



*Procés per a la síntesi enzimàtica
total de l'octapèptid PhAc-CCK-8*

Memòria que presenta:

M. Mercè Fité i Gòdia

per a optar al grau de Doctor per la
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, maig de 2000

Títol: Procés per a la síntesi enzimàtica total de l'octapèptid PhAc-CCK-8.

Realitzat per: M. Mercè Fité i Gòdia.

Dirigit per: Glòria Caminal i Saperas i M. Dolors Benaiges i Massa.

Departament d'Enginyeria Química.

Programa de Biotecnologia.

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, maig de 2000.

Aquest treball ha estat subvencionat pel Centre de Referència en Biotecnologia (CERBA) i la CICYT amb el projecte BIO95-1083.

M^a DOLORS BENAIGES I MASSA, Professora titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i GLORIA CAMINAL I SAPERAS Investigadora titular del CSIC en el Laboratori Associat al CNB al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEM:

Que la llicenciada M. Mercè Fité i Gòdia ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball que amb el títol **“Procés per a la síntesi enzimàtica total de l’octapèptid PhAc-CCK-8”**, presenta en aquesta memòria, i que constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prenguem coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola Superior d'Enginyeries de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, 5 de maig de 2000

M^a Dolors Benaiges i Massa

Gloria Caminal i Saperas

Als meus pares i al Joan

Agraïments

Dono les gràcies especialment a les meves directores Glòria i Dolors, per tot el que m'han ensenyat, per la seva col·laboració i ànims en la realització del treball.

A tot l'equip de pèptids pels consells rebuts en els moments més crítics i les estones més divertides que hem compartit.

Al Josep per transmetre'm confiança, interès i il·lusió en el treball en tot moment.

Al Pere pels consells i idees que m'ha donat i per totes les "provatines" que m'ha suggerit al llarg d'aquests anys.

Al Goyo, per haver estat tan bon mestre com amic..., algú a qui mai no s'oblida.

A la Xat, que amb el seu treball m'ha aplanat el camí per aconseguir "l'octa".

Al Salvador, per ser un bon amic a qui he tingut la sort de conèixer gràcies als pèptids. Al Luis Javier per la seva aportació en el treball i per ensenyar-me a fer el dulce de mango.

A la gent de la Unitat de Química i Bioquímica de proteïnes del CSIC per la seva cordialitat i simpatia. Molt especialment a la Carme i l'Eulàlia per la seva desinteressada ajuda que m'han mostrat en tot moment.

Al Xavi Font per la gran lírica del seu poema, acompanyada de l'excel·lent musicalitat d'una guitarra de tres cordes, en fi per fer-me riure com ningú. També al Carles Paredes, Anne, Eva, Julio, Olga, Claudia, Rosi, Georgina, Ester, Alícia, Núria, per tots els bons moments que hem passat junts.

En general a totes les persones del Departament d'Enginyeria Química que al llarg d'aquests anys han creat un ambient idoni per a treballar i m'han regalat la seva companyia.

Al Jordi i a l'Enric Solé que tant em van ajudar sense ells ni saber-ho.

Al Josep i la Bern per ser tan comprensius amb mi.

Als meus pares que sempre m'han donat l'ajut i recolzament necessaris per anar endavant. A ells els ho dec tot.

Al Joan que m'ha ajudat fins a l'últim moment i m'ha donat forces quan ja no me'n quedaven..... gràcies per haver estat al meu costat.

Ah!! i al cromatògraf que tan bé s'ha portat !!!!

Índex

Índex	i
Capítol 1 Presentació	1
Capítol 2 Introducció	3
2.1 Síntesi enzimàtica de pèptids	3
2.1.1 Aspectes cinètics de la síntesi de pèptids	4
2.1.2 Estratègies de síntesi	5
2.2 Proteases	13
2.2.1 Especificitat de les proteases.....	14
2.2.2 Classificació de les proteases	17
2.3 Altres enzims	23
2.3.1 Penicil·lina acilases	23
2.4 Immobilització d'enzims	26
2.4.1 Immobilització per adsorció.....	28
2.4.2 Immobilització per enllaç covalent	28
2.5 Sistemes de reacció amb baix contingut en aigua.....	32
2.5.1 Medis de reacció orgànics amb baix contingut en aigua.....	34
2.5.2 Sistemes de reacció sòlid-sòlid	42
2.6 La CCK i CCK-8	46
2.6.1 Funcions de la CCK	46
2.6.2 La CCK-8	48
2.7 Estudis previs	49
2.7.1 Síntesi del dipèptid Z-Gly-Trp-OR	50
2.7.2 Síntesi del tripèptid Z-Gly-Trp-Met-OR	50
2.7.3 Síntesi del dipèptid H-Asp(OR)-Phe-NH ₂ (R: H, Bu ^t).....	54
2.7.4 Síntesi del pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	54
Capítol 3 Objectius	59
Capítol 4 Materials i mètodes	61
4.1 Materials	61
4.1.1 Derivats d'aminoàcids.....	61
4.1.2 Enzims	61
4.1.3 Suports d'immobilització.....	62
4.1.4 Solucions tampó	63
4.1.5 Dissolvents	63
4.1.6 Altres reactius.....	64
4.2 Equips	65
4.2.1 Reactors.....	65

4.2.2	Equips d'anàlisi	70
4.2.3	Altres equips.....	70
4.3	Mètodes generals	70
4.3.1	Modificacions d'aminoàcids	70
4.3.2	Immobilització d'enzims.....	75
4.3.3	Reaccions enzimàtiques	80
4.3.4	Mètodes d'anàlisi	81
4.3.5	Anàlisi del contingut d'aigua i fixació de l'activitat d'aigua (a_w).....	83
4.3.6	Mètodes de purificació	86
4.4	Condicions específiques per les diferents reaccions enzimàtiques.....	87
4.4.1	N-Prot./desprot. de derivats d'aminoàcids i pèptids amb PGA immob.	87
4.4.2	Síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8.....	93
4.4.3	Estudi de les condicions de síntesi de la CCK-8.....	100
4.4.4	Procés de síntesi de la CCK-8.....	101
4.4.5	Síntesi del dipèptid Z-Asp(OBu ¹)-Phe-NH ₂	108
4.5	Condicions específiques per a les reaccions químiques	109
4.5.1	Desprotecció del grup Z del dipèptid Z-Asp(OBu ¹)-Phe-NH ₂	109
4.5.2	Síntesi química de PhAc-Asp(OBu ¹)-OH.....	110
Capítol 5 Resultats i discussió.....		111
5.1	N-Prot./desprot. de derivats d'aminoàcids i pèptids amb PGA immob.	111
5.1.1	N-protecció d'aminoàcids	112
5.1.2	Reac. de síntesi de R-Gly-Trp-OBzl (on R: PhAc, Mand, Boc, Z).....	123
5.1.3	Desprotecció del pentapèptid	137
5.2	Síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8	146
5.2.1	Estratègia (Asp+Tyr)+Met. Utilització de Fmoc com a grup N-protector de l'àcid aspàrtic	147
5.2.2	Estratègia (Asp+Tyr)+Met. Utilització de PhAc com a grup N-protector de l'àcid aspàrtic	154
5.2.3	Estratègia Asp+(Tyr+Met).....	169
5.2.4	Avaluació de les dues estratègies de síntesi.....	172
5.3	Estudi de les condicions de síntesi de la CCK-8.....	173
5.3.1	Síntesi enzimàtica de l'octapèptid.....	173
5.3.2	Modificacions de l'octapèptid per a obtenir la CCK-8.....	177
5.4	Procés de síntesi de la CCK-8.....	179
5.4.1	Procés de síntesi del pentapèptid C-terminal de la CCK-8 (4-8).....	179
5.4.2	Procés de síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8 (1-3).....	206
5.4.3	Síntesi de l'octapèptid PhAc-CCK-8 a escala preparativa.....	212
Capítol 6 Conclusions		219
Apèndix A Nomenclatura.....		223
A.1	Derivats comercials.....	223
A.2	Derivats sintetitzats al laboratori	223
A.3	Simbologia	224
A.3.1	Aminoàcids	224
A.3.2	Grups protectors	225

A.3.3 Esters	225
A.3.4 General	225
Apèndix B Càlcul de rendiments	227
B.1 Relació d'àrees.....	227
B.2 Calibratges	228
Apèndix C pH òptim en una reacció de síntesi de pèptids sota control termodinàmic.....	231
Apèndix D Concentracions residuals de dissolvents permeses segons la FDA..	233
D.1 Introducció	233
D.2 Classificació	233
D.2.1 Dissolvents que han d'evitar-se (classe 1)	233
D.2.2 Dissolvents que han de limitar-se (classe 2)	234
D.2.3 Dissolvents amb baixa toxicitat potencial (classe 3).....	236
D.2.4 Dissolvents sense dades toxicològiques suficients	237
Bibliografia	239

Capítol 1 Presentació

Aquesta tesi s'emmarca dins les investigacions realitzades en el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona en col·laboració amb la Unitat de Química i Bioquímica de Proteïnes del CID-CSIC, en el camp de la síntesi enzimàtica de pèptids.

El treball es centra en desenvolupar un procés per a la síntesi enzimàtica de l'octapèptid C-terminal de la CCK (CCK-8). A banda que la seqüència de la CCK-8 està formada per aminoàcids de naturalesa molt variada, fet que és interessant des d'un punt de vista d'estudi bàsic, l'interès més rellevant d'aquesta molècula és que presenta un ampli espectre d'activitat biològica i un elevat potencial terapèutic.

- La introducció de la memòria s'ha distribuït en tres parts ben diferenciades que es detallen a continuació:
 - Diferents aspectes cabdals en la síntesi enzimàtica de pèptids (estratègies de control de les reaccions, especificitat i mètodes d'immobilització d'enzims, sistemes de reacció amb baix contingut en aigua, etc.).
 - Característiques i funcions de la CCK i CCK-8.
 - Un resum dels estudis previs realitzats en el grup de recerca sobre la síntesi enzimàtica del pentapèptid C-terminal de la CCK-8, els quals han servit de referència i punt de partida per aquest treball.
- El capítol de resultats i discussió s'ha subdividit en diferents apartats. Val a dir que l'ordre en que s'han presentat no sempre correspon a l'ordre cronològic en que es van realitzar els experiments.
 - Inicialment es presenten les investigacions de N- protecció/desprotecció realitzades amb penicil·lina G acilasa (PGA) d'E. coli. Aquests estudis es van començar amb la N- protecció de diferents derivats d'aminoàcids a escala analítica amb els grups protectors fenilacetil i mandelil (PhAc, Mand). Seguidament aquestes reaccions es van realitzar a escala preparativa.

En segon terme es presenta l'estudi de l'enllaç peptídic R-Gly-Trp-OBzl (dipèptid 4-5 de la CCK-8, on R: PhAc, Mand) amb l'objectiu d'investigar i comparar la influència dels grups protectors PhAc i Mand sobre la reactivitat

del donador d'acil. Al mateix temps s'intenta optimitzar la reacció amb una finalitat de procés, variant diferents paràmetres (relació donador d'acil/nucleòfil, percentatge de tampó en el medi, suport d'immobilització de l'enzim, etc.).

Aquest estudi es tanca amb l'aplicació de la PGA en una reacció de desprotecció del grup N- protector. Concretament es tria desprotegir el grup PhAc del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (la síntesi d'aquesta molècula s'exposa en apartats posteriors del treball), ja que aquesta etapa és necessària per tal de poder abordar la síntesi de l'octapèptid.

- En un segon bloc, s'inicia l'estudi de la síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8 a escala analítica, a partir de les dues estratègies de síntesi possibles (Asp+Tyr)+Met i Asp+(Tyr+Met). Es modifiquen diverses variables (sistemes de reacció, grups N- protectors, esters carboxiterminals, etc.) per a intentar assolir rendiments més elevats, sobretot en la reacció de síntesi del tripèptid.
- Seguidament es presenta un apartat dedicat a trobar unes bones condicions per a la síntesi de l'octapèptid i tot seguit s'introdueixen les modificacions necessàries per a l'obtenció de la PhAc-CCK-8 (eliminació dels esters tert-butílics dels residus d'àcid aspàrtic i sulfatació de la tirosina).
- L'últim bloc del capítol es destina a presentar el procés global per a la síntesi enzimàtica de la PhAc-CCK-8 a escala preparativa.

Tenint com a base l'esquema de síntesi del pentapèptid dels estudis previs realitzats per altres components del grup d'investigació, es proposa un nou esquema amb la idea de definir un procés global per a la síntesi d'aquesta molècula. La viabilitat d'aquest esquema es comprova a escala analítica. Posteriorment es realitza la síntesi del pentapèptid i la desprotecció del grup PhAc, amb PGA, a escala de grams.

A continuació es planteja el procés per a la síntesi del tripèptid N-terminal a partir de les condicions trobades anteriorment a escala analítica.

Finalment es du a terme la síntesi de la PhAc-CCK-8 a escala preparativa.

Capítol 2 Introducció

2.1 Síntesi enzimàtica de pèptids

El concepte de síntesi enzimàtica de pèptids ja va ser desenvolupat per J.H. van't Hoff a l'any 1898, quan va suggerir que les proteases –enzims que normalment catalitzen l'escissió d'enllaços peptídics– podien ser utilitzades per sintetitzar-los, pel principi de reversibilitat de les reaccions químiques (van't Hoff, 1898). També hi contribuí Wilhem Ostwald amb el concepte de catalitzador, com agent que accelera l'assoliment de l'equilibri (Ostwald, 1901).

Tot i així fins l'any 1937 no es va realitzar la primera prova experimental d'una síntesi d'aquest tipus, quan Bergmann i Fraenkel-Conrat van trobar que la Bz-Leu-OH en presència de Leu-NHPh i de papaïna conduïa a la formació de Bz-Leu-Leu-NHPh (Bergmann *et al.*, 1938b) i al mateix temps Bergmann i Fruton van demostrar la formació de Bz-Tyr-Gly-NHPh a partir de Bz-Tyr-OH i Gly-NHPh utilitzant - quimotripsina (-QT) (Bergmann *et al.*, 1938a).

Tots aquests estudis es van realitzar amb la creença que, *in vivo*, la síntesi enzimàtica de pèptids també es portava a terme mitjançant la reversibilitat de les reaccions hidrolítiques catalitzades per proteases. Aquest concepte de formació de les proteïnes en els éssers vius va ser vigent fins que es va demostrar que aquest procés és altament endotèrmic i que són necessàries de l'ordre de 2 a 4 kcal/mol per enllaç peptídic format. Així a l'any 1953, Borsook va demostrar que en els éssers vius, la síntesi enzimàtica de pèptids no és possible a partir de l'acció inversa a la hidròlisi enzimàtica (Borsook, 1953).

La creença que les proteases catalitzaven la biosíntesi de proteïnes es va descartar definitivament amb l'aparició dels treballs de Watson i Crick sobre el codi genètic i els papers del m- i el t-RNA durant el procés de síntesi *in vivo* de proteïnes (Watson, 1977).

Malgrat tot, els treballs sobre la utilització de proteases en síntesi de pèptids van continuar, aprofitant les idees i les investigacions iniciades per Fraenkel-Conrat i Joseph Fruton.

2.1.1 Aspectes cinètics de la síntesi de pèptids

En una reacció no catalitzada, d'hidròlisi o síntesi d'un enllaç peptídic, només un número limitat de molècules posseeixen per elles mateixes la suficient energia per arribar a passar la barrera d'activació i consegüentment en aquesta situació la velocitat de reacció és molt lenta.

Per definició, un catalitzador incrementa la velocitat de reacció disminuint l'energia d'activació i aquest fet permet que un major nombre de molècules arribin a l'estat ric en energia (vegi's Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.).

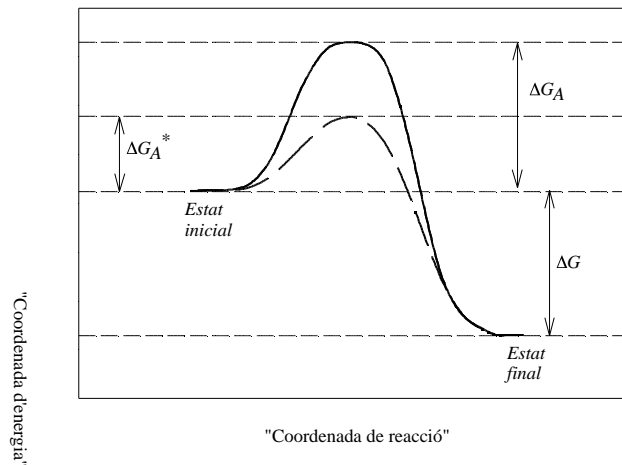


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Barrera energètica a superar per un sistema en una reacció química no catalitzada (—) i catalitzada (---). ΔG indica l'energia lliure global de la reacció, en tant que ΔG_A i ΔG_A^* denoten l'energia d'activació en absència i en presència, respectivament, de catalitzador.

L'explicació de com acceleren la velocitat de reacció les proteases, es troba en el fet que actuen orientant correctament els substrats i els seus grups reaccionants, acostant-los entre ells, al mateix temps que al centre actiu de la proteasa.

Les proteases, malgrat ser conegudes per la seva acció proteolítica, obeeixen en comú amb els altres biocatalitzadors el principi de reversibilitat, és a dir, en un determinat procés acceleren tant la reacció proteolítica com proteosintètica (Page, 1977). Donat que l'enzim varia la velocitat però no l'equilibri, la posició d'aquest determina exclusivament si un enllaç peptídic és preferiblement generat o escindit.

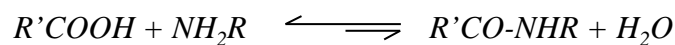
En termes químics, la formació o trencament d'un enllaç peptídic pot considerar-se com una acilació electrofílica d'una amina o una molècula d'aigua respectivament. Malgrat tot, tant la proteosíntesi com la proteòlisi no poden tenir lloc espontàniament perquè l'electrofilicitat del carboni α -carboxílic del grup acil no és prou elevada.

De totes maneres, es pot assolir un estat de transició energèticament més favorable si abans de la reacció s'augmenta la nucleofilicitat del grup acil acceptor o l'electrofilicitat del grup carboxil del donador d'acil. La segona alternativa s'utilitza en síntesi de pèptids i implica disminuir la densitat electrònica del grup α -carboxil introduint un substituent electronegatiu. Aquest procés s'anomena activació del grup α -carboxílic i condueix a la formació d'un intermedi ric en energia amb un gran potencial de transferència del grup acil, el qual ràpidament porta cap a l'aminòlisi o la hidròlisi.

Moltes proteases poden operar d'acord amb el principi general d'activació carboxílica. On, per exemple, el grup acil d'un determinat substrat s'uneix covalentment a la proteasa respectiva a través d'un enllaç ester per a formar l'intermedi ric en energia anomenat complex acil-enzim. Aquest complex és un ester actiu altament electrofílic, que pot patir una desacilació per atac nucleofílic. Si el nucleòfil és l'aigua, té lloc la hidròlisi de l'ester i si és una amina d'un segon aminoàcid, es produeix la formació d'un enllaç peptídic.

2.1.2 Estratègies de síntesi

Donat que sota condicions fisiològiques, l'equilibri d'una reacció catalitzada per proteases està totalment desplaçat en el sentit de la hidròlisi, per tal d'afavorir la proteosíntesi cal trobar maneres per reduir les barreres energètiques que caracteritzen el procés o bé maneres de sobrepassar-les.



Per tal d'actuar sobre el procés de síntesi d'enllaços peptídics catalitzats per proteases, habitualment s'utilitzen dues vies diferents: el control termodinàmic del procés o el control cinètic.

2.1.2.1 Síntesi de pèptids controlada termodinàmicament

La formació d'enllaços peptídics controlada termodinàmicament és la utilització directa de la capacitat de les proteases per a catalitzar la reacció inversa a la hidròlisi de pèptids (Fruton, 1982; Petkov, 1982).

La síntesi de pèptids controlada termodinàmicament es pot emprar amb totes les proteases i amb aquells substrats que no tinguin protegit l'extrem C-terminal.

Tot i així, si s'utilitzen proteases no específiques per condensar segments, poden produir-se ruptures d'enllaços no desitjades, ja que poden donar-se reaccions secundàries si alguna de les seqüències conté algun dels aminoàcids que correspon al substrat específic de la proteasa.

Cal tenir present que la síntesi d'enllaços peptídics –al contrari de la hidròlisi– és un procés endotèrmic, ja que té lloc amb una pèrdua d'entropia i és energèticament tan desfavorable que la constant K_{sin} per l'enllaç de dos aminoàcids no protegits és inferior a 10^{-5} (Jakubke *et al.*, 1985).

Un esquema general de la reacció podria ésser el que es presenta a la Figura
¡Error!Argumento de modificador desconocido.:

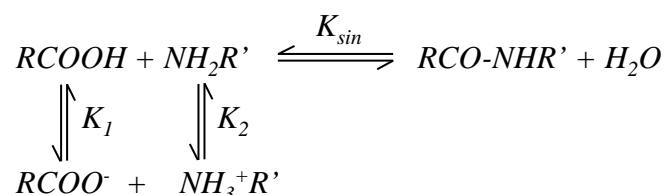


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema d'una reacció realitzada sota control termodinàmic.

La reacció només té lloc entre les espècies no ionitzades, les concentracions de les quals evidentment depenen del pH i del pK de cada substrat. És a dir, que quant més gran siguin les concentracions d'espècies no ionitzades més ho serà la concentració de pèptid format.

Tot i així, la constant d'equilibri del procés sol ser molt petita i per tant la quantitat de pèptid format és baixa. D'altra banda l'única funció de la proteasa, com ja s'ha esmentat, és accelerar l'assoliment de l'equilibri per formar el pèptid. Així, per tal d'incrementar el rendiment de síntesi s'ha d'aconseguir dirigir la posició de l'equilibri, fet que es pot aconseguir actuant sobre l'equilibri iònic o químic, bé desplaçant-los o actuant sobre els valors de les pròpies constants.

2.1.2.1.1 Modificació de l'equilibri iònic

- La modificació de l'equilibri iònic, actuant sobre els valors de les constants del sistema es pot aconseguir de diverses formes, les quals es detallen a continuació.

- **Eliminació del caràcter zwitteriònic dels reactants.** La naturalesa endotèrmica d'aquesta reacció ve induïda principalment pel caràcter zwitteriònic dels aminoàcids i pèptids lliures, és a dir, per la naturalesa àcida i bàsica dels grups reaccionants. Conseqüentment, eliminant aquest caràcter s'obté una disminució en la concentració dels grups ionitzats. Això es pot aconseguir, en una primera aproximació, amb la introducció de grups protectors en les funcions -amino i -carboxíliques que no intervenen en l'enllaç, però cal tenir present que la introducció d'aquests grups també modifica el pK dels substrats.

Les conseqüències d'aquesta manipulació es reflecteixen en el següent exemple on l'energia requerida per a la transferència del protó disminueix quan es treballa amb grups protectors (Carpenter, 1960).



- **Efecte dels cossolvents orgànics.** Una altra tècnica que s'utilitza per modificar l'equilibri iònic és afegir un cossolvent orgànic. El cossolvent provoca una disminució de la constant dielèctrica del medi, que a la vegada fa disminuir la ionització dels grups. Com que aquest efecte es fa notar més en els grups la ionització dels quals prové d'una separació de càrregues, el pK majorment modificat serà el del grup carboxil (Homandberg *et al.*, 1981), tal i com s'il·lustra a la Figura **Argumento de modificador desconocido.**

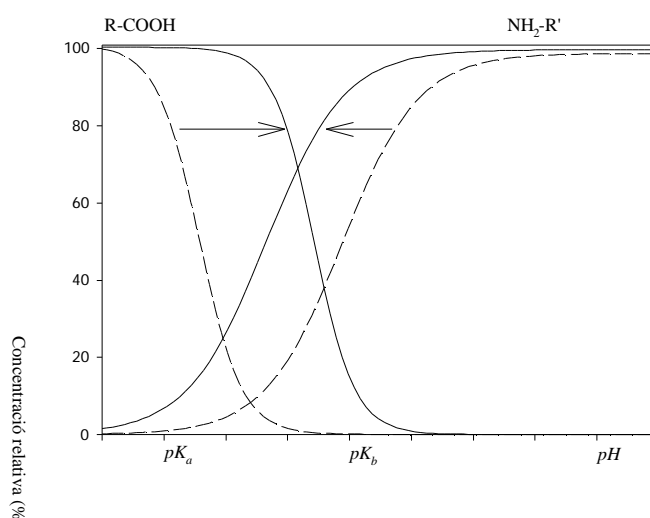


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Efecte de l'addició d'un cossolvent orgànic en la ionització dels grups $-R-COOH$ i NH_2-R' i en la modificació dels respectius pKs .

La variació del pK d'aquests grups fa que, en definitiva, s'incrementi la constant d'equilibri de proteosíntesi, donant lloc a un augment del rendiment de la reacció (Michaelis *et al.*, 1925; Mizutani, 1925).

Alguns dels dissolvents més emprats per a tal efecte són: metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfòxid, dioxà, acetona, acetonitril i alguns polialcohols.

El desavantatge principal que presenten aquests sistemes és que l'activitat catalítica de les proteases disminueix a mesura que augmenta la concentració de cossolvent i, per tant, el temps requerit per assolir l'equilibri també augmenta. Només els polialcohols, que actuen com a estabilitzadors dels enzims, es poden utilitzar en elevades concentracions sense inactivar els enzims, però en alguns casos s'ha trobat que tenen efectes negatius sobre els substrats.

- **Variació de la temperatura.** La ionització d'àcids i bases depèn de la temperatura i la seva relació es pot expressar segons la següent equació:

$$-\frac{d(pK)}{dT} = \frac{pK}{T} + \frac{S^0}{2.303RT} = \frac{pK + 0.218 S^0}{T},$$

on S^0 és l'increment d'entropia estàndard.

El grau d'ionització dels grups -amino dels aminoàcids varia doncs amb la temperatura, el valor de pK_2 disminueix a l'augmentar la temperatura, aproximadament entre 0.025-0.030 unitats per grau centígrad. La ionització del grup -carboxil en canvi es veu poc afectada per aquesta variable.

- Una altra forma de modificar l'equilibri iònic és desplaçant-lo, variant la concentració de formes no ionitzades, tal i com es detalla a continuació.
 - **Variació del pH.** La ionització també està afectada per la concentració de H^+ en el medi. Tot i que variant el pH es pugui aconseguir, per exemple, una desprotonació òptima de l'amina de l'aminoàcid que actua com a nucleòfil, en el mateix valor de pH, el carboxil de l'altre aminoàcid estarà totalment ionitzat, impedingint l'atac del nucleòfil. Per tant, es fa necessari determinar un pH òptim de treball, el qual s'ha demostrat que ve donat en funció de les constants de dissociació dels substrats: K_1 i K_2 , segons l'expressió (Lvedas *et al.*, 1980; Kullmann, 1987), (veure demostració a §C):

$$pH_{\text{òptim}} = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2)$$

Les constants de dissociació depenen de l'aminoàcid i de si aquest està protegit o no. Aquests valors es troben tabulats o són fàcilment determinables.

Així mateix, cal que aquest pH es trobi dins de l'interval de pH on l'enzim presenta activitat. Per tant, sovint el pH adequat és un compromís entre el pH òptim des del punt de vista de les càrregues iòniques i el pH òptim de l'enzim.

2.1.2.1.2 Modificació de l'equilibri químic

- Les estratègies per a desplaçar l'equilibri químic en favor de la síntesi es basen en la manipulació de la llei d'acció de masses. Donat que en aquest tipus de reaccions els productes que s'obtenen són el pèptid i l'aigua, resulta evident que una forma de desplaçar l'equilibri en favor de la síntesi peptídica és actuant sobre el propi producte, ja sigui controlant la solubilitat o bé extraient-lo. Alternativament també es pot actuar sobre l'altre producte de la reacció, el que significa disminuir la concentració d'aigua del medi, i una altra opció es treballar amb excés d'algun dels reactius. A continuació s'expliquen amb més detall aquestes estratègies per desplaçar l'equilibri.
 - **Processos controlats per la solubilitat.** Una tècnica comunament utilitzada en la síntesi enzimàtica de pèptids és la precipitació del producte, la qual es fonamenta en la baixa solubilitat en medi aquós dels pèptids completament

protegits. En aquests casos, a mesura que el producte es va sintetitzant, es va separant del medi per precipitació, facilitant així la seva recuperació. D'aquesta forma es desplaça l'equilibri a favor de la síntesi i el rendiment que s'obtingui dependrà de la solubilitat del producte. La constant d'equilibri per una reacció, on algun dels productes precipita, és deguda als seus límits de solubilitat en el sistema, i és més gran com més elevada sigui la concentració inicial de substrats i més petita la solubilitat del producte en el sistema. Aquest mètode és molt utilitzat si el producte és molt insoluble en comparació amb els substrats.

D'altra banda, es pot forçar que el producte sigui menys soluble en el medi de reacció complexant-lo. Així, el terme complexació específica del producte, es refereix a la síntesi en presència d'un reactiu complexant, capaç d'interaccionar amb el producte (Homandberg *et al.*, 1981). La complexació fa que la concentració de producte es mantingui per sota de l'equilibri i, com a conseqüència, que l'equilibri es desplaci cap a la formació del pèptid. Entre els diversos complexants assajats, la majoria són pèptids i/o proteïnes, tot i que també, existeixen substàncies no peptídiques que poden emprar-se com a complexants (Chaiken, 1981).

- **Utilització de sistemes bifàsics.** La utilització de sistemes bifàsics, implica la transferència dels productes peptídics des de la fase aquosa a la fase orgànica –sempre i quan el producte sigui més soluble en el dissolvent orgànic– produint-se així, una extracció continua del producte del medi de reacció. El punt clau en la utilització d'aquests sistemes es troba en la relació de volums entre la fase aquosa i la fase orgànica, així com en els coeficients de partició dels reactants i productes entre les dues fases (Martinek *et al.*, 1981a/b).

La influència d'aquestes variables pot ser quantificada. Així Martinek i col·laboradors van desenvolupar una expressió per la constant d'equilibri d'una reacció tipus: $A+B \rightleftharpoons C+D$, per un sistema bifàsic, la qual es detalla a continuació:

$$K_{bifàsic} = K_{aquós} \frac{(1 + \alpha P_c) + (1 + \alpha P_d)}{(1 + \alpha P_a) + (1 + \alpha P_b)}$$

Essent : $V_{org}/V_{aquós}$ i P els coeficients de partició entre la fase orgànica i aquosa dels reactants i productes.

- **Disminució de la concentració de l'aigua.** Com que la formació d'enllaços peptídics suposa l'alliberament d'aigua, el desplaçament de l'equilibri químic també es pot aconseguir reduint-ne la concentració. Amb aquest objectiu es poden utilitzar sistemes de reacció amb baix contingut en aigua com són: les micel·les reverses, els sistemes de reacció sòlid-sòlid o els medis orgànics amb baix contingut en aigua.

D'altra banda, l'addició de cossolvents orgànics, a més dels efectes esmentats anteriorment sobre l'equilibri iònic, també pot desplaçar l'equilibri químic reduint la concentració d'aigua.

- **Efecte de la concentració dels reactants.** D'acord amb la llei d'acció de masses, el grau de síntesi depèn de la concentració dels reactius i dels productes. Per tant, les reaccions catalitzades per proteases poden dirigir-se cap a la síntesi peptídica manipulant aquestes concentracions. Així doncs, addicionant un dels reactius en gran excés, pot millorar-se el rendiment.
- La modificació de l'equilibri químic com s'ha esmentat, també es pot fer actuant directament sobre les constants, això és variant la temperatura.
 - **Efecte de la temperatura.** La posició de l'equilibri depèn de la temperatura segons l'equació de van't Hoff:

$$\frac{d \ln K}{d(1/T)} = - \frac{H^0}{R}$$

A partir d'aquesta expressió s'observa que la variació de la temperatura pot canviar la constant d'equilibri i com a resultat influir en la formació de l'enllaç peptídic.

2.1.2.2 Síntesi de pèptids controlada cinèticament

Una via alternativa a la síntesi enzimàtica de pèptids controlada per l'equilibri, és la síntesi sota control cinètic que segueixen les serin i tiol proteases.

