



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

Dipartimento di Scienze Chimiche

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA

**SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E STUDI CONFORMAZIONALI
DELLA TILOPEPTINA B,
UN PEPTIDE NATURALE ATTIVO SULLE MEMBRANE BIOLOGICHE**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Controrelatore: Prof. Stefano Mammi

Laureanda: Claudia Poloni

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>	9
1.3.1. <i>Alameticina come modello</i>	10
1.3.2. <i>Peptaibolici a “corta” e “media” sequenza</i>	14
1.4. <i>Scopo della Tesi</i>	15
2. PARTE SPERIMENTALE	17
2.1. <i>Materiali e metodi</i>	17
2.1.1. <i>Reagenti e solventi</i>	17
2.1.2. <i>Strumentazione e metodi</i>	18
2.2. <i>Sintesi in soluzione e caratterizzazione</i>	25
2.2.1. <i>Sintesi di derivati di amminoacidi</i>	25
2.2.2. <i>Sintesi dei frammenti</i>	28
2.2.3. <i>Reazioni di condensazione</i>	38
2.2.4. <i>Prova di sblocco del peptide ottenuto in soluzione</i>	41
2.3. <i>Sintesi su fase solida e caratterizzazione</i>	41
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	43
3.1. <i>Sintesi dei peptidi</i>	43
3.1.1. <i>Strategia di sintesi in soluzione</i>	43
3.1.2. <i>Strategia di sintesi in fase solida</i>	46
3.1.3. <i>Gruppi protettori utilizzati nella sintesi in soluzione</i>	49
3.1.4. <i>Gruppi protettori utilizzati in sintesi su fase solida</i>	51
3.1.5. <i>Metodi di attivazione</i>	53

3.1.5. <i>Metodiche di caratterizzazione</i>	56
3.2. <i>Indagini conformazionali</i>	58
3.2.1. <i>Assorbimento IR</i>	58
3.2.2. <i>Spettrometria NMR</i>	66
3.2.3. <i>Dicroismo circolare</i>	72
3.3. <i>Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali</i>	75
4. <i>CONCLUSIONI</i>	79
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	80

ABBREVIAZIONI

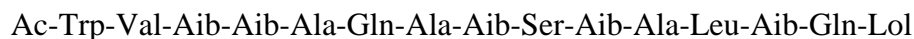
Ac	= acetile
(Ac) ₂ O	= anidride acetica
AcOEt	= acetato di etile
Aib	= acido α -amminoisobutirrico
Boc	= <i>terz</i> -butossicarbonile
(Boc) ₂ O	= di- <i>terz</i> -butil dicarbonato
Bzl	= benzile
CD	= dicroismo circolare
CDCl ₃	= deuterocloroformio
Ch	= colesterolo
CHCl ₃	= cloroformio
CH ₂ Cl ₂	= diclorometano
CH ₃ CN	= acetoneitrile
CF	= carbossifluoresceina
DCM	= diclorometano
DCHA	= dicicloesilammonio
DEA	= dietilammina
DIPEA	= N,N-diisopropiletilammina
DMF	= dimetilformamide
DMSO	= dimetilsolfossido
EDC	= N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide
EP	= etere di petrolio
PC	= fosfatidilcolina
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
Gln	= glutammica
Glu(OMe)	= acido glutammico metil-estere
HATU	= O-(azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
Hepes	= acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico
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
Iva	= isovalina
Lipo	= lipoico
Lol	= leucinolo
CH ₃ CN	= acetonitrile
MeOH	= metanolo
NMM	= N-metilmorfolina
NMP	= N-metilpirrolidone
NMR	= risonanza magnetica nucleare
NOESY	= spettroscopia di correlazione dipolare
OMe	= metossi
OSu	= 1-ossi-succinimmide
Pro	= prolina
R _f	= fattore di ritenzione
ROESY	= spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
SUV	= vescicole unilamellari piccole
Spps	= <i>solid phase peptide synthesis</i>
SUV	= <i>small unilamellar vesicles</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>)
Tos	= p-toluensolfonile (tosile)
Triton X-100	= polietilenglicole terzocetilfeniletere
Trt	= trifenilmetile (tritile)
UV-Vis	= spettroscopia di assorbimento ultravioletto-visibile

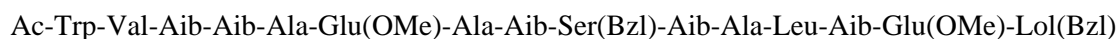
N.B: Nel testo gli amminoacidi chirali si intendono di configurazione L (S) qualora questa non venga specificata.

RIASSUNTO

La presente Tesi si inserisce in una linea di ricerca che mira a comprendere come si esplichi l'attività antibiotica dei peptaibolici. Mediante il lavoro qui riportato sono state individuate strategie adeguate ad effettuare la sintesi chimica della tilopeptina B, di sequenza:



In particolare, essa è stata preparata mediante sintesi su fase solida, mentre con i metodi tradizionali della sintesi in soluzione è stato preparato il suo analogo



Sui due peptidi e alcune loro sequenze corte sono stati condotti studi conformazionali in soluzione (mediante assorbimento IR, NMR e CD). Ne è emerso che i peptidi esaminati assumono in prevalenza conformazioni α -elicoidali molto stabili, in quanto poco influenzate dal solvente.

Studi preliminari di interazione con membrane modello, vescicole formate da fosfatidilcolina e colesterolo, hanno evidenziato una discreta abilità della tilopeptina B e del suo analogo di permeare i doppi strati fosfolipidici.

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 comprendere come si esplichino l'attività antibiotica dei peptaibolici.

Recentemente è stato isolato un nuovo antibiotico peptaibolico, la tilopeptina B (Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol) che, con i suoi 15 residui, si inserisce nel gruppo di antibiotici peptaibolici a "media" lunghezza. Questa caratteristica ha suscitato interesse in quanto si hanno veramente poche informazioni sul meccanismo di interazione di questi peptidi con le membrane. In questo Laboratorio, infatti, sono stati sintetizzati finora peptaibolici a "corta" e "lunga" sequenza e si è visto che presentano meccanismi diversi d'interazione con le membrane, pur portando in entrambi i casi alla permeazione del doppio strato fosfolipidico.

Con questa Tesi ci si è proposti di individuare una strategia adeguata ad effettuare la sintesi per via chimica della tilopeptina B, sia utilizzando metodi tradizionali in soluzione, sia i più veloci metodi su fase solida. Inoltre, si è voluto iniziare uno studio delle sue proprietà conformazionali, correlabili all'attività biologica.

Per meglio comprendere l'argomento di questa Tesi, nelle sezioni che seguono si forniranno alcune nozioni di base sugli antibiotici peptaibolici. Inoltre, poiché essi sono caratterizzati dalla presenza dell'amminoacido Aib (acido α -amminoisobutirrico) si daranno alcune informazioni di tipo stereochimico su tale amminoacido. Infine, si riassumerà quanto noto sui meccanismi d'azione dei peptaibolici N-acetilati, alla cui classe appartiene anche la tilopeptina.

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.

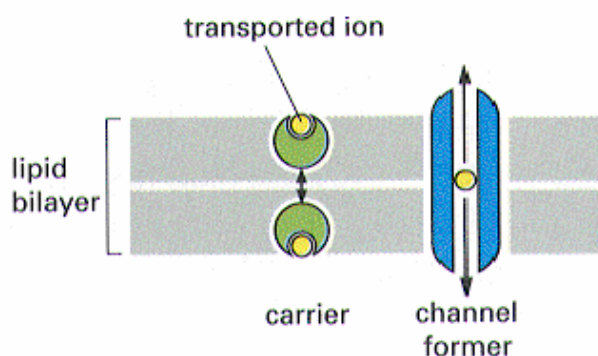


Figura 1.1 Meccanismi di azione degli ionofori: *carrier* (sinistra) e *channel former* (destra).

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.

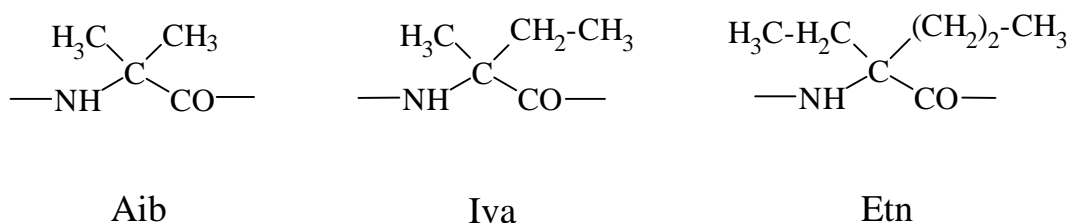


Figura 1.3 Amminoacidi C^α-tetrasostituiti presenti nelle sequenze degli antibiotici peptaibolici.

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] tricodocenine 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] È 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 aminoacido 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, aminoacidi 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.

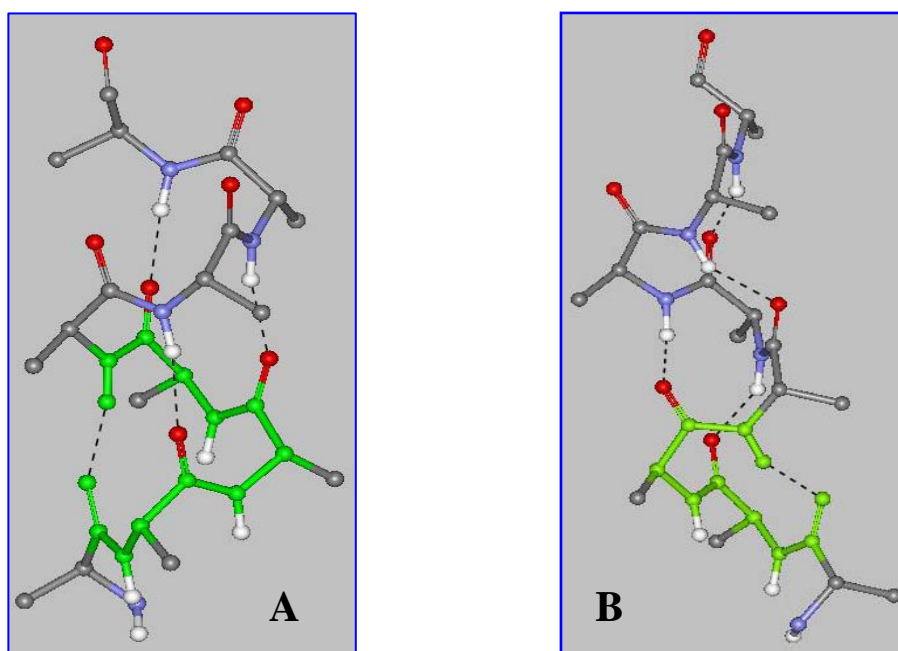


Figura 1.4 Elica- α destrogira (A) e elica- 3_{10} destrogira (B).

L' α -elica è caratterizzata da 3.63 residui di aminoacido 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- C_{13} 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]

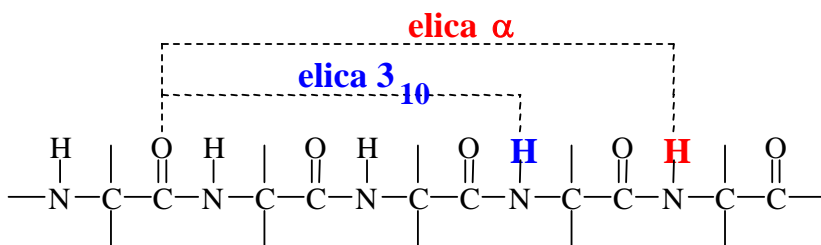


Figura 1.5 Legami a idrogeno *intramolecolari* nei due tipi di eliche (α e 3_{10}).

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 destrorse di tipo 3_{10} e α .^[27]

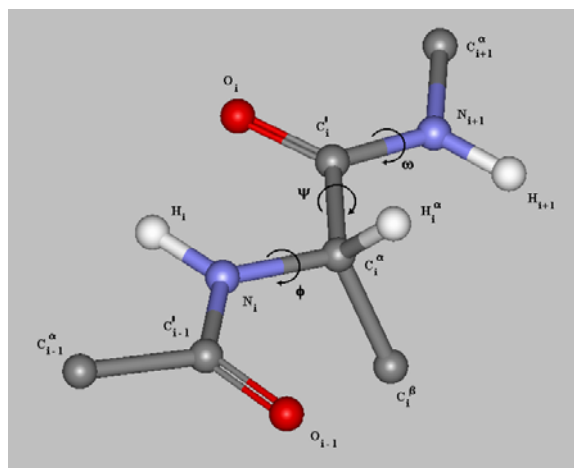


Figura 1.6 Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ($\phi_i = \psi_i = \omega_i = 180^\circ$) e il residuo centrale è in configurazione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

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]

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.

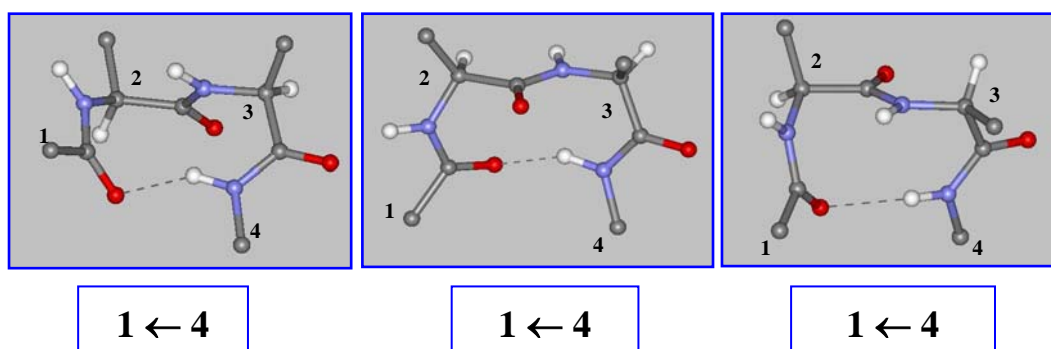


Figura 1.7 Rappresentazione dei tre ripiegamenti- β ideali (I, II, III) aventi il legame peptidico centrale *trans*.

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 omo-tripeptidi N-protetti formano una struttura- C_{10} di tipo III (o III'), indipendentemente dalla natura dei gruppi terminali.

