i amb H₂O (6 mL, 1 x 15 min). La fase orgànica es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i la dissolució obtinguda es va concentrar a pressió reduïda fins a sequedat. L'anàlisi per HPLC del sòlid obtingut (5,29 g de **6997_QF-15392-01**) va mostrar el producte **6997** amb una puresa cromatogràfica del 73,0 % (17,6 min), un 20,8

% de DBF (13,0 min) i un 4,5 % de material de partida Fmoc-Cys(Trt)-OH a temps de retenció 14,6 min (**Figura 177**).

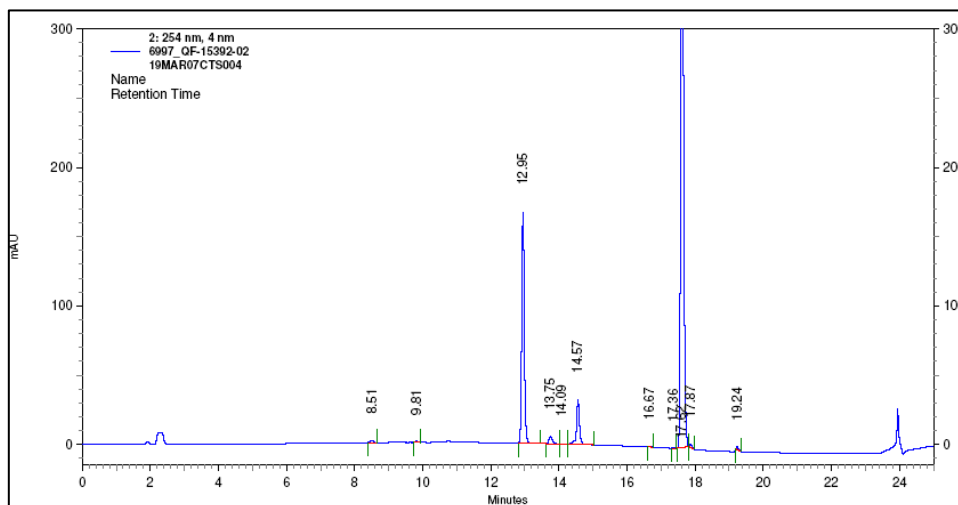


Figura 177. Cromatograma de **6997_QF-15392-01**. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.1.5. SÍNTESI DE **6997_QF-15395**

La reacció es va dur a terme en un reactor de 150 mL amb agitació magnètica a 800 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.1.1*). Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (15,0 g, 1,00 eq), H-Leu-O^tBu-HCl (6,37 g, 1,11 eq), HOBt·H₂O (3,98, 1,01 eq), EDC·HCl (5,43 g, 1,11 eq) i DIPEA (7,02 g, 2,12 eq), fent servir DMF (37 mL) com a dissolvent. A les 17 h de reacció, el cru es va transvasar a un reactor de 250 mL proveït d'agitació magnètica i es va carregar AcOEt (50 mL). Es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució d'àcid cítric al 5 % (25 mL, 2 x 15 min), una dissolució aquosa sat de NaHCO₃ (25 mL, 1 x 15 min) i H₂O (25 mL, 1 x 15 min). La fase orgànica es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i la dissolució obtinguda es va concentrar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (16,2 g de **6997_QF-15395-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 178**) i el producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 69,3 % (17,7 min). El pic cromatogràfic corresponent al DBF (13,0 min,) es va detectar amb un 27,9 %.

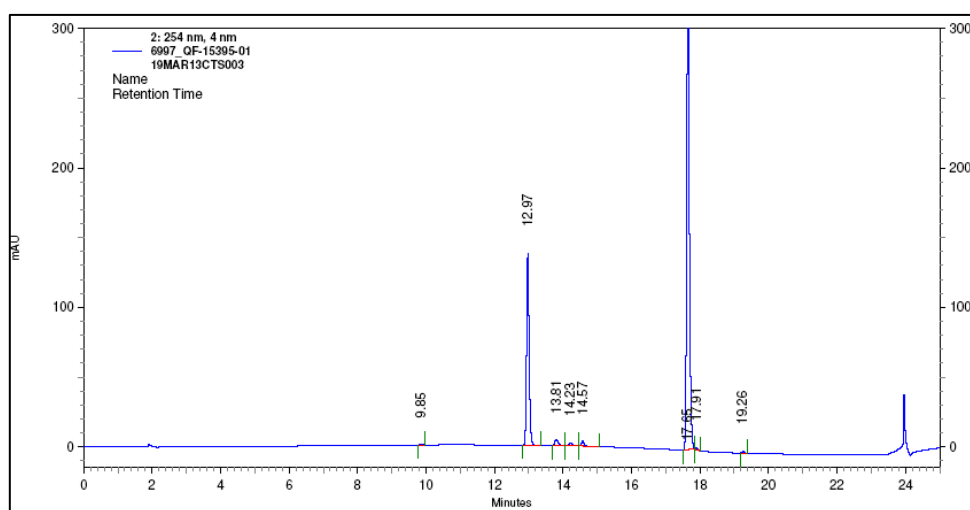


Figura 178. Cromatograma de **6997_QF-15395-01**. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.1.6. SÍNTESI DE 6997_UB-19101

La reacció es va dur a terme en un reactor de 50 mL amb agitació magnètica a 800 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.1.1*). Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (5,05 g, 1,00 eq), H-Leu-OⁱBu·HCl (1,97 g, 1,02 eq), HOBt·H₂O (1,40, 1,06 eq), EDC·HCl (1,88 g, 1,14 eq) i DIPEA (2,41 g, 2,16 eq), emprant DMF (12 mL) com a dissolvent. A les 2 h de reacció, la temperatura externa es va ajustar a 25 °C i es va iniciar l'addició d'H₂O (10 mL) en 15 min al cru de reacció. Un sòlid gomós va precipitar i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut es va carregar a un reactor de 150 mL i es va dissoldre en AcOEt (40 mL) amb agitació magnètica a 800 rpm. Es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució aquosa sat de NaHCO₃ (30 mL, 2 x 10 min), una dissolució aquosa sat de NaCl (30 mL, 1 x 10 min) i una dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % (30 mL, 2 x 10 min). La fase orgànica es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent de la dissolució obtinguda es va concentrar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (4,33 g de **6997_UB-19101-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 179**) i el producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 95,0 % (17,1 min). El pic cromatogràfic corresponent al DBF (12,4 min) es va detectar amb un 2,3 %.

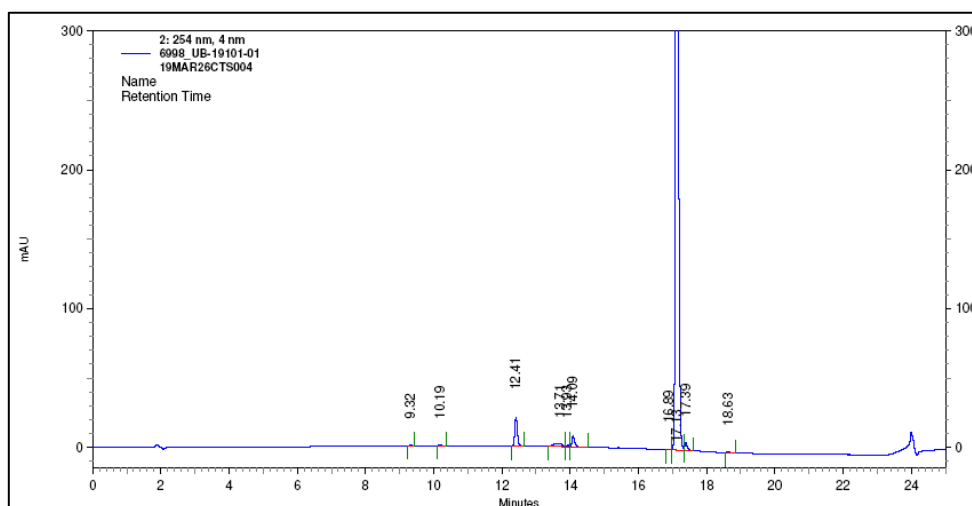


Figura 179. Cromatograma de **6997_UB-19101-01**. (Mètode B, *apartat 8.3.3*).

8.5.1.7. SÍNTESI DE 6997_UB-19115

La reacció es va dur a terme en un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles a 200 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.1.1*). Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (20,01 g, 1,00 eq), H-Leu-OⁱBu·HCl (7,62 g, 1,00 eq), HOBt·H₂O (5,13, 0,98 eq), EDC·HCl (7,22 g, 1,10 eq) i DIPEA (9,38 g, 2,12 eq), fent servir DMF (66 mL) com a dissolvent. Passada 1 h de reacció, el cru es va transvasar a un reactor de 250 mL, es va carregar AcOEt (80 mL) i la mescla es va agitar magnèticament a 800 rpm. Es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució aquosa d'àcid cítric al 5 % (40 mL, 3 x 15 min), una dissolució aquosa sat de NaHCO₃ (40 mL, 2 x 15 min) i una dissolució aquosa sat de NaCl (40 mL, 1 x 15 min). La fase orgànica es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent de la dissolució obtinguda es va concentrar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (23,04 g de **6997_UB-19115-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 180**) i el producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 93,2 % (17,5 min). El pic cromatogràfic corresponent al DBF (12,9 min) es va detectar amb un 3,3 %.

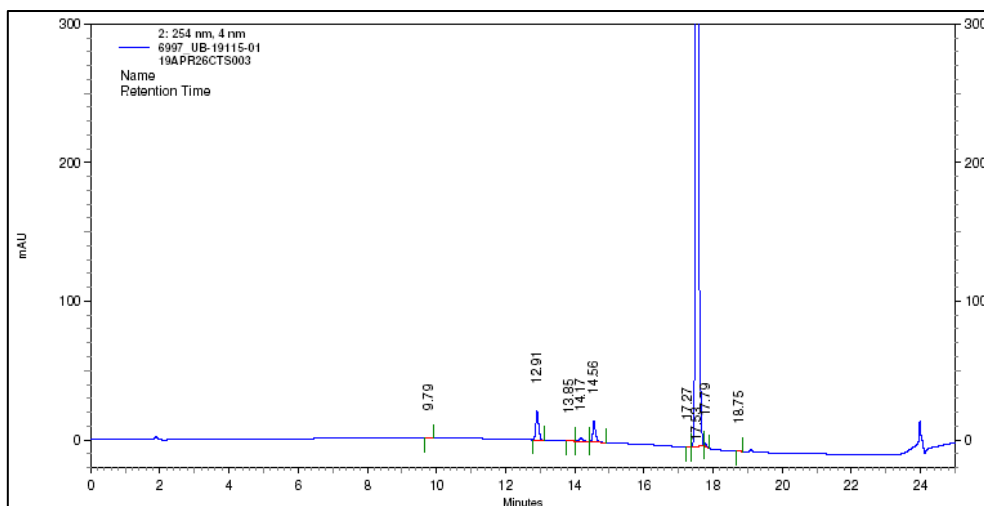


Figura 180. Cromatograma de 6997_UB-19115-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.1.8. SÍNTESI DE 6997_UB-19141

La reacció es va dur a terme en un reactor de 150 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles a 200 rpm i seguint el procediment general (apartat 8.5.1.1). Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (15,02 g, 1,00 eq), H-Leu-O^tBu-HCl (5,76 g, 1,01 eq), HOBt·H₂O (3,81, 0,97 eq), EDC·HCl (5,46 g, 1,11 eq) i DIPEA (7,07 g, 2,14 eq), fent servir DMF (49 mL) com a dissolvent. Passada 1 h de reacció, es va dur a terme el tractament del cru de reacció amb un procediment molt similar al que es va fer en la prova anterior (apartat 8.5.1.7). El sòlid obtingut (18,05 g de 6997_UB-19141-01) es va analitzar per HPLC (Figura 181) i va mostrar un 92,5 % del producte 6997 (17,5 min) i un 3,1 % de DBF (12,9 min).

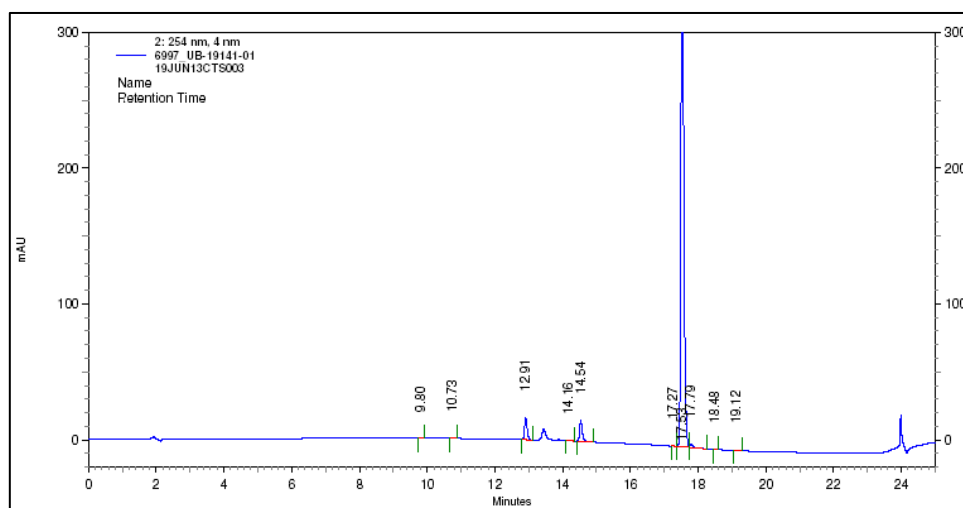


Figura 181. Cromatograma de 6997_UB-19141-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.1.9. SÍNTESI DE 6997_UB-23467

La reacció es va dur a terme en un reactor de 250 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles a 200 rpm i seguint el procediment general (apartat 8.5.1.1). Els reactius utilitzats van ser Fmoc-Cys(Trt)-OH (22,10 g, 1,00 eq), H-Leu-O^tBu-HCl (8,43 g, 1,00 eq), HOBt·H₂O (5,64, 0,98 eq), EDC·HCl (8,00 g, 1,11 eq) i DIPEA (10,51 g, 2,15 eq), emprant DMF (72 mL) com a dissolvent. Passades 2 h de reacció, es va dur a terme el tractament del cru de reacció

seguint el procediment utilitzat en la prova **6997_UB-19115-01** (*apartat 8.5.1.7*), amb la diferència que, després dels rentats de la fase orgànica, no es va dur a terme l'eliminació del dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat. La dissolució obtinguda (**6997_UB-23467-diss**) es va analitzar per HPLC (**Figura 182**) i el producte **6997** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 91,2 % (22,3 min).

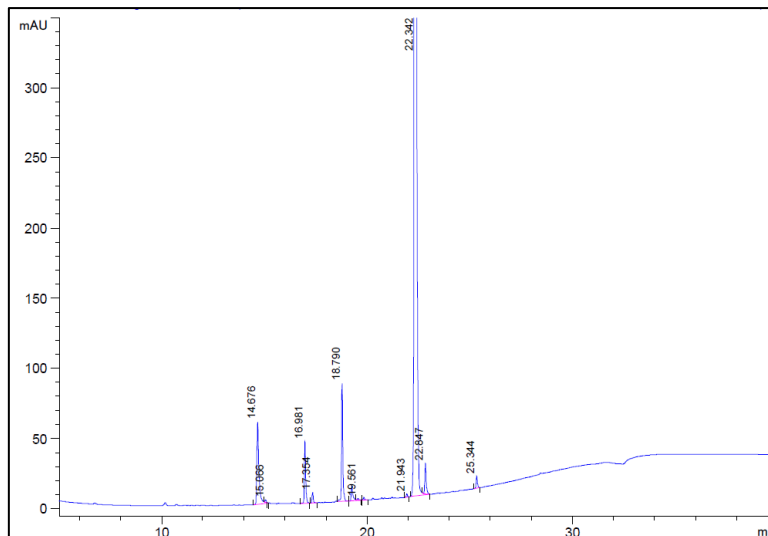
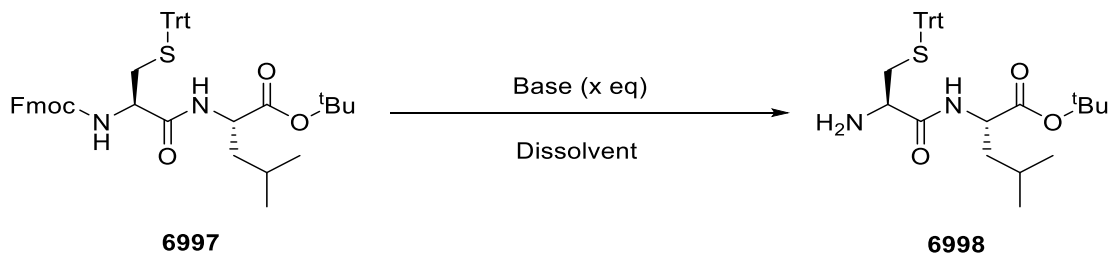


Figura 182. Cromatograma de **6997_UB-23467-diss**. (Mètode B, *apartat 8.3.3*).

El **6997** obtingut en la dissolució es va quantificar per ^1H -RMN (riquesa del 16 %, 27,46 g de **6997**), i, a continuació es va dur a terme l'eliminació del grup protector Fmoc per obtenir **6998** directament de la dissolució d'AcOEt (*veure apartat 8.5.2.14*).

8.5.2. SÍNTESI DE 6998

8.5.2.1. PROCEDIMENT GENERAL

Esquema 67. Esquema de la síntesi del dipèptid **6998**.

En un reactor de volum adequat per a cada escala de síntesi, i proveït d'agitació magnètica o d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles, es va carregar el dipèptid protegit **6997** i es va afegir una base i un dissolvent. La reacció es va monitoritzar per HPLC mitjançant l'anàlisi cada 30 min d'una alíquota del cru (50 µL del cru en 10 mL de MeCN), fins que el pic cromatogràfic corresponent al **6997** no es va detectar. A partir de la síntesi de **6998_UB-19103**, la reacció es va monitoritzar també per ¹H-RMN (400 µL del cru en 400 µL DMSO-d₆). Un cop determinat el final de la reacció, es va dur a terme el tractament del cru de reacció per obtenir el sòlid desitjat **6998**. Aquest sòlid es va assecar al dessecador de buit a 40 °C fins a pes constant. En els següents apartats, s'indica la base i el dissolvent utilitzats per a cada experiment, les quantitats de reactius, el tractament dut a terme amb els crus de síntesi i els grams de producte obtinguts.

8.5.2.2. SÍNTESI DE **6998_QF-15388**

En un baló de 25 mL proveït d'agitació magnètica es va carregar el sòlid **6997_QF-15382-01** (1,51 g, 1,00 eq) i es va tractar amb piperidina (700 µL, 3,54 eq) en DCM (6,3 mL). La mescla es va agitar a 800 rpm a ta fins a obtenir una dissolució completa i, a les 3 h de reacció, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El cru resultant es va tractar amb heptà (5 mL), la suspensió es va agitar durant 30 min i es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut es va redissoldre amb AcOEt (6 mL) i es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ a pH 6,2 (6 mL, 2 x 15 min), una dissolució aquosa sat de NaHCO₃ (6 mL, 1 x 15 min) i H₂O (6 mL, 1 x 15 min). La fase orgànica es va assecar amb Na₂SO₄ anh, es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (810 mg de **6998_QF-15388-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 183**) i el producte **6998** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 9,8 % (13,6 min). El pic cromatogràfic corresponent al DBF (12,9 min) es va detectar amb un 19,3 % i el corresponent a l'adducte de piperidina (6,1 min) amb un 70,7 %.

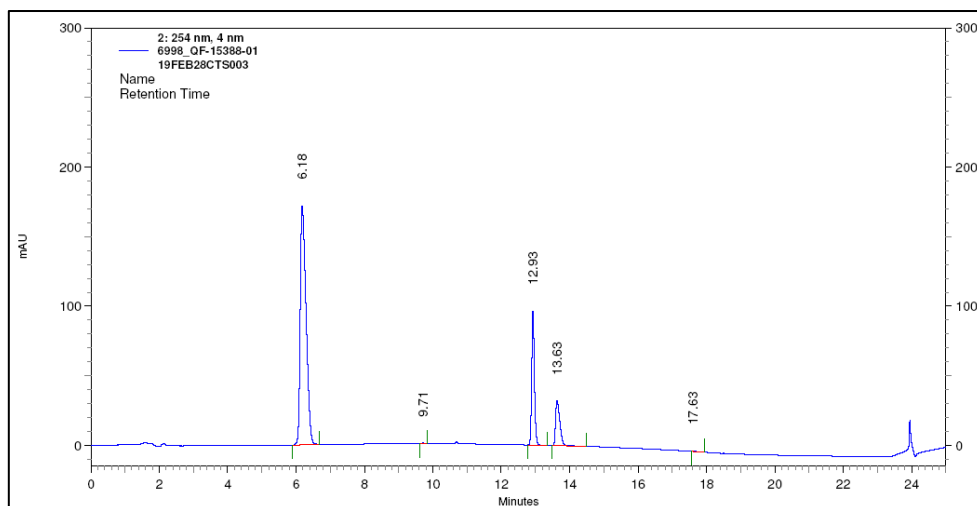


Figura 183. Cromatograma de 6998_QF-15388-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).

8.5.2.3. SÍNTESI DE 6998_UB-19103

En un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica es va carregar el sòlid **6997_QF-15382-01** (200 mg, 1,00 eq) i es va tractar amb piperidina (100 μ L, 3,82 eq) en DCM (900 μ L). La dissolució es va agitar a 800 rpm a ta durant 2 h i a continuació, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (**6998_UB-19103-01**) es va analitzar per ^1H -RMN en DMSO-d_6 (**Figura 184**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:1,04:0,10 (6998/FM-pip/DBF).

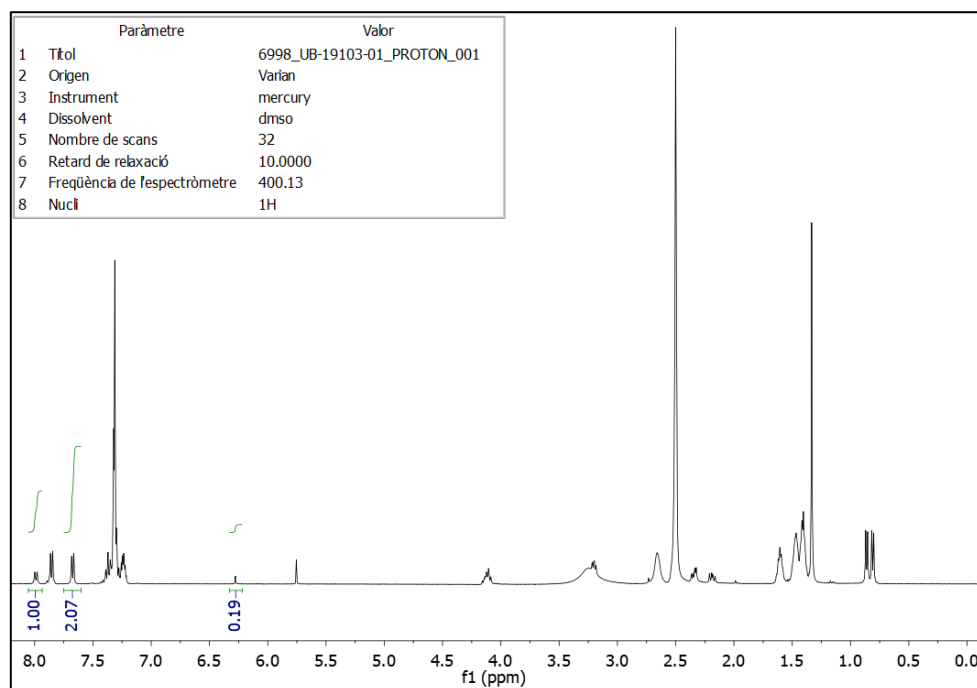


Figura 184. Espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de 6998_UB-19103-01.

8.5.2.4. SÍNTESI DE 6998_UB-19105

En un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica es va carregar el sòlid **6997_QF-15382-01** (200 mg, 1,00 eq) i es va tractar amb DBU (50 μ L, 1,26 eq) en THF (900 μ L). La dissolució es va agitar

a 800 rpm a ta i a les 2 h de reacció, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. L'oli obtingut (**6998_UB-19105-01**) es va analitzar per ^1H -RMN en DMSO-d_6 (**Figura 185**) i la relació molar obtinguda pel producte i el subproducte va ser d'1:1 (**6998/DBF**).

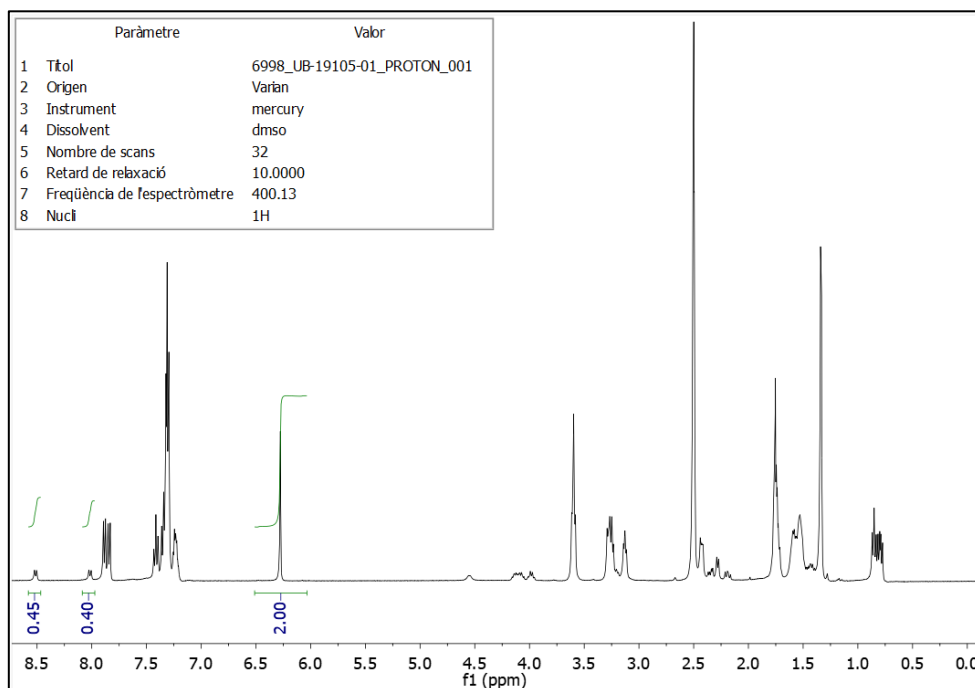


Figura 185. Espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **6998_UB-19105-01**.

8.5.2.5. SÍNTESI DE **6998_UB-19106**

El sòlid **6997_QF-15382-01** (200 mg, 1,00 eq) es va carregar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica i es va dissoldre en DCM (1500 μL). A continuació, es va carregar 4-AMP (800 μL , 25,18 eq) a la dissolució i la mescla de reacció es va agitar a 800 rpm a ta. Als 30 min de reacció, es van dur a terme rentats del cru amb una dissolució aquosa de NaCl sat (3 mL, 2 x 10 min), amb una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 5,5 (3 mL, 2 x 10 min) i amb H_2O (6 mL, 1 x 15 min). En l'última extracció amb H_2O es va haver d'afegir DCM (2 mL) per desfer l'emulsió en la interfase. La fase orgànica obtinguda es va analitzar per ^1H -RMN i al detectar-se encara l'adducte de FM-AMP en la fase orgànica, es va tornar a afegir NaH_2PO_4 a pH 5,5 (5 mL) i la mescla es va agitar a 800 rpm durant 12 h. A continuació, les fases es van separar i la fase orgànica es va analitzar per ^1H -RMN, detectant-se encara l'adducte de FM-AMP i a més a més, DBF. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat, el sòlid obtingut es va dissoldre en AcOEt (3 mL) i la dissolució resultant es va transvasar a un baló de 10 mL. Tot seguit, es va dur a terme un rentat amb una dissolució de NaH_2PO_4 a pH 5,5 (3 mL, 2 x 10 min) i la fase orgànica obtinguda es va analitzar per ^1H -RMN, on l'adducte de FM-AMP ja no es va detectar. La fase orgànica es va assecar amb Na_2SO_4 anh, es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (**6998_UB-19106-01**) es va analitzar per ^1H -RMN en DMSO-d_6 (**Figura 186**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0,09 (**6998/FM-AMP/DBF**).

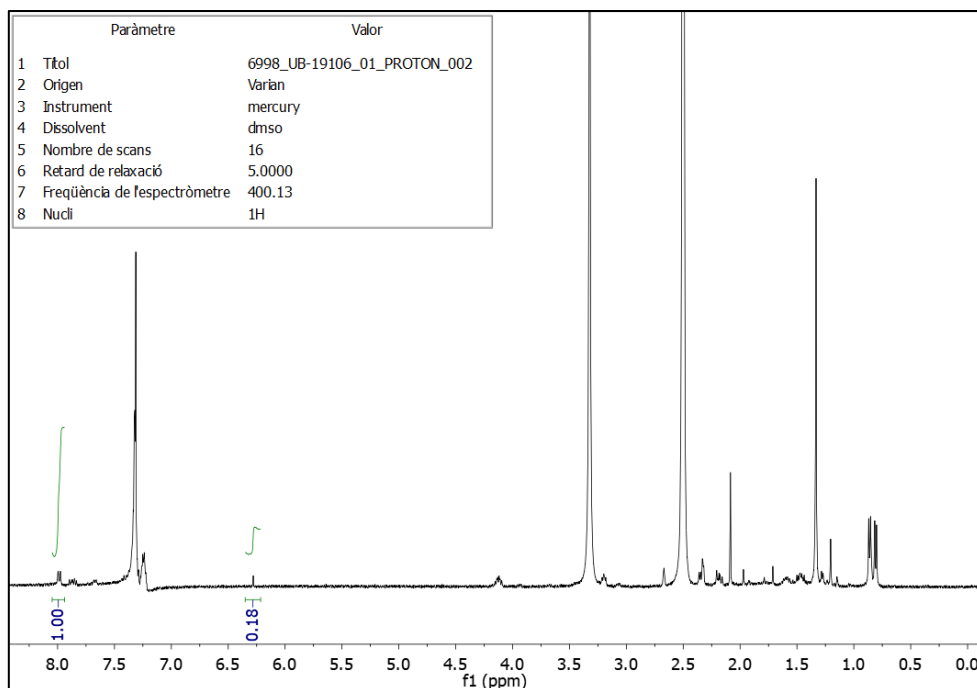


Figura 186. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19106-01**.

8.5.2.6. SÍNTESI DE **6998_UB-19109**

El sòlid **6997_QF-15382-01** (250 mg, 1,00 eq) es va carregar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica, es va dissoldre en DCM (1880 µL) i es va carregar 4-AMP (1000 µL, 25,18 eq) a la dissolució. La mescla es va agitar a 800 rpm a ta i als 25 min de reacció, la dissolució es va enterbolir i el dissolvent de la reacció es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut es va dissoldre en AcOEt (5 mL) i es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució aquosa de NaCl sat (5 mL, 2 x 10 min) i una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 5,5 (5 mL, 4 x 10 min), observant-se la formació d'emulsions en les interfases. La fase orgànica resultant es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (45 mg de **6998_UB-19109-01**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 187**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0,04 (**6998**/FM-AMP/DBF).

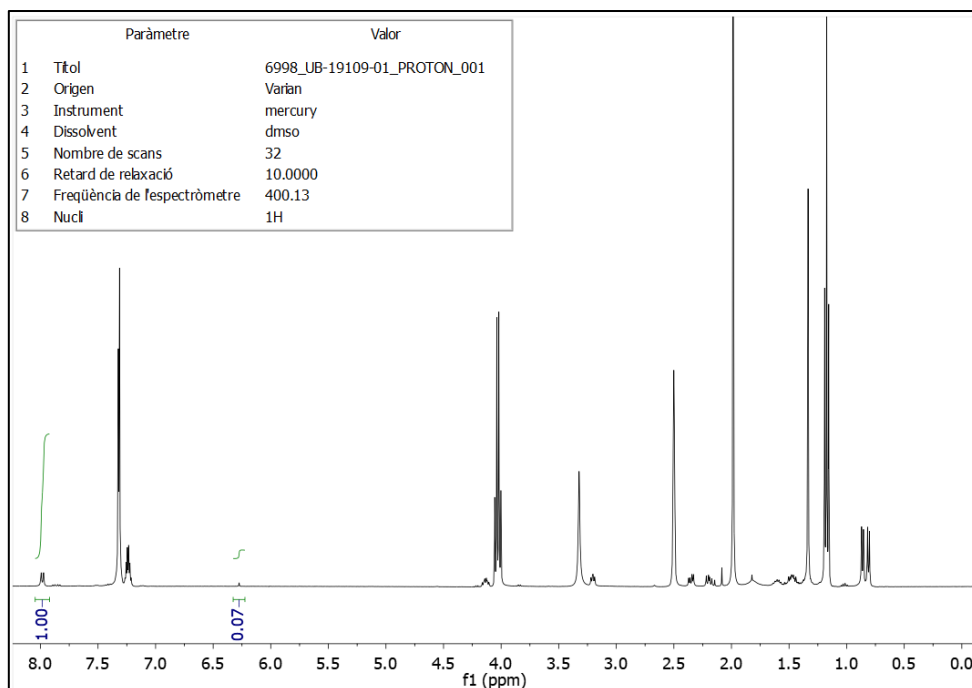


Figura 187. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19109-01**.

8.5.2.7. SÍNTESI DE **6998_UB-19112**

El sòlid **6997_QF-15395-01** (1,01 g, 1,00 eq) es va carregar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica, es va dissoldre en DMF (7400 µL) i es va carregar 4-AMP (800 µL, 4,99 eq) a la dissolució. La mescla es va agitar a 800 rpm i es va observar com la solució s'enterbolia i precipitava un sòlid que no dipositava al parar l'agitació. Una alíquota de la mescla (50 µL) es va transvasar a un matràs de 10 mL amb MeCN (6 mL) i es va observar com el sòlid dipositava al fons del matràs. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid es va analitzar per HPLC-MS i ¹H-RMN (**6998_UB-19112-01**), detectant majoritàriament la *m/z* i els senyals corresponents a l'adducte de FM-AMP. A les 2 h de reacció, el cru es va transvasar a un baló amb MeCN (70 mL) i el sòlid va dipositar al fons del baló. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i es va obtenir un sòlid (**6998_UB-19112-02**), on el producte majoritari era l'adducte, i una dissolució que contenia **6998** i l'adducte. El dissolvent de la dissolució es va concentrar a pressió reduïda fins a 10 mL, es va transvasar a un baló de 200 mL i es va carregar amb AcOEt (60 mL). A continuació, es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució aquosa de NaCl sat (60 mL, 2 x 10 min), una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 5,5 (60 mL, 3 x 10 min) i H₂O (60 mL 1 x 10 min). La fase orgànica resultant es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (613 mg de **6998_UB-19112-03**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 188**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0 (**6998**/FM-AMP/DBF).

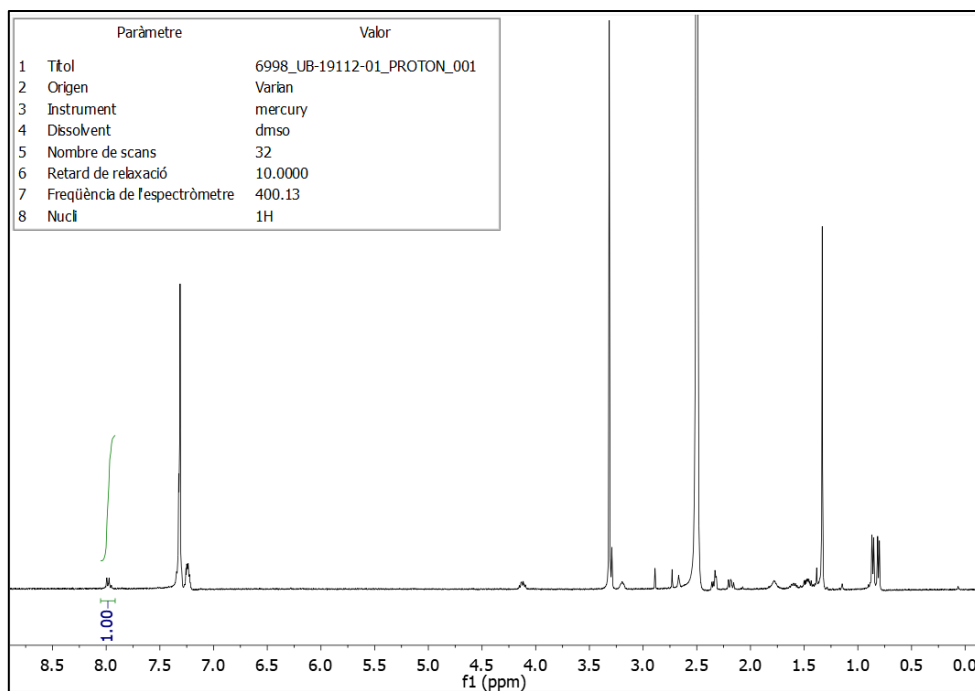


Figura 188. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19112-03**.

8.5.2.8. SÍNTESI DE **6998_UB-19119**

El sòlid **6997_UB-19115-01** (502 mg, 1,00 eq) es va carregar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica, es va dissoldre en DCM (2700 µL) i es va carregar a la dissolució TAEA (1200 µL, 12,09 eq). La mescla es va agitar a 800 rpm i es va observar com la solució s'enterbolia i precipitava un sòlid gomós que no dipositava al parar l'agitació. Passades 2,5 h de reacció, el cru es va transvasar a un baló de 100 mL amb agitació magnètica i es va carregar més DCM (30 mL). A continuació, es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una de dissolució aquosa sat de NaCl (30 mL, 3 x 15 min) i una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ pH 5,5 (30 mL, 3 x 15 min). La fase orgànica resultant es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut (130 mg de **6998_UB-19119-01**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ i (**Figura 189**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0,07 (**6998**/FM-TAEA/DBF).

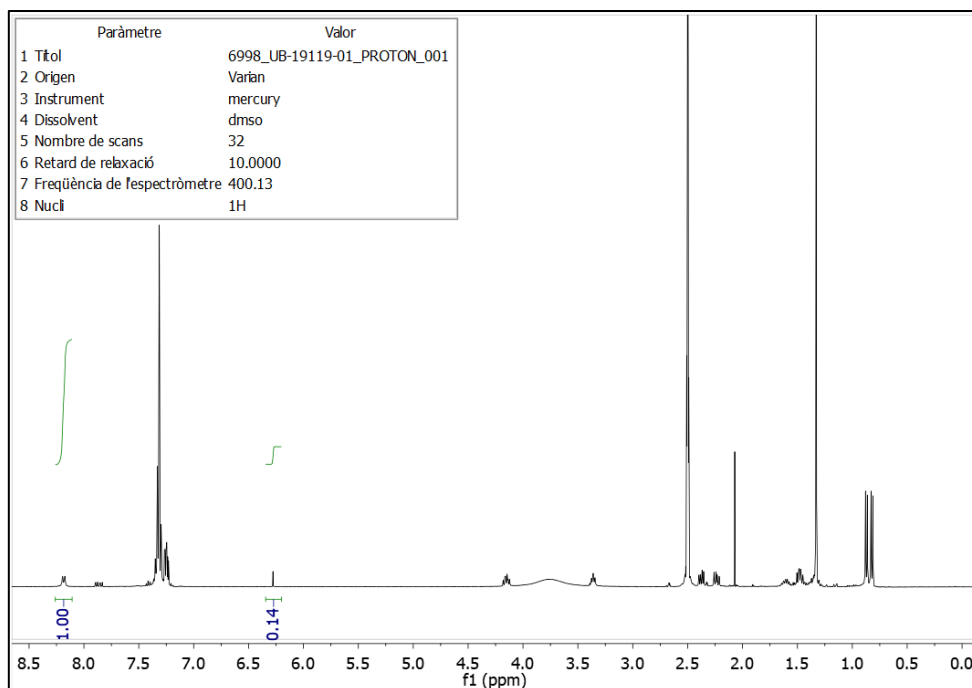


Figura 189. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19119-01**.

8.5.2.9. SÍNTESI DE **6998_UB-19130**

El sòlid **6997_UB-19115-01** (2,01 g, 1,00 eq) es va carregar en un reactor de vidre de 50 mL proveït d'agitació magnètica i es va dissoldre en MeCN (13 mL). A continuació, es va carregar 4-AMP (1556 µL, 5,08 eq) i es va observar com precipitava un sòlid. Als 30 min de reacció, la temperatura externa es va ajustar a 5 °C i la mescla es va agitar a 800 rpm durant 1,5 h. La suspensió obtinguda es va filtrar a pressió reduïda i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. El sòlid obtingut es va transvasar a un baló de 100 mL, es va afegir AcOEt (40 mL) i es van dur a terme rentats de la fase orgànica amb una dissolució sat de NaCl (40 mL, 2 x 15 min) i amb una dissolució 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 5,5 (40 mL, 2 x 15 min). La fase orgànica resultant es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat. L'oli obtingut (1,16 g de **6998_UB-19130-02**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 190**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0 (**6998**/FM-AMP/DBF).

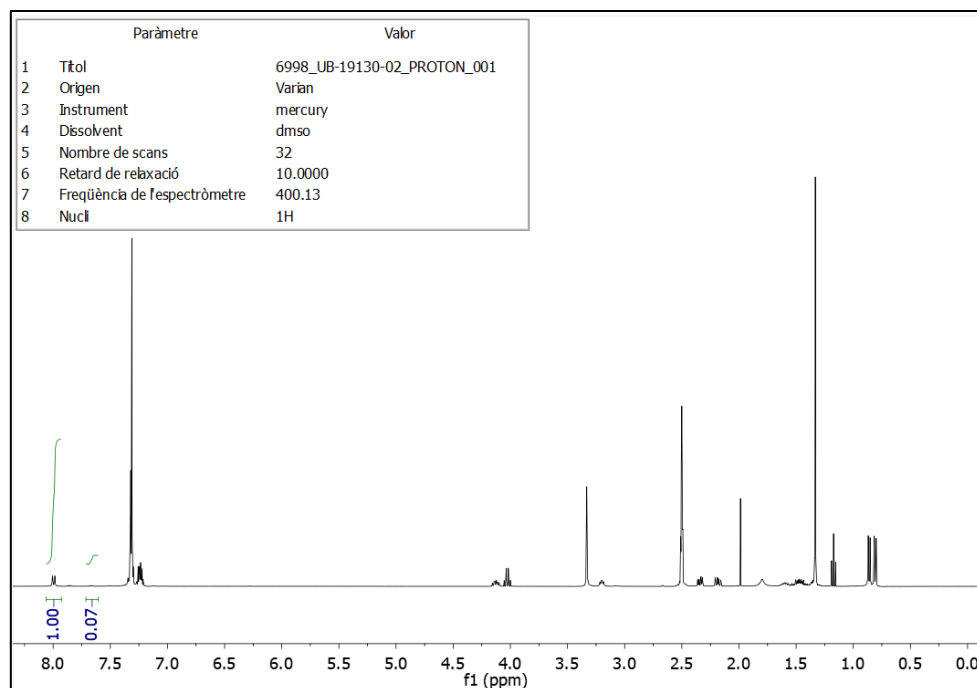


Figura 190. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19130-02**.

8.5.2.10. SÍNTESI DE **6998_UB-19132**

El sòlid **6997_UB-19115-01** (2,00 g, 1,00 eq) es va carregar en un reactor de vidre de 50 mL proveït d'agitació magnètica i es va dissoldre en DMF (15 mL). Tot seguit es va carregar 4-AMP (1535 µL, 5,02 eq), el cru de reacció es va agitar a 800 rpm i es va observar com precipitava un sòlid. Als 25 min, la suspensió es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació magnètica. La mescla es va agitar a 800 rpm, es va carregar AcOEt (120 mL) i es va iniciar la introducció de CO₂ amb un flux continu durant 10 min. La temperatura interna de la suspensió es va mesurar amb una sonda tèrmica i es va observar com la temperatura inicial (20,3 °C) va augmentar lleugerament a mesura que s'introduïa CO₂ a la suspensió (25,4 °C). Als 10 min de reacció, la temperatura interna va tornar a baixar (19,4 °C) i es va finalitzar la introducció de CO₂. La suspensió del cru es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va descartar (2,41 g de **6998_UB-19132-01**, majoritàriament l'adducte de FM-AMP i la base 4-AMP, tal com va mostrar les anàlisis d'HPLC-MS i ¹H-RMN). La dissolució obtinguda es va rentar amb H₂O (100 mL, 3 x 15 min) i la fase orgànica resultant es va assecar amb Na₂SO₄ anh, la suspensió es va filtrar i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda fins a obtenir un oli. L'oli resultant es va dissoldre amb AcOEt (4 mL) en un baló de 100 mL proveït d'agitació magnètica, es va addicionar H₂O (60 mL) gota a gota i va precipitar un sòlid. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (941 mg de **6998_UB-19132-02**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 191**). La relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0 (**6998**/FM-AMP/DBF).

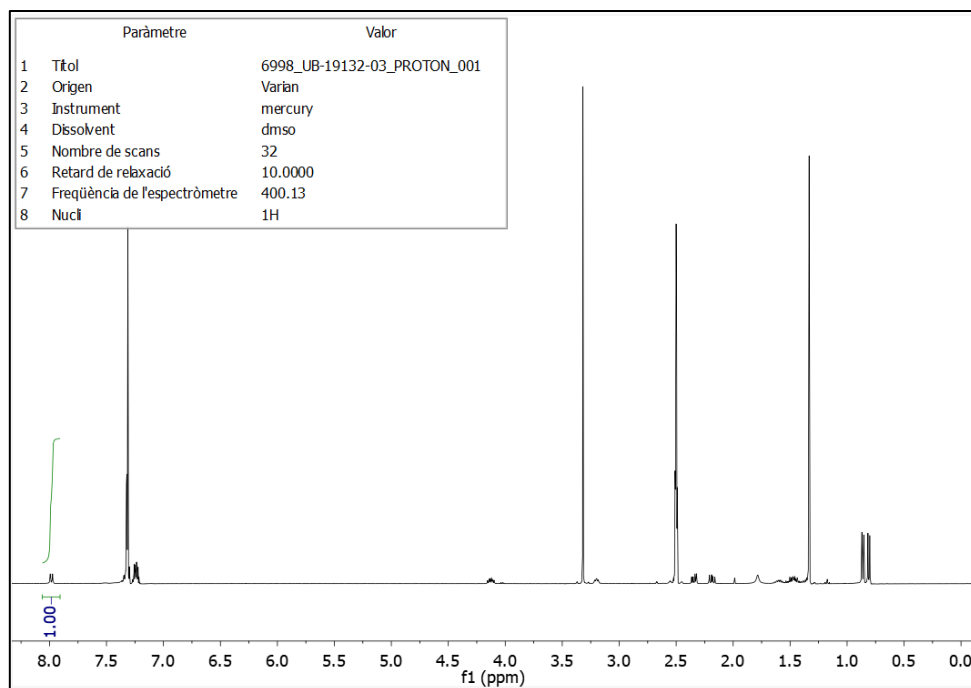


Figura 191. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19132-02**.

8.5.2.11. SÍNTESI DE **6998_UB-19134**

El sòlid **6997_UB-19115-01** (2,00 g, 1,00 eq) es va carregar en un reactor de vidre de 50 mL proveït d'agitació magnètica i es va dissoldre en AcOEt (15 mL). Es va carregar 4-AMP (1525 µL, 4,99 eq) i la mescla es va agitar a 800 rpm, observant-se com precipitava un sòlid. Als 40 min de reacció, el cru es va transvasar a un reactor de 150 mL proveït d'agitació magnètica, la mescla es va agitar a 800 rpm, es va afegir AcOEt (110 mL) i es va introduir CO₂ amb un flux continu durant 15 min. A continuació, la temperatura externa es va refredar a 5 °C, la suspensió es va deixar en agitació durant 1 h i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda, obtenint-se un sòlid que es va descartar (**6998_UB-19134-01**, majoritàriament adducte de FM-AMP i 4-AMP, tal com va mostrar l'anàlisi d'HPLC-MS), i una dissolució incolora transparent (**6998_UB-19134-diss**) que es va analitzar per ¹H-RMN (**Figura 192**). L'espectre ¹H-RMN de la dissolució va mostrar DBF junt amb el producte desitjat **6998**, amb una relació molar 1:0:0,5 (**6998**/FM-AMP/DBF), raó per la qual la prova es va abandonar.

