

ESTUDI DEL COST DE LA SÍNTESI DEL PÈPTID BP100

Estudiant: Lluna Varea Pérez

Correu electrònic: lluna.varea9@gmail.com

Grau en Química

Tutor: Eduard Bardají Rodríguez

Correu electrònic: eduard.bardaji@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 05/06/202

Abreviatures

SPPS	Síntesi de pèptids en fase sòlida
AMP's	Pèptids antimicrobians
AA	Aminoàcid
Leu	Leucina
Ala	Alanina
Gly	Glicina
Val	Valina
Lys	Lisina
Phe	Fenilalanina
Ile	Isoleucina
Tyr	Tirosina
Thr	Treonina
MBHA	4-Metilbenzhidrilamina
PEG	Polietilenglicol
Boc	tert-Butiloxicarbonil
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Alloc	Aliloxicarbonil
^t Bu	tert-Butil
Pd	Pal·ladi
TFA	Àcid trifluoroacètic
DMF	N,N-Dimetilformamida

DIC	N,N-Diisopropilcarbodiimida
Oxima	Cianohidroximinoacetat d'etil
DCM o CH ₂ Cl ₂	Diclorometà
pyr	Piridina
H ₂ O	Aigua
HF	Àcid fluorhídric
PD	Poliestirè
PS	poliestirè-divinilbenzè
Ac ₂ O	Anhídrid acètic
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
MALDI	Desorció/ionització làser assistida per matriu
TOF	Temps de vol
HCCA	Àcid alfa-cià-4-hidroxicinàmic
m/z	massa/càrrega
h	hora
min	minut

ÍNDEX

RESUM	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
REFLEXIONS SOBRE ÈTICA, SOSTENIBILITAT I PERSPECTIVA DE GÈNERE	viii
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Pèptids antimicrobians	1
1.2. Síntesi de pèptids en fase sòlida	1
- Aspectes generals de la síntesi de pèptids en fase sòlida	1
- Selecció de la resina i les seves propietats	4
- Test de ninhidrina i tractament amb anhídrid acètic	4
- Eliminació dels grups protectors.....	6
- Activació del grup carboxil dels aminoàcids.....	10
2. OBJECTIVES	10
3. METODOLOGIA	11
3.1. Síntesi del pèptid BP100	11
4. RESULTATS	13
5. DISCUSSIÓ	23
6. CONCLUSIONS	24
7. BIBLIOGRAFIA	26

RESUM

La química de pèptids va ser revolucionada gràcies a Robert Bruce Merrifield l'any 1963. La investigació d'aquest bioquímic es va centrar en l'obtenció de pèptids mitjançant la síntesi en fase sòlida (SPPS), aquest mètode destaca per la seva simplicitat i per la fàcil producció de pèptids i proteïnes. La SPPS és un mètode ràpid i prou senzill, tot i això, presenta diferents aspectes que són importants per a la síntesi, com ara la selecció de la resina, els dissolvents implicats, els diferents grups protectors, els reactius necessaris per activar el grup α -carboxil de l'aminoàcid, el test de ninhidrina, etc.

Per desenvolupar aquesta memòria s'ha fet una àmplia recerca bibliogràfica. Alguns dels temes més rellevants tractats en aquest treball han sigut: la descripció del pèptid BP100, la història i el desenvolupament de la síntesi de pèptids en fase sòlida, les etapes que cal seguir per aquesta i, finalment, la comptabilitat per la síntesi del pèptid BP100.

El pèptid estudiat és el BP100, KKLFFKILKYL-NH₂, el qual és un pèptid antimicrobià (AMPs). Aquests són proteïnes naturals que es troben presents en animals, plantes, insectes i bacteris, i s'encarreguen de la defensa de l'hoste contra possibles organismes patògens.

En aquest treball s'ha fet un estudi sobre la comptabilitat per dur a terme la síntesi del pèptid BP100 mitjançant una síntesi en fase sòlida. S'ha estudiat i controlat tots els paràmetres i ha calgut un seguiment constant a fi de saber les despeses que es produeixen. El procediment experimental s'ha dut a terme de tal manera que s'ha intentat minimitzar el màxim possible el cost. Altrament, s'ha observat i estudiat les diferents propietats i característiques de la resina enfront diferents dissolvents.

Finalment, s'ha analitzat i caracteritzat el pèptid mitjançant l'ús de les tècniques HPLC i MALDI-TOF, que ofereixen una quantificació, una anàlisi quantitativa i qualitativa i la identificació del pèptid sintetitzat. La utilització d'aquestes tècniques ha permès comprovar i demostrar que el pèptid obtingut s'ha sintetitzat correctament i amb èxit fent servir el mètode en fase sòlida.

RESUMEN

La química de péptidos fue revolucionada gracias a Robert Bruce Merrifield en 1963. La investigación de este bioquímico se centró en la obtención de péptidos mediante la síntesis en fase sólida (SPPS), este método destaca por su simplicidad y por la fácil producción de péptidos y proteínas. La SPPS es un método rápido y bastante sencillo, aun así, presenta diferentes aspectos que son importantes para la síntesis, como por ejemplo la selección de la resina, los disolventes que se utilizan, los diferentes grupos protectores, los reactivos necesarios para activar el grupo α -carboxilo del aminoácido, la prueba de ninhidrina, etc.

Para desarrollar esta memoria se ha hecho una amplia investigación bibliográfica. Algunos de los temas más relevantes tratados en este trabajo han sido: la descripción del péptido BP100, la historia y el desarrollo de la síntesis de péptidos en fase sólida, las etapas que hay que seguir por esta y, finalmente, la contabilidad por la síntesis del péptido BP100.

El péptido estudiado es el BP100, KKLFFKILKYL-NH₂, el cual se trata de un péptido antimicrobiano. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son proteínas naturales que se encuentran presentes en animales, plantas, insectos y bacterias. Estos péptidos se encargan de la defensa del huésped contra posibles organismos patógenos.

En este trabajo se ha hecho un estudio sobre la contabilidad para llevar a cabo la síntesis del péptido BP100 mediante una síntesis en fase sólida. Se ha estudiado y controlado todos los parámetros y ha hecho falta un seguimiento constante a fin de saber los gastos que se producen. El procedimiento experimental se ha llevado a cabo de tal manera que se ha intentado minimizar el máximo posible el coste. De lo contrario, se ha observado y estudiado las diferentes propiedades y características de la resina enfrente diferentes disolventes.

Finalmente, se ha analizado y caracterizado el péptido mediante el uso de las técnicas HPLC y MALDI-TOF, que ofrecen una cuantificación, un análisis cuantitativo y cualitativo y la identificación del péptido sintetizado. La utilización de estas técnicas ha permitido comprobar y demostrar que el péptido obtenido se ha sintetizado correctamente y con éxito usando el método en fase sólida.

ABSTRACT

Peptide chemistry was revolutionized by Robert Bruce Merrifield in 1963. The research of this biochemist focused on obtaining peptides by solid-phase synthesis (SPPS), this method stands out for its simplicity and easy production of peptides and proteins. SPPS is a fast and quite simple method, even so, it presents different aspects that are important for the synthesis, such as the selection of the resin, the solvents used, the different protecting groups, the reagents necessary to activate the α -carboxyl group of the amino acid, the ninhydrin test, etc.

To develop this report, extensive bibliographic research has been carried out. Some of the most relevant topics covered in this work have been: the description of the BP100 peptide, the history and development of solid-phase peptide synthesis, the steps involved in the synthesis, and, finally, the accounting for the synthesis of the BP100 peptide.

The peptide studied is BP100, KKLFFKKILKYL-NH₂, an antimicrobial peptide. Antimicrobial peptides (AMPs) are natural proteins found in animals, plants, insects, and bacteria. These peptides are responsible for host defense against potential pathogenic organisms.

In this work, a study has been made on the accounting required to carry out the synthesis of the BP100 peptide by solid-phase synthesis. All parameters have been studied and controlled and constant monitoring has been necessary to know the costs incurred. The experimental procedure has been carried out in such a way as to minimize the cost as much as possible. Otherwise, the different properties and characteristics of the resin against different solvents have been observed and studied.

Finally, the peptide has been analyzed and characterized using HPLC and MALDI-TOF techniques, which provide quantification, quantitative and qualitative analysis, and identification of the synthesized peptide. The use of these techniques has made it possible to verify and demonstrate that the peptide obtained has been correctly and successfully synthesized using the solid-phase method.

REFLEXIONS SOBRE ÈTICA, SOSTENIBILITAT I PERSPECTIVA DE GÈNERE

La síntesi de pèptids en fase sòlida ha estat un gran descobriment per a la química de pèptids i la investigació biomèdica. Per dur a terme aquest mètode cal l'ús de dissolvents, i hi ha un debat de si la investigació i els experiments químics justifiquen l'ús excessiu de certs dissolvents. Existeix un Reial Decret¹, el qual defineix els objectius per prevenir o reduir els efectes nocius que poden derivar sobre les persones i el medi ambient en treballar amb dissolvents orgànics.

L'ús de dissolvents en la química és una pràctica comuna, ja que es fan servir en moltes aplicacions, des de la síntesi de molècules fins a la neteja de diferents estris, no obstant això, presenten implicacions ètiques importants, pel fet que alguns d'aquests dissolvents poden ser altament tòxics, carcinògens o perjudicials per a la salut i el medi ambient. Això ha fet plantejar-se si és ètica la utilització d'aquestes substàncies químiques en certs àmbits. Per aquest fet, s'han plantejat diferents solucions, com ara, controlar i limitar el seu ús i establir solucions alternatives per reduir la seva presència.

