



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.**

*Dipartimento di Chimica Organica*

**TESI DI LAUREA**  
**in Chimica Industriale**

**PEPTIDI IN CONFORMAZIONE COMPLETAMENTE  
ESTESA: SINTESI, STUDI CONFORMAZIONALI E  
INFLUENZA DEL SOLVENTE SULLA STRUTTURA  
TRIDIMENSIONALE**

**RELATORE: PROF.SSA CRISTINA PEGGION**  
**CONTRORELATORE: PROF. DANILO PEDRON**

**LAUREANDO: ALESSANDRO ANTONIAZZI**

***ANNO ACCADEMICO 2010-2011***

**INDICE**

<i>Abbreviazioni</i> .....	<i>III</i>
1. <i>INTRODUZIONE</i>	
1.1. <i>Struttura secondaria dei peptidi C<sup>α</sup> tetrasostituiti</i> .....	2
1.2 <i>Gli omopeptidi Deg e la loro conformazione</i> .....	7
1.3 <i>Scopo di questo lavoro di tesi</i> .....	13
2. <i>PARTE SPERIMENTALE</i>	
2.1. <i>Materiali e metodi</i> .....	16
2.1.1. <i>Reagenti e solventi</i> .....	16
2.1.2. <i>Strumentazioni e metodi</i> .....	17
2.2. <i>Sintesi e caratterizzazione</i> .....	19
2.2.1. <i>Sintesi dei derivati degli amminoacidi</i> .....	19
2.2.2. <i>Sintesi dei peptidi Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu (n= 1-5)</i> .....	20
2.2.3 <i>Sintesi dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (n= 1-5)</i> .....	23
2.3. <i>Strategia di sintesi</i> .....	34
2.4. <i>Gruppi protettori e metodi di attivazione</i> .....	36
3. <i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	
3.1. <i>Analisi NMR</i> .....	40
3.1.1. <i>Titolazioni NMR con DMSO</i> .....	40
3.1.2. <i>NMR bidimensionale</i> .....	47
3.2. <i>Spettrofotometria di assorbimento IR</i> .....	62
3.2.1. <i>Peptidi modello in elica 3<sub>10</sub></i> .....	65
3.2.2. <i>Peptidi modello in conformazione completamente estesa</i> .....	67
3.2.3. <i>PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (in CDCl<sub>3</sub>)</i> .....	71
3.2.4. <i>PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu (in CDCl<sub>3</sub>)</i> .....	75
3.2.5. <i>Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (in CDCl<sub>3</sub>)</i> .....	78
3.2.6 <i>Studio dell'effetto del solvente</i> .....	79

---

3.3. Spettroscopia UV-Visibile.....	82
3.3.1. Fluorescenza statica.....	83
3.3.2 Fluorescenza risolta nel tempo.....	88
3.4. Diffrazione dei raggi X.....	96
4. CONCLUSIONI.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	103

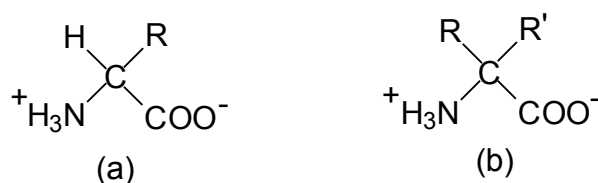
**ABBREVIAZIONI**

(Ac) <sub>2</sub> O	= anidride acetica
AcOEt	= acetato di etile
Aib	= acido $\alpha$ -amminoisobutirrico
DEA	= dietilammina
Deg	= dietilglicina
DIEA	= <i>N,N</i> , diisopropiletilammina
DMSO	= dimetilsolfossido
EDC	= <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide
EP	= etere di petrolio
EtOH	= etanolo
Et <sub>2</sub> O	= etere dietilico
Fmoc	= <i>N</i> -fluorenil-9-metilossicarbonilossi
FT-IR	= spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
HATU	= <i>O</i> -(7-azabenzotriazolil-1)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HOAt	= 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
IR	= infrarosso
MeOH	= metanolo
NMR	= risonanza magnetica nucleare
OMe	= metossi
<i>Ot</i> Bu	= <i>tert</i> -butossi
OX	= ossazolone
PyrAc	= 1-pirene acetile
PyrAcOH	= Acido 1-pirenil acetico
p(NO <sub>2</sub> )Bzl	= <i>p</i> -nitrobenzile
R <sub>f</sub>	= fattore di ritenzione
ROESY	= spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
TEA	= trietilammina
TFA	= acido trifluoroacetico
Tfa	= trifluoroacetile

(Tfa) <sub>2</sub> O	= anidride trifluoroacetica
TLC	= cromatografia su strato sottile
TMS-Cl	= clorotrimetilsilano
TOCSY	= spettroscopia di correlazione scalare omonucleare tipo Hartmann-Hahn
Xxx	= amminoacido generico
Z	= benzilossicarbonile o carbobenzossi

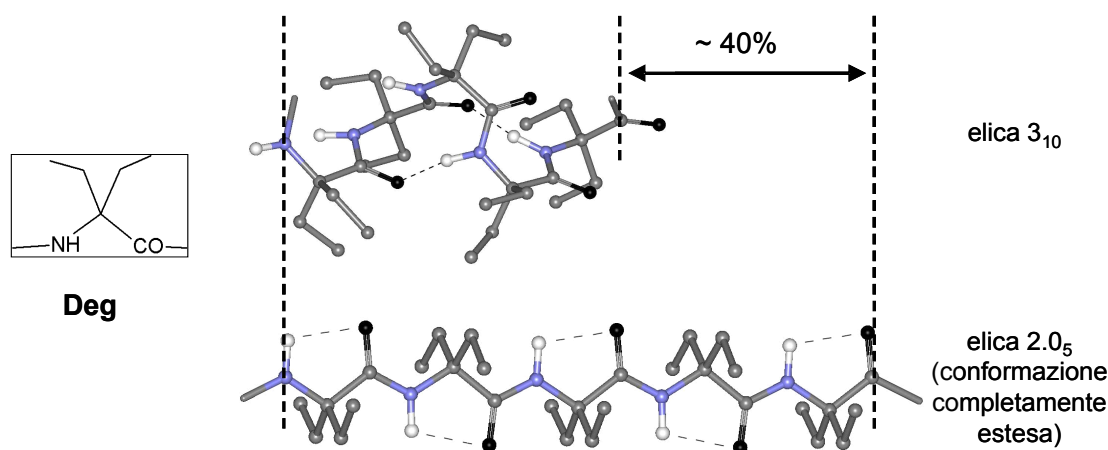
## 1. INTRODUZIONE

Questo lavoro di Tesi si occupa dello studio delle conformazioni assunte da particolari omopeptidi, formati da  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -*tetrasostituiti*. Tali residui sono così denominati perché, a differenza degli  $\alpha$ -amminoacidi proteici ( $C^\alpha$ -*trisostituiti*), hanno l'atomo di carbonio in  $\alpha$  al gruppo acido, di tipo quaternario (Fig. 1.1).



**Figura 1.1.** Formula di struttura di un  $\alpha$ -amminoacido  $C^\alpha$ -tri- (a) ed uno  $C^\alpha$ -*tetrasostituito* (b)

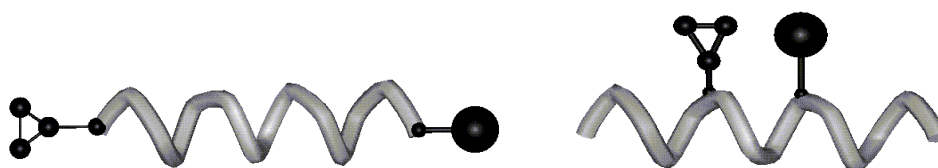
Gli  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -*tetrasostituiti* sono molto più ingombrati dei normali  $\alpha$ -amminoacidi proteici e, di conseguenza, i peptidi che li contengono adottano conformazioni più stabili e rigide<sup>1</sup>. Le strutture secondarie assunte più comunemente sono l' $\alpha$ -elica e l' $3_{10}$ -elica (Fig. 1.2), ma gli omopeptidi di alcuni  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -*tetrasostituiti*, come ad esempio il Deg (Fig. 1.2), possono anche assumere una conformazione completamente estesa (Fig. 1.2).



**Figura 1.2.** Struttura chimica del Deg ( $C^{\alpha,\alpha}$ -dietilglicina) e modelli molecolari del segmento  $-(\text{Deg})_5-$  in conformazione elicoidale  $3_{10}$  e completamente estesa.

Questo tipo di conformazione risulta particolarmente interessante per applicazioni in chimica supramolecolare e bioorganica. Infatti, uno spaziatore<sup>2-5</sup> o un templat<sup>6-8</sup> peptidico in tale conformazione, che ha tra le due estremità la stessa distanza che si ritrova in uno spaziatore peptidico in elica  $3_{10}$ , utilizza circa la metà di residui amminoacidici. Per inciso, si ricorda che si definiscono "spaziatori" (Fig. 1.3) quei sistemi molecolari peptidici le cui estremità, modificate con opportune sonde molecolari, vengono a trovarsi a "distanza" definita e variabile. Sono invece definiti "templati" (Fig. 1.3) quei sistemi molecolari peptidici che consentono di disporre opportuni raggruppamenti chimici, presenti nelle catene laterali, in "orientazione spaziale" e distanza relativa definite e variabili.

Per i nostri scopi sarebbe particolarmente interessante riuscire ad indurre una transizione tra la conformazione completamente estesa e l'elica  $3_{10}$ , entrambe comunemente adottate da residui come il Deg. Infatti, la notevole contrazione (40%) della molecola nel passaggio da una struttura all'altra (Fig. 1.2) potrebbe essere sfruttata per la realizzazione di macchine molecolari.



**Fig. 1.3** Rappresentazione schematica di uno "spaziatore" e di un "templat".

In particolare, il presente lavoro di Tesi si occuperà di investigare la stabilità della conformazione completamente estesa assunta da omopeptidi del Deg in ambienti (solventi) diversi. Pertanto, nelle sezioni introduttive che seguono, saranno riassunte le caratteristiche strutturali dei peptidi contenenti  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti e, in particolare di quelli contenenti il Deg.

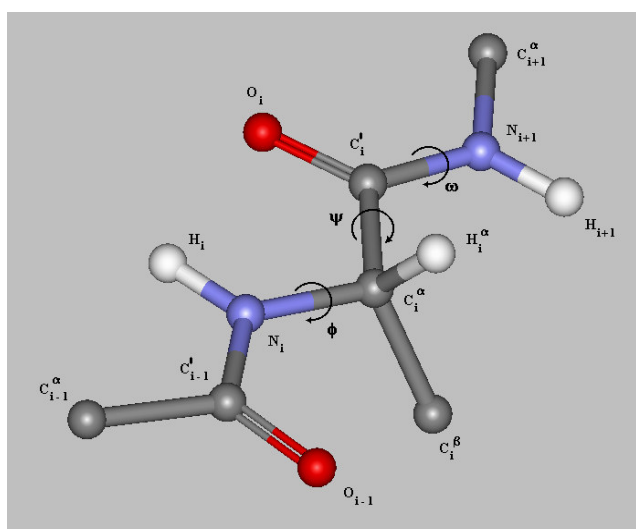
## 1.1 STRUTTURE SECONDARIE DEI PEPTIDI $C^\alpha$ -TETRASOSTITUITI

La conformazione che assume un peptide nello spazio tende a minimizzare l'energia intrinseca della struttura. La stabilizzazione di quest'ultima dipende fortemente dalle interazioni tra gli atomi della molecola, come legami idrogeno e ingombro sterico.

I peptidi naturali tendono ad assumere conformazioni che permettano loro di stabilizzarsi attraverso la formazione di molti legami idrogeno tra il protone ammidico e un ossigeno carbonilico di diversi gruppi ammidici. Attraverso la formazione di questi legami e in considerazione della flessibilità e dell'ingombro delle catene laterali, si formano preferenzialmente strutture a elica e foglietti  $\beta$ .

Gli amminoacidi che sono stati utilizzati in questo lavoro possiedono la peculiare caratteristica di essere afflitti da due catene laterali relativamente ingombranti che rendono il peptide più rigido.

Per descrivere la conformazione di una catena peptidica si utilizza comunemente descrivere gli angoli torsionali dei legami di due unità di amminoacido legate tra loro (Fig. 1.4). In particolare utilizzeremo la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica<sup>9</sup>.

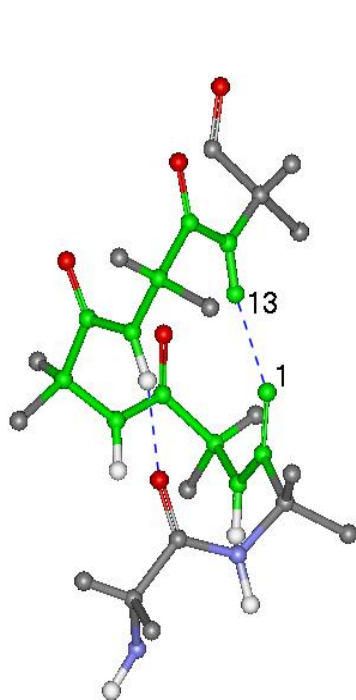
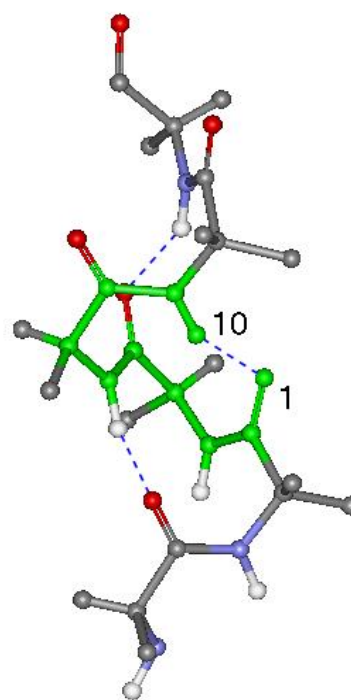
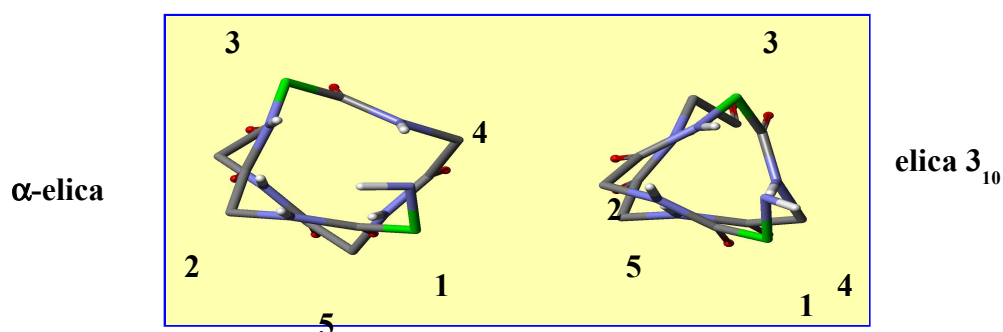


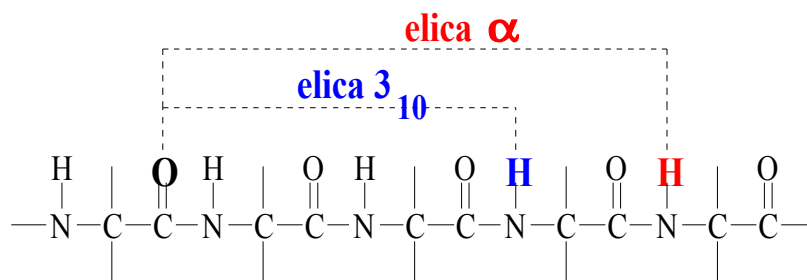
**Figura 1.4** Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ( $\Phi_i = \Psi_i = \omega_i = 180^\circ$ ) e il residuo centrale è in configurazione L.

In natura le principali strutture secondarie riscontrabili sono l'elica  $\alpha$ , le strutture  $\beta$ , i ripiegamenti  $\beta$  e l'elica  $3_{10}$ . Tra queste le più abbondanti sono le due strutture elicoidali<sup>10</sup>. Esse sono distinguibili tra loro per il numero di residui di amminoacidi per giro d'elica, per il passo dell'elica, per la grandezza dei cicli formati dai legami a idrogeno intramolecolari  $C=O \cdots H-N$  e per gli angoli torsionali ( $\phi$  e  $\psi$ ). Le eliche più



note sono l' $\alpha$ -elica e l'elica  $3_{10}$ .<sup>10</sup> L' $\alpha$ -elica (Fig. 1.5a) è caratterizzata da 3.63 residui per giro ed è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo C=O di un residuo in posizione  $i$  e il gruppo N-H in posizione  $i+4$  ( $i \leftarrow i+4$ ) (Fig. 1.6), che formano così cicli di 13 atomi (ripiegamenti  $\alpha$  o strutture  $C_{13}$ ). L'elica  $3_{10}$  (Fig. 1.5b) ha 3.24 residui amminoacidici per giro. È stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo C=O in posizione  $i$  e il gruppo N-H in posizione  $i+3$  ( $i \leftarrow i+3$ ) (Fig. 1.6), che formano così cicli di 10 atomi (ripiegamenti  $\beta$  o strutture  $C_{10}$ ). L'elica  $3_{10}$  risulta più stretta (Fig 1.5c) e allungata rispetto all' $\alpha$ -elica. I parametri che caratterizzano le due strutture sono riportati in Tabella 1.<sup>10</sup>

Fig. 1.5a Elica  $\alpha$  destrogira.Fig. 1.5b Elica  $3_{10}$  destrogira.Fig. 1.5c Proiezioni lungo l'asse dell' $\alpha$ -elica (a sinistra) e dell'elica  $3_{10}$  (a destra).

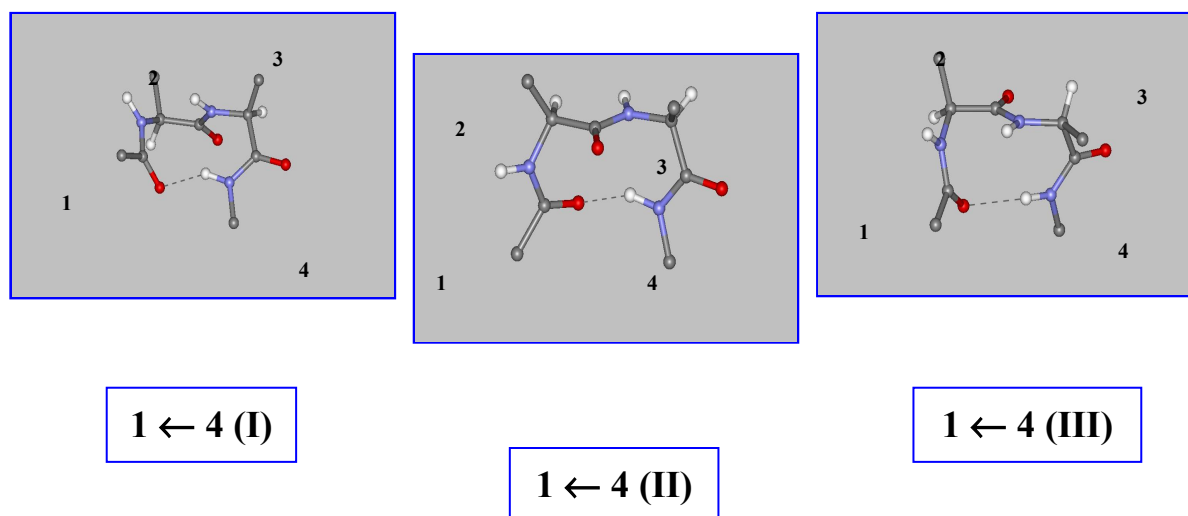


**Fig. 1.6** Legami a idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche ( $\alpha$  e  $3_{10}$ ).

PARAMETRO	ELICA $3_{10}$	ELICA $\alpha$
$\Phi$	$-57^\circ$	$-63^\circ$
$\Psi$	$-30^\circ$	$-42^\circ$
Angolo del legame idrogeno $N \cdots O=C$	$128^\circ$	$156^\circ$
Rotazione per residuo	$111^\circ$	$99^\circ$
Traslazione assiale per residuo	$1.94 \text{ \AA}$	$1.56 \text{ \AA}$
Numero di residui per giro	3.24	3.63
Passo dell'elica	$6.29 \text{ \AA}$	$5.67 \text{ \AA}$

**Tabella 1** Parametri delle eliche destrogire di tipo  $3_{10}$  e  $\alpha$

I ripiegamenti  $\beta^{11-13}$  (Fig. 1.7) sono stati classificati da Venkatachalam<sup>11</sup> nei tipi I, II, III (ripiegamenti destrogiri) e nei corrispondenti enantiomeri I', II', III' a seconda dei valori degli angoli torsionali assunti dai residui  $i+1$  e  $i+2$  compresi entro il legame a idrogeno (Tabella 2). Tali ripiegamenti rivestono una notevole importanza nello studio della struttura secondaria e terziaria delle proteine, ma va anche ricordato che la successione di ripiegamenti- $\beta$  di tipo III o III' genera eliche  $3_{10}$  destrogire o sinistrogire, rispettivamente.

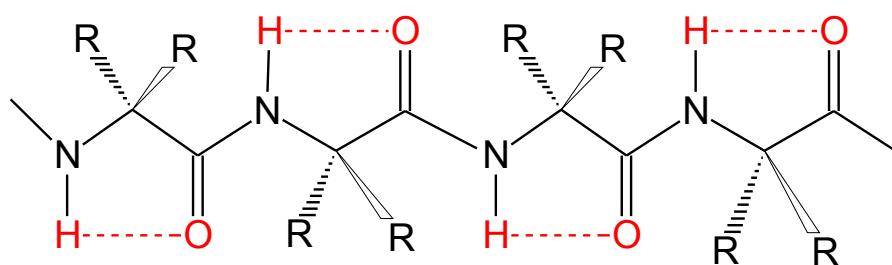


**Fig. 1.7** Rappresentazione dei tre ripiegamenti  $\beta$  ideali (I, II, III) aventi il legame peptidico centrale *trans*.

Ripiegamento $\beta$	$\phi (i+1)$	$\psi (i+1)$	$\phi (i+2)$	$\psi (i+2)$
<b>Tipo I</b>	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$
<b>Tipo II</b>	$-60^\circ$	$+120^\circ$	$+80^\circ$	$0^\circ$
<b>Tipo III</b>	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-60^\circ$	$-30^\circ$

**Tabella 2** Valori degli angoli torsionali per i residui  $i+1$  e  $i+2$  nei ripiegamenti  $\beta$  di tipo I, II e III

La conformazione completamente estesa di cui si analizzerà la stabilità in questo lavoro è piuttosto rara. Essa è caratterizzata da angoli torsionali  $\phi, \psi \cong 180^\circ$ . La sua stabilizzazione passa attraverso la formazione di un legame a idrogeno intramolecolare tra i gruppi N-H e C=O dello stesso residuo, che chiude, così, uno pseudociclo di 5 atomi (per questo motivo detta struttura  $C_5$ ).<sup>12,14-17</sup> Una rappresentazione grafica di tale insolita conformazione (elica  $2.0_5$ ) è riportata in Fig. 1.8.



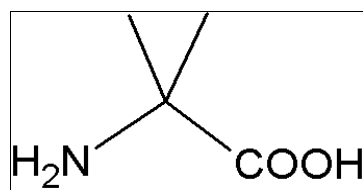
**Figura 1.8.** Rappresentazione schematica di un tetrapeptide in conformazione completamente estesa ( $\phi, \psi \cong 180^\circ$ , struttura  $C_5$ ). I legami ad idrogeno intraresiduo sono indicati da linee tratteggiate.

È interessante notare che nelle conformazioni elicoidali esiste un momento di dipolo in quanto i gruppi  $C=O \cdots H-N$  sono tutti all'incirca paralleli all'asse dell'elica ed hanno lo stesso verso. Nel caso invece della struttura completamente estesa il momento di dipolo è nullo. Infatti, i gruppi  $C=O$  ed  $N-H$  sono disposti ortogonalmente all'asse dell'elica  $2.0_5$  (Fig. 1.10) e i loro momenti di dipolo puntano alternativamente in direzioni opposte.

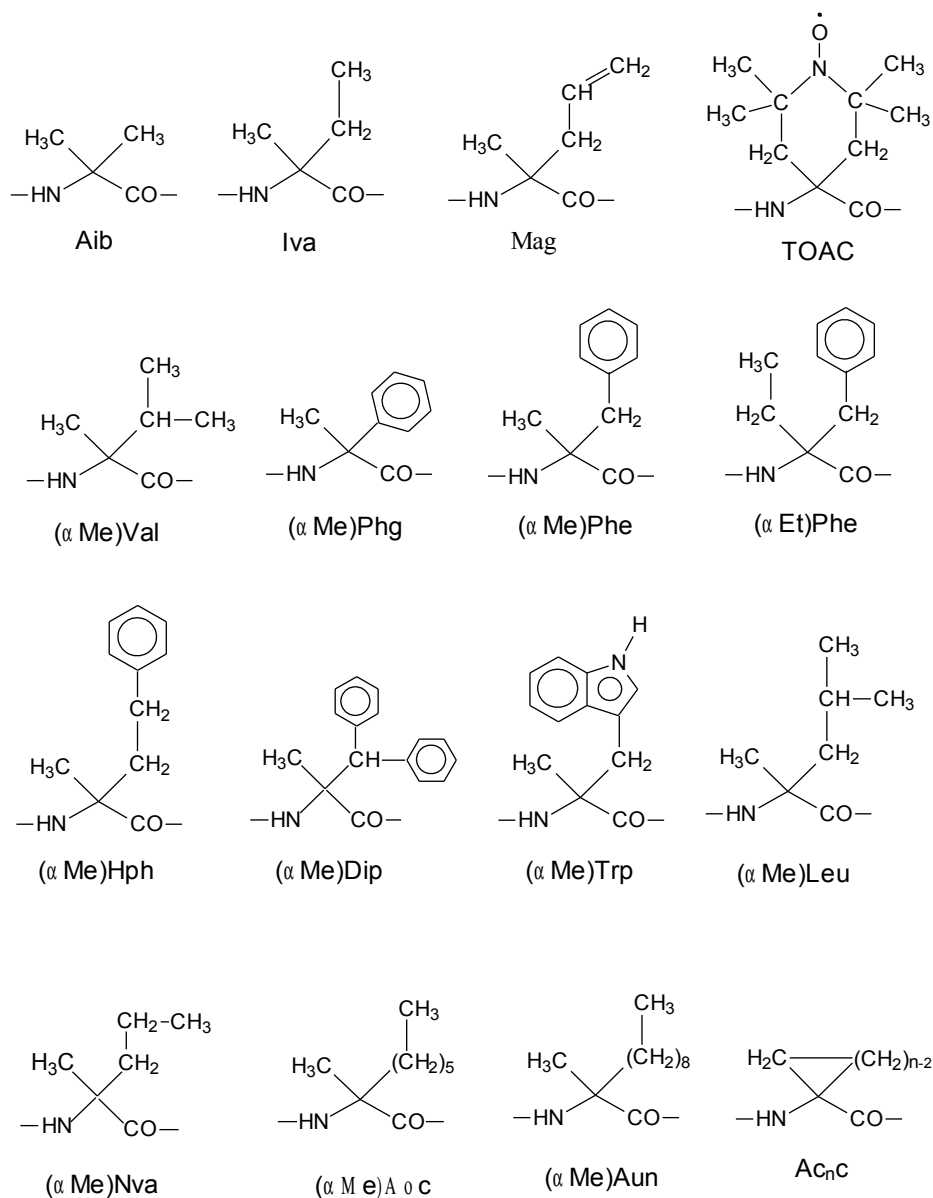
## 1.2 GLI OMOPEPTIDI DEL Deg E LA LORO CONFORMAZIONE

Abbiamo già detto come gli omopeptidi degli  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti possiedano una conformazione più rigida e stabile rispetto agli  $\alpha$ -amminoacidi proteici ( $C^\alpha$ -trisostituiti).

Calcoli di energia conformazionale<sup>18-20</sup> sull'Aib (acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico, Fig 1.9), il più semplice  $\alpha$ -amminoacido  $C^\alpha$ -tetrasostituito, hanno evidenziato come la presenza di due gruppi metilici sul  $C^\alpha$  imponga una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile, che risulta essenzialmente confinato alla regione delle strutture elicoidali di tipo  $\alpha$  e di tipo  $3_{10}$ . Poiché il residuo di Aib è achirale le eliche destrogire e sinistrogire dei suoi omopeptidi sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. Le indagini conformazionali in soluzione (mediante assorbimento IR e spettrometria  $^1H$  NMR) e allo stato cristallino (diffrazione dei raggi X) indicano che la conformazione elicoidale di tipo  $3_{10}$  è quella preferita dagli omopeptidi dell'Aib.<sup>21-24</sup> La stessa conclusione vale anche per molti  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti chirali (Fig. 1.10).



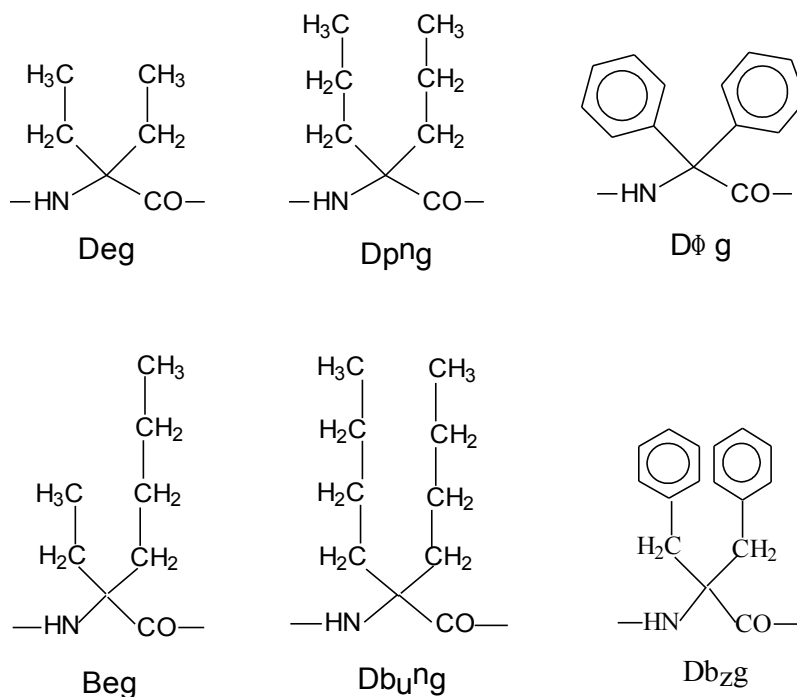
**Figura 1.9** Struttura chimica di un residuo di acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico (Aib).



**Figura 1.10.**  $\alpha$ -Aminoacidi  $\text{C}^\alpha$ -tetrasostituiti promotori di strutture elicoidali.

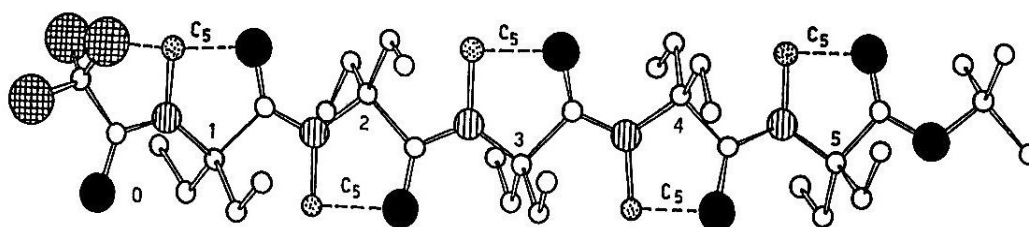
Diversamente da quanto riscontrato per l'Aib e gli  $\alpha$ -amminoacidi di Fig. 1.10, il Deg e gli  $\alpha$ -amminoacidi  $\text{C}^\alpha$ -tetrasostituiti  $\text{Dp}^n\text{g}$ ,  $\text{Db}_u^n\text{g}$ ,  $\text{D}\phi\text{g}$  e  $\text{Db}_z\text{g}$  (Fig. 1.11), aventi

due catene laterali uguali legate al  $C^\alpha$  più lunghe di un gruppo metilico e non ciclizzate tra loro, assumono preferenzialmente la conformazione completamente estesa ( $C_5$ , Fig. 1.8).<sup>1c,14-17,25-27</sup>



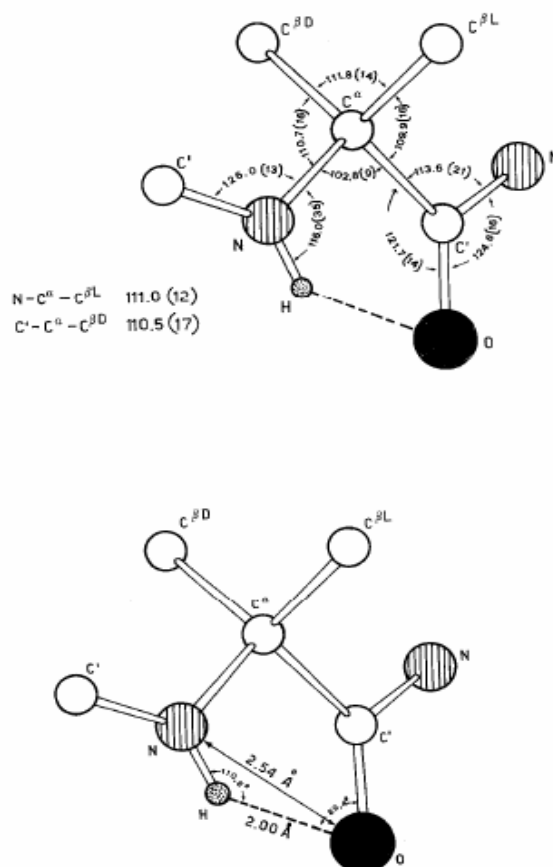
**Figura 1.11.** Formule di struttura di  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti con propensione per la conformazione  $C_5$ .

Negli omopeptidi degli amminoacidi Deg e  $Dp^n g$  sono state osservate per la prima volta strutture  $C_5$  consecutive (elica  $2.0_5$ ) allo stato cristallino. Un esempio significativo di questa insolita conformazione estesa è riportato in Fig. 1.12.<sup>15</sup>



**Figura 1.12.** Struttura ai raggi X di Tfa-(Deg)<sub>5</sub>-OtBu. I legami a idrogeno intramolecolari sono indicati da linee tratteggiate.

L'esame di numerose strutture ai raggi X di omopeptidi e peptidi modello contenenti Deg, Dp<sup>n</sup>g e Db<sub>u</sub><sup>n</sup>g nella conformazione completamente estesa ha permesso di ricavare i valori medi che caratterizzano la conformazione C<sub>5</sub> (Fig. 1.13).<sup>1c</sup>



**Figura 1.13.** Valori medi dei parametri che caratterizzano la conformazione C<sub>5</sub>.

In particolare, si è potuto stabilire che:<sup>1c</sup>

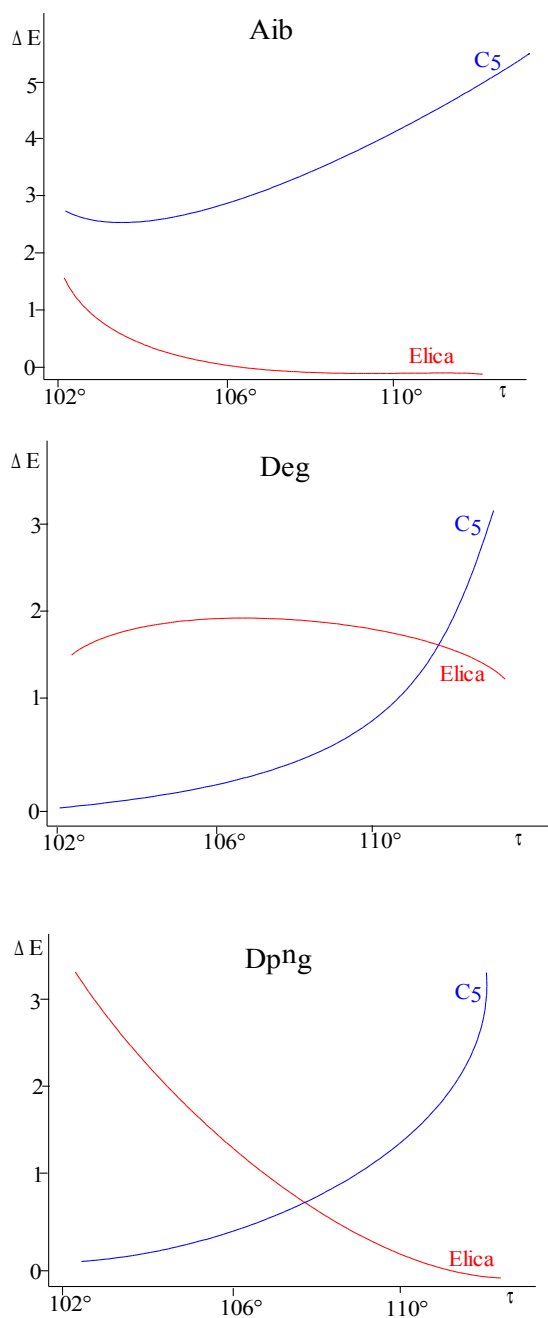
- i gruppi N-H e C=O che caratterizzano la struttura pentagonale C<sub>5</sub> non sono coinvolti in legami ad idrogeno *intermolecolari*;
- le catene laterali di Deg, Dp<sup>n</sup>g e Db<sub>u</sub><sup>n</sup>g sono anch'esse completamente estese per minimizzare interazioni molecolari sfavorevoli tra catene laterali e con la catena peptidica;
- la distanza intramolecolare N···O è corta (2.54 Å);
- l'angolo di legame N-C<sup>α</sup>-C' (τ) è normalmente compreso tra 102° e 105°, valore nettamente inferiore al tetraedrico.

