



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

Dipartimento di Scienze Chimiche

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA

**SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E STUDI CONFORMAZIONALI
DI ANALOGHI DELL'ANTIBIOTICO PEPTIDICO TRICOGINA GA IV,
CONTENENTI L'AMMINOACIDO *p*CN-(α Me)Phe**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Controrelatore: Prof.ssa Marilena Di Valentin

Laureando: Edoardo Longo

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

INDICE

<i>Riassunto</i>	iii
<i>Abbreviazioni</i>	v
1. INTRODUZIONE	1
1.1. <i>Gli antibiotici peptaibolici</i>	2
1.2. <i>Stereochimica dei peptidi contenenti Aib</i>	5
1.3. <i>Peptaibolici N-acetilati: caratteristiche strutturali e meccanismi d'interazione con le membrane</i>	10
1.3.1. <i>Alameticina come modello</i>	10
1.4. <i>Antibiotici lipopeptaibolici</i>	15
1.5. <i>Il gruppo pCN-fenil come sonda</i>	22
1.6. <i>Scopo della tesi</i>	24
2. PARTE SPERIMENTALE	25
2.1. <i>Materiali e metodi</i>	25
2.1.1. <i>Reagenti e solventi</i>	25
2.1.2. <i>Strumentazione e metodi</i>	26
2.2. <i>Sintesi in soluzione e caratterizzazione</i>	30
2.2.1. <i>Sintesi di derivati di amminoacidi</i>	30
2.2.2. <i>Sintesi di intermedi Boc-protetti al gruppo N-terminale</i>	33
2.2.3. <i>Sintesi di intermedi Z-protetti al gruppo N-terminale</i>	41
2.2.4. <i>Sintesi di intermedi n-ottanoilati al gruppo N-terminale</i>	44
2.3. <i>Sintesi su fase solida e caratterizzazione</i>	46
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	47
3.1. <i>Sintesi dell'amminoacido H-L-pCN-(αMe)Phe-OH</i>	47
3.2. <i>Sintesi dei peptidi</i>	47
3.2.1. <i>Strategia di sintesi in soluzione</i>	48
3.2.2. <i>Strategia di sintesi in fase solida</i>	52

3.2.3. Gruppi protettori utilizzati nella sintesi in soluzione.....	54
3.2.4. Gruppi protettori utilizzati in sintesi su fase solida	55
3.2.5. Metodi di attivazione	56
3.2.6. Metodi di caratterizzazione	58
3.3. Indagini conformazionali	59
3.2.1. Spettroscopia infrarossa	59
3.2.2. Spettrometria ¹ H-NMR.....	65
3.2.3. Dicroismo circolare	67
3.4. Interazione con membrane lipidiche artificiali.....	71
4. CONCLUSIONI	75
BIBLIOGRAFIA	77
Ringraziamenti	

RIASSUNTO

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto che si prefigge di sintetizzare tre analoghi della tricogina GA IV contenenti l'amminoacido H-L-*p*CN-(α Me)Phe-OH:

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**1**)

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-L-Ile-L-Lol (**2**)

n-ottanoil-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**3**)

Il peptide **3** è stato preparato mediante sintesi su fase solida, mentre con i metodi tradizionali della sintesi in soluzione sono stati preparati segmenti dalla cui condensazione sarà possibile ottenere i peptidi **1** e **2**.

Sui peptidi sintetizzati sono stati condotti studi conformazionali in soluzione (mediante assorbimento IR, NMR e CD) che hanno dimostrato che essi assumono conformazioni elicoidali molto stabili.

Studi preliminari di interazione con membrane modello hanno anche evidenziato che l'analogo **3** è in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici. Inoltre, il gruppo *p*CN-fenilico si è dimostrato significativamente sensibile all'ambiente circostante, in quanto lo stiramento del triplo legame del CN, nello spettro di assorbimento IR, è influenzato dal solvente.

ABBREVIAZIONI

AcOEt	= acetato di etile
Aib	= acido α -amminoisobutirrico
Boc	= <i>terz</i> -butossicarbonile
(Boc) ₂ O	= di- <i>terz</i> -butil dicarbonato
CD	= dicroismo circolare
CDCl ₃	= deuterocloroformio
CHCl ₃	= cloroformio
CH ₂ Cl ₂	= diclorometano
DCM	= diclorometano
DEA	= dietilammina
DIPEA	= N,N-diisopropiletilammina
DMSO	= dimetilsolfossido
EDC	= N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimide
EP	= etere di petrolio
EtOH	= etanolo
Et ₂ O	= etere dietilico
ESI	= <i>electronspray ionization</i>
Fmoc	= 9-fluorenilmetossicarbonile
FT-IR	= spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
Gly	= glicina
HATU	= O-(azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HFIP	= esafluoroisopropanolo
HOAt	= 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	= 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HPLC	= cromatografia liquida ad alte prestazioni
IR	= assorbimento infrarosso
Ile	= isoleucina
Leu	= leucina
Lipo	= lipoico
Lol	= leucinolo
MeOH	= metanolo

NMM	= N-metilmorfolina
NMR	= risonanza magnetica nucleare
NOESY	= spettroscopia di correlazione dipolare
OMe	= metossi
OSu	= 1-ossi-succinimide
R _f	= fattore di ritenzione
ROESY	= spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
SDS	= sodiododecilsolfato
Spps	= <i>solid phase peptide synthesis</i>
TDM	= N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano
TEA	= trietilammina
TFA	= acido trifluoroacetico
THF	= tetraidrofurano
TIS	= triisopropilsilano
TLC	= cromatografia su strato sottile
TOCSY	= spettroscopia di correlazione scalare omonucleare tipo Hartmann-Hahn
TOF	= analizzatore a tempo di volo (<i>time of flight</i>)
Trt	= trifenilmetile (tritile)
UV-Vis	= spettroscopia di assorbimento ultravioletto-visibile

N.B: Nel testo gli amminoacidi chirali si intendono di configurazione L qualora questa non venga specificata.

1. INTRODUZIONE

L'insorgere di resistenza agli antibiotici tradizionali da parte dei batteri sta stimolando un notevole interesse per la preparazione di molecole in grado di contrastare tale tendenza. Gli antibiotici peptaibolici, composti di natura peptidica che fanno parte del sistema di difesa di alcuni organismi viventi, esplicano la loro attività antibiotica alterando la permeabilità delle membrane degli organismi patogeni. Tuttavia, gli specifici meccanismi molecolari di questo processo sono in molti casi ancora sconosciuti.

La presente Tesi si inserisce in una linea di ricerca che mira a meglio comprendere l'attività antibiotica dei peptaibolici, ed in particolare della tricogina GA IV. Lo scopo di questo lavoro è infatti la sintesi di analoghi di tale lipopeptaibolico aventi un residuo di C^α-metil-*paraciano*-fenilalanina [*p*CN-(α Me)Phe] al posto di un residuo di acido α -amminoisobutirrico (Aib). La *p*CN-(α Me)Phe funziona come sonda per tecniche IR e di fluorescenza, le cui informazioni serviranno a determinare la tipologia di interazione con le membrane cellulari da parte della tricogina. E' noto infatti che lo *stretching* del triplo legame del CN varia sensibilmente a seconda dell'idrofobicità dell'ambiente in cui viene a trovarsi.

Nelle seguenti sezioni si riporta ciò che già è noto sui meccanismi d'azione dei peptaibolici ed in particolare della tricogina GA IV. Saranno anche riassunte le caratteristiche conformazionali principali indotte dall'Aib sui peptidi in cui viene inserito. L'Aib infatti, presenta in grande abbondanza nei peptaibolici, è in larga parte responsabile delle conformazioni elicoidali, della resistenza alla degradazione enzimatica e dell'attività antibatterica degli antibiotici peptaibolici. Alla classe degli α -amminoacidi C^α-tetrasostituiti, il cui prototipo è l'Aib, appartiene anche la *p*CN-(α Me)Phe.

1.1 Gli antibiotici peptaibolici

Alcuni peptidi ionoforici,^[1] isolati da microbi e funghi, sono in grado di interagire con le membrane biologiche e di modificarne la permeabilità agli ioni. Questa attività si traduce molto spesso in un'alterazione degli equilibri *intracellulari* che porta alla disgregazione (morte) della cellula aggredita.

Gli ionofori agiscono secondo almeno due meccanismi indipendenti: il trasporto diretto di ioni (ionofori *carrier*) o la formazione di canali nelle membrane (ionofori *channel former*). Gli ionofori *carrier* (**Figura 1.1**, sinistra) sono spesso peptidi ciclici capaci di chelare selettivamente ioni metallici formando complessi lipofili che possono diffondere attraverso il doppio strato lipidico.

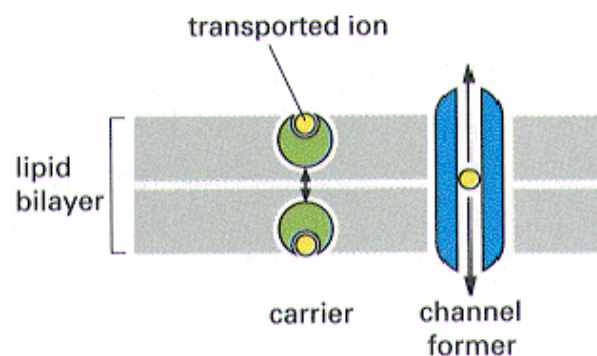


Figura 1.1 Meccanismi di azione degli ionofori *carrier* (sinistra) e *channel former* (destra).

Gli ionofori *channel former* (Figura 1.1, destra) sono invece generalmente peptidi lineari in grado di formare pori attraverso i quali gli ioni possono diffondere liberamente. A quest'ultima classe di ionofori appartengono gli antibiotici peptaibolici,^[2,3] una selezione rappresentativa dei quali, con le relative sequenze amminoacidiche, è riportata in **Figura 1.2**.

Questi antibiotici sono chiamati peptaibolici in quanto composti lineari di natura peptidica, ricchi in acido α -amminoisobutirrico (**Aib**; **Figura 1.3**) e recanti all'estremità C-terminale un residuo di 1,2-amminoalcol.

Alcuni peptaibolici contengono, oltre all'Aib, altri due amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti, l'isovalina (Iva) e l' α -etilnorvalina (Etn) (Figura 1.3). E' da notare che l'Iva è di solito presente come enantiomero D, ma alcune sequenze peptaiboliche contengono L-Iva.

ALCUNI ANTIBIOTICI PEPTAIBOLICI RAPPRESENTATIVI

ALAMETICINA	Ac Aib Pro Aib Ala Aib Ala Gln Aib Val Aib Gly Leu Aib Pro Val Aib Aib Glu Gln Fol
TRICORZIANINA	Ac Aib Ala Ala Aib Aib Gln Aib Aib Aib Ser Leu Aib Pro Leu Aib Ile Gln Gln Wol
TRICOTOXINA	Ac Aib Gly Aib Leu Aib Gln Aib Aib Ala Ala Aib Aib Pro Leu Aib Iva Glu Vol
ZERVAMICINA	Ac Trp Ile Glu Iva Val Thr Aib Leu Aib Hyp Gln Aib Hyp Aib Pro Fol
SAMAROSPORINA	Ac Phe Aib Aib Aib Val Gly Leu Aib Aib Hyp Gln Iva Hyp Ala Fol
TRICOVIRINA	Ac Aib Asn Leu Aib Pro Ser Val Aib Pro Aib Leu Aib Pro Lol
CERVININA	Ac Leu Aib Pro Aib Leu Aib Pro Ala Aib Pro Val Lol
ARZIANINA	Ac Aib Asn Leu Ile Aib Pro Iva Leu Aib Pro Lol
TRICOGINA	FA Aib Gly Leu Aib Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
TRICONINGINA KB I	FA Aib Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
TRICONINGINA KB II	FA Iva Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
LP237-F8	FA Aib Pro Phe Aib Gln Gln Aib Etn Gln Ala Lol
TRICODECENINA	FA Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
PEPTAIBOLINA	Ac Leu Aib Leu Aib Fol

(FA, *fatty acid*, indica un acido grasso con un numero di atomi di carbonio compreso tra 8 e 15).

Figura 1.2 Sequenze amminoacidiche di una selezione rappresentativa di antibiotici peptaibolici.

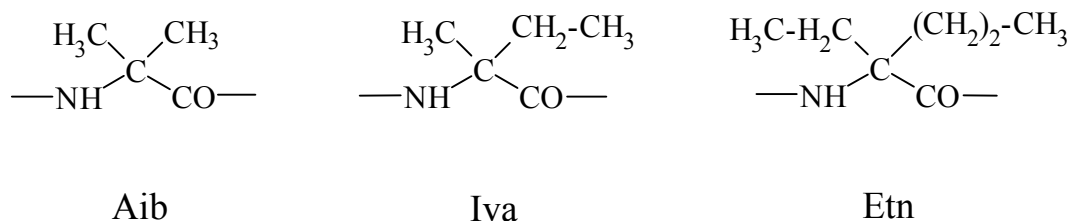


Figura 1.3 Amminoacidi C^α-tetrasostituiti presenti nelle sequenze degli antibiotici peptaibolici.

Nella maggioranza dei casi tale gruppo N-bloccante è costituito dall'acetile (Figura 1.2). Nel corso degli ultimi anni sono stati però identificati alcuni peptidi, tricogina GA IV,^[4,5] triconingine KB I e KB II,^[6] antibiotici LP237-F7,^[7] LP237-F8^[7,8] e LP237-F5,^[7] tricodécenine I e II,^[9] che presentano all'estremità N-terminale una catena acilica lineare lunga (Figura 1.2). Per questi composti è stato proposto il nome di "lipopeptaibolici".^[5-10] E' interessante notare che gli antibiotici peptaibolici a sequenza corta (fino a undici residui) finora noti sono in larghissima prevalenza lipopeptaibolici.

I peptaibolici sono presenti in natura come miscele di più componenti (almeno 12 nel caso dell'alameticina), probabilmente a motivo della sintesi non-ribosomiale attraverso la quale sono prodotti.^[11] I peptidi costituenti tali miscele spesso differiscono tra loro per la sostituzione di un solo residuo amminoacidico. Per la separazione di queste miscele si è rivelata particolarmente utile la tecnica HPLC.^[12] La presenza dell'Aib e dei gruppi bloccanti N- e C-terminali^[13] ha inoltre complicato la determinazione della struttura primaria dei peptaibolici. La spettrometria di massa^[14] e le spettrometrie ¹H e ¹³C NMR^[15,16] si sono dimostrate tecniche fondamentali per la risoluzione di questi problemi.

Come anticipato, l'attività antibiotica dei peptaibolici si esplica attraverso la modulazione della permeabilità delle membrane biologiche. I peptaibolici possono quindi possedere attività citolitica ed emolitica,^[17] possono disaccoppiare la fosforilazione ossidativa^[18] e accrescere la permeabilità dei liposomi.^[19] È noto inoltre che alcuni di essi, come ad esempio l'alameticina,^[20] sono in grado di formare pori voltaggio-dipendenti.^[21] Quest'ultimo aspetto dei peptaibolici ha destato molto interesse. L'alameticina e i peptidi ad essa correlati possono infatti fungere da modello^[22] per la

comprensione di sistemi molto più complessi, quali sono i canali formati da proteine nelle membrane cellulari. Tra questi si collocano i canali ionici che sono responsabili dell'eccitazione nervosa e del controllo del potenziale *transmembrana*.

Negli anni recenti i peptaibolici sono stati studiati, oltre che dal punto di vista biofisico, anche sul piano conformazionale, al fine di comprendere la relazione esistente tra sequenza peptidica e conformazione, e tra questa e l'attività biologica. Dato l'elevato contenuto di Aib e considerate le peculiari propensioni strutturali di questo residuo, l'attenzione si è focalizzata in particolare sull'influenza esercitata da tale amminoacido sulla struttura tridimensionale dello scheletro peptidico dei peptaibolici.^[23] Di seguito sarà quindi brevemente descritto quanto noto circa la conformazione assunta dai peptidi contenenti l'amminoacido C^α-tetrasostituito Aib.

1.2 Stereochimica dei peptidi contenenti Aib

L'Aib è il più semplice amminoacido C^α-tetrasostituito. Calcoli di energia conformazionale^[24-26] hanno evidenziato che la presenza di due gruppi metilici sul C^α impone una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile all'Aib, che risulta quindi confinato alla regione delle conformazioni elicoidali di tipo α (Figura 1.4 A) e di tipo 3_{10} (Figura 1.4 B). Poiché il residuo di Aib è achirale, le eliche destrogire e sinistrogire dei suoi omopeptidi, oligo (Aib)_n, sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. Qualora siano presenti, oltre all'Aib, amminoacidi chirali, il senso di spiralizzazione dell'elica sarà governato dalla chiralità di questi ultimi: gli L-amminoacidi proteici favoriscono eliche destrogire; al contrario, i D-amminoacidi favoriscono eliche sinistrogire.

L' α -elica è caratterizzata da 3.63 residui di amminoacido per giro (**Tabella 1.1**) ed è stabilizzata da legami a idrogeno *intramolecolari* tra l'ossigeno carbonilico (gruppo C=O) di un residuo e il protone ammidico (gruppo NH) del quarto residuo successivo ($i \leftarrow i + 4$) (Figura 1.5). Il legame a idrogeno chiude pertanto un ciclo formato da 13 atomi (struttura-C₁₃ o ripiegamento- α). L'elica- 3_{10} , invece, presenta 3.24 residui per giro (**Tabella 1.1**) con legami a idrogeno *intramolecolari* tra il gruppo C=O di un residuo e il gruppo NH del terzo residuo successivo ($i \leftarrow i + 3$) (Figura 1.5). Il legame a idrogeno

chiude quindi un ciclo comprendente 10 atomi (struttura- C_{10} o ripiegamento- β). I parametri più significativi relativi alle eliche- α e -3_{10} sono riportati in Tabella 1.1.^[27]

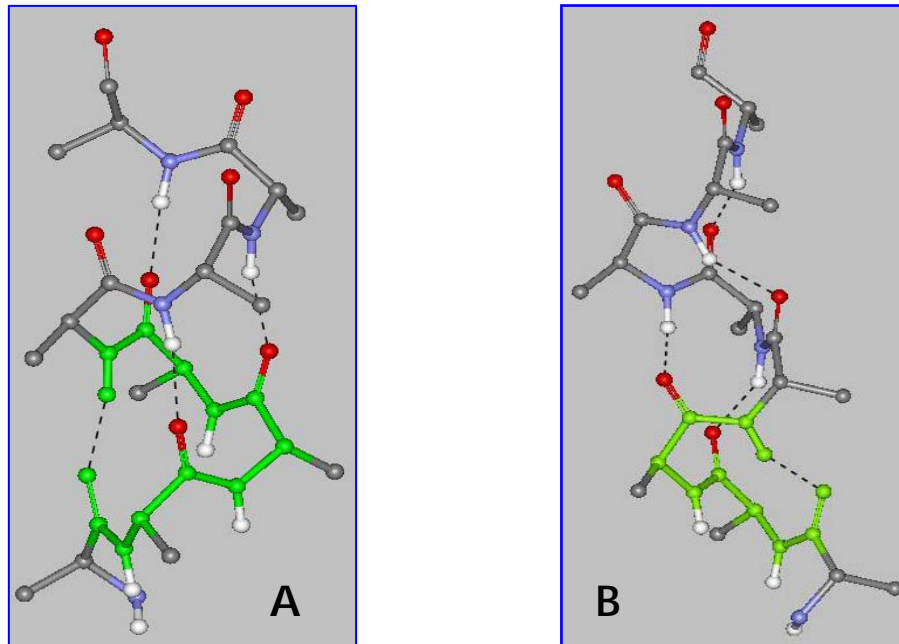


Figura 1.4 Elica- α destrogira (A) e elica- 3_{10} destrogira (B).

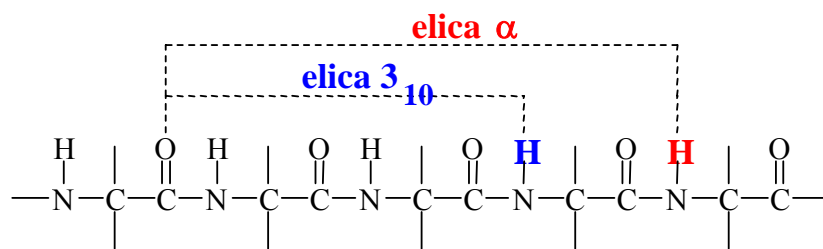


Figura 1.5 Legami a idrogeno *intramolecolari* nei due tipi di eliche (α e 3_{10}).

Parametri	Elica 3_{10}	Elica α
ϕ	-57°	-63°
ψ	-30°	-42°
Angolo del legame idrogeno $N\cdots O=C$	128°	156°
Rotazione per residuo	111°	99°
Traslazione assiale per residuo	1.94 \AA	1.56 \AA
Numero di residui per giro	3.24	3.63
Passo dell'elica	6.29 \AA	5.67 \AA

Tabella 1.1 Parametri per le eliche destrogire di tipo 3_{10} e α .^[27]

Per gli angoli torsionali che definiscono la conformazione di una catena polipeptidica (Figura 1.6) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica.^[28]

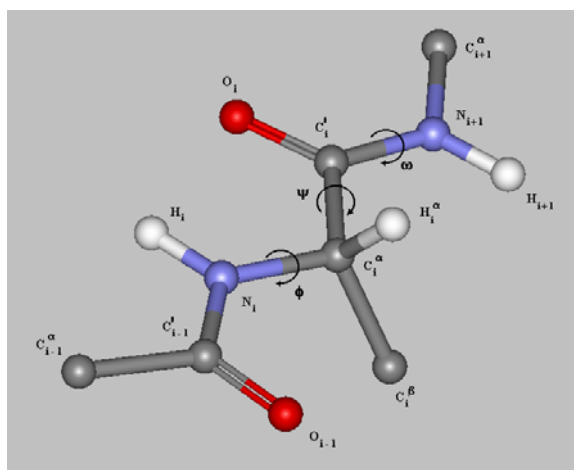


Figura 1.6 Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ($\phi_j = \psi_j = \omega_j = 180^\circ$) e il residuo centrale è in configurazione L.^[28]

I ripiegamenti β ^[29-31] (β -turns; Figura 1.7) sono stati classificati da Venkatachalam^[29] 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 1.2). La successione di ripiegamenti- β di tipo III o III' genera eliche- 3_{10} destrogire o sinistrogire, rispettivamente.

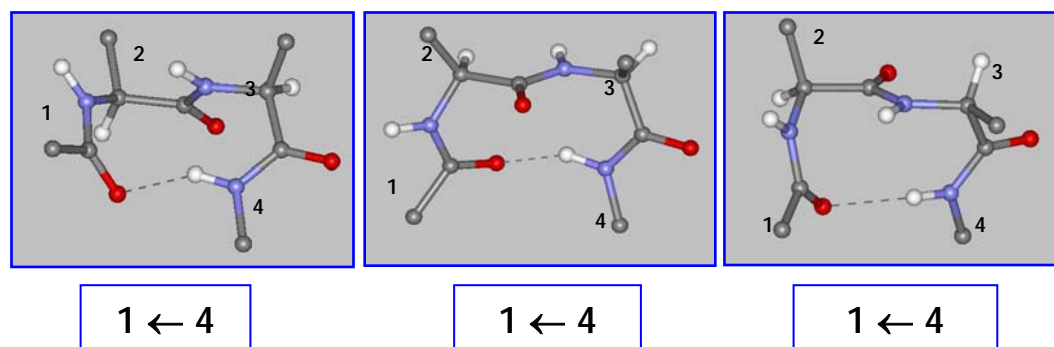


Figura 1.7 Rappresentazione dei tre ripiegamenti- β ideali (I, II, III) aventi il legame peptidico centrale *trans*.

Ripiegamento- β	$\phi (i+1)$	$\psi (i+1)$	$\phi (i+2)$	$\psi (i+2)$
Tipo I	-60°	-30°	-90°	0°
Tipo II	-60°	$+120^\circ$	$+80^\circ$	0°
Tipo III	-60°	-30°	-60°	-30°

Tabella 1.2 Valori degli angoli ϕ e ψ per i residui $i+1$ e $i+2$ nei ripiegamenti- β di tipo I, II e III.

L'estrema facilità con cui peptidi contenenti Aib forniscono cristalli singoli ha consentito l'analisi mediante diffrazione dei raggi X della serie completa degli omopolipeptidi dell'Aib fino all'undecamero.^[32-43] Gli omotripeptidi N-protetti formano una struttura- C_{10} di tipo III (o III'), indipendentemente dalla natura dei gruppi terminali.