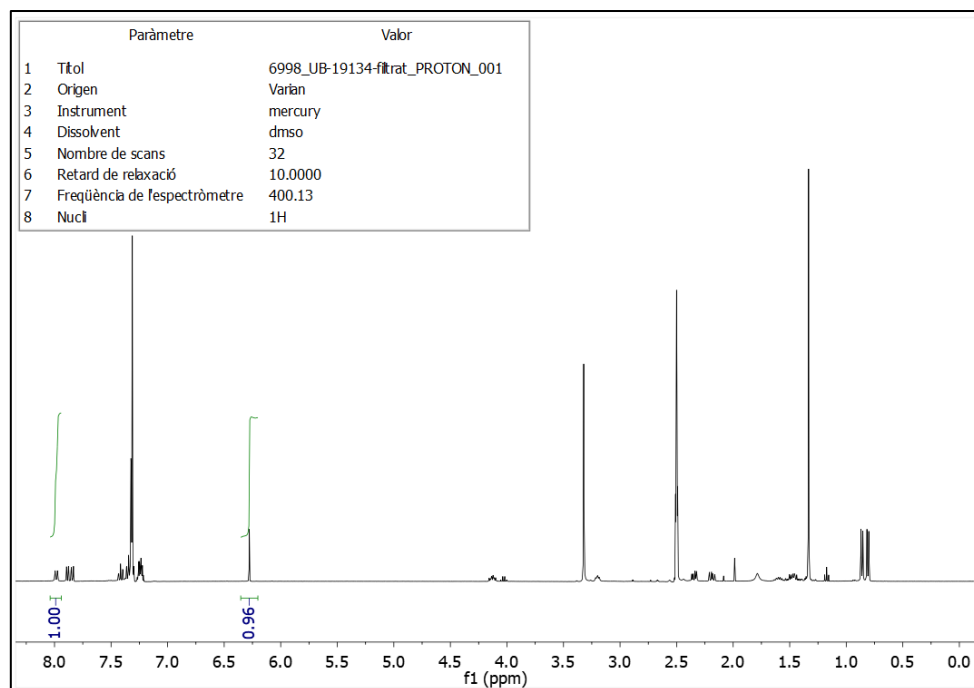


Figura 192. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19134-filtrat**.

8.5.2.12. SÍNTESI DE **6998_UB-19135**

En aquesta prova es van utilitzar les mateixes condicions de reacció i la mateixa escala de treball que en la prova **6998_UB-19134** (*apartat 8.5.2.11*), però en aquest cas la reacció es va deixar 5 h en agitació i a continuació, es va dur a terme el tractament del cru de reacció similar al que es va fer en la prova anterior (*apartat 8.5.2.11*). La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i es va obtenir un sòlid (2,08 g de **6998_UB-19135-01**, majoritàriament l'adducte de FM-AMP i 4-AMP segons l'anàlisi d'HPLC) i una dissolució (**6998_UB-19134-diss**). El dissolvent de **6998_UB-19134-diss** es va eliminar a pressió reduïda fins a sequedat i el sòlid obtingut (1,23 g de **6998_UB-19135-02**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 193**). La relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0 (**6998**/FM-AMP/DBF).

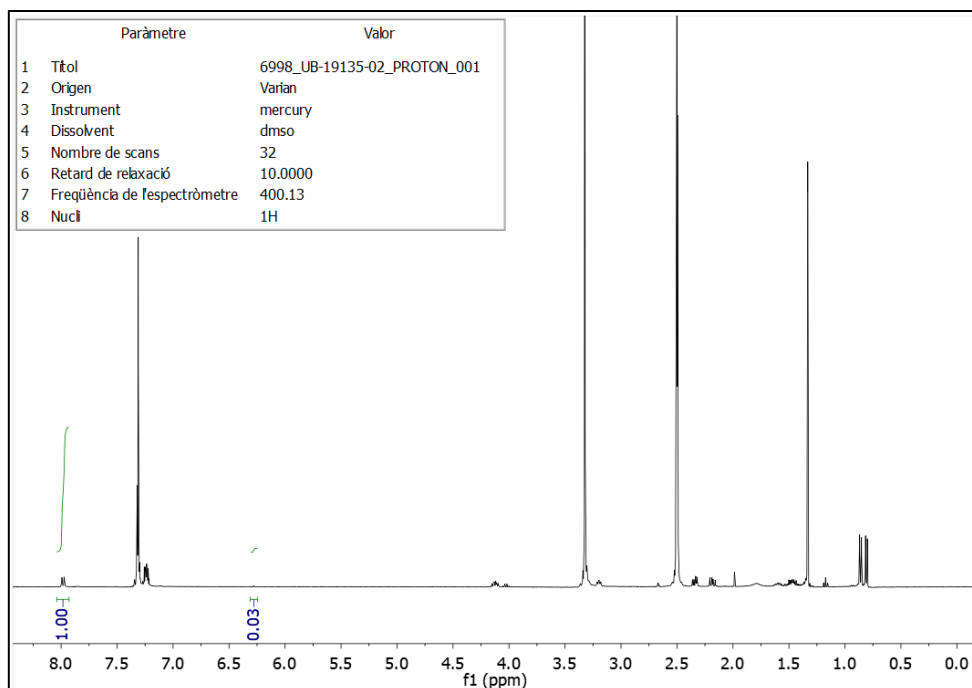


Figura 193. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de 6998_UB-19135-02.

8.5.2.13. SÍNTESI DE 6998_UB-19144

En aquesta prova es van utilitzar les mateixes condicions de reacció que en la prova **6998_UB-19134** (*apartat 8.5.2.11*), però a major escala. La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 150 mL proveït d'agitació mecànica i pales de tefló abatibles. Els reactius utilitzats van ser **6997_UB-19141-01** (13,1 g, 1,00 eq), 4-AMP (10 mL, 5,00 eq) i AcOEt (101 mL). La reacció es va deixar en agitació 4 h i, a continuació, es va dur a terme el tractament del cru de reacció amb un procediment similar amb el que es va fer en la prova **6998_UB-19134** (*apartat 8.5.2.11*). En aquest cas, es va transvasar el cru a un reactor d'1 L amb agitació mecànica, es va carregar més AcOEt (813 mL) i es va introduir un flux constant de CO₂ durant 1 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i es va obtenir un sòlid (15,4 g de **6998_UB-19144-01**, majoritàriament l'adducte de FM-AMP i 4-AMP per anàlisi d'HPLC-MS) i una dissolució (**6998_UB-19144-diss**). Aquesta dissolució es va concentrar a pressió reduïda fins a uns 13 mL i es va transvasar a un reactor de 250 mL amb agitació mecànica. Es va addicionar H₂O (150 mL) al cru durant 1 h, va precipitar un sòlid i la temperatura externa es va programar per refredar de 25 °C a 4 °C en 4 h. La suspensió es va deixar en agitació a 4 °C durant 12 h i es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut (8,96 g de **6998_UB-19144-02**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 194**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0 (**6998**/FM-AMP/DBF).

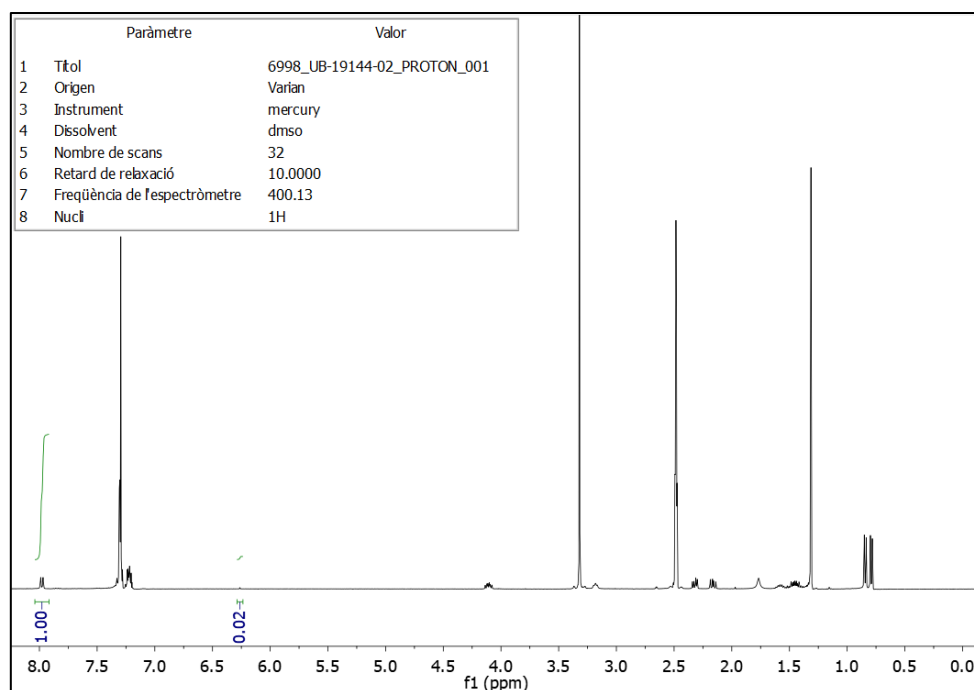


Figura 194. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-19144-02**.

8.5.2.14. SÍNTESI DE **6998_UB-23469**: MAJOR ESCALA

En aquesta prova es van utilitzar les mateixes condicions de reacció que en la prova **6998_UB-19134** (*apartat 8.5.2.11*), però a major escala. La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 500 mL proveït d'agitació mecànica i pales de teflò abatibles. En aquesta prova, el producte de partida utilitzat va ser la dissolució d'AcOEt obtinguda en la prova **6997_UB-23467-diss** (205 mL, 1,00 eq). Aquesta dissolució es va carregar al reactor amb 4-AMP (20 mL, 4,94 eq) i la reacció es va deixar en agitació 8 h a 25 °C. A continuació, la temperatura externa es va ajustar a 2 °C, i la mescla es va deixar en agitació a 200 rpm durant 12 h. Al dia següent, la temperatura externa es va pujar a 25 °C, es va afegir més 4-AMP (5 mL, 1.24 eq) i la reacció es va mantenir durant 4 h en aquestes condicions. Tot seguit, es va dur a terme el tractament del cru de reacció seguint el procediment descrit a la prova **6998_UB-19134** (*apartat 8.5.2.11*). En aquest cas, es va transvasar el cru a un reactor de 2 L amb agitació mecànica, es va carregar més AcOEt (1500 mL) i es va introduir un flux constant de CO₂ durant 1 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda, el sòlid es va descartar i el dissolvent de la dissolució es va concentrar a pressió reduïda fins a uns 20 mL. El cru obtingut es va transvasar a un reactor de 250 mL amb agitació mecànica a 200 rpm, es va carregar H₂O (324 mL) i va precipitar un sòlid. La suspensió es va deixar 12 h en agitació a 5 °C i al dia següent es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut (15,69 g de **6998_UB-23469-02**) es va analitzar per ¹H-RMN en DMSO-d₆ (**Figura 195**) i la relació molar obtinguda pel producte i els subproductes va ser d'1:0:0 (**6998**/FM-AMP/DBF).

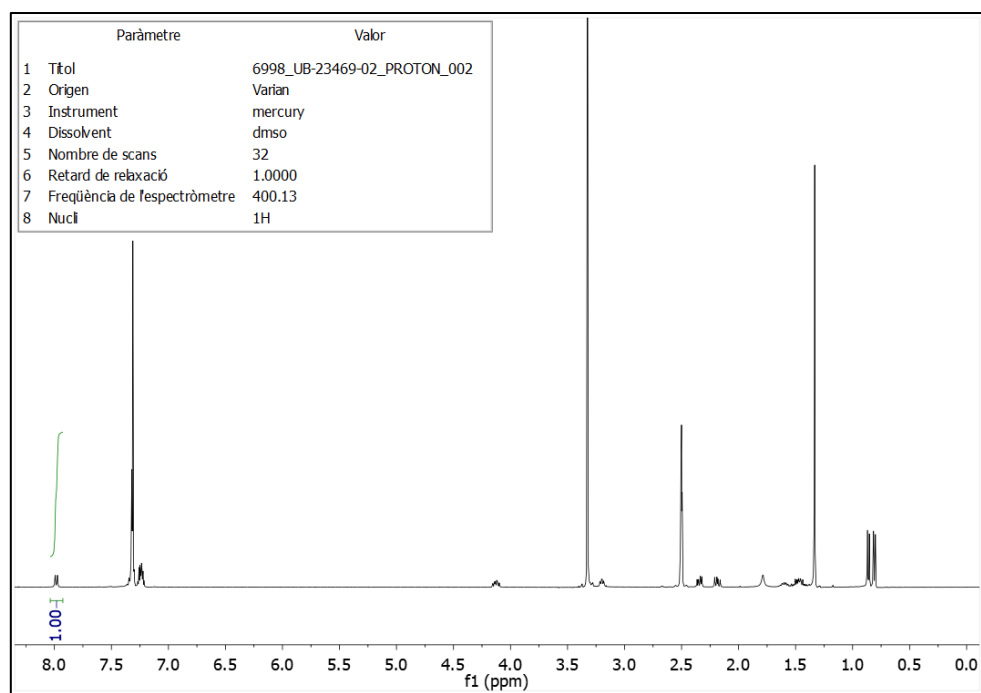
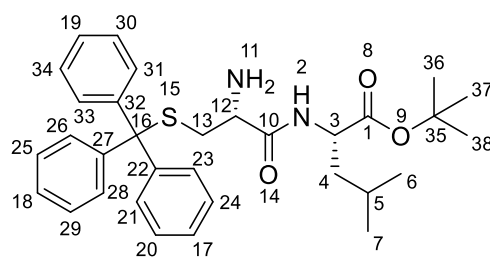
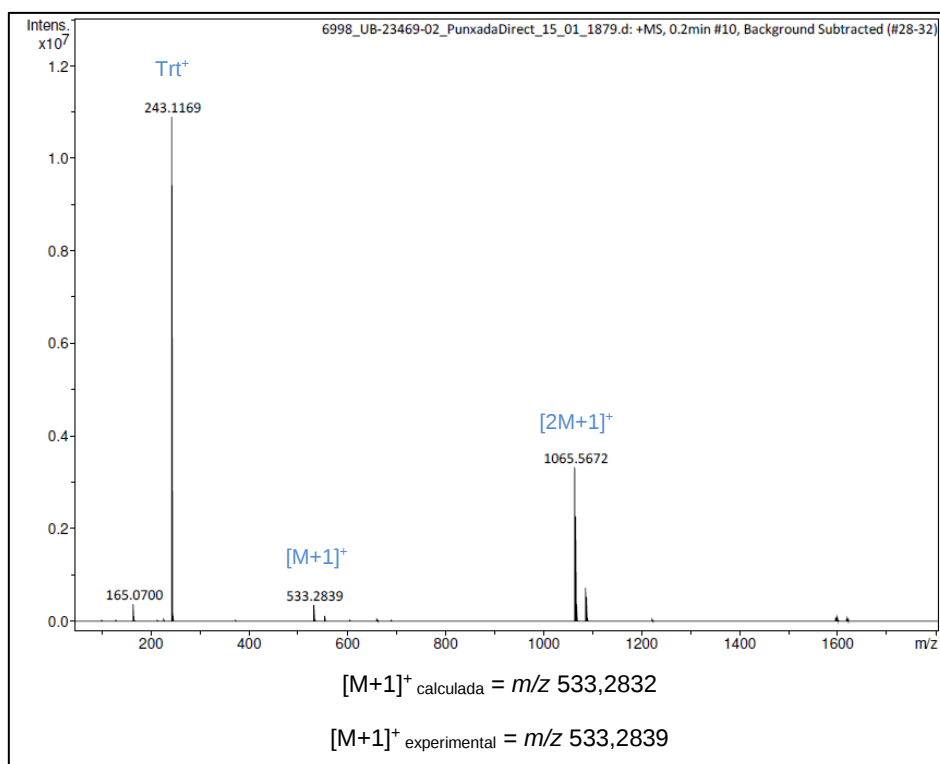


Figura 195. Espectre de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de **6998_UB-23469-02**.

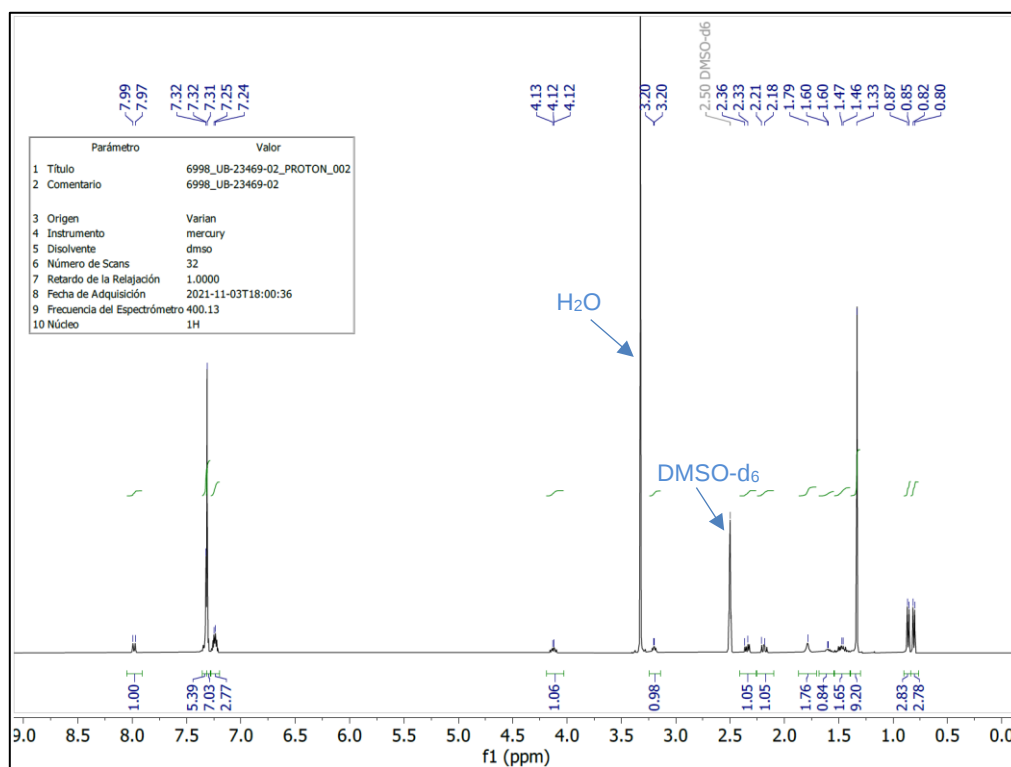
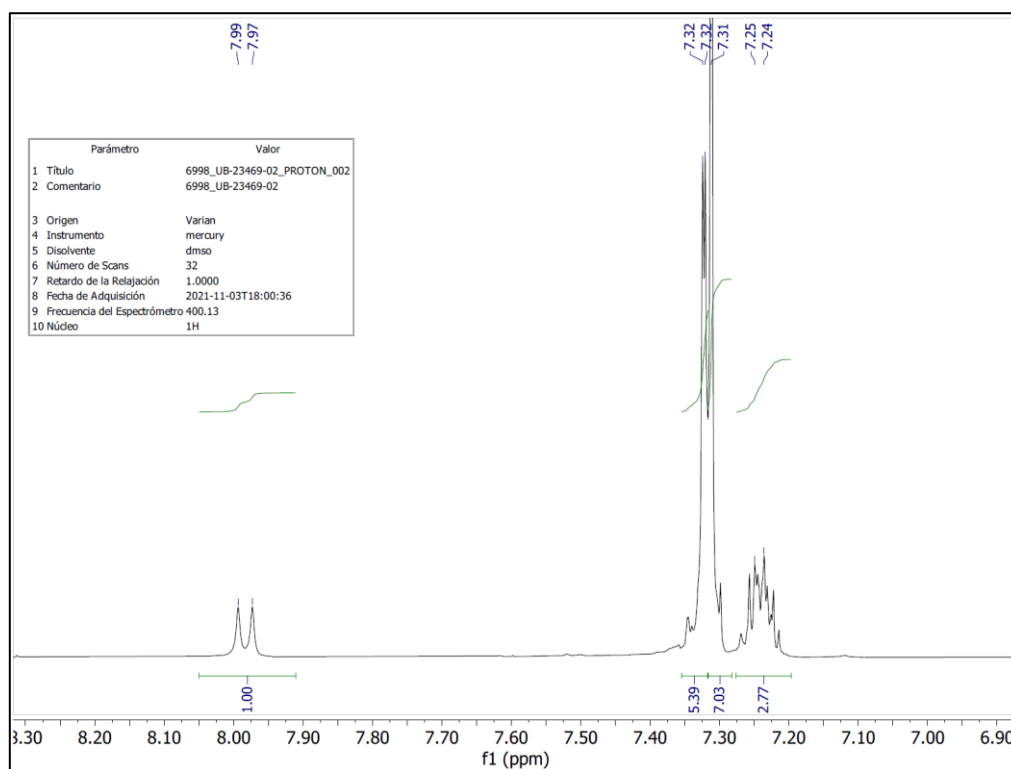
8.5.3. CARACTERITZACIÓ DE 6998

**6998**Fórmula química: $C_{32}H_{40}N_2O_3S$ Massa exacta: m/z 532,2760 $[M+1]^+ = m/z$ 533,2832

8.5.3.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

**Figura 196.** Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de **6998_UB-23469-02**.

8.5.3.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.5.3.2.1. ESPECTRES DE ^1H -RMNFigura 197. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6998_UB-23469-02.Figura 198. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6998_UB-23469-02.

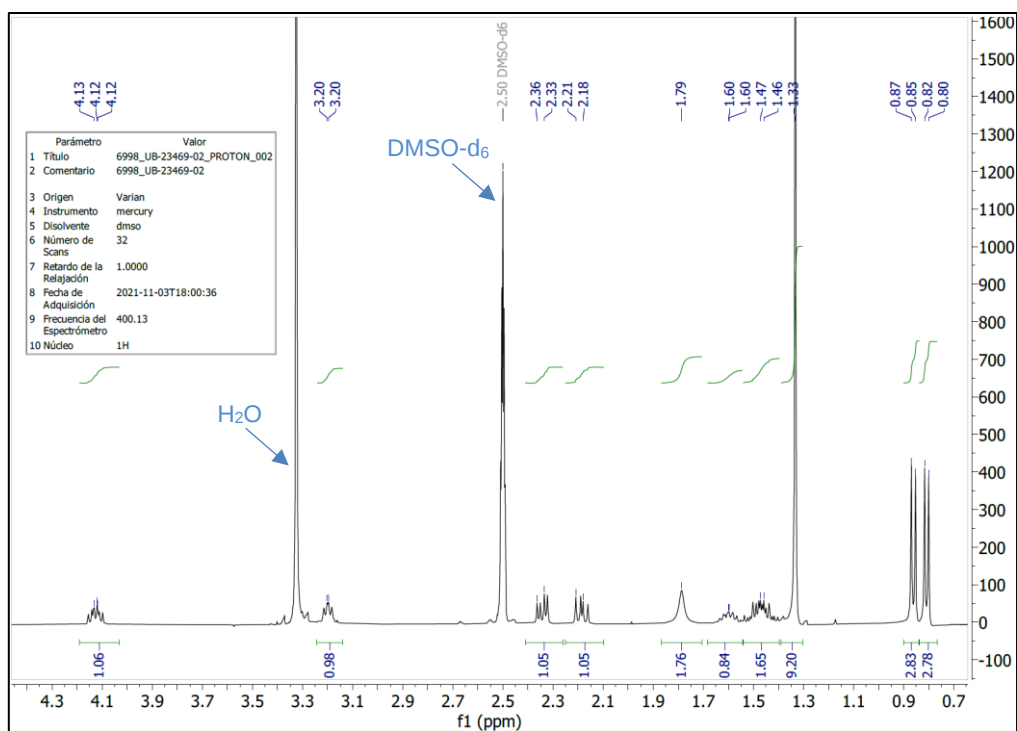


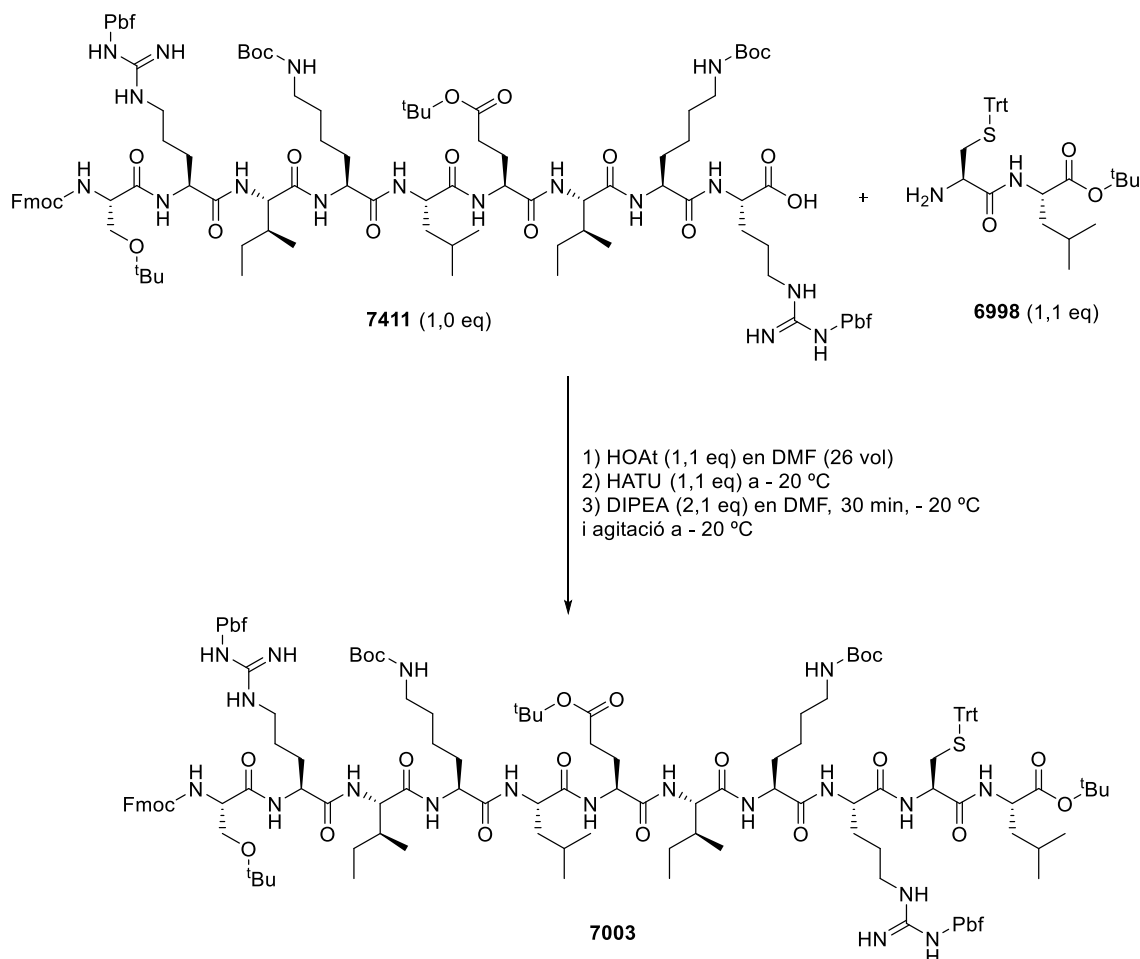
Figura 199. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **6998_UB-23469-02**.

Taula 83. Proposta d'assignació de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO-d_6 de **6998_UB-23469-02**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2.50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Constant d'acoblament (Hz)	Integral	ASSIGNACIÓ
7,98	d	8,2	1	H2
7,32	d	1,6	5	H21+H23+H26+H28+H3
7,31	s	-	7	1+H33+H20+H24+H25+ H29+H30+H34
7,24	multiplet	-	3	H17+H18+H19
4,12	multiplet	-	1	H3
3,20	dd	4,0; 5,2	1	H12
2,34	dd	5,2; 11,2	1	H13+H13'
2,19	dd	7,7; 11,2	1	
1,79	broad signal	-	2	H11
1,60	multiplet	-	1	H5
1,47	multiplet	-	2	H4+H4'
1,33	s	-	9	H36+H37+H38
0,86	d	6,7	3	H6+H7
0,81	d	6,7	3	

8.5.4. SÍNTESI DE 7003

8.5.4.1. PROCEDIMENT GENERAL



Esquema 68. Condicions de reacció per a la síntesi del fragment peptídic protegit 7003.

En un reactor de volum adequat per a cada escala de síntesi, proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles, es van carregar els pèptids protegits **7411** i **6998**, HOAt i es va utilitzar DMF com a dissolvent. La mescla es va agitar a 200 rpm fins a obtenir una dissolució completa, i a continuació, la temperatura externa es va refredar a - 20 °C. Un cop assolida la temperatura, es va carregar HATU i es va iniciar l'addició d'una solució de DIPEA en DMF en 30 min. La reacció es va monitoritzar per HPLC mitjançant l'anàlisi d'una alíquota del cru (0,2 mL de solució en 100 mL de MeCN) cada hora, fins que el pic cromatogràfic corresponent al **7411** no es va detectar. Un cop determinat el final de la reacció, el cru es va transvasar a un reactor o baló de volum adequat i es va dur a terme la precipitació del pèptid desitjat amb l'addició d'H₂O en 30 min a 5 °C. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va assecat al dessecador de buit a 40 °C fins a pes constant. En els següents apartats s'indiquen les quantitats utilitzades de reactius per a cada síntesi, així com els grams de producte obtinguts i la puresa cromatogràfica del producte desitjat.

8.5.4.2. SÍNTESI DE 7003_UB-21599

La reacció es va dur a terme en un reactor de 100 mL i seguint el procediment general (*apartat* 8.5.4.1). Els reactius utilitzats van ser **7411_UB-21578-01** (1,00 g, 1,00 eq), una barreja dels lots

6998_UB-19132-02 i **6998_UB-19135-02** (270 mg, 1,10 eq), HOAt (70 mg, 1,12 eq), HATU (193 mg, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (140 mg, 2,35 eq) en DMF (5400 µL), fent servir DMF (22 mL) com a dissolvent. A les 2,5 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (240 mL). El sòlid obtingut (1,13 g de **7003_UB-21599-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 200**) i el producte **7003** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 89,0 % (30,8 min), acompanyat d'un 4,1 % de **6998** (18,4 min).

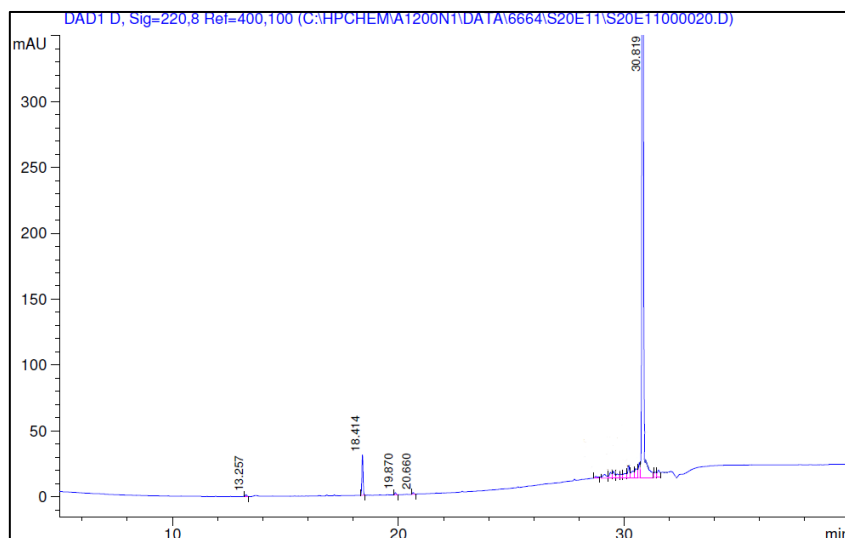


Figura 200. Cromatograma de **7003_UB-21599-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.2.1. PROVES DE PURIFICACIÓ

Les proves per purificar l'intermedi peptídic **7003** es van realitzar amb el sòlid **7003_UB-21599-01** (50 mg) en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica, i van consistir en assajar la solubilitat del sòlid amb 12 dissolvents diferents (**Taula 84**). Primerament, es van afegir 6 volums del dissolvent (300 µL) al sòlid amb una micropipeta de capacitat 100-1000 µL, i la mescla es va agitar durant 5 min. Cap prova va donar una dissolució completa, raó per la qual es van afegir 4 volums més de dissolvent (200 µL). Les proves que van donar una dissolució completa es van descartar i les proves que van donar una suspensió es van filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va analitzar per HPLC.

Taula 84. Proves de purificació de **7003_UB-21599-01**.

Dissolvent	Volum afegit (μL)	Aspecte	Volum afegit (μL)	Aspecte	Filtració	% A HPLC	
						7003	6998
7003_UB-21599-01						89,0	4,1
DCM	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-
Acetona	300	Suspensió	200	Suspensió	Ràpida	95,3	n.d
MeOH	300	Suspensió	200	Suspensió	Ràpida	95,3	0,16
EtOH	300	Suspensió	200	Suspensió	Lenta	95,3	0,13
TBME	300	Suspensió	200	Suspensió	Lenta	95,3	0,44

Dissolvent	Volum afegit (μL)	Aspecte	Volum afegit (μL)	Aspecte	Filtració	% A HPLC	
						7003	6998
Toluè	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-
Heptà	300	Suspensió	200	Suspensió	Ràpida	93,5	2,12
2-MeTHF	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-
IPA	300	Suspensió	200	Suspensió	Ràpida	94,8	0,31
CPME	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-
AcOEt	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-
MeCN	300	Suspensió	200	Suspensió	Ràpida	95,4	n.d

8.5.4.3. SÍNTESI DE 7003_UB-23428

La reacció es va dur a terme en un reactor de 100 mL i seguint el procediment general (*apartat 8.5.4.1*). Els reactius utilitzats van ser **7411_UB-21578-01** (2,01 g, 1,00 eq), **6998_UB-19144-02** (550 mg, 1,12 eq), HOAt (150 mg, 1,20 eq), HATU (385 mg, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (255 mg, 2,14 eq) en DMF (9,5 mL), fent servir DMF (53 mL) com a dissolvent. A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (100 mL) i el sòlid obtingut (2,40 g de **7003_UB-23428-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 201**), determinant-se una puresa cromatogràfica del 91,8 % pel producte **7003** (30,7 min) i 2,0 % pel dipèptid protegit **6998** (18,4 min).

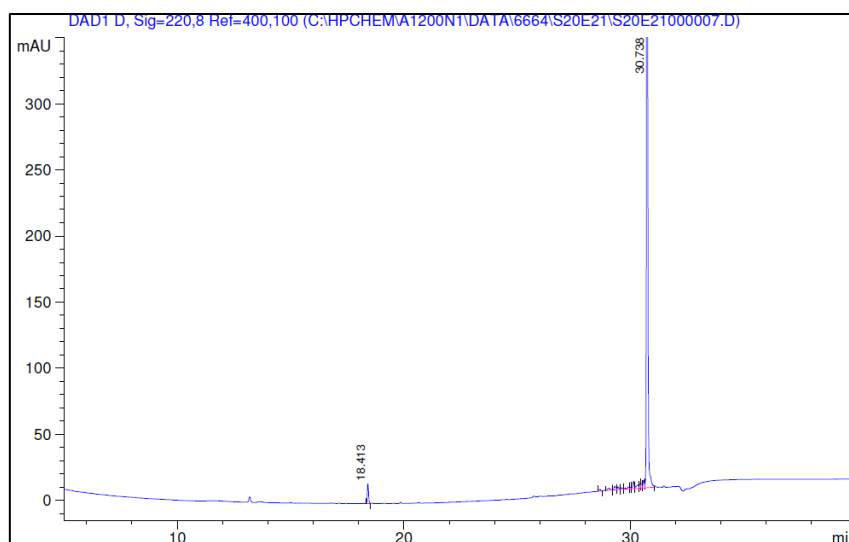


Figura 201. Cromatograma de **7003_UB-23428-01**. (Mètode A, *apartat 8.3.3*).

8.5.4.3.1. PROVES DE PURIFICACIÓ

Prova 1. El sòlid **7003_UB-23428-01** (99 mg) es va introduir en un baló de 5 mL proveït d'agitació magnètica i es va afegir acetona (1 mL). La suspensió es va agitar a 300 rpm durant 1 h i, posteriorment, es va filtrar a pressió reduïda. La filtració de la suspensió va ser lenta i el sòlid obtingut (70 mg de **7003_UB-23428-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 202**), obtenint-se una puresa cromatogràfica del 95,0 % pel producte **7003** (30,8 min). El pic cromatogràfic corresponent al **6998** no es va detectar.

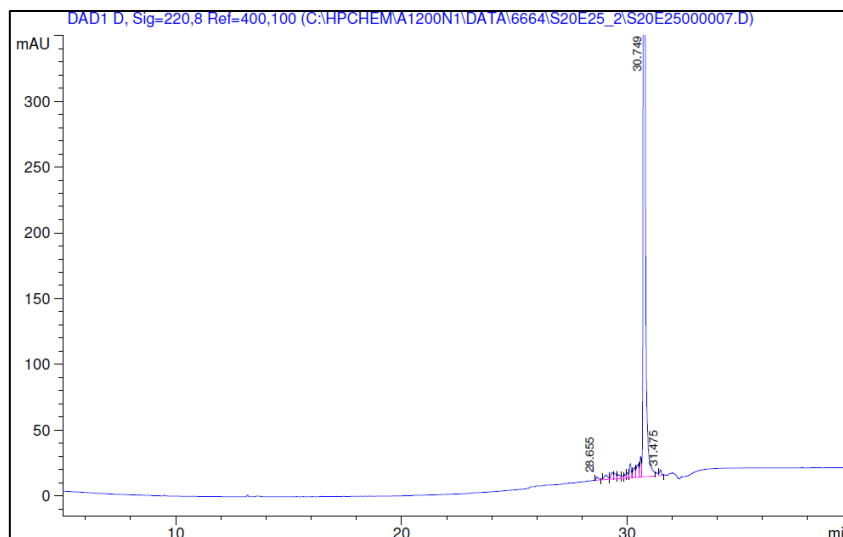


Figura 202. Cromatograma de **7003_UB-23428-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 2. El sòlid **7003_UB-23428-01** (99 mg) es va introduir en un baló de 5 mL proveït d'agitació magnètica i es va afegir MeCN (1 mL). La suspensió es va agitar a 300 rpm durant 1 h i posteriorment, es va filtrar a pressió reduïda. La filtració de la suspensió va ser ràpida i el sòlid obtingut (81 mg de **7003_UB-23428-03**) es va analitzar per HPLC (**Figura 203**), obtenint-se un 94,7 % de puresa cromatogràfica pel producte **7003** (30,7 min). El pic cromatogràfic corresponent al **6998** no es va detectar.

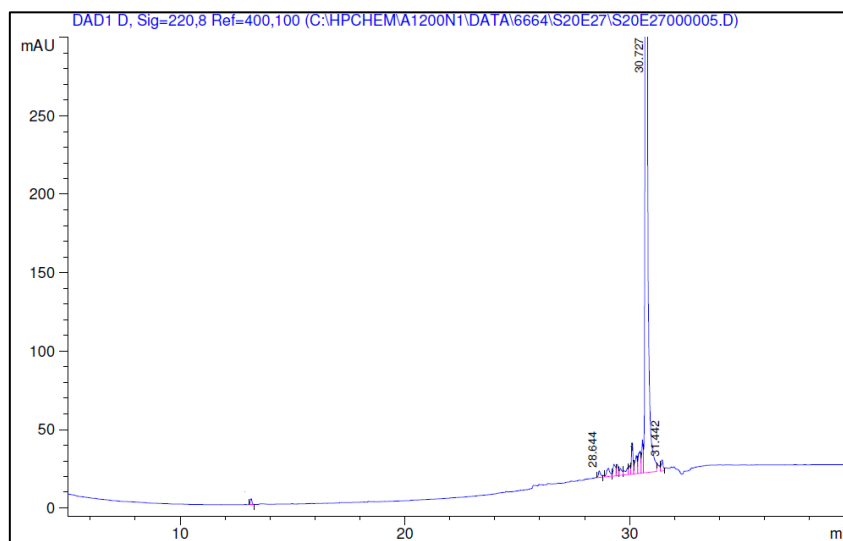


Figura 203. Cromatograma de **7003_UB-23428-03**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.3.2. PURIFICACIÓ

El sòlid **7003_UB-23428-01** (2,02 g) es va introduir en un baló de 50 mL amb agitació magnètica i es va afegir MeCN (20 mL). La suspensió es va agitar a 300 rpm durant 1 h i es va filtrar a pressió reduïda. L'anàlisi per HPLC del sòlid obtingut (1,79 g de **7003_UB-23428-04**) va mostrar una puresa cromatogràfica del 95,1 % pel producte **7003** (30,7 min) i el pic cromatogràfic corresponent al **6998** no es va detectar (**Figura 204**).

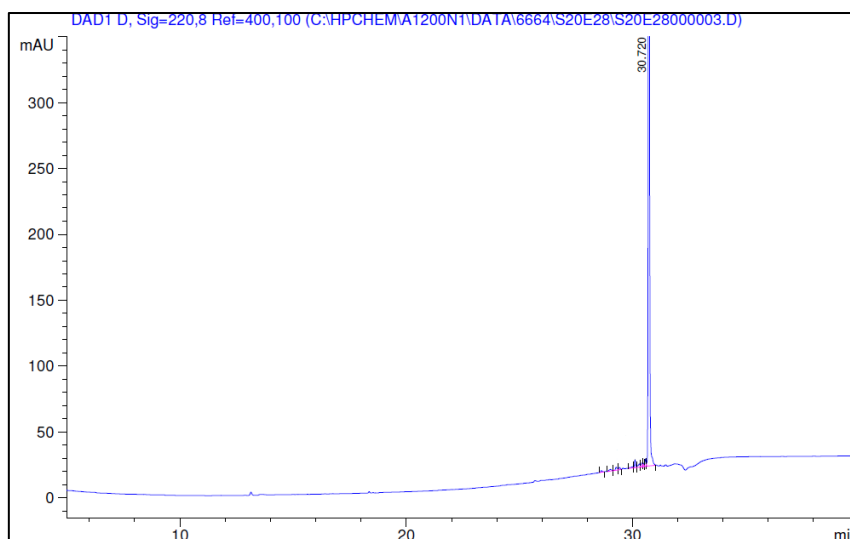


Figura 204. Cromatograma de **7003_UB-23428-04**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.4. SÍNTESI DE **7003_UB-23456**

La reacció es va dur a terme en un reactor de 100 mL i seguint el procediment general (apartat 8.5.4.1). Els reactius utilitzats van ser **7411_UB-21550-01** (1,60 g, 1,00 eq), **6998_UB-19144-02** (430 mg, 1,10 eq), HOAt (116 mg, 1,16 eq), HATU (309 mg, 1,11 eq) i una solució de DIPEA (203 mg, 2,14 eq) en DMF (7,5 mL), fent servir DMF (43 mL) com a dissolvent. A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (80 mL) i el sòlid obtingut (1,71 g de **7003_UB-23456-01**) es va analitzar per HPLC (Figura 205). El producte **7003** va donar una puresa cromatogràfica del 88,2 % (30,1 min), amb un 2,5 % de **6998** (18,0 min).

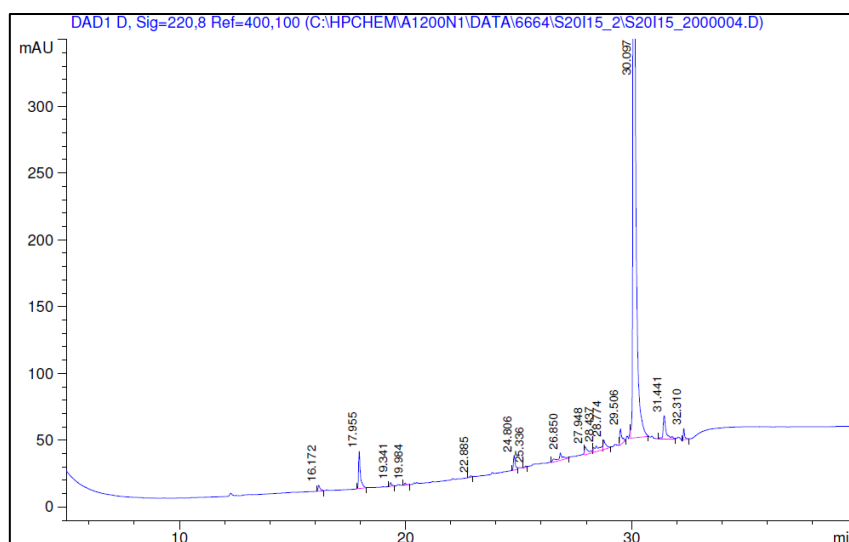


Figura 205. Cromatograma de **7003_UB-23456-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.4.1. PURIFICACIÓ

El sòlid **7003_UB-23456-01** (1,71 g) es va carregar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica i es va afegir MeCN (17 mL). La suspensió es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h i es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut (1,52 g de **7003_UB-23456-02**) es va analitzar per HPLC

(Figura 206) i el producte **7003** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 91,8 % (29,1 min), essent molt minoritària (0,1 %) la presència de **6998** (17,4 min).

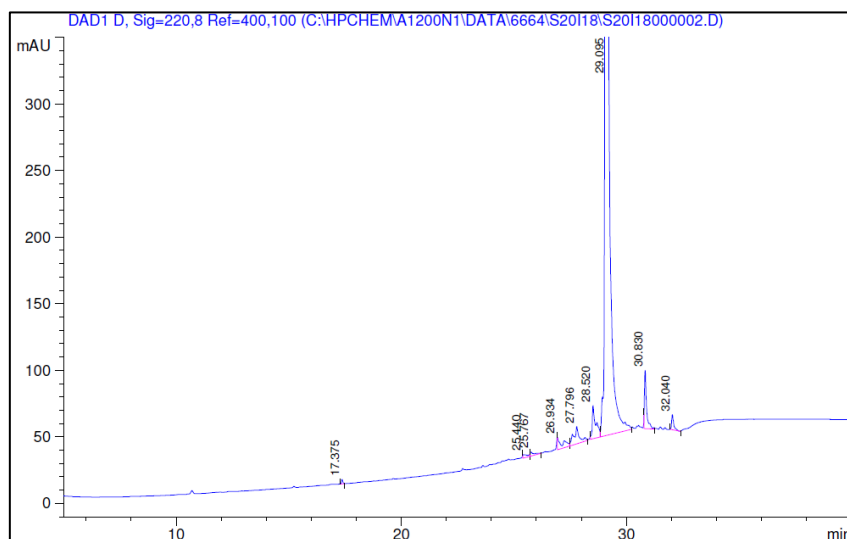


Figura 206. Cromatograma de **7003_UB-23456-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.5. SÍNTESI DE **7003_UB-23457**

La reacció es va dur a terme en un reactor de 100 mL i seguint el procediment general (apartat 8.5.4.1). Els reactius utilitzats van ser **7411_UB-23401-01** (2,01 g, 1,00 eq), **6998_UB-19144-02** (547 mg, 1,12 eq), HOAt (138 mg, 1,10 eq), HATU (384 mg, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (258 mg, 2,17 eq) en DMF (9,3 mL), fent servir DMF (53 mL) com a dissolvent. A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (100 mL) i el sòlid obtingut (2,25 g de **7003_UB-23457-01**) es va analitzar per HPLC (Figura 207). La puresa cromatogràfica del producte **7003** va ser del 79,7 % (30,1 min), amb un 2,0 % de **6998** (18,0 min).