En primer lloc, és rellevant que es prenguin mesures per reduir l'ús d'aquests dissolvents, sempre que sigui possible. Així com la utilització de dissolvents verds, que són més sostenibles i tenen una toxicitat menor, fer servir mètodes alternatius que no requereixin volums elevats de dissolvents i fent un ús adequat d'aquests.

En resum, és important l'establiment de controls i límits per la seva utilització per evitar els efectes nocius que aquests poden provocar tant al medi ambient com a la salut humana. Així mateix, cal també fomentar la recerca i el desenvolupament de nous mètodes i noves tecnologies per reduir el seu ús o substituir-ho per productes més sostenibles i ètics.

El factor més destacat és el factor ambiental i els efectes nocius que poden causar si es produeix una gestió inadequada dels residus. Per això cal tenir molta cura i consciència de l'ús dels dissolvents com també, de l'abocament d'aquests. És crucial fer servir sistemes de purificació d'aire i aigua, filtres i altres mecanismes que puguin ajudar a eliminar les

¹ <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/01/31/117/dof/cat/pdf>

substàncies tòxiques o perjudicials. Així mateix, és molt important seguir la llei de gestió de residus per minimitzar el màxim possible els efectes perjudicials que tenen sobre el medi ambient i la salut humana.

Pel que fa a la fase sòlida és un mètode que no genera gairebé cap residu, ja que no necessita volums elevats de dissolvents. Es tracta d'un mètode no tòxic i gràcies a aquest s'obtenen bons resultats farmacològics.

Un altre punt que cal tractar és la perspectiva de gènere respecte a la ciència. En l'àmbit científic aquest aspecte ha sigut una qüestió crucial que ha estat en el punt de mira durant els últims anys, atès que moltes dones no han tingut les mateixes oportunitats i reconeixements que han tingut els homes. Això ha ajudat a mantenir una societat desigual. La falta de representació de les dones en l'àmbit científic i els obstacles que han impedit continuar amb el seu desenvolupament professional són un clar exemple de la desigualtat que pateixen. Cal destacar que aquesta desigualtat que hi ha pot tenir un impacte important en la forma en què es presenten els resultats en els diferents àmbits de la ciència.

En el meu cas, si es fa una anàlisi general dels articles tractats per desenvolupar la memòria d'aquest treball sobre la síntesi de pèptids en fase sòlida es pot veure clarament que els homes ocupen la majoria de representació en aquest camp. Molts estudis han demostrat que les dones tenen molta menys representació i presenten més impediment a l'hora de publicar articles científics en revistes de prestigi.

En el meu cas no he tingut un grup de recerca i, per tant, no m'he trobat en cap circumstància que pogués opinar sobre aquest aspecte. Tot i això, crec que és molt interessant poder donar el nostre punt de vista per tal d'aconseguir una ciència més justa, equitativa i inclusiva.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Pèptids antimicrobians

Els pèptids antimicrobians (AMPs), també coneguts com a pèptids de defensa de l'hoste, són pèptids relativament curts de fins a uns 50 aminoàcids que tenen propietats antibiòtiques i generalment estan carregats positivament. La majoria dels AMPs tenen la capacitat de matar patògens microbians directament, mentre que d'altres actuen indirectament modulant els sistemes de defensa de l'hoste.^{[1], [2]}

El pèptid que s'ha escollit per realitzar aquest treball és el BP100, el qual és un pèptid multifuncional actiu en membrana de tan sols 11 aminoàcids (KKLFKKILKYL-NH₂) que presenta una alta activitat antimicrobiana, una capacitat eficient de penetració cel·lular i baixos efectes secundaris hemolítics.^[3]

1.2. Síntesi de pèptids en fase sòlida

L'any 1963, Robert Bruce Merrifield va publicar la primera síntesi d'un pèptid constituït mitjançant el mètode en fase sòlida (SPPS, de l'anglès solid phase peptide synthesis), i va obtenir el primer tetrapèptid Leu-Ala-Gly-Val^{[4], [5]}. Merrifield va ser el primer que va proposar una síntesi peptídica molt més eficient als mètodes de síntesis peptídiques iniciats per Fischer, els quals eren lents, tediosos i requerien una alta especialització. La introducció d'aquest nou mètode va revolucionar el camp de la química de pèptids, ja que el temps requerit per la síntesi de pèptids va disminuir considerablement i aquesta era prou senzilla.

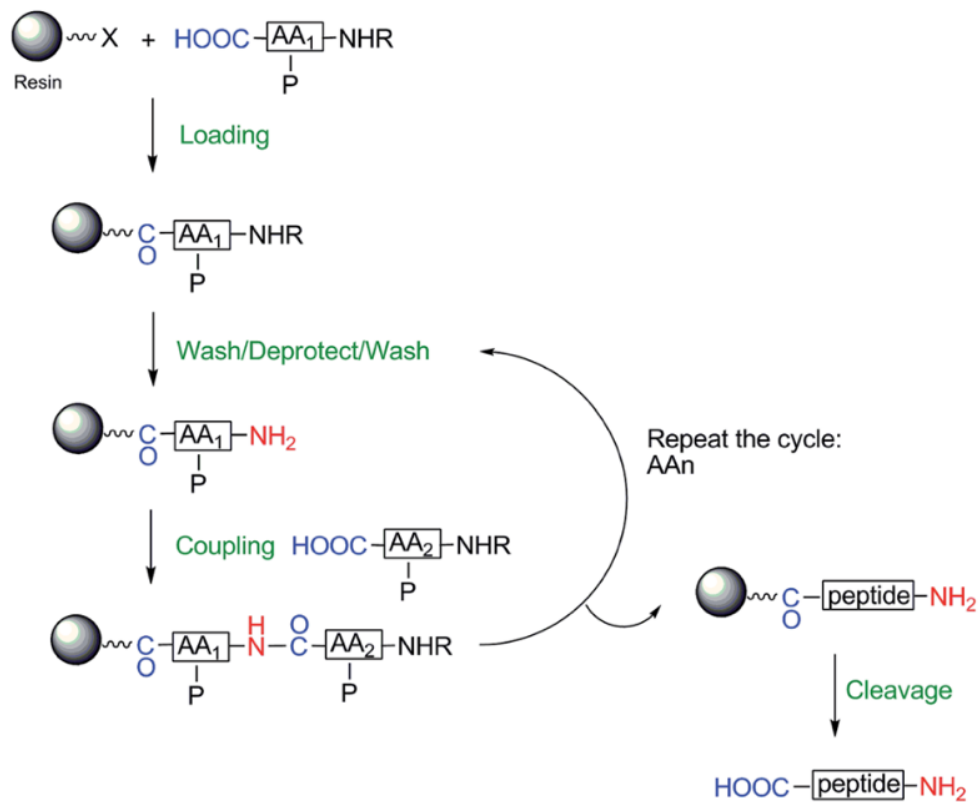
Aquest mètode consisteix en l'acoblament d'una cadena peptídica de manera escalonada mentre un extrem de la cadena està unit a un suport sòlid, que aquest es pot eliminar fàcilment amb uns dissolvents adequats^[6]. Per poder emprar aquesta tècnica cal tenir en compte alguns aspectes com el tipus de resina que cal utilitzar, l'inflament d'aquesta, el tipus de grups enllaçadors, els diferents grups protectors, etc.

- Aspectes generals de la síntesi de pèptids en fase sòlida

La síntesi peptídica en fase sòlida es basa a acoblar covalentment dos o més aminoàcids mitjançant enllaços amida. La síntesi comença amb l'acoblament del primer aminoàcid (AA₁) a partir del residu C-terminal (grup carboxil), que s'uneix covalentment a un suport

orgànic sòlid amb l'ajuda d'un enllaç èster o amida. Aquesta unió ha de ser prou forta i estable enfront dels tractament d'eliminació del grup N α -protector i pels acoblaments dels aminoàcids de cada cicle, no obstant això, aquesta unió ha de tenir una certa labilitat que permeti la separació del pèptid del suport sòlid sense que hi hagi danys en la seqüència d'aminoàcids.^[7] Un cop acoblat l'aminoàcid, la resina es filtra i es renta per eliminar els subproductes i l'excés de reactiu. Seguidament, s'elimina el grup N- α -protector del nou AA i es renta de nou la resina. A continuació, s'acobla el següent aminoàcid (AA₂) i el procés es repeteix fins a obtenir la seqüència peptídica desitjada.

L'elongació de la cadena es realitza en la direcció C \rightarrow N mitjançant l'eliminació successiva del grup protector α -amino, mentre que les cadenes laterals reactives es protegeixen mitjançant un grup protector temporal. Un cop aconseguida la seqüència peptídica final s'eliminen els grups protectors, normalment en un sol pas, la qual es denomina desprotecció global, i el pèptid se separa de la resina. A l'esquema 1 hi ha representat l'esquema general empleat per la SPPS.^{[8], [9]}



Esquema 1: Esquema general de la síntesi de pèptids en fase sòlida.

Els grups protectors més utilitzats en la SPPS són el grup terç-butoxi-carbonil (Boc) que és làbil en medi àcid com l'àcid trifluoroacètic (TFA), i el grup fluoren-9-ilmetiloxicarbonil (Fmoc) que és làbil en medi bàsic com la piperidina.