En aquest, cas l'aminoàcid o pèptid que aporta el seu grup -carboxílic en l'enllaç peptídic no està lliure, sinó que es troba en forma d'ester. Aquest substrat reacciona amb l'enzim, donant lloc a la formació d'un complex acil-enzim de gran poder acilant. El complex acil-enzim és desacilat competitivament per l'aigua i pel nucleòfil (NH₂-R'), segons l'esquema que es mostra a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**

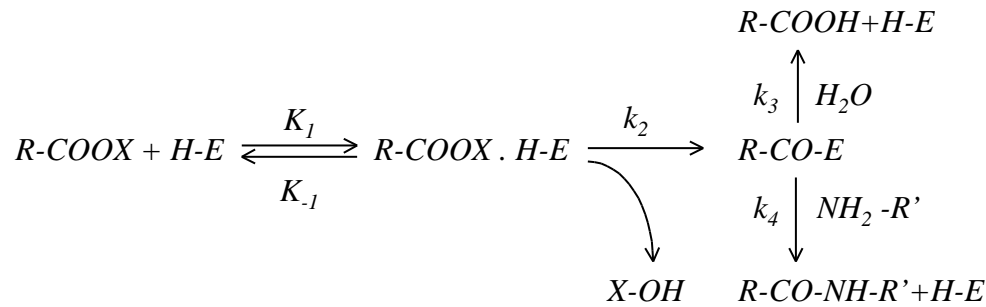


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema de reacció realitzada sota control cinètic.

L'atac nucleofílic de l'aigua sobre aquest intermedi provocarà la hidròlisi del complex activat. Ara bé, si el nucleòfil és un grup -amino d'un aminoàcid o d'un pèptid i és més nucleòfil que l'aigua, es formarà preferentment un enllaç peptídic, el que implica $k_4[\text{Nucleòfil}] \gg k_3[\text{H}_2\text{O}]$. Com que la formació de l'enllaç peptídic és essencialment irreversible i competitiva amb la hidròlisi, els productes que es formin dependran de la velocitat relativa de les dues reaccions.

Durant la reacció, el producte s'acumula en el medi de reacció, fins que la seva concentració és superior a la de l'equilibri, moment en que comença a hidrolitzar-se, però a una velocitat de reacció inferior a la de síntesi per control cinètic. Si es deixa evolucionar el sistema s'arribarà a un punt en el que les baixes concentracions de substrats faran que la velocitat de síntesi per control cinètic sigui inferior a la d'hidròlisi per control termodinàmic i aquest serà el punt a partir del que s'haurà de parar la reacció per tal d'obtenir un millor rendiment de síntesi de producte, tal i com es pot apreciar a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

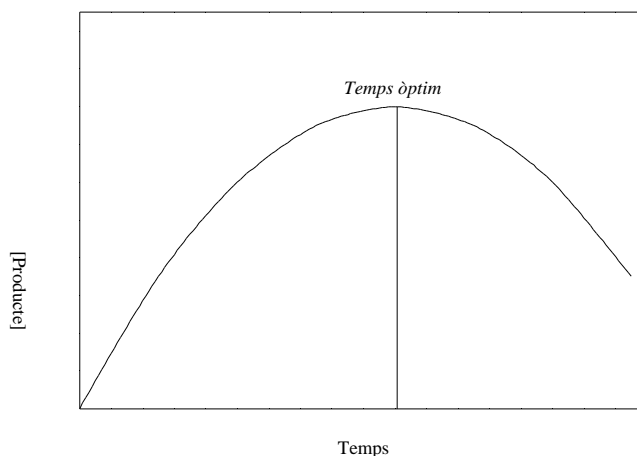


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Temps òptim d'aturada d'una reacció de síntesi de pèptids controlada cinèticament.

Aquestes reaccions amb control cinètic poden dur-se a terme a pH alcalins, ja que treballant en aquestes condicions, la capacitat proteolítica de moltes proteases és baixa, mentre que la seva capacitat esteràsica és manté alta. Per tant, s'afavoreix la formació del complex acil-enzim i s'evita la hidròlisi secundària de l'enllaç peptídic. Un altre avantatge és que a pH bàsic el grup -amino de l'aminoàcid o pèptid que actua com a nucleòfil no està protonat.

Les condicions de síntesi en control cinètic, són diferents de les de control termodinàmic. Els paràmetres en que aquest fet és més obvi, són la quantitat d'enzim i el temps de reacció. Per exemple en la síntesi de Z-Phe-Ala-NH₂ amb control termodinàmic, es requereixen 200 µM de -QT i un temps de reacció de 20 hores, en comparació amb 20 µM de -QT i un temps de 5 minuts amb control cinètic (Oka *et al.*, 1977).

2.2 Proteases

Des de la perspectiva bioquímica les proteases es poden dividir en dos grans grups: les endopeptidases, les quals hidrolitzen en llocs determinats del mig de la cadena i les exopeptidases que hidrolitzen a partir d'un cap de la cadena peptídica.

Les proteases són enzims hidrolítics però s'ha demostrat que revertint l'acció de les endopeptidases es poden formar enllaços peptídics. Aquest fet no és aplicable a les exopeptidases, ja que l'única que pot catalitzar la formació d'aquest enllaç és la carboxipeptidasa Y.

2.2.1 Especificitat de les proteases

L'avantatge més obvi de la síntesi enzimàtica ve donat per la capacitat dels enzims de catalitzar reaccions amb una especificitat que no es pot atènyer de cap altra forma. A l'igual que molts altres enzims, les proteases tenen restringida la seva activitat a un número limitat de substrats. Com a conseqüència, l'ús d'aquests enzims per a la formació d'enllaços peptídics resulta molt adequada per a evitar la formació de molts subproductes.

Per tal d'utilitzar l'enzim més adient en la catàlisi d'un determinat enllaç peptídic, és necessari conèixer l'especificitat de la proteasa en la hidròlisi de l'enllaç peptídic, ja que les mateixes característiques estructurals de RCO-NHR' que influencien la velocitat del trencament hidrolític de l'enllaç CO-NH, estan involucrades en la síntesi del mateix enllaç.

Es poden distingir tres nivells d'especificitat: especificitat estructural, regioespecificitat i estereoespecificitat.

2.2.1.1 Especificitat estructural

El 1967, Schechter i Berger van introduir un sistema de nomenclatura per a descriure la interacció entre les proteases i els substrats, el qual també resulta útil per a expressar de forma convencional l'especificitat d'una proteasa per a una determinada posició del substrat (Schechter *et al.*, 1967). En aquest sistema, el lloc d'unió entre el substrat i la proteasa es pot imaginar com un conjunt de posicions, de manera que cada una d'elles interacciona amb un aminoàcid del substrat.

Per convenció, els aminoàcids del substrat s'anomenen P i els diferents llocs de la proteasa que interaccionen amb el substrat s'anomenen S. Els aminoàcids situats a l'extrem aminoterminal de l'enllaç escindit s'enumeren P_1, P_2, P_3 , comptant en direcció cap a l'extrem, tal i com s'indica a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**, mentre que els residus a l'extrem carboxiterminal de l'enllaç escindit s'enumeren P_1', P_2', P_3', \dots . De la mateixa manera els llocs d'unió de la proteasa s'anomenen $S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3', \dots$

Així, seguint aquesta notació com a exemple en el cas de la tripsina, P_1 correspon a un residu d'Arg o Lys.

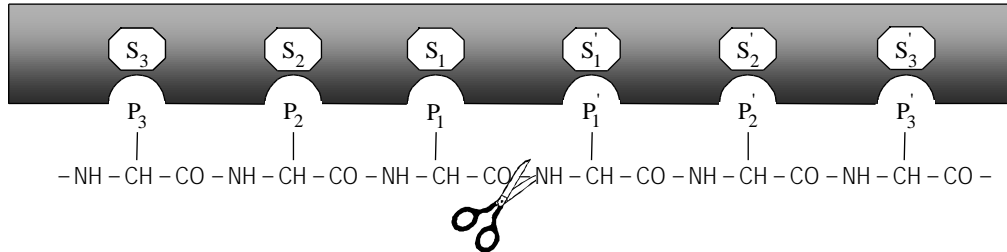


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Nomenclatura de Schechter i Berger per a la unió d'un substrat peptídic a una proteasa. La proteasa està representada per la zona ombrejada. P_1, \dots, P_1', \dots són les cadenes laterals de sis aminoàcids i S_1, \dots, S_1', \dots són els llocs d'unió corresponents de l'enzim.

L'especificitat de les proteases es classifica habitualment en especificitat primària i secundària.

L'especificitat primària és la que s'associa amb les interaccions entre la mínima porció de la molècula de substrat necessària per a la catàlisi i la regió complementària del centre actiu que inclou els grups enzimàtics que estan directament relacionats amb el trencament i la formació de l'enllaç peptídic. A la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es presenten les proteases més comunes com també la seva especificitat primària pels substrats (Morihara, 1987).

L'especificitat secundària d'una proteasa s'associa amb les interaccions enzim-substrat que es produeixen quan es substitueix un substrat format només per un aminoàcid preferit per la proteasa (ex: Ac-Tyr-NH₂), per una sèrie d'oligopèptids en els que el mateix tipus d'enllaç és trencat (ex: -Tyr-NH-) i s'estudia l'efecte de la variació de la longitud de la cadena del substrat i de la naturalesa dels aminoàcids flanquejant l'enllaç peptídic trencat.

La presència de l'aminoàcid/s correcte/s dictat per l'especificitat primària d'una proteasa, és un requisit indispensable per a que es realitzi la catàlisi amb èxit. Mentre que el compliment de l'especificitat secundària no és en molts casos imprescindible tot i que pot afectar l'eficiència catalítica.

Proteasa	Tipus	Especificitat
----------	-------	---------------

-quimotripsina, subtilisina	Ser	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Trp,Tyr,Phe,Leu	P ₁ '=Yaa
Elastasa	Ser	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Ala,Ser	P ₁ '=Yaa
Pepsina	Asp	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Phe,Tyr,Leu	P ₁ '=Trp,Phe,Tyr
Termolisina	Metal·lo	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Xaa	P ₁ '=Leu,Phe
Papaïna	Cis	-P ₂ -P ₁ -P ₁ '	P ₁ =Xaa P ₂ =Phe,Val,Leu	P ₁ '=Yaa
Carboxipeptidasa Y	Ser	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Xaa	P ₁ '=Yaa
Catepsina B	Cis	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Arg	P ₁ '=Yaa
Proteasa II de Mixobacter	Metal·lo	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Xaa	P ₁ '=Lys
Clostripaïna	Cis	-P ₁ -P ₁ '-	P ₁ =Arg	P ₁ '=Yaa

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Proteases més comunes, tipus i especificitat. Xaa: diversos residus aminoàcids. Yaa: varis residus d'aminoàcids ester o amida terminals. P₂, P₁ i P₁': aminoàcids dels substrats, segons la nomenclatura de Schechter i Berger.

2.2.1.2 Regioespecificitat

La regioespecificitat de les proteases està associada amb una part molt concreta del substrat, de forma que la reacció només té lloc entre el grup -carboxil i el grup -amino terminals. A excepció d'aquests dos grups els altres grups reactius potencials del substrat no prenen part en la catàlisi. Aquest fet permet que en síntesi enzimàtica es pugui treballar amb els substrats mínimament protegits.

2.2.1.3 Estereoespecificitat

Les proteases presenten una estereoespecificitat en el reconeixement del substrat que està determinada per la seva configuració. Així actuen quasi exclusivament sobre un isòmer òptic i ignoren l'altre. En concret demostren una preferència absoluta per la forma L-enantiòmer del substrat. Aquest avantatge és probablement el més important respecte a la síntesi química ja que les proteases es poden usar també per separar isòmers d'una mescla racèmica. D'altra banda, el producte resultant d'una síntesi serà òpticament homogeni malgrat que els substrats inicials siguin una mescla òpticament heterogènia.

2.2.2 Classificació de les proteases

Les primeres classificacions de les proteases es basaven en la seva mida molecular, la càrrega o la seva especificitat pels substrats. Posteriorment s'ha trobat més convenient classificar-les pels seus centres actius, els seus mecanismes d'acció i estructura tridimensional.

La Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular divideix les proteases en classes –basant-se en el seu mecanisme catalític– i en famílies. Cada família presenta un conjunt característic d'aminoàcids funcionals, disposats en una configuració particular per a formar el centre actiu.

Actualment es reconeixen cinc classes: serinproteases (EC 3.4.21), metal·loproteases (EC 3.4.24), cisteinproteases (EC 3.4.22), aspàrticproteases (EC 3.4.23) i treoninproteases (EC 3.4.25). A continuació es descriuen algunes característiques del mecanisme catalític de les diferents classes de proteases utilitzades en el treball, al mateix temps que es detallen algunes propietats i aplicacions de les proteases que s'han emprat.

2.2.2.1 Serinproteases

Aquesta classe d'enzims és la més estudiada dins el camp de les proteases i possiblement dins l'enzimologia en general.

Les serinproteases tenen en comú, la presència, en el centre actiu d'un residu de serina, un d'histidina i un d'àcid aspàrtic. El tret rellevant del seu mecanisme catalític és la generació del complex covalent acil-enzim, produint-se la formació d'un ester entre el grup hidroxil de la serina i la funció acil del substrat.

Les serinproteases inclouen dues famílies: les serinproteases d'origen mamífer (per exemple quimotripsina (EC 3.4.21.1.), elastasa pancreàtica (EC 3.4.21.36) i les serinproteases d'origen bacterià (subtilisina (EC 3.4.21.62)).

α -Quimotripsina

La α -quimotripsina és un enzim digestiu de 25 kd que es sintetitza en forma de precursor. El paper principal que té en l'organisme és hidrolitzar enllaços peptídics durant la digestió intestinal de les proteïnes. La cadena polipeptídica del quimotripsinogen –precursor inactiu de la α -quimotripsina– està formada per 245 aminoàcids. Durant el procés d'activació els residus 14-15 i 147-148 del quimotripsinogen són escindits. Les tres cadenes polipeptídiques romanents són unides mitjançant dos ponts

disulfur intercatenaris per a formar la molècula activa de α -quimotripsina. La cadena polipeptídica d'aquest enzim està plegada en dos dominis del tipus α -barril antiparal·lel. El centre actiu està situat en un solc entre els dos dominis. Un dels dominis contribueix amb dos residus de la tríade catalítica: His 57 i Asp 102, mentre que la Ser 195 es troba en el segon domini. La Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. en mostra la seva estructura.

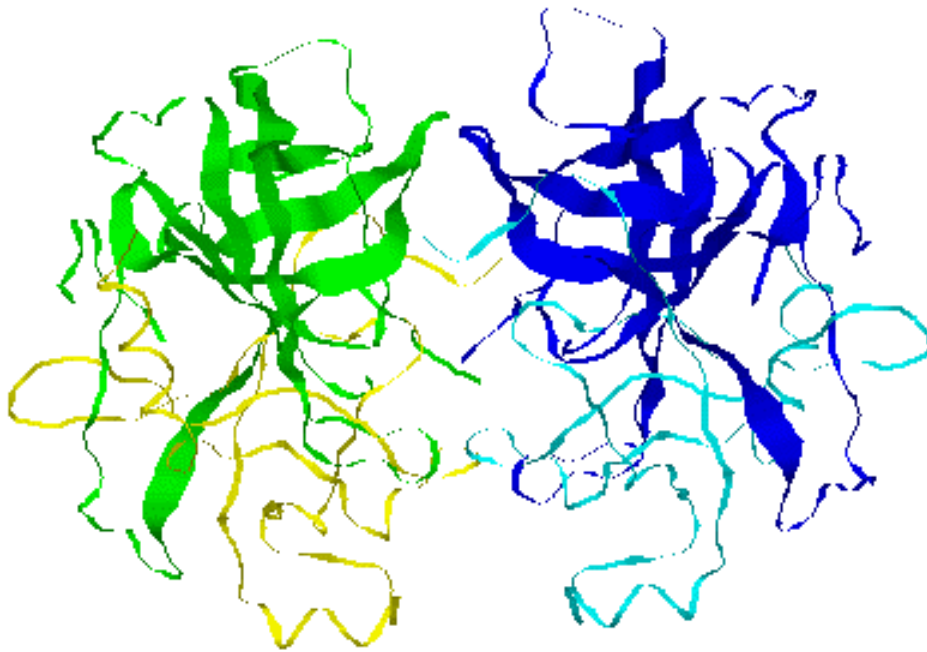


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Estructura de l' α -quimotripsina a una resolució d'1.68 Å on es poden observar els dos dominis (Tsukada *et al.*, 1985).

La α -quimotripsina presenta una clara preferència pels enllaços adjacents als grups carbonil d'aminoàcids aromàtics com Phe, Tyr, Trp, Leu (Bergmann *et al.*, 1937/38a). A més els pèptids que contenen His, Met o Thr en posició P₁, també són reconeguts com a substrats, tot i que amb menys eficiència. Aquest enzim presenta baixa especificitat pel que fa als nucleòfils, acceptant així una àmplia varietat d'aminoàcids o pèptids. Respecte a l'especificitat secundària s'expressa amb menys grau ja que només presenta una certa preferència pels aminoàcids hidrofòbics en posició P₂ i P₁' (Bauer, 1978).

Als anys 70, Morihara i Oka van investigar de forma sistemàtica la proteosíntesi mitjançant la utilització d'aquest enzim, i a partir de la informació d'aquests estudis

es van poder establir les seves condicions òptimes d'actuació (Morihara *et al.*, 1977). Al contrari del que succeeix amb la proteòlisi catalitzada per aquest enzim, la proteosíntesi es veu afavorida per l'ús de pH més alcalins. Així el pH òptim de la - quimotripsina per a hidrolitzar fragments peptídics és de 7.8, mentre que el rang de pH òptim per a la síntesi està entre 9 i 11.

2.2.2.2 Metal·loproteases

Aquest grup d'enzims –a l'igual que succeeix amb les aspàrticproteases– en el seu mecanisme catalític no formen intermedis covalents. Les metal·loproteases en canvi necessiten un ió metàl·lic per a exercir la seva activitat catalítica. Aquest metall normalment és el zinc, malgrat que en alguns casos pot ser substituït per altres metalls de transició.

Aquesta classe d'enzims també inclou dues famílies, les metal·loproteases d'origen mamífer (neurolisina (EC 3.4.24.16)) i les d'origen bacterià com ara la termolisina (EC 3.4.24.27) i la deuterolisina (EC 3.4.24.39).

Termolisina

La termolisina és una metal·loproteasa neutre que s'obté a partir de *Bacillus thermoproteolyticus*. Es tracta d'una endopeptidasa termostable amb un pes molecular de 34.6 kd. La Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** en mostra la seva estructura.

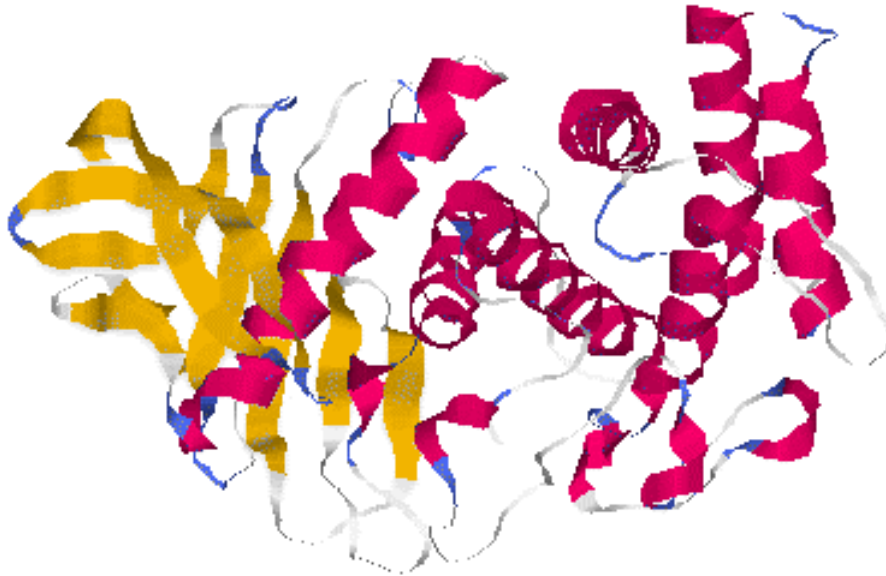


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Estructura de la termolisina a una resolució d'1.70 Å (Holland et al., 1994).

El seu mecanisme catalític requereix que en el centre actiu s'uneixi un ió de zinc (Latt *et al.*, 1969), mentre que quatre ions de calci són necessaris per a la seva termostabilitat (Feder *et al.*, 1971).

Els estudis inicials realitzats sobre l'especificitat de la termolisina indiquen que preferentment trenca els enllaços peptídics en els que el grup imino prové d'un aminoàcid hidrofòbic (Leu, Phe, etc.) (Mori-hara, 1974), i que la velocitat de trencament es pot veure incrementada quan la funció carbonil de l'enllaç a trencar pertany també a un aminoàcid hidrofòbic (Mori-hara *et al.*, 1970).

El primer estudi sistemàtic sobre l'activitat proteosintètica de la termolisina va ser publicat el 1977 per Isowa *et al.* Aquests autors van estudiar l'acoblament de diferents Z-aminoàcids amb H-Phe-Val-OBu^t a pH 7.5, utilitzant com a catalitzador aquest enzim (Isowa *et al.*, 1977).

Entre les aplicacions recents, més destacables d'aquest enzim es pot citar el seu ús en reaccions de síntesi de pèptids mitjançant sistemes de reacció sòlid-sòlid (Kuhl *et al.*, 1995).

2.2.2.3 Cisteinproteases

Aquesta classe de proteases presenta una gran similitud amb les serinproteases perquè també formen un intermedi covalent. Les cisteinproteases es caracteritzen per la presència, en el centre actiu, d'un residu de cisteïna, un d'histidina i un d'àcid aspàrtic; tots ells relacionats amb l'activitat catalítica de l'enzim.

El mecanisme catalític d'aquest grup d'enzims està involucrat en la formació del complex acil-enzim, on la funció acil del substrat s'uneix al residu de cisteïna, mitjançant un enllaç tioester, la formació del qual està facilitada per les cadenes laterals de la histidina i de l'aspàrtic.

Alguns exemples d'enzims d'aquesta família són la papaïna (EC 3.4.22.2), bromelaïna (EC 3.4.22.32), proteïnasa d'estreptococs (EC 3.4.22.10), actinidina (EC 3.4.22.14), etc.

Papaïna

La papaïna va ser de les primeres proteases amb la que es va investigar la capacitat de sintetitzar un pèptid predefinit (Bergmann *et al.*, 1938b).

La papaïna és una cisteïna o tiol proteasa que s'extreu del làtex de la Carica papaya (Lin, 1988). Aquest làtex conté diversos enzims i la papaïna representa només una part minoritària de tota l'activitat proteolítica present.

És un enzim compost per una cadena polipeptídica senzilla de 212 aminoàcids, amb un pes molecular de 23.4 kd. Es tracta d'una proteïna globular amb dos dominis estructurals i la seva conformació està estabilitzada per tres ponts disulfur. La seva ruptura dona lloc a la destrucció de la proteïna, tal i com indica la pèrdua de l'activitat biològica, catalítica i immunològica. Malgrat això, no són essencials els tres ponts disulfur per a l'execució de les funcions biològiques. El trencament específic de només un dels ponts disulfur, dut a terme mitjançant la reducció de la molècula en urea 8M, dona lloc a la formació d'un derivat enzimàtic parcialment reduït, el qual és catalíticament actiu.

La forma de la molècula és esfèrica i la cadena està plegada en dues parts diferents, les quals estan dividides per un solc. La Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** en mostra la seva estructura.



Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Estructura de la papaïna a una resoluci3 d'1.65 Å (Kamphuis et al., 1984).

Es coneix a partir d'estudis de raigs X, que el centre actiu està situat a la superfície d'aquest solc. El grup sulfhidril actiu del residu cisteïna 25 està situat a la seva esquerra i el residu histidina 158 a la seva dreta.

Una característica important del centre actiu d'aquest enzim és la seva mida. Per a mesurar-lo Schechter i Berger van utilitzar una sèrie de substrats i inhibidors suficientment grans com per a interaccionar amb les parts més llunyanes del centre d'unió de la papaïna i van establir que el centre actiu és prou gran com per a acomodar i unir-se amb set aminoàcids, quatre en el costat acil de l'enllaç escindit (S_4 a S_1) i tres en el costat amino (S_1' a S_3').

Cal assenyalar que la papaïna presenta una especificitat primària molt baixa, però té preferència per la presència d'un residu aminoàcid hidrofòbic (Phe, Val i Leu) en posició P_2 . Aquest requeriment també es pot trobar fàcilment treballant amb aminoàcids protegits amb grups aromàtics o alifàtics voluminosos, com ara: Bz (benzoil), Z (benziloxicarbonil), Boc (tert-butiloxicarbonil), etc. Aquesta característica de l'especificitat de la papaïna sembla que pot estar relacionada amb la interacció de la cadena lateral del residu P_2 amb una regió del centre actiu que inclou Trp-69. Una altra característica d'aquest enzim és la preferència per una cadena lateral molt hidrofòbica en posició P_1' . Cal tenir present que la manca d'especificitat de la papaïna, incrementa la possibilitat que els enllaços peptídics que ja existeixen en la molècula de substrat, puguin ser subjectes d'hidròlisi secundària.

L'àmplia especificitat de la papaïna queda reflectida en diversos treballs que utilitzen un aminoàcid poc habitual en la síntesi de pèptids com és el γ -carboxiglutàmic (Cerovsky *et al.*, 1985; Pera *et al.*, 1996).

Per a mantenir l'activitat enzimàtica de la papaïna és necessari crear un ambient reductor ja que la presència d'oxigen impossibilita el funcionament de l'enzim. Aquest ambient acostuma a aconseguir-se mitjançant l'addició d'agents reductors al medi de reacció com ara el β -mercaptoetanol. Una altra manera d'eliminar l'oxigen és aprofitar la major solubilitat del nitrogen en aigua per tal de desplaçar l'oxigen, fent bombollear nitrogen.

Es coneix també, que alguns ions metàl·lics: Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} i Pb^{2+} són inhibidors de la papaïna. Els complexos inactius poden ser totalment reactivats amb l'addició d'EDTA i cisteïna.

Donada l'estabilitat estructural de la papaïna en un ampli rang de pH, la síntesi peptídica amb aquest enzim pot tenir lloc en un interval de pH ampli, que va des de 4.7 a 9.5.

La capacitat proteosintètica de la papaïna per acoblar diferents fragments peptídics ha quedat demostrada per exemple mitjançant la preparació de l'octapèptid de l'angiotensina (Isowa *et al.*, 1977) i diversos derivats de l'encefalina (Wong *et al.*, 1979).

2.3 Altres enzims

2.3.1 Penicil·lina acilases

Les penicil·lina acilases (EC 3.5.1.11) són un grup d'enzims que es produeixen en bacteries, fongs, llevats i actinomicets, els quals catalitzen la hidròlisi reversible de la cadena lateral de molècules de penicil·lina (vegi's Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**). Aquests enzims s'agrupen en tres classes, basant-se en l'activitat preferent de l'enzim per un determinat substrat (Sudhakaran *et al.*, 1992):

- Penicil·lina G acilasa (PGA): hidrolitza preferentment la penicil·lina G (benzilpenicil·lina).
- Penicil·lina V acilasa (PVA): hidrolitza la penicil·lina V (fenoximetilpenicil·lina).
- Ampicil·lina acilasa (Apc A): hidrolitza específicament l'ampicil·lina (D- α -aminobenzilpenicil·lina).

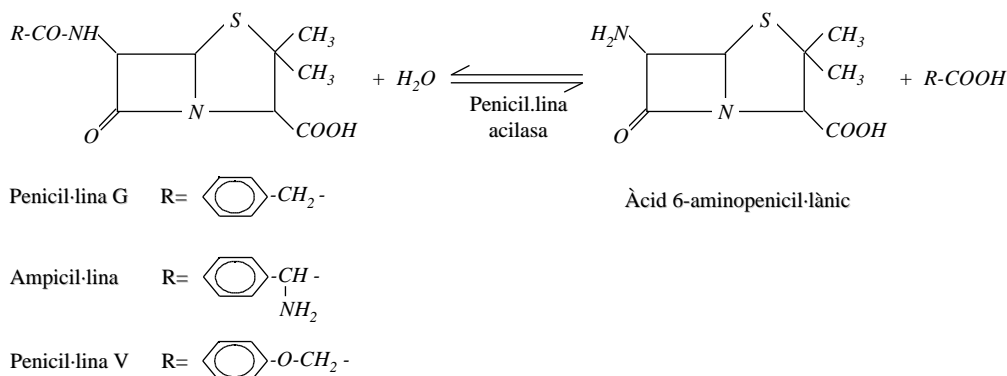


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Reaccions catalitzades per penicil·lina acilases.

Aquests enzims són àmpliament utilitzats en la indústria farmacèutica per a la producció d'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA) i àcid 7-aminodesacetoxicefalosporànic (7-ADCA), els quals posteriorment són processats fins a obtenir diverses penicil·lines semisintètiques. Els antibiòtics semisintètics, a part de presentar una major estabilitat i ser absorbits més fàcilment, representen una solució als problemes de resistència microbiana als antibiòtics.

Les reaccions d'hidròlisi amb aquests enzims són catalitzades a pH alcalins (7.5-8.5), mentre que a pH àcid o neutre (4-7) promouen les reaccions d'acilació (Shewale *et al.*, 1990). D'aquesta manera les penicil·lines acilases són utilitzades per transacilar un gran nombre d'antibiòtics β -lactàmics (Fernández-Lafuente *et al.*, 1996). A banda de les aplicacions ja esmentades, aquests enzims també s'utilitzen en reaccions de protecció/desprotecció de pèptids, resolució òptica de fenilglicina, desesterificació de carbinols, etc. L'enzim pot utilitzar-se tant en forma lliure com immobilitzada. En concret aquest enzim s'ha emprat en la desprotecció de diferents pèptids biològicament actius com l'aspartame, insulina, etc.; tal i com es mostra a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido., on es citen també diferents treballs de protecció d'aminoàcids i pèptids amb el grup PhAc.

Reacció	Aminoàcid o pèptid	Referència
---------	--------------------	------------

Protecció (PhAc)	Ser-OMe, Met-OEt, Tyr-OEt, Gly-Gly, Gly-Asp, Gly-Tyr, Gly-Leu, Gly-Met, Gly-Ser, Gly-Pro, Ala-Tyr, Ser-Tyr, Gly-Tyr-Gly, Gly-Leu-Tyr	Pesssina <i>et al.</i> , 1988
	Gly-OMe, Tyr-OMe, Phe-OMe, Leu-OMe	Didziapetris <i>et al.</i> , 1991
Desprot.	PhAc-Gly, PhAc-Leu	Cole, 1964
	PhAc-Ser-Leu-OBu ^t , PhAc-Ala-Ala-OBu ^t PhAc-Gly-Phe-OBu ^t , PhAc-Thr-Ala-OBu ^t PhAc-Phe-Ala-OBu ^t , PhAc-Gly-Val-OMe PhAc-Phe-Leu-OMe, PhAc-Gly-Ser-OBzl PhAc-Ala-Val-OBzl, PhAc-Gly-Leu-OAl PhAc-Ile-Ala-OAl	Waldmann, 1988
	PhAc-Aspartame, PhAc-Asp-Val-OMe, PhAc-Asp- -OBzl, PhAc-Asp- -OMe	Fuganti <i>et al.</i> , 1986
	PhAc-Gly-Phe-Leu-OBu ^t PhAc-Phe-Leu-OBu ^t PhAc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OBu ^t	Didziapetris <i>et al.</i> , 1991
	PhAc-insulina	Wang <i>et al.</i> , 1986
	N- -PhAc-vasopresina	Brtnik <i>et al.</i> , 1981

*Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.:
Protecció/desprotecció enzimàtica del grup PhAc, amb penicil·lina acilasa, de
diferents aminoàcids/pèptids.*

Els avantatges d'utilitzar la penicil·lina acilasa en la desprotecció de grups amino de pèptids són les que es detallen a continuació (Waldmann *et al.*, 1994):

- La reacció de desprotecció té lloc a temperatura ambient i a pH relativament suaus (8.1).
- No es produeix el trencament d'altres enllaços amida del pèptid.
- Tampoc trenca els enllaços ester que protegeixen la funció carboxílica.
- La desprotecció pot tenir lloc en presència de dissolvents.

De totes maneres, la velocitat d'hidròlisi ve determinada per la naturalesa dels aminoàcids, la seva configuració i la solubilitat del pèptid.

Pel que fa a la N-protecció enzimàtica de pèptids, presenta un avantatge respecte a la protecció química ja que no és necessària la protecció dels grups funcionals degut a les condicions suaus en que té lloc la reacció.