Per quanto riguarda l'angolo  $\tau$ , è da notare che il suo valore medio nelle strutture ai raggi X dell'Aib è  $111^\circ$ , prossimo al tetraedrico.

Sono stati effettuati calcoli di energia conformazionale sui composti modello Ac- $X_{xx}$ -NHMe ( $X_{xx} = \text{Aib, Deg, Dp}^n\text{g}$ ), introducendo l'angolo di legame  $\tau$  tra le variabili.<sup>29</sup> Nel caso dell'Aib la conformazione elicoidale risulta più stabile di quella estesa nell'intero intervallo di  $\tau$  considerato (corrispondente a quello osservato in peptidi mediante diffrazione ai raggi X), sebbene la differenza di energia tra le due conformazioni diminuisca al diminuire di  $\tau$  (Fig. 1.14). Per Deg e  $\text{Dp}^n\text{g}$ , invece, l'ordine di stabilità delle conformazioni elicoidale ed estesa dipende da  $\tau$ , risultando favorita quella estesa per  $\tau < 108^\circ$ . E' pertanto ragionevole ritenere che la diversa preferenza conformazionale di Deg,  $\text{Dp}^n\text{g}$ ,  $\text{Db}_u^n\text{g}$ ,  $\text{D}^u\text{g}$  e  $\text{Db}_z\text{g}$  rispetto all'Aib sia imputabile alla repulsione sterica tra le due ingombranti catene laterali. Tale repulsione diminuisce comprimendo l'angolo di legame N- $\text{C}^\alpha$ -C' fino a  $102\text{-}103^\circ$  e allo stesso tempo favorisce la formazione del legame a idrogeno intraresiduo che caratterizza la conformazione completamente estesa.

La rilevanza ai fini conformazionali della geometria attorno al  $\text{C}^\alpha$ , ed in particolare dell'angolo di legame  $\tau$ , emerge anche dagli studi condotti sulle preferenze conformazionali degli acidi 1-amminocicloalcan-1-carbossilici. In questi amminoacidi, infatti, l'angolo di legame  $\tau$  è correlato all'angolo di legame endociclico al  $\text{C}^\alpha$  ( $\text{C}^{\beta 1}\text{-C}^\alpha\text{-C}^{\beta 2}$ ), che a sua volta dipende dal numero di atomi di carbonio dell'anello alifatico. Ad esempio, per Ac<sub>5</sub>c (stesse catene laterali del Deg, ma chiuse in un ciclo) l'angolo di legame interno all'anello è prossimo al tetraedrico e pertanto anche  $\tau$  non si discosta significativamente da tale valore. Si è infatti trovato che Ac<sub>5</sub>c preferisce assumere conformazioni elicoidali di tipo  $\alpha$  o  $3_{10}$ , piuttosto che completamente estese ( $\text{C}_5$ ).<sup>1c</sup>





**Figura 1.14** Andamento dell'energia in residui di Aib, Deg e Dp<sup>ng</sup> in funzione dell'angolo  $\tau$  (N- C <sup>$\alpha$</sup> -C') per strutture elicoidali (Elica) e completamente estese (C<sub>5</sub>).

È però da notare che mentre per Deg e Dpg le catene laterali possono assumere una disposizione "tutto *trans*", questo ovviamente non è possibile nel caso di un ciclo alifatico.

Tuttavia, non in tutti i casi si può prevedere quale conformazione sarà assunta da un peptide contenente  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti. Per alcuni di essi, infatti, la preferenza per la struttura ripiegata o per la completamente estesa non sembra essere così ben definita. È stato osservato sperimentalmente che la sostituzione del residuo centrale di Deg nella sequenza omo-peptidica  $-(\text{Deg})_5-$  con l'amminoacido  $C^\alpha$ -trisostituito Abu (acido 2-amminobutirrico), che perturba l'allineamento regolare delle catene laterali, è sufficiente a provocare il ripiegamento del peptide in elica  $3_{10}$ .<sup>28</sup>

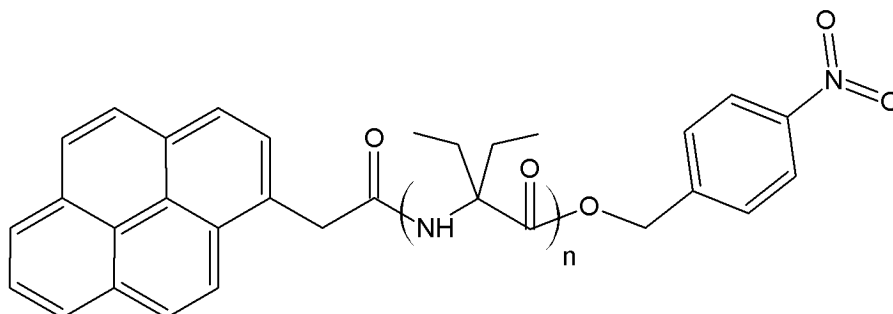
Infine, va ricordato che per molto tempo si è ritenuto che solo peptidi basati su glicine disostituite al  $C^\alpha$  con catene laterali uguali (e quindi achirali) potessero formare strutture completamente estese di una certa lunghezza. Infatti, i pochi esempi di strutture  $C_5$  coinvolgenti amminoacidi chirali  $[(\alpha\text{Me})\text{Leu}, (\alpha\text{Me})\text{Dip}$  e  $(\alpha\text{Me})\text{Phg}]^{1c,29}$  erano limitati a derivati di amminoacidi o a peptidi corti. Tuttavia, recenti studi conformazionali condotti sulle sequenze omo-peptidiche  $-(\text{S})\text{-Beg}]_n-$  (Beg,  $C^\alpha$ -butil-etilglicina;  $n = 0-6$ )<sup>27</sup> e  $-(\text{S})\text{-(}\alpha\text{Et)Ahe}]_n-$   $[(\alpha\text{Et})\text{Ahe}$ , acido  $\alpha$ -ammino eptanoico o  $C^\alpha$ -pentil-etilglicina;  $n = 0-5$ ]<sup>32</sup> hanno riaperto la questione. Emerge infatti che le sequenze  $-(\text{S})\text{-Beg}]_n-$  e  $-(\text{S})\text{-(}\alpha\text{Et)Ahe}]_n-$  assumono conformazioni completamente estese (planari) allo stato cristallino e, molto probabilmente, anche in soluzione.

### 1.3 SCOPO DI QUESTO LAVORO DI TESI

Questo lavoro punta principalmente a valutare la stabilità della struttura  $C_5$  assunta dagli omopeptidi del Deg e l'influenza che su di essa possono avere solventi diversi. Per poter valutare l'effettiva struttura secondaria utilizzeremo delle sonde molecolari che interagiscono tra loro in maniera differente a seconda della distanza che le separa. Legando queste sonde ai due estremi di un omopeptide Deg, possiamo riconoscere la diversa conformazione nello specifico solvente in quanto una conformazione completamente estesa spazia le due estremità del peptide di circa il 40% in più rispetto ad una conformazione ad elica.

In particolare la scelta delle sonde è ricaduta su una coppia di molecole la cui interazione può essere facilmente studiata mediante fluorescenza UV. All'estremità N

terminale del peptide abbiamo collocato una unità di pirene (1-pirenil acetica), mentre all'estremità C terminale si è posto un gruppo *p*-nitrobenzilico (Fig. 1.15).



**Figura 1.15:** struttura chimica della serie omopeptidica sintetizzata e studiata in questo lavoro di Tesi.

Si sfrutta quindi l'azione di *quencher* del gruppo *p*-nitrobenzilico nei confronti del pirene<sup>30,31</sup>. Per valutare le distanze tra le due sonde, si procederà ad eseguire misure di fluorescenza statica e risolta nel tempo. Entrambi i metodi permettono di valutare le distanze che separano il pirene dal *quencher* attraverso la valutazione delle efficienze di *quenching*. Il metodo risolto nel tempo misura il decadimento radiativo dopo un impulso di eccitazione e l'interpolazione dei dati ottenuti permette di fare alcune considerazioni sulle conformazioni presenti in soluzione.

Anche altri metodi di analisi saranno impiegati per valutare le strutture secondarie. Utilizzando la risonanza magnetica nucleare, in particolare attraverso esperimenti 2D di correlazione spaziale e scalare, è possibile assegnare i vari segnali ai diversi atomi e valutare le correlazioni esistenti tra questi. Una struttura elicoidale avrà correlazioni spaziali tra gli atomi diverse di quelle riscontrabili per una struttura completamente estesa. Pertanto, si cercherà di individuare dei parametri che ci permettano di assegnare la struttura assunta dal peptide. La difficoltà maggiore è costituita dalla forte sovrapposizione dei segnali in quanto si analizza un omopeptide di un aminoacido con due catene laterali identiche.

Si sfrutterà anche la spettroscopia di assorbimento IR analizzando le frequenze vibrazionali dei legami N-H e C=O ammidici. Essi infatti risentono della diversa conformazione in quanto, in una struttura C<sub>5</sub>, tutti gli N-H sono impegnati in legami

idrogeno intramolecolari, cosa che non accade per alcuni N-H N-terminali di un'elica. Inoltre, la diversa forza dei legami idrogeno nelle due conformazioni dovrebbe ripercuotersi su posizione e intensità degli assorbimenti ammidici nello spettro IR<sup>32</sup>.

Val la pena di ricordare brevemente che il pirene è un cromoforo che offre ampie possibilità. Ne sono testimonianza i numerosi lavori, nella letteratura recente, in cui si sfruttano le proprietà di tale sistema aromatico policiclico. Alcune applicazioni sono di seguito elencate:

- la presenza di eccimeri negli spettri di fluorescenza è stata sfruttata come metodo per verificare la formazione di aggregati di due o più eliche peptidiche contenenti residui di Pya (L-1-pirenil alanina);<sup>33</sup>
- in molti sistemi donatore-spaziatore-accettore il pirene è stato usato come donatore<sup>34</sup> o accettore<sup>35</sup> in trasferimenti elettronici;
- è stata riportata la possibilità di utilizzare la fluorescenza del pirene come sonda per misurare la temperatura in solventi organici<sup>37</sup> e per studiare la conformazione della poliglutammina;<sup>38</sup>
- tramite assorbimento UV-VIS è stata evidenziata la reversibilità termica di un processo di auto-assemblaggio di particelle d'oro;<sup>39</sup>
- misure di elettrochemiluminescenza in sistemi peptidici contenenti pirene e fenotiazina hanno permesso di ricavare informazioni conformazionali in peptidi ripiegati "a forcina di capelli";<sup>40</sup>
- l'acido pirenilbutirrico ancorato all'N-terminale di un residuo di fenilalanina è stato usato come "forbice chirale" per scindere in maniera selettiva alcuni legami ammidici in proteine;<sup>41</sup>
- sono state studiate le caratteristiche spettrali di cromofori pirenici inseriti in varie matrici polimeriche sintetiche;<sup>42</sup>
- la possibilità di avere  $\pi$ -stacking tra più unità pireniche è stata utilizzata per realizzare strutture molecolari che agiscono come gelificanti di solventi organici.<sup>43,44</sup>

## 2 PARTE SPERIMENTALE

### 2.1 Materiali e metodi

#### 2.1.1 Reagenti e solventi

*Acros Organics* (Geel, Belgio):

HCl-Deg, N-(benzilossicarbonilossi)-succinimide, cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato, *N,N*-diisopropiletilammina metanolo per spettroscopia, *N*-etil-*N'*-(3-dimetilammino)propil-carbodiimide cloridrato, anidride acetica, 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo.

*Aldrich Chem. Co.* (Winsconsin, USA):

acido 1-pirenilacetico, iodio, anidride trifluoroacetica, sodio boroidruo.

*Alphagaz* (Liscate, Milano):

*iso*-butene.

*Artiglass* (Due Carrare, Padova):

idrossido di potassio.

*Carlo Erba* (Milano):

acetato di etile, acetone, acido acetico glaciale, acido formico, acido solforico 98%, bicarbonato di sodio, bisolfato di potassio, 1-butanolo, cloroformio, cloruro di metilene, etanolo, metanolo, etere etilico, etere di petrolio (30-50 °C), idrossido di sodio, ipoclorito di sodio, metanolo, solfato di sodio anidro, trietilammina.

*Fluka* (Buchs, Svizzera):

acido trifluoroacetico, acetonitrile, benzilcloroformiato, catalizzatore 10%Pd/C, clorotrimetilsilano, dietilammina, *N*-metilmorfolina, ninidrina, 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, 3-pentanone.

*GL Biochem* (Shanghai):

O-(7-azabenzotriazolil-1)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato.

*J.T. Baker* (Olanda)

idrossido d'ammonio 28-30%.

*Merck* (Darmstadt, Germania):

gel di silice per cromatografia "flash".

*Prolabo* (Parigi, Francia):

acido cloridrico 37%, cloruro di sodio.

### 2.1.2. Strumentazione e metodi

#### **Cromatografia su strato sottile**

Le reazioni sono state seguite tramite cromatografia su strato sottile utilizzando lastre di gel di silice 60 F<sub>254</sub> (Merck). I fattori di ritenzione sono stati determinati utilizzando tre diverse miscele di solventi come eluenti:

CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH 9:1	Rf <sub>1</sub>
1-butanol/AcOH/H <sub>2</sub> O 3:1:1	Rf <sub>2</sub>
Toluene/EtOH 7:1	Rf <sub>3</sub>

Per la rivelazione dei prodotti sono stati utilizzati una lampada UV per evidenziare i composti contenenti gruppi aromatici, l'esposizione ai vapori di iodio e la reazione ipoclorito - reattivo al TDM<sup>48</sup> per rivelare composti contenenti gruppi ammidici e l'ossidazione con permanganato.

#### **Punti di fusione**

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Leitz modello Laborlux 12 munito di tavolino riscaldante.

#### **Flash cromatografia**

La "cromatografia flash" è stata effettuata usando come fase stazionaria il gel di silice 60 Merck (granulometria 40-63 µm).

#### **Fluorescenza**

Le misure di fluorescenza statica e risolta nel tempo dei peptidi contenenti le coppie PyrAc/ -O(NO<sub>2</sub>)Benz, sono state eseguite dal gruppo del Prof. Mariano Venanzi

(Università di Roma "Tor Vergata"). Le misure di fluorescenza statica sono state eseguite usando uno spettrofluorimetro Spex Fluoromax-2 (Edison Nj) operante in modalità SPC (single photon counting).

Per le misurazioni di decadimento è stato utilizzato uno spettrofluorimetro CD900 (Edinburgh Instruments) operante in modalità SPC.

### **Spettrometria di massa**

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro di massa a tempo di volo, *time of flight* (Mariner modello ESI-TOF, Perseptive Biosystems), usando come tecnica di ionizzazione l'ESI. Gli ioni positivi o negativi formati sono stati accelerati a 10, 15, 20 o 30 keV e analizzati in modo lineare.

### **Spettroscopia di assorbimento IR**

Gli spettri di assorbimento FT-IR sono stati raccolti con uno spettrofotometro FT-IR Perkin-Elmer modello 1720 X interfacciato a un "personal computer" IBM PS/2 modello 50 Z. Per le elaborazioni spettrali (sottrazione del solvente e derivatizzazione) è stato utilizzato il "software" SpectraCalc della Galactic (Salem, USA).

Gli spettri di assorbimento FT-IR in soluzione di deuterocloroformio sono stati effettuati utilizzando celle (Perkin-Elmer) con cammino ottico di 0.01, 0.1 e 1 cm e finestre di CaF<sub>2</sub>.

### **Spettrometria NMR**

Gli spettri <sup>1</sup>H NMR sono stati registrati con gli spettrometri Bruker modelli AC 200, e 400. Gli spostamenti chimici sono espressi in parti per milione ( $\delta$ ) rispetto al segnale del tetrametilsilano. Le molteplicità dei picchi sono espresse come s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), qd (quartetto di doppietti), m (multipletto), mentre b ("broad") indica un segnale allargato.

## 2.2 Sintesi e caratterizzazione

### 2.2.1 Sintesi dei derivati degli amminoacidi

#### **Tfa-Deg-OH**<sup>27b,50</sup>

A 0°C, si scioglie H-Deg-OH (8.00 g, 61.00 mmoli) in (Tfa)<sub>2</sub>O (≈25 ml). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 5 giorni. Si neutralizza la soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> e si estrae 2 volte con Et<sub>2</sub>O per togliere l'anidride che non ha reagito. Si porta il pH della fase acquosa a 2 con HCl 2N e si estrae 3 volte con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Si anidrifica la fase organica su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, si filtra e si tira a secco.

**Resa:** 86%.

**Punto di fusione:** 115-117 °C (da Et<sub>2</sub>O/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.50; **Rf<sub>2</sub>:** 0.90; **Rf<sub>3</sub>:** 0.40.

**IR (film):** 3364, 1716, 1615, 1529 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** δ 9.22 (s, 1H, COOH); 7.25 (s, 1H, NH); 2.51 (qd, 2H, β-CH<sub>2</sub>); 2.00 (qd, 2H, β-CH<sub>2</sub>); 0.84 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub>).

#### **Z-Deg-OH**<sup>52</sup>

Ad una soluzione di H-Deg-OH (5.03 g, 38.17 mmoli) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro si aggiungono, sotto flusso di N<sub>2</sub>, TMS-Cl (9.65 ml, 76.33 mmoli) e DIEA (12.62 ml, 76.33 mmoli, fino pH 8). Si toglie il flusso di N<sub>2</sub> e si mette a riflusso per 12 ore. Si raffredda la soluzione a 0°C e si aggiunge Z-Cl (5.45 ml, 38.166 mmoli). Si lascia agitare a 0°C per 1 ora e a temperatura ambiente per un giorno. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende con una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> al 5%. Si estrae 2 volte con Et<sub>2</sub>O lo Z-Cl che non ha reagito e si acidifica la fase acquosa fino a pH 2 con HCl 2N. Si estrae il prodotto con AcOEt, si anidrifica su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, si filtra e si tira a secco.

**Resa:** 71%.

**Punto di fusione:** 91-93 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.65; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.40.

**IR (film):** manca l'NH a circa 3300, 1716, 1685, 1512 cm<sup>-1</sup>.



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  7.36 (s, 5H, Z fenile CH); 5.71 (s, 1H, NH); 5.09 (s, 2H, Z  $\text{CH}_2$ ); 2.34 (qd, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.85 (qd, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 0.83 (t, 6H, 2  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ ).

### **Z-Deg-OtBu**<sup>51</sup>

In una bottiglia di vetro a tenuta di pressione si scioglie Z-Deg-OH (7.15 g, 26.94 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro (81 ml). Si mette la bottiglia in un bagno di acetone e, mediante l'aggiunta di ghiaccio secco, si porta la temperatura a  $-60^\circ\text{C}$ . Dopo aver gorgogliato isobutene (31 ml) nella bottiglia, si aggiunge  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.27 ml). Si tappa e si lascia a temperatura ambiente per una settimana. A fine reazione si raffredda a  $-60^\circ\text{C}$ , si versa la miscela di reazione in una soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  al 5% (250 ml) e si lascia evaporare spontaneamente l'isobutene per qualche ora sotto agitazione. Si separa la fase organica da quella acquosa e si lava quest'ultima 2 volte con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Le fasi organiche vengono riunite ed evaporate a secchezza. Si riprende il residuo con AcOEt e si lava con  $\text{KHSO}_4$  al 5%,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  al 5% e  $\text{H}_2\text{O}$ . Si anidrifca su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , si filtra e si tira a secco.

**Resa:** 92%.

**Punto di fusione:**  $40\text{-}41^\circ\text{C}$ .

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.90.

**IR** (film): 3420, 1732, 1717  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  7.34 (s, 5H, Z fenile CH); 5.89 (s, 1H, NH); 5.07 (s, 2H, Z  $\text{CH}_2$ ); 2.31 (qd, , 2H, 1  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.73 (qd, , 2H, 1  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.46 (s, 9H, OtBu 3  $\text{CH}_3$ ); 0.76 (t, 6H, 2  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ ).

### **2.2.2 Sintesi dei peptidi Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu (n= 2-5)**

#### **Tfa-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu**<sup>50,54</sup>

Si pone Z-Deg-OtBu (7.93 g, 24.7 mmol) in diclorometano anidro e si aggiunge un 30% in peso di carbone palladiato al 5% (0,24 g). Si lascia a reagire sotto flusso di idrogeno per un giorno fino a completa rimozione del gruppo Z. Si filtra il catalizzatore su celite e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone Tfa-Deg-OH (27.17 mmol, 6.17 g) e EDC (29.64 mmol, 5.68 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora per formare l'ossazolone. A questa soluzione si aggiunge il H-Deg-OtBu preparato precedentemente e si lascia a riflusso per 3 giorni. Si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica viene anidrificata, filtrata e tirata a secco.

**Resa:** 65%.

**Punto di fusione:** 110-112 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.90.

**IR** (KBr): 3360, 3295, 1735, 1710, 1663, 1524 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 7.98 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 6.87 (s, 1H, NH<sup>2</sup>), 2.65 (qd, 2H, 1 β-CH<sub>2</sub>), 2.46 (qd, 2H, 1 β-CH<sub>2</sub>), 1.83-1.69 (m, 4H, 2 β-CH<sub>2</sub>), 1.50 (s, 9H, OtBu 3 CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub>), 0.76 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub>)

#### **Tfa-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu**<sup>50,54</sup>

Si pone Tfa-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu (5.21g, 13.15 mmol) in etanolo, si aggiunge NaBH<sub>4</sub> (157.8 mmol, 5.97g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo, si riprende con acqua e si estrae con etere etilico. Si anidrifica l'etere, si filtra e si tira a secco. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone Tfa-Deg-OH (13.15 mmol, 2.99 g) e EDC (15.78 mmol, 3.03 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora per formare l'ossazolone. A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a riflusso per 3 giorni. Si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica viene anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e tirata a secco. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash usando come eluente una miscela di Etere di petrolio/AcOEt (9:1).

**Resa:** 32%.

**Punto di fusione:** 155-157 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.85.

**IR** (KBr): 3393, 3360, 1730, 1664 cm<sup>-1</sup>.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.00 (s, 1H,  $\text{NH}^1$ ); 7.42 (s, 1H,  $\text{NH}^2$ ); 6.86 (s, 1H,  $\text{NH}^3$ ); 2.64 (m, 4H, 1  $\beta\text{-CH}_2^1$  e 1  $\beta\text{-CH}_2^2$ ); 2.43 (qd, 2H, 1  $\beta\text{-CH}_2^3$ ); 1.77 (m, 4H, 1  $\beta\text{-CH}_2^1$  e 1  $\beta\text{-CH}_2^2$ ); 1.73 (qd, 2H, 1  $\beta\text{-CH}_2^3$ ); 1.50 (s, 9H, *Ot*Bu 3  $\text{CH}_3$ ); 0.83 (t, 6H, 2  $\gamma\text{-CH}_3^1$ ); 0.77 (t, 12H, 2  $\gamma\text{-CH}_3^2$  e 2  $\gamma\text{-CH}_3^3$ ).

#### **Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-*Ot*Bu**<sup>50,54</sup>

Si pone Tfa-(Deg)<sub>3</sub>-*Ot*Bu (1.637g, 3.212 mmol) in etanolo, si aggiunge  $\text{NaBH}_4$  (38.54 mmol, 1.46g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo e si riprende con acqua e si estrae con etere etilico. Si anidrifica l'etere, si filtra e si tira a secco. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone Tfa-Deg-OH (3.85 mmol, 0.876 g) e EDC (3.85 mmol, 0.739 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora per formare l'ossazolone. A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>3</sub>-*Ot*Bu preparato precedentemente e si lascia a riflusso per 3 giorni. Si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di  $\text{KHSO}_4$  5% e  $\text{NaHCO}_3$  5%. La fase organica viene anidrificata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrata e tirata a secco. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash usando come eluente una miscela di Etere di petrolio/AcOEt (7:3).

**Resa:** 44%.

**Punto di fusione:** 219-220 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.85.

**IR** (KBr): 3391, 3352, 1735, 1717, 1677, 1659  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.01 (s, 1H,  $\text{NH}^1$ ); 7.44 (s, 1H,  $\text{NH}^2$ ); 7.41 (s, 1H,  $\text{NH}^3$ ); 6.86 (s, 1H,  $\text{NH}^4$ ); 2.67-2.60 (m, 6H, 1  $\beta\text{-CH}_2^1$ , 1  $\beta\text{-CH}_2^2$ , 1  $\beta\text{-CH}_2^3$ ); 2.44 (qd, 2H, 1  $\beta\text{-CH}_2^4$ ); 1.78-1.69 (m, 8H, 1  $\beta\text{-CH}_2^1$ , 1  $\beta\text{-CH}_2^2$ , 1  $\beta\text{-CH}_2^3$  e 1  $\beta\text{-CH}_2^4$ ); 1.50 (s, 9H, *Ot*Bu 3  $\text{CH}_3$ ); 0.86-0.76 (m, 18H, 24  $\gamma\text{-CH}_3$ ).

#### **Tfa-(Deg)<sub>5</sub>-*Ot*Bu**<sup>50,54</sup>

Si pone Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-*Ot*Bu (0.750g, 1.20 mmol) in etanolo, si aggiunge  $\text{NaBH}_4$  (14.40 mmol, 0.55g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo e si riprende con acqua e si estrae con

diclorometano. Si anidrifica la fase organica, la si filtra e evapora a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone Tfa-Deg-OH (1.80 mmol, 0.408 g) e EDC (1.80 mmol, 0.165 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora per formare l'ossazolone. A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a riflusso fino a completezza della reazione. Si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica viene anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e tirata a secco. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash usando come eluente una miscela di Etere di petrolio/AcOEt (5:5).

**Resa:** 26.5%.

**Punto di fusione:** 232-233 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.75.

**IR** (KBr): 3392, 3352, 1733, 1717, 1677, 1657 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.02, 7.46, 7.42, 7.40 e 6.86 (5s, 5H, 5 NH) 2.82-2.61 (m, 8H, 4 β-CH<sub>2</sub>); 2.44 (qd, 2H, 1 β-CH<sub>2</sub>); 1.75-1.67 (m, 10H, 5 β-CH<sub>2</sub>); 1.50 (s, 9H, OtBu 3 CH<sub>3</sub>); 0.87-0.73 (m, 30H, 10 γ-CH<sub>3</sub>).

### 2.2.3 Sintesi dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Benz (n= 1-5)

#### PyrAc-Deg-OtBu

Si pone Z-Deg-OtBu (0.295 g, 1.112 mmol) in diclorometano anidro e si aggiunge un 30% in peso di carbone palladiato al 5%. Si lascia reagire sotto flusso di idrogeno per un giorno fino a completa rimozione del gruppo Z. Si filtra il catalizzatore su celite e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone Pyr-AcOH (0.7 mmol, 0.183 g), HOAt (0.7 mmol, 0.095 g) e EDC (0.7 mmol, 0.134 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora. A questa soluzione si aggiunge il H-Deg-OtBu preparato precedentemente e si lascia a reagire a riflusso per 1.5 giorni. Si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica viene anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e tirata a secco. Si purifica il prodotto mediante

cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di etere di petrolio/ acetato di etile (8/2).

**Resa:** 18%.

**<sup>1</sup>H NMR:** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 8.56 (d, 1H, Pyr 1 CH); 8.14-7.93 (m, 8H, Pyr 8 CH); 7.13 (s, 1H, NH), 4.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 2.73 (qd, , 2H, 1 β-CH<sub>2</sub>), 1.90 (qd, 2H, 1 β-CH<sub>2</sub>), 1.28 (s, 9H, OtBu 3 CH<sub>3</sub>), 0.79 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-Deg-OH**

A 0°C si scioglie PyrAc-Deg-OtBu (0.086 g, 0.20 mmoli) in una soluzione 6:4 di TFA: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 30 minuti. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con Et<sub>2</sub>O per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato su gooch ed essiccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e NaOH sotto vuoto.

**Resa:** 95%.

**Punto di fusione:** 279-281°C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.25; **Rf<sub>2</sub>:** 0.35; **Rf<sub>3</sub>:** 0.95.

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO, 200 MHz): δ 8.32-7.98 (m, 9H, Pyr CH), 4.28 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 3.24 (b, 1H, COOH), 1.69-1.27 (m, 4H, 2 β-CH<sub>2</sub>), 0.48 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-Deg-O-(pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si riprende il PyrAc-Deg-OH con acetone, si aggiunge TEA (0.24 mmol, 0.03ml), 4-nitrobenzil bromuro (0.24 mmol, 0.052 g) e ossido di argento (I) (1.2 mmol, 0.028 g). Dopo un'ora si evapora l'acetone, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela metanolo/ diclorometano (0.5: 9.5).

**Resa:** 34%

**Punto di fusione:** 141-143°C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP).

**Rf<sub>1</sub>:**0.95 ; **Rf<sub>2</sub>:**0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:**0.70.

**IR** (KBr): 3385, 1738, 1649, 1519 cm<sup>-1</sup>.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  8.27-7.92 (m, 11H, 9 Pyr CH + 2 p nitrobenzile CH), 5,00 (d, 2H, p-nitrobenzile ), 4,30 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  in  $\alpha$  Pyr), 1,76-1,31 (m, 4H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 0.53 (t, 6H, 2  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ ).

**Spettrometria di massa** (ESI-TOF):  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 509.213$ ;  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sp.}} = 509.212$ .

### **PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu**

Si pone Tfa-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu (0.250g, 0.631 mmol) in etanolo, si aggiunge  $\text{NaBH}_4$  (6.31 mmol, 0.238g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo e si riprende con acqua e si estrae con diclorometano. Si anidrifica la fase organica, la si filtra e evapora a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone Pyr-AcOH (0.757 mmol, 0.197 g), HOAt (0.757 mmol, 0.103 g) e EDC (0.820 mmol, 0.157 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora. A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a reagire a riflusso per 1.5 giorni. Si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di  $\text{KHSO}_4$  5% e  $\text{NaHCO}_3$  5%. La fase organica viene anidrificata, filtrata e tirata a secco. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di Etere di petrolio/ Acetato di etile (7/3).

**Resa:** 21%.

**Punto di fusione:** 131-133 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.70.

**IR** (KBr): 3399, 3341, 1721, 1653, 1494, 1457  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.37 (d, 1H, Pyr 1 CH); 8.20-7.96 (m, 8H, Pyr 8 CH); 6.85 (s, 1H,  $\text{NH}^1$ ); 6.71 (s, 1H,  $\text{NH}^2$ ); 4,29 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  in  $\alpha$  Pyr); 2.55 (qd, 2H, 1  $\beta$ - $\text{CH}_2^1$ ); 2.30 (qd, 2H, 1  $\beta$ - $\text{CH}_2^2$ ); 1.60 (qd, 4H, 1  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.42 (s, 9H, OtBu 3  $\text{CH}_3$ ); 0.66 (t, 12 H, 2  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ ).

### **PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OH**

A 0°C si scioglie PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu (0.12 g, 0.22 mmoli) in 3 ml circa di soluzione 6:4 di TFA:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1

ora. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con Et<sub>2</sub>O per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato su gooch ed essiccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e NaOH sotto vuoto.

**Resa:** 95%.

**Punto di fusione:** 223-225 °C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.25; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.30.

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO, 200 MHz): δ 8.17- 8.09 (m, 9H, Pyr CH), 7.57 (s, 1H, NH), 7.01 (s, 1H, NH), 4,29 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr); 2.29 (m, 6H, 2 β-CH<sub>2</sub><sup>1</sup> e 1 β-CH<sub>2</sub><sup>2</sup>), 1.87 (qd, 2H, 1 β-CH<sub>2</sub><sup>2</sup>); 1.07 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub><sup>1</sup>), 0.82 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub><sup>2</sup>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-O- (pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si riprende il PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OH con una miscela di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5), si aggiungono 4-nitrobenzil bromuro (0.159 mmol, 0.034 g) e ossido di argento (I) (0.133 mmol, 0.031 g) e si lascia per otto ore a riflusso. A fine reazione si filtra su celite, si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash.

**Resa:** 50%

**Punto di fusione:** 166-168°C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.55.

**IR** (KBr): 3340, 1736, 1646, 1520, 1494, 1457 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 8.26 (d, 1H, Pyr 1 CH); 8.21-7.87 (m, 10H, 8 Pyr CH + 2 p nitrobenzile CH), 7.34/7.30 (d, 2H, CH<sub>2</sub> p-nitrobenzile ), 7.18 (s, 1H, NH), 6.50 (s, 1H, NH), 5,08 (s, 2H, p-nitrobenzile ), 4,22 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 2.35-2.16-1.68-1.50 (m, 8H, 2 β-CH<sub>2</sub>), 0.55 (t, 12H, 2 γ-CH<sub>3</sub>).

**Spettrometria di massa** (ESI-TOF): [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 622.299; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 622.2882.

### **PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu**

Si pone Tfa-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu (0.204g, 0.400 mmol) in etanolo, si aggiunge NaBH<sub>4</sub> (40.03 mmol, 0.150g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo e si riprende con acqua e si estrae

con diclorometano. Si anidrifca la fase organica, la si filtra e evapora a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone PyrAcOH (0.480 mmol, 0.125 g), HOAt (0.480 mmol, 0.065 g) e EDC (0.480 mmol, 0.092 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora. A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a reagire a temperatura ambiente per 1.5 giorni. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di Diclorometano/ metanolo (97/3).

**Resa:** 83%.

**Punto di fusione:** 188-190°C (da CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP). **Rf<sub>1</sub>:** 0.90; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.70.

**IR** (KBr): 3336, 1720, 1658, 1491, 1456 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 7.87-8.41 (m, 9H, Pyr 8 CH); 7.21 (s, 1H, NH<sup>1</sup>); 6.89 (s, 1H, NH<sup>2</sup>); 6.76 (s, 1H, NH<sup>3</sup>); 4.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr); 2.48 (qd, 8H, 1 β-CH<sub>2</sub><sup>1</sup>); 1.62 (qd, 8H, 1 β-CH<sub>2</sub><sup>2</sup>); 1.47 (s, 12H, OtBu 3 CH<sub>3</sub>); 0.78-0.58 (t, 18H, 2 γ-CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OH**

A 0°C si scioglie PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu (0.13 g, 0.21 mmoli) in 3 ml circa di soluzione 6:4 di TFA: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 ora. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con Et<sub>2</sub>O per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato su gooch ed essiccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e NaOH sotto vuoto.

**Resa:** 95%.

**Punto di fusione:** 210-212 °C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.25; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.30.

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO, 200 MHz): δ 8.17- 8.09 (m, 9H, Pyr CH), 7.57 (s, 1H, NH), 7.01 (s, 1H, NH), 4.27 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 2.29 (m, 6H, 2 β-CH<sub>2</sub><sup>1</sup> e 1 β-CH<sub>2</sub><sup>2</sup>), 1.87 (qd, 2H, 1 β-CH<sub>2</sub><sup>2</sup>); 1.07 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub><sup>1</sup>), 0.82 (t, 6H, 2 γ-CH<sub>3</sub><sup>2</sup>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si riprende il PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OH con acetone, si aggiunge trietilammina (0.251 mmol, 0.035ml) e 4-nitrobenzil bromuro (0.251 mmol, 0.043 g) e si lascia a reagire per



un'ora. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela metanolo/ diclorometano (1/99).

