



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Sintesi e caratterizzazione di peptidi e di sistemi
peptide-porfirina per studi spettroscopici**

Relatrice: Prof.ssa Marta De Zotti

Controrelatore: Prof. Agostino Migliore

Laureando: Pietro Lazzarotto

Matricola: 2024517

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

A Gigio, Gianni, Lore, Ugo e Biancarosa

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	V
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUZIONE.....	1
1.1 IL TRASFERIMENTO ELETTRONICO IN NATURA	1
1.2 PEPTIDI COME MEDIATORI DEL TRASFERIMENTO ELETTRONICO	2
1.3 PEPTIDI CONTENENTI AIB PER STUDI DI ET.....	5
1.3.1 La Tricogina GA IV e i suoi analoghi	6
2 SCOPO DELLA TESI.....	11
2.1 Ade-K2569-Thym	12
2.2 TPP-WW-K2569-WW-Lipo.....	12
2.3 TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	12
2.4 Ac-WW-K2569-WW-Ac.....	13
2.5 Ade-LUKIL-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ e Ade-K25(Ade)69-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	13
3 PARTE SPERIMENTALE.....	15
3.1 MATERIALI E METODI	15
3.1.1 Reagenti e solventi.....	15
3.1.2 Strumentazione	15
3.1.2.1 Cromatografia a media pressione (Biotage Isolera Prime).....	15
3.1.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	16
3.1.2.3 Liofilizzatore.....	16
3.1.2.4 LC-MS	16
3.1.2.5 HRMS	16
3.1.2.6 Dicroismo Circolare (CD).....	17
3.2 PROCEDURE GENERALI	17
3.2.1 SPPS manuale.....	17
3.2.2 Sblocco in piccolo	18
3.2.3 Purificazione con Biotage [®] Isolera Prime	19
3.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONI.....	19
3.3.1 Sintesi di AdeCOOEt.....	19
3.3.2 Sintesi di AdeCOOH	20
3.3.3 Sintesi ZnTPP-Thym	20
3.3.4 Sintesi di H ₂ N-KLUKIL su resina 1,2-diamminoetan-tritilica.....	22

3.3.5 Sintesi di Ade-K2569 su resina 1,2-diamminoetan-tritilica	23
3.3.6 Sintesi del peptide Ade-K2569-Thym	24
3.3.7 Sintesi di Ade-K25(Ade)69-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	25
3.3.8 Sintesi di H ₂ N-WW-K2569-WW su resina 1,2-diamminoetan-tritilica	28
3.3.9 Sintesi di TPP-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	29
3.3.10 Coupling acido lipoico su ZnTPP-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	30
3.3.11 Sintesi di H ₂ N-WW-K2569-WW-K2569-WW su resina 1,2-diamminoetan-tritilica	31
3.3.12 Sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	32
3.3.13 Sintesi di Ac-WW-K2569-WW-Ac	33
3.3.14 Sintesi di H ₂ N-LUKIL su resina 1,2-diamminoetan-tritilica.....	34
3.3.15 Sintesi parziale del peptide Ade-LUKIL-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	34
4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	37
4.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA	37
4.1.1 Resine per SPPS	39
4.1.2 Attivatori di <i>coupling</i>	40
4.1.3 Gruppi protettori	42
4.1.3.1 Gruppo protettore Fmoc.....	42
4.1.3.2 Gruppo protettore Boc	43
4.1.3.3 Gruppo protettore Alloc	44
4.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONI.....	45
4.2.1 Sintesi di AdeCOOH	45
4.2.2 Sintesi ZnTPP-Thym	47
4.2.3 Sintesi del peptide Ade-K2569-Thym	49
4.2.4 Sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo	52
4.2.5 Sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	56
4.2.6 Sintesi del peptide Ac-WW-K2569-WW-Ac.....	58
4.2.7 Sintesi del peptide Ade-LUK(Boc)IL-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	60
4.2.8 Sintesi del peptide Ade-K25(Ade)69-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	62
4.3 DICROISMO CIRCOLARE.....	66
5 CONCLUSIONI.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	71

ABBREVIAZIONI

AA = Amminoacido generico

Ac = Acetile

Ac₂O = Anidride acetica

ACN = Acetonitrile

AcOEt = Acetato di etile

AcOH = Acido acetico

AdeCOOH = Acido 2-(6-amminopurin-9-il)acetico

AdeCOOEt = 2-(6-amminopurin-9-il)acetato di etile

Aib = Acido α -amminoisobutirrico

Alloc = Allilossicarbonile

Boc = Ter-butilossicarbonile

CD = Dicroismo circolare

DCM = Diclorometano

DIC = N,N'-Diisopropilcarbodiimmide

DIPEA = Diisopropiletilammina

DMF = N,N-Dimetilformammide

EDC = 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide

ET = Trasferimento elettronico

Et₂O = Etere dietilico

EtOH = Etanolo

ESI = Electro-Spray Ionization

Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile

Gly = Glicina

HATU = 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-ossido
esafluorofosfato

HFIP = 1,1,1,3,3,3-esafluoroisopropanolo

HOAt = 1-idrossi-7-azabenzotriazolo

HOBt = N-idrossibenzotriazolo

HPLC = High Performance Liquid Chromatography (cromatografia liquida ad alta
prestazione)

Ile = Isoleucina

LC-MS = Cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa

Leu = Leucina

Lipo = Acido lipoico

Lys = Lisina

MeOH = Metanolo

MW = Peso molecolare

NMM = N-metilmorfolina

OxymaPure[®] = Cianoidrossiimmunoacetato di etile

SDS = Sodio dodecilsolfato

SPPS = Sintesi peptidica su fase solida

TFA = Acido trifluoroacetico

THF = Tetraidrofurano

ThymCOOH = Acido 2-(5-metil-2,4-diossopirimidin-1-il)acetico

TLC = Thin Layer Chromatography (cromatografia su strato sottile)

TOF = Analizzatore a tempo di volo (*time-of-flight*)

TPP-COOH = 5-(4-carbossifenil)-10,15,20-(trifenil)porfirina

TPP-NH₂ = 5-(4-amminofenil)-10,15,20-(trifenil)porfirina

t_R = Tempo di ritenzione

Trp = Triptofano

ABSTRACT

I processi di trasferimento elettronico sono di fondamentale importanza per numerose funzioni biologiche, tra cui la respirazione cellulare e la fotosintesi clorofilliana. La disposizione spaziale ordinata delle unità redox coinvolte in queste trasformazioni è necessaria per poter garantire l'elevata efficienza del trasferimento, e un ruolo centrale è fornito dalle strutture proteiche, che possiedono la capacità di adottare specifiche conformazioni tridimensionali, come α -eliche e β -foglietti. Ciò fornisce dei cammini preferenziali per il trasferimento degli elettroni all'interno di questi sistemi complessi.

Il trasferimento elettronico mediato da catene peptidiche è stato quindi studiato estesamente durante gli anni e si è visto, in particolare, come le strutture elicoidali siano quelle più efficaci e interessanti grazie alla relativa rigidità della struttura, alla possibilità di modulare la distanza tra le unità redox impegnate nel trasferimento elettronico e alla presenza di un macrodipolo generato dalla somma dei singoli momenti di dipolo relativi ai legami peptidici.

La possibilità di costruire dei monostrati autoassemblati, sfruttando l'intrinseca capacità di aggregazione delle eliche peptidiche, ha portato, inoltre, allo studio di questi processi all'interno di sistemi ibridi, in cui i peptidi vengono supportati su superfici di materiali conduttori o semiconduttori. In particolare, un analogo del peptide naturale Tricogina GA IV, che presenta quattro residui di lisina al posto dei residui di glicina della sequenza nativa, è stato impiegato nella costruzione di sistemi *self-assembled* su un elettrodo d'oro, per esperimenti di trasferimento elettronico fotoindotto.

Ispirati dalla sequenza di questo analogo, nel presente lavoro di Tesi sono stati sintetizzati sei peptidi che condividono parte della sua sequenza originaria.

Tutte le sequenze sono state sintetizzate tramite la sintesi peptidica su fase solida (*SPPS*) e le derivatizzazioni, dove presenti, sono state fatte utilizzando una combinazione di *SPPS* e di sintesi in soluzione. I peptidi sintetizzati sono i seguenti: Ade-K2569-Thym, TPP-WW-K2569-WW-Lipo, TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂, Ac-WW-K2569-WW-Ac, Ade-LUKIL-NHCH₂CH₂NH₂ e Ade-K25(Ade)69-NHCH₂CH₂NH₂, dove *K2569* rappresenta la sequenza dell'analogo della Tricogina GA IV con le quattro lisine.

I peptidi sono stati ottenuti con delle rese comprese tra il 13% e il 26%. I peptidi purificati sono stati ottenuti con purezze comprese tra l'81% e il 92%. Le caratterizzazioni sono state fatte

tramite cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS).

Inoltre, i peptidi Ade-K2569-Thym, TPP-WW-K2569-WW-Lipo e TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ sono stati caratterizzati dal punto di vista conformazionale tramite misure di dicroismo circolare (CD) in tre diversi solventi: H₂O, MeOH e una soluzione di SDS 100mM in acqua (ambiente membrano-mimetico).

1 INTRODUZIONE

1.1 IL TRASFERIMENTO ELETTRONICO IN NATURA

In natura, i fenomeni di trasferimento elettronico (ET) sono di fondamentale importanza per lo svolgimento di specifiche funzioni biologiche, sia nei sistemi animali che in quelli vegetali [1]. I processi che prevedono il trasferimento di elettroni sono implicati in numerose trasformazioni metaboliche ed enzimatiche, tra cui la respirazione cellulare (Figura 1.1) e la fotosintesi [2]. In questi processi il trasferimento di elettroni avviene tra diverse unità redox formate da complessi proteici o cluster metallici, ma è interessante notare come un ruolo fondamentale sembra essere svolto dalle strutture secondarie adottate dalle proteine. La natura, ad esempio, utilizza le lipoproteine ed altre strutture ordinate per organizzare le molecole di clorofilla, in modo tale da conferire direzionalità ai processi di trasferimento elettronico [3]. La capacità delle catene polipeptidiche di adottare delle specifiche strutture tridimensionali, come α -eliche e foglietti β , risulta essere importante al fine di garantire dei cammini preferenziali per il trasferimento di elettroni all'interno di questi sistemi complessi. La struttura elicoidale, in particolare, sembra essere quella con la miglior capacità di mediare il trasferimento elettronico [4]. L'importanza dell'ET a livello biologico ha portato, quindi, alla necessità di studiare i meccanismi intrinseci coinvolti in questi processi, partendo dall'analisi di sistemi analoghi più semplici.

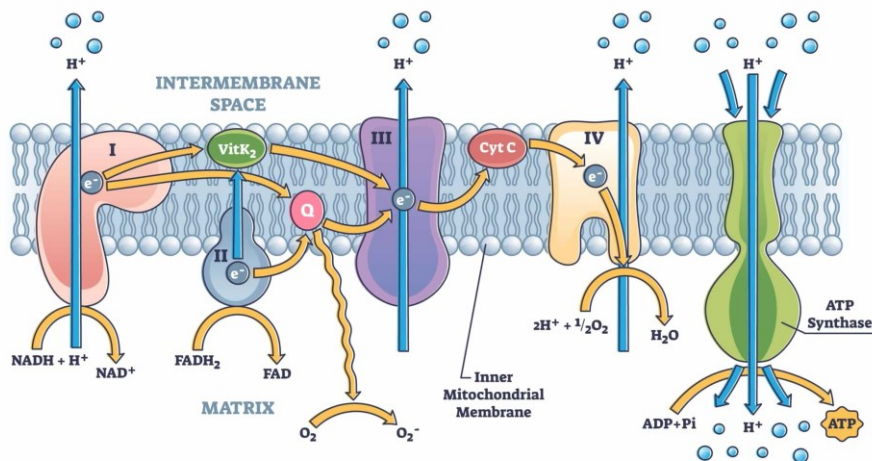


Figura 1.1: Schema dei complessi proteici che costituiscono la catena di trasporto elettronico implicata nella respirazione cellulare.

1.2 PEPTIDI COME MEDIATORI DEL TRASFERIMENTO ELETTRONICO

Il trasferimento elettronico da un donatore ad un accettore è stato studiato estesamente, sia in soluzione che in fase solida, utilizzando diversi *linker* delle due unità [2]. Tra i vari *spacer* studiati, i peptidi sono risultati essere interessanti per vari motivi: la facilità di controllo della loro struttura secondaria, che permette una progettazione precisa della distanza tra le unità redox (utile nel caso di studi di ET dipendenti dalla distanza), la possibilità di utilizzare diversi tipi di amminoacidi, la facilità di funzionalizzazione (utile sia nel caso di studi spettroscopici specifici, sia nel caso dell'ancoraggio di questi sistemi a substrati conduttori o semiconduttori), e la loro intrinseca biocompatibilità, che potrebbe essere sfruttata per la progettazione di sensori biologici [5].

Tra le varie strutture secondarie adottate dai sistemi peptidici, le eliche sembrano essere quelle più interessanti per le applicazioni e gli studi che riguardano il trasferimento elettronico. Questo è dovuto alla possibilità di ancorare sonde alle loro estremità, alla loro tendenza a formare monostrati autoassemblati su superfici e alle loro proprietà elettroniche. La particolare struttura tridimensionale delle eliche peptidiche, infatti, permette l'allineamento dei momenti di dipolo dei singoli gruppi ammidici che, sommandosi, danno luogo ad un momento di dipolo relativo all'intera struttura elicoidale [6]. Diversi studi hanno dimostrato l'importanza di questa grandezza fisica nella mediazione del trasferimento elettronico, anche se non si è ancora compreso pienamente il suo ruolo. Se in alcuni casi il dipolo orientato con il verso concorde rispetto alla direzione del trasferimento elettronico sembra aumentare l'efficienza di quest'ultimo [7], in altre circostanze si è rivelato ininfluenza rispetto all'efficienza del trasferimento [8]. Le eliche permettono, inoltre, un migliore controllo della distanza tra le unità redox interagenti nel trasferimento elettronico, grazie alla scelta mirata dei residui amminoacidici costituenti il peptide, che ne caratterizzano la struttura secondaria [9]. Gli amminoacidi C^α-tetrasostituiti sono i candidati più interessanti da questo punto di vista perché sono in grado di promuovere il *folding* elicoidale delle sequenze peptidiche, in quanto i sostituenti geminali riducono lo spazio conformazionale disponibile ai corrispondenti residui [10].

Numerosi studi sul trasferimento elettronico mediato da peptidi elicoidali sono presenti in letteratura, basati sia su esperimenti fatti in soluzione che in sistemi supportati [2]. Mentre gli studi in soluzione hanno portato ad una comprensione molto ampia di questi fenomeni, lo studio di sistemi ibridi basati su peptidi legati a substrati conduttori o semiconduttori era ancora

agli albori fino a una ventina d'anni fa. Al giorno d'oggi, i metodi utilizzati per la costruzione di monostrati peptidici autoassemblati (in inglese *SAMs*, *Self-Assembled Monolayers*) hanno permesso di studiare il trasferimento elettronico di questi nanosistemi, con lo scopo e l'auspicio di poter ricavare ulteriori e complementari informazioni su tali processi [11].

Esistono quattro ragioni importanti per studiare i *SAM* basati su peptidi: (i) i peptidi possono essere funzionalizzati facilmente, introducendo amminoacidi con proprietà peculiari; (ii) la struttura secondaria adottata dalla catena peptidica può essere controllata per formare delle strutture ordinate, anche nel caso di oligomeri corti; (iii) le proprietà autoassemblanti intrinseche dei peptidi elicoidali; (iv) il fatto che il legame peptidico sia polare permette, nel caso di strutture ordinate come α -eliche o eliche 3_{10} , la formazione di un momento di macrodipolo stabilizzato dalle interazioni a idrogeno che si formano tra gli ossigeni carbonilici e gli idrogeni ammidici. Quest'ultimo punto è interessante, in quanto il campo elettrostatico associato al macrodipolo sembra favorire i processi di trasferimento elettronico direzionale, anche su lunghe distanze [12].

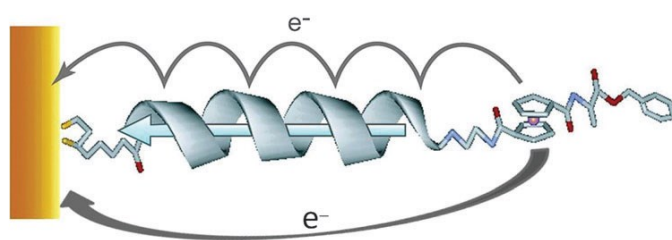


Figura 1.2: Schema semplificato dei due meccanismi di trasferimento elettronico principali che sono coinvolti nel caso di peptidi elicoidali. In alto *electron hopping*, in basso *electron tunneling*. È indicata anche la direzione del macrodipolo lungo l'asse elicoidale, con il verso concorde al trasferimento dell'elettrone [4].

L'opinione corrente ipotizza due meccanismi principali per il trasferimento elettronico mediato da peptidi elicoidali [13] [14]: (i) il meccanismo di *electron tunneling* (anche detto di *superexchange*), un processo quantomeccanico coerente che prevede il trasferimento diretto dell'elettrone dal gruppo donatore all'accettore, e (ii) il meccanismo di *electron hopping*, un processo semi-classico incoerente che vede la presenza di diversi siti di mediazione del trasferimento elettronico, solitamente associati ad orbitali vuoti (nel caso dei peptidi questi siti corrispondono ai gruppi ammidici) (Figura 1.2).

Il primo meccanismo è quello prevalente a distanze corte (inferiori a circa 20 Å) ed è formalizzato, attraverso la teoria di Marcus, da una dipendenza esponenziale decrescente della velocità del processo rispetto alla distanza.

Il secondo meccanismo, invece, sembrerebbe essere prevalente a distanze superiori ma, secondo diversi studi, in questo regime di lunghezze possono entrare in gioco vari contributi relativi alla composizione amminoacidica del peptide oppure alla dinamica molecolare delle strutture risultanti [15]. La dipendenza è in questo caso di tipo lineare, ed è evidente il passaggio da un meccanismo all'altro se si guarda al grafico che correla la costante cinetica del processo di ET alla distanza tra il donatore e l'accettore (Figura 1.3) [16]. È in ogni caso evidente come i peptidi elicoidali abbiano un ruolo attivo nella mediazione del trasferimento elettronico.

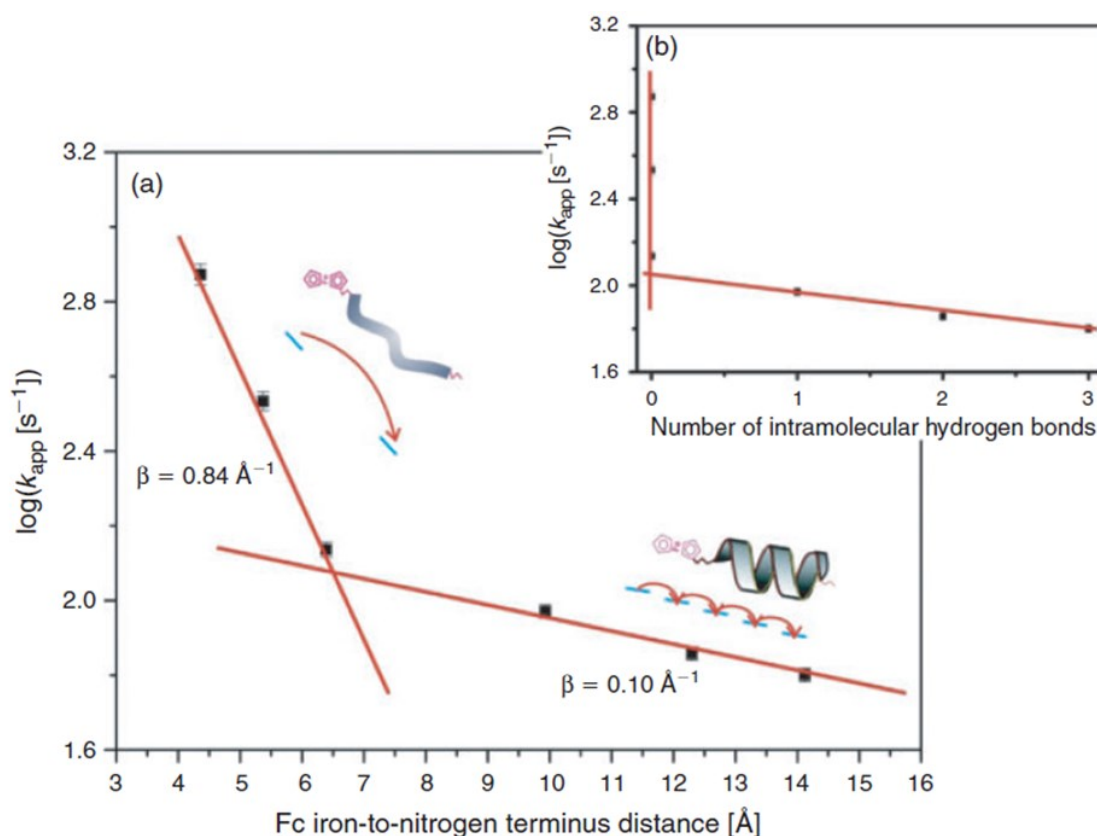


Figura 1.3: Grafico che correla la costante cinetica del processo di ET alla distanza tra le unità redox interagenti. La grandezza β rappresenta la costante di decadimento del coupling elettronico ed è indicativa del meccanismo adottato; è infatti evidente il cambiamento di meccanismo dipendente dalla distanza [16].

1.3 PEPTIDI CONTENENTI AIB PER STUDI DI ET

L'acido α -amminoisobutirrico (Aib) è un α -amminoacido non proteinogenico C^α -tetrasostituito che presenta due gruppi metilici geminali (Figura 1.4). Esso è stato riscontrato in natura all'interno di alcuni peptidi prodotti da batteri e funghi, nonché su meteoriti, in tracce [17].

L'interesse per questo particolare amminoacido, e in generale per tutti gli amminoacidi C^α -tetrasostituiti, risiede, come si è già detto, nel fatto che possiedono la capacità di indurre la formazione di strutture peptidiche elicoidali stabili, riducendo lo spazio conformazionale disponibile [18].

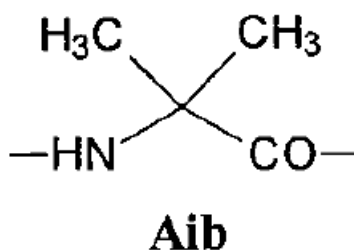


Figura 1.4: Struttura chimica del residuo amminoacidico di Aib.

In letteratura sono presenti numerosi esempi di peptidi costituiti da un'alta percentuale di Aib che sono stati sfruttati per studi sul trasferimento elettronico, in quanto essi adottano delle strutture elicoidali rigide, anche con un numero di residui basso. Questi peptidi, funzionalizzati con unità fotoattive o che presentano dei residui fluorescenti o redox-attivi, sono stati impiegati per la formazione di monostrati autoassemblati su superfici d'oro, con lo scopo di studiare il trasferimento elettronico mediato dalle eliche peptidiche (Figura 1.5). Questi sistemi potrebbero essere interessanti anche per la costruzione di dispositivi biomolecolari in grado di generare corrente in seguito all'irraggiamento con delle radiazioni di opportuna lunghezza d'onda [19].

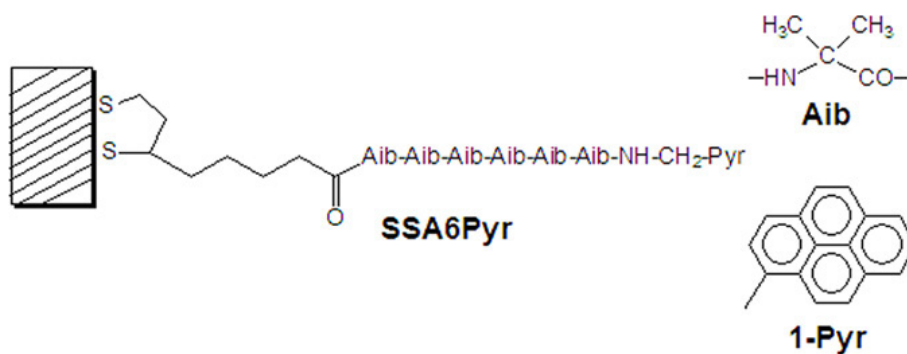
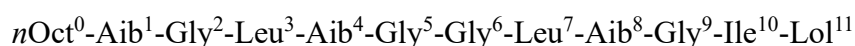


Figura 1.5: Esempio di un sistema basato su un omopeptide costituito da Aib e funzionalizzato con un'unità di pirene per studi di trasferimento elettronico fotoindotto e generazione di fotocorrente [19].

1.3.1 La Tricogina GA IV e i suoi analoghi

La Tricogina GA IV è un peptide antibatterico capostipite della famiglia dei lipopeptaibolici, così chiamati perché presentano: (i) un gruppo acilico a catena lunga legato all'estremità N-terminale, (ii) la presenza sostanziale di residui di Aib e (iii) un gruppo 1,2-amminoalcolico C-terminale [20]. Questo peptide è stato studiato intensamente sia dal punto di vista strutturale che per la sua capacità di interagire con membrane lipidiche, quindi per la sua potenzialità come agente antibiotico [21]. La sequenza della Tricogina GA IV è rappresentata di seguito:



dove $n\text{Oct}$ è il gruppo n-ottanoile e Lol è l'1,2-amminoalcol leucinolo.

Oltre alle applicazioni biologiche, alcuni analoghi della Tricogina GA IV sono stati presi in considerazione come *building blocks* per la costruzione di dispositivi nanometrici biomolecolari. Uno studio ha riportato la sintesi e la caratterizzazione di una serie di analoghi che presentano uno o più residui di lisina al posto dei residui di glicina, presenti nel lipopeptaibolico naturale, con lo scopo di testare questi composti anche in ambiente acquoso (essendo un amminoacido basico, la lisina aumenta la solubilità del peptide in acqua) e per aumentare il carattere anfifilico dato dalla peculiare struttura tridimensionale del peptide [22]. La Tricogina GA IV presenta, infatti, una struttura elicoidale destrorsa anfifilica, in cui i residui apolari (Leucina, Isoleucina) risiedono su un lato dell'elica, le glicine sul lato opposto e i residui di Aib tra una faccia e l'altra della struttura (Figura 1.6) [23].

