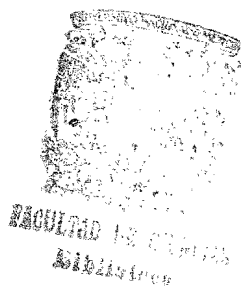




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO SOBRE EL METODO DE MERRIFIELD  
DE SINTESIS DE PEPTIDOS POR FASE SOLIDA**



1971

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A

**ERNESTO W. OECHLER GALICIA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A PATRICIA, MI ESPOSA, POR SU VALIOSO ESTIMULO, COMPRESION Y CARIÑO.

A MIS HIJOS: GENIE, ERNESTO, Y MONICA, CON UNA GRAN ESPERANZA Y MI  
ETERNO CARIÑO.

A MIS PADRES Y HERMANOS, CON CARIÑO.

DESEO TESTIMONIAR MI AGRADECIMIENTO IMPERECEDERO AL SR. DR.  
PATRICIO AGUIRRE A. Y A SU SEÑORA ESPOSA VICTORIA EUGENIA BA-  
RROSO DE AGUIRRE, POR SU APOYO Y SINCERA ESTIMACION.

AGRADEZCO AL BILOGO JAVIER TABOADA RAMIREZ  
SU DIRECCION PA RA LA FORMACION DE ESTE TRABAJO.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Y A MIS MAESTROS CON RESPETO Y ADMIRACION.

LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTE TRABAJO SE REALIZO  
EN LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACION BIOQUIMICA--  
DEL WARNER LAMBERT RESEARCH INSTITUTE, MORRIS --  
PLAINS, NEW JERSEY, U.S.A.

# CONTENIDO

## I.- INTRODUCCION

## II.- TEORIA

### A) DESCRIPCION DEL METODO

- a) El soporte sólido
- b) Acoplamiento al soporte sólido
- c) Protección del grupo amino terminal
- d) Formación del enlace peptídico
- e) Liberación de la resina

### B) APLICACIONES ESPECIFICAS Y SINTESIS AUTOMATICA

- a) Síntesis de bradikina
- b) Síntesis de angiotensina
- c) Síntesis de insulina

### C) PRINCIPALES MODIFICACIONES AL METODO DE MERRIFIELD

## III.- SINTESIS DEL DIPEPTIDO GLICIL-L-FENILALANINA

### A) MATERIAL Y EQUIPO

### B) PARTE EXPERIMENTAL

- a) Reacciones y procedimiento esquematizado
- b) Preparación de t-BOC L-fenilalanina
- c) Preparación de t-BOC glicina
- d) Proceso de esterificación
- e) Acoplamiento
- f) Desacoplamiento
- g) Identificación y caracterización

### C) DISCUSION

## IV.- APENDICE

## V.- BIBLIOGRAFIA



## ABREVIATURAS

t-BOC	t-butil oxi carbonil-
Cbz	Carbobenzoxi -
DMF	Dimetilformamida
TEA	Trietilamina
DVB	Divinilbenzeno
DCCI	N, N' dicitclohexil carbodiimida
TFA	Acido trifluoroacético
EtO Ac.	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
HO Ac.	Acido acético
HO Ac. Gl	Acido acético glacial
t-Bu	t-butil -
mM	milimol
(P)	Polímero

## I.- INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La síntesis de péptidos y proteínas es una de las funciones primordiales de la célula viva, y, la serie de intrincadas reacciones que la célula tiene que llevar a cabo para lograr su propósito, son aún poco conocidas; menos aún, pero no por eso menos interesantes, lo son las relacionadas con la estructura y función de péptidos biológicamente activos.

¿Cómo funciona una hormona y cómo podemos regular o modificar su acción? ¿Por qué las enzimas actúan como potentes agentes catalíticos específicos? ¿Cuál es la razón de la intensa actividad de las toxinas bacterianas; por ejemplo, las endotoxinas? ¿Cuál es el papel de los péptidos y proteínas en el control de la función genética?

Estas y muchas más preguntas podrán ser mejor comprendidas cuando podamos identificar y sintetizar, primero los productos activos, y posteriormente, compuestos análogos de los mismos. Por ejemplo, se podría sintetizar un análogo de la Insulina que mostrara una actividad más prolongada y con menos efectos colaterales para el tratamiento de la diabetes.

Mucho antes de que la biosíntesis de proteínas fuera relativamente comprendida, a principios de siglo, los químicos Fisher y Forneau (1) lograron en 1901 la síntesis del péptido glicil-glicina y desde entonces, se ha visto un esfuerzo constante por desarrollar nuevos y mejores métodos de síntesis.

De los avances más notables que fueron logrados en la década de 1950, tenemos la síntesis del nonapéptido oxitocina, efectuada por Du Vigneaud et al. (2).

Desde entonces, el interés por la síntesis de péptidos fue incrementando y muchos científicos se pusieron a tratar de encontrar soluciones a la multitud de problemas que esto representa.

Se logró entonces la síntesis de la hormona adrenocortico trópica, conteniendo 39 residuos de aminoácidos.

A principios de 1963 y como resultado del trabajo en equipo de varios investigadores, tres grupos de científicos: el primero en Estados Unidos, el segundo en Alemania y el tercero en China, tuvieron éxito en sintetizar una proteína comparativamente simple, la insulina, que es una hormona pancreática constituida por dos cadenas de aminoácidos con 21 y 30 residuos respectivamente.

Estos fueron por supuesto logros de gran trascendencia, ya que representan enormes cantidades de tiempo, energía, esfuerzo y materiales, además de una astuta planeación para la resolución del problema.

Desde la síntesis convencional de péptidos por métodos clásicos, hasta que en 1965 se logró la síntesis de la insulina se ha trabajado con un nuevo enfoque del problema que eventualmente ha sido llevado hasta la síntesis automática de polipéptidos, sueño largamente acariciado por varios científicos, que ahora es un hecho.

Se trata del proceso desarrollado por Merrifield (3,4), quien ideó el proceso por fase sólida. La idea básica partía de la posibilidad de anclar un aminoácido a un soporte sólido y de una manera progresiva, paso a paso, añadirle los residuos hasta lograr el péptido deseado, que entonces sería separado del material de soporte, aislado y purificado. De esta manera todos los reactivos usados, subproductos y contaminantes, serían fácilmente removidos por lavados y simple filtración, reduciendo considerablemente el tiempo necesario empleado para la síntesis, dando rendimientos más altos y productos más puros.

La primera parte de este trabajo presenta la teoría del Método de Merrifield y como segunda parte la descripción detallada de la síntesis de un dipéptido. El trabajo experimental del autor consistió en llevar a cabo la síntesis por fase sólida del dipéptido glicil-L-fenilalanina.

Está dirigido a los estudiantes de las Ciencias Biomédicas interesados en el problema de la síntesis de péptidos, ya sea por su importancia intrínseca, o probablemente, como un paso intermedio para logros de mayor trascendencia.

La síntesis del dipéptido se reseña con el mayor detalle posible, dando especial atención a las dificultades técnicas encontradas y las soluciones que se dieron para allanar estos problemas.

## II.- TEORIA

## DESCRIPCION DEL METODO DE MERRIFIELD

El método consiste en una síntesis en fase sólida, es decir, el aminoácido se mantiene unido a una resina insoluble; después de la adición de cada aminoácido a la cadena peptídica, el complejo péptido-resina debe ser purificado de la contaminación causada por el exceso de reactivos y productos secundarios de la reacción por simple filtración.

Al terminar de añadir el último aminoácido, se separa el péptido de la resina bajo condiciones de hidrólisis lo suficientemente suaves para que no afecten al enlace peptídico y razonablemente específicas para evitar reacciones laterales indeseables.

El péptido, en solución, es separado de la resina insoluble por filtración y de ser necesario cristalizado o purificado por los métodos clásicos de cromatografía o contracorriente.

### EL SOPORTE SOLIDO.

Para la síntesis por fase sólida se requiere de un soporte que tenga las siguientes características:

- A) Ser completamente insoluble en todos los solventes usados.
- B) Tener una configuración física y química estable.
- C) Proveer de una superficie amplia de reacción.
- D) Poderse substituir fácilmente con un grupo reactivo, al cual la cadena peptídica pueda anclarse por medio de un enlace covalente.
- E) Proveer de un enlace de fácil formación pero estable a través de la reacción de síntesis.
- F) Estructura que permita un lavado sencillo y filtración rápida.

Después de un largo proceso de pruebas fueron investigados muchos polímeros y modos de acoplamiento, entre ellos: celulosa, alcohol polivinílico, polimetacrilato y poliestireno sulfonado.

El polímero que dió mejores resultados y cubrió todos los requisitos, fue el copolímero clorometilado de estireno y divinilbenzeno. Esta resina además tiene la propiedad de hincharse en solventes no polares, dada la estructura semejante a un gel poroso que permite la rápida penetración de los reactivos, debido a una permeabilidad aumentada. Bajo ciertas condiciones, virtualmente todos y cada uno de los anillos aromáticos pueden ser substituídos.

Esto significa que si las condiciones lo requieren puede prepararse una resina en donde las reacciones no sólo ocurran en la superficie de la misma, sino también en el interior de la red de poliestireno (matriz), teniendo la ventaja de que puedan acomodarse un mayor número de moles de péptidos por unidad de peso del polímero.

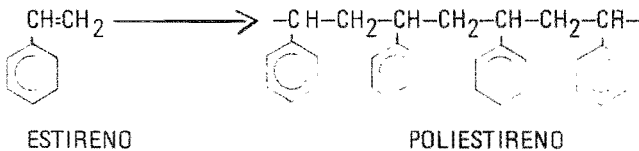
## ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RESINA (5)

Poliestireno.

El estireno polimeriza bajo una gran variedad de condiciones para dar poliestireno, que es un polímero de alto peso molecular, soluble en solventes aromáticos, clorinados y de los llama dos polímeros por agregación.

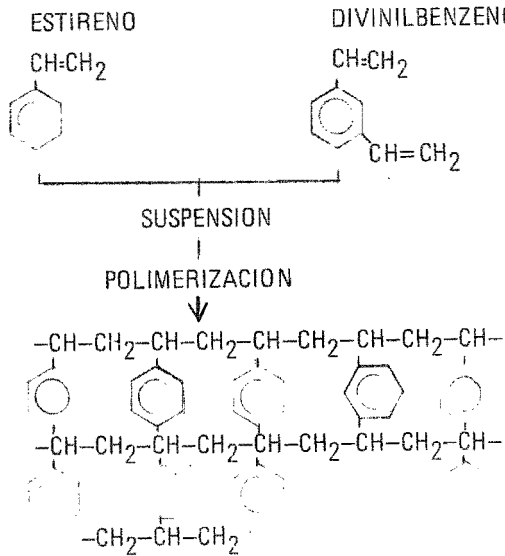
El monómero estireno puede ser polimerizado solo, (polimerización masiva) en solución o como una emulsión o suspensión en agua. En todos los casos, la velocidad de polimerización aumenta muy rápidamente con un aumento en la temperatura, o bien por el uso de catalizadores.

### POLIMERIZACION DEL ESTIRENO



Para la preparación de resinas, generalmente se emplea un copolímero de estireno y DVB - que, al polimerizar, lo hace en forma de una red tridimensional, enlazada a intervalos por unidades - de DVB que quedan incorporadas entre 2 cadenas lineales del poliestireno.

## COPOLIMERO DE POLIESTIRENO - D V B



El copolímero así obtenido no se fundirá y será insoluble en todos los solventes, aunque se hinchará en solventes orgánicos como benceno o tolueno, pero no en agua o soluciones acuosas. Cada partícula de esta resina podría considerarse como una "molécula gigante", en donde las cadenas eslabonadas del polímero se extenderían en cada partícula en todas direcciones.

La preparación del poliestireno, invariablemente se hace por suspensión - polimerización; la mezcla de monómeros se dispersa como pequeñas gotas en una solución acuosa y el copolímero es entonces obtenido en forma de pequeños glóbulos de 1mm., o menos de diámetro.