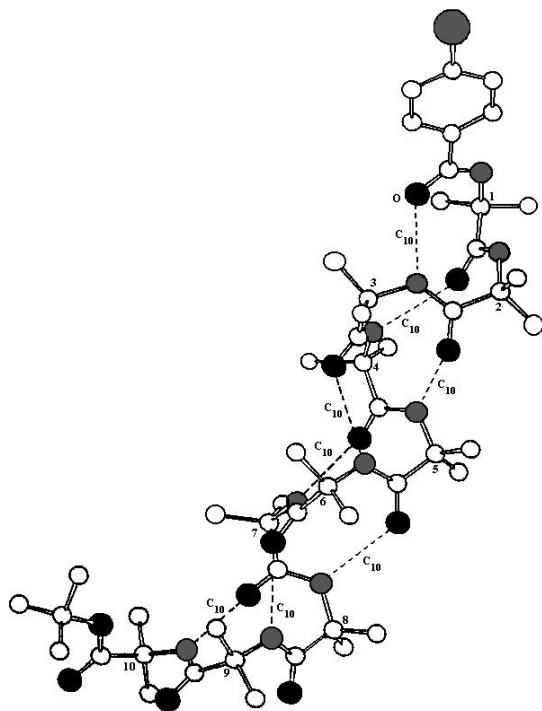


Figura 1.8 Struttura ai raggi X di $p\text{BrBz}-(\text{Aib})_{10}\text{-OtBu}$. I legami a idrogeno sono indicati da linee tratteggiate.^[40,41]

Nel caso di peptidi contenenti residui di Aib e residui di amminoacidi proteici (C^α -trisostituiti), allo stato cristallino si riscontrano esclusivamente strutture elicoidali. Tali eliche possono essere di tipo 3_{10} , di tipo α , o "miste" (un segmento α -elicoidale preceduto e/o seguito da alcune strutture C_{10}). Dall'esame di oltre 40 strutture ai raggi X, riportate in letteratura fino al 1990, di peptidi di lunghezza compresa tra 4 e 16 residui contenenti Aib e amminoacidi proteici emerge che tra i fattori che concorrono ad orientare la preferenza conformazionale verso l'una o l'altra struttura elicoidale vi sono la lunghezza di catena, il contenuto in Aib e la sequenza.^[45,46] Complessivamente l' α -elica tende ad essere favorita al crescere della lunghezza di catena e al decrescere del contenuto in Aib, anche se le eccezioni sono

Tutti gli altri membri superiori della serie formano invariabilmente il numero massimo di strutture C_{10} consecutive di tipo III (o III') compatibile con la lunghezza di catena, generando eliche- 3_{10} . A titolo di esempio in Figura 1.8 è riportata la struttura del decapeptide $p\text{BrBz}-(\text{Aib})_{10}\text{-OtBu}$.^[40,41]

La conformazione adottata allo stato cristallino dagli omopeptidi dell'Aib è quindi elicoidale di tipo 3_{10} .

Indagini conformazionali in soluzione (mediante assorbimento IR e spettrometria ^1H NMR) indicano che tale conformazione prevale nettamente anche in solventi poco polari quale il deuterocloroformio.^[32,44]

numerose e il ruolo giocato dalla sequenza è di problematica valutazione. D'altro canto i peptidi "corti" (fino a sei residui) manifestano una nettissima preferenza per l'elica-3₁₀.

In conclusione, la notevole mole di dati strutturali su peptidi contenenti Aib ha evidenziato l'elevata capacità di tale residuo amminoacidico non proteico di promuovere e stabilizzare i ripiegamenti- β e le conformazioni elicoidali.

1.3 Peptaibolici N-acetilati: caratteristiche strutturali e meccanismi d'interazione con le membrane

Gli antibiotici peptaibolici che possiedono in posizione N-terminale un gruppo acetilico possono essere suddivisi, sulla base del numero di residui e delle omologie di sequenza, in tre categorie: peptaibolici a sequenza lunga (17-19 residui), a sequenza media (14-15 residui) e a sequenza corta (5-13 residui). Alla seconda categoria appartiene la tilopeptina.^[47] I peptaibolici N-acetilati esibiscono sequenze molto simili, caratterizzate da un alto contenuto di amminoacidi idrofobici (es. Leu, Val, Ile), da pochi amminoacidi idrofilici (es. Ser, Thr ma soprattutto Glu, Gln e Hyp) e da alcuni residui di Pro. È inoltre frequente la sequenza Aib-Pro(Hyp). A questo proposito si ricorda che l'amminoacido Pro(Hyp) interrompe lo schema dei legami a idrogeno delle strutture elicoidali e che la sequenza Aib-Pro può essere accomodata solamente in ripiegamenti- β di tipo I o III.^[48,49]

1.3.1 Alameticina come modello

I peptaibolici a lunga sequenza (Figura 1.2), come ad esempio l'alameticina,^[19] la tricolorianina,^[50] e la tricotossina,^[51] possiedono le seguenti analogie di sequenza: (i) un residuo di Gln in posizione 6 o 7; (ii) una sequenza Aib-Pro in posizione 12-13 (o 13-14); (iii) uno o due residui di Glu o Gln in posizione C-terminale. Sulla base di tali somiglianze e di numerose evidenze sperimentali si può ragionevolmente ritenere che questi peptidi possiedano conformazioni simili.

Tra le prime sequenze peptaiboliche ad essere delucidate si annoverano quelle dell'alameticina. Come già ricordato, l'interesse per l'alameticina discende dalla sua attività antibatterica ed emolitica.^[52] E' ritenuto che tale azione sia dovuta alla formazione di pori *trans*-membrana, voltaggio-dipendenti.^[21,53-55] A tal fine la conformazione elicoidale, promossa dai numerosi residui di Aib presenti, risulta essere l'unico requisito strutturale essenziale, come evidenziato da G. Jung già nel 1985.^[52] La struttura ai raggi X dell'alameticina (Figura 1.9)^[56] è caratterizzata da un segmento α -elicoidale che si estende dall'estremità N-terminale fino al gruppo NH del residuo di Aib¹³. Vi è quindi una struttura C₁₀ a livello della sequenza Aib¹³-Pro¹⁴, seguita da una breve porzione elicoidale a carattere misto $\alpha/3_{10}$. Schematicamente quindi l'alameticina è rappresentabile come due segmenti elicoidali i cui assi formano un angolo di circa 20°: il residuo di Pro¹⁴ interrompe lo schema di legami a idrogeno e determina la diversa orientazione dell'elica C-terminale corta rispetto all'elica N-terminale lunga. Il carattere dell'elica è inoltre leggermente anfifilico, dato che i residui idrofilici di Gln⁷,

Glu¹⁸ e i carbonili di Aib¹⁰ e Gly¹¹ (questi ultimi non coinvolti in legami a idrogeno) giacciono sulla faccia convessa della combinazione dei due segmenti elicoidali.

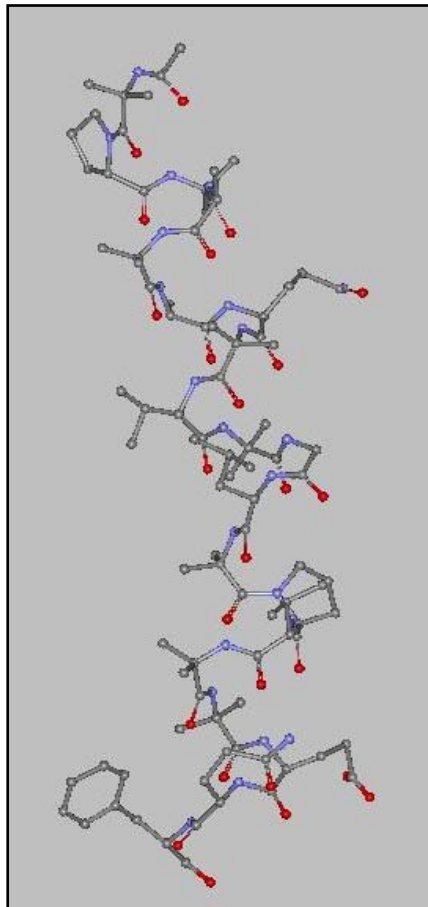


Figura 1.9 Struttura cristallina dell'alameticina F-30/I.^[56]

Analogie con la struttura dell'alameticina si sono trovate nella struttura cristallina della Leu-zervamicina^[57] (sequenza in Fig. 1.2), caratterizzata da una regione α -elicoidale tra i residui 1-9 e da un nastro di ripiegamenti β (una variante dell'elica-3₁₀)^[58] nella restante porzione. Anche la zervamicina presenta un'angolazione dello scheletro peptidico a livello della Pro(10) e la sua struttura elicoidale ha un carattere anfifilico. È stato inoltre osservato^[53] come la conformazione assunta dalla Leu-zervamicina allo stato cristallino sia notevolmente simile alla porzione 5-20 dell'alameticina. Nel cristallo di zervamicina eliche peptidiche si dispongono in modo circolare e

reciprocamente antiparallelo, con le facce convesse (ricche di residui idrofilici) orientate verso l'interno dei canali che vengono così formati.

La conformazione dell'alameticina riscontrata allo stato cristallino sembra essere mantenuta anche in soluzione, come emerge da studi condotti mediante ^1H -, ^{13}C - e ^{15}N -NMR in solventi organici^[59-60] e sistemi micellari.^[61] Studi CD hanno indicato una struttura largamente α -elicoidale per l'alameticina e i peptaibolici ad essa correlati.

La proprietà più interessante dell'alameticina è la sua capacità di formare pori voltaggio-dipendenti in membrane lipidiche artificiali planari.^[22,53] Le indagini biofisiche più informative hanno mirato alla determinazione delle curve I/V (corrente/voltaggio) e delle fluttuazioni di corrente per singolo canale. Le prime consistono nell'applicare al doppio strato un voltaggio crescente nel tempo e nel misurare la corrispondente variazione di conducibilità in presenza del peptide. Si osserva che la membrana comincia a condurre solo al di sopra di un certo voltaggio critico. Tale conducibilità è da imputarsi all'apertura contemporanea di molti canali. Se invece si applica alla membrana un potenziale costante, ma inferiore al voltaggio critico, si possono misurare delle fluttuazioni di corrente dovute all'apertura e chiusura di singoli canali. Sulla base di queste e di altre misure è stato possibile stabilire che questi canali sono formati da un certo numero di eliche peptidiche che, attraversando la membrana da parte a parte, si dispongono in cerchio e parallelamente fra loro, orientando la faccia idrofilica verso l'interno (modello “a doghe di botte”, Figura 1.10).

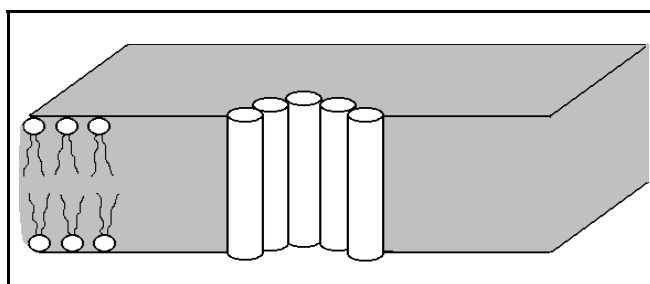


Figura 1.10 Modello “a doghe di botte” per la formazione di canali nelle membrane cellulari da parte di molecole elicoidali di alameticina.

E' opportuno precisare che le lunghezze totali dell'alameticina e di peptaibolici, quali la zervamicina, determinate cristallograficamente (28-34 Å) sono sostanzialmente

paragonabili allo spessore della porzione idrofobica di una membrana a doppio strato, che è di circa 34 Å.^[62]

Di difficile spiegazione è la dipendenza dal voltaggio (*voltage-gating*) dell'apertura dei canali ionici. Sono stati pubblicati molti modelli teorici atti a spiegare tale fenomeno. Brevemente, essi possono essere suddivisi in tre gruppi. Nel primo gruppo l'applicazione del voltaggio aumenterebbe la partizione del peptide tra il doppio strato lipidico e la fase acquosa, con conseguente formazione degli aggregati peptidici.^[63] Nel secondo gruppo, che si basa sull'elevato momento di dipolo dei peptidici, aggregati stabili di alameticina, formati da monomeri α -elicoidali allineati in modo antiparallelo, sarebbero presenti a livello delle membrane in assenza di voltaggio. L'applicazione di quest'ultimo indurrebbe un riallineamento dei dipoli fra loro con corrispondente apertura dei canali (modello a *flip-flop*).^[64] In una variante di questo modello il voltaggio indurrebbe inoltre l'espulsione di un'elica centrale che altrimenti occluderebbe il poro.^[17] In un terzo gruppo il voltaggio sarebbe responsabile di un cambiamento conformazionale della molecola di alameticina. In questo contesto, in un modello proposto da Fox e Richards,^[56] che si basa sulla struttura cristallina dell'alameticina, in assenza di voltaggio *transmembrana* solo la porzione N-terminale del peptide sarebbe inserita nel doppio strato in conformazione elicoidale. La corta elica C-terminale, che forma un angolo con la precedente a livello del residuo di Pro¹⁴ ed è ricca di residui idrofilici, rimarrebbe nel solvente. L'imposizione di un voltaggio avrebbe l'effetto di provocare un allineamento delle due porzioni elicoidali e il peptide potrebbe così inserirsi completamente nel doppio strato (Figura 1.11).

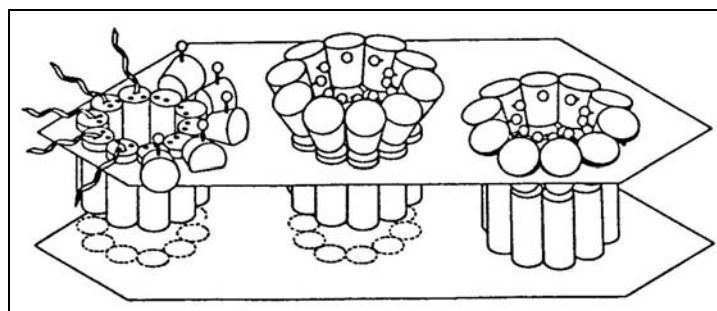


Figura 1.11 Modello d'azione per l'alameticina proposto da Fox e Richards:^[56] in presenza di voltaggio *transmembrana* le singole eliche si raddrizzano e il cilindro (poro) così formatosi si infila nel doppio strato fosfolipidico.

È difficile discriminare tra questi modelli sulla base dei dati sperimentali esistenti. Uno studio compiuto da Archer e Cafiso^[65] sulla corrente indotta dall'alameticina in vescicole unilamellari in presenza di un potenziale *transmembrana* ha indicato che, sebbene la corrente indotta sia voltaggio-dipendente, non lo è invece la partizione del peptide all'interno del doppio strato.

Questo risultato renderebbe poco probabile il primo modello descritto. Archer *et al.*^[66] hanno anche determinato, mediante la tecnica ESR su alameticina marcata al C-terminale con una sonda paramagnetica (nitrossido), che in assenza di voltaggio l'alameticina sembra essere monomericamente a livello delle membrane.

Tale risultato è stato confermato in modo analogo da Barranger-Mathys e Cafiso.^[67] L'insieme di questi dati renderebbe meno credibili i modelli in cui l'alameticina sarebbe aggregata già in assenza di voltaggio. Più di recente Barranger-Mathys e Cafiso^[68] hanno anche determinato l'orientazione dell'alameticina nelle membrane in assenza di potenziale (mediante ESR, utilizzando una serie di suoi analoghi marcati con uno *spin-label*, o sonda radicalica, in diverse posizioni della catena). Questo studio ha consentito di stabilire che l'alameticina è orientata perpendicolarmente alla membrana, con la porzione N-terminale completamente inserita nel doppio strato e quella C-terminale esposta al solvente. Tale osservazione corroborerebbe il terzo modello di *voltage-gating*, secondo cui il voltaggio sarebbe responsabile di una transizione conformazionale e conseguente inserimento dell'alameticina nelle membrane. Questo sembra in definitiva il modello che meglio interpreta l'insieme di evidenze sperimentali finora raccolte. Vogel *et al.*^[69] hanno proposto, basandosi su peptidi modello contenenti un residuo di Pro nella sequenza, che la presenza di un'angolatura nell'elica peptidica e le conseguenti fluttuazioni tra stati ripiegati e lineari di tali eliche *transmembrana* siano in realtà una caratteristica comune a molte proteine di membrana e che siano responsabili dell'apertura e chiusura di canali voltaggio-dipendenti.

1.4 Antibiotici lipopeptaibolici: tricogina GA IV

Gli antibiotici lipopeptaibolici^[5-10] (Figura 1.2) differiscono dagli altri membri della famiglia per la presenza in posizione N-terminale di un gruppo acilico di 8-10 atomi di carbonio, e per la corta sequenza (7-11 residui, includendo nel computo l'1,2-amminoalcol C-terminale). La tricogina GA IV,^[4,5] le triconingine KB I e KB III,^[6] e le tricodecine,^[9] mancano inoltre di residui idrofilici e di Pro(Hyp). Solo di recente sono stati isolati gli antibiotici LP237-F5,7,8^[7,8] che, contenendo residui di Tyr, Gln e Pro, sono più simili ai peptaibolici N-acetilati. Gli antibiotici del gruppo LP237 presentano inoltre nella loro sequenza un amminoacido C^α-tetrasostituito chirale molto inusuale, l' α -etilnorvalina (Etn, Figura. 1.3).

La sequenza della tricodecena corrisponde alla porzione C-terminale (residui 5-11) della tricogina GA IV. Le triconingine differiscono dalla tricogina GA IV per la sostituzione di due residui di Leu con due Val nelle posizioni 3 e 7. La triconingina KB II contiene inoltre un residuo N-terminale di D-Iva in sostituzione dell'Aib presente nella tricogina GA IV e nella triconingina KB I.

Non è stato ancora accertato se i lipopeptaibolici siano in grado di formare pori voltaggio-dipendenti in membrane lipidiche planari. E' invece documentato che questi peptidi possiedono significativa attività antibiotica contro i batteri Gram-positivi.^[4,6] Inoltre la miscela di LP237-F5,7,8^[7,8] ha attività citotossica su cellule leucemiche di topo. La tricogina GA IV e le triconingine sono in grado di aumentare la permeabilità agli ioni di vescicole fosfolipidiche unilamellari (SUV) in assenza di un potenziale transmembrana.^[4,6] La tricogina GA IV, in particolare, ha in questo senso un'attività paragonabile a quella di peptaibolici più lunghi.

La tricogina GA IV è stato il primo lipopeptaibolico ad essere isolato e pertanto è anche il peptide di questa famiglia più estesamente studiato.

La conformazione di questo peptaibolico è stata studiata in MeOH mediante NMR ¹H e ¹³C e CD.^[4b] Sulla base di questi risultati è stata proposta una conformazione principalmente α -elicoidale con qualche struttura C₁₀. Più recentemente è stata risolta la struttura ai raggi X del racemato della tricogina GA IV, ottenuto facendo co-cristallizzare gli enantiomeri "tutto D" e "tutto L" in quantità equimolari.^[70] Nel cristallo

sono presenti due molecole indipendenti per ciascun enantiomero (molecola A e molecola B), di conformazione molto simile (Figura 1.12).

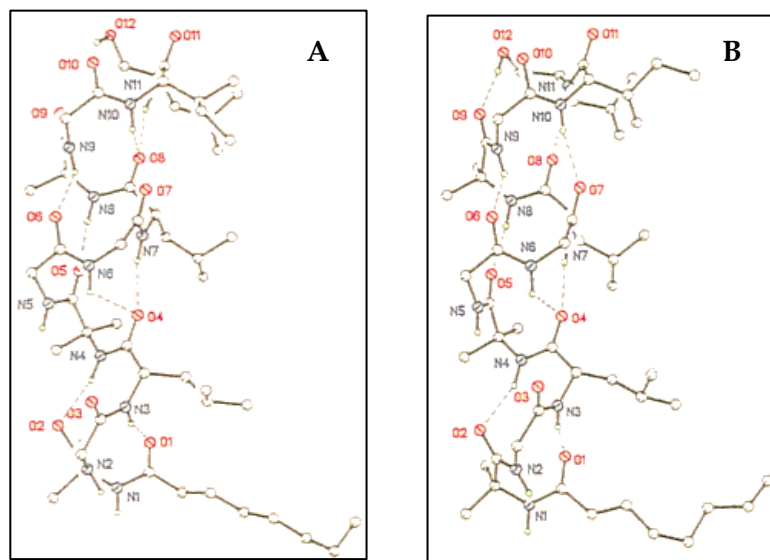


Figura 1.12 Struttura cristallina della tricogina GA IV (enantiomero "tutto L", molecola **A** a sinistra, molecola **B** a destra). I legami a idrogeno sono indicati da linee tratteggiate.

Il peptide assume una conformazione elicoidale mista $\alpha/3_{10}$ (destrogiro per l'enantiomero L, sinistrogiro per quello D). In particolare si riscontra un breve segmento elicoidale 3_{10} nella regione N-terminale, seguito da un segmento più lungo di α -elica irregolare. Il gruppo ottanoilico N-terminale è orientato perpendicolarmente all'asse dell'elica e la lunghezza della porzione peptidica è circa 16 Å, corrispondente a circa metà dello spessore di una membrana lipidica a doppio strato. Inoltre il carattere dell'elica è in qualche modo anfifilico, dato che, sebbene manchino residui propriamente idrofili, i quattro residui di Gly (il residuo meno idrofobico nella sequenza) sono disposti su una faccia dell'elica, mentre le catene laterali idrofobiche di Leu, Ile, Lol e il gruppo ottanoilico sono disposti sull'altra faccia. Dall'impacchettamento cristallino emerge che tali eliche anfifiliche si dispongono a cerchio a formare un canale in cui sono ospitate molecole d'acqua co-cristallizzate (Figura 1.13). Questo canale si estende all'infinito, in quanto paia di molecole di uguale senso d'avvolgimento sono connesse testa-coda attraverso legami a idrogeno intermolecolari.

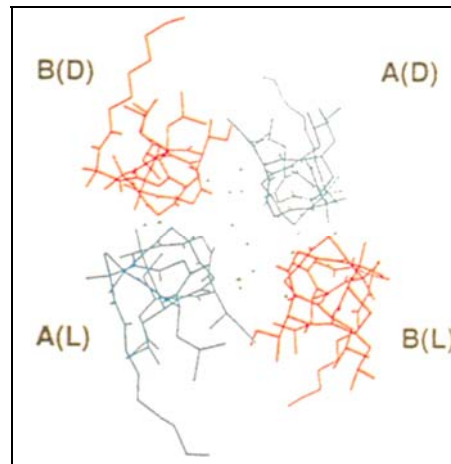


Figura 1.13 Formazione di canali da parte di eliche di tricogina GA IV allo stato cristallino (visione lungo l'asse dell'elica). Le molecole d'acqua sono indicate da punti. Sono indicati inoltre il tipo di enantiomero (L o D) e di molecola indipendente (A o B).

E' evidente che la tricogina GA IV, date le sue dimensioni, non è in grado di attraversare da parte a parte la membrana lipidica come fanno invece i peptaibolici più lunghi. Di conseguenza, per giustificare la sua attività sulle membrane, occorre invocare un modello di azione diverso da quello già descritto per i peptaibolici più lunghi.

Peptidi elicoidali anfifilici in grado di modulare la permeabilità delle membrane possono agire secondo almeno due meccanismi indipendenti:^[71] (i) un certo numero di eliche peptidiche si associano fra loro inserendosi perpendicolarmente alla membrana, perforandola da parte a parte e dando luogo alla formazione di un poro (modello “a doghe di botte”; vedi Figura 1.10); (ii) le eliche peptidiche si dispongono parallelamente alla superficie della membrana (modello “a tappeto”; Figura 1.14, a sinistra) interagendo in qualche modo con essa e modificando le proprietà fisiche del doppio strato (ad esempio distruggendo l'impaccamento lipidico e/o modificando la curvatura intrinseca di ciascun monostrato).

Alla luce delle informazioni ricavate dalla struttura cristallina della tricogina GA IV è stato ipotizzato che questa possa agire sulle membrane secondo un modello a “doghe di botte” modificato (Figura 1.15, a destra). Molecole di tricogina GA IV si legherebbero testa-a-testa in maniera non covalente dando origine a dimeri di lunghezza sufficiente ad attraversare la membrana. Si formerebbe così un canale idrofilico, al cui interno si troverebbero le facce ricche di Gly. La funzione del gruppo *n*-ottanoilico potrebbe

essere quella di inserirsi tra le facce idrofobiche delle molecole orientate testa-a-testa, governando in qualche misura l'allineamento tra le due metà del poro.

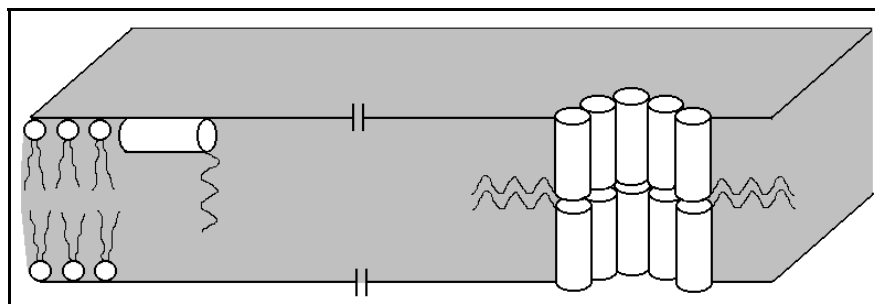


Figura 1.14 Meccanismo di azione della tricogina GA IV sulle membrane secondo i modelli "a tappeto" (sinistra) e "a doghe di botte modificato" (destra).