In uno studio è risultato evidente come la sostituzione dei quattro residui di glicina della struttura nativa del peptide naturale con quattro residui di lisina aumentasse l'idrosolubilità del peptide mantenendo una conformazione ad elica destrorsa stabile [24]. A pH 3, in cui tutte e quattro le lisine risultano protonate, la conformazione più popolata risulta essere quella ad elica 3_{10} , mentre a pH 11, in cui le lisine risultano complessivamente deprotonate, la conformazione maggioritaria è quella ad α -elica [22]. Quest'ultima presenta 3.63 residui per giro ed è più corta rispetto all'elica 3_{10} , che presenta 3.24 residui per giro [25]; in virtù di una differenza di lunghezza di circa 4 Å, è risultato subito evidente come questo peptide potesse essere impiegato come una “molla” biomolecolare, con la capacità di allungarsi o contrarsi reversibilmente in base al pH.

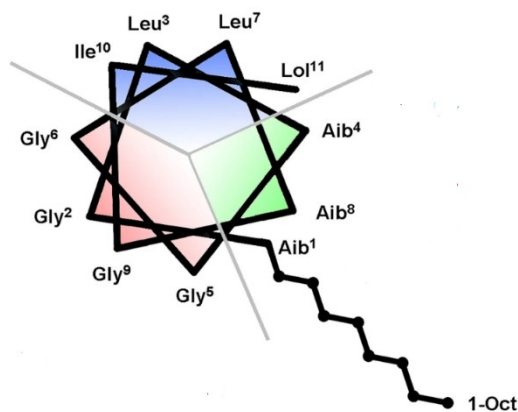


Figura 1.6: Rappresentazione dall'alto della struttura della Tricogina GA IV [23].

In un articolo pubblicato nel 2019 [26], gli autori hanno messo in pratica l'applicazione di questa peculiarità strutturale per la costruzione di un nanosistema supportato su una superficie d'oro, con lo scopo di condurre degli studi di produzione di fotocorrente. Una superficie d'oro è stata funzionalizzata con un derivato dell'acido lipoico (Figura 1.7) che presenta legata un'adenina (Lipo-Ade), sfruttando il legame S-Au (circa 40 kcal/mol) [27], per la produzione di un monostrato autoassemblato. Altri due monostrati sono stati legati al primo, sfruttando la complementarità di riconoscimento delle basi azotate adenina e timina [28]. Il secondo strato è composto da un peptide analogo della Tricogina GA IV, in cui le quattro glicine della sequenza nativa sono state sostituite da quattro lisine e l'unità di leucinolo C-terminale è stata sostituita da un residuo di leucina. Questo analogo è stato derivatizzato con la timina (Thym)

e l'adenina (Ade), rispettivamente sulle estremità N- e C-terminali. Di seguito è rappresentata la sequenza del peptide sintetizzato:



Il terzo monostato è composto, invece, da una zinco-tetrafenilporfirina derivatizzata con la timina (ZnTPP-Thym), per poter interagire selettivamente o con il derivato dell'acido lipoico o con l'estremità C-terminale del peptide attraverso il riconoscimento complementare delle due basi azotate (timina-adenina).

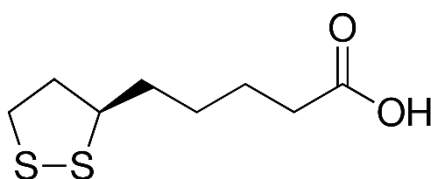


Figura 1.7: Struttura chimica dell'acido α -lipoico.

Il nanosistema composto dai tre monostati autoassemblati basato sulle interazioni dei legami a idrogeno (Figura 1.9) è stato studiato attraverso varie tecniche elettrochimiche e spettroscopiche ed è, inoltre, stato testato per valutare la sua capacità di generare una corrente elettrica in seguito all'irraggiamento con una radiazione nello spettro visibile, sfruttando il trasferimento elettronico fotoindotto (*PET, Photoinduced Electron Transfer*) mediato dalla porfirina (Figura 1.8).

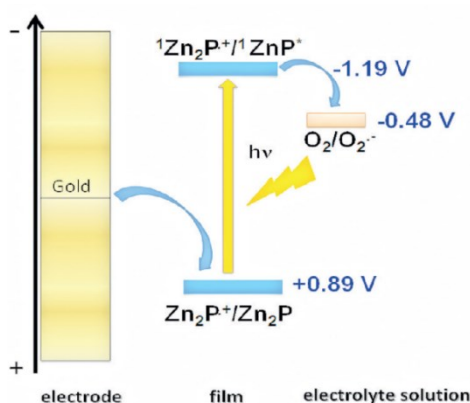


Figura 1.8: Diagramma energetico del trasferimento elettronico fotoindotto tra la superficie d'oro e l'unità porfirinica in seguito all'illuminazione con luce visibile [26].

Il sistema, come predetto, è risultato essere abile nella generazione di una fotocorrente catodica (dall'elettrodo d'oro al cromoforo porfirinico) e, nonostante l'efficienza della conversione luce-corrente sia bassa (2.3%), questo valore è tra i più alti mai rilevati per sistemi che sfruttano le interazioni a legame idrogeno di questo tipo. Questo risultato è stato commentato dagli autori dello studio ed è ascrivibile a vari motivi, tra cui l'orientazione del macrodipolo molecolare dell'elica peptidica. Ogni legame peptidico contribuisce con un dipolo di circa 3.6 Debye e la conformazione elicoidale prevede l'allineamento più o meno efficace dei singoli dipoli che, sommandosi, generano un macrodipolo parallelo all'asse elicoidale e orientato dal C-terminale all'N-terminale [29]. Il fatto che il peptide si orienti, nel nanosistema, con l'estremità N-terminale rivolta verso l'elettrodo, fa sì che il trasferimento elettronico da quest'ultimo alla tetrafenilporfirina avvenga nel verso opposto rispetto all'orientazione del dipolo dell'elica. Questo è uno dei possibili contributi che portano ad una diminuzione dell'efficienza di conversione luce-corrente del sistema. Il sistema è risultato essere comunque più efficiente rispetto all'analogo che non presenta il monostrato peptidico, suggerendo che la presenza del peptide sia comunque importante nel mediare efficacemente il trasferimento elettronico. Il meccanismo ipotizzato, vista la lunghezza del peptide di circa 17 Å, è di tipo *electron tunneling*, quindi prevede il trasferimento diretto dell'elettrone dalla superficie d'oro al cromoforo porfirinico. Oltre alla struttura elicoidale del peptide, sembrano avere un ruolo sia i legami a idrogeno stabilizzanti l'elica che le interazioni che si instaurano tra le basi azotate [6].

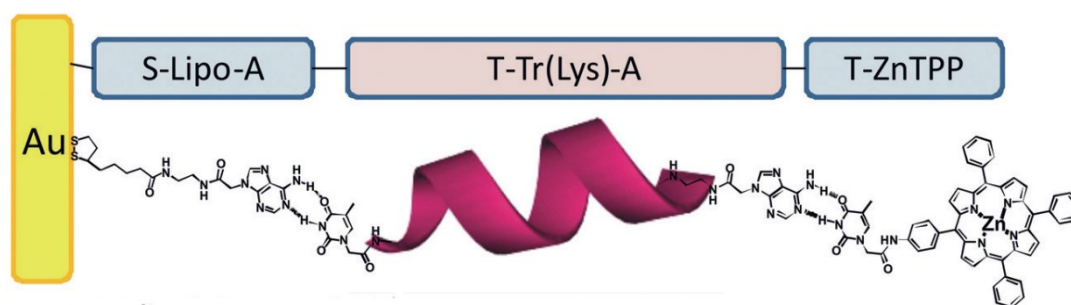


Figura 1.9.: Schema del nanosistema autoassemblato formato dai tre monostrati legati tra di loro tramite interazioni a idrogeno tra le basi azotate timina e adenina [26].

Uno studio successivo [30] ha utilizzato lo stesso sistema per valutare l'efficienza nella generazione di fotocorrente dipendente dal pH, sfruttando la presenza dei residui di lisina. A pH 4 il peptide adotta una struttura a elica 3_{10} , mentre a pH 11 una conformazione ad α -elica

(Figura 1.10), e l'efficienza nella generazione di fotocorrente è risultata essere maggiore a pH acido (Figura 1.11). Infatti, il trasferimento elettronico attraverso i peptidi protonati potrebbe aumentare la conducibilità rispetto a peptidi neutri o carichi negativamente a causa di una diminuzione dell'energia dei livelli elettronici. La dipendenza conformazionale in base al pH è probabilmente dovuta al fatto che, a pH acido, quando tutte le lisine risultano protonate, si instaurano delle repulsioni elettrostatiche tra le cariche positive, che favoriscono la struttura a elica 3_{10} , più allungata rispetto all' α -elica.

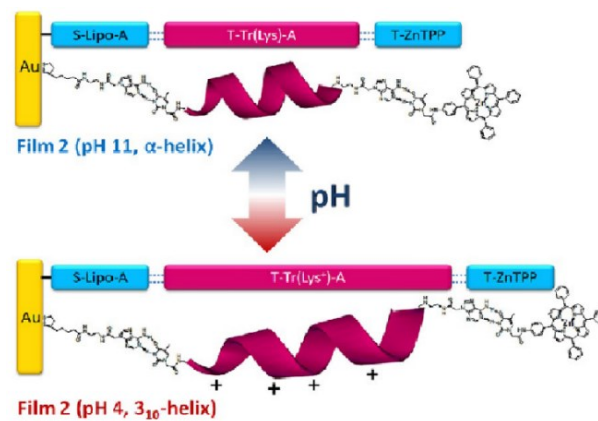


Figura 1.10: Schema del cambiamento conformazionale dipendente dal pH nel sistema autoassemblato costituito dai tre monostrati [30].

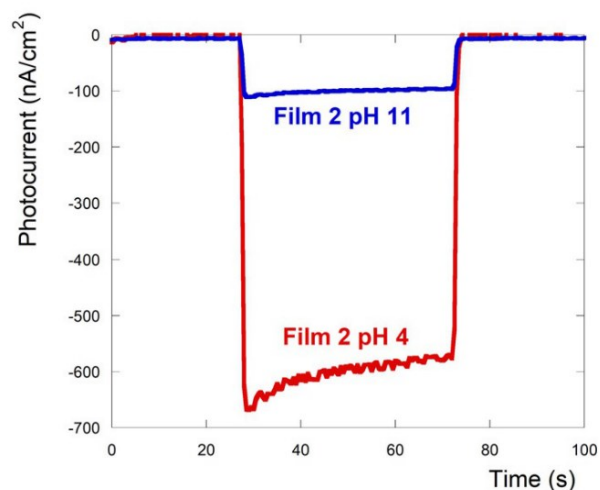


Figura 1.11: Segnali di fotocorrente ottenuti eccitando il nanosistema autoassemblato ad una lunghezza d'onda di 430 nm, a pH 4 e a pH 11 [30].

2 SCOPO DELLA TESI

Il presente elaborato di Tesi ha come oggetto la sintesi, la caratterizzazione strutturale e l'analisi conformazionale di una serie di peptidi contenenti l'amminoacido C^α-tetrasostituito Aib (acido α-amminoisobutirrico), in grado di indurre e stabilizzare le conformazioni elicoidali. I peptidi, ispirati alla sequenza di un analogo del peptaibolico naturale Tricogina GA IV, saranno derivatizzati con diverse funzionalità in vista delle loro possibili applicazioni spettroscopiche. Oltre ai peptidi, saranno sintetizzati anche: (i) il derivato dell'adenina "AdeCOOH", che presenta un gruppo carbossilico utile per le funzionalizzazioni sull'N-terminale o in catena laterale, e (ii) il derivato ZnTPP-Thym, già sfruttato nello studio a cui si ispira questa Tesi.

Di seguito sono riportate le sequenze dei peptidi che verranno sintetizzati:

Peptide	Sequenza
Ade-K2569-Thym	Ade-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Leu-NHCH ₂ CH ₂ NH-Thym
TPP-WW-K2569-WW-Lipo	TPP-Trp-Trp-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Leu-Trp-Trp-NHCH ₂ CH ₂ NH-Lipo
TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	TPP-Trp-Trp-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Leu-Trp-Trp-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Leu-Trp-Trp-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂
Ac-WW-K2569-WW-Ac	Ac-Trp-Trp-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Leu-Trp-Trp-NHCH ₂ CH ₂ NH-Ac
Ade-LUKIL-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	Ade-Leu-Aib-Lys(Boc)-Ile-Leu-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂
Ade-K25(Ade)69-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	Ade-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys(Ade)-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Leu-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂

Le sequenze amminoacidiche dei peptidi saranno sintetizzate tramite la sintesi peptidica su fase solida (SPPS), sfruttando la strategia che impiega i gruppi protettori *Fmoc* per la protezione delle estremità N^α-amminiche. Le derivatizzazioni alle estremità N- e C- terminali o in catena laterale, dove presenti, saranno realizzate attraverso la SPPS (nel caso di Ade e TPP) o tramite la sintesi in soluzione (nel caso di Thym, Lipo e Ac).

I peptidi saranno studiati e analizzati tramite tecniche cromatografiche, spettrometria di massa HRMS (ESI-TOF) e dicroismo circolare (CD), per caratterizzarli e valutare la conformazione che adottano in diversi solventi.

Lo scopo ultimo, quindi, è quello di produrre dei sistemi peptidici in grado di autoassemblarsi, che possano essere utilizzati per studi spettroscopici o di trasferimento elettronico fotoindotto, come descritto nei successivi paragrafi.

2.1 Ade-K2569-Thym

Il peptide Ade-K2569-Thym verrà sintetizzato con lo scopo di fornire un sistema analogo a quello già descritto in letteratura (Thym-K2569-Ade). Il peptide sintetizzato verrà impiegato nello stesso tipo di nanosistema per valutare l'influenza che l'orientazione del momento di dipolo elicoidale ha sull'efficienza della generazione di fotocorrente. Utilizzando i medesimi monostrati Lipo-Ade e ZnTPP-Thym, l'orientazione del peptide risulterebbe opposta rispetto al lavoro originario. La presenza dei residui di lisina potrebbe essere sfruttata per studi sul trasferimento elettronico pH-dipendente, come già citato nel capitolo precedente.

2.2 TPP-WW-K2569-WW-Lipo

Il peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo verrà sintetizzato con lo scopo di costruire un sistema interamente covalente in grado di autoassemblarsi su superfici d'oro, grazie alla funzionalità *Lipo* all'estremità C-terminale, per studi di trasferimento elettronico fotoindotto. La sequenza del peptide si ispira al sistema autoassemblato descritto nel paragrafo 1.3.1 e permetterà di valutare l'efficienza del trasferimento elettronico attraverso legami covalenti (sistema nuovo) o legami a idrogeno (sistema con le basi azotate). Le coppie di residui di triptofano alle estremità della sequenza *K2569* verranno inserite per mimare la componente aromatica delle basi azotate complementari del sistema non covalente.

2.3 TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂

Il peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ verrà sintetizzato con lo scopo di costruire un sistema interamente covalente, ispirato al peptide descritto nel paragrafo precedente (2.2), ma con due strati peptidici tra superficie e sonda porfirinica. La presenza di due sequenze *K2569* consecutive, separate da una coppia di residui di triptofano, ha lo scopo di mimare il dimero non covalente dello stesso tipo di sistema. Esso potrebbe essere utilizzato

per studi di trasferimento elettronico a lungo raggio oppure venire funzionalizzato con altre unità all'estremità C-terminale, per poter essere legato a varie superfici.

2.4 Ac-WW-K2569-WW-Ac

Il peptide Ac-WW-K2569-WW-Ac verrà sintetizzato con lo scopo di fornire un riferimento per i peptidi descritti precedentemente (paragrafi 2.2 e 2.3). Inoltre, esso potrebbe essere impiegato per studi di *self-assembly* in soluzione, sfruttando l'intrinseca fluorescenza delle funzionalità indoliche dei triptofani.

2.5 Ade-LUKIL-NHCH₂CH₂NH₂ e Ade-K25(Ade)₆₉-NHCH₂CH₂NH₂

I peptidi Ade-LUKIL e Ade-K25(Ade)₆₉ verranno sintetizzati con lo scopo di fornire una base per derivatizzazioni future. La catena laterale del residuo di lisina di Ade-LUKIL recherà un gruppo protettore acido-labile e potrà essere deprotetta successivamente per poterla funzionalizzare, assieme all'estremità C-terminale, con ThymCOOH. In maniera analoga, l'estremità C-terminale del peptide Ade-K25(Ade)₆₉ potrà venire derivatizzata con ThymCOOH, per poi rimuovere i gruppi protettori dalle catene laterali dei residui Lys², Lys⁶ e Lys⁹. I derivati così prodotti potrebbero essere impiegati come *building blocks* per la costruzione di materiali autoassemblanti, in grado di autoripararsi grazie alle interazioni complementari tra le basi azotate, oppure per studi spettroscopici e di trasferimento elettronico.

3 PARTE SPERIMENTALE

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Reagenti e solventi

Carlo Erba	ACN per HPLC; MeOH per HPLC; TEA
Honeywell	DCM; DMF; Et ₂ O; Piperidina
Iris Biotech	Resina 1,2-diamminoetan-tritilica; DIC; EDC HCl; Fmoc-AA-OH; HATU; HOAt; HOBt; OxymaPure [®]
Sigma	AcOEt; Acetato di zinco diidrato; Acetone; AcOH; (±)- α -acido lipoico; ACN anidro; Adenina; Ac ₂ O; Bromoacetato di etile; Cloroformio; Cloruro di calcio; DCM anidro; DMF anidra; Etere di petrolio; Et ₂ O; EtOH; Fenilsilano; Gel di silice; HCl; KHSO ₄ ; MeOH; NMM; Idruro di sodio; NaHCO ₃ ; NaOH; Solfato di sodio; <i>Tetrakis</i> (trifenilfosfina)Palladio(0); THF; ThymCOOH
Fluorochem	Fmoc-Aib-OH
Novabiochem	Fmoc-Lys(Alloc)-OH; Resina 1,2-diamminoetan-tritilica
AmBeed	AdeCOOEt
Porphychem	TPP-COOH; TPP-NH ₂

3.1.2 Strumentazione

3.1.2.1 Cromatografia a media pressione (Biotage Isolera Prime)

I peptidi sono stati purificati tramite lo strumento Isolera Prime Biotage[®]. Esso è un cromatografo a media pressione che lavora contemporaneamente a due lunghezze d'onda comprese tra 260 e 206 nm. Il campione da purificare viene caricato, attraverso una cartuccia di caricamento (*cartridge*), in una colonna C18 Snap Ultra, che presenta un flusso di lavoro di 12 mL/min e un volume morto di 15 mL. In generale, per la purificazione, vengono utilizzati i seguenti eluenti: A) 90% H₂O MilliQ + 10% ACN + 0.1% HCl e B) 10% H₂O MilliQ + 90% ACN + 0.1% HCl, tranne nel caso della purificazione del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo, dove si usano gli stessi eluenti ma senza la presenza di acido. Nel paragrafo 3.2.3 è riportata la procedura generale per la purificazione dei peptidi.

3.1.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Lo strumento utilizzato per la registrazione dei cromatogrammi HPLC è un cromatografo Pharmacia Biotech, il quale presenta un detector funzionante a tre lunghezze d'onda contemporaneamente, comprese tra 260 e 205 nm. In base alla polarità del prodotto da analizzare si utilizzano due colonne differenti, entrambe a fase inversa: Agilent Zorbax RX-C18 5 μ m e Phenomenex C4, entrambe con flusso di 1 mL/min. Gli eluenti utilizzati per le analisi HPLC sono i seguenti: A) 90% H₂O MilliQ + 10% ACN + 0.05% TFA e B) 10% H₂O MilliQ + 90% ACN + 0.05% TFA. Nella preparazione degli eluenti viene utilizzata H₂O MilliQ degassata, per evitare l'insorgenza di bolle all'interno dello strumento.

3.1.2.3 Liofilizzatore

Il liofilizzatore utilizzato è un Edwards Modulyo, costituito da un modulo in cui è contenuto un compressore refrigerato ad aria e una camera di condensazione. Possiede otto porte, a cui possono essere collegati dei palloni o delle boccette, utilizzando degli adattatori opportuni. Dopo aver congelato i campioni con ghiaccio secco, i recipienti vengono collegati agli adattatori e, tramite delle valvole poste in corrispondenza dei rubinetti, viene portato il vuoto.

3.1.2.4 LC-MS

Lo strumento utilizzato è un LC-MS della Agilent (*LC*: Agilent 1200 Series HPLC; *MS*: 6120 ESI-Quadrupole MS). La colonna utilizzata per la separazione dei componenti è una Agilent Zorbax RX-C18 5 μ m e gli eluenti utilizzati sono i seguenti: A) 90% H₂O milliQ + 10% ACN + 0.05% TFA e B) 10% H₂O milliQ + 90% ACN + 0.05% TFA. Il detector del cromatografo rivela due lunghezze d'onda contemporaneamente (220 nm e 280 nm) e fornisce due cromatogrammi, misurati alle due lunghezze d'onda, e un cromatogramma con i dati relativi all'analisi di massa.

3.1.2.5 HRMS

Gli spettri di massa ad alta risoluzione vengono misurati dal servizio di spettrometria di massa attivo presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Padova, tramite spettrometro di massa Micromass ESI-TOF o Waters Xevo ESI-TOF, entrambi utilizzati sempre in modalità positiva.

3.1.2.6 Dicroismo Circolare (CD)

Gli spettri CD sono stati acquisiti su uno spettrofotometro Jasco J-815, utilizzando una cella al quarzo con lunghezza del percorso di 1 mm (Hellma Analytics, Monaco, Germania). Come solvente è stato utilizzato metanolo, acqua o una soluzione di sodio dodecil solfato (SDS) 100 mM in acqua. Sono state preparate soluzioni 0.1-0.01 mM dei peptidi in ciascuno dei solventi scelti. Quindi, 300 μ L di ciascuna soluzione sono stati inseriti nella cella di quarzo da 1 mm e la cella è stata inserita nel supporto per cella dello strumento. Le misure sono state eseguite a 25°C, acquisendo 16 scansioni.

3.2 PROCEDURE GENERALI

3.2.1 SPPS manuale

La sintesi peptidica in fase solida (SPPS) è una tecnica che permette la sintesi di peptidi e derivati peptidici tramite una serie di *step* che vengono ripetuti ciclicamente:

1. In una siringa per sintesi in fase solida delle dimensioni adeguate (6 mL o 15 mL) viene inserita la quantità di resina desiderata. Le siringhe sono dei reattori in plastica che presentano un setto poroso, il quale permette di trattenere il supporto solido e, al contempo, di lasciare scorrere i solventi e i reagenti in essi solubili.
2. *Swelling*: la resina viene ricoperta con DMF degassata e si lascia in agitazione il sistema per circa 30 minuti, quindi il solvente viene eliminato attraverso il setto poroso e il processo viene ripetuto una seconda volta. Lo scopo di questo *step* è quello di rigonfiare in modo appropriato la resina, permettendo così l'esposizione adeguata dei siti attivi sui quali crescerà la catena peptidica.
3. *Coupling*: in una boccetta si pesano le quantità necessarie di amminoacido Fmoc-protetto e di OxymaPure[®], calcolate rispetto al *loading* teorico della resina, e si sciolgono nella quantità opportuna di DMF degassata. A questo punto, si aggiungono le quantità previste di DIC e si inserisce all'interno della siringa di reazione la soluzione preparata. Il sistema viene lasciato in agitazione per circa 60 minuti, trascorsi i quali si elimina la soluzione di reazione tramite il setto poroso. Se la sintesi prevede un doppio *coupling*, il processo viene ripetuto allo stesso modo una seconda volta.
4. Lavaggi dopo il *coupling*: dopo aver eliminato la soluzione dei reagenti, la resina viene lavata con DMF per almeno 6 volte, agitando vigorosamente la siringa per qualche secondo ed eliminando il solvente tramite il setto poroso.

5. Deprotezione *Fmoc*: per la deprotezione dell'estremità N-terminale protetta dal gruppo *Fmoc* si utilizza una soluzione di piperidina al 20% in DMF. La soluzione di deprotezione viene inserita all'interno della siringa e si lascia in agitazione il sistema per circa 5 minuti, quindi si filtra tramite il setto poroso e si ripete il passaggio una seconda volta, lasciando reagire per circa 10 minuti.
6. Lavaggi dopo la deprotezione: dopo aver eliminato la soluzione di deprotezione, la resina viene lavata con DMF per almeno 7 volte, agitando vigorosamente la siringa per qualche secondo ed eliminando il solvente tramite il setto poroso.
7. La sintesi del peptide prosegue ripetendo consecutivamente gli *step* dal 3 al 6.
8. Sblocco del peptide dalla resina: a sequenza completata, la resina viene seccata con DCM e trattata con la quantità opportuna di una soluzione di HFIP al 30% in DCM, lasciando in agitazione per circa 60 minuti. La soluzione viene quindi raccolta in una boccetta o in un pallone tramite il setto poroso, avendo cura di raccogliere scrupolosamente tutta la miscela per evitare perdita di prodotto, aiutandosi eventualmente con piccole aliquote di DCM. Per garantire la raccolta quantitativa del peptide, il processo di sblocco dalla resina viene ripetuto altre due volte, la prima lasciando in agitazione il sistema per 60 minuti circa e la seconda lasciandolo reagire *overnight*.
9. Le soluzioni di sblocco vengono portate a secco tramite evaporazione sotto un leggero flusso di azoto o tramite *rotavapor* e il peptide grezzo raccolto viene analizzato tramite HRMS e HPLC, per poter valutare l'efficienza della sintesi e l'eventuale necessità di purificazione.

3.2.2 Sblocco in piccolo

Per valutare l'andamento delle sintesi in fase solida vengono prelevati pochi granelli di resina in seguito ad alcuni *coupling* e inseriti in una siringa per SPPS da 1 mL. Vengono quindi seccati con DCM e trattati con una miscela di HFIP 30% in DCM per 1 ora. La miscela di sblocco viene quindi raccolta in una eppendorf, portata a secco con un leggero flusso di azoto e la quantità raccolta viene analizzata tramite HRMS e HPLC, per poter valutare l'avvenuta reazione. Poiché tutti i peptidi sintetizzati nel presente lavoro di Tesi sono stati prodotti utilizzando la resina 1,2-diaminoetan-tritilica, è importante deproteggere l'estremità N-terminale del peptide in crescita dal gruppo *Fmoc* il prima possibile, per evitare reazioni indesiderate.