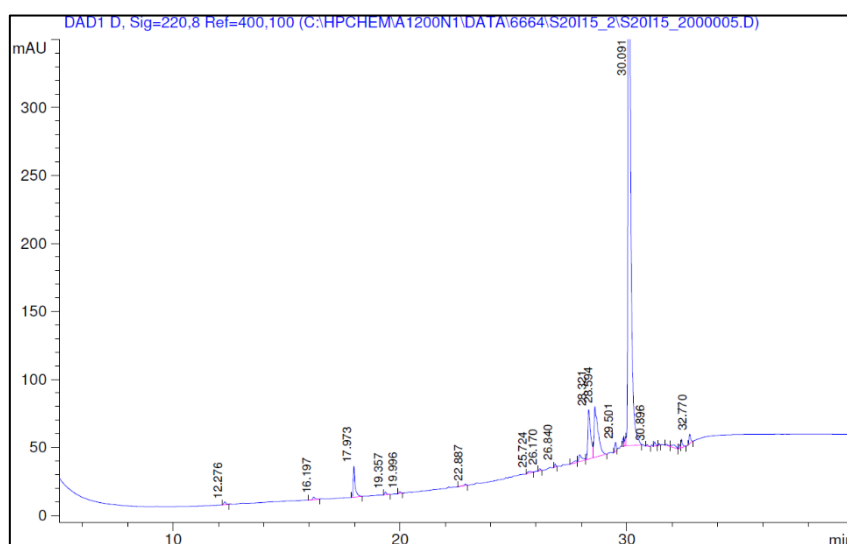


Figura 207. Cromatograma de **7003_UB-23457-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.5.1. PURIFICACIÓ

El sòlid **7003_UB-23457-01** (2,18 g) es va carregar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica i es va afegir MeCN (22 mL). La suspensió es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h i es va filtrar a

pressió reduïda. El sòlid obtingut (2,00 g de **7003_UB-23457-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 208**) i va mostrar el producte **7003** amb una puresa cromatogràfica del 83,4 % (29,1 min). El dipèptid protegit **6998** (17,4 min) va ser pràcticament indetectable (0,06 %).

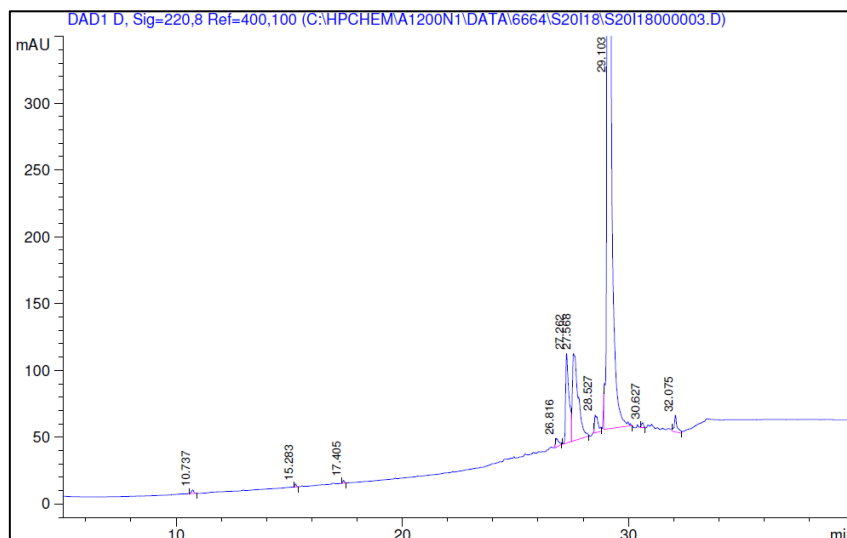


Figura 208. Cromatograma de **7003_UB-23457-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.6. SÍNTESI DE **7003_UB-26908**

La reacció es va dur a terme en un reactor de 500 mL i seguint el procediment general (*apartat 8.5.4.1*). Els reactius utilitzats van ser **7411_UB-23492-01** (5,03 g, 1,00 eq), **6998_UB-23469-02** (1,34 g, 1,09 eq), HOAt (347 mg, 1,11 eq), HATU (961 mg, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (635 mg, 2,13 eq) en DMF (22 mL), fent servir DMF (134 mL) com a dissolvent. A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (200 mL), la suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (5,86 g de **7003_UB-26908-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 209**). El producte **7003** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 96,4 % (29,4 min) i el dipèptid protegit **6998** (17,5 min) amb un 1,4 %.

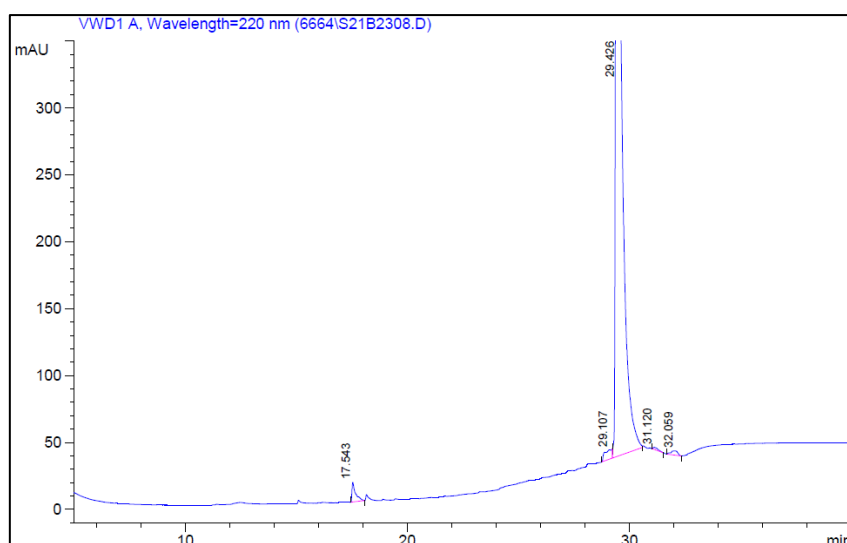


Figura 209. Cromatograma de **7003_UB-26908-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.6.1. PURIFICACIÓ

El sòlid **7003_UB-26908-01** (5,70 g) es va carregar a un baló de 100 mL amb agitació magnètica i es va afegir MeCN (60 mL). La suspensió es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h i es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut (5,09 g de **7003_UB-26908-02**) es va analitzar per HPLC, mostrant el producte **7003** amb una puresa cromatogràfica del 98,1 % (29,4 min) i el pic cromatogràfic corresponent al **6998** no es va detectar (**Figura 210**).

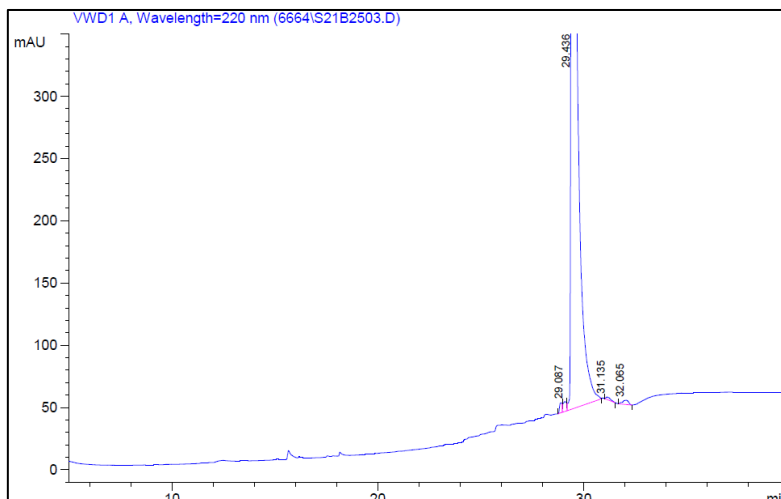


Figura 210. Cromatograma de **7003_UB-26908-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.7. SÍNTESI DE **7003_UB-26927**: MAJOR ESCALA

La reacció es va dur a terme en un reactor de 2 L amb clau de descàrrega i seguint el procediment general (*apartat 8.5.4.1*). Els reactius utilitzats van ser **7411_UB-23492-01** (23,4 g, 1,00 eq), **6998_UB-23469-02** (6,23 g, 1,09 eq), HOAt (1,61 g, 1,10 eq), HATU (4,49 g, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (2,91 g, 2,10 eq) en DMF (105 mL), utilitzant com a dissolvent DMF (630 mL). A les 4 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (900 mL), la suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (29,3 g de **7003_UB-26927-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 211**). El producte **7003** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 83,4 % (28,7 min), acompanyat d'un 6,7 % de **6998** (17,0 min).

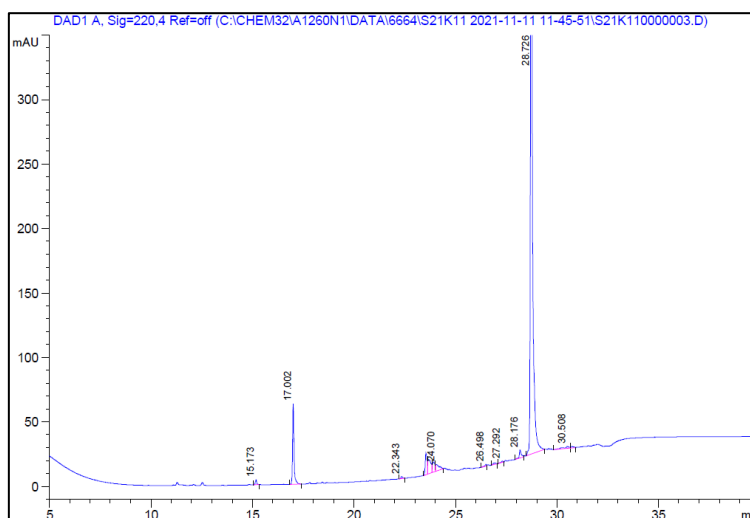


Figura 211. Cromatograma de **7003_UB-26927-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.4.7.1. PURIFICACIÓ

El sòlid **7003_UB-26927-01** (29,0 g) es va carregar a un reactor de vidre de 100 mL amb agitació mecànica i pales de tefló abatibles, es va afegir MeCN (300 mL), la suspensió resultant es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h i es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut (24,3 g de **7003_UB-26927-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 211**), obtenint-se una puresa cromatogràfica del 97,6 % pel producte **7003** (28,8 min) i del 0,2 % pel dipèptid protegit **6998** (17,0 min).

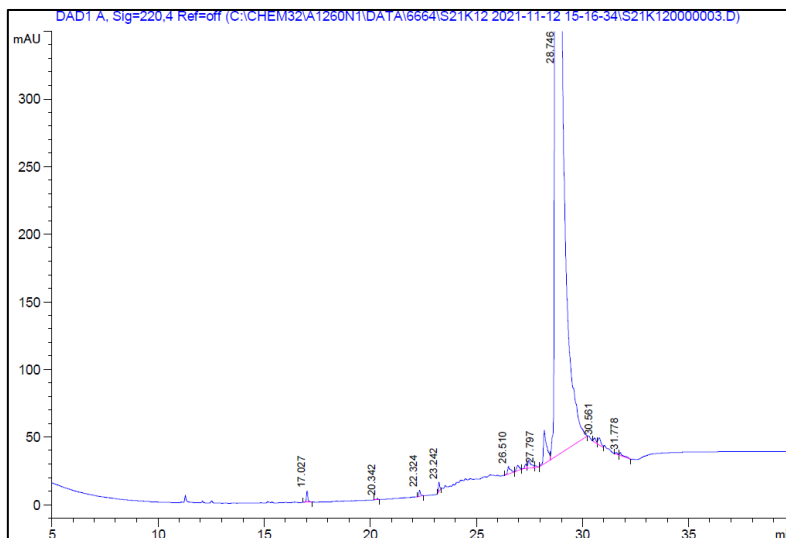
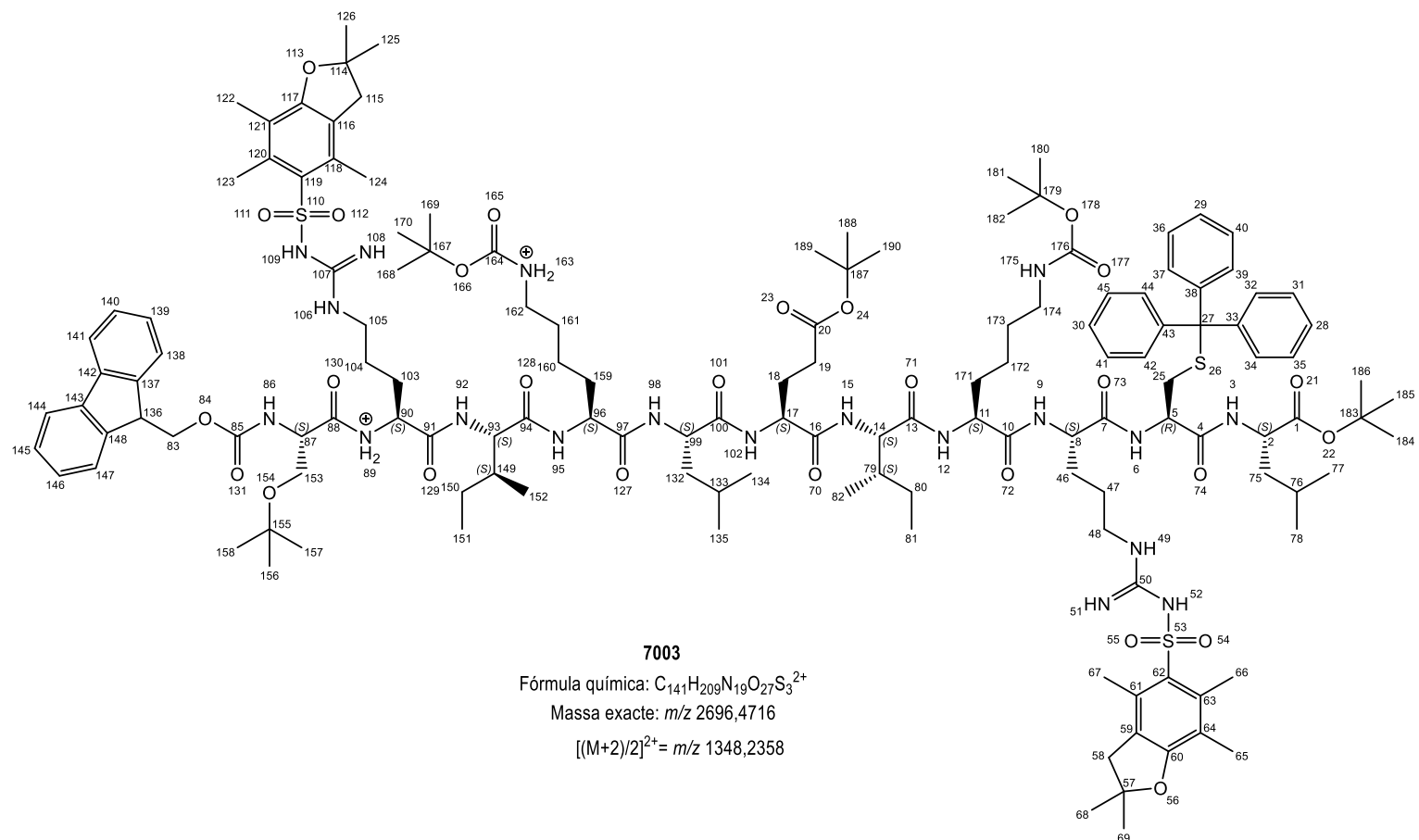


Figura 212. Cromatograma de **7003_UB-26927-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.5. CARACTERITZACIÓ DE 7003



8.5.5.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

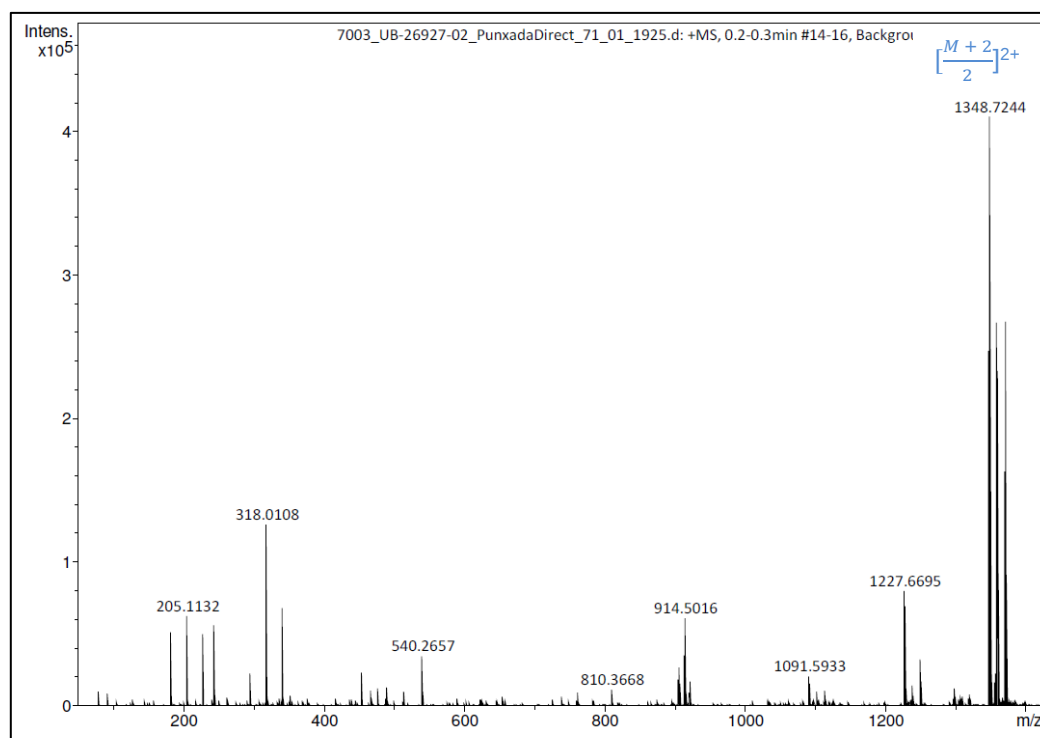


Figura 213. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7003_UB-26927-02.

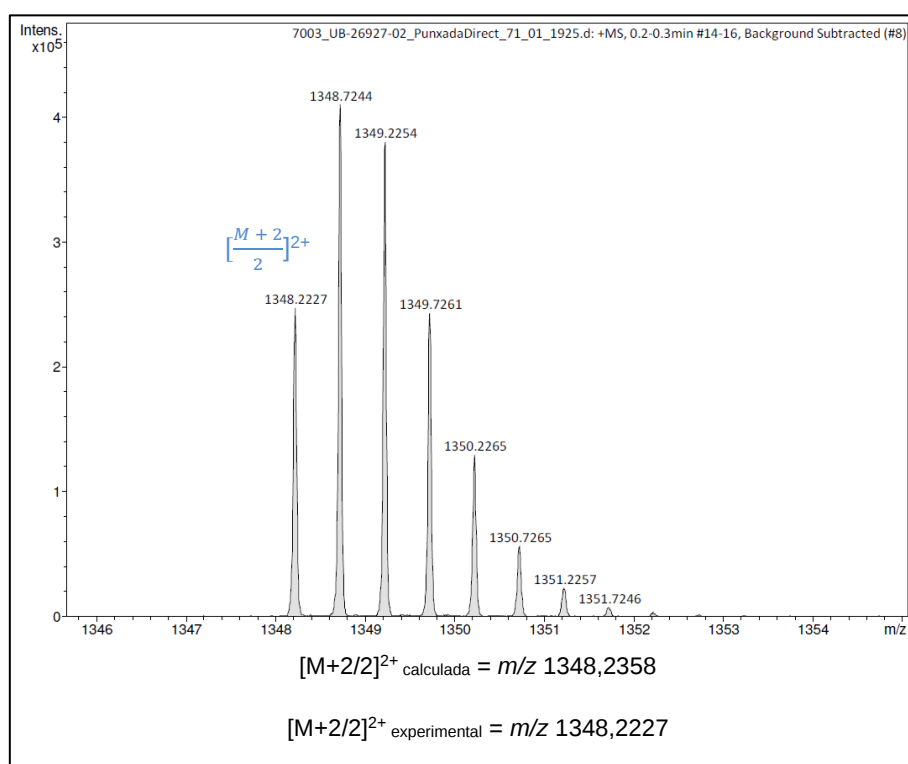
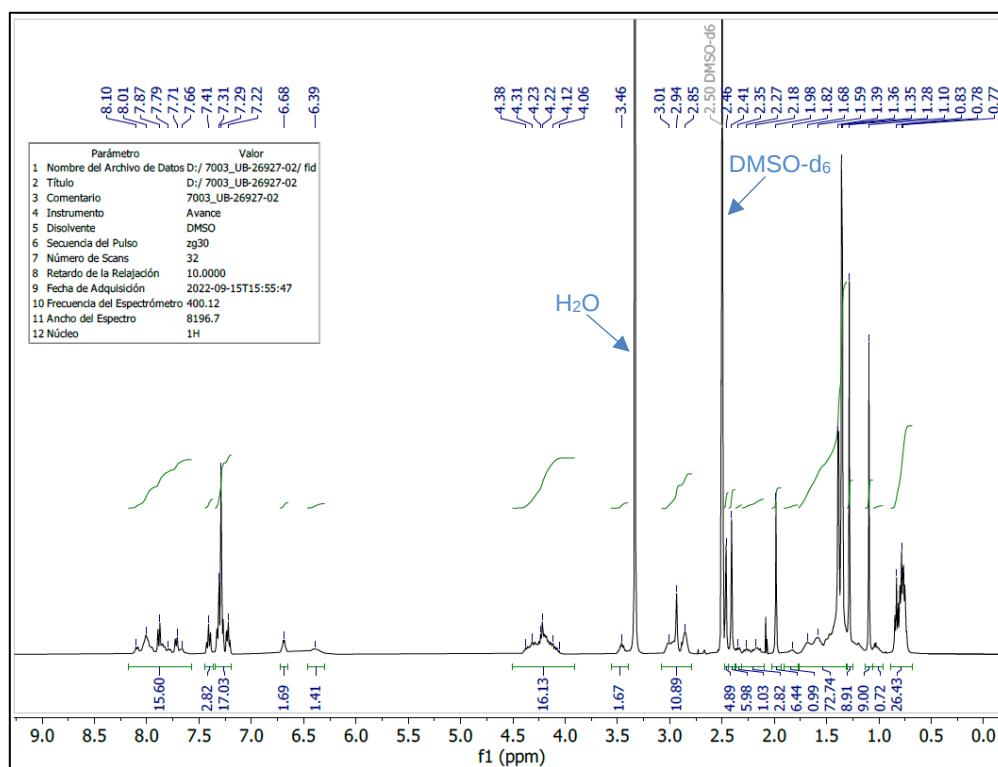
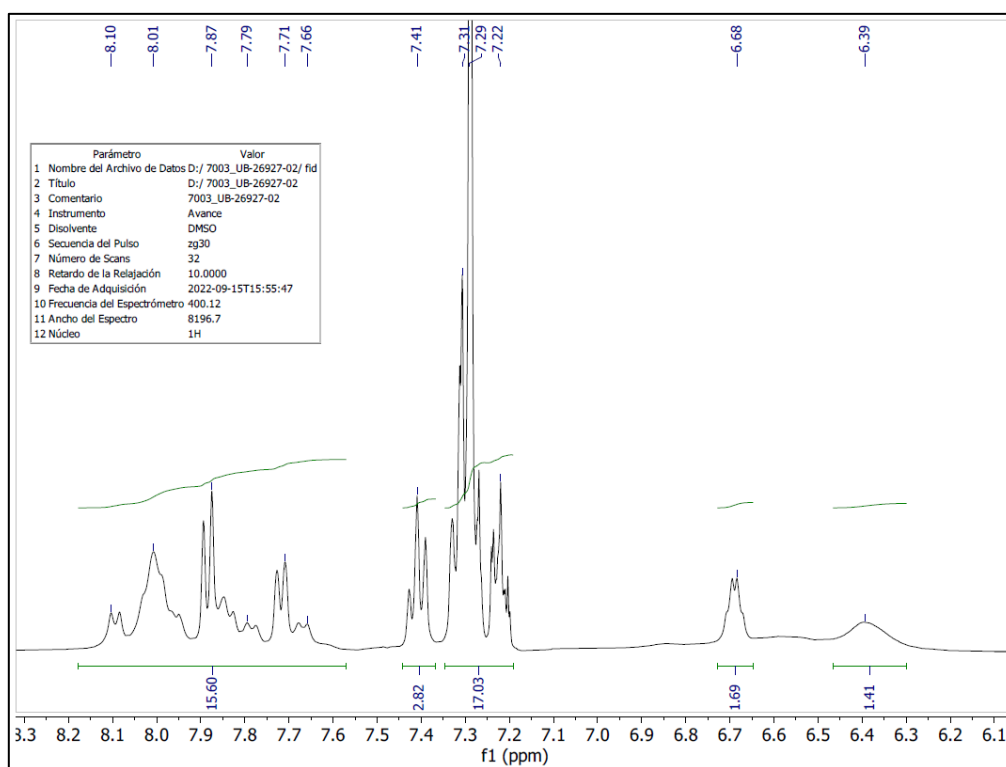


Figura 214. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7003_UB-26927-02.

8.5.5.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.5.5.2.1. ESPECTRES DE ^1H -RMNFigura 215. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 7003_UB-26927-02.Figura 216. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 7003_UB-26927-02.

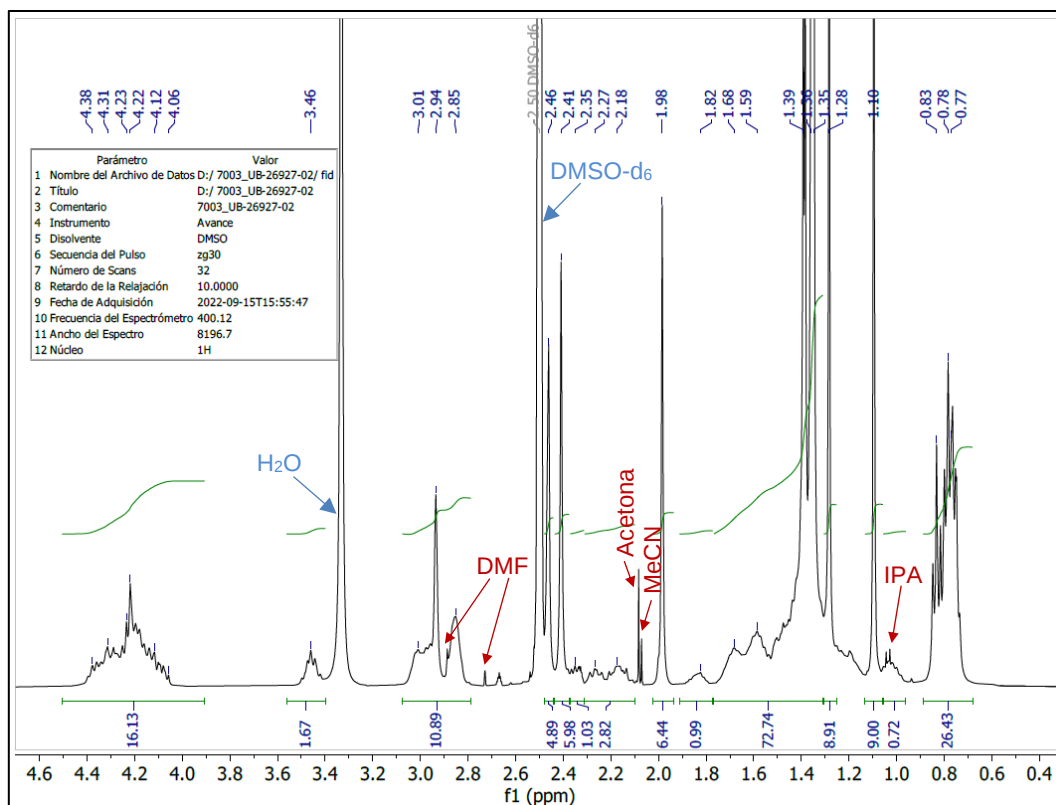


Figura 217. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **7003_UB-26927-02**.

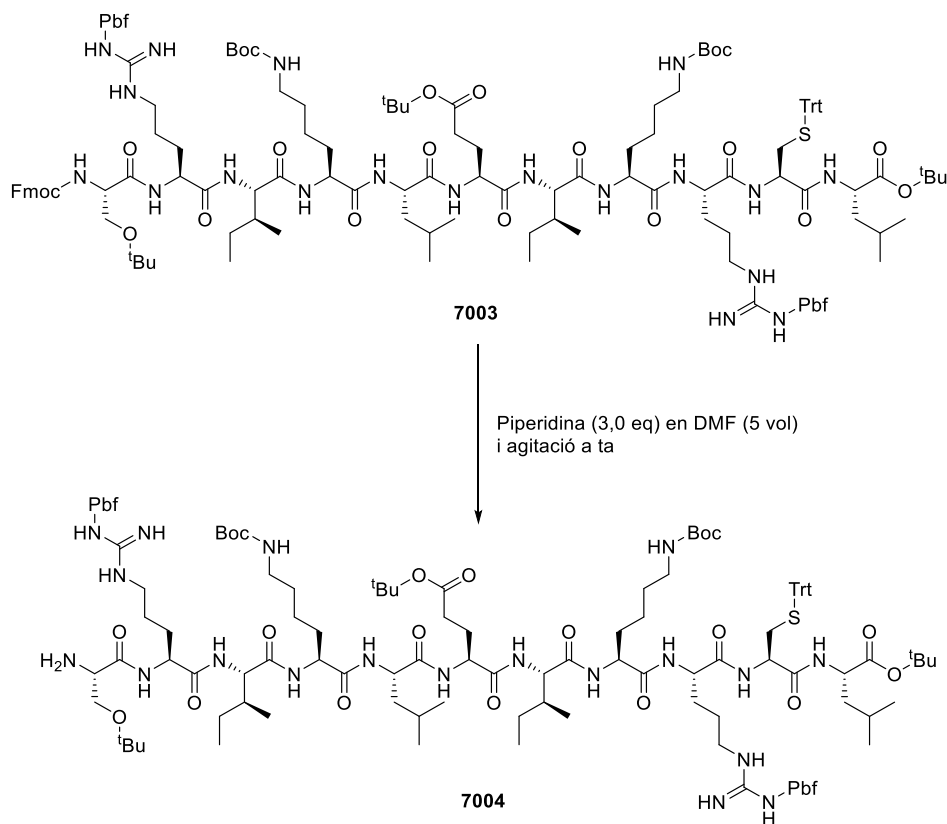
Taula 85. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO-d_6 de **7003_UB-26927-02**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Constant d'acoblament (Hz)	Integral	REGIÓ	ASSIGNACIÓ
8,10 – 7,60	multiplet	-	10 (16)	NH Amides peptídiques	H3+H6+H9+H12+H 15+H89+H92+H95 +H98+H102
7,87	d	7,4	2 (16)	Haromàtic Fmoc	H141+H144
7,79	d	8,1	1 (16)	NH Guanidina	H109 / H108 / H106 / H49 / H51 / H52
7,71	d	7,5	2 (16)	Haromàtic Fmoc	H138+H147
7,66	d	8,1	1 (16)	NH Guanidina	H109 / H108 / H106 / H49 / H51 / H52
7,41	multiplet	-	3	Haromàtic Fmoc	H139+H112
				NH Amides peptídiques	H86
7,35 – 7,20	multiplet	-	17	Haromàtic Fmoc	H140+H145
				Haromàtic Trt	H39+H40+H29+H3 6+H37+H32+H31+ H28+H35+H34+H4 4+H45+H30+H41+ H42

6,68	multiplet	-	2	NH Guanidina	H109 / H108 / H106 / H49 / H51 / H52
6,39	broad signal	-	2	NH Guanidina	
4,40 – 4,00	multiplet	-	16	CH Cadena peptídica	H87+H90+H93+H9 6+H99+H17+H14+ H11+H8+H5+H2
				NH Carbamat	H163+H175
				CH ₂ i CH Fmoc	H83 (CH ₂) + H136 (CH)
3,46	multiplet	-	2	CH ₂	H153
3,10 – 2,80	multiplet	-	10	CH ₂	H105+H162+H19+ H174+H48
2,46	s	-	6	CH ₃ Pbf	H123+H66
2,41	s	-	6	CH ₃ Pbf	H122+H65
2,35	multiplet	-	1	CH ₂	H25+H25'
2,27	multiplet	-	1		
2,18	multiplet	-	2		
1,98	s	-	6	CH ₃ Pbf	H124+H67
1,82	multiplet	-	1	CH ₂	H115' / H58'
1,80 – 1,00	m	-	31	CH ₂	H103+H104+H159 +H160+H161+H18 +H171+H172+H17 3+H46+H47+H75+ H132 H115' / H58'
				CH	H149+H133+H79+ H76
1,40 – 1,30	m	-	41	CH ₃ ^t Bu	H168+H169+H1170 +H188+H189+H19 0+H180+H181+H1 82
				CH ₃	H126+H125+H68+ H69
				CH ₂	H80'+H150'
1,28	s	-	9	CH ₃ ^t Bu	H186+H185+H184
1,10	s	-	9	CH ₃ ^t Bu	H156+H157+H158
0,9 – 0,7	m	-	26	CH ₃	H151+H152+H135 +H134+H82+H81+ H77+78
				CH ₂	H80+H150

8.5.6. SÍNTESI DE 7004

8.5.6.1. PROCEDIMENT GENERAL

Esquema 69. Esquema de la síntesi del fragment peptídic **7004**.

En un reactor de volum adequat per a cada escala de síntesi, i proveït d'agitació magnètica o d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles, es va carregar el fragment peptídic **7003** i es va tractar amb una base en un determinat dissolvent, segons la prova realitzada. La reacció es va monitoritzar per HPLC mitjançant l'anàlisi d'una alíquota del cru (50 µL del cru en 10 mL DMF) cada 30 min, fins que el pic cromatogràfic corresponent al **7003** no es va detectar. Un cop comprovat el final de la reacció, es va dur a terme el tractament del cru de reacció per obtenir el sòlid desitjat **7004**. El sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit a 40 °C fins a pes constant. En els següents apartats s'indica la base i el dissolvent utilitzats per a cada prova, les quantitats de reactius, el tractament del cru dut a terme per a cada síntesi, els grams de producte obtinguts i la puresa cromatogràfica del producte desitjat.

8.5.6.2. SÍNTESI DE 7004_UB-23431

En un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica, es va carregar el sòlid **7003_UB-23428-04** (801 mg, 1,00 eq) i es va afegir DMF (4 mL). La mescla es va agitar a 800 rpm durant 10 min (dissolució tèrbola) i es va carregar una solució de piperidina (110 mg, 4,35 eq) en DMF (500 µL). La dissolució va esdevenir groga transparent i, passats 30 min de reacció, el cru es va transvasar a un reactor de vidre de 100 mL amb agitació mecànica i pala de tefló abatible. Es va addicionar H₂O al cru (80 mL) en 30 min a 5 °C i la suspensió resultant es va agitar a 200 rpm durant 1,5 h a aquesta temperatura. A continuació, la suspensió es va intentar filtrar a pressió reduïda però la filtració va resultar molt lenta i es va haver d'aturar. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda

escalfant el bany a 40 °C fins obtenir un oli que es va carregar al reactor altra vegada, es va agitar a 800 rpm i es va addicionar H₂O (10 mL) en 10 min. La suspensió resultant es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (435 mg de **7004_UB-23431-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 218**). El producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 76,2 % (27,2 min), amb la presència d'un 18,2 % de DBF (16,7 min).

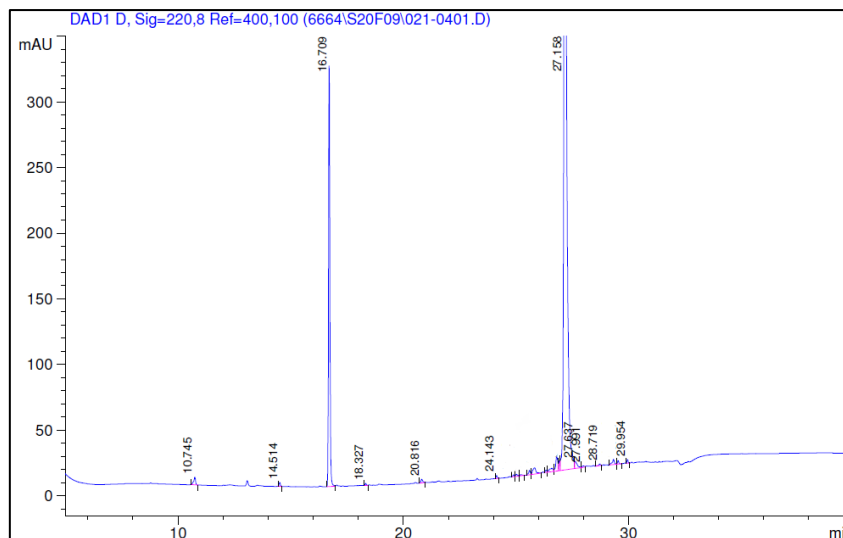


Figura 218. Cromatograma de **7004_UB-23431-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.6.2.1. PROVES DE PURIFICACIÓ

Les proves per purificar l'intermedi peptídic **7004** es van realitzar amb el sòlid **7004_UB-23431-01** (50 mg) en tubs d'assaig proveïts d'agitació magnètica. Es va provar la solubilitat del sòlid amb 8 dissolvents diferents (**Taula 86**), afegint 6 volums del dissolvent (300 µL) al sòlid amb una micropipeta de capacitat 100-1000 µL i agitant la mescla durant 5 min. Al no aconseguir-se en aquestes condicions una dissolució completa del sòlid, es van afegir 4 volums més de dissolvent (200 µL) i les proves que van passar a ser una dissolució completa es van descartar. En les proves que es va observar una suspensió, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va analitzar per HPLC.

Taula 86. Proves de purificació del sòlid **7004_UB-23431-01**.

Dissolvent	Volum afegit (µL)	Aspecte	Volum afegit (µL)	Aspecte	Filtració	% A HPLC	
						7004	DBF
7004_UB-23431-01						76,1	18,2
Acetona	300	Sòlid gomós	200	Sòlid gomós	Molt lenta	83,6	1,6
MeOH	300	Suspensió densa	200	Suspensió densa	Lenta	93,2	0,3
TBME	300	Sòlid que diposita	200	Sòlid que diposita	Ràpida	92,9	1,1
Toluè	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-
Heptà	300	Suspensió densa	200	Sòlid que diposita	Ràpida	92,5	1,1
2-MeTHF	300	Sòlid gomós	200	Dissolució	-	-	-

Dissolvent	Volum afegit (μL)	Aspecte	Volum afegit (μL)	Aspecte	Filtració	% A HPLC	
						7004	DBF
IPA	300	Suspensió densa	200	Suspensió	Lenta	93,5	1,0
MeCN	300	Suspensió densa	200	Suspensió	Lenta	95,6	n.d

8.5.6.3. SÍNTESI DE 7004_UB-23453

En un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica, es va carregar el sòlid **7003_UB-23428-04** (403 mg, 1,00 eq) i es va afegir DMF (2 mL). La mescla es va agitar a 400 rpm durant 10 min (dissolució amb partícules en suspensió) i, a continuació, es va carregar 4-AMP (89 mg, 5,22 eq). La dissolució va esdevenir groga transparent i, passats 35 min de reacció, va precipitar un sòlid. A les 4 h de reacció, el cru es va transvasar a un reactor de vidre de 100 mL amb agitació mecànica i pales de tefló abatibles, i es va afegir AcOEt (40 mL). La mescla es va agitar a 200 rpm i es va introduir CO₂ amb un flux continu durant 35 min, detectant-se canvis en la temperatura interna de la suspensió (T inicial: 19,5 °C, T a 10 min: 22,5 °C, T a 30 min: 19,4 °C). A continuació, la temperatura externa es va refredar a 5 °C i la mescla es va agitar durant 1 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda, procés que va resultar lent. La dissolució es va concentrar a pressió reduïda fins a uns 25 mL i la suspensió resultant es va carregar a un reactor de 50 mL proveït d'agitació magnètica. Es va carregar a la suspensió 4-AMP (85 mg, 4,98 eq) i la mescla es va agitar a 800 rpm durant 1 h. El CO₂ es va introduir a la suspensió durant 30 min i, a continuació, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. La dissolució obtinguda es va tenir en la nevera tot el cap de setmana i es va observar com va precipitar un sòlid. La suspensió es va filtrar i el sòlid obtingut (52 mg de **7004_UB-23453-03**) es va analitzar per HPLC (**Figura 219**). El producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 66,3 % (26,6 min) acompanyat d'un 21,1 % de DBF (16,3 min) i un 4,0 % d'adducte de FM-AMP (8,3 min).

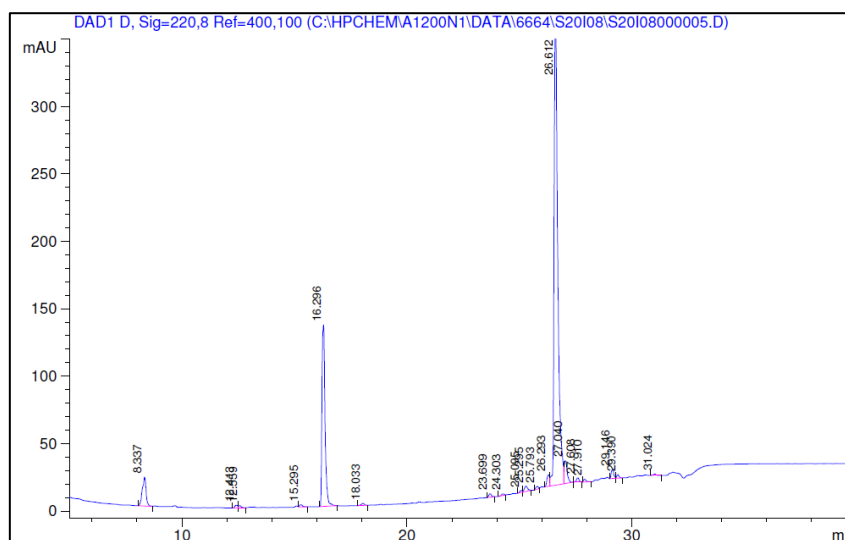


Figura 219. Cromatograma de **7004_UB-23453-03**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.6.4. SÍNTESI DE 7004_UB-23461

El sòlid **7003_UB-23456-02** (1,00 g, 1,00 eq) es va carregar en un baló de 10 mL amb agitació magnètica i es va dissoldre en DMF (4 mL). La mescla es va agitar a 800 rpm i es va afegir una

solució de piperidina (105 mg, 3,33 eq) en DMF (900 µL). A les 3 h de reacció, el cru es va dividir en fraccions per dur a terme diferents proves de tractament del cru de reacció.

Prova 1. Una alíquota del cru (1 mL) es va transvasar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica i es va afegir AcOEt (5 mL) i una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (5 mL). La mescla es va agitar a 600 rpm durant 30 min i es va transvasar a un embut de decantació, on les fases es van separar. En el segon rentat de la fase orgànica amb una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (5 mL) es va observar una emulsió en la interfase i una fase orgànica amb un sòlid gomós, que obturava l'embut de decantació. No es van poder separar les fases i el dissolvent orgànic es va evaporar a pressió reduïda fins a 3 mL, quedant el sòlid en suspensió en la fase aquosa. La suspensió es va transvasar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica, es va carregar MeCN (15 mL) i la mescla es va agitar a 600 rpm durant 12 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida) i el sòlid obtingut (77 mg de **7004_UB-23461-P1-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 220**). El producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 91,3 % (25,3 min).

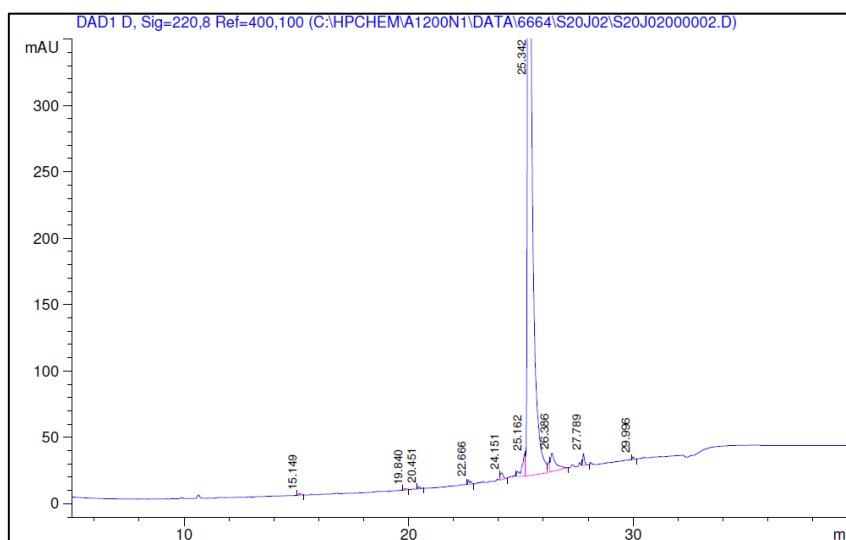


Figura 220. Cromatograma de **7004_UB-23461-P1-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 2. Una alíquota del cru (1 mL) es va transvasar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica i es va afegir 2-MeTHF (5 mL) i una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (5 mL). La mescla es va agitar a 600 rpm durant 30 min, es va transvasar a un embut de decantació i les fases es van separar. Es va dur a terme un altre tractament de la fase orgànica amb la dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (5 mL, 1 x 15 min), la mescla es va enterbolir i es va afegir més 2-MeTHF (30 mL). Les fases es van separar, la fase orgànica resultant es va assecar amb Na_2SO_4 anh, la suspensió es va filtrar i la dissolució del cru es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 1 mL. El cru es va transvasar a un reactor de 50 mL proveït d'agitació magnètica, es va addicionar MeCN (12 mL) en 10 min i va precipitar un sòlid gomós. La suspensió es va agitar a 600 rpm durant 3 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració molt lenta). El sòlid obtingut (11 mg de **7004_UB-23461-P2-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 221**), resultant una puresa cromatogràfica del 95,5 % pel producte **7004** (25,5 min).

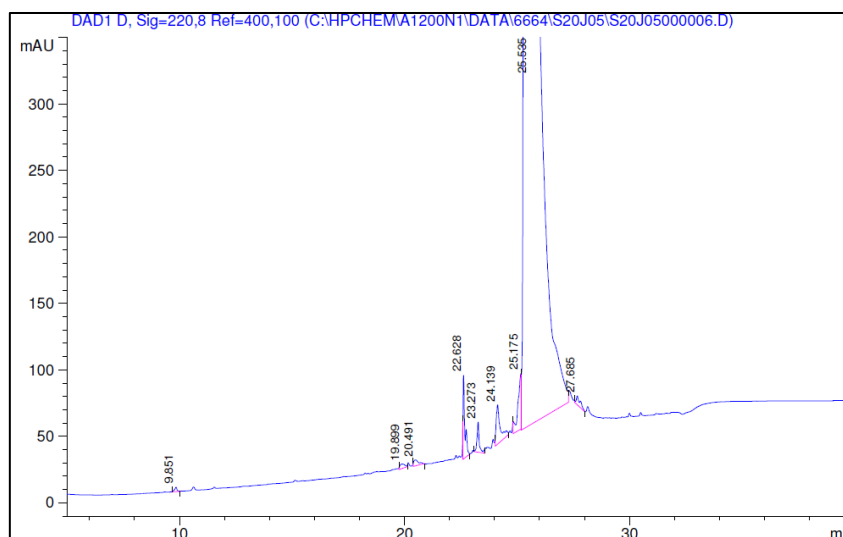


Figura 221. Cromatograma de **7004_UB-23461-P2-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 3. Una alíquota del cru (1 mL) es va transvasar a un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va afegir AcOEt (5 mL) i una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (5 mL). La mescla es va agitar a 600 rpm durant 30 min, es va transvasar a un embut de decantació i les fases es van separar. Al resultar una fase orgànica molt viscosa, es va diluir amb AcOEt (5 mL), es va assecar amb Na_2SO_4 anh, la suspensió es va filtrar i la dissolució del cru es va concentrar a pressió reduïda en el rotavapor fins a 0,5 mL. L'oli resultant es va transvasar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica i es va afegir MeCN (5 mL) al cru en 10 min. Al rascar les parets del reactor, va precipitar un sòlid i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (61 mg de **7004_UB-23461-P3-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 222**) i el producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 85,7 % (25,0 min).