2.3.1.1 Penicil·lina G acilasa (PGA)

La PGA d'*E. coli* és generada a partir d'un precursor polipeptídic a través d'un procés proteolític que dóna lloc a l'enzim actiu format per dues subunitats dissimilars – (25000 Da) i (65000 Da)– que estan unides per interaccions hidrofòbiques (Sudhakaran *et al*, 1992).

El precursor de la PGA està format per quatre dominis estructurals, que són: el pèptid senyal, la subunitat , el pèptid espaiador i la subunitat . Cada un d'aquests dominis juga un paper crucial en el procés de formació de l'enzim actiu, el qual inclou les següents etapes:

1. Síntesi del precursor polipeptídic.
2. Transport del precursor a l'espai periplàsmic i eliminació del pèptid senyal.
3. Trencament proteolític N-terminal de la subunitat .
4. Eliminació del pèptid espaiador a partir de la subunitat en diverses etapes proteolítiques.

Aquest processament de la PGA és inusual en proteïnes d'origen procariòtic i és anàleg al que segueixen les preprohormones (Steiner, 1976).

S'ha postulat que la subunitat –en concret la regió que compren la Met 168– està involucrada en la unió de la cadena lateral de la penicil·lina G i per tant determina l'especificitat de l'enzim pels substrats. D'altra banda la Ser 290 de la subunitat és el residu del centre actiu responsable de la formació dels intermedis acil-enzim.

2.4 Immobilització d'enzims

Malgrat que l'ús de diversos sistemes de reacció en síntesi enzimàtica de pèptids –medi orgànic amb baix contingut en aigua, sistemes bifàsics o micel·les reverses– permeten assolir rendiments de reacció molt elevats, aquests processos comporten problemes quan es realitzen a escala industrial, principalment per les dificultats que es presenten a l'hora de separar el biocatalitzador del medi de reacció i dels productes i per tant poder-los reutilitzar. Per tal d'evitar aquests problemes i al mateix temps

aconseguir una major estabilitat dels biocatalitzadors, s'han desenvolupat diverses tècniques d'immobilització.

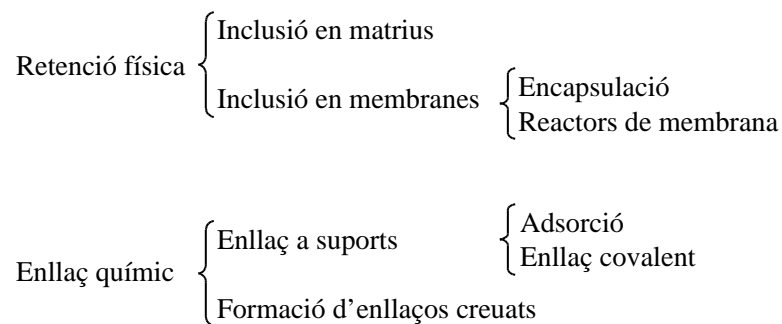
Es defineix immobilització d'un enzim com “el confinament o localització física de l'enzim en una determinada regió o espai mantenint la seva activitat catalítica” (Kennedy *et al.*, 1987).

Alguns avantatges i inconvenients de la immobilització es presenten a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**

Avantatges	<input checked="" type="checkbox"/> Permet la reutilització o utilització en forma continua de l'enzim i per tant la disminució del cost del procés.
	<input checked="" type="checkbox"/> Augment de l'estabilitat i la resistència a la desnaturalització dels enzims.
	<input checked="" type="checkbox"/> Major facilitat per a separar l'enzim del medi de reacció.
Inconvenients	<input checked="" type="checkbox"/> Pèrdua d'activitat en el procés d'immobilització.
	<input checked="" type="checkbox"/> Possibles limitacions de transferència de matèria.
	<input checked="" type="checkbox"/> Despeses associades al procés d'immobilització.

Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.:** Avantatges i inconvenients associats a la immobilització d'enzims.

Els diferents sistemes d'immobilització es poden classificar d'acord amb la naturalesa de l'enllaç entre l'enzim i el suport d'immobilització segons el següent esquema:



A continuació es descriuen els dos tipus d'immobilització que s'han utilitzat en el transcurs d'aquest treball, que són la immobilització per adsorció i per enllaç covalent.

2.4.1 Immobilització per adsorció

L'adsorció d'un enzim a un suport insoluble està descrit com el mètode d'immobilització més senzill. Aquest mètode consisteix en posar en contacte una solució aquosa que conté l'enzim amb un suport inert i insoluble que és la superfície adsorbent.

Els tipus d'interaccions entre el suport i l'enzim que afavoreixen l'adsorció són de tipus iònic, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals o interaccions específiques. Els suports comunament utilitzats per aquest tipus d'immobilització són: sílica (Cassells *et al.*, 1988), Celita (Reslow *et al.*, 1988a/b), florisil (silicat de magnesi) (Guibe-Jampel *et al.*, 1987), alumina (òxid d'alumini) (Guibe-Jampel *et al.*, 1987), Accurel (polietilè alta-densitat) (Brady *et al.*, 1988; Adlercreutz, 1991), etilcel·lulosa (Brady *et al.*, 1988), vidre de grandària de porus controlada (Reslow *et al.*, 1988a/b) i poliamida (Adlercreutz, 1991).

El principal avantatge que presenta aquest mètode és la seva simplicitat i el major inconvenient és que l'enzim no està lligat fermament al suport. Així, la introducció de canvis en les condicions experimentals, com ara variacions de pH, força iònica, temperatura o tipus de dissolvent, poden afectar l'estabilitat dels enllaços entre l'enzim i el suport i provocar que l'enzim es desadsorbeixi. També cal assenyalar, que una elevada concentració d'aigua en el medi de reacció desfà les unions enzim-suport. Conseqüentment aquest tipus de preparacions només són vàlides per treballar amb medis orgànics amb baix contingut en aigua.

2.4.2 Immobilització per enllaç covalent

La utilització de mètodes d'immobilització que es basen en l'establiment d'interaccions febles entre l'enzim i el suport presenta el risc que es desadsorbeixi el catalitzador. Per solucionar aquest inconvenient i obtenir catalitzadors més estables, s'han desenvolupat mètodes d'immobilització que comporten l'establiment d'enllaços covalents entre l'enzim i el suport. La formació d'aquests enllaços dona lloc a una rigidesa en l'estructura tridimensional de l'enzim. Aquest fet es pot correlacionar amb l'adquisició de noves propietats, que en general tendeixen a fer més estable el catalitzador, permetent que treballi a nivells de temperatura i pH més amplis.

Tot i així, com a inconvenients d'aquest tipus d'immobilització cal esmentar, que la modificació notable de l'estructura de l'enzim que es produeix en la formació d'aquests enllaços, pot afectar el centre actiu de l'enzim degut a la unió d'aquest amb el suport, fet que en algunes ocasions pot conduir a pèrdues d'activitat enzimàtica. D'altra banda, en la immobilització per enllaç covalent, cal realitzar una sèrie d'etapes químiques que compliquen la metodologia de la immobilització.

Per l'establiment d'aquests enllaços es plantegen tres possibilitats diferents:

- Formació de grups reactius sobre l'enzim, capaços de reaccionar amb els del suport.
- Formació de grups reactius sobre el suport, capaços de reaccionar amb l'enzim.
- Utilització de reactius bifuncionals, capaços de reaccionar simultàniament amb els grups del suport i de l'enzim.

Tot i que les tres alternatives són possibles en teoria, la que fa referència a l'activació de grups funcionals de l'enzim és la menys apropiada. Els grups que formen les cadenes laterals dels aminoàcids constituents dels enzims (àcid carboxílic, grups tiol, fenol, amina primària etc.), estan ben definits, però són químicament poc reactius i els mètodes per aconseguir les condicions d'activació són poc compatibles amb la conservació de l'activitat enzimàtica. Per tant, en la major part dels casos, es prefereix l'activació del suport o l'ús de reactius bifuncionals en comptes de l'activació dels grups funcionals dels enzims.

Donat que la varietat de suports i mètodes d'activació que existeixen és molt àmplia, es pot seleccionar per a cada aplicació quin és el suport i mètode d'activació més adequat.

Els suports més emprats per a la immobilització covalent es poden classificar en les següents categories: polisacàrids (agarosa, cel·lulosa, etc.), vidre porós, polímers acrílics i altres polímers.

A l'hora de plantejar-se quin és el mètode d'activació més adient per a cada cas, cal tenir en consideració quins són els grups funcionals dels enzims i quins són els grups superficials presents en el suport.

D'entre els grups funcionals que es troben en les cadenes laterals dels aminoàcids, els que determinen la reactivitat de l'enzim són els que tenen una concentració relativa més gran en les proteïnes enzimàtiques. Majoritàriament els més abundants són lisina i serina, tot i que d'altres com metionina, treonina i tirosina també són reactius, generalment estan situats en llocs més inaccessibles.

D'altra banda, els grups funcionals del suport que es troben més freqüentment en els materials d'immobilització són: amina, diol, àcid carboxílic i amina aromàtica. Aquestes funcions, aplicant mètodes estàndard de química orgànica, es poden transformar en grups funcionals molt més reactius com ara: sals de diazoni, aldehids, clorur de triazina, isocianats, isotiocianats, iminocarbonat, epòxids, sulfones insaturades, cianohidròxids, tiols, àcids carboxílics, -halocarbonils.

2.4.2.1 Immobilització per enllaç covalent multipuntual

En el present treball la penicil·lina G acilasa (PGA) s'ha immobilitzat per enllaç covalent multipuntual degut als coneixements que es tenia que aquest tipus d'immobilització confereix a l'enzim una gran estabilitat (Klibanov, 1982). A més de l'efecte d'immobilització en el sentit de la recuperació física de l'enzim, aquest mètode confereix al biocatalitzador rigidesa i per tant estabilitat. Aquest fet comporta que l'enzim sigui més resistent a canvis conformacionals induïts per calor, dissolvents orgànics, agents desnaturalitzants, és a dir, davant de diverses condicions desnaturalitzants que poden provocar inactivació per desplegaments de l'estructura proteica. L'aplicació d'aquest tipus d'immobilització requereix tenir en consideració els punts que s'exposen a continuació.

2.4.2.1.1 Selecció adequada del suport

La morfologia interna del suport és un dels punts essencials a escollir si es consideren les diferents possibilitats d'acoblament geomètric enzim-suport, és a dir la congruència geomètrica enzim-suport. Si es treballa amb suports porosos, l'estructura interna dels quals està formada per espais buits envoltats de superfície (exemple: sílica, alumina, agarosa) es té una gran congruència geomètrica enzim-suport. En aquest cas s'incrementa la rigidesa d'una petita part de la superfície enzimàtica (10-20%), traduint-se en una rigidesa més global de la mateixa, donades les fortes interaccions entre totes les parts de l'enzim (Guisán *et al.*, 1991).

Així, els suports porosos amb una gran superfície seran els més adequats per a l'estabilització de l'enzim ja que permeten una interacció proteïna-superfície ideal per a establir el major nombre d'interaccions. Tanmateix, no s'ha d'oblidar la grandària de la proteïna a immobilitzar, de manera que el suport d'immobilització haurà d'ésser el que tenint la major àrea superficial, el seu diàmetre de porus sigui suficientment gran per a permetre l'entrada sense dificultat de l'enzim a immobilitzar.

2.4.2.1.2 Activació del suport

Per tal que es pugui dur a terme la formació de múltiples enllaços, el suport i l'enzim han de presentar nombrosos grups que puguin reaccionar.

Existeixen diverses raons per escollir els grups amino dels enzims – -NH_2 dels residus de lisina i NH_2 -terminals– per a intervenir en el procés d'interacció enzim-suport ja que moltes proteïnes tenen una gran quantitat de residus de lisina que no estan involucrats en el centre catalític de l'enzim. En segon lloc, els grups amino (polars) es troben a la superfície proteica, exposats al medi. A més, els grups amino quan no estan protonats presenten una alta reactivitat sense necessitar una activació prèvia (Guisán, 1988).

En referència al suport, és necessària l'absència d'impediments estèrics per a que es produeixi la reacció química amb els grups amino activats. Com a conseqüència, les possibilitats que es donin interaccions en diversos punts entre dues estructures relativament rígides –enzim i suport– és més alta. Els grups funcionals que responen a aquests requeriments són els grups aldehid moderadament separats de la superfície del suport. Les cadenes aldehídiques adequades hauran de presentar:

- Una grandària suficient per a permetre una moderada separació entre l'enzim i la superfície del suport, per tal d'evitar problemes estèrics i unions inespecífiques i alhora una separació relativament pròxima per conferir rigidesa a l'estructura proteica.
- Elevada estabilitat química fins i tot en medis moderadament alcalins. Com a conseqüència es poden dur a terme processos llargs de multiinteracció entre suports amb una elevada densitat de grups actius a la superfície i enzims amb molts grups amino actius.

A fi d'introduir els grups aldehids en el suport és necessari que aquest tingui grups fàcilment activables, com ara grups hidroxil, per tal que puguin reaccionar amb la cadena aldehídica que es vol introduir.

2.4.2.1.3 Presència de substrat o inhibidor

Alguns substrats (o inhibidors), poden exercir un efecte estabilitzant sobre l'estructura tridimensional de l'enzim, impeding distorsions importants de la mateixa.

En el cas de la PGA, el centre actiu té una estructura complexa i és necessari un canvi conformacional que provoqui l'accessibilitat del mateix. La presència de substrats al medi desencadena aquest canvi conformacional i aquest depèn del tipus de substrat. Per aquest motiu en el procés d'immobilització s'afegeix el substrat

corresponent per tal que l'enzim adquireixi la configuració adequada i a més es mantingui fix després de la immobilització. La utilització de diversos substrats pot donar lloc a preparacions immobilitzades amb diferent especificitat.

En concret, la immobilització de la PGA –utilitzada en el present treball en les reaccions de N- protecció i desprotecció de diferents derivats d'aminoàcids/pèptids– s'ha dut a terme per enllaç covalent multipuntual, utilitzant agarosa com a suport (polímer natural format per unitats de glucosa unides per enllaços -1,3 i -1,4). Aquests suports eren activats amb glicidol i al llarg de la immobilització s'addicionava àcid fenilacètic com a substrat estabilitzant, tal i com es detalla a materials i mètodes (§4.3.2.2).

2.5 Sistemes de reacció amb baix contingut en aigua

A partir dels raonaments presentats a §2.1.2, s'extreu que la síntesi enzimàtica de pèptids tant sota control cinètic com termodinàmic de la reacció, es veu afavorida reduint la concentració d'aigua en el medi de reacció. Aquest fet, junt amb la constatació que molts substrats utilitzats en aquestes síntesis són insolubles en medis aquosos, ha portat al desenvolupament de sistemes de reacció amb baix contingut en aigua. Entre ells, destaquen les micel·les reverses, els sistemes orgànics amb baix contingut en aigua i –amb posterioritat– els sistemes de reacció sòlid-sòlid.

A continuació es detallen breument –ja que no han estat utilitzats en el present treball– les característiques principals dels sistemes de reacció que es basen en l'ús de micel·les reverses.

Les micel·les reverses són agregats de molècules de surfactants (detergents, fosfolípids, etc.), de forma esfèrica que es formen espontàniament en presència de dissolvents orgànics. La seva part interior està formada pels “caps” polars de les molècules de surfactants, mentre que la part externa està constituïda per les “cues” hidrofòbiques d'aquestes molècules, tal i com es pot observar a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

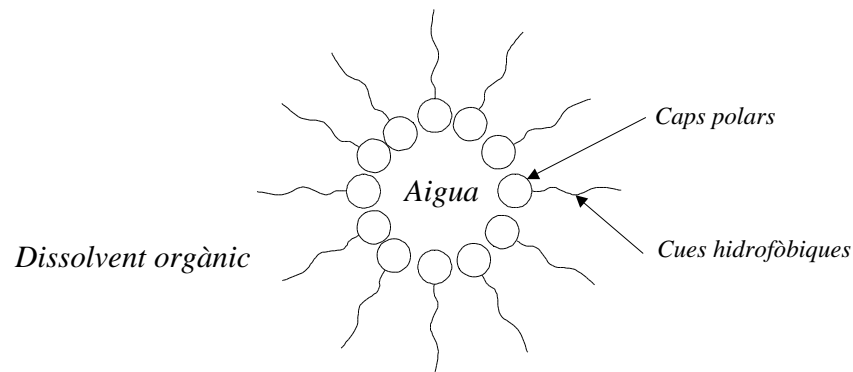


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema d'una micel·la reversa immersa en dissolvent orgànic.

L'addició de petites quantitats d'aigua provoca que aquests agregats s'inflin i formin microgotetes d'aigua que es troben separades del dissolvent orgànic per les molècules de surfactant. Aquest tipus de sistema, termodinàmicament estable, és una microemulsió d'aigua en un oli.

Entre les propietats més importants de les micel·les reverses hidratades es pot destacar la seva capacitat per atrapar els enzims en les seves cavitats interiors sense que aquests últims perdin activitat. El biocatalitzador és atrapat simplement agitant una solució aquosa d'enzim amb el dissolvent orgànic que conté el surfactant (Martinek, 1977) o bé dissolent l'enzim en les micel·les reverses pre-hidratades (Menger *et al.*, 1979), de manera que el contingut total d'aigua en aquest tipus de sistemes és inferior a l'1% en volum. En aquest context, es pot destacar la flexibilitat d'aquests sistemes, donat que l'enzim pot escollir el microambient òptim per al seu funcionament. Per exemple, un enzim de naturalesa hidrofílica es localitza en la cavitat interior de la micel·la on hi ha l'aigua; un enzim amb la superfície activada interacciona amb la interfase formada per les molècules de surfactants, mentre que un enzim hidrofòbic contacta amb la regió hidrofòbica de la membrana de la micel·la o fins i tot amb el dissolvent.

Aquest mètode és utilitzat, a més, per retenir cèl·lules, les quals es poden solubilitzar mantenint la seva viabilitat (Haering *et al.*, 1985). Entre les diverses aplicacions de les micel·les reverses destaquen: la síntesi enzimàtica de pèptids (Lütti *et al.*, 1984), la conversió enzimàtica d'esteroids (Lee *et al.*, 1986), prostaglandines (Mevhk *et al.*, 1985), glicèrids (Han *et al.*, 1986), àcid linoleic (Luisi *et al.*, 1984) i alcohols de cadena llarga (Martinek *et al.*, 1982).

Es coneix que l'estabilitat dels enzims atrapats en les micel·les reverses depèn del contingut d'aigua del sistema i de la naturalesa del surfactant (Han *et al.*, 1986). En aquest treball no s'ha explorat aquest mètode, sí en canvi els medis orgànics amb baix contingut en aigua i els sistemes de reacció sòlid-sòlid, que són tractats en els següents apartats.

2.5.1 Medis de reacció orgànics amb baix contingut en aigua

La constatació que només és necessària una petita quantitat d'aigua per mantenir la conformació catalíticament activa de les proteïnes i el fet que molts enzims poden funcionar perfectament en sistemes orgànics microaquosos, ha conduït a una àmplia aplicació de la síntesi enzimàtica en aquests tipus de sistemes (Klibanov, 1989/90).

Així, treballant en aquestes condicions s'ha aconseguit sintetitzar dipèptids i tripèptids mitjançant l'ús d'enzims lliures (en suspensió), immobilitzats o modificats (Gaertner *et al.*, 1991; Kise *et al.*, 1991). Igualment també es troba referida la síntesi de diversos oligopèptids curts (Kitaguchi *et al.*, 1989; Mitin, 1988) i la producció de productes a gran escala com el precursor de l'aspartame (N-CBZ-Asp-Phe-OMe) i la malil-tirosina (Mal-Tyr) (Merkler, 1994; Auriol *et al.*, 1990).

Els beneficis que ofereixen aquests tipus de sistemes estan ben documentats i majoritàriament són els següents:

- S'afavoreix la síntesi de pèptids i les reaccions d'hidròlisi pràcticament es suprimeixen.
- El fet d'utilitzar dissolvents orgànics en molts casos facilita la solubilització dels substrats hidrofòbics.
- Permet treballar amb enzims immobilitzats per adsorció ja que el baix contingut d'aigua del medi de reacció no provoca la desadsorció.
- La inhibició pel substrat i/o producte sovint es pot reduir aplicant de forma adequada l'enginyeria del medi de reacció (Brink *et al.*, 1988).
- Sovint es simplifica la purificació del producte i la recuperació de l'enzim.
- En aquests tipus de sistemes molts enzims incrementen la seva termostabilitat (Adlercreutz *et al.*, 1987).

A continuació es discuteixen alguns dels paràmetres que influeixen en la síntesi enzimàtica en aquests tipus de medis de reacció.

El concepte i la mesura del pH d'un sistema està ben definit quan es treballa en medis de reacció bàsicament aquosos. Es planteja doncs, el problema de la noció de pH en els sistemes orgànics amb baix contingut en aigua.

El fet de mantenir el control del pH del microambient de l'enzim és important ja que aquest determina l'estat d'ionització de l'enzim. Tot i així en un medi orgànic no es pot produir protonació/desprotonació. Conseqüentment en aquests casos el pH de la solució aquosa a partir de la qual s'extreu l'enzim abans de dipositar-lo en el medi de reacció, és el que determina l'estat d'ionització de l'enzim. Així, Zaks i Klibanov utilitzen el terme de "memòria del pH" per il·lustrar aquesta observació (Zaks *et al.*, 1985). Segons aquesta teoria els grups protonats es mantenen en aquest estat quan estan en contacte amb un dissolvent apolar, i aquesta condició es manté constant sempre i quan ni els substrats, ni els productes generats tinguin càrrega.

D'altra banda en algunes reaccions, es produeixen alteracions en les concentracions d'àcid o base, i aquest fet pot influenciar el comportament de l'enzim. Aquest problema es pot intentar resoldre introduint compostos que actuen com a tampons en la fase orgànica (Bell *et al.*, 1995). Amb aquest objectiu alguns autors addicionen àcids altament hidrofòbics i les seves sals sòdiques, o bases molt hidrofòbiques en forma d'hidroclorhidrats (Blackwood *et al.*, 1994). Amb la mateixa finalitat, també es poden afegir bases o àcids solubles en medis orgànics per tal de compensar el pH. En el present treball s'ha utilitzat trietilamina (TEA) com a base amb aquest propòsit.

Un altre factor important en la síntesi enzimàtica en aquests medis de reacció és l'efecte dels dissolvents. Aquests poden influenciar l'activitat i l'estabilitat dels enzims de diverses formes. Els efectes més importants dels dissolvents depenen de les seves propietats físiques. La solubilitat de l'aigua en el dissolvent té una gran importància. Per la majoria dels enzims l'activitat catalítica en dissolvents orgànics, augmenta al fer-ho la hidratació de l'enzim (Zaks *et al.*, 1988 ; Adlercreutz, 1991). Els dissolvents amb una alta capacitat per dissoldre aigua, poden extreure-la del microambient de l'enzim i així fer decreïxer la seva activitat.

La polaritat d'un dissolvent és el factor principal amb el que s'ha intentat correlacionar l'activitat dels biocatalitzadors. Un paràmetre que mesura la polaritat o hidrofobicitat d'un dissolvent és el log P i es defineix com el logaritme del coeficient de partició d'un dissolvent en un sistema bifàsic octanol-aigua. Els dissolvents amb valors alts de log P (corresponen a dissolvents hidrofòbics), provoquen menys inactivació dels enzims que els que tenen valors baixos de log P. La correlació entre el log P dels dissolvents i l'activitat i estabilitat dels biocatalitzadors es va proposar inicialment a partir de dades obtingudes de cèl·lules i va ser estesa posteriorment als

enzims. En la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenta la correlació obtinguda per Brink *et al.* entre el log P del dissolvent i l'activitat de cèl·lules epoxiditzants (Brink *et al.*, 1985). Tot i que la correlació té les seves limitacions, s'ha comprovat la validesa de la tendència proposada per a diversos tipus de sistemes (Mattiasson *et al.*, 1991).

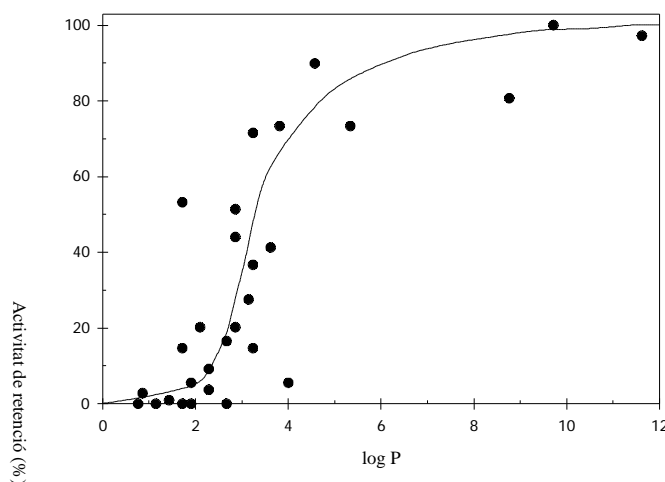


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Activitat de retenció de cèl·lules epoxiditzants exposades a dissolvents orgànics versus log P (Brink *et al.*, 1985).

De totes maneres, a l'hora d'escollir el dissolvent per a una determinada reacció cal tenir en compte principalment: l'efecte del dissolvent en l'estabilitat del biocatalitzador, com ja s'ha mencionat, els efectes del dissolvent en la reacció –inclou la solubilitat dels substrats i dels productes, la posició de l'equilibri de la reacció, etc. (Tewari *et al.*, 1995; Panintrarux *et al.*, 1995)– i la toxicitat del dissolvent de cara a la seva utilització a nivell industrial.

Donat que els enzims no són solubles en medis orgànics, quan es treballa amb aquests medis, normalment s'utilitzen immobilitzats per deposició sobre suports, ja que aquest és un mètode senzill i amb el que s'obté un alt rendiment perquè la desadsorció de l'enzim està desfavorida en aquests medis. A més, es contribueix en principi a estabilitzar l'enzim i a millorar el seu contacte amb els substrats a l'estar distribuït amb el suport de forma més dispersa. Per tant, un dels paràmetres que s'ha de seleccionar a l'hora de realitzar una síntesi és el suport d'immobilització de l'enzim.

Al llarg de molts anys, s'havien considerat els suports d'immobilització com a materials inerts i la seva influència sobre el comportament cinètic del biocatalitzador s'atribuïa únicament al diàmetre de porus, l'àrea específica, la mida de la partícula, etc., o sigui a les característiques pròpies del suport. No obstant, posteriorment es va veure que el suport també influenciava pel que fa a la partició de l'aigua en el sistema, de manera que no només competeixen per l'aigua el dissolvent i l'enzim. Així, Reslow *et al.* van introduir el concepte d'aquafilicitat (Aq), definit com el quocient entre la quantitat d'aigua adsorbida en el suport i la quantitat d'aigua dissolta en el dissolvent, emprant com a dissolvent diisopropil èter saturat i utilitzant diferents suports d'immobilització (Reslow *et al.*, 1988a).

D'aquesta forma, com més gran és l'aquafilicitat d'un suport, la seva tendència per captar aigua de la fase orgànica i de l'enzim és major i per tant l'enzim resta poc hidratat. Mentre que quan s'utilitzen suports amb baixa aquafilicitat, l'enzim pot competir per l'aigua i per tant la seva activitat pot ser més elevada.

Els enzims només mostren activitat catalítica quan presenten una conformació estrictament definida. Aquesta conformació en solució ve determinada pel paper directe o indirecte de l'aigua en l'establiment d'una complexa xarxa d'interaccions hidrofòbiques, electrostàtiques i per ponts d'hidrogen (Tanford, 1961; Schultz *et al.*, 1979).

El reemplaçament de l'aigua per un dissolvent orgànic, en principi sembla que hauria de distorsionar l'estructura nativa de la proteïna i destruir l'activitat catalítica. De fet, utilitzant dissolvents orgànics completament anhidres no es detecta activitat enzimàtica, per tant es dedueix que cal la presència de l'aigua perquè es doni la catàlisi. La hipòtesi més comuna i acceptada indica que la presència d'una capa hidratada al voltant de l'enzim és un requisit indispensable pel seu correcte funcionament. Com ja s'ha esmentat, el dissolvent i el suport són dos elements que afecten en la redistribució d'aquesta capa. Per tant, per a estudiar la influència de diferents dissolvents o suports d'immobilització sobre l'activitat enzimàtica s'hauria de treballar mantenint constant el grau d'hydratació de l'enzim.

Desafortunadament, la concentració d'aigua no és una mesura adequada per conèixer el seu efecte en les reaccions amb baix contingut en aigua, donat que l'efecte de l'aigua depèn no només de la quantitat que n'hi ha present, sinó també de la seva distribució entre els diferents components del sistema. Per això és millor considerar l'activitat termodinàmica de l'aigua: a_w , que correspon a l'aigua disponible del sistema.

2.5.1.1 Concepte d'activitat de l'aigua

Considerem un vial tancat que conté un dissolvent orgànic amb aigua, el biocatalitzador (suport i enzim) també amb un cert contingut d'aigua i un espai amb vapor. L'aigua es distribuirà per tot el sistema fins a assolir l'equilibri. És a dir, els potencials químics –i per tant les fugacitats– seran iguals a cada fase, malgrat que les concentracions d'aigua puguin ser diferents. Aquest equilibri depèn de la pressió i la temperatura.

La fugacitat de l'aigua en una fase gasosa es defineix com

$$f_w^{gas} = \phi_w y_w P,$$

on ϕ_w és el coeficient de fugacitat, y_w és la fracció molar d'aigua en el gas i P és la pressió total del gas. En un gas ideal, el coeficient de fugacitat val 1 i, per tant, la fugacitat és reduïda a la pressió parcial de l'aigua. A la pressió i temperatura de treball de la present tesi es pot considerar la fase vapor com a gas ideal.

En una fase líquida no ideal, l'expressió de la fugacitat és

$$f_w^{liquid} = \gamma_w x_w f_w^0,$$

on γ_w és el coeficient d'activitat del líquid, x_w és la fracció molar d'aigua en el líquid i f_w^0 és la fugacitat de l'aigua en un estat de referència, que es pren com la unitat. Quan no hi ha interacció entre els components d'una mescla, $\gamma_w = 1$, la qual cosa no es compleix en els casos tractats en aquesta tesi.

Es defineix activitat de l'aigua, a_w , d'acord amb el següent quocient:

$$a_w = \frac{f_w^{liquid}}{f_w^0} = \gamma_w x_w$$

Notem que quan no hi ha interacció entre els components del líquid, a_w es reduïa a la fracció molar i per tant tota l'aigua del sistema resta disponible. En el cas d'aigua pura, $a_w = 1$.

Així doncs, si es vol comparar l'efecte del dissolvent o del suport d'immobilització en –per exemple– l'activitat enzimàtica cal realitzar l'estudi a la mateixa a_w i no pas a la mateixa concentració d'aigua. Com a exemple es pot citar l'estudi realitzat per Adlercreutz sobre la comparació de l'activitat enzimàtica de la quimotripsina, en una reacció d'alcoholisi treballant amb diversos suports a a_w conegudes (Adlercreutz, 1991). Aquest autor va trobar que amb la majoria de suports no variava el perfil de

percentatge d'activitat vers a_w (vegi's Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**), malgrat que les activitats enzimàtiques absolutes sí que canviaven.

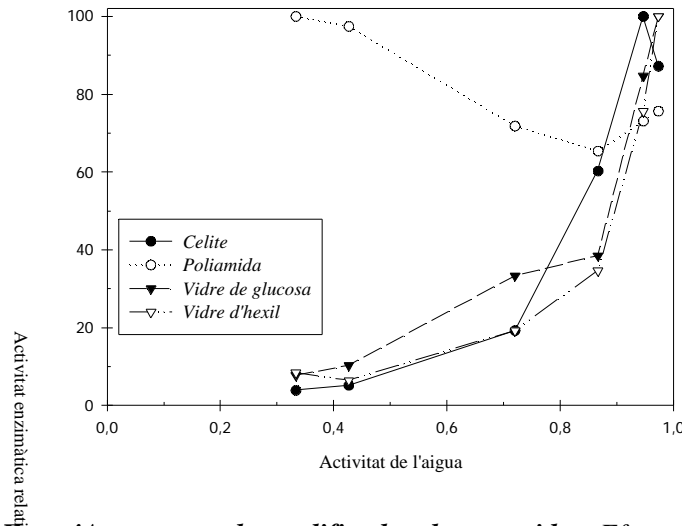


Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Efecte de l'aigua en l'activitat d'alcoholisi de la quimotripsina en diferents suports. Els valors de cada suport estan normalitzats respecte a la seva màxima activitat per tal d'emfatitzar el perfil d'activitat vs. a_w . Les dades estan extretes d'Adlercreutz, 1991.