**Resa:** 25%

**Punto di fusione:** 183-184 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 95; **Rf<sub>2</sub>:** 95; **Rf<sub>3</sub>:** 450.

**IR** (KBr): 3338, 1737, 1648, 1520, 1490, 1457 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 8.05-8.34 (m, 11H, 9 Pyr CH + 2 p nitrobenzile CH), 7.50/7.46 (d, 2H, CH<sub>2</sub> p-nitrobenzile ), 7.26 (s, 1H, NH), 6.92 (s, 1H, NH), 6.63 (s, 1H, NH), 5,22 (s, 2H, p-nitrobenzile ), 4,30 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 2.27/1.86/1.59/1.26 (m, 12 H, 2 β-CH<sub>2</sub>), 0.55 (t, 18 H, γ-CH<sub>3</sub>).

**Spettrometria di massa** (ESI-TOF): [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 735.385; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 735.3703.

#### **PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu**

Si pone Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (0.119g, 0.191 mmol) in etanolo, si aggiunge NaBH<sub>4</sub> (1.91 mmol, 0.072g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo e si riprende con acqua e si estrae con diclorometano. Si anidrifica la fase organica, la si filtra e evapora a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone PyrAcOH (0.287 mmol, 0.075 g), HOAt (0.287 mmol, 0.039 g) e EDC (0.306 mmol, 0.059 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora . A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a reagire a temperatura ambiente per 1.5 giorni. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ metanolo (98/2).

**Resa:** 87%.

**Punto di fusione:** 104-106°C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.90; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.55.

**IR** (KBr): 3332, 1721, 1657, 1490, 1457 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 8.32-8.37 (m, 1H, Pyr CH) 7.93-8.18 (m, 8H, Pyr 8 CH); 7.28 (s, 1H, NH<sup>1</sup>); 7.21 (s, 1H, NH<sup>2</sup>); 6.91 (s, 1H, NH<sup>3</sup>); 6.83 (s, 1H, NH<sup>4</sup>); 4.28

(s, 2H, CH<sub>2</sub> in  $\alpha$  Pyr); 2.50 (qd, 8H, 1  $\beta$ -CH<sub>2</sub><sup>1</sup>); 1.64 (qd, 8H, 1  $\beta$ -CH<sub>2</sub><sup>2</sup>); 1.48 (s, 9H, OtBu 3 CH<sub>3</sub>); 0.61-0.88 (t, 16H, 2  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OH**

A 0°C si scioglie PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (0.1 g, 0.13 mmoli) in 2 ml circa di soluzione 6:4 di TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 ora. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con Et<sub>2</sub>O per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato ed essiccato su NaOH sotto vuoto.

**Resa:** 95%.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 200 MHz): 8.59 (d, 1H, Pyr 1 CH);  $\delta$  8.37-8.12 (m, 8H, Pyr 8 CH), 8.53, 7.96, 7.58, 7.47 (4 s, 4H, 4 NH); 4.27 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in  $\alpha$  Pyr) 1.98 (qd, 2H, 1  $\beta$ -CH<sub>2</sub>); 1.95-1.84 (m, 14H, 7  $\beta$ -CH<sub>2</sub>); 1.17-0.71 (m, 24H, 8  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O-(pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si riprende il PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OH con una miscela di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5), si aggiungono 4-nitrobenzil bromuro (0.159 mmol, 0.034 g) e ossido di argento (I) (0.133 mmol, 0.031 g) e si lascia per un giorno a temperatura ambiente. A fine reazione si filtra su celite, si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ etanolo (96/4).

**Resa:** 52%.

**Punto di fusione:** 180-182 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.40.

**IR** (KBr): 3411, 3327, 1738, 1672, 1521, 1456 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  8.29-8.24 (m, 1 H, Pyr CH), 8.17- 7.89 (m, 10 H, 9 Pyr CH + 2 p nitrobenzile CH), 7.48/7.44 (d, 2H, CH<sub>2</sub> p-nitrobenzile ), 6.95 (s, 1H, NH), 6.76 (s, 1H, NH), 6.68 (s, 1H, NH), 6.49 (s, 1H, NH), 5.20 (s, 2H, p-nitrobenzile ), 4.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in  $\alpha$  Pyr), 2.34-2.17/2.04-1.90/1.79-1.44 (m, 16 H, 2  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 0.69-0.57 (t, 24 H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>).

**Spettrometria di massa (ESI-TOF):**  $[M+H]^+_{\text{calc.}} = 848.471$ ;  $[M+H]^+_{\text{sper.}} = 848.4467$ .

### **PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OtBu**

Si pone Tfa-(Deg)<sub>5</sub>-OtBu (0.119g, 0.191 mmol) in etanolo, si aggiunge NaBH<sub>4</sub> (1.91 mmol, 0.072g) e si lascia a riflusso fino a completa rimozione del trifluoroacetile. A fine reazione si evapora l'etanolo e si riprende con acqua e si estrae con diclorometano. Si anidrifica la fase organica, la si filtra e evapora a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone PyrAcOH (0.287 mmol, 0.075 g), HOAt (0.287 mmol, 0.039 g) e EDC (0.306 mmol, 0.059 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora. A questa soluzione si aggiunge il H-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a reagire a temperatura ambiente per 1.5 giorni. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ metanolo (98/2).

**Resa:** 89%.

**Punto di fusione:** 207-209 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.70 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.40.

**IR (KBr):** 3412, 3319, 1728, 1666, 1527, 1455 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** δ 8.33-8.37 (m, 1H, Pyr CH) 7.95-8.19 (m, 8H, Pyr 8 CH); 7.32 (s, 1H, NH<sup>1</sup>); 7.27(s, 1H, NH<sup>2</sup>); 7.26 (s, 1H, NH<sup>3</sup>); 6.92 (s, 1H, NH<sup>4</sup>); 6.86 (s, 1H, NH<sup>4</sup>); 4.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr); 2.60-2.33/ 1.88-1.55 (qd, 20H, β-CH<sub>2</sub>); 1.48 (s, 9H, OtBu 3 CH<sub>3</sub>); 0.52-0.87 (t, 16H, 2 γ-CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OH**

A 0°C si scioglie PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OtBu (0.1 g, 0.13 mmoli) in 2 ml circa di soluzione 6:4 di TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 ora. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con Et<sub>2</sub>O per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato ed essiccato su NaOH sotto vuoto.

**Resa:** 95%.

**Punto di fusione:** 207-209 °C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.25 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.25.

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO, 200 MHz): 8.39 (d, 1H, Pyr 1 CH); δ 8.27-8.02 (m, 8H, Pyr CH), 8.59, 8.53, 7.96, 7.58, 7.47 (s, 5H, NH); 4.28 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 2.55-2.28/1.76-1.50 (m, 20H, β-CH<sub>2</sub>); 0.88-0.54 (m, 30H, γ-CH<sub>3</sub>).

### **PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-O-(pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si riprendono 65 mg PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OH con una miscela di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5), si aggiungono 4-nitrobenzil bromuro (0.159 mmol, 0.034 g) e ossido di argento (I) (0.133 mmol, 0.031 g) e si lascia per un giorno a temperatura ambiente. A fine reazione si filtra su celite, si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ etanolo (96/4).

**Resa:** 65%.

**Punto di fusione:** 234-236 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.35.

**IR** (KBr): 3318, 1737, 1666, 1523, 1455 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 8.36 - 7.96 (m, 11 H, 9 Pyr CH + 2 p nitrobenzile CH), 7.57 / 7.52 (d, 2H, CH<sub>2</sub> p-nitrobenzile ), 7.09 (s, 1H, NH), 7.06 (s, 1H, NH), 6.17 (s, 1H, NH), 6.37 (s, 1H, NH), 5.24 (s, 2H, p-nitrobenzile ), 4.33 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr), 2.34-2.42/1.25 (m, 20 H, β-CH<sub>2</sub>), 1.22-1.20/ 1.03-0.53 (t, 30H, γ-CH<sub>3</sub>).

**Spettrometria di massa** (ESI-TOF): [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 961.557; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 961.5456.

### **Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si scioglie Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu in (0.0815 g, 0.131 mmoli) in 10 ml circa di soluzione 6:4 di TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 ora. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con Et<sub>2</sub>O per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato ed essiccato su NaOH sotto vuoto. Il solido ottenuto viene sciolto in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5), si aggiungono 4-

nitrobenzil bromuro (0.196 mmol, 0.042 g) e ossido di argento (I) (0.131 mmol, 0.031 g) e si lascia per un giorno a temperatura ambiente a reagire. Il giorno seguente si filtra su celite, si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di  $\text{KHSO}_4$  5% e  $\text{NaHCO}_3$  5%. La fase organica è anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ metanolo (96/4).

**Resa:** 72%.

**Punto di fusione:** 185-187 °C ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EP}$ ).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.55.

**IR** (KBr): 3346, 1726, 1655, 1523, 1492, 1459  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  8.20/8.15 (d, 2 H, CH p-nitrobenzile), 7.48/7.44 (d, 2H,  $\text{CH}_2$  p-nitrobenzile ), 8.16 (s, 1H, NH), 7.32 (s, 1H, NH), 6.51 (s, 1H, NH), 5,22 (s, 2H, p-nitrobenzile ), 2.60-2.30/1.80-1.00 (m, 16 H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 0.90-0.50 (t, 24 H,  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ ).

**Spettrometria di massa** (ESI-TOF):  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 702.378$ ;  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sper.}} = 702.3489$ .

### **Pyr-Ac-(Aib)<sub>5</sub>-OtBu**

Si pone Z-(Aib)<sub>5</sub>-OtBu (0.080g, 0.273 mmol) in metanolo, si aggiunge un 30% in peso di carbone palladiato (0,24 g) e si lascia a reagire sotto flusso di idrogeno per un giorno fino a completa rimozione del gruppo Z. Si filtra il catalizzatore su celite e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo è ripreso con acetonitrile anidro.

In un secondo pallone si pone PyrAcOH (0.328 mmol, 0.085 g), HOAt (0.328 mmol, 0.056 g) e EDC (0.328 mmol, 0.063 g) in acetonitrile anidro a reagire per un'ora . A questa soluzione si aggiunge il H-(Aib)<sub>5</sub>-OtBu preparato precedentemente e si lascia a reagire a temperatura ambiente per 1.5 giorni. Si purifica il prodotto mediante cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ metanolo (100/4).

**Resa:** 26 %.

**Punto di fusione:** 296-298°C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.45; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95; **Rf<sub>3</sub>:** 0.20.

**IR** (KBr): 3423, 3322, 1731, 1665, 1525, 1453  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.24- 7.90 (m, 9H, Pyr CH); 7.29-7.26 (s, 2H, NH); 7.12(s, 1H, NH); 6.00 (s, 1H, NH); 5.81 (s, 1H, NH); 4,27 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  in  $\alpha$  Pyr); 1.43 (s, 9H, *OtBu* 3  $\text{CH}_3$ ) ; 1.33-1.14 (s, 30H,  $\beta$ - $\text{CH}_3^2$  e  $\beta$ - $\text{CH}_3^4$ ).

### **PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-OH**

A 0°C si scioglie PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-*OtBu* ( 0.053g, 0.072 mmoli) in 5 ml circa di soluzione 1:1 di TFA:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 ora. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende più volte con  $\text{Et}_2\text{O}$  per allontanare completamente il TFA. Il solido ottenuto viene filtrato su gooch ed essiccato su  $\text{P}_2\text{O}_5$  e NaOH sotto vuoto.

**Resa:** 95%.

**Punto di fusione:** 240-241 °C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.25; **Rf<sub>2</sub>:** 0.90; **Rf<sub>3</sub>:** 0.10.

**$^1\text{H NMR}$**  (DMSO, 200 MHz): 9.15 (s, 1H, NH),  $\delta$  8.51-8.56 (d, 1H, Pyr 1 CH); 8.47 (s, 1H, NH); 8.35-8.38 (d, 2H, Pyr 2 CH); 8.32 (s, 1H, NH); 8.26-8.27 (m, 3H, Pyr 3 CH); 8.07-8.25 (m, 3H, Pyr 3 CH); 7.61(s, 1H, NH); 7.35 (s, 1H, NH); 4,25 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  in  $\alpha$  Pyr), 1.57 (s, 6H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_3$ ); 1.42 (s, 6H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_3$ ); 1.38 (s, 6H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_3$ ); 1.36 (s, 6H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_3$ ); 1.34 (s, 6H, 2  $\beta$ - $\text{CH}_3$ ).

### **PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-O-(pNO<sub>2</sub>)Bzl**

Si riprende il PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-OH con una miscela di  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (95:5), si aggiungono 4-nitrobenzil bromuro (0.108 mmol, 0.023 g) e ossido di argento (I) (0.072 mmol, 0.017 g) e si lascia per un giorno a temperatura ambiente. A fine reazione si filtra su celite, si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di  $\text{KHSO}_4$  5% e  $\text{NaHCO}_3$  5%. La fase organica è anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ metanolo (95/5).

**Resa:** 87%.

**Punto di fusione:** 234-236 °C (da AcOEt/EP).

**Rf<sub>1</sub>:** 0.75 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.25.

**IR** (KBr): 3318, 1740, 1663, 1523, 1455 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.35- 7.98 (m, 9H, Pyr CH); 7.56/ 7.49 (d, 2H, CH<sub>2</sub> p-nitro benzile ); 7.45 (s, 1H, NH), 7.39 (s, 1H, NH); 7.21(s, 1H, NH); 6.54 (s, 1H, NH); 5.90 (s, 1H, NH); 5,16 (s, 2H, p-nitrobenzile ); 4,34 (s, 2H, CH<sub>2</sub> in α Pyr); 1.52/1.47/1.37/0.98 (s, 6/6/12/6H, β-CH<sub>3</sub>);

**Spettrometria di massa** (ESI-TOF): [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 821.397; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 821.3853.

### Ac-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl

Si pone l'acido acetico ( 0,02 ml, 0,35 mmol) in una miscela di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5), si aggiungono 4-nitrobenzil bromuro (0.23 mmol, 0.050 g) e ossido di argento (I) (0.115 mmol, 0.027 g) e si lascia per un giorno a temperatura ambiente. A fine reazione si filtra su celite, si evapora il solvente, si riprende con acetato di etile e si eseguono lavaggi con soluzioni di KHSO<sub>4</sub> 5% e NaHCO<sub>3</sub> 5%. La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e evaporata. Il prodotto è purificato attraverso cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela di diclorometano/ metanolo (95/5).

**Resa:** 71%

**Punto di fusione:** 73-76 °C.

**Rf<sub>1</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>2</sub>:** 0.95 ; **Rf<sub>3</sub>:** 0.85 .

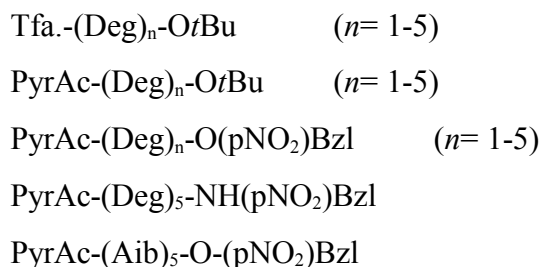
**IR** (KBr): 3406, 1738, 1655, 1520, 1447 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 8.13 (d, 2 H, CH p-nitrobenzile), 7.19 (d, 2 H, CH p-nitrobenzile), 5.13 (s, 2 H, CH<sub>2</sub> p-nitrobenzile), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato).

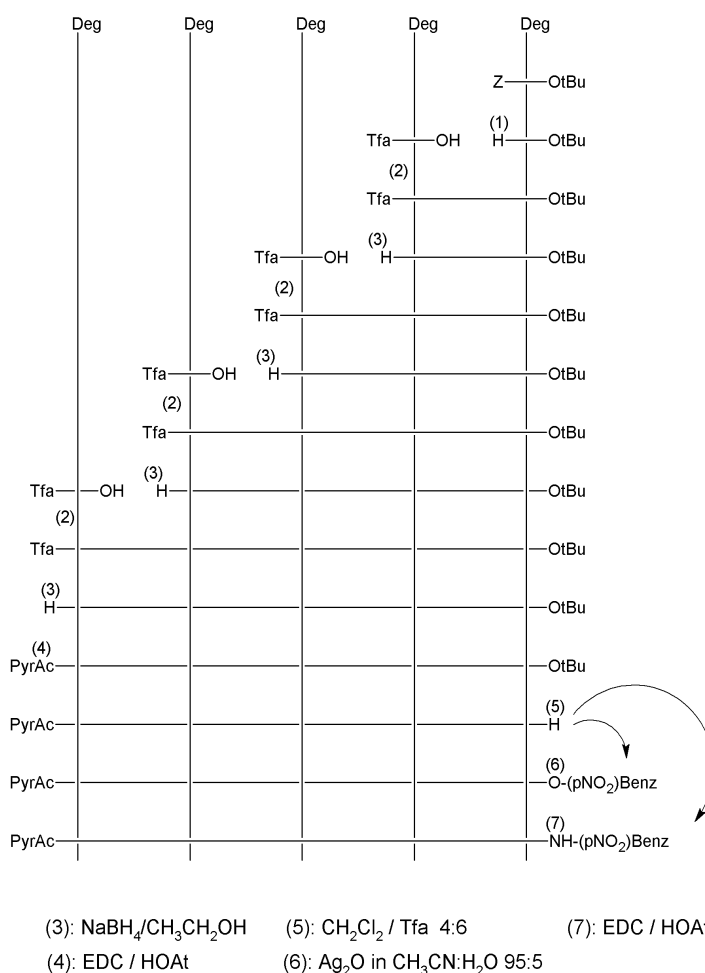
### 2.3 Strategia di sintesi

I peptidi descritti in questa tesi sono stati preparati seguendo metodiche di sintesi in soluzione, sfruttando l'esperienza acquisita da questo laboratorio nelle sintesi coinvolgenti α-amminoacidi C<sup>α</sup>-tetrasostituiti. La più veloce tecnica di sintesi su fase solida non è stata utilizzata a causa della scarsa reattività degli α-amminoacidi C<sup>α</sup>-

tetrasostituiti nella formazione del legame peptidico. Inoltre la sintesi in soluzione consente di isolare e caratterizzare tutte le sequenze corte intermedie in modo da valutare l'effetto della lunghezza di catena sulla conformazione del peptide. Come già detto, i peptidi progettati sono stati i seguenti:



Per la sintesi è stato seguito un processo "step by step" a partire dal residuo C-terminale, come illustrato nello schema (fig 2,1).



**Fig. 2.1:** Sintesi dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O-(pNO<sub>2</sub>)Bzl (n=1-5) e Pyr-(Deg)<sub>5</sub>-NH-(pNO<sub>2</sub>)Bzl.



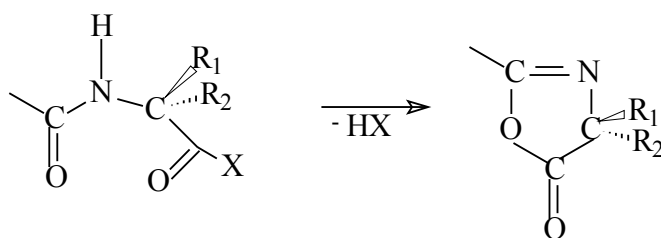
## 2.4 Gruppi protettori e metodi di attivazione

Come gruppo N<sup>α</sup>-protettore nella sintesi delle serie omopeptidiche Tfa-(Deg)<sub>n</sub>O<sup>t</sup>Bu (*n*= 1-5) e PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl è stato utilizzato il Tfa (trifluoroacetile). La scelta di tale gruppo è stata dettata da esigenze di coupling (vedi più avanti). Il Tfa si rimuove per riduzione con NaBH<sub>4</sub> in EtOH.<sup>59</sup> In tali condizioni rimangono inalterati i legami peptidici. Tuttavia, nonostante questa reazione proceda a riflusso, la resa non è quantitativa e può verificarsi una parziale riduzione dell'estere *tert*-butilico, utilizzato qui come C-protettore, a motivo dei tempi di reazione lunghi richiesti per la rimozione completa del Tfa.

La buona selettività del NaBH<sub>4</sub> per l'ammide coinvolgente il Tfa è dovuta alla presenza dei tre atomi di fluoro elettronegativi. La loro elevata elettronegatività rende il carbonio carbonilico dell'ammide N-terminale più elettrofilo e quindi maggiormente suscettibile all'attacco nucleofilo dell'idruro rispetto all'estere e alle altre ammidi del peptide.

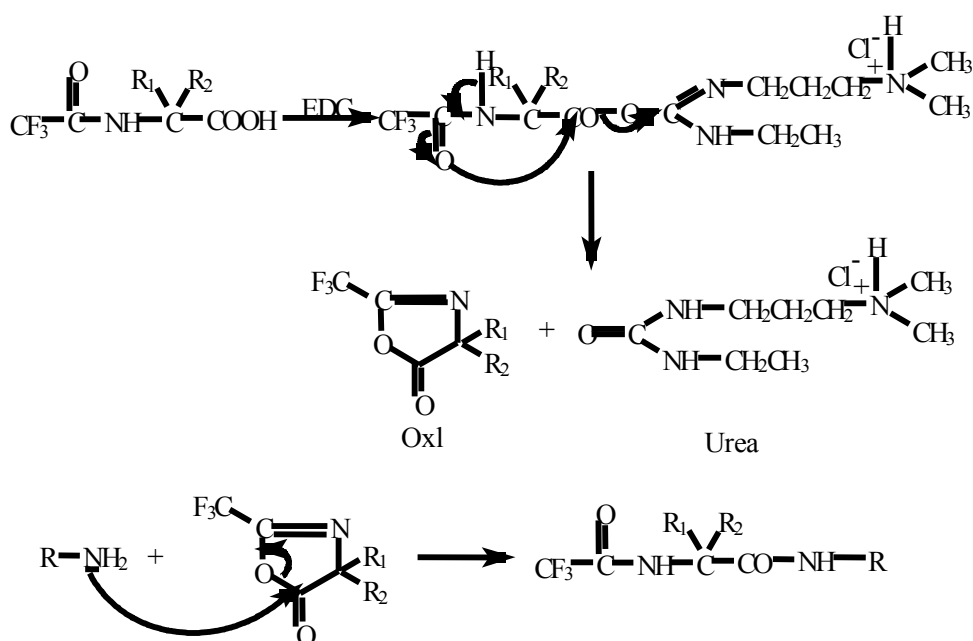
L'estere *tert*-butilico è stato scelto come gruppo C-protettore in quanto aumenta la solubilità dei peptidi nei solventi organici, ostacola la reazione di ciclizzazione a dichetopiperazina dei dipeptidi N<sup>α</sup>-deprotetti e inoltre può venire facilmente rimosso per acidolisi.

L'ingombro spaziale dei gruppi etile del Deg lo rendono poco reattivo nella formazione del legame peptidico. Questa scarsa reattività non permette di utilizzare i classici metodi di attivazione, ma obbliga a utilizzare l'attivazione *via trifluoroacetil ossazolone*, il metodo che si è rivelato più efficace per la sintesi degli omopeptidi di questo amminoacido.<sup>27a,50,54,63</sup>



**Fig. 2.2** Reazione di formazione dell'ossazolone.

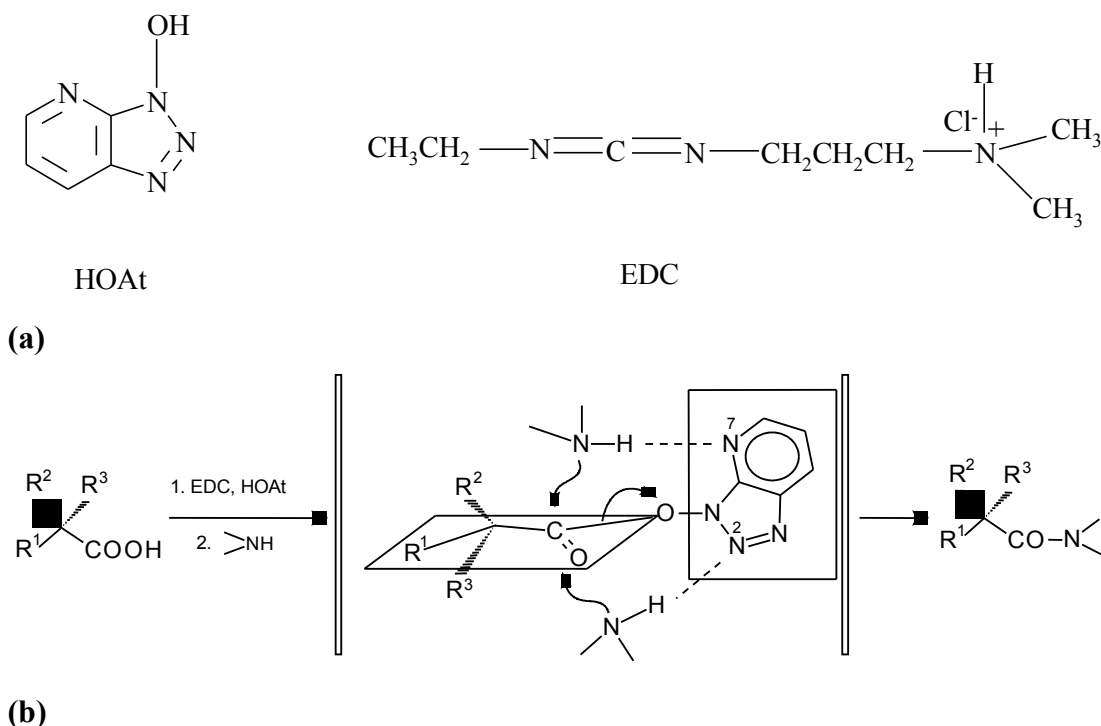
In genere l'attivazione via ossazolone (Fig. 2.2) non viene utilizzata per la scarsa reattività di tali eterocicli. Con gli amminoacidi proteici, inoltre, l'ossazolone non è stabile e dà luogo a estesa racemizzazione. Nel caso degli  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti gli ossazoloni sono invece stabili (effetto *gem*-dimetile o Thorpe-Ingold)<sup>1c</sup>, anche se poco reattivi. Tuttavia, la presenza dei tre atomi di fluoro nei trifluoroacetil ossazoloni rende il carbonio carbonilico dell'eterociclo molto elettrofilo e facilmente attaccabile da parte del nucleofilo  $H_2N-R$  (Fig. 2.3).



**Figura. 2.3** Reazione di formazione dell'ossazolone e successiva reazione di coupling.

L'ossazolone può essere facilmente formato trattando Tfa-(Deg)-OH con EDC. Pertanto, in questa Tesi si è preparata la serie omopeptidica Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu ( $n = 2-5$ ) utilizzando l'ossazolone derivante da Tfa-Deg-OH per acilare gli omo-peptidi del Deg N-deprotetti, H<sub>2</sub>N-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu. Il metodo è risultato efficace, in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>26a,45-47</sup>

Nella reazione con l'acido 1-pirenilacetico si ricorre ai metodi di attivazione del gruppo carbossilico *via* EDC/HOAt (Fig. 2.4), a motivo della loro efficacia e della loro praticità d'uso. L'HOAt permette di sopprimere la racemizzazione e al tempo stesso di favorire la reazione di acilazione. In realtà gli  $\alpha$ -amminoacidi C <sup>$\alpha$</sup> -tetrasostituiti non possono racemizzare in quanto privi dell'atomo di idrogeno sul C <sup>$\alpha$</sup> , ma l'efficienza dell'HOAt nell'aiutare la formazione del legame ammidico rende comunque auspicabile il suo utilizzo con amminoacidi ingombrati.



**Figura 2.4:** (a) Strutture chimiche dei reagenti utilizzati per l'attivazione del gruppo carbossilico con il metodo EDC/HOAt; (b) Meccanismo d'azione dell'HOAt.

La carbodiimmide (EDC) promuove la formazione di un intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido N<sup>α</sup>-protetto e l'HOAt (Fig. 3.3). Successivamente l'HOAt catalizza l'attacco nucleofilo del gruppo amminico: tale effetto è attribuibile all'assistenza fornita dai due atomi di azoto, in posizione 2 e 7. Infatti la conformazione preferita allo stato cristallino dagli -OAt esteri prevede la perpendicolarità del piano dell'HOAt rispetto a quello del gruppo carbossilico.<sup>1b</sup> Se tale disposizione tridimensionale si conserva in soluzione, il gruppo amminico che attacca l'estere trova assistenza su entrambe le facce da parte dell'atomo di azoto in posizione 2 o 7 dell'HOAt [Fig.2.4 (b)].

La reazione con il p-nitrobenzil bromuro inizialmente è stata eseguita con la sola aggiunta di base (TEA) con lo scopo di neutralizzare l'acido bromidrico che si forma nella reazione di sostituzione. Successivamente si è modificato il metodo di sintesi per migliorare la resa. L'aggiunta di Ag<sub>2</sub>O promuove la reazione perché favorisce la sottrazione di HBr che forma AgBr e acqua. Anche il solvente svolge un ruolo importante in quanto coinvolto nel processo di spostamento del bromuro. Per questo, si è utilizzata una miscela acetonitrile/acqua 95/5.<sup>50</sup> Con questi accorgimenti la resa di reazione è aumentata notevolmente.

Tutti i composti sono stati caratterizzati mediante determinazione del punto di fusione (se solidi), del comportamento cromatografico (misura dei fattori di ritenzione in tre sistemi eluenti diversi), mediante assorbimento IR allo stato solido e spettrometria <sup>1</sup>H NMR.

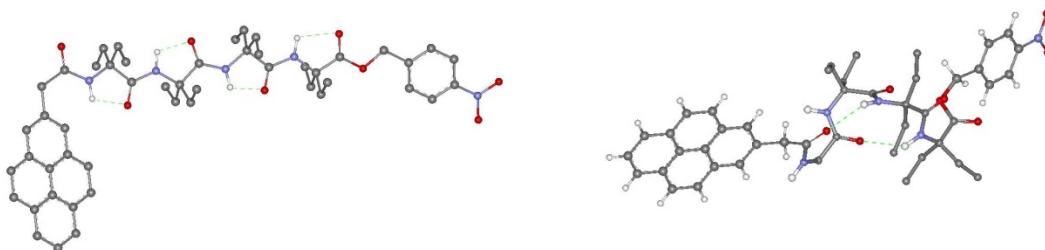


## 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 ANALISI NMR

#### 3.1.1 TITOLAZIONI NMR CON DMSO

Per analizzare la conformazione assunta dai nostri peptidi in cloroformio è possibile sfruttare la diversa accessibilità dei protoni ammidici. Nella conformazione completamente estesa tutti i protoni N-H sono impegnati in legami idrogeno *intra*residuo e risultano quindi non disponibili a formare legami a idrogeno con agenti esterni. La struttura a elica  $3_{10}$ , invece, non impegna tutti i protoni ammidici in ponti a idrogeno, ma lascia liberi quelli dei primi due residui (fig. 3.1). Giocando su questa differenza è possibile valutare la conformazione dei nostri peptidi.

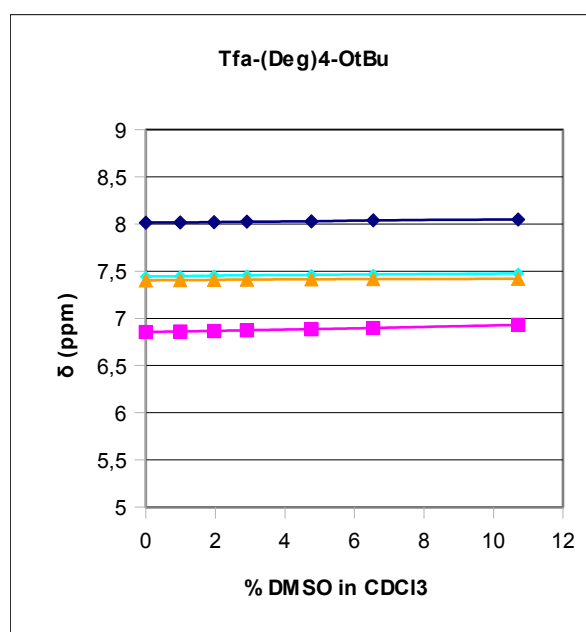


**Figura 3.1:** Legami ad idrogeno *intramolecolari* nel caso delle due diverse conformazioni  $C_5$  (sinistra) e elica  $3_{10}$  (destra) per una molecola di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl. Come si può notare i primi due NH ammidici dell'elica non sono impegnati da legami a idrogeno (in verde).

Al peptide sciolto in cloroformio aggiungeremo percentuali crescenti di dimetilsolfossido (DMSO-*d*<sub>6</sub>), un forte accettore di legami a idrogeno<sup>51,52</sup>; potremo così investigare la capacità di quest'ultimo di impegnare i protoni ammidici in legami a idrogeno monitorando la variazione del *chemical shift* di questi ultimi<sup>53,54</sup>.

Nel caso della conformazione  $C_5$  avremmo deboli interazioni con il DMSO, in funzione del fatto che i protoni sono già tutti impegnati in ponti a idrogeno *intraresiduo*. Una conformazione ad elica, invece, mostrerà un'interazione molto maggiore per i primi due residui che si sposteranno sensibilmente a campi più bassi ( $\delta$  maggiori) per via dell'effetto deschermante indotto dal legame a idrogeno.

#### TITOLAZIONE Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu



**Fig. 3.2:** Variazione dei chemical shift dei protoni ammidici del Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

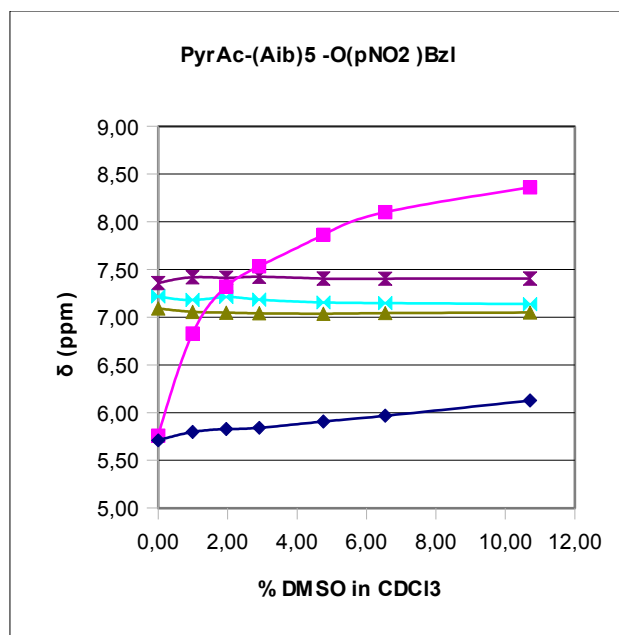
**Tabella 3.1:** Variazione dei chemical shift dei protoni ammidici del Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	% DMSO in CDCl <sub>3</sub>
8,01	7,44	7,4	6,86	0
8,02	7,45	7,41	6,86	0,99
8,02	7,45	7,41	6,87	1,96
8,02	7,46	7,41	6,87	2,91
8,03	7,46	7,41	6,89	4,76
8,04	7,47	7,42	6,9	6,54
8,05	7,48	7,42	6,93	10,71

Questa titolazione è stata effettuata su un omopeptide per il quale è nota la stabilità in conformazione completamente estesa<sup>15</sup>. Il suo comportamento è compatibile con la conformazione  $C_5$  in quanto, come si vede dal grafico, la *chemical shift* dei

protoni non varia sensibilmente con l'aggiunta di DMSO dal momento che tutti i protoni ammidici sono già impegnati in legami a idrogeno *intramolecolari*.