El grup Fmoc és un grup protector temporal pel grup α -amino, que s'elimina a cada etapa de desprotecció. El Fmoc s'elimina generalment amb amines secundàries, tot i que també es poden emprar amines primàries i terciàries. La més usada és una dissolució d'entre el 20-50% de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF). En canvi, com a protecció permanent dels grups reactius de les cadenes laterals dels aminoàcids normalment s'utilitza el grup Boc o grups tert-butil, i aquest s'eliminen al final de tota la síntesi. L'eliminació de la majoria d'aquests grups es realitza amb TFA en presència d'agents nucleòfils. L'ús d'àcids forts com l'HF no són necessaris pel fet que el TFA és capaç d'eliminar els grups protectors i separar el pèptid del suport sòlid.^[7]

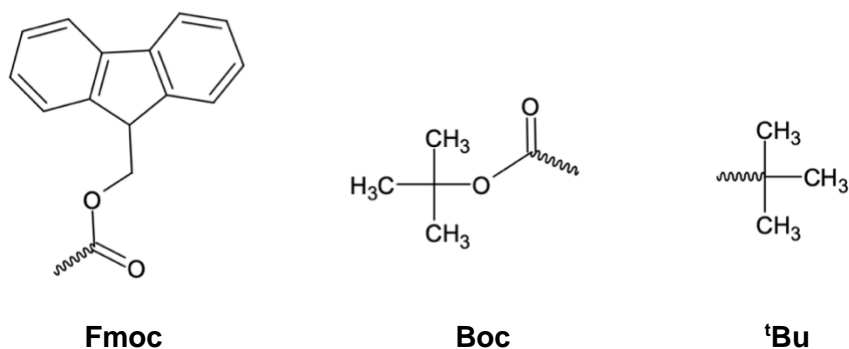


Figura 1: Estructura dels grups protectors Fmoc, Boc i tBu.

Com s'ha dit anteriorment, és necessari l'ús de grups protectors N-terminals i de la cadena lateral durant la síntesi per evitar reaccions secundàries. En la síntesi de pèptids en fase sòlida es diferencien, en general, dos mètodes; el mètode Fmoc, que és el més emprat actualment, i el mètode Boc. Això es deu al fet que el primer pot ser eliminat en condicions més suaus que el segon.

L'estratègia Fmoc/tBu utilitza com a grup protector temporal el Fmoc, que s'elimina a través d'un tractament amb piperidina, mentre que el linker i el grup semipermanent, tBu o Boc, s'eliminen amb TFA.

Per altra banda, l'estratègia Boc-^tBu/Benzil utilitza com a grup protector temporal el Boc-^tBu que es treu amb TFA, mentre que el linker i grup protector semipermanent, Benzil, carbobenzoxi o similar, s'eliminen amb un tractament amb HF.

- **Selecció de la resina i les seves propietats**

La principal característica de la SPPS és que requereix la presència d'un suport polimèric insoluble que permet una fàcil separació dels dissolvents i reactius mitjançant un simple procés de filtració o centrifugació. Per tal que el suport sigui útil per la SPPS cal que sigui inert a tots els reactius i dissolvents usats en la síntesi, ha de tenir una gran capacitat d'inflament i cal que sigui altament porós. Existeix una gran varietat de suports per la SPPS, els més utilitzats són les resines de poliestirè (PS), les resines de poliacrilamida i les resines basades en polietilenglicol (PEG).

La resina més utilitzada comunament és el PS, en la química en fase sòlida. Normalment, les resines són partícules petites i esfèriques que poden tenir dues mides diferents: 100-200 mesh i 200-400 mesh i la càrrega, en les resines comercials típiques, va de 0,3 a 2,5 mmol_(grup reactiu) per g_(suport).

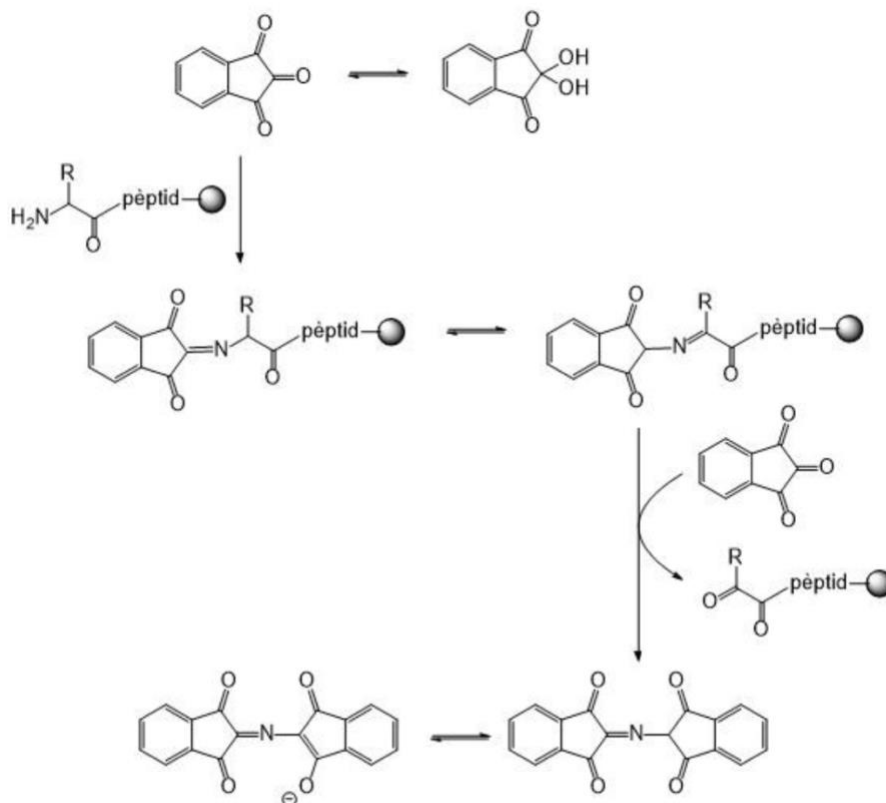
Una de les principals propietats que tenen les resines és el factor d'inflament a causa de l'efecte que tenen els dissolvents orgànics sobre aquesta. És a dir, depenent del dissolvent que s'utilitzi el factor d'inflament serà diferent, no obstant això, aquest factor també depèn del tipus de resina que s'empri. Merrifield, a partir de la síntesi de pèptids clàssica, va poder observar que la resina quan estava en contacte amb diclorometà (CH₂Cl₂) patia un inflament major que en DMF. Altrament, el factor d'inflament disminueix gradualment en aquest dissolvent a mesura que la seqüència peptídica es va fent més gran, mentre que el factor d'inflament augmenta en DMF. Per tant, aquesta resina s'infla en dissolvents no polars com el toluè i el CH₂Cl₂.

Els dissolvents més utilitzats són el CH₂Cl₂ i la DMF, tot i això, el dissolvent principal per dur a terme l'etapa d'acoblament és el DMF.^[9]

- **Test de ninhidrina i tractament amb anhídrid acètic**

La prova de Kaiser es tracta d'una prova qualitativa que permet identificar compostos que presenten grups amino lliures com ara els α-aminoàcids, amines primàries i amoni. Aquesta s'utilitza com a un indicador per identificar si una etapa d'acoblament ha finalitzat o no. La

prova es basa en la reacció de la ninhidrina amb amines primàries, que dona un color lilós a la solució. Una característica important d'aquesta prova és que requereix una quantitat mínima d'anàlit i el resultat s'obté en pocs minuts.



Porpra de Ruhemann

Esquema 2: Test de ninhidrina. Extret de [9].

Per realitzar l'assaig es necessiten els següents reactius:

- Reactiu A: dissolució de ninhidrina (2,5 g) en etanol absolut (50 mL).
- Reactiu B: dissolució de fenol (200 mg) en etanol absolut (50 mL).
- Reactiu C: dissolució de NaCN 1mM (1 mL) en piridina destil·lada sobre ninhidrina (49 mL).

Per realitzar el test només cal tractar la mostra amb 2 gotes de cada un dels reactius i cal escalfar-la a 100 °C durant 3 minuts. Un cop finalitzat el temps cal comprovar el color, un color blavós indica la presència d'amines lliures per sobre d'1 μmol de grups amino per gram de resina i, per tant, l'acoblament de l'aminoàcid no ha estat complet (assaig positiu).

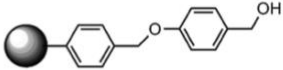
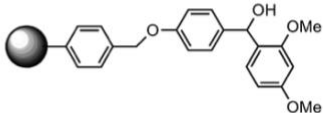
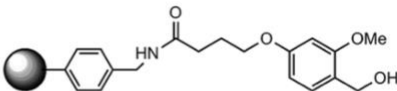
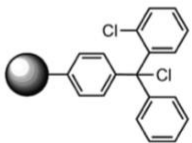
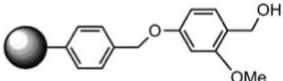
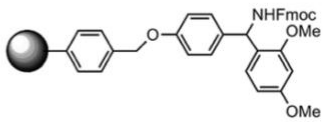
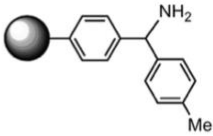
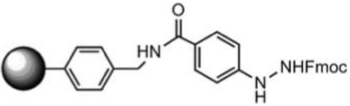
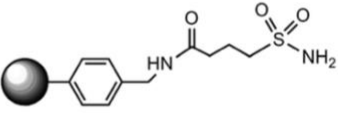
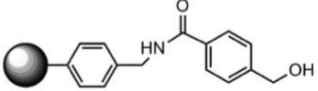
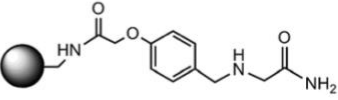
Per contra, una coloració groguenca és indicativa d'absència d'amines primàries lliures i, en conseqüència, d'un acoblament efectiu (assaig negatiu).^[1]

En cas d'obtenir un assaig positiu es fa un segon acoblament, si després d'aquesta nova etapa hi ha amines lliures presents es fa un nou tractament amb anhídrid acètic que en contacte amb amines forma amides i això impedeix el creixement de la seqüència en aquella molècula.^{[9], [10]}

- **Eliminació dels grups protectors**

Els enllaçadors (*Linker*) són unitats químiques que s'utilitzen per unir els aminoàcids a la resina i, per tant, permeten el creixement de molècules en fase sòlida. A la taula 1 es poden observar les resines més típiques per a la SPPS amb el seu enllaçador corresponent. Aquest determinarà les condicions que cal emprar perquè la seqüència d'aminoàcids final es pugui separar de la resina.