2.5.1.2 Mètodes de mesura i control d'activitat de l'aigua

Els coeficients d'activitat de l'aigua (γ_w) es poden calcular a partir de models teòrics, que utilitzen diverses equacions tenint en compte les interaccions entre components (Margules, van Laar, NRTL, UNIFAC, UNIQUAC). Un dels més emprats és el mètode UNIFAC (Fredenslund, 1975), que calcula els paràmetres d'interacció per contribució de grups. Un cop conegut γ_w , es pot calcular l'activitat i per tant es té la correlació a_w versus contingut d'aigua.

Alternativament es pot calcular l'activitat de l'aigua experimentalment. Amb aquest objectiu s'utilitza una barreja aigua-dissolvent orgànic que es situa en un recipient tancat i es deixa que la barreja líquida assoleixi l'equilibri amb el vapor. Mesurant la pressió parcial de l'aigua en la fase gas coneixerem l'activitat de l'aigua. Si, a més, mesurem el contingut d'aigua del líquid podrem obtenir γ_w .

Treballant amb medis orgànics, el contingut d'aigua normalment es mesura a partir d'alguna variant del mètode de Karl-Fischer. Totes les mesures –tant de concentració d'aigua com d' a_w – que es fan a partir de les mostres s'han de realitzar amb cura perquè existeix la possibilitat que es produeixin variacions durant el procés, per volatilitat, adsorció a certs materials o captació d'humitat. Aquestes variacions són especialment rellevants en els medis menys polars en els que les concentracions d'aigua són molt baixes (Halling, 1994).

En el cas de la síntesi enzimàtica de pèptids per control cinètic no hi ha formació d'aigua al llarg de la reacció i el seu consum en les reaccions d'hidròlisi (reaccions secundàries indesitjades i per tant reduïdes al mínim) és pràcticament menyspreable. Per tant resulta suficient fixar l' a_w a l'inici dels experiments. Existeixen diverses formes per fixar el valor de l' a_w que es detallen a continuació:

- Si per a un sistema en concret es coneix la correlació contingut d'aigua- a_w (obtinguda a partir d'alguns dels mètodes esmentats anteriorment), es pot afegir directament el contingut d'aigua al medi de reacció, considerant que la correlació ha de tenir en compte tots els elements de la mescla, és a dir tant els substrats com el suport d'immobilització.
- Alternativament es pot treballar en un ambient d'humitat controlada. Aplicant aquesta metodologia el problema principal és que els vapors que provenen del dissolvent poden afectar adversament al sensor que mesura la humitat. No obstant, existeix un sensor que es pot submergir en les fases orgàniques (Khan *et al.*, 1990).
- Altrament, els diversos components del medi de reacció es poden equilibrar a través de la fase gasosa a l' a_w desitjada, utilitzant una solució saturada d'una sal d' a_w fixa i coneguda. Aquesta aproximació va ser aplicada per primera vegada en biocatàlisi, utilitzant medis no convencionals per Goderis *et al.* i posteriorment ha tingut una gran aplicació (Goderis *et al.*, 1987). El procediment s'il·lustra esquemàticament a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

En funció de l' a_w que es vulgui obtenir es poden utilitzar solucions saturades de diferents sals. A continuació a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenta una llista de diferents sals i la seva a_w corresponent.

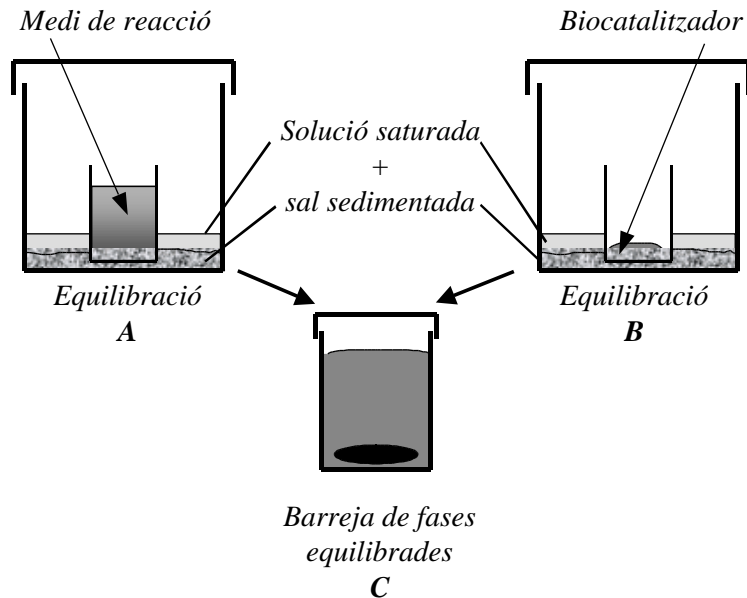


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Fixació de l' a_w dels diferents components d'una reacció, mitjançant l'ús de solucions saturades de sals d' a_w fixa i coneguda. A: equilibració del medi de reacció. B: equilibració del catalitzador/suport. C: barreja de les fases un cop equilibrades.

Sal	a_w
Clorur de liti, LiCl	0.113
Acetat potàsic, KCH ₃ COO	0.225
Clorur de magnesi, MgCl ₂	0.328
Nitrat de magnesi, Mg(NO ₃) ₂	0.529
Clorur sòdic, NaCl	0.753
Clorur potàsic, KCl	0.843
Nitrat potàsic, KNO ₃	0.936
Sulfat potàsic, K ₂ SO ₄	0.973

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Sals i a_w corresponents (Greenspan, 1977).

En les situacions en que es consumeix o es produeix aigua durant la reacció, cal controlar l' a_w al llarg del procés. En aquests casos és necessari treballar amb una cambra d'humitat controlada en que es pugui addicionar o extreure aigua.

Alternativament, Jasmedh Kaur *et al.* han desenvolupat un sistema per controlar l' a_w treballant amb medis orgànics, que consisteix en l'ús de solucions de sals saturades circulant dins d'un tub de silicona que es troba submergit en el dissolvent (Kaur *et al.*, 1997).

2.5.2 Sistemes de reacció sòlid-sòlid

El desenvolupament de diferents mètodes per a la producció de pèptids biològicament actius a gran escala ha estat continuat al llarg de les últimes dècades (Kullman, 1987). Aquest fet és degut a que s'han aïllat i caracteritzat una gran quantitat de pèptids bioactius i a que es coneixen més les seves funcions i propietats biològiques. Conseqüentment, l'interès comercial per l'aparició d'oligopèptids en la preparació de productes farmacèutics i com additius alimentaris ha anat creixent.

Tot i els considerables avanços que s'han realitzat en el camp de la síntesi enzimàtica de pèptids en medis amb baix contingut en aigua i en medis bifàsics, encara existeixen certes dificultats que impedeixen que aquesta metodologia sintètica tingui una aplicació més àmplia (López-Fandiño *et al.*, 1994b). En particular, un dels problemes més habituals que es presenten és la limitada solubilitat d'alguns substrats en dissolvents que són considerats com els més apropiats per dur a terme la reacció enzimàtica i que porta com a resultat l'obtenció de baixes productivitats. A més, existeixen limitacions pel que fa a l'ús de determinats dissolvents orgànics, especialment en la producció de pèptids que tenen una finalitat alimentària o farmacèutica (Ikeda, 1992).

Des de principis dels anys 90, però, s'ha començat a utilitzar un nou tipus de sistema de reacció dins de la síntesi enzimàtica, que es caracteritza perquè es tracta de medis molt concentrats, que poden contenir al voltant del 10-20% en pes d'aigua o dissolvent orgànic, de manera que els reactius es troben majoritàriament insolubilitzats en el medi de reacció.

Les investigacions al respecte, s'han desenvolupat a partir de dues aproximacions diferents:

- La formació de barreges eutèctiques semilíquides.
- Treballar amb substrats sòlids, addicionant una mínima quantitat de líquid.

La primera de les aproximacions, es va iniciar amb els estudis de Gill *et al.* sobre la síntesi de pèptids curts catalitzats per proteases (Gill *et al.*, 1993). Inicialment van dur a terme la síntesi de L-Phe-Leu-NH₂ a partir de L-Phe-OEt (líquid viscos) i Leu-

NH₂ (sòlid). En aquesta síntesi van comprovar que l'addició de petites quantitats de dissolvents orgànics, malgrat que incrementava la velocitat de reacció, no modificava significativament el rendiment. D'altra banda aquests autors van detectar activitat enzimàtica fins i tot quan treballaven amb els dos substrats sòlids, els quals en barrejar-se formaven una fase líquida. La hipòtesi que van formular al respecte és que els aminoàcids utilitzats en aquestes reaccions formaven espontàniament barreges eutèctiques semilíquides. Posteriorment altres investigacions dels mateixos autors (Gill *et al.*, 1994), s'han concentrat en aconseguir el punt eutèctic de substrats model.

Gill *et al.* treballant amb aquest tipus de sistemes han demostrat que la formació de l'eutèctic està fortament influenciada pel tipus de grup N-protector del donador d'acil. Així, es coneix que els esters de L-aminoàcids protegits amb el grup fenilacetil (N-PhAc) de seguit formen eutèctics amb punts de fusió baixos amb L-Leu-NH₂, en contrast, per exemple amb els derivats N-trifluoracetil (N-TFAC) quan s'utilitzen en combinació amb el mateix nucleòfil (Gill *et al.*, 1994).

D'altra banda, aquests autors també han constatat al llarg de les seves investigacions que la formació de l'eutèctic es pot afavorir amb l'addició de petites quantitats d'adjuvants. A més la utilització d'aquests compostos permet manipular la composició de la fase líquida i en particular les proporcions relatives dels dos substrats. Així han trobat que, tot i que el comportament relatiu dels adjuvants varia amb la reacció i l'enzim estudiat, els millors resultats generalment els han obtingut utilitzant dissolvents amb valors del paràmetre de solubilitat de Hildebrand (δ) entre 8.5 i 10.0 i valors de log P entre -1.5 i -0.5 (López-Fandiño *et al.*, 1994a).

Aquests estudis duts a terme amb serinproteases, han estat ampliat amb l'objectiu d'esbrinar si altres enzims, són actius en mescles eutèctiques. D'aquesta manera han dut a terme diferents reaccions catalitzades per papaïna, termolisina, proteïnasa K i pronasa E, obtenint com a resultat que tots aquests enzims són actius en aquestes condicions i assolint rendiments de reacció de 24-80%. La viabilitat d'aquests sistemes de reacció s'ha demostrat també treballant amb derivats d'aminoàcids de diferent naturalesa: alifàtics, aromàtics, àcids i bàsics; i amb la síntesi –tant seqüencial com convergent– de diversos di- tri- i pentapèptids bioactius (López-Fandiño *et al.*, 1994a/b).

Pel que fa a la segona aproximació que s'ha esmentat anteriorment, es va caracteritzar pels estudis basats en la reducció sistemàtica del contingut de dissolvent present en el medi de reacció.

Aquesta via es va iniciar amb els treballs realitzats per Kuhl *et al.* on es descriuen les síntesis de Boc-Ala-Phe-Leu-NH₂ i Z-Ala-Phe-Leu-NH₂ catalitzades per -QT. El sistema de reacció emprat era bastant complex ja que es tractava de suspensions en diversos dissolvents orgànics de diferent polaritat (des de tricloretilè fins a hexà) i utilitzant sals hidratades com a única font d'aigua (Kuhl *et al.*, 1990). En altres estudis posteriors els mateixos autors descriuen la síntesi de pèptids en presència de petites quantitats d'aigua i sense l'addició de dissolvents orgànics (Kuhl *et al.*, 1995). També ha estat sintetitzada la Leu-encefalina a escala preparativa en un sistema sense dissolvents orgànics, amb sals hidratades i utilitzant un homogeneïtzador rotatiu (Klein *et al.*, 1996).

Així, dins d'aquest context, apareixen qüestions sobre el mecanisme real d'aquests tipus de reaccions, com ara: on té lloc la reacció, a la fase líquida o sòlida?, i com és d'important l'existència d'una fase líquida?

En aquesta direcció López Fandiño *et al.* van realitzar estudis centrats en examinar la fase líquida en el transcurs de dues reaccions de síntesi. En concret van utilitzar com a donadors d'acil: L-Phe-OEt (líquid) i Z-Tyr-OEt (sòlid) i com a nucleòfil en ambdós casos: L-Leu-NH₂ (sòlid) per a obtenir L-Phe-Leu-NH₂ i Z-Tyr-Leu-NH₂ respectivament. A partir d'aquesta investigació van demostrar per microscopia de polarització (PM) i microscopia infraroja de transformada de Fourier (FTIRM), que la reacció té lloc a la fase líquida. Així, la primera reacció es donava en una suspensió de substrats, mentre que la segona requeria la formació d'una mescla eutèctica semilíquida (López-Fandiño *et al.*, 1994a).

D'altra banda Kuhl *et al.*, a partir d'uns estudis completament diferents també van constatar el requeriment d'una fase líquida en aquests sistemes de reacció. Aquests autors van estudiar la variació del rendiment d'una reacció, utilitzant com a substrats Z-Phe-OH i Leu-NH₂, en funció de la quantitat d'aigua addicionada al medi. D'aquesta manera van trobar que era necessària una mínima quantitat d'aigua per a mantenir l'activitat catalítica de l'enzim (Kuhl *et al.*, 1995).

Erbeldinger *et al.* també han estudiat el paper de l'aigua en aquests sistemes de reacció. Així, van dur a terme una síntesi sense addicionar aigua i van detectar que hi havia reacció malgrat que fos molt lenta. En canvi, si els substrats s'assecaven rigorosament abans de començar l'experiment, no es detectava activitat enzimàtica. Comparant les dues mescles de reacció descrites, van observar que només amb el 0.5% (p/p) en aigua que hi havia de diferència degut al procés d'assecament, era suficient per a formar la fase líquida necessària per a la reacció (Erbeldinger *et al.*, 1998a).

Com es pot generar la fase líquida?

El cas més simple es dona quan un dels substrats és líquid a la temperatura de reacció. En aquesta situació, aquest substrat pot dissoldre parcialment l'altre substrat que és sòlid.

Tot i així, és més freqüent la situació en que els dos reactius en estat pur es troben en forma sòlida, llavors el mètode més lògic per a obtenir una fase líquida és afegint un tercer component que és líquid a la temperatura de reacció (Erbeldinger *et al.*, 1998b).

Per últim la fase líquida es pot generar també a partir de dos reactius sòlids, sense l'addició d'un tercer component, mitjançant la formació de mescles eutèctiques semilíquides (Gill *et al.*, 1993).

2.5.2.1 Avantatges i inconvenients dels sistemes de reacció sòlid-sòlid

La utilització de concentracions altes de substrats i els elevats rendiments que s'obtenen amb aquests sistemes de reacció condueix a una raó de producte per volum de reactor més elevada que amb els sistemes convencionals. Aquest fet és prometedor de cara a l'aplicació industrial i en general quan es treballa a gran escala perquè és possible arribar a obtenir més producte amb el mateix volum de reactor, fent que el procés sigui així més econòmic.

D'altra banda, en els casos en que no és necessari l'ús de dissolvents orgànics com a adjuvants, els processos són més ecològics i a més a més així s'evita una possible contaminació dels productes per part dels dissolvents, la qual cosa pot representar un problema especialment per a les indústries alimentàries i farmacèutiques. Així mateix, també s'evita el risc que es produeixi desactivació dels enzims per part dels dissolvents.

A banda de l'aplicació principal que és la síntesi de pèptids, aquest mètode també es pot utilitzar en la síntesi de sucres i àcids grassos.

Finalment la poca solubilitat d'alguns reactius en aquest cas no esdevé un problema, ja que aquest tipus de reaccions es basa en la utilització de substrats i productes majoritàriament insolubles.

Com a principal inconvenient, es pot citar que aquests sistemes de reacció fan difícil la recuperació dels enzims i per tant la seva reutilització.

2.6 La CCK i CCK-8

La colecistokinina (CCK), és una hormona polipeptídica de 33 aminoàcids que va ser aïllada per primera vegada a partir del tracte gastrointestinal de porc, per Mutt i Jorpes (Mutt *et al.*, 1971).

Històricament, l'existència de la CCK es va intuir a partir dels estudis gastrointestinals realitzats amb gossos per Okada (Okada, 1914/15).

A l'any 1928, Ivy i Oldberg van descriure una substància que era alliberada a partir de l'intestí, la qual produïa la contracció de la vesícula biliar i van suggerir el nom de CCK per a aquesta hormona (Ivy *et al.*, 1928). Entre 1941 i 1943, Harper, Vass i Raper, van demostrar experimentalment que el teixit intestinal porcí contenia una hormona diferent a la secretina, que estimulava la secreció dels enzims pancreàtics. Així van anomenar aquesta hormona pancreozimina (Harper *et al.*, 1941/1943). Originàriament, la CCK i la pancreozimina es pensava que eren dues hormones diferents, però un cop van ser purificades i caracteritzades es va demostrar que eren idèntiques (Mutt *et al.*, 1971).

Posteriorment a l'aïllament i caracterització de la CCK, es va confirmar que aquesta existeix en extractes de teixits en una gran varietat de mides i que a més a més d'estar present en l'intestí, també es pot extreure a partir del teixit cerebral.

També s'han identificat dos receptors que uneixen la CCK. El receptor CCK_A es troba abundantment en les cèl·lules pancreàtiques acinars, mentre que el receptor CCK_B, és la forma predominant en el cervell i l'estómac.

2.6.1 Funcions de la CCK

La CCK és present en les cèl·lules endocrines del duodè i jejúnum. L'estímul més potent perquè es doni l'alliberament de la CCK al torrent sanguini és la presència d'aliments parcialment digerits en el lumen intestinal.

La CCK és una hormona clau en els processos fisiològics que regulen la digestió i absorció dels aliments. Entre les seves funcions principals hom pot destacar que és el mitjancer principal de la contracció –que es produeix després de menjar– de la vesícula biliar, la qual comporta l'alliberament de la bilis en el duodè. A més, estimula la secreció d'enzims pancreàtics, retarda el buidat gàstric, regula la secreció gàstrica àcida i la motilitat intestinal, intervé en l'alliberament d'insulina i en la inhibició de l'absorció d'aigua i electròlits.

D'altra banda es coneix que la CCK actua en el cervell com a neurotransmissor (Vanderhaeghen *et al.*, 1980) i que es troba àmpliament distribuïda tant en el sistema nerviós perifèric com en el central.

D'entre tots els efectes produïts per la CCK que s'han esmentat, la seva influència en la regulació de l'apetit és una de les activitats que ha rebut més atenció.

Diversos estudis han demostrat que l'administració exògena de CCK redueix la ingesta d'aliments en diverses espècies, inclosos els humans (Kissilieff *et al.*, 1981; Schwartz *et al.*, 1991). Tot i així, segons Ballinger *et al.*, a partir d'aquests experiments no queda clar si els efectes de l'administració de la CCK exògena podien ser els mateixos que els de l'endògena (Ballinger *et al.*, 1995).

Per a refermar la hipòtesi que la CCK és un pèptid relacionat amb la sacietat, s'han realitzat estudis en els que la ingesta de menjar va ser mesurada en resposta als tractaments que afecten a la secreció de CCK endògena. L'alliberament de la CCK a l'intestí es pensa que es produeix gràcies a l'acció d'un pèptid alliberador de la CCK, secretat a partir del pàncrees i possiblement del duodè (Miyasaka *et al.*, 1989). Aquest pèptid és degradat per la tripsina i l'administració oral d'inhibidors de la tripsina incrementa l'alliberament de la CCK (Calam *et al.*, 1987). L'administració d'inhibidors de la tripsina abans de menjar, ha demostrat que redueix la subseqüent ingesta d'aliments, presumiblement a través d'un increment en l'alliberació de la CCK, tot i que la seva concentració en el plasma no es va mesurar en aquests experiments (Hill *et al.*, 1990).

En altres estudis s'ha manipulat l'alliberament endogen de la CCK a través de la L-fenilalanina (que és un potent alliberador de CCK). L'estudi va ser dissenyat de manera que la L-fenilalanina era administrada abans de menjar i es va observar que les concentracions plasmàtiques de CCK quan l'àpat començava ja eren similars als nivells de després de menjar. Així es va demostrar que l'administració de L-fenilalanina provoca l'alliberament de la CCK i va ser associat amb una reducció significant de la ingesta d'aliments comparat amb el placebo i l'administració de D-fenilalanina, que és un alliberador molt dèbil de la CCK (Ballinger *et al.*, 1994).

Posteriorment, els mateixos autors han estudiat l'efecte de la CCK exògena en relació amb la ingesta d'aliments. En aquest treball es va administrar infusions de CCK-8 en dosis que reproduïen les concentracions fisiològiques pròpies de després de menjar i es va comparar amb l'efecte que produïa l'administració d'infusions salines. Els resultats obtinguts indiquen que en el primer cas disminuïa significativa-

ment la ingesta d'aliments en comparació amb els assaigs en que s'aplicava la infusió salina (Ballinger *et al.*, 1995).

Hi ha doncs, una gran evidència acumulada en favor de que la CCK està involucrada en els mecanismes bioquímics que condueixen a la sacietat.

2.6.2 La CCK-8

S'ha demostrat que la CCK existeix en el cervell, almenys en cinc formes. Tot i que hi ha controvèrsies, sobre quina és la forma majoritària (degut a les diferents tècniques utilitzades per a l'extracció), sembla que hi ha un cert acord en que la forma predominant és la CCK-8 (60-70%) i un (15%) de CCK-33 (Morley, 1982).

Yalow i col·laboradors han extret dos enzims amb capacitat de convertir la CCK a partir de cervell porcí i boví (Straus *et al.*, 1978; Maleski *et al.*, 1980; Ryder *et al.*, 1980). Aquests enzims converteixen la CCK-33 en CCK-12 i CCK-8, respectivament. L'activació d'aquests enzims se sap que és depenent de la formació d'un complex amb Mn^{2+} (Lee *et al.*, 1980).

Entre les diferents formes que presenta la CCK, es coneix que l'octapèptid carboxiterminal d'aquesta hormona, la CCK-8 (CCK₂₆₋₃₃): H-Asp-Tyr(SO₃)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, posseeix una potència igual o major a la de la CCK-33 en molts dels seus efectes (Villanueva *et al.*, 1982). La CCK-8 és la mínima seqüència amb activitat biològica i és especialment activa quan la tirosina és sulfatada. El present treball consisteix en desenvolupar un procés per a la síntesi enzimàtica d'aquesta molècula.

La CCK-8 actua a la perifèria com a missatger gastrointestinal i en el sistema nerviós central com a neurotransmissor i es coneix que intervé en els mecanismes que regulen la sacietat. S'ha demostrat que l'administració intraventricular de CCK-8 en el cervell provoca hiperglicèmia (Morley *et al.*, 1981) i hipotèrmia en rates (Morley *et al.*, 1980; Katsuura *et al.*, 1981). L'aplicació de dosis farmacològiques d'aquesta molècula (150-1000 µg/kg) produeix sedació, catalèpsia i ptosis (Zetler, 1980a/b;). A més, l'administració parenteral de l'octapèptid s'ha comprovat que produeix analgèsia en rates (Zetler, 1980a). Existeixen evidències de que la CCK-8 actua com antagonista dels sistemes dopaminèrgics (Zetler, 1981). També està relacionada amb l'alliberament de l'hormona del creixement (Morley *et al.*, 1979). En altres estudis, s'ha dut a terme la injecció de CCK-8 en rates i la subseqüent administració de solucions de cafeïna, etanol o aigua. Els resultats indiquen que la CCK-8 redueix el consum d'etanol i la ingesta d'aliments. En canvi, en el cas en que s'administra

cafeïna, la ingesta d'aliments també es veu reduïda però es detecta un alta activitat en les rates a causa de que el consum de cafeïna no es veu modificat amb l'administració de CCK-8 (Kulkosky *et al.*, 1991).

Així doncs, es tracta d'una molècula amb una àmplia activitat biològica i amb un potencial interès farmacològic.

2.7 Estudis previs

Els últims estudis (Capellas, 1997, Capellas *et al.*, 1996a/96b/97) realitzats dins el projecte *CICYT SAF 92-02-61-C02*^{*}, consistien en establir l'estratègia òptima per a la síntesi enzimàtica del pentapèptid C-terminal de la colecistoquinina (CCK-5), H-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, en medi orgànic i amb baix contingut en aigua. Aquesta síntesi es va enfocar des del punt de vista d'optimitzar cada acoblament enzimàtic per a obtenir el màxim rendiment de producte final, al mateix temps que es van tractar aspectes de metodologia i altres estudis bàsics. Per a dur a terme aquest objectiu, es va estudiar la influència que tenien una sèrie de factors en els diferents enllaços els quals es detallaran en els següents apartats.

Per a la síntesi del pentapèptid es va proposar una estratègia convergent (3+2), o sigui mitjançant l'acoblament CCK-5 (1-3), Z-Gly-Trp-Met-OR (on R: Al, Cam, Et) i CCK-5 (4-5), H-Asp(OR)-Phe-NH₂ (on R: H, Bu¹), tal i com es mostra a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

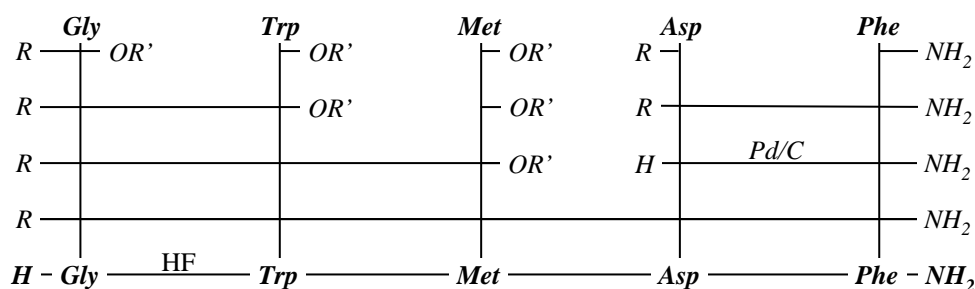


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema de síntesi del pentapèptid C-terminal de la colecistoquinina. R: grup protector N- α amino i R': grup protector C- α carboxil (Capellas, 1997).

^{*} El títol del projecte és: *Valoración y puesta a punto de métodos enzimo-químicos para la síntesis de cabezas de serie y análogos de péptidos biológicamente activos. Aplicación a la CCK-8, un péptido potencialmente útil en el estudio de la saciedad.*

Aquestes reaccions es van realitzar tenint en compte les següents consideracions prèvies:

- Minimitzar el procés de protecció i desprotecció.
- L'especificitat primària de les proteases.
- L'alt rendiment de síntesi dels dipèptids Asp-Phe i Gly-Trp (Calvet *et al.*, 1996).

2.7.1 Síntesi del dipèptid Z-Gly-Trp-OR

La síntesi preparativa dels dipèptids, Z-Gly-Trp-OR (on R: Bzl, Me), es va realitzar en les condicions òptimes d'operació segons Calvet *et al.*, 1996. Els rendiments de reacció van ser superiors al 90% i els rendiments globals (després de purificar els productes) foren: 93% i 84% per Z-Gly-Trp-OMe i Z-Gly-Trp-OBzl respectivament. Seguidament es va dur a terme la síntesi del dipèptid Z-Gly-Trp-OCam, partint del substrat: Z-Gly-Trp-OH. El Z-Gly-Trp-OH es va obtenir per hidròlisi del Z-Gly-Trp-OMe amb $-QT$. El rendiment global, partint de Z-Gly-Trp-OMe va ser del 87%.

2.7.2 Síntesi del tripèptid Z-Gly-Trp-Met-OR

La síntesi del tripèptid es va realitzar a partir de la condensació 2+1, Z-Gly-Trp-OR (on R: Bzl, Cam, Me) i H-Met-OR (on R: Al, Et), en medi orgànic amb baix contingut en aigua, catalitzada per $-QT$ adsorbida sobre un suport sòlid.

Donat que amb les proves preliminars es van aconseguir rendiments de producte relativament baixos, l'objectiu següent va ser analitzar amb més detall les variables que afecten aquesta reacció per tal de millorar-ne el rendiment, tal i com es detalla als apartats següents.

2.7.2.1 Activitat de l'aigua: a_w

Es va estudiar la influència de l' a_w (en un rang entre 0.1 i 0.9) en la reacció: Z-Gly-Trp-OMe + H-Met-OEt, utilitzant $-QT$ adsorbida sobre Celite o poliamida i com a dissolvent acetat d'etil (AE).

Treballant amb $-QT$ adsorbida sobre poliamida a $a_w=0.1$ l'enzim ja tenia activitat i aquesta creixia lleugerament a mesura que augmentava l' a_w . El rendiment màxim de producte (39%), però, s'obtenia quan l' a_w era 0.1 perquè per sobre d'aquest valor

decreixia el producte ja que augmentava la velocitat d'hidròlisi del complex acil-enzim.

Si s'utilitzava Celite com a suport el comportament que s'observava era molt diferent. Quan l'activitat d'aigua era inferior a 0.5, l'activitat enzimàtica era mínima, per sobre d'aquest valor la velocitat de reacció creixia fins arribar a un màxim quan l' a_w era 0.8. Pel que fa al rendiment, el màxim (12%) s'obtenia quan l' a_w estava entre 0.6 i 0.8, a partir d'aquest punt baixava ja que augmentava la hidròlisi.

A la vista d'aquests resultats, el rendiment més alt (39%), s'obtenia treballant a $a_w=0.1$ i amb poliamida com a suport.

Seguidament es va fer el mateix estudi amb un dissolvent miscible en aigua com ara l'acetonitril (ACN). Els resultats obtinguts van ser similars als de l'acetat d'etil, rendiments i velocitats inicials de reacció més elevats amb poliamida que amb Celite-545 i treballant a una a_w de 0.1.

2.7.2.2 Influència del suport d'immobilització

Es va fer un estudi amb diversos suports que presenten diferents característiques físico-químiques. Els materials assajats eren: dos tipus de poliamida, terra de diatomees, polipropilè i vidre de grandària de porus controlada. Les reaccions es van dur a terme en acetat d'etil i a una activitat d'aigua aproximadament de 0.1.

Es va veure que les propietats catalítiques de la -QT depenen fortament del suport utilitzat. Amb suports tipus poliamida s'obtenien els rendiments i velocitats de reacció més elevats. Per a explicar l'activitat de les diferents preparacions immobilitzades es van considerar característiques físiques del suport (àrea superficial accessible i hidrofobicitat del suport) i la càrrega enzimàtica.

Àrea superficial accessible del suport

En suports amb una gran àrea superficial, les molècules d'enzim cobreixen l'àrea amb una sola capa. Quan s'utilitzen suports amb àrea superficial petita es formen varies capes amb molècules d'enzim i només la capa externa resta accessible als substrats. Així l'activitat enzimàtica serà més alta amb els suports que tinguin una àrea superficial accessible gran. Això es complia per tots els suports provats excepte pel polipropilè, possiblement a causa de problemes d'hidrofobicitat.

Hidrofobicitat del suport

La quantitat d'aigua adsorbida per les diferents preparacions immobilitzades a una mateixa a_w és un altre factor que pot influenciar l'activitat de l'enzim immobilitzat. Els suports tipus poliamida i vidre de grandària de porus controlada retenien més aigua adsorbida. Tot i que l'aigua adsorbida per aquests tres suports era similar, l'activitat enzimàtica era diferent. Això podria ser degut a les diferències d'àrea superficial accessible com s'ha esmentat abans. D'altra banda, suports del tipus Celite, altres terres de diatomees i polipropilens adsorbien molta menys quantitat d'aigua. En aquests casos, tant l'activitat enzimàtica com la quantitat d'aigua adsorbida per gram de suport eren similars per a cada preparació, tot i que els suports tipus polipropilè tenen una àrea superficial accessible més gran. Donat que el polipropilè és un material molt hidrofòbic, això va fer pensar que les interaccions de l'enzim amb el suport poden ser molt dèbils provocant una desactivació de l'enzim amb la conseqüent disminució de l'activitat enzimàtica.