3.2.3 Purificazione con Biotage® Isolera Prime

In base al cromatogramma HPLC del peptide grezzo viene impostato un gradiente a scalini che va dallo 0% al 100% di eluente B, in cui sia previsto almeno un volume di colonna per ogni variazione del 10% di B. La colonna viene quindi equilibrata facendo eluire, in ordine, un volume di 4 colonne (CV) di eluente B, di 4 colonne di eluente 50% A e 50% B e di 4 colonne di eluente A. Nel frattempo, il campione da purificare viene caricato sulla cartuccia di caricamento (*cartridge*), sciogliendolo nella minima quantità di metanolo (massimo 1 mL), la quale viene posta in testa alla colonna al termine dell'equilibratura. Il gradiente precedentemente impostato viene fatto partire e la purificazione viene seguita attraverso un cromatogramma che appare sul *monitor* dello strumento, il quale rivela l'assorbanza in uscita a due diverse lunghezze d'onda. In base ai picchi presenti nel cromatogramma, le frazioni di purificazione vengono raccolte all'interno di provette ordinate e numerate, e le rispettive soluzioni vengono analizzate tramite LC-MS o HPLC/HRMS. Le frazioni con una purezza simile vengono raccolte in un pallone e il solvente organico (ACN) viene evaporato tramite *rotavapor*. La soluzione acquosa rimanente viene ghiacciata con del ghiaccio secco e liofilizzata, per ottenere così il peptide purificato anidro.

3.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONI

3.3.1 Sintesi di AdeCOOEt

Procedura:

In un pallone da 250 mL vengono inseriti 2.102 g di adenina (15.6 mmol, 1 eq.), si sospendono in 45 mL di DMF anidra e si lascia in agitazione a temperatura ambiente. In una boccetta si pesano 0.786 g di NaH (32.7 mmol, 2 eq.) e la polvere viene coperta con etere di petrolio. Si lascia quindi decantare il solido per circa 10 minuti e si rimuove delicatamente la fase organica con una pipetta Pasteur. Lo stesso processo viene ripetuto una seconda volta. Si aggiunge alla sospensione di adenina l'idruro di sodio in piccole porzioni, si tappa con tubo al cloruro di calcio e si lascia in agitazione per 2 ore. Durante questo tempo vengono aggiunti alla miscela di reazione altri 3 mL di DMF anidra, per facilitare l'agitazione meccanica da parte dell'ancoretta magnetica. La miscela si presenta bianca e schiumosa. Sul pallone di reazione viene montato quindi un gocciolatore contenente 3.45 mL di bromoacetato di etile (31.1 mmol, 2 eq.), il quale viene inserito nella miscela di reazione goccia a goccia per un totale di circa 3 ore. Si nota inizialmente un cambiamento di colore della miscela da bianco a rosa pallido e,

dopo la completa aggiunta del reagente, essa appare giallo crema e si nota un precipitato bianco in sospensione. Si controlla l'andamento della reazione con una TLC (eluente DCM/MeOH 8:2). Si lascia in agitazione per altre 2 ore e si pone il pallone in frigorifero *overnight*. Il giorno seguente, si lascia in agitazione per circa 30 minuti e si fa un'altra TLC (eluente DCM/MeOH 8:2), che conferma la scomparsa di adenina reagente ($R_{f,Adenina} = 0.36$; $R_{f,AdeCOOEt} = 0.70$). Si filtra su gooch e si lava il filtrato con sei aliquote di etere etilico.

Il solido raccolto viene posto in essiccatore per rimuovere il solvente residuo e si ottengono 1.820 g di AdeCOOEt (resa: 53%).

LC-MS (ESI-Q): $[M]_{calc.} = 221.09$; exp: $[M+H]^+ = 222.2$ m/z, $[M-Et+H]^+ = 194.1$ m/z.

3.3.2 Sintesi di AdeCOOH

In un pallone da 250 mL si inseriscono 2.0 g di AdeCOOEt (commerciale o proveniente dalla sintesi precedente), quindi 60 mL di MeOH e si lascia agitare la sospensione in un bagno di acqua e ghiaccio per circa 10 minuti. Viene aggiunta lentamente alla miscela una soluzione acquosa di NaOH 2 M, fino a pH 14. Si lascia in agitazione per circa 1 ora, mantenendo sempre la temperatura intorno agli 0°C, e si controlla il decorso della reazione con TLC (eluente DCM/MeOH/AcOH 12:8:1; $R_{f,AdeCOOEt} = 0.81$; $R_{f,AdeCOOH} = 0.17$). Si aggiunge lentamente una soluzione acquosa di HCl 4 M, fino a pH 1, e compare un precipitato bianco. Si filtra la miscela su gooch e il filtrato viene lavato con qualche aliquota di acqua deionizzata fredda. Dopo aver lasciato il solido in essiccatore *overnight*, vengono raccolti 1.7 g di prodotto (resa: 98%).

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{calc.} = 193.06$; exp: $[M+H]^+ = 194.0679$ m/z.

3.3.3 Sintesi ZnTPP-Thym

Procedura:

In un pallone da 100 mL vengono inseriti 111 mg di ThymCOOH (0.60 mmol, 3 eq.) e 7 mL di DCM anidro. Vengono inseriti anche 82 mg di HOAt e 115 mg di EDC·HCl, precedentemente disciolti in una soluzione di DCM/DMF 7:3 (10 mL), entrambi anidri, e si lascia in agitazione tappando con tubo al cloruro di calcio. Dopo circa 30 minuti dall'aggiunta degli attivatori, vengono inseriti nella miscela di reazione 126 mg di TPP-NH₂ (0.20 mmol, 1 eq.), precedentemente disciolti in 4 mL di DCM anidro, e 155 µL di NMM, fino a pH 8, e si

lascia in agitazione per 4 ore circa. Il controllo con TLC (DCM/MeOH 75:25) conferma che la reazione è andata a completezza ($R_{f,TPP-NH_2} = 0.86$; $R_{f,TPP-Thym} = 0.28$). Si evapora il solvente con *rotavapor* e si riprende varie volte con toluene per facilitare l'evaporazione della DMF residua, fino ad ottenere un olio molto viscoso di colore viola intenso. Il crudo di reazione (510 mg) viene purificato con colonna cromatografica a gel di silice, sfruttando un gradiente di DCM/MeOH da 95:5 a 80:20.

Dopo aver unito le frazioni in un pallone e averle portate a secco, si raccolgono 151 mg di prodotto (resa: 95%).

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{calc.} = 795.30$; exp: $[M+H]^+ = 796.3709$ m/z.

Procedura di zincatura di TPP-Thym (sintesi ZnTPP-Thym)

In un pallone da 50 mL vengono inseriti 35 mg di TPP-Thym, proveniente dalla sintesi precedente, e si sciolgono in THF. Si aggiungono quindi alla miscela 4 mL di una soluzione satura di acetato di zinco diidrato in MeOH e si lascia reagire a riflusso per 1 ora circa, controllando con LC-MS l'andamento della reazione. Dopo aver portato a secco la miscela e aver disciolto il grezzo in DCM, si estrae il prodotto con acetato di etile, lavandolo con acqua deionizzata per tre volte. La fase organica viene raccolta in una beuta e anidrificata con solfato di sodio. In seguito alla filtrazione si porta a secco e si lascia in essiccatore *overnight* (37 mg, resa 97%).

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{calc.} = 857.21$; exp: $[M+H]^+ = 857.2054$ m/z.

RP-HPLC (gradiente da 60 a 100% di B in 40 minuti, colonna C18, flusso 1 mL/min): $t_R = 15.1$ min; purezza: 96%.

3.3.4 Sintesi di H₂N-KLUKIL su resina 1,2-diamminoetan-tritilica

Sequenza peptidica legata alla resina: Lys¹-Leu²-Aib³-Lys⁴-Ile⁵-Leu⁶

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di Fmoc-AA-OH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	MW (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Fmoc-Leu-OH	353.42	3	425 mg
Fmoc-Ile-OH	353.42	3	425 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	3	564 mg
Fmoc-Aib-OH	325.36	3	392 mg
OxymaPure [®]	142.11	3	171 mg
DIC	126.20	3	152 μ L

In una siringa per SPPS da 15 ml vengono pesati 495 mg di resina 1,2-diamminoetan-tritilica (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.401 mmol (1 eq.). Tutti gli Fmoc-AA-OH vengono inseriti nella sequenza attraverso un singolo *coupling*, sfruttando un eccesso di 3 equivalenti, tranne nel caso del residuo di Fmoc-Aib-OH e del residuo di leucina adiacente (Leu⁷), che vengono aggiunti con due *coupling* da 3 equivalenti l'uno. Ciascun *coupling* dura 60 minuti circa e gli attivatori utilizzati sono OxymaPure[®] e DIC. A sequenza completata, la resina viene seccata con DCM e posta in essiccatore *overnight*, per poter essere poi utilizzata per le successive sintesi.

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 940.67$; exp: $[M+H]^+ = 941.6625$ m/z, $[M+2H]^{2+} = 470.2765$ m/z, $[M-2\text{Boc}+2H]^{2+} = 371.2733$ m/z.

3.3.5 Sintesi di Ade-K2569 su resina 1,2-diamminoetan-tritilica

Sequenza peptidica legata alla resina: Ade⁰-Aib¹-Lys²-Leu³-Aib⁴-Lys⁵-Lys⁶-Leu⁷-Aib⁸-Lys⁹-Ile¹⁰-Leu¹¹-NHCH₂CH₂NH₂

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di Fmoc-AA-OH, AdeCOOH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	MW (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Fmoc-Leu-OH	353.42	3	168 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	3	223 mg
Fmoc-Aib-OH	325.36	3	155 mg
AdeCOOH	193.17	3	92 mg
OxymaPure [®]	142.11	3	68 mg
DIC	126.20	3	74 µL
HATU	380.24	3	181 mg
HOAt	136.11	3	65 mg
DIPEA	129.25	6	83 µL

Il peptide è stato sintetizzato partendo di resina con legato il peptide H₂N-KLUKIL (paragrafo 3.3.4). Si sono pesati 196 mg di resina-peptide (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), corrispondenti a 0.159 mmol (1 equivalente).

Per il completamento della sequenza amminoacidica si eseguono un *coupling*, con eccesso di 3 equivalenti, per i residui di Fmoc-Lys(Boc)-OH e due *coupling* consecutivi, sempre con un eccesso di 3 equivalenti, per i residui Fmoc-Aib-OH e Fmoc-Leu-OH. In entrambi i casi il tempo di reazione per ciascun *coupling* è di circa 60 minuti e vengono utilizzati come attivatori OxymaPure[®] e DIC.

Per la funzionalizzazione dell'estremità N-terminale con AdeCOOH si utilizza una miscela di AdeCOOH, HATU e HOAt (3 equivalenti ciascuno) e DIPEA (6 equivalenti). L'AdeCOOH viene sciolta in DMF degassata assieme agli attivatori e alla base, e si lascia preattivare per circa 10 minuti; quindi, si inerte la miscela nella siringa di reazione e si lascia reagire *overnight* (circa 17 ore). Il giorno successivo, si fanno 2 lavaggi con la soluzione di piperidina al 20% in DMF e 8 lavaggi con DMF, per eliminare l'adenina in eccesso, e 6 lavaggi con DCM per seccare la resina.

Per lo sblocco del peptide dalla resina si utilizza una soluzione di HFIP al 30% in DCM. Le soluzioni di sblocco vengono raccolte in tre palloni, si portano a secco e vengono raccolti complessivamente 181 mg di peptide grezzo, di cui 150 mg dal primo sblocco (resa complessiva peptide grezzo: 61%; resa primo sblocco: 51%).

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 1855.20$; exp: $[M+H]^+ = 1856.0171$ m/z, $[M+2H]^{2+} = 928.5688$ m/z e impurezza a 1037.6051 m/z.

RP-HPLC (gradiente da 0 a 100% di B in 33 minuti, colonna C18, flusso 1 mL/min): $t_R = 24.9$ min (prodotto desiderato) e $t_R = 23.4$ min (impurezza).

3.3.6 Sintesi del peptide Ade-K2569-Thym

Il peptide grezzo ottenuto dalla sintesi precedente viene inserito in un pallone e sospeso in DCM anidro, quindi viene aggiunta la minima quantità di DMF per facilitare la dissoluzione. In tre diverse boccette vengono preparate le soluzioni madre degli attivatori utilizzando per tutte un eccesso di 15 equivalenti calcolato rispetto alla quantità di peptide grezzo: ThymCOOH viene sciolta in 1.5 mL di una soluzione di DCM/DMF 1:1, HOBt in 1.5 mL di DCM anidro ed EDC in 1.5 mL di DCM anidro.

La reazione viene portata avanti per 2 giorni utilizzando la seguente strategia: in una boccetta pulita vengono inserite le quantità opportune delle tre soluzioni madre degli attivatori e 500 μ L di DCM anidro, quindi si lascia preattivare per circa 10 minuti e la soluzione risultante viene inserita nel pallone di reazione; il pH viene aggiustato a circa 8.5 con la quantità opportuna di NMM e si lascia in agitazione tappando con tubo al cloruro di calcio. La reazione viene monitorata tramite HPLC, fino alla scomparsa del picco relativo al peptide reagente. Sono necessari complessivamente 2.5 equivalenti di ThymCOOH e attivatori per portare la reazione a completezza.

Il crudo di reazione viene concentrato sottovuoto e liofilizzato per eliminare le tracce di DMF, quindi viene disciolto in acetato di etile e lavato, tramite un imbuto separatore, con acqua acida (3 volte), acqua deionizzata (3 volte), acqua basica (3 volte) e nuovamente acqua deionizzata (3 volte). La fase organica viene raccolta in una beuta, anidrificata con solfato di sodio e filtrata in un pallone, per essere poi portata a secco. Il peptide grezzo viene quindi purificato tramite cromatografia a fase inversa a media pressione, utilizzando una colonna C18 SNAP Ultra 12 g (volume colonna: 15 mL), per ottenere circa 45 mg di prodotto.

Il peptide purificato Boc-protetto viene trattato per tre volte, 1 ora ciascuna, con 5 mL di HCl 3M in MeOH anidro, quindi si fanno dei lavaggi con MeOH evaporando di volta il solvente. Vengono raccolti 44 mg di peptide Ade-K2569-Thym (resa: 26%).

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 1621.03$; exp: $[M+2H]^{2+} = 810.7322$ m/z, $[M+3H]^{3+} = 540.7981$ m/z, $[M+4H]^{4+} = 405.6735$ m/z.

RP-HPLC (gradiente da 0 a 100% di B in 30 minuti, colonna C18, flusso 1 mL/min): $t_R = 12.5$ min; purezza: 81%.

3.3.7 Sintesi di Ade-K25(Ade)69-NHCH₂CH₂NH₂

Sequenza: Ade⁰-Aib¹-Lys²-Leu³-Aib⁴-Lys⁵(Ade)-Lys⁶-Leu⁷-Aib⁸-Lys⁹-Ile¹⁰-Leu¹¹-NHCH₂CH₂NH₂

SPPS:

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di Fmoc-AA-OH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	M.W. (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Fmoc-Lys(Alloc)-OH	452.51	3	210 mg
Fmoc-Aib-OH	325.36	3	151 mg
Fmoc-Leu-OH	353.42	3	164 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	3	218 mg
OxymaPure [®]	142.11	3	66 mg
DIC	126.20	3	72 μ L

Il peptide è stato sintetizzato partendo dalla resina con legato il peptide H₂N-KLUKIL, la cui sintesi è descritta nel paragrafo 3.3.4. Si sono pesati 191 mg di resina-peptide (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.155 mmol (1 equivalente). Per il completamento della sequenza si eseguono un *coupling* con eccesso di 3 equivalenti per i residui Fmoc-Lys(Boc)-OH e Fmoc-Lys(Alloc)-OH, e due *coupling* consecutivi, sempre con un eccesso di 3 equivalenti, per i residui Fmoc-Aib-OH e Fmoc-Leu-OH.

In entrambi i casi, il tempo di reazione per ciascun *coupling* è di circa 60 minuti e vengono utilizzati come attivatori OxymaPure® e DIC. Una volta completata la sequenza amminoacidica, la resina viene seccata con DCM e lasciata in essiccatore *overnight*.

Deprotezione Alloc

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di reagenti utilizzate per la deprotezione del gruppo protettore *Alloc*:

Reagente	M.W. (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Tetrakis(trifenilfosfina)palladio (0)	1155.56	0.25	45 mg
Fenilsilano	108.22	24	459 µL

In una siringa per SPPS da 6 mL vengono pesati 191 mg di resina-peptide provenienti dalla sintesi precedente, che corrispondono a 0.155 mmol (1 equivalente). Vengono aggiunti 0.25 equivalenti di tetrakis(trifenilfosfina)palladio (0) e 24 equivalenti di fenilsilano, precedentemente disciolti in 3.5 ml di DCM anidro. Tramite un setto si rimuove l'ossigeno insufflando azoto per 2-3 minuti, quindi si rimuove il setto, si tappa più velocemente possibile, sigillando con del *parafilm*, e si lascia in agitazione per 30 minuti, coprendo la siringa con foglio d'alluminio per evitare il contatto con la luce. Trascorsi i 30 minuti, si fanno dei lavaggi con DCM e il processo viene ripetuto un'altra volta. In seguito ai lavaggi con DCM, DMF e nuovamente DCM si verifica l'esito della deprotezione con uno sblocco in piccolo.

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 1581.11 \text{ m/z}$; exp: $[M+H]^+ = 1581.0933 \text{ m/z}$, $[M+2H]^{2+} = 791.0621 \text{ m/z}$, $[M-\text{Boc}+2H]^{2+} = 741.0295 \text{ m/z}$, $[M-2\text{Boc}+2H]^{2+} = 691.0078 \text{ m/z}$, $[M-3\text{Boc}+2H]^{2+} = 640.9734 \text{ m/z}$, $[M-3\text{Boc}+3H]^{3+} = 427.6578 \text{ m/z}$.

Coupling AdeCOOH SPPS

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di AdeCOOH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	M.W. (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
AdeCOOH	193.17	6	179.69 mg
HATU	380.24	6	353.70 mg
HOAt	136.11	6	126.61 mg
DIPEA	129.25	12	324 μ L

Il *coupling* di AdeCOOH sull'estremità N-terminale e sulla catena laterale di Lys⁵ viene fatto sfruttando un eccesso di 6 equivalenti di AdeCOOH, HATU e HOAt (avendo cura di pesare una quantità di HATU leggermente inferiore rispetto a quella di HOAt) e 12 equivalenti di DIPEA, che vengono fatti preattivare per 10 minuti circa dopo averli sciolti in DMF degasata (rimane una sospensione). Sono necessari almeno 3 *coupling overnight*, con un eccesso di 6 equivalenti ciascuno, per poter legare quantitativamente la base azotata ad entrambe le estremità amminiche (N-terminale ed ϵ -NH₂ della lisina).

Dopo l'ultimo *coupling*, si fanno 2 lavaggi con la soluzione di piperidina al 20% in DMF e 8 lavaggi con DMF, per eliminare l'adenina in eccesso, e 6 lavaggi con DCM per seccare la resina.

Per lo sblocco del peptide dalla resina si utilizza una soluzione di HFIP al 30% in DCM, che viene fatta reagire per 1 ora. La miscela di sblocco viene raccolta in una boccetta e portata a secco sotto un leggero flusso di azoto, quindi viene posta in essiccatore *overnight* (121 mg, resa del 40%, relativa al peptide grezzo Boc-protetto su Lys², Lys⁶ e Lys⁹).

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 1930.20; exp: [M+H]⁺ = 1931.1946 m/z e altri segnali.

3.3.8 Sintesi di H₂N-WW-K2569-WW su resina 1,2-diamminoetan-tritilica

Sequenza peptidica legata alla resina: Trp¹-Trp²-Aib³-Lys⁴-Leu⁵-Aib⁶-Lys⁷-Lys⁸-Leu⁹-Aib¹⁰-Lys¹¹-Ile¹²-Leu¹³-Trp¹⁴-Trp¹⁵

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di Fmoc-AA-OH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	MW (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.59	3	432 mg
Fmoc-Leu-OH	353.42	3	290 mg
Fmoc-Ile-OH	353.42	3	290 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	3	384 mg
Fmoc-Aib-OH	325.36	3	267 mg
OxymaPure [®]	142.11	3	117 mg
DIC	126.20	3	104 μ L

In una siringa per SPPS da 15 ml si inseriscono 338 mg di resina 1,2-diamminotano-tritilica (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.273 mmol (1 equivalente). Per ciascun *coupling* viene usato un eccesso di 3 equivalenti, facendo reagire il corrispondente Fmoc-AA-OH con OxymaPure[®] e DIC per un tempo di circa 60 minuti. L'unica eccezione riguarda i residui Leu⁹, Leu⁵ e Trp², che vengono inseriti con due *coupling* consecutivi, ciascuno con un eccesso di 3 equivalenti. A sequenza completata, la resina viene seccata con DCM e posta in essiccatore *overnight*, per poter essere poi utilizzata per le sintesi successive.

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 2824.68; exp: [M+2H]²⁺ = 1413.3289 m/z.

3.3.9 Sintesi di TPP-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂

Sequenza: TPP⁰-Trp¹-Trp²-Aib³-Lys⁴-Leu⁵-Aib⁶-Lys⁷-Lys⁸-Leu⁹-Aib¹⁰-Lys¹¹-Ile¹²-Leu¹³-Trp¹⁴-Trp¹⁵-NHCH₂CH₂NH₂

SPPS

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di TPP-COOH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	M.W. (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
TPP-COOH	658.75	2	169 mg
OxymaPure [®]	142.11	2	36 mg
DIC	126.20	2	40 µL

Per il *coupling* di TPP-COOH sull'estremità N-terminale si pesano 158 mg di resina con legato il peptide H₂N-WW-K2569-WW (paragrafo 3.3.8), che corrispondono a 0.128 mmol (1 equivalente) e, in seguito allo *swelling* con DMF degasata, si fanno reagire TPP-COOH, OxymaPure[®] e DIC con un eccesso di 2 equivalenti per tutta la notte (circa 17 ore), coprendo la siringa di reazione con foglio d'alluminio per evitare il contatto con la luce.

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 3464.91; exp: [M+2H]²⁺ = 1733.4646 m/z.

Per la zincatura della porfirina in fase solida si utilizza una soluzione satura di acetato di zinco diidrato in DMF/EtOH 1:1 v/v e si lascia reagire *overnight*.

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 3526.82; exp: [M+2H]²⁺ = 1764.9094 m/z, [M+Na+H]²⁺ = 1775.9017 m/z.

Lo sblocco del peptide dalla resina viene effettuato lasciando reagire la resina per 60 minuti circa con una soluzione di HFIP al 30% in DCM. Le miscele di sblocco vengono raccolte in delle boccette, portate a secco sotto un leggero flusso di azoto e poste in essiccatore *overnight*. Il peptide grezzo raccolto pesa 272 mg, di cui 200 mg dal primo sblocco (resa peptide grezzo: 60%). Con l'intento di eliminare eventuali impurezze, si è deciso di precipitare il grezzo in etere dietilico, ma parte del peptide viene solubilizzata (soluzione color rosa pallido).

3.3.10 Coupling acido lipoico su ZnTPP-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂

Per il *coupling* in soluzione di acido lipoico all'estremità C-terminale del peptide TPP-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ si pesano 35 mg di peptide grezzo e vengono disciolti in 3 mL di DCM anidro. In tre diverse boccette vengono preparate le soluzioni madre degli attivatori utilizzando per tutte un eccesso di 12 equivalenti calcolato rispetto alla quantità di peptide grezzo: l'acido lipoico viene sciolto in 500 µL di DCM anidro, HOBt in 500 µL di DCM anidro ed EDC in 1 mL di una soluzione DCM/DMF 1:1. La reazione viene portata avanti utilizzando la seguente strategia: in una boccetta pulita vengono inserite le quantità opportune delle tre soluzioni madre degli attivatori e 500 µL di DCM anidro, quindi si lascia preattivare per circa 10 minuti e la soluzione risultante viene inserita nel pallone di reazione; il pH viene aggiustato a circa 8.5 con la quantità opportuna di NMM e si lascia in agitazione tappando con tubo al cloruro di calcio e coprendo il sistema con del foglio d'alluminio. L'aggiunta dei reagenti viene fatta di volta in volta con piccole quantità (massimo 0.5 equivalenti per aggiunta). La reazione viene monitorata tramite TLC (eluente DCM/MeOH 9:1), fino alla scomparsa del peptide reagente ($R_f = 0.42$) e alla comparsa delle macchie relative al prodotto ($R_f = 0.46, 0.50$). Sono necessari complessivamente 2.3 equivalenti di acido lipoico e attivatori per portare la reazione a completezza, in circa 6 ore totali. Il crudo di reazione viene portato a secco, disciolto in acetato di etile e lavato, tramite un imbuto separatore, con acqua acida (3 volte), acqua deionizzata (3 volte), acqua basica (3 volte) e nuovamente acqua deionizzata (3 volte). La fase organica viene raccolta in una beuta, anidrificata con solfato di sodio e filtrata in un pallone, per essere poi portata a secco.

Il peptide grezzo viene trattato con 12 mL di una miscela TFA/DCM 1:1 per 2 ore e, subito dopo l'aggiunta della soluzione di deprotezione, si nota un cambiamento repentino di colore da viola intenso a verde brillante. In seguito alla reazione, si porta a secco e si fanno alcuni lavaggi con MeOH, evaporando di volta in volta il solvente per rimuovere più possibile il TFA rimasto. Il peptide grezzo pesa all'incirca 25 mg. L'analisi RP-HPLC (gradiente 0-100% di B, C18) vede la presenza di due picchi tra 14 e 15 min e quattro picchi tra 22 e 26 minuti, questi ultimi escono con 100% di B.

Il peptide viene purificato con cromatografia a fase inversa a media pressione, utilizzando i seguenti eluenti: A) 90% H₂O milliQ + 10% ACN e B) 10% H₂O MilliQ + 90% ACN (colonna SNAP C18 Ultra 12g, flusso 12 mL/min, volume colonna 15 mL). Dalla purificazione si ottengono 8 mg di prodotto.

RP-HPLC (gradiente da 0 a 100% di B in 20 minuti, 10 min a 100% di B, colonna C18, flusso 1 mL/min): $t_R = 25.5$ min; purezza: 90%.