Taula 1: Resines més utilitzades en la síntesi de pèptids en fase sòlida amb el seu Linker corresponent

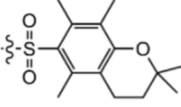
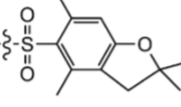

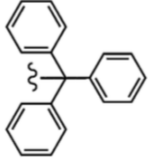
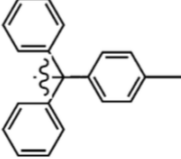

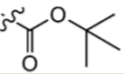
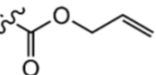

Resin name	Resin structure	Cleavage conditions	Peptide product
Wang resin		90–95% TFA in CH ₂ Cl ₂ 1–2 h	Acid
Rink acid resin		1–5% TFA in CH ₂ Cl ₂ 5–15 min or 10% AcOH in CH ₂ Cl ₂ , 2 h	Acid
HMPB resin		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ 2–5 min	Acid
2-Chlorotrityl chloride resin		1–5% TFA in CH ₂ Cl ₂ 1 min	Acid
SASRIN resin		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ 5–10 min	Acid
Rink amide resin		50% TFA in CH ₂ Cl ₂ 1 h	Amide
MBHA resin		HF 0 °C, 1 h	Amide
Hydrazine resin		Cu(OAc) ₂ , pyridine, acetic acid, nucleophile in CH ₂ Cl ₂ or THF	Acid, ester, amide
Sulfonamide resin		1. ICH ₂ CN/DIPEA/NMP, 24 h 2. Nucleophile, DMAP, 24 h	Acid, ester, thioester, amide, etc.
HMBA resin		NaOH, N ₂ H ₄ , NH ₃ in MeOH 24 h ROH LiBH ₄	Acid, hydrazide, amide Ester Alcohol
PEGA-BAL resin		TFA-TFMSA (19 : 1)	Acid

Com es pot observar, en la majoria de les resines les condicions de separació tenen lloc en condicions àcides i donen com a resultat pèptids que contenen una amida (per exemple, la resina MBHA) o un àcid carboxílic (per exemple, la resina SASRIN) en el C-terminal. Les

resines d'hidrazina i de sulfonamida poden donar diferents productes segons les condicions de clivatge utilitzades.

Els residus laterals dels aminoàcids poden tenir diferents grups protectors i les condicions d'eliminació d'aquests grups són específiques per a cada aminoàcid. La taula 2 mostra alguns aminoàcids amb els seus grups protectors més populars i les seves condicions de desprotecció corresponents.

Taula 2: Grups protectors de cada aminoàcid i les condicions de desprotecció de cada un.

Amino acid	Protecting group	Structure	Deprotection conditions
Arg	Pmc		90–95% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 2–4 h
	Pbf		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ /TIS, 1 h (longer times in multiple Arg containing peptides)
Asp/Glu	O ^t Bu		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
Asn/Gln	Trt		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30–60 min
Cys	Mtt		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 60 min
	Trt		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
	S ^t Bu		TFMSA
His	Mtt		15% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 1 h
	Trt		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
	Boc		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
Lys/Orn	Boc		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
	Mtt		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
	Alloc		Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol%), PhSiH ₃ , THF/CH ₃ OH, 12 h
Ser/Thr	^t Bu		90% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 30 min
Trp	Trt		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 2 h
	Boc		95% TFA in CH ₂ Cl ₂ , 1 h
	Alloc		Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol%), methylanilin, DMSO–THF–0.5 M HCl (1 : 1 : 0.5), 8 h
Tyr	Trt		2% TFA in CH ₂ Cl ₂
	^t Bu		35% TFA in CH ₂ Cl ₂
	Alloc		Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol%), PhSiH ₃ , THF/CH ₃ OH

Per exemple, els grups protectors com l'Alloc de Lys o el ^tBu del Thr mostres condicions de desprotecció diferent. El grup Alloc l'eliminació està catalitzada per Pd, en canvi, el ^tBu cal utilitzar una solució del 90% de TFA en CH₂Cl₂.

Els grups protectors dels residus dels aminoàcids cal eliminar-los una vegada acabada la seqüència peptídica. Aquesta es pot realitzar abans de la separació del pèptid de la resina o al mateix temps, si les condicions de separació ho permeten.

- Activació del grup carboxil dels aminoàcids

Per activar el grup α -carboxil de l'aminoàcid és necessària l'addició d'un reactiu d'acoblament per tal que es doni una ràpida i quantitativa formació de l'enllaç amida.

Les carbodiimides són bons agents de deshidratació i comunament es fan servir per activar àcids carboxílics per a la formació d'amides o èsters. Una de les primeres carbodiimides que es va utilitzar per a la SPPS va ser la N,N'-diciohecilcarbodiimida (DCC), però els grans desavantatges d'aquesta van portar al desenvolupament d'un nou compost, la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) que va ser una alternativa a la DCC. La DIC és un compost fàcilment manipulable i s'elimina ràpidament per extracció.^[11]

Quan es dona l'activació de α -carbonil tan sols amb carbodiimides es poden produir reaccions secundàries i moltes d'aquestes es poden evitar amb la introducció d'un additiu, com el cianhidroximinoacetat d'etil (Oxima). Aquest s'utilitza com a additiu d'acoblament en l'enllaç convencional de pèptids en solució, com per exemple, en una síntesi peptídica en fase sòlida.^[7]

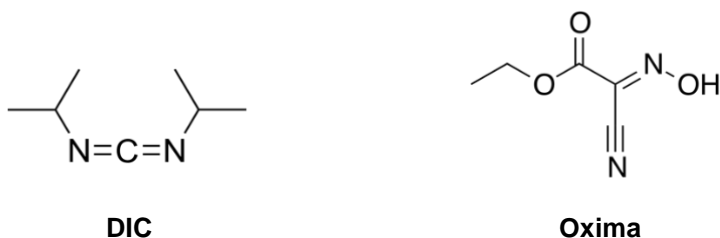


Figura 2: Estructura de la DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida) i l'Oxima (cianhidroximinoacetat d'etil)

2. OBJECTIVES

The main objective of this work is to investigate and collect information on solid-phase peptide synthesis to analyze this method and study the cost of BP100 peptide synthesis. This objective is specifically focused on the application of the solid-phase peptide synthesis

method, and therefore, this method has been studied in detail to improve its process and obtain the desired peptide with acceptable yield and quality.

It has also involved an evaluation and optimization of the experimental parameters to minimize the expenses, an investigation on the types of solvents, reaction conditions, resin/solvent ratio, and other key factors to improve the efficiency of this synthesis has been carried out.

Finally, the synthesized peptide has been characterized by analytical techniques such as HPLC (High-performance liquid chromatography) and MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass detection) mass spectrometry.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntesi del pèptid BP100

La síntesi del pèptid BP100 s'ha realitzat mitjançant la síntesi de pèptids en fase sòlida utilitzant el mètode Fmoc. Com a suport sòlid s'ha utilitzat la resina 4-metilbenzidrilamina (MBHA) que és un polímer entrecruat de poliestirè-divinilbenzè (PS) (Figura 3a), i com a linker l'àcid 4'-[R,S]- α -[1-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-2,4-dimetoxibenzil]-fenoxiacètic (Fmoc-Rink-amida) (Figura 3b) de càrrega 0,56 mmol/g i com a aminoàcids s'han fet servir els següents: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH i Fmoc-Phe-OH.^[1]

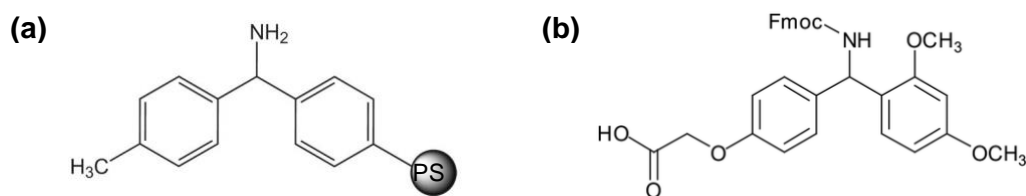


Figura 3: (a) Resina MBHA, on PS és poliestirè-divinilbenzè; (b) Linker Fmoc-Rink-amida.