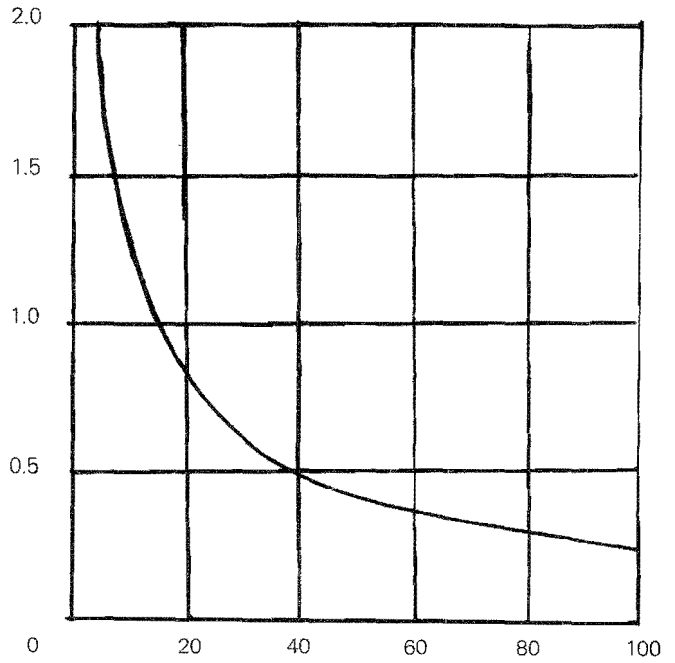
Estos glóbulos son muy estables y fáciles de manejar, evitándose también el desperdicio proveniente de la desintegración, como la de las resinas preparadas en forma masiva, ya que se puede obtener un tamaño de partícula predeterminado según el grado de agitación durante la preparación. Para prevenir el agregado de partículas durante su preparación, es conveniente el uso de algún agente emulsionante que actúe como estabilizador de la suspensión, tal como: alcohol polivinílico, bentonita, almidón o derivados celulósicos.

La proporción de divinilbenzeno puede ser variada sobre un amplio rango.

El grado al cual el poliestireno se hinchará en el solvente orgánico, dependerá del grado de enlaces transversales. Copolímeros que contengan una alta proporción de divinilbenzeno absorberán de 0.25 a 0.50 gr. de tolueno por gramo de resina. Si la proporción de divinilbenzeno es disminuída, el peso del tolueno absorbido aumenta rápidamente.



Gramos de tolueno absorbidos por  
gramos de resina.



Porcentaje de solución de divinilbenzeno, en mezcla monomérica.

HINCHAMIENTO DE POLIESTIRENO EN TOLUENO

Estos copolímeros de estireno y divinilbenzeno pueden obtenerse comercialmente con varios grados de enlaces transversales y diferentes tamaños de glóbulos. El usado generalmente para síntesis por fase sólida, es de glóbulos de 200—400 mallas.

Respecto a la proporción de divinilbenzeno más adecuada, se ha encontrado que la proporción 1<sup>o</sup>/<sub>o</sub> da glóbulos frágiles susceptibles de ser destruidos por la agitación mecánica necesaria para la síntesis, dificultando la operación de filtrado; por otro lado, una proporción mayor de 8 a 16<sup>o</sup>/<sub>o</sub> de divinilbenzeno resultó en una resina en donde los glóbulos eran muy rígidos y compactos, — evitando la fácil penetración de los reactivos y provocando una baja en la velocidad de reacción causando que las reacciones fueran incompletas.

Los mejores resultados que se obtuvieron fueron con una proporción de 2<sup>o</sup>/<sub>o</sub> de DV B, que una vez lavado con 1M NaOH, 1M HCl, agua, DMF, y MeOH, secado al vacío a 100°C, dió por resultado una resina de aspecto cremoso o blanquecino con el tamaño de glóbulos que varió entre 20 y 80 micras de diámetro, que es la resina generalmente usada para la síntesis por fase sólida.

## ACOPLAMIENTO DE LA CADENA PEPTIDICA AL SOPORTE SOLIDO:

### ESTERIFICACION

Para lograr un acoplamiento adecuado a la resina clorometilada, se requieren nuevamente - ciertas particularidades:

A) El enlace debe permanecer estable durante todas las reacciones del proceso, por lo cual debe ser un enlace de tipo covalente en lugar de uno de tipo iónico.

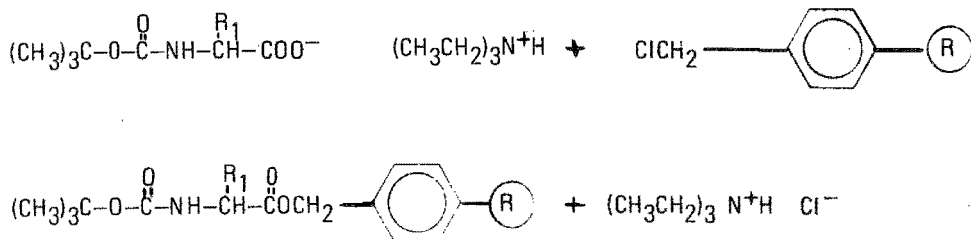
B) Reconocer que el proceso es diferente y distinto al proceso de  cromatografía por inter - cambio iónico.

C) En principio, el aminoácido puede ser acoplado ya sea por el grupo carboxilo o amino, y el péptido formado desde el grupo C - Terminal o N - terminal.

En la práctica, sin embargo, se encadena el grupo carboxílico del aminoácido C - terminal al polímero con el objeto de minimizar el peligro de racemización.

D) Los enlaces más adecuados pueden ser, por consiguiente, enlaces a través de ésteres, amidas y tal vez hidrazidas; pueden ser empleados por su estabilidad, pero deben ser capaces de permitir posteriormente un desacoplamiento de la resina al terminarse la síntesis bajo condiciones de hidrólisis selectiva que no rompa los enlaces peptídicos o algunos otros sitios sensibles de la cadena peptídica.

### REACCION DE ESTERIFICACION



De los diferentes modos de enlace, el que mostró ser más útil para la síntesis por fase sólida fue el derivado del éster benzílico, ya que es estable durante las reacciones de desprotección y acoplamiento de aminoácidos, y porque el péptido final puede ser fácilmente removido selectivamente de la resina por hidrólisis del éster con HBr o un medio ligeramente alcalino.

## SELECCION DEL PROTECTOR DEL GRUPO AMINO

Es de primera importancia la selección del protector del grupo amino terminal. Para ello se requiere:

- A) Que sea estable
- B) Fácil de preparar
- C) Que minimice la recemización durante el proceso de síntesis y
- D) Que pueda ser removido bajo condiciones tales que no afecten el enlace péptido o el enlace a la resina.

Antes de llevar a cabo el acoplamiento de cada residuo de aminoácido, es necesario determinar previamente cual es la configuración del péptido a sintetizar. Los aminoácidos son compuestos que poseen varios grupos reactivos: básicamente un grupo amino ( $-NH_2$ ), y uno carboxilo ( $-COOH$ ). En muchas ocasiones se encuentran otros localizados en cadenas laterales.

De una manera general, todos menos uno, de los grupos reactivos deben ser bloqueados, esto es, inactivados químicamente protegiéndolos de reacciones no deseadas. Al mismo tiempo que los grupos reactivos que no se desea que intervengan en la reacción son bloqueados selectivamente, es posible activar el grupo escogido para reaccionar, incrementando su nivel energético, de tal manera que pueda reaccionar con el grupo reactivo activado de otro aminoácido para formar el enlace peptídico.

Originalmente se usó el grupo Cbz como bloqueador del grupo alfa-amino por el bien conocido método de Bergmann (6), ya que cumple con los tres primeros requisitos satisfactoriamente, aunque con el último solo bajo condiciones especiales. En la síntesis normal de péptidos el Cbz es ampliamente usado, sin embargo, en el presente caso no es el mejor grupo de elección, ya que la hidrólisis de los grupos Cbz puede en general ser lograda por hidrogenación catalítica o por el uso de HBr anhidro; sin embargo, la hidrogenación no es posible, ya que requiere un catalizador que es sólido y éste no es efectivo, pues el sustrato también es sólido, además se observó que las condiciones ideales para el desacoplamiento del grupo protector atacaban al éster benzílico con el que estaba unido el aminoácido a la resina.

Se hicieron pruebas con el objeto de mejorar el método y se estudiaron los derivados naftalénicos de formilo, tritilo, y 2 hidroxil-1 naftaleno, que no resultaron convenientes para las condiciones particulares empleadas.

Se logró un gran avance con el uso del grupo (t-BOC) como protector. Este grupo cumple con todos los requisitos necesarios, es fácilmente hidrolizable bajo condiciones más suaves, con HCl 1N en HOAc, el t-BOC puede ser removido cuantitativamente en unos cuantos minutos sin afectar sensiblemente al enlace éster benzílico de la resina. Y es posible entonces liberar al péptido completo de la resina por medio de HBr en TFA en condiciones ácidas que eliminan el peligro de la racemización.

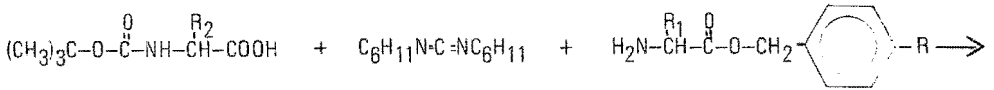
## FORMACION DEL ENLACE PEPTIDICO

Los requerimientos que se imponen por el método de fase sólida tienden a ser más rigurosos que los de los métodos convencionales.

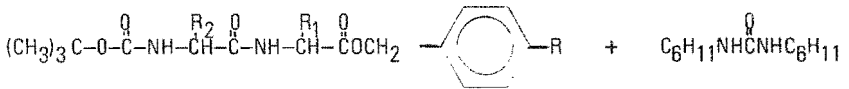
Es necesario y esencial que este paso de la reacción sea forzado hacia una reacción cuantitativa completa en cada paso, ya que de no ser así existe el peligro durante la formación de la cadena, de que se formen cadenas incompletas, a las que les faltaría uno o más de los aminoácidos del péptido, los cuales se acumularían contaminando el producto final y serían difíciles de separar.

Como activador para la formación del enlace peptídico, se usó con buen éxito la DCCI, — con lo que se lograron rendimientos cercanos al 100%.

### FORMACION DEL ENLACE PEPTIDICO MEDIANTE DICICLOHEXILCARBODIIMIDA (DCCI)



DCCI



DIPEPTIDO

DICICLOHEXILUREA

El intermediario activo formado entre la DCCI y el t-BOC aminoácido es extremadamente reactivo y se acopla muy rápidamente con el grupo amino libre al final de la cadena peptídica. El exceso de reactivos es fácilmente removido por filtración después de cada acoplamiento.

Estudios referentes a la velocidad de reacción indican que ésta es completa en 30 min. a pesar de ser un sistema heterogéneo los altos rendimientos se deben a los solventes que producen el hinchamiento de la resina (casi al doble de su tamaño original), y que al mismo tiempo tienen una constante dieléctrica alta.

Solventes tales como DMF o cloruro de metileno, son efectivos, mientras que benceno, dioxano, etanol y agua no lo son.

Dado que el uso de DMF favorece la formación de acil urea se prefirió el uso del cloruro de metileno, que en proporción de 2:1 asegura una completa acilación del grupo N-terminal del aminoácido.

En este solvente y a temperatura ambiente, con un exceso de 50% del t-BOC aminoácido, la reacción es cuantitativa y completa en pocos minutos. El subproducto, dicitohexilurea, aunque relativamente insoluble en la mayoría de los solventes, es fácil y rápidamente removido del complejo péptido-resina por lavados con EtOH y HOAc. Cualquier cantidad del contaminante amino acil-urea es también removido al mismo tiempo por filtración.

#### LIBERACION DEL PEPTIDO DE LA RESINA.

El último paso consiste en hidrolizar el enlace del éster benzílico que ha mantenido al péptido unido a la resina durante todo el proceso de la síntesis. Como se indicó anteriormente, este tipo de unión fue escogido por ser estable durante la síntesis y puede ser removido selectivamente en el tiempo preciso sin alterar la cadena peptídica.

La resina se suspende en TFA y se burbujea HBr anhidro, dentro del frasco de reacción para producir el desacoplamiento. Estos reactivos también liberan al mismo tiempo los grupos protectores laterales de la cadena.

El péptido -por primera vez en soluciones- es separado por filtración y purificado, de ser necesario, por los métodos usuales de cromatografía o contrarriente. Puede entonces ser analizado y, cuando es posible, ensayado biológicamente para demostrar su potencia.