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*BrBz-(Aib)₁₀-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]

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

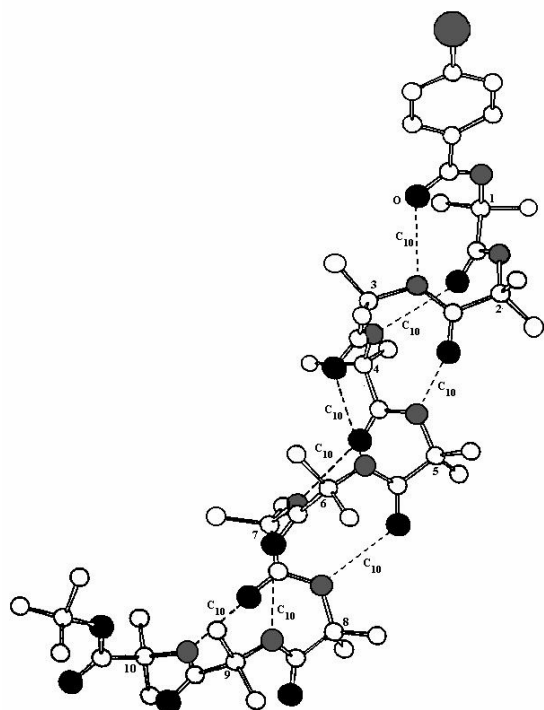


Figura 1.8 Struttura ai raggi X di *p*BrBz-(Aib)₁₀-OtBu. I legami a idrogeno sono indicati da linee tratteggiate.^[40,41]

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 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- 3_{10} .

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

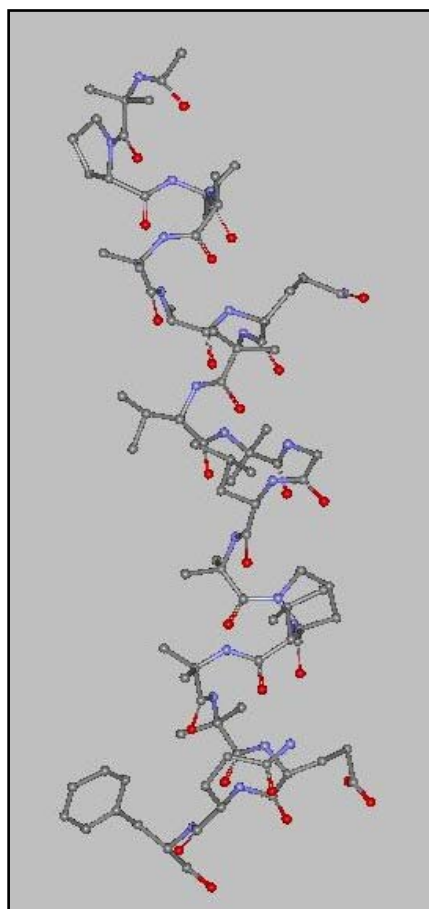


Figura 1.9 Struttura cristallina dell'alameticina F-30/I.^[56]

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.

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-, ¹³C- e ¹⁵N-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).

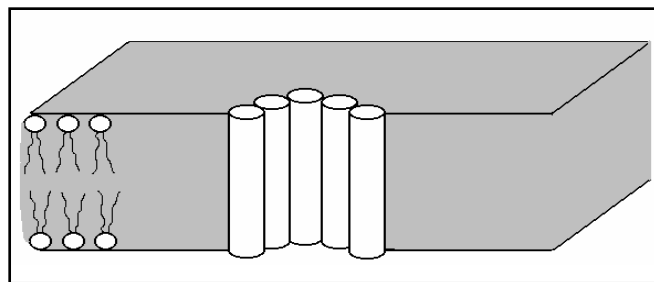


Figura 1.10 Modello “a doghe di botte” per la formazione di canali nelle membrane cellulari da parte di molecole elicoidali di alameticina.

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 peptaibolici, 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).

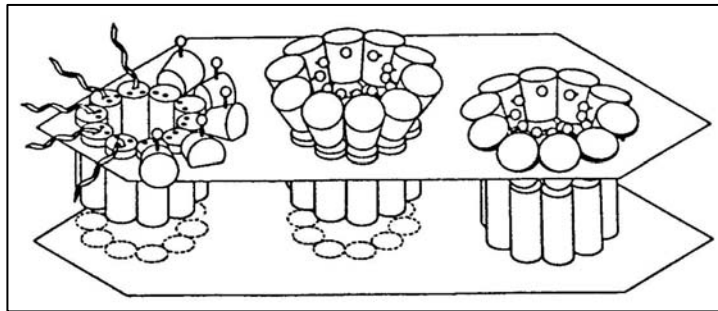


Figura 1.11 Modello d'azione per l'alameticina proposto da Fox e Richards:^[56] in presenza di voltaggio transmembrana le singole eliche si raddrizzano e il cilindro (poro) così formatosi si infila nel doppio strato fosfolipidico.

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.

1.3.2 Peptaibolici a “corta” e “media” sequenza

Sebbene siano stati compiuti numerosi studi e avanzate ipotesi sul meccanismo di azione di peptaibolici N-acetilati a sequenza “lunga”, minore attenzione è stata rivolta ai membri della famiglia a sequenza “intermedia” e “corta”. Questi, infatti, non sono in grado di attraversare da parte a parte la membrana lipidica e quindi occorre invocare un modello di azione diverso da quello già descritto per i peptaibolici più lunghi.

E' stato recentemente verificato che anche peptaibolici corti, come arzianine, tricolorovine e tricolorozine ^[70-73], sono in grado di formare pori voltaggio-dipendenti in modo analogo all'alameticina. Poiché si può escludere che questi peptidi siano in grado di trapassare la membrana allo stato monomero, è stato proposto da Menestrina et al. ^[74] e da Sansom ^[53a] che due eliche peptidiche possano dimerizzare testa-coda attraverso forze di van der Waals e legami a idrogeno *intramolecolari* in modo da originare eliche sufficientemente lunghe da passare la membrana da parte a parte.

Sui peptaibolici a “media” lunghezza poco è noto. In particolare, non vi sono studi conformazionali né sono stati avanzati modelli di interazione con le membrane per le tilopeptine, peptaibolici isolati nel 1999 dal fungo *Tylopilus neofellus*.^[75] Le loro sequenze sono:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Tilopeptina A: Ac-Trp-Val-Aib-D-Iva-Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol

Tilopeptina B: Ac-Trp-Val-Aib---Aib--Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol

Nel 2007 si è scoperto che la tilopeptina viene prodotta in realtà dal fungo ascomiceta *Sepedonium chalcipori*. Pertanto, il fungo *Tylopilus neofellus*, da cui erano state isolate le tilopeptine, era stato probabilmente infettato dal *Sepedonium chalcipori*. E' noto infatti che il genere *Sepedonium* è capace di infettare il corpo fruttoso del *Tylopilus neofellus* portando alla necrosi totale.^[76]

La tilopeptina esibisce una blanda attività antimicrobica nei confronti di alcuni batteri Gram-positivi, ma è inattiva nei confronti di funghi patogeni o batteri Gram-negativi. A parte questi due lavori citati,^[75,76] null'altro era noto sulle tilopeptine al momento in cui si è iniziata questa Tesi riguardante la sintesi e gli studi conformazionali della tilopeptina B. Tuttavia, a poche settimane dalla conclusione del lavoro di Tesi è apparso un articolo in cui si riporta la sintesi su fase solida della tilopeptina A.^[77]

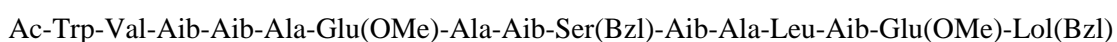
1.4 Scopo della Tesi

Come discusso nel precedente paragrafo, la capacità dei peptaibolici di perturbare i doppi strati fosfolipidici rende questi composti di origine naturale particolarmente interessanti per lo sviluppo di nuovi antibiotici e inoltre permette di comprendere maggiormente le interazioni peptide/membrana. Come obiettivo primario di questa Tesi, ci si propone quindi la sintesi del peptaibolico tilopeptina B, di sequenza



sia mediante la strategia di sintesi su fase solida che la classica sintesi in soluzione. Il primo approccio, ossia la sintesi su fase solida, permette di ottenere rapidamente un peptide, ma presenta spesso rese modeste o insoddisfacenti quando sono presenti amminoacidi stericamente impediti come l'Aib. Tuttavia, sfruttando l'esperienza acquisita da questo Laboratorio con l'Aib, si ritiene di poter affrontare e portare a termine tale sintesi. Come già ricordato nella sezione precedente, mentre questo lavoro di Tesi era nelle sue fasi conclusive è stata pubblicata la sintesi su fase solida della tilopeptina A, che differisce dalla B solo per avere un residuo di D-Iva al posto di un Aib in posizione 4.^[77]

Mediante strategie di sintesi in soluzione, invece, ci si propone di mettere a punto una strategia sintetica versatile per l'analogo della tilopeptina B:



Tale peptide può essere convertito nella tilopeptina B attraverso uno stadio di idrogenazione catalitica, che permette la rimozione dei gruppi protettori benzilici, e uno di ammonolisi, che converte i residui di Glu(OMe) in Gln.

In un precedente lavoro di Tesi^[78] si è osservato che l'analogo [Glu(OMe)^{7,18,19}] alameticina F50 mantiene in soluzione la stessa conformazione dell'alameticina F50. Anche alcuni test di interazione con cellule e membrane hanno dato risultati comparabili per i due peptidi. Pertanto, pure nel caso della tilopeptina si pensa di studiare l'analogo contenente Glu(OMe). L'approccio che si intende seguire, e cioè la sintesi per condensazione di segmenti, dovrebbe consentire di realizzare analoghi contenenti una varietà di gruppi (ad es. fluorofori, gruppi redox, radicali liberi, sonde NMR), adatti a studiare la tilopeptina (conformazione, meccanismo d'azione e interazione con le membrane) mediante una vasta gamma di tecniche spettroscopiche.

In questo lavoro di Tesi ci si propone anche di eseguire studi conformazionali in soluzione (mediante assorbimento IR, NMR, CD) sui peptidi sintetizzati e di indagarne la capacità di alterare la permeabilità delle membrane lipidiche a doppio strato attraverso saggi con vescicole.

Come logico sviluppo di tali studi, ci si aspetta di poter progettare in futuro nuovi antibiotici peptidici ad attività controllata e selettiva.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Materiali e metodi

2.1.1 Reagenti e solventi

Acros-Janssen (Geel, Belgio): acido α -aminoisobutirrico, alcol benzilico, acido trifluoroacetico, triisopropilsilano(TIS) (99%), L-triptofano, L-leucina, 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo, cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato, diossano, metanolo per spettroscopia, 2,2,2-trifluoroetano per spettroscopia, anidride acetica, THF, N-N-diisopropiletilamina.

Alltech (Deerfield, USA): isopropanolo.

Aldrich Chem. Co. (Winston, USA): acido p-toluensolfonico, etilcloroformiato, benzil bromuro, sodio idruo 60%, metanolo deuterato, Hepes, di-ter-butil dicarbonato.

Artiglass (Due Carrare, Padova): idrossido di potassio.

Bachem (Bubendorf, Svizzera): Boc-Glu(OMe)-OH DCHA, Boc-Ser(Bzl)-OH.

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), acetonitrile per HPLC, idrossido di sodio, ipoclorito di sodio, metanolo, solfato di sodio anidro, toluene, trietilammina.

PE Biosystems (Warrington, Regno Unito): O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato.

Fluka (Buchs, Svizzera): acetonitrile, dimetilformammide anidro, acido trifluoroacetico per HPLC (>99,5%), THF anidro, metanolo anidro, ninidrina, litio boro idruo, Fmoc-Osu, dietilamina, N-metilmorfolina, Triton X-100, catalizzatore 10% Pd(C), sodiododecilsolfato, N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano.

GLS (Shanghai): 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, HATU.

Iris Biotech (Marktredwitz, Germania): N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato, L-Leucinolo-2-clorotritil resina.

Merck (Darmstadt, Germania): gel di silice per cromatografia "flash", SICAPENT con indicatore.

Novabiochem (Svizzera): Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH.

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-butanol/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 e il reattivo alla ninidrina per i gruppi amminici primari.

Flash cromatografia

La "cromatografia flash"^[79] 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 della permeabilità di membrane lipidiche 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 fluire 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 compresi 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.

HPLC

Le analisi HPLC sono state effettuate impiegando due cromatografi:

- 1- il cromatografo Hewlett Packard, serie 1050, dotato di camera per degasare i solventi; autocampionatore Hewlett Packard, serie 1050; rivelatore Hewlett Packard, serie 1050 operante a 215 nm; integratore Shimadzu C-R6A Chromatopac. E' stata utilizzata la colonna analitica a fase inversa C_{18} 218TP104 (250 \times 4.6 mm, flusso di 1.5 mL/min, 10 μ m di diametro) della Vydac.
- 2- il cromatografo Dionex, serie P680, dotato di camera per degasare i solventi; autocampionatore Dionex, serie ASI-100; rivelatore Dionex, Softron GmbH operante a 215 nm; interfacciato ad un computer. E' stata utilizzata la colonna analitica a fase inversa C_{18} 218TP104 (250 \times 4.6 mm, flusso di 1.5 mL/min, 10 μ m di diametro) della Vydac.

Come eluente si è fatto uso di una miscela dei seguenti solventi:

A: H₂O-TFA 0.1% v/v.

B: CH₃CN90%-H₂O10%-TFA 0.1% v/v/v.

La purificazione del prodotto ottenuto su fase solida è stata effettuata mediante HPLC preparativa utilizzando lo strumento Shimadzu serie LC-8A, dotato di sistema di controllo Shimadzu serie SCL-6B, di detector spettrofotometrico Shimadzu SPD-6A e registratore Perkin Elmer serie 561 a 230 nm. La colonna utilizzata è una C₁₈ (250 × 22 mm, flusso di 15 mL/min, particelle da 10 μm di diametro) della Vydac.

Come eluente si è fatto uso di una miscela dei seguenti solventi:

A: H₂O- TFA 0.05% v/v.

B: CH₃CN 90%-H₂O 10%-TFA 0.05% v/v/v.

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 × cm² × dmol⁻¹):

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

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.