### TITOLAZIONE PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl



**Fig. 3.3:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

**Tabella 3.2:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

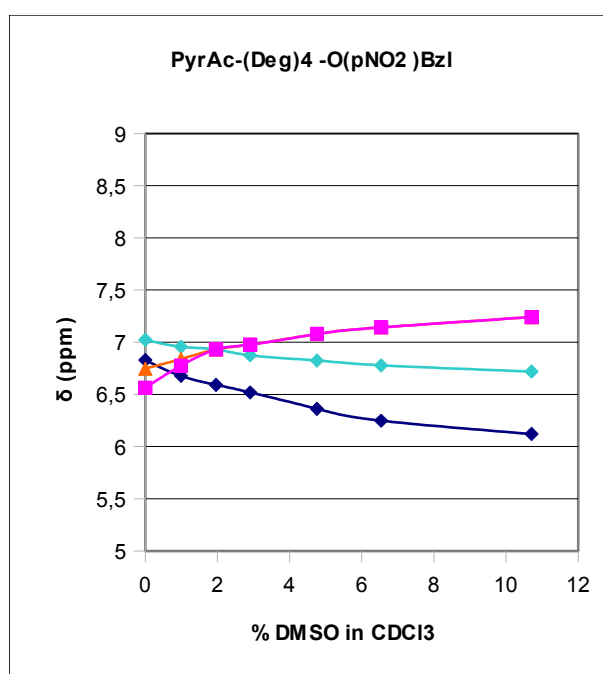
$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	% DMSO in CDCl <sub>3</sub>
7,36	7,22	7,09	5,76	5,71	0,00
7,42	7,18	7,06	6,83	5,80	0,99
7,41	7,21	7,05	7,32	5,83	1,96
7,42	7,18	7,04	7,53	5,84	2,91
7,40	7,15	7,04	7,86	5,91	4,76
7,40	7,15	7,04	8,10	5,97	6,54
7,40	7,14	7,05	8,36	6,13	10,71

Gli omopeptidi dell'Aib sono noti per la loro stabilità conformazionale in elica  $3_{10}^{21-24}$ . In questa titolazione si può vedere come anche questo peptide, protetto alle estremità C e N terminale rispettivamente con il gruppo 1-pirenilacetico e il gruppo p-nitrobenzile, assuma una struttura secondaria ad elica. Dal grafico si nota subito che un protone ammidico subisce pesantemente l'influenza delle aggiunte di DMSO, un



secondo protone la subisce in maniera meno evidente, mentre i rimanenti tre protoni sono quasi imperturbati. Il pesante spostamento del primo protone è causato dalla sua disponibilità a dare legami a idrogeno con il DMSO; queste interazioni provocano un deschermaggio dell'idrogeno e, quindi, una migrazione del segnale a *chemical shift* maggiori. Il secondo protone subisce anch'esso l'influenza del DMSO, in quanto libero da legami a idrogeno *intramolecolari*, ma in misura minore in funzione della sua posizione più interna nell'elica.

#### TITOLAZIONE PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl



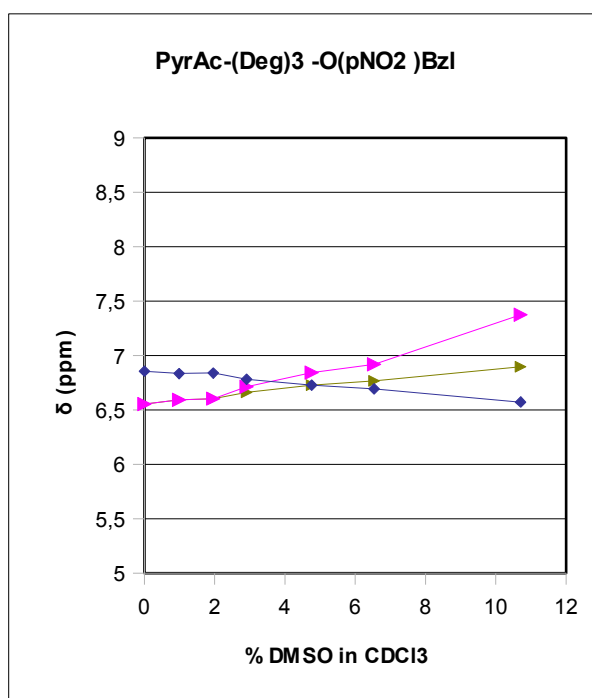
**Fig. 3.4:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

**Tabella 3.3:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO, (sopra ogni colonna si notano le assegnazioni dei protoni ammidici, ricavate attraverso esperimenti di NMR 2D. La numerazione inizia dal residuo N terminale).

NH 3	NH 2	NH 4	NH 1	% DMSO in CDCl <sub>3</sub>
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	
7,02	6,83	6,75	6,56	0
6,96	6,68	6,84	6,78	0,99
6,93	6,59	6,93	6,93	1,96
6,87	6,52	6,98	6,98	2,91
6,83	6,36	7,08	7,08	4,76
6,78	6,25	7,14	7,14	6,54
6,72	6,12	7,24	7,24	10,71

La titolazione del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl mostra un comportamento anomalo, infatti si notano spostamenti di frequenza dei protoni che non sono facilmente interpretabili. L'aspetto di questa titolazione non rispecchia quello della conformazione estesa visto che i protoni subiscono l'influenza del DMSO, ma non mostra nemmeno un andamento caratteristico dell'elica. In una conformazione elicoidale solo due protoni subiscono una migrazione verso *chemical shift* maggiori mentre i rimanenti rimangono stabili. In questo caso, invece, tutti i protoni variano il proprio segnale, anche se in maniera più contenuta rispetto ai protoni del primo residuo di un'elica ( $\Delta\delta \approx 1,5-2,5$ ). Alcuni presentano addirittura un andamento in controtendenza spostandosi verso frequenze minori. I picchi di questi protoni si allargano all'aumentare della quantità di DMSO aggiunta, fatto che potrebbe indicare la compresenza di più conformazioni.

#### TITOLAZIONE PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl



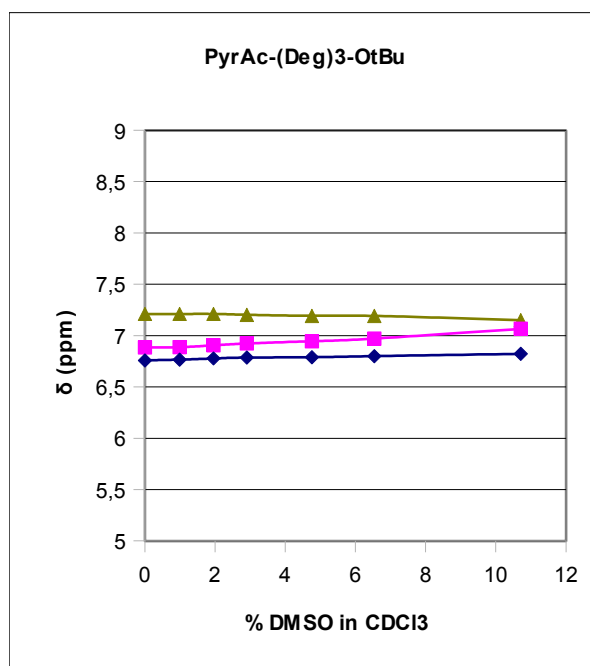
**Fig. 3.5:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

**Tabella 3.4:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	% DMSO in CDCl <sub>3</sub>
6,55	6,55	6,86	0
6,59	6,59	6,83	0,99
6,6	6,6	6,84	1,96
6,66	6,71	6,78	2,91
6,73	6,84	6,73	4,76
6,77	6,92	6,69	6,54
6,9	7,38	6,57	10,71

Anche per il *tripeptide* si possono fare lo stesso tipo di considerazioni fatte per il *tetrapeptide*, indice del fatto che questo comportamento non è dovuto a impurezze o a caratteristiche peculiari specifiche del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl.

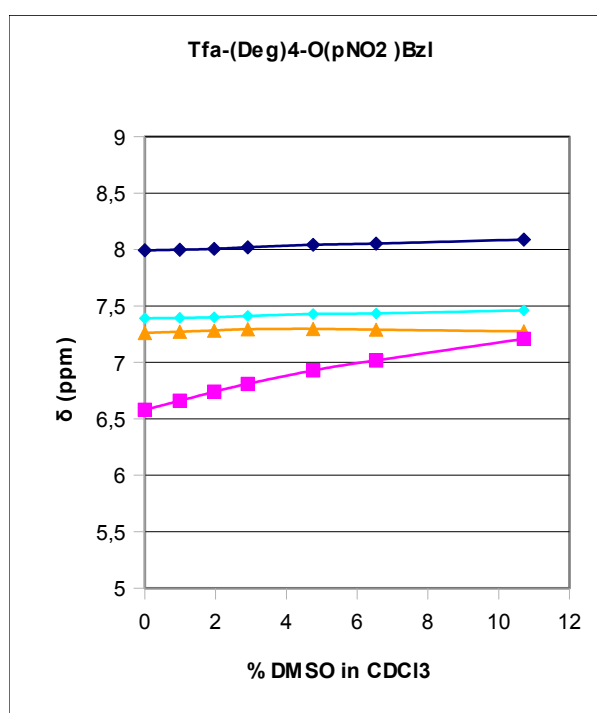
#### TITOLAZIONE PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu E Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl



**Fig. 3.6:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

**Tabella 3.5:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del PyrAc-(Deg)<sub>3</sub>-OtBu all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	% DMSO in CDCl <sub>3</sub>
7,21	6,89	6,76	0
7,21	6,89	6,77	0,99
7,21	6,91	6,78	1,96
7,2	6,92	6,79	2,91
7,19	6,95	6,79	4,76
7,19	6,97	6,8	6,54
7,15	7,07	6,82	10,71



**Fig. 3.7:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

**Tabella 3.6:** Variazione dei *chemical shift* dei protoni ammidici del Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl all'aggiunta di una crescente quantità di DMSO.

$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	% DMSO in CDCl <sub>3</sub>
7,99	7,39	7,26	6,58	0
8	7,39	7,27	6,66	0,99
8,01	7,4	7,28	6,74	1,96
8,02	7,41	7,29	6,81	2,91
8,04	7,43	7,3	6,93	4,76
8,05	7,43	7,29	7,02	6,54
8,09	7,46	7,28	7,21	10,71

Per valutare l'effetto dei sostituenti abbiamo eseguito la titolazione su due omopeptidi protetti solamente all'estremità C o N terminale. Per entrambi si nota la stabilità dei segnali dei protoni all'aggiunta di DMSO, solamente per il peptide Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl si nota un comportamento leggermente anomalo del protone ammidico più vicino al gruppo p-nitrobenzile. Questa analisi serve per valutare l'influenza dei gruppi protettori sull'andamento delle precedenti titolazioni e ci permette di capire che il comportamento riscontrato per il Pyr-Ac-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl non è dovuto solo ai gruppi protettori in sé, ma anche a interazioni tra questi e, probabilmente, ad una compresenza di più conformazioni del nostro peptide.

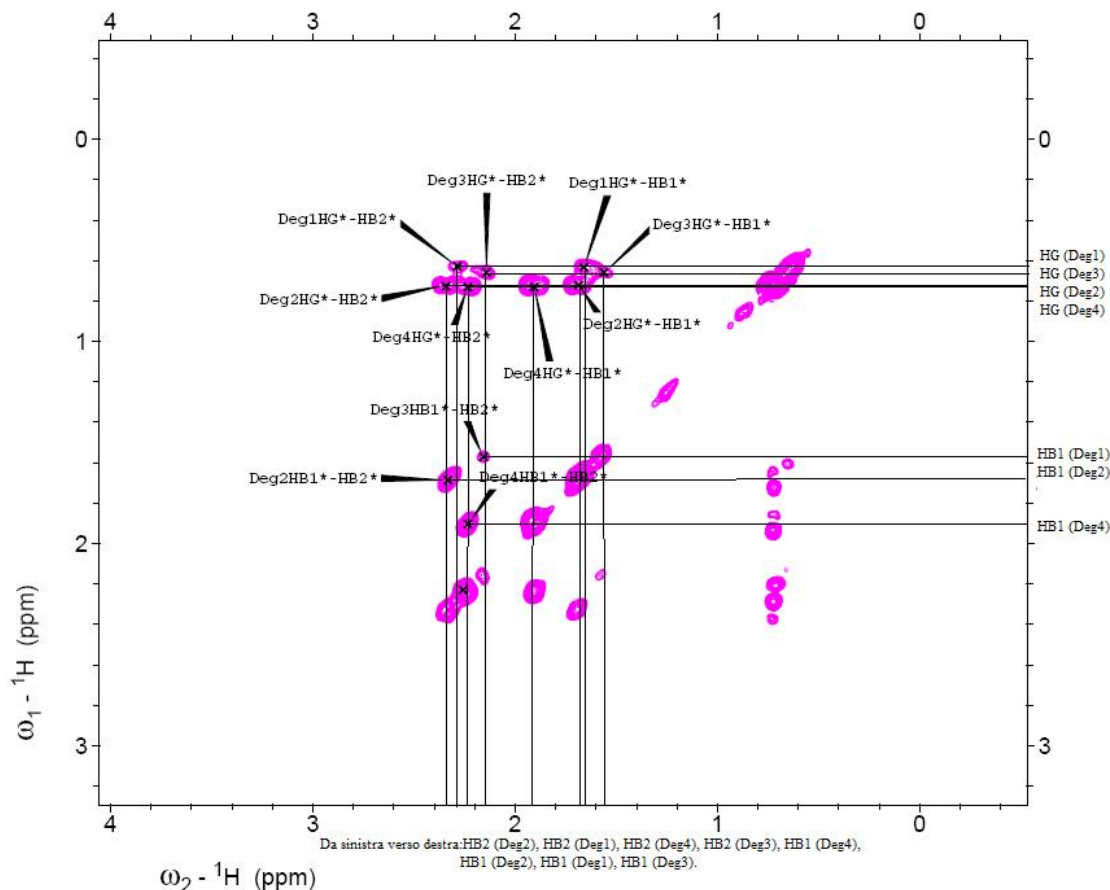
### 3.2.2 NMR BIDIMENSIONALE

Le tecniche di NMR bidimensionale permettono di mettere in correlazione tra loro i nuclei investigati. Secondo la tecnica impiegata si possono osservare le correlazioni scalari (lungo i legami) o spaziali. Per i nostri scopi sarà utile utilizzare le correlazioni scalari tra protoni (spettri COSY e TOCSY) principalmente per un lavoro di assegnazione dei protoni delle catene laterali. Vista la difficoltà di assegnazione che si incontra quando si ha a che fare con omopeptidi, si utilizzeranno a tale scopo anche spettri etero-correlati <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C che ci permetteranno di attribuire ad ogni residuo di Deg la giusta posizione nella sequenza. Le informazioni ricavate dagli spettri a correlazione spaziale (ROESY, NOESY<sup>55</sup>) invece ci permetteranno di ricavare le informazioni conformazionali che ci interessano. Tutti gli spettri sono stati acquisiti con uno strumento da 400 Mhz.

Nota. I cross-picchi di maggiore interesse portano l'indicazione dell'interazione che essi rappresentano. Si utilizza la lettera B per indicare la posizione β rispetto al carbonile e la lettera G per la posizione γ. Allo stesso modo sono denominate a lato le rette che indicano la frequenza di risonanza dei vari gruppi

*PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl in CDCl<sub>3</sub>*

SPETTRO COSY

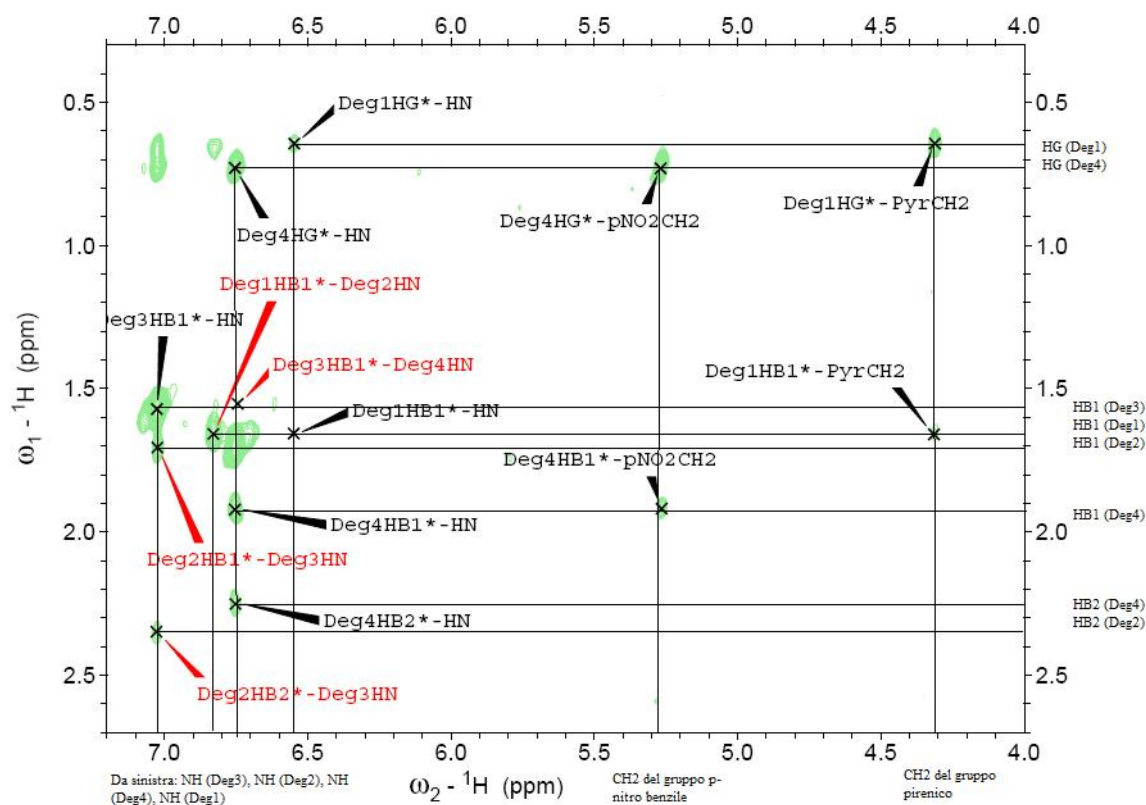


**Fig. 3.8:** Regione  $\beta\text{CH}-\gamma\text{CH}$  dello spettro COSY del  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_4\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in  $\text{CDCl}_3$ , 298K).

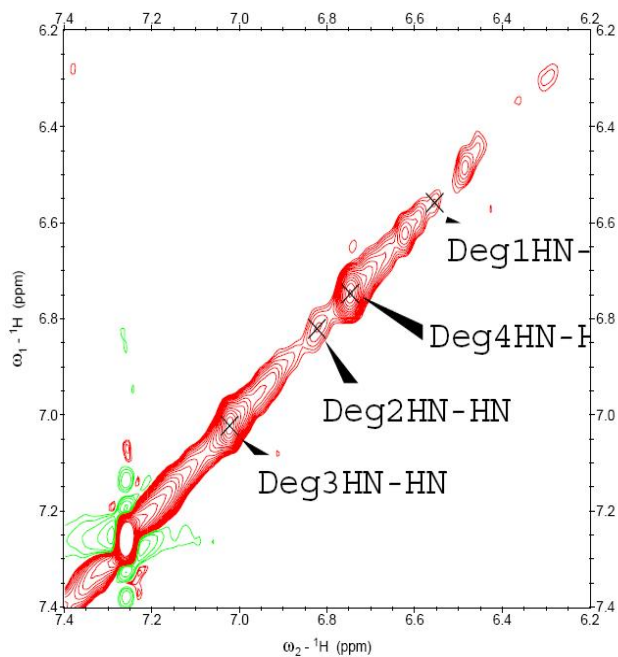
L'analisi COSY permette di evidenziare le correlazioni tra protoni scalarmente vicini inducendo un trasferimento della magnetizzazione tra nuclei attraverso i legami. Uno spettro di questo tipo permette di leggere sulla diagonale un normale spettro NMR, mentre fuori della diagonale si possono notare i cross-picchi, indicatori della vicinanza dei nuclei in analisi.

Nel nostro caso abbiamo considerato solo la zona che va dai 0 ai 4 ppm in quanto è la zona dove risuonano i protoni delle catene laterali, gli unici che possono dare cross-picchi in quanto sufficientemente vicini.

Questo spettro ci ha permesso di assegnare le frequenze delle catene laterali, informazione utile per la successiva analisi di correlazione spaziale.

SPETTRO ROESY in  $CDCl_3$ 

**Fig. 3.9:** Regione  $\beta$ CH-NH e  $\gamma$ CH-NH dello spettro ROESY di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in  $CDCl_3$ , 298K).



**Fig. 3.10:** Regione NH-NH dello spettro ROESY di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in  $CDCl_3$ , 298K).

Nell'analisi ROESY si sfrutta l'effetto NOE che permette il trasferimento dell'eccitazione tra nuclei spazialmente vicini attraverso interazioni dipolari. Questi spettri sono utili per analizzare le distanze tra i vari protoni e costituiscono un potente strumento per l'analisi conformazionale.

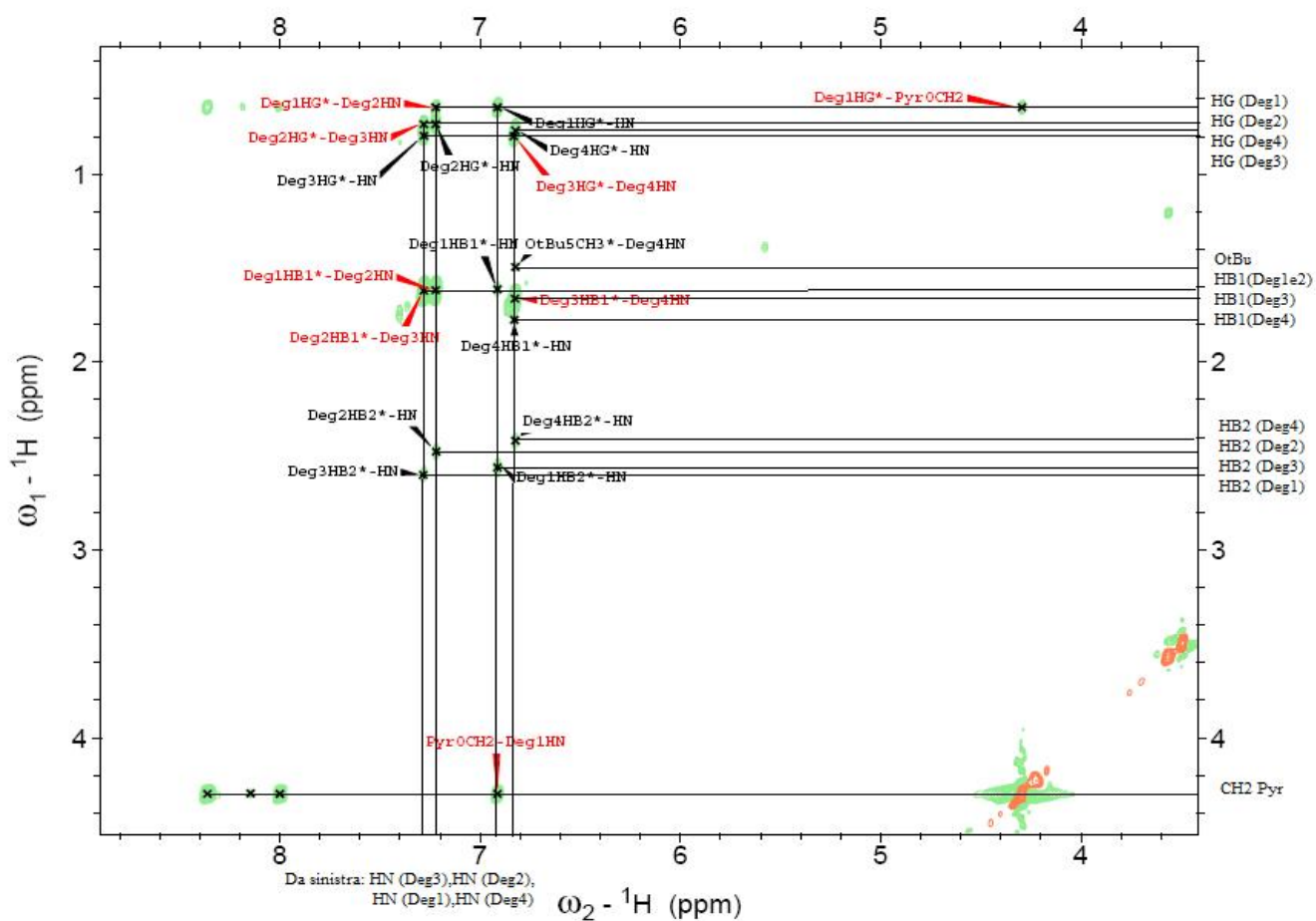
In primo luogo osserveremo la zona degli NH ammidici. In una conformazione ad elica essi sono distanziati da circa 3 Å, mentre in una conformazione estesa si osservano distanze maggiori, circa 5 Å, cioè la distanza limite per osservare ancora interazioni con questa tecnica. L'assenza di cross-picchi tra i protoni ammidici del nostro analita possono indicare l'assenza di interazioni spaziali. In realtà i picchi dei NH ammidici sono molto allargati (osservabile nello spettro monodimensionale) e quindi hanno molta difficoltà a dare cross-picchi visibili. Dalla zona direttamente superiore si ricavano le interazione tra gli stessi protoni ammidici e quelli delle catene etiliche laterali degli amminoacidi. Anche questa zona non fornisce molte informazioni strutturali per via della probabile compresenza delle due conformazioni che allarga i segnali dei protoni ammidici. È comunque possibile assegnare i segnali dei vari residui grazie all'interazione spaziale delle ammidi con il gruppo CH<sub>2</sub> dei gruppi C terminale e N terminale. Questi interagiscono con il primo e l'ultimo NH degli amminoacidi permettendoci di identificarli, i due amminoacidi rimanenti sono stati assegnati attraverso uno spettro HMQC che mette in relazione i nuclei di carbonio con i protoni e ci permette di vedere le interazioni del protone ammidico con i suoi vicini.

#### *PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu in CDCl<sub>3</sub>*

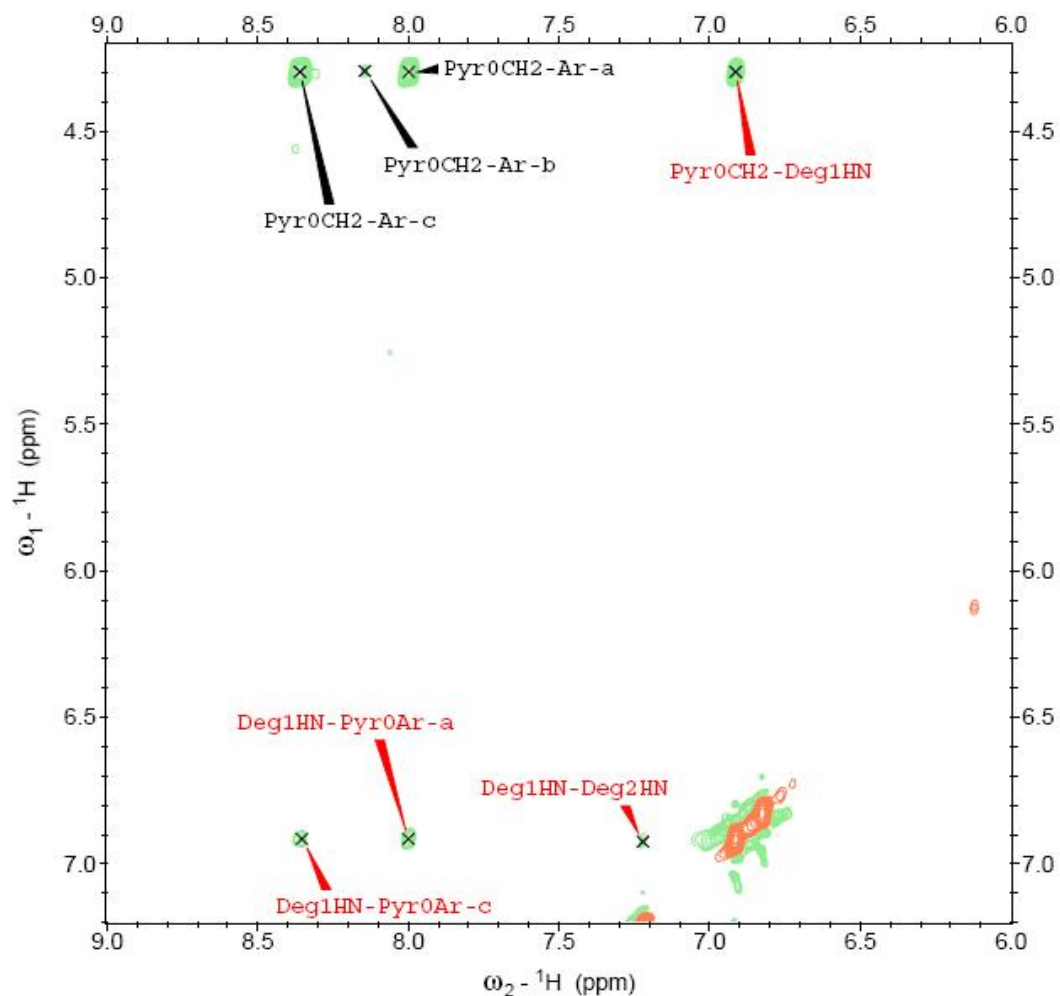
Per valutare in modo più completo il nostro peptide abbiamo analizzato anche due tetrapeptidi, analoghi del precedente, rispettivamente senza il gruppo N e C terminale.



## SPETTRO NOESY



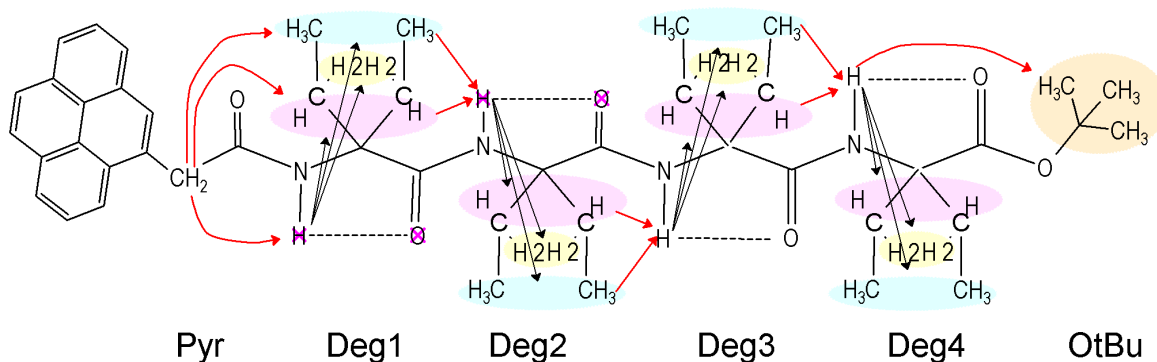
**Fig. 3.11:** Regione  $\beta\text{CH-NH}$  e  $\gamma\text{CH-NH}$  dello spettro NOESY di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in  $\text{CDCl}_3$ , 298K).



**Fig. 3.12:** Regione NH–NH e NH–CH<sub>2</sub> (Pyr) dello spettro NOESY di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (400 MHz, 2×10<sup>-3</sup> M in CDCl<sub>3</sub>, 298K). Si noti la debole interazione tra l' NH del mono-peptide e l'NH del dipeptide in basso nella figura.

Gli spettri ottenuti da questo peptide sono più facilmente interpretabili per via della migliore risoluzione dei segnali dei protoni ammidici.

L'immagine 3.13 mostra le interazioni più importanti presenti in questo spettro.



**Fig. 3.13:** Interazioni spaziali tra i protoni del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu, in rosso sono indicate le interazioni *inter* residuo, mentre in nero quelle *intra*.

Risulta caratteristica l'intensità dei picchi delle interazioni NH-CH *intra* e *inter* residuo. Come si intuisce anche dal disegno precedente, i protoni delle catene laterali dell' amminoacido precedente al protone ammidico in esame sono molto più vicini di quelli del residuo stesso e ciò si traduce in una maggiore interazione e quindi una maggiore intensità del segnale. In una struttura elicoidale il ripiegamento della catena comporta una variazione delle distanze e l'intensità dell'interazione *intra* residuo diventa quella più importante. Infatti in configurazioni a elica è possibile notare che i cross-picchi di area maggiore sono quelli *intra*residuo, inoltre si possono notare anche interazioni dei protoni ammidici con le catene laterali di peptidi anche non direttamente legati, ma distanziati da uno o due residui<sup>56</sup>.

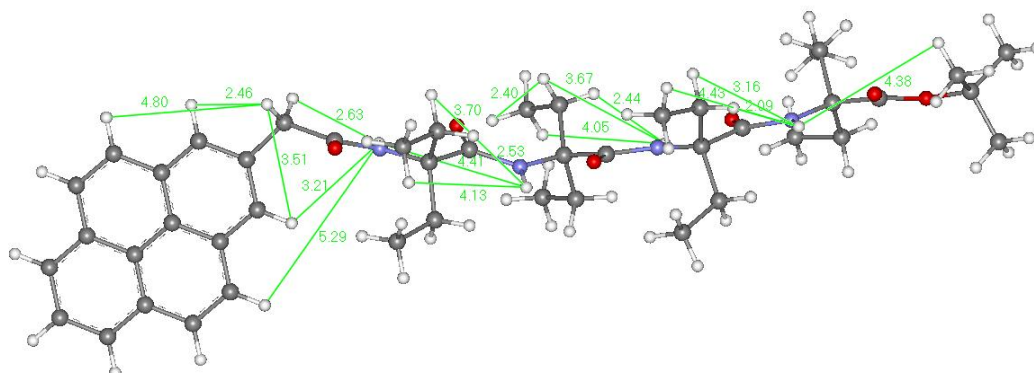
Dagli integrali delle aree dei cross-picchi è possibile ricavare le distanze tra i vari protoni e simulare la struttura risultante.

**Tabella 3.7:** Distanze calcolate tra i protoni del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu in CDCl<sub>3</sub> attraverso l'integrazione delle aree dei cross-picchi.

Protone 1	Protone 2	Distanza (Å)
Hβ1 (Deg1)	Hβ2 (Deg1)	1,78
Hβ1 (Deg1)	HN (Deg1)	4,45
Hβ1 (Deg1)	HN (Deg2)	2,76
Hβ2 (Deg1)	HN (Deg1)	4,13
Hγ (Deg1)	Hβ2 (Deg1)	2,64
Hγ (Deg1)	HN (Deg1)	3,52
Hγ (Deg1)	HN (Deg2)	4,03
HN (Deg1)	HN (Deg2)	4,49
Hβ1 (Deg2)	Hβ2 (Deg2)	1,47
Hβ1 (Deg2)	HN (Deg3)	2,77
Hβ2 (Deg2)	HN (Deg2)	4,27
Hγ (Deg2)	Hβ2 (Deg2)	2,38
Hγ (Deg2)	HN (Deg2)	3,61
Hγ (Deg2)	HN (Deg3)	3,8
Hβ1 (Deg3)	Hβ2 (Deg3)	1,8
Hβ1 (Deg3)	HN (Deg4)	2,72
Hβ2 (Deg3)	HN (Deg3)	4,22
Hγ (Deg3)	Hβ2 (Deg3)	1,83
Hγ (Deg3)	HN (Deg3)	3,66
Hγ (Deg3)	HN (Deg4)	3,85
Hβ1 (Deg4)	Hβ2 (Deg4)	1,39
Hβ1 (Deg4)	HN (Deg4)	4,34
Hβ2 (Deg4)	HN (Deg4)	4,3
Hγ (Deg4)	Hβ2 (Deg4)	4,1
Hγ (Deg4)	HN (Deg4)	3,59
OtBu	HN (Deg4)	4,74

Dallo spettro NOESY si vede come ci sia una piccola interazione tra il protone ammidico del primo e del secondo residuo. Questa interazione potrebbe indurre a supporre un qualche ripiegamento che avvicini i due protoni, ma attraverso il calcolo degli integrali si nota come in realtà la distanza tra i due sia coerente con una conformazione estesa.