II.- B) APLICACIONES ESPECIFICAS Y SINTESIS AUTOMATICA.

## APLICACIONES ESPECIFICAS.

El proceso que se acaba de describir parecerá que presenta algunas similitudes con el mecanismo de síntesis de proteínas en la célula viva. Ambos procesos dependen de un soporte en forma de partículas, en el caso de la célula, el ribosoma; ambos implican la activación del aminoácido; en la célula, el aminoácido es activado por la molécula rica en energía ATP (Adenosin trifosfato); y ambos procesos se llevan a cabo por medio de pasos consecutivos hasta formar el producto deseado.

La analogía no debe ser tomada en forma rigurosa, ya que la síntesis natural es mucho más rápida, elegante y eficiente que la lograda en el laboratorio, y no se puede todavía competir con el complejo proceso de la célula en este punto.

De hecho, esta síntesis por fase sólida no se planeó originalmente copiando el patrón seguido por la célula, sino que fue posteriormente cuando las similitudes se hicieron evidentes.

En un principio, todo el proceso se ideó con el propósito de lograr la síntesis automática de péptidos como una de las aplicaciones específicas, que actualmente es un hecho.

## SINTESIS AUTOMATICA.

En última instancia, la idea original de Merrifield (7, 8), fue lograr un sistema de síntesis simplificada que pudiera ser automatizada. La decisión original de sintetizar la cadena peptídica unida a un soporte insoluble, fue basada en la idea de que este tipo de truco podría darnos una mejor oportunidad de lograr el objetivo. Uno de los factores más importantes, es que toda la síntesis y los pasos intermediarios de purificación se llevan a cabo en el mismo frasco.

Se construyó un aparato que puede efectuar estas operaciones en forma automática por medio de un ciclo programado en donde los reactivos y solventes son introducidos conforme a una previa secuencia establecida para la adición de cada aminoácido. Al final de cada ciclo, el aparato se auto-ajusta y empieza el nuevo ciclo automáticamente, que consiste en exactamente la misma serie de pasos, sólo que se adiciona un nuevo aminoácido.

Hoy en día, es posible adquirir comercialmente un sintetizador automático de péptidos, que basado en el método de Merrifield para la síntesis por fase sólida, y constituido por un sistema modular consistente de unidades de control, reactivo y reactor, automáticamente dicta la secuencia, volúmenes y tiempos de mezclado para reactivos y solventes según el programa previamente determinado por el operador. El aparato trabaja 24 horas por día. Resultado: la síntesis de péptidos es acelerada y el personal liberado para efectuar otras funciones. Con este aparato, las técnicas, secuencias y ventajas del método de fase sólida son retenidas, mientras que el tedioso procedimiento manual es virtualmente eliminado.



Se lograron sintetizar varios di, tri y tetrapéptidos introduciéndose mejoras experimentales al método, hasta que finalmente se logró la síntesis de péptidos biológicamente activos como la bradikinina, angiotensina e insulina.

Como ilustración ejemplificada del método, se describirá brevemente el proceso de síntesis por fase sólida de algunos péptidos de importancia biológica:

### BRADIKININA

Este importante nonapéptido fue primeramente reconocido en plasma tratado con veneno de serpiente o tripsina. Su función fisiológica normal no ha sido totalmente esclarecida, se sabe que es un agente hipotensivo potente, aumenta la permeabilidad capilar, causa constricción bronquial, dolor, inflamación y hace que los músculos lisos se contraigan.

La síntesis de la bradikinina, y especialmente de análogos adecuados, es importante para la comprensión futura de su mecanismo de acción.

El péptido contiene los aminoácidos polifuncionales, arginina y serina, además del iminoácido prolina. Su actividad biológica podría usarse para determinar la pureza del producto obtenido.

### PROCESO EJEMPLIFICADO DE LA SINTESIS: (SEGUN MERRIFIELD 9, 10).

El copolímero de estireno 20/o divinilbenzeno es clorometilado y luego esterificado con la sal trietilamónica del t-BOC-nitro-L-arginina, el grupo protector removido con HCl 1N en ácido acético, el clorhidrato resultante neutralizado por un tratamiento de TEA en exceso.

La base libre es entonces acoplada con t-BOC L-Phe, con la ayuda de DCCI. Estos últimos tres pasos constituyen un ciclo de la síntesis, es decir, el aumento de la cadena por un residuo de aminoácido. Los residuos restantes fueron acoplados de una manera similar, repitiendo el ciclo siete veces más con el derivado del aminoácido adecuado hasta la obtención del nonapéptido:

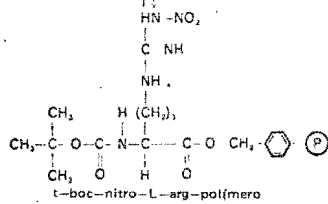
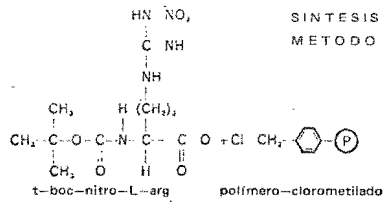
t-BOC nitro-L-Arginil-L-Prolil-L-Prolilglicil-L-Fenilalanil-orto-Benzil-L-Seril-L-Prolil-L-Fenilalanil-nitro-L-Arginil-Copoliestireno divinilbenzeno.

El péptido protegido es removido de la resina por medio de tratamiento con HBr TFA, estos reactivos también liberan el t-BOC. N-terminal y el enlace éter del residuo orto-benzil serina. Los grupos nitro son removidos por hidrogenolisis usando negro de paladio como catalizador, dando así el péptido libre.

El rendimiento y la homogeneidad del producto, tanto como su actividad biológica, fueron extremadamente buenos comparados con el péptido natural.

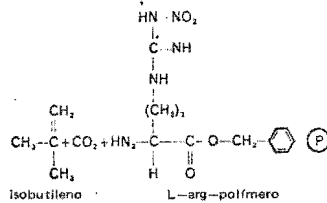


SINTESIS DE BRADIKININA POR EL  
METODO DE FASE SOLIDA .

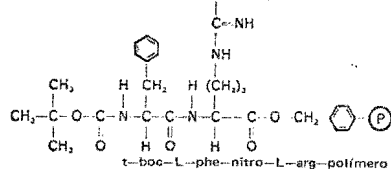


2 | HCl CH<sub>3</sub>COOH

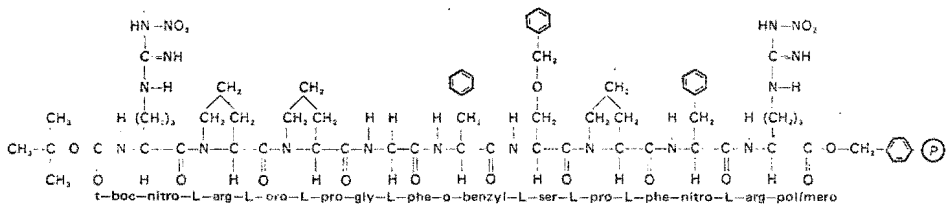
3 | Et<sub>3</sub>N dimetilformamida



4 | t-boc-L-phe  
dichlorohexilcarbodiimida  
HN-NO<sub>2</sub>

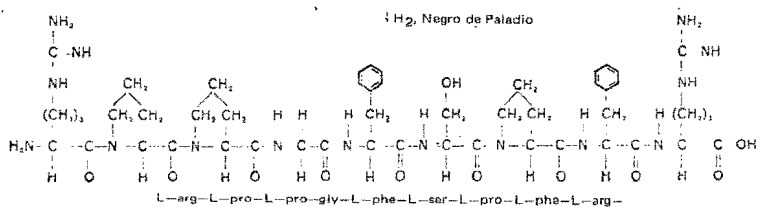


Repetir pasos 2, 3, 4, siete veces más  
usando los aminoácidos adecuados.



↓ HBr·F<sub>3</sub>CCOOH

↓ H<sub>2</sub>, Negro de Paladio



BRADIKININA

## SINTESIS DE ANGIOTENSINA II

La síntesis de este importante octapéptido hipertensivo, fue de interés porque se sabía de antemano, que una vez lograda ésta, el nuevo método proveerá una ruta rápida y simplificada hacia la síntesis de varios análogos de la hormona, tal y como se ha logrado en el caso de la bradikinina. Además, la síntesis de la angiotensina, nos provee de otras pruebas para la eficacia del método, dado que contiene cinco aminoácidos nuevos que no habían sido introducidos aún por éste método, ya que para que el mismo tenga un valor eficaz, debe éste de poder tratar con todos los aminoácidos.

El enfoque general se llevó a cabo exactamente como en el caso de la bradikinina. Todos los aminoácidos se usaron como derivados del N(alfa)-t-BOC, con los siguientes grupos protectores adicionales para los aminoácidos trifuncionales: tirosina-o-benzil éter, imidazol-benzil histidina, nitroarginina, y beta-benzil aspartato.

Todos fueron acoplados por el procedimiento de la DCCI. El octapéptido protegido fue desacoplado de la resina con HBr, con la pérdida simultánea de los éter y éster benzílicos.

Los residuos de benzil histidina y nitroarginina, fueron finalmente desprotegidos por hidrogenolisis con paladio-BaSO<sub>4</sub> como catalizador.

Se obtuvo un rendimiento general de 56<sup>0</sup>/o de 5-ileucina-angiotensina II como un péptido homogéneo.

El producto mostró actividad biológica total en el ensayo con útero en la rata.

## SINTESIS DE INSULINA

La molécula más pequeña que podemos considerar como una verdadera proteína es la insulina, la cual se escogió para la síntesis por fase sólida, no sólo por su tamaño, sino también por otras variadas e importantes razones.

La disponibilidad de esta hormona sintética nos ayudaría a contestar muchas preguntas referentes a su mecanismo de acción. La molécula de insulina es mucho más compleja que un simple péptido como la bradikinina o la angiotensina. No solamente posee cerca de seis veces más aminoácidos, sino que también tiene una gran variedad de ellos: 17 en lugar de 5. Esto introduce muchos nuevos problemas para la protección de las cadenas laterales. Particularmente complicada es la presencia de tres enlaces disulfuro (S-S) como enlaces transversales entre las unidades de cisteína.

La insulina consiste de dos cadenas de péptidos lineales: la cadena A, con 21 residuos de aminoácidos y la cadena B, con 30. Están unidas por los puentes disulfuro entre las dos cadenas, además de la presencia de un enlace disulfuro inter-cadena. La molécula tiene una conformación tridimensional definida.

## SINTESIS AUTOMATICA DE LA INSULINA

Un gran número de investigadores han trabajado en la síntesis de insulina y han producido pequeñas cantidades del péptido.

Con el fin de producir cantidades útiles de insulina, se llevó a cabo la síntesis de la misma por el método de fase sólida automatizado. Los resultados han sido muy alentadores, aunque se tuvieron que llevar a cabo más de 5,000 operaciones separadas para acoplar los 51 aminoácidos, la mayoría de ellas se llevaron a cabo automáticamente por medio de un programador de tambor, de tal manera que fue posible para un solo hombre llevar a cabo la síntesis de ambas cadenas en cuestión de pocos días.

Se comenzó preparando aproximadamente 2 grs. de la cadena A, protegida y 8 grs. de la cadena B. La reacción que desacopló las cadenas peptídicas de la resina, también removió los grupos laterales protectores, quedando sólo los grupos benzil, de la cisteína e histidina que fueron removidos por reducción con sodio metálico en amoníaco. Puesto que los grupos de la cisteína que quedaron en forma reducida, fueron inestables para los pasos de purificación, se estabilizaron por conversión hacia S-sulfonatos (S-SO<sub>3</sub>).

En esta forma, las dos cadenas peptídicas fueron purificadas por tres métodos:

- A) Filtración la cual depende del tamaño molecular.
- B) Distribución por contracorriente, la cual depende de la solubilidad diferencial y
- C) Electroforesis, la cual depende de la carga eléctrica.

Los productos resultantes fueron homogéneos para estos criterios.

El paso final fue la combinación de las dos cadenas purificadas de la insulina. Primero, los sulfonatos de la cisteína se convirtieron de nuevo a la forma S-H activa y luego, se unieron las dos cadenas por oxidación lenta con aire de las formas S-H de ambas cadenas.