Per realitzar la síntesi s'ha seguit el següent procediment:

1. Primer de tot es pesen 2,2 g de la resina, s'introdueix en una xeringa de 100 mL, que contingui 2 o 3 filtres, i es fan una sèrie de rentats per activar la resina amb CH_2Cl_2 (2 x 3') i DMF (5 x 3').
2. L'elongació del pèptid es du a terme mitjançant etapes seqüencials d'eliminació del grup Fmoc i d'acoblament de l'aminoàcid. L'eliminació del Fmoc es fa en tres tractaments consecutius de 5, 10 i 10 minuts, respectivament, amb piperidina/DMF (3:7).
3. Després de cada etapa d'eliminació es fan varis de rentats amb DMF (5 x 3 min), CH_2Cl_2 (1 x 3 min) i finalment, DMF (1 x 3 min). Aquests canvis de dissolvents activen la resina, pel fet que provoca canvis en l'entorn d'aquesta.
4. L'acoblament dels aminoàcids es realitza conjuntament amb Oxima i DIC, dissolt en DMF a temperatura ambient i sota agitació durant 4-5 h. Per preparar aquesta barreja primer s'addiciona la quantitat necessària d'aminoàcid dintre d'un falcó, seguidament s'afegeix l'oxima i s'addiciona DMF fins a un volum total aproximat de 7-7,5 mL. A continuació, es barreja amb l'ajuda d'un vòrtex o d'un ultrasò i finalment s'addiciona la DIC.
5. Un cop passat aquest temps es porta a cap el test de ninhidrina per comprovar que l'acoblament sigui efectiu. En cas de no ser així, s'afegeix un 20% més d'aminoàcid + Oxima + DIC dissolt en DMF i es deixa barrejar durant 2-3 hores més. Finalment, si l'acoblament no s'ha donat completament es fan dos tractaments amb pyr-Ac₂O-DCM (5:15:10) de 3' + 30'.
6. Un cop finalitzada aquesta etapa es torna a rentar la resina amb DMF (5 x 3 min), CH_2Cl_2 (1 x 3 min) i DMF (1 x 3 min) i es repeteix el procés d'eliminació del grup Fmoc i l'acoblament de l'aminoàcid fins a aconseguir la seqüència completa, a partir de l'etapa 2. Un cop finalitzada l'elongació del pèptid s'elimina el grup Fmoc i es fan diversos rentats amb DMF, CH_2Cl_2 i èter etílic.
7. Tot seguit es fan tres tractaments amb TFA/TIS/H₂O milli-Q (95 : 2,5 : 2,5) de 30', 1 h 30' i 1 h, respectivament. Cal anar agitant de tant en tant. Un cop passat el temps

establert cal recollir el líquid que s'obté de cada un dels tractaments en un mateix matràs de fons rodó de 100 mL. La xeringa es guarda al congelador fins al seu pròxim ús.

8. S'addiciona aproximadament uns 5 ml de metanol al matràs i s'evapora conjuntament amb el TFA mitjançant l'ús d'un rotavapor. Aquest procés es repeteix uns quants cops fins a obtenir un líquid oliós de color groc i transparent.
9. El producte obtingut es reparteix en parts iguals en dos falcons, prèviament tarats. A continuació s'afegeix aigua fins a omplir dos terços dels falcons i seguidament s'addicionen aproximadament uns 5 mL de dietilèter. S'agita fins a assolir una solució homogènia i es deixa reposar en un bany de gel fins a apreciar bé les dues fases. Un cop es tinguin les dues fases ben separades es fa una extracció i es repeteix el procés diversos cops fins a aconseguir una interfase clara i neta.
10. Per un altre costat, es tracta el contingut de la xeringa amb aigua destil·lada durant uns minuts i es recull el líquid en un nou falcó, prèviament tarat. Aquest procés es repeteix diversos cops per arrossegar producte, en cas que en quedés. Seguidament, es fa el mateix procediment que en l'apartat anterior. En últim lloc, un cop la interfase sigui clara en els tres falcons s'extreu el dietilèter, que conté les impureses, i es guarden en el congelador.
11. Un cop congelat, s'aboca el dietilèter, que es torba en estat líquid, en un quart falcó i es guarda per analitzar-lo més tard, per si han quedat restes del producte. Els tres falcons s'introdueixen a la liofilitzadora durant 1 o 2 dies.
12. Per acabat, es pesa el producte final per calcular el rendiment. Es posa una petita quantitat del producte en un vial HPLC i en un eppendorf i s'afegeix uns 500 µL d'H₂O (0,1% TFA) per analitzar la mostra per HPLC i MALDI-TOF.

4. RESULTATS

El producte obtingut es va analitzar mitjançant desorció/ionització làser assistida per matriu amb detecció de masses per temps de vol (MALDI-TOF) i cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

El MALDI-TOF permet fer l'anàlisi de molècules amb un pes molecular elevat per aconseguir-ne la composició elemental. Els espectres de masses MALDI es van registrar en un instrument Autoflex maX (Bruker Daltonics) en el rang de masses de 1000-2200 Da, com a mètode es va utilitzar el RP_Pepmix i es va utilitzar una potència del làser del 80%. Per la seva anàlisi es va agafar una petita mostra del producte, es va diluir en H₂O (0,1% de TFA) en una matriu d'àcid alfa-cià-4-hidroxicinàmic (HCCA) i es va fer cristal·litzar 1µL sobre una placa metàl·lica durant uns 10 minuts. La barreja d'aigua i un dissolvent orgànic, en aquest cas el TFA, permet que les molècules hidrofòbiques i hidrofíliques es dissolguin en la solució. En la figura 4 es pot observar l'espectre del producte obtingut en el rang de masses de 1000-2200 Da.

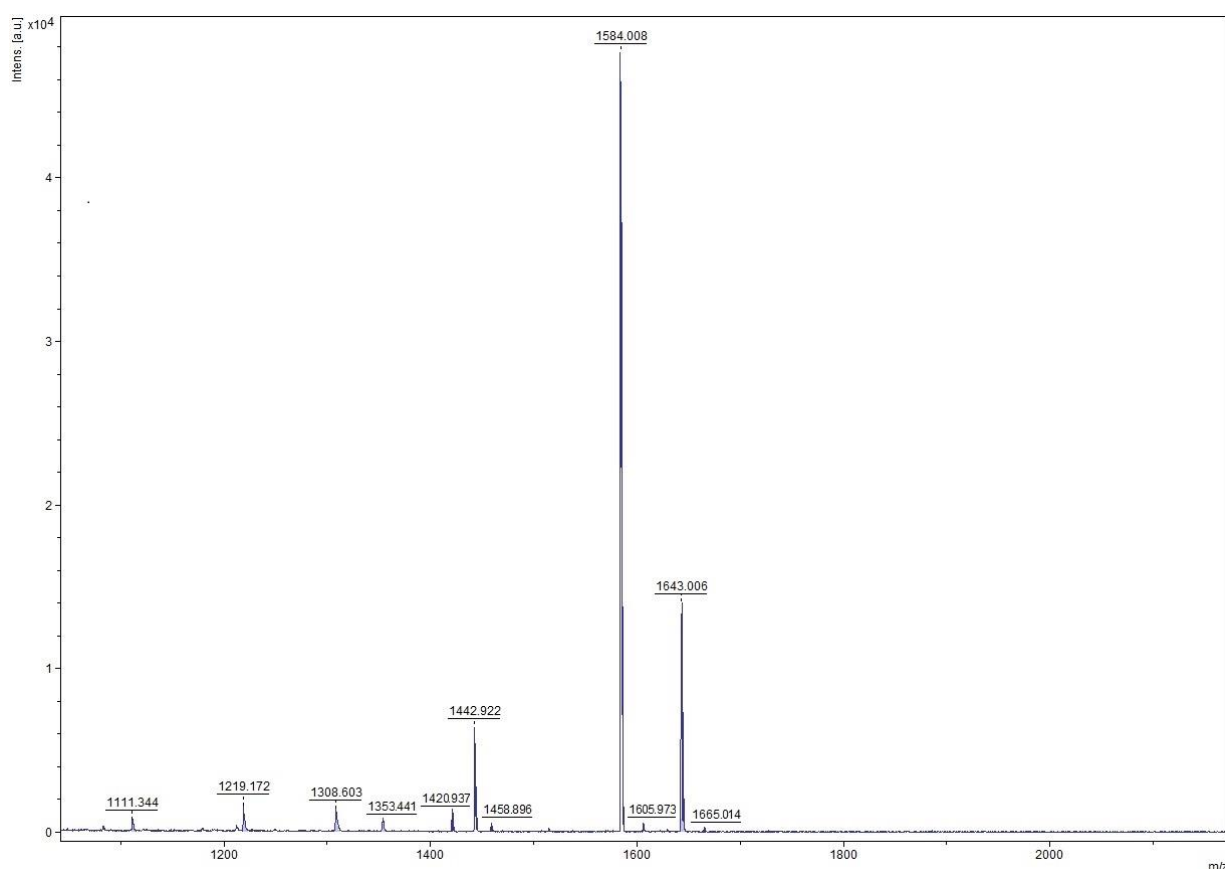
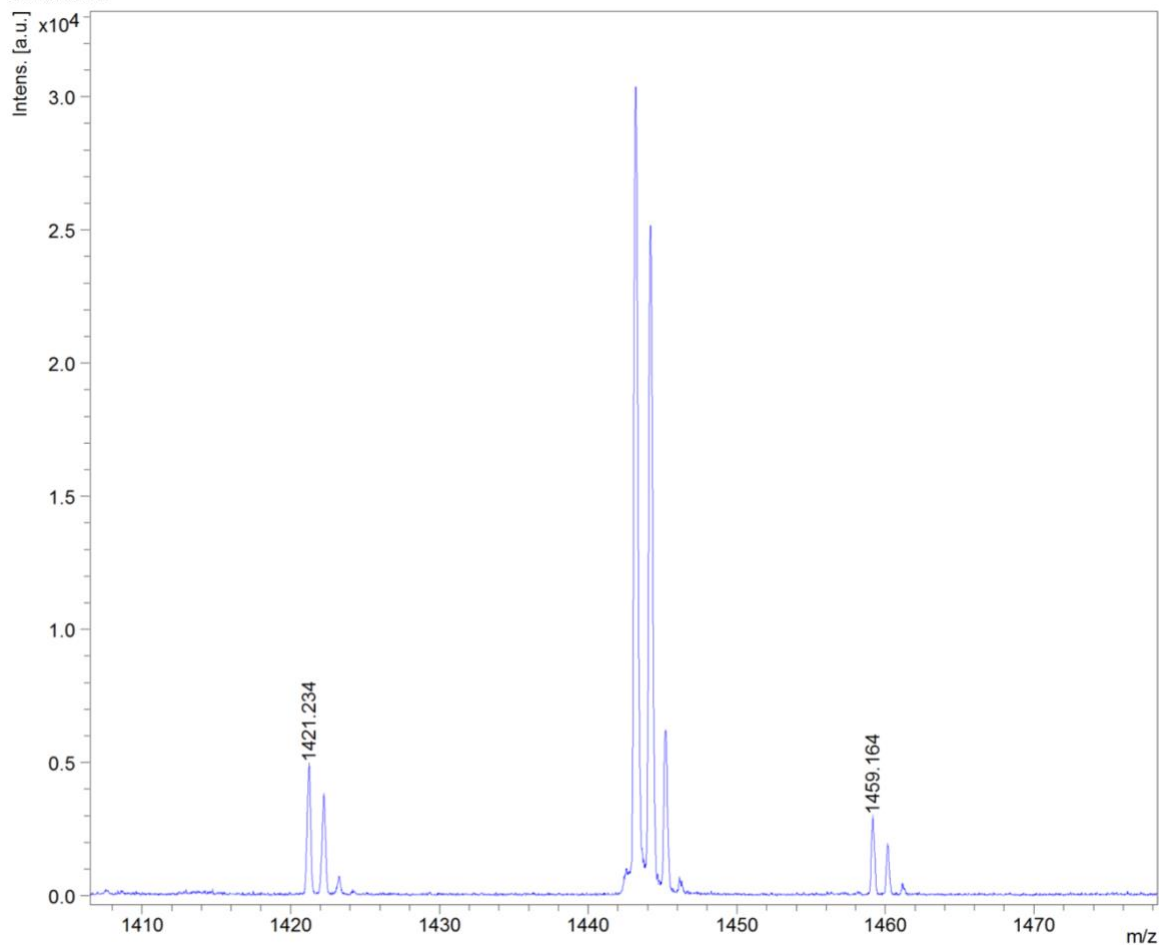