La differenza fondamentale tra quest'ultimo modello e quello "a tappeto", dove la funzione del gruppo ottanoilico sarebbe quella di ancorare la molecola di alla superficie della membrana perturbandone l'impaccamento fosfolipidico, consiste nella diversa orientazione del peptide rispetto al piano della membrana.

Per chiarire questo punto nel nostro Laboratorio sono stati sintetizzati tre analoghi della tricogina GA IV, recanti ciascuno un residuo di TOAC (acido 2,2,6,6

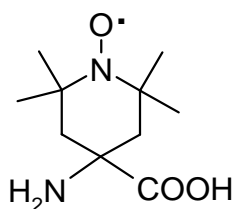


Figura 1.15: Struttura chimica dell'amminoacido TOAC.

tetrametilpiperidino-1-ossile-4-ammino-4-carbossilico) (Figura 1.15) in sostituzione dei residui di Aib nelle posizioni 1, 4 e 8 della sequenza.^[72] Il TOAC è un amminoacido C^α-tetrasostituito recante in catena laterale un radicale libero nitrossilico, utile come sonda ESR e *quencher* di fluorescenza. Esso ha proprietà conformazionali analoghe a quelle dell'Aib. Dettagliate

analisi conformazionali hanno infatti dimostrato che il TOAC è un forte induttore di ripiegamenti β e di strutture elicoidali di tipo α e 3_{10} sia allo stato cristallino che in soluzione.^[46b,73-79] Pertanto la sostituzione dell'Aib con il TOAC in questi analoghi della tricogina GA IV è attesa mantenere sostanzialmente inalterata la conformazione del peptide.^[46b] I risultati dello studio mediante ESR di tali peptidi in presenza di liposomi indicano che la tricogina GA IV si dispone con l'asse elicoidale parallelo alla superficie della membrana lipidica^[72]. Questo risultato è stato confermato indipendentemente mediante misure di *quenching* di fluorescenza da parte degli stessi peptidi in presenza di membrane lipidiche a doppio strato contenenti sonde fluoroforiche a diverse profondità rispetto alla superficie della membrana.^[80]

I risultati sopra esposti sono quindi consistenti con l'ipotesi di meccanismo di azione della tricogina GA IV "a tappeto", e incompatibili con il meccanismo "a doghe di botte" che richiede l'orientazione del peptide perpendicolare al piano della membrana. Va però ricordato che tali risultati sono stati ottenuti in assenza di potenziale transmembrana. Pertanto essi non sono necessariamente estendibili all'interazione della tricogina GA IV con una membrana cellulare.

Più recentemente, sempre nel nostro Laboratorio, sono stati sintetizzati altri analoghi della tricogina GA IV, contenenti in posizione opportune sonde fluorofore, allo scopo di estendere lo studio dell'attività in membrana a tecniche spettroscopiche quali l'assorbimento UV e la fluorescenza.^[81] I risultati ottenuti da tali analisi, condotte su liposomi, hanno portato a concludere che il meccanismo di azione della tricogina GA IV sui doppi strati è dominato dall'equilibrio tra una specie inattiva monomeric, che si orienta parallelamente alla superficie del doppio strato, e una forma aggregata, che si inserisce in membrana consentendo il rilascio di marcatori inclusi nei liposomi (*leakage*). Inoltre, solo il rilascio di sonde di determinate dimensioni ($r \sim 2$ nm) è risultato favorito (*size-selective leakage*). Questo dato, assieme al riscontro di una forte correlazione tra concentrazione di aggregato in membrana e perturbazione della membrana stessa, sembrerebbe supportare, al contrario di quanto osservato per i TOAC-analoghi, l'ipotesi di formazione del poro transmembrana (modello "a doghe di botte").

Un'altra caratteristica chimica della tricogina GA IV (e dei lipopeptidici in generale) collegabile all'attività di membrana è la presenza della catena acilica in posizione N-terminale. Allo scopo di esaminare il ruolo di questa funzione sulla capacità di modificare la permeabilità delle membrane fosfolipidiche il nostro Laboratorio ha anche sintetizzato una serie di analoghi della tricogina GA IV, con catena acilica di lunghezza variabile, di formula:^[82]



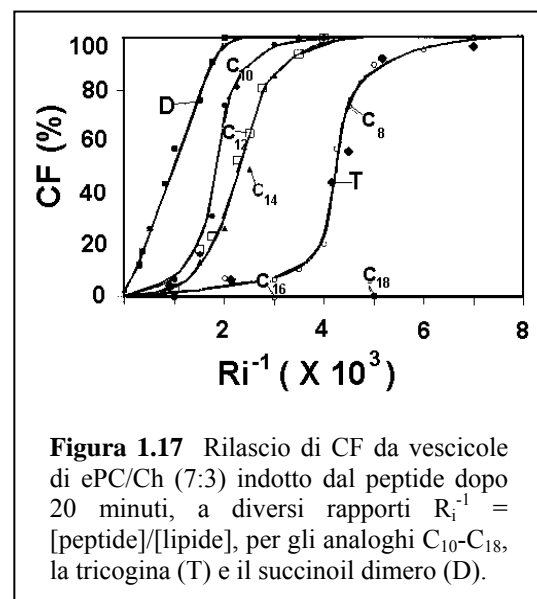
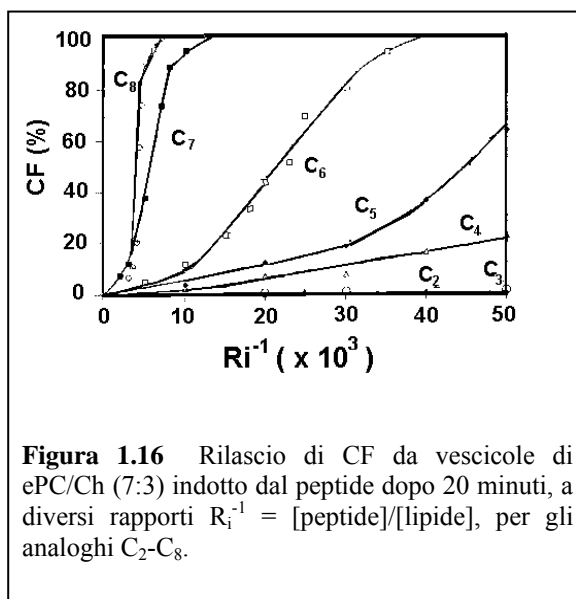
con $n = 0-16$ (che verranno per brevità indicati con C₂-C₁₈, rispettivamente).

È stato inoltre sintetizzato il succinil-dimero di formula:



Quest'ultimo peptide mima la disposizione testa a testa di due molecole di tricogina GA IV e ha lunghezza sufficiente a trapassare le membrane a doppio strato. Tutti questi peptidi sono caratterizzati da un metilestere C-terminale, precursore sintetico dell'amminoalcol. Tuttavia, è stato verificato che la sostituzione del leucinolo (Lol) C-terminale con Leu-OMe non determina variazioni di attività. E' stata evidenziata una sostanziale identità conformazionale degli analoghi fra loro e con il peptide naturale.^[82] Per quanto riguarda il succinil dimero, l'indagine NMR ha rivelato la presenza di un solo "set" di segnali di protoni (¹H NMR) o di carboni (¹³C NMR), indicando che le due metà della molecola sono equivalenti.^[83]

La capacità di modificare la permeabilità delle membrane lipidiche da parte della tricogina GA IV e dei suoi analoghi è stata esaminata misurando la percentuale di rilascio di carbossifluoresceina (CF) da vescicole unilamellari (SUV) di fosfatidilcolina/colesterolo (ePC/Ch) 7:3, per rapporti [peptide]/[lipide] variabili (Figure 1.16 e 1.17).^[82] Al crescere della lunghezza della catena lipidica si è osservato un continuo aumento di attività (da C₃ a C₁₀; C₂ è sostanzialmente inattivo) quindi una leggera diminuzione andando da C₁₀ a C₁₄. Gli analoghi C₁₆ e C₁₈ sono praticamente inattivi. Quest'ultimo dato è probabilmente imputabile ad un effetto cinetico dovuto alla minor solubilità in acqua di questi analoghi se paragonati a quelli recanti catene aciliche più corte, e di conseguenza alla loro diffusione più lenta. E' da ricordare che tutte queste misure sono state effettuate con un tempo di incubazione di 20 minuti. Il succinil dimero è più efficiente di tutti gli undecapeptidi.



Per gli analoghi C₂, C₈ e C₁₆ [L-Leu¹¹OMe] sono state anche misurate l'attività antibatterica contro lo *Staphylococcus aureus* e quella emolitica su eritrociti umani. L'ordine di attività dei tre analoghi è quello già riscontrato sui liposomi; ovvero l'analogo C₈ e il peptide naturale hanno proprietà identiche, mentre gli analoghi C₂ e C₁₆ sono praticamente inattivi.

Recentemente sono state sintetizzate tutte le sequenze peptidiche corte C-terminali recanti un gruppo ottanoilico all'N-terminale.^[84] Già a livello di tetrapeptide è stata rilevata una discreta capacità di permeare i doppi strati fosfolipidici. Tale attività cresce quindi gradatamente fino all'undecapeptide (tricogina GA IV a sequenza completa).

E' stato inoltre sintetizzato un analogo della tricogina GA IV sostituendo tutti i residui di Gly con Ser ([Ser^{2,5,6,9},L-Leu¹¹ OMe]tricogina), e ne è stata risolta la struttura ai raggi X.^[85] La conformazione di questo analogo è risultata sostanzialmente identica a quella della tricogina GA IV (Figura 1.18).

La presenza dei quattro residui di Ser allineati su una faccia della superficie elicoidale conferisce a questo analogo un carattere più spiccatamente anfifilico rispetto alla tricogina GA IV naturale, come evidenziato dalla più elevata attività emolitica e di alterazione della permeabilità delle membrane lipidiche.^[86]

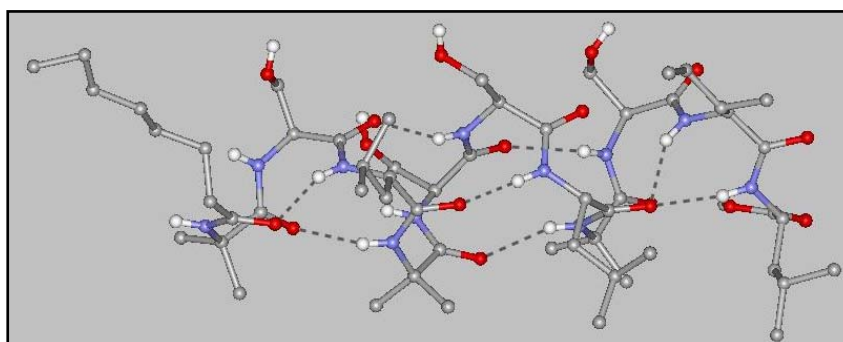
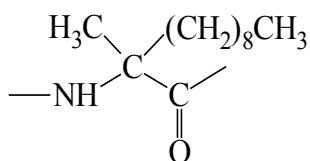


Figura 1.18 Struttura ai raggi X del [Ser^{2,5,6,9},L-Leu¹¹ OMe] analogo della tricogina GA IV. I legami a idrogeno intramolecolari sono indicati da linee tratteggiate.^[85]

E' stato anche condotto uno studio NMR bidimensionale in ambiente micellare membrano-mimetico sugli analoghi [Leu¹¹OMe]tricogina e [Ser^{2,5,6,9},Leu-OMe¹¹]tricogina.^[87] In queste condizioni entrambi i peptidi assumono una

conformazione elicoidale mista $\alpha/3_{10}$, analogamente a quanto riscontrato allo stato cristallino, con una minore flessibilità evidenziabile per l'analogo contenente i quattro residui di Ser.

Infine, sono stati preparati analoghi della tricogina GA IV sostituendo il gruppo *n*-ottanoilico N-terminale con un ulteriore residuo o di Aib o dell'acido 2-ammino-2-



(α Me)Aun

Figura 1.19 Struttura chimica dell'amminoacido (α Me)Aun.

metilundecanoico [(α Me)Aun, Figura 1.19], entrambi N-acetilati.^[88] Questi analoghi mantengono le principali caratteristiche conformazionali della tricogina GA IV, come evidenziato da studi di CD, FT-IR ed NMR. Solo il secondo analogo, che possiede una catena laterale alchilica lunga, è in grado però di alterare la permeabilità di vescicole lipidiche unilamellari

in modo simile alla tricogina GA IV. Questo risultato indica che è possibile spostare la catena lipofilica della dal gruppo N-bloccante alla catena laterale di un ulteriore residuo N-terminale conservando le proprietà conformazionali e di attività del peptide originale.^[88]

1.5 Il gruppo *p*CN-fenil come sonda

Una possibile via per determinare il modo con cui la tricogina interagisce con la membrana è quello di modificare residui specifici con altri amminoacidi che possano agire da sonda. Come già ricordato in questa Tesi ci si è concentrati sul gruppo *para*-cianofenilico. In particolare, si è fatto uso dell'amminoacido *p*CN-(α Me)Phe (figura 1.20). Esso è stato sintetizzato in forma otticamente pura, con un metodo chemoenzimatico, nei laboratori dei dott. Q. R. Broxterman e B. Kaptein della DSM Research (Olanda). Commercialmente è disponibile solamente la *p*CN-Phe (figura 1.20) e tutti i lavori sinora pubblicati riguardano tale amminoacido. Nulla è ancora noto sulle caratteristiche spettroscopiche e conformazionali della *p*CN-(α Me)Phe.

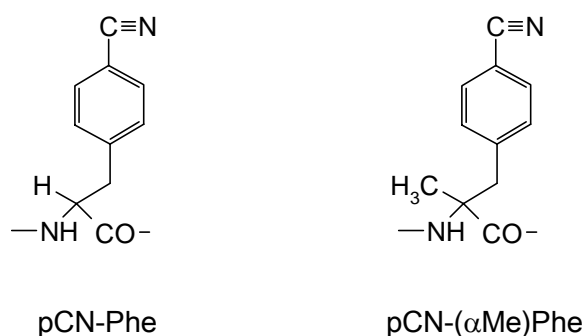


Fig. 1.20 Analoghi della Phe contenenti il gruppo *p*CN-fenilico.

Il gruppo *p*CN-fenilico si presta molto bene ad essere impiegato nell'ambito di indagini mediante assorbimento IR,^[89-100] in quanto la frequenza di *stretching* del triplo legame -CN cade a circa 2250 cm^{-1} , una regione spettrale dove non si hanno generalmente sovrapposizioni di altre bande di assorbimento. L'aspetto più interessante è che la posizione nello spettro di tale banda dipende fortemente dall'ambiente che circonda il gruppo -CN, ovvero dal solvente, dal campo elettrico locale e dai legami ad idrogeno che lo coinvolgono.^[92-94,97-99]

Per quanto riguarda l'emissione di fluorescenza, la *p*CN-Phe presenta due massimi approssimativamente a 233 e 280 nm. Questa caratteristica permette sia di eccitare selettivamente tale sonda (a 240 nm) in presenza di Trp o Tyr, sia di rivelare effetti dipendenti dall'intorno utilizzando la transizione a 295 nm.^[98] Inoltre, la catena laterale della *p*CN-Phe non risulta particolarmente ingombrante o polare da indurre variazioni nella conformazione del peptide, come avviene spesso con altre sonde fluorescenti.

La sonda *p*CN-Phe va inserita nella sequenza della tricogina in modo da non alterare le preferenze conformazionali del peptaibolico. In particolare, la *p*CN-Phe potrà rimpiazzare un α -amminoacido C^α -trisostituito, mentre la *p*CN-(α Me)Phe dovrà essere inserita al posto di un α -amminoacido C^α -tetrasostituito. Pertanto, la *p*CN-Phe potrà sostituire una Leu o la Ile, la *p*CN-(α Me)Phe un residuo di Aib.

1.6 Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto che si prefigge di sintetizzare tre analoghi della tricogina GA IV contenenti l'amminoacido H-L-*p*CN-(α Me)Phe-OH:

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**1**)

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-L-Ile-L-Lol (**2**)

n-ottanoil-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**3**)

Per i primi due analoghi si è previsto di seguire la metodica classica della sintesi in soluzione. Infatti, la più veloce sintesi su supporto solido dà risultati modesti quando si deve inserire all'interno di una catena un residuo stericamente impedito come la *p*CN-(α Me)Phe. Pertanto, solo per il terzo analogo è stata prevista la sintesi su fase solida. Pur richiedendo tempi notevolmente più lunghi, la sintesi in soluzione presenta tuttavia il vantaggio di poter isolare e studiare tutti i peptidi corti intermedi.

Come si vedrà più avanti, il presente lavoro di Tesi riporta una parte di questo complesso cammino sintetico. In particolare, è stato possibile sintetizzare il peptide **3** mediante sintesi su fase solida e alcuni segmenti intermedi degli analoghi **1** e **2**.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.1 Reagenti e solventi

Acros-Janssen (Geel, Belgio): acido α -aminoisobutirrico, acido trifluoroacetico, L-leucina, L-isoleucina, glicina, cloroformio deuterato, diossano, metanolo per spettroscopia, triisopropilsilano (TIS) (99%), 2,2,2-trifluoroetanolo per spettroscopia, anidride acetica, THF, N,N-diisopropiletilamina, catalizzatore 10% Pd/C, 1-idrossi-1H-benzotriazolo.

Aldrich Chem. Co. (Winston, USA): Hepes, di-ter-Buil dicarbonato.

Carlo Erba (Milano): acetato di etile, acetone, acido acetico glaciale, bicarbonato di sodio, bisolfato di potassio, cloroformio, cloruro di metilene, etanolo, etere dietilico, etere di petrolio (30-50 °C), idrossido di sodio, ipoclorito di sodio, metanolo, solfato di sodio anidro, toluene, trietilammina.

DSM Research (Paesi Bassi): H-L-pCN-(α Me) fenilalanina.

Fluka (Buchs, Svizzera): acido trifluoroacetico per HPLC (>99,5%), THF anidro, metanolo anidro, litioboridruo, N-metilmorfolina, catalizzatore 10% Pd/C, N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano.

GL Biochem (Shanghai): 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato.

Iris Biotech (Marktredwitz, Germania): N-etil-N'-(3-dimetilammino) propilcarbodiimmide cloridrato, benzilossicarbonil-N-idrossisuccinimmide.

Merck (Darmstadt, Germania): gel di silice per cromatografia "*flash*".

Prolabo (Parigi, Francia): HCl, cloruro di sodio.

Sigma (St. Louis, USA): N(Bu)₄I, resina Sephadex G-75, colesterolo, α -fosfatidil-L-colina (tipo XVI-E, polvere liofilizzata).

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 F₂₅₄ (Merck). I fattori di ritenzione sono stati determinati utilizzando tre diverse miscele di solventi come eluenti:

CHCl ₃ /EtOH 9:1	Rf ₁
1-Butanolo/AcOH/H ₂ O 3:1:1	Rf ₂
toluene/EtOH 7:1	Rf ₃

Per la rivelazione dei prodotti su lastra sono stati usati una lampada UV per gruppi aromatici, il reattivo al TDM per i legami ammidici.

CROMATOGRAFIA FLASH

La "cromatografia *flash*"^[101] è stata effettuata usando come fase stazionaria il gel di silice 60 Merck (granulometria 40-63 μ m). Il campione da purificare è stato caricato in testa alla colonna disciolto nell'eluente prescelto per la separazione.

DETERMINAZIONE DEI PUNTI DI FUSIONE

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

MISURE POLARIMETRICHE

Le misure polarimetriche sono state effettuate con un polarimetro Perkin-Elmer modello 241 equipaggiato con un termostato Haake modello D8, utilizzando una cella con cammino ottico di 10 cm, alla lunghezza d'onda della riga D del sodio (589 nm).

MODULAZIONE DI PERMEABILITA' DI MEMBRANE ARTIFICIALI

Le misure di modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali sono state eseguite seguendo il rilascio di CF da vescicole unilamellari (SUV) di fosfatidilcolina/colesterolo 7:3 secondo il seguente metodo: a 25mg di PC solida liofilizzata sono stati aggiunti 308 μ l di una soluzione di Ch 45.38 mM in CH_2Cl_2 distillato. La miscela lipidica (PC:Ch 7:3 in moli) è stata seccata facendo flussare azoto e ponendo in essiccatore, sotto vuoto, per circa 2 ore. È stata preparata una soluzione di carbossifluoresceina 50 mM: a 113 mg di carbossifluoresceina si aggiungono 1 mL di acqua distillata, alcune gocce di NaOH 1N fino a rendere omogenea la soluzione, 2 ml di tampone Hepes 30 mM a pH 7.4 e quindi acqua distillata fino a raggiungere un volume di 6mL. Il pH finale era compreso tra 7.4 e 7.5. La miscela lipidica è stata idratata con 6 ml di CF 50 mM. La sospensione lipidica è stata lasciata riposare a temperatura ambiente e al buio per 15 ore. Il giorno successivo la soluzione è stata sonicata a 0° C per 45 minuti. Le vescicole SUV sono state separate dalla carbossifluoresceina non incapsulata mediante "gel filtration" su colonna di Sephadex G-75 (diametro colonna 2 cm, altezza della fase stazionaria 60 cm), usando come eluente la soluzione di NaCl 100mM tamponato con Hepes 5 mM, pH 7.4. È stato calcolato il fattore di diluizione per la soluzione lipidica. La concentrazione totale di lipidi è stata mantenuta costante per tutti gli esperimenti ([PC+Ch] 0.06 mM) che sono stati eseguiti in cuvette in PVC (1 cm x 1 cm) contenenti 2.5 ml di sospensione lipidica, misurando, mediante fluorescenza, la CF rilasciata a diversi rapporti

$$R^{-1} = \frac{[\text{peptide}]}{[\text{lipide}]}$$

ottenuti aggiungendo aliquote di una soluzione metanolica del peptide. Le misure di fluorescenza sono state eseguite su uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer MPF-66 a 20° C, λ_{exc} 488 nm, λ_{em} 520 nm. La percentuale di CF rilasciata al tempo t (pari a 20min) è stata determinata come

$$\%CF = \frac{F_t - F_0}{F_T - F_0} \cdot 100$$

dove F_0 : intensità di fluorescenza delle vescicole in assenza del peptide;

F_t : intensità di fluorescenza al tempo t in presenza del peptide;

F_T : intensità totale di fluorescenza determinata distruggendo le vescicole mediante addizione di 50 μ l di Triton X-100 al 10% in acqua.

DICROISMO CIRCOLARE

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con il dicrografo Jasco modello J-715, utilizzando celle di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 0.02cm. I valori sono espressi in ellitticità molare (gradi x cm^2 x dmol^{-1}):

$$[\Theta]_T = (\text{PM} \times \Theta) / (l \times c) = 3300 \times \Delta\varepsilon = 3300 \times (\varepsilon_L - \varepsilon_R)$$

dove Θ = ellitticità osservata

PM = peso molecolare totale del peptide

l = lunghezza del cammino ottico in cm.

c = concentrazione in gr/l

$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ = differenza tra i coefficienti di estinzione della luce polarizzata sinistrogira e destrogira, rispettivamente.

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 INFRAROSSO

Gli spettri di assorbimento IR allo stato solido, in pastiglia di KBr, sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello 580 B equipaggiato con una "IR data station" Perkin-Elmer 3600. Gli spettri di assorbimento IR in deuterochloroformio (99.8% d_2 ; Fluka) sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR modello 1720X operante in trasformata di Fourier, interfacciato ad un personal computer IBM PS/2 modello 50 Z, e celle di cammino ottico di 0.1, 1.0 e 10.0 mm con finestre in CaF_2 . Per ogni spettro sono state eseguite 50 scansioni alla risoluzione nominale di 4 cm^{-1} e con acquisizione digitalizzata del segnale a intervalli di 1 cm^{-1} , utilizzando un "sample shuttle" che consente l'acquisizione alternata del campione e del fondo strumentale. Gli spettri del solvente sono stati ottenuti nelle stesse condizioni ed utilizzando le stesse celle impiegate per i campioni. Allo scopo di minimizzare i contributi del vapore d'acqua atmosferico, il banco ottico ed il vano campioni dello strumento sono stati mantenuti sotto un flusso costante di azoto. Le posizioni dei massimi di assorbimento, di spalle e di bande parzialmente sovrapposte sono state determinate con l'ausilio della derivata seconda. Le elaborazioni spettrali (sottrazione del solvente e derivatizzazione) sono state effettuate con il programma SpectraCalc della Galactic (Salem, USA).

SPETTROSCOPIA NMR

Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati con gli spettrometri Bruker modelli AC 200, AC 250, Advance DRX 400 e DMX 600 MHz. Come solventi sono stati usati il deuterocloroformio (99.96% \underline{d} ; *Aldrich*) e il dimetilsolfossido (99.96 \underline{d}_6 , *Acros*) e il metanolo deuterato CD_3OH (99% \underline{d}_3 ; *Aldrich*). Gli spostamenti chimici sono espressi in parti per milione (δ) rispetto al segnale del tetrametilsilano. Le costanti di accoppiamento sono misurate in Hertz. Le molteplicità dei picchi sono espresse come s (singoletto), d (doppio), t (tripletto), dd (doppio di doppietti) e m (multipletto).