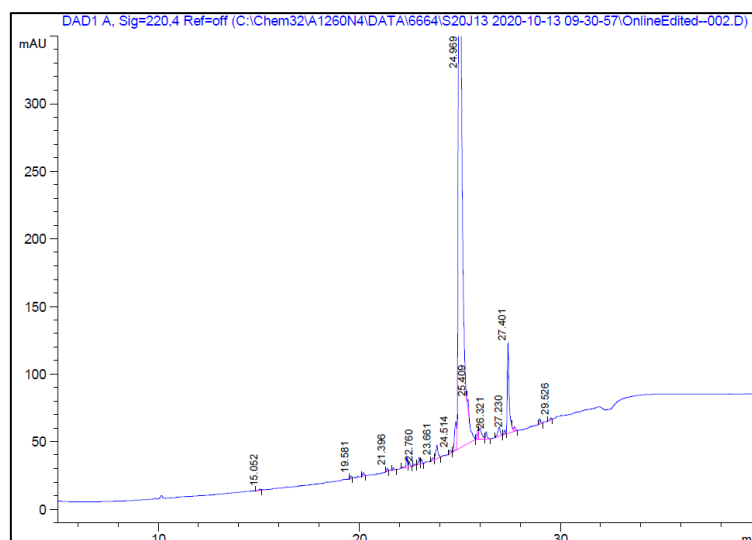


Figura 222. Cromatograma de **7004_UB-23461-P3-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 4. Una alíquota del cru (1 mL) es va transvasar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica i es va addicionar una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (1 mL) en 3 min. Un sòlid va precipitar i la suspensió es va agitar a 600 rpm durant 30 min. Es va addicionar MeCN (2 mL) a la suspensió en 5 min, la mescla es va agitar durant 1 h i la suspensió es va filtrar

a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (137 mg de **7004_UB-23461-P4-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 223**), obtenint-se una puresa cromatogràfica del 85,5 % pel producte **7004** (25,0 min).

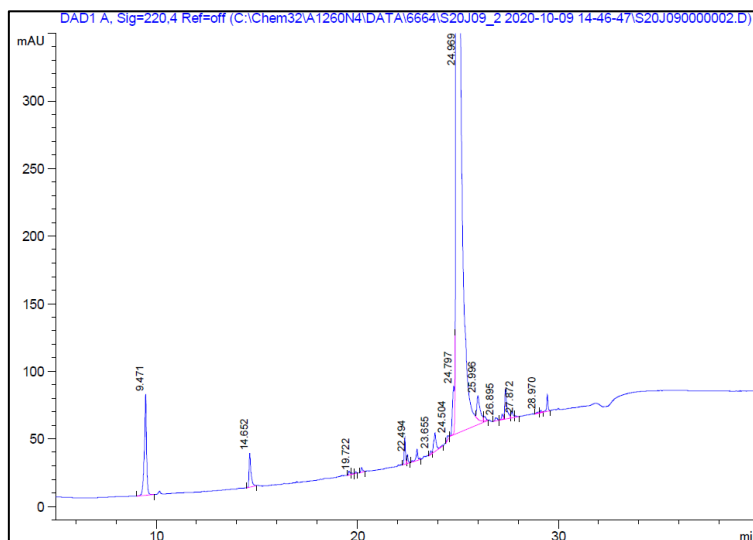


Figura 223. Cromatograma de **7004_UB-23461-P4-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 5. Una alíquota del cru (2 mL) es va transvasar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica i es va addicionar MeCN (4 mL) al cru en 5 min. La solució es va enterbolir però no es va observar precipitat. A continuació, es va addicionar una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (4 mL) en 2 min i va precipitar un sòlid. La suspensió es va agitar durant 2 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut (252 mg de **7004_UB-23461-P5-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 224**) i el producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 91,7 % (25,0 min).

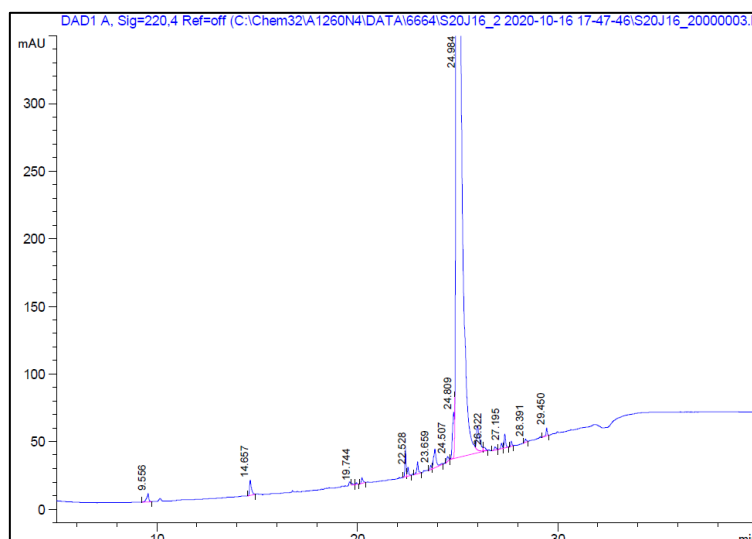


Figura 224. Cromatograma de **7004_UB-23461-P5-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.6.5. SÍNTESI DE **7004_UB-23465**

El sòlid **7003_UB-23457-02** (1,50 g, 1,00 eq) es va carregar en un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va dissoldre en DMF (6 mL). La mescla es va agitar a 800 rpm i es va afegir una

solució de piperidina (150 mg, 3,17 eq) en DMF (1 mL). A les 2 h de reacció, el cru es va dividir en fraccions per dur a terme diferents proves de tractament del cru de reacció.

Prova 1. Una alíquota del cru (3 mL) es va transvasar a un baló de 10 mL amb agitació magnètica i es va addicionar una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (3 mL) en 2 min. Un sòlid va precipitar i la suspensió es va agitar a 800 rpm durant 2 h. Passat el temps, es va addicionar MeCN (30 mL) a la suspensió, la mescla es va agitar durant 2 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (65 mg de **7004_UB-23465-P1-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 225**) i es va determinar pel producte **7004** una puresa cromatogràfica del 77,8 % (25,0 min).

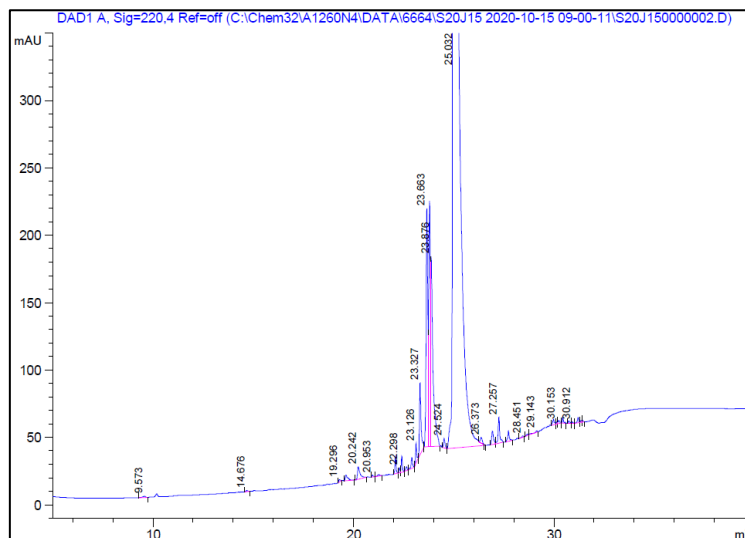


Figura 225. Cromatograma de **7004_UB-23465-P1-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 2. Una alíquota del cru (3 mL) es va transvasar a un baló de 10 mL amb agitació magnètica i es va addicionar MeCN (6 mL) en 5 min. La dissolució es va enterbolir, però no es va observar la precipitació de cap sòlid. Passada 1 h d'agitació, es va addicionar una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3 (3 mL) al cru en 2 min, un sòlid va precipitar i la suspensió es va agitar a 800 rpm durant 2 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (416 mg de **7004_UB-23465-P2-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 226**). El producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 80,9 % (25,0 min).

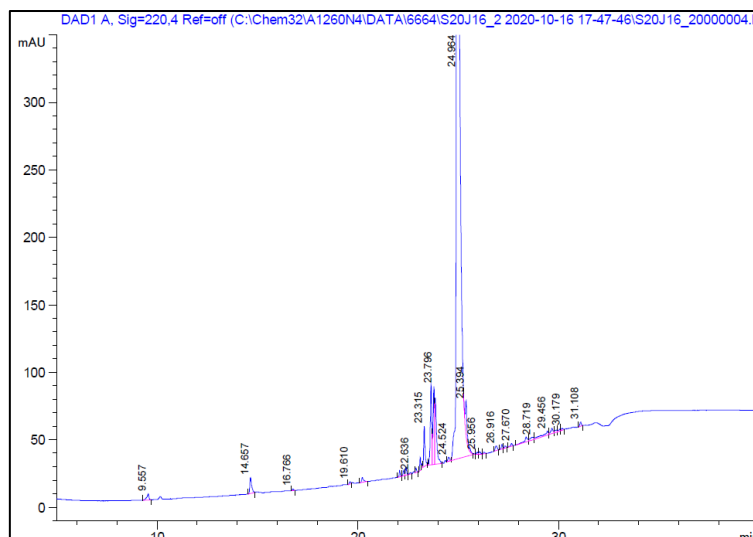


Figura 226. Cromatograma de 7004_UB-23465-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.6.6. SÍNTESI DE 7004_UB-26910

El sòlid **7003_UB-26908-02** (1,02 g, 1,00 eq) es va carregar en un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va dissoldre en DMF (4 mL). La mescla es va agitar a 600 rpm i es va afegir una solució de piperidina (38 mg, 1,18 eq) en DMF (1 mL). A les 2 h de reacció, el cru es va dividir en diferents fraccions per dur a terme proves de tractament del cru de reacció.

Prova 1. Una alíquota del cru (1,5 mL) es va transvasar a un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va addicionar H₂O (1 mL) en 2 min. Un sòlid que no dipositava al parar l'agitació va precipitar i la suspensió es va agitar a 800 rpm durant 12 h. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (207 mg de **7004_UB-26910-P1-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 227**). La puresa cromatogràfica del producte **7004** va ser del 80,9 % (25,7 min), detectant-se DBF (15,6 min) en un 13,7 % i FM-pip (10,0 min) en un 3,8 %.

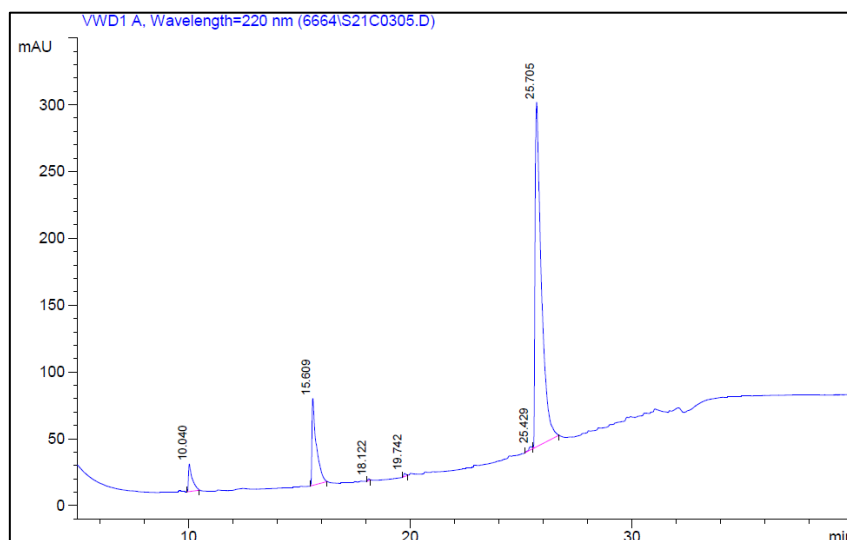


Figura 227. Cromatograma de 7004_UB-26910-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

El sòlid **7004_UB-26910-P1-01** (200 mg) es va carregar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica i es va carregar MeCN (2 mL). La suspensió es va agitar a 600 rpm durant 5 h i es va

filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (170 mg de **7004_UB-26910-P1-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 228**) i el producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 97,9 % (25,8 min).

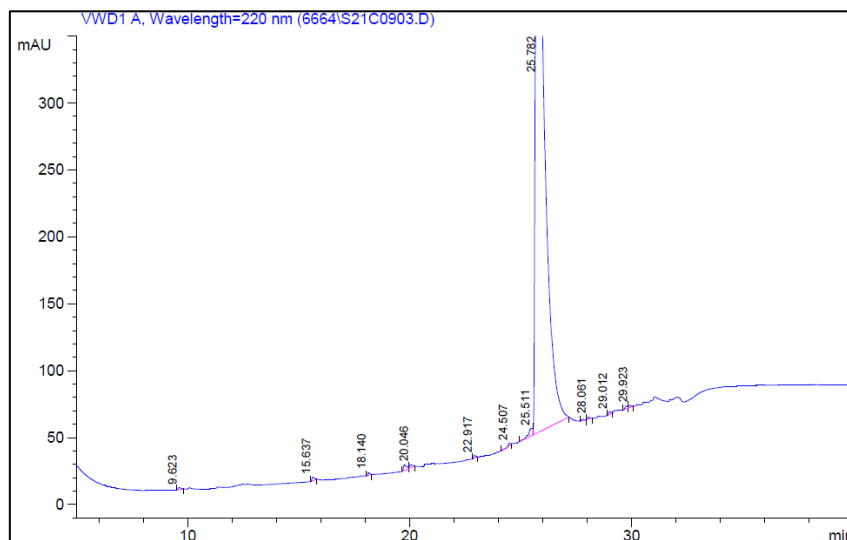


Figura 228. Cromatograma de **7004_UB-26910-P1-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 2. Una alíquota del cru (1,5 mL) es va transvasar a un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va addicionar TBME (7 mL) en 10 min. Es va observar la decantació d'un oli i la suspensió es va agitar a 800 rpm durant 48 h. Un sòlid havia precipitat i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (58 mg de **7004_UB-26910-P2-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 229**) i el producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 87,8 % (25,7 min). Els subproductes DBF (15,6 min) i FM-pip (10,0 min) es van detectar en un 9,5 % i un 1,0 %, respectivament.

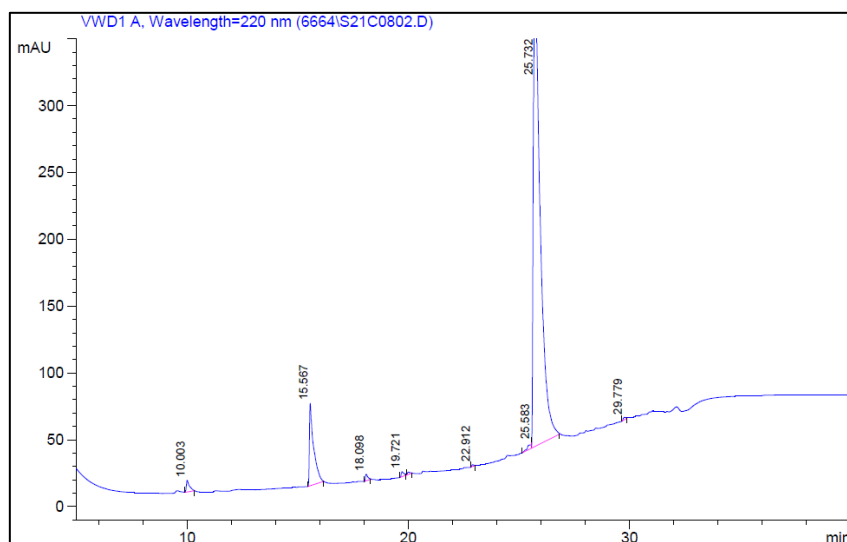


Figura 229. Cromatograma de **7004_UB-26910-P2-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 3. Una alíquota del cru (1,5 mL) es va transvasar a un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va addicionar MeCN (5 mL) en 10 min. La dissolució es va enterbolir i la mescla es va deixar en agitació a 800 rpm durant 12 h. Al dia següent, es va observar un sòlid i la

suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (20 mg de **7004_UB-26910-P3-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 230**) i es va determinar una puresa cromatogràfica del 84,5 % pel producte **7004** (25,7 min).

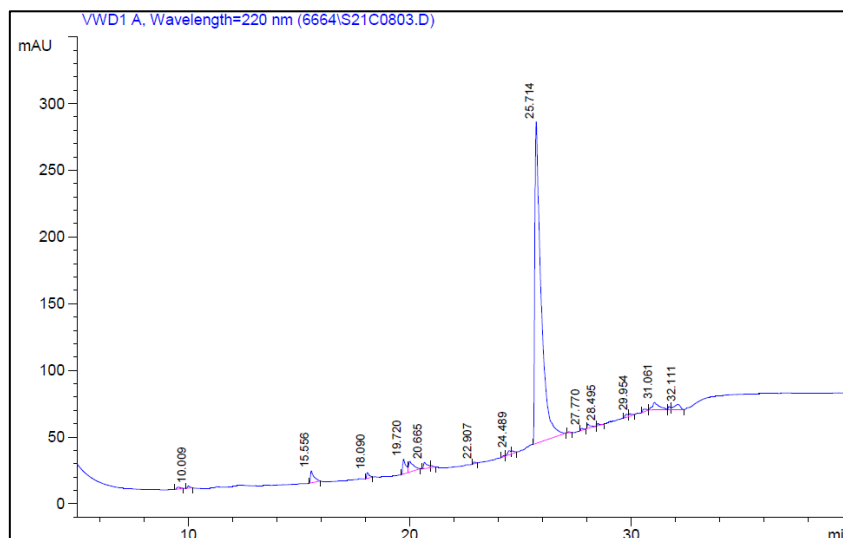


Figura 230. Cromatograma de **7004_UB-26910-P3-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

Prova 4. Una alíquota del cru (1,5 mL) es va transvasar a un baló de 20 mL amb agitació magnètica i es va addicionar una dissolució aquosa 100 mM de NaH_2PO_4 a pH 3,00 (1 mL) en 2 min. Un sòlid que no dipositava al parar l'agitació va precipitar i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut (224 mg de **7004_UB-26910-P4-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 231**) i el producte desitjat es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 79,0 % pel **7004** (25,7 min). Els subproductes DBF (15,5 min) i FM-pip (10,0 min) es van detectar en un 12,1 % i un 4,2 %, respectivament.

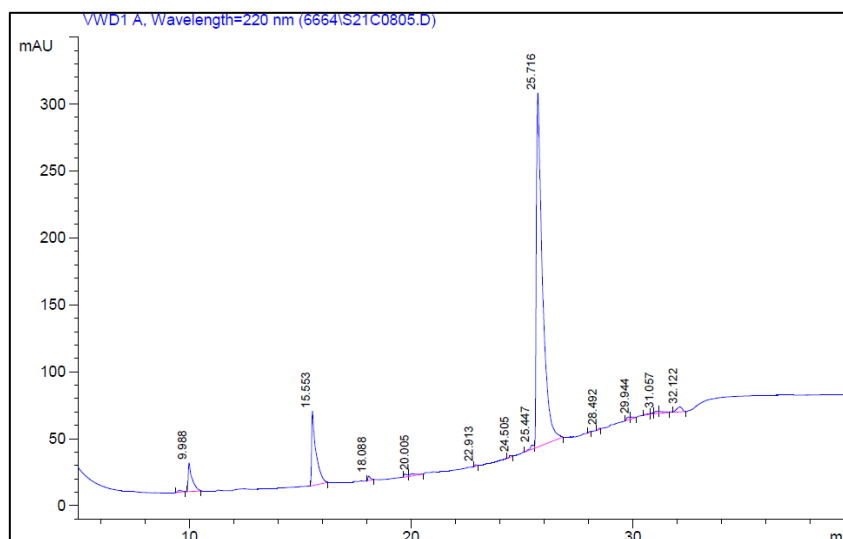


Figura 231. Cromatograma de **7004_UB-26910-P4-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

El sòlid **7004_UB-26910-P4-01** (217 mg) es va carregar a un baló de 10 mL proveït d'agitació magnètica i es va afegir MeCN (2 mL). La suspensió es va agitar a 600 rpm durant 5 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (180 mg de **7004_UB-26910-P4-02**) es

va analitzar per HPLC (**Figura 232**) i **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 95,9 % (25,7 min).

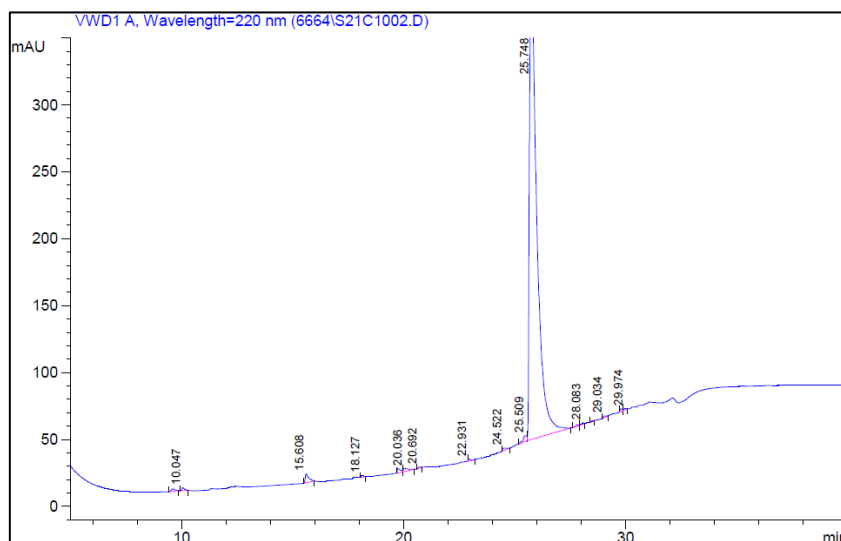


Figura 232. Cromatograma de 7004_UB-26910-P4-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.6.7. SÍNTESI DE 7004_UB-26918

El sòlid **7003_UB-26908-02** (3,00 g, 1,00 eq) es va carregar en un reactor de vidre de 100 mL amb agitació mecànica i pales de tefló abatibles, i es va dissoldre en DMF (11 mL). La mescla es va agitar a 200 rpm i es va afegir una solució de piperidina (114 mg, 1,20 eq) en DMF (4 mL). Passada 1 h de reacció, la temperatura externa es va refredar a 5 °C i es va addicionar una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 3,00 (15 mL) al cru en 15 min. Va precipitar un sòlid que no dipositava al parar l'agitació, la suspensió es va agitar a 5 °C durant 2 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut (2,73 g de **7004_UB-26918-01**) es va carregar a un reactor de 50 mL amb agitació magnètica, i es va afegir MeCN (27 mL). La suspensió es va agitar a 600 rpm a ta durant 2 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (1,90 g de **7004_UB-26918-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 233**), determinant-se per **7004** una puresa cromatogràfica del 95,9 % (25,2 min).

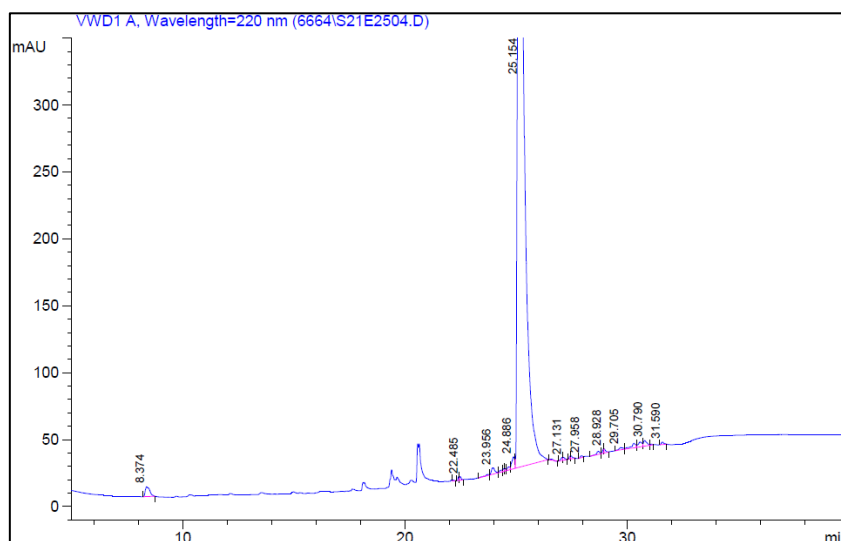


Figura 233. Cromatograma de 7004 UB-26918-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.6.8. SÍNTESI DE 7004_UB-26929: MAJOR ESCALA

El sòlid **7003_UB-26927-02** (23,0 g, 1,00 eq) es va carregar en un reactor de vidre de 500 mL amb agitació mecànica i pales de tefló abatibles, i es va dissoldre en DMF (100 mL). La mescla es va agitar a 200 rpm i es va afegir una solució de piperidina (880 mg, 1,21 eq) en DMF (13 mL). A les 2 h de reacció, la temperatura externa es va refredar a 5 °C i una dissolució aquosa 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 3,00 (115 mL) es va addicionar al cru en 20 min. Un sòlid que no dipositava al parar l'agitació va precipitar, la suspensió es va agitar durant 2 h a 5 °C i es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta). El sòlid obtingut (24,3 g de **7004_UB-26929-01**) es va carregar a un reactor de 250 mL amb agitació mecànica, i es va afegir MeCN (250 mL). La suspensió es va agitar a 200 rpm a ta durant 2 h i es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). El sòlid obtingut (19,1 g de **7004_UB-26929-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 234**) i el producte **7004** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 94,7 % (25,0 min).

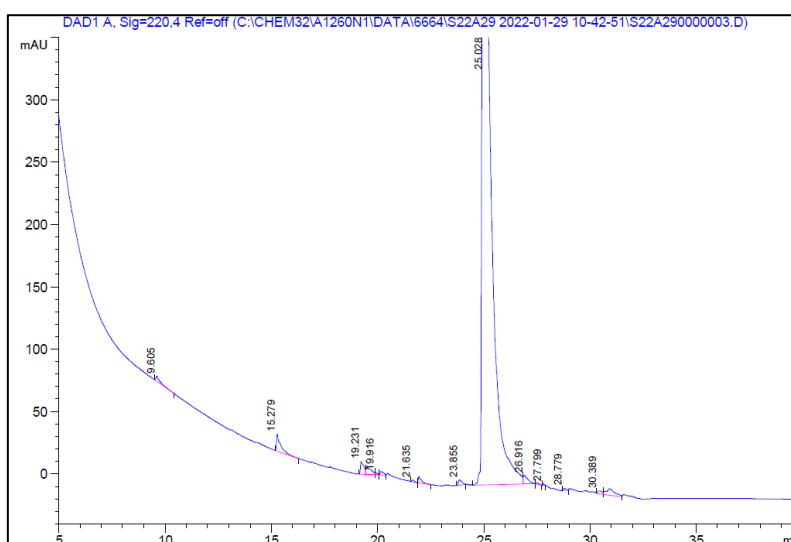
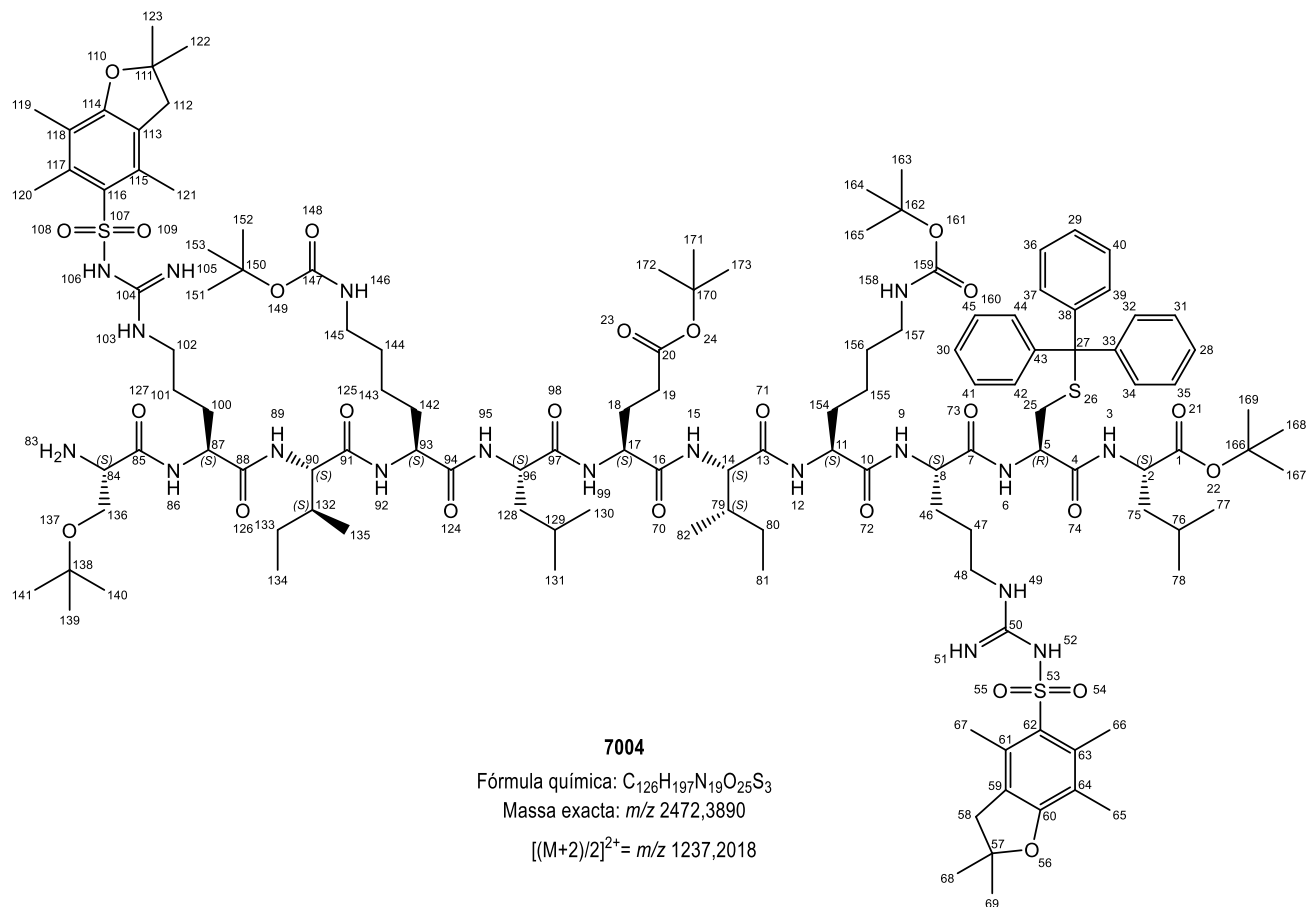


Figura 234. Cromatograma de **7004_UB-26929-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.7. CARACTERITZACIÓ DE 7004



8.5.7.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

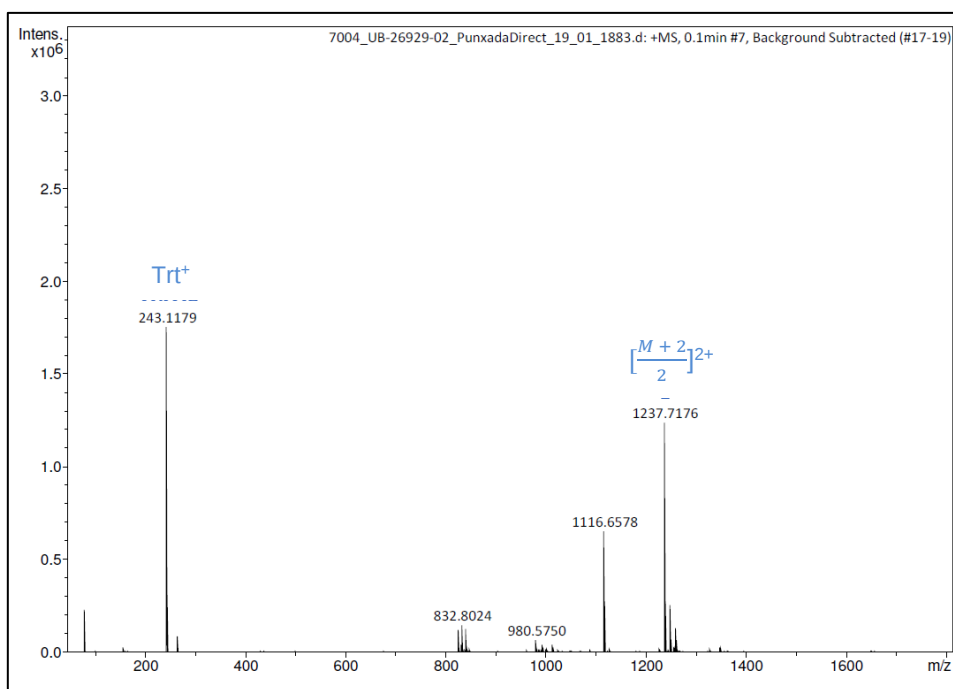


Figura 235. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7004_UB-26929-02.

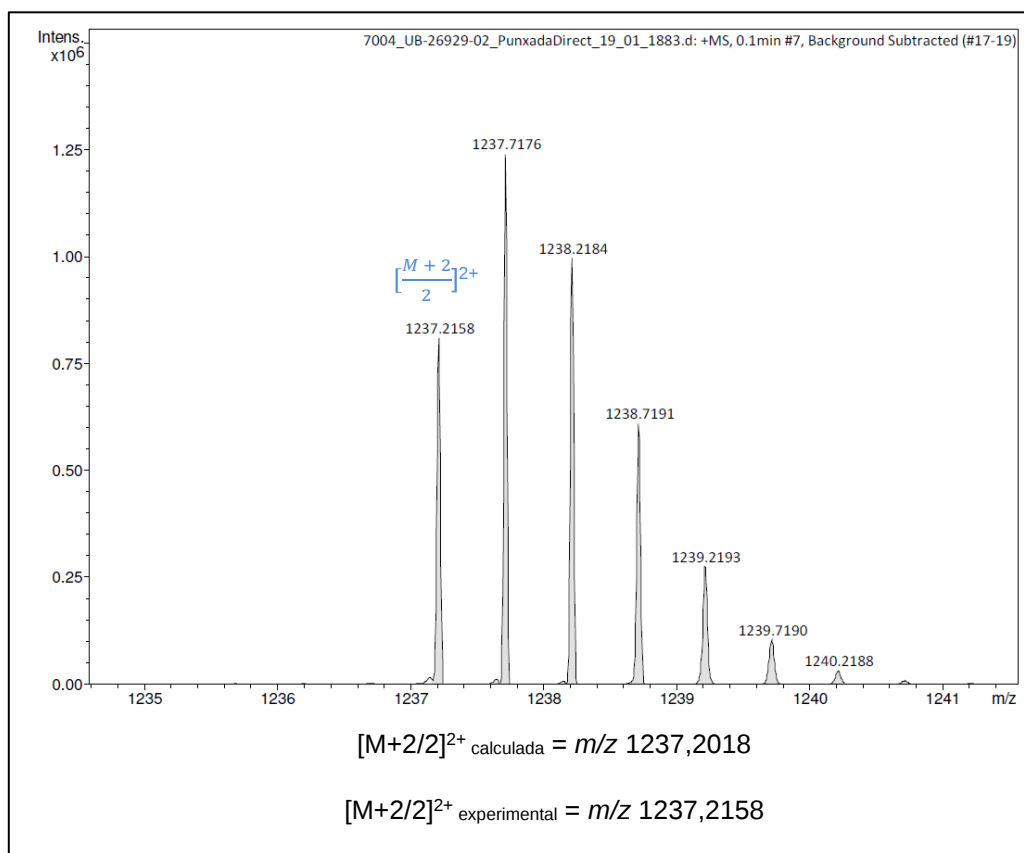
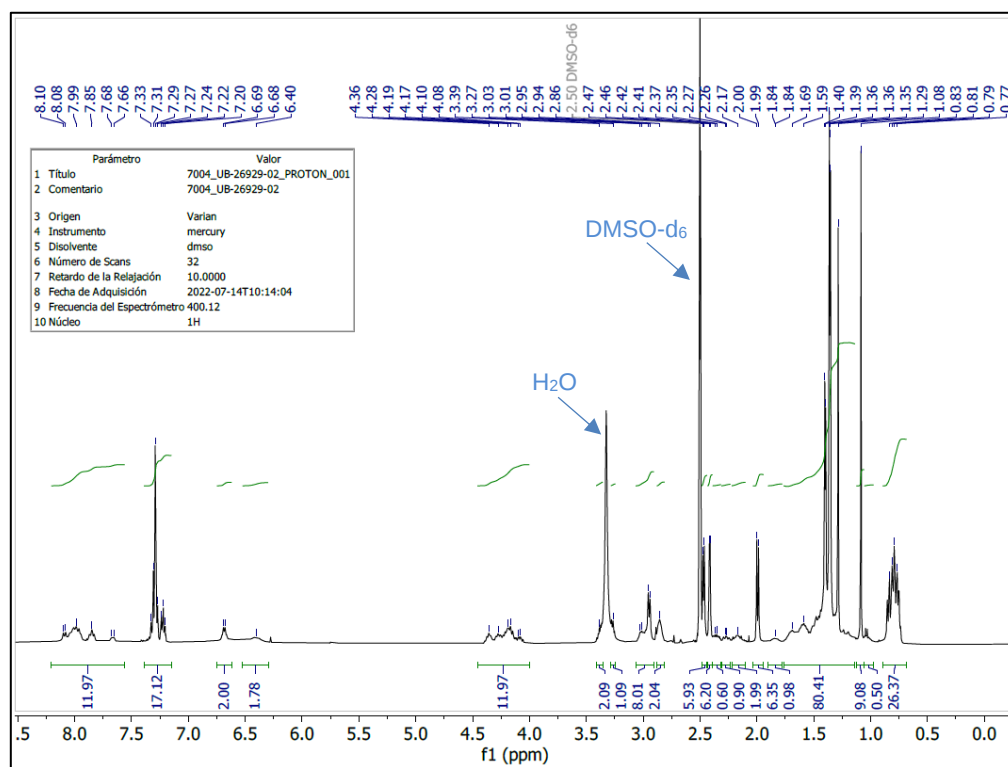
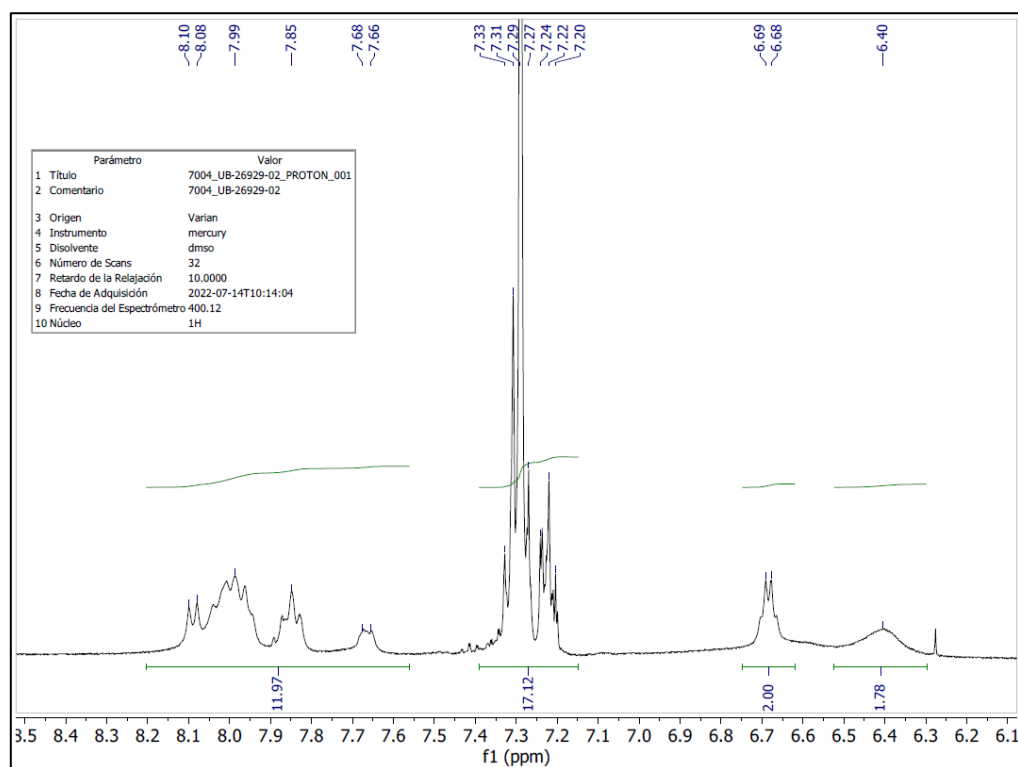


Figura 236. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7004_UB-26929-02.

8.5.7.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.5.7.2.1. ESPECTRES DE ^1H -RMNFigura 237. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 7004_UB-26929-02.Figura 238. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 7004_UB-26929-02.

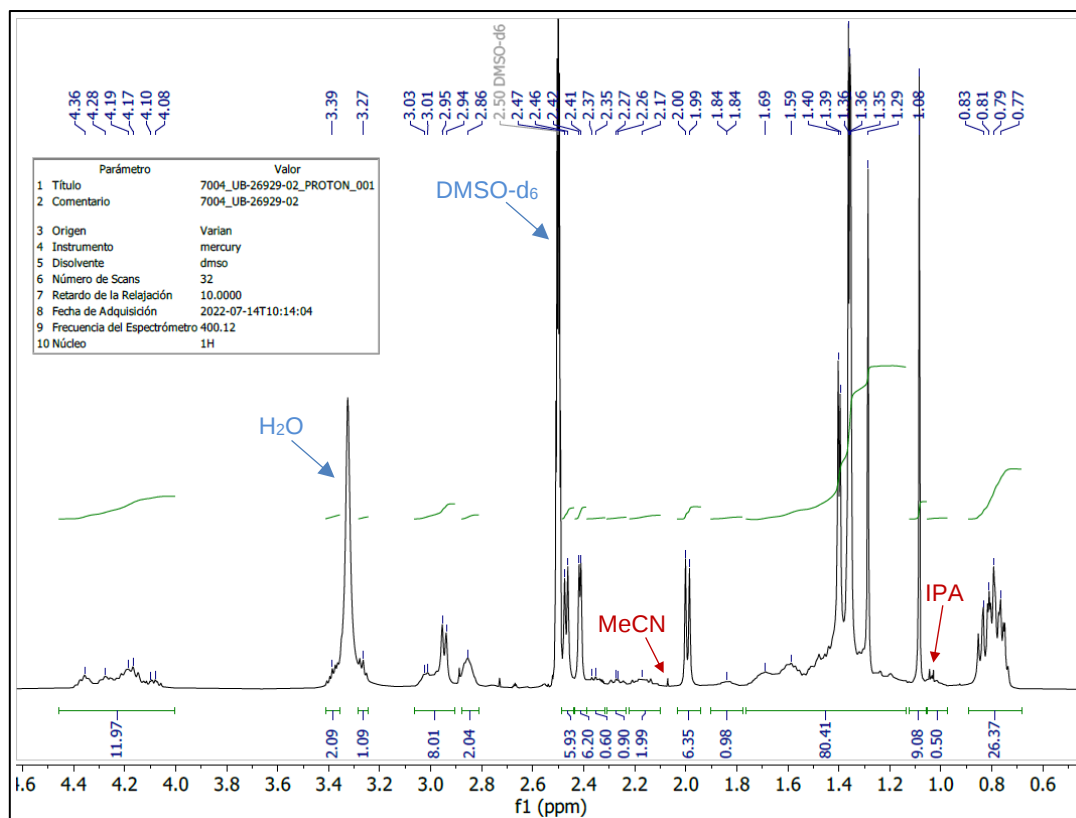


Figura 239. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **7004_UB-26929-02**.

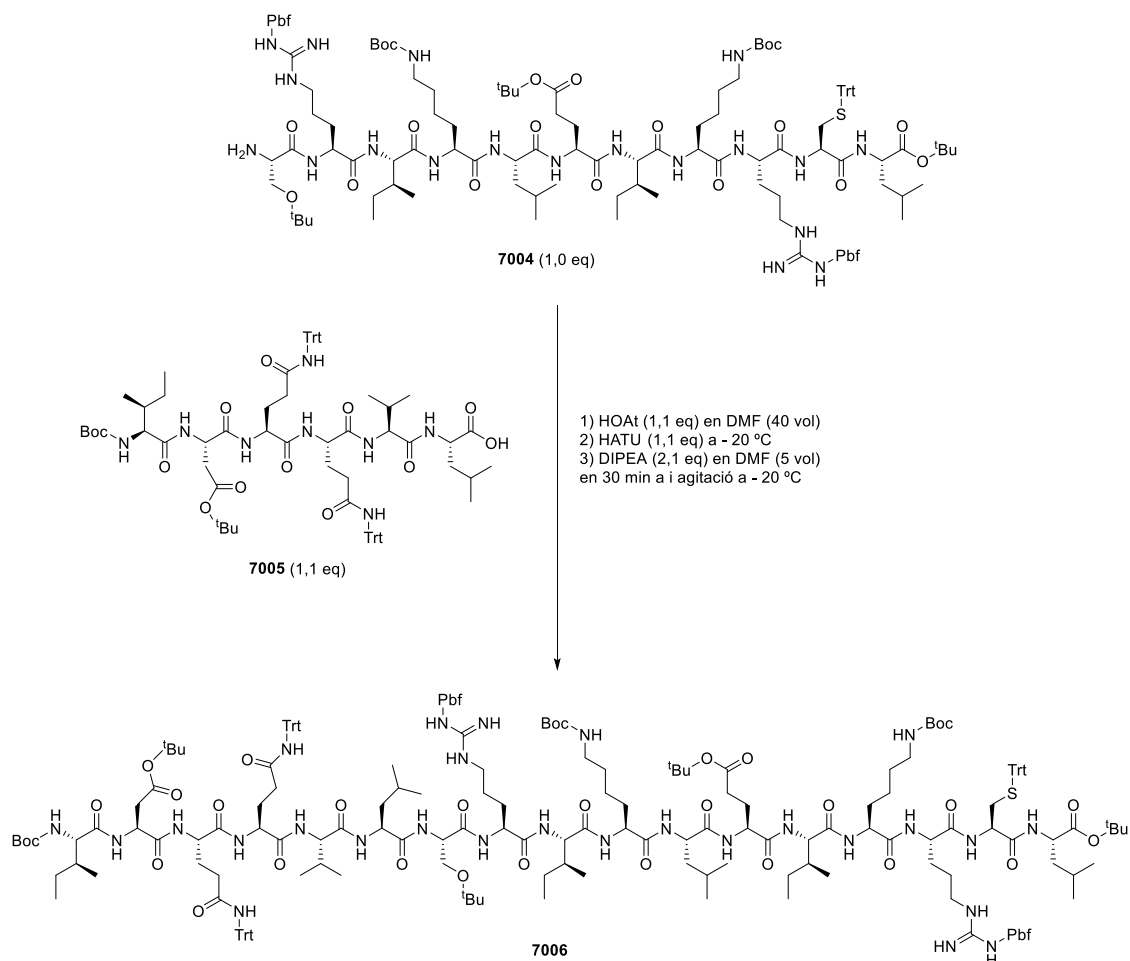
Taula 87. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO-d_6 de **7004_UB-26929-02**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Integral	REGIÓ	ASSIGNACIÓ
8,10 – 7,66	multiplet	10 (12)	NH Amides peptídiques	H3+H6+H9+H12+H15 H99+H95+H92+H89+H86
	multiplet	2 (12)	NH Guanidina	H106 / H52 / H105 / H51 / H103 / H49
7,35 – 7,20	multiplet	17	NH ₂	H83
			H _{aromàtic} Trt	H42+H41+H30+H45+H44 H37+H36+H29+H40+H39 H32+H31+H28+H35+H34
6,68	multiplet	2	NH Guanidina	H106 / H52 / H105 / H51 / H103 / H49
6,39	<i>broad signal</i>	2	NH Guanidina	
4,40 – 4,00	multiplet	12	CH Cadena peptídica	H87+H90+H93+H96+H17 H14+H11+H8+H5+H2
			NH Carbamat	H146+H158
3,39	multiplet	2	CH ₂	H136
3,27	multiplet	1	CH	H84
3,10 – 2,80	multiplet	10	CH ₂	H102+H145+H157+H19+H48
2,47	s	3	CH ₃	H120+H66
2,46	s	3	Pbf	

2,42	s	3	CH ₃	H119+H65
2,41	s	3	Pbf	
2,37	multiplet	1	CH ₂	H25+H25'
2,26	multiplet	1		
2,17	multiplet	2	CH ₂	H112+H58
2,00	s	3	CH ₃	H121+H67
1,99	s	3	Pbf	
1,82	multiplet	1	CH ₂	H112' / H58'
1,80 – 1,00	m	31	CH ₂	H101+H100 H144+H143+H142 H128 H18 H154+H155+H156 H46+H47 H75 H112' / H58'
			CH	H132+H129+H79+H76
1,40 – 1,30	m	41	CH ₃ 'Bu	H151+H152+H153 H171+H172+H173 H163+H164+H165
			CH ₃	H123+H122 H68+H69
			CH ₂	H133'+H80'
1,29	s	9	CH ₃ 'Bu	H167+H168+H169
1,08	s	9	CH ₃ 'Bu	H139+H140+H141
0,90 – 0,70	m	26	CH ₃	H134+H135+H131+H130 H82+H81+H77+H78
			CH ₂	H133+H80

8.5.8. SÍNTESI DE 7006

8.5.8.1. PROCEDIMENT GENERAL

**Esquema 70.** Condicions de reacció per a la síntesi del fragment peptídic **7006**.

En un reactor de volum adequat per a cada escala de síntesi i proveït d'agitació magnètica o mecànica amb pales de tefló abatibles, es van carregar els intermedis peptídics **7004** i **7005**, HOAt i DMF. La mescla es va agitar fins a obtenir una dissolució completa i, a continuació, la temperatura externa es va refredar a - 20 °C. Un cop assolida la temperatura, es va carregar HATU i es va iniciar l'addició d'una solució de DIPEA en DMF en 30 min. La reacció es va monitoritzar per HPLC mitjançant l'anàlisi d'una al·lquota del cru (100 µL del cru en 2 mL DMF) cada hora, fins que el pic cromatogràfic corresponent al **7004** es va detectar amb un percentatge d'àrea menor al 1,0 %. El cru es va transvasar a un reactor o a un baló de volum adequat i es va dur a terme la precipitació del pèptid desitjat amb l'addició d'H₂O al cru en 30 min a 5 °C. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit a 40 °C fins a pes constant. En els següents apartats, s'indiquen les quantitats utilitzades de reactius per a cada síntesi, així com els grams de producte obtinguts i la seva puresa cromatogràfica.