Figura 4: Espectre de masses MALDI-TOF, en un rang de masses de 1000 a 2200 Da.

El pic a 1420,937 Da correspon al pèptid BP100. En la figura 5 es pot veure el sumatori de 5000 espectres en el rang de masses de 1400-1480 Da, on el pic a 1421,234; 1443,201 i 1459,164 Da corresponen a $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ i $[M + K]^+$, respectivament.

Comment 1

Comment 2



m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
1421.234	60		5476	4900	1360
1443.201	389		4897	30385	10288
1459.164	38		5808	2965	750

Figura 5: Espectre de masses MALDI-TOF, en un rang de masses de 1400 a 1480Da.

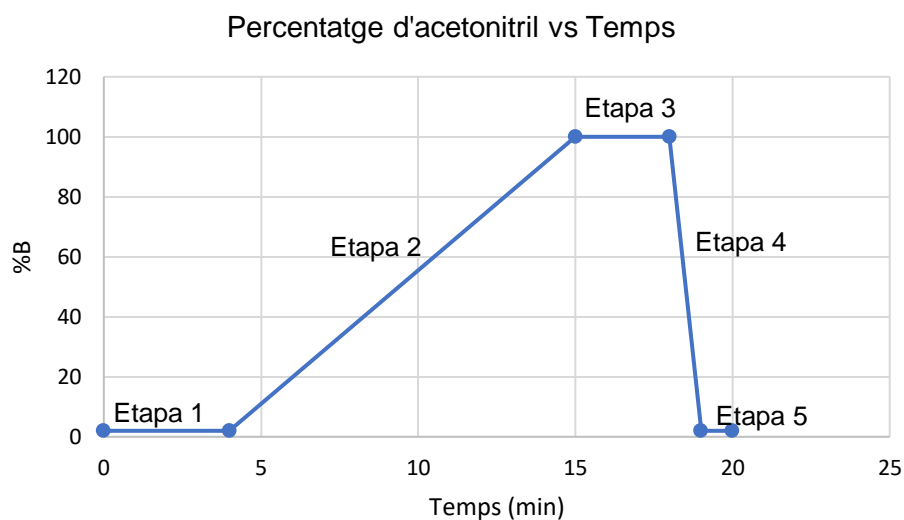
Per altra banda, es va analitzar el producte obtingut mitjançant HPLC-MS. Aquesta és una tècnica que permet separar, analitzar, quantificar i caracteritzar mesclades de productes poc o gens volàtils. Els espectres de masses HPLC es van registrar a partir de l'instrument Agilent 1100 HPLC Standard, que contenia una columna Luna C18 endcapping TMS de sílice completament porosa, de 3µm de mida de partícula, 100 Å de mida de porus, 75 mm de llarg i 4,6 mm de diàmetre intern. El mètode que es va emprar va ser l'Àngel Columna Luna.M, amb un flux d'1 ml/min durant 20 minuts i com a solvents es va fer servir el 98%

d'aigua i el 2% d'acetonitril. A la següent taula hi ha la variació entre el percentatge d'acetonitril que reacciona en relació amb el temps.

Taula 3: Relació entre el percentatge dels dissolvents i el temps de cada una de les etapes.

Etapa	Temps (min)	% Acetonitril	% Aigua
1	0	2	98
2	4	2	98
3	15	100	0
4	18	100	0
5	19	2	98
6	20	2	98

Aquesta relació entre l'acetonitril i el temps de cada etapa es va representar gràficament per poder calcular el volum de cada un dels dissolvents i així extreure'n un cost estimat.



Gràfic 1: Relació del percentatge consumit d'acetonitril en cada una de les etapes.

En primer lloc, es va analitzar el producte obtingut a diferents longituds d'ona mitjançant l'HPLC i es va injectar un volum de 1 μ L. En l'espectre de longitud d'ona de 220,4 i 214,4 nm es pot observar un pic que correspon al producte amb un temps de retenció de 8,916 minuts.

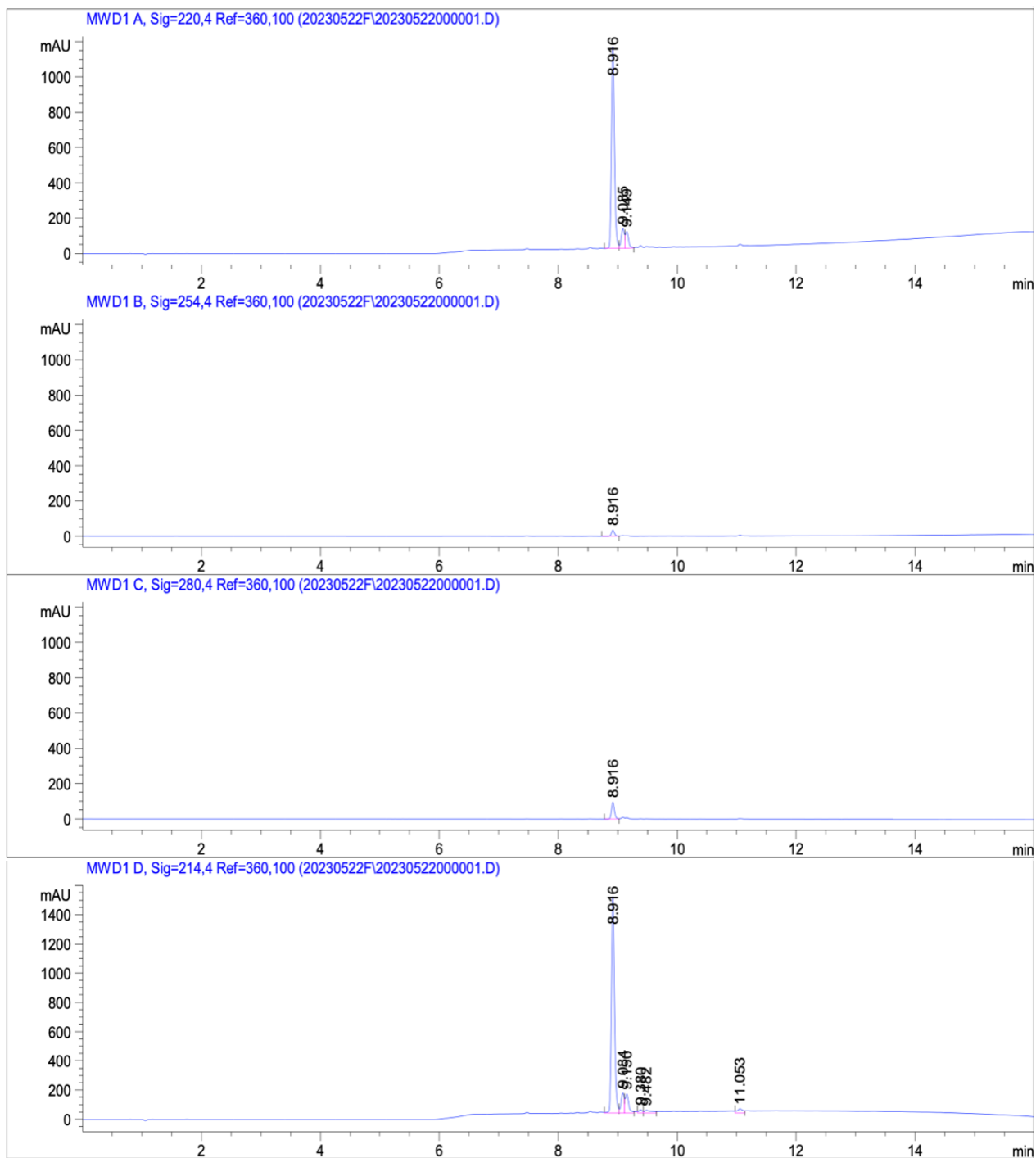


Figura 6: Espectre del producte obtingut a diferents longituds d'ona.