Se obtuvo la insulina sintética, la hormona fue activa en los ensayos biológicos usuales que están basados en la cantidad que debe ser inyectada en ratones para provocar una baja en el azúcar sanguíneo que cause convulsiones en un 50% de los ratones experimentados. Comparativamente no se observó ninguna variación en referencia a la hormona natural.

II.- C) PRINCIPALES MODIFICACIONES AL METODO DE  
MERRIFIELD.

## PRINCIPALES MODIFICACIONES AL METODO DE MERRIFIELD

### PROPUESTAS HASTA 1968.

Paralelamente a la elaboración del trabajo experimental se llevó a cabo el Congreso No. 155 de la Sociedad Química Americana (Marzo 31—Abril 15, 1968) del cual se incluyen las siguientes comunicaciones por considerarlas de gran interés.

JOHN C. SHEEHAN del Instituto de Tecnología de Massachusett, comunica una revisión de los diferentes grupos protectores del carboxilo y amino de los aminoácidos usados en síntesis de péptidos, y además nuevas técnicas de protección selectiva de los grupos carboxilo y tiol.

Los grupos protectores del N-Amino terminal son en orden de frecuencia de uso:

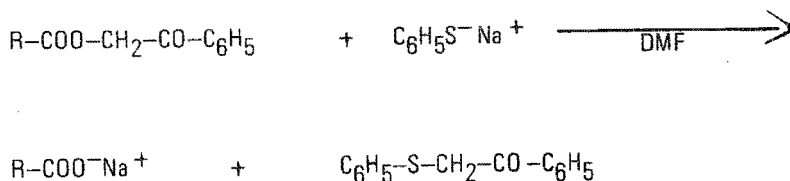
Cbz	Arilsulfenil
t-Boc	Triflouroacetil:
Etaloil	Formil
Tritil	Tosil

Grupos protectores del grupo carboxilo.

Benzil	Etil
t-Butil	Fenacil (PAC)
Metil	Difenilmetil

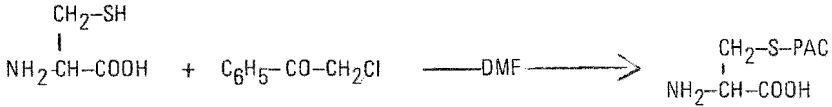
Los métodos aplicados para la remoción de estos grupos de bloqueo son muy similares, lo que constituye una característica indeseable.

El grupo PAC,  $C_6H_5-CO-CH_2$  introducido por Sheehan y Daves en 1966, es algo diferente a los otros grupos protectores. Se remueve por medio de un agente altamente nucleofílico, el tiofenóxido de sodio bajo condiciones muy suaves, en DMF a temperatura ambiente.



REMOCION DEL GRUPO PROTECTOR PAC CON DMF.

EL PAC tiene además la característica de bloquear selectivamente los grupos tiol de la cisteína.



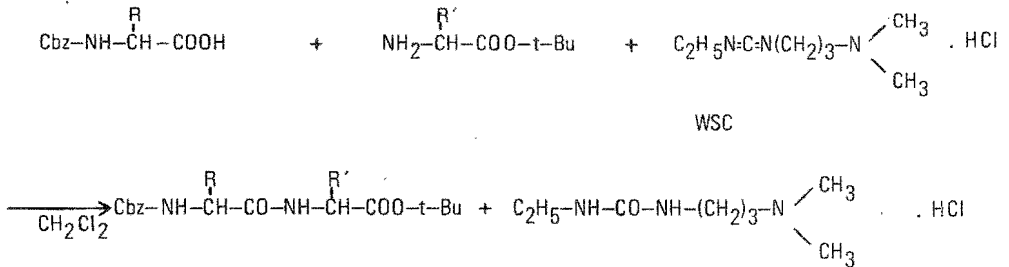
### PROTECCION SELECTIVA DE LOS GRUPOS TIOL POR MEDIO DEL PAC.

Los compuestos S - Fenil no reaccionan con HBr, HO Ac o solución acuosa de Na OH - pero pueden ser removidos con Na OCH<sub>3</sub> en metanol.

Sheehan también discute los métodos de acoplamiento que de acuerdo a su popularidad y frecuencia de uso son DCCl, carbodiimida hidró soluble (WSC), mezclas de Anhídridos y ésteres activos, por ejemplo:

P - NO<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>S, OCH<sub>2</sub>CN  
carbonil diimidazol, cloruro ácido, sales de isoxazolium

Reporta un esquema para la síntesis rápida de un oligopéptido sin el aislamiento de intermedios.



### SINTESIS RAPIDA DE PEPTIDOS USANDO WSC

La síntesis se completa en menos de una hora y el producto es purificado lavándolo con NaHCO<sub>3</sub> y HCl diluido. La eficiencia del método y su rendimiento, son altos. La hidrogenación desprotege el grupo amino del péptido y se puede seguir un nuevo ciclo.

El proceso se repite hasta la obtención del oligopéptido deseado.

GARLAND R MARSHALL Universidad Washington, San Luis Missouri. Da a conocer aplicaciones del método en fase sólida para la síntesis de ciertos análogos del glucagon conteniendo triptofano.

También comunica la capacidad del método para lograr la incorporación de los 20 residuos de aminoácidos más comunes por medios automáticos.

En la síntesis de péptidos que contienen triptofano se encuentran serios problemas, debido a la destrucción de éste aminoácido durante los diferentes pasos involucrados.

Se encontró que la adición de mercaptanol al 10% en 1N HCl/HOAc, usado para la remoción del grupo protector t-BOC, protege completamente al triptofano de la oxidación. Se observan recuperaciones en un 100% de este aminoácido.

El desacoplamiento del péptido protegido de la resina, con HBr/CF<sub>3</sub>-COOH, destruye al rededor del 50% del triptofano presente; pero cuando este paso se lleva a cabo con HF anhidro, no se registran pérdidas de triptofano.

La incorporación de histidina a una cadena peptídica, también presenta problemas particulares a menos que se proteja debidamente su cadena lateral. Varios grupos protectores han sido tratados, principalmente: benzil, carbobenzoxi y dinitrofenil.

La remoción del grupo benzil se lleva a cabo por hidrogenación, pero en algunos péptidos, esto da lugar a dificultades.

El Cbz es muy sensible a los alcalis y es removido aún con MeOH.

El grupo dinitrofenil es muy prometedor, puede ser removido por agentes nucleofílicos, pero existen evidencias de que es eliminado aún durante la neutralización del HCl/TEA.

Durante la síntesis por fase sólida del péptido con la secuencia Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Pro, la incorporación de la histidina como el siguiente aminoácido, se observó que sólo se había logrado en un 20%.

Se encontró que trabajando con resinas de DVB y reemplazando el HOAc por dioxano en una solución de 1N HCl se obtuvo un 100% de incorporación.

JOHN STEWART Instituto Rockefeller, New York, hace saber las dificultades encontradas para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina. Todos los experimentos tuvieron éxito, con la excepción de los relativos a glutamina y triptofano. Para aminoácidos tales como metionina, cisteína, e histidina, es preferible usar:

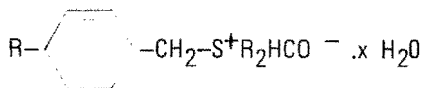
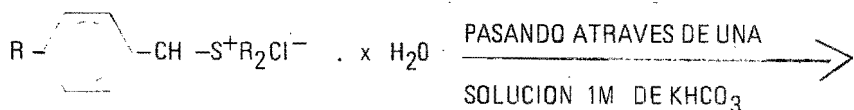
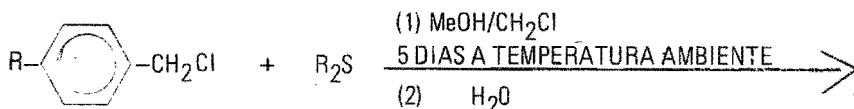




hidroxi, por medio de una reacción en dos pasos, el aminoácido es esterificado a la resina usando como agente acoplante la DCCl. Este método, aunque produjo una mejora en los rendimientos de esterificación, requiere de mayores cantidades del aminoácido protegido. Estos dos métodos han sido insatisfactorios para la incorporación de glutamina.

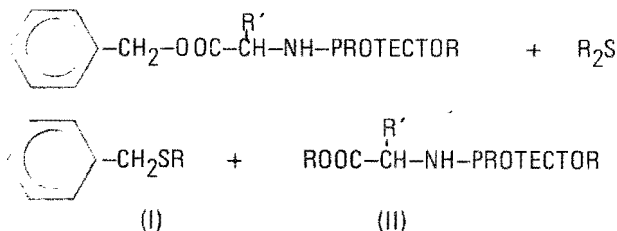
Dorman et al. han mejorado el paso de esterificación mediante el uso de resinas sulfonadas, en particular, usando una resina sulfonada básica, en la cual el cloruro ha sido reemplazado por  $\text{HCO}_3^-$  o por  $1/2 \text{CO}_3^{2-}$ , con excelentes resultados.

La preparación de la resina es como sigue:



Cuando esta resina sulfónica básica, es mezclada con una solución de dioxano conteniendo cantidades estequiométricas del aminoácido protegido, ocurre una reacción de neutralización, que es seguida por un cambio iónico del  $-\text{HCO}_3^-$  por el anión  $-\text{COO}^-$  del aminoácido. Secando la mezcla a temperatura ambiente bajo vacío y posteriormente calentándola por 4 ó 5 horas a  $80 - 85^\circ\text{C}$ , la esterificación procede esencialmente hasta su terminación (I).

También se forman en pequeña cantidad, ésteres de alquilo (II), pero son removidos con facilidad de la resina.



Esta nueva resina modificada ofrece varias ventajas sobre las otras. Glutamina puede ser esterificada a la resina con éxito. Sólo se necesitan cantidades estequiométricas de los aminoácidos, y

como no están presentes bases externas, los problemas de racemización disminuyen. Los rendimientos de esterificación son muy altos, del orden de 85 – 95<sup>o</sup>/o.

J.H. JOHNSON, Monsanto Company, St. Louis, Mo., comunicó que la síntesis de péptidos por fase sólida no es tan simple como ha sido sugerida por otros investigadores. Cada péptido ofrece sus propios problemas, que tienen que ser solucionados por una serie particular de condiciones. El tiempo involucrado en encontrar estas condiciones muy bien podría exceder el tiempo de síntesis usado por los métodos clásicos. Sin embargo, una aplicación potencial podría encontrarse para la preparación industrial en gran escala de péptidos después de todo, los problemas de síntesis particulares ya han sido ensayados. Ciertamente se pueden preparar cantidades mayores por el método de fase sólida, en menos tiempo y con menos inconvenientes, y normalmente se obtienen altos rendimientos.

Los fragmentos sintetizados de la molécula de la hormona del crecimiento humano, fueron estudiados por las características poco comunes que ofrecen sus residuos hidrofóbicos y hidrofílicos, y sus interacciones con la resina polimérica.

Se observó una baja en la producción de la cadena peptídica después del primero o segundo residuo, especialmente con aminoácidos que son hidrofóbicos, tales como fenilalanina y benzil tirosina. Este problema no se observó con glicina, nitroarginina y otros.

Sheraga y colaboradores, han reconocido fuertes interacciones no polares entre la resina poliestirénica y las porciones no polares de las moléculas orgánicas, tales como alcoholes y ácidos carboxílicos. Esto podría explicar el potencial de acoplamiento de la resina para algunos residuos, contribuyendo a su carencia para el acoplamiento en esta etapa.

Durante la síntesis por fase sólida de la hormona humana del crecimiento, fragmento 145-161, se encontró un marcado descenso en la producción de la cadena peptídica, cuando se intentó incorporar alanina después de Leu-Leu (en el 13avo. residuo). Sin embargo, es muy interesante observar que en la síntesis de la misma secuencia en esta hormona, pero en el fragmento 147-154, (que ocurre en el 6o. residuo), la alanina se incorporó correctamente sin haberse observado una baja en la producción. Probablemente el doblamiento del péptido más largo, crea una estructura terciaria que provoca una disminución en la cantidad de enlaces útiles.

Estos logros animaron a los investigadores en la búsqueda de nuevas resinas poliméricas, que presentaran características menos hidrofóbicas, y fue comunicada la síntesis de una nueva resina, N-clorometil maleimida-copolímero.