8.5.8.2. SÍNTESI DE 7006_UB-26904

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL amb agitació magnètica a 400 rpm i seguint el procediment general (apartat 8.5.8.1). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-23465-**

P2-01 (330 mg, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (199 mg, 1,10 eq), HOAt (21 mg, 1,16 eq), HATU (58 mg, 1,14 eq) i una solució de DIPEA (52 mg, 3,02 eq) en DMF (2 mL), fent servir DMF com a dissolvent (13 mL). A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (22 mL) i el sòlid obtingut (430 mg de **7006_UB-26904-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 240**). El producte **7006** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 75,0 % (32,5 min).

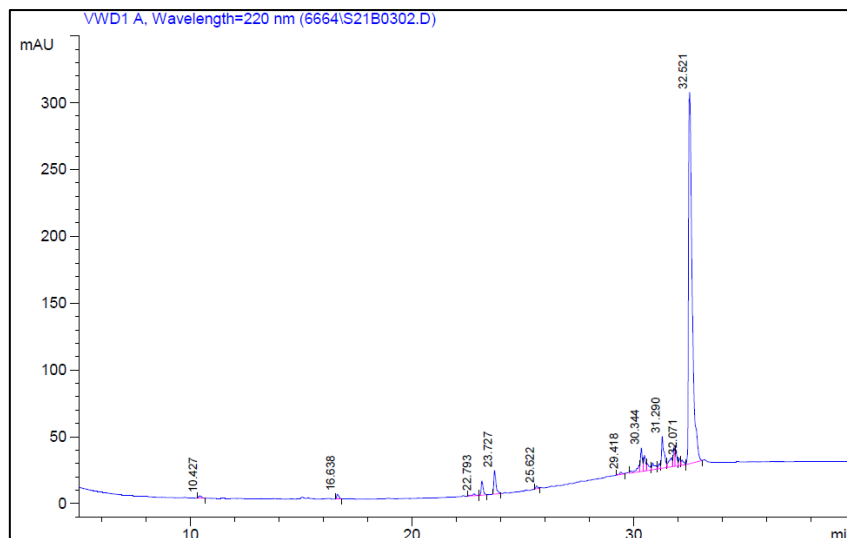


Figura 240. Cromatograma de **7006_UB-26904-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

El sòlid **7006_UB-26904-01** (430 mg) es va carregar en un baló de 5 mL proveït d'agitació magnètica, es va afegir EtOH (1,4 mL) i la mescla es va agitar a 300 rpm. La suspensió es va escalfar a 45 °C i es va observar una dissolució completa. La mescla es va deixar en agitació 1 h i va precipitar un sòlid. A les 4 h d'agitació, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (290 mg de **7006_UB-26904-02**) es va analitzar per HPLC (**Figura 241**). Es va determinar una puresa cromatogràfica pel **7006** del 81,9 % (32,4 min).

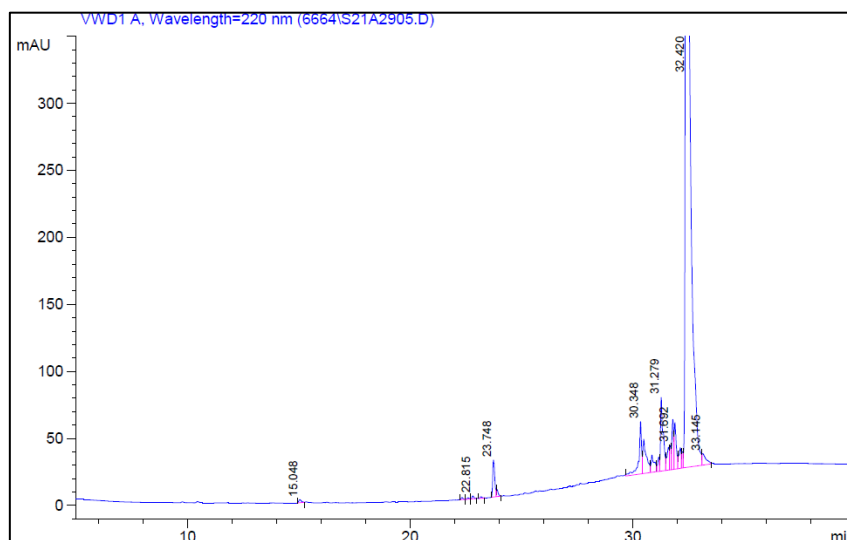


Figura 241. Cromatograma de **7006_UB-26904-02**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.8.3. SÍNTESI DE 7006_UB-26906

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL amb agitació magnètica a 400 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-23461-P4-01** (90 mg, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (56 mg, 1,14 eq), HOAt (6 mg, 1,21 eq), HATU (16 mg, 1,16 eq) i una solució de DIPEA (22 mg, 4,68 eq) en DMF (2 mL), fent servir DMF com a dissolvent (3,6 mL). A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (6 mL) i el sòlid obtingut (110 mg de **7006_UB-26906-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 242**). El producte **7006** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 80,3 % (32,5 min).

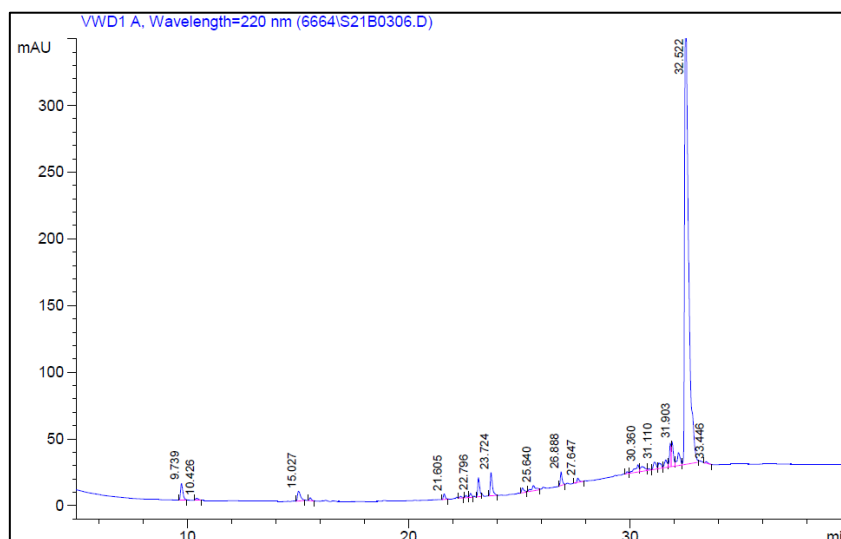


Figura 242. Cromatograma de **7006_UB-26906-01**. (Mètode A, *apartat 8.3.3*).

8.5.8.4. SÍNTESI DE 7006_UB-26914

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL amb agitació magnètica de 400 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-26910-P1-02** (159 mg, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (96 mg, 1,10 eq), HOAt (10 mg, 1,14 eq), HATU (28 mg, 1,15 eq) i una solució de DIPEA (29 mg, 3,49 eq) en DMF (1 mL), fent servir DMF (6,4 mL) com a dissolvent. A les 5 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (12 mL) i el sòlid obtingut (240 mg de **7006_UB-26914-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 243**), resultant una puresa cromatogràfica del 86,4 % per **7006** (32,5 min).

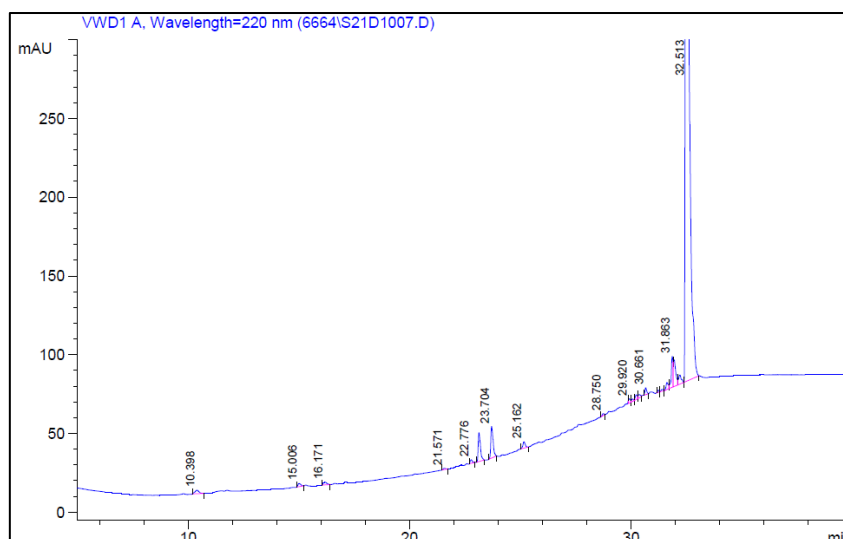


Figura 243. Cromatograma de 7006_UB-26914-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.8.5. SÍNTESI DE 7006_UB-26915

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL proveït d'agitació magnètica a 400 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-26910-P4-02** (170 mg, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (103 mg, 1,11 eq), HOAt (11 mg, 1,18 eq), HATU (29 mg, 1,11 eq) i una solució de DIPEA (27 mg, 3,04) en DMF (1 mL), fent servir DMF (6,8 mL) com a dissolvent. A les 5 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (22 mL) i el sòlid obtingut (220 mg de **7006_UB-26915-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 244**). El producte **7006** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 87,0 % (32,5 min).

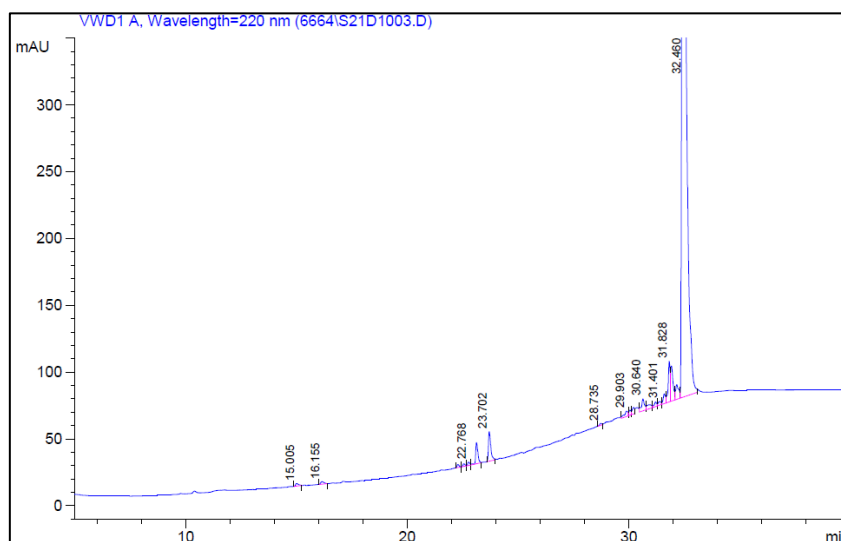


Figura 244. Cromatograma de 7006_UB-26915-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.8.6. SÍNTESI DE 7006_UB-26920

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 150 mL proveït d'agitació mecànica a 200 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-26918-02** (1,80 g, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (1,09 g, 1,11 eq), HOAt (109 mg, 1,10 eq), HATU (305 mg, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (285 mg, 3,03 eq) en DMF (5 mL), fent servir

DMF (67 mL) com a dissolvent. A les 3 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (117 mL) i el sòlid obtingut (2,74 g de **7006_UB-26920-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 245**), obtenint-se una puresa cromatogràfica del 89,2 % per **7006** (32,4 min).

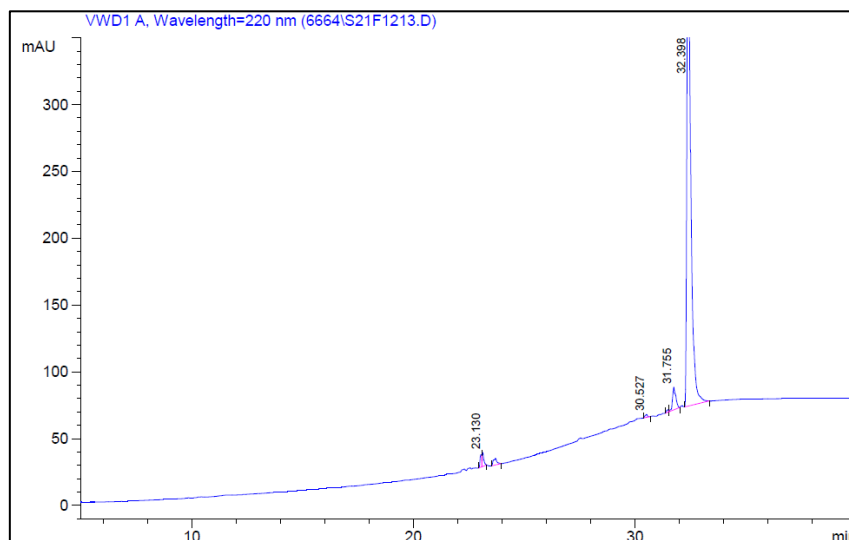


Figura 245. Cromatograma de **7006_UB-26920-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.8.7. SÍNTESI DE **7006_UB-26930**

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL amb agitació magnètica de 300 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-26929-02** (510 mg, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (303 mg, 1,08 eq), HOAt (30 mg, 1,07 eq), HATU (86 mg, 1,10 eq) i una solució de DIPEA (91 mg, 3,42 eq) en DMF (1,6 mL), fent servir DMF (14 mL) com a dissolvent. A les 5 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (20 mL) i el sòlid obtingut (660 mg de **7006_UB-26930-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 246**). El producte **7006** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 85,3 % (32,1 min).

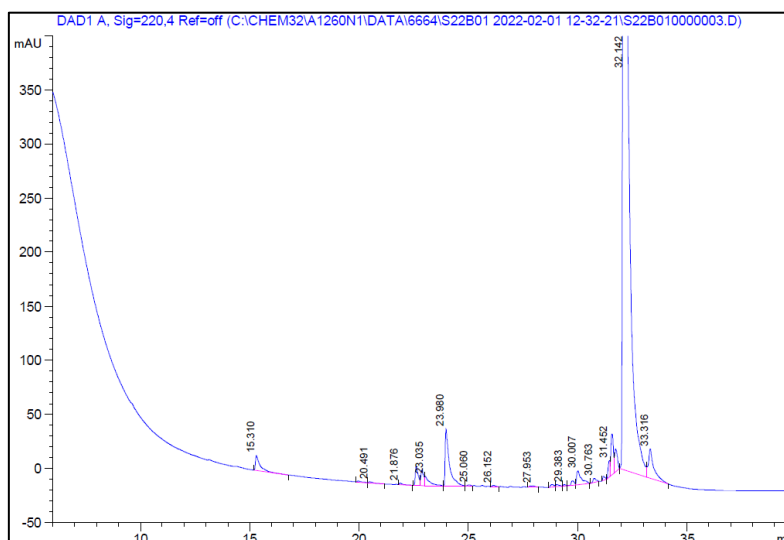


Figura 246. Cromatograma de **7006_UB-26930-01**. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.8.8. SÍNTESI DE 7006_UB-26931

La reacció es va dur a terme en un vial de 10 mL proveït d'agitació magnètica a 500 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-23453-03** (40 mg, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (24 mg, 1,10 eq) i HOAt (3 mg, 1,36 eq), dissolts en 1 mL de DMF. Es va carregar HATU (7 mg, 1,14 eq) i una solució de DIPEA (7 mg, 3,35 eq) en DMF (130 µL). A les 5 h de reacció, el pèptid es va precipitar amb H₂O (1,6 mL) i el sòlid obtingut (**7006_UB-26931-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 247**). El producte **7006** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 89,7 % (32,2 min).

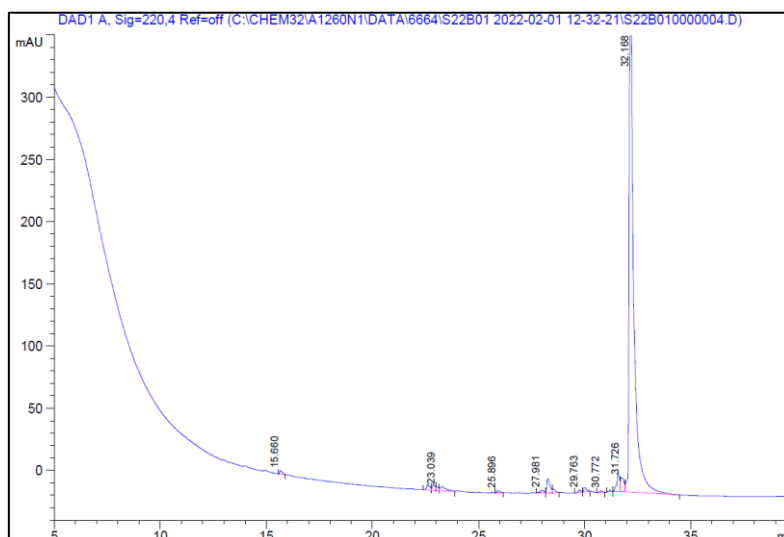


Figura 247. Cromatograma de **7006_UB-26931-01**. (Mètode A, *apartat 8.3.3*).

8.5.8.9. SÍNTESI DE 7006_UB-26932: MAJOR ESCALA

La reacció es va dur a terme en un reactor de 2 L amb clau de descàrrega proveït d'agitació mecànica a 200 rpm i seguint el procediment general (*apartat 8.5.8.1*). Els reactius utilitzats van ser **7004_UB-26929-02** (18,01 g, 1,00 eq), **7005_UB-23475-P3-01** (10,87 g, 1,10 eq), HOAt (1,09 g, 1,10 eq), HATU (3,09 g, 1,12 eq) i una solució de DIPEA (2,84 g, 3,02 eq) en DMF (56 mL), fent servir DMF (480 mL) com a dissolvent. A les 3 h de reacció, es va addicionar H₂O (720 mL), la suspensió resultant es va descarregar per la clau de descàrrega del reactor i es va filtrar a pressió reduïda (filtració de 2 h). El sòlid obtingut (26,20 g de **7006_UB-26932-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 248**) i el producte **7006** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 81,8 % (32,1 min).

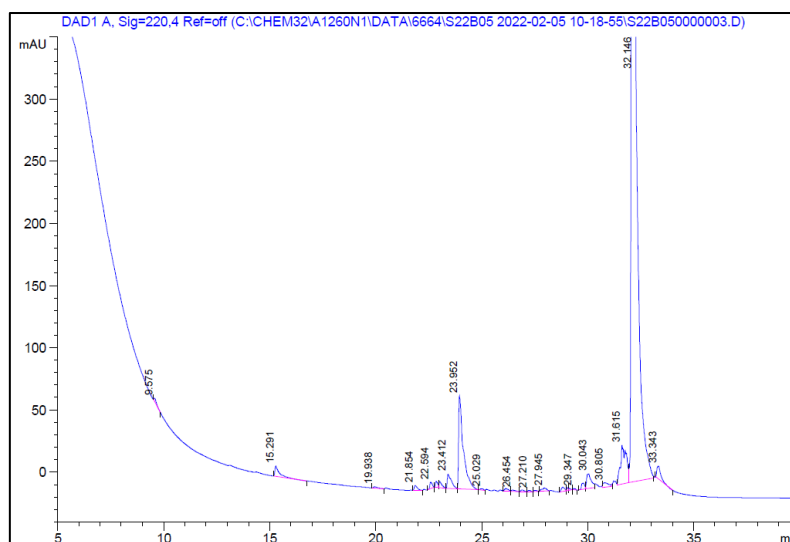
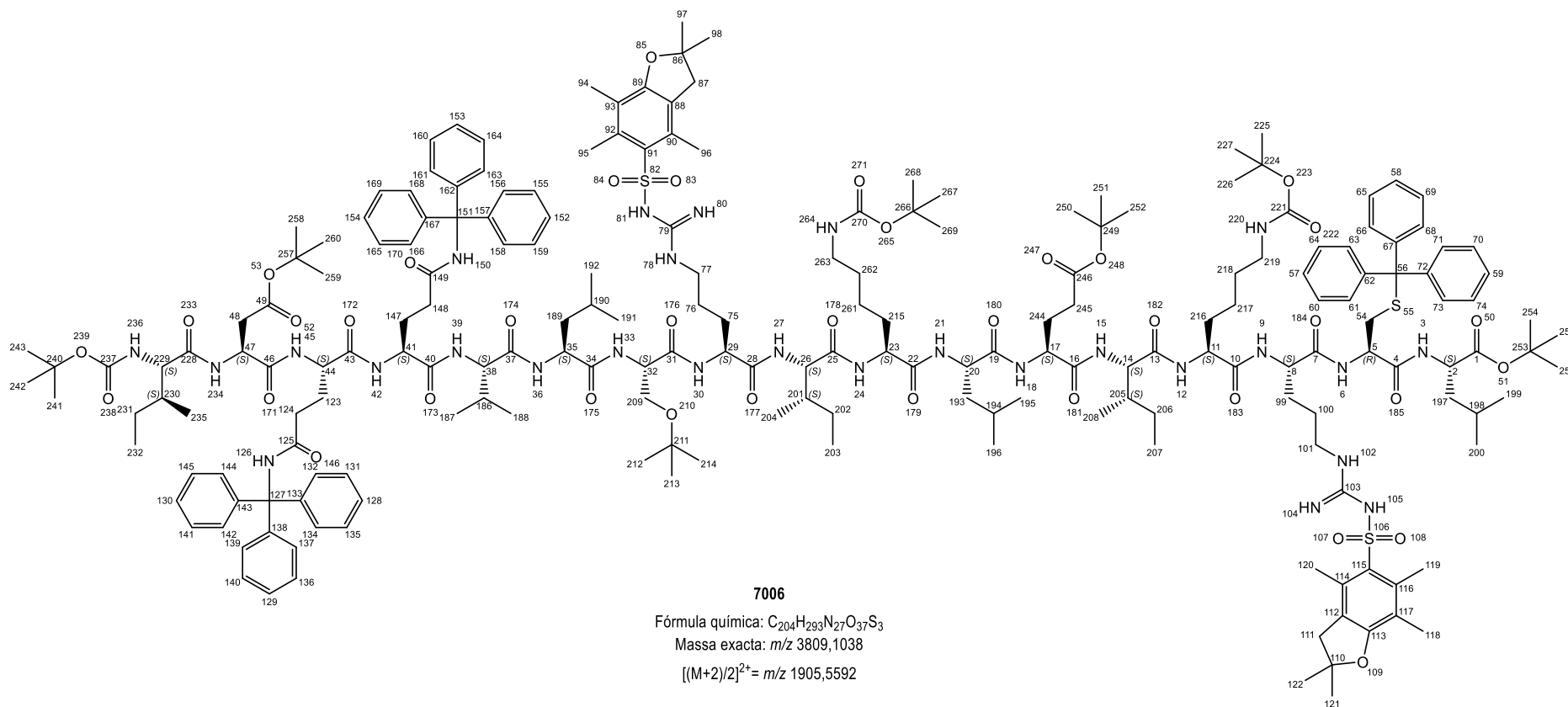


Figura 248. Cromatograma de 7006_UB-26932-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).

8.5.9. CARACTERITZACIÓ DE 7006



8.5.9.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

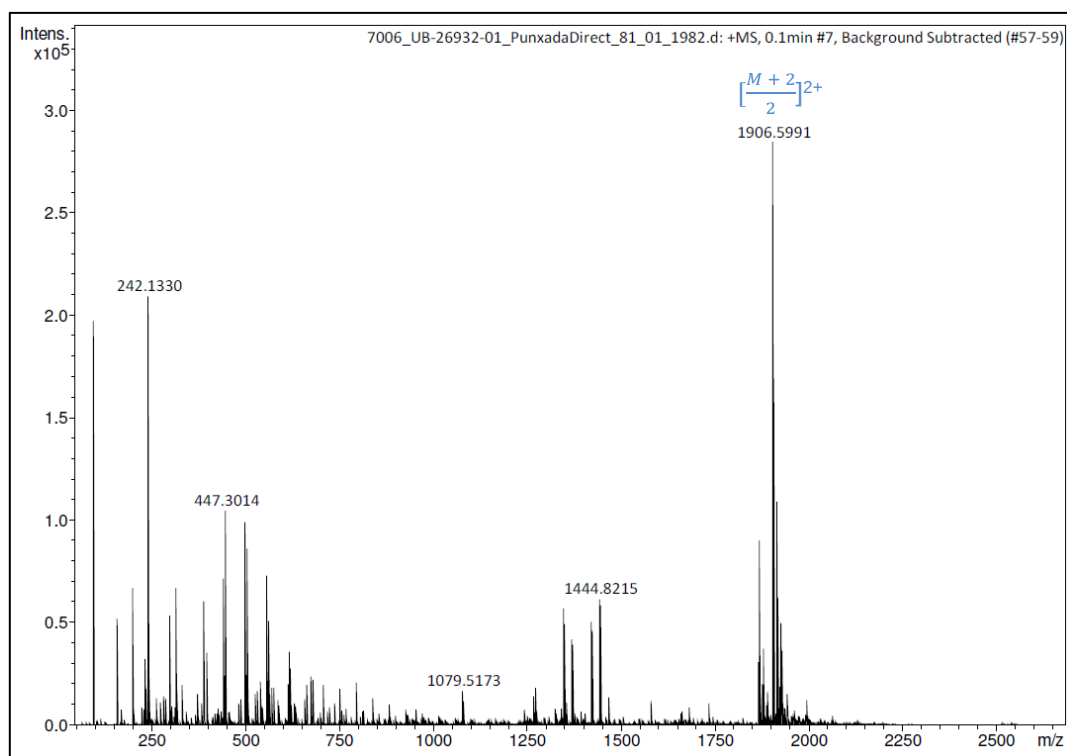


Figura 249. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7006_UB-26932-01.

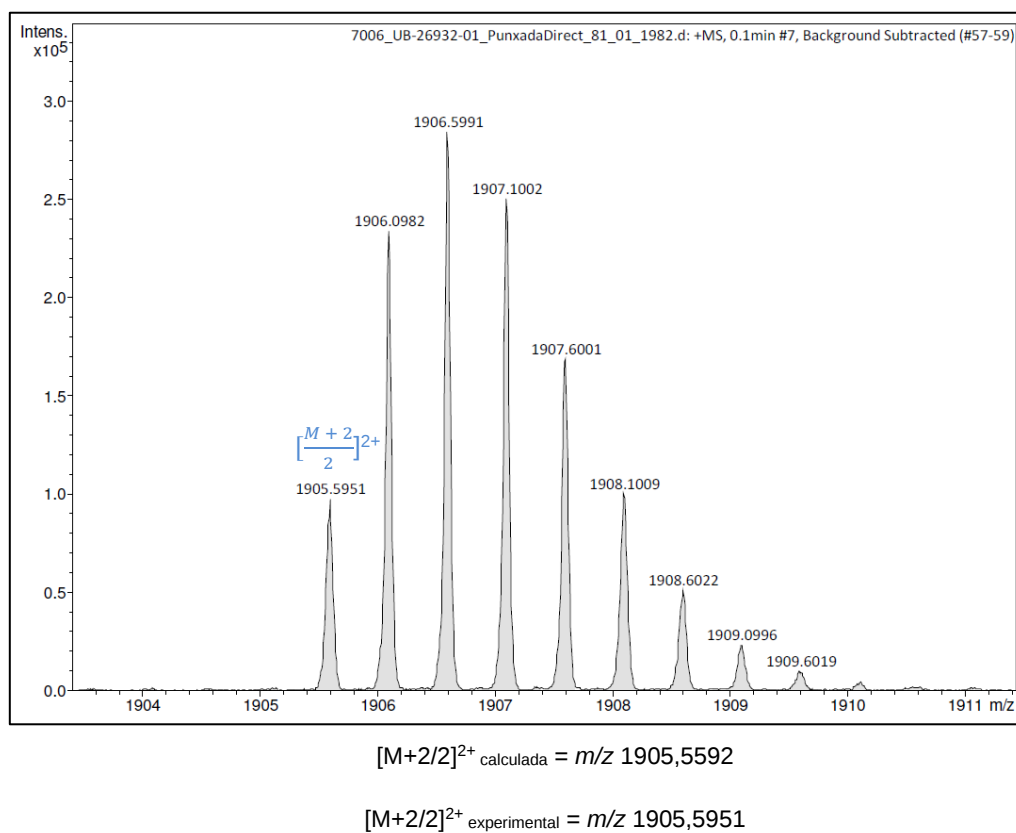
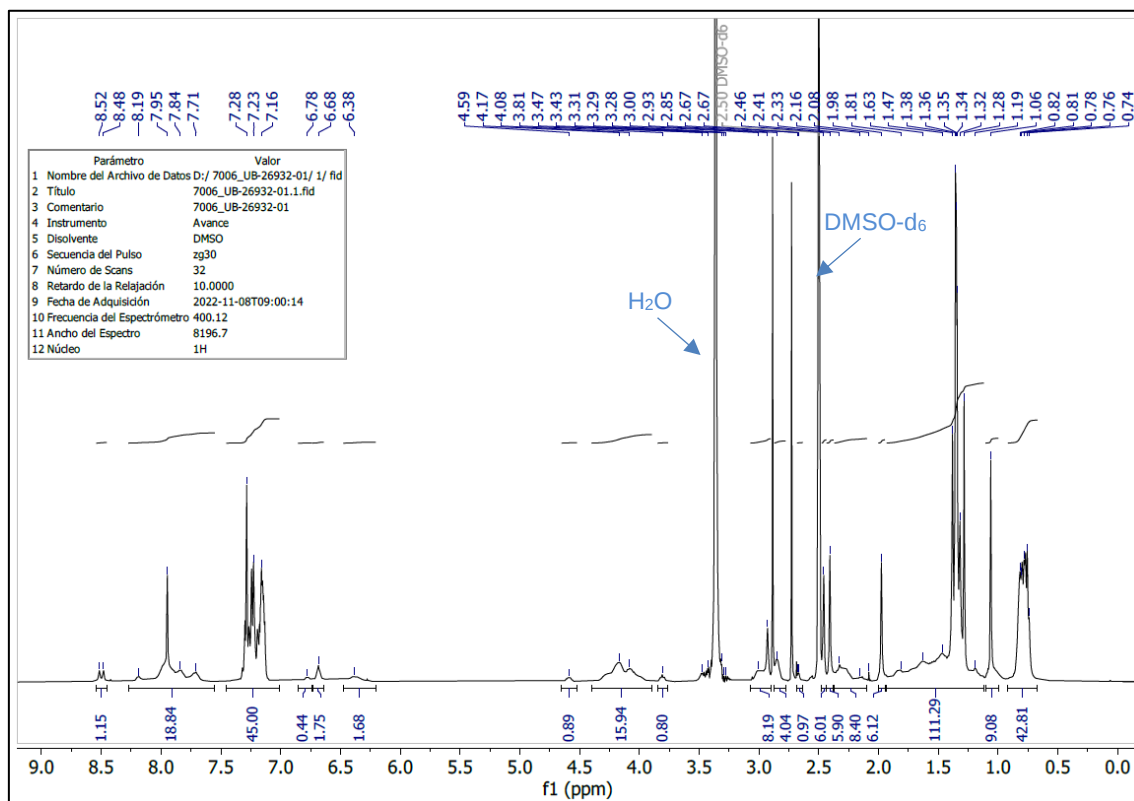
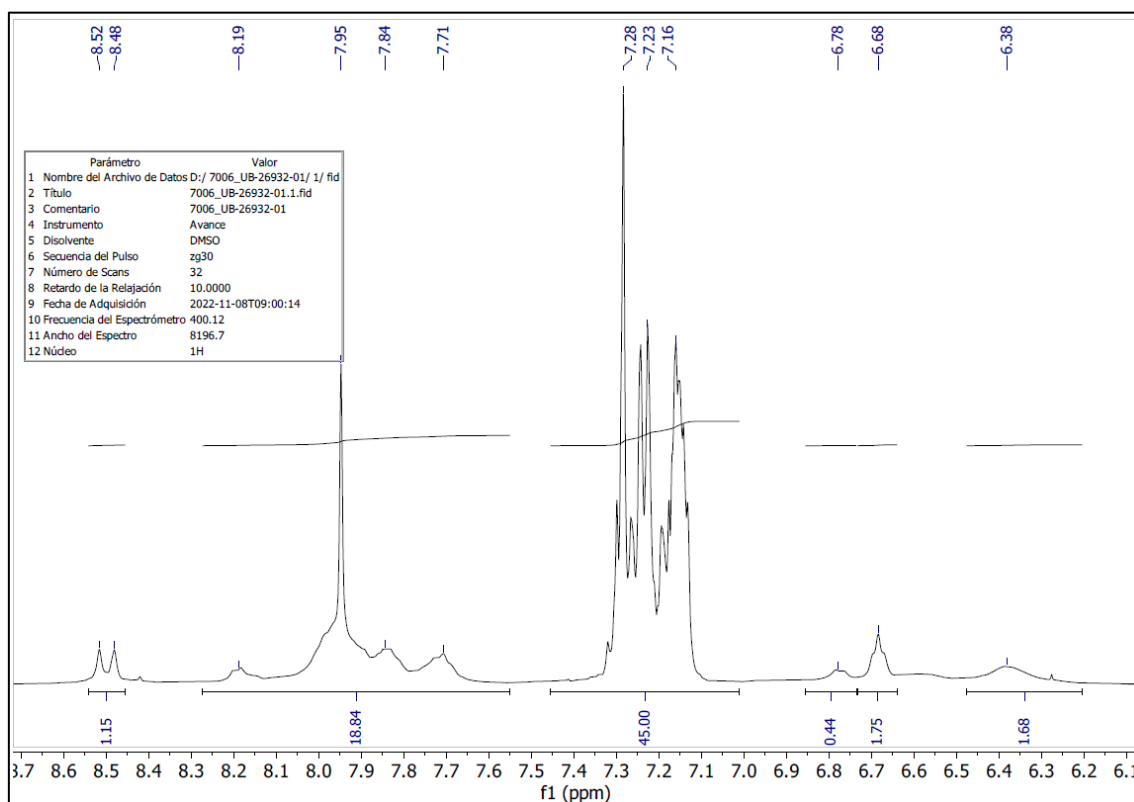


Figura 250. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7006_UB-26932-01.

8.5.9.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.5.9.2.1. ESPECTRES DE ^1H -RMNFigura 251. Espectre de ^1H -RMN (DMSO-d₆) de 7006_UB-26932-01.Figura 252. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d₆) de 7006_UB-26932-01.

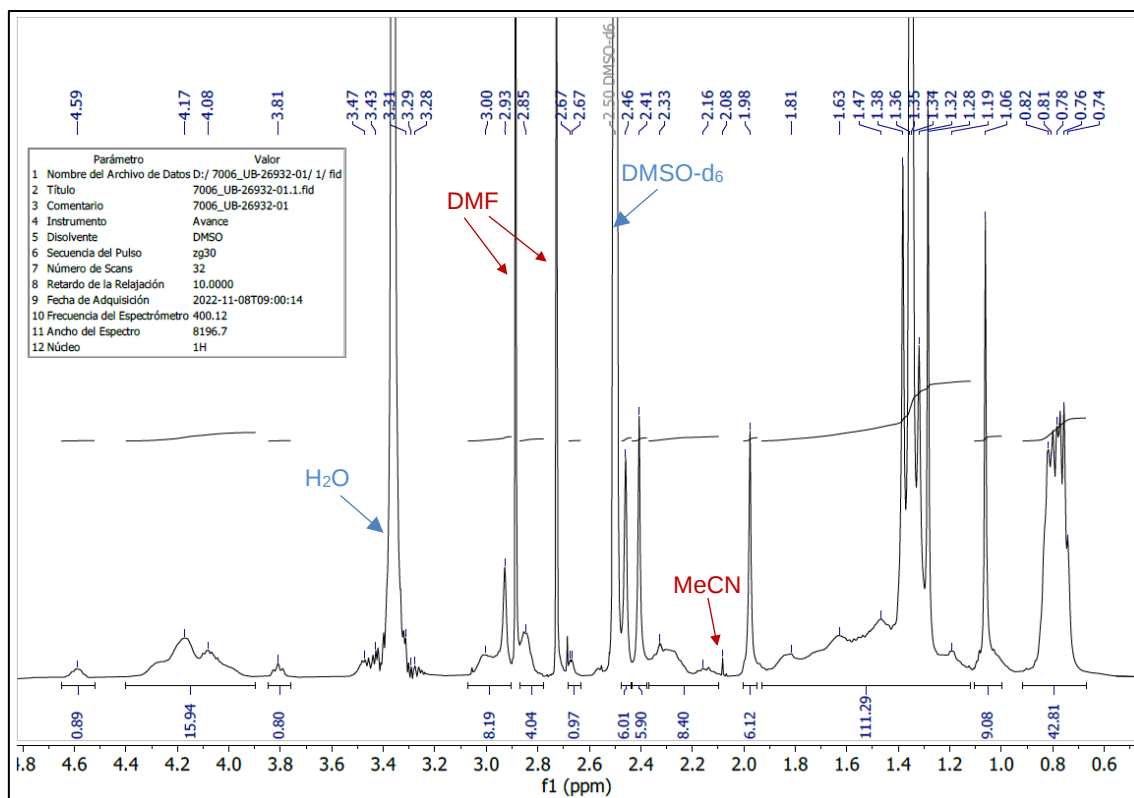


Figura 253. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **7006_UB-26932-01**.

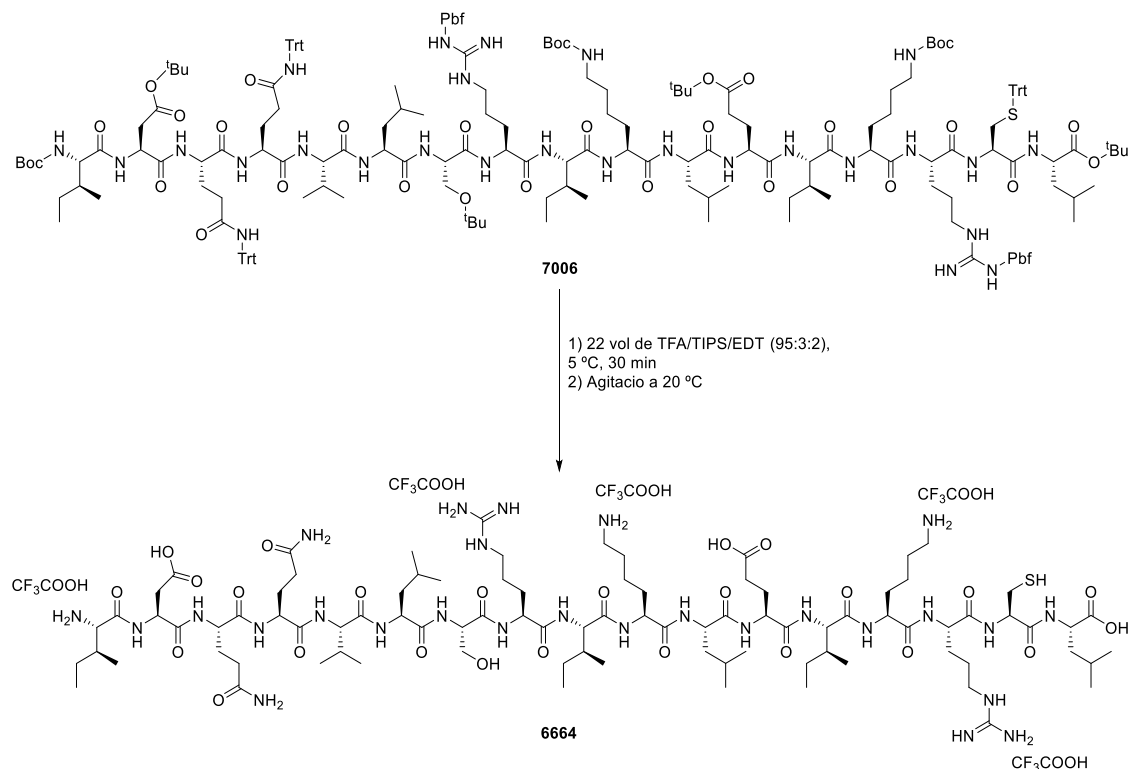
Taula 88. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO-d_6 de **7006_UB-26932-01**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Constant d'acoblament (Hz)	Integral	REGIÓ	ASSIGNACIÓ
8,50	d	14,1	1	NH Amides peptídiques	H234 / H45 / H42 / H39 / H36 H33 / H30 / H27 / H24 / H21 H18 / H15 / H12 / H9 / H6 / H3
8,20 – 7,60	multiplet	-	19	NH Guanidina	H81 / H80 / H78 / H102 / H104 / H105
				NH Amides trítol	H150+H126
7,35 – 7,10	multiplet	-	45	H _{aromàtic} Trítol	H60+H61+H57+H64+H63+ H66+H65+H58+H69+H68+ H71+H70+H59+H74+H73+ H158+H159+H152+H155+ H156+H163+H164+H153+ H160+H161+H168+H169+ H154+H165+H166+H132+ H131+H128+H135+H134+ H137+H136+H129+H140+ H139+H142+H141+H130+ H145+H144

6,78	multiplet	-	1	NH Amides peptídiques	H236
6,68	multiplet	-	2	NH Guanidina	H81 / H80 / H78 / H102 / H104 / H105
6,38	<i>broad signal</i>	-	2		
4,59	multiplet	-	1	CH Cadena peptídica	H47
4,40 – 4,00	multiplet	-	16	CH Cadena peptídica	H44+H41+H35+H32+H29+ H26+H23+H20+H17+H14+ H11+H8+H5+H229
				NH Carbamat	H264+H220
3,81	multiplet	-	1	CH Cadena peptídica	H38
3,30 Senyal d'H ₂ O	multiplet	-	2	CH ₂	H209
	multiplet	-	1	CH	H2
3,10 – 2,80	multiplet	-	12	CH ₂	H219+H263+H77+H101+H 54+H48
2,46	s	-	6	CH ₃ Pbf	H95+H119
2,41	s	-	6	CH ₃ Pbf	H94+H118
2,40 – 1,00	multiplet	-	53	CH ₂	H231+H124+H123+H147+ H148+H189+H75+H76+H2 15+H261+H262+H193+H2 44+H245+H216+H217+H2 18+H99+H100+H197+H87 +H111+H202+H206
				CH	H230+H186+H190+H201+ H194+H205+H198
1,98	s	-	6	CH ₃ Pbf	H96+H120
1,40 – 1,30	multiplet	-	57	CH ₃ ^t Bu	H226+H227+H225+H250+ H251+H252+H267+H268+ H269+H258+H260+H259+ H243+H242+H241
				CH ₃	H121+H122+H97+H98
1,28	s	-	9	CH ₃ ^t Bu	H254+H255+H256
1,06	s	-	9	CH ₃ ^t Bu	H212+H213+H214
0,80 – 0,70	multiplet	-	44	CH ₃	H232+H235+H187+H188+ H192+H191+H204+H203+ H196+H195+H208+H207+ H200+H199
				CH ₂	H202'+H206'

8.5.10. SÍNTESI DE 6664

8.5.10.1. PROCEDIMENT GENERAL

Esquema 71. Condicions de reacció per a la obtenció del **6664** (FT).

Les reaccions per l'obtenció de **6664** es van dur a terme en l'aïllador de HP-APIs en atmosfera de N₂. Una barreja de TFA, TIPS i EDT (95:3:2 en volum) es va preparar i es va transferir a un reactor de volum adequat per a cada escala de síntesi i proveït d'agitació magnètica. La mescla es va agitar a 400 rpm, la temperatura externa es va programar a 5 °C i el precursor **7006** es va carregar al reactor. La mescla de reacció es va agitar 30 min a 5 °C (suspensió groga) i, a continuació, la temperatura externa es va ajustar a 25 °C. Passada 1 h de reacció, es va observar un canvi d'aspecte de la suspensió a rosa pàl·lid i, 2 h més tard, la suspensió es va convertir en vermella. A les 4 h de reacció, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda i la dissolució obtinguda es va tornar a carregar al reactor. La temperatura externa es va refredar a 3 °C i es va addicionar 2-MeTHF al cru en 30 min. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut es va assecar al dessecador de buit a 40 °C fins a pes constant.

8.5.10.2. SÍNTESI DE **6664_UB-26917**

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL i seguint el procediment general (apartat 8.5.10.1). Una barreja dels sòlids **7006_UB-26914-01** i **7006_UB-26915-01** (274 mg, 1,00 eq) es va tractar amb la barreja TFA (5700 µL)/TIPS (180 µL)/EDT (120 µL). El cru de reacció es va agitar durant 7 h, i a continuació, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida) i el sòlid es va descartar. A la dissolució resultant es va addicionar 2-MeTHF (33 mL), la suspensió es va filtrar (filtració lenta) i el sòlid obtingut (90 mg de **6664_UB-26917-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 254**), determinant-se una puresa cromatogràfica del 76,7 % per **6664** (18,1 min).

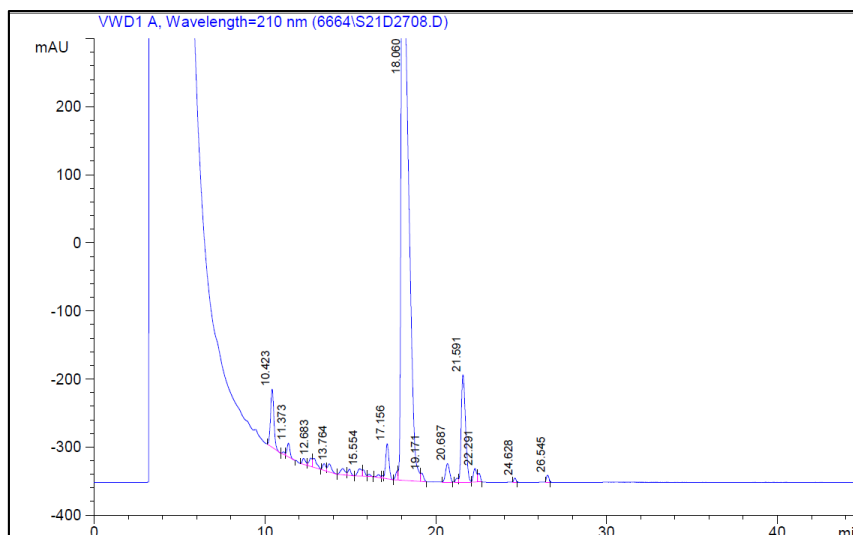


Figura 254. Cromatograma de 6664_UB-26917-01. (Mètode C, apartat 8.3.3).