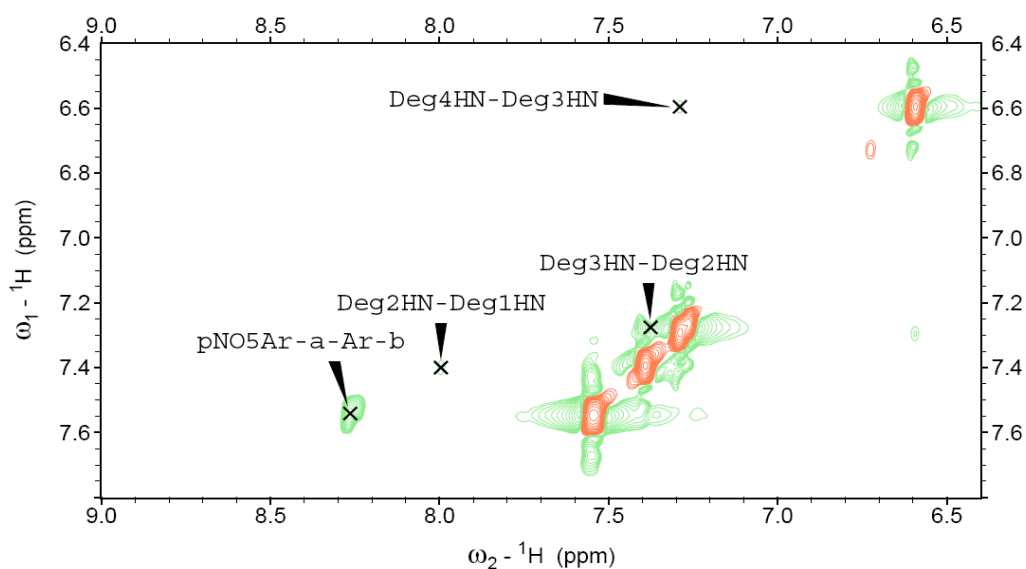
Con queste distanze abbiamo costruito un modello che non costituisce una vera e propria simulazione, ma un arrangiamento manuale che può comunque essere utile per valutare la struttura.



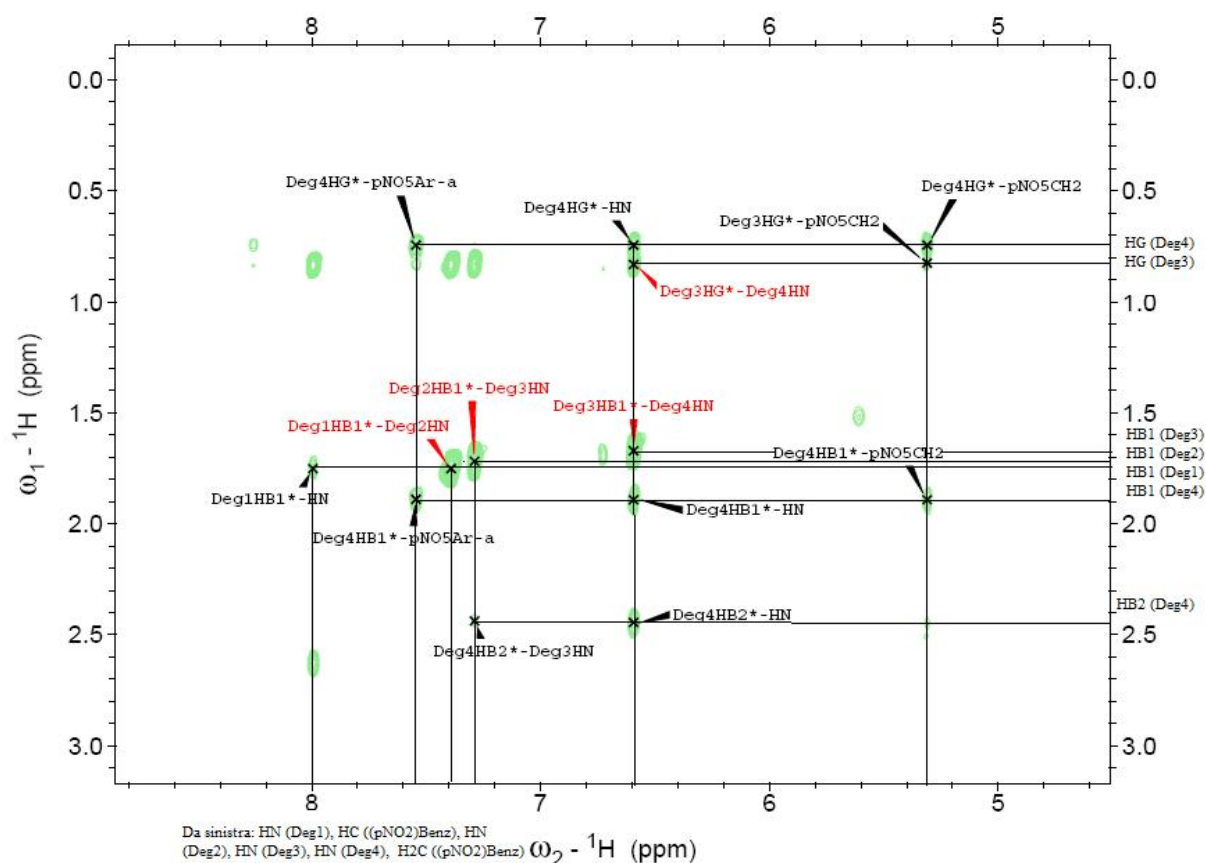
**Fig. 3.14:** Struttura del PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu fatta arrangiando le distanze su quelle calcolate attraverso l'integrazione dei cross-picchi.

Anche dal modello si nota come la struttura completamente estesa sia compatibile con i dati sperimentali ricavati dall' NMR.

*Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl IN CDCl<sub>3</sub>*



**Fig. 3.15:** Regione NH-NH e NH-CH<sub>2</sub> [(pNO<sub>2</sub>)Benz] dello spettro NOESY di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz, 2×10<sup>-3</sup> M in CDCl<sub>3</sub>, 298K). Si notano interazioni NH-NH di debole intensità.

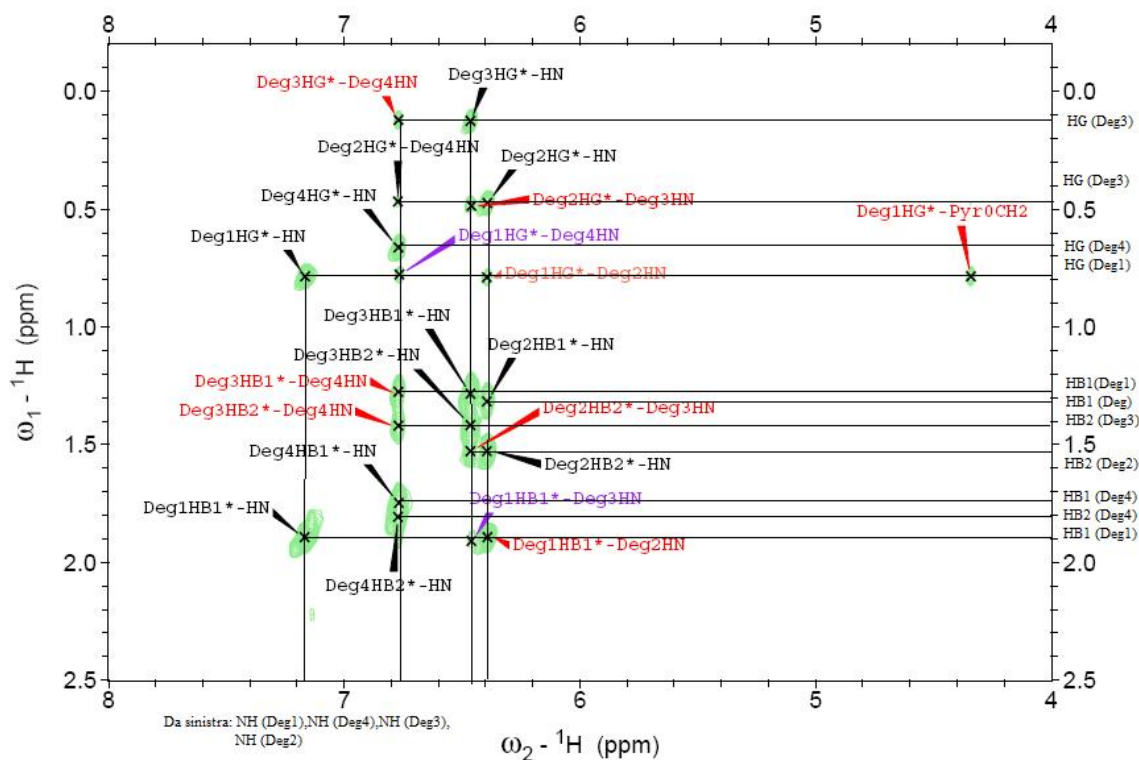


**Fig. 3.16:** Regione  $\beta$ CH-NH e  $\gamma$ CH-NH dello spettro NOESY di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in CDCl<sub>3</sub>, 298K).

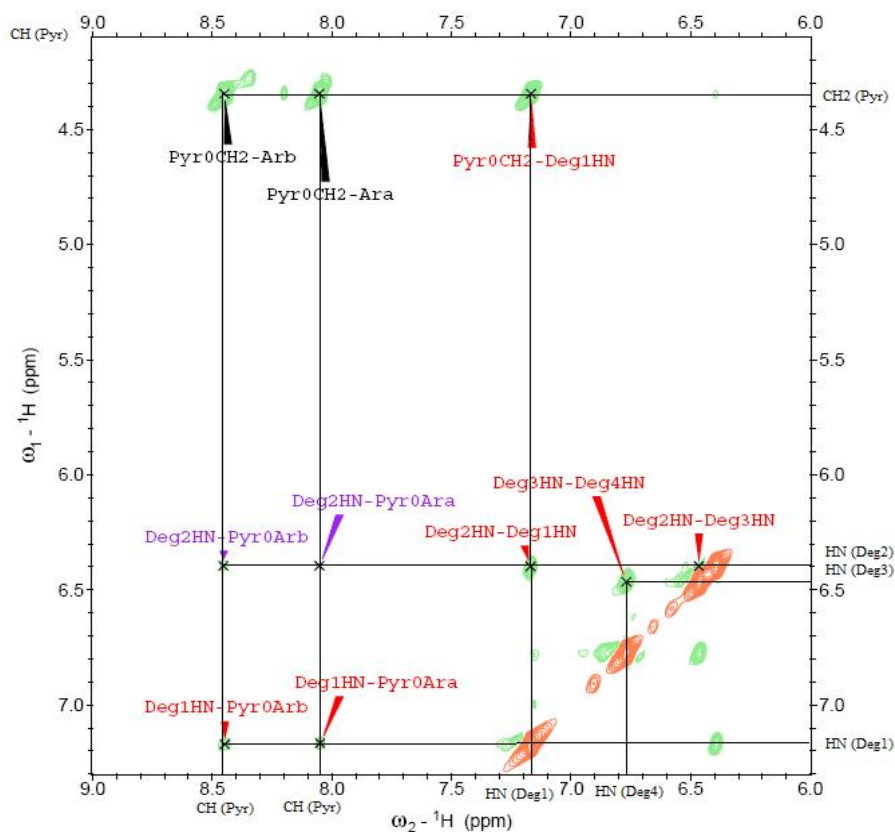
Anche per questo peptide si può affermare che la conformazione preferita, in cloroformio, è di tipo esteso. Si può notare come le interazioni CH $\beta$ -NH+1 siano più intense rispetto alle interazioni CH $\beta$ -NH. I cross-picchi tra i protoni ammidici (fig 3.15) sono di debole intensità e sono coerenti con le distanze tipiche di una struttura C<sub>5</sub>.

### *PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu IN CD<sub>3</sub>CN*

Per verificare la stabilità conformazionale del peptide abbiamo modificato le condizioni di intorno del peptide al fine di indurre una transizione da conformazione estesa a elica. Il parametro più ovvio da modificare è il solvente, che, se di polarità maggiore rispetto al cloroformio, può indurre un ripiegamento della catena. L'acetonitrile deuterato è stato preferito al metanolo per evitare la banda del protone alcolico.



**Fig. 3.17:** Regione  $\beta\text{CH-NH}$  e  $\gamma\text{CH-NH}$  dello spettro NOESY di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298K). In nero sono segnate le interazioni *intra* residuo, in rosso quelle con un residuo direttamente legato e in viola quelle separate da uno o più residui.



**Fig. 3.18:** Regione NH–NH e NH-CH<sub>2</sub> (Pyr) dello spettro NOESY di PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (400 MHz, 2×10<sup>-3</sup> M in CD<sub>3</sub>CN, 298K), si notano le interazioni NH(i)-NH(i+1) tipiche dell'elica<sup>56</sup>.

Il cambio di solvente comporta notevoli variazioni molto interessanti. In primo luogo si nota la comparsa di correlazione tra gli NH ammidici con i loro prossimi, fattore tipico di configurazioni ad elica. Sono presenti tutti i cross-picchi di tipo NH(i)→NH(i+1) tipici delle conformazioni elicoidali. A questi si aggiungono tutti i cross-picchi di tipo βCH(i)→NH(i+1) che, per un peptide composto da soli aminoacidi C<sup>α</sup>-tetrasostituiti vanno a sostituire, nella diagnosi del tipo di conformazione, quelli di tipo αCH(i)→NH(i+1) (regione di finger-print per peptidi contenenti aminoacidi proteici). Insieme ad essi sono presenti anche i segnali NOE *intra*residuo di tipo βCH(i)→NH(i) e γCH(i)→NH(i), con un'intensità leggermente maggiore rispetto agli analoghi segnali *inter*residuo; questo comportamento è abbastanza normale per peptidi in conformazione elicoidale.

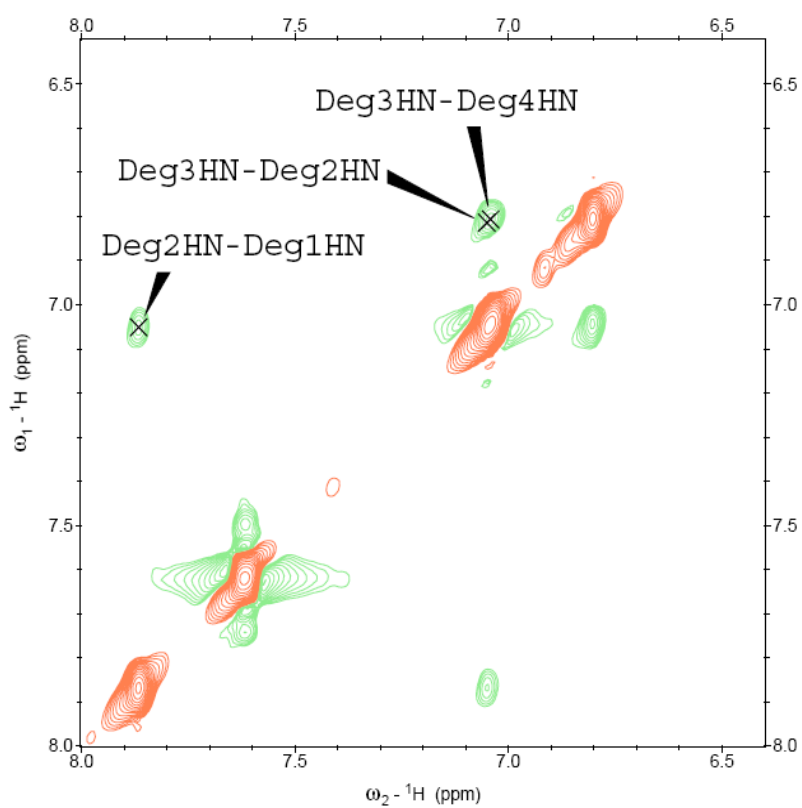
La conferma di questa ipotesi ci viene ancora una volta dall'osservazione dello spettro NOESY. Oltre ai segnali "vicini" tra residui i e residui i+1 si trovano anche dei cross-picchi a lunga distanza e precisamente un segnale βCH(i)→NH(i+2) e un segnale



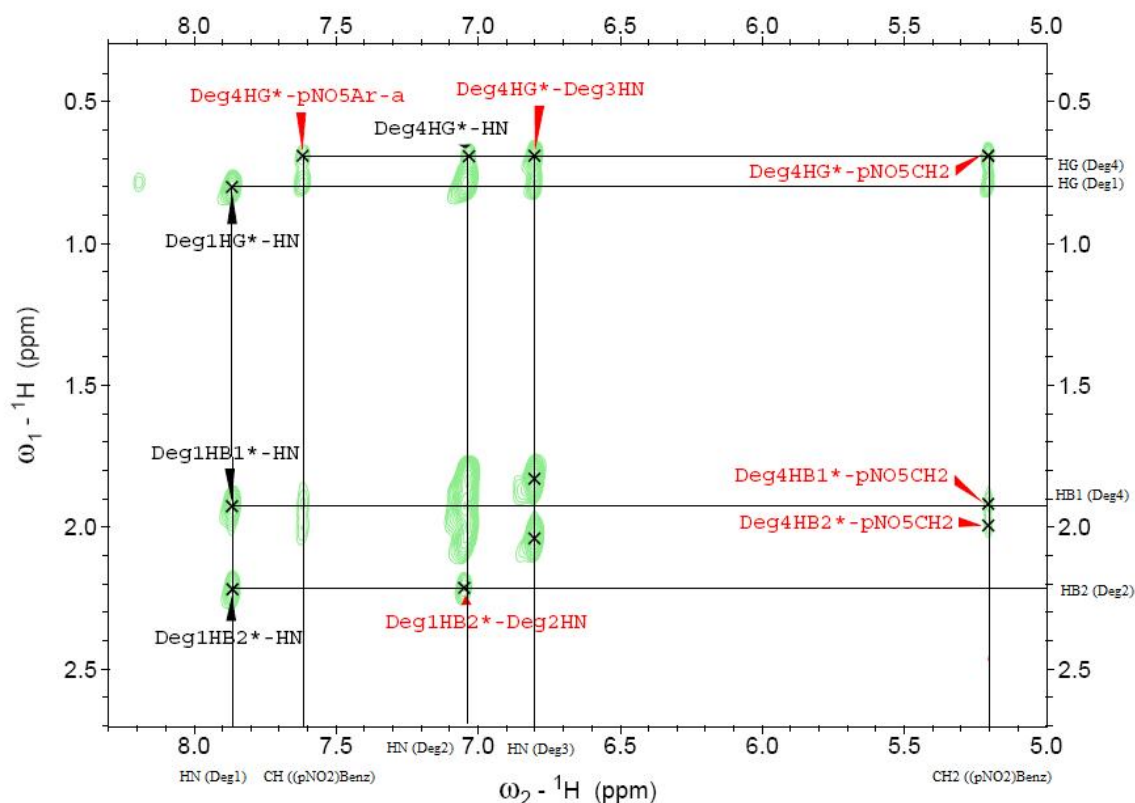
$\gamma\text{CH}(i)\rightarrow\text{NH}(i+3)$  (in viola in figura 3.18.). Il primo è diagnostico della presenza dell'elica  $3_{10}$ , mentre il secondo è compatibile sia con un'elica  $3_{10}$  che con un'elica  $\alpha^5$ .

Volendo disegnare un modello, analogamente a quanto fatto per il peptide in  $\text{CDCl}_3$ , a partire dalle distanze che si possono ricavare dall'integrazione dei segnali NMR dello spettro NOESY, la struttura più probabile sarebbe quella di un'elica.

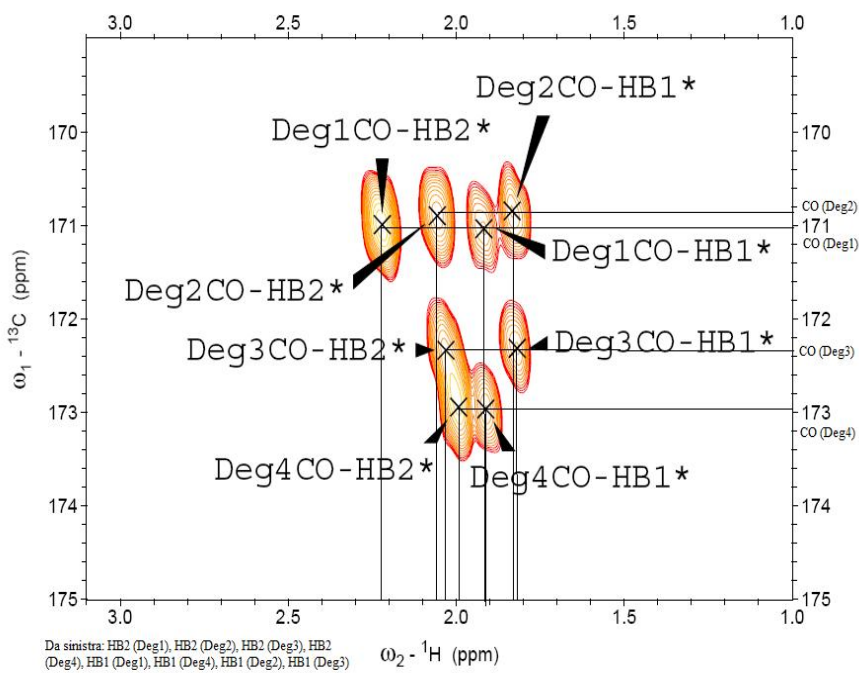
*Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl IN CD<sub>3</sub>CN*



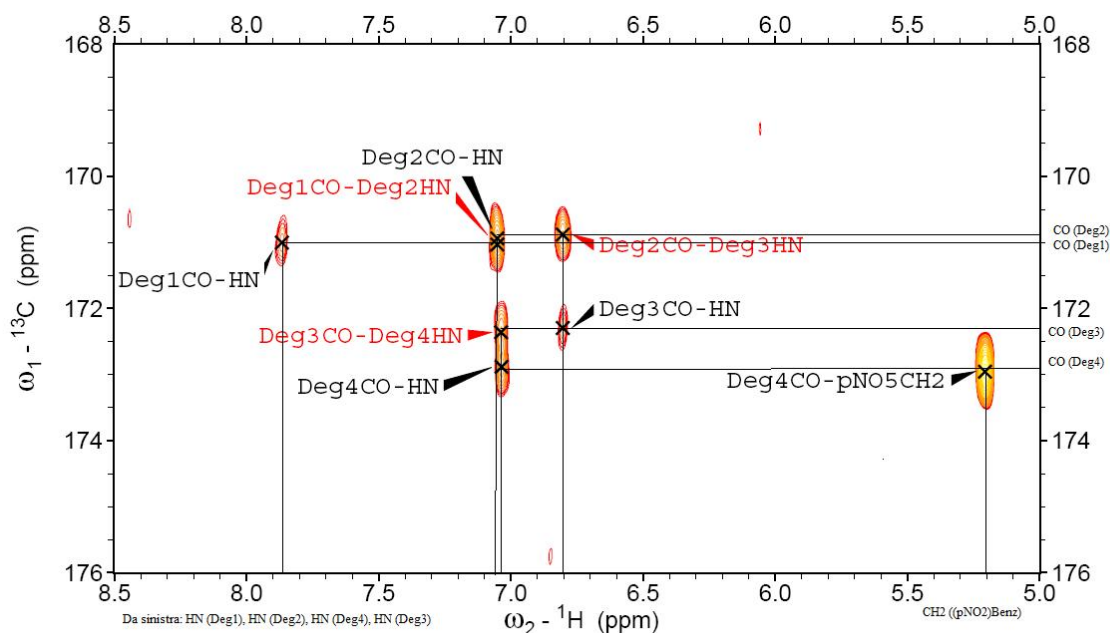
**Fig. 3.19:** Regione NH–NH NOESY di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298K), si notano le interazioni NH(i)-NH(i+1) tipiche dell'elica.



**Fig. 3.20:** Regione  $\beta\text{CH-NH}$  e  $\gamma\text{CH-NH}$  dello spettro NOESY di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in CD<sub>3</sub>CN, 298K).



**Fig. 3.21:** Regione  $\beta\text{CH-CO}$  dello spettro eterocorrelato (CO selettivo) di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in CD<sub>3</sub>CN, 298K).



**Fig. 3.22:** Regione  $\beta\text{CH-CO}$  dello spettro eterocorrelato (CO selettivo) di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (400 MHz,  $2 \times 10^{-3}$  M in CD<sub>3</sub>CN, 298K).

Come nel caso del Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl il peptide in esame presenta una configurazione ad elica in acetonitrile. Nuovamente si notano intense interazioni NH(i)-NH(i+1) nello spettro NOESY e un aumento delle intensità dei segnali CH $\beta$ -NH rispetto agli CH $\beta$ (i)-NH(i+1).

A titolo di esempio riguardo l'assegnazione delle frequenze di risonanza, sono riportate due zone degli spettri eterocorrelati CO selettivi. Questo tipo di analisi permette di apprezzare le interazioni tra i carboni carbonilici e i protoni. Queste interazioni risultano utili per assegnare le frequenze di risonanza dei protoni ammidici e CH<sub>2</sub> $\beta$  dei vari residui. In questo caso si è proceduto a localizzare la frequenza di risonanza del protone ammidico del quarto residuo grazie alla sua interazione con il gruppo (pNO<sub>2</sub>)Bzl e successivamente si è proceduto ad assegnare i segnali dei rimanenti protoni seguendo le interazioni CO(i)-NH(i+1) e CO-NH.

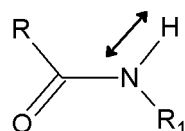
### 3.2 SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO IR

La spettrofotometria di assorbimento IR ci permette di ricavare interessanti informazioni sulla struttura tridimensionale di un peptide, indagando principalmente gli assorbimenti vibrazionali del gruppo ammidico. In particolare è utile analizzare le variazioni degli assorbimenti al variare della conformazione della catena peptidica. Come abbiamo precedentemente evidenziato nell'analisi strutturale mediante NMR, una delle principali differenze tra la conformazione completamente estesa e l'elica  $3_{10}$  è la presenza di gruppi N-H liberi da legami a idrogeno in quest'ultima. Altre differenze sono dovute alla direzione e forza dei legami ad idrogeno che si formano: infatti una conformazione  $C_5$  avrà ponti H meno stabili che influenzeranno, ad esempio, in maniera minore la frequenza di *stretching* del gruppo N-H, mentre una struttura ad elica, o in misura ancora maggiore una struttura a foglietto  $\beta$  pieghettato, andranno a spostare maggiormente ad energie inferiori la sua frequenza di risonanza<sup>57-58</sup>.

In particolare, andremo a valutare gli assorbimenti negli intervalli di frequenza degli *stretching* N-H ( $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ ) e delle ammidi I e II ( $1700-1450\text{ cm}^{-1}$ ).

#### AMMIDE A (STRETCHING N-H, $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ )

In questa zona spettrale cadono gli assorbimenti dovuti agli *stretching* degli N-H ammidici (banda ammidide A, figura 3.23), che variano molto a seconda della presenza e dell'intensità di legami ad idrogeno che impegnino questo gruppo.



**Fig. 3.23:** *stretching* N-H dell'ammide che origina la cosiddetta banda dell'ammide A

In modo qualitativo si potrebbe dire che un legame ad idrogeno esplica una forza attrattiva verso il protone andando a alleggerire il legame N-H che avrà quindi bisogno di minore energia per entrare in risonanza.

Gruppi N-H liberi assorbono a frequenze di circa  $3420\text{ cm}^{-1}$ , mentre gli N-H legati assorbono a minore energia (e quindi minore frequenza). Pertanto, la frequenza di assorbimento dell'ammide A, che dipende dall'intensità del legame ad idrogeno, darà indicazioni sul tipo di struttura tridimensionale adottata da un peptide. Una conformazione completamente estesa sarà caratterizzata da frequenze maggiori ( $\approx 3360\text{ cm}^{-1}$ ) rispetto al foglietto  $\beta$  (assorbimenti a circa  $3300\text{ cm}^{-1}$ ) o ad un'elica (circa  $3330\text{ cm}^{-1}$ ). La frequenza di assorbimento dell'ammide A nell'elica varia con il variare della lunghezza della catena peptidica. Le frequenze tipiche di un'elica iniziano a vedersi con una catena di lunghezza minima di tre residui, numero indispensabile per ottenere un primo avvolgimento ( $\beta$ -turn), ma all'aumentare del numero di residui si ottiene un rafforzamento della struttura elicoidale, in funzione del maggior numero di ponti H, ed uno spostamento del massimo di assorbimento ad energie inferiori. Si osserva, infine, un assestamento del segnale a circa  $3330\text{ cm}^{-1}$ , quando si raggiunge la lunghezza di otto residui e la conformazione ad elica risulta completamente stabilizzata.

Le diverse conformazioni possono essere distinte attraverso i loro assorbimenti di stretching NH, in particolare attraverso la presenza dell'assorbimento di protoni non legati e della frequenza del massimo dell'assorbimento dei protoni legati<sup>32,57,58</sup>.

#### AMMIDE I E II ( $1700\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ )

Nell'intervallo di frequenza che va da  $1700$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$  si possono osservare gli assorbimenti detti ammidine I e II. L'assorbimento ammidine I è dovuto principalmente al moto di *stretching* C=O (circa 80%), con un contributo di *bending* N-H (10%) e di *stretching* C-N (10%). Esso si presenta a frequenze tra i  $1660$  e i  $1620\text{ cm}^{-1}$  (figura 3.24). L'ammide II è invece costituita da un 40% di *stretching* C-N e un 60% di *bending* N-H e si può normalmente osservare a frequenze che vanno dai  $1570$  ai  $1480\text{ cm}^{-1}$  (figura 3.24).

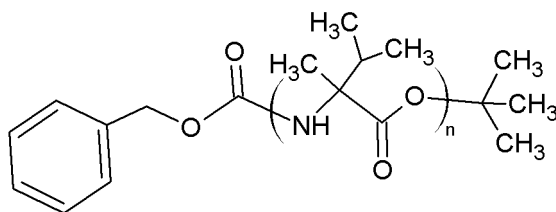


**Figura 3.24:** Rappresentazione dei modi vibrazionali dell'ammide I e dell'ammide II.

Anche questi modi sono influenzati dalla struttura secondaria a cui appartengono e permettono di fare un'analisi qualitativa della conformazione assunta dal peptide<sup>32</sup>.

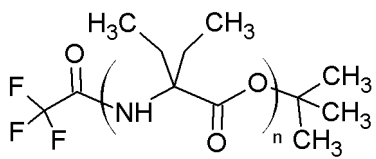
### ANALISI DELLE SERIE PEPTIDICHE DI QUESTA TESI

Per valutare le conformazione assunta dai peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl abbiamo confrontato gli spettri ottenuti con quelli di due peptidi di cui è nota la conformazione. Per l'elica 3<sub>10</sub> abbiamo preso come riferimento la serie omopeptidica Z-((αMe)Val)<sub>n</sub>-OtBu (n = 3-8) (figura 3.25) di cui è ben nota la stabilità conformazionale e la struttura elicoidale<sup>59</sup>.



**Fig. 3.25:** Struttura chimica della serie omopeptidica Z-((αMe)Val)<sub>n</sub>-OtBu, nota assumere conformazioni elicoidali di tipo 3<sub>10</sub> in CDCl<sub>3</sub>.

Per la valutazione dei segnali dovuti alla conformazione completamente estesa abbiamo utilizzato come riferimento la serie omopeptidica Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu (n = 1-5) (figura 3.26) di cui è stata ampiamente dimostrata l'adozione di strutture multiple di tipo C<sub>5</sub> in soluzioni di CDCl<sub>3</sub>.<sup>15</sup>



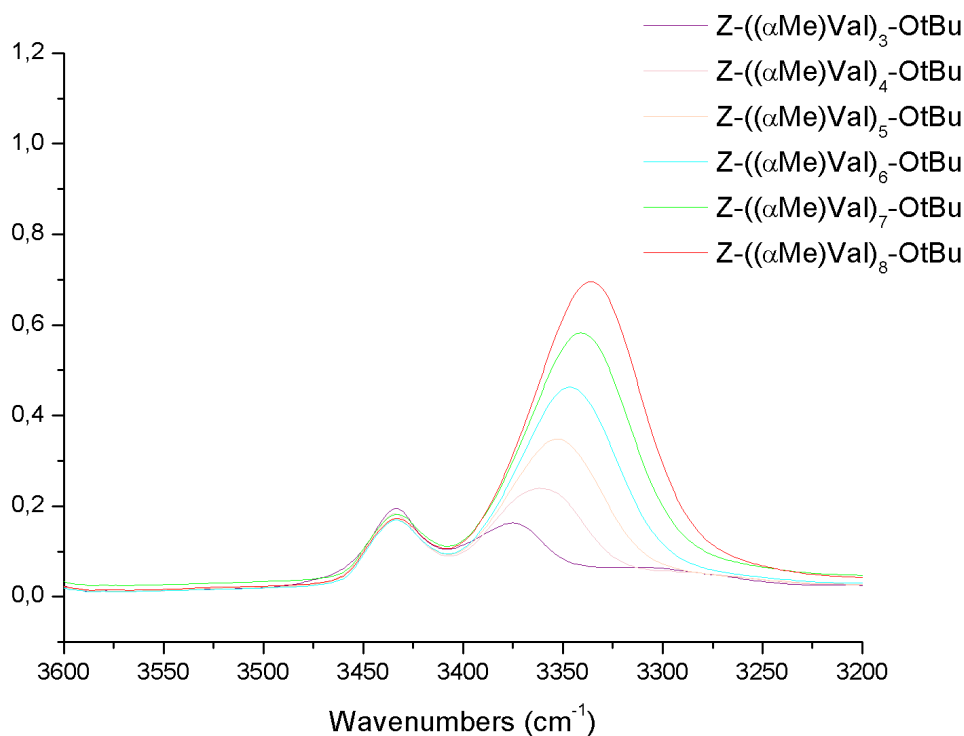
**Fig. 3.26:** Struttura chimica della serie omopeptidica Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu, nota per preferire la conformazione completamente estesa in CDCl<sub>3</sub>.

Per entrambi i riferimenti, l'intensità degli spettri è stata normalizzata rispetto al segnale del carbonile estereo, uno solo per tutti i peptidi, in modo da eliminare gli effetti dovuti a imprecisioni delle pesate. Si è inoltre eseguita una sottrazione dello spettro del dipeptide omologo da quelli della serie Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu (n = 3-5) e del tripeptide nella serie Z-((αMe)Val)<sub>n</sub>-OtBu (n = 4-8). Quest'ultima operazione risulta utile per eliminare

i contributi dovuti alle due estremità C e N terminali, che presentano assorbimenti leggermente diversi per l'influenza dei gruppi protettori. Nel caso dell' $(\alpha\text{Me})\text{Val}$  si sottrae il *tripeptide* in quanto è il primo della serie a dare luogo ad un  $\beta$ -turn.

### Peptidi modello in elica $3_{10}$

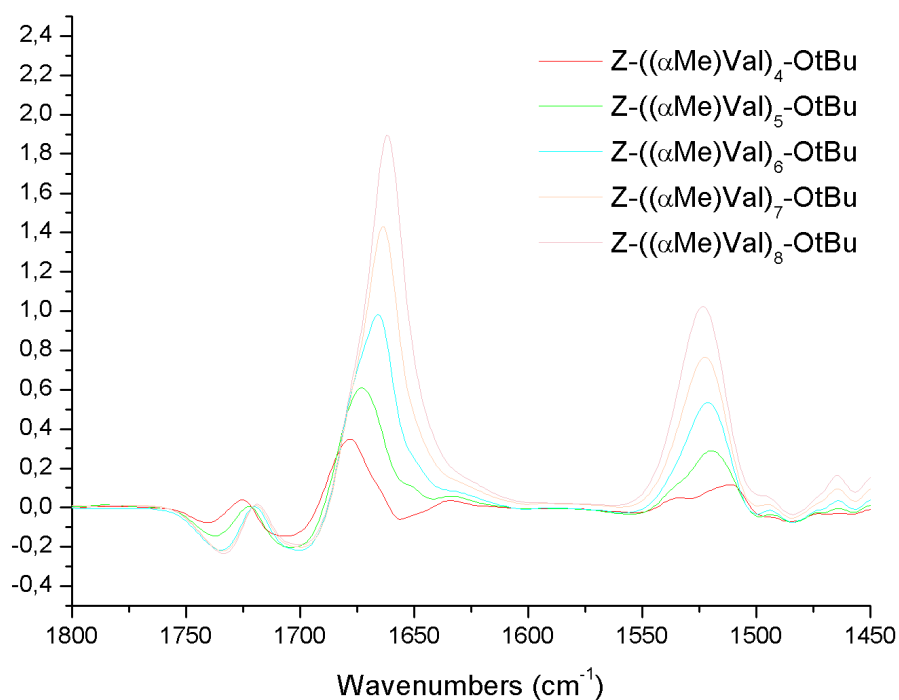
Gli spettri di assorbimento IR nella zona ammidica A per la serie omopeptidica  $Z-(\alpha\text{Me})\text{Val}_n\text{-OtBu}$  ( $n = 3-8$ ) sono mostrati in figura 3.27. La tabella 3.8 riporta invece gli assorbimenti nelle zone ammidica A, ammidica I e ammidica II. Infine, in figura 3.28 si trovano gli spettri risultanti dalle sottrazioni sopra descritte.