Càrrega enzimàtica

Quan els enzims són dipositats sobre suports sòlids s'ha d'optimitzar la quantitat d'enzim dipositat sobre el material per tal d'evitar una sobrecàrrega o pèrdua d'enzim, ja que això en disminueix l'efectivitat. Per optimitzar la càrrega enzimàtica es van fer una sèrie d'experiments amb diferents quantitats de -QT per gram de suport, utilitzant acetat d'etil i poliamida. Com a resultat es va obtenir que la velocitat de reacció augmentava amb la càrrega enzimàtica fins a un màxim de 17-25 mg/g. El mateix estudi es va fer utilitzant acetonitril com a dissolvent i els resultats que es van obtenir van ser similars als d'acetat d'etil. D'altra banda, també es va determinar la càrrega òptima utilitzant Celite com a suport que en aquest cas corresponia a 8 mg/g.

2.7.2.3 Addició de dissolvents orgànics polars al medi de reacció

Està descrit a la literatura que l'addició de petites quantitats de dissolvents orgànics polars en el medi de reacció incrementa l'activitat enzimàtica i disminueix les reaccions competitives d'hidròlisi (Reslow *et al.*, 1992). És per aquest motiu que en el següent grup d'experiments es van provar dos dissolvents orgànics polars: dimetilsulfòxid (DMSO) i trietilamina (TEA).

Es va dur a terme la reacció: Z-Gly-Trp-OMe + H-Met-OEt, en acetat d'etil i acetonitril amb 0.2 i 0.5% (v/v) de tampó respectivament ($a_w=0.1$), utilitzant com a catalitzador -QT adsorbida sobre Celite o poliamida i addicionant DMSO o TEA

(0.5% v/v). A més es van realitzar també experiments control, o sigui en absència d'additius.

En tots els casos estudiats, l'activitat enzimàtica i els rendiments decreixien quan s'afegia DMSO en el medi de reacció. En canvi, l'efecte de la TEA depenia del suport i dissolvent emprats. Quan la -QT estava dipositada sobre poliamida, l'addició de TEA no augmentava l'activitat. És més, la presència d'aquest additiu en acetonitril incrementava la relació producte d'hidròlisi/tripèptid mentre que amb acetat d'etil l'efecte no era significatiu.

Quan la reacció era catalitzada per -QT immobilitzada sobre Celite, hi havia un augment de l'activitat enzimàtica amb l'addició de TEA (molt major però amb acetonitril que amb acetat d'etil). Això incrementava la conversió del substrat i, malgrat que també creixia el quocient producte d'hidròlisi/tripèptid, el rendiment millorava significativament.

Per tant els millors resultats que s'obtingueren en aquest estudi per a la síntesi del tripèptid van ser: treballar amb acetat d'etil, amb o sense TEA amb -QT immobilitzada sobre poliamida, o bé acetonitril amb TEA fent servir l'enzim depositat sobre Celite.

2.7.2.4 Influència de l'estructura de l'ester donador d'acil

La naturalesa química de l'ester del substrat donador del grup acil té una forta influència en l'activitat i rendiment en síntesi enzimàtica de pèptids. A més si la reactivitat per l'ester donador d'acil és alta, la formació de subproductes al llarg de la reacció es veurà reduïda. Aquest fet era important en l'esmentat treball ja que el tripèptid podia reaccionar amb H-Met-OEt per donar tetra, penta o hexapèptids amb més d'un residu de metionina. Per aquest motiu es va estudiar la síntesi del tripèptid amb tres esters donadors d'acil diferents: Z-Gly-Trp-OBzl, Z-Gly-Trp-OMe i Z-Gly-Trp-OCam.

Els millors resultats es van aconseguir utilitzant Z-Gly-Trp-OCam com a donador d'acil, seguit per Z-Gly-Trp-OBzl i Z-Gly-Trp-OMe. Treballant amb Z-Gly-Trp-OCam el màxim rendiment de producte es va obtenir al cap de 2-4 hores, minimitzant-se així la formació de subproductes. Pel contrari, el màxim rendiment de subproductes es va obtenir amb el substrat menys reactiu (Z-Gly-Trp-OMe) degut al llarg temps de reacció necessari per a assolir la màxima concentració de producte.

2.7.2.5 Influència del grup C- α carboxil del nucleòfil

La baixa efectivitat de la metionina com a nucleòfil va portar a investigar si altres C- derivats tenien més bona nucleofilicitat. Aquest estudi era interessant també des del punt de vista sintètic, ja que el tripèptid obtingut seria utilitzat directament com a donador d'acil en la següent etapa d'acoblament. Es van dur a terme uns experiments utilitzant H-Met-OMe, H-Met-OAl, H-Met-OBu^t i H-Met-NH₂ com a nucleòfils. Les reaccions es van realitzar utilitzant acetonitril amb 0.5% (v/v) de tampó i 0.5% (v/v) de TEA. Els rendiments obtinguts seguien el següent ordre: H-Met-NH₂>H-Met-OEt>H-Met-OBu^t>H-Met-OAl=H-Met-OMe. El millor nucleòfil per a la -QT era el derivat amida, amb el que es va obtenir un 90% de tripèptid. Ara bé, aquest derivat d'aminoàcid no tenia interès pel propòsit del treball ja que primer s'hauria de desaminar enzimàticament el grup amida i posteriorment esterificar, cosa que compliava molt el procés. Els rendiments més elevats de subproducte es van obtenir amb el nucleòfil H-Met-OAl. Això significa que entre els C- derivats del tripèptid, el Z-Gly-Trp-Met-OAl era el més reactiu i per tant era la millor opció com a donador d'acil pel pròxim acoblament també catalitzat amb -QT.

2.7.2.6 Síntesi preparativa del tripèptid Z-Gly-Trp-Met-OAl

Després d'haver realitzat l'estudi de les condicions de reacció de síntesi del tripèptid detallades anteriorment, es va dur a terme la síntesi preparativa dels tripèptids Z-Gly-Trp-Met-OEt i Z-Gly-Trp-Met-OAl (Capellas, 1997).

2.7.3 Síntesi del dipèptid H-Asp(OR)-Phe-NH₂ (R: H, Bu^t)

Aquesta síntesi (segons les condicions de Calvet *et al.*, 1996) es va dur a terme a partir dels derivats d'aminoàcids: Z-Asp(OBu^t)-OH o Z-Asp-OH, com a donadors d'acil, i H-Phe-NH₂ com a nucleòfil, obtenint-se rendiments de reacció molt elevats, en tots dos casos 93% (Capellas, 1997).

2.7.4 Síntesi del pentapèptid H-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Les primeres proves de síntesi del pentapèptid es van fer a partir dels substrats donadors d'acil: Z-Gly-Trp-Met-OR (R: Al, Cam, Et) i del nucleòfil H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ sota control cinètic i amb -QT. Aquest enllaç, però, calia optimitzar-lo degut a la baixa especificitat de la -QT vers els residus de metionina. Amb l'objectiu de trobar les condicions òptimes d'operació es van estudiar els següents factors:

2.7.4.1 Influència del procés d'asseccament en l'activitat del catalitzador

Malgrat treballar amb el biocatalitzador equilibrat a una a_w de 0.1, es van detectar diferències en l'activitat enzimàtica final en funció del procés d'asseccament seguit. Per avaluar aquesta influència es van provar tres procediments diferents:

- Equilibrar directament la preparació immobilitzada a una activitat d'aigua aproximadament de 0.1 sense eliminació prèvia de l'aigua.
- Evaporar al buit la preparació immobilitzada i després equilibrar-la a una activitat d'aigua aproximadament de 0.1.
- Liofilitzar la preparació immobilitzada i després equilibrar-la a una activitat d'aigua aproximadament de 0.1.

Els resultats obtinguts indicaven que l'activitat enzimàtica observada quan l'equilibració es realitzava sense prèvia evaporació de l'aigua era més elevada que quan es duïen a terme els altres procediments. Probablement l'extracció de l'aigua abans d'equilibrar podria donar lloc a alguna desactivació irreversible de l'enzim.

2.7.4.2 Influència de l'estructura de l'ester donador d'acil

Es va estudiar la influència de l'ester C- donador d'acil amb els substrats: Z-Gly-Trp-Met-OAl, Z-Gly-Trp-Met-OCam i Z-Gly-Trp-Met-OEt. Els resultats d'aquests experiments indicaven que les velocitats de reacció obtingudes amb els derivats al·lílic i carboxamidometílic (Al i Cam) eren més elevades que amb l'ester etílic (Et), reduint així el temps necessari per a obtenir el rendiment màxim de pentapèptid.

El rendiment (70%) i el quocient producte format/donador d'acil hidrolitzat eren similars pels esters etil i al·lil (tot i que el temps de reacció fou més curt en utilitzar el segon substrat).

En el cas de l'ester Cam, el quocient pentapèptid format/hidròlisi del donador d'acil resultà més elevat que en els casos anteriors, obtenint-se així un increment en el rendiment de la reacció (80%). Malgrat això, calia tenir en compte que la preparació d'aquest derivat representava addicionar dues etapes més en el procediment, reduint, per tant, el rendiment global de la síntesi total.

2.7.4.3 Influència del medi de reacció

Amb l'objectiu de conèixer l'efecte de la TEA en aquesta reacció es van dur a terme diversos experiments, utilitzant com a donadors d'acil Z-Gly-Trp-Met-OAl i Z-Gly-Trp-Met-OCam, en acetonitril amb 0.5% (v/v) de tampó i 0.5% (v/v) de TEA.

Els resultats indicaven que l'addició de TEA incrementava molt la velocitat inicial de reacció. El rendiment no es veia afectat amb l'addició de TEA quan el donador d'acil era Z-Gly-Trp-Met-OAl (69% sense TEA i 68% amb TEA). En canvi amb l'ester carboxamidomètilic decreixia lleugerament el rendiment de producte i s'incrementava la quantitat de substrat hidrolitzat. Tot i que els rendiments no milloraven, l'increment de la velocitat de reacció escurçava el temps de reacció incrementant-se 4 i 5 vegades la productivitat pels esters al·lil i carboxamidometil respectivament.

La influència del dissolvent també es va investigar. La reacció de condensació entre Z-Gly-Trp-Met-OR (on R: Al, Cam) i H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ es va dur a terme amb acetat d'etil amb 0.2% (v/v) de tampó ($a_w=0.1$), amb i sense TEA.

Tant amb Z-Gly-Trp-Met-OAl com amb Z-Gly-Trp-Met-OCam el temps de reacció utilitzant acetat d'etil era més gran que amb acetonitril. També s'obtenien quantitats més elevades de subproductes amb acetat d'etil que amb acetonitril, assolint-se uns rendiments més baixos (48-57%) amb acetat d'etil. L'addició de TEA, tot i que no modificava el rendiment, escurçava el temps de reacció.

En resum, el millor medi de reacció per a dur a terme la síntesi enzimàtica del pentapèptid era: acetonitril amb tampó Tris-HCl pH=9, 50 mM (0.5% v/v) i TEA (0.5% v/v), utilitzant -QT depositada sobre poliamida, equilibrada directament sense assecament previ a una activitat d'aigua aproximadament de 0.1.

2.7.4.4 Estudi de l'estructura del nucleòfil

Un dels avantatges de la síntesi enzimàtica de pèptids és la possibilitat d'utilitzar aminoàcids i fragments peptídics amb la mínima protecció en les cadenes laterals dels derivats d'aminoàcids. Això abarateix el preu dels substrats de partida, disminueix el número de passos de procés i com a resultat afavoreix l'economia del procés.

Es va investigar si en les condicions òptimes trobades anteriorment era possible fer servir H-Asp-Phe-NH₂, malgrat que els derivats d'aspàrtic -desprotegits han estat descrits com a nucleòfils pobres en reaccions catalitzades per la -QT (Clapés *et al.*, 1990a; Widmer *et al.*, 1985). Es van dur a terme diferents experiments fent servir Z-Gly-Trp-Met-OAl com a donador d'acil i H-Asp-Phe-NH₂ com a nucleòfil, el dissolvent era acetonitril amb 0.5% (v/v) de tampó i diferents quantitats de TEA, des de 0.5% fins a 2%. La velocitat inicial de reacció augmentava obtenint-se un màxim a una addició de 1.5% (v/v) de TEA. Aquest percentatge de TEA corresponia a una concentració estequiomètrica per a neutralitzar el grup amino i l'àcid -carboxílic. Amb aquest percentatge es va obtenir el màxim rendiment de producte (50%). Un

increment de la quantitat de TEA, donava lloc a un rendiment similar, però augmentava el temps de reacció, disminuint així la productivitat.

2.7.4.5 Síntesi enzimàtica de Z-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

Considerant els resultats obtinguts en les reaccions prèvies, es va dur a terme la reacció de síntesi del pentapèptid a escala preparativa, utilitzant com a donador d'acil Z-Gly-Trp-Met-OAl perquè tot i que amb Z-Gly-Trp-Met-OCam s'obtenien rendiments més elevats, la preparació d'aquest derivat suposava dos passos addicionals i dificultats en la purificació, reduint considerablement el rendiment global, i pel que fa al nucleòfil es va utilitzar el dipèptid que tenia el residu d'àspartic protegit ja que donava millors rendiments.

La desprotecció del grup -tert-butil del pentapèptid es va fer per mitjà d'una acidòlisi amb àcid trifluoracètic i la desprotecció del grup Z amb fluorur d'hidrogen líquid.

Així doncs l'esquema complert per a l'obtenció de la CCK-5 segons Capellas, 1997 és el que es presenta a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**

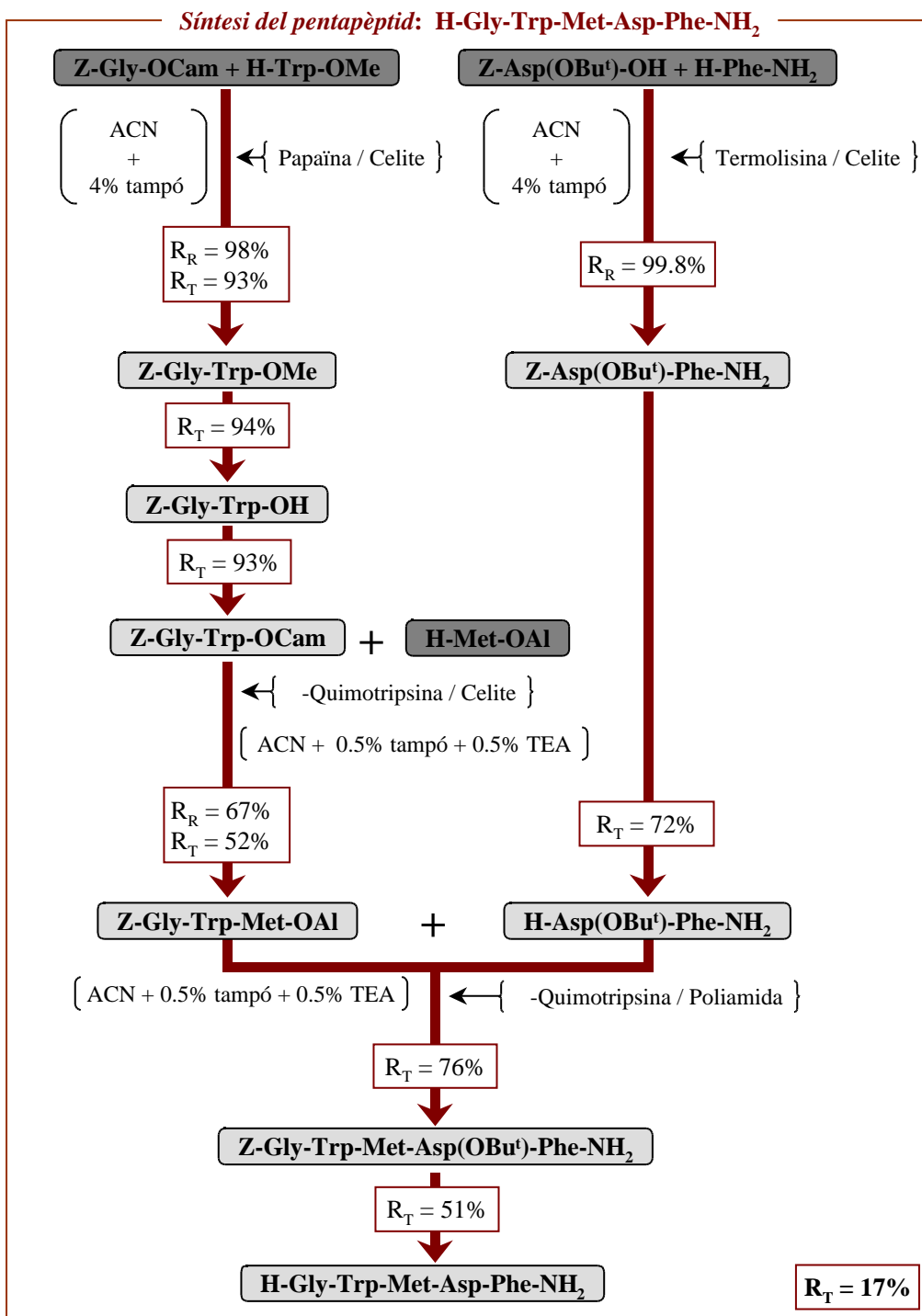


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Procediment global de síntesi del pentapèptid segons (Capellas, 1997). R_R indica rendiment de reacció, i R_T indica rendiment conjunt de reacció, desprotecció i purificació.

Capítol 3 Objectius

L'objectiu final de la present tesi és desenvolupar un procés per a la síntesi enzimàtica de la CCK-8. Per a assolir-lo es requereix la consecució dels següents objectius parcials:

1. Posar a punt una metodologia per a la introducció i eliminació enzimàtica de grups N- protectors en derivats d'aminoàcids i pèptids.
2. Explorar diferents alternatives de síntesi del tripèptid Asp-Tyr-Met (tripèptid 1-3 de la CCK-8), per a trobar-ne l'òptima.
3. Definir un procés per a la síntesi del pentapèptid (4-8) de la CCK-8, prenent com a punt de partida l'esquema seguit en estudis previs realitzats dins del projecte. Es pretén integrar els processos de reacció i purificació, per a reduir el número d'etapes i evitar purificacions intermèdies sempre que sigui possible; amb la finalitat de millorar el rendiment i disminuir la complexitat del procés.
4. Desenvolupar un procés per a la síntesi enzimàtica del tripèptid (1-3) de la CCK-8 amb els mateixos criteris seguits en el procés de síntesi del pentapèptid.
5. Aconseguir unes condicions que facin factible la síntesi de l'octapèptid (Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂); és a dir l'acoblament enzimàtic entre el tripèptid (1-3) i el pentapèptid (4-8).
6. Trobar les condicions per a obtenir la CCK-8 –en la seva forma biològicament activa– modificant l'octapèptid.
7. Sintetitzar la CCK-8 a escala preparativa i definir-ne un procés de síntesi global.

Capítol 4 Materials i mètodes

4.1 Materials

4.1.1 Derivats d'aminoàcids

Al llarg d'aquesta investigació es van utilitzar molts derivats d'aminoàcids comercials. El seu nom, referència i els subministradors habituals es troben detallats a l'apèndix A, on s'especifiquen també els diversos compostos que van ser sintetitzats en el laboratori.

4.1.2 Enzims

Els enzims que es van emprar per catalitzar les reaccions d'aquest treball van ser: PGA, papaïna, -QT i termolisina. A continuació se'n detallen les característiques principals.

- **Penicil·lina G acilasa (PGA)** (EC 3.5.1.11). Generosament cedida per Antibiótics S.A. Extractes semipurificats de penicil·lina G acilasa d'*E. coli* que contenen 400-500 UI/ml d'extracte. Una UI (unitat internacional) es defineix com la quantitat de PGA que hidrolitza 1 μ mol de penicil·lina G per minut a 37°C.
- **Papaïna** (EC 3.4.22.2). Enzim del grup cisteïna o tiol proteasa, provinent de la Carica papaya. Subministrada per Fluka BioChemika (ref: 76220) amb una activitat de 3 unitats/mg de proteïna. També ha estat subministrat per Sigma (ref: P-4762) i amb les següents característiques: tipus IV, cristal·litzada dues vegades i en forma de pols liofilitzada. La seva activitat segons el catàleg és de: 10-20 unitats/mg de proteïna. Una unitat d'activitat hidrolitza 1.0 μ mol de BAEE (N-benzoil-L-arginina etil ester) per minut, a pH 6.2 i a una temperatura de 25°C.
- **α -Quimotripsina** (EC 3.4.21.1). Subministrada per Sigma (ref: C-4129). S'obté a partir de pàncrees boví. Tipus II, cristal·litzada tres vegades a partir de quimotripsinogen quatre vegades cristal·litzat; dialitzada, essencialment lliure de sals i liofilitzada. Activitat: 40-60 unitats/mg de proteïna, utilitzant BTEE (N-benzoil-

L-tirosina etil ester) com a substrat. Una unitat hidrolitza 1.0 μmol de BTEE per minut a un pH de 7.8 i a una temperatura de 25°C.

- **Termolisina** (EC 3.4.24.27). Subministrada per Sigma (Ref: P-1512). S'obté a partir de *Bacillus thermoproteolyticus* rokko. Tipus X, cristal·litzada i liofilitzada, conté sals de calci i sodi; activitat: 50-100 unitats/mg de proteïna. Una unitat hidrolitza caseïna per produir el color equivalent a 1.0 μmol de tirosina per minut a pH 7.5 a 37°C (color pel reactiu Folin-Ciocalteu).

4.1.3 Suports d'immobilització.

Per a immobilitzar les proteases abans esmentades es van fer servir dos suports: Celite i poliamida, mentre que la PGA s'immobilitzava en gels d'agarosa. A continuació es descriuen algunes característiques d'aquests suports.

- **Celite.** És una terra de diatomees. La terra de diatomees és la forma cristal·litzada de molècules de sílice sedimentades, provinents de l'esquelet extern d'aquesta família d'algues. Aquestes en són les seves característiques:

- Celite 545

Subministrador:	Fluka Chemika (ref. 0717).
Diàmetre de partícula:	20-45 μm .
Àrea específica:	2.19 m^2/g .
Diàmetre de porus:	17000 nm.

- Celite R633

Subministrador:	Manville.
Diàmetre de partícula:	297-595 μm .
Àrea específica:	2.25 m^2/g .
Diàmetre de porus:	6500 nm.

- **Poliamida.** És un polímer sintètic d'origen orgànic. El que s'ha utilitzat per a la immobilització de la α -quimotripsina té les següents característiques:

Subministrador:	Akzo (ref. EP-700, tipus PA602).
Diàmetre de partícula:	<800 μm .
Àrea específica:	8.4 m^2/g .
Diàmetre de porus:	500-300 nm.

- **Agarosa 6BCL.** Gels d'agarosa (6%) entrelaçats. L'agarosa és un polímer natural format per unitats de glucosa unides per enllaços α -1,3 i α -1,4. Aquests gels eren generosament cedits per Hispanagar S.A. (Burgos).

4.1.4 Solucions tampó

Les solucions tampó que es van utilitzar al llarg d'aquest treball van ser les següents:

- Tampó bòric-borax, 100 mM, pH=8.2 (0.5 mM EDTA).
- Tampó Tris-HCl (hidroximetil)aminometà-clorhídric, 50 mM, 100 mM, 400 mM, pH=9.
- Tampó MOPS (àcid 3-morfolino-propasulfònic), 50 mM, pH=7.
- Tampó citrat, 200 mM, pH=6.
- Tampó bicarbonat, 80 mM i 200 mM, pH=10.
- Tampó fosfat sòdic, 100 mM, pH=6.5, 8 i 9.

4.1.5 Dissolvents

Per a aquest treball es van fer servir els dissolvents mostrats a continuació a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.:**

<i>Producte</i>	<i>Subministrador</i>	<i>Codi</i>	<i>Puresa (%)</i>	
1,2-Etanodiol	FLUKA	02390	-	98
2,3-Butanodiol	SIGMA	B8,490-4	-	98
2-Propanol	PANREAC	141090	Puríssim	99
Acetat d'etil	SDS	0020521	Anàlisi	99.8
Acetat de metil	SDS	14475	-	99
Acetona	PANREAC	131007	Anàlisi	99.5
Acetonitril	SDS	0063921	HPLC	99.8
Diclorometà	SDS	02937E16	HPLC	99.9
Dimetilformamida	PANREAC	131785	Anàlisi	99
Dimetilsulfòxid	DOESDER	621954	HPLC	99
Etanol	PANREAC	121086	Anàlisi	99.5
Èter dietílic	MERCK	100926	Puríssim	99
Hexà	SDS	052053021	Anàlisi	99
Metanol	SDS	0933721	HPLC	99.8
Propionat de metil	SDS	15017	-	99
Tetrahidrofurà	SIGMA	T5267	-	>99

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Característiques dels dissolvents utilitzats.

Als dissolvents orgànics se'ls afegia tamís molecular per tal de mantenir-los en un ambient el més anhidre possible.

4.1.6 Altres reactius

- Àcid acètic glacial: Panreac. Cod. 141008. Riq. 99.5-100.5%.
- Àcid trifluoracètic: SDS. Ref. 0080272. Per síntesi. Pur. mínima 99%.
- Àcid cítric (anhidre): Panreac. Cod. 131808. Per anàlisi. Riq. mínima: 99.5%.
- Àcid clorhídric (0.05 N): Panreac. Cod. 182107. Solució valorada.
- Àcid 6-nitro-3-(fenil-acetamido) benzoic: Sigma. Ref. N8883. Pur. aprox. 98%.
- Àcid bòric: Panreac.Cod. 131015. Per anàlisi. Riq. mínima: 99.5%.
- Àcid 3-morfolino-propasulfònic (MOPS): Fluka. Ref. 02708. Pur. >99%.
- Tris-HCl (hidroximetil)aminometà-clorhídric: Merk. Ref. 8387.0500.
- Àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA): Panreac. Cod. 131026, per anàlisi. Riq. mínima 99%.
- Àcid sulfúric (96%): Panreac. Per anàlisi. Ref. 131058. Riq. mínima 95%.
- Hydranal-Coulomat A: Alco. Ref. 34807.
- Hydranal-Coulomat C: Alco. Ref. 34808.
- 1,4 Ditio-D,L-Treitól: Fluka. Ref. 43819. Pur. Mínima 99%.
- Aigua MilliQ: MilliQ-Plus de Millipore.
- Carbonat de cesi: Merck. Ref. 2040.
- Carbonat de sodi: Probus. Calitat reactiu (cristal·litzat).
- Bicarbonat sòdic: Panreac. Cod. 121638. Per anàlisi Riq. 99.5-101.0%.
- Clorur sòdic: Panreac. Cod. 121659, per anàlisi. Riq. mínima 99%.
- Sulfat sòdic anhidre: Panreac. Cod. 131716, per anàlisi. Riq. mínima 99%.
- Iodacetamida: Sigma. Ref. I6125. Cristal·lina.
- Tiosulfat sòdic 5-hidrat: Panreac. Cod. 131721. Per anàlisi-ACS.
- Glicidol (2,3- epoxi-1-propanol): Sigma. Ref. G-0887. Pur. mínima 96%.
- Neu carbònica: Subministrada per Carbueros Metálicos S.A.
- Tioanisol: Sigma. Ref. T2765.
- Borhidrur sòdic: Sigma. Ref. S-9125. Pur. aprox. 98%.
- m-Periodat sòdic: Sigma. Ref. S-1878. Pur. mínima 99%.
- -Mercaptoetanol: Sigma. Ref. M-6250.

- Tetraborat de sodi (10 hidrat): Panreac. Cod. 131644. Per anàlisi. Riq. 99.5-102.5%.
- 2-Cloracetamida: Fluka. Ref. 22790. Per HPLC. Pur. >98%.
- Anisol: Fluka. Ref. 10520. Pur. 99%.
- Piridina: Fluka. Ref. 82704. Pur. 99.8%.
- Trietilamina: Sigma. Ref. T0886. Pur. mínima 99%.
- Catalitzador pal·ladi/carboni: Aldrich. Ref. E101.
- Hidròxid sòdic: Panreac. Cod. 171690. 30% (p/v).
- Fosfat sòdic monobàsic 2-hidrat: Panreac. Cod. 131677. Per anàlisi.
- Disodihidrofosfat 12-hidrat: Fluka. Ref. 71650 Pur. >99%.
- Iodur potàsic: Merck. Ref. 5040. Puríssim.

4.2 Equips

4.2.1 Reactors

Els reactors utilitzats en aquest treball van ser els que es detallen a continuació:

- Els primers tipus de reactors que es van emprar per a la síntesi peptídica, eren uns vials de 5 ml de capacitat, on s'afegia 1, 2 o 4 ml de mescla reaccionant. Quan el volum de mescla reaccionant era més gran (10-15 ml), es feia servir unes ampolles de 25 ml o 50 ml de capacitat, tancades amb un tap de goma i posteriorment segellades.
- Per dur a terme les reaccions de N- protecció de derivats d'aminoàcids i les reaccions –a escala preparativa– de desprotecció del pentapèptid, s'utilitzaven ampolles amb tap de rosca de diferents volums (25-500 ml).
- Reactor de vidre de 200 ml de capacitat que era emplenat amb 60 o 100 ml de mescla reaccionant en funció de la reacció. Aquest reactor té incorporada una camisa i a la part inferior una placa porosa –tal i com es pot observar a la Figura **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**– que facilita la separació de l'enzim de la mescla reaccionant un cop acabada la reacció.
- Reactor de forma esfèrica, amb tres deflectors a 120°, de 500 ml de capacitat.
- Reactor esfèric de 1000 ml de capacitat.

L'agitació i termostatització dels vials i les ampolles s'aconseguia –excepte quan s'indiqui el contrari– mitjançant un bany agitat que es movia a 200 r.p.m. i mantenia

la temperatura constant a 25°C. A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es mostra una fotografia d'aquests reactors.



Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Fotografia dels vials i ampolles utilitzats en diferents reaccions enzimàtiques d'aquest treball.

L'agitació a l'interior de la resta de reactors esmentats s'aconseguia mitjançant un rodets de pales mogut per un motor que girava a 120 r.p.m. Aquests reactors –excepte en el cas del que disposa de camisa– es mantien submergits en un bany d'aigua a 25°C. A la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es pot veure el dispositiu experimental amb el reactor de 500 ml, mentre que la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido. mostra un detall del reactor de 200 ml de capacitat.

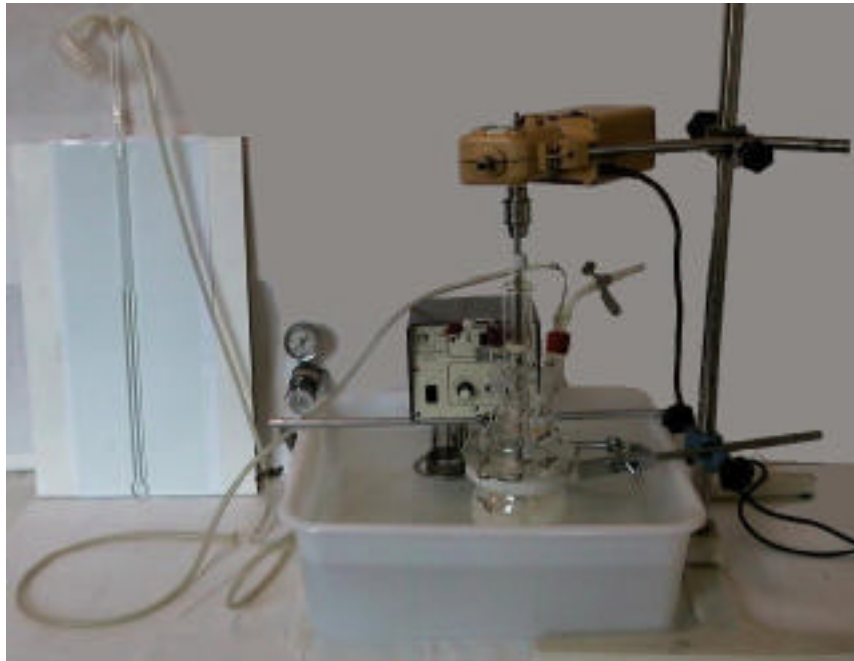


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Vista del dispositiu experimental.