El sòlid **6664_UB-26917-01** (80 mg) es va tornar a tractar amb la barreja TFA (1660 µL)/TIPS (51 µL)/EDT (34 µL). La mescla es va agitar a 400 rpm a ta i, en aquest cas, l'aspecte va ser una dissolució completa transparent lleugerament vermella. A les 4 h de reacció, es va addicionar 2-MeTHF (5 mL) al cru en 5 min, la suspensió resultant es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (**6664_UB-26917-02**) es va analitzar per HPLC (Figura 255). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 68,0 % (19,8 min).

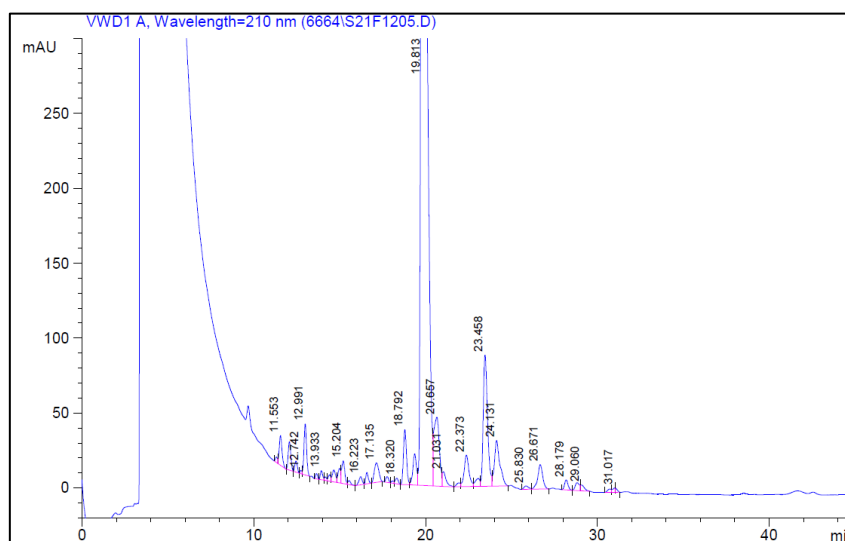


Figura 255. Cromatograma de 6664_UB-26917-02. (Mètode C, apartat 8.3.3).

8.5.10.3. ELIMINACIÓ DELS GRUPS PROTECTORS DELS INTERMEDIS

8.5.10.3.1. ELIMINACIÓ DELS GRUPS PROTECTORS DE 6998

El sòlid **6998_UB-19144-02** (200 mg) es va carregar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica, i es va afegir la barreja TFA (4180 µL)/TIPS(132 µL)/EDT (88 µL). La mescla de reacció es va agitar a 600 rpm a ta i, a les 7 h de reacció, es va addicionar 2-MeTHF (8 mL) al cru en 10 min. No va precipitar cap sòlid i la dissolució del cru de reacció (**6998_UB-26922-diss**) es va analitzar per HPLC-MS.

8.5.10.3.2. ELIMINACIÓ DELS GRUPS PROTECTORS DE 7005

El sòlid **7005_UB-23475-P3-01** (200 mg) es va carregar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica i es va afegir la barreja TFA (4180 µL)/TIPS (132 µL)/EDT (88 µL). La mescla de reacció es va agitar a 600 rpm a ta i, a les 7 h de reacció, es va addicionar 2-MeTHF (8 mL) al cru en 10 min. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (**7005_UB-26922-01**) es va analitzar per HPLC-MS.

8.5.10.3.3. ELIMINACIÓ DELS GRUPS PROTECTORS DE 7411

El sòlid **7411_UB-23492-01** (200 mg) es va carregar a un baló de 50 mL amb agitació magnètica, i es va afegir la barreja TFA (4180 µL)/TIPS (132 µL)/EDT (88 µL). La mescla de reacció es va agitar a 600 rpm a ta i, les 7 h de reacció, es va addicionar 2-MeTHF (8 mL) al cru en 10 min. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid obtingut (**7411_UB-23492-01**) es va analitzar per HPLC-MS.

8.5.10.4. SÍNTESI DE 6664_UB-26923

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL i seguint el procediment general (*apartat 8.5.10.1*). El sòlid **7006_UB-26920-01** (200 mg) es va tractar amb la barreja TFA (3900 µL)/TIPS (264 µL)/EDT (176 µL) i a les 7 h de reacció, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). Es va addicionar 2-MeTHF (25 mL) a la dissolució resultant, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració lenta) i el sòlid obtingut (**6664_UB-26923-01**) es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 256**), observant-se un temps de retenció no habitual en el pic principal corresponent a la *m/z* de **6664** (habitualment al voltant de 20 min). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 77,8 % (45,1 min).

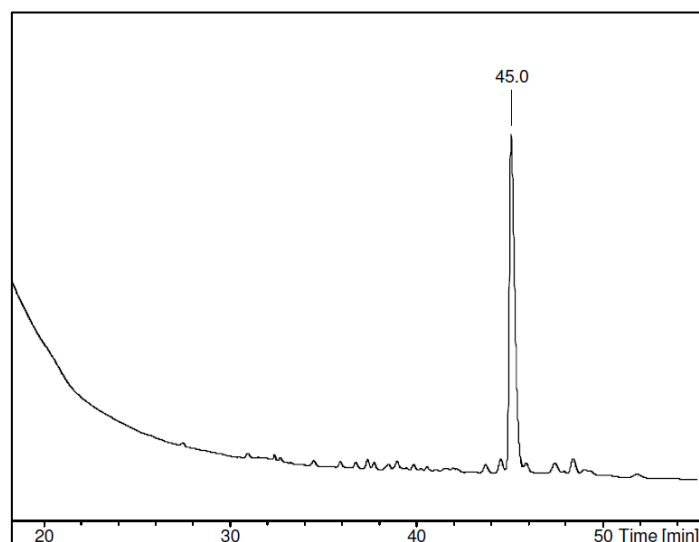


Figura 256. Cromatograma de **6664_UB-26923-01**. (Mètode D, *apartat 8.3.3*).

8.5.10.5. SÍNTESI DE 6664_UB-26924

La reacció es va dur a terme en un reactor de vidre de 50 mL i seguint el procediment general (*apartat 8.5.10.1*). El sòlid **7006_UB-26920-01** (200 mg) es va tractar amb la barreja TFA (3900 µL)/TIPS (264 µL)/EDT (176 µL) i a les 7 h de reacció, la suspensió es va filtrar a pressió reduïda (filtració ràpida). La dissolució obtinguda es va precipitar amb TBME (25 mL) i el sòlid obtingut (**6664_UB-26924-01**) es va analitzar per HPLC (**Figura 257**), observant-se un temps de retenció

no habitual en el pic principal corresponent a la m/z de **6664**. La puresa cromatogràfica del producte **6664** va ser del 74,8 % (36,9 min).

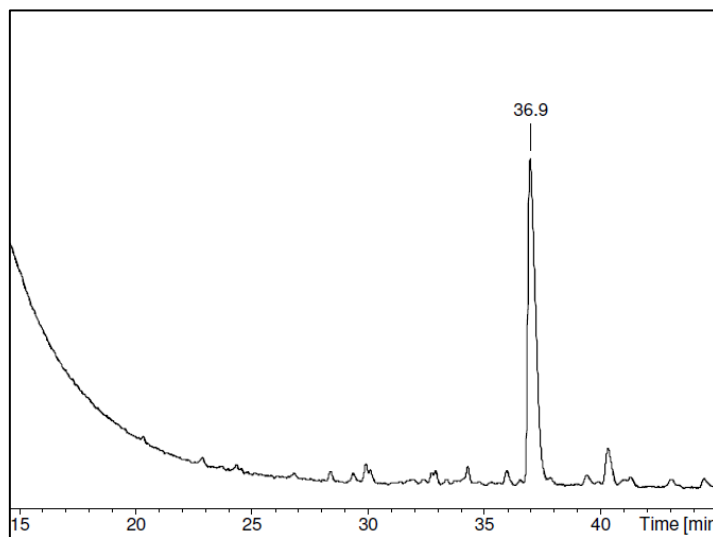


Figura 257. Cromatograma de **6664_UB-26924-01**. (Mètode C, apartat 8.3.3).

8.5.10.6. SÍNTESI DE **6664_UB-26935**

Les següents proves es van dur a terme en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica. El sòlid **7006_UB-26932-01** (50 mg) es va carregar i es van provar diferents barreges de TFA i capturadors de carbocations. El cru de reacció es va agitar a 600 rpm a ta durant 5 h. A continuació, es va addicionar 2-MeTHF (1 mL) i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut es va analitzar per HPLC-MS per avaluar la puresa cromatogràfica del producte desitjat i les impureses generades, però no es va determinar la quantitat de sòlid obtinguda.

Prova 1. Barreja de TFA (990 μ L)/TIPS (110 μ L). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 47,5 % (20,0 min, **Figura 258**).

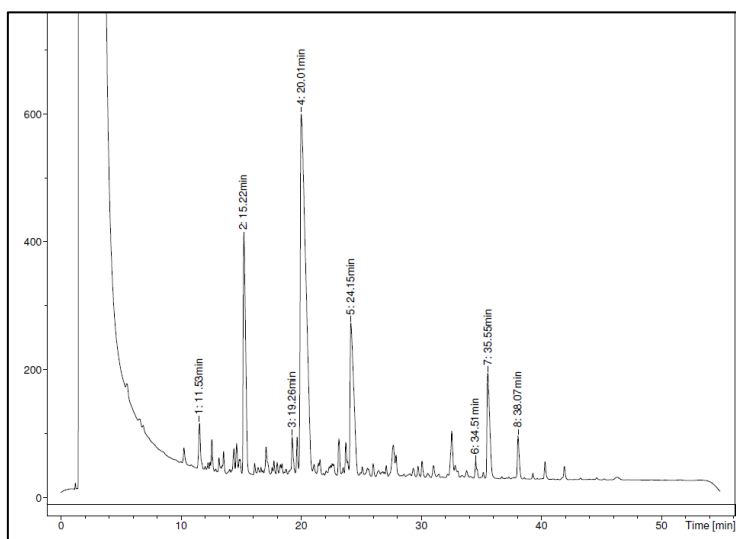


Figura 258. Cromatograma de **6664_UB-26935-P1-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 2. Barreja de TFA (990 μL)/TES (110 μL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 52,7 % (19,6 min, **Figura 259**).

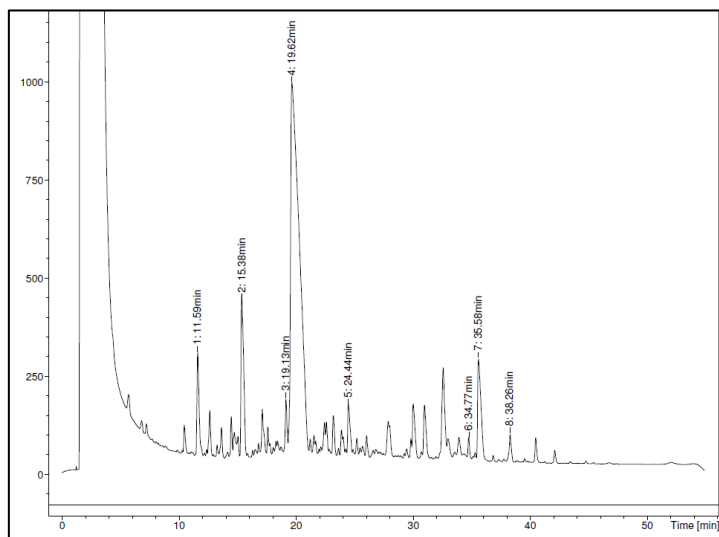


Figura 259. Cromatograma de **6664_UB-26935-P2-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 3. Barreja de TFA (880 μL)/TIPS (132 μL)/1-octanol (88 μL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 69,0 % (18,7 min, **Figura 260**).

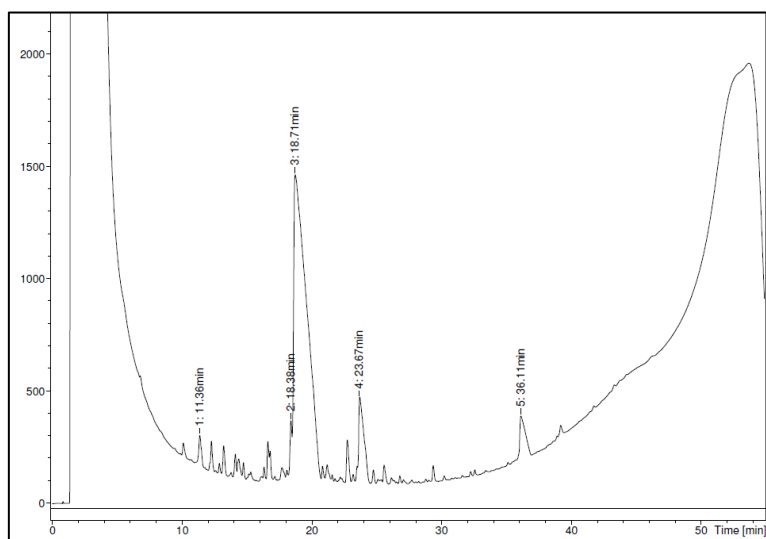


Figura 260. Cromatograma de **6664_UB-26935-P3-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 4. Barreja de TFA (990 μL)/TIPS (83 μL)/H₂O (28 μL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 58,2 % (17,8 min, **Figura 261**).

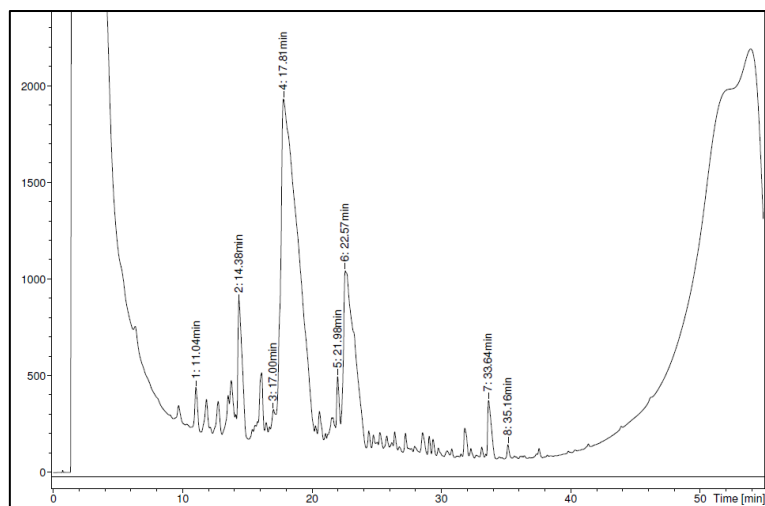


Figura 261. Cromatograma de **6664_UB-26935-P4-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 5. Barreja de TFA (990 µL)/TES (66 µL)/1-octantiol (44 µL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 62,9 % (20,5 min, **Figura 262**).

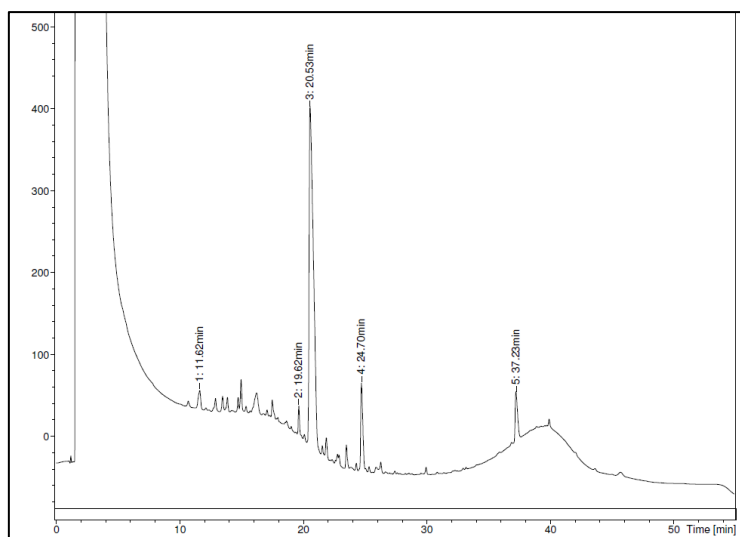


Figura 262. Cromatograma de **6664_UB-26935-P5-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 6. Barreja de TFA (990 µL)/TIPS (66 µL)/1-octantiol (44 µL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 62,4 % (20,3 min, **Figura 263**).

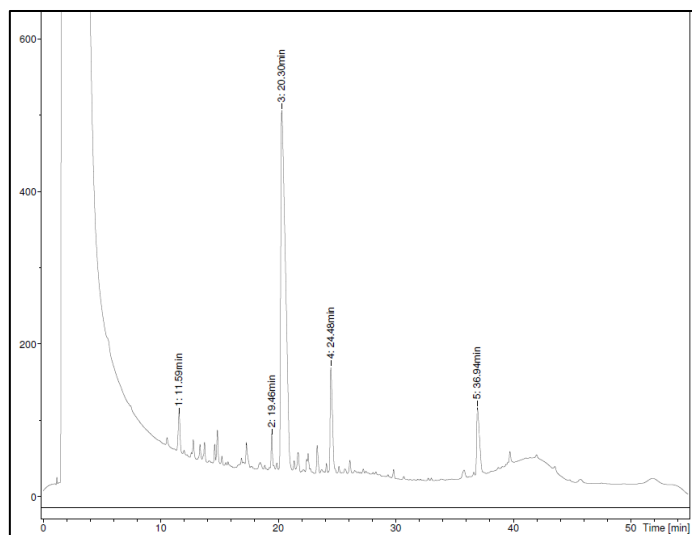


Figura 263. Cromatograma de **6664_UB-26935-P6-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

8.5.10.7. SÍNTESI DE **6664_UB-26938**

Les següents proves es van dur a terme en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica i el procediment utilitzat va ser el descrit per la prova **6664_UB-26935** (apartat 8.5.10.6), però amb un temps de reacció d'1 h. El producte de partida va ser **7006_UB-26932-01** (50 mg).

Prova 1. Barreja de TFA (990 µL)/TES (110 µL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 60,8 % (18,9 min, **Figura 264**).

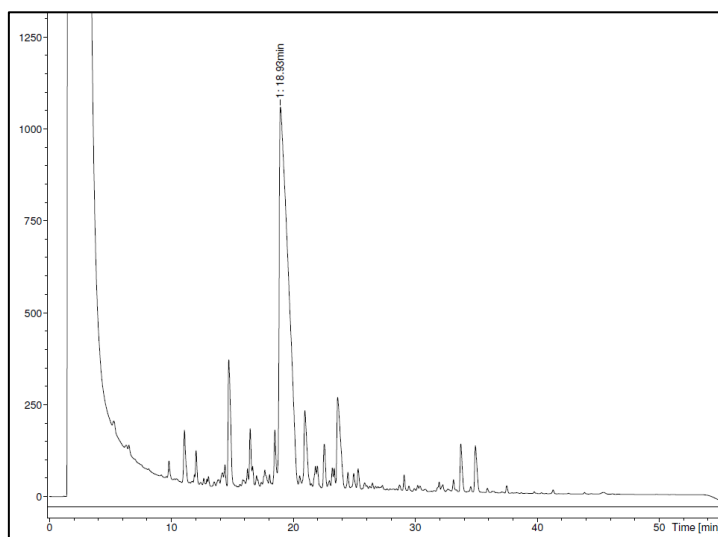


Figura 264. Cromatograma de **6664_UB-26938-P1-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 2. Barreja de TFA (880 µL)/TES (110 µL)/1-octantiol (110 µL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 67,8 % (19,9 min, **Figura 265**).

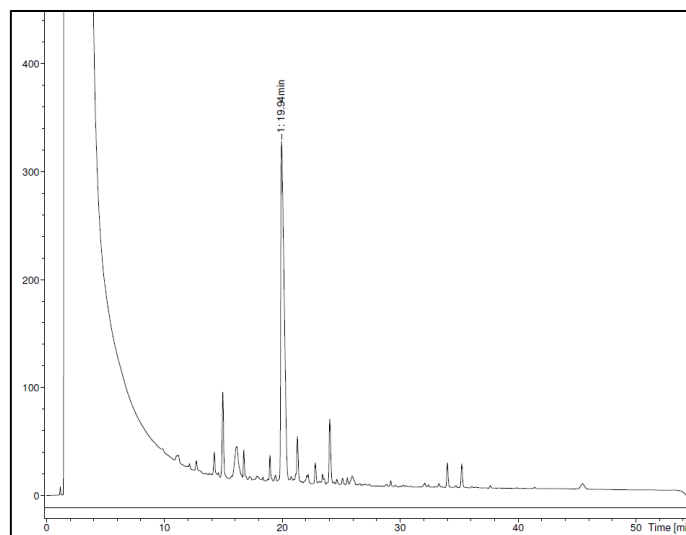


Figura 265. Cromatograma de **6664_UB-26938-P2-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

8.5.10.8. SÍNTESI DE **6664_UB-26940**

La reacció es va dur a terme en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica. El sòlid **7006_UB-26932-01** (28 mg) es va tractar amb la barreja TFA (880 µL)/TES (110 µL)/1-octantiol (110 µL) i el cru de reacció es va agitar a 600 rpm a ta durant 1 h. A continuació, es va addicionar 2-MeTHF (2 mL) i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 266**) però no es va determinar la quantitat obtinguda de sòlid. El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 56,5 % (21,6 min).

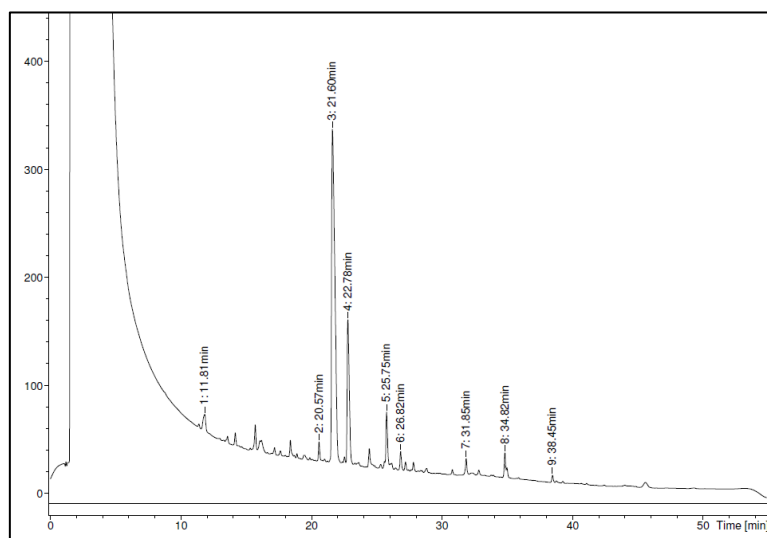


Figura 266. Cromatograma de **6664_UB-26940-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

8.5.10.9. SÍNTESI DE **6664_UB-26941**

La reacció es va dur a terme en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica. El sòlid **7006_UB-26932-01** (50 mg) es va tractar amb la barreja de TFA (470 µL)/TES (59 µL)/1-octantiol (59 µL). La mescla es va agitar a 600 rpm a ta i una alíquota del cru es va analitzar per HPLC-MS, cada 1 h, durant 4,5 h. A continuació, es va addicionar 2-MeTHF (1 mL) i la suspensió es va filtrar a pressió reduïda. El sòlid obtingut es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 267**) però no es va

determinar la quantitat obtinguda de sòlid. La puresa cromatogràfica de **6664** va ser del 66,9 % (20,3 min).

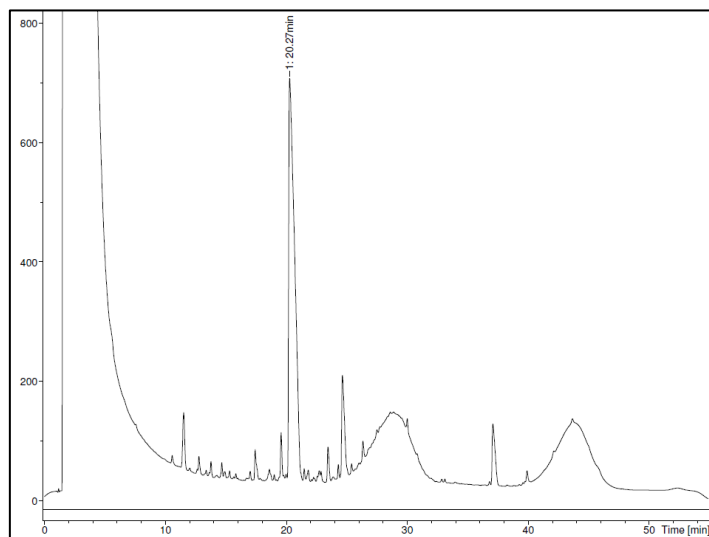


Figura 267. Cromatograma de **6664_UB-26941-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

8.5.10.10. SÍNTESI DE **6664_UB-26944**

Les següents proves es van dur a terme en un tub d'assaig proveït d'agitació magnètica. El sòlid **7006_UB-26932-01** (100 mg) es va carregar i es van provar diferents barreges de TFA/TES/1-octantiol i diferents concentracions de reacció. La mescla es va agitar a 600 rpm a ta, el cru es va dividir en 3 parts i el pèptid desitjat es va precipitar amb 2-MeTHF (de 0,5 mL a 2 mL) a diferents temps de reacció (1 h, 2,5 h i 5 h). Els sòlids obtinguts es van analitzar per HPLC-MS però no es va determinar la quantitat de sòlid obtinguda en cada experiment.

Prova 1. Barreja TFA (1600 µL)/TES (400 µL)/1-octantiol (2000 µL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 37,0 % (23,9 min) en el sòlid obtingut a la 1 h de reacció, del 53,3 % (23,1 min) en el sòlid obtingut a les 2,5 h de reacció i del 71,7 % (23,9 min) en el sòlid obtingut a les 5 h de reacció (**Figura 268**).

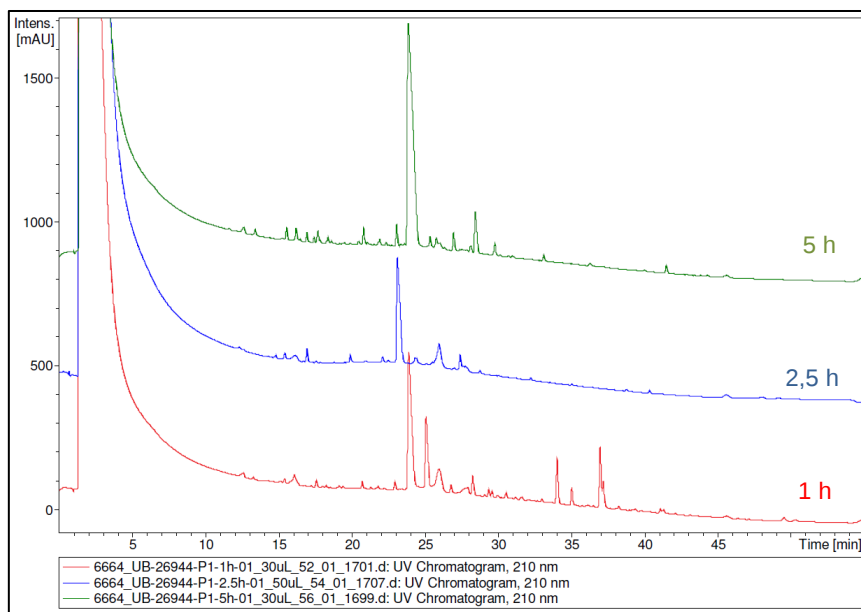


Figura 268. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de **6664_UB-26944-P1**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 2. Barreja TFA (470 μ L)/TES (118 μ L)/1-octantíol (588 μ L). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 24,1 % (23,3 min) en el sòlid obtingut a la 1 h de reacció, del 62,9 % (23,4 min) en el sòlid obtingut a les 2,5 h de reacció i del 64,5 % (22,9 min) en el sòlid obtingut a les 5 h de reacció (**Figura 269**).

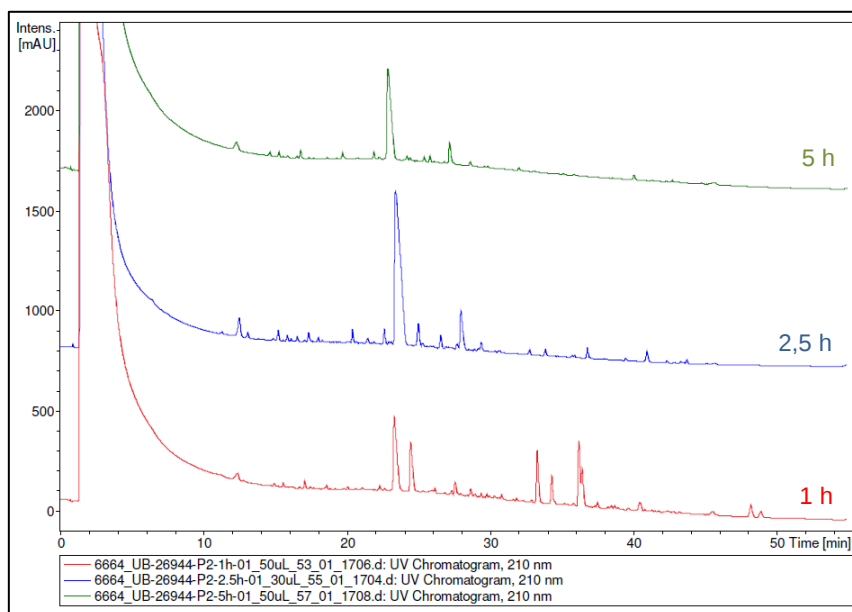


Figura 269. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de **6664_UB-26944-P2**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 3. Barreja TFA (3200 μ L)/TES (400 μ L)/1-octantíol (400 μ L). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 59,8 % (19,3 min) en el sòlid obtingut a la 1 h de reacció, del 62,2 % (19,9 min) en el sòlid obtingut a les 2,5 h de reacció i del 63,4 % (19,5 min) en el sòlid obtingut a les 5 h de reacció (**Figura 270**).

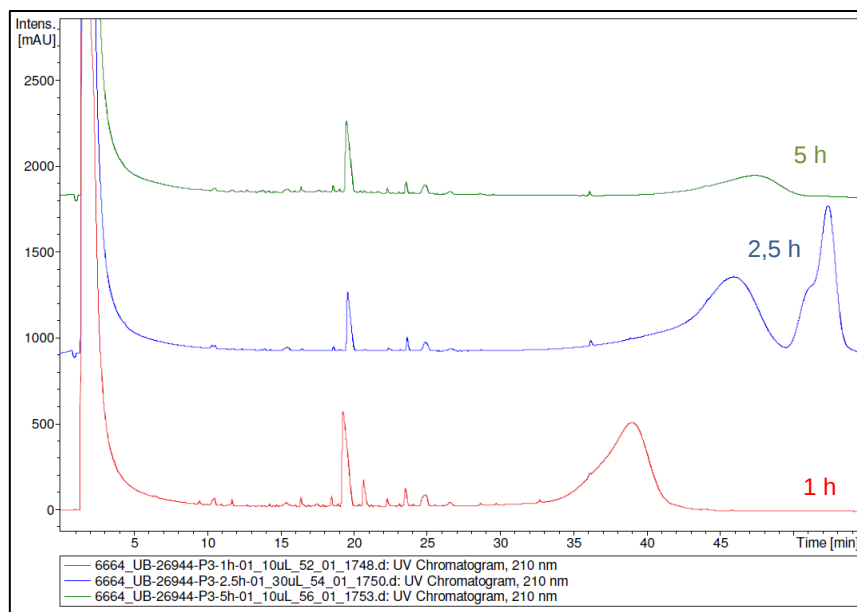


Figura 270. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de **6664_UB-26944-P3**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 4. Barreja TFA (941 µL)/TES (118 µL)/1-octantíol (118 µL). El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 61,2 % (19,0 min) en el sòlid obtingut a la 1 h de reacció, del 58,8 % (19,6 min) en el sòlid obtingut a les 2,5 h de reacció i del 57,4 % (19,4 min) en el sòlid obtingut a les 5 h de reacció (**Figura 271**).

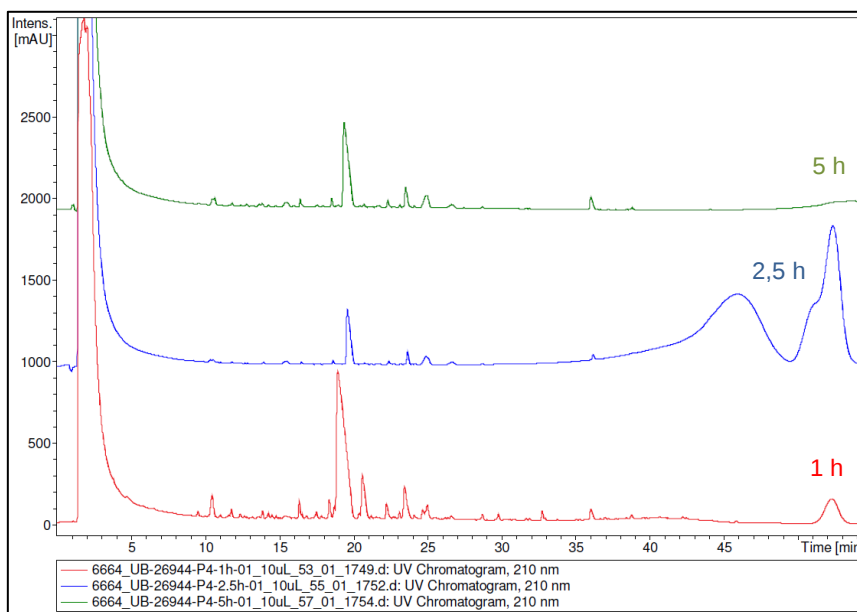


Figura 271. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de **6664_UB-26944-P4**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

Prova 5A. Barreja TFA (1090 µL)/TES (182 µL)/1-octantíol (545 µL). En aquesta prova només es va precipitar sòlid a les 2,5 h i el producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 72,0 % (19,4 min, **Figura 272**).

Prova 5B. Mateix experiment que Prova 5A. El producte **6664** es va detectar amb una puresa cromatogràfica del 72,5 % (19,4 min, **Figura 272**).

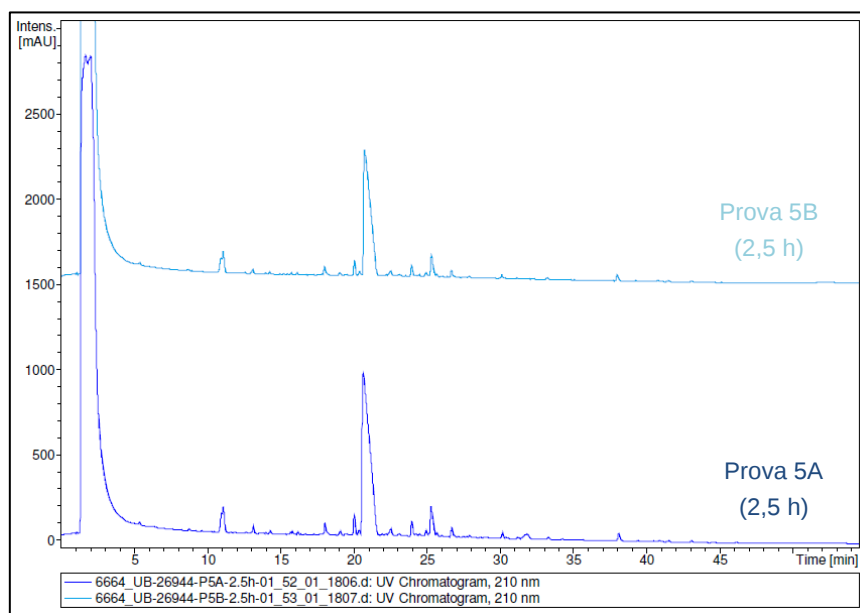


Figura 272. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts en l'obtenció de **6664_UB-26944-P5**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

8.5.10.11. SÍNTESI DE **6664_UB-26948**

La barreja de TFA (8 mL)/TES (2 mL)/1-octantíol (10 mL) es va preparar i es va transferir a un reactor de 100 mL proveït d'agitació mecànica amb pales de tefló abatibles. La mescla es va agitar a 200 rpm, la temperatura externa es va programar a 5 °C i el sòlid **7006_UB-26932-01** (1,0 g) es va carregar al reactor. La mescla de reacció es va agitar 10 min a 5 °C, i a continuació, es va programar una rampa de temperatura de 5 °C a 25 °C en 20 min. La mescla de reacció va esdevenir una suspensió rosa pàl·lid. A les 5 h de reacció, la temperatura externa es va ajustar a 3 °C i es va addicionar 2-MeTHF (40 mL) al cru en 15 min. La suspensió es va filtrar a pressió reduïda i el sòlid resultant es va assecar al dessecador de buit fins a pes constant. El sòlid obtingut (427 mg de **6664_UB-26948-01**) es va analitzar per HPLC-MS (**Figura 273**), determinant-se una puresa cromatogràfica del 70,4 % per **6664** (18,6 min).

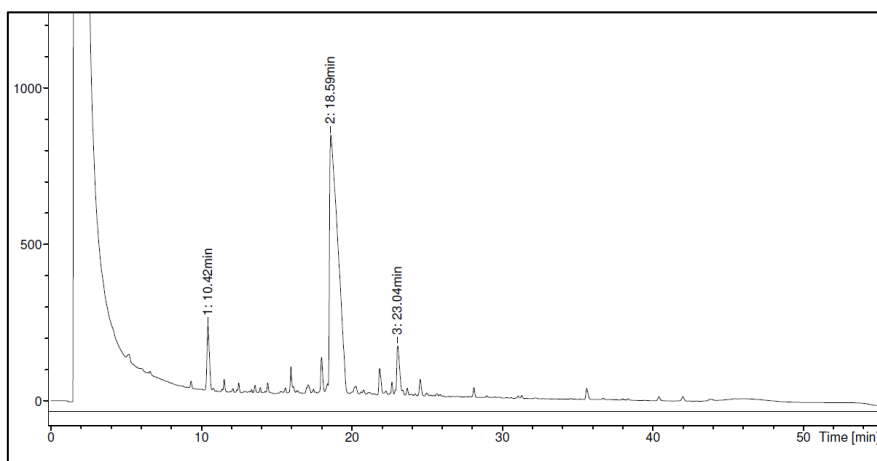
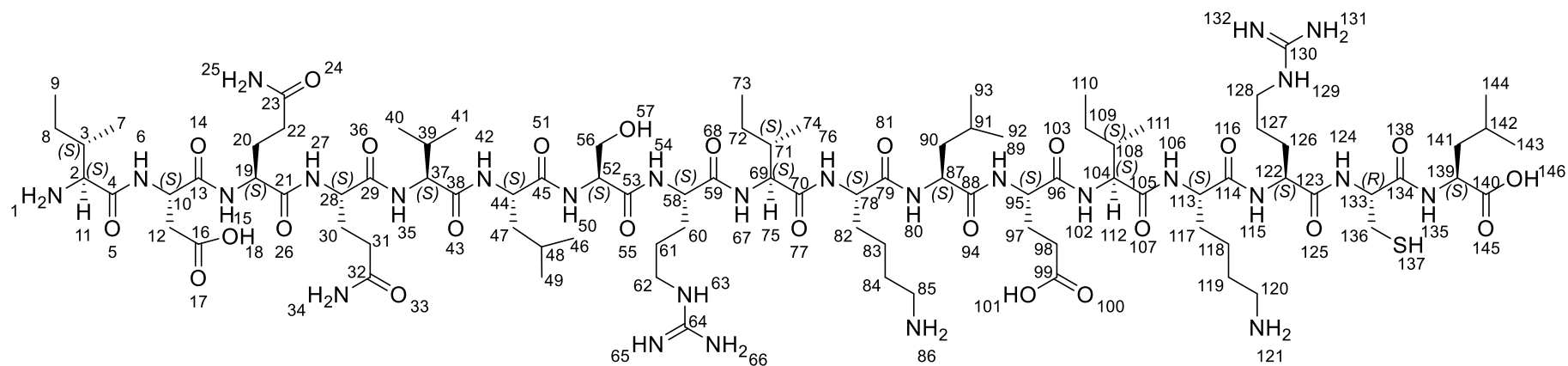


Figura 273. Cromatograma de **6664_UB-26948-01**. (Mètode D, apartat 8.3.3).

8.5.11. CARACTERITZACIÓ DE 6664 (LOT UB-26948)

**6664**Fórmula química: $C_{90}H_{163}N_{27}O_{25}S$ Massa exacta: m/z 2054,2034 $[(M+2)/2]^{2+} = m/z$ 1028,1090

8.5.11.1. ESPECTROMETRIA DE MASSES

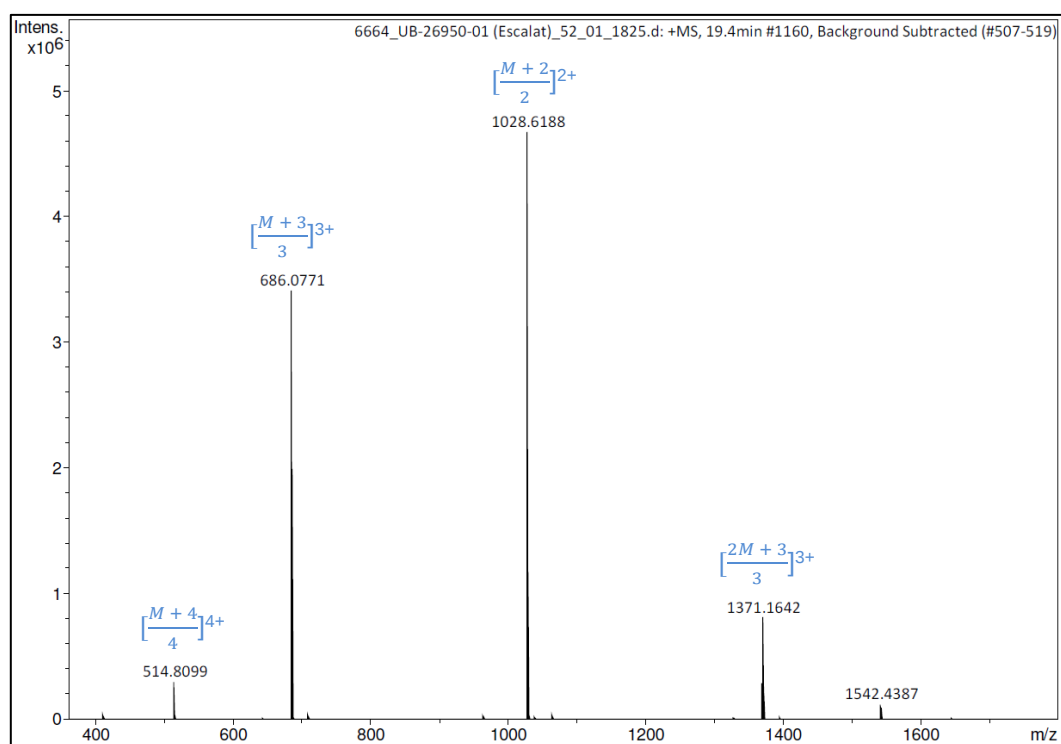
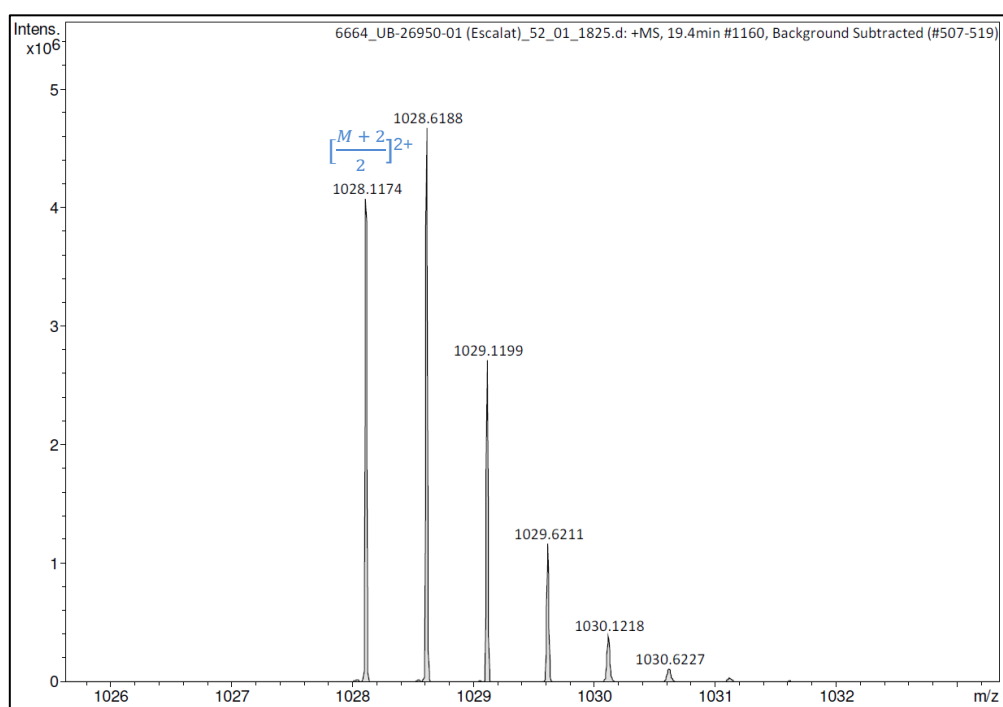


Figura 274. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de **6664_UB-26948-01**.