La capacidad de un aminoácido para acoplarse a esta resina, fue demostrada haciendo reaccionar N-acetil-glicina en la presencia de trietilamina y dimetilsulfóxido (DMSO). El análisis elemental demostró la remoción de todo el cloro. También se hizo notar que este acoplamiento puede llevarse a cabo bajo reflujo en etanol en condiciones similares al método de Merrifield. El paso de desacoplamiento puede llevarse a cabo con 1N HCl/HOAc. Gl., a temperatura ambiente, en 2 horas.

Dado que estos tipos de uniones son lábiles a las condiciones normales de remoción de los agentes bloqueantes, debería ser usado, un nuevo grupo bloqueador. Hoy en día, el uso de grupos -orto-nitrofenilsulfenilo para la protección de los grupos alfa aminos, está siendo investigado. Se ha encontrado que este grupo protector puede ser removido con cantidades estequiométricas de HCL, o también con reactivos nucleofílicos.

### III.- SINTESIS DEL DIPEPTIDO GLICIL – L – FENILALANINA

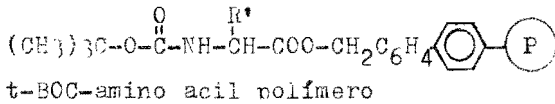
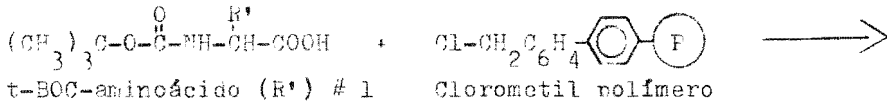
## A) MATERIAL Y EQUIPO

Formato de t-butil azida y t-BOC amino ácidos	Preparados como se describe en el texto - usando material grado reactivo.
N, N'- diciclohexilcarbodiimida	Mann Research Laboratories.
Dimetilformamida	Fisher Scientific Co.
Cloruro de metileno	Fisher Scientific Co.
1N HCl-ácido acético	Preparado haciendo pasar HCl gaseoso a -- través de ácido acético glacial.
Polímero clorometilado (Resina de Merrifield)	X-2 BIO BEADS 200-400 Mallas Cyclo - Chemical Co.
Trietilamina	Eastman Organic Chemicals.
Etanol absoluto	USP o NF reactivo certificado
Acido trifluoroacético anhidro	Eastman Organic Chemicals.
Acido acético glacial	USP o NF grado reactivo
Frasco de reacción	12 x 4 cm. acondicionado con un filtro de vidrio poroso en la base.
Agitador mecánico	Construído para rotar el frasco de reacción en un angulo de 90 grados, de la posición horizontal a la vertical a aproximadamente 30 rotaciones/min.
Placas de gel de sílice	Silica G (con sulfato de calcio) 5x20 cm. - Mann Research lab.
Analizador automático de aminoácidos.	Technicon
Autograde chamber	De nueve cámaras.

### III.- B) PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

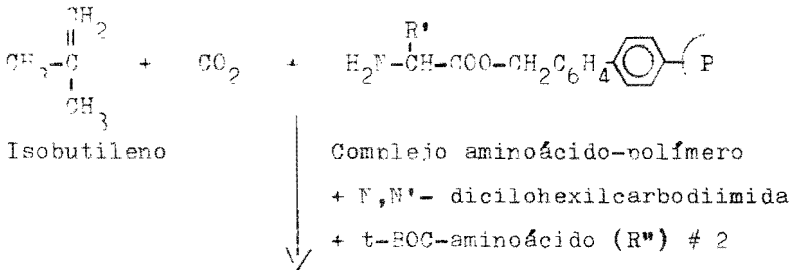
ESQUEMA GENERAL DE REACCIONES QUE SE LLEVAN A CABO DURANTE LA SINTESIS POR FASE SOLIDA.

I.-ESTERIFICACION

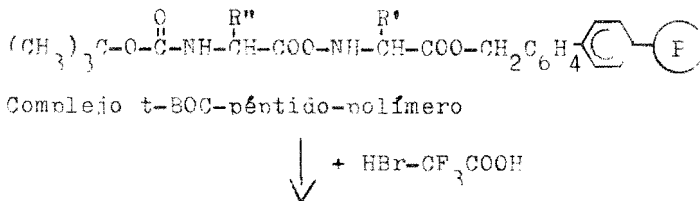


+ 1N HCl/HO Ac.

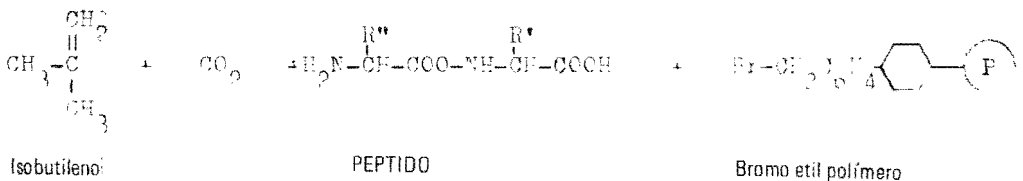
II.-DESPROTECCION



III.-ACOPLAMIENTO.

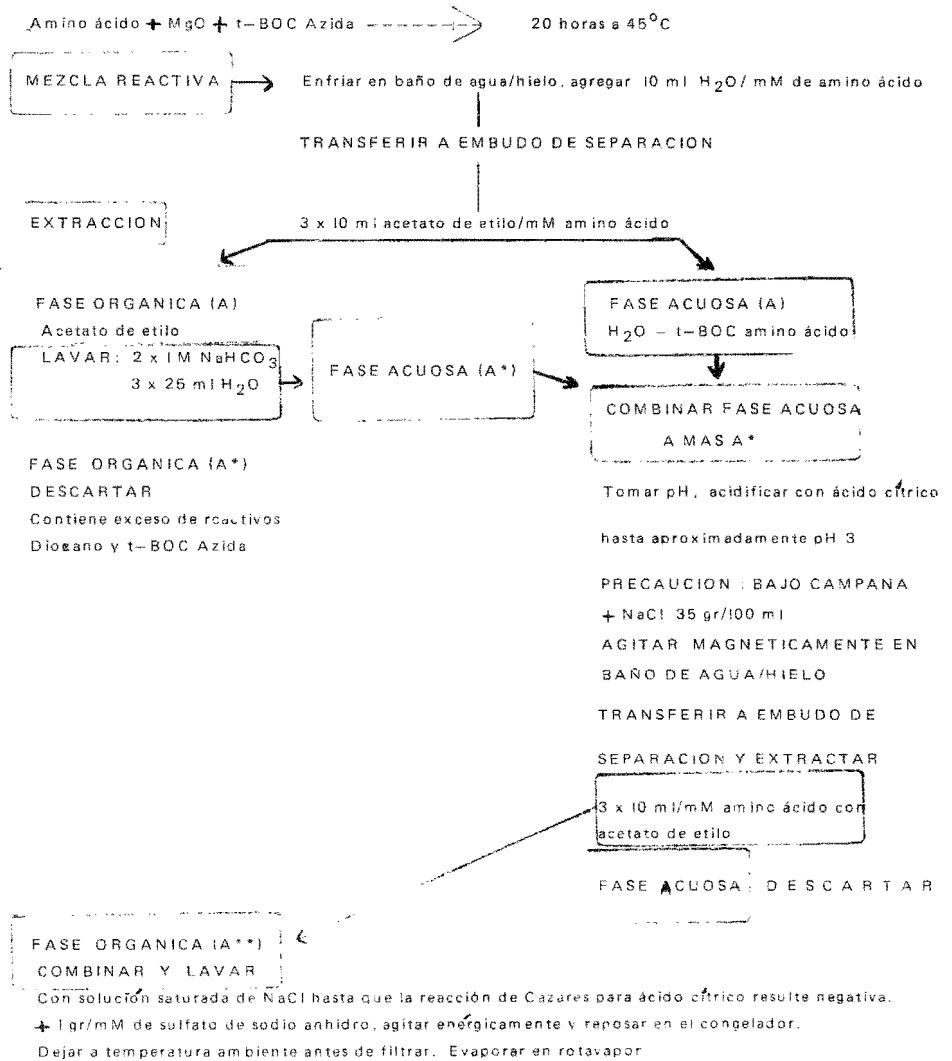


IV.-LIBERACION DE LA RESINA





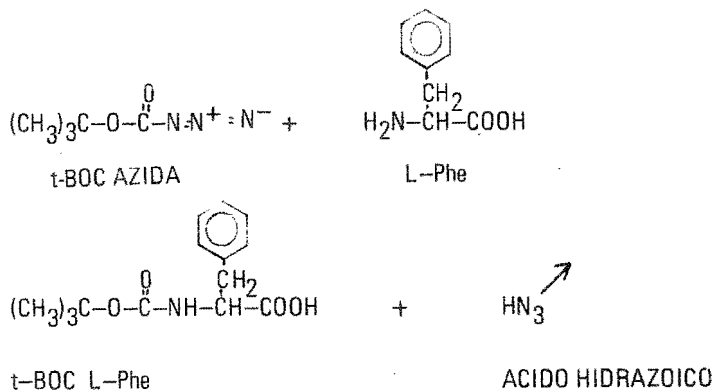
PROCEDIMIENTO ESQUEMATIZADO DE LA PREPARACION DE UN t-BOC AMINO ACIDO  
PARA LA SINTESIS POR FASE SOLIDA.



## PREPARACION DE t-BOC AMINOACIDOS.

## PREPARACION DE t-butil oxi carbonil-L-fenilalanina (t-BOC L-Phe)

Se sigue el proceso descrito por R. von Schwyzer (11) de acuerdo con la siguiente reacción.



Se usaron 25 milimoles de L-Phe que dan un rendimiento teórico de 6.6 gramos.

MATERIAL	Milimoles	Peso Molecular	Gramos
L-Phe	25	165	4.125
Oxido de magnesio	50	40	2.00
Formato de t-BOC azida	50	143	7.15(7.2 ml)

DIOXANO AL 64<sup>o</sup>/o 4.7 ml/milimol de L-Phe = 117.5 ml.

Añadir lentamente los 4.125g L-Phe a un matraz esférico de 250 ml, que contiene los 117.5 ml. de dioxano al 64<sup>o</sup>/o bajo agitación magnética por un período de 30 min. La L-Phe es parcialmente soluble y no se incorpora con facilidad. A la suspensión obtenida se le agregan 2.0 g. de MgO manteniendo la agitación. Se pone el matraz en baño de aceite a 45<sup>o</sup>C y se mantiene en agitación por 30 min. más.

Agregar los 7.2 ml. de formato de t-BOC azida muy lentamente y mantener la agitación en el baño de aceite a 45<sup>o</sup>C por 20 horas a reflujo.

Enfriar en baño de agua/hielo y añadir 10 ml. de  $H_2O/mM$  de L-Phe (250ml). Transferir - cuantitativamente a un embudo de separación (1000 ml) y extraer la fase acuosa 3x250 ml. de acetato de etilo.

La fase acuosa presentó un pH de 8.2 y un volumen aproximado de 450 ml.

Añadir suficiente ácido cítrico (sólido) lentamente y bajo constante agitación registrando - el pH con potenciómetro hasta obtener un pH de 3. (Aproximadamente se usaron 25 g)

PRECAUCION: Llevar a cabo esta reacción bajo campana, ya que se libera ácido hidrazoi - co que es altamente tóxico.

Agregar suficiente NaCl hasta saturación, (35 g /100 ml) 157 NaCl.

El pH bajó a 2.2. Mantener la solución en baño de agua/hielo bajo agitación magnética por un período de hora y media. Transferir la suspensión a un embudo de separación (1000 ml). Se recomienda el uso de embudos con llaves de Teflon porque la sal y la baja temperatura en que se trabaja, en ocasiones "pegan" las llaves de vidrio.

Extraer 3x250 ml. de acetato de etilo (10 ml/mM). Descartar la fase acuosa.

Combinar los 3 extractos de la fase orgánica y lavar con porciones de 30 ml. con solución - saturada de NaCl hasta que la reacción de Casares\* (12) para ácido cítrico sea negativa.

Agregar 1 gde sulfato de sodio anhidro por mM de L-Phe (250). Agitar a través de papel - - filtro Whatman No. 1 con embudo Buchner bajo vacío a temperatura ambiente.