**Fig. 3.27:** Spettri di assorbimento IR di  $Z-(\alpha \text{ Me})\text{Val}_n\text{-OtBu}$  ( $n = 3-8$ ) in  $\text{CDCl}_3$ , nella regione ammidica A, alla concentrazione 1 mM. Gli spettri sono normalizzati per l'assorbimento a  $1721 \text{ cm}^{-1}$ .

**Tabella 3.8:** Frequenze di assorbimento IR dei peptidi sottoelencati in deuteriocloroformio alla concentrazione di  $1 \times 10^{-3}$  M.

Peptide (in CDCl <sub>3</sub> )	3600-3200 cm <sup>-1</sup>	1800-1500 cm <sup>-1</sup>
Z-(( $\alpha$ Me)Val) <sub>3</sub> -OtBu	3434, 3362	1722, 1669, 1500
Z-(( $\alpha$ Me)Val) <sub>4</sub> -OtBu	3434, 3362	1723, 1677, 1507
Z-(( $\alpha$ Me)Val) <sub>5</sub> -OtBu	3433, 3353	1722, 1671, 1513, 1501
Z-(( $\alpha$ Me)Val) <sub>6</sub> -OtBu	3434, 3347	1721, 1666, 1517, 1501
Z-(( $\alpha$ Me)Val) <sub>7</sub> -OtBu	3433, 3341	1721, 1664, 1521, 1501
Z-(( $\alpha$ Me)Val) <sub>8</sub> -OtBu	3432, 3336	1721, 1662, 1521, 1501



**Fig. 3.28:** Spettri di assorbimento IR, alla concentrazione 1 mM in CDCl<sub>3</sub>, ottenuti sottraendo lo spettro di Z-(( $\alpha$ Me)Val)<sub>3</sub>-OtBu da quelli di Z-(( $\alpha$ Me)Val)<sub>n</sub>-OtBu ( $n = 4-8$ ). Le intensità degli spettri sono state normalizzate a 1721 cm<sup>-1</sup>. E' mostrata la zona delle ammidi I e II.

AMMIDE A: Come si nota dagli spettri sopra riportati (figura 3.27), tutti i peptidi presentano una banda a 3433 cm<sup>-1</sup> dovuta allo *stretching* degli NH liberi da legami a

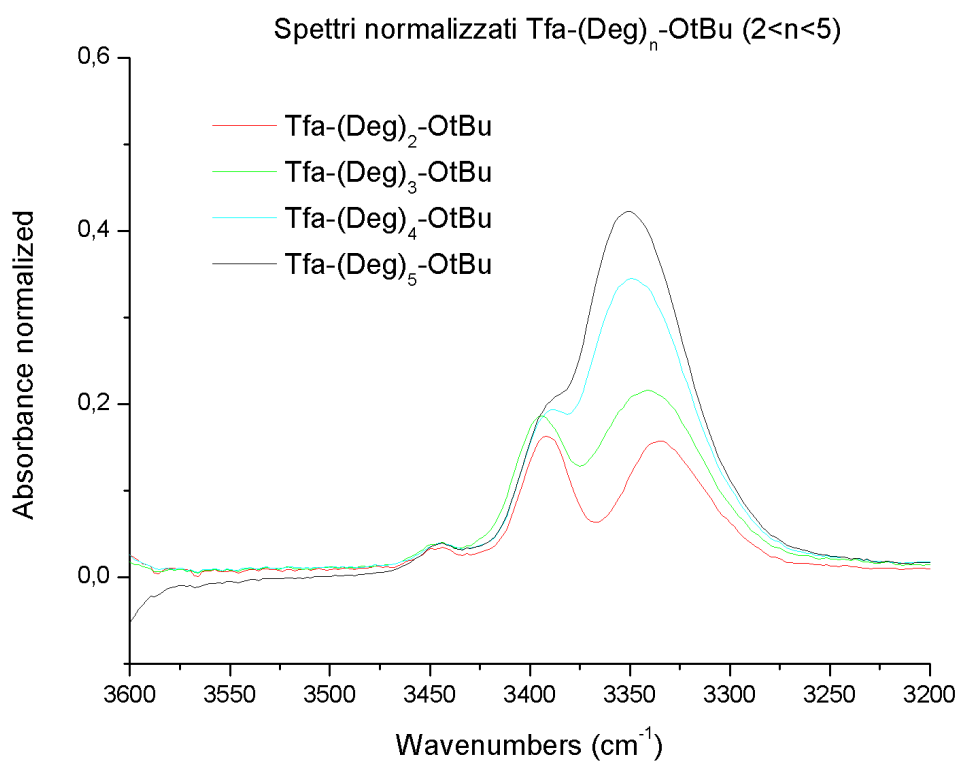


idrogeno. L'intensità di tale banda non cresce al crescere della catena, in quanto gli NH ammidici non impegnati sono sempre e solo quelli dei primi due residui. Le bande a frequenze minori sono dovute agli NH impegnati in legami H. Esse presentano l'andamento tipico di un'elica, in questo caso la  $3_{10}$ , in quanto all'aumentare della lunghezza della catena si spostano a numeri d'onda minori, a causa della stabilizzazione della struttura secondaria, assestandosi attorno ai  $3340\text{ cm}^{-1}$  per i peptidi più lunghi.

AMMIDE I E II: Tipicamente le  $\alpha$  eliche e le eliche  $3_{10}$  mostrano in genere una sola banda dovuta all'ammide I attorno ai  $1650\text{ cm}^{-1}$  (figura 3.28). La banda a  $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$  è dovuta al moto dell'ammide II e presenta anch'essa un andamento caratteristico. Per i peptidi più corti il segnale è formato da due bande in funzione della presenza di N-H legati attraverso ponti H e di N-H liberi. Per i peptidi più lunghi, prevale la banda delle ammidi legate. Questo segnale presenta uno *shift* verso numeri d'onda maggiori. Infine, si noti il caratteristico rapporto tra le aree dei segnali dell'ammide I e II che risulta di circa 2:1.

### **Peptidi modello in conformazione completamente estesa**

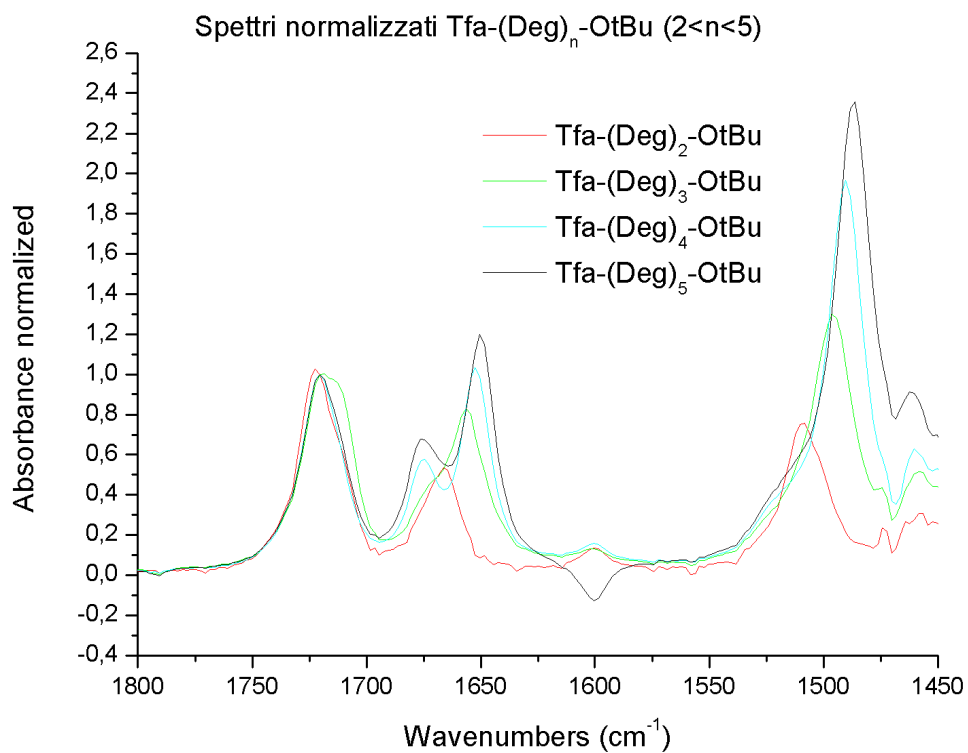
Gli spettri di assorbimento IR della serie omopeptidica Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu nelle regioni ammidate A e ammidate I e II e le relative frequenze di assorbimento sono riportati nelle figure 3.29 e nella tabella 3.9, rispettivamente. La figura 3.30 mostra invece gli spettri risultanti sottraendo quello del *dipeptide* dagli spettri degli omologhi superiori.



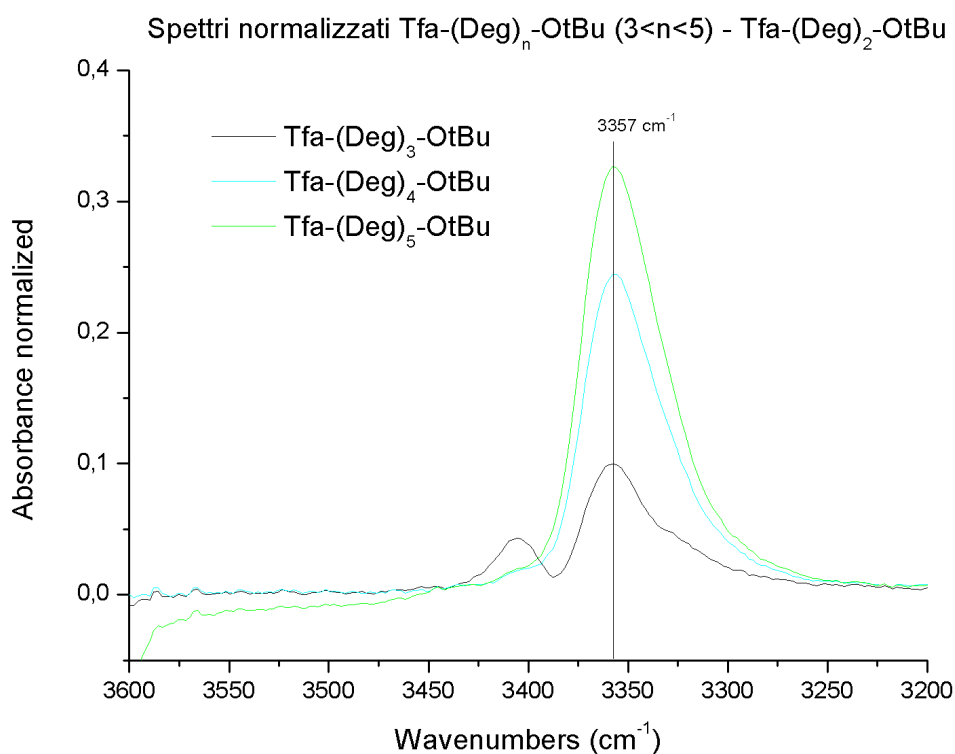
**Fig. 3.29:** Spettri di assorbimento IR di Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu ( $n = 2-5$ ) in  $\text{CDCl}_3$ , nella regione amide A, alla concentrazione 1 mM. Gli spettri sono normalizzati per l'assorbimento a  $1720 \text{ cm}^{-1}$ .

**Tabella 3.9:** Frequenze di assorbimento IR dei peptidi sottoelencati in  $\text{CDCl}_3$  alla concentrazione di  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Peptide (in $\text{CDCl}_3$ )	3600-3200 $\text{cm}^{-1}$	1800-1450 $\text{cm}^{-1}$
Tfa-(Deg) <sub>2</sub> -OtBu	3446, 3392, 3338	1722, 1666, 1508
Tfa-(Deg) <sub>3</sub> -OtBu	3446, 3394, 3338	1720, 1678, 1656, <u>1496</u>
Tfa-(Deg) <sub>4</sub> -OtBu	3446, 3394, <u>3358</u> , 3337	1720, 1676, 1652, <u>1490</u>
Tfa-(Deg) <sub>5</sub> -OtBu	3446, 3396, <u>3360</u>	1720, 1676, 1650, <u>1486</u>



**Fig. 3.30:** Spettri di assorbimento IR di Tfa-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu ( $n = 2-5$ ) in CDCl<sub>3</sub>, nella regione delle ammidi I e II, alla concentrazione 1 mM. Le intensità degli spettri sono normalizzate per l'assorbimento a 1720 cm<sup>-1</sup>.



**Fig. 3.31:** Spettri di assorbimento IR, alla concentrazione 1 mM in  $\text{CDCl}_3$ , ottenuti sottraendo lo spettro di  $\text{Tfa-(Deg)}_2\text{-OtBu}$  da quelli di  $\text{Tfa-(Deg)}_n\text{-OtBu}$  ( $n = 3-5$ ). Le intensità degli spettri sono state normalizzate a  $1720 \text{ cm}^{-1}$ . E' mostrata la regione dell'ammide A.

**STRETCHING NH:** Per i peptidi  $\text{Tfa-(Deg)}_n\text{-OtBu}$  ( $n = 2-5$ ) gli assorbimenti sopra  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , dovuti allo *stretching* degli NH liberi da legami a idrogeno, sono estremamente deboli in quanto tutti gli NH sono impegnati in ponti idrogeno *intra*residuo. La banda visibile a circa  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , che all'aumentare della lunghezza della catena rimane di intensità costante, è assegnabile allo stiramento N-H del residuo C-terminale. E' dovuta alla conformazione completamente estesa ( $C_5$ ) stabilizzata da un legame idrogeno *intramolecolare* di tipo  $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ , in cui l'accettore di legame idrogeno è il C=O dell'estere *OtBu*. Essa cade a numeri d'onda superiori, rispetto alle bande degli altri N-H ammidici, poiché il C=O estereo è un peggior accettore di legame ad H rispetto al C=O ammidico. La banda degli NH legati presenta un segnale a  $3340 \text{ cm}^{-1}$ , con una deriva fino a  $3350 \text{ cm}^{-1}$  per il *pentapeptide*. Eseguendo una sottrazione

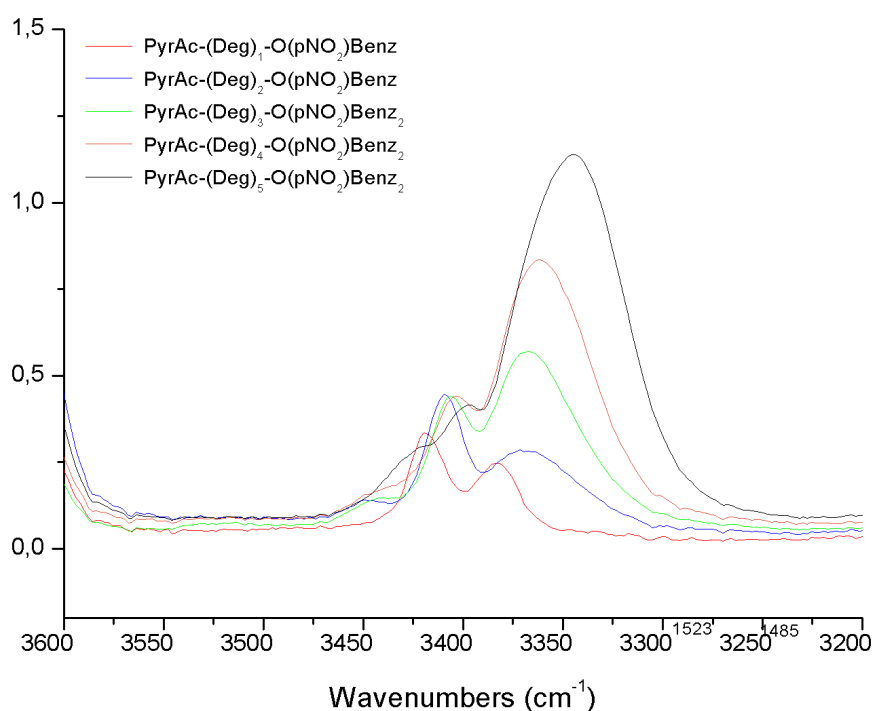
dello spettro del *dipeptide* da quello degli omologhi superiori eliminiamo il contributo delle due estremità del peptide e possiamo osservare come la banda degli NH legati risulti ferma a circa  $3360\text{ cm}^{-1}$ . Questa frequenza è caratteristica delle strutture  $C_5$ .

AMMIDE I E II: Rispetto all'elica  $3_{10}$ , si nota immediatamente come il rapporto delle aree tra ammidi I e II risulti invertito: qui la banda dovuta all'ammide II ha intensità circa doppia rispetto a quella dell'ammide I. Il segnale dell'ammide I si presenta a circa  $1660\text{ cm}^{-1}$  sotto forma di un doppio picco con una separazione di  $27\text{ cm}^{-1}$  per il *pentapeptide*.

Il segnale dell'ammide II è costituito da una sola banda e risulta spostato a numeri d'onda inferiori, rispetto all'elica  $3_{10}$ , e al crescere della catena peptidica si muove verso frequenze minori (da  $1494\text{ cm}^{-1}$  a  $1487\text{ cm}^{-1}$ ), in controtendenza rispetto all'elica  $3_{10}$ .

### **PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (in CDCl<sub>3</sub>)**

Gli spettri di assorbimento IR della serie omopeptidica PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(NO<sub>2</sub>)Bzl (in CDCl<sub>3</sub>) nelle regioni ammidi A e le relative frequenze di assorbimento sono riportati nella figura 3.32 e nella tabella 3.10, rispettivamente.



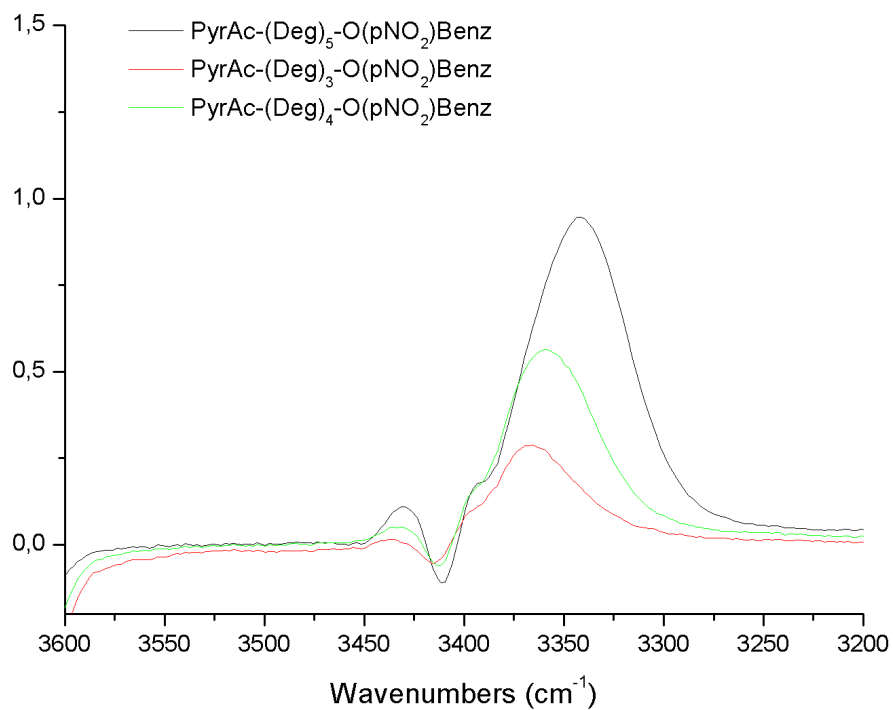
**Fig. 3.32:** Spettri di assorbimento IR nella regione amide A, alla concentrazione 1 mM in  $\text{CDCl}_3$ . Le intensità degli spettri sono state normalizzate a  $1732 \text{ cm}^{-1}$ .

**Tabella 3.10:** Frequenze di assorbimento IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) dei peptidi sottoelencati in  $\text{CDCl}_3$  alla concentrazione di  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$

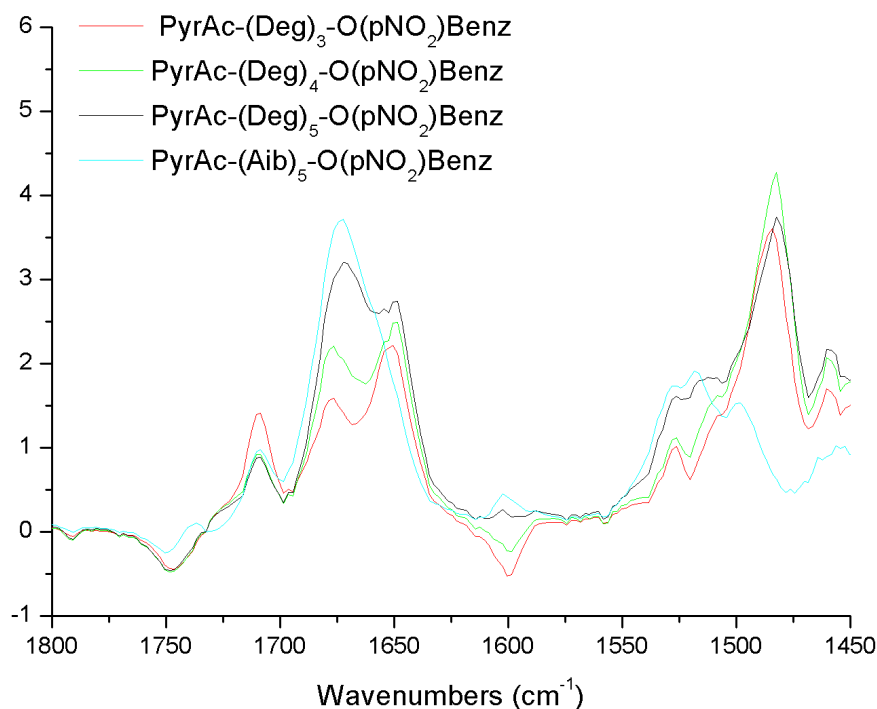
Peptide (in $\text{CDCl}_3$ )	3600-3200 $\text{cm}^{-1}$	1800-1450 $\text{cm}^{-1}$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	<u>3420</u> , <u>3382</u>	1724, 1668, 1594, <u>1520</u> , <u>1498</u>
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3450, 3410, <u>3376</u>	1718, 1672, <u>1656</u> , 1594, <u>1520</u> , <u>1480</u>
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3444, 3408, <u>3372</u>	1724, 1704, <u>1662</u> , <u>1626</u> , 1594, <u>1518</u> , <u>1477</u>
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3450, 3406, <u>3370</u>	1716, <u>1665</u> , <u>1643</u> , 1594, <u>1520</u> , <u>1472</u>
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3428, 3400, <u>3340</u>	1716, <u>1662</u> , <u>1643</u> , 1594, <u>1516</u> , <u>1472</u>
PyrAc-(Aib) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	<u>3460</u> , 3426, 3400, <u>3344</u>	1732, <u>1666</u> , 1594, <u>1516</u>

La figura 3.33 mostra, per le zone amide A, lo spettro risultante sottraendo quello del *dipeptide* dagli spettri degli omologhi superiori. Poiché nella regione delle ammidi I e II assorbe anche il gruppo nitro, in tale regione si è preferito sottrarre lo spettro del *p*-nitrobenzil acetato, sintetizzato allo scopo (figura 3.34). La stessa figura

riporta anche per confronto lo spettro di PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl, un peptide sicuramente in elica  $3_{10}$ .



**Fig. 3.33:** Spettri di assorbimento IR nella regione amide A, alla concentrazione 1 mM in CDCl<sub>3</sub>, ottenuti sottraendo lo spettro di PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl da quelli degli omologhi superiori. Le intensità degli spettri sono state normalizzate a 1732 cm<sup>-1</sup>.



**Fig. 3.34:** Spettri di assorbimento IR nella regione delle ammidi I e II A, alla concentrazione 1 mM in  $\text{CDCl}_3$ , ottenuti sottraendo lo spettro di  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_2\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  da quelli degli omologhi superiori. E' anche riportato lo spettro di  $\text{PyrAc}-(\text{Aib})_5\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$ . Le intensità degli spettri sono state normalizzate a  $1732\text{ cm}^{-1}$ .

AMMIDE A: gli spettri sottrazione di figura 3.33 non dovrebbero contenere il contributo del *dipeptide* e quindi i segnali delle ammidi N e C terminali legate a pirene e *p*-nitrobenzile. La serie peptidica in esame mostra un comportamento intermedio tra le due situazioni (elica  $3_{10}$  e conformazione completamente estesa). Come si può notare i peptidi più corti mostrano una banda degli NH legati attorno ai  $3360\text{ cm}^{-1}$  con una banda degli NH liberi poco intensa, caratteristiche tipiche di una conformazione  $C_5$ , ma allo stesso tempo si nota un incremento di quest'ultima banda e uno spostamento del massimo della banda degli NH legati verso numeri d'onda minori. Per il *pentapeptide* osserviamo un brusco cambio di comportamento con un salto della banda degli NH legati a  $3340\text{ cm}^{-1}$  e un incremento più accentuato della banda degli NH liberi. Questo andamento si può razionalizzare se pensiamo che il nostro peptide assuma sia la



configurazione completamente estesa che quella ad elica e che questo equilibrio sia spostato verso l'elica  $3_{10}$  per il *pentapeptide*.

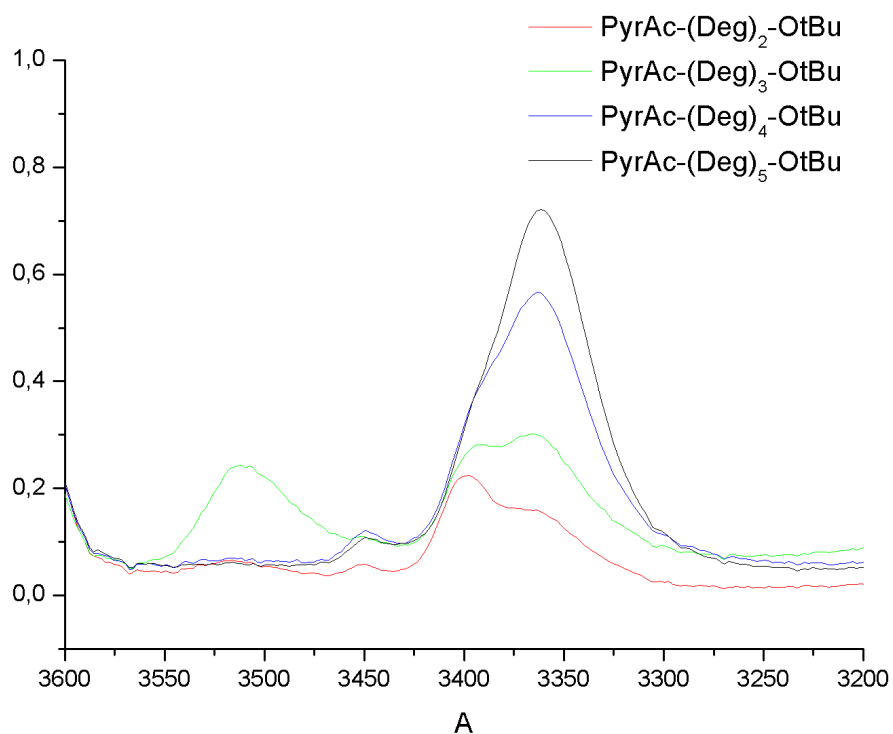
AMMIDE I E II: Possiamo immediatamente notare come le bande delle ammidi I e II abbiano aree confrontabili, con un comportamento intermedio tra quello dell'elica  $3_{10}$  e della conformazione  $C_5$ .

Il segnale dell'ammide I è simile alla doppia banda dovuta alla conformazione estesa, ma il *pentapeptide* presenta un brusco incremento della banda a maggiori numeri d'onda, avvicinandosi maggiormente allo spettro di un'elica  $3_{10}$ .

L'ammide II conferma queste osservazioni mostrando una preponderanza della banda a minori numeri d'onda per il *tri* e *tetrapeptide*, mentre nel *pentapeptide* diminuisce di intensità la banda a  $1480\text{ cm}^{-1}$  e aumenta quella a  $1510\text{ cm}^{-1}$ . Per permettere un confronto visuale più immediato è stato inserito nel grafico anche lo spettro del  $\text{PyrAc}-(\text{Aib})_5\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  per il quale l'analisi NMR (vedi sezione precedente) indica una struttura  $3_{10}$ -elicoidale. Per poter confrontare questi diversi spettri la sottrazione è stata fatta con lo spettro dell'acetato di *p*-nitrobenzile e non sul *dipeptide*.

### ***PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-OtBu (in CDCl<sub>3</sub>)***

Per verificare se il comportamento inaspettato (conformazione mista estesa/elica  $3_{10}$ ) dei peptidi  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_n\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  fosse dovuto a interazioni tra le due estremità aromatiche (nella struttura cristallina del *dipeptide*, vedi più avanti, si osserva uno *stacking* tra pirene e nitrobenzene), abbiamo eseguito le analisi IR anche sulla serie di peptidi mancanti dell'unità *p*-nitrobenzilica C-terminale. La figura 3.35 mostra gli spettri nella regione ammidi A degli omopeptidi  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_n\text{-OtBu}$  ( $n = 2-5$ ) e la tabella 3.11 ne riporta le frequenze di assorbimento più significative.

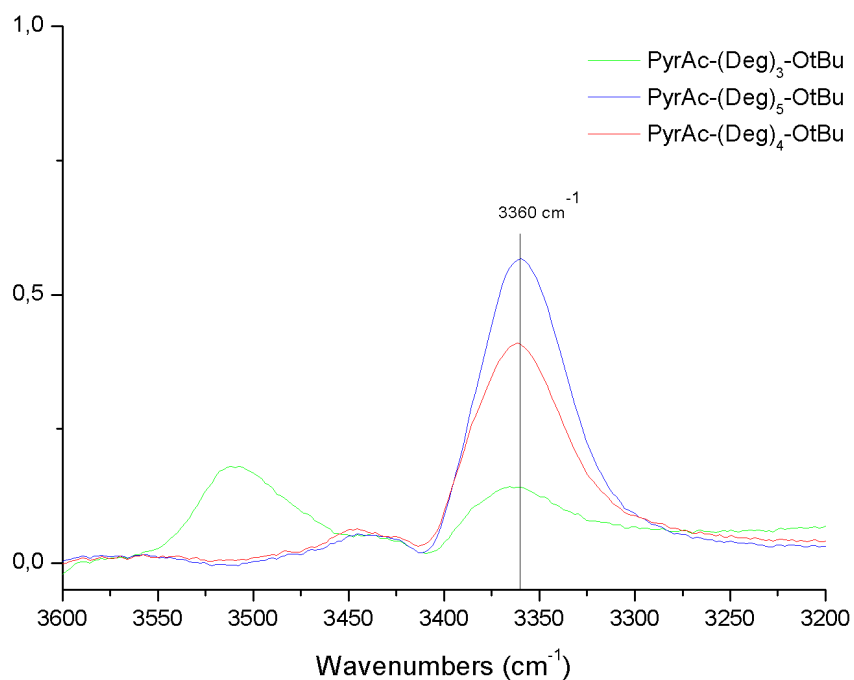


**Fig. 3.35:** Spettri di assorbimento IR nella regione amide A, alla concentrazione 1 mM in  $\text{CDCl}_3$ . Le intensità degli spettri sono state normalizzate a  $1720 \text{ cm}^{-1}$ .

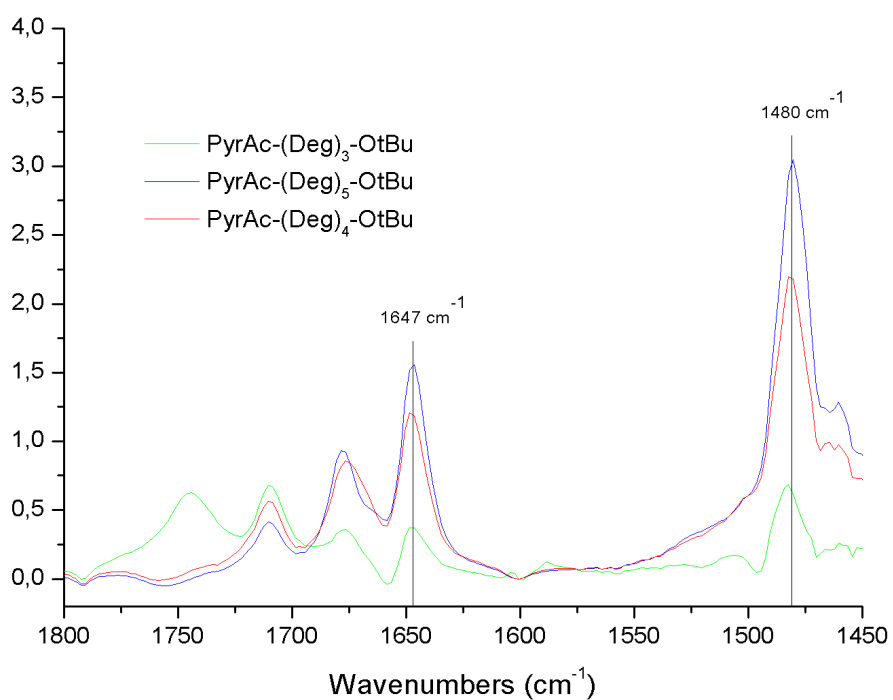
**Tabella 3.11:** Frequenze di assorbimento IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) dei peptidi sotto elencati in  $\text{CDCl}_3$  alla concentrazione di  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Peptide (in $\text{CDCl}_3$ )	3600-3200 $\text{cm}^{-1}$	1800-1450 $\text{cm}^{-1}$
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -OtBu	3447, 3397, 3363	1716, 1668, 1652, 1594, 1480
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -OtBu	3516, 3450, 3398, 3364	1740, 1716, 1674, 1644, 1594, 1478
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -OtBu	3450, 3396, 3362	1716, 1674, 1644, 1594, 1478
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -OtBu	3450, 3396, 3364	1716, 1674, 1644, 1594, 1478

Nelle figure 3.36 e 3.37 sono riportati gli spettri ottenuti sottraendo quello del dipeptide dagli spettri degli omologhi superiori.



**Fig. 3.36:** Spettri di assorbimento IR nella regione amide A, alla concentrazione 1 mM in CDCl<sub>3</sub>, ottenuti sottraendo lo spettro di PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu da quelli degli omologhi superiori. Le intensità degli spettri sono state normalizzate a 1720 cm<sup>-1</sup>.



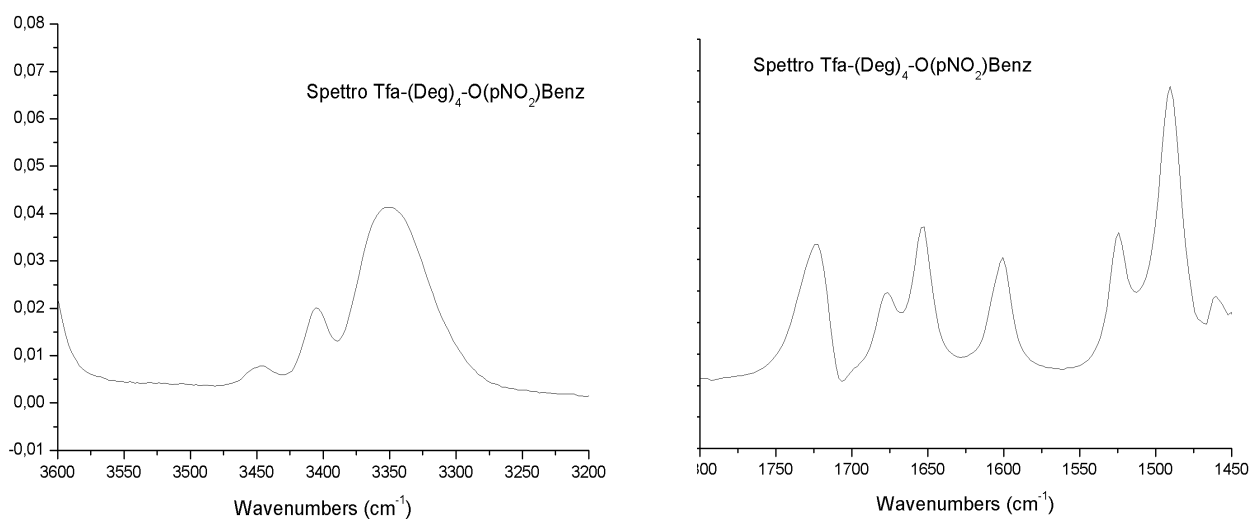
**Fig. 3.37:** Spettri di assorbimento IR nella regione 1800-1450  $\text{cm}^{-1}$ , alla concentrazione 1 mM in  $\text{CDCl}_3$ , ottenuti sottraendo lo spettro di PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu da quelli degli omologhi superiori. Le intensità degli spettri sono state normalizzate a 1720  $\text{cm}^{-1}$ .