Spettroscopia ultravioletta

Gli spettri di assorbimento UV sono stati acquisiti con uno spettrofotometro Shimadzu interfacciato con un computer. Sono state utilizzate delle celle in quarzo con cammino ottico di 1.0cm. Questa spettroscopia è stata utilizzata per determinare, attraverso la legge di Lambert-Beer, la concentrazione delle soluzioni adoperate poi per gli studi di dicroismo circolare. Si segue l'assorbimento del Trp a 278.4 nm ($\varepsilon=1790$, MeOH).

Spettrometria di massa

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

Spettroscopia di assorbimento IR

Gli spettri di assorbimento 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 deuterocloroformio (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% d_2 ; *Aldrich*) e il dimetilsolfossido (99.96 d_6 , *Acros*) e il metanolo deuterato CD_3OH (99% 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 (doppietto), t (tripletto), dd (doppietto di doppietti) e m (multipletto).

Procedure generali della sintesi su fase solida

Per la sintesi in automatico in fase solida è stato impiegato il sintetizzatore Advanced ChemTech 348 Ω . Lo strumento è costituito essenzialmente da:

- un reattore composto da 396 pozzetti da 2 mL di volume ciascuno, agitato meccanicamente;
- 4 bottiglie di vetro contenenti i solventi di lavaggio e la soluzione di piperidina
- un vassoio di provettoni nei quali vengono introdotte le soluzioni dei reagenti;
- un braccio meccanico supportante un ago e collegato ad una siringa, che trasferisce ai pozzetti i reagenti necessari ad ogni stadio di sintesi.

Sia il reattore che i provettoni e le bottiglie sono protetti da setti di teflon, che vengono bucati dall'ago meccanico solo al momento del trasferimento delle soluzioni.

Il funzionamento dello strumento è controllato da un software attraverso il quale è possibile impostare il protocollo generale di sintesi per l'attacco di un nuovo amminoacido e la matrice specifica da applicare al singolo pozzetto, corrispondente alla sequenza peptidica da far crescere in quella posizione. Si tratta di fornire una serie di comandi relativi alle varie operazioni da eseguire (quantità e sito di prelievo del reagente-solvente, destinazione di trasferimento, tempo di reazione-agitazione, filtrazione delle soluzioni dalla resina), dai quali viene automaticamente

creato un file contenente tutti i passaggi che verranno seguiti dallo strumento nella creazione della sequenza peptidica.

Prima di procedere alla sintesi, è necessario solvatare (rigonfiare) la resina con NMP (almeno 30 minuti) per assicurare un efficace diffusione dei reagenti ai siti attivi della resina.

Una volta rigonfiata la resina, si avvia la sintesi in fase solida applicando il metodo *step by step* che prevede la condensazione successiva di singoli residui. In particolare ogni ciclo di sintesi, che corrisponde all'attacco di un nuovo residuo alla resina, comprende tre passaggi fondamentali:

1. la deprotezione del gruppo Fmoc dalla funzione α -amminica del peptide-resina: sono stati previsti due trattamenti successivi della resina con una soluzione al 20% di piperidina in DMF (rispettivamente 5 e 20 minuti), seguiti da filtrazione della soluzione e lavaggio della resina con NMP per 5 volte.
2. la condensazione del nuovo Fmoc-amminoacido sulla catena peptidica in crescita (reazione di *coupling*): 4 equivalenti di Fmoc-amminoacido (rispetto al numero di siti attivi sulla resina) sono stati sciolti con una soluzione 0.5M di HATU in DMF (4 equivalenti) e, dopo l'aggiunta della soluzione 1M di DIPEA in DMF (8 equivalenti), in alcuni casi, la reazione di acilazione è stata condotta per 45 minuti. I reagenti in eccesso ed i sottoprodotti sono stati rimossi per filtrazione e la resina è stata lavata più volte prima di ripetere lo step 1. Se la reazione coinvolge un amminoacido Aib, viene effettuato un doppio *coupling*. E nel caso particolare di condensazione di Aib su Aib il tempo di *coupling* viene raddoppiato.
3. dopo l'ultimo step di *coupling*, il peptide-resina subisce un lavaggio finale con DCM, l'asciugatura sotto corrente d'azoto e l'essiccazione sotto vuoto.

La resina utilizzata per la sintesi del peptide è la resina 2-cloro-tritile, già funzionalizzata con l'amminoalcol C-terminale, H-Lol. La resina presenta un grado di sostituzione (numero di siti attivi per grammo di resina) di 0.45mmoli/ g. Le sintesi sono state condotte su scala 0.05-0.06 mmol di siti attivi di resina.

La procedura di sblocco del peptide dalla resina dipende dal tipo di resina utilizzata. Nel caso della resina Cl-tritile, il peptide viene rimosso per trattamento con una soluzione di HFIP 30% / DCM 70% (1mL ogni 20mg di resina). La soluzione viene agitata su Vortex per 90 minuti.

2.2 Sintesi in soluzione e caratterizzazione

Oltre ai prodotti di seguito descritti si sono utilizzati altri derivati di amminoacidi già precedentemente sintetizzati nel nostro laboratorio:

- Boc-Ala-OH,
- Boc-Val-OH.

2.2.1 Sintesi di derivati di amminoacidi

Boc-Aib-OH ^[80]

Si sciolgono 20.59g di H-Aib-OH (0.2mol) in 50 mL di NaOH 4M. Si aggiungono 50 mL di diossano e si porta la soluzione a 0°C. Si aggiungono 16.00g di (Boc)₂O (0.07mol) e si lascia in agitazione a 45°C, controllando che il pH rimanga 10. Si aggiungono altre due porzioni di (Boc)₂O (16.00g, 0.07mol) dopo 8 e 16 ore. Dopo due giorni si evapora il diossano a pressione ridotta e si estrae il (Boc)₂O che non ha reagito con Et₂O. Si acidifica a pH3 con KHSO₄ solido e si estrae con AcOEt (2x50mL). Gli estratti organici riuniti vengono lavati con acqua. Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt-etero di petrolio.

Resa: 49%.

Punto di fusione: 120-122°C.

Rf₁: 0.90; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.40.

IR(KBr): 3310, 1739, 1660, 1545 cm⁻¹.

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): δ 5.05 [s, 1H, Aib NH], 1.54 [s, 6H, Aib 2 βCH₃], 1.45 [s, 9H, Boc 3 CH₃].

p-Tos-OH•H-Aib-OBzl

Si sciolgono 10.3g di H-Aib-OH (0.1mol), 19.4g di acido p-toluensolfonico (0.1mol) e 41.6 mL di alcol benzilico (0.4mol) in 25 mL di toluene. Si scalda la soluzione a 95°C, portando così a riflusso l'azeotropo toluene-H₂O (T_{eb}:85°C). Si elimina l'acqua utilizzando il sistema Dean-Stark. Dopo 5 ore si diluisce con 50 mL di etere etilico e si filtra il precipitato formatosi. Si pulisce il precipitato con etere etilico. Si purifica ricristallizzando il prodotto da MeOH-Et₂O.

Resa: 88%.

Punto di fusione: 150-153°C.

Rf₁: 0.15; **Rf₂:** 0.70; **Rf₃:** 0.30.

IR(KBr): 3430, 1748, 1612, 1545 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.36 [s, 2H, Aib NH₂], 7.73 [d, 2H, Tos 2CH arom], 7.28 [m, 5H, Bzl 5CH arom], 7.09 [d, 2H, Tos 2CH arom], 5.11 [s, 2H, Bzl CH₂], 2.32 [s, 3H, Tos CH₃], 1.53 [s, 6H, Aib 2βCH₃].

Fmoc-Trp-OH ^[81]

Ad una sospensione di H-Trp-OH (2.25 g, 11mmol) in 50 ml di acqua, si aggiungono 1.54mL di TEA(11mmol). Si aggiungono 3.37 g (10mmol) di Fmoc-OSu sciolti in 25 ml di CH₃CN e si lascia sotto agitazione dopo aver regolato il pH a 8-9. Dopo un giorno si evapora CH₃CN a pressione ridotta e si porta la soluzione acquosa a pH 8 con TEA. Si estrae con poco Et₂O Fmoc-OSu che non ha reagito. Si acidifica a pH 2 con KHSO₄ solido e si estrae Fmoc-Trp-OH più volte con AcOEt (3x50mL). Gli estratti organici riuniti vengono lavati con acqua. Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt-etere di petrolio.

Resa: 90%.

Punto di fusione: 164-166 °C.

Rf₁: 0.65; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.20.

[α]²⁰_D = -27.8° (c=1, DMF).

IR (KBr): 3407, 3388, 3328, 1693, 1537 cm⁻¹.

$^1\text{H NMR}$ (250MHz,DMSO): δ 10.85 [s, 1H, Trp NH indolo], 7.89-7.20 [m, 11H, Trp 2CH indolico, Fmoc 8CH fluorenilico, Trp NH₂] 7.17 [s, 1H, Trp 1CH indolico], 7.07-6.97 [2t, 2H, Trp 2CH indolico], 4.18-4.01 [m, 4H, Trp α CH, Fmoc CH-9, Fmoc CH₂], 4.20 [dd, 1H, Trp β CH], 3.01 [dd, 1H, Trp β CH].

Boc-Leu-OH ^[82]

Si sciolgono 12.00g di H-Leu-OH (0.09mol) in 80 mL di H₂O. Si aggiungono 12.8 mL di TEA. A parte si sciolgono 28.00g di (Boc)₂O (0.12mol) in CH₃CN e si aggiunge questa soluzione a quella acquosa. Dopo un giorno si evapora CH₃CN a pressione ridotta. Si acidifica a pH3 con KHSO₄ solido e si estrae con AcOEt (2x150mL). Gli estratti organici riuniti vengono lavati con acqua (300mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto è un olio.

Resa: 96%.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.40.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -27.0^\circ$ (c=1, CH₃COOH).

IR(KBr): 3327, 1718, 1513 cm⁻¹.

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl₃): δ 4.91[s, 1H, Leu NH], 4.31 [m, 1H, Leu α CH], 1.83-1.50 [m, 3H, Leu β CH₂, γ CH], 1.45 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 0.95 [m, 6H, Leu 2 δ CH₃].

Boc-Lol ^[83]

Ad una soluzione di Boc-Leu-OH (8.53g, 37.00 mmol) in THF anidro si aggiungono, a -10°C, 4,06mL di NMM (37.00 mmol) e 3.53mL di etilcloroformiato (37.00 mmol).Dopo 30 minuti si aggiungono 75mL di una soluzione 2M di LiBH₄ in THF (150mmol). Si aggiungono circa 530mL di MeOH in 30 minuti e si attendono 3 ore. Si neutralizza la soluzione con HCl 1M e si evapora il solvente organico a pressione ridotta. Si riprende con CH₂Cl₂ e si lava con H₂O. Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Si purifica mediante cromatografia flash (eluente MeOH 3% in CH₂Cl₂).

Resa: 80%.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.50.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -25.1^\circ$ (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3337, 1687, 1525 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, DMSO): δ 6.40 [d, 1H, Lol NH], 4.54 [t, 1H, Lol OH], 3.45 [m, 1H, Lol α CH], 3.34-3.10 [m, 2H, Lol CH₂OH], 1.58 [m, 1H, Lol γ CH], 1.36 [s, 9H, Boc CH₃], 1.22 [m, 2H, Lol β CH₂], 0.86 [d, 3H, Lol δ CH₃], 0.83 [d, 3H, Lol δ CH₃].

Boc-Lol(Bzl) ¹⁸⁴¹

Ad una soluzione di Boc-Lol (4.87g, 22.00mmol) in THF anidro si aggiungono a 0°C e in atmosfera inerte, 1.02g di NaH 60% (25.00mmol). Quando non si nota più reattività, si aggiungono 2.73mL di benzil bromuro (23.00mmol) e 0.8g di N(Bu)₄I (2.30mmol). Dopo un giorno si evapora il solvente organico a pressione ridotta, si riprende con AcOEt e si lava con H₂O. Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Si purifica mediante cromatografia flash (eluente AcOEt 10%, etere di petrolio).

Resa: 68%.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.80.

[α]_D²⁰ = -34.6° (c=1, MeOH).

IR (KBr): 3351, 1712 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, DMSO): δ 7.31 [m, 5H, Bzl CH arom], 6.62 d, [1H, Lol NH], 4.45 [s, 2H, Bzl CH₂], 3.66 [m, 1H, α CH], 3.28 [m, 2H, Lol CH₂OH], 1.59 [m, 1H, Lol γ CH], 1.36 [s, 9H, Boc CH₃], 1.24 [m, 2H, Lol β CH₂], 0.86 [d, 3H, Lol δ CH₃], 0.83 [d, 3H, Lol δ CH₃].

2.2.2 Sintesi dei frammenti

Sintesi del segmento A

Boc-Aib-Aib-OBzl

Si sciolgono nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato 2.40g di Boc-Aib-OH (11.8 mmol) e si aggiungono 1.59g di HOBt (11.8 mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 2.26g di EDC·HCl (11.8 mmol), 1.3 mL di NMM (11.8 mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 2.28g di H-Aib-OBzl (11.8 mmol) [precedentemente ottenuto sospendendo p-Tos-OH·H-Aib-OBzl in AcOEt e eseguendo lavaggi basici con una soluzione di NaHCO₃ al 5%]. Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per sei giorni, controllando che il pH rimanga 8-9. Si evapora il CH₂Cl₂, si

riprende con AcOEt (140mL), si lava con acido citrico 0.5M (4x80mL), H₂O (2x80mL), NaHCO₃ 5% (3x80mL), H₂O (2x80mL). Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt–etere di petrolio.

Resa: 78%.

Punto di fusione: 122-123°C.

Rf₁: 0.90; **Rf₂:** 0.95; **Rf₃:** 0.55.

IR(KBr): 3421, 3308, 1734, 1715, 1699, 1650, 1537 cm⁻¹.

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, OBzl 5 CH benzilico], 7.14 [s, 1H, Aib NH ammidico], 5.15 [s, 2H, OBzl CH₂], 4.84 [s, 1H, Aib NH uretanico], 1.55 [s, 6H, Aib 2 βCH₃], 1.42 [m, 15H, Aib 2 βCH₃, Boc 3 CH₃].

Boc-Val-Aib-Aib-OBzl

Si sciolgono 1.52g di Boc-Val-OH (7mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.95g di HOAt (7 mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 1.34g di EDC·HCl (7 mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 2.75g CF₃COOH·H-Aib-Aib-OBzl (7mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (2.65g, 7mmol)] e 1.3 mL di NMM (11.8 mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per quattro giorni, controllando che il pH rimanga 8-9. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (70mL), si lava con acido citrico 0.5M (4x50mL), H₂O (1x80mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x80mL). Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt–etere di petrolio.