En segon lloc, es va analitzar una barreja del BP100 i el producte per comprovar que el producte corresponia amb el pèptid estudiat. Es va injectar un volum d'1 µL.

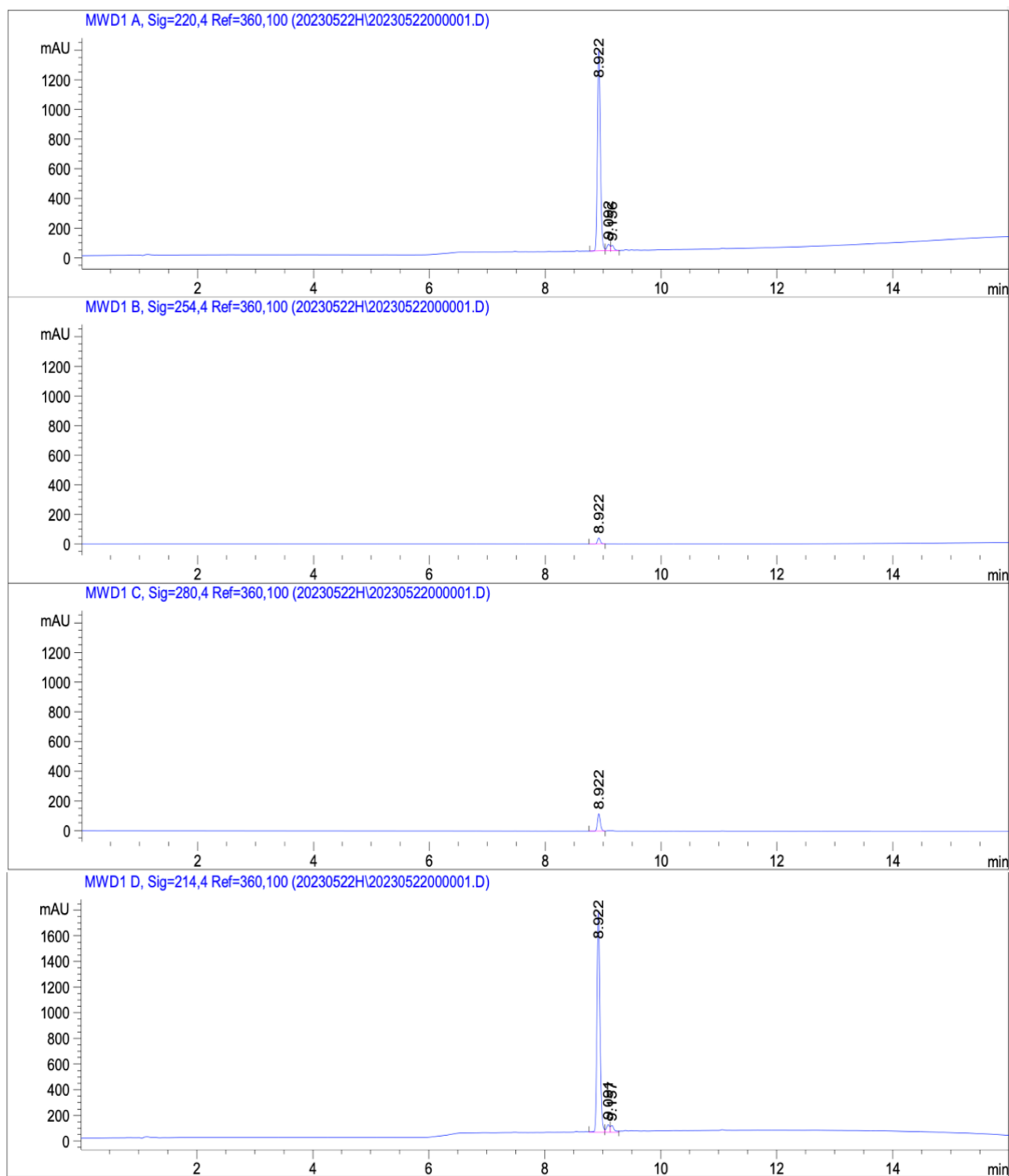


Figura 7: Espectre de la barreja entre el BP100 i el producte obtingut a diferents longituds d'ona.

Es pot veure que hi ha un pic amb un senyal molt més pronunciat que la resta amb un temps de retenció de 8,922 minuts. En l'observar un sol pic de tanta intensitat es pot afirmar que gran part del producte es tracta del pèptid BP100.

El BP100 és un pèptid de tan sols 11 aminoàcids (KKLFFKKILKYL-NH₂). Els aminoàcids tenen dos sistemes de nomenclatura, el clàssic sistema de tres lletres i l'actual sistema d'una sola lletra, tots dos permeten la representació de l'estructura primària d'una proteïna. El BP100 està constituït per 5 aminoàcids i alguns d'ells es repeteixen al llarg de la seqüència. A la taula 4 hi ha els aminoàcids que formen el pèptid i la massa molar del Fmoc-Aminoàcid-OH corresponent a cada un d'ells.

Taula 4: Pes molecular corresponent a cada Fmoc-Aminoàcid-OH i la nomenclatura de cada un dels aminoàcids que formen el BP100.

Aminoàcid	Codi (3 lletra)	Codi (1 lletra)	Fmoc-Aminoàcid-OH	Pes molecular
Isoleucina	Ile	I	Fmoc-Ile-OH	353,4
Leucina	Leu	L	Fmoc-Leu-OH	353,4
Lisina	Lys	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6
Fenilalanina	Phe	F	Fmoc-Phe-OH	387,5
Tirosina	Tyr	Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459,5

A la taula 5 es mostra el recull de les diferents etapes, per ordre, per sintetitzar el BP100, els tres reactius necessaris per fer l'acoblament amb la massa molar corresponent a cada un d'ells i el dia en què es va fer. En totes les etapes d'acoblament es va utilitzar 700,3 mg d'oxima i 763,1 µL de DIC.

Taula 5: Etapes d'acoblament amb el dia corresponent en què es va iniciar l'acoblament i la quantitat necessària de cada un dels reactius.

DIA	ETAPA		Massa molar	mg	µL
24/04	1	Fmoc-Leu-OH	353,4	1741,6	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
25/04	2	Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,6	2264,9	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
26/04	3	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6	2309,3	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
27/04	4	Fmoc-Leu-OH	353,4	1741,6	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
2/05	5	Fmoc-Ile-OH	353,4	1741,6	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
8/05	6	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6	2309,3	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
9/05	7	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6	2309,3	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
10/05	8	Fmoc-Phe-OH	387,5	1909,6	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
11/05	9	Fmoc-Leu-OH	353,4	1741,6	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
15/05	10	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6	2309,3	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1
15/05	11	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6	2309,3	
		Oxima	142,1	700,3	
		DIC	126,2	621,9	763,1

Per fer un estudi sobre la comptabilitat es va fer un balanç diari del DMF, DCM i la piperidina. En la taula 6 hi ha representat el dia d'inici i el dia final, amb l'hora respectiva, de cada un dels acoblaments. Per altra banda, també hi ha representat el pes dels dissolvents i el volum de piperidina que es va utilitzar en cada una de les etapes.

Taula 6: Balanç diari del DMF, DCM i la piperidina.

Etapa acoblament	Data inici	Hora inici	Dat final	Hora final	Balanç		
					DMF (g)	DCM (g)	Piperidina (mL)
1 ^{ra}	24/04	12:17	25/04	9:00	281	192	45
2 ^{na}	25/04	15:20	26/04	8:55	171	90	55
3 ^{ra}	26/04	10:45	27/04	11:30	186	53	30
4 ^{ta}	27/04	13:05	28/04	9:50	173	187	30
5 ^{na}	2/05	10:30	2/05	15:25	170	150	40
6 ^{na}	8/05	12:45	9/05	8:20	167	105	50
7 ^{na}	9/05	10:05	10/05	8:45	249	90	50
8 ^{na}	10/05	10:20	11/05	9:40	197	96	35
9 ^{na}	11/05	11:25	12/05	9:30	246	162	45
10 ^{na}	15/05	11:45	15/05	17:00	291	156	50
11 ^{na}	15/05	18:45	16/05	10:45	247	70	50

Pel que fa a cada etapa es pot estimar que al dia es poden realitzar com a molt dues etapes d'acoblament i cada una de les etapes de desprotecció i d'acoblament ocupaven un total de 3 hores.

El volum mitjà que s'ha fet servir de DMF, DCM i piperidina al llarg de la síntesi va ser 216,2; 122,8 g i 43,6 mL, respectivament. Mentre que la mediana han sigut 197, 105 i 45 mL, respectivament. Tenint en compte que el volum gastat total de piperidina al 30% és de 480 ml i aquesta es prepara amb 30% de piperidina en DMF, s'ha gastat 144 ml de piperidina i 336 ml de DMF en preparar-la.