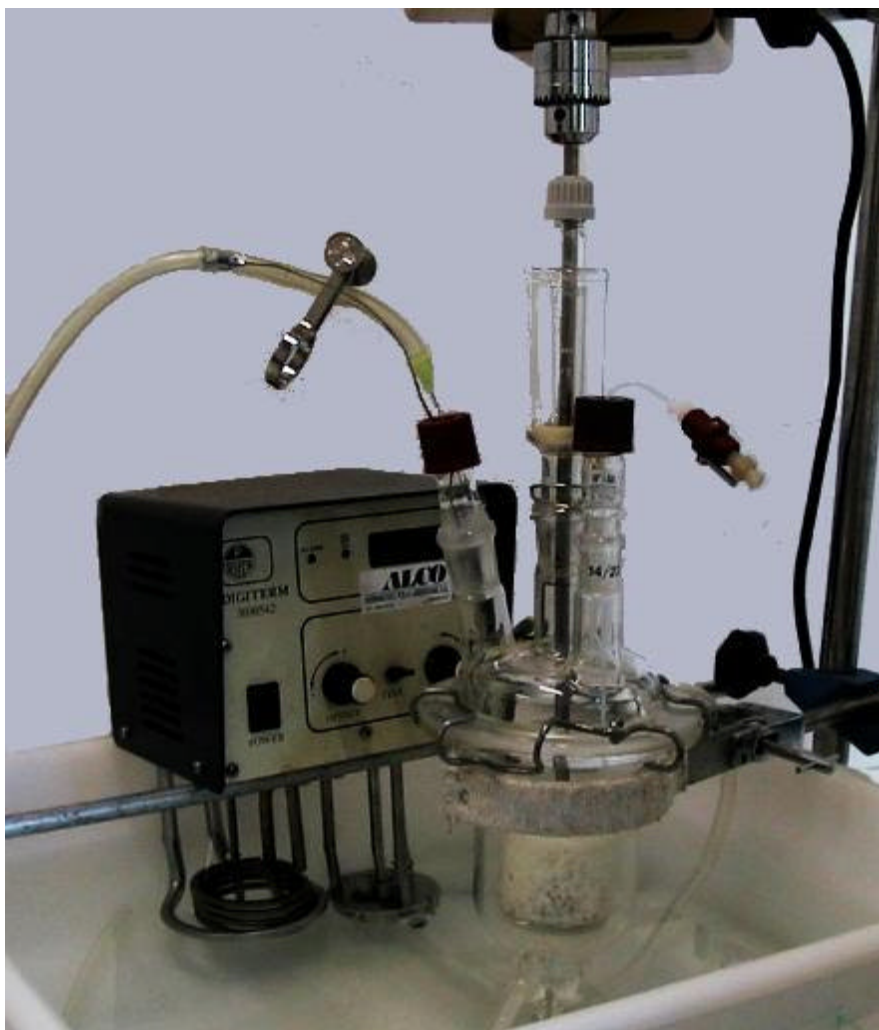


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Detall del reactor de 200 ml de capacitat.

Per mantenir l'activitat de la papaïna en un determinat sistema de reacció i evitar així l'oxidació dels ponts disulfur dels residus de cisteïna, és necessària l'absència d'agents oxidants com ara l'oxigen present en l'aire. En el present treball, aquest requisit s'ha acomplert aplicant un corrent de nitrogen dins el reactor. Al mateix temps aquest procediment evita l'entrada d'aire humit de l'exterior a dins del sistema i per tant constitueix una de les mesures que s'han aplicat per mantenir constant el contingut d'aigua del medi de reacció. A tal efecte s'ha dissenyat el dispositiu experimental que pot observar-se a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido., on es mostren també les diverses entrades del sistema.

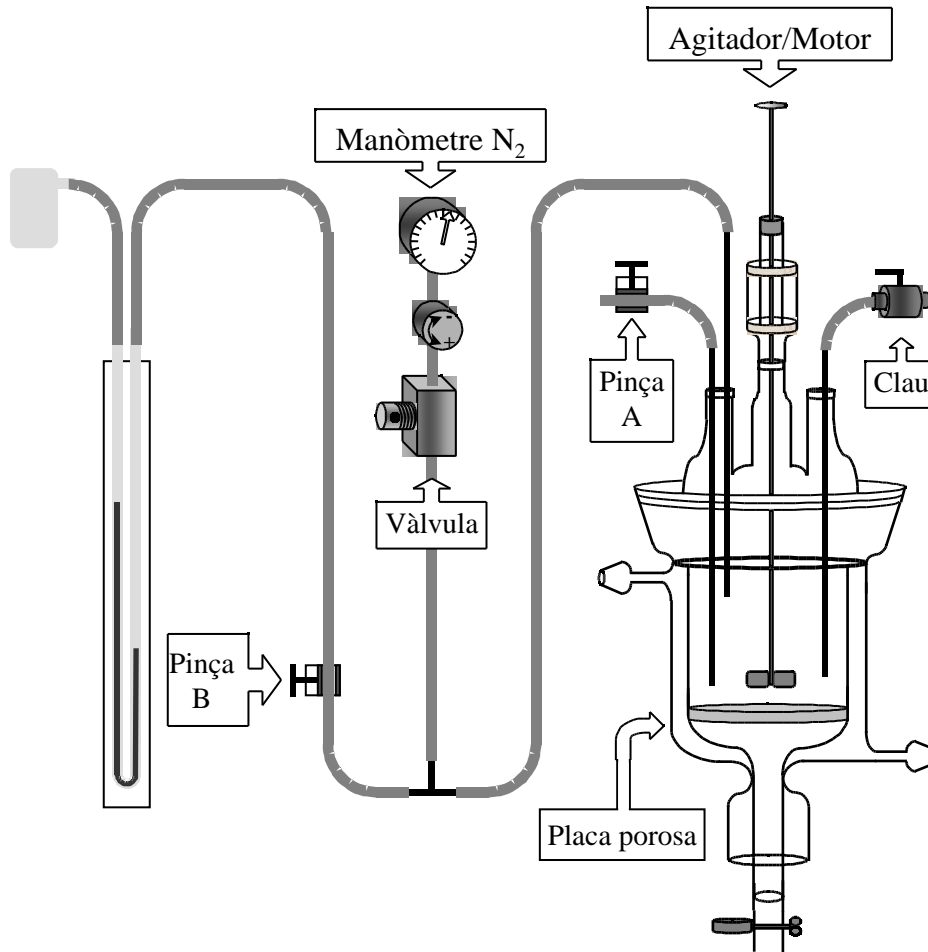


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Esquema del dispositiu experimental.

A continuació es detallen les operacions que es realitzaven:

La vàlvula obria el pas de nitrogen cap a tot el sistema. Quan es mantenia la pinça A oberta i la B tancada, passava un corrent de nitrogen que desplaçava l'oxigen de l'interior del reactor. Aquesta operació es realitzava per tal d'eliminar l'oxigen dissolt en el medi. Quan es tancava la pinça A i es seguia bombollejant s'aconseguia una sobrepressió en el sistema. Passats uns segons es tancava la vàlvula per aturar l'entrada de nitrogen. Obrint la pinça B es connectava el sistema a un manòmetre que permetia mesurar la sobrepressió. D'altra banda la presa de mostres es realitzava amb una xeringa a través de la clau situada en una de les sortides del reactor.

4.2.2 Equips d'anàlisi

4.2.2.1 Equip de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

Equip analític de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), en fase reversa i detecció ultraviolada.

- Cromatògraf: WATERS TM, LC Module I plus.
- Ordinador personal.
- Detector Waters 486. Detecció ultraviolada, amb un rang de longitud d'ona de 190-380 nm. La màxima sensibilitat de l'instrument és 0.001 AFS (unitats d'absorbància en l'escala total). La làmpada és de deuteri.
- Columna LichroCART 250-4 HPLC (Lichrosphere 100, RP-18, 5µm, 250x4 mm).
- Autoinjector amb selecció de mostres.

4.2.3 Altres equips

- Karl-Fischer Moisture Titrator. MKC-210 i ADP-351 (Kyoto Electronics).
- Liofilitzador Heto, model CT110.
- Liofilitzador Virtis Sentry 5L.
- Rotavapor Heidolph, model W2000.
- Bany agitad, termostatitzat Gallenkamp. Agitació de 0-200 rev/min.
- Ultrasons P. Selecta.
- Balança analítica digital Mettler, model AC100.
- Mesurador de pH Crison, model 2001.
- Bany Digiterm 3000542.
- Centrífuga Hettich Mikro 12-24.
- Centrífuga Beckman J2-21M/E.

4.3 Mètodes generals

4.3.1 Modificacions d'aminoàcids

4.3.1.1 Extracció del grup clorhidrat o p-tosilat

Alguns esters d'aminoàcids s'obtenen comercialment en forma de clorhidrats o p-tosilats, com és el cas de H-Trp-OBzl.HCl, H-Met-OEt.HCl, H-Met-OAl.p-tosilat i

H-Tyr-OAl.p-tosilat. Per poder solubilitzar aquests reactius en medis orgànics han d'estar en forma d'esters lliures. Amb aquesta finalitat es seguia el següent procediment:

- Es dissol el reactiu en forma de clorhidrat o p-tosilat en la mínima quantitat possible d'aigua Milli-Q i es transvasa aquesta solució a un embut d'extracció.
- Es prepara una solució de Na_2CO_3 en aigua amb un excés 1.1 o 1.5 (per a l'extracció del grup clorhidrat o p-tosilat respectivament) respecte a la proporció estequiomètrica de reactiu (2 mol de H-Trp-OBzl.HCl/ H-Met-OEt.HCl/ H-Met-OAl.p-tosilat, H-Tyr-OAl.p-tosilat reaccionen amb 1 mol de Na_2CO_3) i s'addiciona a l'embut d'extracció. A continuació s'afegeix un volum d'acetat d'etil equivalent al de la fase aquosa.
- Es realitza una primera extracció de forma que el derivat d'aminoàcid lliure del grup clorhidrat o p-tosilat s'extreu cap a la fase orgànica.
- Un cop separades les dues fases es comprova el pH de la fase aquosa i si és necessari s'ajusta fins a un valor de pH 9-10, addicionant NaOH al 30% (p/v). Si es sobrepassés aquest valor de pH, es podria hidrolitzar el grup ester de la molècula.
- S'addiciona un volum equivalent d'acetat d'etil i es realitza una segona extracció, per tal de recuperar la màxima quantitat possible de producte i així obtenir un rendiment més elevat en el procés.
- S'ajunten les dues fases orgàniques i es renten amb una solució aquosa saturada amb NaCl. A la fase orgànica se li addiciona sulfat sòdic anhidre (Na_2SO_4) per eliminar l'aigua. Passats 20 minuts es filtra i s'evapora el dissolvent amb un rotavapor. El sòlid o l'oli que s'obté –en funció del producte– es deixa a assecar al buit.

Així s'obtenen els reactius en forma d'esters lliure i ja poden ésser utilitzats com a substrats en les reaccions de síntesi enzimàtica. A la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es presenten els rendiments obtinguts en aquests processos d'extracció.

<i>Producte</i>	<i>Rendiment d'extracció (%)</i>
H-Trp-OBzl	90.4
H-Met-OEt	73.2
H-Met-OAl	84.3
H-Tyr-OAl	68.1

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Rendiments obtinguts en l'extracció dels grups clorhidrat o p-tosilat de diferents derivats d'aminoàcids.

4.3.1.2 Preparació d'esters carboxamidomètics

La síntesi de l'ester carboxamidomètic (Cam) de diferents derivats d'aminoàcids es va realitzar segons el mètode de la sal de cesi (Wang *et al.*, 1977) i es detalla a continuació:

Es dissol el derivat d'aminoàcid en una mescla aigua/acetonitril (10:1). Seguidament s'addiciona el carbonat de cesi (Cs_2CO_3) (excés d'1.2 equivalents) de forma controlada, evitant que el medi s'escalfi. Aquesta dissolució, es congela amb neu carbònica i es liofilitza durant 48 hores, obtenint-se un sòlid.

Seguidament a aquest sòlid se li addiciona dimetilformamida (DMF) fins a aconseguir dissoldre'l completament. A aquesta solució se li afegeix la 2-cloracetamida (excés d'1.5 equivalents), molt lentament i amb una agitació constant, que es manté posteriorment durant 96 hores. Passat aquest temps, s'evapora la DMF i és molt important en aquest punt eliminar tot el dissolvent perquè d'altra manera s'arrossega posteriorment en la purificació del producte.

Cal assenyalar que en la síntesi de PhAc-Asp(OBu¹)-OCam va ésser necessari utilitzar iodacetamida (més reactiva) en comptes de 2-cloracetamida perquè tingués lloc la reacció.

La purificació d'aquests productes es realitza mitjançant extraccions líquid-líquid, tal i com es descriu a l'apartat 4.3.6.1. En el cas del PhAc-Asp(OBu¹)-OCam, el procés de purificació s'inicia dissolent el residu sòlid en acetat d'etil i fent una extracció amb una solució de tiosulfat sòdic (10% p/v); a continuació es segueix el mateix procés que pels altres derivats carboxamidomètics.

4.3.1.3 Hidròlisi de l'ester benzílic de Mand-Gly-OBzl

Donat que els derivats d'aminoàcids amb l'ester carboxiterminal Cam no es poden obtenir comercialment es va determinar preparar el Mand-Gly-OCam introduint l'ester carboxamidomètic al Mand-Gly-OH i aquest últim compost es va obtenir a partir de la hidròlisi de l'ester benzílic del Mand-Gly-OBzl. El procediment seguit per dur a terme l'esmentada hidròlisi és el que es detalla a continuació:

El substrat Mand-Gly-OBzl (2.81 g) es dissol en 117.5 ml d'ACN/tampó bòric-borax pH 8.2 (80/20% (v/v)). Per iniciar la reacció s'addicionen 0.95 g de papaïna immobilitzada per adsorció sobre Celite (100 mg de papaïna/g de Celite). Un cop s'ha hidrolitzat tot el substrat s'obté: Mand-Gly-OH i alcohol benzílic. A continuació s'evapora l'acetoneitril. Per iniciar la síntesi de Mand-Gly-OCam a partir del Mand-Gly-OH que s'ha obtingut s'addiciona Cs_2CO_3 i 100 ml d'aigua. Aquesta mescla es transvasa a un embut d'extracció. S'addiciona un volum equivalent d'acetat d'etil i es realitza una extracció. Així s'obté a la fase orgànica l'alcohol benzílic i a la fase aquosa Mand-GlyOCs⁺. Seguidament s'evapora l'acetat d'etil romanent de la fase aquosa, es congela la solució i es liofilitza. El procediment que es segueix a continuació per a la preparació completa de Mand-Gly-OCam és el mateix que s'ha descrit a l'apartat 4.3.1.2.

4.3.1.4 Hidròlisi de l'ester carboxamidomètilic del PhAc-Asp(OBu^t)-OCam

Es van dissoldre 3.05 mmols (1.11 g) de PhAc-Asp(OBu^t)-OCam en una solució acetoneitril/aigua: 62.2/37.8% (v/v). A continuació, per a iniciar la hidròlisi de l'ester carboxamidomètilic (Cam) es va addicionar una solució de carbonat sòdic 0.1M, en una relació molar PhAc-Asp(OBu^t)-OCam/carbonat sòdic: 1/1.25. El seguiment de la reacció es va fer extraient mostres de 25 µl, a les que s'addicionava 25 µl d'àcid acètic i 450 µl d'eluent d'HPLC abans de passar a ser analitzades. Per aturar la reacció es va addicionar àcid cítric 5% (v/v) fins a assolir un pH de 7. A continuació es va evaporar l'acetoneitril en un rotavapor i el residu que es va obtenir es va dissoldre en una solució de bicarbonat sòdic 5% (v/v). Seguidament es va realitzar una extracció amb acetat d'etil i un rentat de la fase orgànica amb una solució aquosa saturada amb NaCl. La fase orgànica es va assecar amb sulfat sòdic i després de filtrar es va evaporar el dissolvent.

4.3.1.5 Hidròlisi de l'ester mètilic de PhAc-Gly-OMe

La hidròlisi de l'ester mètilic de PhAc-Gly-OMe es va realitzar enzimàticament en un reactor de 1000 ml de capacitat. Aquest substrat (7.6 g) es va dissoldre en un volum de 500 ml d'una solució ACN/tampó bòric-borax, pH 8.2 en una relació 10/90% (v/v). Per a iniciar la reacció es van addicionar 14.2 g de biocatalitzador (papaïna immobilitzada sobre gels d'agarosa per enllaç covalent multipuntual). El seguiment de la reacció es va fer per HPLC i s'extreien mostres de 25 µl que es diluïen amb 475 µl d'eluent d'HPLC abans de ser analitzades. Un cop finalitzada la

reacció, la purificació del producte hidrolitzat es va realitzar com es detalla a continuació:

El medi de reacció es separa de l'enzim per filtració (l'enzim es renta amb ACN per recuperar la màxima quantitat possible de producte, es filtra i el líquid que s'obté s'ajunta amb el medi prèviament filtrat).

S'evapora el dissolvent del filtrat. S'addiciona una solució de bicarbonat sòdic 5% (v/v) i un volum equivalent d'acetat d'etil i es realitza una extracció. Un cop s'han separat les dues fases en la fase orgànica, es troba el substrat PhAc-Gly-OMe que no ha reaccionat i en la aquosa el producte hidrolitzat. A la fase aquosa se li addiciona àcid cítric i acetat d'etil. Es realitza una extracció i el producte hidrolitzat passa a la fase orgànica. S'addiciona sulfat sòdic per assecar l'aigua del dissolvent, es filtra i s'evapora el dissolvent en un rotavapor.

Aquest procés també es va realitzar amb papaïna lliure d'acord amb les següents condicions:

Es van dissoldre 7.8835 g de PhAc-Gly-OMe en 550 ml d'una solució acetonitril/tampó bòric-borax pH 8.2 (10/90% (v/v)) i es va addicionar 1.75 g de papaïna sense immobilitzar per iniciar la reacció.

4.3.1.6 Hidròlisi de l'ester metílic de Fmoc-Asp-Tyr-OMe

La hidròlisi de l'ester metílic del dipèptid Fmoc-Asp-Tyr-OMe es va dur a terme enzimàticament. Amb aquesta finalitat es van dissoldre 2 g d'aquest compost en 50 ml d'una mescla acetonitril/tampó Tris-HCl, pH 9, 100 mM (38/62% v/v). Per tal d'iniciar la reacció es van addicionar 1.4 g de biocatalitzador (-QT immobilitzada per enllaç covalent multipuntual sobre gels d'agarosa, 40 mg de -QT/ml d'agarosa). Per seguir la reacció s'extreien mostres de 50 µl, se'ls addicionava 10 µl d'àcid acètic per aturar la reacció i es diluïen en 950 µl d'eluent d'HPLC i tot seguit passaven a ser analitzades. Un cop finalitzada la reacció es va filtrar el medi per separar-lo de l'enzim i es va recuperar el producte (Fmoc-Asp-Tyr-OH) mitjançant extraccions líquides amb acetat d'etil.

4.3.2 Immobilització d'enzims

4.3.2.1 Immobilització per adsorció

Degut a que els enzims són insolubles en quasi tots els dissolvents orgànics, es poden immobilitzar per adsorció, mantenint-se units al suport d'immobilització encara que no hi estiguin enllaçats covalentment (Clapés *et al.*, 1990b).

Aquesta tècnica és molt senzilla de realitzar, perquè només consisteix en dipositar l'enzim sobre el suport d'immobilització, d'acord amb el següent procediment:

A una certa quantitat d'enzim (en funció de la càrrega enzimàtica desitjada) se li afegeix 1 ml del tampó corresponent, de manera que l'enzim queda dissolt en el tampó. Seguidament a aquesta solució se li addiciona 1 g de suport (Celite o poliamida). És important que l'addició del suport es faci de forma gradual i que al mateix temps es vagi remouent la preparació, per tal de que al final del procés sigui el més homogènia possible. Seguidament es posa a assecar la preparació immobilitzada.

Per a immobilitzar la papaïna, el tampó que es feia servir era bòric-borax 100 mM, pH 8.2. A més en el procés d'immobilització s'afegia una quantitat en pes de 1-4 Ditio-D-L-Treitól igual que d'enzim. Aquest compost s'addicionava per ajudar a impedir el trencament dels ponts disulfur de la papaïna. Seguidament la preparació immobilitzada s'assecava durant 24 hores al buit.

Quan s'immobilitzava termolisina, el tampó utilitzat era MOPS 50 mM, pH 7, i el procés d'assecament que es seguia era el mateix que per la papaïna.

El tampó utilitzat per a la immobilització de la -QT era Tris-HCl 50 mM, pH 9. En aquest cas la preparació immobilitzada es posava a equilibrar a una $a_w=0.1$ tal i com s'explica a §¡Error!Argumento de modificador desconocido. de materials i mètodes.

4.3.2.2 Immobilització per enllaç covalent multipuntual

La immobilització de la penicil·lina G acilasa (PGA) es realitzava per enllaç covalent multipuntual amb gels d'agarosa, donat que és una metodologia que dona lloc a derivats molt estables i a més presenta l'avantatge que l'enzim immobilitzat es pot utilitzar en qualsevol medi de reacció aquós, sense perill de que es perdi la unió al suport, a diferència del que succeeix pel mètode d'adsorció. No obstant, la majoria de suports generalment no tenen capacitat d'enllaçar-se amb els enzims i per tant han d'ésser activats prèviament per a poder ésser utilitzats.

En concret, aquesta immobilització es duia a terme pel mètode del glicidol. Seguint aquesta metodologia és necessari realitzar dues etapes d'activació dels gels, prèvia immobilització de l'enzim, les quals s'indiquen a continuació:

1. Modificació dels grups hidroxil de la superfície del gel. Aquesta etapa es realitza amb glicidol, obtenint-se grups gliceril, tal i com es pot observar a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.b.
2. Oxidació dels grups gliceril amb NaIO_4 , per obtenir grups glioxil com es pot veure a la Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.c.
3. Immobilització de l'enzim, Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.d-e.

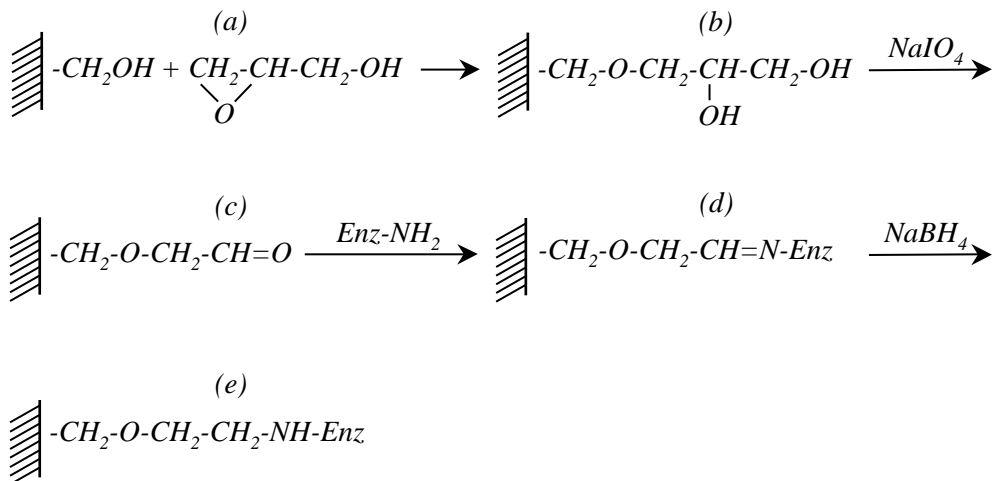


Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Immobilització per enllaç covalent multipuntual segons el mètode glicidol.

A continuació es detalla el procediment seguit en cada una de les etapes que s'han esmentat.

Activació dels gels d'agarosa amb glicidol

Es renta l'agarosa abundantment amb aigua destil·lada. Amb aquesta finalitat es col·loca l'agarosa en un filtre de placa porosa (el qual es troba a sobre d'un kitasato), es va addicionant aigua, al mateix temps que es remou el suport suaument amb una espàtula. Es connecta el kitasato al buit per filtrar l'aigua amb la que s'ha rentat l'agarosa i es repeteix aquest procediment diverses vegades.

Un cop s'ha rentat l'agarosa ja està preparada per iniciar el procés d'activació pel mètode del glicidol. L'activació de 35 g humits d'agarosa (50 ml) es realitza tal i com es detalla a continuació:

Es prepara una solució 1.7 N de NaOH (1.13 g) i 28.6 mg/ml de NaBH₄ (0.474 g) en 16.6 ml d'aigua.

En un vial s'addicionen els 35 g d'agarosa, 10 ml d'aigua i els 16.6 ml de la solució que s'ha preparat anteriorment. A continuació s'agita aquesta mescla per homogeneïtzar-la.

S'addicionen 12 ml de glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) i es deixa la barreja en un agitador rotatori, a 20°C (temperatura ambient) durant 18 hores.

Oxidació dels grups gliceril de l'agarosa amb NaIO₄

Passades les 18 hores es renta l'agarosa abundantment amb aigua, tal i com s'ha detallat anteriorment. Es pesen 31.5 g d'agarosa (45 ml) activada amb glicidol i es porten a 450 ml amb aigua.

L'oxidació de l'agarosa es realitza addicionant 200 µmol de NaIO₄/ml d'agarosa. Amb aquesta finalitat es prepara una solució de NaIO₄ en aigua i s'afegeix a la solució d'agarosa. La mescla resultant es deixa en un agitador rotatori.

El seguiment de la reacció d'oxidació del suport es pot fer valorant el percentatge de NaIO₄ romanent al llarg del temps per espectrofotometria. D'aquesta manera es pot conèixer en quin moment s'atura la reacció i d'altra banda el grau d'activació que assoleix l'agarosa.

Així en primer lloc es prepara una solució de NaIO₄ en aigua en la mateixa proporció –ml NaIO₄/ml totals– que en el procés d'activació de l'agarosa, per tal de conèixer l'absorbància de partida.

Es prepara una cubeta que conté:

- 1 ml de KI 10% (H₂O).
- 1 ml de CO₃HNa (saturat).
- 1 ml de solució problema (solució de NaIO₄ en aigua o solució de la reacció d'agarosa que s'està oxidant).

Per tant, si es llegeix l'absorbància (a 500 nm) de la mostra sense agarosa (temps 0) i de les diverses mostres a diferents temps al llarg de la reacció d'oxidació, es pot obtenir una taula com la que es presenta a continuació, on s'inclouen els valors obtinguts pel cas concret que s'ha anat detallant:

Temps (min)	Absorbància	NaIO ₄ romanent (%)	NaIO ₄ consumit (%)
0	1.031	100	0
50	0.5	48.51	51.49
60	0.379	36.77	63.23
65	0.457	44.33	55.67

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Absorbància, percentatges de NaIO₄ romanent i consumit al llarg del temps, en un dels processos d'oxidació dels grups gliceril de l'agarosa amb NaIO₄ realitzat en el present treball.

Si es pren com a percentatge de NaIO₄ consumit, el valor mitjà de les dues últimes mostres, s'obté que s'ha consumit un 59.45% del NaIO₄ inicial.

- Número de μmols de NaIO₄ inicials: 9000.
- Número de μmols de NaIO₄ consumits: 5350.5.
- Així s'obté una agarosa activada amb: 5350.5 μmols d'aldehyd/45 ml = 118.9 μmols d'aldehyd/ml d'agarosa.

Immobilització de la penicil·lina G acilasa

Abans d'iniciar el procés d'immobilització de la penicil·lina G acilasa, és necessari mesurar l'activitat de l'enzim lliure, per tal de conèixer l'activitat enzimàtica que se li ofereix al suport en el moment d'immobilitzar.

- Mesura de l'activitat enzimàtica de la penicil·lina G acilasa abans d'immobilitzar

Es prenen 10 μl de penicil·lina G acilasa i es dilueixen en 990 μl d'aigua. S'addicionen 2 ml d'àcid 6-nitro-3-(fenil-acetamido)benzoic (NIPAB) que és substrat de l'acilasa en una cubeta i s'afegeixen 20 μl de la solució enzimàtica anterior.

Es llegeix el pendent de la recta que s'obté (a 405 nm i 25°C) i el nombre d'unitats internacionals d'activitat enzimàtica es calculen a partir de l'expressió 4.1 (el valor que s'obté es multiplica pel factor de dilució):

$$\text{Activitat (UI/ml)} = \frac{2 \cdot 1.7 \cdot V_1 \cdot \text{Abs/min}}{9 \cdot V_2}, \quad (4.1)$$

on V_1 és el volum total de la cubeta (ml de NIPAB + ml de solució enzimàtica) i V_2 el volum de solució enzimàtica.

Al llarg de les diverses immobilitzacions que s'han realitzat en aquest treball s'han ofert 1000 unitats d'acilasa per ml d'agarosa. En aquest cas concret s'utilitzen 11.2 g d'agarosa (16 ml). Donat que l'activitat calculada de l'acilasa lliure és de 322 UI/ml implica que seran necessaris al voltant de 49.6 ml d'acilasa.

D'altra banda la immobilització es realitza amb una relació volum gel/volum total: 1/10. Per 16 ml d'agarosa (160 ml totals) s'ha d'addicionar 144 ml de solució que han de contenir –en volums iguals– una solució d'àcid fenilacètic en bicarbonat, aigua i penicil·lina G acilasa. A tal efecte es prepara una solució 333 mM d'àcid fenilacètic (2.27 g) –substrat natural de l'enzim– en 48 ml de bicarbonat 0.2 M. El substrat s'afegeix perquè la immobilització es faci en la forma estructural de l'enzim més adequada. A continuació s'addicionen 48 ml d'aigua i s'ajusta el pH a 10.1. S'afegeix 48 ml de penicil·lina G acilasa a la mescla anterior i es torna a ajustar el pH a 10.1. Seguidament s'addiciona l'agarosa i es deixa amb agitació suau durant 3 hores.

Finalment s'afegeix l'agent reductor: 0.16 g de NaBH_4 (1 mg/ml d'agarosa) i es deixa durant 30 minuts en agitació. Passat aquest temps es renta la preparació immobilitzada.

Així doncs les condicions finals d'immobilització són les següents:

- Bicarbonat 60 mM, pH=10.
- Àcid fenilacètic: 100 mM.
- Relació gel/volum total: 1/10
- Mesura de l'activitat de la penicil·lina G acilasa immobilitzada.

La mesura de l'activitat de la PGA immobilitzada es realitza trencant el derivat per determinar tota l'activitat immobilitzada (d'aquesta manera s'eliminen els problemes de transferència de matèria interna i s'avalua l'enzim que realment s'ha immobilitzat).

En un vial es pesen 0.07 g de derivat, s'addicionen 0.9 ml d'aigua i es deixa amb agitació magnètica durant 48 hores a 4°C perquè es trenqui el derivat. Passat aquest temps es mesura la seva activitat per espectrofotometria a partir de 2 ml de NIPAB als que s'addicionen 10 μl del derivat trencat en solució. El càlcul de les unitats d'activitat enzimàtica es realitza a partir de l'expressió 4.1.

4.3.3 Reaccions enzimàtiques

En aquest apartat es descriu la metodologia general seguida per dur a terme les reaccions enzimàtiques en vials i reactors, mentre que a l'apartat 4.4 es detallen les condicions específiques per a cada reacció.

4.3.3.1 Reaccions en vials i ampolles

Es pesen els substrats i es col·loquen en un vial de reacció. A continuació s'addiciona el dissolvent i el volum de tampó corresponent. Aquesta mescla es sonica per tal de solubilitzar els substrats i s'extreu una mostra (que equival al temps 0). Seguidament s'addiciona l'enzim per iniciar la reacció i es col·loca el vial en un bany a una determinada agitació i temperatura. El seguiment de la reacció es realitza extraient diverses mostres que són analitzades per HPLC. Les mostres es prenen directament amb micropipeta, excepte quan s'utilitzen les ampolles amb tap de goma i segellades. En aquests casos s'extreuen amb una xeringa (connectada a una agulla) a través del tap.

4.3.3.2 Reaccions en altres reactors

Es pesen els substrats i s'addicionen a una ampolla de vidre on s'hi afegeix també el dissolvent. Aquesta mescla es sonica per homogeneïtzar els substrats i tot seguit es transvasa al reactor utilitzant una xeringa de vidre. A continuació es mesura el contingut d'aigua del medi de reacció i s'addiciona només el volum de tampó restant per assolir el percentatge d'aigua final desitjat en el medi. S'extreu una mostra (que correspon a temps 0) i s'afegeix l'enzim per tal d'iniciar la reacció. Les mostres que es prenen al llarg de l'experiment són analitzades per HPLC.