2.2 SINTESI IN SOLUZIONE E CARATTERIZZAZIONE

2.2.1 Sintesi dei derivati di amminoacidi

HCl·H-L-Leu-OMe^[103]

A 165 mL di MeOH anidro, raffreddato a -30°C , lentamente e sotto agitazione sono stati aggiunti 18.2 mL di SOCl_2 ($118.97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $1.638 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $2.50\cdot 10^{-1}$ moli). Sono quindi stati introdotti 30 g di H-L-Leu-OH ($131.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $2.28\cdot 10^{-1}$ moli).

Il pallone è stato quindi chiuso con un tubo di CaCl_2 e si è lasciato tornare la miscela di reazione a temperatura ambiente. Successivamente il sistema è stato portato a riflusso per circa 20 ore. Il decorso della reazione è stato seguito mediante TLC.

Il solvente è stato quindi rimosso a pressione ridotta, riprendendo più volte con Et_2O . Il prodotto è stato precipitato da MeOH- Et_2O come solido bianco. Resa 92%.

Punto di fusione: $150\text{-}151^\circ\text{C}$.

Rf₁: 0.57, **Rf₂:** 0.71, **Rf₃:** 0.31.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: 20.5° ($c=0.5$, MeOH).

IR (KBr): 3388, 1736, 1588 cm^{-1} .

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 4.01 [m, 1H, Leu α -CH], 3.70 [s, 3H, OMe CH_3], 1.77-1.50 [m, 3H, Leu β - CH_2 , Leu γ -CH], 0.84 e 0.81 [2d, 6H, 2 Leu δ - CH_3].

Boc-L-Leu-OH^[82]

5 g di H-L-Leu-OH ($131.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $3.8\cdot 10^{-2}$ moli) sono stati sospesi in 50 mL di acqua deionizzata a cui sono stati aggiunti 30 mL di diossano. Sotto agitazione sono stati aggiunti 10.7 mL di TEA ($101.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $0.726 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $8.2\cdot 10^{-2}$ moli) e, lentamente, 50 mL di una soluzione preparata sciogliendo 11.28 g di Boc_2O ($388.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $4.7\cdot 10^{-2}$ moli) in 30 mL di diossano. Dopo 90 minuti sono stati aggiunti altri 50 mL. La reazione è stata seguita via TLC.

Dopo 12 ore il diossano è stato rimosso a pressione ridotta e la soluzione acquosa risultante acidificata a pH~1-2 con KHSO_4 . il prodotto è stato estratto con AcOEt, e la fase organica è stata lavata più volte con acqua e quindi anidrificata su Na_2SO_4 . Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come olio incolore. Resa 93%.

Rf₁: 0.48; **Rf₂**: 0.91; **Rf₃**: 0.39.

$[\alpha]_D^{20}$ = -16.8° (c=0.35, MeOH).

IR (film): 3327, 1718, 1513 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 5.05 [d, 1H, Leu NH], 4.33 [m, 1H, Leu α -CH], 1.74 [m, 3H, Leu β -CH₂, γ -CH], 1.45 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 0.98 [m, 6H, Leu 2 δ -CH₃].

Boc-L-Ile-OH

15 g di H-L-Ile-OH ($131.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $1.14\cdot 10^{-1}$ moli) sono stati sospesi in 150 mL di acqua deionizzata a cui sono stati aggiunti 100 mL di diossano. Sotto agitazione sono stati aggiunti 32.1 mL di TEA ($101.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $0.726 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $2.30\cdot 10^{-1}$ moli) e, lentamente, 50 mL di una soluzione preparata sciogliendo 44.3 g di Boc_2O ($388.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $1.2\cdot 10^{-1}$ moli) in 100 mL di diossano. Dopo 90 minuti sono stati aggiunti altri 50 mL. La reazione è stata seguita via TLC.

Dopo una notte il diossano è stato rimosso a pressione ridotta e la soluzione acquosa risultante acidificata a pH~1-2 con KHSO_4 . il prodotto è stato estratto con AcOEt, e la fase organica è stata lavata più volte con acqua e quindi anidrificata su Na_2SO_4 . Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come olio incolore. Resa 74%.

Rf₁: 0.57; **Rf₂**: 0.94; **Rf₃**: 0.47.

$[\alpha]_D^{20}$: 5.3° (c=1.8, MeOH)

IR (film): 3306, 2968, 2598, 1702, 1646 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.14 [d, 1H, Ile NH], 4.27 [m, 1H, Ile α -CH], 1.87 [m, 1H, Ile β -CH], 1.40 [s, 9H, Boc 3 CH_3], 0.97 [d, 3H, Ile γ - CH_3], 1.25-1.18 [m, 2H, Ile γ - CH_2], 0.93-0.87 [m, 3H, Ile δ - CH_3].

Boc-L-pCN-(α Me)Phe-OH

2g di H-L-pCN-(α Me)Phe-OH ($204.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $1\cdot 10^{-2}$ moli) sono stati sospesi in 10 mL di acqua deionizzata a cui sono stati aggiunti 10 mL di diossano. La soluzione è stata raffreddata a 0°C .

Sotto agitazione sono stati aggiunti 1.5 mL di TEA ($101.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $0.726 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $1.1\cdot 10^{-2}$ moli) e 1.2g di Boc_2O ($388.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $5.3\cdot 10^{-3}$ moli). Il pH è stato mantenuto a 9-10 per tutto il decorso della reazione. Dopo 1 ora la miscela viene riscaldata a 40°C , e lasciata in agitazione per 8 ore. Quindi è stata effettuata una seconda aggiunta di Boc_2O e TEA e si è lasciato il sistema per una notte a temperatura ambiente. Il mattino seguente si è effettuata un'altra aggiunta di Boc_2O e si è riportato la temperatura a 40°C , mantenendo il pH costante a 9-10. Tali condizioni sono state mantenute per l'intera giornata. Alla sera si è lasciato tornare la miscela a temperatura ambiente e la si è lasciata in agitazione l'intera notte controllando il pH con una cartina al tornasole umida.

Il diossano è stato quindi rimosso a pressione ridotta e la soluzione acquosa acidificata a $\text{pH}\sim 1-2$ con KHSO_4 . il prodotto è stato estratto con AcOEt , e la fase organica è stata lavata più volte con acqua e quindi anidrificata su Na_2SO_4 . Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come solido bianco. Resa 75%.

Punto di fusione: $131-133^\circ\text{C}$.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.89; **Rf₃:** 0.55.

$[\alpha]_D^{20}$: -48.5° ($c=0.6$, MeOH)

IR (KBr): 3421, 2984, 2938, 2229, 1715, 1694, 1502 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.60-7.24 [2d, 4H, fenile 2 *o*-CH, 2 *m*-CH], 5.03 [s, 1H, NH], 3.41 [s, 2H, β - CH_2], 1.54 [s, 3H, β - CH_3], 1.48 [s, 9H, Boc 3 CH_3].

Z-L-Leu-OH^[104]

5g di H-L-Leu-OH ($131.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $5.3\cdot 10^{-2}$ moli) sono stati sospesi in 25 mL di acqua deionizzata a cui sono stati aggiunti 30 mL di diossano. La soluzione viene portata a 0°C . Sotto agitazione sono stati aggiunti 14g di Z-OSu ($249.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $5.6\cdot 10^{-2}$ moli). Successivamente sono stati introdotti 7.3 mL di TEA ($101.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $0.726 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $2.8\cdot 10^{-1}$ moli). la miscela è stata lasciata a temperatura ambiente e sotto agitazione per una giornata mantenendo il pH a 9-10. La reazione è stata seguita mediante TLC.

Dopo una giornata, il diossano è stato rimosso a pressione ridotta. La soluzione acquosa è stata acidificata a pH~1-2 con KHSO_4 . Il prodotto è stato estratto con AcOEt, e la fase organica è stata lavata più volte con acqua e quindi anidrificata su Na_2SO_4 . Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come olio incolore. Resa 91%.

Rf₁: 0.80, **Rf₂**: 0.95.

[α]_D²⁰: -14.7° (c=0.5, MeOH).

IR (KBr): 3325, 1714, 1532 cm^{-1} .

¹H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (m, 5H, Z fenile CH), 6.08 e 5.23 (2d, 1H, Leu NH), 5.13 (s, 2H, Z CH_2), 4.46-4.19 (m, 1H, Leu α -CH), 1.83-1.47 (m, 3H, Leu β - CH_2 , Leu γ -CH), 1.00-0.80 (m, 6H, Leu 2 δ - CH_3).

2.2.2 Sintesi di intermedi Boc-protetti al gruppo N-terminale

Boc-L-Ile-L-Leu-OMe

A una soluzione di Boc-L-Ile-OH (9.22 g, $3.7\cdot 10^{-2}$ moli), HOBt (5.53 g, $4.1\cdot 10^{-2}$ moli) ed EDC (1.91 g, $4.1\cdot 10^{-2}$ moli) in CH_2Cl_2 anidro a 0°C sono stati aggiunti $\text{HCl}\cdot\text{H-L-Leu-OMe}$ (7.73 g, $4.1\cdot 10^{-2}$ moli) e NMM (10.52 mL, $8.4\cdot 10^{-2}$ moli). Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida. Il sistema di reazione è stato chiuso con un tubo a CaCl_2 e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 22 ore. Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta e ripreso varie volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO_4 al 5%, H_2O , NaHCO_3 al 5% e H_2O . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 , filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come solido bianco. Resa 78%.

Punto di fusione: $145\text{-}150^\circ\text{C}$.

Rf₁: 0.93; **Rf₂**: 0.97; **Rf₃**: 0.69.

[α]_D²⁰: 57.3° (c =0.7, MeOH).

IR (KBr): 3344, 3279, 2966, 2938, 2880, 1759, 1638, 1649, 1553, 1522 cm^{-1} .

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 6.24-6.20 [d, 1H Leu NH], 5.05 [d, 1H, Ile NH], 4.68-4.59 [m, 1H, Ile α-CH], 3.95-3.10 [m, 1H, Leu α-CH], 3.72 [s, 3H, -OMe CH₃], 1.98-1.90 [m, 1H, Ile β-CH], 1.75-1.50 [m, 5H, Leu β-CH₂, Ile γ-CH₂, Leu γ-CH], 1.44 [s, 9H, Boc 3CH₃], 0.94-0.92 [m, 12H, Leu 2δ-CH₃, Ile δ-CH₃, Ile γ-CH₃].

Boc-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe

In 30 mL di una soluzione al 50% di TFA in CH₂Cl₂ sono stati introdotti sotto agitazione 7.07 g di Boc-L-Ile-L-Leu-OMe ($2.0 \cdot 10^{-2}$ moli). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per circa 2 ore. La reazione è stata monitorata tramite TLC. Il solvente è stato quindi rimosso a pressione ridotta utilizzando una trappola di NaOH per rimuovere il TFA in eccesso, ed il solido ottenuto ripreso più volte con Et₂O. Infine si è proceduto a sciogliere tale solido nella minima quantità di CH₂Cl₂ anidro.

Contemporaneamente in 30 mL di CH₂Cl₂ anidro sono stati introdotti Boc-Gly-OH (4.03 g, $2.3 \cdot 10^{-2}$ moli), HOBt (3.4 g, $2.5 \cdot 10^{-2}$ moli), EDC (4.8 g, $2.5 \cdot 10^{-2}$ moli) e NMM (5.5 mL, $5.0 \cdot 10^{-2}$ moli). La soluzione è stata lasciata in agitazione a 0°C per circa un'ora.

Le due soluzioni sono state quindi riunite e si è lasciato il sistema in agitazione a temperatura ambiente per tre giorni. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida. Quindi, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. L'olio risultante è stato poi sciolto in 200 mL di AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Sono stati ottenuti 8.9 g di prodotto non pulito. Il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica "flash" su gel di silice (eluente CHCl₃-EtOH 9.8:0.2). Le frazioni pulite sono state raccolte e l'eluente evaporato. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 98.8%.

Punto di fusione: 120-122°C.

Rf₁: 0.71; **Rf₂:** 0.91; **Rf₃:** 0.47.

[α]_D²⁰: -43.9° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3352, 3257, 2962, 2872, 1722, 1518 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 6.91-6.87 [d, 1H, Ile NH], 6.69-6.65 [d, 1H, Leu NH], 5.42-5.27 [t, 1H, Gly NH], 4.62-3.76 [m, 4H, Ile CH, Leu CH, Gly CH₂], 3.71 [s, 3H, -

OMe CH₃], 2.20-1.46 [m, 6H, Ile β-CH, Leu γ-CH, Ile γ-CH₂, Leu β-CH₂], 1.44 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 1.00-0.74 [m, 12H, Leu 2 δ-CH₃, Ile γ-CH₃, Leu δ-CH₃].

Boc-Gly-L-Ile-L-Lol

In un pallone a tre colli sono stati introdotti 1 g di Boc-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe ($2.4 \cdot 10^{-3}$ moli) e 10 mL di THF anidro. Il sistema di reazione, chiuso con un tubo a CaCl₂, è stato lasciato in agitazione e sotto flusso di N₂ per circa 30 minuti. Dopodiché sono stati gocciolati molto lentamente 5 mL di una soluzione ~1M (precedentemente preparata) di LiBH₄ in THF anidro. Il sistema di reazione, chiuso con un tubo a CaCl₂, è stato lasciato sotto agitazione e sotto flusso di N₂ per circa un'ora. La reazione è stata monitorata tramite TLC.

La miscela di reazione è stata quindi portata a 0°C e sono stati aggiunti pochi mL di AcOEt onde fermare la reazione. Sotto agitazione e a 0°C la miscela è stata acidificata a pH~2 con KHSO₄ 5%. Il prodotto è stato estratto quindi con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 71%.

Punto di fusione: 148-151°C.

Rf₁: 0.41; **Rf₂:** 0.79; **Rf₃:** 0.36.

[α]_D²⁰: -66.5° (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): 3474, 3405, 3288, 2965, 1678, 1642, 1545 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 6.69 [d, 1H, Ile NH], 6.31 [d, 1H, Lol NH], 5.23 [t, 1H, Gly NH], 4.24 [2d, 2H, Gly α-CH₂], 3.80-3.48 [m, 4H, Ile α-CH, Lol CHCH₂OH, Lol CH₂OH], 1.90-1.20 [m, 17H, Lol γ-CH, Ile β-CH, Boc 3 CH₃, Ile γ-CH₂, Lol β-CH₂], 0.97-0.89 [m, 12H, Lol 2 δ-CH₃, Ile 2 γ-CH₃].

Boc-L-pCN-(αMe)Phe-Gly-L-Ile-L-Lol

Questo composto è stato preparato da Boc-L-pCN-(αMe)Phe-OH (0.33 g; $1.1 \cdot 10^{-3}$ moli) e H-Gly-Ile-L-Lol ($8.2 \cdot 10^{-4}$ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc all'estremità N-terminale, in HCl 1.5 M in MeOH) come descritto per Boc-Gly-L-Ile-L-Lol con l'uso di HOAt/EDC come attivante. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per cinque giorni. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO_4 al 5%, H_2O , NaHCO_3 al 5% e H_2O . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 , filtrata e tirata a secco. Il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica "flash" su gel di silice (eluente CH_2Cl_2 -MeOH 9.9:0.1). Le frazioni pulite sono state raccolte e l'eluente evaporato. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 55%.

Rf₁: 0.35; **Rf₂**: 0.89; **Rf₃**: 0.19.

[α]_D²⁰: -58.3° (c =5, MeOH).

IR (KBr): 3318, 2960, 2935, 2229, 1657, 1538 cm^{-1} .

¹H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.75 [m, 1H, Gly NH], 7.52-7.48 [d, 1H, Ile NH], 7.60-7.23 [2d, 4H, fenile 2 *o*-CH, 2 *m*-CH], 6.70-6.65 [m, 1H, Ile NH], 5.44 [s, 1H, *p*CN-(α Me)Phe NH], 4.16-3.12 [m, 7H, Ile α -CH, Lol CHCH₂OH, Lol CH₂OH, Leu α -CH, Gly α -CH₂], 2.05-1.90 [m, 1H, Ile β -CH], 1.80-1.15 [m, 20H, 2Leu γ -CH, Ile β -CH, Boc 3 CH₃, Ile γ -CH₂, 2Leu β -CH₂], 0.97-0.85 [m, 6H, Leu 2 δ -CH₃, Ile 2 γ -CH₃, Lol 2 δ -CH₃].

Boc-L-Leu-L-pCN-(α Me)Phe-Gly-L-Ile-L-Lol

Questo composto è stato preparato da Boc-L-Leu-OH (0.65 g; $3.1 \cdot 10^{-3}$ moli) e H-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-Ile-L-Lol ($1.4 \cdot 10^{-3}$ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc- all'estremità N-terminale, in HCl 1.5 M in MeOH) come descritto per Boc-L-*p*CN-(α Me)Phe-L-Ile-L-Lol con l'uso di HOAt/EDC come attivante. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per cinque giorni. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO_4 al 5%, H_2O , NaHCO_3 al 5% e H_2O . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 , filtrata e tirata a secco. Il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica "flash" su gel di silice (eluente CH_2Cl_2 -MeOH 9.9:0.1). Le frazioni pulite sono state raccolte e l'eluente evaporato. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa %.

Punto di fusione: 118-122°C.

Rf₁: 0.55; **Rf₂**: 0.94; **Rf₃**: 0.31.

$[\alpha]_D^{20}$: -109.3° (c =0.3, MeOH).

IR (KBr): 3360, 2960, 2229, 1662, 1529 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 8.20-6.92 [m, 4H, 4 NH], 7.51-7.34 [2d, 4H, fenile 2 *o*-CH, 2 *m*-CH], 5.35 [m, 1H, Leu NH], 4.21-3.03 [m, 8H, Ile α -CH, Lol CHCH₂OH, Lol CH₂OH, 2 Leu α -CH, Gly α -CH₂], 2.00-1.90 [m, 1H, Ile β -CH], 1.80-1.10 [m, 23H, 2Leu γ -CH, Ile β -CH, Boc 3 CH₃, Ile γ -CH₂, 2Leu β -CH₂, Lol γ -CH, Lol β -CH₂], 1.00-0.80 [m, 12H, 2Leu 2 δ -CH₃, Ile 2 γ -CH₃, Lol 2 δ -CH₃].

Boc-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe

Questo composto è stato preparato da Boc-Aib-OH (3.04 g; $1.5 \cdot 10^{-2}$ moli) e H-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe ($1.2 \cdot 10^{-2}$ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc- all'estremità N-terminale, in TFA -50% in CH_2Cl_2 -) come descritto per Boc-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per circa 24 ore. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO_4 al 5%, H_2O , NaHCO_3 al 5% e H_2O . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 , filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 72%.

Punto di fusione: 170-172°C.

Rf₁: 0.40; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.30.

$[\alpha]_D^{20}$: -91.1° (c =0.1, MeOH).

IR (KBr): 3288, 2961, 2874, 1756, 1652, 1526 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.86 [d, 1H, Ile NH], 7.00 [t, 1H, Gly NH], 6.77 [d, 1H, Leu NH], 5.02 [s, 1H, Aib NH], 4.64-4.52 [m, 1H, Leu α -CH], 4.34-4.27 [m, 1H, Ile α -CH], 3.95-3.27 [d, 2H, Gly α -CH₂], 3.70 [s, 3H, OMe CH₃], 2.07 [m, 1H, Ile β -CH], 1.78-1.63 [m, 20H, Leu γ -CH, Boc 3 CH₃, Aib 2 β -CH₃, Leu β -CH₂, Ile γ -CH₂], 0.95-0.85 [m, 12H, Leu 2 δ -CH₃, Ile 2 δ -CH₃].

Boc-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe

Questo composto è stato preparato da Boc-Leu-OH (1.74 g; $7.5 \cdot 10^{-3}$ moli) e H-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe ($6.8 \cdot 10^{-3}$ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc- all'estremità N-terminale, in TFA -50% in CH_2Cl_2 -) come descritto per Boc-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a

temperatura ambiente per circa 36 ore. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 88%.

Punto di fusione: 174-176°C.

Rf₁: 0.46; **Rf₂:** 0.93; **Rf₃:** 0.36.

[α]_D²⁰: -37.23 (c =0.5, MeOH).

IR (KBr): 3379, 3350, 2965, 1750, 1680, 1545 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.39 [m, 1H, Ile NH], 7.30 [m, 1H, Gly NH], 6.87-6.83 [d, 1H, Leu NH], 6.57 [s, 1H, Aib NH], 5.52 [m, 1H, Leu NH], 4.68-3.78 [m, 5H, Leu α-CH, Leu α-CH, Ile α-CH, Gly α-CH₂], 3.71 [s, 3H, OMe CH₃], 2.05 [m, 1H, Ile β-CH], 1.72-1.50 [m, 14H, 2 Leu γ-CH, 2 Leu β-CH₂, Aib 2 β-CH₃], 1.43 [s, 11H, Boc 3 CH₃, Ile γ-CH₂], 0.98-0.84 [m, 18H, 2 Leu 2 δ-CH₃, Ile 2 δ-CH₃].

Boc-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe

Questo composto è stato preparato da Boc-Gly-OH (1.23 g; 7.0·10⁻³ moli) e H-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe (5.8·10⁻³ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc- all'estremità N-terminale, in TFA -50% in CH₂Cl₂-) come descritto per Boc-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per circa 20 ore. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 83%.

Punto di fusione: 80-84°C.

Rf₁: 0.42; **Rf₂:** 0.93; **Rf₃:** 0.31.

[α]_D²⁰: -343.6° (c =0.3, MeOH).

IR (KBr): 3315, 2961, 1654, 1536 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.86-7.22 [d, 1H, Leu NH], 7.34-7.30 [m, 2H, Ile NH, Gly NH], 6.99 [s, 1H, Aib NH], 6.73-6.69 [d, 1H, Leu NH], 5.68-5.62 [t, 1H, Gly NH],

4.18-3.35 [m, 10H, 2 Leu α -CH, Ile α -CH, 2 Gly α -CH₂, OMe CH₃], 2.08 [m, 1H, Ile β -CH], 1.64-1.50 [m, 14H, 2 Leu β -CH₂, 2 Leu γ -CH, Aib 2 β -CH₃], 1.41 [s, 9H, Boc 3 CH₃, Ile γ -CH₂], 0.95-0.82 [m, 180H, 2 Leu 2 δ -CH₃, Ile 2 δ -CH₃].

Boc-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe

Questo composto è stato preparato da Boc-Gly-OH (0.88 g; $5.0 \cdot 10^{-3}$ moli) e H-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe ($3.75 \cdot 10^{-3}$ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc- all'estremità N-terminale, in TFA -50% in CH₂Cl₂-) come descritto per Boc-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per circa 18 ore. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 74%.

Punto di fusione: 153-155°C.

Rf₁: 0.25; **Rf₂:** 0.87; **Rf₃:** 0.16.

[α]_D²⁰: -35.3°(c =0.5, MeOH).

IR (KBr): 3305, 2960, 1656, 1521 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.10 [m, 1H, Gly NH], 7.69 [m, 1H, Gly NH], 7.48 [m, 2H, Ile NH, Leu NH], 7.10-7.00 [m, 2H, Aib NH, Leu NH], 5.61 [t, 1H, Gly NH], 4.14-3.26 [m, 12H, 3 Gly α -CH₂, 2 Leu α -CH, Ile α -CH, OMe CH₃], 2.05 [m, 1H, Ile β -CH], 1.80-1.10 [m, 25H, 2 Leu β -CH₂, 2 Leu γ -CH, Ile γ -CH₂, Aib 2 β -CH₃, Boc 3 CH₃, Ile γ -CH₂], 0.98-0.82 [m, 12H, 2 Leu 2 δ -CH₃, Ile 2 γ -CH₃].

Boc-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol

In un pallone a tre colli sono stati introdotti 1.6 g di Boc-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe ($2.2 \cdot 10^{-3}$ moli) e 10 mL di THF anidro. Il sistema di reazione, chiuso con un tubo a CaCl₂, è stato lasciato in agitazione e sotto flusso di N₂ per circa 30 minuti. Dopodiché sono stati gocciolati molto lentamente 5 mL di una soluzione ~1M (precedentemente preparata) di LiBH₄ in THF anidro. Il sistema di reazione, chiuso con

un tubo a CaCl₂, è stato lasciato sotto agitazione e sotto flusso di N₂ per circa un'ora. La reazione è stata monitorata tramite TLC.

La miscela di reazione è stata quindi portata a 0°C e sono stati aggiunti pochi mL di AcOEt onde fermare la reazione. Sotto agitazione e a 0°C la miscela è stata acidificata a pH~2 con KHSO₄ 5%. Il prodotto è stato estratto quindi con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 61%.

Punto di fusione: 178-184°C.

Rf₁: 0.06; **Rf₂:** 0.79; **Rf₃:** 0.03.

[α]_D²⁰: -45.4° (c =0.8, MeOH).