STRETCHING NH: si osserva che negli spettri non sottratti (figura 3.35) il segnale degli NH liberi è poco intenso e che negli spettri sottratti (figura 3.36) il massimo delle bande è centrato a 3360  $\text{cm}^{-1}$ . Queste evidenze sono caratteristiche della conformazione completamente estesa. Va osservato che la banda sopra 3500  $\text{cm}^{-1}$  nel tripeptide è probabilmente dovuta alla presenza di acqua nel campione.

AMMIDE I E II: Anche in questa zona i segnali mostrano un andamento tipico di una conformazione C<sub>5</sub> con il picco dell'ammide II centrato a 1480  $\text{cm}^{-1}$  e di intensità doppia rispetto all'ammide I, che comprende due picchi con il maggiore posto a 1647  $\text{cm}^{-1}$ .

### ***Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (in CDCl<sub>3</sub>)***

Per completare il quadro, si è anche sintetizzato e studiato un peptide privo di gruppo pirenico: Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl. La figura 3.38 mostra gli spettri in  $\text{CDCl}_3$  e la tabella 3.12 ne riporta le frequenze di assorbimento più significative.



**Fig. 3.38:** Spettro di assorbimento IR di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl in  $\text{CDCl}_3$  alla concentrazione 1 mM, nelle regioni delle ammidi A, I e II.

**Tabella 3.12:** Frequenze di assorbimento IR di Tfa-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl in CDCl<sub>3</sub> alla concentrazione di 1×10<sup>-3</sup> M.

Peptide (in CDCl <sub>3</sub> )	3600-3200 cm <sup>-1</sup>	1800-1450 cm <sup>-1</sup>
Tfa-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3448, 3406, 3364, 3340	1715, 1672, 1648, 1594, 1520, 1484

STRETCHING NH: Si può notare la bassa intensità del segnale degli NH liberi e la banda degli NH legati posta sui 3350 cm<sup>-1</sup>.

AMMIDE I E II: Non avendo eseguito nessuna sottrazione si vedono due segnali a 1524 e 1600 cm<sup>-1</sup> dovuti al *p*-nitrobenzile C terminale. Escludendo quest'ultimi dalle nostre considerazioni possiamo notare come anche questo peptide mostri caratteristiche da catena estesa con un rapporto ammidine I/II di 1:2, segnale dell'ammidine I costituito da due picchi e segnale dell'ammidine I posto sotto i 1500 cm<sup>-1</sup>. Pertanto, possiamo concludere che l'abbondanza di strutture <sub>3</sub><sub>10</sub>-elicoidali in soluzione di CDCl<sub>3</sub>, osservata per i peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (*n* = 2-5), è probabilmente imputabile ad un effetto dei due gruppi aromatici N- e C- terminali.

## Studio dell'effetto del solvente

*PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (in CH<sub>3</sub>CN)*

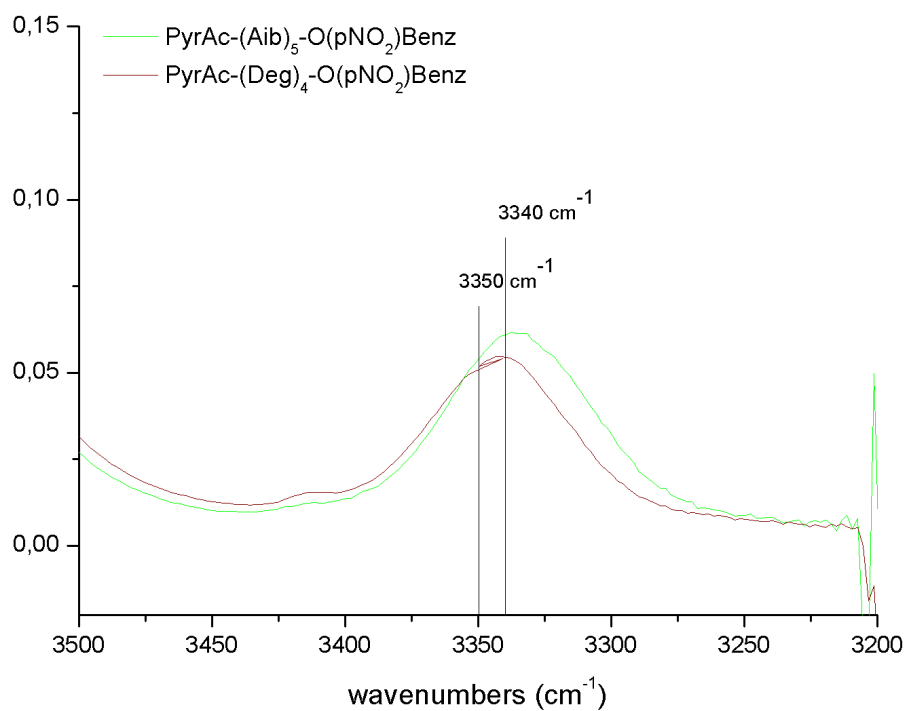
*PyrAc-(Deg)<sub>4</sub>-OtBu (in CH<sub>3</sub>CN)*

*PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (in CH<sub>3</sub>CN)*

La compresenza della struttura completamente estesa e dell'elica <sub>3</sub><sub>10</sub> nei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl può essere interessante in quanto ci permette di giocare sulla struttura secondaria variando le condizioni di intorno. In particolare abbiamo aumentato la polarità del solvente e registrato lo spettro di assorbimento IR (come precedentemente era stato fatto anche nell'analisi NMR 2D).

Il solvente utilizzato, l'acetonitrile, presenta l'inconveniente del segnale dello *scissoring* e dello stiramento dei protoni del CH<sub>3</sub>. Essi rendono meno interpretabile la

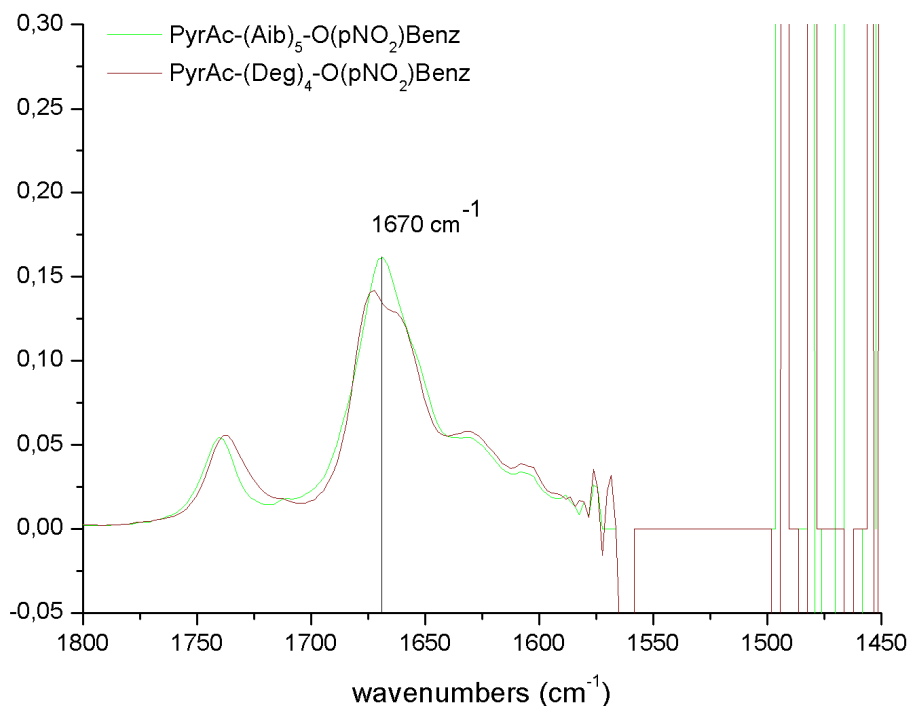
zona dello *stretching* NH e vanno a saturare la zona dell'ammide II. Sono tuttora in corso misure in acetonitrile deuterato. Alcuni dati preliminari sono riportati di seguito.



**Fig. 3.39:** Spettri di assorbimento IR per i peptidi indicati, in  $\text{CH}_3\text{CN}$  alla concentrazione 1 mM, nella regione dell'ammide A.

**Tabella 3.13:** frequenze di assorbimento IR dei peptidi indicati in  $\text{CH}_3\text{CN}$  alla concentrazione 1 mM.

<b>Peptide (in <math>\text{CH}_3\text{CN}</math>)</b>	<b>3600-3200 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>1800-1600 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3412, <u>3341</u>	1732, <u>1668</u> , 1630, 1608
PyrAc-(Aib) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	3413, <u>3336</u>	1732, <u>1663</u> , 1630, 1608



**Fig. 3.40:** Spettri di assorbimento IR per i peptidi indicati, in  $\text{CH}_3\text{CN}$  alla concentrazione 1 mM, nella regione dell'ammide I.

**STRETCHING NH:** Per effetto dei segnali dovuti all'acetonitrile non si vedono chiaramente i segnali dovuti ai protoni ammidici liberi, ma dal segnale dei protoni legati si nota come il *pentapeptide* dell'Aib e il  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_4\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  abbiano il massimo posto a  $3340\text{ cm}^{-1}$ , valore tipico della conformazione a elica.

**AMMIDE I E II:** La zona dell'ammide II risulta saturata in quanto coperta dal segnale del *bending* del  $\text{CH}_3$  dell'acetonitrile. La zona dell'ammide I conferma la tendenza dei peptidi ad assumere la conformazione elicoidale. Il *pentapeptide* dell'Aib mostra il picco a  $1670\text{ cm}^{-1}$  della conformazione a elica e il  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_4\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  presenta uno spettro confrontabile.

### 3.3 SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE

Queste analisi spettroscopiche sono state condotte presso l'università degli studi di Roma "Tor Vergata" dal Prof. Mariano Venanzi. Essendo le analisi ancora in corso, in questa Tesi sono riportati soltanto dati preliminari, peraltro piuttosto significativi

L'obiettivo principale dello studio è determinare l'influenza del solvente sulla struttura secondaria assunta dai peptidi del Deg sintetizzati durante questo internato di Tesi.

L'interazione tra le due sonde N e C terminali (rispettivamente pirene e *p*-nitrobenzile) permette di valutare le distanze che intercorrono tra loro e, di conseguenza, di avere indicazioni sulla struttura 3D della catena peptidica. Il pirene è una sonda chimica molto utilizzata in quanto si tratta di un sistema ad alta coniugazione con una grande probabilità di transizione radiativa, che lo rende un importante fluoroforo<sup>33-44</sup>. Il *p*-nitrobenzile svolge, invece, l'azione di *quencher* ed è in grado di smorzare l'emissione di fluorescenza del pirene.<sup>30,31</sup> Il grado di *quenching* è influenzato dalla distanza dal cromoforo ed è quindi funzione del numero di residui dei peptidi spaziatori e della conformazione da essi assunta.

Le misure effettuate dal prof. M. Venanzi sono di due tipi:

- Fluorescenza statica: il campione è irradiato in continuo da un fascio di luce eccitante e si misura, ad un angolo di 90°, lo spettro di emissione del pirene smorzato dal *p*-nitrobenzile. Con questo metodo l'efficienza di *quenching* risulterà una media delle efficienze relative ad ogni singola conformazione assunta dal peptide.

- Fluorescenza risolta nel tempo: il campione è sottoposto a impulsi di luce eccitante di breve durata e si misura il numero di fotoni emessi nel tempo durante il decadimento dello stato eccitato. La cinetica del decadimento è differente a seconda dello stato conformazionale assunto dal peptide. Eseguendo un *fitting* della curva di



decadimento è possibile valutare le costanti cinetiche e il peso dei contributi di ciascuna conformazione.

I campioni sono stati analizzati in quattro diversi solventi: acetonitrile, diclorometano, metanolo e diossano. Le concentrazioni dei campioni sono state mantenute a livelli micromolari in modo da evitare interazioni intermolecolari tra *quencher* e fluoroforo e la formazione di eccimeri (dimeri dello stato eccitato) del pirene.<sup>60</sup> I campioni sono stati inoltre flussati con Argon prima di ogni misura, per evitare che l'ossigeno presente in soluzione funga da *quencher* collisionale<sup>60</sup>.

### **FLUORESCENZA STATICA**

L'efficienza di *quenching*  $E_q$  per la fluorescenza statica è stata trovata attraverso la relazione:

$$E_q = 1 - \Phi / \Phi_0$$

dove  $\Phi$  e  $\Phi_0$  sono rispettivamente la resa quantica in presenza e assenza del *quencher* e  $\Phi = k_r / k_{tot}$ , cioè il rapporto tra la costante cinetica radiativa e quella totale.

Essendo la resa quantica proporzionale al rapporto tra l'intensità di emissione e l'assorbanza [ $\Phi \propto I/A(\lambda_{ecc})$ ], allora è possibile calcolare l'efficienza quantica attraverso la relazione:<sup>60</sup>

$$E_q = 1 - (I / A) \cdot (A_0 / I_0)$$

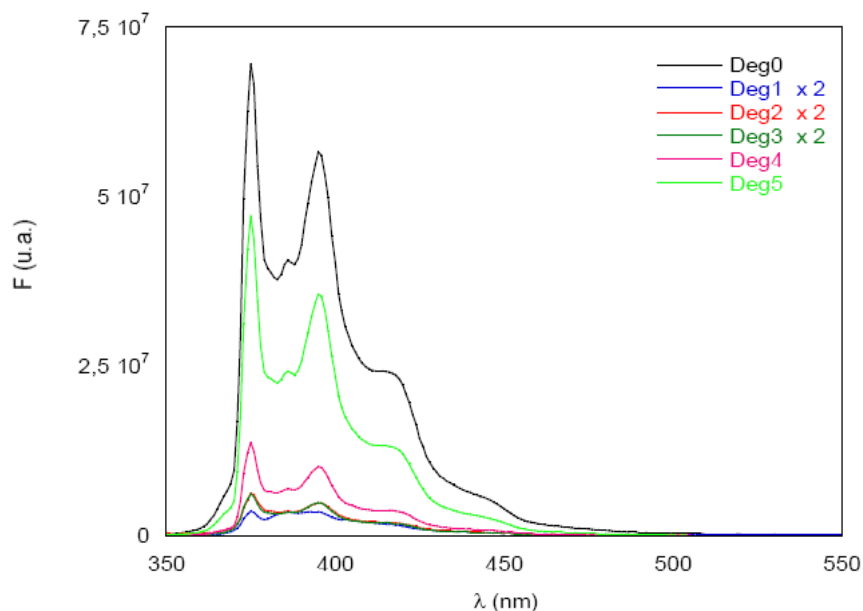
### **ANALISI DEI PEPTIDI DELLA SERIE PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl (n = 1-5),**

NB: Nei grafici si utilizza la nomenclatura Deg0 per il PyrAcOH, Deg<sub>n</sub> (n=1-5) per i peptidi della serie PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl dove n indica il numero di residui componenti la catena peptidica.

#### **Acetonitrile**

I campioni sono stati eccitati alla lunghezza d'onda  $\lambda = 343$  nm, corrispondente al picco di massimo assorbimento del pirene. Gli spettri di emissione sono riportati in figura 3.41 e le relative efficienze di *quenching* in tabella 3.14. Come riferimento per il

massimo di intensità di fluorescenza è stato usato acido 1-pirenil acetico (Deg0 in figura 3.41).



**Fig. 3.41:** Spettri di emissione dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in acetonitrile. Deg0 corrisponde a acido 1-pirenil acetico. I valori di intensità dei peptidi con  $n = 1, 2, 3$  sono stati moltiplicati per due.

**Tabella 3.13:** Efficienze di quenching dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ), ricavate tramite fluorescenza statica in acetonitrile.

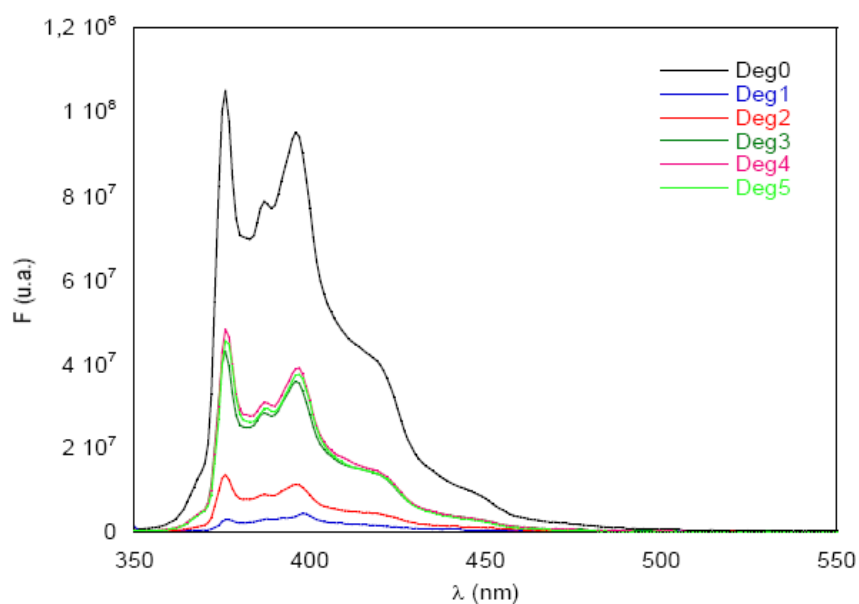
Peptide	$E_q$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,99
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,99
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,99
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,83
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,78

Per i primi tre peptidi lo smorzamento dell'emissione è talmente intenso che la differenza tra di essi risulta minima. Il *tetra* e *pentapeptide* presentano sempre un'azione di *quenching* molto intensa, ma si inizia a vedere l'azione dell'aumento delle distanze

dovuto al crescere della lunghezza della catena. Il lento decrescere della efficienza di *quenching* può indicare una conformazione ad elica  $3_{10}$ , in quanto l'allontanamento del *quencher* dal pirene è meno marcato di quanto sarebbe nella conformazione completamente estesa. Tale conclusione è supportata dal confronto con i successivi spettri acquisiti in cloroformio, dove l'efficienza di *quenching* decresce molto più velocemente all'aumentare del numero di residui. Le analisi NMR e IR, precedentemente discusse, hanno infatti indicato che in  $\text{CDCl}_3$  la struttura completamente estesa ha un peso significativo nell'equilibrio conformazionale.

### Cloroformio

I campioni sono stati eccitati alla lunghezza d'onda  $\lambda = 346$  nm. Gli spettri di emissione sono riportati in figura 3.42 e le relative efficienze di *quenching* in tabella 3.14.



**Fig. 3.42:** Spettri di emissione dei peptidi  $\text{PyrAc}-(\text{Deg})_n\text{-O}(\text{pNO}_2)\text{Bzl}$  ( $n = 1-4$ ) in cloroformio.

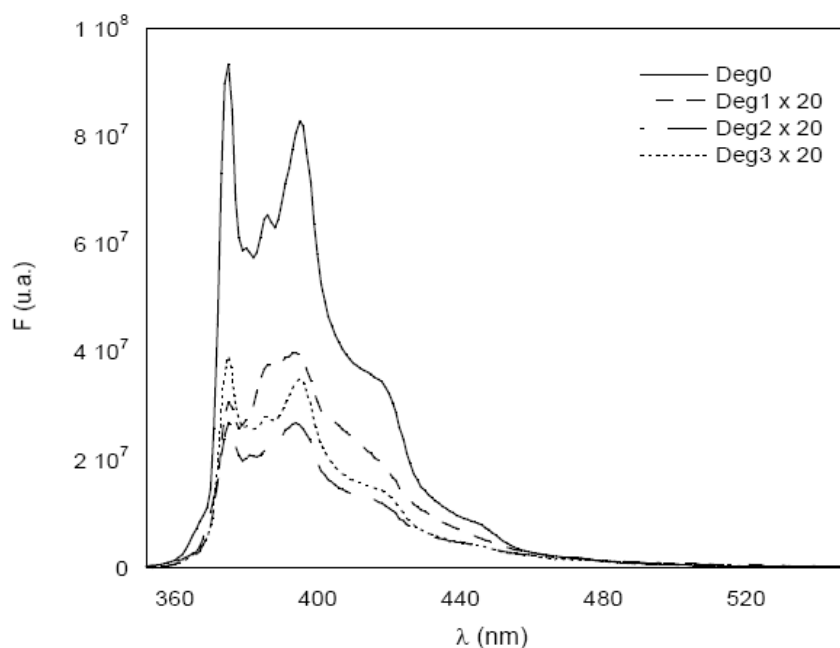
**Tabella 3.14:** Efficienze di *quenching* dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ), ricavate tramite fluorescenza statica in cloroformio.

Peptide	$E_q$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,97
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,89
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,64
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,68
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,65

Confrontando l'andamento di queste efficienze di *quenching* con quelle in acetonitrile si nota la diminuzione molto più rapida all'allungarsi del peptide. L'andamento per i primi tre peptidi è compatibile con una catena estesa. Nel *tetra* e *pentapeptide* l'efficienza del *quenching* non cala ulteriormente, come ci si potrebbe aspettare per una struttura completamente estesa. Questo comportamento può essere dovuto alla coesistenza di strutture elicoidali e completamente estese nei peptidi più lunghi, come d'altra parte indicato anche dalle analisi conformazionali condotte mediante IR ed NMR. Con questo metodo, infatti, si vede una media di tutte le situazioni presenti in soluzione, senza la possibilità di distinguere i pesi delle singole conformazioni.

### ***Metanolo***

I campioni sono stati eccitati ad una lunghezza d'onda  $\lambda = 346$  nm, gli spettri di emissione sono riportati ) in figura 3.43 e le relative efficienze di *quenching* in tabella 3.15.



**Fig. 3.43:** Spettri di emissione dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in metanolo, le intensità di fluorescenza dei peptidi sono moltiplicate per 20.

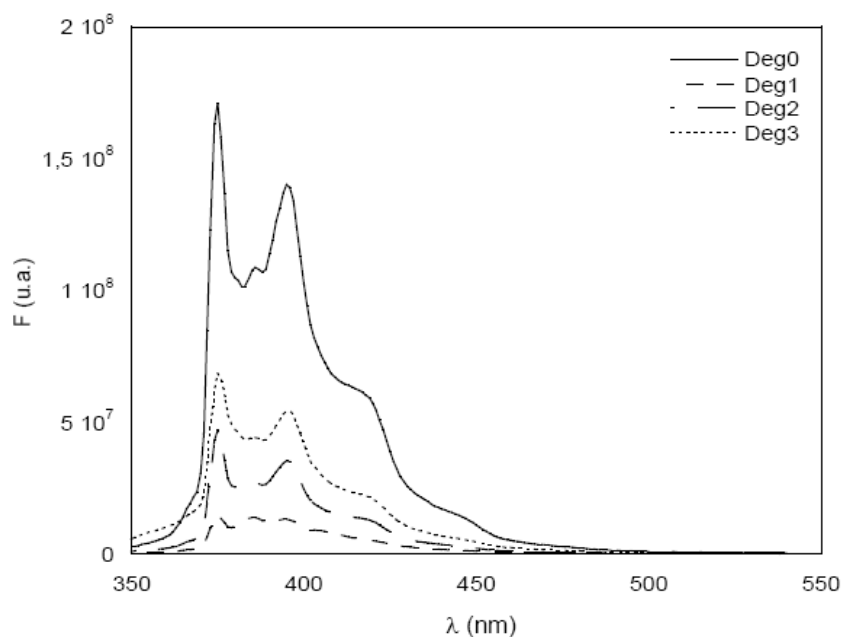
**Tabella 3.15:** Efficienze di *quenching* dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ), ricavate tramite fluorescenza statica in metanolo.

Peptide	$E_q$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,98
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,98
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,98

Come in acetonitrile, anche in questo solvente polare si nota una forte efficienza di *quenching*, che fa ipotizzare che i peptidi assumano una conformazione elicoidale.

### ***Diossano***

Per escludere possibili effetti di smorzamento dovuti a solventi clorurati, sono state eseguite misure anche in diossano, simile per polarità al cloroformio. I campioni sono stati eccitati alla lunghezza d'onda  $\lambda = 345$  nm. Gli spettri di emissione sono riportati in figura 3.44 e le relative efficienze di *quenching* in tabella 3.16.



**Fig. 3.44:** Spettri di emissione dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in diossano.

**Tabella 3.16:** Efficienze di *quenching* dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ), ricavate tramite fluorescenza statica in diossano.

Peptide	$E_q$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,96
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,89
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,84

I risultati ottenuti sono simili a quelli osservati in cloroformio e suggeriscono nuovamente una prevalenza della struttura estesa in solventi apolari.

#### **FLUORESCENZA RISOLTA NEL TEMPO:**

Dopo l'applicazione di un impulso di luce al campione, la variazione del numero di molecole dello stato eccitato seguirà una cinetica del tipo:

$$dN^*/dt = -k_{\text{tot}} N^*$$

La costante cinetica  $k_{\text{tot}}$  è composta dai vari contributi di decadimento radiativo ( $k_r$ ), non radiativo ( $k_{\text{nr}}$ ) e dell'effetto di *quenching* ( $k_q [Q]$ ).

$$k_{\text{tot}} = k_r + k_{\text{nr}} + k_q [Q]$$

Integrando la legge cinetica e considerando la proporzionalità tra l'intensità della luce trasmessa  $I$  e la popolazione dello stato eccitato ( $I \propto k_r N^*$ ), si può scrivere:

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad (\text{tempo di vita } \tau = 1/k)$$

Per distinguere i singoli contributi al decadimento delle varie conformazioni si considera l'intensità di emissione come sommatoria dell'emissione di ciascuna specie.

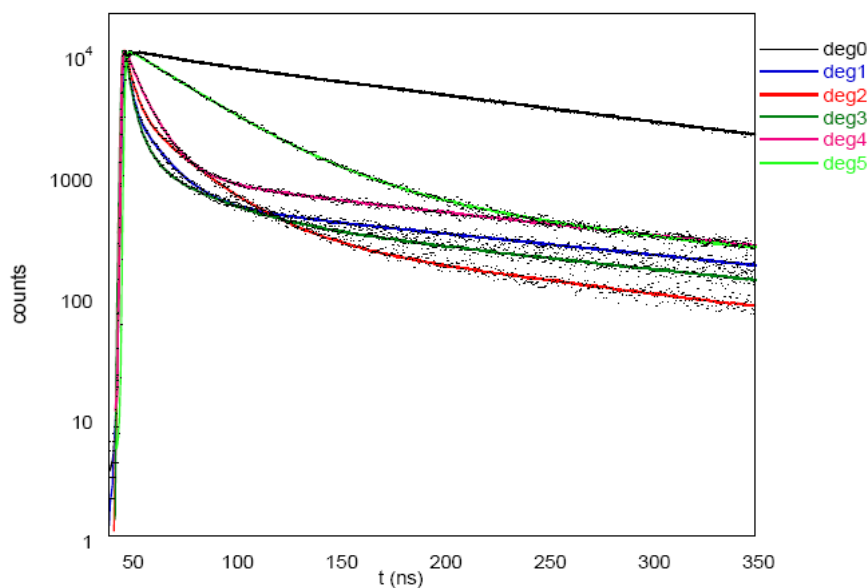
$$I_{(t)} = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i}$$

Eseguendo quindi un'interpolazione dei dati ottenuti è possibile ottenere il valore dei tempi di vita e delle  $\alpha$  (popolazione relativa) di ciascun contributo.

Inoltre è possibile definire un tempo di vita medio  $\langle \tau \rangle$  e ottenere una efficienza media di *quenching* confrontabile con quella ricavata dalla fluorescenza statica utilizzando la relazione che lega i tempi di vita alla efficienza di *quenching*.<sup>60</sup>

$$E_q = 1 - \Phi / \Phi_0 = 1 - (k_r / (k_r + k_{\text{nr}} + k_q [Q])) / (k_r / (k_r + k_{\text{nr}})) = 1 - (k_r + k_{\text{nr}}) / (k_r + k_{\text{nr}} + k_q [Q]) = 1 - \tau / \tau_0$$

### Acetonitrile



**Fig. 3.45:** Decadimenti dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in acetonitrile.

**Tabella 3.17:** Parametri di fluorescenza risolta nel tempo ottenuti da analisi multiesponenziale relativi ai peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in acetonitrile. I tempi di vita sono espressi in nanosecondi.

Peptide	$\alpha_1$	$\tau_1$	$\alpha_2$	$\tau_2$	$\alpha_3$	$\tau_3$	$\alpha_4$	$\tau_4$
PyrAc-OH	0,15	26,3	0,85	193,7				
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,80	1,7	0,17	13,2	0,03	244,3		
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,60	0,8	0,25	3,9	0,12	24,9	0,01	207,0
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,72	2,6	0,22	5,4	0,04	29,9	0,02	259,2
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,35	2,3	0,60	9,9	0,05	218,1		
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,35	1,0	0,60	33,1	0,05	210,5		

**Tabella 3.18:** efficienze di *quenching* ricavate dai tempi medi (analisi multiesponenziale) e dalla fluorescenza statica per i peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in acetonitrile.

Peptide	$\langle E_q \text{ (dinamica)} \rangle$	$E_q \text{ (statica)}$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,94	0,99
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,96	0,99
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,94	0,99
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,89	0,83
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,82	0,78

*Efficienza di quenching:* Le efficienze di *quenching* calcolate con i tempi di vita medi sono coerenti con quelle precedentemente ricavate attraverso fluorescenza statica. Come commentato per la fluorescenza statica in acetonitrile la conformazione prevalente è quella ad elica  $3_{10}$ . Infatti, l'efficienza di *quenching* è alta e diminuisce molto lentamente all'aumentare del numero di residui.

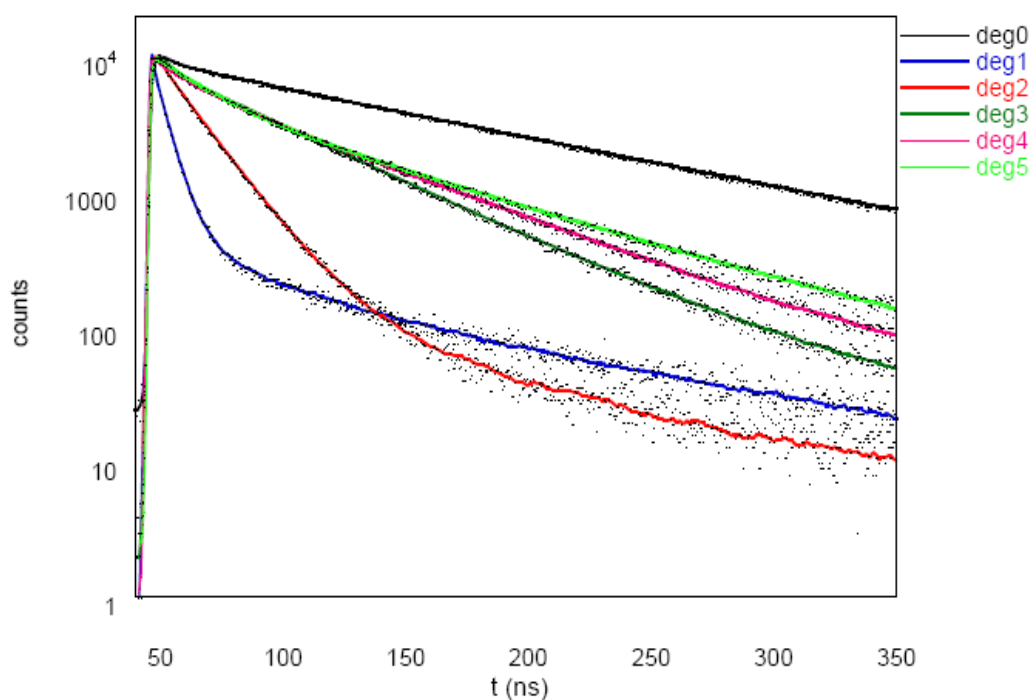
*Analisi multiesponenziale:* ogni tempo di decadimento e ogni  $\alpha$  sono rappresentativi di uno stato conformazionale presente in soluzione. Spesso sono presenti più di due stati conformazionali in quanto non esistono solo le due situazioni estreme di conformazione completamente estesa o totalmente ripiegata a elica, ma dovrebbero esistere una serie di conformazioni intermedie con la catena peptidica ripiegata solo in parte. L'analisi IR non permette di distinguere queste situazioni intermedie in quanto è sensibile ai singoli gruppo ammidici e non risente di interazioni a lunga distanza, utili per distinguere un peptide completamente ripiegato da uno parzialmente ripiegato. D'altro canto, l'NMR consentirebbe di rivelare le interazioni a lunga distanza (attraverso



l'effetto NOE) e quindi di assegnare anche le varie strutture 3D presenti all'equilibrio conformazionale. Tuttavia, nella scala dei tempi dell'NMR i peptidi interconvertono facilmente da una conformazione ad un'altra. Pertanto, il segnale NMR sarà poco utile poiché rappresenta una media delle situazioni spaziali sperimentate da un atomo nelle varie strutture peptidiche tridimensionali presenti all'equilibrio.

Sulla base delle precedenti analisi e valutando i dati ottenuti, possiamo affermare che i tempi di decadimento più brevi corrispondono a conformazioni con una maggiore percentuale di elica. Nel caso delle misure eseguite in acetonitrile si nota come i tempi di decadimento siano principalmente di tipo breve, dovuti quindi a strutture elicoidali. Solo nel caso del *pentapeptide* si nota un aumento della presenza di strutture estese.

### Cloroformio



**Fig. 3.46:** Decadimenti dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in cloroformio.

**Tabella 3.19:** Parametri di fluorescenza risolta nel tempo ottenuti da analisi multiesponenziale relativi ai peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in cloroformio. I tempi di vita sono espressi in nanosecondi.

Peptide	$\alpha_1$	$\tau_1$	$\alpha_2$	$\tau_2$	$\alpha_3$	$\tau_3$	$\alpha_4$	$\tau_4$
PyrAc-OH	0,25	4,1	0,08	193,7	0,67	116,8		
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,85	0,3	0,14	5,5	0,006	21,4	0,004	107,3
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,39	1,7	0,60	16,7	0,01	77,3		
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,38	4,4	0,60	46,9	0,02	108,9		
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,40	1,7	0,25	18,3	0,35	60,0		
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,29	1,7	0,43	21,0	0,28	75,8		

**Tabella 3.20:** efficienze di *quenching* ricavate dai tempi medi (analisi multiesponenziale) e dalla fluorescenza statica ( $n = 1-5$ ) per i peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-5$ ) in cloroformio.

Peptide	$\langle E_q \text{ (dinamica)} \rangle$	$E_q \text{ (statica)}$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,95	0,97
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,86	0,89
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,63	0,64
PyrAc-(Deg) <sub>4</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,68	0,68
PyrAc-(Deg) <sub>5</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,62	0,65

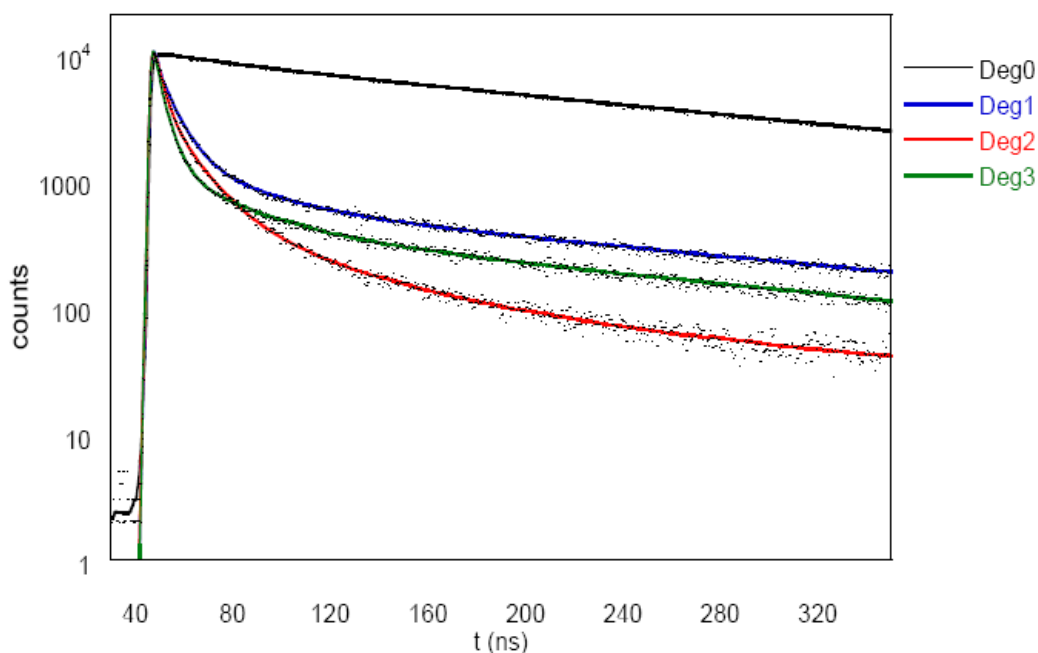
*Efficienza di quenching:* Le efficienze di *quenching* calcolate con i tempi di vita medi sono nuovamente confrontabili con quelle ricavate da fluorescenza statica. La minore efficienza di *quenching* è indice di una maggiore distanza tra i *probe* e, quindi, di una probabile struttura estesa dei peptidi. Infatti, all'aumentare del numero di residui si nota come l'efficienza di *quenching* decresca molto più velocemente. Il *tetra* e il *pentapeptide* presentano una  $E_q$  confrontabile con quella del *tripeptide*, ma comunque di valore inferiore rispetto a quella calcolata in acetonitrile. Questo comportamento può essere dovuto alla compresenza di più conformazioni con un aumento, per i peptidi più lunghi, del contributo dovuto alla struttura elicoidale.