Resa: 68%.

Punto di fusione: 102-104°C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.50.

[α]₂₀^D: -6.9 (c=1, MeOH).

IR(KBr): 3324, 1741, 1686, 1660, 1524 cm⁻¹.

¹H-NMR (250MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, OBzl 5 CH benzilico], 7.20 [s, 1H, Aib NH], 6.33 [s, 1H, Aib NH], 5.13 [s, 2H, OBzl CH₂], 4.91 [d, 1H, Val NH uretanico], 3.76 [m, 1H, Val αCH], 2.11 [m, 1H, Val βCH], 1.69-1.44 [m, 21H, 2 Aib 4CH₃, Boc 3 CH₃], Boc CH₃], 0.96 [d, 3H, Val γCH₃], 0.90 [d, 3H, Val γCH₃].

Fmoc-Trp-Val-Aib-Aib-OBzl

Ad una soluzione di 1.28g di Fmoc-Trp-OH (3mmol) in 5 mL CH₂Cl₂ distillato e 5mL di DMF anidro, si aggiunge una soluzione di 1.13g (3mmol) di CF₃COOH·H-Val-Aib-Aib-OBzl [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (1.44g, 3mmol)] e 0.33 mL di NMM (3mmol). Si aggiungono 0.41g di HOBt (3mmol). Si porta il sistema a 0°C e si aggiungono 0.58g di EDC·HCl (3mmol). Si mantiene il pH 8. Dopo 2 giorni si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (70mL), si lava con acido citrico 0.5M (4x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (4x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt–etere di petrolio.

Resa: 71%.

Punto di fusione: 122-124°C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.40.

[α]₂₀^D: -12.7° (c=1, MeOH).

IR(KBr): 3408, 3302, 1717, 1665, 1641, 1516 cm⁻¹.

¹H-NMR (250MHz, CDCl₃): δ 8.25 [s, 1H, Trp NH indolico], 7.75 [d, 2H, Fmoc 2CH fluorenilico], 7.65 [d, 1H, Trp CH indolico], 7.52 [d, 2H, Fmoc 2CH fluorenilico], 7.50-7.10 [m, 13H, OBzl 5 CH benzilico, Trp 4CH indolico, Fmoc 4CH fluorenilico], 7.08 [s, 1H, Aib NH], 6.37 [s, 1H, Aib NH], 6.26 [d, 1H, Val NH], 5.44 [d, 1H, Trp NH], 5.14 [s, 2H, OBzl CH₂], 4.04 [m, 3H, Fmoc CH₂ e CH-9], 4.18 [t, 1H, αCH], 3.91 [t, 1H, αCH], 3.25 [d, 2H, Trp βCH₂], 2.11 [m, 1H, Val βCH], 1.57-1.39 [m, 12H, 2 Aib 4CH₃], 0.79 [d, 3H, Val γCH₃], 0.73 [d, 3H, Val γCH₃].

Ac-Trp-Val-Aib-Aib-OBzl

Ad una soluzione di 0.3g di Fmoc-Trp-Val-Aib-Aib-OBzl (0.38mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato, si aggiungono 2 mL di una soluzione di DEA al 20% in CH₂Cl₂. Dopo 5 ore si evapora il solvente e si riprende più volte con CH₂Cl₂ per eliminare DEA. Si scioglie nuovamente il prodotto nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.36 mL di anidride acetica (3.8mmol) e 0.32 mL di diisopropiletilammina (1.9mmol). Dopo 5 ore si evapora il solvente e si riprende con toluene per eliminare l'anidride acetica. Si riprende con AcOEt e si lava con H₂O

(1x50mL), acido citrico 0.5M (1x50mL), H₂O (1x50mL). Si tira a secco e si lascia tritare in etere etilico per eliminare il dibenzofulvene.

Resa: 92%.

Punto di fusione: 207-210 °C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.95; **Rf₃:** 0.50.

[α]₂₀^D: -7.1°(c=0.3, DMF).

IR(KBr): 3444, 3310, 3261, 1736, 1668, 1630, 1543, 1518 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, DMSO): δ 10.86 [s,1H, Trp NH indolico], 8.11 [m, 2H, Val NH, Trp NH], 8.01[s, 1H Aib NH], 7.55 [m, 2H, Trp CH indolico, Aib NH], 7.32 [m, 6H, OBzl 5 CH benzilico, Trp CH indolico], 7.15 [s, 1H, Trp CH indolico], 7.04 [t, 1H, Trp CH indolico] , 6.96 [t, 1H, Trp CH indolico], 4.99 [s, 2H, OBzl CH₂], 4.59 [m, 1H, Trp αCH], 3.94 [t, 1H, Val αCH], 3.10-2.89 [m, 2H, Trp βCH₂], 1.99 [m, 1H, Val βCH], 1.77 [s, 3H, Ac CH₃], 1.30 [m, 12H, 2 Aib 4CH₃], 0.86 [m, 6H, Val 2γCH₃].

Sintesi del segmento B

Boc-Ala-Aib-OBzl

Si sciolgono 3.23g di Boc-Ala-OH (17.1 mmol) e si aggiungono 2.31g di HOBt (17.1 mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 3.27g di EDC·HCl (17.1 mmol) e una soluzione di 3.31g di H-Aib-OBzl (17.1 mmol) [precedentemente ottenuto sospendendo p-Tos-OH·H-Aib-OBzl in AcOEt e eseguendo lavaggi basici con una soluzione di NaHCO₃ al 5%] e di 1.88 mL di NMM (17.1mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato. Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per cinque giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (75mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (2x50mL), NaHCO₃ 5% (4x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Si purifica mediante cromatografia flash (eluente AcOEt 25%, n-esano).

Resa: 80%.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.60.

[α]₂₀^D: -34.0° (c=1, MeOH).

IR(KBr): 3318, 1739, 1661, 1522 cm⁻¹.

¹H-NMR (250MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, OBzl 5 CH benzilico], 6.75 [s, 1H, Aib NH], 5.16 [m, 2H, OBzl CH₂], 5.88 [m, 1H, Ala NH], 4.09 [m, 1H, Ala αCH], 1.56 [s, 3H, Aib βCH₃], 1.53 [s, 3H, Aib βCH₃], 1.43 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 1.28 [d, 3H, Ala βCH₃].

Boc-Glu(OMe)-Ala-Aib-OBzl

Si sciolgono 1.31g di Boc-Glu(OMe)-OH (5mmol) [precedentemente ottenuto sospendendo Boc-Glu(OMe)-OH DCHA in AcOEt e eseguendo lavaggi acidi con una soluzione di acido citrico 0.5M] nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 1.15g di HOBt (8mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 1.62g di EDC·HCl (8mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 3.15g CF₃COOH·H-Ala-Aib-OBzl (8mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (3.65g, 8mmol)] e 0.93 mL di NMM (8.5mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per quattro giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (70mL), si lava con acido citrico 0.5M (4x50mL), H₂O (1x80mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x80mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt-etero di petrolio.

Resa: 86%.

Punto di fusione: 107-109 °C.

Rf₁: 0.90; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.45.

[α]₂₀^D: -39.2° (c=1, MeOH).

IR(KBr): 3344, 3315, 3241, 1734, 1687, 1652, 1540, 1525, 1503 cm⁻¹.

¹H-NMR (600MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, OBzl 5 CH benzilico], 6.91 [s, 1H, Aib NH], 6.75 [s, 1H, Ala NH], 5.38[s, 1H, Glu(OMe) NH], 5.14 [s, 2H, OBzl CH₂], 4.41 [t, 1H, Ala αCH], 4.10 [m, 1H, Glu(OMe) αCH], 3.68 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 2.43 [m, 2H, Glu(OMe) γCH₂], 2.09 [m, 1H, Glu(OMe) βCH₂], 1.92 [m, 1H, Glu(OMe) βCH₂], 1.54 [m, 6H, Aib 2 βCH₃], 1.43 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 1.32 [d, 3H, Ala βCH₃].

Boc-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-OBzl

Si sciolgono 0.56g di Boc-Ala-OH (3mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.40g di HOBt (3mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 0.57g di EDC·HCl (3mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 3.15g CF₃COOH·H-

Ala-Aib-OBzl (8mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (1.5g, 8mmol)] e 0.66 mL di NMM (6mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 24 ore, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (50mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (4x50mL), H₂O (1x85mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt-etero di petrolio.

Resa: 80%.

Punto di fusione: 147-148°C.

Rf₁: 0.85; **Rf₂:** 0.80; **Rf₃:** 0.45.

[α]₂₀^D: -48.9° (c=1, MeOH).

IR(KBr): 3400, 3298, 1738, 1718, 1663, 1634, 1526 cm⁻¹.

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.72 [d, 1H, NH], 7.33 [m, 6H, NH, OBzl 5 CH benzilico], 6.94 [s, 1H, NH], 5.14 [s, 2H, OBzl CH₂], 4.99 [s, 1H, Ala NH], 4.45 [m, 1H, αCH], 4.32 [m, 1H, αCH], 3.98 [m, 1H, αCH], 3.71 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 2.48 [m, 2H, Glu(OMe) γCH₂], 2.11 [m, 2H, Glu(OMe) βCH₂], 1.54 [m, 6H, Aib 2 βCH₃], 1.43 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 1.38 [m, 3H, Ala βCH₃], 1.34 [m, 3H, Ala βCH₃].

Sintesi del segmento C

Boc-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Si sciolgono 1.74g di Boc-Glu(OMe)-OH (6.6mmol) [precedentemente ottenuto sospendendo 2.95g di Boc-Glu(OMe)-OH DCHA in AcOEt e eseguendo lavaggi acidi con una soluzione di acido citrico 0.5M] nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.89g di HOBt (6.6mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 1.26g di EDC·HCl (6.6mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 2.05g CF₃COOH·H-Lol(Bzl) (6.4mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (1.98g, 6.4mmol)] e 0.72 mL di NMM (6.6mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 24 ore, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (75mL), si lava con acido citrico 0.5M (5x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (4x50mL), H₂O (1x50mL). Si

anidrifica con Na_2SO_4 , si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt–etere di petrolio.

Resa: 71%.

Punto di fusione: 72-74 °C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.65.

$[\alpha]_{20}^D$: -28.7° (c=1, MeOH).

IR(KBr): 3336, 3300, 1731, 1685, 1649, 1553, 1526 cm^{-1} .

¹H-NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.31 [m, 5H, Bzl 5 CH benzilico], 6.21 [d, 1H, Lol NH], 5.21 [d, 1H, Glu(OMe) NH], 4.50 [m, 2H, Bzl CH_2], 4.16 [m, 1H, Lol αCH], 4.09 [m, 1H, Glu(OMe) αCH], 3.67 [s, 3H, Glu(OMe) OCH_3], 3.44 [m, 2H, Lol $\beta'\text{CH}_2$], 2.43 [m, 2H, Glu(OMe) γCH_2], 2.07 [m, 1H, Glu(OMe) βCH_2], 1.90 [m, 1H, Glu(OMe) βCH_2], 1.58 [m, 3H, Lol 2 βCH_2 , γCH], 1.43 [s, 9H, Boc 3 CH_3], 0.9 [d, 6H, Lol δCH_3].

Boc-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Si sciolgono 0.79g di Boc-Aib-OH (3.9mmol) nella minima quantità di CH_2Cl_2 distillato e si aggiungono 0.52g di HOBt (3.9mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 0.74g di EDC·HCl (3.9mmol) e una soluzione in CH_2Cl_2 distillato di 1.80g $\text{CF}_3\text{COOH}\cdot\text{H}\cdot\text{Glu(OMe)-Lol(Bzl)}$ (3.9mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH_2Cl_2 del corrispondente Boc-derivato (1.75g, 3.9mmol)] e 0.40 mL di NMM (4mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 36 ore, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH_2Cl_2 , si riprende con AcOEt (70mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H_2O (1x50mL), NaHCO_3 5% (4x50mL), H_2O (1x50mL). Si anidrifica con Na_2SO_4 , si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt–etere di petrolio.

Resa: 91%.

Punto di fusione: 98-100°C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.50.

$[\alpha]_{20}^D$: -26.9° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3365, 3308, 1744, 1690, 1650, 1543, 1522 cm^{-1} .

¹H-NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.32 [m, 6H, 1NH, Bzl 5 CH benzilico], 6.80 [m, 1H, 1NH], 4.87 [s, 1H, Aib NH], 4.51 [m, 2H, Bzl CH_2], 4.37 [m, 1H, Lol αCH], 4.18 [m, 1H, Glu(OMe) αCH], 3.68 [s, 3H, Glu(OMe) OCH_3], 3.45 [m, 2H, Lol $\beta'\text{CH}_2$], 2.47

[m, 2H, Glu(OMe) γ CH₂], 2.13 [m, 1H, Glu(OMe) β CH₂], 2.05 [m, 1H, Glu(OMe) β CH₂], 1.55 [m, 3H, Lol β CH₂, γ CH], 1.44 [s, 15H, Boc 3 CH₃, Aib 2 CH₃], 0.89 [d, 6H, Lol δ CH₃].

Boc-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Si sciolgono 0.56g di Boc-Leu-OH (2.4mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.33g di HOAt (2.4mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 0.47g di EDC·HCl (2.4mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 1.33g CF₃COOH·H-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) (2.4mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (1.30g, 2.4mmol)] e 0.27 mL di NMM (2.4mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 3 giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (60mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita da AcOEt–etere di petrolio.

Resa: 74%.

Punto di fusione: 114-115 °C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.45.

[α]₂₀^D: -29.2° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3306, 1741, 1684, 1644, 1521 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 6H, 1NH, Bzl 5 CH benzilico], 6.97 [d, 1H, 1NH], 6.53 [s, 1H, NH], 4.86 [d, 1H, Leu NH], 4.53 [m, 2H, Bzl CH₂], 4.40 [m, 1H, Lol α CH], 4.18 [m, 1H, Glu(OMe) α CH], 3.90 [m, 1H, Leu α CH], 3.65 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 3.49 [m, 1H, Lol β' CH₂], 3.43 [m, 1H, Lol β' CH₂], 2.48-2.18 [m, 3H, Glu(OMe) γ CH₂, Glu(OMe) β CH₂], 2.03 [m, 1H, Glu(OMe) β CH₂], 1.60-1.43 [m, 21H, Lol β CH₂ γ CH, Leu β CH₂ γ CH, Boc 3 CH₃, Aib 2 CH₃], 0.91 [m, 12H, Lol δ CH₃, Leu δ CH₃].