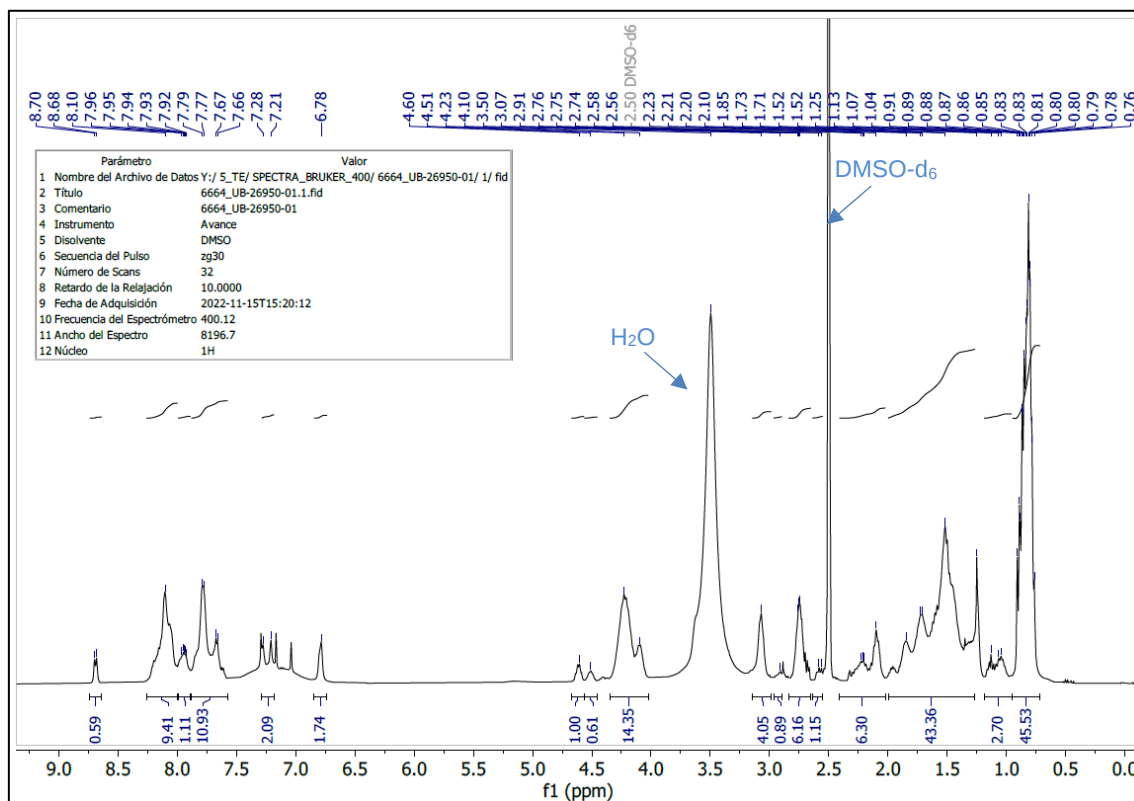
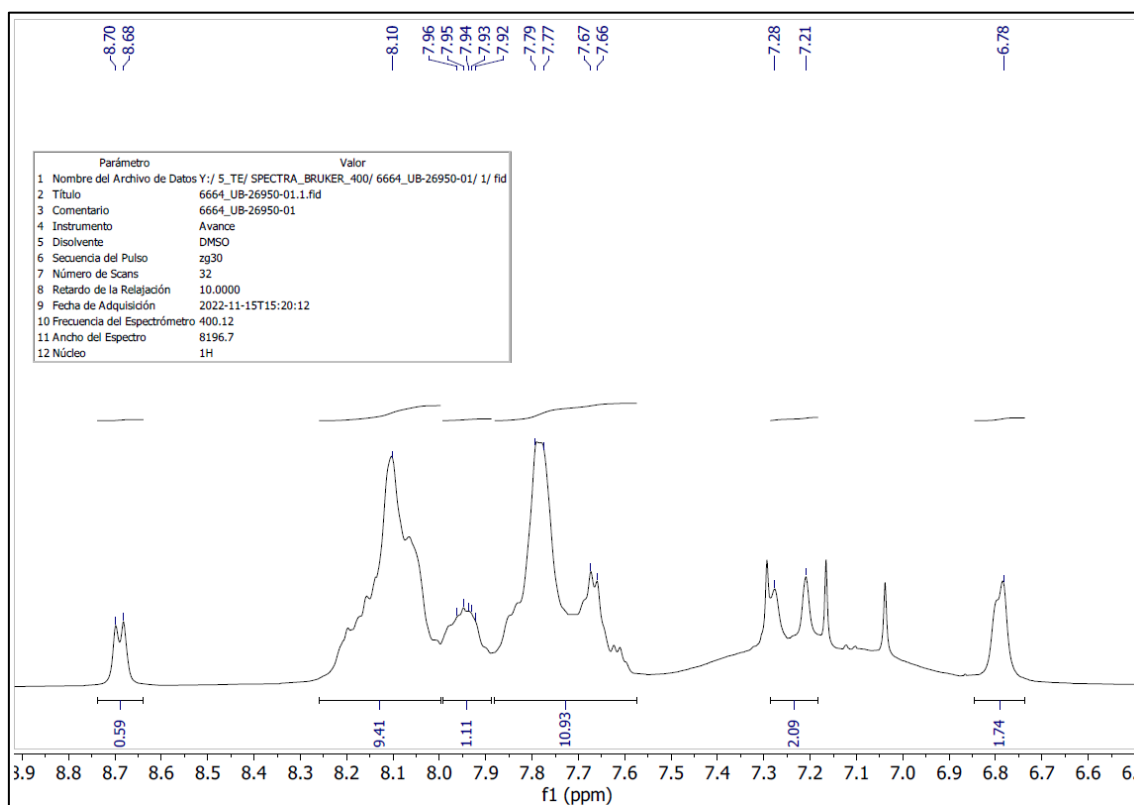


$$[M+2/2]^{2+}_{\text{calculada}} = m/z \, 1028,1090$$

$$[M+2/2]^{2+}_{\text{experimental}} = m/z \, 1028,1174$$

Figura 275. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de **6664_UB-26948-01**.

8.5.11.2. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

8.5.11.2.1. ESPECTRES DE ^1H -RMNFigura 276. Espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6664_UB-26948-01.Figura 277. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6664_UB-26948-01.

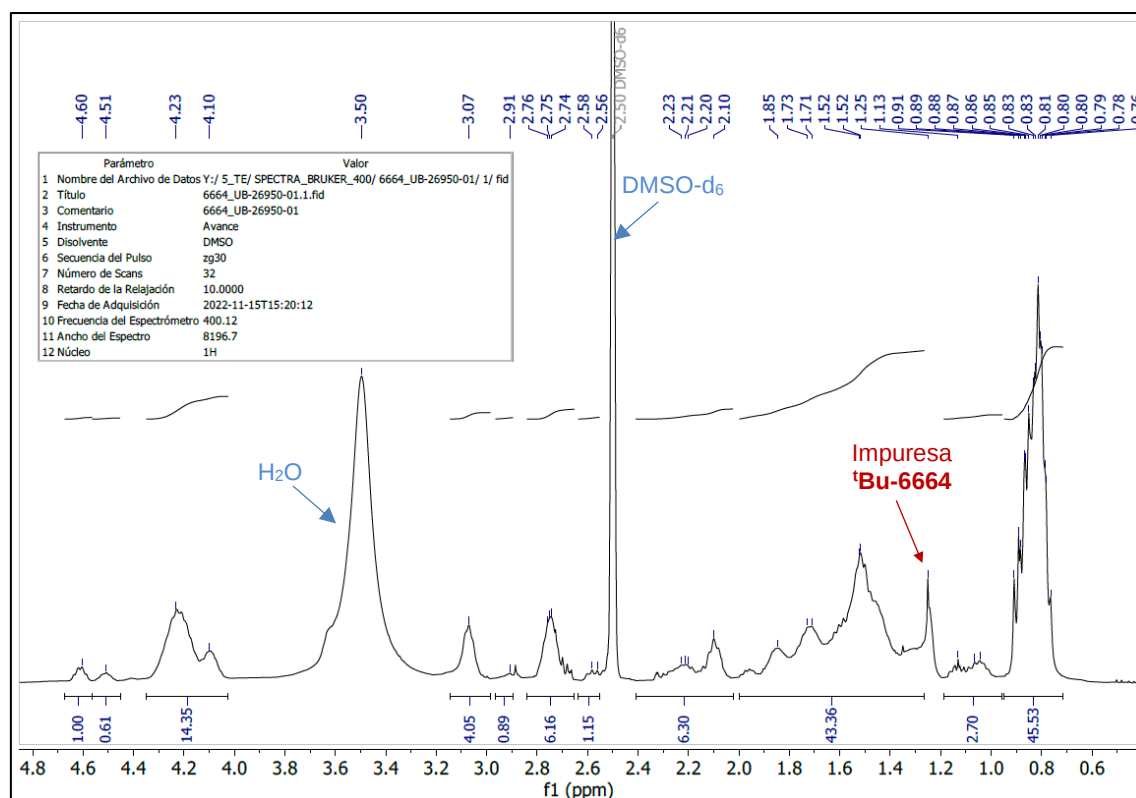


Figura 278. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de **6664_UB-26948-01**.

Taula 89. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de ^1H -RMN (400 MHz) en DMSO-d_6 de **6664_UB-26948-01**. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).

δ (ppm)	Multiplicitat	Constant d'acoblament (Hz)	Integral	REGIÓ	ASSIGNACIÓ
8,69	d	6,6	1	NH Amides peptídiques	H6 / H15 / H27 / H35 / H42 / H46 / H54 / H67 / H76 / H80 / H89 / H102 / H106 / H115 / H124 / H135
8,30 – 7,60	multiplet	-	21	NH Guanidina	H63 / H65 / H66 / H129 / H131 / H132
				NH Amides	H25+H34
7,28	multiplet	-	2	NH Guanidina	H63 / H65 / H66 / H129 / H131 / H132
6,78	<i>broad signal</i>	-	2		
4,60– 4,00	multiplet	-	16	CH	H10+H19+H28+H37 +H44+H52+H58+H69+

				Cadena peptídica	H78+H87+H95+H104+H113+H122+H133+H139
3,50 Senyal d'H ₂ O	multiplet	-	2	CH ₂	H56
			1	CH	H11
3,2 – 2,60	multiplet	-	12	CH ₂	H62+H128+H136+H120+H85+H12
2,60 – 1,00	multiplet	-	48	CH ₂	H20+H22+H30+H31+H47+H61+H60+H82+H83+H84+H97+H98+H90+H117+H118+H119+H127+H126+H141+H8+H72+H109
				CH	H142+H108+H91+H71+H48+H39+H3
1,00 – 0,60	multiplet	-	45	CH ₃	H144+H143+H110+H111+H93+H92+H73+H74+H49+H50+H40+H41+H7+H9
				CH ₂ *	H8'+H72'+H109'

Els senyals dels protons bescanviables (**H1+H18+H57+H86+H101+H121+H137+H146**) no es van poder assignar ja que són senyals molt amples i el seu desplaçament químic depèn fonamentalment del pH de la dissolució.

8.5.12. CÀLCULS

Per tal de facilitar la comprensió dels càlculs per nosaltres **6664** és la sal que està composta per **6664** base lliure (BL) + TFA i el mateix per la impuresa de **^tBu-6664** (**^tBu-6664** base lliure (BL) + TFA).

8.5.12.1. CÀLCUL PER A LA QUANTIFICACIÓ DEL TFA (LOT **6664_UB-26948-01**)

Els càlculs s'han realitzat a partir del ¹⁹F-RMN de la **Figura 116** (apartat 5.6.5).

(1) Dades inicials:

- 7,9 mg de 5-fluoro-2-oxindol (patró)

- 40,0 mg de **6664_UB-26948-01**

(2) Càlcul de mols de TFA:

$$\text{mols de F patró} = \frac{\text{mg de patró}}{\text{PM de patró}} \times \text{PURESA} = \frac{7,9 \text{ mg}}{151,14 \text{ mg/mmol}} \times 1 = 5,23 \cdot 10^{-2} \text{ mmols}$$

(3) Càlcul dels mmols de TFA a la mostra :

$$\text{Integració normalitzada pel TFA} = 79,20 \times \frac{1 \text{ àtom de F en patró}}{3 \text{ àtoms de F en TFA}} = 26,40$$

$$\text{mmols de TFA en la mostra} = \frac{26,40}{20,80} \times 5,23 \cdot 10^{-2} \text{ mmols de F en patró} = 6,64 \cdot 10^{-2} \text{ mmols}$$

suposant que les fonts de TFA són **6664** i subproductes d'origen peptídic com la impuresa **^tBu-6664** (pèptids de delació, pèptids procedents de reaccions secundàries):

$$\text{mmols totals de TFA en mostra} = 6,64 \cdot 10^{-2} \text{ mmols} = 5 \times (n_{6664} + n_{t\text{Bu-6664}})$$

On n_{6664} són els mmols de **6664** i $n_{t\text{Bu-6664}}$ són els mmols de **^tBu-6664**.

(4) Càlcul dels mg de TFA a la mostra:

$$6,64 \cdot 10^{-2} \text{ mmol TFA} \cdot \frac{114,02 \text{ mg TFA}}{1 \text{ mmol TFA}} = 7,57 \text{ mg}$$

$$\text{Percentatge de TFA en mostra} = \frac{7,57 \text{ mg TFA en mostra}}{40,00 \text{ mg de mostra}} \cdot 100 = 18,9 \%$$

8.5.12.2. CÀLCUL PER A LA QUANTIFICACIÓ DE DISSOLVENTS RESIDUALS I DE LA BASE LLIURE DE 6664 (LOT UB-26948-01)

Els càlculs s'han realitzat a partir del ^1H -RMN de la **Figura 117** (apartat 5.6.5).

(1) Dades inicials:

- 5,69 mg d'àcid maleic (patró)

- 40,27 mg de **6664_UB-26948-01**

(2) Integracions normalitzades de producte, dissolvent i patró:

$$2\text{-MeTHF} \rightarrow \frac{10,54}{2 \text{ H de metilè}} = 5,27$$

$$\text{DMF} \rightarrow \frac{0,82}{3 \text{ H de metil}} = 0,27$$

$$\mathbf{6664} \rightarrow \frac{11,33}{1 \text{ H d'amida}} = 11,33$$

$$\text{Àcid maleic} \rightarrow \frac{77,31}{2 \text{ H de doble enllaç}} = 38,66$$

(3) Càlcul dels mmols de patró a la mostra:

$$\text{mmols de patró} = \frac{\text{mg patró}}{\text{PM patró}} \times \text{PURESA} = \frac{5,69 \text{ mg}}{116,10 \text{ mg/mmol}} \times 0,9994 = \mathbf{4,90 \cdot 10^{-2} \text{ mmols}}$$

(4) Càlcul del percentatge de 2-MeTHF a la mostra:

$$\text{mmols de 2-MeTHF en mostra} = \frac{5,27}{38,66} \times 4,90 \cdot 10^{-2} \text{ mmol patró en mostra} = 6,68 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}$$

$$\text{mg de 2-MeTHF en mostra} = 6,68 \cdot 10^{-3} \text{ mmol de 2-MeTHF} \times \frac{86,10 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} = 5,75 \cdot 10^{-1} \text{ mg}$$

$\text{percentatge de 2-MeTHF en mostra} = \frac{5,75 \cdot 10^{-1} \text{ mg de 2-MeTHF en mostra}}{40,27 \text{ mg de mostra}} \times 100$ $= \mathbf{1,43 \%}$

(5) Càlcul del percentatge de DMF a la mostra:

$$\text{mmols de DMF en mostra} = \frac{0,27}{38,66} \times 4,90 \cdot 10^{-2} \text{ mmol patró en mostra} = 3,42 \cdot 10^{-4} \text{ mmol}$$

$$\text{mg de DMF en mostra} = 3,42 \cdot 10^{-4} \text{ mmol de DMF} \times \frac{73,09 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} = 0,03 \text{ mg}$$

$$\text{percentatge de DMF en mostra} = \frac{0,03 \text{ mg DMF en mostra}}{40,27 \text{ mg de mostra}} \times 100 < 0,1^4 \%$$

(6) Càlcul del percentatge de **BL₆₆₆₄** a la mostra:

$$\text{mmols de BL}_{6664} \text{ en mostra} = \frac{11,33}{38,66} \times 4,90 \cdot 10^{-2} \text{ mmol patró en mostra} = 1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$$

$$\text{mg de BL}_{6664} \text{ en mostra} = 1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmol de BL}_{6664} \times \frac{2055,52 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} = 29,60 \text{ mg}$$

$$\text{percentatge de BL}_{6664} \text{ en mostra} = \frac{29,60 \text{ mg BL}_{6664} \text{ en mostra}}{40,27 \text{ mg de mostra}} \times 100 = 73,5 \%$$

8.5.12.3. CÀLCUL PER A LA QUANTIFICACIÓ DE LA IMPURESA **BL_{tBu-6664}** MITJANÇANT DECONVOLUCIÓ DE SENYALS DE ¹H-RMN (LOT UB-26948-01)

Els càlculs s'han realitzat a partir del ¹H-RMN de la **Figura 40**.

(1) Dades inicials:

- 5,69 mg d'àcid maleic (patró)

- 40,27 mg de **6664_UB-26948-01**

(2) Càlcul dels mmols de patró a la mostra:

$$\text{mmols de patró} = \frac{\text{mg patró}}{\text{PM patró}} \times \text{PURESA} = \frac{5,69 \text{ mg}}{116,10 \text{ mg/mmol}} \times 0,9994 = 4,90 \cdot 10^{-2} \text{ mmols}$$

(3) Càlcul del percentatge i dels mmols de **BL_{tBu-6664}** a la mostra:

En el cas d'aquests senyals, les àrees han estat determinades a través d'un procés de convulació dut a terme amb el programa MestreNova (referència)

$$\text{Integració normalitzada d'àcid maleic} = \frac{1304,57}{2 \text{ H de doble enllaç}} = 652,29$$

$$\text{Integració normalitzada de BL}_{t\text{Bu-6664}} = \frac{89,13}{9 \text{ H de t-butil}} = 9,90$$

$$\begin{aligned} \text{mmols de BL}_{t\text{Bu-6664}} \text{ en mostra} &= \frac{9,90}{652,29} \times 4,90 \cdot 10^{-2} \text{ mmol patró en mostra} \\ &= 7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \end{aligned}$$

$$\text{mg de BL}_{t\text{Bu-6664}} \text{ en mostra} = 7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmol de BL}_{t\text{Bu-6664}} \times \frac{2111,63 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} = 1,57 \text{ mg}$$

⁴ Quantificacions per sota del 0,1 % s'expressen d'aquesta manera perquè el valor real està per sota del límit de quantificació (LOQ) de l'instrument.

$$\text{percentatge de } BL_{tBu-6664} \text{ en mostra} = \frac{1,57 \text{ mg } BL_{tBu-6664} \text{ en mostra}}{40,27 \text{ mg de mostra}} \times 100 = 3,9 \%$$

8.5.12.4. Càlcul per a la riquesa de 6664 i per a la quantificació del TRIFLUOROACETAT DE LA IMPURESA TERC-BUTILADA (LOT UB-26948-01)

- (1) Càlcul de la fracció molar de BL_{6664} i $BL_{tBu-6664}$:

La fracció molar es defineix com:

$$x_i = \frac{n_i}{n_t}$$

On n_i és el nombre de mols del component i de la mescla i n_t és el nombre total de mols de la mescla. Per tant, segons els resultats descrits a l'apartat 2.4:

$$x_{6664} = \frac{1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmols}}{1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmols} + 7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmols}} = 0,95$$

$$x_{tBu-6664} = \frac{7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmols}}{1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmols} + 7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmols}} = 0,05$$

- (2) Càlcul dels mmols de TFA associats a BL_{6664} i $BL_{tBu-6664}$:

Utilitzant la fórmula general:

$$n_i = x_i \cdot n_t$$

i el resultat descrit a l'apartat 2.1:

$$\text{mmols de TFA}_{6664} = 0,95 \times 6,64 \cdot 10^{-2} \text{ mmols de TFA totals} = 6,31 \cdot 10^{-2} \text{ mmols}$$

$$\text{mmols de TFA}_{tBu-6664} = 0,05 \times 6,64 \cdot 10^{-2} \text{ mmols de TFA totals} = 3,32 \cdot 10^{-3} \text{ mmols}$$

- (3) Càlcul de la estequiometria BL:TFA:

Utilitzant els resultats descrits a l'apartat 2.4

$$\text{Relació molar } (BL_{6664}:TFA) = \frac{6,31 \cdot 10^{-2} \text{ mmols de TFA}}{1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmols de } 6664} = 4,4$$

$$\text{Relació molar } (BL_{tBu-6664}:TFA) = \frac{3,32 \cdot 10^{-3} \text{ mmols de TFA}}{7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmols de } tBu-6664} = 4,4$$

- (5) Càlcul de la riquesa de 6664

$$\begin{aligned} \text{mg de } 6664 &= 1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mmols de } BL_{6664} \times \frac{1 \text{ mmol } 6664}{1 \text{ mmol de } BL_{6664}} \\ &\times \frac{2055,52 \text{ mg} + (4,4 \times 114,02) \text{ mg}}{1 \text{ mmol } 6664} = 36,82 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Riquesa de } 6664 = \frac{\text{mg de } 6664}{\text{mg de mostra}} \cdot 100 = \frac{36,82 \text{ mg}}{40,27 \text{ mg}} \cdot 100 = 91,44 \%$$

(6) Càlcul del percentatge de la impuresa **tBu-6664**:

$$\begin{aligned} & \text{mg de } \mathbf{tBu-6664} \text{ a la mostra} \\ &= 7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mmols de } \mathbf{BL_{tBu-6664}} \times \frac{1 \text{ mmol de } \mathbf{tBu-6664}}{1 \text{ mmol de } \mathbf{BL_{tBu-6664}}} \\ &\times \frac{2111,63 \text{ mg} + (4,4 \cdot 114,02) \text{ mg}}{1 \text{ mmol } \mathbf{tBu-6664}} = 1,94 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\mathbf{Riquesa de tBu-6664} = \frac{\text{mg de } \mathbf{tBu-6664}}{\text{mg de mostra}} \cdot 100 = \frac{1,94 \text{ mg}}{40,27 \text{ mg}} \cdot 100 = \mathbf{4,82 \%}$$

ANNEX

9. ANNEX

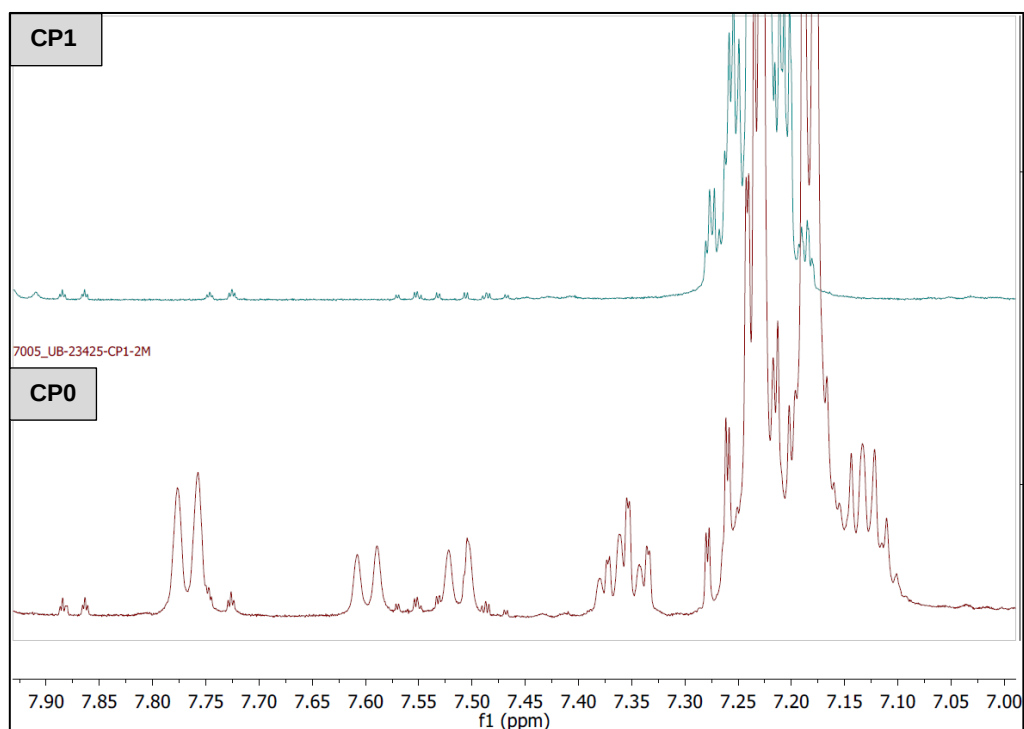


Figura A1. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de tetrapeptidil-resina abans (CP0) i després del tractament amb piperidina (CP1) per eliminar el grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de **7005_UB-23417**.

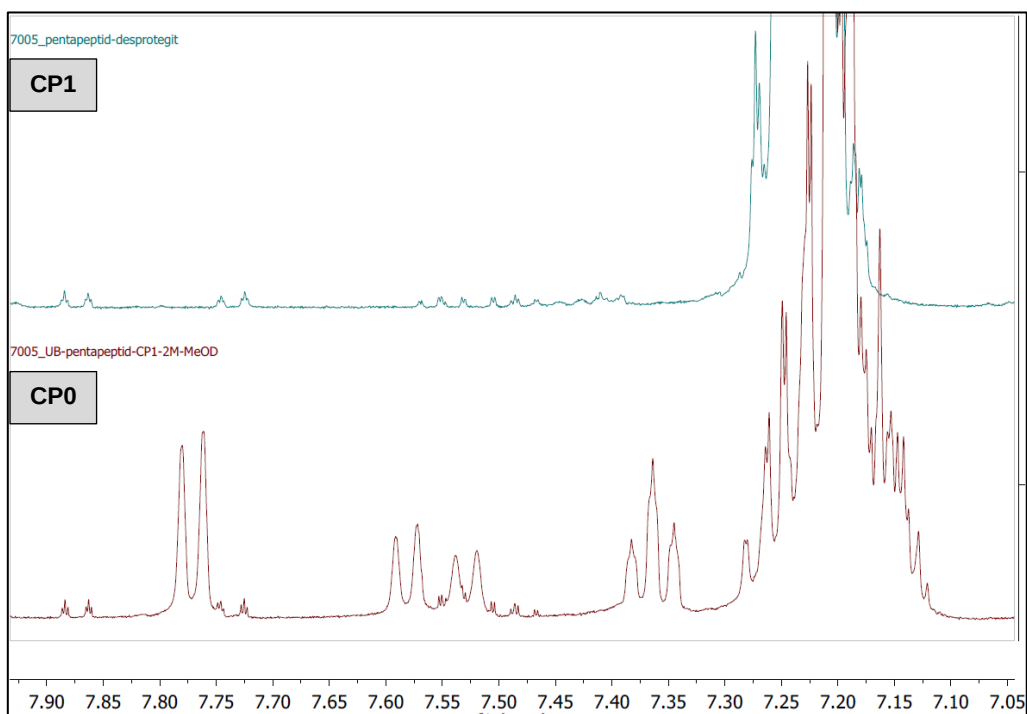


Figura A2. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de pentapeptidil-resina abans (CP0) i després del tractament amb piperidina (CP1) per eliminar el grup Fmoc del residu d'àcid aspàrtic en la síntesi de **7005_UB-23417**.

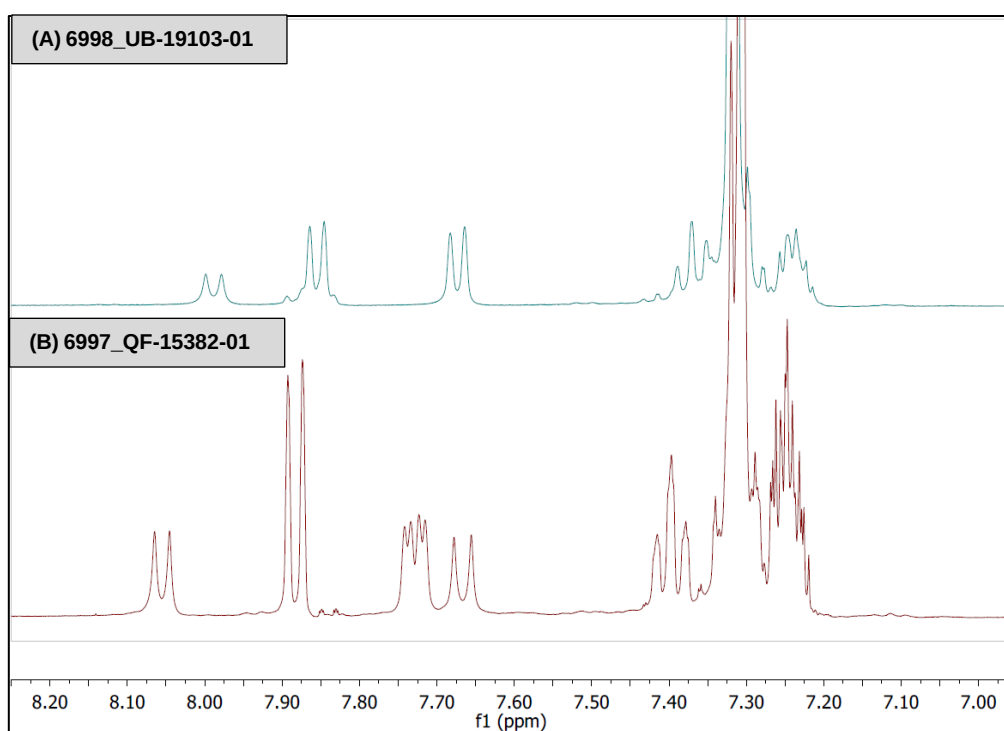


Figura A3. Regió aromàtica dels espectres de ^1H -RMN (DMSO- d_6) dels sòlids (A) 6998_UB-19103-01 i (B) 6997_QF-15382-01.

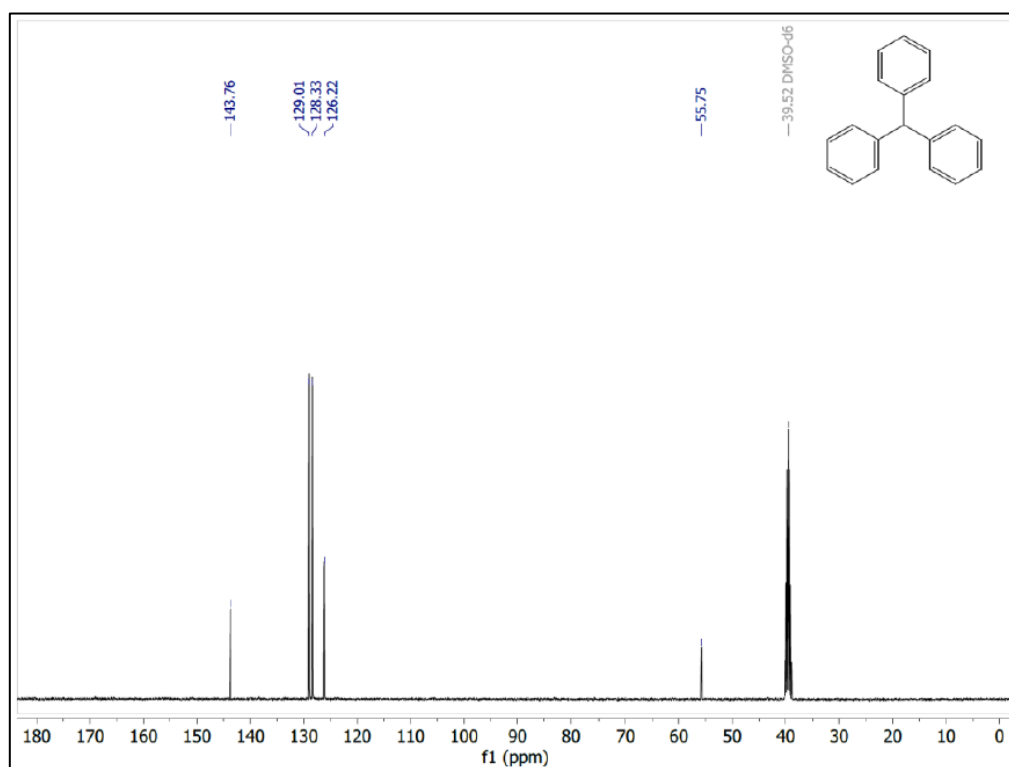


Figura A4. Espectre de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) del sòlid format en la síntesi de 6664_UB-26917 (trifenilmetà).

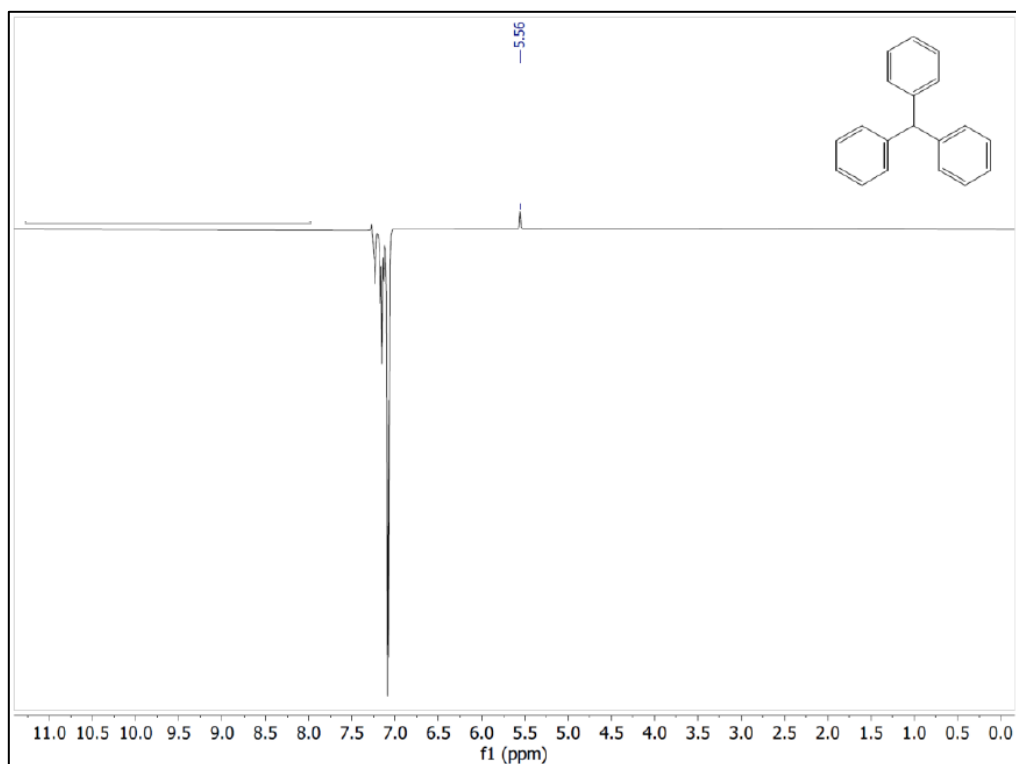


Figura A5. Espectre de NOESY-1D (DMSO- d_6) del sòlid format en la síntesi de **6664_UB-26917** (trifenilmetà).

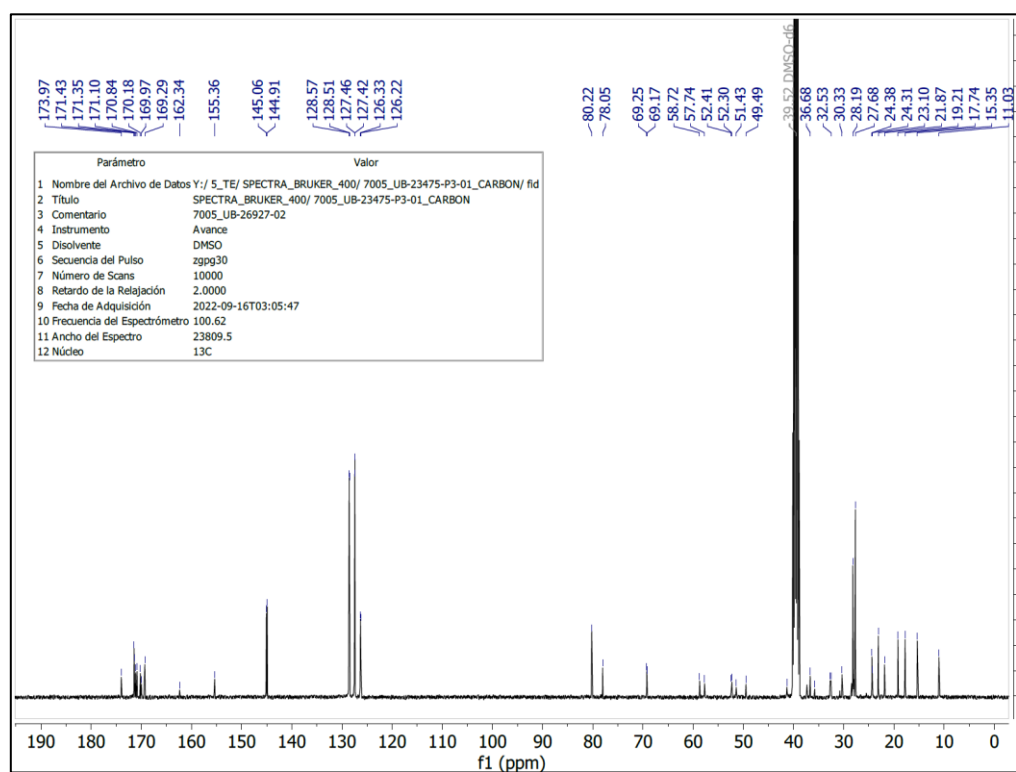


Figura A6. Espectre de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) del **7005_UB-23475-P3-01**.

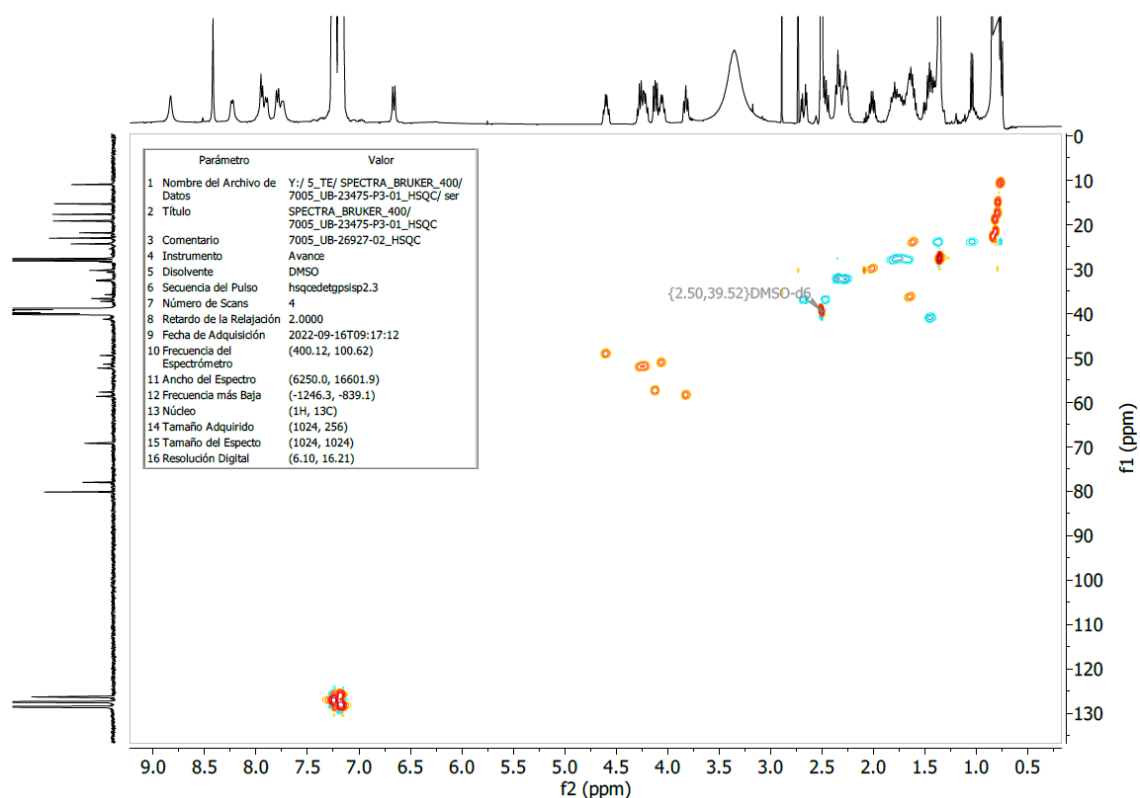


Figura A7. Espectre (^1H , ^{13}C)-HSQC (DMSO- d_6) del 7005_UB-23475-P3-01.

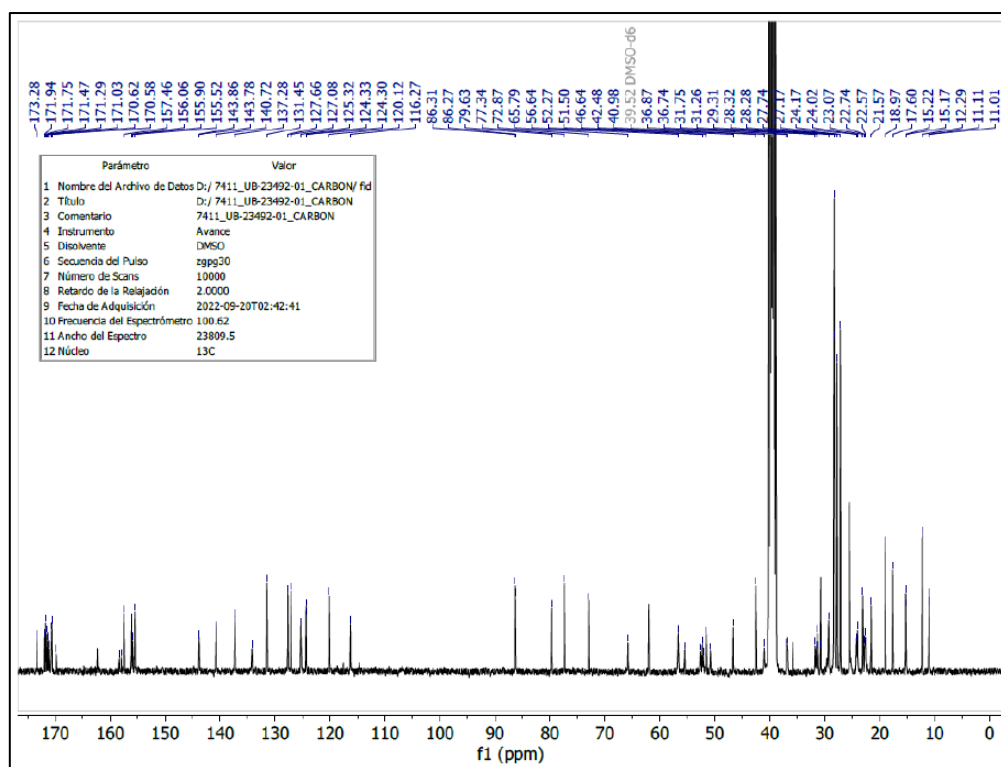


Figura A8. Espectre de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) del 7411_UB-23492-01.

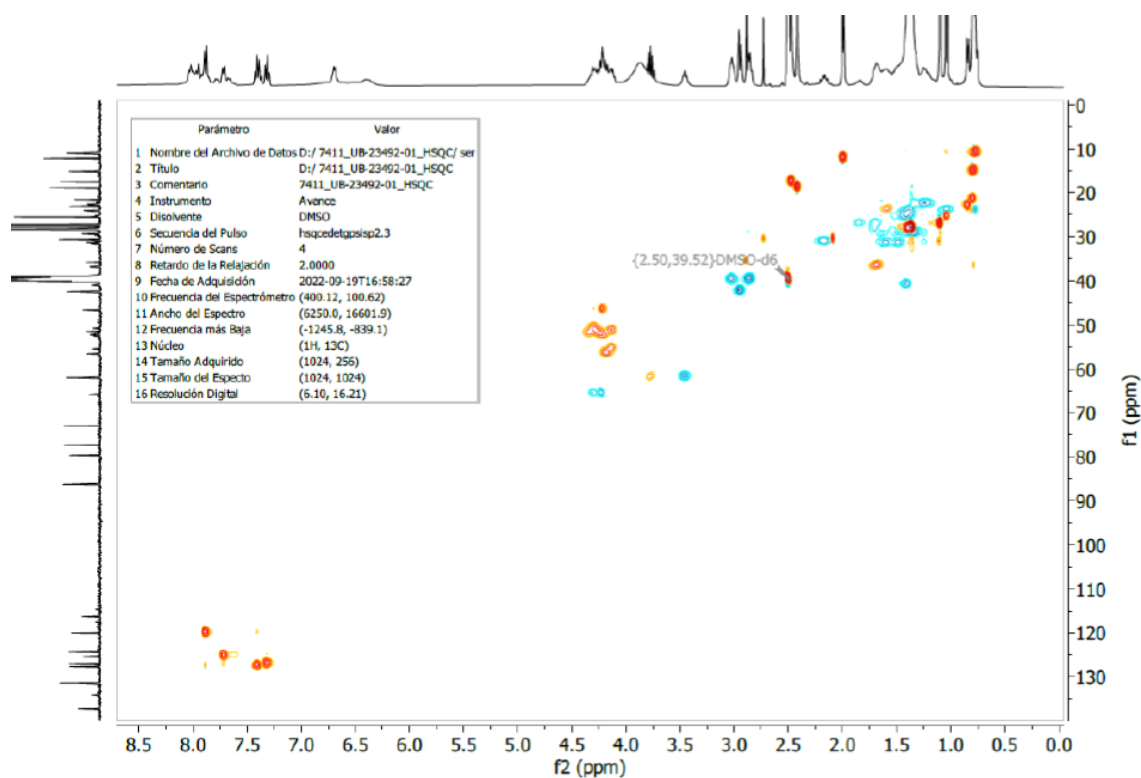


Figura A9. Espectre (^1H , ^{13}C)-HSQC (DMSO- d_6) del 7411_UB-23492-01.

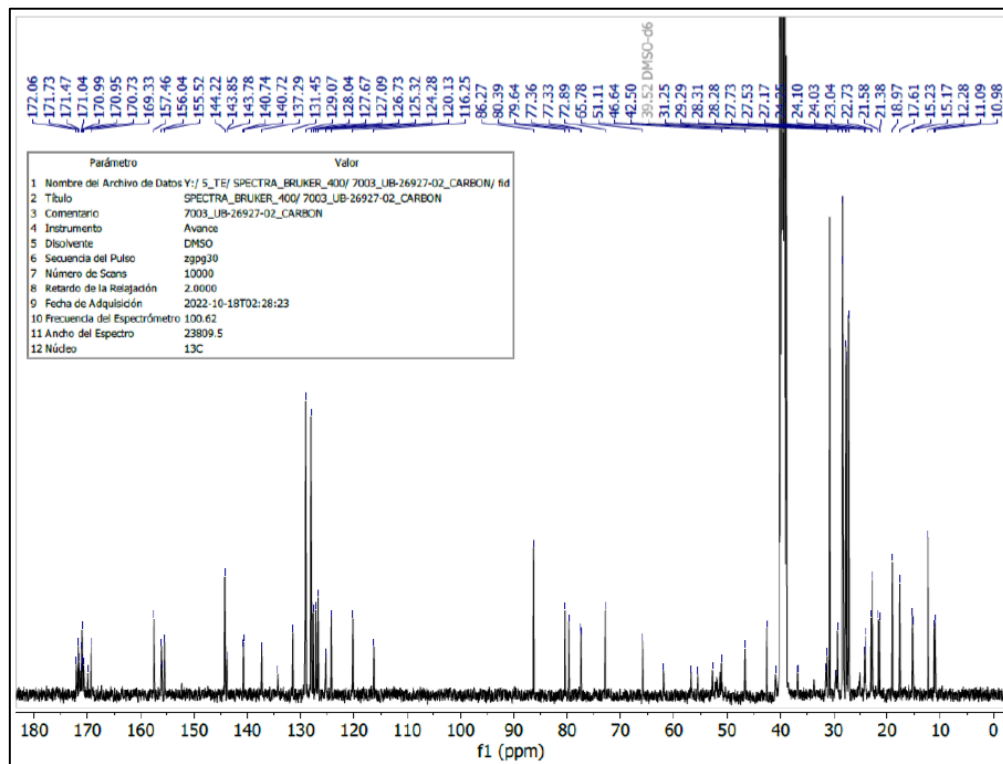


Figura A10. Espectre de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) del 7003_UB-26927-02.

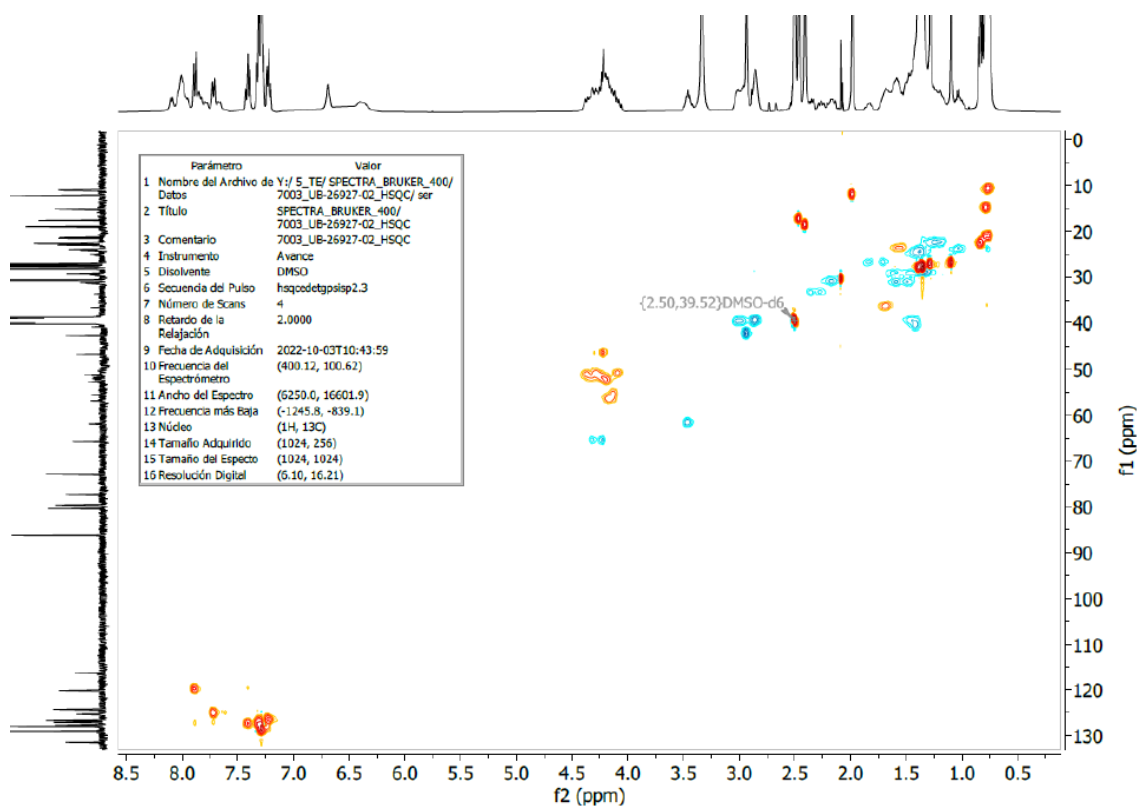


Figura A11. Espectre de (^1H , ^{13}C)-HSQC (DMSO- d_6) del 7003_UB-26927-02.