IR (KBr): 3367, 2960, 1655, 1538 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.53 [m, 1H, Gly NH], 7.81-7.61 [m, 4H, Gly NH, Ile NH, Leu NH, Leu NH, Gly NH], 7.05 [s, 1H, Aib NH], 6.68 [m, 1H, Gly NH], 4.06-3.59 [m, 11H, 3 Gly α-CH₂, Leu α-CH, Lol CHCH₂OH, Ile α-CH, Lol CH₂OH], 2.05 [m, 1H, Ile β-CH], 1.68-1.25 [m, 25H, 2 Leu β-CH₂, 2 Leu γ-CH, Ile γ-CH₂, Aib 2 β-CH₃, Boc 3 CH₃, Ile γ-CH₂], 0.91 [m, 18H, 2 Leu 2 δ-CH₃, Ile 2 γ-CH₃].

Boc-L-pCN-(αMe)Phe-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol

Questo composto è stato preparato da Boc-L-pCN-(αMe)Phe-OH (0.46 g; 1.5·10⁻³ moli) e H-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (1·10⁻³ moli, ottenuto per rimozione del gruppo protettore Boc- all'estremità N-terminale, in TFA -50% in CH₂Cl₂-) come descritto per Boc-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-OMe con l'uso di HOAt/EDC come attivante. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per cinque giorni. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica "flash" su gel di silice (eluente CH₂Cl₂-MeOH 9.2:0.8). Le frazioni pulite sono state raccolte e l'eluente evaporato. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 30%.

Punto di fusione: 135-139°C.

Rf₁: 0.06; **Rf₂:** 0.84; **Rf₃:** 0.02.

$[\alpha]_D^{20}$: -109.3° (c=0.3, MeOH).

IR (KBr): 3318, 2960, 2229, 1657, 1538 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 9.04 [m, 1H, Gly NH], 8.36 [m, 1H, Gly NH], 8.03-7.61 [m, 3H, Ile NH, Leu NH, Gly NH], 7.55-7.21 [m, 4H, (α Me)Phe(pCN) fenile 2 *o*-CH, 2 *m*-CH], 7.37 [m, 2H, Lol NH, Aib NH], 6.39 [s, 1H, (α Me)Phe(pCN) NH], 4.82-3.26 [m, 13H, (α Me)Phe(pCN) CH_2 -fenile, 3 Gly α -CH₂, Leu α -CH, Lol CHCH_2OH , Ile α -CH, Lol CH_2OH], 2.05 [m, 1H, Ile β -CH], 1.80-1.05 [m, 28H, Lol β -CH₂, Leu β -CH₂, Lol γ -CH, Leu γ -CH, Ile γ -CH₂, Aib 2 β -CH₃, Boc 3 CH₃, (α Me)Phe(pCN) β -CH₃, Ile γ -CH₂], 0.90-0.81 [m, 18H, Leu 2 δ -CH₃, Ile 2 γ -CH₃, Lol 2 δ -CH₃].

2.2.3 Sintesi di intermedi Z-protetti al gruppo N-terminale

Z-Gly-Gly-O^tBu

In un pallone da 500 mL è stato flussato N₂ per circa 30 minuti. È stato quindi introdotto il catalizzatore (1 g di Pd/C), lasciando fluire N₂ per altri 15 minuti. Sono stati introdotti quindi 100 mL di CH₂Cl₂, e, sotto agitazione e flusso di azoto, 6.5 g di *Z-Gly-O^tBu* ($2.4 \cdot 10^{-2}$ moli). Il sistema è stato lasciato in agitazione e sotto flusso di H₂ per circa 2 ore. Il catalizzatore è stato quindi filtrato su celite ed il solvente concentrato a pressione ridotta.

Contemporaneamente in 150 mL di THF anidro sono stati introdotti 14.2 g di *Z-Gly-OH* ($6.8 \cdot 10^{-2}$ moli). Sotto agitazione il sistema è stato raffreddato a -20°C e sono stati aggiunti 7.5 mL di NMM ($6.8 \cdot 10^{-2}$ moli). Lentamente sono stati quindi introdotti 7.6 mL di isoBuilcloroformato ($5.5 \cdot 10^{-2}$ moli).

Le due soluzioni sono state quindi unite, e la miscela lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un giorno e una notte. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come olio incolore. Resa 100%.

Rf₁: 0.71; **Rf₂**: 0.89; **Rf₃**: 0.47.

IR (KBr): 3331, 2978, 2935, 1730, 1678 1530 cm^{-1} .

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.34 [s, 5H, Z fenile], 6.55 [m, 1H, Gly NH], 5.53 [m, 1H, Gly NH], 5.12 [s, 2H, Z CH₂], 3.94-3.89 [2d, 4H, 2 Gly α-CH₂], 1.46 [s, 9H, O^tBu 3 CH₃].

Z-Aib-Gly-Gly-O^tBu

Questo composto si prepara da Z-Aib-OH (10.67 g, 4.5·10⁻² moli) e H-Gly-Gly-O^tBu (4.5·10⁻² moli; ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH del corrispondente Z-derivato) come sopra descritto per Z-Gly-Gly-O^tBu. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP come solido bianco. Resa 85%.

Punto di fusione: 97-100°C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.87; **Rf₃:** 0.33.

IR (KBr): 3541, 3329, 2676, 1741, 1647, 1538 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.34 [s, 6H, Z fenile, Gly NH], 7.09-7.03 [t, 1H, Gly NH], 5.35 [s, 1H, Aib NH], 5.07 [s, 2H, Z CH₂], 4.01-3.90 [2d, 4H, Gly α-CH₂], 1.51 [s, 6H, Aib 2 Aib β-CH₃], 1.44 [s, 9H, O^tBu 3 CH₃].

Z-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu

In un pallone da 500 mL è stato flussato N₂ per circa 30 minuti. È stato quindi introdotto il catalizzatore (1.1 g di Pd/C), lasciando fluire N₂ per altri 15 minuti. Sono stati introdotti quindi 100 mL di CH₃OH e, sotto agitazione e flusso di azoto, 7 g di Z-Aib-Gly-Gly-O^tBu (1.7·10⁻² moli). Il sistema è stato lasciato in agitazione e sotto flusso di H₂ per circa 2 ore. Il catalizzatore è stato quindi filtrato su celite ed il solvente concentrato a pressione ridotta.

Contemporaneamente in 20 mL di CH₂Cl₂ anidro sono stati introdotti 6.2 g di Z-L-Leu-OH (2.3·10⁻² moli), HOBt (4.1 g, 3.0·10⁻² moli) ed EDC (5.76 g, 3.0·10⁻² moli). La soluzione è stata portata a 0° C e sono stati aggiunti 7.06 mL di NMM (6.4·10⁻² moli).

Le due soluzioni sono state quindi unite, e la miscela lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un giorno e una notte. Si è controllato costantemente che vi fosse un eccesso di base con una cartina al tornasole umida.

Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta, riprendendo più volte con AcOEt. Il prodotto è stato lavato varie volte con KHSO₄ al 5%, H₂O, NaHCO₃ al 5% e

H₂O. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e tirata a secco. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 60%.

Punto di fusione: 95-99°C.

Rf₁: 0.51; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.31.

[α]_D²⁰: -21.1° (c=0.5, MeOH).

IR (KBr): 3330, 2957, 1733, 1669, 1532 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.35 [m, 6H, Z fenile, Gly NH], 6.96 [m, 1H, Gly NH], 6.89 [s, 1H, Aib NH], 5.85 [d, 1H, Leu NH], 5.10 [s, 2H, Z CH₂], 4.12-4.03 [m, 1H, Leu CH], 3.84-3.61 [2dd, 2H, 2 Gly CH₂], 1.65-1.50 [s, 6H, Aib β-CH₃, Leu β-CH₂, Leu γ-CH], 1.44 [m, 12H, O^tBu 3 CH₃, Aib β-CH₃], 0.96-0.82 [m, 6H, Leu 2 δ-CH₃].

Z-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu

Questo composto si prepara da Z-Gly-OH (2.31 g, 1.1·10⁻² moli) e H-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu (6.7·10⁻³ moli; ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH del corrispondente Z-derivato) come sopra descritto per Z-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 80%.

Punto di fusione: 153-158°C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.89; **Rf₃:** 0.25.

[α]_D²⁰: -38.3° (c =0.5, MeOH).

IR (KBr): 3287, 2962, 1647, 1532 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.58-7.55 [d, 1H, Leu NH], 7.48-7.39 [m, 1H, Gly NH], 7.30-7.21 [m, 1H, Gly NH], 7.03 [s, 1H, Aib NH], 5.67 [t, 1H, Gly NH], 5.14-4.97 [2d, 2d, 2H, Z CH₂], 4.52-4.36 [m, 1H, Leu α-CH], 3.96-3.45 [3dd, 6H, 3 Gly α-CH₂], 1.76-1.60 [m, 3H, Leu β-CH₂, Leu γ-CH], 1.55 [s, 3H, Aib β-CH₃], 1.43 [s, 9H, O^tBu 3 CH₃], 1.37 [s, 3H, Aib β-CH₃], 0.92-0.87 [m, 6H, Leu 2 δ-CH₃].

Z-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu

Questo composto si prepara da Z-Aib-OH (1.43 g, 6·10⁻³ moli) e H-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu (3.6·10⁻³ moli; ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH del corrispondente Z-derivato) come sopra descritto per Z-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 100%.

Punto di fusione: 135-138°C.

Rf₁: 0.31; **Rf₂:** 0.88; **Rf₃:** 0.11.

[α]_D²⁰: -5.3° (c =0.2, MeOH).

IR (KBr): 3327, 2981, 1754, 1677, 1660, 1537 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.76-7.35 [m, 9H, 5 NH, Z fenile], 5.49 [s, 1H, Aib NH], 5.10 [s, 2H, Z CH₂], 4.26-3.55 [m, 10H, Leu α-CH, 3 Gly α-CH₂, 3 Gly α-CH₂], 1.73-1.40 [m, 18H, Leu β-CH₂, Leu γ-CH, Aib β-CH₃, O^tBu 3 CH₃, Aib β-CH₃], 0.92-0.87 [m, 6H, Leu 2 δ-CH₃].

2.2.4 Sintesi di intermedi *n*-ottanoilati al gruppo N-terminale

n-Ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu

Questo composto si prepara dall'acido *n*-Ottanoico (1.48 mL, 3·10⁻³ moli) e H-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu (2.3·10⁻³ moli; ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH del corrispondente *Z*-derivato) come sopra descritto per *Z*-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu. Il prodotto è precipitato da AcOEt-EP. Resa 71%.

Punto di fusione: 183-186°C.

Rf₁: 0.26; **Rf₂:** 0.84; **Rf₃:** 0.06.

[α]_D²⁰: -182.14° (c =0.2, MeOH).

IR (KBr): 3329, 2931, 1754, 1658, 1542 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.68-7.04 [m, 6H, 6 NH], 4.36-3.68 [m, 7H, 3 Gly α-CH₂, Leu α-CH], 2.24-2.47 [m, 2H, *n*-Ottanoil -CH₂CO-], 1.84-1.46 [m, 24H, Leu β-CH, -O^tBu 3 CH₃, 2 Aib 2 β CH₃, Leu γ-CH₂], 1.26 [m, 10H, *n*-Ottanoil 5 CH₂], 0.95-0.82 [m, 9H, Leu 2 δ-CH₃, *n*-Ottanoil ω-CH₃].

n-Ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-OH

1g di *n*-Ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-O^tBu [1.5·10⁻³ moli] è stato posto in una soluzione di TFA/CH₂Cl₂ al 50%. La reazione è stato mantenuta in agitazione per 2 ore, monitorandola via TLC. Il diclorometano è stato quindi evaporato, riprendendo più volte con Et₂O. Il solido ottenuto è stato quindi essiccato a pressione ridotta. Il prodotto è stato quindi purificato tramite precipitazione in AcOEt/EP. Resa 98%.

Punto di fusione: 59-64°C.

Rf₁: 0.02; **Rf₂:** 0.75; **Rf₃:** 0.01.

[α]_D²⁰: -8.2° (c =6, MeOH).

IR (KBr): 3302, 2959, 2933, 1736, 1660, 1545 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.94-7.20 [m, 6H, 6 NH], 6.16 [s, 1H, Gly -COOH], 4.11-3.78 [m, 7H, 3 Gly α-CH₂, Leu α-CH], 2.23 [m, 2H, *n*-Ottanoil -CH₂CO-], 1.54.1.44 [m, 24H, Leu β-CH, -O^tBu₃ CH₃, 2 Aib 2 β CH₃, Leu γ-CH₂], 1.26 [m, 10H, *n*-Ottanoil 5 CH₂], 0.95-0.82 [m, 9H, Leu 2 δ-CH₃, *n*-Ottanoil ω-CH₃].

2.3 SINTESI SU FASE SOLIDA E CARATTERIZZAZIONE

n-Ottanoil-*L*-*p*CN-(αMe)*Phe*-*Gly*-*L*-*Leu*-*Aib*-*Gly*-*Gly*-*L*-*Leu*-*Aib*-*Gly*-*L*-*Ile*-*L*-*Lol* (**3**)

Il peptide Fmoc-*Gly*-*L*-*Leu*-*Aib*-*Gly*-*Gly*-*L*-*Leu*-*Aib*-*Gly*-*L*-*Ile*-*L*-*Lol* è stato sintetizzato in modo automatico, secondo la procedura generale di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2, a partire da 108.6 mg di resina H-*Lol*-Cl-tritile (0.05 mmol). Su tale peptide, ancorato alla resina, viene eseguito lo sblocco e un *coupling* (in modo manuale) con *n*-ottanoil-*p*CN-(αMe)*Phe*-OH.

Si è eseguito lo sblocco dalla resina con una soluzione di HFIP/DCM seguito dallo sblocco dei gruppi protettori con una soluzione di TFA/TIS/H₂O (95%-2.5%-2.5%). Il

prodotto è stato essiccato sotto vuoto su P₂O₅. Il prodotto è stato purificato mediante cromatografia “flash” su gel di silice. Si ottiene il prodotto pulito con resa del 90%.

Spettrometria di massa (ESI-TOF): [M]⁺_{calc} = 1168.58.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.37 [t, 1H, Gly² NH], 8.18 [s, 1H, *p*CN(αMe)Phe¹-NH], 8.08 [s, 1H, Aib⁸-NH], 8.06 [s, 1H, Aib⁴-NH], 7.97 [t, 1H, Gly⁵-NH], 7.94-7.92 [m, 2H, Gly⁶-NH e Leu⁷-NH], 7.87 [t, 1H, Gly⁹ NH], 7.75-7.73 [d, 3H, Leu³-NH e *p*CN(αMe)Phe¹ H_{3,5}], 7.42-7.40 [d, 1H, Ile¹⁰ NH], 7.34 [d, 1H, Lol¹¹-NH], 7.28-7.26 [d, 2H, *p*CN(αMe)Phe¹ H_{2,6}], 4.20-4.13 [m, 2H, Leu³ α-CH e Leu⁷ α-CH], 4.07-4.05 [m, 1H, Ile¹⁰ α-CH], 3.79-3.67 [m, 4H, Lol¹¹ α-CH, Gly⁶ 2 α-CH e Gly² 1 α-CH], 3.63-3.51 [m, 5H, Gly⁵ 2 α-CH, Gly⁹ 2 α-CH e Gly² 1 α-CH], 3.30 [m, 2H, *p*CN(αMe)Phe¹ βCH e Lol¹¹ 1 β'CH], 3.15-3.09 [m, 2H, *p*CN(αMe)Phe¹ βCH e Lol¹¹ 1 β'CH], 2.26-2.28 [m, 1H, *n*Oct 1 α-CH], 2.16-2.13 [m, 1H, *n*Oct 1 α-CH], 1.79-1.80 [m, 1H, Ile¹⁰ β-CH], 1.63-1.40 [m, 10H, Leu³ β-CH₂ e γ-CH, Leu⁷ β-CH₂ e γ-CH, *n*Oct β-CH₂, Ile¹⁰ 1 γ-CH, Lol¹¹ γ-CH] 1.35 [s, 6H, Aib⁴ 2 β-CH₃], 1.33 [s, 7H, Aib⁸ 2 β-CH₃ e Lol¹¹ 1 β-CH], 1.26-1.23 [m, 9H, Lol¹¹ 1 β-CH e *n*Oct (CH₂)₄], 1.20 [s, 3H, *p*CN(αMe)Phe¹ βCH₃], 1.10 [m, 1H, Ile¹⁰ 1 γ-CH], 0.88-0.78 [m, 27H, Leu³ 2 δ-CH₃, Leu⁷ 2 δ-CH₃, Ile¹⁰ γ-CH₃ e δ-CH₃, Lol¹¹ 2 δ-CH₃ e *n*Oct ω-CH₃].

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi dell'amminoacido H-L-*p*CN-(α Me)Phe-OH

L'amminoacido H-L-*p*CN-(α Me)Phe-OH è stato gentilmente donato dai dott. Q. B. Broxterman e B. Kaptein della DSM Research (Olanda). Essi hanno preparato tale amminoacido in forma otticamente pura mediante un efficiente procedimento chemoenzimatico, illustrato in figura 3.1.

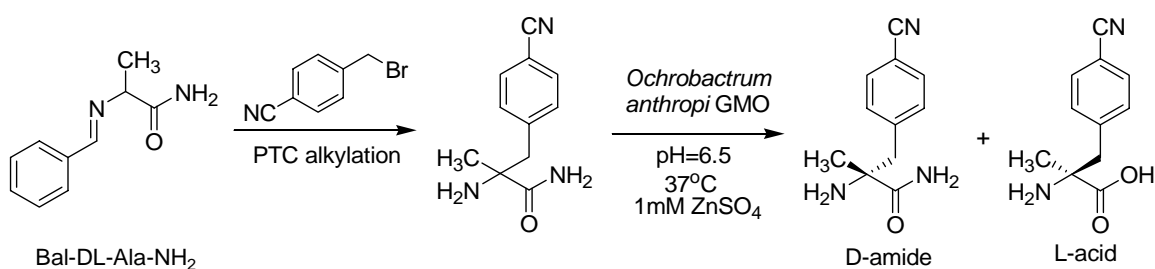


Fig. 3.1 Metodo di sintesi di H-L-*p*CN-(α Me)Phe-OH

Bal-DL-Ala-NH₂ è stata ottenuta facendo reagire l'ammide dell'Ala con benzaldeide. Il protone acido sul C ^{α} viene strappato con relativa facilità in condizioni basiche, permettendo l'alchilazione da parte del 4-(bromometil)-benzonitrile. Il processo avviene in un sistema bifasico utilizzando un trasportatore di fase (Bu₄N⁺-HSO₄⁻). La base di Schiff è poi riconvertita in ammina per idrolisi in condizioni acide blande.

L'ammino-ammido racemo ottenuta è stata quindi sottoposta ad idrolisi enzimatica: l'ammidasi GMO dall'*Ochrobactrum anthropi* è infatti in grado di idrolizzare selettivamente l'enantiomero L (e.e.>98%).

3.2 Sintesi dei peptidi

Il progetto in cui si inserisce questo lavoro di Tesi prevede la sintesi dei seguenti tre analoghi della tricogina:

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-L-pCN-(α Me)Phe-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**1**)

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-L-pCN-(α Me)Phe-Gly-L-Ile-L-Lol (**2**)

n-ottanoil-L-pCN-(α Me)Phe-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**3**)

L'analogo **3** è stato preparato su "fase solida", mentre si è riusciti a preparare alcuni segmenti degli analoghi **1** e **2** mediante le procedure tipiche della sintesi peptidica in soluzione. La condensazione dei segmenti preparati consentirà successivamente di ottenere anche gli analoghi **1** e **2**. Come già ricordato si è tentata, con successo, la sintesi su fase solida solo per il peptide **3** in quanto l'amminoacido stericamente impedito *p*CN-(α Me)Phe è stato introdotto come ultimo passaggio. Si è già visto in precedenza nel nostro Laboratorio che l'introduzione all'interno di una catena peptidica di amminoacidi scarsamente reattivi porta a rese molto modeste.

La sintesi in soluzione di peptidi relativamente lunghi (> 10 residui) richiede certamente più tempo, ma offre comunque numerosi vantaggi: (i) l'ottenimento di prodotti ad ottima purezza ottica in quantità elevate e (ii) la possibilità di studiare, nel corso della sintesi, gli effetti dell'allungamento della catena peptidica sulla conformazione, poiché si possono isolare sequenze peptidiche intermedie. Il vantaggio principale della sintesi in fase solida consiste nella velocità mediante la quale si ottiene il prodotto finale.

3.2.1 Strategia di sintesi in soluzione

La strategia sintetica migliore per minimizzare i rischi di racemizzazione prevede di partire dal residuo C-terminale e aggiungere un amminoacido alla volta, protetto al gruppo amminico da una funzione uretanica (*step-by-step approach*). Tuttavia la quantità di tempo necessaria rappresenta un limite per questo tipo di sintesi. Un'alternativa valida è rappresentata dalla sintesi per segmenti (*fragment condensation approach*), i cui vantaggi rispetto allo *step-by-step approach* sono essenzialmente tre: (i) tempi di sintesi ridotti, grazie tra l'altro alla possibilità di procedere in parallelo nella preparazione dei segmenti peptidici richiesti, (ii) isolamento più facile dei prodotti in quanto differiscono significativamente dai reagenti nei pesi molecolari, e quindi nelle proprietà chimico-fisiche, (iii) rese decisamente migliori per quanto riguarda la formazione dei segmenti intermedi, in quanto solamente nell'ultimo passaggio di sintesi

si ha la formazione di un segmento molto lungo; nel caso di sintesi *step-by-step* questa ultima evenienza si ha molto più spesso, a scapito della resa globale della reazione.

Di contro tale procedura presenta non trascurabili rischi di racemizzazione (o epimerizzazione) all'atto della giunzione dei segmenti. Nella fase di attivazione della funzione carbossilica può essere persa la purezza ottica del residuo C-terminale, ma talvolta anche quella del penultimo residuo.

È questo in particolare il caso che si verifica quando il meccanismo di *coupling* comporta la formazione di un ossazolone, come di norma accade quando l'amminoacido attivato è un residuo di Aib. L'effetto *gem*-dialchile,^[46b] derivante dalla doppia sostituzione in posizione α da parte dei gruppi metilici, favorisce la formazione dell'ossazolone: l'eterociclo così formato mette a repentaglio la purezza ottica dell'amminoacido che precede l'Aib come illustrato in fig 3.2.

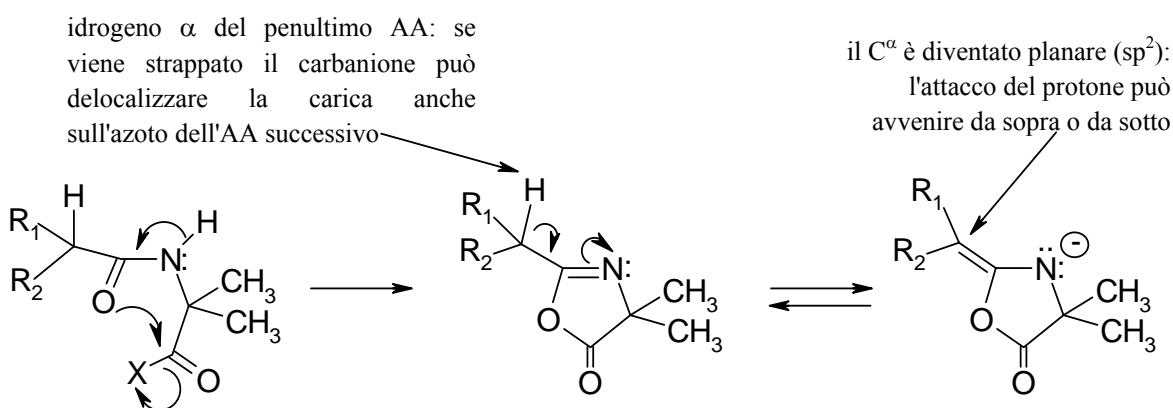


Fig. 3.2 Meccanismo di racemizzazione *via* ossazolone del penultimo amminoacido nella condensazione di segmenti

Gli analoghi della tricogina GA IV che ci si è proposti di ottenere col presente lavoro di Tesi hanno richiesto di applicare entrambi gli approcci.

Fondamentale al fine della scelta *a priori* della migliore strategia di sintesi è stato il passaggio di riduzione dell'estremità C-terminale da estere (-Leu-OMe) ad alcol (-Lol). L'utilizzo come riducente del LiBH₄, ha imposto in sostanza la strategia. Evidenze riscontrate in precedenza nei laboratori in cui questo lavoro è stato svolto, hanno mostrato una certa labilità del gruppo *p*CN verso tale riducente. Di conseguenza si è

scelto di ridurre ad alcol l'estremità C-terminale, prima di introdurre in catena l'amminoacido *p*CN-(α Me)Phe. Inoltre, nei segmenti contenenti tale residuo, si è dovuto procedere utilizzando come gruppo protettore all'estremità N-terminale il Boc. Negli altri casi si è proceduto molto più agevolmente (per rese, tempi di sintesi e stabilità degli intermedi protetti) *via* protezione con lo Z, la cui rimozione richiede un'idrogenazione catalitica, non compatibile con l'integrità del gruppo *p*CN-fenile. Si sono messi a punto quindi cammini di sintesi differenti per gli analoghi **1** e **2**, che tenessero conto di queste considerazioni. Questo ha avuto un peso notevole sulle rese delle reazioni e quindi sulla scelta iniziale delle quantità di reagenti da impiegare.