Boc-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Si sciolgono 0.36g di Boc-Ala-OH (1.9mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.26g di HOBt (1.9mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 0.36g di EDC·HCl (1.9mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 1.13g

CF₃COOH·H-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) (1.7mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (1.10g, 1.7mmol)] e 0.21 mL di NMM (1.9mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 24 ore, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (60mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si concentra. Il prodotto precipita AcOEt-etero di petrolio.

Resa: 94%.

Punto di fusione: 60-63°C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.45.

[α]₂₀^D: -33.1° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3311, 1740, 1722, 1646, 1530 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, Bzl 5 CH benzilico], 7.22 [m, 1H, 1NH], 7.10 [s, 1H, 1NH], 6.98 [d, 1H, 1NH], 6.55 [d, 1H, NH], 4.99 [m, 1H, Ala NH], 4.54 [s, 2H, Bzl CH₂], 4.35 [m, 1H, αCH], 4.17 [m, 1H, αCH], 4.03 [m, 1H, αCH], 4.18 [m, 1H, Glu(OMe) αCH], 3.75 [m, 1H, αCH], 3.66 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 3.50 [m, 1H, Lol β'CH₂], 3.42 [m, 1H, Lol β'CH₂], 2.47-2.32 [m, 3H, Glu(OMe) γCH₂, Glu(OMe) βCH₂], 2.10 [m, 1H, Glu(OMe) βCH₂], 1.67-1.26 [m, 24H, Lol βCH₂ γCH, Leu βCH₂ γCH, Boc 3 CH₃, Aib 2 CH₃, Ala CH₃], 0.91 [m, 12H, Lol δCH₃, Leu δCH₃].

Boc-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Si sciolgono 0.32g di Boc-Aib-OH (1.57mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.21g di HOAt (1.57mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 0.30g di EDC·HCl (1.57mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 1.15g CF₃COOH·H-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) (1.57mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (1.13g, 1.57mmol)] e 0.17 mL di NMM (1.57mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 4 giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (50mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄. Il prodotto precipita da AcOEt-etero di petrolio.

Resa: 71%.

Punto di fusione: 70-73°C.

Rf₁: 0.70; **Rf₂:** 0.80; **Rf₃:** 0.35.

[α]₂₀^D: -14.6° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3307, 1740, 1651, 1531 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.38 [d, 1H, 1NH], 7.31 [m, 5H, Bzl 5 CH benzilico], 7.19 [m, 1H, 1NH], 7.15 [m, 1H, 1NH], 7.09 [d, 1H, 1NH], 6.56 [d, 1H, 1NH], 5.09 [s, 1H, Aib NH], 4.55 [s, 2H, Bzl CH₂], 4.35 [m, 1H, α CH], 4.12 [m, 3H, 3 α CH], 3.65 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 3.54 [m, 1H, Lol β' CH₂], 3.43 [m, 1H, Lol β' CH₂], 2.44 [m, 3H, Glu(OMe) γ CH₂, Glu(OMe) β CH₂], 2.10 [m, 1H, Glu(OMe) β CH₂], 1.67-1.40 [m, 30H, Lol β CH₂ γ CH, Leu β CH₂ γ CH, Boc 3 CH₃, Aib 4 CH₃, Ala CH₃], 0.91 [m, 12H, Lol 2 δ CH₃, Leu 2 δ CH₃].

Boc-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Si sciolgono 0.32g di Boc-Ser(Bzl)-OH (1.1mmol) nella minima quantità di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono 0.15g di HOAt (1.1mmol). Si raffredda a 0°C e si aggiungono 0.21g di EDC·HCl (1.1mmol) e una soluzione in CH₂Cl₂ distillato di 0.81g CF₃COOH·H-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) (0.99mmol) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (0.80g, 0.99mmol)] e 0.12 mL di NMM (1.1mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 3 giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (60mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄. Si purifica mediante cromatografia flash (eluente MeOH 4%, CH₂Cl₂).

Resa: 65%.

Punto di fusione: 65-68 °C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.95; **Rf₃:** 0.40.

[α]₂₀^D: -14.1° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3310, 1738, 1722, 1661, 1530 cm⁻¹.

Spettrometria di massa (ESI-TOF): [M+H]⁺_{sper} = 982.52.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.51 [d, 1H, 1NH], 7.43 [d, 1H, 1NH], 7.31 [m, 10H, Bzl 5 CH benzilico, Ser(Bzl) 5 CH benzilico], 7.16 [m, 2H, 2NH], 7.06 [d, 1H, 1NH], 6.69 [s, 1H, 1NH], 5.54 [s, 1H, Ser(Bzl) NH], 4.55 [s, 4H, Bzl 2CH₂], 4.33 [m, 1H, α CH], 4.18 [m, 1H, 1 α CH], 4.07 [m, 1H, 1 α CH], 3.98 [m, 2H, 2 α CH], 3.77 [m, 2H, Ser(Bzl) β CH₂], 3.64 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 3.52 [m, 1H, Lol β' CH₂], 3.41 [m, 1H,

Lol β' CH₂], 2.46 [m, 2H Glu(OMe) γ CH₂], 2.38 [m, 1H, Glu(OMe) β CH₂], 2.12 [m, 1H, Glu(OMe) β CH₂], 1.72-1.39 [m, 30H, Lol β CH₂ γ CH, Leu β CH₂ γ CH, Boc 3 CH₃, Aib 4 CH₃, Ala CH₃], 0.93 [m, 12H, Lol 2 δ CH₃, Leu 2 δ CH₃].

2.2.3 Reazioni di condensazione

Boc-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-OH

Si sciolgono 0.32g (0.55mmol) di Boc-Ala- Glu(OMe)-Ala-Aib-OBzl in 5mL di MeOH. In atmosfera inerte si aggiunge una quantità di Pd/C sufficiente ad annerire la soluzione. Si lascia il sistema sotto flusso di H₂ per un'ora. Si tira a secco e si riprende più volte con toluene fino ad ottenere il precipitato.

Resa: 99%.

Punto di fusione: 101-104 °C.

Rf₁: 0.30; **Rf₂:** 0.80; **Rf₃:** 0.15.

[α]₂₀^D: -36.6° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3319, 1720, 1653, 1525 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.84 [d, 1H, NH], 7.69 [s, 1H, NH], 7.20 [s, 1H, NH], 5.16 [s, 1H, Ala NH], 4.48 [m, 1H, α CH], 4.37 [m, 1H, α CH], 4.05 [m, 1H, α CH], 3.68 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 2.47 [m, 2H, Glu(OMe) γ CH₂], 2.11 [m, 2H, Glu(OMe) β CH₂], 1.54 [m, 6H, Aib 2 β CH₃], 1.43 [s, 9H, Boc 3 CH₃], 1.37 [m, 6H, 2Ala β CH₃].

Boc-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Una sospensione di 0.27g di Boc-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-OH (0.55mmol) e di 0.08g di HOAt (0.55mmol) in CH₂Cl₂ anidro viene raffreddata a 0°C. Si aggiungono 0.10g (0.55mmol) di EDC·HCl e dopo qualche minuto una soluzione di 0.51g (0.51mmol) di CF₃COOH·H-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (0.50g, 0.51mmol)] e di 0.06mL di NMM (mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 3 giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (60mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄. Il prodotto precipita da AcOEt-etero di petrolio.

Resa: 84 %.

Punto di fusione: 93-96 °C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.95; **Rf₃:** 0.25.

[α]_D²⁰: -20.9° (c=0.5, MeOH).

IR (KBr): 3327, 1739, 1660, 1533 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.19 [d, 1H, 1NH], 7.81 [m, 2H, 2NH], 7.63 [d, 1H, 1NH], 7.55 [d, 1H, 1NH], 7.49 [d, 1H, 1NH], 7.32 [m, 13H, 3NH, Ser(Bzl) 5CH aromatici, Lol(Bzl) 5CH aromatici], 7.10 [d, 1H, 1NH], 5.15 [s, 1H, 1NH uretanico], 4.57 [m, 4H, 2Bzl 2CH₂], 4.32 [m, 1H, 1αCH], 4.17 [m, 2H, 2αCH], 4.02 [m, 5H, 5αCH], 3.85 [m, 2H, Ser(Bzl) βCH₂], 3.74 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 3.70 [s, 3H, Glu(OMe) OCH₃], 3.54 [m, 1H, Lol β'CH₂], 3.42 [m, 1H, Lol β'CH₂], 2.45 [m, 5H 2Glu(OMe) 2γCH₂, 1βCH₂], 2.45 [m, 1H, Glu(OMe) βCH₂], 2.01 [m, 2H, Glu(OMe) βCH₂], 1.87-1.40 [m, 42H, Lol βCH₂ γCH, Leu βCH₂ γCH, Boc 3 CH₃, 3Aib 6 CH₃, 3Ala 3CH₃], 0.89 [m, 12H, Lol 2δCH₃, Leu 2δCH₃].

Ac-Trp-Val-Aib-Aib-OH

Si sospendono 0.21g (0.35mmol) di Ac-Trp-Val-Aib-Aib-OH in 5mL di MeOH e 5 mL di DMF. In atmosfera inerte si aggiunge una quantità di Pd/C sufficiente ad annerire la soluzione. Si lascia il sistema sotto flusso di H₂ per un'ora. Si tira a secco e si riprende più volte con toluene fino ad ottenere il precipitato.

Resa: 99%.

Punto di fusione: 157-161°C.

Rf₁: 0.05; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.05.

[α]₂₀^D: -12.3° (c=0.5, MeOH).

IR(KBr): 3416, 1657, 1521 cm⁻¹.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 10.86 [s,1H, Trp NH indolico], 8.16 [m, 1H, 1NH], 8.01[m, 2H, 2NH], 7.88 [m, 1H, 1NH], 7.57 [d, 1H, Trp CH indolico], 7.30 [d, 1H, Trp CH indolico], 7.10 [s, 1H, Trp CH indolico], 7.04 [t, 1H, Trp CH indolico] , 6.96 [t, 1H, Trp CH indolico], 4.59 [m, 1H, Trp αCH], 4.12 [m, 1H, Val αCH], 3.12 [dd, 1H, Trp βCH₂], 2.91 [dd, 1H, Trp βCH₂], 2.02 [m, 1H, Val βCH], 1.78 [s, 3H, Ac CH₃], 1.32 [m, 12H, 2 Aib 4CH₃], 0.83 [m, 6H, Val 2γCH₃].

Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl)

Una sospensione di 0.13g di Ac-Trp-Val-Aib-Aib-OH (0.27mmol) e 37mg di HOAt (0.27mmol) in CH₂Cl₂ anidro e DMF viene raffreddata a 0°C. Si aggiungono 52mg (0.27 mmol) di EDC·HCl e dopo qualche minuto una soluzione di 0.24g (0.18mmol) di CF₃COOH·H-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) [precedentemente ottenuto per acidolisi, con TFA 50% in CH₂Cl₂ del corrispondente Boc-derivato (0.24g, 0.18mmol)] e di 0.05mL di NMM (0.30mmol). Si mantiene a 0°C per un'ora, poi a temperatura ambiente per 3 giorni, controllando che il pH rimanga 8. Si evapora il CH₂Cl₂, si riprende con AcOEt (60mL), si lava con acido citrico 0.5M (3x50mL), H₂O (1x50mL), NaHCO₃ 5% (3x50mL), H₂O (1x50mL). Si anidrifca con Na₂SO₄. Si purifica mediante cromatografia flash (eluente MeOH 8%, CH₂Cl₂).

Resa: 40%.

Punto di fusione: 148-151 °C.

Rf₁: 0.60; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.10.

[α]_D²⁰ = -29.8° (c=0.5, MeOH).

IR (KBr): 3328, 1740, 1660, 1538 cm⁻¹.

Spettrometria di massa (ESI-TOF): [M]⁺_{calc} = 1748.94; [M+2H]⁺⁺_{sper} = 875.48.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OH): δ 10.415 (d, 1H, ε-NH Trp¹); 8.25 (s, 1H, NH Aib¹⁰); 8.18-8.16 (m, 1H, NH Trp¹); 8.10-8.08 [d, 1H, NH Glu(OMe)⁶]; 8.04 [s e d, 2H, NH Aib⁸ e Ser(Bzl)⁹]; 7.98-7.96 (m, 2H, NH Ala⁵ e Leu¹²); 7.87-7.86 (d, 1H, NH Ala¹¹); 7.81 (s, 1H, NH Aib⁴); 7.79-7.78 (d, 1H, NH Ala⁷); 7.73 (s, 1H, NH Aib¹³); 7.63-7.61 [d, 1H, NH Glu(OMe)¹⁴]; 7.59-7.57 (d, 1H, NH Val²); 7.52-7.50 (m, 2H, NH Aib¹⁴, H-4 Trp¹); 7.49-7.47 [d, 1H, NH Lol(Bzl)¹⁵]; 7.36-7.24 (m, 11H, H-7 Trp¹, 2 Ph-Bzl); 7.22 (d, 1H, H-2 Trp¹); 7.11-7.07 (t, 1H, H-6 Trp¹); 7.01-6.97 (t, 1H, H-5 Trp¹); 5.19 [s, 2H, CH₂-Bzl Ser(Bzl)⁹]; 4.52 [s, 2H, CH₂-Bzl Lol(Bzl)¹⁵]; 4.50-4.49 (m, 1H, α-CH Trp¹); 4.24-3.19 [m, 1H, α-CH Glu(OMe)¹⁴]; 4.18-4.12 [m, 3H, α-CH Lol¹⁵, α-CH e β-CH Ser(Bzl)⁹]; 4.11-3.94 [m, 5H, α-CH Ala⁵, α-CH Glu(OMe)⁶, α-CH Ala⁷, α-CH Ala¹¹ e α-CH Leu¹²]; 3.89-3.88 [d, 1H, β-CH Ser(Bzl)⁹]; 3.62 [s, 3H, CH₃ Glu(OMe)^{6 o 14}]; 3.56 [s, 3H, CH₃ Glu(OMe)^{6 o 14}]; 3.49-3.41 [m, 3H, α-CH Val² e β²-CH₂ Lol(Bzl)¹⁵]; 3.26-3.24 (m, 2H, β-CH₂ Trp¹); 2.65-2.40 [m, 4H, γ-CH₂ Glu(OMe)⁶ e γ-CH₂ Glu(OMe)¹⁴]; 2.35-2.22 [m, 2H, β-CH Glu(OMe)⁶ e β-CH Glu(OMe)¹⁴]; 2.15-2.06 [m, 2H, β-CH

Glu(OMe)⁶ e β -CH Glu(OMe)¹⁴]; 2.04 (s, 3H, CH₃ Ac); 1.94-1.85 (m, 3H, β -CH Val², β -CH e γ -CH Leu¹²); 1.81-1.71 [m, 1H, γ -CH Lol(Bzl)¹⁵]; 1.65-1.60 [m, 2H, β -CH Leu¹² e β^1 -CH Lol(Bzl)¹⁵]; 1.58 (s, 6H, β -CH₃ Aib⁸ e Aib¹⁰); 1.53 (s, 3H, β -CH₃ Aib¹³); 1.52-1.49 (m, 18H, β -CH₃ Aib⁴, Ala⁷, Aib⁸, Aib¹⁰, Ala¹¹ e Aib¹³); 1.46 (s, 3H, β -CH₃ Aib⁴); 1.42 (s, 6H, β -CH₃ Ala⁵ e β -CH₃ Aib³); 1.37-1.39 [bs, 4H, β -CH₃ Aib³ e β^1 -CH Lol(Bzl)¹⁵]; 1.02-1.01 (m, 1H); 0.91-0.87 [m, 15H, 2 δ -CH₃ Leu¹², 2 δ -CH₃ Lol(Bzl)¹⁵ e γ -CH₃ Val²]; 0.72-0.70 (d, 3H, γ -CH₃ Val²).