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 2852.52$; exp: $[M+3H+O]^{3+} = 956.8384$ m/z, $[M+3H+2O]^{3+} = 962.2997$ m/z, $[M+4H+O]^{4+} = 717.5192$ m/z, $[M+4H+2O]^{4+} = 721.9892$ m/z, $[M+2H+O]^{5+} = 574.1706$ m/z, $[M+2H+2O]^{5+} = 577.7857$ m/z.

3.3.11 Sintesi di H₂N-WW-K2569-WW-K2569-WW su resina 1,2-diamminoetan-tritilica

Sequenza peptidica legata alla resina: Trp¹-Trp²-Aib³-Lys⁴-Leu⁵-Aib⁶-Lys⁷-Lys⁸-Leu⁹-Aib¹⁰-Lys¹¹-Ile¹²-Leu¹³-Trp¹⁴-Trp¹⁵-Aib¹⁶-Lys¹⁷-Leu¹⁸-Aib¹⁹-Lys²⁰-Lys²¹-Leu²²-Aib²³-Lys²⁴-Ile²⁵-Leu²⁶-Trp²⁷-Trp²⁸-NHCH₂CH₂NH₂

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di Fmoc-AA-OH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagenti	MW (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Fmoc-Leu-OH	353.42	3	470 mg
Fmoc-Ile-OH	353.42	3	470 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	3	623 mg
Fmoc-Aib-OH	325.36	3	432 mg
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.59	3	700 mg
OxymaPure [®]	142.11	3	189 mg
DIC	126.20	3	206 μ L

Vengono pesati 547 mg di resina con legato il peptide H₂N-WW-K2569-WW (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.443 mmol (1 equivalente). In seguito allo *swelling* in DMF, per ciascuno Fmoc-AA-OH vengono eseguiti due *coupling* consecutivi da 3 equivalenti ciascuno (attivatori OxymaPure[®] e DIC), utilizzando ogni volta reagenti freschi e lasciando reagire 60 minuti per ciascun *coupling*. A sequenza completata, la resina viene seccata con DCM e posta in essiccatore *overnight*, per poter essere utilizzata per la sintesi successiva.

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 5017.03$; exp: $[M+3H]^{3+} = 1673.2383$ m/z.

3.3.12 Sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂

Sequenza: TPP⁰-Trp¹-Trp²-Aib³-Lys⁴-Leu⁵-Aib⁶-Lys⁷-Lys⁸-Leu⁹-Aib¹⁰-Lys¹¹-Ile¹²-Leu¹³-Trp¹⁴-Trp¹⁵-Aib¹⁶-Lys¹⁷-Leu¹⁸-Aib¹⁹-Lys²⁰-Lys²¹-Leu²²-Aib²³-Lys²⁴-Ile²⁵-Leu²⁶-Trp²⁷-Trp²⁸-NHCH₂CH₂NH₂

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di TPP-COOH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	MW (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
TPP-COOH	658.75	1.5	224 mg
OxymaPure [®]	142.11	1.5	48 mg
DIC	126.20	1.5	53 µL

Per il *coupling* di TPP-COOH sull'estremità N-terminale si pesano 280 mg di resina con legato il peptide H₂N-WW-K2569-WW-K2569-WW (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.227 mmol (1 equivalente) e, in seguito allo *swelling* con DMF degasata, si fanno reagire TPP-COOH, OxymaPure[®] e DIC con un eccesso di 1.5 equivalenti per una notte (circa 17 ore), coprendo la siringa di reazione con foglio d'alluminio per evitare il contatto con la luce. Dopo i lavaggi con DMF, la resina viene seccata con DCM e posta in essiccatore *overnight*.

Si pesano 12 mg della resina-peptide appena sintetizzata e si trattano con HFIP 30% in DCM per 1 ora circa per rimuovere il peptide dalla resina. La miscela di sblocco viene raccolta in un pallone e portata a secco. Nello stesso pallone si inseriscono quindi 2 ml di HCl 3M in MeOH e si lascia reagire per 1 ora circa. Dopo aver portato a secco, si ripete la medesima procedura di deprotezione dei Boc, quindi si fanno alcuni lavaggi con MeOH, portando a secco di volta in volta, e si lascia liofilizzare per 5 ore circa. Si raccolgono circa 10 mg prodotto (solido verde).

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 4256.52; exp: [M+4H]⁴⁺ = 1065.1259 m/z, [M+5H]⁵⁺ = 852.5112 m/z, [M+6H]⁶⁺ = 710.9310 m/z, [M+7H]⁷⁺ = 609.2232 m/z, [M+8H]⁸⁺ = 533.2013 m/z.

3.3.13 Sintesi di Ac-WW-K2569-WW-Ac

Sequenza: Ac-Trp¹-Trp²-Aib³-Lys⁴-Leu⁵-Aib⁶-Lys⁷-Lys⁸-Leu⁹-Aib¹⁰-Lys¹¹-Ile¹²-Leu¹³-Trp¹⁴-Trp¹⁵-NHCH₂CH₂NH-Ac

Si pesano 62 mg di resina con legato il peptide H₂N-WW-K2569-WW (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.050 mmol, e vengono trattati per 1 ora circa con una soluzione di HFIP al 30% in DCM. La miscela di sblocco viene raccolta in un pallone e portata a secco (circa 47 mg). Nello stesso pallone vengono aggiunti 2 mL di DCM anidro e si raffredda la soluzione a circa -10° C con un bagno di ghiaccio e sale. Si inseriscono quindi 15 µL di anidride acetica (0.159 mmol) e si porta il pH a 8 con l'aggiunta di 20 µL di DIPEA. Si lascia quindi in agitazione *overnight*, tappando il pallone con un tubo al CaCl₂. Il solvente viene evaporato, si riprende con toluene e si porta a secco di volta in volta per almeno 5 volte. Per facilitare la raccolta quantitativa del peptide grezzo, che appare come un olio viscoso, si precipita con etere etilico e successivamente si porta a secco, in modo da avere un solido più manipolabile.

La rimozione dei gruppi protettori *Boc* viene eseguita trattando tre volte il peptide grezzo con 10 mL di HCl 3M in MeOH per 1 ora circa, portando a secco tra un trattamento e l'altro. In seguito, si fanno alcuni lavaggi con MeOH, portando a secco di volta in volta. Si precipita quindi con etere dietilico e si evapora il solvente per ottenere circa 40 mg di una polvere cristallina bianca (peptide grezzo).

Il peptide grezzo viene purificato tramite cromatografia a fase inversa a media pressione (colonna C18 Snap Ultra, flusso 12 mL/min, volume colonna 15 mL), per ottenere 14 mg di prodotto (resa: 13%).

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 2108.28; exp: [M+2H]²⁺ = 1055.0978 m/z, [M+3H]³⁺ = 703.6962 m/z, [M+4H]⁴⁺ = 528.0309 m/z.

RP-HPLC (gradiente da 0 a 100% di B in 33 min, colonna C18, flusso 1 mL/min): t_R = 21.0 min; purezza: 92%.

3.3.14 Sintesi di H₂N-LUKIL su resina 1,2-diamminoetan-tritilica

Sequenza peptidica legata alla resina: Leu¹-Aib²-Lys³-Ile⁴-Leu⁵-NHCH₂CH₂NH₂

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di Fmoc-AA-OH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	M.W. (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
Fmoc-Leu-OH	353.42	3	431 mg
Fmoc-Ile-OH	353.42	3	431 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	3	572 mg
Fmoc-Aib-OH	325.36	3	397 mg
OxymaPure [®]	142.11	3	174 mg
DIC	126.20	3	189 μ L

Si sono pesati 502 mg di resina 1,2-diamminoetan-tritilica (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.407 mmol (1 equivalente). I residui Fmoc-Leu-OH e Fmoc-Ile-OH vengono fatti reagire tramite due *coupling* consecutivi, utilizzando un eccesso di 3 equivalenti per ciascuno, mentre per gli altri residui si fa un *coupling* singolo, utilizzando lo stesso eccesso. Gli attivatori utilizzati nella sintesi sono OxymaPure[®] e DIC. A sintesi conclusa, la resina viene seccata con DCM e posta in essiccatore *overnight*.

HRMS (ESI-TOF): [M]_{calc.} = 712.52; exp: [M+H]⁺ = 713.5322 m/z, [M-Boc+H]⁺ = 613.4737 m/z, [M-tBu+H]⁺ = 657.4655 m/z, [2M+H]⁺ = 1426.0344 m/z.

3.3.15 Sintesi parziale del peptide Ade-LUKIL-NHCH₂CH₂NH₂

Sequenza: Ade⁰-Leu¹-Aib²-Lys³(Boc)-Ile⁴-Leu⁵-NHCH₂CH₂NH₂

Nella tabella seguente sono riportate le quantità di AdeCOOH e attivatori utilizzate per la sintesi:

Reagente	MW (g/mol)	Eccesso (eq.)	Quantità
AdeCOOH	193.17	3	161 mg
HATU	380.24	3	318 mg
HOAt	136.11	3	114 mg
DIPEA	129.25	6	291 μ L

Per il *coupling* di AdeCOOH sull'estremità N-terminale del peptide LUKIL-NHCH₂CH₂NH₂ supportato sulla resina vengono pesati 344 mg di resina con legato il peptide H₂N-LUKIL (*loading* teorico: 0.81 mmol/g), che corrispondono a 0.279 mmol (1 equivalente). L'AdeCOOH viene legata quantitativamente dopo 4 *coupling overnight* (circa 17 ore), utilizzando un eccesso di 3 equivalenti di AdeCOOH, HATU e HOAt e di 6 equivalenti di DIPEA, avendo cura di pesare una quantità di HATU leggermente inferiore rispetto a HOAt e lasciando preattivare per circa 10 minuti prima di inserire la miscela degli attivatori nella siringa. Dopo il *coupling* completo, la resina viene seccata con DCM e posta in essiccatore *overnight*.

Il peptide viene sbloccato dalla resina tramite un trattamento di 1 ora con una soluzione di HFIP al 30% in DCM e la miscela di sblocco viene raccolta in una boccetta e portata a secco sotto un leggero flusso di azoto. Si ottengono 288 mg di peptide grezzo *Boc*-protetto (resa peptide grezzo: 117%).

HRMS (ESI-TOF): $[M]_{\text{calc.}} = 887.57$; exp: $[M+H]^+ = 888.5707$ m/z e altri segnali (vedi "Risultati e Discussione").

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS, *Solid Phase Peptide Synthesis*), ideata negli anni '60 da Merrifield, è una delle tecniche più rivoluzionarie dell'ultimo secolo [31]. Essa permette di sintetizzare sequenze peptidiche supportate su una resina insolubile e i vantaggi che le vengono attribuiti riguardano soprattutto la semplicità operativa, la relativa velocità e la possibilità di portare avanti la sintesi senza dover isolare gli intermedi di reazione. Il segreto di questa tecnica si basa proprio sul supporto solido insolubile, che permette di eliminare gli attivatori e i reagenti in eccesso tramite dei semplici passaggi di filtrazione e di lavaggio, garantendo al contempo che il peptide rimanga saldamente ancorato alla resina. Di fondamentale importanza è anche il fatto che il peptide sintetizzato può essere rimosso, una volta completata la sua sequenza, in condizioni *ortogonali* rispetto ad eventuali altri gruppi protettori presenti sulle catene laterali.

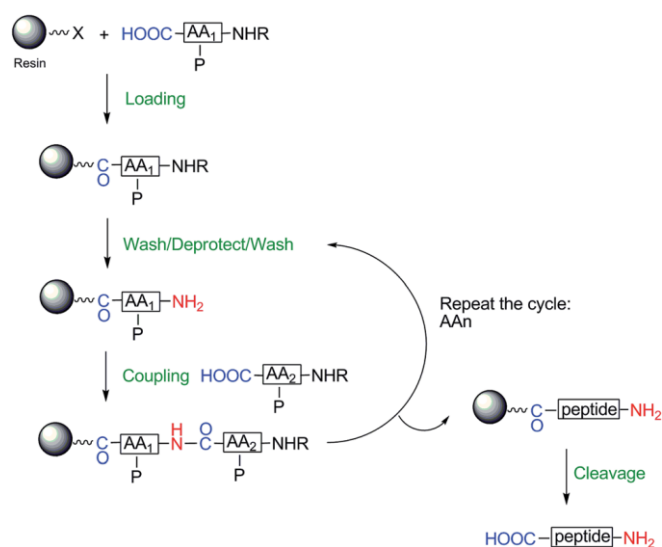


Figura 4.1: Schema generale della sintesi peptidica su fase solida (SPPS) [32].

Il peptide in crescita è legato al supporto covalentemente all'estremità C-terminale e la sintesi viene portata avanti sequenzialmente fino all'estremità opposta, tramite vari *step* di *coupling*, deprotezione e lavaggio (Figura 4.1) [32]. La sintesi si avvale di amminoacidi N^α-protetti, che vengono attivati per rendere la funzione carbossilica più suscettibile all'attacco nucleofilo da parte dell'ammina libera N-terminale della catena peptidica [33]. Il motivo principale legato alla direzione di sintesi riguarda il rischio di epimerizzazione. In condizioni basiche, la formazione del composto ciclico 5-(4*H*)-ossazolone tramite reazione intramolecolare è favorita dalla presenza di un buon gruppo uscente (Figura 4.2, Path B) [34]. Questa reazione è invece sfavorita quando si utilizzano amminoacidi N^α-protetti con gruppi funzionali uretanici, che inibiscono la racemizzazione rendendo l'idrogeno dell'ossazolone meno acido, grazie all'ossigeno uretanico, e quindi meno disposto ad essere rimosso dalla base [35]. L'epimerizzazione durante la sintesi peptidica potrebbe avvenire anche per rimozione diretta del protone dal carbonio alfa, reso più acido grazie all'attivazione del gruppo carbossilico; in questo caso la racemizzazione avviene attraverso un meccanismo di tautomerizzazione cheto-enolica (Figura 4.2, Path A).

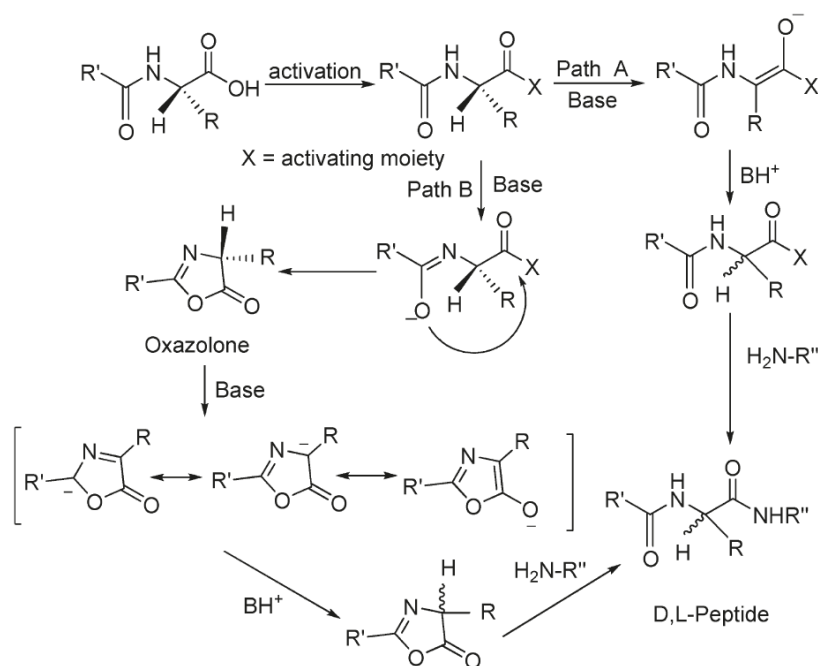


Figura 4.2: Probabili meccanismi che causano la racemizzazione dei centri chirali sulle catene peptidiche. Path A) Racemizzazione tramite rimozione diretta del protone sul carbonio α; Path B) Meccanismo di racemizzazione attraverso la formazione dell'intermedio ciclico 5-(4*H*)-ossazolone [34].

Nonostante i numerosi vantaggi, questa tecnica presenta alcuni svantaggi rispetto alla controparte in soluzione: (i) l'elevato costo delle resine impiegate; (ii) l'utilizzo di un elevato eccesso di reagenti e di solventi organici, che quindi devono poi essere smaltiti correttamente e in sicurezza; (iii) la possibilità di avere reazioni collaterali.

4.1.1 Resine per SPPS

La resina tipicamente utilizzata nella sintesi su fase solida è costituita da polistirene, che presenta una percentuale dell'1-2% di divinilbenzene come agente di *crosslinking*. La funzione di quest'ultimo è quella di creare delle reticolazioni tra le catene di polistirene, che permettano al materiale di essere meccanicamente resistente ma al contempo sufficientemente flessibile per il rigonfiamento da parte del solvente (*swelling*); è infatti fondamentale che la resina sia stabile ma non rigida, per permettere l'accesso dei reagenti in prossimità dei siti attivi [31]. Esistono moltissimi tipi di resine per la sintesi peptidica su fase solida e la differenza principale riguarda il *linker* su cui si lega il primo amminoacido, che determina le condizioni di distacco del peptide dalla resina, le quali devono risultare ortogonali rispetto alle condizioni di rimozione di altri gruppi protettori, presenti sulla funzione α -amminica o sulle catene laterali. Una grandezza fondamentale che caratterizza le resine utilizzate per la sintesi peptidica su fase solida è il cosiddetto *loading*, misurato in mmol/g, che rappresenta il numero di siti attivi disponibili per l'attacco del primo amminoacido, ovvero il numero di moli di peptide che sono in grado di legarsi per ogni grammo di resina. Nonostante un valore elevato di *loading* sia auspicabile, esso non deve risultare troppo alto, altrimenti l'accesso dei reagenti sui siti attivi potrebbe essere ostacolato dall'elevato affollamento dovuto alle catene peptidiche in crescita.

La resina utilizzata per la sintesi di tutti i peptidi nel presente lavoro di Tesi è la 1,2-diamminoetan-tritilica, caratterizzata da un *linker* tritilico che presenta un'unità etilendiamminica, da cui il nome. Per la rimozione del peptide dal supporto solido è sufficiente un trattamento con HFIP al 30% in DCM e il peptide viene sbloccato dalla resina con la funzionalità etilendiamminica legata sul C-terminale (Figura 4.3). La scelta di questo tipo di resina riguarda la possibilità di funzionalizzare ulteriormente l'estremità C-terminale dei peptidi, sfruttando il gruppo funzionale amminico fornito dal *linker*, per produrre derivati contenenti acido lipoico o timina.

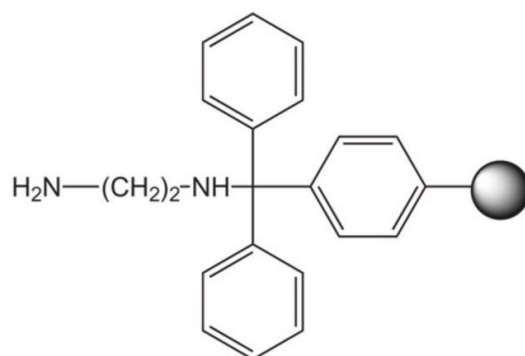


Figura 4.3: Struttura della resina 1,2-diamminoetan-tritilica, utilizzata in questo lavoro.

4.1.2 Attivatori di *coupling*

La formazione del legame peptidico durante la sintesi su fase solida (*coupling*) viene promossa dall'utilizzo di attivatori della funzione carbossilica [36]. Tipicamente, vengono utilizzate delle carbodiimmidi reattive che, reagendo con gli amminoacidi, portano alla formazione di O-acilisourea, la quale può subire diversi tipi di reazione per produrre il nuovo legame ammidico. La via più auspicabile è quella che vede la sua trasformazione nel corrispondente estere attivo da parte di specie come HOBt, HOAt o OxymaPure[®] (Figura 4.4, percorso E).

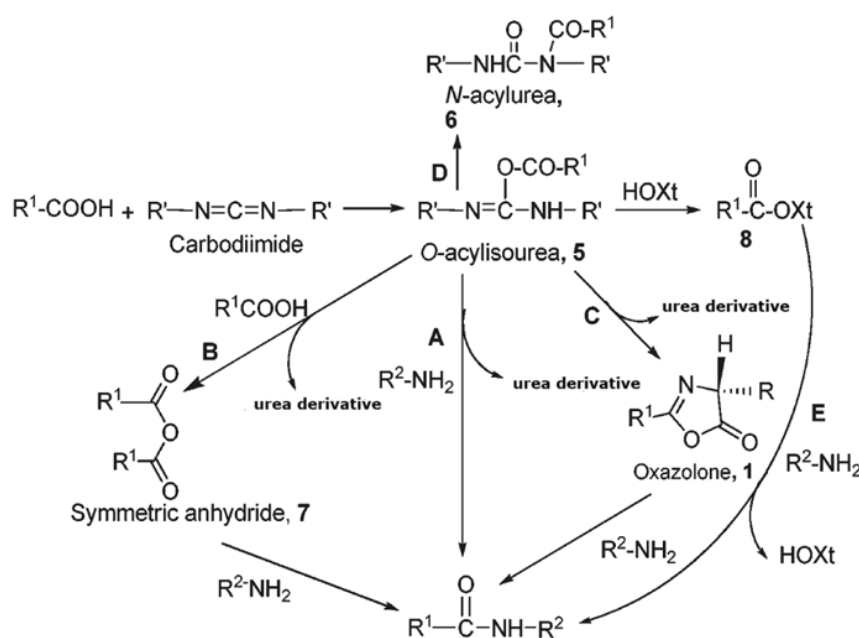


Figura 4.4: Meccanismi di formazione del legame peptidico attraverso O-acilisourea e formazione dell'estere attivo [34].

L'attivazione della funzione carbossilica viene fatta per rendere il carbonio carbonilico più suscettibile all'attacco nucleofilo da parte dell'ammina N-terminale della catena peptidica in crescita [37]. Gli esteri attivi utilizzati sono degli ottimi attivatori sia perché forniscono dei buoni gruppi uscenti ma anche perché rendono il carbonio carbonilico più elettrofilo e, al contempo, sfavoriscono la racemizzazione.

In questo lavoro di Tesi, per la sintesi SPPS, si sono scelti gli attivatori di *coupling* OxymaPure[®] e DIC, per l'attacco dei singoli residui aminoacidici e di TPP-COOH, e HATU, HOAt, assieme alla DIPEA, per il *coupling* di AdeCOOH. Va ricordato comunque che la strategia di attivazione della funzione α -carbossilica non è esclusiva della sintesi su fase solida ma viene ampiamente sfruttata anche per la sintesi in soluzione; infatti, per le derivatizzazioni con ThymCOOH e acido lipoico, sono stati utilizzati gli attivatori HOBt ed EDC, in presenza di NMM come base.

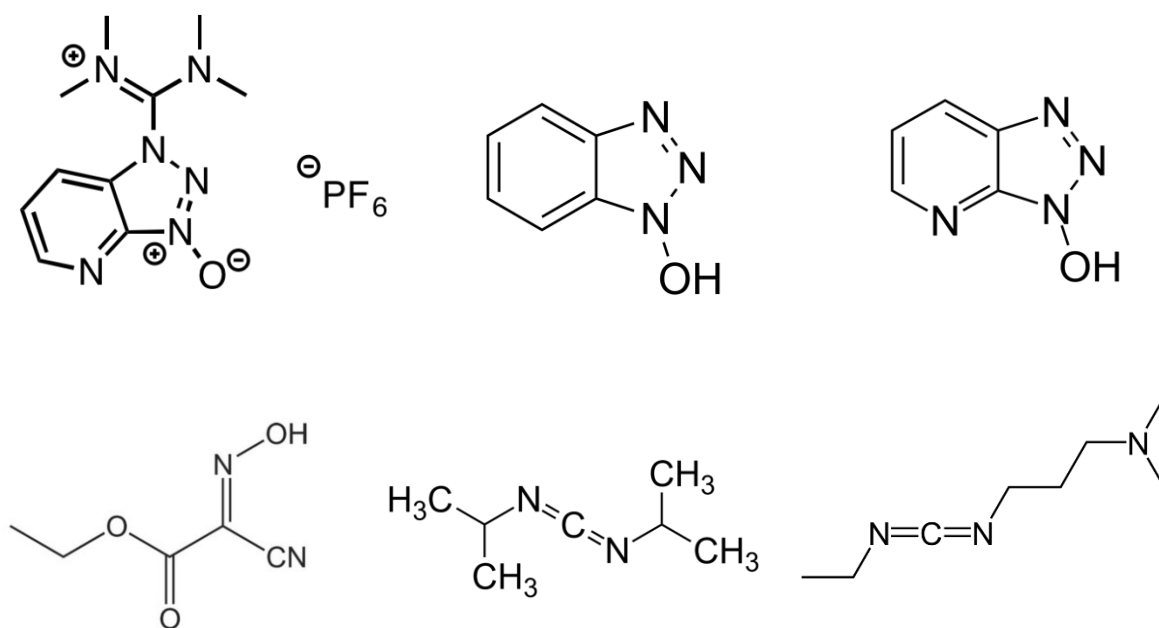


Figura 4.5: Strutture chimiche degli attivatori utilizzati nel presente lavoro di Tesi. Da sinistra verso destra e dall'alto verso il basso troviamo, in ordine: HATU, HOBt, HOAt, OxymaPure, DIC ed EDC.

4.1.3 Gruppi protettori

La sintesi peptidica fa largo uso di numerosi gruppi protettori, in particolare della funzionalità N^α -amminica o di gruppi funzionali presenti sulle catene laterali degli amminoacidi. La protezione dell'estremità N-terminale è necessaria per evitare che, nelle condizioni di reazione adottate, avvenga la formazione del legame ammidico tra le varie molecole dell'amminoacido attivato (formazione di omopeptidi in soluzione); inoltre, i gruppi protettori normalmente impiegati sono di tipo uretanico, per sfavorire la racemizzazione dei centri chirali. Di seguito sono riportati e descritti brevemente i gruppi protettori che sono stati impiegati nelle sintesi.