Transferir la fase orgánica a un matraz esférico y evaporar a  $37^{\circ}C$  y 95 mm Hg en rotava - por. Se obtuvo un líquido oleoso de color amarillento que se colocó en un desecador evacuado a 45 mm Hg. Posteriormente se disolvió en 5 ml de acetato de etilo y se agregaron 20 ml de Skelly Solve - B.

Se puso en baño de acetona/hielo seco y raspando con una varilla de vidrio las paredes del - matraz, precipitó un material cristalino, el cual fue filtrado y colocado hasta peso constante en un - desecador evacuado.

RENDIMIENTO EXPERIMENTAL: 4.69 g igual a 71<sup>0</sup>/o del rendimiento teórico.

\* REACCION DE CASARES: Evaporar 0.1 ml de la solución problema a sequedad en baño - maría. Enfriar a temperatura ambiente, agregar 0.5 ml. de anhídrido acético y 2.5 ml de piridina. - Reposar por 5 m in. Se forma un color rosa con la presencia de 0.010 mg. de ácido cítrico.

## ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DEL t-BOC L-Phe POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Preparar soluciones de t-BOC L-Phe, L-Phe grado reactivo y t-BOC L-Phe preparado en el experimento anterior, de 1 microgramo/microlitro. Aplicar 5 microlitros de cada uno de los anteriores en dos placas de gel de sílice para cromatografía en capa fina. Como sistema de solventes se usó cloroformo-alcohol metílico-ácido acético glacial 95:5:1

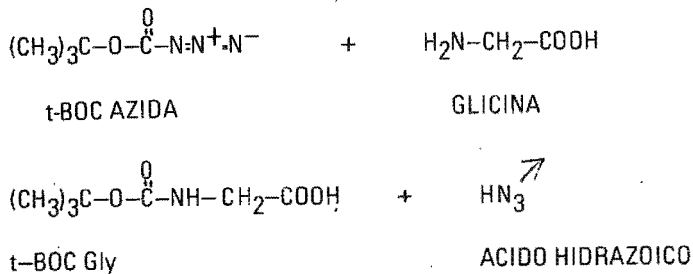
Exponer una de las placas previamente a la prueba con solventes, a vapores de HCl por 15 min. con el objeto de hidrolizar la unión del t-BOC de la Phe.

Correr las placas por 30 min. secar al aire y rociar con una solución de ninhidrina al 0.3%. El color se desarrolla a 100°C en 5 min.

**RESULTADO:** Se observa una sola mancha homogénea que indica que el producto es puro.

### PREPARACIÓN DE t-butil oxi carbonil glicina (t-BOC Gly)

Se sigue el proceso descrito por von Schwyzer (11) de acuerdo con la siguiente reacción:



MATERIAL	milimoles	Peso Molecular	Gramos
Glicina	25	75.07	1.875
Oxido de magnesio	50	40.0	2.0
Formato de t-BOC. azida	50	143	7.15

DIOXANO al 35% 4ml/mM de Gly = 100 ml.

Colocar 1.875 g de glicina en un matraz esférico de 250 ml. y añadir 100 ml. de dioxano al 35<sup>o</sup>/o; agitar magnéticamente hasta lograr la total incorporación de la glicina, que en este caso es completamente soluble, dando una solución transparente.

Agregar 2.0 g de MgO y 7.15 ml de formato de t-BOC azida lentamente y bajo continua agitación magnética. Poner en baño de aceite a 45<sup>o</sup>C. Mantener la agitación por 20 horas bajo reflujo.

Se sigue básicamente el mismo proceso ya descrito para la preparación del t-BOC L-Phe.

En esta ocasión, la evaporación de la fase orgánica en el rotavapor se llevó a cabo a 85 mm. Hg y 37<sup>o</sup>C, se obtuvo un líquido oleoso translúcido el cual cristalizó con la adición de 15 ml. de Skelly Solve B.

Se raspó el matraz con una varilla de vidrio; el enfriamiento de la solución a 0<sup>o</sup>C. incremento la formación de cristales.

Los cristales así obtenidos se secaron en desecador evacuado que contenía además cloruro de calcio anhidro, hasta peso constante.

RENDIMIENTO TEORICO: 4.35 g

RENDIMIENTO EXPERIMENTAL: 3.976 g = 91<sup>o</sup>/o.

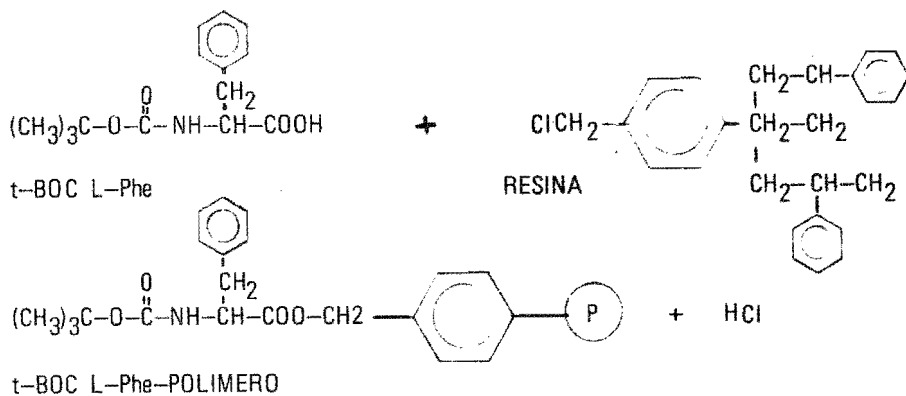
La caracterización del t-BOC-glicina, se llevó a cabo por el mismo procedimiento descrito para el t-BOC L-Phe.

RESULTADO: Se observó una sola mancha homogénea indicando que el producto es puro.

## ESTERIFICACION DE LA RESINA

ESTERIFICACION DEL t-BOC L-Phe

A LA RESINA



MATERIAL	milimoles	Peso Molecular	Gramos
t-BOC L-Phe	7.55	265	2.0
RESINA DE MERRIFIELD Capacidad: 1,5 mEq Cl/g.	1.55		5.01
TEA (d= 0.729)	6.8	101.2	0.685 (96 ml)

De acuerdo con Merrifield, se requieren 6.5 mM de TEA por cada 7.2 mM de t-BOC, es decir 0.904 mM TEA/mM de t-BOC.- (6.8 mM TEA/7.55 mM t-BOC L-Phe igual a 0.685 g.

Etanol absoluto, usar según Merrifield 2 ml/g de Resina (usar 10.2 ml)

Colocar en un vaso de precipitado de 25 ml 2 g. de t-BOC L-Phe, agregar 6.2 ml de etanol absoluto y agitar magnéticamente. Agregar 0.96 ml de TEA y continuar la agitación lentamente hasta obtener una solución transparente.

Transferir la solución cuantitativamente a un matraz esférico de 50 ml usando para lo mismo la segunda porción de etanol absoluto de 4.0 ml. Agregar 5.01 g de Resina de Merrifield y trabajar con un condensador provisto de una trampa de Drierita. Agitar magnéticamente muy lentamente y mantenerlo en baño de aceite a 80°C por 48 horas a reflujo.

Dejar enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y transferir a un embudo de 40 ml provisto con filtro de vidrio poroso (grado M) previamente tarado, lavar bajo agitación lenta por medio de una hoja de teflon accionada por un rotor de velocidad regulable. PRECAUCION: Hay la posibilidad de destruir la resina si se agita muy enérgicamente.

#### LAVADOS:

- 1) 5 X 50 ml de etanol absoluto
- 2) 5 X 50 ml de agua destilada
- 3) 5 X 50 ml de metanol absoluto FILTRAR DESPUES DE CADA LAVADO

La resina se coloca sobre cloruro de calcio en un desecador evacuado hasta peso constante.

PESO RESINA ESTERIFICADA 5.808 g

#### ANALISIS DE LA RESINA ESTERIFICADA POR MEDIO DEL ANALIZADOR AUTOMATICO DE AMINOACIDOS (TECHNICON)

##### MATERIAL:

SOLUCION AMORTIGUADORA NUMERO 1 pH: 2.875

##### FORMULA PARA PREPARAR UN LITRO

14.71 g	citrato de sodio bihidratado
900 ml	agua bidestilada (o destilada a partir de acido sulfúrico diluido)
5.0 ml	tiodiglicol
10 ml	Brij 35 (solución detergente)

Titular con HCl. 6 N después de aforar el volumen a 1 L, ajustar a pH 2.875 de ser necesario.

## SOLUCION AMORTIGUADORA NUMERO 2 pH: 3.800

## FORMULA PARA PREPARAR UN LITRO

14.71 g	citrato de sodio bihidratado
900 ml	agua bidestilada
50 ml	solución 1.000N de NaOH
5.0 ml	tiodiglicol
10.0 ml	Brij 35

Titular con HCl 6 N después de aforar el volumen a 1 L., ajustar a pH 3.800 de ser necesario.

## SOLUCION AMORTIGUADORA NUMERO 3 pH 5.00

## FORMULA PARA PREPARAR UN LITRO

14.71 g	citrato de sodio bihidratado
900 ml	agua bidestilada
50 ml	solución 1.000 N de NaOH
35.07 g	NaCl
10 ml	Brij 35

## PRECAUCION: NO USAR TIODIGLICOL

Titular con HCl. 6 N después de aforar el volumen a 1 L., ajustar a pH 5.00 de ser necesario.

## SOLUCION PATRON DE NIN HIDRINA

Ninhidrina 20 g:

Hidrantina 1.5 g

Metil cellosolve 650 ml



Solución 4.0 N de acetato de sodio a pH 5.5 \_ 350 ml.

Para cada análisis tomar 330 ml. de solución patrón de ninhidrina y agregar 1320 ml de diluyente cellosolve: (700 ml de metil cellosolve libre de peróxido, más 700 ml de agua destilada).

Preparación de la solución:

Disolver la ninhidrina y la hidrantina en el metil cellosolve, vaciaren en una botella ambar y burbujear nitrógeno en la solución por 15 min. Añadir el amortiguador de acetato de sodio a la solución de ninhidrina e inmediatamente continuar burbujear nitrógeno a través de la solución por 30 min. mas.

#### PROCEDIMIENTO ANALITICO.

El analizador automático de aminoácidos es un instrumento que separa los aminoácidos -- provenientes de un hidrolizado de proteínas por medio de una resina de intercambio iónico y automáticamente determina su concentración a partir del eluato de la columna.

#### HIDROLIZACION DEL COMPLEJO t-BOC L-Phe - RESINA

Pesar con exactitud 18.5 mg ( $\pm$  15--20 mg) de la resina esterificada en un matraz esférico de 10 ml. Añadir 2.0 ml de agente hidrolítico compuesto de:

1 Parte de HCl 12 N	3 ml
4 partes de $CF_3$ COOH	12 ml

Poner a reflujo en un baño de aceite a 110°C por 24 horas.

NOTA: No desechar el resto del agente hidrolítico ya que posteriormente se usará para lavar el hidrolizado. Mantenerlo refrigerado.

Enfriar el hidrolizado a temperatura ambiente antes de filtrarlo con un filtro de vidrio poroso (grado 10 M) bajo vacío, el filtrado se recibe en un matraz esférico de 250 ml.

Lavar el residuo cuidadosamente con porciones de 4x2 ml. del agente hidrolítico y combinar los lavados con el filtrado, el cual es evaporado por medio de un rotavapor a 40°C y 50 mm Hg. Se disuelve con 5 ml. de agua destilada y evaporar de nuevo con el mismo sistema. Desechar bajo cloruro de calcio en desecador evacuado.

Redisolver el hidrolizado en 10 ml. de 0.12N HCl y una alícuota de 0.5 ml (0.925 mg) se coloca en la columna.

La elución se lleva a cabo por medio de un gradiente de sales y pH producido por un Auto-grad de 9 cámaras que contiene las siguientes mezclas de amortiguadores.

CAMARA No.	Amortiguador No. 1 pH 2.875	Amortiguador No. 2 pH 3.80	Amortiguador No. 3 pH 5.00
1	75	0	0
2	75	0	0
3	75	0	0
4	75	0	0
5	0	70	5
6	6	9	60
7	0	0	75
8	0	0	75
9	0	0	75

Volumen total por cámara: 75 ml.