2.2.4 Prova di sblocco del peptide ottenuto in soluzione

Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol
Si sciolgono 60mg (0.1mmol) di Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl) in 5mL di MeOH. In atmosfera inerte si aggiunge una quantità di Pd/C sufficiente ad annerire la soluzione. Si lascia il sistema sotto flusso di H₂ per 24 ore. Si esegue un prelievo per effettuare un'analisi di massa dopo 6 ore.

2.3 Sintesi su fase solida e caratterizzazione

Tilopeptina B

Il peptide è stato sintetizzato in modo automatico, secondo la procedura generale di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 2.1, a partire da 108.6 mg di resina H-Lol-Cltrile (0.05 mmol). 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%). Viene essiccato sotto vuoto su P₂O₅. Si ottiene il prodotto grezzo con resa del 90%.

Il prodotto è stato purificato tramite HPLC.

Resa: 20%.

Rf₁: 0.05; **Rf₂:** 0.70; **Rf₃:** 0.05.

[α]_D²⁰ = -15.0° (c=0.1, MeOH).

IR (KBr): 3418, 1658, 1538 cm⁻¹.

HPLC (35-90%CH₃CN/H₂O 9/1 in 15 min, flow 1.5mL/min): 12.7 min.

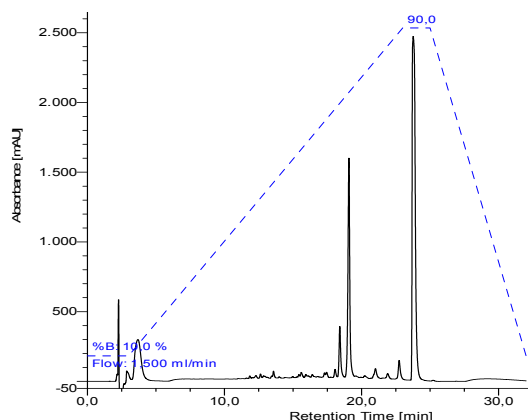


Figura 2.1 Cromatogramma del prodotto grezzo.

Spettrometria di massa (ESI-TOF): $[M]^+_{\text{calc}} = 1538.85$; $[M+2H]^{++}_{\text{sper}} = 770.42$,
 $[M+H+Na]^{++}_{\text{sper}} = 781.90$, $[M+H+K]^{++}_{\text{sper}} = 789.39$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OH): δ 10.42 (d, 1H, ϵ -NH Trp¹); 8.25 (s e d, 2H, NH Gln⁶ e Aib⁸); 8.19-8.17 (m, 2H, NH Leu¹² e Trp¹); 8.15 (s, 1H, NH Aib¹⁰); 8.02 (s e d, 2H, NH Aib¹³ e Ala⁵); 7.89 (s, 1H, NH Aib⁴); 7.87 (d, 1H, NH Ala¹¹); 7.86 (d, 2H, NH Ala⁷ e Ser⁹); 7.60-7.59 (m, 2H, 2 NH Val² e Lol¹⁵); 7.57 (s, 1H, NH Aib³); 7.52-7.50 (m, 3H, NH e δ NH Gln¹⁴, H-4 Trp¹); 7.42 (s, 1H, δ NH Gln⁶); 7.33-7.32 (d, 1H, H-7 Trp¹); 7.22 (d, 1H, H-2 Trp¹); 7.10-7.08 (t, 1H, H-6 Trp¹); 7.00-6.97 (t, 1H, H-5 Trp¹); 6.82 (s, 1H, δ NH Gln¹⁴); 6.72 (s, 1H, δ NH Gln⁶); 5.35 (m, 1H, OH Lol¹⁵); 5.19-5.14 (t, 1H, OH Ser⁹); 4.51-4.48 (m, 1H, α -CH Trp¹); 4.20-4.15 (m, 1H, α -CH Gln¹⁴); 4.18-3.98 (m, 8H, α -CH Ala⁵, α -CH Ala⁷, α -CH Gln⁶, α -CH Ala¹¹, α -CH Leu¹², α -CH Lol¹⁵, α -CH e β -CH Ser⁹); 3.57-3.54 (m, 3H, α -CH Val² e β^2 -CH₂ Lol¹⁵); 3.26-3.24 (m, 2H, β -CH₂ Trp¹); 2.59-2.46 (m, 3H, γ -CH₂ Gln⁶ e γ -CH Gln¹⁴); 2.43-2.37 (m, 1H, γ -CH Gln¹⁴); 2.33-2.25 (m, 2H, β -CH Gln⁶ e β -CH Gln¹⁴); 2.21-2.18 (m, 1H, β -CH Gln⁶); 2.16-2.10 (m, 1H, β -CH Gln¹⁴); 2.04 (s, 3H, CH₃ Ac); 1.94-1.85 (m, 3H, β -CH Val², β -CH e γ -CH Leu¹²); 1.79-1.72 (m, 1H, γ -CH Lol¹⁵); 1.65-1.60 (m, 2H, β -CH Leu¹² e β^1 -CH Lol¹⁵); 1.58 (s, 3H, β -CH₃ Aib¹⁰); 1.57 (s, 3H, β -CH₃ Aib⁸); 1.55 (s, 3H, β -CH₃ Aib¹³); 1.52-1.51 (m, 15H, β -CH₃ Aib⁴, Ala⁷, Aib⁸, Ala¹¹ e Aib¹³); 1.50-1.496 (d, 3H, β -CH₃ Ala⁵); 1.49 (s, 3H, β -CH₃ Aib¹⁰); 1.48 (s, 3H, β -CH₃ Aib⁴); 1.43 (s, 3H, β -CH₃ Aib³); 1.42 (s, 3H, β -CH₃ Aib³); 1.37-1.31 (m, 1H, β^1 -CH Lol¹⁵); 0.94-0.89 (m, 15H, 2 δ -CH₃ Leu¹², 2 δ -CH₃ Lol¹⁵ e γ -CH₃ Val²); 0.72-0.70 (d, 3H, γ -CH₃ Val²).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi dei peptidi

La sintesi chimica della tilopeptina è stata affrontata sia mediante le classiche procedure di sintesi in soluzione *step-by-step* che la sintesi su fase solida. I peptaibolici, a causa della presenza di amminoacidi C^α-tetrasostituiti, l'Aib nel caso specifico della tilopeptina, hanno una reattività notevolmente più bassa nella formazione del legame ammidico rispetto agli amminoacidi proteici. Pertanto è necessario ricorrere, soprattutto in sintesi su fase solida, a particolari procedure durante i *coupling* che coinvolgano l'Aib. La presenza degli amminoacidi C^α-tetrasostituiti porta ad avere prodotti non puri e in rese modeste e per questo si deve ricorrere alla purificazione mediante tecnica HPLC del prodotto ottenuto.

La sintesi in soluzione di questi 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.

3.1.1 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, come già accennato, 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 due: (i) tempi di sintesi ridotti, grazie tra l'altro alla possibilità di procedere in parallelo nella preparazione dei segmenti peptidici richiesti, e (ii) isolamento più facile dei prodotti in quanto differiscono significativamente nei pesi molecolari, e quindi nelle proprietà chimico-fisiche, dai reagenti. 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 figura 3.1.

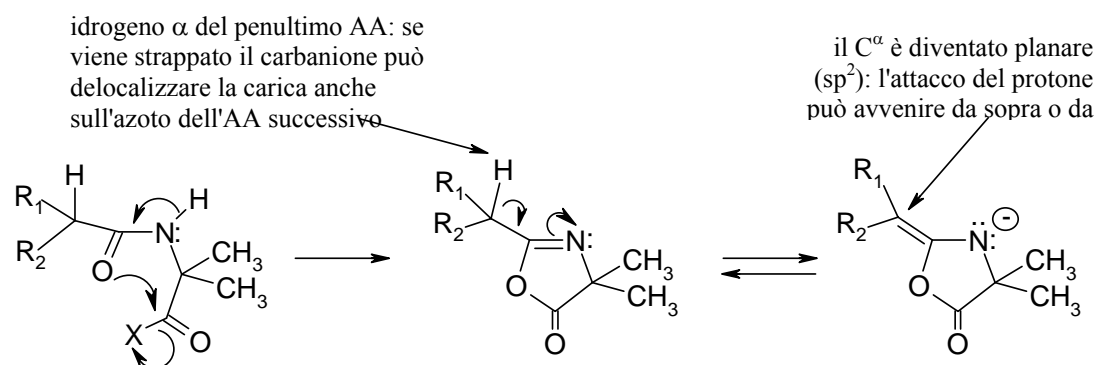


Figura 3.1 Meccanismo di racemizzazione *via* ossazolone del penultimo amminoacido nella condensazione di segmenti.

La strategia sintetica adottata in questa Tesi risulta essere una combinazione dei due metodi, poiché lo schema di sintesi progettato per la tilopectina B prevede la condensazione di tre segmenti, precedentemente sintetizzati *step-by-step*.

Nel delineare la strategia più opportuna si è tenuto particolarmente conto del fatto che i *coupling*, che prevedono la partecipazione del gruppo amminico dell'Aib, avvengono con difficoltà.

Ci si è inoltre preoccupati di cercare uno schema di sintesi versatile che permettesse di realizzare in futuro ulteriori analoghi, diversamente sostituiti. Sono stati individuati tre frammenti principali (**A**, **B**, **C**) da sintetizzare *step-by-step*.

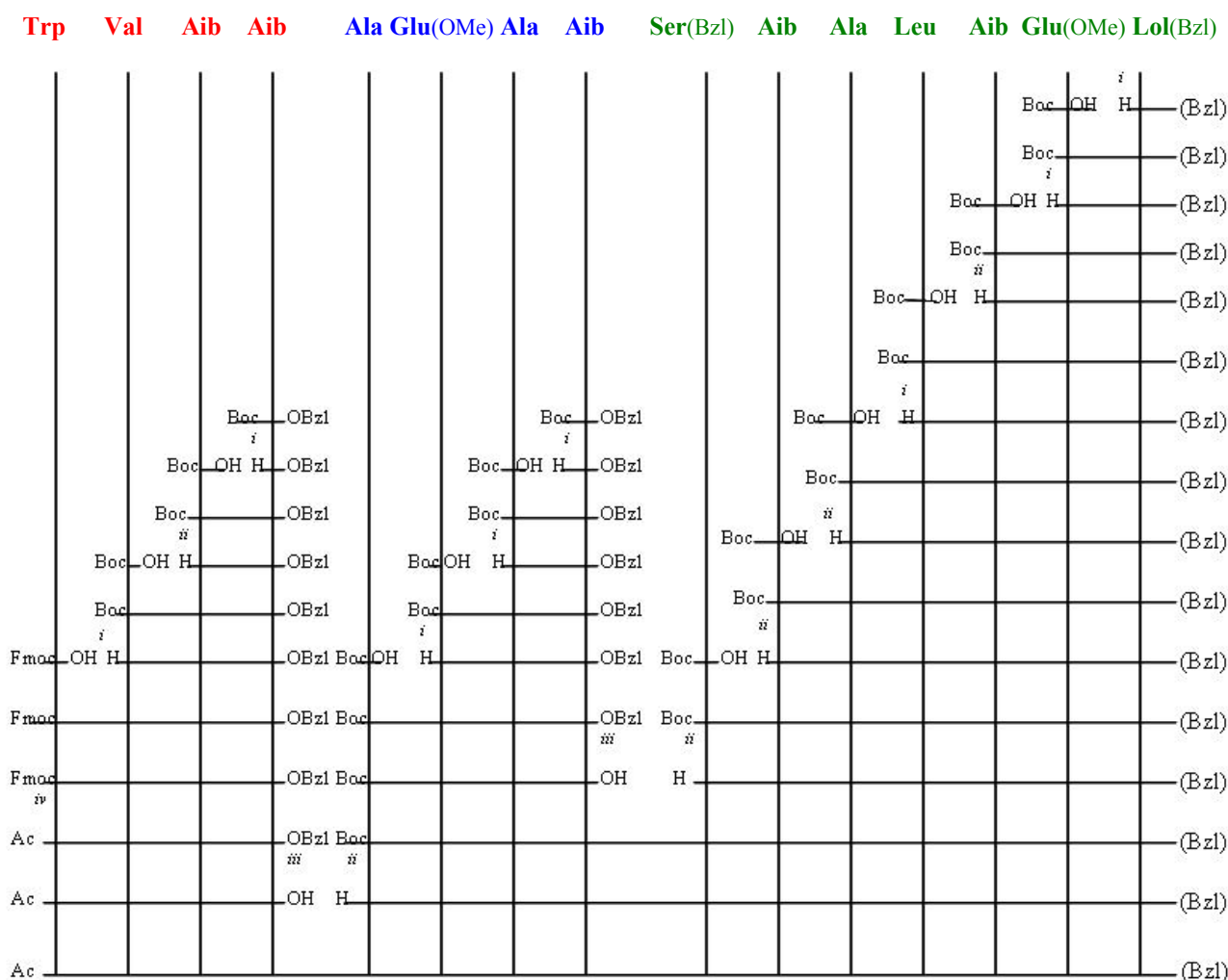
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ac-Trp	Val	Aib	Aib	Ala	Glu*	Ala	Aib	Ser*	Aib	Ala	Leu	Aib	Glu*	Lol*
Segmento A				Segmento B				Segmento C						

*Si veda la discussione sulle catene laterali.