4.1.3.1 Gruppo protettore Fmoc

La strategia di sintesi utilizzata per la SPPS utilizza amminoacidi Fmoc-protetti sulla funzionalità N^α -amminica. Il gruppo protettore Fmoc (9-fluorenilmetilossicarbonile), sviluppato da Carpino nel 1970 [38], fa parte della famiglia dei gruppi protettori uretanici ed è particolarmente utile in quanto la sua rimozione richiede condizioni relativamente blande (soluzione di piperidina al 20% in DMF) e ortogonali rispetto a gruppi protettori acido-labili. In seguito alla rimozione dello Fmoc (Figura 4.6), che prevede un meccanismo *Elcb* (eliminazione monomolecolare base-catalizzata), viene liberata CO_2 e si forma dibenzofulvene; questa specie può formare un addotto con la piperidina, che ne inibisce quindi la possibile polimerizzazione, che potrebbe portare alla formazione di sottoprodotti insolubili difficili da rimuovere [39].

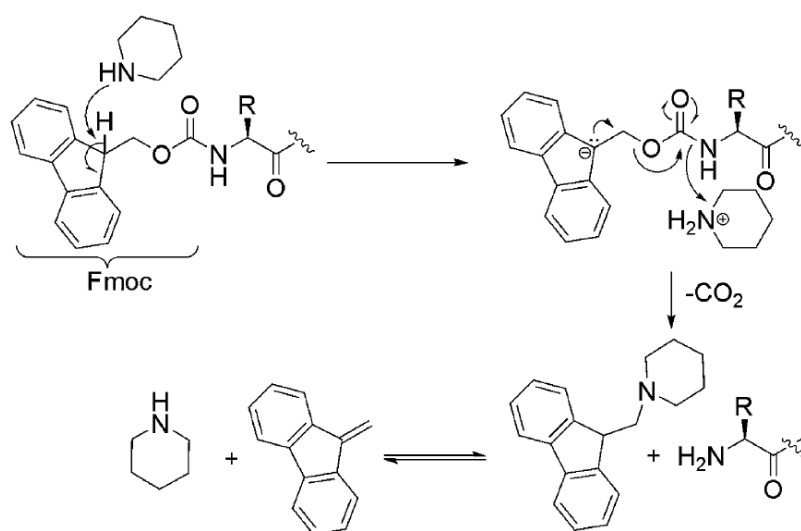


Figura 4.6: Meccanismo di rimozione del gruppo protettore Fmoc. La reazione viene catalizzata dalla piperidina, che forma un addotto con il dibenzofulvene [32].

Il gruppo protettore dev'essere stabile nelle condizioni di formazione del legame peptidico, per evitare reazioni indesiderate, e deve poter essere rimosso con relativa facilità e velocità. Fmoc rispetta entrambi questi requisiti e, per questo motivo, viene ampiamente utilizzato per la sintesi di peptidi su fase solida.

4.1.3.2 Gruppo protettore Boc

Un altro gruppo protettore molto utilizzato nella sintesi peptidica è il gruppo *Boc* (*tert*-butilossicarbonile) [40]. Esso è rimovibile in condizioni acide (TFA in CH_2Cl_2 o HCl in MeOH), quindi in condizioni ortogonali rispetto allo Fmoc, e il suo meccanismo di rimozione prevede un riarrangiamento elettronico in seguito alla protonazione dell'ossigeno carbonilico, con formazione del carbocatione *tert*-butilico e successiva decarbossilazione spontanea (Figura 4.7). Nel presente lavoro di Tesi questa protezione è stata sfruttata per le catene laterali dei residui di lisina (Lys) e triptofano (Trp), poiché quasi tutti i peptidi sintetizzati necessitavano di funzionalizzazioni N- e C-terminali oppure derivatizzazioni selettive di un unico residuo di lisina; infatti, il gruppo Boc è stabile nelle condizioni di rimozione del peptide dalla resina 1,2-diamminoetan-tritilica (HFIP 30% in DCM) [41].

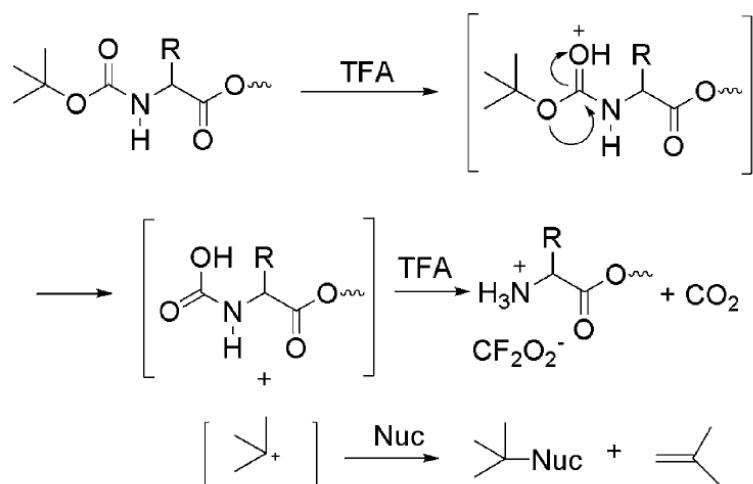


Figura 4.7: Meccanismo di rimozione del gruppo protettore Boc [32].

4.1.3.3 Gruppo protettore Alloc

Per la prova di sintesi dell'analogo che un'adenina-COOH legata alla catena laterale della lisina, è stato sfruttato il gruppo protettore *Alloc* (allilossicarbonile), il quale viene utilizzato solitamente per reazioni di ciclizzazione di peptidi in fase solida [42] [43]. In questo caso è stato usato per permettere la derivatizzazione selettiva dell'N-terminale o della catena laterale della lisina (Lys⁵), sfruttando le sue condizioni di rimozione ortogonali sia alle condizioni basiche usate per la rimozione del gruppo Fmoc che alle condizioni acide impiegate nella deprotezione dal gruppo Boc [40]. Il gruppo protettore Alloc viene infatti rimosso selettivamente sfruttando un donatore di idruro (fenilsilano) e un catalizzatore di Palladio (0), solitamente *tetrakis*(trifenilfosfina)Palladio (0) [44]. Il meccanismo di rimozione dell'Alloc prevede il trasferimento palladio-catalizzato dell'allile a varie specie nucleofile (Figura 4.8), in questo caso l'idruro fornito dal fenilsilano.

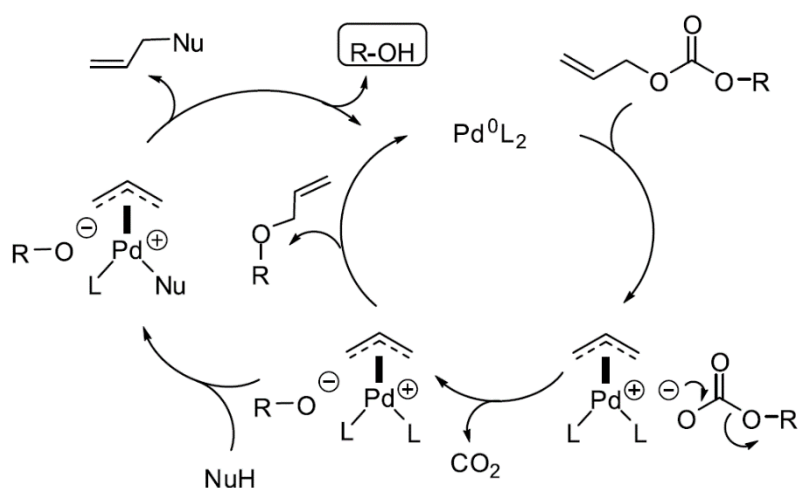


Figura 4.8: Meccanismo di rimozione del gruppo protettore Alloc palladio-catalizzato.

4.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONI

4.2.1 Sintesi di AdeCOOH

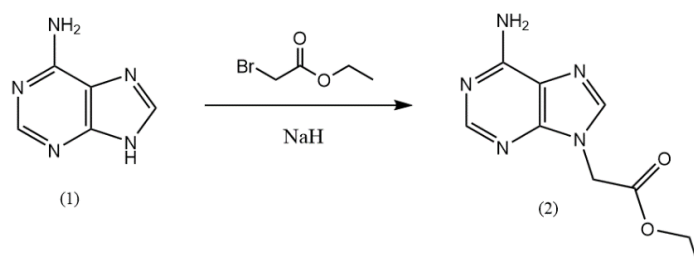


Figura 4.9: Schema di reazione per la sintesi di AdeCOOEt a partire da adenina.

Il primo passaggio è la sintesi di AdeCOOEt (Figura 4.9), che prevede l'alchilazione dell'azoto dell'adenina con una funzionalità acetica, sfruttando una reazione di sostituzione nucleofila tra l'ammina secondaria della base azotata e il carbonio in posizione α del bromoacetato di etile [45]. Essendo il bromuro un buon gruppo uscente, la reazione avviene con relativa facilità dopo trattamento dell'ammina con NaH. La resa del 53% non è tuttavia molto alta e questo è probabilmente dovuto alla presenza del prodotto nelle acque di lavaggio in seguito alla filtrazione. L'analisi LC-MS conferma la presenza del prodotto desiderato (cromatogramma e spettro non riportati).

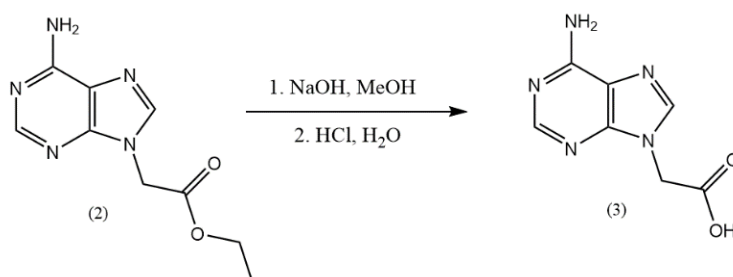


Figura 4.10: Schema di reazione per la sintesi di AdeCOOH a partire da AdeCOOEt.

Si procede con una reazione di saponificazione, ovvero la trasformazione dell'estere nel corrispondente acido carbossilico tramite trattamento con idrossido e successivo *quenching* con acido (Figura 4.10) [46]. L'AdeCOOEt viene inizialmente trattato con una soluzione acquosa concentrata di NaOH, per favorire l'attacco dello ione ossidrile sul carbonio carbonilico dell'estere e, successivamente, con una soluzione acquosa di HCl, che ha la funzione sia di neutralizzare la base in eccesso che di protonare quantitativamente la funzionalità carbossilica di AdeCOOH. Essendo quest'ultima debolmente solubile in acqua, la filtrazione e i lavaggi fatti con qualche aliquota di acqua fredda servono per eliminare i sali in eccesso e l'etanolo che si libera dall'estere. Il prodotto desiderato viene ottenuto con una resa molto alta (98%) e viene caratterizzato tramite HRMS (Figura 4.11), che ne conferma la natura.

L'AdeCOOH prodotto da queste sintesi è stato utilizzato per la derivatizzazione di tre peptidi, sfruttando la sintesi su fase solida (paragrafi successivi).

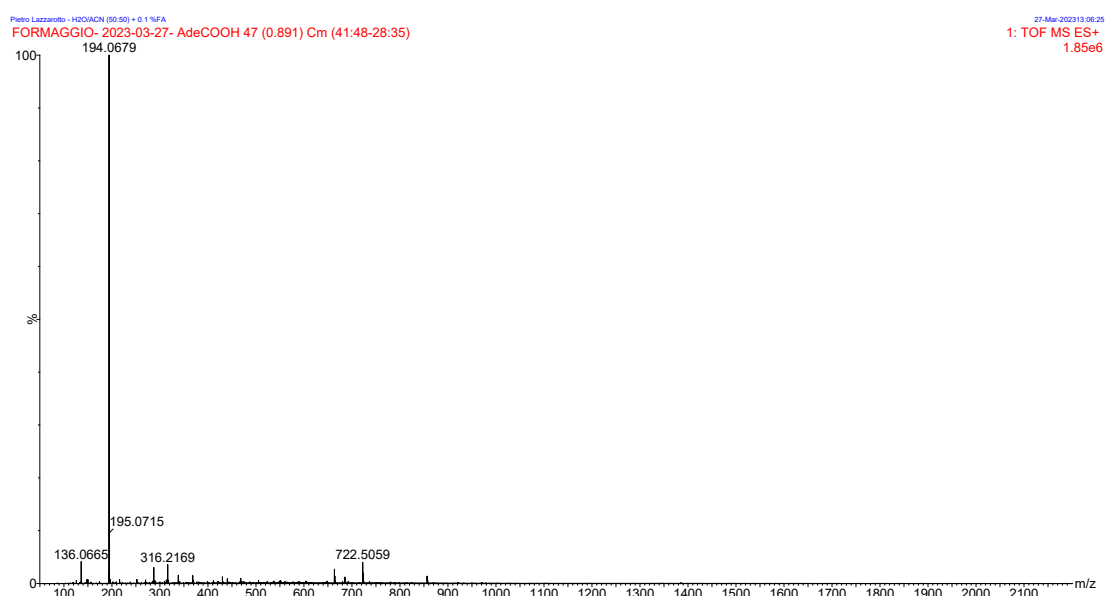


Figura 4.11: Spettro HRMS (ESI-TOF) di AdeCOOH. E' evidente il segnale relativo allo ione molecolare monoprotonato a m/z 194.0679.

4.2.2 Sintesi ZnTPP-Thym

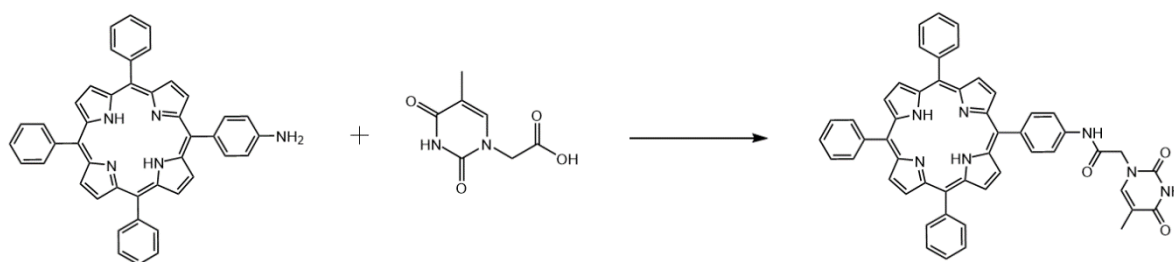


Figura 4.12: Schema di reazione per la sintesi di TPP-Thym.

La sintesi di TPP-Thym vede la formazione di un nuovo legame ammidico, grazie alla reazione di sostituzione nucleofila tra l'ammina di TPP-NH₂ e la funzione carbossilica di ThymCOOH (Figura 4.12) [28]. La lentezza di questa reazione è dovuta sia alla scarsa capacità di gruppo uscente dell'ossidrile che alla mediocre nucleofilicità dell'ammina anilinicata legata al sistema tetrafenilporfirinico. L'utilizzo di opportuni attivatori (HOBt ed EDC) della funzione carbossilica di ThymCOOH si rivela necessaria per poter avere rese quantitative e tempi di reazione relativamente veloci; la reazione, infatti, è caratterizzata da una resa elevata (95%). Per la sintesi è stato utilizzato DCM anidro con una piccola quantità di DMF anidra; quest'ultima, avendo un punto di ebollizione di 153°C, è difficile da evaporare, per cui uno dei modi per facilitarne l'eliminazione è quello di evaporarla sottovuoto in evaporatore rotante, riprendendo la miscela con del toluene e sfruttando così la formazione di una miscela azeotropica, che presenta una temperatura di ebollizione inferiore rispetto ad entrambi i singoli componenti della soluzione [47]. La purificazione con colonna cromatografica a gel di silice è necessaria per poter rimuovere i reagenti e gli attivatori in eccesso dal crudo di reazione.

La reazione di zincatura di TPP-Thym si basa su un lavoro presente in letteratura [28], ma in questo caso viene utilizzato un diverso solvente, THF, meno impattante rispetto al cloroformio usato nel lavoro originale e con una temperatura di ebollizione relativamente simile (CHCl₃: 61°C; THF: 66°C) [48]. La soluzione satura di diacetato di zinco diidrato in metanolo e le condizioni di riflusso servono per poter garantire la zincatura completa del macrociclo porfirinico, che viene seguita tramite LC-MS. In seguito all'eliminazione dell'acetato di zinco in eccesso, tramite il *workup*, si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 97% e con una purezza del 96% (Figura 4.13). La natura del composto è confermata dallo spettro HRMS (Figura 4.14).

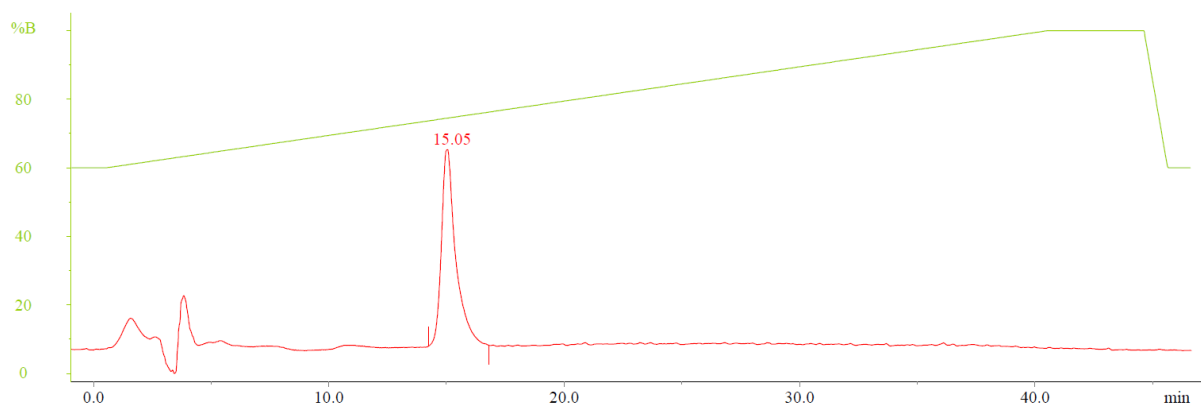


Figura 4.13: Cromatogramma RP-HPLC di ZnTPP-Thym (gradiente; 60-100% di B in 40 min; colonna: C18; flusso 1 mL/min). $t_R = 15.05$ min; purezza: 96%.

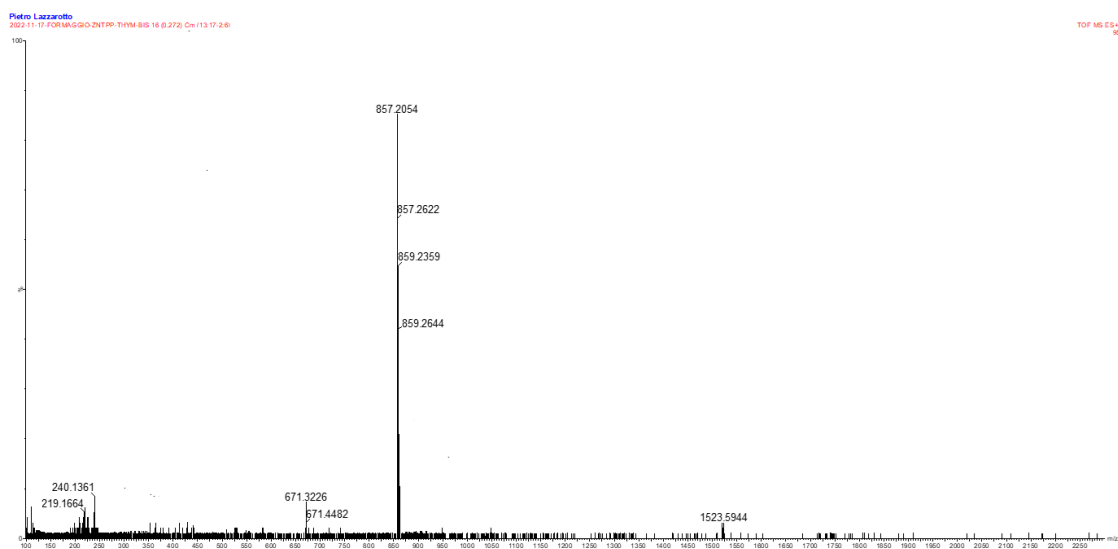


Figura 4.14: Spettro HRMS (ESI-TOF) di ZnTPP-Thym ($[M+H]^+ = 857.2054$ m/z).

4.2.3 Sintesi del peptide Ade-K2569-Thym

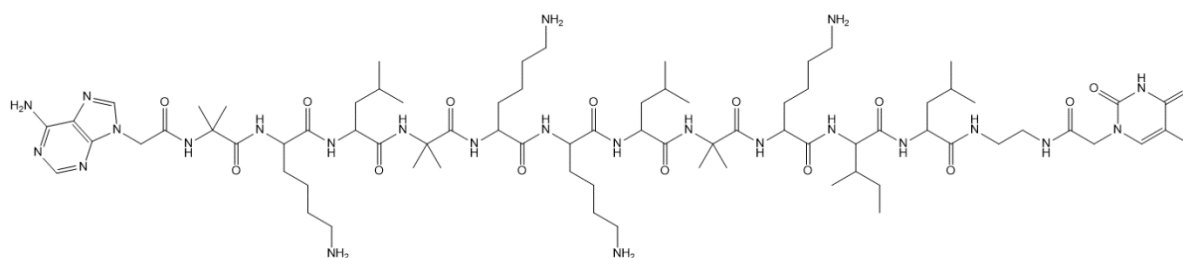


Figura 4.15: Struttura chimica del peptide Ade-K2569-Thym.

Con lo scopo di poter studiare l'efficienza del trasferimento elettronico in base all'orientamento del macrodipolo dell'elica peptidica, si è deciso di sintetizzare l'analogo della tricogina GA IV in cui i quattro residui di glicina sono stati sostituiti da delle lisine, derivatizzandolo in modo complementare rispetto al peptide Thym-K2569-Ade riportato in letteratura [26].

La sequenza amminoacidica è stata sintetizzata in fase solida utilizzando la resina 1,2-diamminoetan-tritilica e gli attivatori OxymaPure® e DIC. Per i residui di Aib e delle leucine ad essi adiacenti è stato necessario fare *coupling* ripetuti: la scarsa reattività è dovuta all'ingombro sterico dei due gruppi metilici geminali sul carbonio α dell'Aib, che limitano l'avvicinamento dei reagenti, ed è più impattante sul gruppo amminico di Aib che deve dare l'attacco nucleofilo, rispetto allo *step* in cui il carbossile attivato di Aib subisce l'attacco nucleofilo. In seguito alla sintesi della sequenza primaria, il composto è stato funzionalizzato con AdeCOOH all'estremità N-terminale, sfruttando la sintesi su fase solida, e con ThymCOOH al C-terminale, sfruttando la sintesi in soluzione in seguito allo sblocco del peptide dalla resina. La funzionalizzazione con AdeCOOH si è rivelata quantitativa con un solo *coupling*, utilizzando HATU e HOAt come attivatori, in presenza di base (DIPEA), ma è evidente, dallo spettro HRMS registrato sul primo sblocco del peptide dalla resina (Figura 4.16), che la reazione non è perfettamente pulita. Si nota, infatti, la comparsa di due sottoprodotti: quello a m/z 855.1068 potrebbe essere la doppia carica dell'analogo N^{α} -formiato, mentre quello a m/z 1038.2142 non è stato identificato. L'esistenza di questi ultimi potrebbe essere giustificata dai tempi di reazione lunghi (*overnight*), che facilitano percorsi di reazione indesiderati nelle condizioni adottate. Il segnale a m/z 1038.2142 è probabilmente relativo a una specie che non possiede ammine libere in quanto, anche in seguito alla reazione con ThymCOOH, è rimasto inalterato. Per valutare se far avvenire la sintesi in soluzione prima o

In seguito alla purificazione, si è fatta una prova utilizzando circa 50 mg di peptide grezzo. La funzionalizzazione con la timina a partire dal peptide grezzo è risultata essere fattibile anche senza previa purificazione, per cui si è deciso di utilizzare questa via per la sintesi completa di Ade-K2569-Thym. Sono stati quindi utilizzati come attivatori HOBt ed EDC, complessivamente con un eccesso di 2.5 equivalenti, e la reazione è stata monitorata tramite HPLC. In seguito alla purificazione, il peptide purificato Boc-protetto è stato trattato con una soluzione di HCl 3M in MeOH anidro per tre volte, per rimuovere quantitativamente i gruppi protettori dalle catene laterali dei residui di lisina, e si è ottenuto quindi il peptide desiderato con una purezza dell'81% (Figura 4.18) e una resa complessiva del 26%. Non è stato possibile ottenere una purezza maggiore per la difficoltà nel separare il picco principale ($t_R = 12.48$) dal picco ad esso adiacente ($t_R = 12.07$ min).

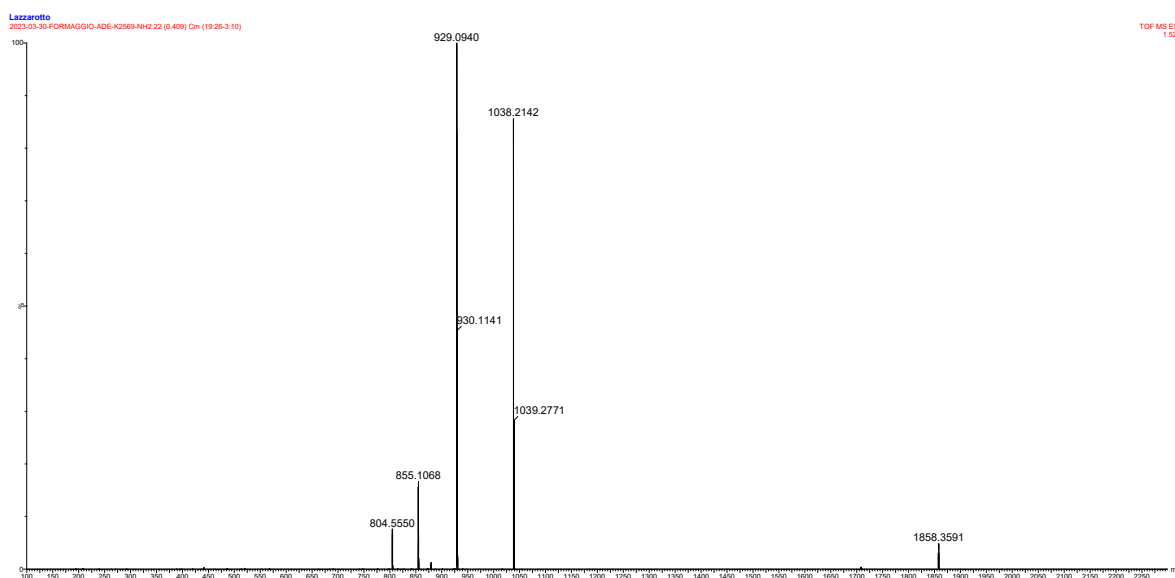


Figura 4.16: Spettro HRMS del peptide grezzo dopo il singolo coupling di AdeCOOH sull'N-terminale ($[M+2H]^{2+} = 929.0940$ m/z).