A part d'això també s'ha tingut en compte el cost dels dissolvents emprats en l'HPLC i el MALDI.

A la següent taula es mostren tots els reactius i dissolvents que s'han fet servir durant l'experiment, amb el seu preu de venda per unitat i el cost real d'aquesta síntesi.

Taula 7: Cost de cada un dels reactius que s'han fet servir per a la síntesi del BP100.

nom	quantitat	unitat (ml o g)	Cost (€) /u	cost real (€)
Resina Fmoc-Rink-amida MBHA	2,200	g	19,400	42,680
Fmoc-Lys(Boc)-OH	2,343	g	1,040	2,437
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0,460	g	1,220	0,561
Fmoc-Ile-OH	0,353	g	0,400	0,141
Fmoc-Leu-OH	1,060	g	0,400	0,424
Fmoc-Phe-OH	0,388	g	0,400	0,155
Oxima	7,704	g	0,350	2,696
DIC	8,394	ml	0,295	2,476
DMF	2805,000	ml	0,009	27,408
DCM	1430,000	ml	0,003	3,662
Piperidina	165,000	ml	0,062	10,230
Metanol	128,000	ml	0,004	0,521
Dietil èter	60,000	ml	0,008	0,460
TFA	75,000	ml	0,114	8,550
TIS	2,100	ml	2,000	4,200
Anhídrid acètic	20,000	ml	0,032	0,637
acetonitril	36,880	ml	0,009	0,339
H2O	103,120	ml	0,001	0,082
			Cost total	107,660

El cost total és d'aproximadament 108 € per la síntesi del pèptid BP100 a partir de 2,2 g de resina. El 40% del cost correspon a la resina, el 31% als dissolvents, el 26% als aminoàcids i el 3% als reactius.

En darrer lloc, es va calcular el rendiment del producte obtingut. Aquest producte s'ha de tenir en compte que té 6 grups amino, 5 de la Lys i 1 de terminal, aquests grups amino formen una sal en reaccionar amb el TFA i, per tant, el pes varia. La massa molar del TFA és 114,02 g/mol que en reaccionar amb 6 grups amino s'obté un pes de 684,12 g/mol, així doncs, la massa total del producte serà aquesta més la massa molar del pèptid que és de 1420,9 g/mol i el resultat és de 2105,02 g/mol. A partir d'aquesta massa molar i els mmols que hi ha a la resina (0,56 mmol/g en 2,2 g de resina MBHA Rink) s'obté un valor de 2,59 g teòrics, mentre que es van obtenir 1,94 g de producte. Per tant, es va aconseguir un rendiment del 75%.

En conclusió, els objectius que es plantejaven a l'inici del treball s'han resolt de manera satisfactòria, ja que, el pèptid s'ha sintetitzat de manera correcta seguint la metodologia escollida i s'ha calculat la comptabilitat de l'elaboració d'aquest pèptid.

5. DISCUSSIÓ

Per calcular les despeses totals primer de tot es va fer un estudi meticulós i en detall de tots els costos que podia presentar la síntesi del BP100, per això, es va dividir en diferents seccions les etapes d'acoblament. En aquest estudi es va obtenir que en cada etapa es consumia un valor mitjà de 216,2 g DMF, 122,8 g DCM i 43,6 ml de piperidina. Per fer el cost es va aproximar els volums a 220 g DMF, 130 g DCM i 50 ml de piperidina, aconseguint un cost total de 108€.

Quant a l'etapa 8 de la metodologia, on es recull en un matràs de fons rodó el líquid obtingut dels tractaments fets per separar el pèptid del suport sòlid, s'afegeix metanol per facilitar l'evaporació del TFA. També cal remarcar que aquest procés és tediós i lent, per millorar-lo caldria tenir el condensador del rotavapor a temperatures molt inferiors per millorar la condensació i, el mateix passa amb el matràs col·lector, el qual a menor temperatura milloraria el procés de condensació.

Mitjançant la tècnica MALDI-TOF es va obtenir un espectre de massa, figura 4, compost pels diferents pics (m/z) obtinguts després de la ionització i desorció del pèptid. L'espectre presenta un rang de masses d'entre 1000-2200 Da, en el qual s'observen 11 pics: 1111,344; 1219,172; 1308,603; 1353,442; 1420,937; 1442,922; 1458,896; 1584,008; 1605,973; 1643,006 i 1665,014 Da. Els diferents pics observats en l'espectre poden correspondre al pèptid amb diferents càrregues, la pèrdua o l'addició d'un o més aminoàcids, diferents fragments generats durant la ionització, etc. S'ha fet una anàlisi i interpretació d'aquests pics per fer un estudi de les possibles modificacions que s'han pogut donar.

Com s'ha dit anteriorment, els pics 1420,937; 1442,922; 1458,896 corresponen amb el pèptid estudiat, BP100, en concret $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ i $[M + K]^+$, respectivament.

Els pics amb una massa de 1458,896; 1584,008; 1605,973; 1643,006 i 1665,014 s'han assignat mitjançant una anàlisi de deducció:

- Pic 1458,896: Presenta una intensitat major que la resta. Aquest pot ser degut a l'addició d'una Tirosina de més a la molècula principal, $[M+Y]^+$.
- Pic 1605,973: S'ha deduït que pot ser degut a l'addició d'un aminoàcid de més, en aquest cas Fenilalanina o Tirosina, més un sodi o un potassi, $[M+Y+Na]^+$ o $[M+F+K]^+$.
- Pic 1643,006: Presenta una intensitat bastant elevada, això pot ser al fet que el grup protector Fmoc no s'hagués eliminat correctament, $[M+Fmoc]^+$.
- Pic 1665,014: Finalment, aquest pic correspon a la suma del pic anterior més una molècula de sodi, $[M+Fmoc+Na]^+$.

6. CONCLUSIONS

In my Final Degree Project, my two main objectives were to synthesize the BP100 peptide and to carry out a study on the cost of this peptide so that it could serve as a reference. The aim of the study has been to deepen the knowledge acquired during the degree and thanks to having obtained satisfactory results in the synthesis of the peptide it has been possible to carry out the other objectives set out at the beginning of the work, such as the accounting and the study of variables that may occur in the synthesis.

The solid-phase method was chosen because it is the most sustainable and efficient method, whose main advantages are its rapidity and ease of performance. The results achieved show that the target peptide has been synthesized in optimum yield

and with adequate purity. The fact that this method has been used has made it possible to reduce costs, since it uses fewer solvents and reagents. On the other hand, it is worth mentioning the importance of using the Fmoc/tBu method to reduce the impact and use of solvents that are not suitable for this synthesis. The use of this method allows the use of very precise quantities of reagents and amino acids, which reduces excessive consumption, minimizes waste and, therefore, reduces total costs. These factors make it an economically viable method for obtaining peptides in an effective and affordable way. Regarding the results obtained, part of the total cost is due to the resin and the solvents, which correspond to 40% and 31% of the total cost, respectively.

As for the analytical techniques used, HPLC and MALDI-TOF have been used for the analysis and characterization of the peptide. HPLC is a technique that allows the separation and purification of complex samples, offers a high resolution that allows the precise detection and quantification of compounds in a sample, is a very sensitive technique and allows quantitative and qualitative analysis. On the other hand, MALDI-TOF allows rapid and direct analysis of samples, is extremely sensitive, i.e., it allows the detection of peptides at very low concentrations, allows very precise identification of molecular mass and is suitable for analyzing complex samples. In both cases, these are techniques that do not require high sample preparation times or complex sample preparation and are therefore quite simple to perform. Therefore, the use of these techniques has allowed us to verify and demonstrate that the BP100 peptide has been successfully synthesized using the solid-phase method.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Oliveras Rovira, À., Planas i Grabuleda, M., & Feliu Soley, L. (2021). *Síntesi de lipopèptids i de pèptids conjugats derivats de BP100: caracterització estructural de lipopèptids lineals i cíclics*. Universitat de Girona
2. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
3. Wadhvani, P., Strandberg, E., van den Berg, J., Mink, C., Bürck, J., Ciriello, R. A. M., & Ulrich, A. S. (2014). Dynamical structure of the short multifunctional peptide BP100 in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1838(3), 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.001>
4. Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>
5. Gutte, B. (2006). Robert Bruce Merrifield (1921-2006). *Angewandte Chemie*, 118(33), 5538–5539. <https://doi.org/10.1002/ange.200602806>
6. Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2006). The Solid Phase Synthesis of Ribonuclease A by Robert Bruce Merrifield. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(26), e21–e23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)55702-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)55702-5)
7. Garay Perez, E., González López, L. J., Albericio Palomera, F. (2012). *Síntesis de péptidos modificados químicamente con posibles aplicaciones farmacéuticas*. Universidad de la Habana.
8. Nandhini, K. P., Albericio, F., & de la Torre, B. G. (2022). 2-Methoxy-4-methylsulfinylbenzyl Alcohol as a Safety-Catch Linker for the Fmoc/tBu Solid-Phase Peptide Synthesis Strategy. *Journal of Organic Chemistry*, 87(15), 9433–9442. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01057>

9. Palomo, J. M. (2014). Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Advances*, 4(62), 32658–32672. <https://doi.org/10.1039/c4ra02458c>
10. Rodríguez, J. A. (1987). Manual de prácticas de bioquímica. Recuperat de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020111502/1020111502.PDF>
11. Carbodiimida. (2019, 23 d'octubre). Wikipedia, La enciclopedia libre. Data de consulta: maig 3, 2023 des. <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Carbodiimida&oldid=120685611>.