Nel caso dell'analogo **1** si è proceduto *step-by-step*, mentre nel caso dell'analogo **2** si è stabilito di procedere con una *fragment condensation* di due segmenti, ciascuno sintetizzato *step-by-step* (vedi **Figura 3.3a, b**).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>n</i> -ottanoile – Aib – Gly – Leu – (<i>p</i> CN)(α Me)Phe – Gly – Gly – Leu – Aib – Gly – Ile – Lol										

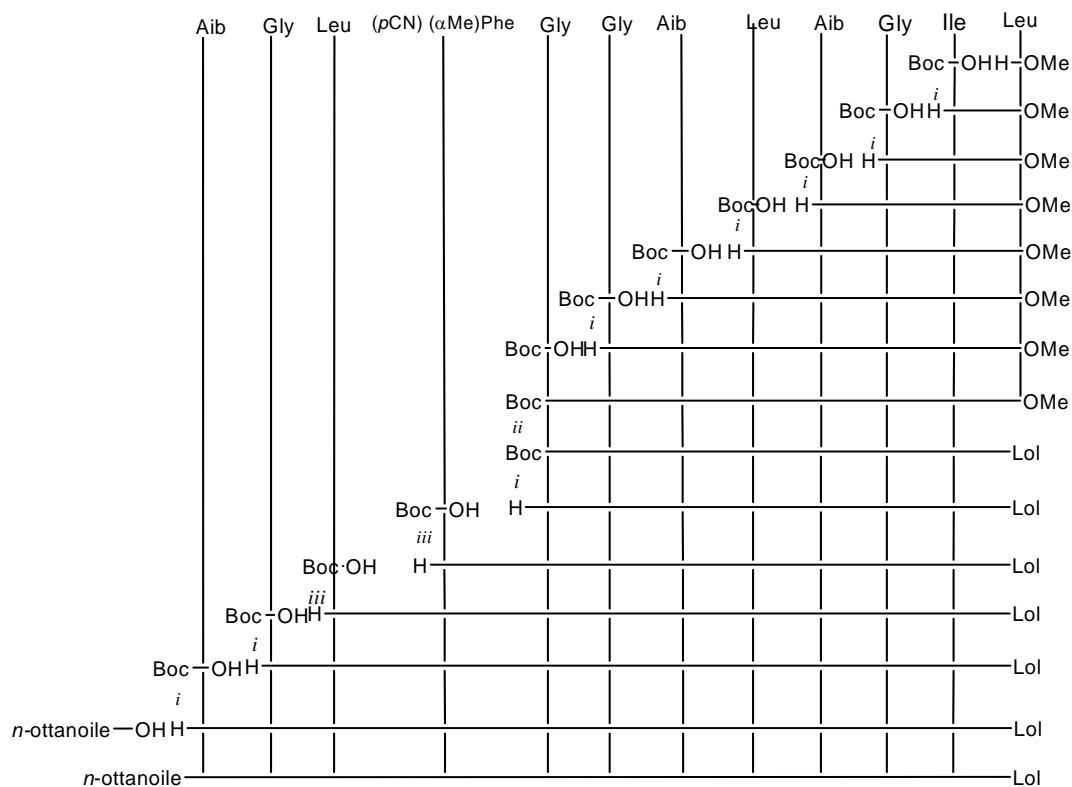
Fig. 3.3a Analogo della tricogina con il residuo (*p*CN)-(α Me)Phe in posizione 4 (analogo **1**)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>n</i> -ottanoile – Aib – Gly – Leu – Aib – Gly – Gly						Leu – (<i>p</i> CN)(α Me)Phe – Gly – Ile – Lol				

Fig. 3.3b Analogo della tricogina con il residuo (*p*CN)-(α Me)Phe in posizione 8 (analogo **2**)

Nel caso dell'analogo (**2**) è stato deciso di interrompere la sequenza tra i residui 6 e 7 perché i due amminoacidi in posizione 5 e 6 non possono racemizzare *via* ossazolone (la Gly è achirale).

Le strategie ideate per le sintesi dei peptidi **1** e **2** vengono illustrate più esaurientemente qui di seguito (**Figure 3.4a e 3.4b**).

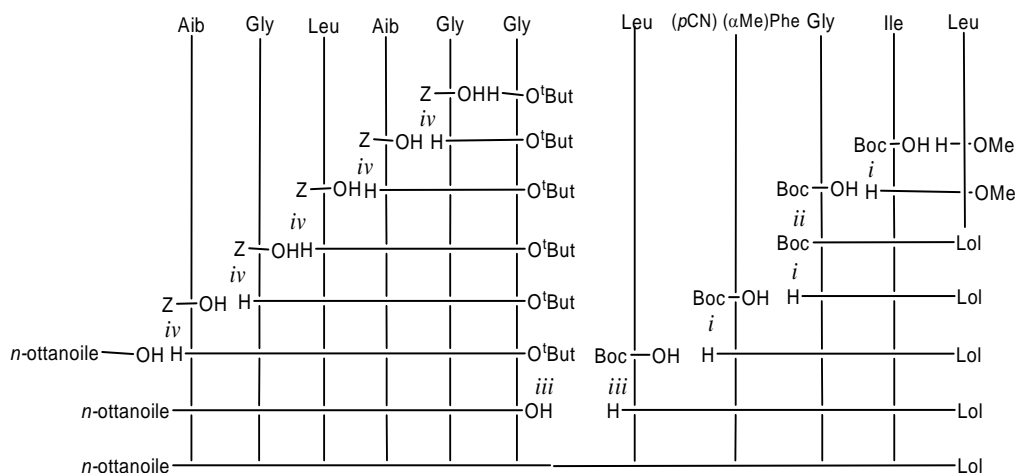


i: deprotezione in TFA/DCM 50% e *coupling* con EDC/HOBt

ii: riduzione con LiBH_4 in THF

iii: deprotezione in HCl/MeOH 0.5 M e *coupling* con EDC/HOAt

Fig. 3.4a Schema della sintesi dell'analogo 1



i: deprotezione in TFA/DCM 50% e *coupling* con EDC/HOBt

ii: riduzione con LiBH_4 in THF

iii: deprotezione in HCl/MeOH 0.5 M e *coupling* con EDC/HOAt

iv: deprotezione *via* idrogenazione catalitica con Pd/C e *coupling* con EDC/HOBt

Fig. 3.4b Schema della sintesi dell'analogo 2

3.2.2 Strategia di sintesi in fase solida

L'analogo 3 della tricogina, con la *p*CN-(α Me)Phe in posizione 1, è stato sintetizzato su fase solida, purificato e caratterizzato grazie al prezioso supporto della Dott.ssa Marta De Zotti, Assegnista di Ricerca nel gruppo del prof. Claudio Toniolo (Università di Padova). La sintesi ha avuto successo.

Il metodo della fase solida prevede l'ancoraggio dello Fmoc-amminoacido C-terminale della sequenza peptidica che si vuole sintetizzare ad una resina reticolata (polistirene-divinilbenzene). Per permettere che l'ancoraggio sia reversibile, che si possa cioè rimuovere il peptide finale dalla resina preservando l'integrità del peptide, tra l'amminoacido e la resina vi è un *linker*. Esso permette di utilizzare diverse condizioni chimiche di rimozione, adattandole alle varie esigenze. L'allungamento della catena peptidica si basa su operazioni ripetute, quali lo sblocco del gruppo N^α -protettore Fmoc dell'amminoacido e il successivo *coupling* con un altro Fmoc-derivato. Alla fine, sintetizzata la sequenza peptidica voluta, si sblocca la catena dalla resina. Viene rappresentato in figura 3.5 un ciclo di sintesi in fase solida.

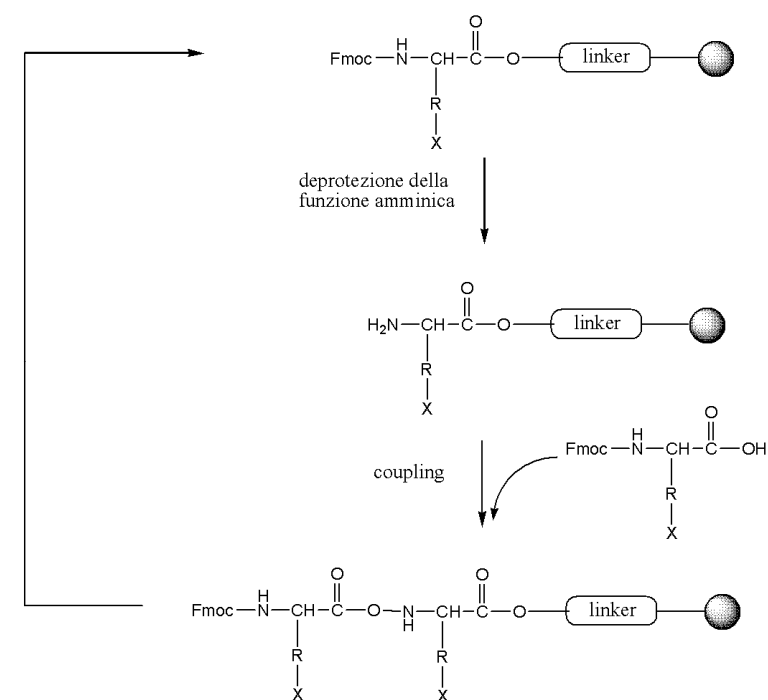


Figura 3.5 Schema generale di sintesi in fase solida.

Tale metodologia assicura il vantaggio di eliminare i reagenti in eccesso e i sottoprodotti solubili con filtrazioni e lavaggi al termine di ogni passaggio: si evitano in questo modo le ripetute estrazioni e cristallizzazioni tipiche della sintesi in soluzione. Questo aspetto è particolarmente importante nella sintesi di sequenze polipeptidiche, perché permette di impiegare reagenti in eccesso per condurre le reazioni a completezza: si evita così che il *coupling* solo parziale di un residuo, oltre ad abbassare drasticamente la resa, porti ad una miscela di sequenze abbreviate differenti solo per qualche residuo, quindi difficili da separare nella purificazione del prodotto.

Chiaramente, lo sbocco del peptide dalla resina non deve avvenire durante gli stadi di *coupling*; è necessario quindi che anche il *linker* non sia sensibile alle condizioni di rimozione del gruppo protettore α -amminico. Volendo ottenere il peptide finale con la funzione alcolica C-terminale libera, si è utilizzato un *linker* 2-cloro-tritile ancorato ad una resina di polistirene-divinilbenzene 1% (Figura 3.6). Questo tipo di resina è *ipersensibile* all'ambiente acido e consente di rimuovere il peptide con HFIP al 20% in DCM.

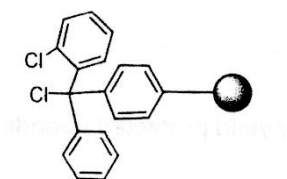


Figura 3.6 Resina 2-Cloro-tritile

Nel nostro caso la sintesi su fase solida è stata eseguita a partire da una resina tritilica, commercialmente disponibile, avente già legato il residuo di leucinolo C-terminale.

3.2.3 Gruppi protettori utilizzati nella sintesi in soluzione

Nella sintesi in soluzione si è utilizzato come gruppo N-protettore il *terz*-butossicarbonile (Boc) o il benzilossicarbonile (Z) (**Figura 3.7**)

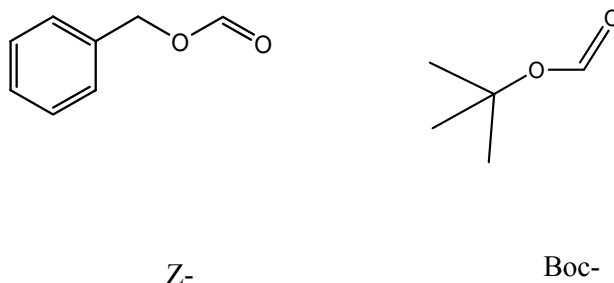


Figura 3.7 Gruppi N-protettori.

Il gruppo -Boc è stato impiegato nella sintesi due sequenze in soluzione poiché, essendo rimuovibile in condizioni acide blande (acido TFA 50% in DCM), è perfettamente ortogonale al gruppo -OMe, utilizzato per la protezione del C-terminale dei medesimi segmenti.

Il gruppo -Z è stato impiegato laddove possibile nella sintesi *step-by-step* del frammento C-terminale dell'analogo **2** per i vantaggi già enunciati rispetto al -Boc. Nel caso della sintesi via -Z si è scelto di proteggere l'estremità C-terminale con il gruppo -O^tBu, rimuovibile in condizioni acide blande (acido TFA 50% in DCM) e quindi perfettamente ortogonale al gruppo -Z.

Si è affrontata la questione del residuo di Lol C-terminale. La riduzione effettuata posteriormente sul peptide (trattamento con LiBH₄) sarebbe stata incompatibile con l'integrità del residuo di (*p*CN)-(α Me)Phe, la cui catena laterale sarebbe stata ridotta. Si è pertanto sintetizzato l'ammino-alcol Lol, partendo dal corrispondente estere metilico,

e lo si è successivamente utilizzato nella sintesi peptidica senza proteggere la funzione alcolica.

Per le catene laterali non c'è stato bisogno di alcuna protezione. Gli amminoacidi che costituiscono la tricogina non hanno reattività o problemi particolari. Infatti, le catene laterali alifatiche non interferiscono con le normali procedure di attivazione e formazione del legame peptidico, presentando altresì il vantaggio di garantire una buona solubilità in solvente organico anche dei segmenti più lunghi.

3.2.4 Gruppi protettori utilizzati in sintesi su fase solida

E' stato utilizzato per la funzione N-amminica nella sintesi in fase solida il gruppo Fmoc (**Figura 3.8**). Per la sua rimozione si è utilizzata piperidina al 20% in DCM, che sottrae tra l'altro anche il dibenzofulvene che si forma come sottoprodotto di reazione (**Figura 3.9**).

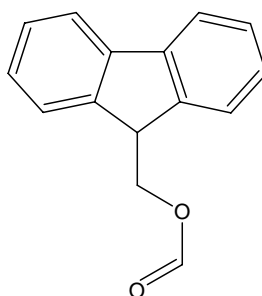


Fig. 3.8 Gruppo protettore Fmoc

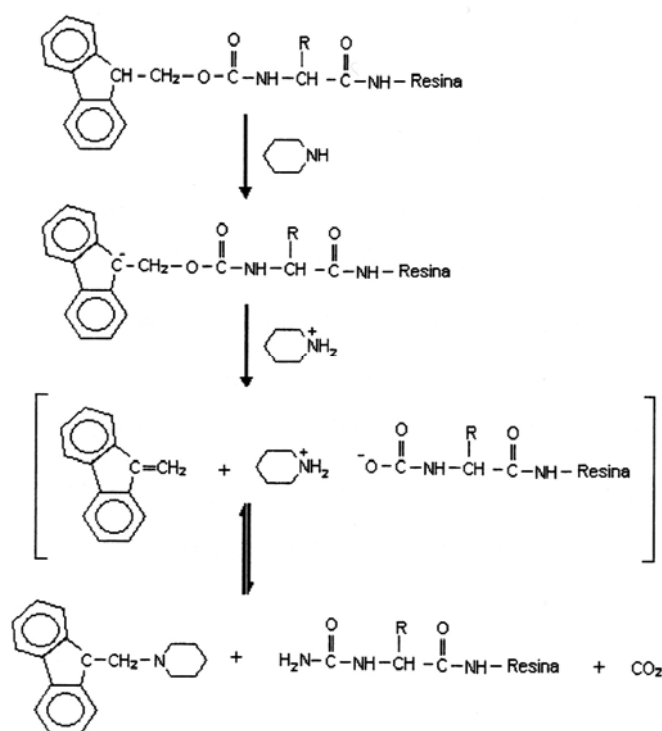


Fig. 3.9 Rimozione dello Fmoc con piperidina

3.2.5 Metodi di attivazione

Per quanto riguarda la scelta dei metodi di formazione dei legami ammidici è opportuno sottolineare che gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti sono poco reattivi nella formazione del legame peptidico a causa dell'ingombro sterico sul C^α . Tale influenza negativa si fa sentire maggiormente sul gruppo amminico che su quello carbossilico.

L'esperienza acquisita in questo Laboratorio nella sintesi di peptidi contenenti amminoacidi stericamente impediti ha suggerito di ricorrere, a motivo dell'efficacia e della praticità d'uso, al metodo di attivazione del gruppo carbossilico *via* EDC/HOAt^[105] o EDC/HOBt (**Figura 3.10**).

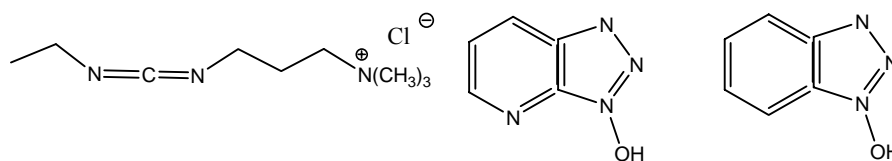


Fig. 3.10 Struttura dell'EDC, dell'HOAt e dell'HOBt

Questi due additivi svolgono la duplice funzione di sopprimere la racemizzazione e di catalizzare la reazione di acilazione. Proprio per questa seconda caratteristica essi vengono a maggior ragione utilizzati anche con gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti, i quali reagirebbero altrimenti lentamente a causa dell'ingombro sterico.

Nella procedura di attivazione *via* EDC/HOAt la carbodiimide promuove la formazione di un intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido N-protetto e l'HOAt.^[88] L'effetto catalitico di tale estere si esplica mediante l'assistenza che gli atomi di azoto, in posizione 2 e 7, forniscono all'attacco nucleofilo del gruppo amminico. Da studi recenti è emerso che la conformazione preferita allo stato cristallino dagli -OAt esteri prevede la perpendicolarità del piano dell'-OAt rispetto a quello del gruppo carbossilico.^[89] Se tale disposizione tridimensionale si conserva in soluzione, il gruppo amminico reagente con l'estere trova assistenza su entrambe le facce da parte dell'atomo di azoto in posizione 2 o 7 dell'-OAt (**Figura 3.11**). Questo meccanismo spiega anche il minor effetto catalitico esercitato dall'HOBt, che può fornire assistenza con un atomo di azoto su una sola faccia.

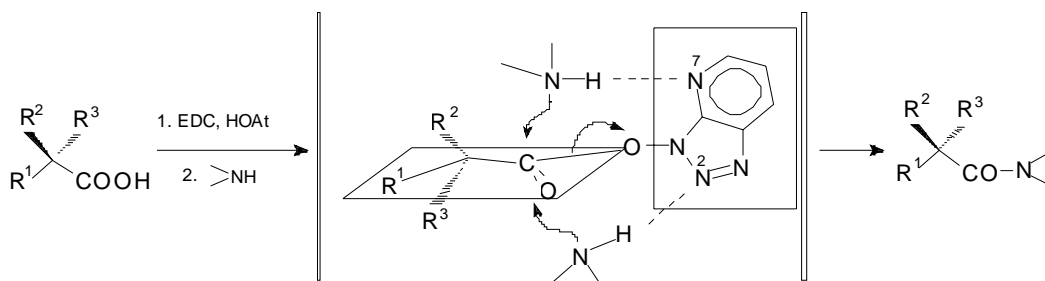


Fig. 3.11 Attacco nucleofilo assistito nella formazione del legame ammidico *via* attivazione del gruppo carbossilico con HOAt.

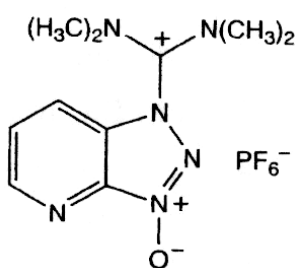


Fig. 3.12 Formula chimica

dell'agente condensante HATU

Per le reazioni di *coupling* nella sintesi su fase solida è stato usato come agente condensante [O-(azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato] (HATU, **Figura 3.12**). Anche in questo caso il meccanismo di reazione comprende la formazione di un intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido N-

protetto e l'HOAt che si stacca dal sale di uronio (**Figura 3.13**).

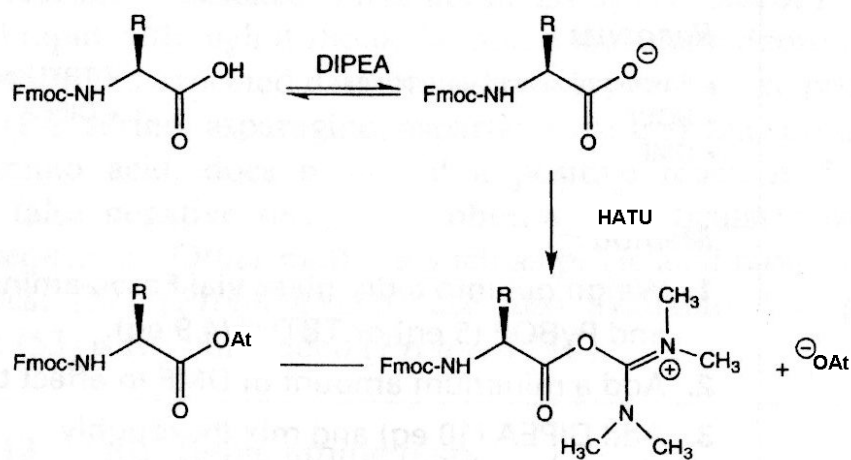


Fig. 3.13 Formazione di un estere-OAt usando HATU.

3.2.6 Metodi di caratterizzazione

Tutti i composti isolati sono stati caratterizzati mediante determinazione del punto di fusione (se solidi), del comportamento cromatografico (TLC in diversi sistemi eluenti), del potere ottico rotatorio specifico, dell'assorbimento IR allo stato solido e con la spettrometria ¹H NMR.

3.3 Indagini conformazionali

3.3.1 Spettroscopia infrarossa

Sono stati condotti studi conformazionali in soluzione attraverso la spettroscopia di assorbimento IR sull'analogo **3** e alcuni segmenti a catena relativamente lunga. Tali indagini permettono di valutare l'entità dei legami a idrogeno tra gli NH e i C=O ammidici dei peptidi e di fare ragionevoli ipotesi sulla loro natura *inter-* o *intra-* molecolare.

Si è ritenuto opportuno focalizzare l'indagine sui peptidi:

- **(A)** Boc-L-Leu-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-L-Ile-L-Lol
- **(B)** Boc-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol
- **(3)** *n*-ott-L-*p*CN-(α Me)Phe-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol

Lo studio è stato effettuato in deuterocloroformio (solvente di bassa polarità) o cloroformio, negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni:^[106]

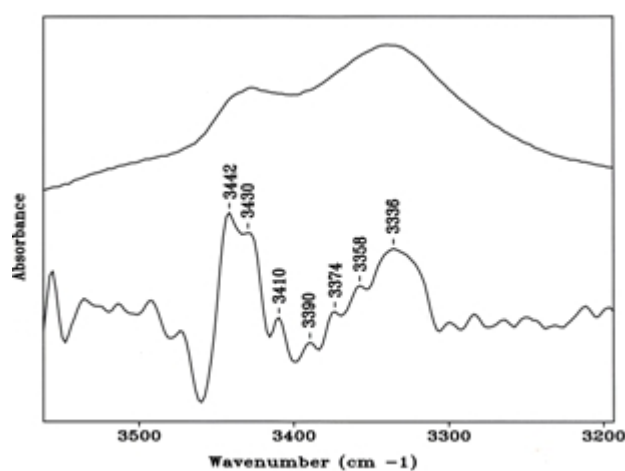
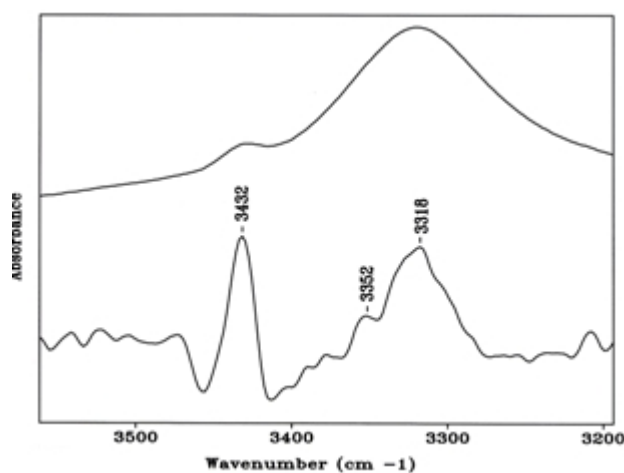
- 3600-3200 cm⁻¹, corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami N-H dei gruppi uretanici e peptidici;
- 1800-1600 cm⁻¹, corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami C=O esterei, uretanici e peptidici.