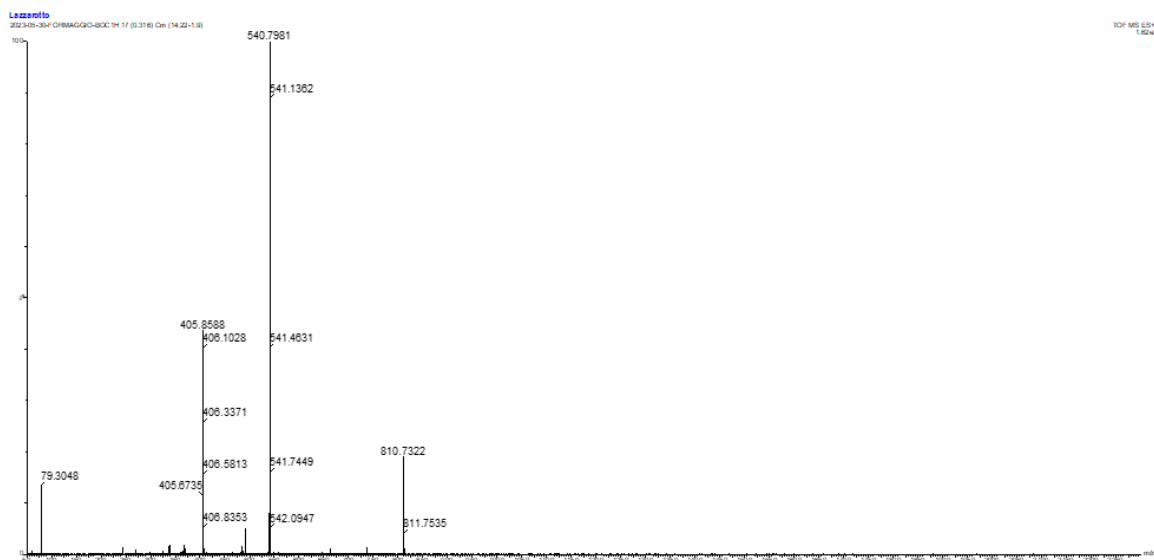


Figura 4.17: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide Ade-K2569-Thym purificato ($[M+H]^+ = 810.7322$ m/z, $[M+2H]^{2+} = 540.7981$ m/z, $[M+3H]^{3+} = 405.6735$ m/z).

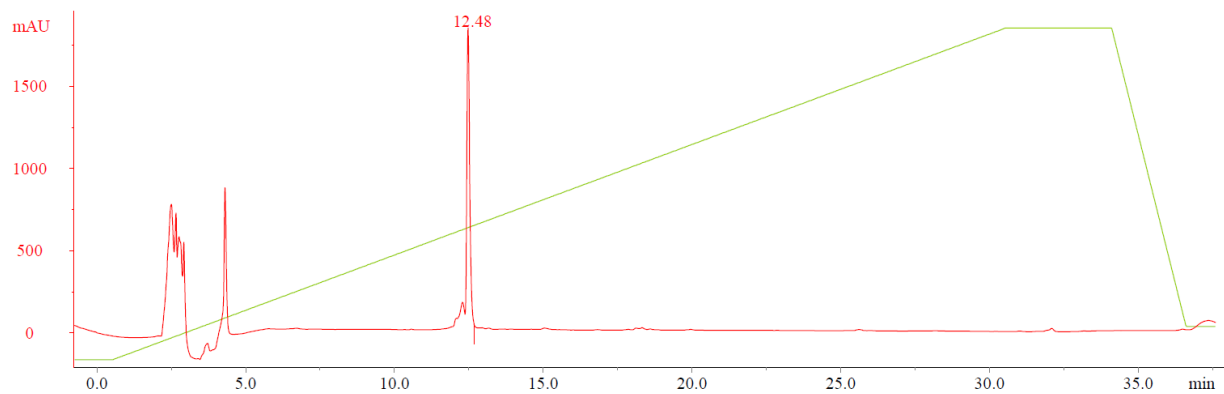


Figura 4.18: Cromatogramma RP-HPLC (gradiente: 0-100% di B in 30 min; colonna: C18; flusso: 1 mL/min) del peptide Ade-K2569-Thym purificato ($t_R = 12.48$ min; purezza: 81%).

4.2.4 Sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo

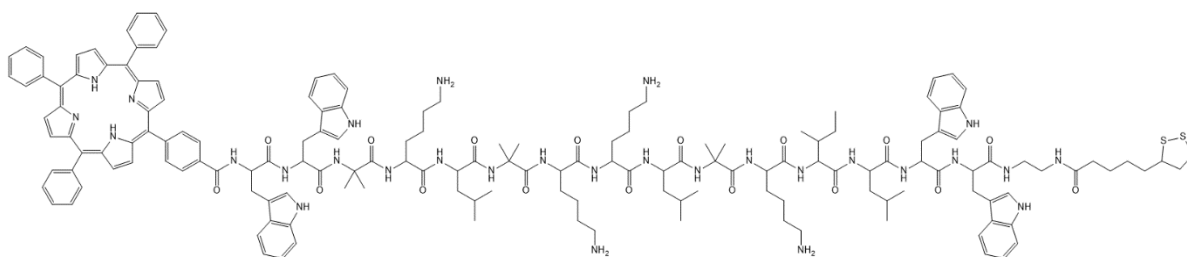


Figura 4.19: Struttura chimica del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo.

La sintesi di H₂N-WW-K2569-WW su resina 1,2-diamminoetan-tritilica è stata completata su fase solida utilizzando gli attivatori OxymaPure® e DIC e, per i residui Trp², Leu⁵ e Leu⁹, sono stati necessari due *coupling* consecutivi. Questo è dovuto alla presenza dei residui di Aib, i cui gruppi metilici geminali sul carbonio α limitano l'avvicinamento dei reagenti. Come sottolineato precedentemente (paragrafo 4.2.3), la scarsa reattività è più impattante sul gruppo amminico di Aib che deve dare l'attacco nucleofilo, rispetto allo *step* in cui il carbossile attivato di Aib subisce l'attacco nucleofilo.

La sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo è stata eseguita partendo dallo *splitting* della resina con legato il peptide H₂N-WW-K2569-WW. In base alla quantità di TPP-COOH disponibile, si è calcolata la quantità di resina da utilizzare e si è deciso di provare a legare l'unità porfirinica all'estremità N-terminale utilizzando un eccesso di 2 equivalenti, al posto dei 3 equivalenti utilizzati solitamente per i residui amminoacidici. Per favorire l'attacco di TPP-COOH, il *coupling* è stato fatto durare per circa 17 ore (*overnight*). Dallo spettro di massa dello sblocco in piccolo in seguito al singolo *coupling*, è evidente la presenza del peptide desiderato (Figura 4.20). Questo dato conferma che il *coupling* con 2 equivalenti e *overnight* è efficace per legare la porfirina; tuttavia, nello spettro, si vedono anche molti altri picchi che non si è riusciti ad identificare. Essi possono essere attribuiti a prodotti dovuti a sottoreazioni a carico degli attivatori o della resina, e la durata della reazione potrebbe essere il motivo principale della loro presenza.

Il peptide è stato zincato direttamente in fase solida utilizzando una soluzione satura di acetato di zinco diidrato in DMF/EtOH 1:1, per facilitarne la dissoluzione, lasciandolo reagire *overnight*. La metallazione completa è confermata dallo spettro HRMS (Figura 4.21), in cui è

evidente la scomparsa dei segnali relativi alla porfirina “libera”, per cui il peptide è stato sbloccato dalla resina tramite trattamento con HFIP 30% in DCM.

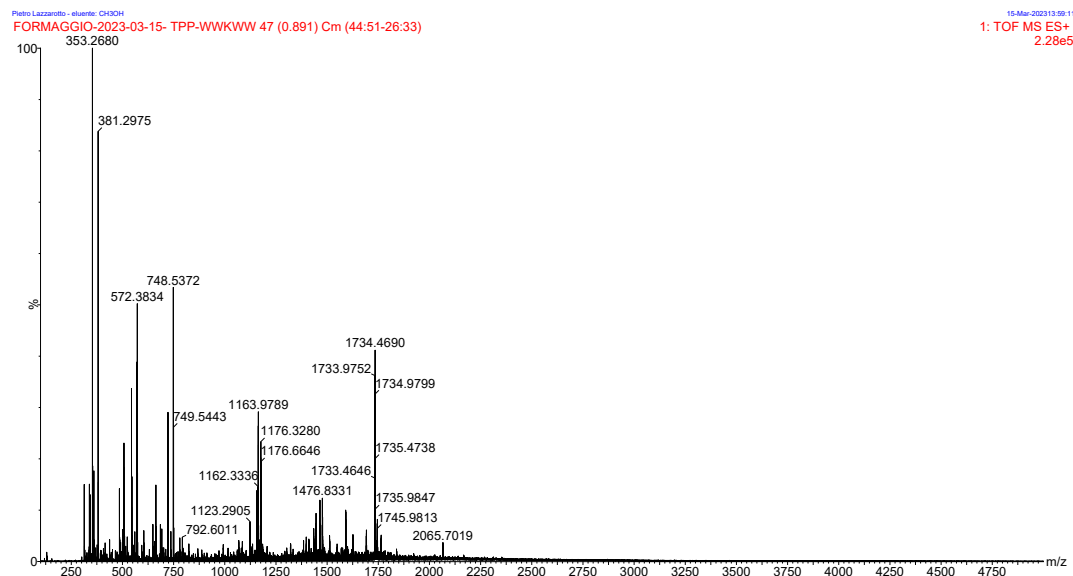


Figura 4.20: Spettro HRMS (ESI-TOF) di TPP-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ Boc-protetto, dopo il singolo coupling con TPP-COOH ($[M+2H]^{2+} = 1733.4646$).

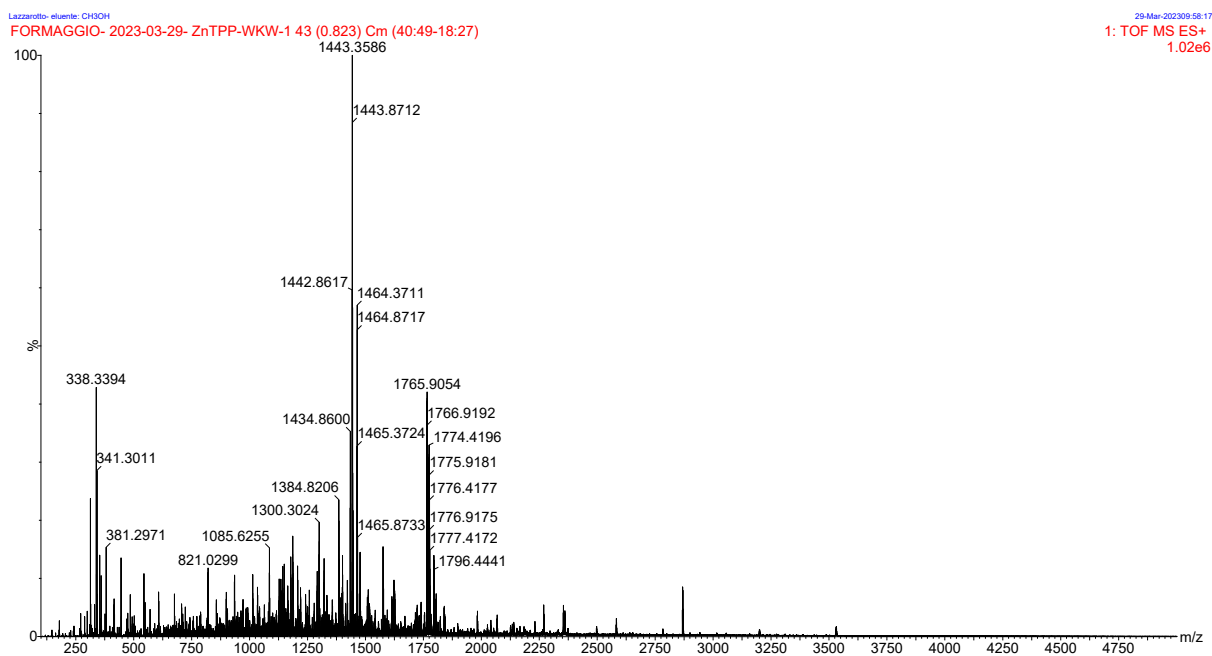


Figura 4.21: Spettro HRMS (ESI-TOF) di ZnTPP-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ Boc-protetto ($[M+2H]^{2+} = 1765.9054$).

La presenza di otto gruppi protettori *Boc* sulle catene laterali dei residui di Lys e Trp, unita alla presenza dell'unità porfirinica N-terminale altamente idrofobica e ingombrata, rendono il peptide in questione insolubile in ambiente acquoso e in solventi mediamente polari. Poiché il cromatogramma HPLC è di difficile interpretazione, si è deciso di legare l'acido lipoico all'estremità C-terminale utilizzando direttamente il peptide grezzo sbloccato dalla resina, senza ulteriori purificazioni. Si potrebbe pensare di eliminare parte delle impurezze tramite precipitazione in etere dietilico, ma questa via non è percorribile, in quanto il peptide viene parzialmente solubilizzato in quel solvente (paragrafo 3.3.9). Il *coupling* di acido lipoico sul C-terminale viene promosso dagli attivatori HOBt ed EDC ed è stato necessario un eccesso maggiore di 2 equivalenti per portare la reazione a completezza, sfruttando aggiunte graduali non superiori a 0.5 equivalenti l'una. La reazione viene monitorata facilmente con TLC, anche grazie al colore intenso prodotto dall'unità porfirinica.

In seguito ai lavaggi per eliminare gli attivatori e i reagenti in eccesso dalla miscela di reazione, il peptide è stato purificato tramite cromatografia a fase inversa a media pressione, in assenza di acido, per ottenere circa 8 mg di prodotto con una purezza del 92% (Figura 4.22).

Sorprendentemente, lo spettro di massa del peptide purificato rivela due cose importanti: la tetrafenilporfirina ha perso lo zinco coordinato precedentemente (demetallazione) e la natura della molecola non è esattamente quella aspettata. La perdita di Zn^{2+} potrebbe essere attribuita ai lavaggi con acqua acida ma anche al trattamento con TFA/DCM 1:1 utilizzato per la deprotezione dei gruppi Boc, seguito dalla purificazione [49]. Per quanto riguarda il secondo punto, i valori dei segnali *m/z* corrispondono agli analoghi mono-ossidato e di-ossidato (Figura 4.23). Questo fatto può essere attribuito alla presenza della porfirina legata covalentemente. Sono note da tempo le capacità fotosensibilizzanti di questa famiglia di cromofori e, infatti, essi sono considerati dei composti promettenti nella terapia fotodinamica, che sfrutta l'eccitazione del diossigeno dal suo stato di tripletto a quello di singoletto, molto più reattivo, per la distruzione selettiva di tessuti tumorali [50]. La presenza di uno o due atomi di ossigeno legati al peptide potrebbe essere quindi spiegata in questo modo: l'unità porfirinica promuove l'eccitazione mediata dalla luce dell'ossigeno dallo stato di tripletto fondamentale allo stato di singoletto eccitato, il quale si lega al peptide. Si presume che l'ossidazione sia avvenuta sugli atomi di zolfo dell'acido lipoico, formando il corrispondente solfossido o addotti simili [51]. La copertura con del foglio d'alluminio dell'ambiente di reazione sembra quindi non essere sufficiente per evitare l'ossidazione della molecola: è necessario probabilmente svolgere questo tipo di reazione in presenza di un'atmosfera inerte, senza ossigeno.

Ulteriori studi sono comunque necessari per stabilire se l'ossidazione sia avvenuta effettivamente sugli atomi di zolfo dell'acido lipoico o in altre parti della struttura peptidica.

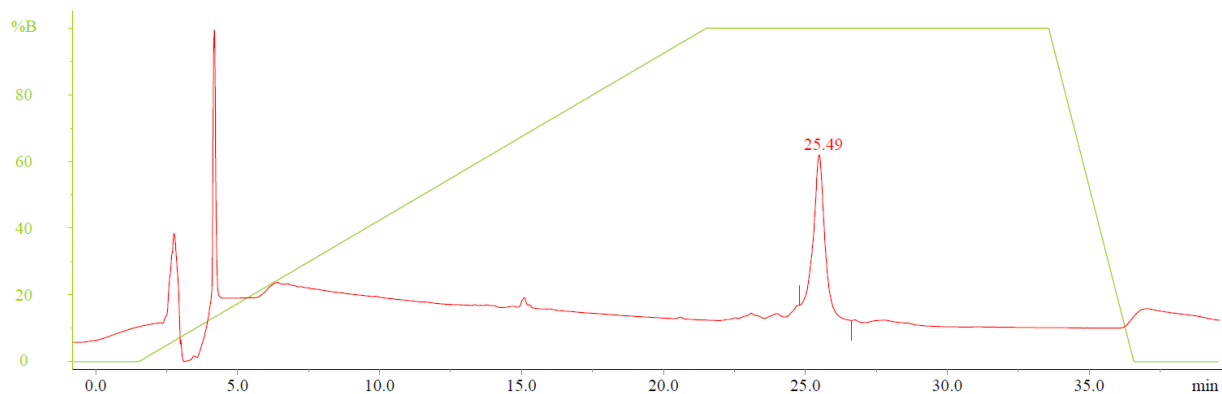


Figura 4.22: Cromatogramma RP-HPLC (gradiente: 0-100% di B in 20 min; colonna: C18; flusso: 1 mL/min) del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo purificato ($t_R = 25.49$ min; purezza: 92%).

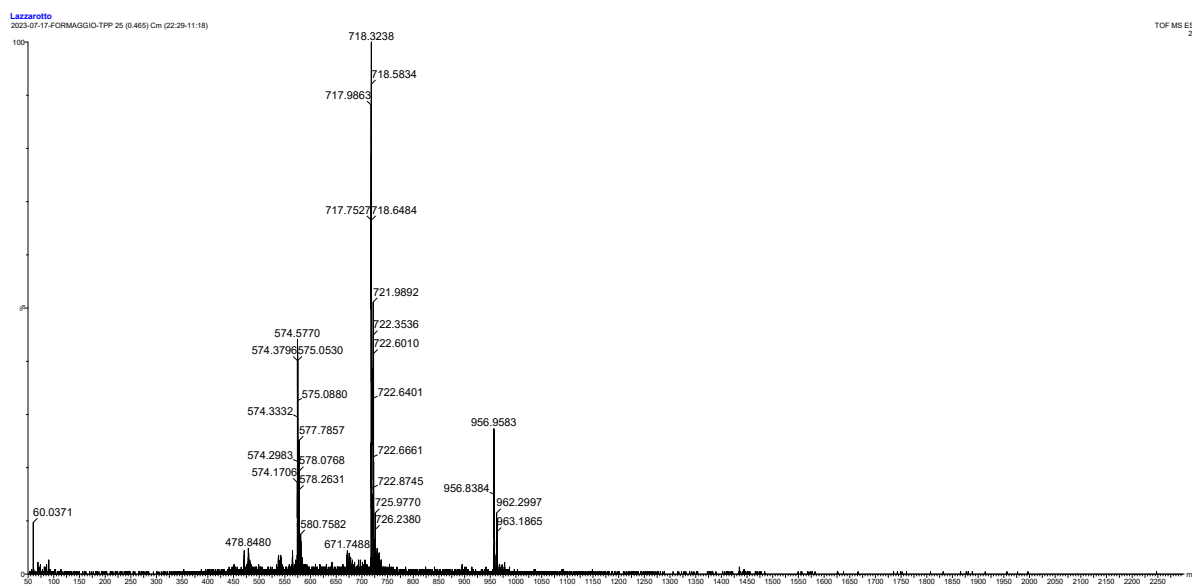


Figura 4.23: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide purificato TPP-WW-K2569-WW-Lipo, che si presenta ossidato ($[M+3H+O]^{3+} = 956.8384$ m/z, $[M+3H+2O]^{3+} = 962.2997$ m/z, $[M+4H+O]^{4+} = 717.5192$ m/z, $[M+4H+2O]^{4+} = 721.9892$ m/z, $[M+2H+O]^{5+} = 574.1706$ m/z, $[M+2H+2O]^{5+}$).

4.2.5 Sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂

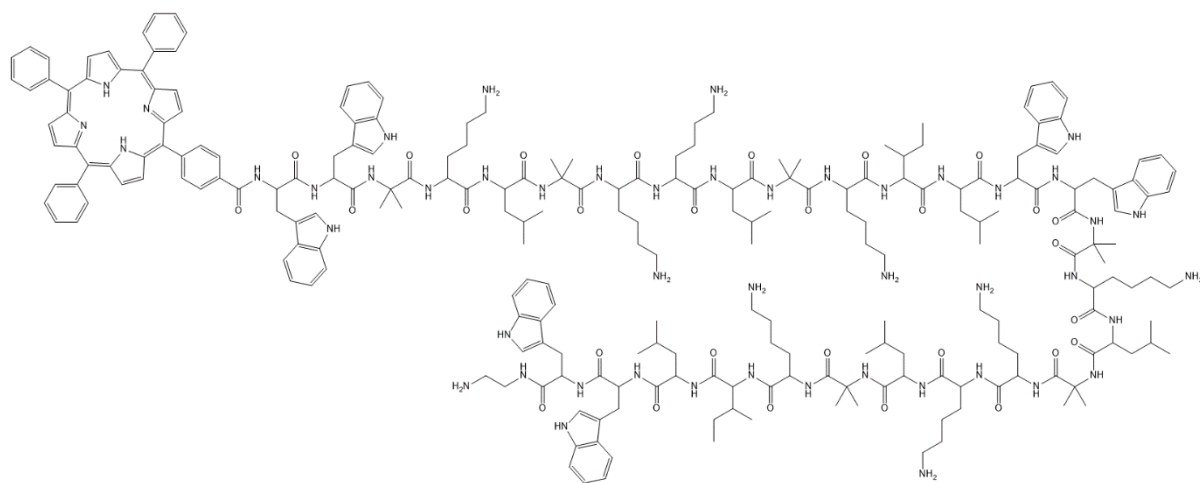


Figura 4.24: Struttura chimica del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂.

La sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ è stata fatta partendo da uno *splitting* della resina con legato il peptide H₂N-WW-K2569-WW, la cui sintesi è descritta nel paragrafo precedente. Per il completamento della sintesi sono stati utilizzati due *coupling* consecutivi per ciascun residuo. La scarsa reattività potrebbe essere dovuta, viste le dimensioni del peptide, a fenomeni di aggregazione tra le varie catene in crescita e all'aumento dell'ingombro sterico all'aumentare della lunghezza. La grandezza del peptide, che presenta, con le lisine e i triptofani Boc-protetti, un peso molecolare di 5661 Da, l'ingombro sterico dato dalla tetrafenilporfirina e la scarsità di siti protonabili liberi hanno reso difficile la sua identificazione tramite HRMS (ESI-TOF). Si è provato quindi ad analizzare il peptide tramite MALDI-TOF, adatto a molecole di grandi dimensioni, ma senza successo [52]. Queste considerazioni hanno portato alla scelta di sbloccare il peptide da una quantità di resina di circa 10 mg, seguita dalla rimozione dei gruppi Boc dai residui di Trp e Lys e da un passaggio di liofilizzazione, per eliminare eventuali gruppi COOH rimasti legati sugli azoti indolici dei triptofani. Il peptide grezzo è stato quindi analizzato tramite HRMS (ESI-TOF) (Figura 4.25) e la presenza della molecola desiderata è confermata dai rispettivi segnali relativi agli ioni molecolari multiprotonati (da 4 a 8 cariche). Ciò dimostra che, anche in questo caso, è sufficiente un singolo *coupling* per la derivatizzazione dell'estremità N-terminale con TPP-COOH, addirittura utilizzando un eccesso inferiore rispetto a quello riportato per la sintesi di TPP-WW-K2569-WW-Lipo (paragrafo 4.2.4). Dallo spettro di massa è comunque evidente che il peptide non sia perfettamente puro, quindi si è provato ad analizzare tramite RP-HPLC.

Non è stato possibile identificare alcun picco, nonostante la presenza dei residui di lisina che dovrebbero garantire la solubilità del peptide in ambienti acquosi, perciò si suppone che la grandezza della molecola sia incompatibile con il tipo di colonna utilizzata. Per eventuali prove future si suggerisce, pertanto, di utilizzare una colonna più adatta a molecole di grandi dimensioni.

Nonostante il peptide non sia stato purificato, esso è stato sottoposto comunque ad analisi di dicroismo circolare, per verificare la sua conformazione in tre diversi solventi (acqua, metanolo e una soluzione acquosa di SDS, paragrafo 4.3)

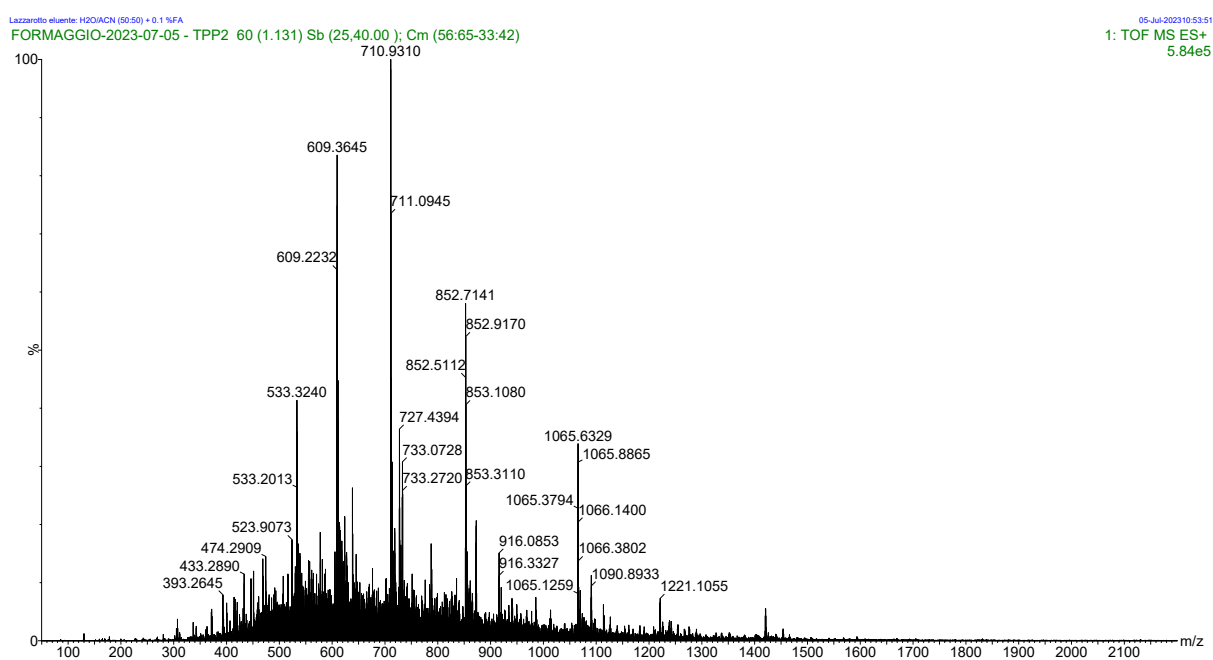


Figura 4.25: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ ($[M+4H]^{4+} = 1065.1259$ m/z, $[M+5H]^{5+} = 852.5112$ m/z, $[M+6H]^{6+} = 710.9310$ m/z, $[M+7H]^{7+} = 609.2232$ m/z, $[M+8H]^{8+} = 533.2013$ m/z).