Si prevede nell'ordine la loro condensazione:

- $B+C \rightarrow BC$
- $A+BC \rightarrow ABC$

La sintesi prevede inizialmente la riduzione dell'amminoacido leucina a leucinolo e la sua successiva protezione come etere benzilico. Questa via sintetica, riassunta nello schema 3, consente di preservare l'integrità ottica dei frammenti peptidici e allo stesso tempo fornisce rese accettabili.



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

ii deprotezione con TFA 50% DCM e *coupling* con HOAt/EDC

iii deprotezione con idrogenazione catalitica e *coupling* con HOAt/EDC

iv deprotezione con piperidina e successiva acetilazione

Schema 3.1 Schema di sintesi della tilopeptina B in soluzione.

Per ottenere l'analogo [Glu(OMe)⁶⁻¹⁴] tilopeptina B, è necessario effettuare la rimozione dei gruppi benzilici presenti sul residuo di Ser e di Lol. Per motivi di tempo tale reazione è stata condotta su una modesta quantità di peptide, senza poter ottimizzare le condizioni. Le analisi HPLC e di massa del peptide deprotetto hanno infatti mostrato la presenza del prodotto desiderato, ma anche la comparsa di sottoprodotti. Infine, la sintesi sarà completata da una ammonolisi, le cui condizioni sono state messe a punto con altri peptaibolici in questo laboratorio, che permetterà di convertire l'estere metilico Glu(OMe) in Gln. Va comunque notato che il peptide recante residui di Glu(OMe) sarà comunque utilizzato per test di bioattività. Si è visto infatti che esso permette di acquisire utili informazioni sul possibile ruolo del gruppo ammidico primario della Gln nel meccanismo di formazione di aggregati.

3.1.2 Strategia di sintesi in fase solida

La tilopeptina B è stata sintetizzata con la tecnica in fase solida, introdotta da Merrifield nel 1963,^[85] che rappresenta un metodo rapido ed efficace per sintetizzare peptidi di piccole e medie dimensioni. Rispetto alla sintesi in soluzione, questa presenta vari vantaggi:

- possibilità di portare a completezza la reazione utilizzando un eccesso dei reagenti solubili, facilmente eliminabili per filtrazione;
- rimozione dei sottoprodotti indesiderati, sempre per filtrazione, con conseguente semplificazione della fase di purificazione;
- possibilità di automazione.

Questo metodo prevede l'ancoraggio dello Fmoc-amminoacido C-terminale della sequenza peptidica che si vuole sintetizzare, ad una resina polistirene-divinilbenzene. Per permettere che l'ancoraggio sia reversibile, che si possa cioè rimuovere il peptide finale dalla resina in condizioni chimiche diverse, tra l'amminoacido e la resina vi è un *linker*. 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 3.2 un ciclo di sintesi in fase solida.

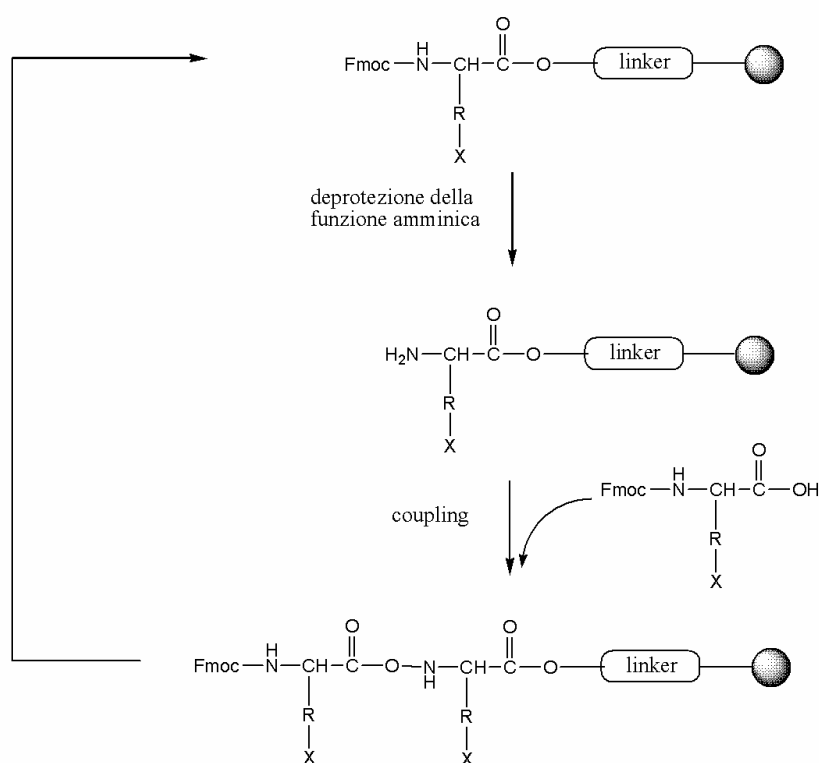


Figura 3.2 Schema generale di sintesi in fase solida.

Come già ricordato 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.

Per evitare il verificarsi di reazioni collaterali che coinvolgono le catene laterali di alcuni amminoacidi, queste vengono protette con gruppi opportuni che soddisfino le condizioni di ortogonalità rispetto alla protezione del gruppo α -amminico. Questo accorgimento assicura che la rimozione del gruppo protettore α -amminico, normalmente Fmoc, ripetuta ad ogni ciclo non provochi il distacco anche parziale degli eventuali gruppi protettori presenti in catena laterale. Chiaramente anche 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 utilizza un *linker* 2-cloro-tritile ancorato ad una resina di polistirene-divinilbenzene 1% (figura 3.3). Questo tipo di resina è *iper*-sensibile all'ambiente acido

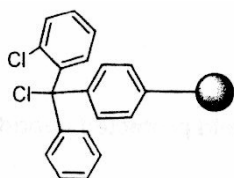


Figura 3.3 Resina 2-Clorotritile.

e consente di rimuovere il peptide con HFIP al 20% in DCM.

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

Lo schema seguente riassume i passaggi salienti della sintesi:

	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	
Ac	Trp	Val	Aib	Aib	Ala	Gln	Ala	Aib	Ser	Aib	Ala	Leu	Aib	Gln	Lol- CITRT
		*	&				*		*			*			

In giallo sono riportati gli amminoacidi per i quali si sono eseguiti due cicli di *coupling* anziché uno.

* Acetilazione: questo passaggio è servito a bloccare la crescita delle catene sulle quali non era avvenuto il *coupling*, in modo da ridurre il numero di sequenze *delete*.

& Tempo di *coupling* raddoppiato (2h per ciascun *coupling*) per favorire la difficile formazione del legame ammidico tra due residui di Aib.

|| Pausa, sblocco, MS: si controlla la sintesi con un'analisi di massa.

Nella pubblicazione [77], che descrive la sintesi in fase solida della tilopeptina A, si utilizza un metodo molto simile a quello utilizzato per questo lavoro di Tesi. Tuttavia per favorire i *coupling* che coinvolgono gli amminoacidi α,α -dialchilati vengono utilizzati Fmoc-amminoacidi attivati come fluoruri acilici. In questa Tesi non è stato utilizzato tale metodo ma si è preferito eseguire due cicli di *coupling*, anziché uno, negli step coinvolgenti i residui α,α -dialchilati. Si sono pure raddoppiati i tempi di reazione nel caso della condensazione Aib-Aib. La resa riportata nell'articolo citato è del 12%, mentre in questo lavoro di Tesi si è ottenuta la tilopeptina B con una resa del 20%.

3.1.3 Gruppi protettori utilizzati nella sintesi in soluzione

Nella sintesi in soluzione si è utilizzato come gruppo N^α-protettore il *terz*-butossicarbonile (Boc, Figura 3.4), tranne che nel caso del residuo N-terminale dove si è utilizzato il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc, Figura 3.4).

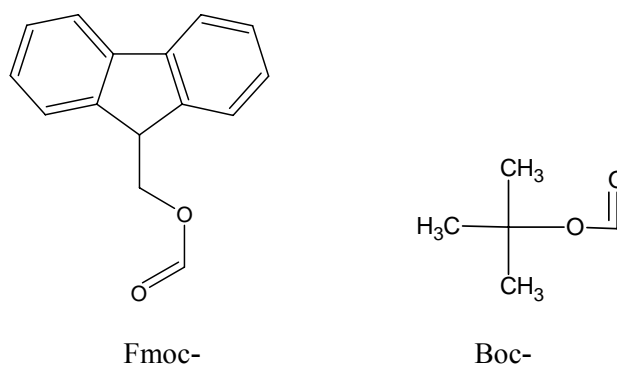


Figura 3.4. Gruppi N^α-protettori.

L'uso del gruppo Boc è stato esteso a tutta la sintesi dei frammenti **A**, **B** e **C** poiché esso, rimuovibile in condizioni acide blande (acido TFA 50% in DCM), è perfettamente ortogonale al gruppo OBzl (Figura 3.5), utilizzato per la protezione del C-terminale dei medesimi segmenti.

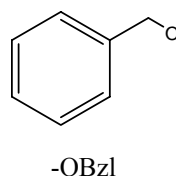


Figura 3.5 Gruppo C-protettore.

Questo gruppo viene rimosso per idrogenazione catalitica con palladio supportato su carbone. La scelta di questo gruppo e del Boc deriva da considerazioni fatte in base ad alcuni amminoacidi presenti nella sequenza.

Si è affrontata la questione del residuo di Lol C-terminale. In particolare, si è deciso di proteggere la funzione alcolica durante i *coupling*. Il Lol, amminoalcol che si ottiene dal corrispondente amminoacido (Leu) per riduzione, è stato sintetizzato e introdotto fin dall'inizio della sintesi del segmento C. Infatti, la riduzione effettuata posteriormente sul peptide (trattamento con LiBH₄) sarebbe stata incompatibile con

l'integrità dei residui di Glu(OMe), le cui catene laterali sarebbero pure state ridotte ad alcoli. Normalmente la riduzione viene effettuata sull'estere metilico dell'amminoacido. La funzione amminica non è protetta e questo permette quindi di proseguire direttamente con la sintesi dopo la riduzione. In questa tesi si è però voluto proteggere la funzione alcolica formatasi, poiché si è visto che i *coupling* hanno difficoltà ad avvenire se questa è libera. Si è pertanto sintetizzato l'amminoalcol partendo dall'amminoacido protetto all'azoto in modo da poter poi proteggere la funzione alcolica. A questo scopo si è utilizzata una procedura descritta in letteratura che prevede la riduzione, da parte del NaBH₄, dell'anidride mista formatasi per reazione del Boc-amminoacido con l'etileloroformiato.^[83] Rispetto alla procedura descritta in letteratura però è stata utilizzata una soluzione di LiBH₄ 2M invece dell'aggiunta diretta del NaBH₄. La funzione alcolica formatasi è stata poi protetta via eterificazione dell'amminoalcol protetto all'azoto con NaH e benzilbromuro.^[84]

Per quanto riguarda le catene laterali la maggior parte degli amminoacidi che costituiscono la tilopeptina non ha problemi particolari. Infatti, sono presenti catene laterali alifatiche che 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. Vi sono però, in particolare, due amminoacidi, la serina e la glutammina che necessitano di protezione. La serina ha un gruppo alcolico in catena laterale che rappresenta un nucleofilo capace di disturbare le reazioni di *coupling*, riducendo le rese di queste reazioni (la stessa considerazione è stata fatta anche per il residuo Lol). Si è pertanto scelto l'etere benzilico per entrambi gli alcoli in modo tale che al termine della sequenza di *coupling* si potesse condurre una sola idrogenazione catalitica per rimuovere entrambe le protezioni. Da questa scelta deriva il fatto che nell'intera sintesi la funzione N^α-amminica è stata protetta con il gruppo Boc, ortogonale al -OBzl.

Anche la Gln, se lasciata non protetta, può dare origine a reazioni collaterali tramite l'ammidica primaria in catena laterale (ciclizzazione a glutarimmide o acido piroglutammico, disidratazione a nitrile). Quest'ultima inoltre limita notevolmente la solubilità. Si è pertanto deciso di non introdurre la Gln come tale, ma come residuo di acido glutammico esterificato con metanolo in catena laterale. Il ripristino della funzione ammidica può essere effettuato con una reazione di ammonolisi sul peptide finale.^[86] Tuttavia in un precedente lavoro di Tesi si è osservato che la sostituzione della

Gln con Glu(OMe) non comporta variazioni conformazionali significative. Pertanto, l'analogo della tilioeptina contenente Glu(OMe) può essere studiato come tale.^[78]

Per il residuo N-terminale, il Trp, non è stato utilizzato il Boc- ma il gruppo Fmoc- per proteggere la funzione N^α-amminica. Questa scelta deriva dal fatto che il Trp è sensibile agli ambienti acidi in cui avviene la rimozione del gruppo Boc, perché si possono formare carbocationi in grado di alchilare l'anello indolico.

3.1.4 Gruppi protettori utilizzati in sintesi su fase solida

E' stato utilizzato per la funzione N^α-amminica nella sintesi in fase solida il gruppo Fmoc (Fmoc, Figura 3.4). Per la 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 3.6).