### ANALISIS DEL ELUYENTE DE LA COLUMNA

La columna fue eluida a una velocidad de flujo de 0.48 a 0.50 ml/min. El eluyente pasado a través del sistema analítico en donde reacciona con el reactivo de ninhidrina en un baño de 95°C., produciendo un color a ser detectado por un sistema de 3 colorímetros. La densidad óptica es registrada por un aparato de registro provisto con 3 plumas, produciendo 3 curvas de densidad óptica.

El primer colorímetro ajustado a 440 milimicras; los otros 2 a 570 milimicras. El segundo tiene un paso de luz de 8 mm. mientras que el tercero posee una abertura de 15 mm lo cual permite una más amplia capacidad analítica que la realizada por un solo colorímetro.

### RESULTADOS:

Se determinaron 0.349 micromoles de L-Phe en el hidrolizado que equivalen a 0.376 micromoles/g de resina esterificada.

Dado que la resina tiene 1.5 mM de Cl/g se obtuvo un rendimiento experimental de 25.10% de esterificación. Se considera en el paso de esterificación un rendimiento teórico de 300%.

### SINTESIS DEL PEPTIDO (ACOPLAMIENTO)

Transferir los 5.8 g. de resina esterificada al frasco de reacción, el cual previamente fue tratado con silicón soluble con el objeto de evitar al máximo posible la adherencia de la resina a las paredes del frasco de reacción lo que puede significar una disminución en el rendimiento final por no reaccionar adecuadamente.

Lavar con 3 x 25 ml. EtOH, filtrar y agregar 2 x 15 ml. de ácido acético glacial, agitando por 30 minutos cada vez y filtrar.

Lavados de 3 minutos con:

- |                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| 1) 3 x 25 ml de HOAc gl.          | Filtrar |
| 2) 3 x 30 ml de EtOH              | Filtrar |
| 3) 3 x 30 ml de DMF*              | Filtrar |
| 4) 2 x 25 ml de DMF – 3 ml de TEA | Filtrar |

Lavar por 15 minutos con 3 x 20 ml de DMF. Filtrar

Añadir 1.31 g de t-BOC Gly (3.6 veces de exceso de t-BOC Gly/M L-Phe disueltos en 6 ml. de DMF, lavar con 6 ml más de DMF. Agitar por temperatura ambiente 10 min.

Añadir 1.54 g de DCCI (3.5 veces de exceso de DCCI/mM L-Phe) disuelto en 3.2 ml de DMF/0.340g de DCCI).

Agitar por 2 horas a temperatura ambiente. Filtrar y lavar: 3 x 25 ml de DMF

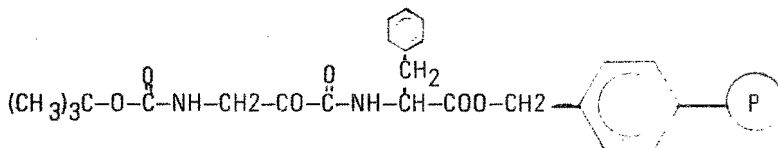
3x 25 ml de EtOH

Lavar con:

- 1) 3 x 25 ml de HO Ac.Gl.
- 2) 3 x 25 ml de EtOH
- 3) 3 x 10 ml de cloruro de metileno.

Secar al vacío por 15 minutos.

COMPLEJO PEPTIDO-RESINA (t-BOC Gly – L-Phe / POLIMERO)



DESACOPLAMIENTO POR HIDROLISIS DEL ESTER.

Agregar 20 ml de TFA al frasco de reacción y tapar la parte superior con una trampa de Drierita, por la parte inferior, burbujear HBr por 60 minutos muy lentamente de tal manera que las partículas de resina se mantengan en suspensión.

(\* El DMF fue previamente purificado por el proceso del BaO) de Thomas & Rochow (14)

PRECAUCION: Trabajar bajo campana.

Al terminar este proceso, el péptido se ha separado de la resina y ha pasado a la solución -- por medio de un proceso hidrolítico.

Filtrar directamente a un matraz de 125 ml de pared gruesa, haciendo vacío y evitando la - formación de espuma.

La resina se lava: 3 x 10 ml de TFA agitando por 3 minutos.

Los filtrados se combinan y la resina se descarta.

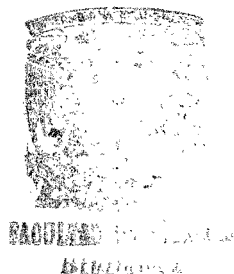
El filtrado se evapora en un rotavapor a 30°C. y 60 mm Hg. PRECAUCION: no aumentar la temperatura de evaporación porque el péptido se encuentra en un medio ácido que puede hidrolizar el enlace peptídico.

## RESULTADO

Se obtuvo un aceite pardo que solidificó incompletamente al ser colocado en un desecador- evacuado por 12 horas.

El aceite se disolvió en 7 ml de CH<sub>3</sub> COOH. Se procedió a liofilizarlo. Se obtuvo un sólido- gomoso de color amarillento que se solubilizó con 5 ml de agua y se filtró para separar un material - ceroso no identificado. Se procedió a congelarlo y liofilizarlo de nuevo por 12 horas. Se obtuvo un - sólido cristalino muy higroscópico de color amarillento el cual fue caracterizado por cromatografía- en capa fina. Se observó la presencia del dipéptido Gly - L-Phe contaminado con una pequeña cantidad de L-Phe libre.

El dipéptido se analizó en su contenido de aminoácido con el analizador automático de -- aminoácidos (Technicon). 0.225 micromoles del hidrolizado (0,3 ml) fueron colocados en la columna y eluidos de la manera usual. Se observaron áreas de fenilalanina en la gráfica correspondiente, - mostrando una mayor concentración de fenilalanina debida a la fenilalanina midieron la contaminan- te.



### III.- C) D I S C U S I O N

## D I S C U S I O N

LAS VENTAJAS DEL METODO DE MERRFIELD DE SINTESIS DE PEPTIDOS POR FASE SOLIDA SON:

- 1.- La fácil remoción de los subproductos y exceso de reactivos del ester insoluble PEPTIDO—RESINA.
- 2.- Se evita en la mayor proporción posible la racemización durante el proceso de síntesis.
- 3.- La posibilidad de su automatización, y con esto, en el futuro la disponibilidad prácticamente ilimitada de una gran variedad de polipéptidos sintéticos, de relativo bajo costo, que abrirán mayores posibilidades de investigación en las distintas disciplinas científicas

El trabajo experimental reportado - la síntesis del dipéptido glicil—L—fenilalanina— fue llevado a cabo en dos ocasiones, la primera, se hizo con el objeto de aprender todos los pasos y dificultades que la técnica presenta; en la segunda ocasión se logró la síntesis del dipéptido doblemente — marcado con carbono 14 y tritio (Gly H<sub>3</sub>—L—Phe C<sub>14</sub>), la que se llevó a cabo aplicando los conocimientos adquiridos en la primera experiencia. En esta segunda síntesis, se tomaron el máximo de — precauciones, puesto que se trabajó con material radioactivo; incluyéndose algunas modificaciones — que comentaré brevemente ya que con ellas se logró incrementar los rendimientos finales.

En la preparación de los respectivos t-BOC, se obtuvieron rendimientos experimentales sensiblemente iguales. El t-BOC L—Phe C<sub>14</sub>, mostro una contaminación con L—fenilalanina libre, debida a que la reacción no se logro cuantitativa. La contaminación fue parcialmente eliminada por cristalización del dipéptido y filtrado de la L—fenilalanina libre que quedó en solución.

Un cambio importante fue en la resina usada. En esta ocasión se usó un polímero con una capacidad de 0.7 mEq Cl., en la previamente usada, con la intención de lograr una mayor penetración del t-BOC L—Phe, y por consiguiente, mayores porcentajes de esterificación. Con el mismo objetivo, se uso en la esterificación un exceso de t-BOC L—Phe y se logró un incremento en la esterificación de 25.1<sup>o</sup>/o obtenido en la primera síntesis a 44<sup>o</sup>/o. Es muy importante en esta etapa, el lavado minucioso del exceso de reactivos ya que se corre el riesgo de obtener el dipéptido final, contaminado.

Este dipéptido doblemente marcado fue usado posteriormente para estudios de metabolismo.

#### IV.- APENDICE

## PREPARACION DEL CLOROMETILPOLIMERO

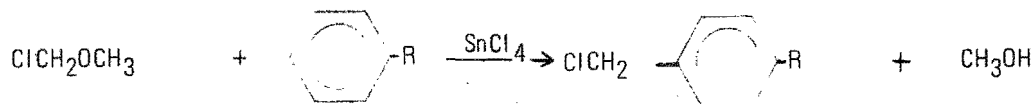
Según Merrifield (3)

Copoliestireno 20/o DVB (50) lavado como se describió anteriormente, es colocado en 300 ml. de cloroformo y agitado durante 60 min. a 25°C y después enfriado a 0°. Agregar una solución fría de 7.5 ml. de SnCl<sub>4</sub> anhidro en 50 ml de eter metil cloro metílico y agitar durante 30 min. a 0°C.

Filtrar y lavar con 1 L. de 1:1 dioxano/agua y después con 1 L. de 3:1 dioxano / 3N HCl. Los glóbulos son entonces lavados con una mezcla que va cambiando progresivamente de agua a dioxano puro y posteriormente hasta metanol absoluto. Deben evitarse cambios bruscos en la concentración de los solventes.

El producto es secado bajo vacío a 100°C. Se obtiene un producto con aproximadamente 220/o de los anillos aromáticos del polímero clorometilado.

## REACCION DE CLOROMETILACION DE LA RESINA





PREPARACION DEL FORMATO DE t-BUTIL AZIDA COMO UN PASO INTERMEDIO QUE SE REQUIERE PARA LA PREPARACION DE t-BOC AMINOACIDOS PARA LA SINTESIS POR FASE SOLIDA

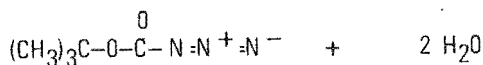
(Según Carpino et al. 13) Las cantidades usadas fueron calculadas para obtener 20 g. de t-BOC azida.

REACCION:

REACCION DE PREPARACION DEL t-BOC AZIDA



t-BUTIL CARBAZATO



t-BOC AZIDA

- 1) Se colocan 25 g. de carbazato de t-butilo en un matraz erlenmeyer de 125 ml. en un baño de agua/hielo.
- 2) Se agregan 22 g. (20.9 ml) de HOAc. Gl. y 31.25 ml. de agua destilada. Se obtuvo una solución ligeramente turbia, la cual fue agitada magnéticamente manteniendo la temperatura entre 9-13°C.
- 3) Se agrega lentamente bajo continua agitación 14.35 g. de NaNO<sub>2</sub> en un período de una hora, manteniendo la agitación durante 30 min. más a la temperatura de 9-13°C.
- 4) La suspensión se transfiere cuantitativamente a un embudo de separación. El matraz se enjuaga con 21.2 ml de agua destilada que se combina con la suspensión.
- 5) Después de agitar fuertemente se permite que la capa oleosa amarilla del t-BOC azida separe de la fase acuosa, la cual se lava tres veces con 15 ml. de éter etílico. Se descarta la fase acuosa y las fases éterea se combinan con la fase oleosa.
- 6) Se lava 3 x 15 ml de agua destilada y luego con 3 x 10 ml. de solución 1M de NaHCO<sub>3</sub>.

7) La fase orgánica se seca, después de descartar la fase acuosa, agregando suficiente  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Después de agitar fuertemente se le deja reposar 12 hs. a temperatura ambiente.

8) Se filtra bajo vacío usando un embudo Buchner y papel filtro Whatman No. 1.

9) El éter es removido bajo un vacío de 140 a 150 mm. de Hg a una temperatura de de 40-45°C. La temperatura de destilación fue de 23°C.