4.2.6 Sintesi del peptide Ac-WW-K2569-WW-Ac

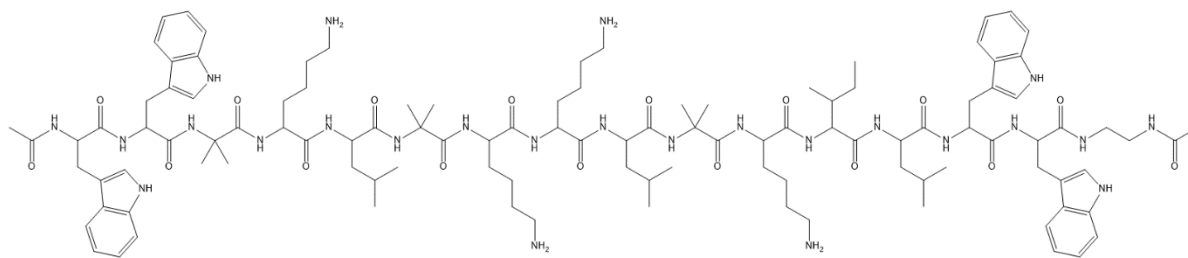


Figura 4.26: Struttura chimica del peptide Ac-WW-K2569-WW-Ac.

Il peptide Ac-WW-K2569-WW-Ac è stato sintetizzato come riferimento rispetto agli analoghi contenenti porfirina. Dopo aver sbloccato il peptide H_2N -WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ dalla resina, esso è stato acetilato in soluzione sfruttando la reazione con anidride acetica [53]. Il pH è stato mantenuto a circa 8 per evitare rimozioni indesiderate dei gruppi protettori Boc in catena laterale, che sono facilmente rimovibili in ambiente acido, e quindi per evitare poliacetilazioni dei residui di lisina e di triptofano.

Gli spettri di massa relativi al crudo della reazione sembravano indicare una purezza elevata per questo peptide (Figura 4.27); si è quindi deciso di rimuovere i gruppi protettori Boc senza purificare il peptide grezzo. L'analisi RP-HPLC successiva alla deprotezione ha rivelato, tuttavia, la presenza di diversi picchi non identificabili e, quindi, è stato necessario procedere con la purificazione del peptide tramite cromatografia a fase inversa a media pressione. Si è ottenuto così il prodotto desiderato con una resa del 13% (Figure 4.28 e 4.29). Parte del prodotto potrebbe essere andata perduta durante lo *step* di purificazione, viste le piccole quantità impiegate, ma un valore così basso è probabilmente dovuto anche a prodotti indesiderati formati durante la reazione di acetilazione, che non sono rilevabili con l'analisi di massa.

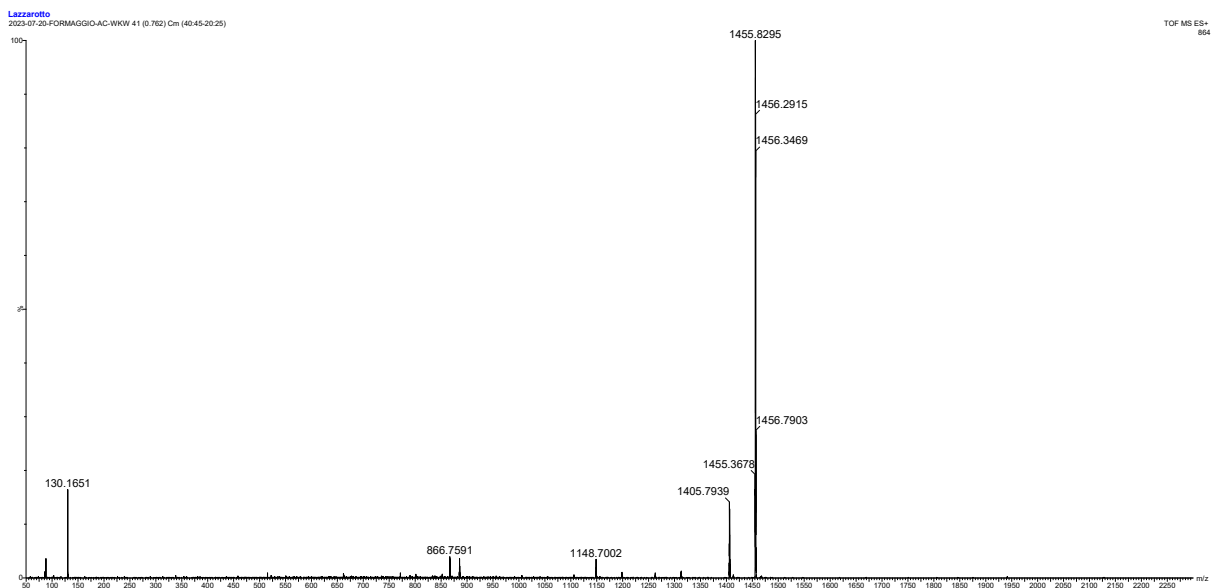


Figura 4.27: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide *Ac-WW-K2569-WW-Ac Boc-protetto* ($[M+2H]^{2+} = 1455.3678$ m/z).

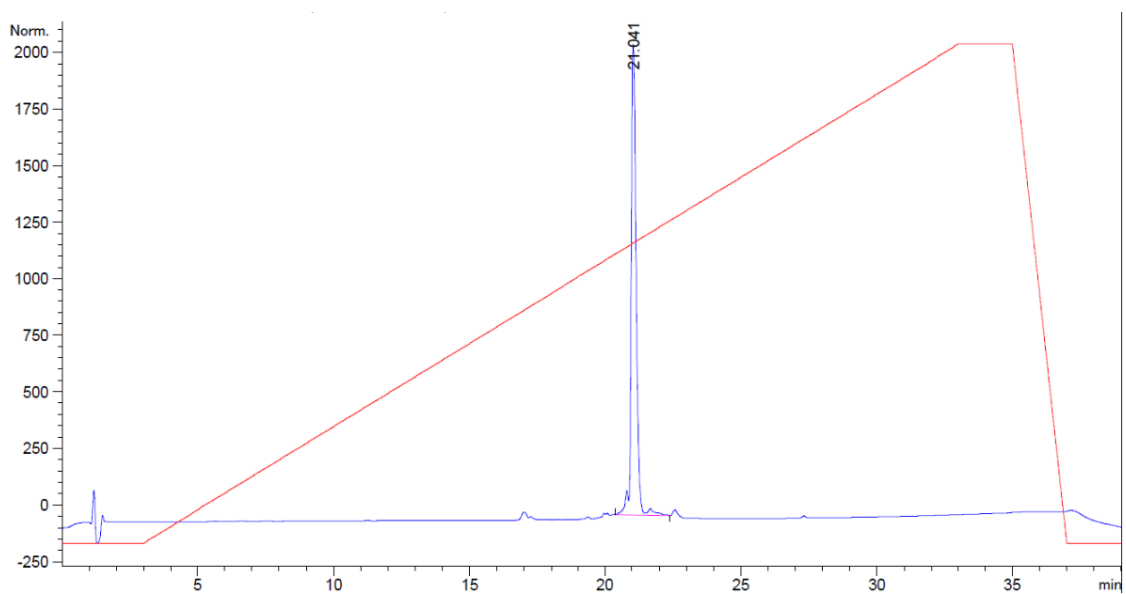


Figura 4.28: Cromatogramma RP-HPLC (gradiente: 0-100% di B in 30 min; colonna: C18; flusso: 1 mL/min) del peptide purificato *Ac-WW-K2569-WW-Ac* ($t_R = 21.04$ min; purezza: 92%).

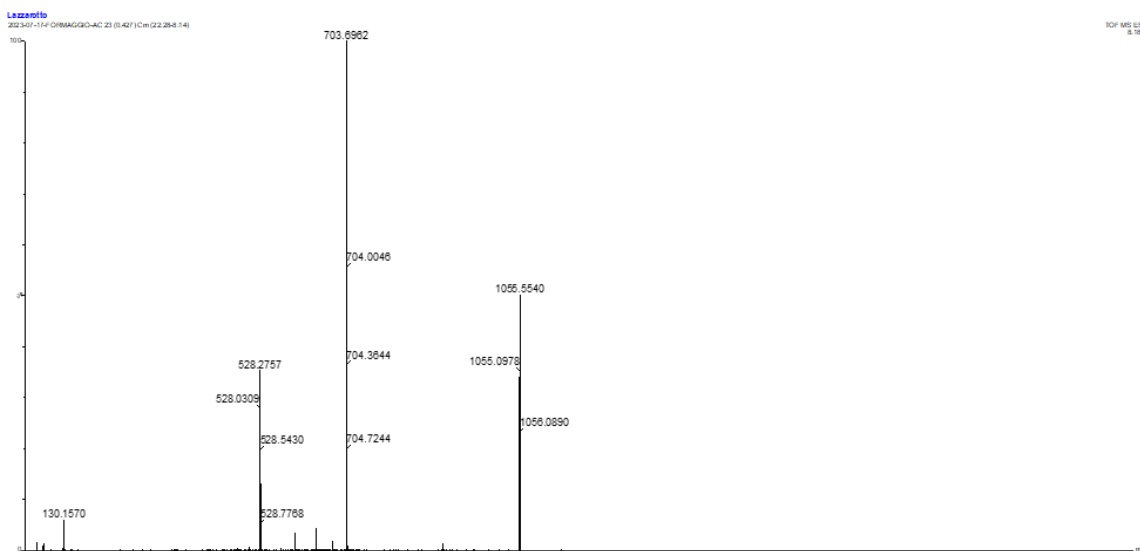


Figura 4.29: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide purificato Ac-WW-K2569-WW-Ac ($[M+2H]^{2+} = 1055.0978$ m/z, $[M+3H]^{3+} = 703.6962$ m/z, $[M+4H]^{4+} = 528.0309$ m/z).

4.2.7 Sintesi del peptide Ade-LUK(Boc)IL-NHCH₂CH₂NH₂

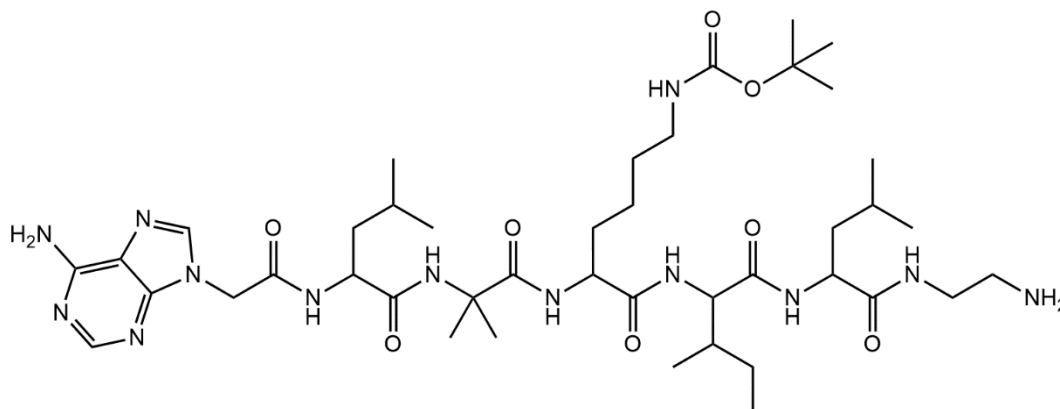


Figura 4.30: Struttura chimica del peptide Ade-LUK(Boc)IL-NHCH₂CH₂NH₂.

Con lo scopo di costruire un peptide in grado di autoassemblarsi attraverso l'interazione tra basi azotate complementari [54], si è deciso di sintetizzare il peptide Ade-LUK(Base)IL-Thym, che presenta una sequenza ispirata alla parte C-terminale dell'analogo K2569 della Tricogina GA IV. Inizialmente, sono state fatte varie prove per sintetizzare il residuo Fmoc-Lys(Thym)-OH, con l'idea di incorporarlo direttamente nella sequenza attraverso la sintesi su fase solida.

La strategia prevedeva di partire dal composto Fmoc-Lys(Boc)-OH e, in seguito alla rimozione del gruppo Boc per trattamento con TFA/DCM 1:1, produrre l'intermedio Fmoc-Lys-OH, da derivatizzare con ThymCOOH in soluzione. La presenza di due gruppi funzionali nucleofili, ovvero l'ammina della catena laterale della lisina e il gruppo carbossilico dello stesso amminoacido, rende tuttavia difficile la funzionalizzazione selettiva della sola catena laterale, per cui non è stato possibile sintetizzare il composto desiderato.

A fronte delle prove fatte, si è quindi deciso di adottare una strategia alternativa che prevede di incorporare la timina in soluzione in seguito allo sblocco del peptide dalla resina e alla rimozione del gruppo Boc, in modo da funzionalizzare contemporaneamente in soluzione sia la catena laterale della lisina che l'estremità C-terminale. La sequenza sintetizzata tramite la sintesi su fase solida è Leu-Aib-Lys(Boc)-Ile-Leu-NHCH₂CH₂NH₂, in cui la lisina è stata incorporata con la funzione amminica protetta dal gruppo Boc. L'attacco dell'adenina sull'estremità N-terminale è stato fatto utilizzando le stesse condizioni adottate per la sintesi degli altri peptidi contenenti adenina, ma in questo caso sono stati necessari ben quattro *coupling overnight* per ottenere la funzionalizzazione quantitativa. Sembrerebbe quindi che l'attacco di AdeCOOH sulla funzione α -amminica del residuo di leucina N-terminale sia inibito dall'ingombro sterico della catena laterale di quest'ultima. Altre motivazioni possono essere ricercate anche nella scarsa solubilità di AdeCOOH nel solvente impiegato (DMF); essa, infatti, rimane parzialmente in sospensione. L'analisi di massa fatta in seguito alla derivatizzazione con AdeCOOH conferma la scomparsa del peptide con l'estremità N-terminale libera e la formazione del prodotto desiderato, anche se sono individuabili altri sottoprodotti, in particolare quello a m/z 811.6087, che non è stato possibile identificare (Figura 4.31). Questo dato potrebbe confermare la scarsa reattività di AdeCOOH. In seguito allo sblocco del peptide dalla resina sono stati raccolti 288 mg di prodotto grezzo, con una resa provvisoria superiore al 100%.

La strategia prevederebbe quindi di proseguire con la purificazione, con la rimozione del gruppo protettore Boc dalla catena laterale di Lys³ e con il doppio *coupling* in soluzione per legare la timina a quest'ultima e all'estremità C-terminale.

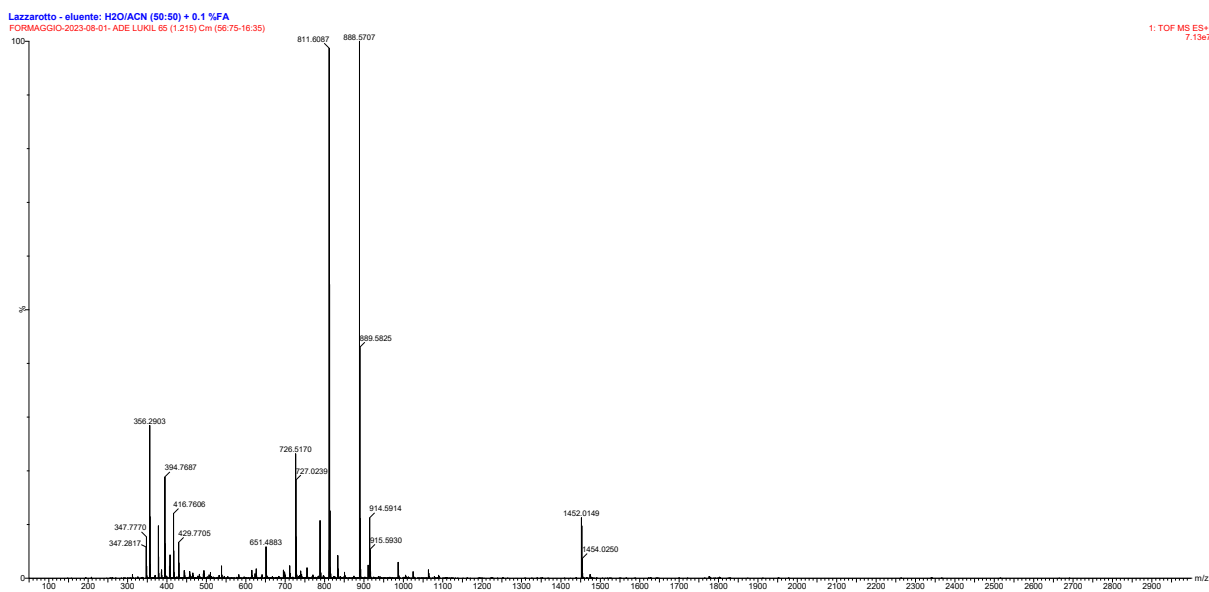


Figura 4.31: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide grezzo Ade-LUK(Boc)IL-NHCH₂CH₂NH₂ ($[M+H]^+$ = 888.5707 m/z).

4.2.8 Sintesi del peptide Ade-K25(Ade)69-NHCH₂CH₂NH₂

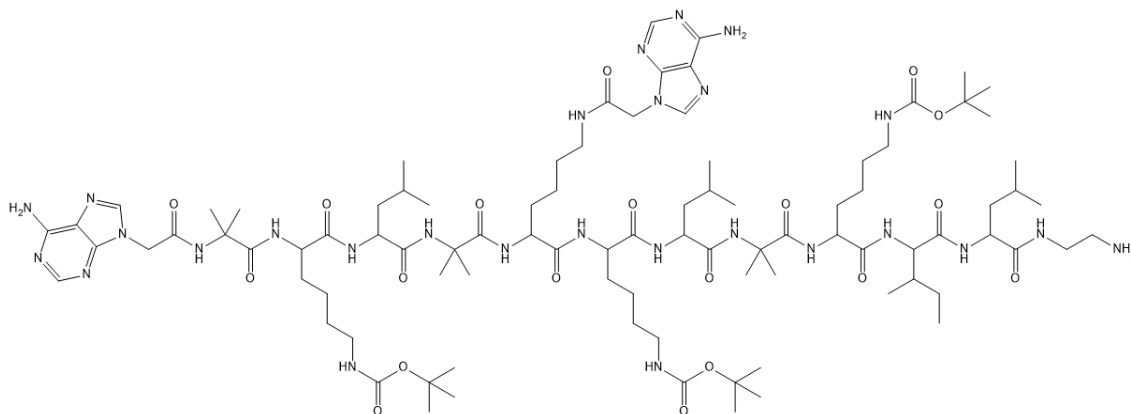


Figura 4.32: Struttura chimica del peptide Ade-K25(Ade)69-NHCH₂CH₂NH₂.

Le considerazioni fatte nel caso della sintesi di Ade-LUK(Boc)IL-NHCH₂CH₂NH₂ si riflettono anche sulla scelta di sintesi adottata nel caso di questo peptide. La presenza di quattro residui di lisina e la necessità di derivatizzare solamente il residuo Lys⁵ non permettono di utilizzare la medesima strategia discussa nel paragrafo precedente.

In questo caso specifico, quindi, si è ricorso al gruppo allilossicarbonilico (*Alloc*), descritto nel paragrafo 4.1.3.3 [43]. Le condizioni di rimozione di questo gruppo, infatti, sono compatibili e ortogonali sia alla rimozione del gruppo Fmoc che a quella dei gruppi Boc e, inoltre, anche alle condizioni di *cleavage* del peptide dalla resina. Questo ha permesso di sintetizzare la sequenza primaria del peptide e portare a termine la rimozione del gruppo Alloc direttamente sulla fase solida, sfruttando la rimozione dell'allile palladio-catalizzata in presenza di fenilsilano [44]. Questo passaggio di rimozione è stato fatto cercando di garantire la presenza di un'atmosfera inerte all'interno della siringa di reazione, in quanto entrambi i reagenti sono sensibili all'umidità e alla presenza di ossigeno.

Utilizzando il complesso *tetrakis*(trifenilfosfina)Palladio(0) in presenza di fenilsilano si è riusciti a rimuovere quantitativamente il gruppo protettore Alloc con due trattamenti (paragrafo 3.3.7), utilizzando le quantità riportate in letteratura [55], e questo ha permesso quindi di funzionalizzare sia l'estremità N-terminale che la catena laterale del residuo Lys⁵ con l'adenina. Sono stati necessari 3 *coupling overnight* per portare a termine la funzionalizzazione con AdeCOOH. Questo è sorprendente, visto che nella sintesi di Ade-K2569-Thym era stato sufficiente un singolo *coupling*.

Abbiamo già visto, nel paragrafo precedente, come l'AdeCOOH sia poco solubile nelle condizioni adottate; il fatto di utilizzarla in larghissimo eccesso (6 equivalenti) riduce ulteriormente la sua solubilità, limitando di conseguenza l'efficienza della reazione. Gli spettri HRMS riportati di seguito confermano sia la rimozione del gruppo protettore *Alloc* (Figura 4.33) che la doppia funzionalizzazione con AdeCOOH (Figure 4.34 e 4.35). In quest'ultimo caso, il segnale relativo allo ione molecolare monoprotonato ha un'intensità bassissima e sono presenti molti segnali intensi non identificabili: questo è probabilmente dovuto alla scarsa affinità protonica del peptide considerato, anche se non è da escludere la presenza di sottoprodotti formati durante il *coupling* con l'adenina, come riscontrato negli altri casi.

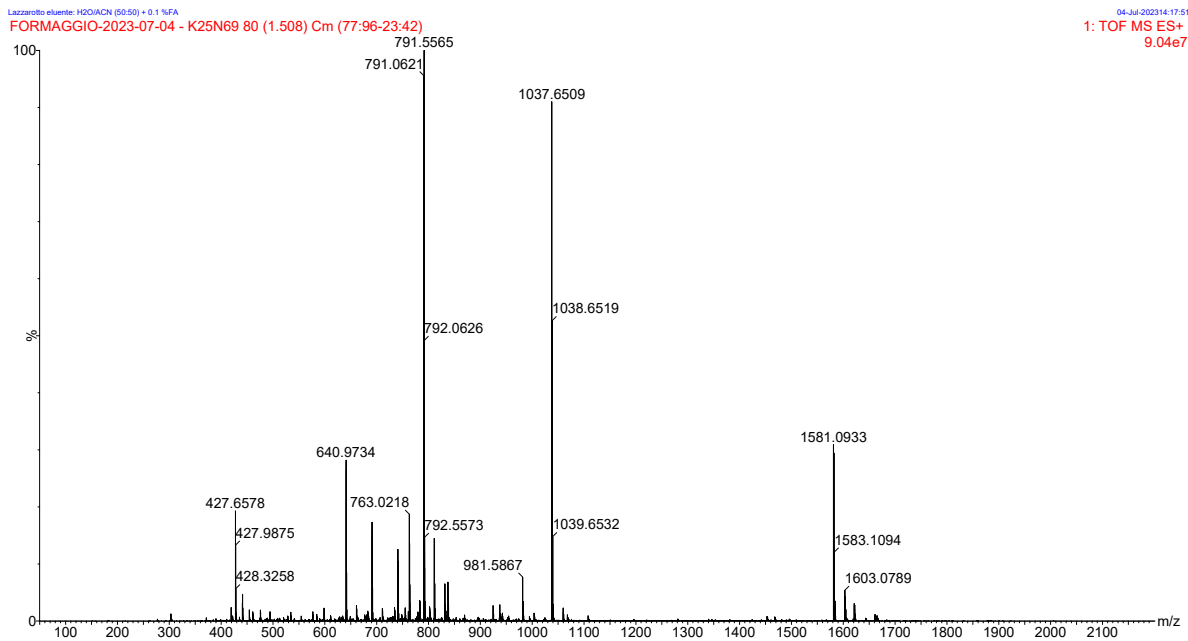


Figura 4.33: Spettro HRMS (ESI-TOF) dello sblocco in piccolo dopo la deprotezione dell'Alloc ($[M+H]^+ = 1581.0933$ m/z, $[M+2H]^{2+} = 791.0621$ m/z, $[M-3Boc+2H]^{2+} = 640.9734$ m/z, $[M-3Boc+3H]^{3+} = 427.6578$ m/z).