*Analisi multiesponenziale:* In questo solvente apolare crescono molto i contributi dovuti ai tempi lunghi, e quindi alla conformazione estesa. Nel caso del *monopeptide* sono preponderanti i tempi brevi. Tuttavia, bisogna considerare che la vicinanza tra i due *probe* e la catena peptidica molto corta comportano piccole differenze tra le

conformazioni e quindi i decadimenti di questo tipo sono probabilmente influenzati principalmente dal meccanismo stesso di decadimento. Per il *tetra* e *pentapeptide* si nota la compresenza di tre conformazioni stabili, probabilmente perché la catena più lunga permette una maggiore stabilità delle strutture parzialmente ripiegate.

### Metanolo

In metanolo e diossano sono state finora eseguite solamente le misure fino al *tripeptide*.



**Fig. 3.47** : Decadimenti dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in metanolo.

**Tabella 3.21:** Parametri di fluorescenza risolta nel tempo ottenuti da analisi multiesponenziale relativi ai peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in metanolo. I tempi di vita sono espressi in nanosecondi.

Peptide	$\alpha_1$	$\tau_1$	$\alpha_2$	$\tau_2$	$\alpha_3$	$\tau_3$	$\alpha_4$	$\tau_4$
PyrAc-OH	0,14	34,00	0,86	230,7				
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,71	0,80	0,23	7,4	0,04	27,3	0,02	240,1
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,70	3,20	0,26	13,1	0,03	49,5	0,01	268,9
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,73	1,00	0,24	4,7	0,02	28,2	0,01	223,2

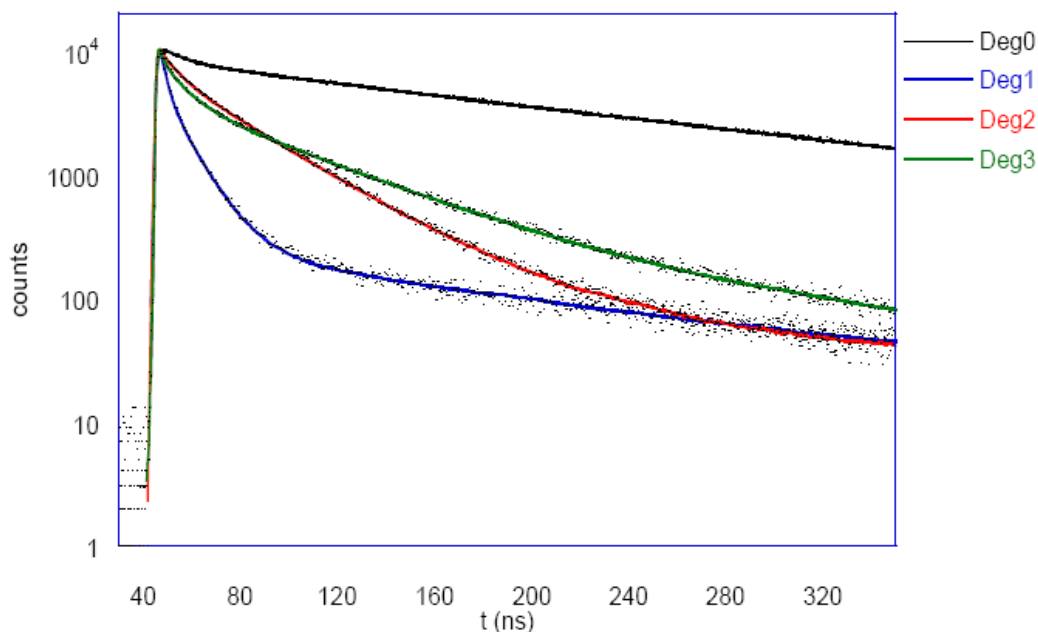
**Tabella 3.22:** efficienze di *quenching* ricavate dai tempi medi (analisi multiesponenziale) e dalla fluorescenza statica per i peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in metanolo.

Peptide	$\langle E_q \text{ (dinamica)} \rangle$	$E_q \text{ (statica)}$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,96	0,98
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,95	0,98
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,98	0,98

*Efficienza di quenching:* Il *quenching* presenta nuovamente un andamento compatibile con strutture 3<sub>10</sub>-elicoidali. In particolare, si nota come il *tripeptide* presenti una  $E_q$  addirittura maggiore del *dipeptide*, a motivo dell'avvicinamento delle due sonde dovuto alla chiusura del primo  $\beta$ -turns.

*Analisi multiesponenziale:* Come in acetonitrile si nota una prevalenza dei tempi corti dovuti ad una maggiore stabilità della struttura elicoidale.

### Diossano



**Fig. 3.48 :** Decadimenti dei peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in diossano.

**Tabella 3.23:** Parametri di fluorescenza risolta nel tempo ottenuti da analisi multiesponenziale relativi ai peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in diossano. I tempi di vita sono espressi in nanosecondi.

Peptide	$\alpha_1$	$\tau_1$	$\alpha_2$	$\tau_2$	$\alpha_3$	$\tau_3$	$\alpha_4$	$\tau_4$
PyrAc-OH	0,29	7,7	0,10	46,9	0,61	194,9		
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,71	1,8	0,28	10,7	0,01	149,9		
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,64	0,5	0,13	6,8	0,22	34,0	0,01	264,8
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,40	1,4	0,33	8,9	0,25	53,0	0,02	231,1

**Tabella 3.24:** efficienze di *quenching* ricavate dai tempi medi (analisi multiesponenziale) e dalla fluorescenza statica per i peptidi PyrAc-(Deg)<sub>n</sub>-O(pNO<sub>2</sub>)Bzl ( $n = 1-3$ ) in diossano.

Peptide	$\langle E_q \text{ (dinamica)} \rangle$	$E_q \text{ (statica)}$
PyrAc-(Deg) <sub>1</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,94	0,96
PyrAc-(Deg) <sub>2</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,89	0,89
PyrAc-(Deg) <sub>3</sub> -O(pNO <sub>2</sub> )Bzl	0,79	0,84

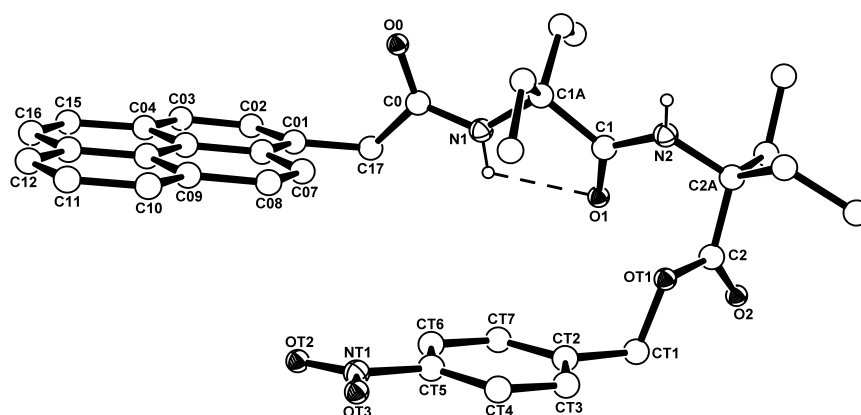
*Efficienza di quenching:* Anche in questo solvente apolare i nostri peptidi sembrano preferire la conformazione estesa. L'efficienza di *quenching*, che decresce meno velocemente rispetto al cloroformio, può essere dovuta alla presenza di una maggiore frazione di peptide elicoidale.

*Analisi multiesponenziale:* Anche in questo solvente apolare si notano gli stessi andamenti dei tempi di decadimento riscontrati in cloroformio: un aumento del peso dei tempi lunghi e un *monopeptide* con tempi corti predominanti. I tempi corti sono leggermente più importanti rispetto alle misure effettuate in cloroformio, confermando una maggiore percentuale di struttura ad elica rispetto al cloroformio.

### 3.4 DIFFRAZIONE DEI RAGGI X

Sono attualmente in corso tentativi di cristallizzazione di tutti i composti sintetizzati, al fine di ottenere cristalli singoli, utili per la determinazione della struttura mediante diffrazione dei raggi X. Tali esperimenti hanno finora dato esito positivo per i peptidi PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl, PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl e PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-OtBu. I primi due composti sono stati cristallizzati per lenta evaporazione da una miscela diclorometano–metanolo, il terzo da metanolo. Le tre strutture sono state risolte dal Dr. M. Crisma (Istituto di Chimica Biomolecolare, CNR, Padova). Di seguito ne vengono illustrati gli aspetti più significativi dal punto di vista conformazionale.

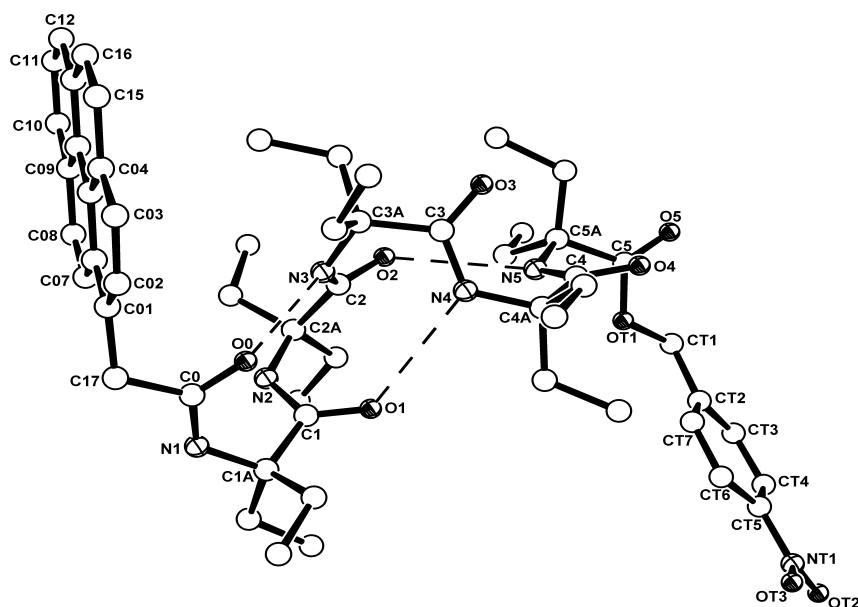
La struttura del dipeptide PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl è illustrata in Fig. 3.49. Il cristallo appartiene ad un gruppo spaziale centrosimmetrico. Pertanto, sono presenti sia la molecola descritta di seguito, sia la sua immagine speculare (con i segni degli angoli torsionali rovesciati). Il residuo di Deg(1) adotta una conformazione completamente estesa, con  $\phi_1, \psi_1 = -171^\circ, -175^\circ$ , e caratterizzata dalla presenza di un legame a idrogeno intramolecolare tra i gruppi N-H e C=O dello stesso residuo (struttura C<sub>5</sub>). Il residuo di Deg(2) è invece in conformazione elicoidale ( $\phi_2, \psi_2 = -43^\circ, -45^\circ$ ).



**Fig. 3.49:** Struttura ai raggi X di PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl. Il legame a idrogeno intramolecolare è indicato da una linea tratteggiata.

L'angolo di legame  $\tau$  (N-C $^{\alpha}$ -C') è prossimo al valore tetraedrico per il residuo di Deg(2) (109.7°), mentre risulta nettamente minore per il residuo di Deg(1) (104.2°). Valori di  $\tau$  inferiori al tetraedrico sono documentati in letteratura per residui amminoacidici coinvolti in strutture C<sub>5</sub>.<sup>1c</sup> Il pirene e l'anello benzenico del *p*-nitrobenzilestere sono pressoché paralleli ma non sovrapposti. La distanza intramolecolare più corta tra atomi di carbonio dei due gruppi (C07 e CT6 in Fig. 3.49) è infatti superiore a 4 Å. Una conformazione simile a quella descritta sopra, con il primo residuo esteso e il secondo elicoidale, è documentata in letteratura per il dipeptide Tfa-(Deg)<sub>2</sub>-OtBu allo stato cristallino.<sup>15a</sup>

Il *pentapeptide* PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl, sebbene non contenga atomi di carbonio asimmetrici, cristallizza in un gruppo spaziale non centrosimmetrico. Nella struttura (Fig. 3.50) lo scheletro peptidico assume una conformazione 3<sub>10</sub>-elicoidale generata dalla successione di tre strutture C<sub>10</sub> consecutive aventi come donatori di legame a idrogeno intramolecolare i gruppi NH del terzo, quarto e quinto residuo amminoacidico e come accettori gli ossigeni carbonilici del gruppo pireneacetile N-terminale e del primo e secondo residuo, rispettivamente. Nel cristallo sono presenti molecole di un solo senso di spiralizzazione.



**Fig. 3.50:** Struttura ai raggi X di PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl. I legami a idrogeno intramolecolari sono indicati da linee tratteggiate.

Si ricorda che per peptidi costituiti di residui achirali l'elica destrogira e quella sinistrogira sono in relazione enantiomerica. Comunemente tali composti cristallizzano in gruppi spaziali centrosimmetrici, nei quali coesistono molecole di entrambi i sensi di spiralizzazione, correlate per simmetria. Se però l'impacchettamento tra molecole della stessa spiralizzazione risulta energeticamente favorito rispetto a quello tra molecole di spiralizzazione opposta, allora le molecole di una spiralizzazione e quelle della spiralizzazione opposta formeranno cristalli separati. La situazione, poco frequente ma non impossibile, è analoga a quella di alcune sostanze chirali, i racemati delle quali, per cristallizzazione, danno luogo a risoluzione spontanea nei due enantiomeri. L'esempio più noto risale alla separazione degli enantiomeri dell'acido tartarico ad opera di Pasteur.

Nel caso di PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl non è possibile determinare senza ambiguità se le molecole presenti nel cristallo utilizzato per la raccolta dei dati di diffrazione siano di spiralizzazione destrogira o sinistrogira. La determinazione della struttura assoluta / configurazione assoluta mediante diffrazione dei raggi X si basa infatti sul fenomeno della dispersione anomala, che è significativo in presenza di atomi pesanti. Nel nostro caso, essendo la molecola costituita solo di carbonio, azoto, ossigeno e idrogeno, l'entità della dispersione anomala è modesta e accompagnata da un margine di incertezza elevato. E' stata scelta quindi la spiralizzazione destrogira che alcuni parametri cristallografici indicano come la più probabile, senza che questo implichi che sia stata determinata la struttura assoluta.

Nel *pentapeptide* i valori delle coppie degli angoli torsionali  $\phi, \psi$  (Tabella 3.25) adottati dai primi quattro residui di Deg sono molto prossimi a quelli dell'elica <sub>3<sub>10</sub></sub> destrogira ideale ( $\phi = -57^\circ$ ,  $\psi = -30^\circ$ ). Il quinto residuo, esterno all'elica, assume angoli torsionali propri della regione delle eliche sinistrogire della mappa conformazionale. Tale inversione di spiralizzazione del residuo C-terminale esterificato rispetto all'elica che lo precede è un'osservazione comune per residui amminoacidici C<sup>α</sup>-tetrasostituiti achirali. Per tutti i cinque residui (elicoidali) di Deg il valore dell'angolo di legame  $\tau$  risulta compreso tra  $109.8^\circ$  e  $112.0^\circ$ .

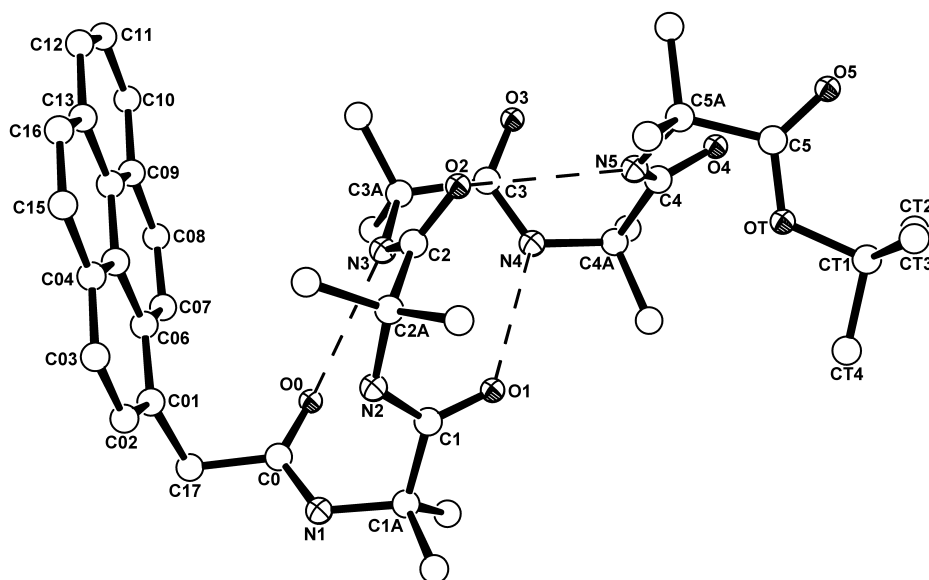


**Tabella 3.25:** Valori degli angoli torsionali  $\phi, \psi$  ( $^\circ$ ) nella struttura di PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl

	Deg(1)	Deg(2)	Deg(3)	Deg(4)	Deg(5)
$\phi$	-54	-55	-53	-59	50
$\psi$	-42	-32	-35	-32	55

L'angolo tra le normali ai piani medi del pirene e dell'anello benzenico del *p*-nitrobenzilestere è di  $43^\circ$ . La linea congiungente i C $^\alpha$  del primo e del quarto residuo, approssimativamente parallela all'asse dell'elica  $3_{10}$ , forma con le normali al pirene e al *p*-nitrobenzilestere angoli di  $33^\circ$  e  $17^\circ$ , rispettivamente.

La struttura del *pentapeptide* PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-OtBu è illustrata in Fig. 3.51. In questo caso la molecola achirale cristallizza in un gruppo spaziale centrosimmetrico. Pertanto nel cristallo sono presenti molecole di entrambe le spiralizzazioni, correlate attraverso un centro di inversione. Di seguito vengono riportati i dati relativi alla molecola di spiralizzazione sinistrogira, scelta arbitrariamente come unità asimmetrica.



**Fig. 3.51:** Struttura ai raggi X di PyrAc-(Aib)<sub>5</sub>-OtBu. I legami a idrogeno intramolecolari sono indicati da linee tratteggiate.

Come atteso, lo scheletro peptidico assume una conformazione  $3_{10}$ -elicoidale generata dalla successione di tre strutture  $C_{10}$  consecutive aventi come donatori di legame a idrogeno intramolecolare i gruppi NH del terzo, quarto e quinto residuo amminoacidico e come accettori gli ossigeni carbonilici del gruppo pireneacetile N-terminale e del primo e secondo residuo, rispettivamente. I valori degli angoli torsionali  $\phi, \psi$  (Tabella 3.26) sono consistenti con una struttura  $3_{10}$ -elicoidale di buona regolarità per i primi quattro residui, accompagnata dalla usuale inversione di spiralizzazione da parte del residuo C-terminale.

**Tabella 3.26:** Valori degli angoli torsionali  $\phi, \psi$  ( $^{\circ}$ ) nella struttura di PyrAc-(Aib) $_5$ -OtBu

	Aib(1)	Aib (2)	Aib(3)	Aib(4)	Aib(5)
$\phi$	55	55	52	58	-49
$\psi$	31	30	36	38	-43

L'angolo tra la congiungente i  $C^{\alpha}$  del primo e del quarto residuo, approssimativamente parallela all'asse dell'elica  $3_{10}$ , e la normale al piano del pirene ha il valore di  $47^{\circ}$ , non molto dissimile da quello riscontrato nella struttura dell'omopentapeptide da Deg.

Le conclusioni più interessanti che si possono trarre sono le seguenti:

- Si conferma che il Deg può adottare sia la struttura completamente estesa che quella elicoidale  $3_{10}$ , mentre l'Aib preferisce nettamente la seconda.
- Il *pentapeptide* Tfa-(Deg) $_5$ -OtBu adotta la struttura completamente estesa allo stato cristallino,<sup>1c</sup> mentre PyrAc-(Deg) $_5$ -OpNO $_2$ Bzl (questo lavoro di Tesi) è in elica  $3_{10}$ . Rimane pertanto da chiarire se la differenza di comportamento sia dovuta ai solventi di cristallizzazione o ai gruppi protettori/bloccanti. Infatti, nell'impaccamento cristallino, sia di PyrAc-(Deg) $_2$ -OpNO $_2$ Bzl che PyrAc-(Deg) $_5$ -OpNO $_2$ Bzl, i gruppi pirene e *para*-nitrobenzile di molecole diverse sono affacciati parallelamente, in coppia e ad una distanza di 3.5 Å, la stessa che separa gli strati della grafite. Anche l'analisi conformazionale in soluzione (NMR, assorbimento IR e fluorescenza), descritta nelle sezioni precedenti, ha rivelato che Tfa-(Deg) $_5$ -OtBu e PyrAc-(Deg) $_5$ -OpNO $_2$ Bzl sono alquanto diversi, con un prevalere di conformazioni  $3_{10}$ -elicoidali nel secondo peptide.

## 4. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto in questa tesi si è proposto di verificare la stabilità della struttura completamente estesa, che può essere adottata dagli omopeptidi del Deg, al variare delle condizioni ambientali. Le catene di peptidi che assumono questo tipo conformazione risultano interessanti per i loro potenziali utilizzi come spaziatori. Infatti, la struttura completamente estesa consente di avere la massima distanza possibile in un peptide tra le estremità N e C terminali.

Per effettuare il presente studio si sono dovuti sintetizzare omopeptidi del Deg con una lunghezza variabile da uno a cinque residui. A questi peptidi sono state successivamente legate una funzione 1-pirenilacetica e *p*-nitrobenzilica alle due estremità N e C terminali, rispettivamente. La sintesi di questi derivati è stata ottimizzata durante questo lavoro di Tesi. In particolare, è stata ottimizzata la formazione dell'estere *p*-nitrobenzilico effettuata mediante sostituzione nucleofila del carbossilato del peptide sul *p*-nitrobenzil bromuro: si sono avute rese migliori utilizzando solventi adatti a favorire l'uscita del bromo e l'ossido di Ag(I), che sottrae l'acido bromidrico che si forma nella reazione.

Gli studi NMR, IR e UV-Vis condotti mettono in evidenza la coesistenza di strutture completamente estese ed elicoidali negli omopeptidi del Deg funzionalizzati con pirene e *paranitrobenzile* alle estremità N e C terminali, rispettivamente. Invece, nei peptidi *monofunzionalizzati* prevale la struttura completamente estesa, almeno in solventi in grado di supportarla. Si può quindi ipotizzare che la struttura dei peptidi doppiamente funzionalizzati sia influenzata da interazioni tra i due sostituenti aromatici. Tale ipotesi è avvalorata dall'analisi mediante diffrazione dei raggi X di PyrAc-(Deg)<sub>2</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl e PyrAc-(Deg)<sub>5</sub>-OpNO<sub>2</sub>Bzl: i gruppi pirene e *para*-nitrobenzile di molecole diverse sono affacciati parallelamente, in coppia e ad una distanza di 3.5 Å.

La variazione del solvente in cui si sono eseguite le analisi ha dato risultati molto interessanti. In solventi poco polari come il cloroformio e il diossano prevale la struttura completamente estesa, mentre in solventi più polari l'equilibrio conformazionale propende per la struttura 3<sub>10</sub>-elicoidale. Nasce così la possibilità di indurre transizioni C<sub>5</sub>→elica 3<sub>10</sub> semplicemente modificando il solvente di lavoro. Tale fenomeno comporta un avvicinamento del 40% delle due estremità, rendendo gli omopeptidi del

Deg molto promettenti per lo sviluppo di dispositivi molecolari (ad es., interruttori). Il lavoro così ottenuto può essere sfruttato in molti campi emergenti della chimica supramolecolare.

**BIBLIOGRAFIA**

1. (a) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Valle, G., Cavicchioni, G., Précigoux, G., Aubry, A. e Kamphuis, J., *Biopolymers*, **33**, 1061 (1993); (b) Toniolo, C., Crisma, M. e Formaggio, F., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 627 (1996); (c) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. e Peggion, C., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **60**, 396 (2001).
2. Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M., Valle, G., Toniolo, C., Bonora, G.M., Broxterman, Q.B. e Kamphuis, J., *Chem. Eur. J.*, **2**, 1104 (1996).
3. Polese, A., Mondini, S., Bianco, A., Toniolo, C., Scorrano, G., Guldi, D. M. e Maggini, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3446 (1999).
4. Oancea, S., Formaggio, F., Campestrini, S., Broxterman, Q. B., Kaptein, B. e Toniolo, C., *Biopolymers (Biospectroscopy)*, **72**, 105 (2003).
5. Antonello, S., Formaggio, F., Moretto, A., Toniolo, C. e Maran, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2874 (2003).
6. (a) Bianco, A., Gasparini, F., Maggini, M., Misiti, D., Polese, A., Prato, M., Scorrano, G., Toniolo, C. e Villani, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7550 (1997); (b) Bianco, A., Corvaja, C., Crisma, M., Guldi, D.M., Maggini, M., Sartori, E. e Toniolo, C., *Chem. Eur. J.*, **8**, 1544 (2002).
7. (a) Rossi, P., Felluga, F., Tecilla, P., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Scrimin, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6948 (1999); (b) Sissi, C., Rossi, P., Felluga, F., Formaggio, F., Palumbo, M., Tecilla, P., Toniolo, C. e Scrimin, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3169 (2001).
8. Chiarani, S., *Tesi di Laurea*, Dipartimento di Chimica Organica, Università di Padova, anno accademico 2002/2003.
9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, 3471 (1970).
10. Toniolo, C. e Benedetti, E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
11. Venkatachalam, C.M., *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968).
12. Toniolo, C., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 1 (1980).
13. Rose, G.D., Gierasch, L.M. e Smith, J.A., *Adv. Protein Chem.*, **37**, 1 (1985).
14. Toniolo, C. e Benedetti, E., in *"Molecular Conformation and Biological Interactions"*, Balaram, P. e Ramaseshan, S., Eds., Indian Academy of Sciences, Bangalore, p. 511 (1991).
15. (a) Benedetti, E., Barone, V., Bavoso, A., Di Blasio, B., Lelj, F., Pavone, V., Pedone, C., Bonora, G.M., Toniolo, C., Leplawy, M.T., Kaczmarek, K. e Redlinski, A., *Biopolymers*, **27**, 357 (1988); (b) Toniolo, C., Bonora, G.M., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Barone, V., Lelj, F., Leplawy, M.T., Kaczmarek, K. E. e Redlinski, A., *Biopolymers*, **27**, 373 (1988).

16. (a) Benedetti, E., Toniolo, C., Hardy, P., Barone, V., Bavoso, A., Di Blasio, B., Grimaldi, P., Lelj, F., Pavone, V., Pedone, C., Bonora, G.M. e Lingham, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 8146 (1984); (b) Bonora, G.M., Toniolo, C., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Benedetti, E., Lingham, I. e Hardy, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 8152 (1984).
17. Crisma, M., Valle, G., Bonora, G.M., Toniolo, C., Lelj, F., Barone, V., Fraternali, F., Hardy, P.M. e Maia, H.L.S., *Biopolymers*, **31**, 637 (1991).
18. Marshall, G.R., in "Intra-Science Chemistry Reports", Vol. 5, Kharasch, N., Ed., Gordon e Breach, New York, p. 305 (1971).
19. Venkataram Prasad, B.V. e Sasisekharan, V., *Macromolecules*, **12**, 1107 (1979).
20. Paterson, Y., Rumsey, S.M., Benedetti, E., Némethy, G. e Scheraga, H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947 (1981).
21. Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Crisma, M., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2437 (1982).
22. Paterson, Y., Stimson, E.R., Evans, D.J., Leach, S.J. e Scheraga, H.A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982).
23. Toniolo, C., Bonora, G.M., Barone, V., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Grimaldi, P., Lelj, F., Pavone, V. e Pedone, C., *Macromolecules*, **18**, 895 (1985).
24. Gessmann, R., Brückner, H., Petratos, K., *J. Pept. Sci.*, **9**, 753 (2003).
25. Pavone, V., Lombardi, A., Saviano, M., Nastri, F., Zaccaro, L., Maglio, O., Pedone, C., Omote, Y., Yamanaka, Y. e Yamada, T., *J. Pept. Sci.*, **4**, 21 (1998).
26. (a) Tanaka, M., Imawaka, N., Kurihara, M. e Suemune, H., *Helv. Chim. Acta*, **82**, 494 (1999); (b) Imawaka, N., Tanaka, M. e Suemune, H., *Helv. Chim. Acta*, **83**, 2823 (2000).
27. Kaul, R., Banumathi, S., Velmurugan, D., Balaji Rao, R. e Balaram, P., *Biopolymers*, **54**, 159 (2000).
28. Benedetti, E., Pedone, C., Pavone, V., Di Blasio, B., Saviano, M., Fattorusso, R., Crisma, M., Formaggio, F., Bonora, G.M., Toniolo, C., Kaczmarek, K., Redlinski, A.S. e Leplawy, M.T., *Biopolymers*, **34**, 1409 (1994).
29. Toniolo, C., Pantano, M., Formaggio, F., Crisma, M., Bonora, G.M., Aubry, A., Bayeul, D., Dautant, A., Boesten, W.H.J., Shoemaker, H.E. e Kamphuis, J., *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 7 (1994).
30. John V. G., James F. H., Victoria L. McG., *J. Phys. Chem. A*, **106**, 10645 (2002).
31. Masahiko S., Satoshi H., Hajime K., Masahiro K., Maki M., Hiroshi S., Trevor A. S., Kenneth P. G., *J. Phys. Chem. B*, **105**, 10407 (2001).
32. Hiroaki M., Gema B., Claudio Toniolo, Nien-Hui G., *J. Phys. Chem. B*, **115**, 5168 (2011).
33. a) Nishino, N., Mihara, H., Tanaka, Y. e Fujimoto, T., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 5767 (1992); b) Mihara, H., Tanaka, J., Fujimoto, T. e Nishino, N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1915 (1995).
34. a) Sisido, M., Hoshino, S., Kusano, H., Kuragaki, M., Makino, M., Sasaki, H., Smith, T. A. e Ghiggino, K. P., *J. Phys. Chem. B*, **105**, 10407 (2001); b) Sasaki,

- H., Makino, M., Sisido, M., Smith, T. A. e Ghiggino, K. P., *J. Phys. Chem. B*, **105**, 10416 (2001); c) Gong, Y.-K. e Nakashima, K., *J. Phys. Chem. B*, **106**, 803 (2002); d) Vullev, V. I., e Jones, G., II, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 8611 (2002).
35. Jones, G., II e Vullev, V. I., *Org. Lett.*, **23**, 4001 (2002).
36. a) Hossain, M. A., Hamasaki, K., Takahashi, K., Mihara, H. e Ueno, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7435 (2001); b) Aoyagi, T., Ikeda, H. e Ueno, A., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **74**, 157 (2001); c) Hossain, M. A., Mihara, H. e Ueno, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11178 (2003).
37. Lou, J., Hatton, A. e Laibinis, P. E., *Anal. Chem.*, **69**, 1262 (1997).
38. Shoji, O., Nakajima, D., Ohkawa, M., Fujiwara, Y., Annaka, M., Yoshikuni, M. e Nakahira, T., *Macromolecules*, **36**, 4557 (2003).
39. Naka, K., Itoh, H. e Chujo, Y., *Langmuir*, **19**, 5496 (2003).
40. Strauß, J. e Daub, J., *Adv. Mater.*, **14**, 1652 (2002).
41. a) Kumar, C., Buranaprapuk, A., Opiteck, G.J., Moyer, M.B., Jockusch, S. e Turro, N.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10361 (1998); b) Kumar, C., Buranaprapuk, A., Sze, H.C., Jockusch, S. e Turro, N.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5810 (2002).
42. Búcsiová, L., Hrdlovič, P. e Chmela, Š., *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **143**, 59 (2001).
43. a) Maitra, U., Potluri, V.K., Sangeetha, N.M., Babu, P. e Raju, A.R., *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 477 (2001);
44. Babu, P., Sangeetha, N. M., Vijaykumar, P., Maitra, U., Rissanen, K. e Raju, A. R., *Chem. Eur. J.*, **9**, 1922 (2003).
45. Leplawy, M.T., Kaczmarek, K., Redlinski, A., *Proceedings of the Tenth American Peptides Symposium*, Marshall, G.R, Ed, ESCOM, Leiden, p.239 (1988).
46. Kaminski, Z., Leplawy, M.T., Olma, A., Redlinski, A., *Peptides 1980*, Brunfeldt, K., Ed, Scriptor, Copenhagen, p. 201 (1981).
47. Hardy, P.M. e Lingham, I.A., *Int. J. Peptide Res.* **21**, 392, 1983.
48. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993)
49. Crisma, M., Valle, G., Moretto, V., Formaggio, F., Toniolo, C. e Albericio, F., *Lett. Pept. Sci.*, **5**, 247 (1998).
50. Jhon, T. L., Ferruccio D'A., Paolo M., Giorgio C., Valerio B., Flavio M., *Tetrahedron: Asymmetry* **2**, 1111 (1991).
51. Martin, R. e Hauthal, G., *"Dimethyl Sulphoxide"*, Van Nostrand-Reinhold, Wokingham, U.K., (1975).
52. Pitner, T.P. e Urry, D.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1399 (1972).
53. Toniolo, C., Formaggio, F., Kaptein, B., Broxterman, Q. B., *Synlet*, 1295 (2006).
54. Prasad, B. V. V.; Balaram, P., *CRC Crit Rev Biochem*, **16**, 307 (1984).

55. (a) Bax, A. e Davis, D., *J. Magn. Reson.*, **65**, 207 (1985); (b) Bothner, A.A., Stephens, R.L., Lee, J., Warren, C.D. e Jeanloz, R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984).
56. Wüthrich, K., *"NMR of Proteins and Nucleic Acids"*, Wiley, New York (1986).
57. a) Palumbo, M., Da Rin, S., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *Makromol. Chem.*, **177**, 1477 (1976); b) Bonora, G.M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R.R. e Stevens, E.S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 179 (1984).
58. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
59. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. e Peggion, C., *Peptide Science*, **60**, 396 (2002)
60. Lacowicks, *Principles of Fluorescence Spectroscopy (terza edizione)*, Springer SGP (2006)



## **Ringraziamenti**

*Ringrazio il prof. Formaggio e la prof.ssa Peggion per la loro gentilezza e disponibilità.*

*Ringrazio il prof. Toniolo per avermi permesso di svolgere il mio internato di Tesi presso il suo laboratorio.*

*Ringrazio il Sig. Schiesari per la sua efficienza e cortesia.*

*Ringrazio tutti i componenti del gruppo Toniolo per gli aiuti che sono sempre stati pronti a darmi.*

*Ringrazio il prof. Venanzi e il suo gruppo per le misure di fluorescenza effettuate.*

*Ringrazio mamma Loretta e papà Bruno per le opportunità che mi hanno fornito e per il loro costante appoggio.*

*Ringrazio mia sorella Alessia per gli ottimi consigli che sa sempre darmi.*

*Ringrazio tutti gli amici veri per la loro vicinanza, per i bei momenti passati e per quelli che verranno.*