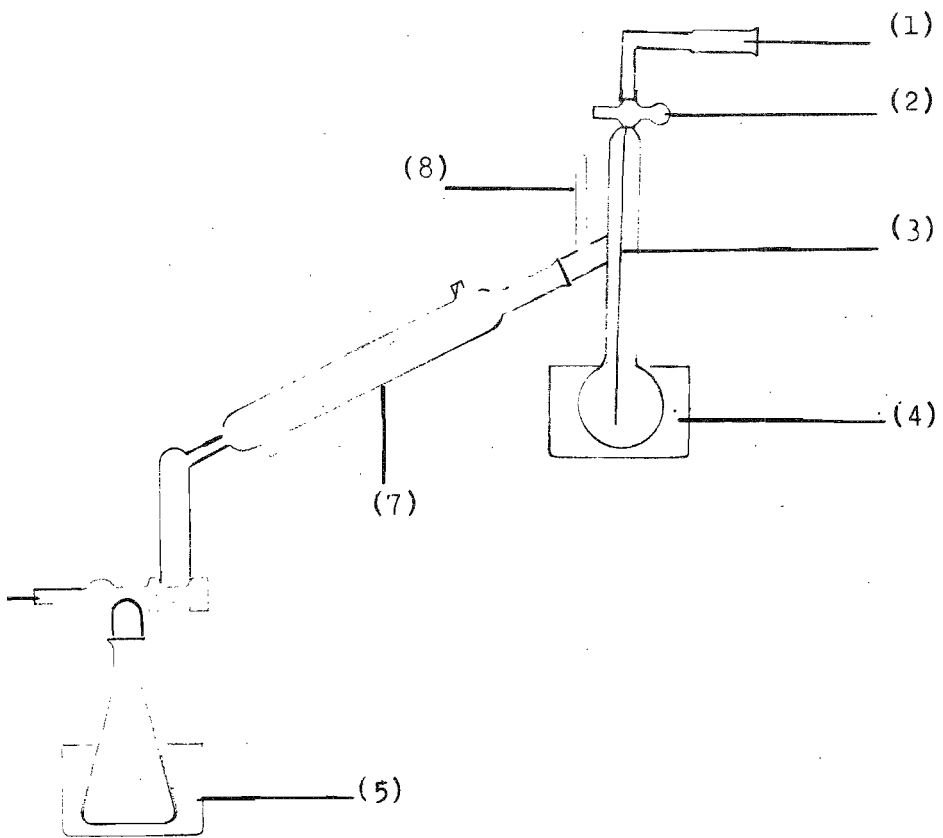


DIAGRAMA DEL APARATO USADO PARA LA PREPARACION DE t-BOC AZIDA

- 1) TRAMPA CON DRIERITA
- 2) PINZA DE CONTROL (REGULADORA DE LA EBULLICION)
- 3) TUBO CAPILAR
- 4) BAÑO DE ACEITE (40 - 45°C)
- 5) BAÑO DE AGUA/HIELO (0°C)
- 6) LLAVE DE DOS PASOS CONECTADA A LA LINEA DE VACIO
- 7) CONDENSADOR
- 8) TERMOMETRO

PURIFICACION DE DMF PARA SU USO EN LA SINTESIS POR FASE SOLIDA POR EL METODO DE THOMAS ET AL. (14)

PROCEDIMIENTO:

El DMF puede descomponerse, especialmente a altas temperaturas, formando dimetilamina y ácido fórmico ( $\text{H}-\text{COOH}$ ). Por consiguiente, para neutralizar cualquier cantidad de  $\text{H}-\text{COOH}$  presente en el DMF, es tratado con  $\text{BaO}$  antes de destilarlo.

MATERIAL:

DMF (Fisher Scientific Co.)  $\text{H}-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  Peso molecular 73.10

$\text{BaO}$  (Alfa Inorganics Inc. Grado reactivo)

Usar 10 g/litro de  $\text{BaO}$  pulverizado.

EXPERIMENTAL:

Los 2 litros de DMF por purificarse, se colocan en un recipiente de reacción (3,500 ml) de fondo esférico, agregar la cantidad adecuada de  $\text{BaO}$  y agitar por una hora, dejar sedimentar y repetir el ciclo dos veces más. Agitar por medio de una hoja de teflón accionada por un rotor de velocidad regulable.

Después de la última agitación, se le deja reposar por 12 horas; después de transcurridas, tomar el líquido sobrenadante procurando no alterar la capa del fondo del  $\text{BaO}$ .

DESTILACION:

Se lleva a cabo en una columna empacada con anillos de vidrio, bajo vacío a 16 mm. de Hg.

Los primeros 250 ml. se descartan y se colecta la parte media del destilado (aproximadamente 1,000 ml.)

Temperatura del calentador eléctrico	54 – 56°C.
Temperatura de destilación	52 – 54°C.
Presión	16 mm de Hg.

PREPARACION EJEMPLIFICADA DE ALGUNOS t-BOC AMINOACIDOS  
SEGUN VON SCHWYZER (11).

t-BOC L-metionina:

6 g. (40mM) de L-metionina y 3.2 g (80mM) de MgO, mezclar en 100 ml de dioxano al 50<sup>o</sup>/o formando una suspensión, agregar 11.6 g. de t-BOC azida (80mM). Reaccionar bajo agitación por 20 hs a 45-50<sup>o</sup>C.- Enfriar en baño de agua/hielo y diluir con 400 ml de agua destilada.- Extraer la fase acuosa con 3x300 ml de EtO Ac., la fase orgánica se lava 3x20 ml de 1M NaHCO<sub>3</sub> y 2x20 ml de agua.- Combinar los extractos acuosos y agregar, en baño de agua/hielo, suficiente ácido cítrico - hasta alcanzar pH 5.- Saturar con NaCl (35 g/100 ml) y extraer con 3x400 ml de EtO Ac.- Lavar la fase orgánica con agua y solución saturada de NaCl.- Secar sobre sulfato de sodio anhidro y evaporar la fase orgánica en rotavapor a 40<sup>o</sup>C. bajo vacío. Se obtuvieron 90 g. de t-BOC L-metionina -- (90<sup>o</sup>/o) en forma de un aceite viscoso de color amarillento.

t-BOC L-leucina:

131 mg (1 micromol) de L-Leu en 1.3 ml de agua se mezclan con 80 mg (2 micromoles) de MgO y una solución de 280 mg de t-BOC azida en 3 ml de dioxano.- Dejar reaccionar por 20 hs a 45<sup>o</sup>C bajo reflujo.- Añadir 15 ml de agua y extraer con EtO Ac.- Acidular la fase acuosa con ácido cítrico a 0<sup>o</sup>C.- La cristalización se presentó inmediatamente.- Rendimiento: 182 mg de t-BOC L-Leu (73<sup>o</sup>/o).

t-BOC L-valina

20 g de L-val - 8.7 g MgO - 200 ml agua y 60 ml de dioxano.- Mezclar bajo agitación a -- 45<sup>o</sup>C, bajo reflujo.- Evaporar el dioxano bajo vacío y mezclar el residuo con 100 ml de agua.- Extraer con EtO Ac.- Acidular con ácido cítrico a 0<sup>o</sup>C y extraer dos veces con EtO Ac., la fase orgánica se lava con agua hasta la neutralización, secar y evaporar en rotavapor, Rendimiento: 62.5 g de t-BOC L-valina (68<sup>o</sup>/o) en forma de un aceite incoloro y viscoso.

N-t-BOC o-benzil-L-tirosina.

2.71 g de o-benzil-L-tirosina (0.01 Mol). Mezclar con 80 ml. de dioxano y 20 ml. de 0.5N-NaOH a 60<sup>o</sup>C hasta total disolución.- Enfriar a 45<sup>o</sup>C y agregar 2.85 g de t-BOC azida (0.02 Mol), - agitar bajo reflujo por 21 hs. Evaporar el dioxano bajo vacío a 40<sup>o</sup>C y extraer el residuo con agua y EtO Ac., acidular la fase acuosa con ácido cítrico a 0<sup>o</sup>C y extraer dos veces con EtO Ac., Lavar, secar y evaporar la fase orgánica por rotavapor.- Rendimiento: 1.5 g de t-BOC o-benzil L-tirosina en forma de un aceite que posteriormente se cristalizó en EtO Ac. y hexano.

TABLAS DE t-BOC.

t-BOC	Base Usada	Solvente de Cristalización	Rendimiento %	Fórmula Empírica
DL-alanina	NaOH	Hexano	62	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> N
L-alanina	NaOH	Hexano	55.5	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> N
Glicina	NaOH	EtOAc-Hexano	77	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> N
L-isoleucina (hemihidrato)	NaOH	Acetona/Agua	9.6	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4.5</sub> N
L-leucina (monovalente)	NaOH	EtOH/Agua	59	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub> N
DL-metionina	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	EtOAc-Hexano	46	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> NS <sup>d</sup>
L-metionina	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Aceite	40	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub>
DL-fenilalanina	NaOH	Hexano	32	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> N
L-fenilalanina	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	EtOAc-Hexano	73	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> N
L-prolina	NaOH	Metil etil cetona-hexano	55	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> N
DL-serina	NaOH	Aceite	29	C <sub>3</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N
L-triptofano	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	EtOAc-Hexano	36	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>
L-tirosina	NaHCO <sub>3</sub>	EtOAc-Hexano	29	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub> N
L-valina	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Hexano	1	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> N

## V.-BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fisher, E. y E. Forneau., The Synthesis of Glycyl-glycine.  
E. BER. DTSCH. CHEM. GES., 34 : 2868 (1901)
- 2.- Du Vigneaud et al., The Synthesis of Oxytocin.  
J. AMER. CHEM. SOC., 75 : 4878 (1953)
- 3.- Merrifield, R.B., Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide.  
J. AMER. CHEM. SOC., 85 : 2149-2154 (1963)
- 4.- Merrifield, R.B., Solid Phase Peptide Synthesis.  
ENDEAVOR, 24 : 3-7 (1965)
- 5.- Salmon, J.E. y D.K. Hale., Ion Exchange; A Laboratory Manual.  
Academic Press, New York 1959.
- 6.- Bergmann, M. y L. Zervas., Aplications of the Carbobenzoxy group to Peptide Synthesis.  
CHEM. BER., 65 : 1192 (1932)
- 7.- Merrifield, R.B., Automated Synthesis of Peptides.  
SCIENCE., 150 : 178-185 (1965)
- 8.- Merrifield, R. B., The Automatic Synthesis of Proteins.  
SCIENTIFIC AMERICAN., 218: (3) 56-74 (1968)
- 9.- Merrifield, R.B., The Synthesis of Bradykinin.  
J. AMER. CHEM. SOC., 86 : 304-305 (1963)
- 10.- Merrifield, R. B., An Improved Synthesis of Bradykinin.  
BIOCHEMISTRY., 3: (9) 1385-1390 (1964)
- 11.- Von Schwyzer, R., P. Sieber y H. Kappeler., Sur Synthese von N-t-Butyloxycarbonyl Aminosäuren.  
HELV. CHIM. ACTA., 42 fasciculus VII, No. 281 2622-2624 (1959)
- 12.- Casares., Reaccion de Casares para ácido cítrico.  
Index Merck., Quinta Edición 1940, Pag. 668 Reacción 608.
- 13.- Carpino, L.A. et al., O-Acyl Hydroxylamines. The Synthesis of O-Benzoyl-hydroxylamine.  
J. AMER. CHEM. SOC., 181 : 955-957 (1969)
- 14.- Thomas, A.B. y E. Rochow., The Purification of Dimethylformamide by the Barium Oxide Method.  
J. AMER. CHEM. SOC., 79 : 6180-6183 (1957)
- 15.- ANDERSON G. y A.C. Mac Gregor., t-Butyloxycarbonyl Aminoacids and their use in Peptide Synthesis.  
J. AMER. CHEM. SOC., 79 : 6180-6183 (1957)
- 16.- Cherbuliez, E., B. Baehler y Rabinowitz J., Study of Peptide Structure. HELV. CHIM. ACTA., 43 fasciculus VI 228-229 (1960)
- 17.- Fisher, R.B., Protein Metabolism. John Wiley & Sons, Inc. New York 1954.
- 18.- Young, G.T., Repor of the Comm ittee on Nomenclature of Peptides, Proceedings of the 5th. European Symposium, Oxford 1962. 261-269. The Macmillan Co. 1963.
- 19.- Florkin, M., y E. Stotz (eds.), Comprehensive Biochmistry, Vol. 6, Elsevier Publishing Co. New York 1965.
- 20.- Stal, E., Suggestions for the Standarisisation of Procedures and Terminology of Thin-layer Chromatography.  
J. CHROMATOGRAPHY., 33 : 273-279 (1968)