Per tutti i peptidi esaminati l'indagine di assorbimento IR è stata effettuata alla concentrazione 10⁻³ M. I risultati sono riportati nella **Tabella 3.1** e nelle **Figure 3.14-3.16**. Le frequenze dei massimi di assorbimento IR nelle regioni 3500-3200 cm⁻¹ e 1800-1600 cm⁻¹ dei peptidi **A**, **B**, **C** sono riportate nella **Tabella 3.1**.

Tabella 3.1 Frequenze di assorbimento IR degli intermedi di interesse alla concentrazione di 10^{-3} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
A*	<u>3442</u> ^b , 3430 ^a , 3410 ^a , 3374 ^a , 3375 ^a , <u>3336</u> ^b	1706, <u>1672</u> , <u>1662</u> , <u>1644</u> ^a , 1644
B**	<u>3432</u> , <u>3352</u> ^a , <u>3318</u> ^b	<u>1726</u> ^a , <u>1660</u>
3**	<u>3410</u> ^a , <u>3376</u> ^a , <u>3318</u> ^b	<u>1710</u> , <u>1656</u> , <u>1636</u> ^a

NOTA: ^aspalla, ^bbanda larga. I valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (.....) intense (___) o molto intense (___). *in CHCl_3 ; **in CDCl_3

**Fig. 3.14** *Stretching* NH e derivata seconda dello spettro tra 3500 e 3200 cm^{-1} per **A** in CHCl_3 **Fig. 3.15** *Stretching* NH e derivata seconda dello spettro tra 3500 e 3200 cm^{-1} per **B** in CDCl_3

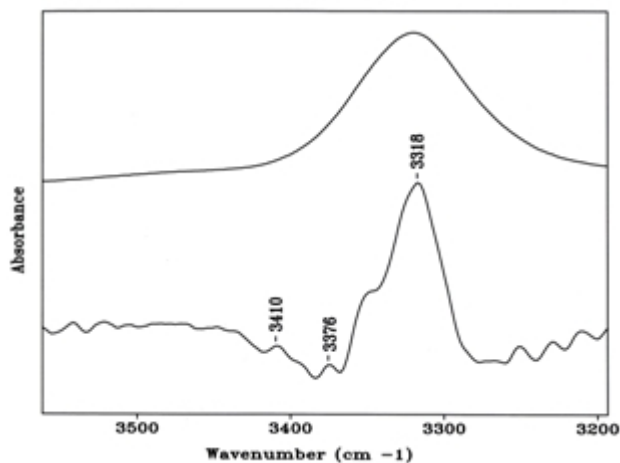


Fig. 3.16 *Stretching* NH e derivata seconda dello spettro tra 3500 e 3200 cm⁻¹ per **3** in CDCl₃

Lo spettro di **3** è stato anche registrato alla concentrazione di 10⁻⁴ M in CDCl₃. Dal confronto con quello raccolto alla concentrazione di 10⁻³ M è possibile trarre conclusioni su eventuali fenomeni di aggregazione e stabilire se i legami ad idrogeno che coinvolgono gli NH siano di tipo *intra*-molecolare. Gli spettri di **3** alle due concentrazioni sono riportati in figura 3.17. Tali spettri sono normalizzati in quanto per il decremento di concentrazione di un fattore 10 si è utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore (1.0 mm per 10⁻³ M e 10.0 mm per 10⁻⁴ M).

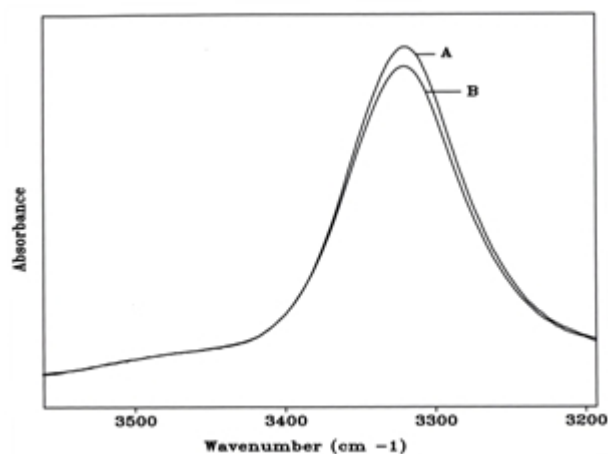


Fig. 3.17 Confronto tra gli spettri del peptide **3** alle concentrazioni 10⁻³ M (A) e 10⁻⁴M (B) nella zona degli *stretching* NH

I risultati più interessanti derivanti dall'indagine di assorbimento IR si possono così riassumere:

- Nella regione spettrale $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ i peptidi esaminati (eccetto il segmento **3**) mostrano due bande: quella a numeri d'onda superiori a 3400 cm^{-1} è assegnabile alle vibrazioni di stiramento di gruppi N-H liberi e solvatati, mentre la banda a frequenze inferiori a 3400 cm^{-1} è assegnabile alle vibrazioni di stiramento di gruppi N-H impegnati in legami ad idrogeno^[107-109].
- Lo studio degli effetti della diluizione sul peptide più lungo, l'analogo **3**, porta a ritenere che i legami ad idrogeno osservati sugli N-H peptidici siano prevalentemente di tipo *intramolecolare*,^[107-109]: infatti, l'intensità delle bande fra $3340\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ diminuisce debolmente con la diluizione da 10^{-3} M a 10^{-4} M . Tale dato è in accordo con l'adozione di una struttura elicoidale, stabilizzata da legami ad H intramolecolari, come indicato anche (vedi paragrafi successivi) dalle analisi NMR e CD. Va anche notato che non si osserva una significativa presenza di N-H non legati (assorbimento sopra 3400 cm^{-1}) anche alla concentrazione di 10^{-4} M . Tale comportamento è stato sempre osservato con la tricogina e i suoi analoghi. Esso sta ad indicare che la tricogina tende ad autoassociare mediante gli N-H N-terminali e i C=O C-terminali, non impegnati nei legami ad H intramolecolari.^[81]
- La banda di stiramento del legame O-H del Lol (ove presente) è di problematica individuazione. Questa banda dovrebbe cadere nella zona dei segnali N-H liberi. L'individuazione della posizione esatta del massimo di assorbimento del legame O-H del Lol non è pertanto possibile.
- Per quanto riguarda la regione spettrale $1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (Tabelle 3.2 e 3.3), nella zona $1740\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ cadono i picchi di assorbimento delle vibrazioni di stiramento dei gruppi C=O uretanici.^[107-109] I gruppi C=O peptidici e ammidici (banda ammide I) risuonano nell'intervallo spettrale $1685\text{-}1659\text{ cm}^{-1}$.^[107-109] Negli spettri dei tre peptidi il massimo di assorbimento della banda ammide I è localizzato a $1660\text{-}1656\text{ cm}^{-1}$. Tale massimo è prossimo alla posizione canonica della banda ammide I delle strutture elicoidali di tipo α (1658 cm^{-1}) e 3_{10} (1662 cm^{-1}).

Riassumendo, i risultati dell'indagine di assorbimento IR in soluzione di CDCl_3 inducono ad ipotizzare che i peptidi esaminati assumano in prevalenza conformazioni elicoidali stabilizzate da legami ad idrogeno *intramolecolari*, pur non consentendo di stabilire se si tratti di eliche- α , di eliche- 3_{10} , o di combinazioni delle due.

Sono stati anche registrati spettri in solventi a diversa polarità (DCM, DMSO e MeOH) nella regione attorno a $2300\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$, al fine di osservare l'influenza dell'ambiente sullo *stretching* del legame CN. Tale informazione, infatti, sarà utilizzata negli studi di interazione con le membrane che saranno condotti presso il laboratorio del prof. Lorenzo Stella (Università di Roma "Tor Vergata"). I risultati sono riassunti in Tabella 3.2. Gli spettri originali sono riportati nelle figure 3.18-3.21.

Tabella 3.2 Frequenze del pCN in diversi solventi l'intermedio A alla concentrazione di 10^{-3} M.

Solvente	$\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1})$
CHCl ₃	2231
MeOH	2231
CH ₂ Cl ₂	2229
DMSO	2225

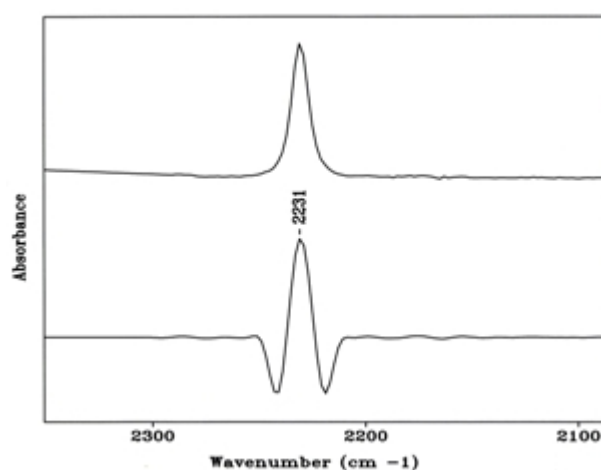


Fig. 3.18 *Stretching* del legame CN in CHCl₃

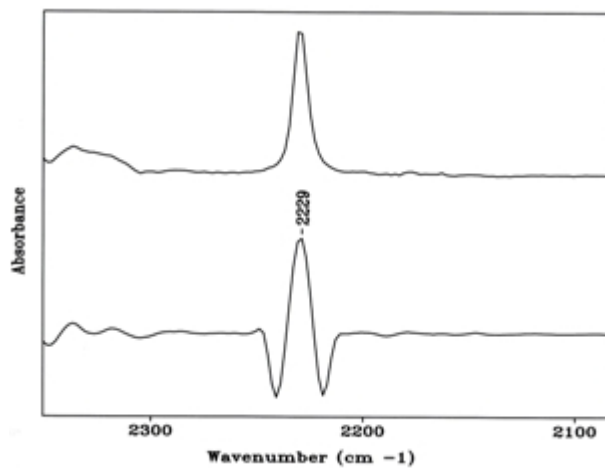


Fig. 3.19 *Stretching* del legame CN in CH₂Cl₂

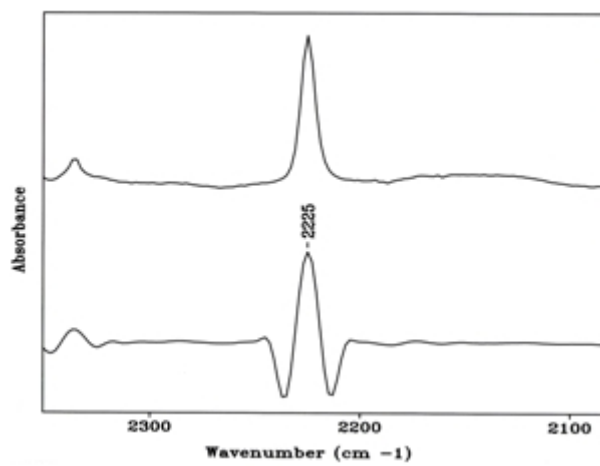


Fig. 3.20 *Stretching* del legame CN in DMSO

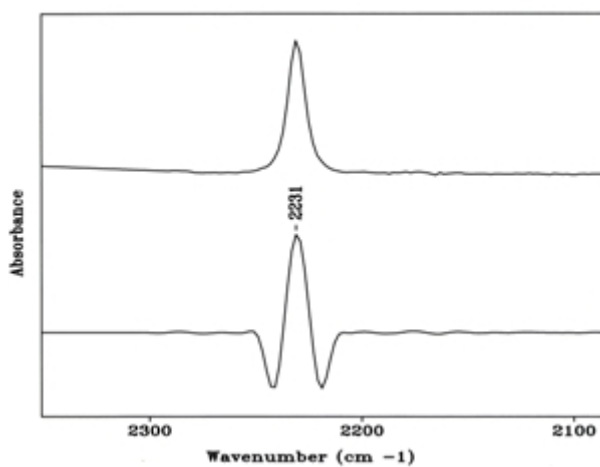


Fig. 3.21 *Stretching* del legame CN in MeOH

Si può osservare come l'ambiente che circonda il nitrile della *p*CN-(α Me)Phe influenzi significativamente la posizione dello stiramento CN nello spettro di assorbimento IR. Lo scostamento di 6 cm⁻¹, passando dal DMSO al CHCl₃ o al MeOH, è in linea con i valori riportati in letteratura per l'amminoacido *p*CN-Phe. Questi dati preliminari sono promettenti in vista dei futuri studi in membrana. Essi serviranno a determinare il grado di inserzione della tricogina nei doppi strati fosfolipidici e, di conseguenza, le modalità della sua azione antibatterica.

3.3.2 Spettroscopia ¹H-NMR

La spettrometria ¹H-NMR è stata impiegata per condurre un'indagine conformazionale sull'analogo **3**, sintetizzato su fase solida.

Gli spettri ¹H-NMR mono e bidimensionali acquisiti per l'undecapeptide [*p*CN-(α Me)Phe¹]-tricogina (**3**) in DMSO-*d*₆ hanno evidenziato la presenza di una struttura secondaria di tipo elicoidale, confermando quanto già osservato tramite gli studi di assorbimento IR in CDCl₃. A tali conclusioni si è giunti analizzando lo spettro ROESY. Grazie anche ai dati dello spettro TOCSY è stato possibile assegnare tutte le risonanze protoniche (**Tabella 3.3**).

Tab. 3.3 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per [*p*CN-(α Me)Phe¹]-tricogina (**3**) (400 MHz, 1 mM in DMSO-*d*₆, 298K).

Residuo	NH	α H	β H	γ H	δ H	Altri
Ott		2.134, 2.259	1.492	1.232	1.232	ϵ CH 1.232; ω CH 0.839
<i>p</i> CN(α Me)Phe ¹	8.16		1.180; 3.085, 3.298			H-2,6 7.258; H-3,5 7.720
Gly ²	8.349	3.537, 3.684				
Leu ³	7.723	4.155	1.497, 1.618	1.618	0.831, 0.875	
Aib ⁴	8.042		1.320			
Gly ⁵	7.948	3.610				
Gly ⁶	7.919	3.713, 3.749				
Leu ⁷	7.910	4.195	1.492, 1.534	1.534	0.819, 0.855	
Aib ⁸	8.061		1.323			
Gly ⁹	7.856	3.582				
Ile ¹⁰	7.396	4.048	1.791	1.099,1.422; 0.789	0.789	0.789
Lol ¹¹	7.325	3.775	1.254, 1.304	1.576	0.780, 0.816	β^2 -CH ₂ OH 3.148, 3.292

La Figura 3.22 mostra la regione ammidica dello spettro ROESY (1 mM, 298K, 400 MHz) del peptide in DMSO- d_6 . La presenza di tutte le correlazioni sequenziali $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$ è diagnostica della presenza di una struttura di tipo elicoidale.^[110]

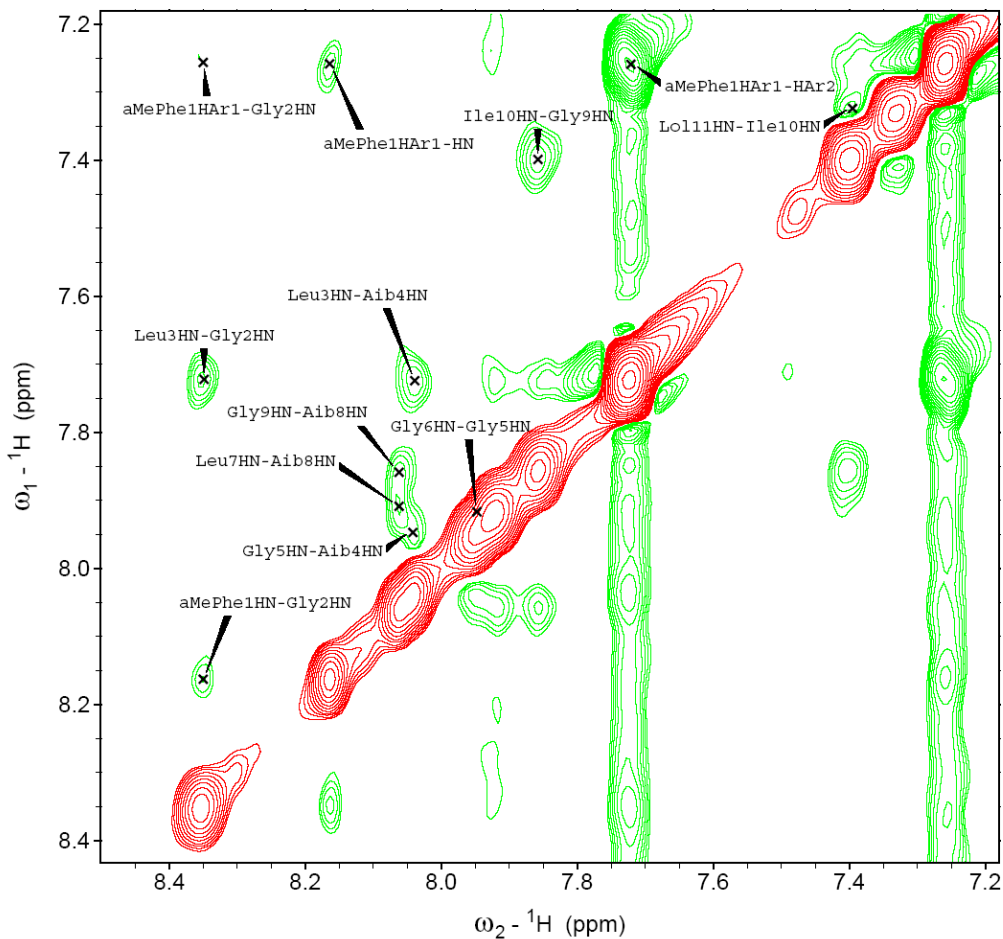


Fig. 3.22. Regione ammidica dello spettro ROESY (298 K, 400 MHz) di $[p\text{CN}-(\alpha\text{Me})\text{Phe}^1]$ -tricogina (**3**) in DMSO- d_6 alla concentrazione di 1 mM.

Pertanto, la presente analisi NMR preliminare in DMSO- d_6 consente di affermare che la struttura elicoidale di $[p\text{CN}-(\alpha\text{Me})\text{Phe}^1]$ -tricogina (**3**) (di tipo α , 3_{10} o probabilmente misto) gode di notevole stabilità. Infatti, pur essendo il DMSO un buon accettore di legami ad idrogeno non è in grado di competere con i legami ad H intramolecolari, di tipo $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}$, che stabilizzano la struttura peptidica.

3.3.3 Dicroismo circolare

Le preferenze conformazionali in soluzione di [*p*CN-(α Me)Phe¹]-trigocina (**3**) sono state esaminate anche mediante dicroismo circolare (CD) in tre diversi solventi: MeOH, TFE e SDS 100 mM in H₂O (ambiente membrano-mimetico). Non è stato possibile condurre l'analisi CD in CDCl₃ o DMSO, solventi utilizzati per le analisi di assorbimento IR e NMR, in quanto essi presentano forti assorbimenti nella zona spettrale UV dove assorbe anche il cromoforo ammidico (180-250 nm).

Le misure sono state condotte a temperatura ambiente e gli spettri sono stati acquisiti alla concentrazione 1×10^{-4} M. Si è studiata in particolare la zona tra 190 nm e 280 nm, dove si trovano le bande corrispondenti alle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del cromoforo peptidico. Le transizioni del cromoforo peptidico sono otticamente inattive, ma la presenza di centri chirali nelle vicinanze del legame peptidico (come i C $^{\alpha}$ degli amminoacidi chirali) e/o la sua appartenenza a strutture secondarie elicoidali (intrinsecamente dissimetriche) le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD.

Utili informazioni sul grado e sul tipo di strutturazione in soluzione del composto in esame si possono ottenere sia dalla forma delle curve spettrali che dalla posizione delle bande dicroiche.

Nella Figura 3.23 si riportano le curve dicroiche ottenute per il peptide nei diversi solventi. Come si può osservare, al variare del solvente gli spettri dicroici non subiscono cambi drammatici. Tale comportamento denota una spiccata stabilità conformazionale dell'undecapeptide **3**, molto probabilmente favorita dai tre residui amminoacidici C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti presenti nella sequenza.

Le tre curve CD, nei tre solventi indicati, sono sempre caratterizzate da due massimi negativi a circa 208 e 222 nm. Curve dicroiche di questo tipo si riscontrano in strutture elicoidali destrorse sia di tipo α che 3_{10} .^[111-114] Si ricorda che, mentre nell' α -elica destrorsa i due massimi negativi, centrati a 208 nm (transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, componente parallela) e 222 nm (transizione $n \rightarrow \pi^*$), sono circa di pari intensità, nell' 3_{10} la transizione $n \rightarrow \pi^*$ presenta un'intensità decisamente ridotta rispetto alla $\pi \rightarrow \pi^*$ e tende a spostarsi leggermente a lunghezze d'onda inferiori.^[111,112] Un valore del rapporto $R = [\Theta]_{222} / [\Theta]_{208}$ inferiore a 0.4 è ritenuto diagnostico della conformazione elicoidale di tipo 3_{10} ,^[112] mentre valori prossimi all'unità sono generalmente considerati tipici dell' α -elica,

anche se non esiste al riguardo unanime consenso.^[113] Valori intermedi indicano una coesistenza in soluzione delle due conformazioni elicoidali α e 3_{10} .

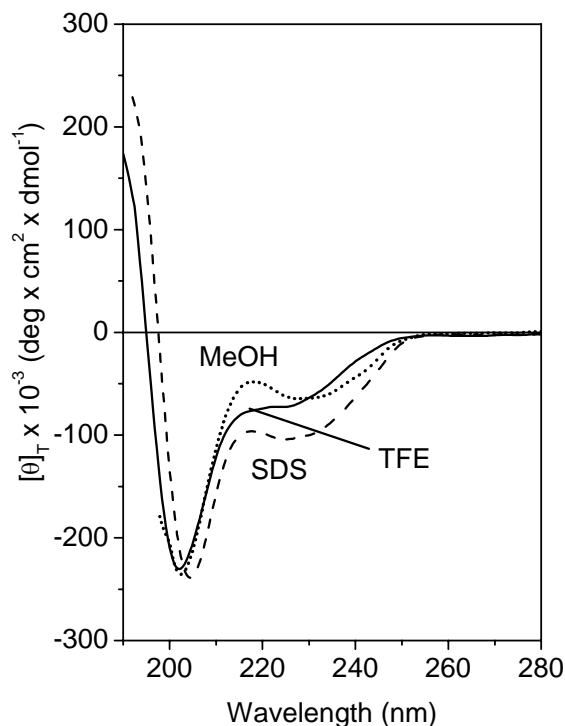


Fig. 3.23. Spettri CD di $[pCN-(\alpha Me)Phe^1]$ -tricogina in soluzione di MeOH (····), TFE (—) e 100 mM SDS in acqua (- · -). Concentrazione peptidica: 0.1 mM.

In Tabella 3.4 sono riportati i valori del rapporto $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ (**R**) per $[pCN(\alpha Me)Phe^1]$ -tricogina (**3**) nei vari solventi utilizzati. I valori di **R** ottenuti indicano la presenza di una struttura elicoidale destrorsa di tipo misto $\alpha/3_{10}$ nei tre solventi considerati. In particolare, in MeOH e TFE sembra prevalere una conformazione più vicina all'elica 3_{10} , mentre l'equilibrio conformazionale sembra spostato più verso l' α -elica in ambiente membranomimetico (SDS).

Tab. 3.4. Valori dell'ellitticità molare ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) e del rapporto $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ (**R**) per $[p\text{CN}-(\alpha\text{Me})\text{Phe}^1]$ -tricogina (**3**) alle lunghezze d'onda corrispondenti ai due massimi negativi delle curve dicroiche nei tre solventi investigati. Concentrazione peptidica: 0.1mM.

Peptide	Solvente	$\theta_T \times 10^{-3}$ (204 nm)	$\theta_T \times 10^{-3}$ (225 nm)	R
[pCN(α Me)Phe ¹]- tricogina	MeOH	-235.6	-64.6	0.27
	TFE	-230.5	-72.5	0.31
	SDS	-238.9	-104.1	0.44

E' a questo punto opportuno introdurre una nota di cautela nell'interpretazione degli spettri dicroici. Infatti, il cromoforo *p*CN-fenilico, achirale, ha assorbimenti nella regione spettrale investigata. Su di esso vi è un'induzione di chiralità da parte della struttura elicoidale peptidica. Pertanto, è ipotizzabile che esso dia un contributo, sia pur lieve, agli spettri dicroici osservati.

Riassumendo, l'analisi CD conferma e integra le informazioni tratte dagli studi conformazionali condotti mediante NMR e assorbimento IR. In particolare, l'undecapeptide **3** adotta una struttura elicoidale molto stabile di tipo $\alpha/3_{10}$.