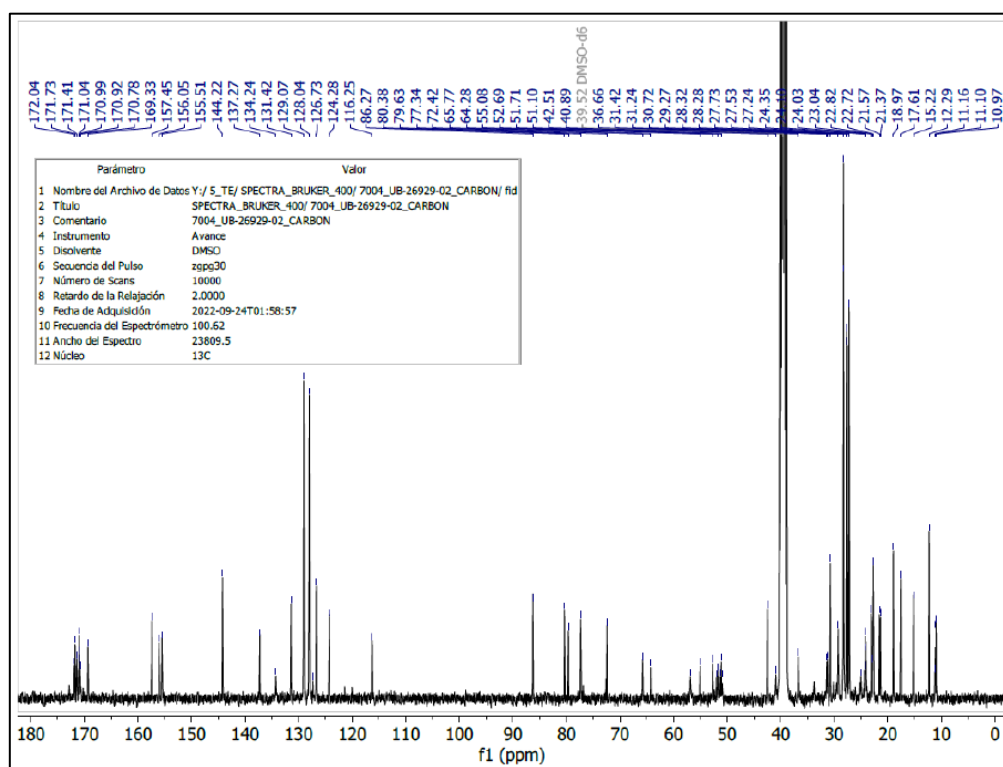


Figura A12. Espectre de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) del 7004_UB-26929-02.

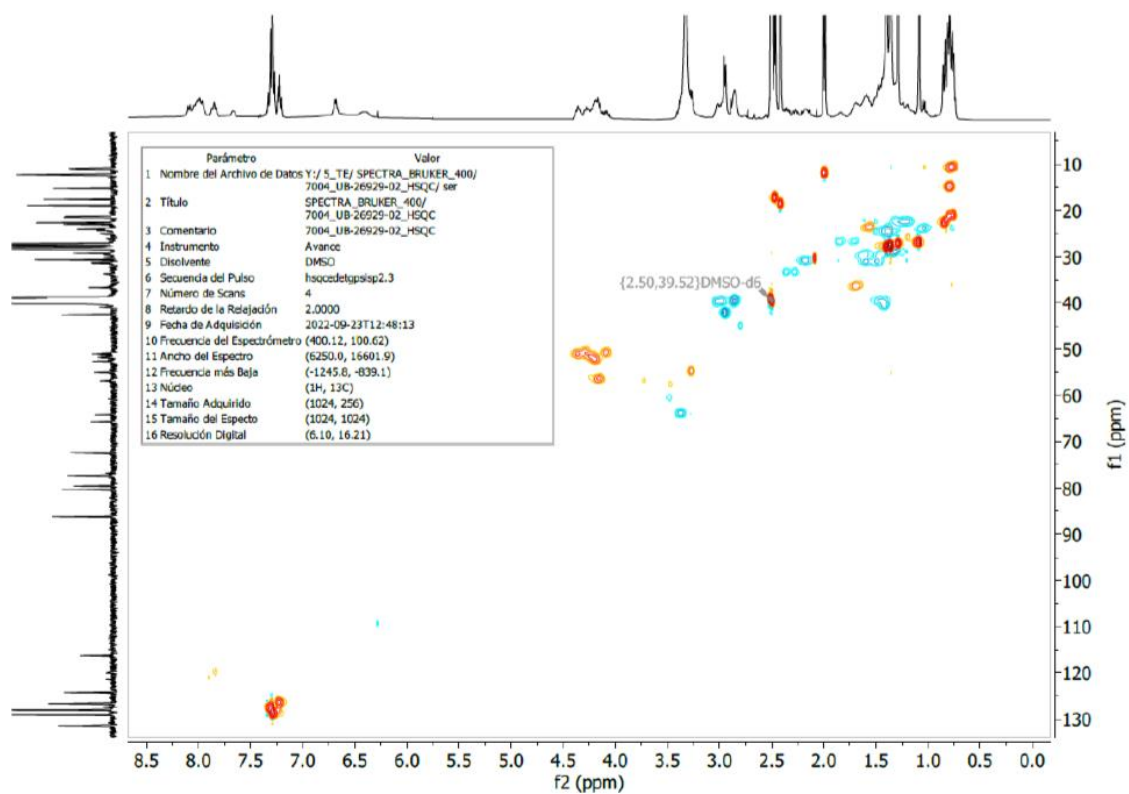


Figura A13. Espectre de (^1H , ^{13}C)-HSQC (DMSO- d_6) del 7004_UB-26929-02.

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Funció dels fàrmacs agonistes i antagonistes.....	9
Figura 2. Avantatges i inconvenients dels pèptids terapèutics en comparació amb els fàrmacs de molècules petites i en comparació amb els productes biològics.5	10
Figura 3. Fases de desenvolupament d'un nou fàrmac.	12
Figura 4. Total de fàrmacs i pèptids nous aprovats per la FDA en els últims 7 anys.	12
Figura 5. Estructura química del FT.....	15
Figura 6. Rang OEL en que es treballa a Esteve Química (1 mg/m3 - 1 ng/m3) i OEL per a un producte HP-API.....	18
Figura 7. Estructures de les resines (A) Merrifield (B) TentaGel® i (C) ChemMatrix®.	28
Figura 8. (A) Resina 2-CTC (B) Resina Rink amida i (C) Espaiador bifuncional de Sheppard.	29
Figura 9. Estratègies de protecció en SPPS.	30
Figura 10. Alguns exemples de carbodiimida.	32
Figura 11. Additius més comuns utilitzats en els acoblaments amb carbodiimides.	33
Figura 12. Reactius d'acoblament basats en HOBt i HOAt.	34
Figura 13. Aminoàcids comercials utilitzats com a material de partida en la síntesi del FT.....	40
Figura 14. Reactor utilitzat per la SPPS (reactor 1).	47
Figura 15. Cromatograma de 7411_UB-19146-01. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	55
Figura 16. Cromatograma de 7005_UB-19166-01. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	57
Figura 17. Reactor convencional de 250 mL utilitzat a l'empresa per síntesi en solució (reactor 2).....	61
Figura 18. (A) Sistema dual d'agitació/filtració amb un nivell d'agitació de 3 pales (agitador A). (B) Sistema dual d'agitació/filtració amb 3 nivells d'agitació de dues pales cada un (agitador B).	62
Figura 19. Filtre porós utilitzat en els sistemes d'agitació/filtració.	62
Figura 20. Reactor 2 amb l'agitador A i la resina després de la filtració.	63
Figura 21. Muntatge del reactor SPPS utilitzant el reactor 2 i l'agitador A (reactor 2A).	64
Figura 22. Comparació dels perfils cromatogràfics dels crus dels lots de 7411 obtinguts utilitzant diferents reactors.	69
Figura 23. Muntatge per dur a terme l'escissió del pèptid d'una alíquota de resina (mg).	71
Figura 24. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina a les 6 h d'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Glu(tBu)-OH) en la síntesi de 7411_UB-21550. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	73
Figura 25. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Glu(tBu)-OH en la síntesi de 7411_UB-21550.. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	73
Figura 26. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de tetrapeptidil-resina després del tractament amb piperidina en la síntesi de 7411_UB-21550. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	75
Figura 27. Comparació dels cromatogrames dels crus acidolítics de les dues mostres de peptidil-resina després de l'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) en la síntesi de 7411_UB-21578.....	78
Figura 28. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Ile-OH en la síntesi de 7411_UB-21578. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	79
Figura 29. Cromatograma del cru acidolític de la mostra de peptidil-resina a les 6 h d'acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) en la síntesi de 7411_UB-23401. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	81

Figura 30. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Ile-OH utilitzant 1 eq de reactius en la síntesi de 7411_UB-23401. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	82
Figura 31. Comparació dels cromatogrames dels crus acidolítics de les dues mostres de peptidil-resina després de reacoblar Fmoc-Ile-OH utilitzant (A) 3 eq i (B) 4 eq de reactius en la síntesi de 7411_UB-23401. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	82
Figura 32. Part de la regió alifàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar els crus acidolítics de mostres de dipeptidil-resina abans (CP0) i després (CP1) d'acoblar el segon aminoàcid (Fmoc-Val-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417.	85
Figura 33. Regió aromàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar els crus acidolítics de mostres de dipeptidil-resina abans (CP0) i després del tractament amb piperidina (CP1) per eliminar el grup Fmoc del residu de valina en la síntesi de 7005_UB-23417.	86
Figura 34. Regió alifàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar els crus acidolítics de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP0), als 10 min d'acoblament (CP1) i a 1 h d'acoblament (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417. Es destaca una ampliació de l'espectre de CP1.....	88
Figura 35. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina després d'acoblar el tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	89
Figura 36. Regió aromàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans (CP0) i després del tractament amb piperidina (CP1) per eliminar el grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de 7005_UB-23417.	90
Figura 37. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de tripeptidil-resina després del tractament amb piperidina en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	91
Figura 38. Regió alifàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP0), als 2 min d'acoblament (CP1) i als 45 min d'acoblament (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417. Es destaca una ampliació de l'espectre de CP1.	92
Figura 39. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda als 2 min d'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP1) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	93
Figura 40. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina als 45 min d'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	93
Figura 41. Cromatograma del cru acidolític d'una alíquota de tetrapeptidil-resina obtinguda després del tractament amb piperidina en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	95
Figura 42. Part de la zona alifàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(tBu)-OH) (CP0), als 2 min d'acoblament (CP1) i als 40 min d'acoblament (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417.....	96
Figura 43. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (MeOD) obtingut a l'analitzar el cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina als 2 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(tBu)-OH) (CP1) en la síntesi de 7005_UB-23417.	97
Figura 44. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda als 2 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(tBu)-OH) (CP1) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	97
Figura 45. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (MeOD) obtingut a l'analitzar el cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina als 40 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(tBu)-OH) (CP1) en la síntesi de 7005_UB-23417.	98
Figura 46. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda als 40 min d'acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(tBu)-OH) (CP1) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	98

Figura 47. Cromatograma del cru acidolític d'una alíquota de pentapeptidil-resina obtinguda després del tractament amb piperidina en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	99
Figura 48. Part de la zona alifàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) obtinguts a l'analitzar el cru acidolític de mostres de peptidil-resina abans d'acoblar el sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP0), als 2 min d'acoblament (CP1) i a 1 h d'acoblament (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417.	100
Figura 49. Part de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (MeOD) del cru de reacció obtingut després de l'escissió als 2 min de reacció d'acoblament del 6è sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP1).....	101
Figura 50. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra obtinguda als 2 min d'acoblament del sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP1) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	101
Figura 51. Part de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (MeOD) del cru de reacció obtingut després de l'escissió als 60 min de reacció d'acoblament del sisè aminoàcid (CP2).	102
Figura 52. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de peptidil-resina obtinguda després d'1 h d'acoblament del sisè aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) (CP2) en la síntesi de 7005_UB-23417. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	102
Figura 53. Estructura de l'aminoàcid H-Arg(Pbf)-OH.	105
Figura 54. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra d'aminoàcid-resina després d'eliminar el grup Fmoc de l'aminoàcid Fmoc-Arg(Pbf)-OH acoblat a la resina 2-CTC en la síntesi de 7411_UB-21578. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	106
Figura 55. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra de dipeptidil-resina presa una vegada l'acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) va donar un test de ninhidrina negatiu en la síntesi de 7411_UB-21578. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	106
Figura 56. Estructura de la impuresa Fmoc-Glu(tBu)-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH.....	107
Figura 57. Cromatograma del cru acidolític d'una mostra presa una vegada es va acoblar el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de 7411_UB-23401. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	108
Figura 58. Estructura de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH.....	108
Figura 59. Estructura del ftalat de diisooctil, contaminant trobat a la síntesi de 7411 en els lots UB-21531 i UB-21550.	110
Figura 60. Cromatograma del rentat de la resina 2-CTC amb DCM. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).....	111
Figura 61. Cromatograma del DCM (A) pres amb una cànula d'acer inoxidable i (B) pres amb el dispensador de plàstic de la mateixa garrafa. (Mètode A, veure apartat 8.3.3).	111
Figura 62. Regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (MeOD) del cru acidolític d'una mostra de dipeptidil-resina després d'acoblar Fmoc-Val-OH (segon aminoàcid) en la síntesi de 7005_UB-23417, abans de rentar (B) i després de rentar (C), comparats amb l'espectre de 1H-RMN de l'HOBt (A).....	112
Figura 63. Regió aromàtica dels espectres de 1H-RMN (MeOD) dels crús acidolítics d'una alíquota de resina després de l'eliminació del grup Fmoc del dipèptid (A), del tripèptid (B), del tetrapèptid (C) i del pentapèptid (D) en la síntesi de 7005_UB-23441.	114
Figura 64. Comparació dels perfils dels cromatogrames dels crús acidolítics dels lots de 7005 obtinguts amb la seqüència de rentats proposada en els estudis precedents (7005_UB-21510-cru, A) i amb la nova seqüència de rentats proposada en aquesta Tesi (7005_UB-23441-cru, B).	124
Figura 65. Cromatograma acidolític de 7005_UB-21510. (Mètode A, apartat 8.3.3).	129
Figura 66. Cromatogrames dels sòlids (A) 7005_UB-21510-P1-01 i (B) 7005_UB-21510-P2-01 obtinguts utilitzant diferents mètodes de neutralització del cru acidolític.	130
Figura 67. Comparació dels perfils cromatogràfics del cru acidolític de 7411_UB-21550 (A) i el sòlid obtingut 7411_UB-21550-01 (B).	135
Figura 68. Comparació dels perfils cromatogràfics del cru acidolític de 7411_UB-21578 (A) i el sòlid obtingut 7411_UB-21578-01 (B).	136

Figura 69. Comparació dels perfils cromatogràfics del cru acidolític de 7411_UB-23401 (A) i el sòlid obtingut 7411_UB-23401-01 (B).....	137
Figura 70. Parts del GFD®Lab Nutsche utilitzat per a l'escalat de la SPPS.	139
Figura 71. Filtre Nutsche GFD®Lab model 050 series utilitzat com a reactor per a l'escalat de la SPPS.....	139
Figura 72. (A) Cistella del filtre Nutsche adaptada amb junta de pressió per a l'escalat de la SPPS; (B) Barra d'agitació utilitzada en el Nutsche per a l'escalat de la SPPS.....	140
Figura 73. Cromatograma de 7005_UB-23475-P3-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	142
Figura 74. Cromatograma de 7411_UB-23492-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	144
Figura 75. Cromatograma de 6997_QF-15382-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	150
Figura 76. Cromatograma de 6997_QF-15392-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	151
Figura 77. Cromatograma de 6997_QF-15386-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	152
Figura 78. Cromatograma de 6998_QF-15388-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	155
Figura 79. Regió aromàtica dels espectres de 1H-RMN de (A) 6998_UB-19105-01 i (B) 6998_UB-19103-01.....	157
Figura 80. Part de la regió alifàtica dels espectres de 1H-RMN de (A) 6998_UB-19105-01 i (B) 6998_UB-19103-01.....	158
Figura 81. Assignació dels senyals aïllats del producte i dels subproductes a la zona aromàtica de l'espectre de 1H-RMN de 6998_UB-19103-01.....	159
Figura 82. Regions aromàtica (A) i alifàtica (B) de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) del cru de 6998_UB-19106.....	161
Figura 83. Comparació de part de la regió alifàtica dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) del cru inicial de 6998 (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa sat de NaCl (A).	162
Figura 84. Comparació de la regió aromàtica dels espectres de 1H-RMN del cru inicial de 6998 (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa sat de NaCl (A).....	162
Figura 85. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) de la fase orgànica després dels rentats amb NaCl (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb la solució de fosfats de pH 5,5 (A).	163
Figura 86. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa de tampó fosfats a pH 5,5 amb fase orgànica de DCM (B) i amb fase orgànica d'AcOEt (A).....	164
Figura 87. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19112-03.....	166
Figura 88. Zona aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) del cru de 6998_UB-19119.....	167
Figura 89 Comparació de regions alifàtiques dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) de la suspensió del cru de reacció (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb solució aquosa sat de NaCl (A).....	168
Figura 90. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) de la fase orgànica després dels rentats amb NaCl (B) i de la fase orgànica després dels rentats amb tampó de fosfats de pH 5,5 (A).	169
Figura 91. Comparació de regions aromàtiques dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) del sòlid 6998_UB-19132-01 (A) i de la dissolució 6998_UB-19132-diss (B).	170
Figura 92. Comparació de les regions alifàtiques dels espectres de 1H-RMN (DMSO-d6) del sòlid 6998_UB-19132-01 (B) i de la dissolució 6998_UB-19132-diss (A).	171
Figura 93. Cromatograma de 6998_UB-19144-02 (Mètode A, apartat 8.3.3).	173
Figura 94. Cromatograma de 6997_UB-23467-diss. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	174
Figura 95. Cromatograma de 6998_UB-23469-02 (Mètode A, apartat 8.3.3).	175
Figura 96. Cromatograma de 7003_UB-21599-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	178

Figura 97. Cromatogrames d'HPLC de (A) 7003_UB-23428-02 precipitat amb acetona i (B) 7003_UB-23428-03 precipitat amb MeCN (Mètode A, apartat 8.3.3).	180
Figura 98. Comparació dels perfils cromatogràfics dels sòlids de 7003 obtinguts després del tractament amb MeCN (Mètode A, apartat 8.3.3).	181
Figura 99. Anàlisi d'HPLC de (A) 7003_UB-26927-01 i (B) del sòlid obtingut 7003_UB-26927-02 després del tractament amb MeCN (Mètode A, apartat 8.3.3).	182
Figura 100. Cromatograma de 7004_UB-23431-01 obtingut per precipitació amb H ₂ O. (Mètode A, apartat 8.3.3).	184
Figura 101. Cromatogrames de (A) 7004_UB-23453-01 i (B) 7004_UB-23453-diss (Mètode A, apartat 8.3.3).	187
Figura 102. Estructura de la piperidina de 7005.	188
Figura 103. Cromatograma de 7004_UB-26929-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	192
Figura 104. Cromatogrames del lot 7006_UB-26904. (A) sòlid precipitat amb aigua, (B) sòlid rentat amb EtOH. (Mètode A, apartat 8.3.3).	195
Figura 105. Cromatogrames dels sòlids precipitats amb H ₂ O de (A) 7006_UB-26931 i (B) 7006_UB-26930. (Mètode A, apartat 8.3.3).	198
Figura 106. Cromatograma de 7006_UB-26932-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	199
Figura 107. Espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) del sòlid format en la síntesi de 6664_UB-26917.	201
Figura 108. Cromatograma de (A) 6664_UB-26917-01 i (B) 6664_UB-26917-02. (Mètode C, apartat 8.3.3).	202
Figura 109. Cromatograma del cru acidolític després de la desprotecció total de 6998 (Mètode A, apartat 8.3.3).	203
Figura 110. Possibles estructures amb m/z 290,2.	203
Figura 111. Cromatograma del cru acidolític després de la desprotecció total de 7005 (Mètode A, apartat 8.3.3).	204
Figura 112. Cromatograma del cru acidolític després de la desprotecció total de 7411 (Mètode A, apartat 8.3.3).	205
Figura 113. Cromatograma de 6664_UB-26935-P3-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	207
Figura 114. Cromatograma del cru acidolític de 6664_UB-26938-P1-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	210
Figura 115. Cromatograma de 6664_UB-26948-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	215
Figura 116. Espectre de ¹⁹ F-RMN (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948-01 amb el patró 5-fluoro-2-oxindol.	215
Figura 117. Espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948-01 amb un patró d'àcid maleic.	216
Figura 118. Regió alifàtica de l'espectre de (1H,13C)-HSQC (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948-01.	217
Figura 119. Deconvolució dels senyals per quantificar la impuresa tBu-6664 a l'espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948, utilitzant àcid maleic com a patró.	217
Figura 120. Espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948-01.	219
Figura 121. Aïllador ProSys®.	236
Figura 122. Cabina Safetech®.	237
Figura 123. Reactors per a la SPPS utilitzats en aquesta tesi.	243
Figura 124. Sistemes duals d'agitació/filtració amb un nivell d'agitació de 3 pales (agitador A) i 3 nivells d'agitació de dues pales cada un (agitador B).	243
Figura 125. Test de ninhidrina positiu (blau) i test de ninhidrina negatiu (groc).	246
Figura 126. Muntatge per dur a terme l'escissió del pèptid de la resina a escala de mg de resina.	246
Figura 127. Cromatograma de 7005_UB-19166-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	254

Figura 128. Cromatograma del cru acidolític de 7005_UB-19182. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	255
Figura 129. Cromatograma de 7005_UB-19182-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	256
Figura 130. Cromatograma de 7005_UB-19182-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	256
Figura 131. Cromatograma de 7005_UB-19182-P3-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	257
Figura 132. Cromatograma de 7005_UB-19182-P4-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	257
Figura 133. Cromatograma de 7005_UB-19182-P5-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	258
Figura 134. Cromatograma de 7005_UB-19182-P6-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	259
Figura 135. Cromatograma de 7005_UB-19182-P7-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	259
Figura 136. Cromatograma de 7005_UB-19182-P8-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	260
Figura 137. Cromatograma de 7005_UB-19182-P9-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	261
Figura 138. Cromatograma del cru acidolític de 7005_UB-21510. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	262
Figura 139. Cromatograma de 7005_UB-21510-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	264
Figura 140. Cromatograma de 7005_UB-21510-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	264
Figura 141. Cromatograma del cru acidolític de 7005_UB-23441. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	266
Figura 142. Cromatograma de 7005_UB-23441-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	268
Figura 143. Cromatograma de 7005_UB-23441-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	268
Figura 144. Cromatograma del cru acidolític de 7005_UB-23475. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	270
Figura 145. Cromatograma de 7005_UB-23475-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	271
Figura 146. Cromatograma de 7005_UB-23475-P1-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	271
Figura 147. Cromatograma de 7005_UB-23475-P1-05. (Mètode A, apartat 8.3.3).	272
Figura 148. Cromatograma de 7005_UB-23475-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	273
Figura 149. Cromatograma de 7005_UB-23475-P3-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	273
Figura 150. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7005_UB- 23475-P3-01.	274
Figura 151. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7005_UB-23475-P3-01.	275
Figura 152. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7005_UB-23475-P3-01.	275
Figura 153. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7005_UB- 23475-P3-01.	276
Figura 154. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7005_UB- 23475-P3-01.	276
Figura 155. Cromatograma de 7411_UB-19146-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	280
Figura 156. Cromatograma del cru acidolític de 7411_UB-21531. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	281
Figura 157. Cromatograma de 7411_UB-21531-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	282
Figura 158. Cromatograma de 7411_UB-21531-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	282
Figura 159. Cromatograma de 7411_UB-21531-P3-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	283
Figura 160. Cromatograma de 7411_UB-21531-P4-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	284
Figura 161. Cromatograma de 7411_UB-21531-P4-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	284
Figura 162. Cromatograma de 7411_UB-21531-P5-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	285
Figura 163. Cromatograma del cru acidolític de 7411_UB-21550. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	286
Figura 164. Cromatograma de 7411_UB-21550-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	287
Figura 165. Cromatograma del cru acidolític de 7411_UB-21578. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	289
Figura 166. Cromatograma de 7411_UB-21578-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	290
Figura 167. Cromatograma del cru acidolític de 7411_UB-23401. (Mètode A, apartat 8.3.3).....	292

Figura 168. Cromatograma de 7411_UB-23401-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	292
Figura 169. Cromatograma de 7411_UB-23492-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	295
Figura 170. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7411_UB-23492-01.	297
Figura 171. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7411_UB-23492-01.	297
Figura 172. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7411_UB-23492-01.	298
Figura 173. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7411_UB-23492-01.	298
Figura 174. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7411_UB-23492-01.	299
Figura 175. Cromatograma de 6997_QF-15382-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	306
Figura 176. Cromatograma de 6997_QF-15386-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	307
Figura 177. Cromatograma de 6997_QF-15392-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	308
Figura 178. Cromatograma de 6997_QF-15395-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	308
Figura 179. Cromatograma de 6997_UB-19101-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	309
Figura 180. Cromatograma de 6997_UB-19115-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	310
Figura 181. Cromatograma de 6997_UB-19141-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	310
Figura 182. Cromatograma de 6997_UB-23467-diss. (Mètode B, apartat 8.3.3).	311
Figura 183. Cromatograma de 6998_QF-15388-01. (Mètode B, apartat 8.3.3).	313
Figura 184. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19103-01.	313
Figura 185. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19105-01.	314
Figura 186. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19106-01.	315
Figura 187. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19109-01.	316
Figura 188. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19112-03.	317
Figura 189. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19119-01.	318
Figura 190. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19130-02.	319
Figura 191. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19132-02.	320
Figura 192. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19134-filtrat.	321
Figura 193. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19135-02.	322
Figura 194. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-19144-02.	323
Figura 195. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-23469-02.	324
Figura 196. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 6998_UB-23469-02.	325
Figura 197. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-23469-02.	326
Figura 198. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-23469-02.	326
Figura 199. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 6998_UB-23469-02.	327
Figura 200. Cromatograma de 7003_UB-21599-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	329
Figura 201. Cromatograma de 7003_UB-23428-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	330
Figura 202. Cromatograma de 7003_UB-23428-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	331
Figura 203. Cromatograma de 7003_UB-23428-03. (Mètode A, apartat 8.3.3).	331
Figura 204. Cromatograma de 7003_UB-23428-04. (Mètode A, apartat 8.3.3).	332
Figura 205. Cromatograma de 7003_UB-23456-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	332

Figura 206. Cromatograma de 7003_UB-23456-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	333
Figura 207. Cromatograma de 7003_UB-23457-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	333
Figura 208. Cromatograma de 7003_UB-23457-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	334
Figura 209. Cromatograma de 7003_UB-26908-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	334
Figura 210. Cromatograma de 7003_UB-26908-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	335
Figura 211. Cromatograma de 7003_UB-26927-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	335
Figura 212. Cromatograma de 7003_UB-26927-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	336
Figura 213. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7003_UB-26927-02.	338
Figura 214. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7003_UB-26927-02.	338
Figura 215. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7003_UB-26927-02.	339
Figura 216. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7003_UB-26927-02.	339
Figura 217. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7003_UB-26927-02.	340
Figura 218. Cromatograma de 7004_UB-23431-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	343
Figura 219. Cromatograma de 7004_UB-23453-03. (Mètode A, apartat 8.3.3).	344
Figura 220. Cromatograma de 7004_UB-23461-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	345
Figura 221. Cromatograma de 7004_UB-23461-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	346
Figura 222. Cromatograma de 7004_UB-23461-P3-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	346
Figura 223. Cromatograma de 7004_UB-23461-P4-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	347
Figura 224. Cromatograma de 7004_UB-23461-P5-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	347
Figura 225. Cromatograma de 7004_UB-23465-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	348
Figura 226. Cromatograma de 7004_UB-23465-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	349
Figura 227. Cromatograma de 7004_UB-26910-P1-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	349
Figura 228. Cromatograma de 7004_UB-26910-P1-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	350
Figura 229. Cromatograma de 7004_UB-26910-P2-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	350
Figura 230. Cromatograma de 7004_UB-26910-P3-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	351
Figura 231. Cromatograma de 7004_UB-26910-P4-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	351
Figura 232. Cromatograma de 7004_UB-26910-P4-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	352
Figura 233. Cromatograma de 7004_UB-26918-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	352
Figura 234. Cromatograma de 7004_UB-26929-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	353
Figura 235. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7004_UB-26929-02.	355
Figura 236. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7004_UB-26929-02.	355
Figura 237. Espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7004_UB-26929-02.	356
Figura 238. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7004_UB-26929-02.	356
Figura 239. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de 1H-RMN (DMSO-d6) de 7004_UB-26929-02.	357
Figura 240. Cromatograma de 7006_UB-26904-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	360
Figura 241. Cromatograma de 7006_UB-26904-02. (Mètode A, apartat 8.3.3).	360
Figura 242. Cromatograma de 7006_UB-26906-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	361

Figura 243. Cromatograma de 7006_UB-26914-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	362
Figura 244. Cromatograma de 7006_UB-26915-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	362
Figura 245. Cromatograma de 7006_UB-26920-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	363
Figura 246. Cromatograma de 7006_UB-26930-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	363
Figura 247. Cromatograma de 7006_UB-26931-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	364
Figura 248. Cromatograma de 7006_UB-26932-01. (Mètode A, apartat 8.3.3).	365
Figura 249. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7006_UB-26932-01.	367
Figura 250. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 7006_UB-26932-01.	367
Figura 251. Espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 7006_UB-26932-01.	368
Figura 252. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 7006_UB-26932-01.	368
Figura 253. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 7006_UB-26932-01.	369
Figura 254. Cromatograma de 6664_UB-26917-01. (Mètode C, apartat 8.3.3).	372
Figura 255. Cromatograma de 6664_UB-26917-02. (Mètode C, apartat 8.3.3).	372
Figura 256. Cromatograma de 6664_UB-26923-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	373
Figura 257. Cromatograma de 6664_UB-26924-01. (Mètode C, apartat 8.3.3).	374
Figura 258. Cromatograma de 6664_UB-26935-P1-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	374
Figura 259. Cromatograma de 6664_UB-26935-P2-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	375
Figura 260. Cromatograma de 6664_UB-26935-P3-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	375
Figura 261. Cromatograma de 6664_UB-26935-P4-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	376
Figura 262. Cromatograma de 6664_UB-26935-P5-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	376
Figura 263. Cromatograma de 6664_UB-26935-P6-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	377
Figura 264. Cromatograma de 6664_UB-26938-P1-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	377
Figura 265. Cromatograma de 6664_UB-26938-P2-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	378
Figura 266. Cromatograma de 6664_UB-26940-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	378
Figura 267. Cromatograma de 6664_UB-26941-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	379
Figura 268. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de 6664_UB-26944-P1. (Mètode D, apartat 8.3.3).	380
Figura 269. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de 6664_UB-26944-P2. (Mètode D, apartat 8.3.3).	380
Figura 270. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de 6664_UB-26944-P3. (Mètode D, apartat 8.3.3).	381
Figura 271. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts a diferents temps en la reacció d'obtenció de 6664_UB-26944-P4. (Mètode D, apartat 8.3.3).	381
Figura 272. Superposició dels cromatogrames d'HPLC dels sòlids obtinguts en l'obtenció de 6664_UB-26944-P5. (Mètode D, apartat 8.3.3).	382
Figura 273. Cromatograma de 6664_UB-26948-01. (Mètode D, apartat 8.3.3).	382
Figura 274. Espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 6664_UB-26948-01.	384
Figura 275. Ampliació de l'espectre de masses d'alta resolució obtingut per injecció directa de 6664_UB-26948-01.	384
Figura 276. Espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948-01.	385
Figura 277. Ampliació de la regió aromàtica de l'espectre de ¹ H-RMN (DMSO-d ₆) de 6664_UB-26948-01.	385

Figura 278. Ampliació de la regió alifàtica de l'espectre de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de 6664_UB-26948-01.	386
---	-----

ÍNDEX D'ESQUEMES

Esquema 1. Formació de l'enllaç amida entre dos aminoàcids (s'especifica l'estereoquímica donat que els aminoàcids es consideren naturals proteínogènics).	25
Esquema 2. Estratègia general de la síntesi de pèptids en solució.	25
Esquema 3. Estratègia general de la síntesi de pèptids en fase sòlida.	26
Esquema 4. Diferents tipus de protecció en la SPPS.	30
Esquema 5. Formació de l'enllaç peptídic.	31
Esquema 6. Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic per activació amb carbodiimida.	32
Esquema 7. Formació de N-acilurea.	32
Esquema 8. (A) Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic amb carbodiimides en presència d'additius; (B) Apropament de reactius per l'efecte anquimèric en el cas de l'HOAt.	33
Esquema 9. Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic utilitzant sals de fosfoni i d'uroní.	35
Esquema 10. Mecanismes de racemització mitjançant l'enolització directa (Camí A) i la formació d'una 5(4H)-oxazolona (Camí B).	36
Esquema 11. Formació d'una DKP.	36
Esquema 12. Capturació del carbocatió Trt per TIPS en medi àcid.	37
Esquema 13. Estratègia general de la síntesi convergent de pèptids en fase sòlida.	38
Esquema 14. Estratègia convergent proposada per a la síntesi de FT.	42
Esquema 15. Síntesi convergent de FT.	43
Esquema 16. Reacció d'incorporació del primer aminoàcid a la resina 2-CTC.	48
Esquema 17. Mecanisme d'eliminació del grup Fmoc amb piperidina.	49
Esquema 18. Reacció de les amines lliures de la resina peptídica amb el reactiu de ninhidrina.	50
Esquema 19. Mecanisme de l'escissió del pèptid de la resina amb tractament àcid.	51
Esquema 20. Incorporació de l'aminoàcid Fmoc-Arg(Pbf)-OH a la resina 2-CTC.	52
Esquema 21. Elongació de la cadena peptídica del fragment 7411.	53
Esquema 22. Escissió del pèptid de la resina per obtenir 7411.	54
Esquema 23. Incorporació de l'aminoàcid Fmoc-Leu-OH a la resina 2-CTC.	55
Esquema 24. Elongació de la cadena peptídica del fragment 7005.	56
Esquema 25. Escissió del pèptid de la resina per obtenir 7005.	57
Esquema 26. Acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Glu(tBu)-OH) en la síntesi de 7411_UB-21550. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per HPLC-MS a les 6 h de reacció.	72
Esquema 27. Eliminació del grup Fmoc del residu d'àcid glutàmic en la síntesi de 7411_UB-21550. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per HPLC després del tractament amb piperidina.	74
Esquema 28. Acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Ile-OH) en la síntesi de 7411_UB-21578. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per HPLC a les 5 h de reacció.	77
Esquema 29. Acoblament del segon aminoàcid (Fmoc-Val-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per ^1H -RMN.	85

Esquema 30. Eliminació del grup Fmoc del residu de valina en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per 1H-RMN després del tractament amb piperidina.	86
Esquema 31. Acoblament del tercer aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per 1H-RMN de les dues mostres recollides a temps diferents.	87
Esquema 32. Eliminació del grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per 1H-RMN i HPLC després del tractament amb piperidina.	90
Esquema 33. Protocol de seguiment per 1H-RMN i HPLC-MS de l'acoblament del quart aminoàcid (Fmoc-Gln(Trt)-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417.	92
Esquema 34. Eliminació del grup Fmoc del residu de glutamina en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per 1H-RMN i HPLC després del tractament amb piperidina.	94
Esquema 35. Acoblament del cinquè aminoàcid (Fmoc-Asp(tBu)-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per 1H-RMN i HPLC de dues mostres de resina recollides a diferents temps.	96
Esquema 36. Eliminació del grup Fmoc del residu d'àcid aspàrtic en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental utilitzat per l'anàlisi per 1H-RMN i HPLC després del tractament amb piperidina.	99
Esquema 37. Acoblament del sisè aminoàcid (Boc-Ile-OH) en la síntesi de 7005_UB-23417. Protocol experimental per l'anàlisi per 1H-RMN de mostres recollides a dos temps diferents.	100
Esquema 38. Mecanisme proposat per la formació de la impuresa Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OH en presència de DIC i HOBt com a conseqüència de l'escissió prematura de l'aminoàcid arginina acoblat a la resina.	109
Esquema 39. Mecanisme proposat per la formació de la impuresa H-Arg(Pbf)-OH durant l'acoblament del segon aminoàcid (veure Esquema 38).	110
Esquema 40. Incorporació de l'HOBt a la resina 2-CTC.	112
Esquema 41. Tractament amb HOBt i DIC de la resina 2-CTC sense capar (A) i amb una resina tractada prèviament durant 5 h amb MeOH i DIPEA (B).	113
Esquema 42. Incorporació d'HOBt a una peptidil-resina.	114
Esquema 43. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi del dipèptid 6997.	149
Esquema 44. Condicions de reacció per a la síntesi del dipèptid 6997_QF-15386.	152
Esquema 45. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi de 6998 (s'ha plantejat un equilibri entre els dos subproductes per raons que es comentaran més endavant).	154
Esquema 46. Condicions de reacció per la síntesi de (A) 6998_UB-19105 i (B) 6998_UB-19103.	156
Esquema 47. Condicions de reacció per a la síntesi de 6998_UB-19106.	160
Esquema 48. Assajos de la síntesi de 6998 utilitzant 4-AMP en diferents condicions experimentals.	164
Esquema 49. Condicions de reacció per a la síntesi de 6998_UB-19119.	167
Esquema 50. Condicions de reacció per a la síntesi i purificació de 6998_UB-19132.	170
Esquema 51. Protocol dels assajos de síntesi de 6998 utilitzant 4-AMP com a base i CO ₂ pel tractament posterior del cru.	172
Esquema 52. Condicions de reacció utilitzades per la reacció d'obtenció del dipèptid 6997_UB-23467 (procés one-pot).	174
Esquema 53. Condicions experimentals per l'obtenció a gran escala de 6998 (6998_UB-23469).	175
Esquema 54. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi del fragment peptídic protegit 7003.	177

Esquema 55. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi de 7004.	183
Esquema 56. Condicions de reacció per a la síntesi de 7004_UB-23453.	186
Esquema 57. Condicions utilitzades per formar el carbamat de FM-AMP durant la purificació de 7004 (lot 7004_UB-23453).	186
Esquema 58. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la síntesi del FT protegit 7006.	194
Esquema 59. Condicions de reacció utilitzades en els estudis precedents per a la obtenció de FT (6664).	200
Esquema 60. Condicions de reacció per a la eliminació dels grups protectors de 6998.	202
Esquema 61. Condicions de reacció per a la eliminació dels grups protectors de 7005.	204
Esquema 62. Condicions de reacció per a la eliminació dels grups protectors de 7411.	205
Esquema 63. Condicions de reacció per a la desprotecció total de 7006 (lot 6664_UB-26948).	214
Esquema 64. Síntesi en fase sòlida de l'hexapèptid 7005.	252
Esquema 65. Síntesi en fase sòlida del nonapèptid 7411.	278
Esquema 66. Condicions de reacció per a la síntesi del dipèptid 6997.	305
Esquema 67. Esquema de la síntesi del dipèptid 6998.	312
Esquema 68. Condicions de reacció per a la síntesi del fragment peptídic protegit 7003.	328
Esquema 69. Esquema de la síntesi del fragment peptídic 7004.	342
Esquema 70. Condicions de reacció per a la síntesi del fragment peptídic 7006.	359
Esquema 71. Condicions de reacció per a la obtenció del 6664 (FT).	371

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Resum dels pèptids aprovats per la FDA entre els anys 2018 i 2021.	13
Taula 2. Grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals utilitzats en la síntesi de FT.	41
Taula 3. Alçada del pic de FM-pip en els cromatogrames d'HPLC dels diferents tractaments de la resina amb piperidina.	49
Taula 4. Condicions d'acoblament dels aminoàcids en la síntesi de 7411_UB-19146.	53
Taula 5. Condicions d'acoblament d'aminoàcids en la síntesi de 7005_UB-19166.	56
Taula 6. Acoblament d'aminoàcids en la síntesi 7411_UB-21531 utilitzant el reactor 1.	59
Taula 7. Acoblament d'aminoàcids en la síntesi 7005_UB-19182 utilitzant el reactor 1.	60
Taula 8. Comparació de les funcionalitzacions obtingudes per l'acoblament del primer aminoàcid en les síntesis de 7005.	65
Taula 9. Comparació de les síntesis de 7005 utilitzant diferents reactors.	65
Taula 10. Comparació de les funcionalitzacions obtingudes per l'acoblament del primer aminoàcid en les síntesis de 7411.	66
Taula 11. Comparació de les reaccions d'acoblament en les síntesis de 7411 utilitzant el reactor 1, el reactor 2A i el reactor 2B.	67
Taula 12. Comparació de les síntesis de 7411 utilitzant diferents reactors.	68
Taula 13. Seguiment de les reaccions d'acoblament i eliminació del grup Fmoc en la síntesi de 7411_UB-21550.	76
Taula 14. Seguiment de les reaccions d'acoblament en la síntesi de 7411_UB-21578.	80
Taula 15. Seguiment de les reaccions d'acoblament en la síntesi de 7411_UB-23401.	83

Taula 16. Comparació dels resultats obtinguts per test de ninhidrina, 1H-RMN i HPLC en el seguiment de les reaccions d'acoblament i eliminació del grup Fmoc en la síntesi de 7005_UB-23417.	104
Taula 17. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes en els rentats després d'acoblar a la resina el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de 7411_UB-21578.	115
Taula 18. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes en els rentats després d'eliminar el grup Fmoc en la síntesi de 7411_UB-21578.	117
Taula 19. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes en els rentats després d'acoblar a la resina el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH) en la síntesi de 7411_UB-23401.	119
Taula 20. Cromatogrames de les dissolucions obtingudes amb la nova seqüència de rentats després d'acoblar a la resina el segon aminoàcid (Fmoc-Lys(Boc)-OH); un rentat a cada etapa de la seqüència de dissolvents i substitució d'IPA per DMF.	121
Taula 21. Àrees de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH en els cromatogrames de cada rentat utilitzant una seqüència de dissolvents que inclou tractaments amb IPA en diferents temps.	122
Taula 22. Àrees de Fmoc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH en els cromatogrames de cada rentat utilitzant una seqüència de dissolvents que inclou tractaments amb MeOH de diferents temps.	123
Taula 23. Proves de precipitació amb el cru de 7005_UB-19182.	126
Taula 24. Proves de precipitació amb els crus de 7005.	132
Taula 25. Proves de precipitació amb el cru de 7411_UB-21531.	133
Taula 26. Proves de precipitació amb els crus de 7411.	137
Taula 27. Condicions d'eliminació del grup Fmoc en la síntesi del 7411_UB-23492.	143
Taula 28. Proves per l'obtenció del dipèptid 6997.	153
Taula 29. Condicions de reacció per l'obtenció de 6998 amb 4-AMP com a base.	165
Taula 30. Condicions de reacció per l'obtenció de 6998 utilitzant 4-AMP com a base i CO ₂ pel tractament posterior del cru.	172
Taula 31. Proves per a la obtenció de 7003.	178
Taula 32. Comparació de les pureses cromatogràfiques obtingudes per 7003 a partir de diferents lots de productes de partida.	179
Taula 33. Assajos de purificació de 7003_UB-21599-01.	179
Taula 34. Purificació de l'undecapèptid protegit 7003 per suspensió del sòlid amb MeCN.	181
Taula 35. Proves de purificació de 7004_UB-23431-01.	185
Taula 36. Proves per l'obtenció de 7004 amb piperidina.	188
Taula 37. Proves de precipitació amb el cru del lot 7004_UB-23461.	189
Taula 38. Proves del tractament del cru de reacció de 7004_UB-23465.	191
Taula 39. Proves del tractament del cru de reacció de 7004_UB-26910.	191
Taula 40. Proves per l'obtenció de 7006 a partir de diferents lots de 7004.	196
Taula 41. Proves per la purificació de 7006.	197
Taula 42. Proves per l'obtenció de 6664 utilitzant diferents condicions acidolítiques.	206
Taula 43. Resultats obtinguts en l'obtenció de 6664_UB-26935 utilitzant diferents mescles acidolítiques.	209
Taula 44. Resultats obtinguts en l'obtenció de 6664_UB-26938 utilitzant diferents mescles acidolítiques.	209
Taula 45. Resultats del tractament acidolític a diferents temps en l'obtenció de 6664_UB-26941.	212
Taula 46. Comparació de síntesis de 6664 utilitzant diferents concentracions de reactius.	212
Taula 47. Proves per l'obtenció de 6664_UB-26944.	213
Taula 48. Quantificació per 1H-RMN (%) de 6664, tBu-6664 i dels dissolvents residuals, en 6664_UB-26948-01.	218

Taula 49. Dissolvents i reactius utilitzats en aquesta Tesi.	233
Taula 50. Instruments utilitzats en aquesta Tesi.	235
Taula 51. Condicions cromatogràfiques: Mètode A.	238
Taula 52. Condicions cromatogràfiques: Mètode B.	239
Taula 53. Condicions cromatogràfiques: Mètode C.	239
Taula 54. Condicions cromatogràfiques: Mètode D.	240
Taula 55. Incorporació del primer aminoàcid a la resina. Protocol 1.....	248
Taula 56. Incorporació del primer aminoàcid a la resina. Protocol 2.....	248
Taula 57. Incorporació del primer aminoàcid a la resina. Protocol 3.....	249
Taula 58. Eliminació del grup Fmoc. Protocol 4.....	249
Taula 59. Eliminació del grup Fmoc. Protocol 5.....	249
Taula 60. Eliminació del grup Fmoc. Protocol 6.....	250
Taula 61. Eliminació del grup Fmoc. Protocol 7.....	250
Taula 62. Acoblament de Fmoc-aminoàcid. Protocol 8.....	250
Taula 63. Acoblament de Fmoc-aminoàcid. Protocol 9.....	251
Taula 64. Acoblament de Fmoc-aminoàcid. Protocol 10.....	251
Taula 65. Escissió del pèptid de la resina. Protocol 11.....	251
Taula 66. Escissió del pèptid de la resina. Protocol 12.....	252
Taula 67. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-19166.	253
Taula 68. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-19182.	254
Taula 69. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-21510.	261
Taula 70. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-23417.	265
Taula 71. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-23441.	266
Taula 72. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7005_UB-23475.	269
Taula 73. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 7005_UB-23475-P3-01. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).	277
Taula 74. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-19146.	279
Taula 75. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-21531.	280
Taula 76. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-21550.	286
Taula 77. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-21578.	288
Taula 78. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-23401.	291
Taula 79. Tractaments de piperidina duts a terme en la síntesi de 7411_UB-23492.....	293
Taula 80. Quantitats de reactius utilitzades en la síntesi de 7411_UB-23492.	294
Taula 81. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 7411_UB-23492-01. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).	299
Taula 82. Proves de solubilitat del sòlid 6997_QF-15382-01.....	306
Taula 83. Proposta d'assignació de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 6998_UB-23469-02. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2.50$ ppm).....	327
Taula 84. Proves de purificació de 7003_UB-21599-01.....	329
Taula 85. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 7003_UB-26927-02. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).	340

Taula 86. Proves de purificació del sòlid 7004_UB-23431-01.	343
Taula 87. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 7004_UB-26929-02. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).	357
Taula 88. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 7006_UB-26932-01. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).	369
Taula 89. Assignació plausible en base a experiments RMN 2D de l'espectre de 1H-RMN (400 MHz) en DMSO-d6 de 6664_UB-26948-01. La referència és el dissolvent semideuterat residual ($\delta = 2,50$ ppm).	386