4.3.3.3 Extracció del contingut sòlid en les reaccions de síntesi

Per poder determinar al final de la reacció si quedava algun producte precipitat sobre la preparació enzimàtica immobilitzada, es realitzava un rentat d'aquest sòlid utilitzant una mescla de dissolvents que faciliten la solubilització d'aquests productes seguint el següent procediment:

- Es comptabilitza el nombre de mostres que s'han extret del medi al llarg de la reacció i es calcula el volum restant.
- Al vial que conté el medi de reacció amb l'enzim se li addiciona dos volums iguals al volum final del medi de reacció de la següent mescla:
 - 50% (v/v) dimetilsulfòxid (DMSO)

- 40% (v/v) metanol
- 10% (v/v) àcid acètic
- Es sonica aquest vial durant uns minuts per facilitar l'extracció dels productes i es deixa sedimentar l'enzim.
- S'extreu una mostra d'un volum tres vegades superior al de les mostres extretes al llarg de la reacció, es dilueix amb eluent d'HPLC i s'analitza.

4.3.3.4 Extracció del contingut sòlid en les reaccions de desprotecció del pentapèptid

Un cop finalitzades les reaccions de desprotecció del pentapèptid, es realitzava un rentat de la preparació immobilitzada per tal d'extreure la major quantitat possible de pentapèptid (protegit o desprotegit) tal i com es detalla a continuació:

- Es comptabilitza el número de mostres que s'han extret del medi al llarg de la reacció i es calcula el volum restant.
- Al vial que conté el medi de reacció amb l'enzim, s'addiciona un determinat número de volums d'etanol i es sonica per afavorir l'extracció del pentapèptid.
- Es filtra l'enzim.
- S'extreu una mostra d'un determinat volum (en funció del volum amb que s'ha realitzat el rentat), es dilueix amb eluent d'HPLC i s'analitza.

4.3.4 Mètodes d'anàlisi

4.3.4.1 Anàlisi per HPLC

El seguiment de la desaparició de substrats i l'aparició de productes al llarg de les reaccions enzimàtiques estudiades en aquest treball, es va dur a terme utilitzant com a tècnica analítica la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), en fase reversa i detecció ultraviolada amb el cromatògraf Waters esmentat anteriorment a l'apartat 4.2.2.1.

Per la columna es feien passar dos eluents –A i B– la composició dels quals es detalla tot seguit:

- Eluent A: aigua + 0.1% (v/v) d'àcid trifluoracètic + 70 µl de trietilamina/litre.
- Eluent B: 80% (v/v) d'acetonitril + 20% (v/v) d'aigua + 0.086% d'àcid trifluoracètic + 70 µl de trietilamina/litre.

La proporció dels dos eluents al llarg del temps de l'anàlisi de la mostra, és un paràmetre molt important a determinar per tal de que la separació dels pics es

produeixi correctament. El gradient d'eluent que es va utilitzar habitualment és el que es detalla a continuació a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

<i>Temps (min)</i>	<i>Eluent A (%)</i>	<i>Eluent B (%)</i>
0	60	40
24	20	80
26	10	90
27	60	40
31	60	40

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Gradient d'eluent emprat habitualment en les anàlisis per HPLC.

No obstant, donat el gran nombre de compostos utilitzats, en alguns casos va ser imprescindible utilitzar un gradient diferent. Aquests gradients s'especifiquen en concret en l'apartat on es descriu la síntesi del compost en qüestió.

Condicions generals d'anàlisi

- Flux: 1 ml/min.
- Volum d'injecció: 20 µl.
- Longitud d'ona: 254,5 nm (quan es volia conèixer la puresa dels productes, l'anàlisi es feia a 215 nm).
- Fase mòbil: eluent A i B, variant el percentatge de cada un en el temps, en funció del gradient emprat.

Preparació de les mostres

La preparació de les mostres abans d'ésser analitzades per HPLC es realitzava de la següent manera, excepte quan s'indiqui el contrari: es prenen 25 µl de mostra, s'addicionava 10 µl d'àcid acètic per aturar la reacció i es diluïa en 965 µl d'eluent d'HPLC.

4.3.4.2 Anàlisi per espectrometria de masses

Les anàlisis per espectrometria de masses van ser realitzades en el Servei d'espectrometria de masses de la Universitat de Barcelona.

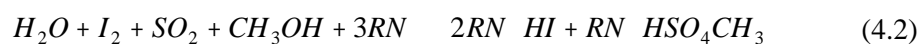
ES-MS: (a) interfase, electrosprai, nitrogen nebulitzador 10 l/h, nitrogen per l'assecat 450 l/h, font de temperatura 80°C amb un voltatge del capil·lar de 3.5 kV i voltatge d'enfocament de 55 V; (b) sistema de bombeig: Phoenix 20 (Carlo Erba, Milan), eluent aigua/acetoneitril (1:1) amb 1% d'àcid fòrmic, cabal d'injecció 7 µl/min. Les anàlisis eren emmagatzemades en un sistema VG-Quattro de Fisons Instruments (Altrincham, UK).

4.3.5 Anàlisi del contingut d'aigua i fixació de l'activitat d'aigua (a_w)

4.3.5.1 Anàlisi del contingut d'aigua

La mesura del contingut d'aigua del medi de reacció es realitzava en un mesurador d'humitat Karl-Fischer. En aquest sistema, l'aigua reacciona amb iode i diòxid de sofre, en presència d'una substància bàsica i metanol.

En la tècnica coulombimètrica, que és la que s'ha emprat en el present treball, el iode és generat electrolíticament dins de l'anòlit, que conté ions de iode. A mesura que el iode es consumeix, d'acord amb l'equació (4.2), l'altre elèctrode de platí detecta el consum de iode desencadenant l'electròlisi per a produir iode d'acord amb l'equació (4.3).



D'acord amb la llei de Faraday, la quantitat de iode generat, és proporcional al corrent generat. En l'equació (4.2), el iode (I_2) i l'aigua reaccionen en una proporció 1:1. Per tant, un mol d'aigua (18 g) equival a 2×96500 Coulombs, o 10.71 Coulombs/mg d'aigua. Això implica que la quantitat total d'humitat pot determinar-se mesurant el corrent total requerit per a l'electròlisi.

Per tal de mesurar la humitat de mostres líquides el procediment general que es seguia és el següent:

- Es pren una mostra (d'un volum que es trobi entre els marges que permet l'aparell) amb una xeringa i es pesa.
- S'introdueix la mostra en el recipient on tenen lloc les reaccions, segons 4.2. i 4.3.
- Es torna a pesar la xeringa.

- S'introdueixen els pesos de la xeringa (amb i sense mostra) de manera que l'aparell calcula el percentatge d'humitat de la mostra en pes.

La mesura del contingut d'humitat d'una mostra sòlida –per exemple una preparació enzimàtica immobilitzada– es realitzava utilitzant l'accessori ADP-351. A tal efecte es diposita la mostra sòlida en un forn (que es troba a una determinada temperatura en funció del material que s'analitza). Com a conseqüència de la calor, la humitat s'evapora i amb un corrent de N_2 s'arrossega aquest vapor fins al recipient on tenen lloc les reaccions de les equacions 4.2. i 4.3.

4.3.5.2 Mètode per fixar l'activitat de l'aigua (a_w)

4.3.5.2.1 Fixació de l' a_w de la preparació immobilitzada

Per tal de fixar l' a_w de les preparacions immobilitzades emprant -QT com a biocatalitzador s'utilitzaven solucions saturades de sals, en concret LiCl ($a_w=0.113$). A continuació es detalla el procediment que es seguia:

A una solució saturada de LiCl, se li addiciona un vial que conté 1 g de preparació immobilitzada (-QT immobilitzada per adsorció sobre Celite o poliamida) i es deixa equilibrant-se a 25°C durant quatre dies (vegi's Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.). Aquest període s'ha determinat estudiant el temps necessari per a que el contingut d'aigua de la preparació immobilitzada amb el sistema experimental emprat, assoleixi l'equilibri. Passat aquest temps la preparació d'enzim immobilitzat ja es pot utilitzar.



Figura ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Fotografia on es pot observar una preparació enzimàtica immobilitzada, equilibrant-se a una $a_w=0.113$, utilitzant una solució saturada de LiCl.

Respecte a les preparacions immobilitzades amb papaïna, no es va poder seguir aquest mètode, donada la pròpia naturalesa de l'enzim, ja que el fet de deixar la preparació en un vial obert i per tant en contacte amb l'oxigen durant tant temps, condueix a l'oxidació dels ponts disulfur de l'enzim. En aquests casos doncs, únicament es va intentar que el procés d'immobilització i assecament de la preparació fos el més reproduïble possible –immobilitzant la mateixa quantitat d'enzim, assecant la preparació en el mateix aparell i el mateix número d'hores– per tal que el contingut final d'aigua de la preparació immobilitzada fos molt similar i en tots els casos força baix.

4.3.5.2.2 Fixació de l' a_w del medi de reacció

Treballant a escala analítica s'addicionava en el medi de reacció el volum de tampó necessari per assolir una a_w de 0.113. En el cas de l'acetat d'etil aquesta quantitat (0.2% (v/v)) va ser calculada experimentalment. En canvi pel que fa a l'acetonitril, la quantitat corresponent (0.5% (v/v)), es va avaluar utilitzant un model termodinàmic mitjançant el mètode de contribució de grups, UNIFAC.

En els experiments realitzats a escala preparativa es va detectar que es produïa un cert increment en el contingut d'aigua al llarg del procés de preparació del medi de

reacció i en el transvasament al reactor, per aquest motiu es va determinar mesurar el contingut d'aigua del medi un cop dins el reactor i addicionar només el contingut de tampó restant per assolir el contingut d'aigua final.

4.3.6 Mètodes de purificació

4.3.6.1 Extraccions líquid-líquid

La metodologia general que es seguia al llarg del treball per realitzar les extraccions líquid-líquid és la següent:

- Dissoldre el sòlid que conté els compostos a separar en un determinat volum d'acetat d'etil i transvasar la solució a un embut d'extracció.
- Addicionar un volum equivalent d'una solució d'àcid cítric al 5% (p/v) i fer una extracció.
- Separar les dues fases.
- Addicionar a la fase orgànica un volum equivalent d'una solució aquosa saturada de NaCl i agitar.
- Separar les dues fases.
- Addicionar a la fase orgànica un volum equivalent d'una solució saturada de bicarbonat sòdic al 5% (p/v) i fer una extracció.
- Separar les dues fases.
- Addicionar a la fase orgànica un volum equivalent d'una solució aquosa saturada de NaCl i agitar.
- Separar les dues fases.
- Addicionar sulfat sòdic anhidre a la fase orgànica.
- Filtrar.
- Evaporar el dissolvent amb un rotavapor.
- Assecar el producte al buit o liofilitzar.

4.3.6.2 Precipitacions

En el present treball els productes que es van separar per precipitació van ser el tripèptid (PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl) i l'octapèptid (PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂). A continuació es detalla el procediment seguit per a cada un d'ells.

4.3.6.2.1 Precipitació de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl

Es prepara un equip de filtració (Millipore), utilitzant un filtre de 0.45 µm per dissolvents orgànics.

Es dissol el sòlid (tripèptid + altres compostos) amb la mínima quantitat possible d'acetat d'etil. S'addiciona hexà a la solució anterior de manera que es produeix una gelificació i es transfereix ràpidament aquest gel al filtre.

Es connecta el sistema al buit per facilitar la filtració dels dissolvents i per assecar el sòlid que queda en el filtre (tripèptid). Extraient una mostra del filtrat es comprova que conté els subproductes no desitjats i tripèptid –aquest últim amb una proporció molt inferior respecte a l'inici de la purificació–. Així es pot repetir el mateix procés diverses vegades per tal de recuperar més tripèptid i augmentar el rendiment de la purificació, tenint present però, que en cada etapa disminueix la puresa del producte que s'obté.

4.3.6.2.2 Precipitació de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

L'octapèptid + altres compostos es troben parcialment solubilitzats en metanol ja que s'observa una terbolesa blanca. Havent filtrat aquesta suspensió s'obté un sòlid que correspon majoritàriament a l'octapèptid.

4.4 Condicions específiques per a les diferents reaccions enzimàtiques

Per a facilitar el pas entre aquest apartat (4.4) i el capítol de resultats i discussió (5), ambdós coincideixen en la seva estructura (títol i numeració). Així, sempre que ha estat possible els apartats del capítol de resultats i discussió (fins a 4rt nivell) tenen el seu equivalent en el present apartat. D'aquesta manera a (4.4.n) li correspon (5.n) (per exemple §5.2.3.1 es correspon amb §4.4.2.3.1).

4.4.1 N-Protecció/desprotecció de derivats d'aminoàcids i pèptids amb PGA immobilitzada

4.4.1.1 N-protecció d'aminoàcids

La introducció enzimàtica de grups protectors a diferents derivats d'aminoàcids es va realitzar tant a nivell analític com a escala preparativa. Aquestes reaccions es duen

a terme en sistemes bifàsics o en sistemes monofàsics en vials de vidre segellats, posats en un bany agitat que es movia a 150 rpm., i a una temperatura de 25°C. Com a catalitzador es va utilitzar la penicil·lina G acilasa (PGA) d'*E. coli* immobilitzada en gels d'agarosa per enllaç covalent multipuntual.

4.4.1.1.1 N-protecció d'esters d'aminoàcids amb el grup fenilacetil en sistemes bifàsics, amb control termodinàmic

El sistema bifàsic utilitzat en tots els experiments consistia en una mescla tampó citrat 200 mM/acetat d'etil, en una relació 1:1, excepte en el cas de H-Gly-OMe que era 1:4.

El medi de reacció es preparava de la següent manera: a la barreja de substrats s'afegeix el tampó citrat 200 mM (saturat amb acetat d'etil) i s'ajusta el pH amb NaOH, seguidament s'enrasa amb el tampó fins al volum desitjat i s'afegeix l'acetat d'etil (saturat amb tampó citrat 200 mM). Es barregen vigorosament les dues fases amb agitació magnètica i llavors es torna a ajustar el pH. Es treu una mostra inicial i les reaccions comencen quan s'afegeix la PGA immobilitzada.

El curs de les reaccions enzimàtiques es seguia per HPLC. Les mostres s'extreien com es detalla a continuació: un cop es treu el vial del bany, es deixa reposar el medi per tal de que es separin bé les dues fases. Llavors es pren mostra d'ambdues fases (25 µl de cadascuna). Seguidament es dilueixen en 475 µl d'eluent d'HPLC i passen a ser analitzades.

4.4.1.1.2 N-protecció d'esters d'aminoàcids amb el grup fenilacetil en sistemes monofàsics, amb control cinètic

Quan es treballava en sistemes monofàsics el medi de reacció es preparava afegint a la barreja de substrats la mescla dissolvent/tampó bicarbonat 80 mM en les proporcions adequades. Després s'ajustava el pH i es treia la mostra inicial. Finalment la reacció començava quan s'afegia la PGA immobilitzada.

El curs de les reaccions enzimàtiques es seguia per HPLC. Es prenen mostres de 25 µl que es dissolien en 475 µl d'eluent d'HPLC i seguidament passaven a ser analitzades.

4.4.1.1.3 N-protecció de H-Gly-OBzl amb el grup mandelil

La N-protecció de H-Gly-OBzl amb el grup Mand es va realitzar en sistemes bifàsics sota control termodinàmic de la reacció tal i com s'ha detallat a §4.4.1.1.1 amb el grup protector PhAc.

Seguidament a la Taula **Error!Argumento de modificador desconocido.** es detallen les concentracions de substrats, el volum de reacció, les unitats internacionals de PGA addicionades i l'estratègia de síntesi emprada per les reaccions de N-protecció de derivats d'aminoàcids amb els grups PhAc i Mand a nivell analític.

<i>Producte</i>	<i>Estratègia</i>	<i>D.A. (mM)</i>	<i>Nu (mM)</i>	<i>Volum (ml)</i>	<i>PGA (UI)</i>
PhAc-Met-OMe	CT	75	75	10	50
PhAc-Gly-OMe	CT	120	120	20	125
Mand-Gly-OBzl	CT	30	30	10	582
PhAc-Asp-OMe	CT	25	25	10	137
	CC	30	30-160	10	30-160
PhAc-Asp-OBzl	CT	25	25	10	137
	CC	30	70	10	200
PhAc-Asp(OBu ^t)-OMe	CT	25	25	10	205
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	CT	25	25	10	86
PhAc-Asp(OMe)-OMe	CT	25	25	10	86

CT: Control termodinàmic, en sistema bifàsic: tampó (citrat 200 mM)/AE (1/1 (v/v)), excepte en el cas de H-Gly-OMe que era una relació 1/4.

CC: Control cinètic, en sistema monofàsic.

DA (donador d'acil): en CT es fa servir l'àcid del corresponent grup protector (Àcid fenilacètic, mandèlic) i en CC l'ester carboxiterminal del corresponent àcid.

Nu (nucleòfil): es fa servir l'ester carboxiterminal de l'aminoàcid amino lliure (H-Gly-OR, H-Met-OR, H-Asp(OR₁)OR₂).

*Taula **Error!Argumento de modificador desconocido.**: Condicions específiques per a les reaccions de N-protecció amb els grups PhAc i Mand, a escala analítica.*

4.4.1.1.4 Síntesi preparativa de derivats d'aminoàcids N-protegits

A la Taula **Error!Argumento de modificador desconocido.** es mostren les condicions específiques per a les reaccions de N-protecció de derivats d'aminoàcids amb els grups PhAc i Mand a nivell preparatiu.

<i>Producte</i>	<i>Estratègia</i>	<i>D.A. (mM)</i>	<i>Nu (mM)</i>	<i>Volum (ml)</i>	<i>PGA (UI)</i>
PhAc-Gly-OMe	CT	120	120	225	1130

<i>Producte</i>	<i>Estratègia</i>	<i>D.A. (mM)</i>	<i>Nu (mM)</i>	<i>Volum (ml)</i>	<i>PGA (UI)</i>
PhAc-Gly-OBzl	CT	100	100	60	1358
Mand-Gly-OBzl	CT	200	200	50	2121
PhAc-Asp-OBzl	CC	60	240	60	1306
PhAc-Asp(OBu ¹)-OMe	CT	50	50	50	912
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	CT	100	100	50	708
PhAc-Asp(OMe)-OMe	CT	100	100	50	708

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques per a les reaccions de N-protecció amb els grups PhAc i Mand, a escala preparativa. Les abreviatures i condicions són les mateixes que es recullen al peu de la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

En la síntesi preparativa després de que la reacció s'acabés i d'extreure la PGA immobilitzada filtrant, el medi de reacció era tractat tal i com segueix.

- En els sistemes bifàsics, la fase orgànica es renta successivament amb àcid cítric 5% (p/v) (3x50 ml), 10% NaHCO₃ (p/v) (3x50 ml) i NaCl saturat (1x50 ml). Seguidament, després de fer els rentats, s'asseca la fase orgànica amb sulfat sòdic anhidre (Na₂SO₄). Després es filtra i per evaporació al buit del dissolvent s'obté un sòlid. Finalment el producte obtingut es posa en un assecador connectat al buit.
- En els sistemes monofàsics, el dissolvent s'evapora fins a sequedat. El residu s'acidifica amb una solució d'àcid cítric (5% p/v) i s'extreu amb acetat d'etil. La fase orgànica llavors es renta successivament amb àcid cítric (5% p/v) (3x 100 ml), tampó fosfat sòdic 0.1 M pH 6.5 i NaCl saturat (3x 100 ml). La fase orgànica s'asseca amb sulfat sòdic anhidre (Na₂SO₄), després es filtra i es concentra fins a sequedat en el rotavapor. Finalment el producte obtingut es posa a assecar al buit.

A la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es presenten específicament els gradients d'anàlisi per HPLC utilitzats per a cada producte.

<i>Producte</i>	<i>Gradient HPLC</i>
PhAc-Met-OMe	30% B a 75% B en 13 min
PhAc-Gly-OMe	30% B a 50% B en 10 min
PhAc-Gly-OBzl	30% B a 75% B en 13 min

Mand-Gly-OBzl	40% B a 80% B en 24 min
PhAc-Asp-OMe	50% B a 70% B en 10 min
PhAc-Asp-OBzl	50% B a 70% B en 10 min
PhAc-Asp(OBu ^t)-OMe	50% B a 70% B en 10 min
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	50% B a 70% B en 10 min
PhAc-Asp(OMe)-OMe	50% B a 70% B en 10 min

Taula Argumento de modificador desconocido.: Gradients d'anàlisi específics pels diferents productes.

4.4.1.2 Reaccions de síntesi de R-Gly-Trp-OBzl (R: PhAc, Mand, Boc o Z)

La síntesi enzimàtica del dipèptid: R-Gly-Trp-OBzl (on R: Mand, PhAc, Boc o Z) es duia a terme addicionant al vial de reacció el donador d'acil corresponent (R₁-Gly-OR₂ on R₁: PhAc, Mand, Boc o Z i R₂: Cam, Bzl, o Me) i el nucleòfil (H-Trp-OBzl) en una relació molar 2:1. Inicialment però, es van realitzar unes proves de síntesi amb unes relacions donador d'acil/nucleòfil: 1/2 (20/40), 1/1 (20/20) i 2/1 (40/20) mM. Aquests substrats es dissolien en acetat d'etil o acetonitril (2 o 4 ml) amb diferents continguts de tampó bòric-borax 100 mM, pH 8.2 i 0.75% (v/v) de -mercaptoetanol. Les reaccions es començaven afegint 0.1 g o 0.25 g d'enzim immobilitzat (papaïna dipositada sobre Celite o poliamida; 100 mg papaïna/g de suport (excepte en l'estudi de la càrrega enzimàtica que era: 10, 15, 30, 60 o 100 mg de papaïna/g de Celite).

4.4.1.3 Desprotecció del pentapèptid

La desprotecció del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (on R: PhAc, Mand), a escala analítica, es va realitzar enzimàticament amb penicil·lina G acilasa immobilitzada per enllaç covalent multipuntual a gels d'agarosa, d'acord amb la següent metodologia:

Al vial de reacció s'hi addiciona una determinada concentració de pentapèptid i 2 ml de mescla dissolvent/tampó. Després de sonicar la mescla per homogeneïtzar-la s'afegeixen 123.76 UI de penicil·lina G acilasa, i es col·loquen els vials en un bany agitat a 150 r.p.m.. Es prenen mostres de 25 µl que es dissolen en 475 µl d'eluent d'HPLC i passen a ser analitzades.

A la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido. es mostren les condicions específiques dels diferents experiments de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂.

La desprotecció del Mand-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ es va realitzar a partir d'una concentració inicial de pentapèptid 5.1mM en ACN/tampó fosfat 20/80% (v/v). La temperatura de reacció era de 30°C.

<i>Estudi</i>	<i>Medi</i>	<i>[Pentapèptid]</i> (mM)	<i>pH</i>	<i>T (°C)</i>
pH	ACN/Tampó 20/80	5.1	6.5	30
	ACN/Tampó 20/80	5.1	8	30
	ACN/Tampó 20/80	5.1	9	30
Relació Diss./Tampó (%, v/v)	ACN/Tampó 10/90	5.1	8	30
	ACN/Tampó 20/80	5.1	8	30
	ACN/Tampó 25/75	5.1	8	30
	ACN/Tampó 30/70	5.1	8	30
[Pentapèptid]	ACN/Tampó 20/80	2.0	8	30
	ACN/Tampó 20/80	3.5	8	30
	ACN/Tampó 20/80	5.1	8	30
	ACN/Tampó 20/80	7.0	8	30
Temperatura	ACN/Tampó 20/80	3.5	8	4
	ACN/Tampó 20/80	3.5	8	30
	ACN/Tampó 20/80	3.5	8	40
Dissolvents	Acetat d'etil saturat *	5.1	8	30
	Acetat de metil saturat *	5.1	8	30
	Tampó fosfat	5.1	8	30
	Etanol/Tampó 20/80	5.1	8	30
	ACN/Tampó 20/80	5.1	8	30

*: Dissolvents saturats amb tampó fosfat pH 8, 100 mM.

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques dels diferents experiments de desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂.

4.4.2 Síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8

4.4.2.1 Estratègia (Asp+Tyr)+Met. Utilització de Fmoc com a grup N- α protector de l'àcid aspàrtic

1.1.1.1.1 Síntesi de Fmoc-Asp(OR₁)-Tyr-OR₂ (on R₁: H, Bu^t i R₂: Me, Bzl)

La síntesi enzimàtica del dipèptid Fmoc-Asp(OR₁)-Tyr-OR₂ (on R₁: H, Bu^t i R₂: Me, Bzl) es va dur a terme en sistemes de reacció sòlid-sòlid seguint la següent metodologia:

A escala analítica

La síntesi enzimàtica d'aquest dipèptid, es va realitzar en vials, a partir dels donadors d'acil Fmoc-Asp-OH o Fmoc-Asp(OBu^t)-OH i dels nucleòfils H-Tyr-OMe o H-Tyr-OBzl. La relació molar entre els substrats (DA/Nu) era: 1/1 (0.05 mmol) quan s'utilitzava Fmoc-Asp(OBu^t)-OH com a donador d'acil i 1/2 (0.05 mmol/0.1 mmol) quan es treballava amb Fmoc-Asp-OH. En tots els casos després de barrejar els substrats s'addicionava 100 μ l de tampó MOPS 50 mM, pH 7. Per a iniciar les reaccions s'afegia diferents quantitats de termolisina i es col·locaven els vials en un bany termostatitzat a diferents temperatures en funció de l'experiment, tal i com es detalla a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**

Degut a les pròpies característiques de baixa homogeneïtat dels sistemes de reacció sòlid-sòlid, cada mostra que s'extreia corresponia a un vial de reacció al qual se li addicionava 500 o 1000 μ l d'una mescla DMSO/metanol/àcid acètic (50/40/10 (v/v)) per parar la reacció i 1 ml d'eluent d'HPLC. Seguidament es prenen 10 o 40 μ l d'aquesta mescla que es barrejaven amb 990 o 960 μ l d'eluent respectivament i s'analitzaven per HPLC.

A escala preparativa

Es barrejaven els dos substrats (sòlids) en un morter de mà. Aquesta mescla es transvasava a un erlenmeyer, s'afegia el tampó i es sonicava per homogeneïtzar. A continuació s'addicionava l'enzim lliure i es tornava a sonicar. Aquest sistema reaccionant es posava en un bany termostatitzat a 40°C. A la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es detallen les condicions específiques en que es van realitzar les diferents reaccions a escala preparativa.

<i>Estudi</i>	<i>DA</i>	<i>Nu</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Enzim (mg)</i>
Temperatura	Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH	H-Tyr-OMe	25	20
			40	
	Fmoc-Asp-OH		25	
			40	
Quantitat d'enzim	Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH	H-Tyr-OMe	40	4
				6
				20
	Fmoc-Asp-OH			4
				6
				20
Sonicació	Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH (√)	H-Tyr-OMe	40	4
	Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH			
	Fmoc-Asp-OH (√)			
	Fmoc-Asp-OH			
Ester del nucleòfil	Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH	H-Tyr-OMe	40	4
		H-Tyr-OBzl		
	Fmoc-Asp-OH	H-Tyr-OMe		
		H-Tyr-OBzl		

√ : Experiments en els que s'aplica sonicació.

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques dels experiments de síntesi del dipèptid Fmoc-Asp(OR₁)-Tyr-OR₂ (on R₁: H, Bu^t i R₂: Me, Bzl), en sistemes de reacció sòlid-sòlid.

<i>Donador d'acil</i>		<i>Nucleòfil</i>		<i>Enzim (mg)</i>	<i>Tampó (ml)</i>
<i>Nom</i>	<i>pes (g)</i>	<i>Nom</i>	<i>pes (g)</i>		
Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH	1.98	H-Tyr-OMe	0.94	132	9.6
Fmoc-Asp-OH	2	H-Tyr-OMe	2.4	150	10
Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH	1	H-Tyr-OBzl	0.6	75	5
Fmoc-Asp-OH	1	H-Tyr-OBzl	1.4	75	5

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques dels experiments de síntesi del dipèptid Fmoc-Asp(OR₁)-Tyr-OR₂ (on R₁: H, Bu^t i R₂: Me, Bzl) a escala preparativa.

4.4.2.1.2 Síntesi de Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OEt (on R: H, Bu^t)

La síntesi enzimàtica del tripèptid Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OEt (on R: H, Bu^t) es va realitzar en vials, a partir dels donadors d'acil: Fmoc-Asp-Tyr-OMe, Fmoc-Asp(OBu^t)-Tyr-OMe, Fmoc-Asp(OBu^t)-Tyr-OBzl i Fmoc-Asp-Tyr-OH i del nucleòfil H-Met-OEt. Aquest enllaç peptídic es va dur a terme tant sota control cinètic com termodinàmic de la reacció i pel que fa als sistemes de reacció es van utilitzar medis orgànics amb baix contingut en aigua (volum de reacció 2ml) i sistemes sòlid-sòlid. A la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** es detallen les condicions de reacció dels experiments realitzats.

<i>Estratègia</i>	<i>DA</i>	<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Sistema reacció</i>	<i>Medi reacció</i>	<i>Enzim</i>	<i>Suport</i>
CC	A	0.05/0.125 (mmol)	Sòlid-Sòlid ^a	-	-QT (4 mg)	-
CC	A	20/50 (mM)	Orgànic amb baix contingut en aigua	ACN 0.5% T ^c	-QT (0.2 g)	Poliamida/Celite
				AE 0.2% T ^c		Poliamida
CC	B	20/30 (mM)	“	ACN 0.5% T ^c	-QT (0.2 g)	Poliamida
CC	C	20/30 (mM)	“	ACN 0.5% T ^c	-QT (0.2 g)	Poliamida
CT	D	20/50 (mM)	“	ACN 0.5% T ^d	Termolisina (0.2 g)	Celite R633
				ACN 4% T ^d		
CT	D	0.05/0.15 (mmol)	Sòlid-Sòlid ^b	-	Termolisina (8 mg)	-

A: Fmoc-Asp-Tyr-OMe

^a : S'addicionen 100 µl de tampó Tris-HCl, 50 mM, pH 9B: Fmoc-Asp(OBu^t)-Tyr-OMe^b : S'addicionen 100 µl de tampó MOPS, 50 mM, pH 7C: Fmoc-Asp(OBu^t)-Tyr-OBzl^c : tampó Tris-HCl, 50 mM, pH 9, (% en v/v)

D: Fmoc-Asp-Tyr-OH

^d : tampó MOPS, 50 mM, pH 7, (% en v/v)

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Condicions específiques dels diferents experiments de síntesi del tripèptid Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OEt (on R: H, Bu^t) en medis orgànics amb baix contingut en aigua o sistemes de reacció sòlid-sòlid.*

En els experiments realitzats en medis orgànics amb baix contingut en aigua la càrrega enzimàtica emprada era: 30 mg -QT/g poliamida, 8 mg -QT/g Celite o 30 mg termolisina/g Celite R633. Per seguir l'evolució d'aquestes reaccions, s'extreien

mostres de 50 µl, s'afegia 10 µl d'àcid acètic (per aturar les reaccions) i 950 µl d'eluent d'HPLC.

En les reaccions en sistemes sòlid-sòlid els vials es sonicaven de tant en tant. Per seguir el transcurs dels experiments es prenen mostres de la següent manera: s'extreia un vial de reacció del bany i s'addicionava 1 ml d'una mescla (DMSO/metanol/àcid acètic) (50/40/10% (v/v)) respectivament +1 ml d'eluent d'HPLC per aturar la reacció. Tot seguit es preparava un vial amb 40 µl d'aquesta mescla i 960 µl d'eluent, el qual s'analitzava per HPLC.

4.4.2.2 Estratègia (Asp+Tyr)+Met. Utilització de PhAc com a grup N-α protector de l'àcid aspàrtic

4.4.2.2.1 Síntesi de PhAc-Asp(OR₁)-Tyr-OR₂

Síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR)-Tyr-OMe (on R: H, Me, Bzl, Bu^t)

La síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR)-Tyr-OMe (on R: H, Bzl, Me, Bu^t) es va realitzar segons les condicions que es detallen a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.. El volum de reacció era de 2 ml. Per tal de mantenir una atmosfera reductora dins els vials s'afegia 0.75% (v/v) de -mercaptoetanol. Els experiments començaven quan s'addicionava 0.2 g de papaïna immobilitzada sobre Celite (càrrega 100 mg papaïna/g Celite).