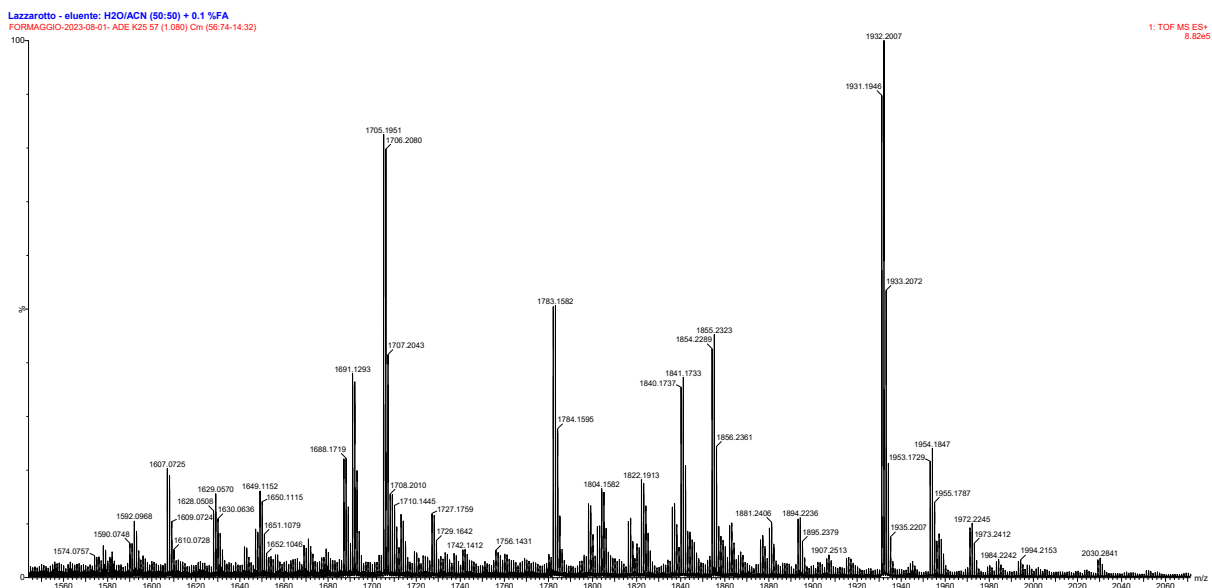


Figura 4.34: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide grezzo Ade-K25(Ade)69-NHCH₂CH₂NH₂ Boc-protetto ($[M+H]^+ = 1931.1946$ m/z).

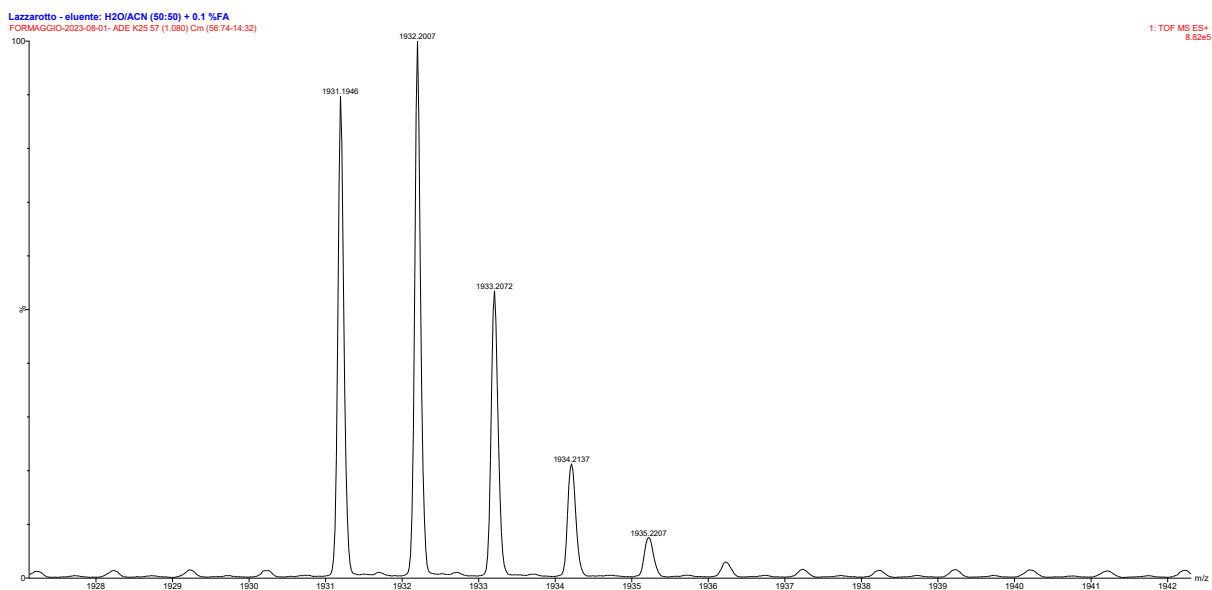


Figura 4.35: Spettro HRMS (ESI-TOF) del peptide grezzo Ade-K25(Ade)69-NHCH₂CH₂NH₂ Boc-protetto nel range di m/z da 1920 a 1945 ($[M+H]^+ = 1931.1946$ m/z).

4.3 DICROISMO CIRCOLARE

Sono state effettuate misure di dicroismo circolare allo scopo di investigare le preferenze conformazionali dei peptidi sintetizzati in soluzione. Le analisi sono state svolte in metanolo, acqua e in presenza di micelle di sodio dodecil solfato (SDS), a 25°C.

La regione in cui vengono condotte le analisi è compresa tra i 185 e i 250 nm (lontano UV), dove sono presenti le bande relative alle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del cromoforo peptidico [56].

Data la natura achirale del legame peptidico, queste transizioni sono otticamente inattive, ma diventano otticamente attive in presenza di centri chirali (quali i C $^{\alpha}$ degli amminoacidi) e/o di strutture secondarie elicoidali, di per sé asimmetriche.

I profili dicroici e la posizione delle bande forniscono indicazioni sul tipo di struttura secondaria (α -elica, elica 3_{10} , β -sheet, random coil) adottata dal peptide esaminato.

Una conformazione α -elicoidale destrógira ha uno spettro dicroico dominato da due massimi negativi a 208 nm e a 222 nm, e uno positivo a circa 190 nm. L'elica 3_{10} si differenzia dall' α -elica per le intensità relative delle bande e che per la loro posizione. Lo spettro dicroico dell'elica 3_{10} destrógira è caratterizzato da una banda positiva a circa 195 nm, di intensità minore rispetto all'elica α , una banda negativa a 204 nm e una molto meno pronunciata a circa 222 nm [57].

La distinzione tra le due strutture secondarie elicoidali (α -elica, elica 3_{10}) è sperimentalmente individuabile dal rapporto R tra le ellitticità delle bande centrate a 204 e 222 nm:

$$R = [\theta]_{222}/[\theta]_{204}$$

Un valore R uguale o inferiore a 0.4 è indicativo di una struttura prevalentemente ad elica 3_{10} , mentre quando il rapporto si avvicina all'unità la struttura prevalente è l' α -elica [56] [57]. Valori intermedi sono diagnostici della compresenza delle due strutture. I valori sperimentali per i peptidi analizzati sono riportati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1. Valori di ellitticità molare $[\theta]_T \times 10^{-3}$ ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) ai massimi negativi e relativo rapporto R per i peptidi analizzati nei diversi solventi. Concentrazione peptidica: tra 1×10^{-5} e 1×10^{-4} M.

Peptide	$[\theta]_{224}$	$[\theta]_{208}$	R $[\theta]_{222}/[\theta]_{204}$
TPP-WW-K2569-WW-Lipo in SDS 100mM	-89.3867	-97.5655	0.92
TPP-WW-K2569-WW-Lipo in MeOH	-204.835	-211.66	0.97
TPP-WW-K2569-WW-Lipo in H ₂ O ^a	-25.1857	-24.239	1.04
TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ in SDS 100mM	-169.008	-194.768	0.87
TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ in MeOH	-273.071	-333.261	0.82
TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ in H ₂ O ^a	-90.3677	-106.563	0.85
Ade-K2569-Thym in SDS 100mM	-117.879	-196.155	0.60
Ade-K2569-Thym in MeOH	-114.074	-195.754	0.58
Ade-K2569-Thym in H ₂ O	-53.1863	-122.208	0.43

(204 nm)

^a Il peptide è molto idrofobico, è possibile che in acqua si organizzi in aggregati.

I profili dicroici registrati nei diversi solventi per i peptidi sintetizzati sono riportati nelle Figure 4.36 e 4.37. Il dicrografo utilizzato, ubicato presso il Dipartimento di Farmacia, permette di acquisire gli spettri fino a circa 192 nm, tagliando quindi in parte il massimo positivo a quella lunghezza d'onda. Tuttavia, è possibile comunque assegnare senza ambiguità una struttura prevalentemente α elicoidale ai due peptidi contenenti la sonda porfirinica nei solventi analizzati (Figura 4.36). Il peptide Ade-K2569-Thym presenta invece i massimi negativi in una posizione e un rapporto R (Tabella 4.1) più vicini a quelli dell'elica 3_{10} , specialmente in acqua. Questa osservazione è in linea con la letteratura, nella quale è riportata questa stessa preferenza per l'adozione di una struttura elicoidale mista $\alpha/3_{10}$, con una prevalenza di elica 3_{10} soprattutto in acqua, per il peptide analogo a quello qui studiato, ma senza le basi azotate [22].

La struttura elicoidale si mantiene stabile al variare del solvente utilizzato, come atteso da peptidi contenenti vari residui di Aib, noto induttore e stabilizzatore di strutture elicoidali.

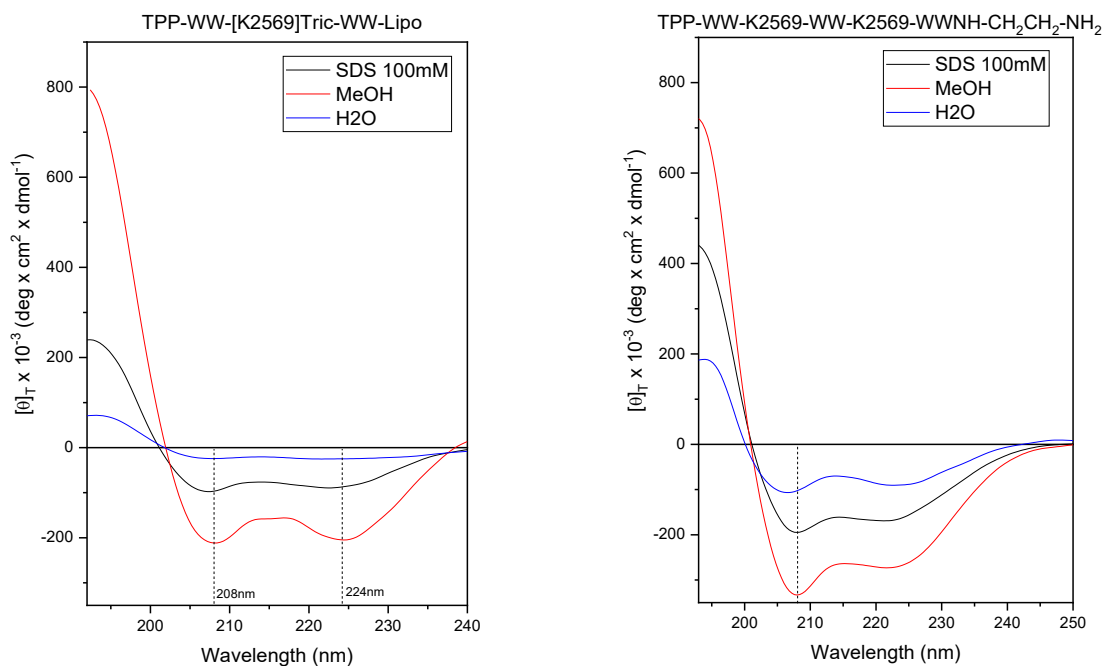


Figura 4.36: Spettri CD acquisiti per i peptidi contenenti la sonda porfirinica nei tre diversi ambienti investigati (metanolo, acqua e soluzione acquosa di SDS 100mM). Concentrazione peptidica: tra 1×10^{-5} e 1×10^{-4} M.

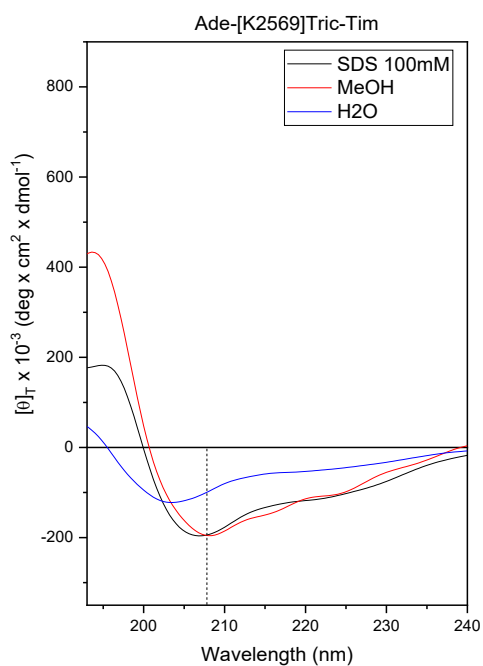


Figura 4.37: Spettri CD acquisiti per il peptide Ade-K2569-Thym nei tre diversi ambienti investigati (metanolo, acqua e soluzione acquosa di SDS 100mM). Concentrazione peptidica: tra 1×10^{-5} e 1×10^{-4} M.

5 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di Tesi riguarda la sintesi e la caratterizzazione di una serie di peptidi ispirati alla sequenza di un analogo del peptaibolico Tricogina GA IV, denominato nel testo *K2569*, che presenta quattro residui di lisina al posto dei residui di glicina che caratterizzano la struttura nativa. Sulla base di recenti lavori riportati in letteratura, si è deciso di sintetizzare questi peptidi con lo scopo di costruire dei sistemi utili per studi spettroscopici.

Tutti i peptidi sono stati sintetizzati utilizzando la sintesi peptidica su fase solida (*SPPS*), sfruttando la resina 1,2-diamminoetan-tritilica, che permette di ottenere i peptidi funzionalizzati con etilendiammina in corrispondenza dell'estremità C-terminale. Questa funzionalità è utile nel caso in cui sia necessario derivatizzare i peptidi in seguito al loro *cleavage* dalla resina.

I peptidi contenenti adenina sono stati funzionalizzati con quest'ultima sfruttando il *coupling* in fase solida di AdeCOOH, attivato dalle specie HATU e HOAt, in presenza di DIPEA. Mentre per la sintesi di Ade-K2569-Thym è risultato sufficiente un singolo *coupling overnight*, nel caso degli altri due peptidi, Ade-LUKIL-NHCH₂CH₂NH₂ e Ade-K25(Ade)₆₉-NHCH₂CH₂NH₂, ne sono serviti, rispettivamente, quattro e tre. Questa differenza è stata attribuita, in un caso, alla presenza della catena laterale della leucina N-terminale, che produce un ingombro sterico e limita l'avvicinamento dei reagenti e, nell'altro caso, alla scarsa solubilità di AdeCOOH nelle condizioni adottate (eccesso di 6 equivalenti). Il primo peptide, dopo la funzionalizzazione con ThymCOOH in soluzione, è stato purificato con successo, ottenendo un prodotto con una purezza superiore all'80% e una resa complessiva del 26%. Per quanto riguarda gli altri due peptidi, sono stati sbloccati dalla resina dopo la funzionalizzazione con adenina, con l'idea di derivatizzarli con la timina in un secondo momento.

Per il *coupling* di TPP-COOH in fase solida sono stati utilizzati con successo gli attivatori impiegati anche per l'attacco dei singoli amminoacidi, ovvero OxymaPure[®] e DIC. Per entrambi i peptidi contenenti la porfirina è stato usato un eccesso inferiore a 3 equivalenti e, nonostante ciò, il *coupling* è stato quantitativo. Questo fatto porta indubbiamente a dei vantaggi dal punto di vista delle risorse (minor spreco e minor costo), anche se il tempo di reazione è elevato (*overnight*). La durata della reazione potrebbe essere il motivo per il quale si formano anche prodotti indesiderati; pertanto, sarebbe interessante poter valutare le migliori condizioni di attivazione di questa specie, che permettano di ottenere *coupling* quantitativi e puliti.

In seguito alla funzionalizzazione con acido lipoico condotta in soluzione, per la sintesi del peptide TPP-WW-K2569-WW-Lipo, e alla purificazione, ci si è accorti che il composto sintetizzato presentava dei segnali HRMS compatibili con il derivato mono- e di-ossidato. Una possibile spiegazione potrebbe riguardare la capacità della porfirina di facilitare, in presenza di luce, la formazione di specie di ossigeno reattive, che avrebbero potuto legarsi agli atomi di zolfo dell'acido lipoico; seppur probabile, questa spiegazione necessita di ulteriori studi per poter essere dimostrata. Banalmente, un accorgimento potrebbe essere quello di svolgere la medesima reazione in condizioni di atmosfera inerte, per evitare ossidazioni indesiderate. Dopo la purificazione ci si è accorti, inoltre, che il macrociclo porfirinico, inizialmente coordinato allo ione Zn^{2+} , aveva subito demetallazione. Questo potrebbe essere dovuto ai lavaggi con acqua acida oppure alle condizioni fortemente acide utilizzate per la rimozione dei gruppi protettori *Boc*. Il peptide in questione è stato comunque ottenuto con una purezza elevata (92%) ma la resa di reazione è risultata essere molto bassa.

Poiché la rivelazione del peptide TPP-WW-K2569-WW-K2569-WW-NHCH₂CH₂NH₂ Boc-protetto sulle catene laterali dei residui di Lys e Trp si è rivelata particolarmente impegnativa, data la sua scarsa affinità protonica ed elevata idrofobicità, esso è stato sbloccato dalla resina e sono stati rimossi i gruppi *Boc*. Questo ha permesso la sua caratterizzazione tramite HRMS (ESI-TOF), che ha confermato quindi l'avvenuto *coupling* di TPP-COOH, ma non ha permesso la sua eventuale funzionalizzazione con acido lipoico.

Un ultimo peptide è stato sintetizzato con lo scopo sia di fornire un riferimento per TPP-WW-K2569-WW-Lipo che di utilizzarlo per studi spettroscopici o di aggregazione. Il peptide in questione è stato acetilato su entrambe le estremità N- e C-terminali e, sebbene sia stato ottenuto con una purezza superiore al 90%, la resa finale è poco più grande del 10%. Quest'ultimo punto andrebbe indagato più a fondo, visto soprattutto il fatto che il derivato *Boc*-protetto appariva pulito nello spettro HRMS.

L'analisi CD ha evidenziato come i peptidi più lunghi, contenenti la sonda porfirinica, adottino una struttura prevalentemente α -elicoidale in tutti gli ambienti testati. Il peptide derivatizzato con le basi azotate (Ade-K2569-Thym) adotta una conformazione elicoidale mista di tipo $\alpha/3_{10}$.

Concludendo, la sintesi e la caratterizzazione dei peptidi riportati in questo elaborato deve considerarsi come un punto di partenza per ulteriori studi spettroscopici, in particolare riguardanti la capacità di autoaggregazione e di mediazione del trasferimento elettronico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Sjulstok, J. Olsen e I. Solov'yov, *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 18446, 2015.
- [2] A. Shah, B. Adhikari, S. Martic, A. Munir, S. Shahzad, K. Ahrmad e H. Kraatz, *Chem Soc Rev*, vol. 44, pp. 1015-1027, 2015.
- [3] M. El-Khouly, E. El-Mohsnawy e S. Fukuzumi, *J. Photochem. Photobiol. C*, vol. 31, pp. 36-83, 2017.
- [4] T. Morita e S. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, pp. 8732-8733, 2003.
- [5] E. Gatto e M. Venanzi, «Peptronics: peptide materials for electron transfer,» in *Peptide Materials: From Nanostructure to Applications*, John Wiley and Sons, 2013, pp. 106-147.
- [6] S. Yasutomi, T. Morita, Y. Imanishi e S. Kimura, *Science*, vol. 304, pp. 1944-1947, 2004.
- [7] E. Galoppini e M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, pp. 2299-2300, 1996.
- [8] T. Morita, S. Kimura, S. Kobayashi e Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, pp. 2850-2859, 2000.
- [9] Y. Arikuma, K. Takeda, T. Morita, M. Ohmae e S. Kimura, *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, pp. 6256-6266, 2009.
- [10] I. Karle e P. Balaram, *Biochemistry*, vol. 29, pp. 6747-6756, 1990.
- [11] M. Venanzi, G. Pace, A. Palleschi, L. Stella, P. Castrucci, M. Scarselli, M. De Crescenzi, F. Formaggio, C. Toniolo e G. Marletta, *Surf. Sci.*, vol. 600, pp. 409-416, 2006.
- [12] Y. Arikuma, H. Nakayama, T. Morita e S. Kimura, *Langmuir*, vol. 27, pp. 1530-1535, 2010.
- [13] S. S. Skourtis, *Pept. Sci.*, vol. 100, pp. 82-92, 2013.
- [14] T. Morita e S. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, pp. 8732-8733, 2003.

- [15] G. Pace, M. Venanzi, P. Castrucci, M. Scarselli, M. De Crescenzi, A. Palleschi, L. Stella, F. Formaggio, C. Toniolo e G. Marletta, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 26, pp. 918-923, 2006.
- [16] J. Yu, J. Horsley e A. Abell, *Aust. J. Chem.*, vol. 66, pp. 848-851, 2013.
- [17] K. Schaefer, I. Dambuza, S. Dall'Angelo, R. Yucel, M. Jaspars, L. Trembleau, M. Zanda, G. Brown, M. Netea e N. Gow, *Microorganisms*, vol. 8, p. 1066, 2020.
- [18] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio e C. Peggion, *Pept. Sci.*, vol. 60, pp. 396-419, 2001.
- [19] E. Gatto, L. Stella, C. Baldini, C. Toniolo, F. Formaggio e M. Venanzi, *Superlattices Microstruct.*, vol. 46, pp. 34-39, 2009.
- [20] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, R. Eband e R. Eband, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, pp. 1179-1188, 2001.
- [21] M. De Zotti, B. Biondi, F. Formaggio, C. Toniolo, L. Stella, Y. Park e H. Hahm, *J. Pept. Sci.*, vol. 15, pp. 615-619, 2009.
- [22] M. De Zotti, B. Biondi, C. Peggion, F. Formaggio, Y. Park, K. Hahm e C. Toniolo, *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, p. 1285, 2012.
- [23] A. Dalzini, C. Bergamini, B. Biondi, M. De Zotti, G. Panighel, R. Fato, C. Peggion, M. Bortolus e A. Maniero, *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 24000, 2016.
- [24] C. Peggion, F. Formaggio, M. Crisma, R. Eband, R. Eband e C. Toniolo, *J. Pept. Sci.*, vol. 9, pp. 679-689, 2003.
- [25] C. Toniolo e E. Benedetti, *Trends Biochem. Sci.*, vol. 16, p. 350, 1991.
- [26] E. Gatto, S. Kubitziky, M. Schriever, S. Cesaroni, C. Mazzuca, G. Marafon, M. Venanzi e M. De Zotti, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 58, pp. 7308-7312, 2019.
- [27] E. Gatto, L. Stella, F. Formaggio, C. Toniolo, L. Lorenzelli e M. Venanzi, *J. Pept. Sci.*, vol. 14, pp. 184-191, 2008.
- [28] G. Marafon, D. Mosconi, D. Mazzier, B. Biondi, M. De Zotti e A. Moretto, *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 73650-73659, 2016.

- [29] E. Gatto, A. Porchetta, M. Scarselli, M. De Crescenzi, F. Formaggio, C. Toniolo e M. Venanzi, *Langmuir*, vol. 28, pp. 2817-2826, 2012.
- [30] S. Kubitzky, M. Venanzi, B. Biondi, R. Lettieri, M. De Zotti e E. Gatto, *Chem. Eur. J.*, vol. 27, pp. 2810-2817, 2021.
- [31] R. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, pp. 2149-2154, 1963.
- [32] J. Palomo, *RSC Adv.*, vol. 4, p. 32658, 2014.
- [33] D. Jaradat, *Amino Acids*, vol. 50, pp. 39-68, 2018.
- [34] A. El-Faham e F. Albericio, *Chem. Rev.*, vol. 111, pp. 6557-6602, 2011.
- [35] J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford: Oxford University Press, 1992.
- [36] E. Valeur e M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, pp. 606-631, 2009.
- [37] C. Montalbetti e V. Falque, *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 10827-10852, 2005.
- [38] L. A. Carpino e G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, pp. 5748-5749, 1970.
- [39] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez e F. Albericio, *Chem. Rev.*, vol. 109, pp. 2455-2504, 2009.
- [40] T. W. Green e P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, New York: Wiley-Interscience, 1999.
- [41] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos e E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, pp. 2559-2560, 1994.
- [42] J. Alsina, F. Rabanal, E. Giralt e F. Albericio, *Tetrahedron Letters*, vol. 35, pp. 9633-9636, 1994.
- [43] F. Guibe e Y. Saint M'leux, *Tetrahedron Letters*, vol. 22, pp. 3591-3594, 1981.
- [44] M. Dessolin, M. G. Guillerez, N. Thieriet, F. Guibe e A. Loffet, *Tetrahedron Letters*, vol. 36, pp. 5741-5744, 1995.

- [45] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen e O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, vol. 59, pp. 5767-5773, 1994.
- [46] C. Saintomé, P. Clivio, A. Favre e J. L. Fourrey, *J. Org. Chem.*, vol. 62, pp. 8125-8130, 1997.
- [47] N. G. Anderson, «Solvent Selection,» in *Practical Process Research and Development (Second Edition)*, ScienceDirect, Academic Press, 2012, pp. 121-168.
- [48] R. K. Henderson, C. Jiménez-González, D. J. C. Constable, S. R. Alston, G. G. A. Inglis, G. Fisher, J. Sherwood, S. P. Binks e A. D. Curzons, *Green Chem.*, vol. 13, pp. 854-862, 2011.
- [49] Y. Saga, S. Hojo e Y. Hirai, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, pp. 5697-5700, 2010.
- [50] J. D. D. Kou e L. Yang, *Oncotarget*, vol. 8, pp. 81591-81603, 2017.
- [51] F. E. Stary, S. L. Jindal e R. W. Murray, *J. Org. Chem.*, vol. 40, pp. 58-62, 1975.
- [52] K. A. Dave, M. J. Headlam, T. P. Wallis e J. J. Gorman, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, pp. 16.13.1-16.13.21, 2011.
- [53] F. Valentini, P. Galloni, D. Brancadoro, V. Conte e F. Sabuzi, *Front. Chem.*, vol. 10, n. 842190, 2022.
- [54] G. Marafon, I. Menegazzo, M. De Zotti, M. Crisma, C. Toniolo e A. Moretto, *Soft Matter*, vol. 13, pp. 4231-4240, 2017.
- [55] P. Grieco, P. M. Gitu e V. J. Hruby, *J. Peptide Res.*, vol. 57, pp. 250-256, 2001.
- [56] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, New York, NY, USA: Plenum Press, 1996.
- [57] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma e J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, pp. 2744-2745, 1996.