3.4 Interazioni con membrane fosfolipidiche

L'analogo [*p*CN(α Me)Phe¹]-tricogina (**3**) è stato saggiato in un test preliminare, atto a verificarne la capacità di alterare la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici. Come termine di confronto cui rapportare le attività misurate è stata usata la tricogina GA IV.^[4,82]

Per concentrazioni diverse di peptide è stata determinata, mediante misure di fluorescenza, la capacità di far rilasciare da SUV di PC/Ch (7:3) la CF precedentemente inglobata. Il rilascio di CF è stato misurato dopo 20 minuti dall'aggiunta del peptide alla soluzione dei liposomi. Una rappresentazione schematica dell'esperimento è riportata in Figura 3.24.

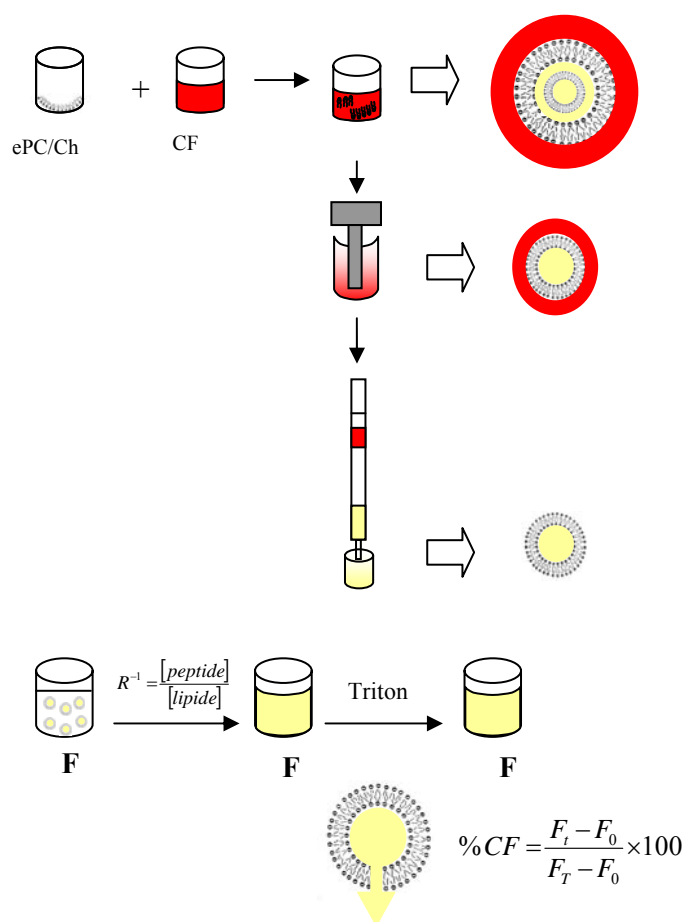


Fig. 3.24 Schema dell'esperimento "leakage".

Procedendo alla misura della fluorescenza relativa ai campioni in analisi, due sono le eventualità che si possono verificare. Nel caso in cui la CF rimanga completamente

inglobata nelle membrane fosfolipidiche integre, l'emissione di fluorescenza è modesta: si verifica infatti il fenomeno dell'*auto-quenching*, dovuto all'elevata concentrazione di CF all'interno delle vescicole. Se, invece, il peptide introdotto rende più permeabile la membrana fosfolipidica, la CF fuoriesce dalle vescicole, diluendosi nell'ambiente circostante: si registra come conseguenza un notevole aumento di fluorescenza. Il valore di massima fluorescenza può essere ricavato aggiungendo Triton alla soluzione lipidica; il tensioattivo iniettato, infatti, opera la completa disgregazione delle membrane causando il rilascio totale di CF.

Nella figura 3.25 sono riportati i risultati della misure di rilascio di CF da liposomi ottenuti con le modalità sopra descritte.

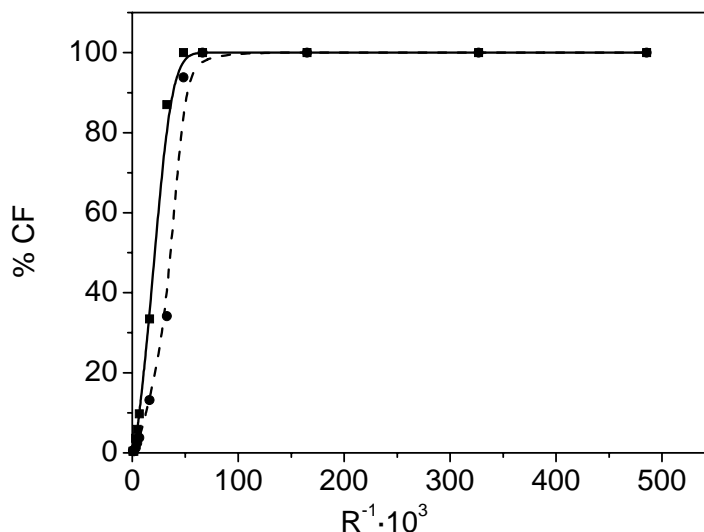


Fig. 3.25 Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch (7:3) dopo 20 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto da $[pCN(\alpha Me)Phe^1]$ -tricogina (3) (—) e dalla tricogina GA IV (- -).

Le curve ottenute hanno un chiaro andamento a sigmoide, indicativo di un meccanismo di azione di tipo cooperativo. In altre parole è necessario che i peptidi raggiungano una concentrazione minima, tale da permettere la formazione di aggregati, prima che riescano a iniziare il processo di permeazione dei doppi strati fosfolipidici.

E' interessante notare come l'attività sembri aumentare con l'aumento dell'idrofobicità totale del peptide. L'analogo $[pCN(\alpha Me)Phe^1]$ -tricogina, infatti, mostra un'attività leggermente superiore a quella del peptaibolico naturale. Questo può essere dovuto ad

una maggiore affinità dell'analogo per la parte interna (idrofobica) del doppio strato fosfolipidico e suggerire pertanto possibili meccanismi di interazione.

Si ricorda comunque che una maggiore attività verso le vescicole utilizzate in questo studio non costituisce necessariamente una qualità per questi peptaibolici. Infatti, le membrane delle cellule batteriche sono alquanto diverse dal modello qui utilizzato, che risulta comunque valido come "screening" preliminare. Per una valutazione più approfondita dell'attività antibiotica rispetto alla tricogina naturale, sarà pertanto necessario attendere l'esito degli studi antibatterici.

4. CONCLUSIONI

Il lavoro di sintesi e caratterizzazione peptidica riportato in questa Tesi ha permesso di individuare opportune strategie di sintesi in soluzione e su fase solida, che consentono di preparare per via chimica numerosi analoghi della tricogina GA IV.

In particolare, la veloce tecnica di sintesi su fase solida si è confermata valida almeno per l'analogo della tricogina avente il residuo di *p*CN-(α Me)Phe, stericamente molto impedito, in posizione N-terminale. D'altro canto, la strategia di condensazione di segmenti consente di poter programmare e preparare quantità discrete di peptidi intermedi, opportunamente funzionalizzati con sonde di varia natura. In tal modo sarà relativamente facile e veloce assemblare analoghi della tricogina, che si prestino a studiarne il meccanismo d'azione sulle membrane biologiche mediante tecniche strumentali diverse e tra loro complementari.

Un'indagine conformazionale in soluzione, condotta mediante assorbimento IR, spettrometria NMR e dicrosmo circolare, ha indicato che i peptidi esaminati assumono in prevalenza conformazioni elicoidali.

Studi preliminari di interazione con membrane modello, vescicole formate da fosfatidilcolina e colesterolo, hanno mostrato che l'analogo della tricogina con un residuo di L-*p*CN-(α Me)Phe in posizione 1 è in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici. Inoltre, tale residuo si è dimostrato essere una sonda sensibile all'ambiente circostante. Infatti, lo stiramento del triplo legame del CN si sposta significativamente nello spettro di assorbimento IR al variare del solvente. Tale risultato è sicuramente incoraggiante in vista dei futuri studi in membrana. Essi serviranno a determinare il grado di inserzione della tricogina nei doppi strati fosfolipidici e, di conseguenza, le modalità della sua azione antibatterica.

BIBLIOGRAFIA

1. Roeske, R.W. e Kennedy, S.J., in "*Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*", Vol. 7, Weinstein, B. Ed., Dekker, New York, pp. 205-265 (1983).
2. Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. e Bonora, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7951 (1982).
3. Brückner, H. e Graf, H., *Experientia*, **39**, 528 (1983).
4. (a) Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Prigent, Y. e Bodo, B., in "*Peptides 1990*", Giralt, E. e Andreu, D. Eds., ESCOM, Leiden, pp.428-429 (1991); (b) Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Prigent, Y. e Bodo, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2170 (1992).
5. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Pirrone, L., Bonora, G. M., Mammi, S. e Peggion, E., in "*Peptides 1992*", Schneider, C. H. e Eberle, A. N. Eds., ESCOM, Leiden, pp.613-614 (1993).
6. Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Vuidepot, I., Messias, M. e Bodo, B., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 249 (1993).
7. Tsantrizos, Y.S., Pischos, S., Sauriol, F. e Widden, P., *Can. J. Chem.*, **74**, 165 (1996).
8. Tsantrizos, Y.S., Pischos, S. e Sauriol, F., *J. Org. Chem.*, **61**, 2118 (1996).
9. Fujita, T., Wada, S., Iida, A., Nishimura, T., Kanai, M. e Toyama, N., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 489 (1994).
10. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Eppard, R. F. e Eppard, R. M., *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 1179 (2001).
11. Kleinkauf, H. e von Döhren, H., *Eur. J. Biochem.*, **192**, 1 (1990).
12. Brückner, H. e Przybylski, M., *J. Chromatogr.*, **296**, 263 (1984).
13. Brückner, H. e Jung, G., *Chromatographia*, **13**, 170 (1980).
14. Rinehart, K.L. Jr., Cook, J.C. Jr., Pandey, R.C., Gaudio, L.A., Meng, H., Moore, M.L., Gloer, J.B., Wilson, G.R., Gutowsky, R.E., Zierath, P.D., Shield,

- L.S., Li, L.H., Renis, H.E., McGovren, J.P. e Canonico, P.G., *Pure Appl. Chem.*, **54**, 2409 (1982).
15. Davoust, D., Bodo, B., Rebuffat, S. e Platzner, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 1 (1983).
16. Rebuffat, S., El Hajji, M., Hennig, P., Davoust, D. e Bodo, B., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 200 (1989).
17. Jung, G., Brückner, H. e Schmitt, H., in "*Structure and Activity of Natural Peptides*", Voelter, W. e Weitzel, G. Eds., de Gruyter, Berlin, pp.75-114 (1981).
18. Mathew, M.K. e Balaram, P., *Mol. Cell Biochem.*, **50**, 47 (1983).
19. Le Doan, T., El Hajji, M., Rebuffat, S., Rajesvari, M.R. e Bodo, B., *Biochim. Biophys. Acta*, **858**, 1 (1986).
20. (a) Payne, J. W., Jakes, R. e Hartley, B. S., *Biochem. J.*, **117**, 757 (1970); (b) Pandey, R.C., Cook, J.C. Jr. e Rinehart, K.L. Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8469 (1977).
21. (a) Mueller, P. e Rudin, D.O., *Nature*, **217**, 713 (1968); (b) Menestrina, G., Voges, K., Jung, G. e Boheim, G., *J. Membr. Biol.*, **93**, 111 (1986).
22. Marsh, D., *Biochem. J.*, **315**, 345 (1996).
23. (a) Venkataram Prasad, B.V. e Balaram, P., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **16**, 307 (1984); (b) Toniolo, C. e Benedetti, E., *Macromolecules*, **24**, 4004 (1991).
24. Marshall, G.R., in *Intra-Science Chemistry Reports*, Vol. 5, Kharasch, N. Ed., Gordon and Breach, New York, pp. 305-316 (1971).
25. Venkataram Prasad, B.V. e Sasisekharan, V., *Macromolecules*, **12**, 1107 (1979).
26. (a) Paterson, Y., Rumsey, S.M., Benedetti, E., Némethy, G. e Scheraga, H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947 (1981); (b) Improta, R., Rega, N., Aleman, C. e Barone, V., *Macromolecules*, **34**, 7550 (2001).
27. Toniolo, C. e Benedetti, E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
28. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, 3471 (1970).
29. Venkatachalam, C.M., *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968).

30. Rose, G.D., Gierasch, L.M. e Smith, J.A., *Adv. Protein Chem.*, **37**, 1 (1985).
31. Toniolo, C., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 1 (1980).
32. 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).
33. Toniolo, C., Valle, G., Bonora, G.M., Crisma, M., Formaggio, F., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V. e Pedone, C., *Biopolymers*, **25**, 2237 (1986).
34. Valle, G., Crisma, M., Toniolo, C., Beißwenger, R., Rieker, A. e Jung, G., *Liebigs Ann. Chem.*, 337 (1989).
35. Valle, G., Crisma, M. e Toniolo, C., *Zeit. Kristallogr.*, **188**, 261 (1989).
36. Souhassou, M., Smith, G.D., Leplawy, M.T. e Marshall, G.R., *Acta Crystallogr.*, **A46**, suppl., C-140, PS-04.01.16 (1990).
37. Pavone, V., Di Blasio, B., Pedone, C., Santini, A., Benedetti, E., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Gazz. Chim. Ital.*, **121**, 21 (1991).
38. Di Blasio, B., Santini, A., Pavone, V., Pedone, C., Benedetti, E., Moretto, V., Crisma, M. e Toniolo, C., *Struct. Chem.*, **2**, 523 (1991).
39. Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. e Bonora G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1988 (1986).
40. Pavone, V., Di Blasio, B., Santini, A., Benedetti, E., Pedone, C., Toniolo, C. e Crisma, M., *J. Mol. Biol.*, **214**, 633 (1990).
41. Toniolo, C., Crisma, M., Bonora, G.M., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C. e Santini, A., *Biopolymers*, **31**, 129 (1991).
42. Geßmann, R., Brückner, H. e Kokkinidis, M., *Acta Crystallogr.*, **B54**, 300 (1998).
43. Geßmann, R., Brückner, H. e Petratos, K., *J. Pept. Sci.*, **9**, 753 (2003).
44. (a) Paterson, Y., Stimson, E.R., Evans, D.J., Leach, S.J. e Scheraga, H.A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982); (b) 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).
45. Karle, I.L. e Balaram, P., *Biochemistry*, **29**, 6747 (1990).

46. (a) Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Santini, A., Crisma, M. e Toniolo, C., in *"Molecular Conformation and Biological Interactions"*, Balaram, P. e Ramaseshan, S. Eds., Indian Academy of Science, Bangalore, pp. 497-502 (1991); (b) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. e Peggion, C., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **60**, 396 (2001).
47. S.-J. Lee, B.-S. Yun, D.-H. Cho, I.-D. Yoo, *J. Antibiot.*, **52**, 998 (1999).
48. Karle, I.L., in *"Membrane Protein Structure"*, White, S.H. Ed., Oxford University Press, Oxford, pp.355-380 (1994).
49. Nair, C.M.K. e Vijayan, M., *J. Indian Inst. Sci.*, **63**, 81 (1981).
50. Duchlohier, H., Molle, G. e Spach, G., *Biochim. Biophys. Acta*, **987**, 133 (1989).
51. Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, H.U., Katz, E., Jung, G. e Boheim, G., *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 108 (1983).
52. Schmitt, H. e Jung, G., *Liebigs Ann. Chem.*, 321 (1985).
53. (a) Sansom, M.S.P., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **55**, 139 (1991); (b) Sansom, M.S.P., *Quart. Rev. Biophys.*, **26**, 365 (1993); (c) Tieleman, D. P., Berendsen, H. J. C. e Sansom, M.S.P., *Biophys. J.*, **80**, 331 (2001).
54. Cafiso, D. S., *Anna. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 141 (1994).
55. (a) Woolley, G. A. e Wallace, B. A., *J. Membr. Biol.*, **129**, 109 (1992); (b) Woolley, G. A. e Wallace, B. A., *Biochemistry*, **32**, 9819 (1993).
56. Fox, R.O. e Richards, F.M., *Nature*, **300**, 325 (1982).
57. Karle, I.L., Flippen-Anderson, J.L., Agarwalla, S. e Balaram, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5307 (1991).
58. Di Blasio, B., Pavone, V., Saviano, M., Lombardi, A., Nastri, F., Pedone, C., Benedetti, E., Crisma, M., Anzolin, M. e Toniolo C., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6273 (1992).
59. Karle, I.L., Flippen-Anderson, J.L., Agarwalla, S. e Balaram, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5307 (1991).
60. (a) Banerjee, U., Tsui, F. P., Balsubramaniam, T. M., Marshall, G. R. e Chan S. L., *J. Mol. Biol.*, **165**, 757 (1983); (b) Esposito, G., Carver, J.A., Boyd, J. e Campbell, I.D., *Biochemistry*, **26**, 1043 (1987); (c) Chandrasekhar, K., Das, M. K.,

- Kumar, A. e Balaram, P., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 167 (1988); d) Yee, A. A. e O'Neil, J. D., *Biochemistry*, **31**, 3135 (1992); e) Kelsh, L. P., Ellena, J. F. e Cafiso, D. S., *Biochemistry*, **31**, 5136 (1992); f) Yee, A. A., Marat, K. e O'Neil, J.D., *Eur. J. Biochem.*, **243**, 283 (1997).
61. (a) Franklin, J. C., Ellena, J. F., Jayasinghe, S., Kelsh, L. P., e Cafiso, D. S., *Biochemistry*, **33**, 4036 (1994); b) Brachais, L., Mayer, C., Davoust, D. e Molle, G., *J. Pept. Sci.*, **4**, 344 (1998); c) Jayasinghe, S., Ellena, J. F., Franklin, J. C. e Cafiso, D. S., *Biophys. J.*, **74**, 3023 (1998); d) Yee, A. A., Szymczyna, B. e O'Neil, J. D., *Biochemistry*, **38**, 6489 (1999); e) Bak, M., Bywater, R. P., Hohwy, M., Thomsen, J. K., Adelhorst, K., Jakobsen, H. J., Sørensen, O. W. e Nielsen, N. C., *Biophys. J.*, **81**, 1684 (2001).
62. Boheim, G., Hanke, W. e Eibl, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3403 (1980).
63. Rizzo, V., Stankowski, S. e Schwarz, G., *Biochemistry*, **26**, 2751 (1987).
64. Boheim, G., Hanke, W. e Jung, G., *Biophys. Struct. Mechanism*, **9**, 181 (1983).
65. Archer, S.J. e Cafiso, D.S., *Biophys. J.*, **60**, 380 (1991).
66. Archer, S.J., Ellena, J.F. e Cafiso, D.S. *Biophys. J.*, **60**, 389 (1991).
67. Barranger-Mathys, M. e Cafiso, D.S., *Biophys. J.*, **67**, 172 (1994).
68. Barranger-Mathys, M. e Cafiso, D.S., *Biochemistry*, **35**, 498 (1996).
69. Vogel, H., Nilsson, L., Rigler, R., Meder, S., Boheim, G., Beck, W., Kurt, H. e Jung, G., *Eur. J. Biochem.*, **212**, 305 (1993).
70. Toniolo, C., Peggion, C., Crisma, M., Formaggio, F., Shui, X. e Eggleston, D.S., *Nature: Struct. Biol.*, **1**, 908 (1994).
71. Epand, R.M., Shai, Y., Segrest, J.P. e Anantharamaiah, G.M., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **37**, 319 (1995).
72. Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P. e Millhauser, G.L., *Biopolymers*, **50**, 239 (1999).
73. Toniolo, C., Valente, E., Formaggio, F., Crisma, M., Pilloni, G., Corvaja, C., Toffoletti, A., Martinez, G.V., Hanson, M.P., Millhauser, G.L., George, C. e Flippen-Anderson, J.L., *J. Pept. Sci.*, **1**, 45 (1995).

74. Smythe, M.L., Nakaie, C.R. e Marshall, G.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10555 (1996).
75. Hanson, P., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7618 (1996).
76. Flippen-Anderson, J.L., George, C., Valle, G., Valente, E., Bianco, A., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **47**, 231 (1996).
77. Hanson, P., Martinez, G., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Vita, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 271 (1996).
78. Crisma, M., Bianco, A., Formaggio, F., Toniolo, C. e Kamphuis, J., *Lett. Pept. Sci.*, **2**, 187 (1995).
79. Hanson, P., Martinez, G., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Vita, C., *Mol. Phys.*, **95**, 957 (1998).
80. Epand, R.F., Epand, R.M., Monaco, V., Stoia, S., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1021 (1999).
81. (a) Mazzuca, C., Stella, L., Venanzi, M., Formaggio, F., Toniolo, C. e Pispisa, B., *Biophys. J.*, **88**, 3411 (2005); (b) Stella, L., Mazzuca, C., Venanzi, M., Palleschi, A., Didonè, M., Formaggio, F., Toniolo, C. e Pispisa, B., *Biophys. J.*, **86**, 936 (2004).
82. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Monaco, V., Goulard, C., Rebuffat, S. e Bodo, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4952 (1996).
83. Locardi, E., *Tesi di Laurea*, Dipartimento di Chimica Organica, Università di Padova, Anno Accademico 1994/1995.
84. Formaggio, F., Peggion, C., Crisma, M., Toniolo, C., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, 1372 (2001).
85. Eggleston, D.S., Shui, X., Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C. in "*Peptides: Chemistry, Structure and Biology*", P.T.P. Kaumaya e R.S. Hodges ed., Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, England, pp. 436-437 (1996).
86. Epand, R.F., Epand, R.M., Formaggio, F., Crisma, M., Wu, H., Lehrer, R. e Toniolo, C., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 703 (2001).

87. Monaco, V., Locardi, E., Formaggio, F., Crisma, M., Mammi, S., Peggion, E., Toniolo, C., Rebuffat, S. e Bodo, B., *J. Pept. Res.*, **52**, 261 (1998).
88. Locardi, E., Mammi, S., Peggion, E., Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Bodo, B., Rebuffat, S., Kamphuis, J. e Broxterman, Q.B., *J. Pept. Sci.*, **4**, 389 (1998).
89. Getahun, Z., Huang, C.-Y., Wang T., De Leòn, B., DeGrado, W. F. e Gai, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 405 (2003).
90. Huang, C.-Y., Wang, T. e Gai, F., *Chem. Phys. Lett.*, **371**, 731 (2003).
91. Tucker, M. J., Getahun, Z., Nanda, V., DeGrado, W. F. e Gai, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5078 (2004).
92. Schultz, K. C., Supekova, L., Ryu, Y., Xie, J., Perera, R. e Schultz, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13984 (2006).
93. Mukherjee, S., Chowdhury, P., DeGrado, W. F. e Gai, F., *Langmuir*, **23**, 11174 (2007).
94. (a) Suydam, I. T., Snow, C. D., Pande, V. S. e Boxer, S. G., *Science*, **313**, 200 (2006) ; (b) Webb, L. J. e Boxer S. G., *Biochemistry*, **47**, 1588 (2008).
95. (a) Lindquist, B. A. e Corcelli, S. A., *J. Phys. Chem. B*, **112**, 6301 (2008); (b) Lindquist, B. A., Furse, K. E. e Corcelli, S. A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 8119 (2009).
96. Fang, C., Bauman, J. D., Das, K., Remorino, A., Arnold, E. e Hochstrasser R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1472 (2008).
97. Ghosh, A., Remorino, A., Tucker, M. J. e Hochstrasser R. M., *Chem. Phys. Lett.*, **469**, 325 (2009).
98. Taskent-Sezgin, H., Chung, J., Patsalo, V., Miyake-Stoner, S. J., Miller, A. M., Brewer, S. H., Mehl, R. A., Green, D. F., Raleigh, D. P. e Carrico, I., *Biochemistry*, **48**, 9040 (2009).
99. Aschaffenburg, D. J. e Moog, R. S., *J. Phys. Chem. B*, **113**, 12736 (2009)
100. Tang, J., Yin, H., Qiu, J., Tucker, M. J., DeGrado, W. F. e Gai, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3816 (2009).
101. Still, W.C., Khan, M. e Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978).

102. Voelter et al., *Tetrahedron*, **28**, 5963 (1972).
103. Warner, V.D., Warner, A.M., Vasselli, J.R., Decke, E., Pi-Sunyer, F.X. e Woods, S.C., *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1186 (1973).
104. Oki, K., Suzuki, K., Tuchia, S., Saito, T. e Kotake, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 2554 (1970).
105. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).
106. Bellamy, M., in *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London (1956).
107. Palumbo, M., Da Rin, S., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *Makromol. Chem.*, **177**, 1477 (1976).
108. Bonora, G. M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R. R. e Stevens, E. S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 179 (1984).
109. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
110. Wüthrich, K., *NMR of Protein and Nucleic Acids*, Wiley, New York (1986).
111. Manning, M. C. e Woody, R.W., *Biopolymers*, **31**, 569 (1991).
112. Toniolo, C., Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M. e Kamphuis, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2744 (1996).
113. Wallimann, P., Kennedy, R. J. e Kemp, D. S., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 1290 (1999).
114. Sreerama, N. e Woody, R. W., Circular dichroism of peptides and proteins. In: *Circular dichroism: principles and applications*. Berova, N., Nakanishi K. e Woody R. W., eds., Wiley, New York, 2000, pp 601-620.