<i>Donador d'acil</i>	<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Medi de reacció</i>
PhAc-Asp-OBzl	20/30	ACN + 0.5% T
PhAc-Asp(OBzl)-OBzl	20/30	ACN + 0.5% T
PhAc-Asp(OMe)-OMe	20/30	ACN + 0.5% T
PhAc-Asp(OBu ^t)-OMe	20/30	ACN + 0.5% T
PhAc-Asp(OBu ^t)-OCam	20/40	ACN + 0.5% T
PhAc-Asp(OBu ^t)-OCam	20/40	AE + 0.2% T

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques dels experiments de síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OR)-Tyr-OMe (on R: H, Bzl, Me, Bu^t). T: tampó bòric-borax, 100 mM, pH 8.2 (% en v/v).

Síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OBzl

La síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OBzl, es va realitzar enzimàticament a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-OCam i del nucleòfil H-Tyr-OBzl. Les diferents relacions molars de substrats (DA/Nu) que es van assajar són les següents:

- 20/30 mM.
- 20/10 mM.
- 40/20 mM.

Els substrats es dissolien en 2 ml d'acetat d'etil i s'addicionava un 0.2% (v/v) de tampó bòric-borax 100 mM, pH 8.2. Per tal de mantenir una atmosfera reductora a dins del vial s'afegia 15 µl de -mercaptoetanol, tot seguit s'addicionava 0.2 g de papaïna immobilitzada sobre Celite (càrrega: 100 mg papaïna/g Celite).

Síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl

La síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl es va realitzar, a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-OCam i del nucleòfil H-Tyr-OAl. Després de dissoldre els substrats en acetat d'etil, s'addicionava 0.2% (v/v) de tampó bòric-borax 100 mM, pH 8.2, i 0.75% (v/v) de -mercaptoetanol. Per a iniciar les reaccions s'afegia papaïna immobilitzada per deposició sobre Celite. Les condicions específiques dels diferents experiments que es van realitzar es detallen a continuació a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido..**

<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Volum reacció (ml)</i>	<i>Enzim (g)</i>	<i>Càrrega enzimàtica (mg/g)</i>
30/20	2	0.2	40
40/20	5	0.5	40
80/40	1	0.1	30

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Condicions específiques dels experiments de síntesi del dipèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl.*

4.4.2.2.2 Síntesi de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl**Síntesi de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OMe**

La síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OMe i del nucleòfil H-Met-OAl es va realitzar enzimàticament

segons les condicions que es detallen a la Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.** El volum de reacció era de 2 ml i s'addicionava 0.2 g de -QT immobilitzada sobre poliamida o Celite (16 mg -QT/g suport) per iniciar les reaccions.

<i>Relació DA/Nu</i>	<i>Medi reacció</i>	<i>Suport</i>
1.42 / 1 (60/42.26 mM)	AE + 0.2% T	Poliamida
0.95 / 1 (40/42.26 mM)	AE + 0.2% T	Poliamida
1 / 1.5 (40/60 mM)	AE + 0.2% T	Poliamida
0.95 / 1 (40/42.26 mM)*	AE + 0.2% T	Poliamida
1.42 / 1 (60/42.26 mM)	AE + 0.2% T	Poliamida
1.42 / 1 (60/42.26 mM)	AE + 0.2% T	Celite
1.42 / 1 (60/42.26 mM)	ACN + 0.5% T	Poliamida
1.42 / 1 (60/42.26 mM)	ACN + 0.5% T	Celite

*En aquest experiment es va addicionar 0.5% (v/v) de TEA.

*Taula **¡Error!Argumento de modificador desconocido.**: Condicions específiques pels experiments de síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl, a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OMe i del nucleòfil H-Met-OAl. T: tampó Tris-HCl, 50 mM, pH 9 (% en v/v).*

Síntesi de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl

La síntesi del tripèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl i del nucleòfil H-Met-OAl es va realitzar enzimàticament, estudiant les següents relacions molars entre els substrats (DA/Nu):

- 1.5/ 1 (25.3 mM/16.9 mM).
- 1/ 1 (25.3 mM/25.3 mM).
- 1/ 2 (25.3 mM/50.6 mM).
- 1/ 4 (25.3 mM/101.2 mM).
- 1/ 6 (25.3 mM/151.8 mM).
- 1/ 10 (25.3 mM/253 mM).

Aquests reactius es dissolien amb 1 ml d'acetat d'etil, i s'addicionava un contingut de tampó Tris-HCl 50 mM, pH 9 de 0.2% (v/v). Per iniciar la reacció, s'afegien 0.2 g

de -QT immobilitzada sobre poliamida per deposició (càrrega enzimàtica 16 mg - QT/g de poliamida).

Aquesta reacció també es va dur a terme a partir d'una relació donador d'acil/nucleòfil 1/4 (25.3/101.2 mM) dels mateixos substrats dissolts en 1 ml d'acetat d'etil (0.2% (v/v) tampó bòric-borax 50 mM, pH 8.2 i 0.75% (v/v) de -mercaptoetanol) utilitzant papaïna (0.2 g) immobilitzada sobre Celite (càrrega 30 mg/g Celite).

4.4.2.3 Estratègia Asp+(Tyr+Met)

4.4.2.3.1 Síntesi de Boc-Tyr-Met-OAl

La síntesi enzimàtica del dipèptid Boc-Tyr-Met-OAl es va dur a terme en una ampolla de vidre de 250 ml de volum, on es va addicionar el donador d'acil Boc-Tyr-OCam (2.27 g, 67 mM) i el nucleòfil H-Met-OAl (1.89 g, 100 mM). Aquests substrats es van dissoldre amb 100 ml d'acetonitril i es va addicionar un contingut tant de tampó Tris-HCl 50 mM, pH 9, com de TEA de 0.5% (v/v). Per a començar la reacció es va afegir 2.5 g de -QT immobilitzada per deposició sobre poliamida (16 mg - QT/g poliamida).

La desprotecció del grup Boc del dipèptid Boc-Tyr-Met-OAl es va realitzar químicament, d'acord amb les següents condicions de reacció: 30% (v/v) de TFA en diclorometà, utilitzant tioanisol com a segrestador. Temps de reacció: 30 minuts.

El procediment seguit per purificar el dipèptid desprotegit va ser el següent: un cop desprotegit el dipèptid, s'evapora el diclorometà. El sòlid que s'obté es dissol en acetat d'etil. A continuació es realitzen extraccions bàsiques amb una solució de bicarbonat (5% (p/v)) i un rentat amb una solució aquosa saturada de NaCl. La fase orgànica s'asseca amb sulfat sòdic anhidre, passats 20 minuts es filtra i posteriorment s'evapora el dissolvent. Finalment el sòlid que s'obté s'asseca al buit.

4.4.2.3.2 Síntesi de R₁-Asp(OR₂)-Tyr-Met-OAl (on R₁: Fmoc, PhAc i R₂: H, Bu^t)

Síntesi de Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OAl (on R: H, Bu^t)

La síntesi del tripèptid Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OAl (on R: H, Bu^t) es va realitzar a partir dels donadors d'acil Fmoc-Asp(OR)-OH (on R: H, Bu^t) i del nucleòfil H-Tyr-Met-OAl. Aquests substrats es dissolien en 2 ml d'acetonitril amb diferents continguts de tampó MOPS 50 mM, pH 7. En tots els casos s'addicionava 0.2 g de termolisina

immobilitzada sobre Celite R633 per iniciar les reaccions (30 mg termolisina/g Celite R633). Per seguir el transcurs dels experiments s'extreien mostres de 50 µl, s'addicionaven 10 µl d'àcid acètic per aturar la reacció i 950 µl d'eluent d'HPLC. Les condicions dels diferents experiments es detallen a continuació a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

<i>Donador d'acil</i>	<i>Medi</i>	<i>Relació DA/Nu</i>
Fmoc-Asp-OH	ACN + 4% T	20/50
	ACN + 10% T	20/50
		40/100
Fmoc-Asp(OBu ^t)-OH	ACN + 4% T	20/30
	ACN + 10% T	20/30
		40/60

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques dels experiments de síntesi del tripèptid Fmoc-Asp(OR)-Tyr-Met-OAl (on R: H, Bu^t). T: tampó MOPS, 50 mM, pH 7 (% en v/v).

Síntesi de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl

La síntesi enzimàtica del tripèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl –seguint l'estratègia Asp+(Tyr+Met)– es va realitzar a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-OCam (20 mM) i del nucleòfil H-Tyr-Met-OAl (60 mM). Aquests substrats es van dissoldre en 2 ml d'acetonitril, i a aquesta mescla es va addicionar un 0.5% (v/v) de tampó bòric-borax, 100 mM, pH 8.2, 16.6 µl de TEA i 15 µl de -mercaptoetanol per mantenir una atmosfera reductora a dins del vial. Per iniciar la reacció es van addicionar 0.2 g de papaïna immobilitzada sobre Celite per deposició (càrrega 100 mg de papaïna/g Celite).

4.4.3 Estudi de les condicions de síntesi de la CCK-8

4.4.3.1 Síntesi enzimàtica de l'octapèptid

Les reaccions de síntesi de l'octapèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂, es realitzaven enzimàticament utilitzant com a donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl (24.08 mM) i com a nucleòfil H-Gly-Trp-Met-

Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (9.86 mM). A aquests substrats se'ls addicionava 1 ml de dissolvent (acetonitril, acetat d'etil, acetat de metil, acetona, tetrahidofurà, tert-butilmetilèter, 2-propanol o DMSO) i en cada cas s'afegia el contingut de tampó Tris-HCl 50 mM, pH 9, que correspon a una a_w de 0.1 i 0.5% (v/v) de TEA. Per iniciar les reaccions s'addicionava 0.1 g de -QT immobilitzada sobre poliamida (30 mg de -QT/g de poliamida). S'extreien mostres de 15 µl, s'addicionaven 10 µl d'àcid acètic per aturar la reacció, seguidament es diluïen amb 475 µl d'eluent d'HPLC i passaven a ser analitzades.

A la Taula **Argumento de modificador desconocido.** s'indica quin és aproximadament el percentatge de tampó –calculat pel mètode UNIFAC– que correspon a aquesta activitat d'aigua pels diferents dissolvents estudiats.

<i>Dissolvent</i>	<i>Tampó (%)</i>
Acetonitril	0.50
Acetat d'etil	0.20
Acetat de metil	0.33
Acetona	0.43
Tetrahidrofurà	0.50
Dimetilsulfòxid	0.50
2-propanol	0.90
Tert-butil metilèter	0.50

*Taula **Argumento de modificador desconocido.**: Percentatge de tampó que correspon a una a_w de 0.1 pels dissolvents emprats en la síntesi de l'octapèptid PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂.*

4.4.4 Procés de síntesi de la CCK-8

4.4.4.1 Procés de síntesi del pentapèptid C-terminal de la CCK-8 (4-8)

4.4.4.1.1 Síntesi de R₁-Gly-Trp-Met-OR₂ (on R₁: Mand, PhAc i R₂: Et, Al) a escala analítica

La síntesi del tripèptid R₁-Gly-Trp-Met-OR₂ (on R₁: Mand, PhAc i R₂: Et, Al), a escala analítica es realitzava enzimàticament, a partir d'1 ml de medi de reacció (de

síntesi del dipèptid Mand-Gly-Trp-OBzl o PhAc-Gly-Trp-OBzl (§4.4.1.2) prèvia filtració de l'enzim). A aquestes solucions s'hi addicionava el nucleòfil H-Met-OEt o H-Met-OAl i 0.1 g de -QT immobilitzada (16 mg -QT/g suport). Els diferents experiments realitzats es detallen a la Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido..

Grup protector	Nucleòfil	Relació DA/Nu	Suport d'immobilització
Mand	H-Met-OEt	1/8	Poliamida
Mand	H-Met-OEt	1/8	Celite
Mand	H-Met-OEt	1/2	Poliamida
Mand	H-Met-OEt	1/4.5	Poliamida
Mand	H-Met-OEt	1/6	Poliamida
PhAc	H-Met-OEt	1/6	Poliamida
PhAc	H-Met-OEt	1/6	Celite
Mand	H-Met-OAl	1/6	Poliamida
PhAc	H-Met-OAl	1/6	Poliamida

Taula ¡Error!Argumento de modificador desconocido.: Condicions específiques dels experiments de síntesi del tripèptid R_1 -Gly-Trp-Met-OR₂ (on R_1 : PhAc, Mand i R_2 : Et, Al).

4.4.4.1.2 Síntesi de R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (on R: Mand, PhAc) a escala analítica

La síntesi enzimàtica del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (on R: Mand, PhAc) a escala analítica es duia a terme a partir del donador d'acil R-Gly-Trp-Met-OAl (on R: Mand, PhAc) i del nucleòfil H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ en una relació molar entre ells 1/1.5 o 1/3 (només quan R: PhAc). Els substrats es dissolien en 1 ml d'acetat d'etil (amb 0.2% (v/v) de tampó Tris-HCl, 50 mM, pH 9) i s'addicionava 0.5% (v/v) de TEA. Per iniciar les reaccions s'afegia 0.1 g de -QT immobilitzada sobre poliamida (30 mg -QT/g poliamida).

4.4.4.1.3 Síntesi de R-Gly-Trp-OBzl (on R: Mand, Boc, PhAc) a escala preparativa

La síntesi del dipèptid R-Gly-Trp-OBzl a escala preparativa (on R: Mand, Boc, PhAc), es va realitzar a partir dels donadors d'acil: Mand-Gly-OBzl (2.392 g, 80

mM), Boc-Gly-OCam (1.7136 g, 80 mM) o PhAc-Gly-OCam (2g, 80 mM) i del nucleòfil H-Trp-OBzl (1.774 g, 40 mM). Quan s'utilitzava el donador d'acil protegit amb el grup Mand o Boc, els substrats es dissolien en 100 ml d'acetat d'etil anhidre. Després de transvasar el medi al reactor, s'ajustava el contingut d'aigua a 0.2% (v/v) amb també Tris-HCl pH 9, 100 mM. D'altra banda, quan el donador d'acil era PhAc-Gly-OCam, els substrats es dissolien en 100 ml d'acetat d'etil saturat amb aigua. Per començar les reaccions en tots els casos s'addicionaven 5 g de papaïna immobilitzada sobre Celite (15 mg de papaïna/g de Celite). Per aturar les reaccions, es filtrava el medi aplicant una sobrepressió de nitrogen a dins del reactor i obrint la sortida inferior del mateix.

4.4.4.1.4 Síntesi de R-Gly-Trp-Met-OAl (on R: Mand, Boc, PhAc) a escala preparativa

Síntesi de R-Gly-Trp-Met-OAl (on R: Mand, Boc)

Es rentava l'enzim utilitzat en la reacció anterior en el mateix reactor amb 100 ml de metanol, per tal d'extreure el dipèptid que podia estar adsorbit. S'aplicava una sobrepressió de nitrogen i es filtrava el líquid del rentat. Aquest filtrat s'evaporava en un rotavapor i el residu que s'obtenia s'assecava al buit. Un cop sec s'ajuntava amb el medi de reacció filtrat anteriorment. A continuació s'addicionava el nucleòfil H-Met-OAl (relació donador d'acil/nucleòfil: 1/6) i 0.55% (v/v) de TEA. Després de sonicar, es transvasava aquest medi de reacció al reactor, comprovant que el contingut d'aigua fos l'adequat (en cas contrari calia evaporar i dissoldre en dissolvent nou). S'addicionaven 10 g de -QT immobilitzada sobre poliamida (càrrega 16 mg -QT/g poliamida) per començar la reacció.

Síntesi de PhAc-Gly-Trp-Met-OAl

Es rentava l'enzim utilitzat en la reacció de síntesi del dipèptid en el mateix reactor amb 100 ml d'acetat d'etil saturat amb aigua. Es filtrava el líquid del rentat aplicant una sobrepressió de nitrogen. El líquid que s'obtenia s'ajuntava amb el medi de reacció que s'havia filtrat anteriorment i s'evaporava en un rotavapor. El sòlid que s'obtenia s'assecava al buit i es resuspensava amb 100 ml d'acetat d'etil anhidre. A continuació s'addicionava el nucleòfil H-Met-OAl (relació donador d'acil/ nucleòfil: 1/6) i 0.55% (v/v) de TEA. Després de sonicar aquesta solució, es transvasava al reactor, es mesurava el contingut d'aigua i s'addicionava el volum de també Tris-HCl 400 mM, pH 9, necessari per assolir un 0.2% (v/v) d'aigua en el medi. Per iniciar la

reacció s'afegien 10 g de -QT immobilitzada sobre poliamida (16 mg -QT/g poliamida).

Un cop finalitzades les reaccions de síntesi del tripèptid R-Gly-Trp-Met-OAl (on R: Mand, PhAc), la separació del tripèptid dels altres compostos del medi de reacció es realitzava –aprofitant la baixa solubilitat del tripèptid en el medi– mitjançant diverses filtracions, utilitzant filtres de diferents mides de porus. Pel que fa al tripèptid Boc-Gly-Trp-Met-OAl, es filtrava el medi i es rentava l'enzim per extreure el producte adsorbit.

4.4.4.1.5 Síntesi de R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (on R: Mand, PhAc, Boc) a escala preparativa

La síntesi del pentapèptid R-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (on R: Mand, PhAc) es va realitzar a partir dels donadors d'acil Mand-Gly-Trp-Met-OAl o PhAc-Gly-Trp-Met-OAl i del nucleòfil H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ amb una relació donador d'acil/nucleòfil: 1/3. Els substrats es dissolien en 60 ml d'acetat d'etil anhidre, s'addicionava TEA (0.5% (v/v)), es sonicava la mescla per homogeneïtzar-la i es transvasava al reactor. S'ajustava el contingut d'aigua a 0.2% (v/v) amb també Tris-HCl, 400 mM, pH 9. Per començar les reaccions s'addicionaven 6 g de -QT immobilitzada sobre poliamida (30 mg -QT/g poliamida). Un cop finalitzades les reaccions, la separació del pentapèptid es realitzava mitjançant filtracions i extraccions líquides.

En la síntesi del pentapèptid Boc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ s'utilitzava una relació donador/nucleòfil 1/1.5. La resta de condicions de reacció eren iguals a les que s'han descrit amb els grup PhAc i Mand. La separació del pentapèptid es duia a terme mitjançant extraccions líquides.

4.4.4.1.6 Desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ a escala preparativa

La desprotecció del pentapèptid PhAc-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ a escala preparativa es va realitzar a partir d'una solució 3.5 mM de pentapèptid parcialment dissolt en etanol/tampó fosfat 100 mM, pH 8 (20/ 80% (v/v)). Per iniciar la reacció es va addicionar 15 g de PGA immobilitzada sobre gels d'agarosa i es va col·locar el vial en un bany a 30°C i 150 r.p.m.. Quan es va detectar que la reacció ja no avançava més, es va seguir el següent procediment:

- Rentar la preparació immobilitzada tal i com s'especifica a §4.3.3.4.
- Evaporar l'etanol.

- Resuspendre el sòlid amb acetat d'etil anhidre.
- Extraccions líquid-líquid per separar el pentapèptid desprotegit del protegit, tal i com es detalla a continuació:
 - Extracció amb àcid cítric 5% (p/v). Així s'obté:
 - Fase orgànica 1: pentapèptid protegit.
 - Fase aquosa 1: pentapèptid desprotegit.
 - La fase orgànica 1 es renta amb una solució aquosa saturada amb NaCl, s'asseca amb sulfat sòdic, es filtra i s'evapora el dissolvent. El sòlid que es forma correspon al pentapèptid que no s'ha desprotegit.
 - A la fase aquosa 1 s'addiciona NaOH 30% (p/v) (fins assolir un pH=8-9) i acetat d'etil. Es realitza una extracció, de manera que el pentapèptid desprotegit ara es troba a la fase orgànica 2.
 - La fase orgànica 2 es renta amb una solució aquosa saturada amb NaCl, s'asseca amb sulfat sòdic anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent. El sòlid que s'obté correspon al producte desprotegit.
- Pesar el pentapèptid que no s'ha desprotegit. Redissoldre amb una solució etanol/tampó fosfat 100 mM, pH 8 i addicionar PGA per iniciar la segona etapa de desprotecció del pentapèptid.

4.4.4.2 Procés de síntesi del tripèptid N-terminal de la CCK-8 (1-3)

4.4.4.2.1 Síntesi de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl

Aquesta síntesi es va realitzar enzimàticament en un reactor de vidre de 500 ml de capacitat, a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-OCam (80 mM) i del nucleòfil H-Tyr-OAl (40 mM) que es van dissoldre en 292 ml d'acetat d'etil. Després de mesurar el contingut d'aigua del medi de reacció, es va addicionar el volum de tampó bòric-borax 100 mM, pH 8.2, necessari per assolir un 0.2% (v/v) d'aigua en el medi. Per iniciar la reacció es va afegir 23.65 g de papaïna immobilitzada sobre Celite (30 mg de papaïna/g de Celite). Un cop finalitzada la síntesi es va seguir el següent procediment:

- Filtrar el medi de reacció en un filtre de placa porosa (mida de porus n°: 2^{*}) per separar el líquid de l'enzim.
- Rentar l'enzim amb acetat d'etil diverses vegades (fins que ja no s'extreu més dipèptid del sòlid). Filtrar els rentats amb filtres de placa porosa (mida de porus n°: 2 i 3^{*}).

- Evaporar el medi filtrat i els rentats de l'enzim.
- Purificar el dipèptid (per extreure l'excés de H-Tyr-OAl), mitjançant extraccions líquid-líquid, tal i com es detalla a l'apartat 4.3.6.1.
- Hidrolitzar l'ester carboxamidomètilic del PhAc-Asp(OBu^t)-OCam tal i com es detalla a l'apartat 4.3.1.4.

4.4.4.2 Síntesi de PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl

La síntesi d'aquest tripèptid es va dur a terme a partir del donador d'acil PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-OAl (26.9 mM) i del nucleòfil H-Met-OAl (107.6 mM). Aquests substrats es van dissoldre en 170 ml d'acetat d'etil anhidre i la mescla es va transvasar al reactor. A continuació es va mesurar el contingut d'aigua del medi i es va addicionar el volum de tampó bòric-borax 100 mM, pH 8.2 necessari per assolir un 0.2% (v/v) d'aigua en el medi. Per començar l'experiment es van afegir 14.23 g de papaïna immobilitzada sobre Celite (30 mg de papaïna/g de Celite).

Quan es va detectar que la reacció ja no avançava més, es va operar d'acord amb el següent procediment:

- Separar el medi de reacció de l'enzim, filtrant amb un filtre de placa porosa (mida de porus número 2).
- Rentar l'enzim amb acetat d'etil –fins que ja no s'extreu més producte– i filtrar.
- Concentrar els rentats evaporant part de l'acetat d'etil i ajuntar-ho amb el medi de reacció prèviament filtrat.
- Purificar el tripèptid per precipitació, tal i com es detalla a l'apartat 4.3.6.2.1. Donat que el filtrat que s'obté un cop acabada la segona etapa de purificació, conté bastant dipèptid, es decideix tornar a iniciar la reacció de síntesi del tripèptid. A tal efecte s'evaporen els dissolvents del filtrat (acetat d'etil + hexà). El residu que s'obté es dissol en acetat d'etil anhidre. A continuació s'addiciona el nucleòfil, el tampó i l'enzim per iniciar la reacció.

4.4.4.3 Síntesi de l'octapèptid a escala preparativa

La síntesi enzimàtica a escala preparativa de l'octapèptid: PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ es va realitzar en el reactor de 200 ml de capacitat, a partir d'una relació donador d'acil (PhAc-Asp(OBu^t)-Tyr-Met-OAl) /nucleòfil (H-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂): 2.44/1, treballant a unes concentracions 23.44 mM/9.6 mM respectivament. Els substrats es van dissoldre en 50 ml d'acetonitril i es va addicionar 0.5% (v/v) de TEA. Després de sonicar el medi de

* La mida de porus número 2 equival a 40-90µm. La mida número 3 equival a 20-40µm.

reacció es va transvasar al reactor i es va mesurar el contingut d'aigua. A continuació es va afegir el volum de tampó Tris-HCl pH 9 necessari per assolir un 0.5% (v/v) d'aigua i 5 g de -QT immobilitzada sobre poliamida (30 mg de -QT/g de poliamida).

Un cop finalitzada la reacció, el procediment que es va seguir va ser el següent:

- Addicionar 100 ml de metanol al reactor per ajudar a solubilitzar el producte i sonicar la mescla.
- Filtrar el medi de reacció amb un filtre de placa porosa (mida de porus n°:2).
- Rentar diverses vegades l'enzim amb metanol per acabar d'extreure el producte, utilitzant el mateix filtre.
- Ajuntar el medi de reacció filtrat amb els diversos rentats de l'enzim.
- Evaporar el dissolvent fins que es comença a detectar una terbolesa que es comprova que correspon a l'octapèptid.
- Separar l'octapèptid tal i com es detalla a §4.3.6.2.2.

4.4.4.4 Modificacions de l'octapèptid per obtenir la CCK-8

1.1.1.1.1 Eliminació dels esters tert-butílics de l'àcid aspàrtic

La desprotecció selectiva dels grups tert-butílics que protegeixen en posició els residus d'àcid aspàrtic de l'octapèptid es va realitzar químicament segons el següent procediment:

Es prepara una mescla amb els següents components:

- Àcid trifluoracètic (TFA) 84% (v/v).
- Etaditiol 20% (v/v).
- Anisol 50% (v/v).
- Diclorometà (DCM) 80% (v/v).
- Aigua 10% (v/v).

S'addicionen 10.89 ml de la mescla a 363 mg d'octapèptid N-protègit amb el grup PhAc. Un cop dissolta aquesta mescla, es deixa reaccionar durant 1 hora.

A continuació s'addiciona tert-butil-metilèter per fer precipitar el producte i seguidament es centrifuga. Després de retirar el sobrenadant es repeteix aquest procés tres vegades, tenint cura d'agitar el tub cada vegada que s'afegeix tert-butil-metilèter per tal de netejar bé el producte. Finalment el precipitat obtingut es dissol amb acetonitril i s'evapora al buit.

4.4.4.2 Sulfatació de la tirosina

Per sulfatar el grup hidroxil fenòlic de la tirosina de l'octapèptid PhAc-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, es va utilitzar com a reactiu acetil sulfat de piridina (PAS), el qual va ser preparat com es detalla a continuació:

Es barregen 28.4 ml d'anhídrid acètic amb 8.05 ml de piridina en un baló i es tapa. Aquesta mescla es refreda en un bany de neu carbònica/ etanol; un cop freda s'afegeix molt a poc a poc, àcid sulfúric concentrat (5.4 ml, 0.1 mmol) amb l'ajut d'un embut d'addició, al mateix temps que es va barrejant amb un agitador magnètic. Un cop acabada l'addició d'àcid, es deixa 10 minuts més agitant-se. Aquesta barreja es precipita amb 300 ml d'èter dietílic i es filtra. El sòlid que s'obté correspon al reactiu PAS i es renta tres vegades amb èter dietílic (300 ml de dissolvent per cada rentat). A continuació es deixa assecant-se al buit.

D'altra banda, abans de començar la reacció de sulfatació, es va liofilitzar l'octapèptid, per eliminar les impureses que podia contenir provinents de la reacció prèvia. Així, es va dissoldre 0.13 g d'octapèptid en 70 ml d'una solució acetonitril/aigua (50/50 (v/v)) i es va congelar amb neu carbònica. Tot seguit es va deixar liofilitzant-se durant 48 h, obtenint-se un sòlid blanc. A continuació es va dissoldre l'octapèptid amb 80 ml d'una solució acetonitril/ dimetilformamida (50/50 (v/v)) i per a iniciar la sulfatació es va addicionar 6.9 g de PAS. L'evolució de la reacció es va seguir extraient mostres de 100 µl d'aquesta mescla, que eren diluïdes amb 300 µl d'eluent abans de ser analitzades per HPLC. Finalment, un cop acabada la reacció, es van evaporar al buit els dissolvents.

4.4.5 Síntesi del dipèptid Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

La síntesi del dipèptid Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ es va realitzar enzimàticament per control termodinàmic de la reacció, a partir dels substrats Z-Asp(OBu^t)-OH (16.1 g, 49.8 mmols) i H-Phe-NH₂ (7.753 g, 47.2 mmols). Aquests substrats es van dissoldre en 210 ml d'acetonitril i es va addicionar un 4% (v/v) de tampó MOPS 50 mM, pH 7 (8.4 ml). Seguidament es van afegir 1.897 g de termolisina, immobilitzada per deposició sobre Celite (càrrega enzimàtica: 40 mg de termolisina/g de Celite). La reacció es va dur a terme en un reactor agitat de 500 ml de capacitat que estava submergit en un bany a una temperatura constant de 25°C. Un cop finalitzada la reacció, per tal d'obtenir el producte pur es va seguir el següent procediment:

- Donat que aquest producte precipita en el medi de reacció, s'addiciona metanol fins a solubilitzar-lo.

- Es separa l'enzim, filtrant amb un filtre de plecs.
- S'evapora el dissolvent del filtrat i s'obté un sòlid.
- El sòlid es resuspèn amb acetat d'etil per realitzar extraccions líquides tal i com es detalla a l'apartat 4.3.6.1, obtenint-se finalment un sòlid blanc que correspon al dipèptid Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂.

4.5 Condicions específiques per a les reaccions químiques

4.5.1 Desprotecció del grup Z del dipèptid Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

La desprotecció del grup Z del dipèptid Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ es va realitzar mitjançant hidrogenació catalítica en medi àcid, d'acord amb el següent procediment:

- Es dissolen 10.5 g de Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ en metanol, pel que són necessaris 2 litres de dissolvent i es transfereix la solució a un matràs de 3 litres que és on tindrà lloc la reacció.
- Es pesen 1.25 g de catalitzador pal·ladi/carboni i es suspenen en una petita quantitat de metanol-aigua al 50% (v/v), sense manipular amb l'espàtula de metall.
- Aquesta suspensió s'addiciona a la solució que conté el dipèptid i a continuació s'afegeix una quantitat estequiomètrica d'àcid acètic (600 µl).
- Es bombolleja nitrogen durant 15 minuts, per desgasificar completament el líquid. Tot seguit s'obre la vàlvula d'hidrogen per iniciar la reacció que té una duració d'1 hora.
- Passat aquest temps, es torna a passar nitrogen i es pren una mostra que s'analitza per HPLC per comprovar l'avanç de la reacció.
- Es filtra el contingut del matràs en un filtre de placa porosa, on prèviament s'hi ha preparat un llit de Celite (tapat amb paper de filtre i compactat amb metanol).
- Al filtrat se li addiciona 1.25 g de Na₂CO₃ per neutralitzar l'àcid acètic que no ha reaccionat.
- S'evapora el dissolvent del filtrat en un rotavapor, addicionant aigua a mesura que es va eliminant el metanol.

- Un cop evaporat el metanol, es comprova que el medi sigui bàsic (en cas contrari s'hi afegeix una solució de bicarbonat), s'addiciona acetat d'etil i s'extreu el producte cap a la fase orgànica. Després d'assecar l'aigua de la fase orgànica amb sulfat sòdic, s'evapora el dissolvent i s'obté un sòlid blanc que correspon al dipèptid desprotegit.

4.5.2 Síntesi química de PhAc-Asp(OBu^t)-OH

Per a la síntesi química del PhAc-Asp(OBu^t)-OH els substrats de partida van ser: H-Asp(OBu^t)-OH i PhAcCl (amb una relació molar Asp(OBu^t)-OH/PhAcCl: 1/1.1).

El procediment seguit en aquesta síntesi va ser el següent: es dissolen 2.57 g de H-Asp(OBu^t)-OH en 45 ml de dioxà/aigua (30/70 (v/v)), seguidament s'afegeix una quantitat estequiomètrica d'una solució de carbonat sòdic (Na₂CO₃) al 20% i s'homogeneïtza la solució. Es va addicionant lentament l'àcid fenilacètic (1.98 ml) –donat que aquest àcid fa baixar molt el pH del medi– al mateix temps que es va afegint gotes de la solució de carbonat sòdic per tal de mantenir el pH del medi entre 7 i 8. La barreja es deixa reaccionant durant 24 hores. Passat aquest temps s'evapora el dissolvent. Seguidament s'afegeix NaHCO₃ (2% p/v) i acetat d'etil (per extreure el PhAcCl) que hi hagi en excés. La fase aquosa obtinguda s'acidifica amb àcid cítric i s'extreu el producte cap a la fase orgànica amb acetat d'etil. Després es fa un rentat amb aigua saturada (NaCl). La fase orgànica s'asseca amb sulfat sòdic anhidre (NaSO₄), es filtra i seguidament s'evapora el dissolvent. Finalment el producte és cristal·litzat en hexà/acetat d'etil.