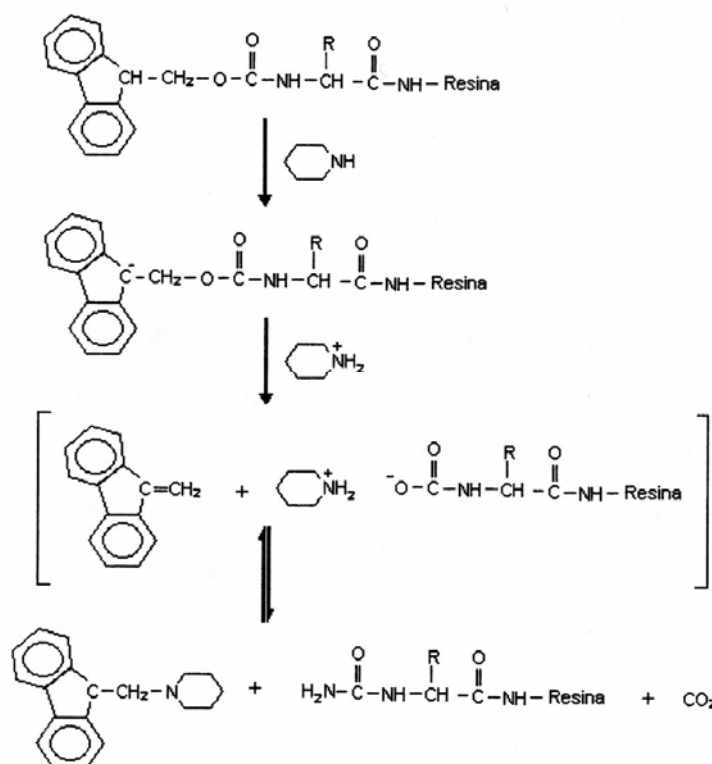


Figura 3.6 Schema del meccanismo di rimozione dello Fmoc con piperidina.

L'utilizzo dell'Fmoc in fase solida richiede che anche le funzioni reattive in catena laterale siano protette con gruppi ortogonali. Normalmente in sintesi su fase solida tutti i gruppi protettori delle catene laterali vengono rimossi con TFA in modo da permettere con una sola reazione la deprotezione totale del peptide. Nel caso specifico della tilopeptina si sono utilizzati i seguenti gruppi protettori:

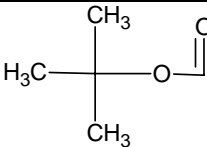
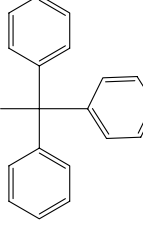
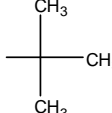
Amminoacido	Gruppo protettore	Formula	Rimozione
Trp	Boc		90% v/v TFA, 1h seguito da 1% aq. TFA, 1-2 h
Gln	Trt		90% v/v TFA, 30-60min
Ser	<i>t</i> Bu		90% v/v TFA, 30 min

Tabella 3.1 Gruppi protettori degli amminoacidi e relativo reagente di sblocco utilizzati per la sintesi della tilopeptina in fase solida.

Durante il processo di deprotezione con TFA, si generano, dai gruppi protettori o dal *linker* della resina, specie carbocationiche altamente reattive che possono reagire o modificare alcuni amminoacidi, come ad esempio il Trp. Come già ricordato sarebbe meglio evitare questa situazione con il Trp. Tuttavia, l'introduzione nell'ambiente di reazione di reagenti nucleofili, conosciuti come *scavengers*, limita notevolmente i rischi di alchilazione del Trp. Pertanto, la sintesi della tilopeptina B è stata condotta utilizzando il derivato commercialmente disponibile Fmoc-Trp(Boc)-OH, ma rimuovendo i gruppi acido-labili in presenza dello *scavenger* triisopropilsilano (Tis) (Figura 3.7).

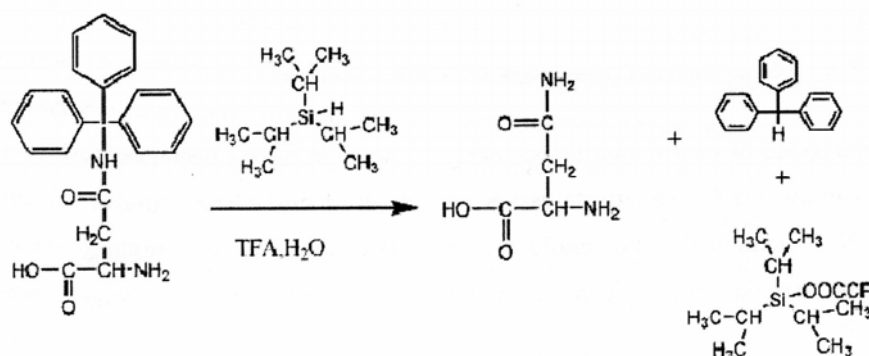


Figura 3.7 Rimozione del gruppo protettore Tritile con l'uso del Tis come *scavenger*.

La deprotezione del Trp può essere incompleta e in questo caso è necessario liofilizzare il prodotto con una soluzione 0.1% acquosa in TFA. Il meccanismo della deprotezione del Boc è rappresentato in figura 3.8. La specie B rappresenta l'incompleta deprotezione. [87]

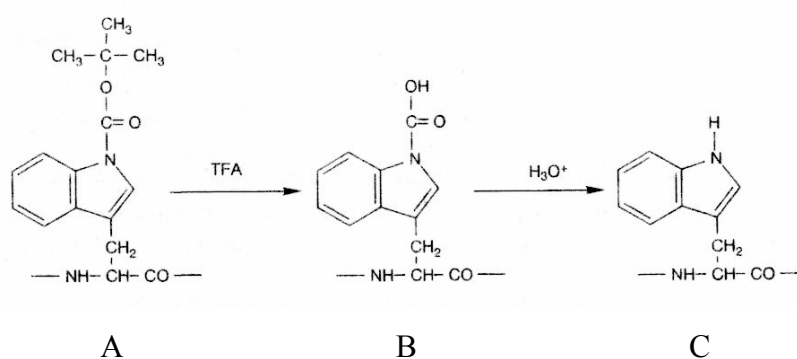


Figura 3.8 Meccanismo della rimozione del Boc sul Trp.

3.1.5 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^[88] o EDC/HOBt (Figura 3.9).

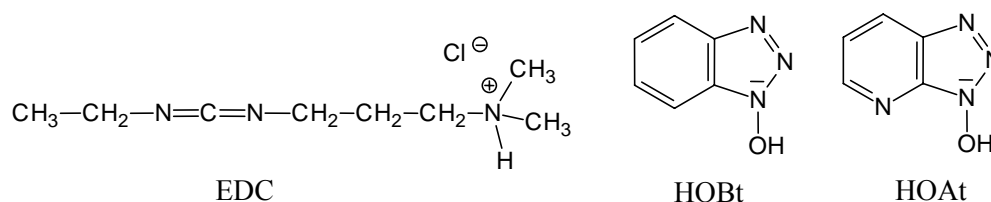


Figura 3.9 Formule di struttura di EDC, HOBt e HOAt.

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 comunemente utilizzati anche con gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti, i quali, essendo privi dell'atomo di idrogeno sul C^α , non possono racemizzare.

Nella procedura di attivazione *via* EDC/HOAt la carbodiimmide promuove la formazione di un intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido N^α -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 3.10). Questo meccanismo spiega anche il minor effetto catalitico esercitato dall'HOBt, che può fornire assistenza con un atomo di azoto su una sola faccia.

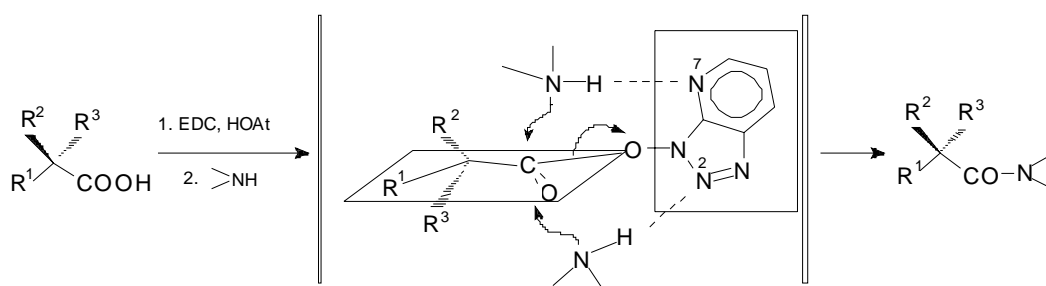


Figura 3.10 Attacco nucleofilo assistito nella formazione del legame ammidico *via* attivazione del gruppo carbossilico con HOAt.

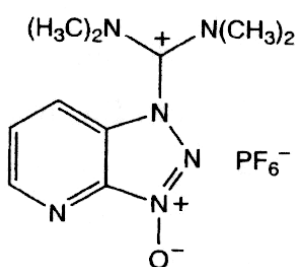


Figura 3.11 Formula chimica dell'agente condensante HATU

Per le reazioni di *coupling* nella sintesi su fase solida è stato usato come agente condensante [O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato] (HATU, Figura 3.11). Anche in questo caso il meccanismo di reazione comprende la formazione di un intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido N^α-protetto e l'HOAt che si stacca dal sale di uronio (Figura 3.12).

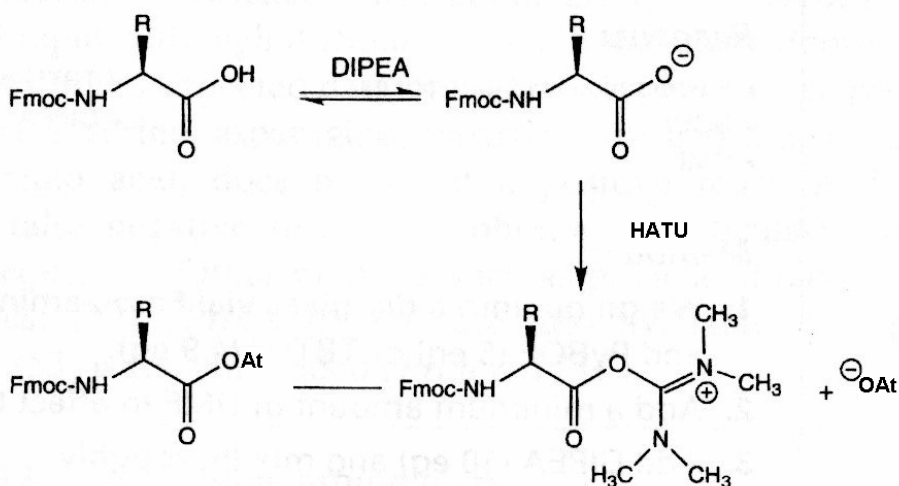


Figura 3.12 Formazione di un estere-OAt usando HATU.

3.1.6 Metodiche di caratterizzazione

Tutti i composti isolabili 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 $^1\text{H NMR}$.

Come ulteriore caratterizzazione, per la tilopeptina B e il suo analogo $[\text{Glu}(\text{OMe})^{6-14} \text{Ser}(\text{Bzl})^9 \text{Lol}(\text{Bzl})^{15}]$ tilopeptina B, si è ricorsi all'analisi HPLC (Figura 3.13).

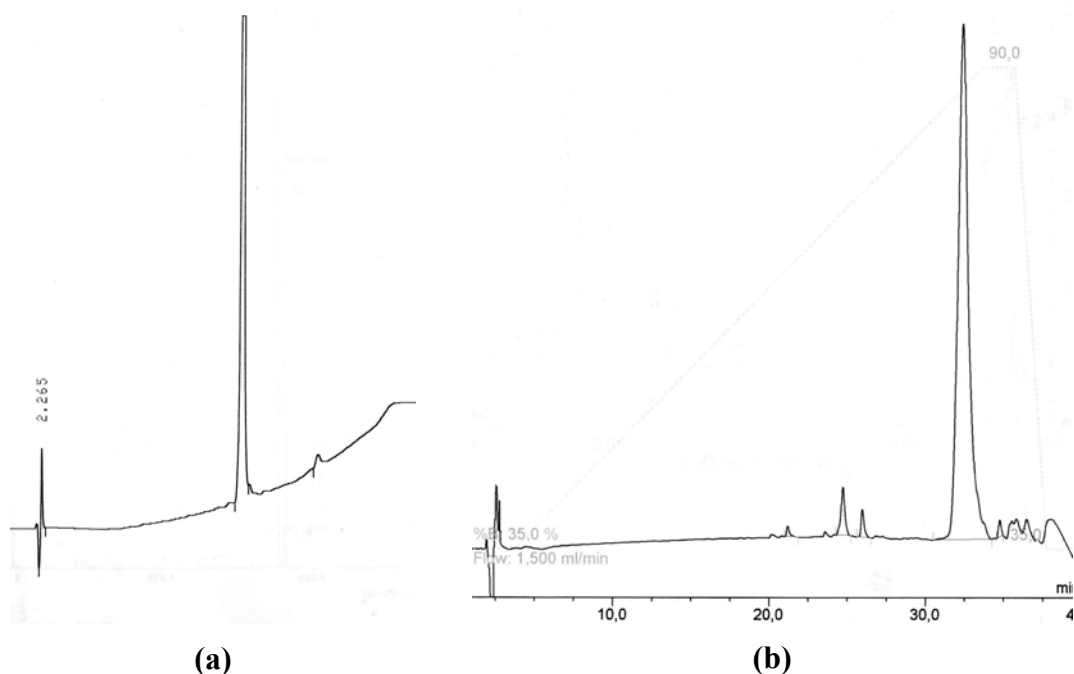


Figura 3.13 Cromatogramma dei prodotti tilopeptina B (a) e $[\text{Glu}(\text{OMe})^{6-14} \text{Ser}(\text{Bzl})^9 \text{Lol}(\text{Bzl})^{15}]$ tilopeptina B (b) in HPLC: colonna C_{18} Vydac gradiente 35-90%B in 15min
 A: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 9/1 + 0.1% TFA
 B: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9/1 + 0.1% TFA

Per alcuni peptidi sono stati registrati anche gli spettri di massa. Si è potuto osservare il picco dello ione molecolare protonato, con carica unitaria, per il segmento C ($m/z = [M+1]$, dove M rappresenta la massa esatta del peptide calcolata con le masse esatte degli isotopi prevalenti di ciascun elemento). Per i segmenti più lunghi, in genere, si è potuto osservare chiaramente il picco dello ione molecolare a doppia carica $[M+2\text{H}]^{++}$, con $m/z=(M+2)/2$, e picchi coinvolgenti ioni di metalli alcalino-terrosi quali $[M+\text{H}+\text{Na}]^{++}$ e $[M+\text{H}+\text{K}]^{++}$.

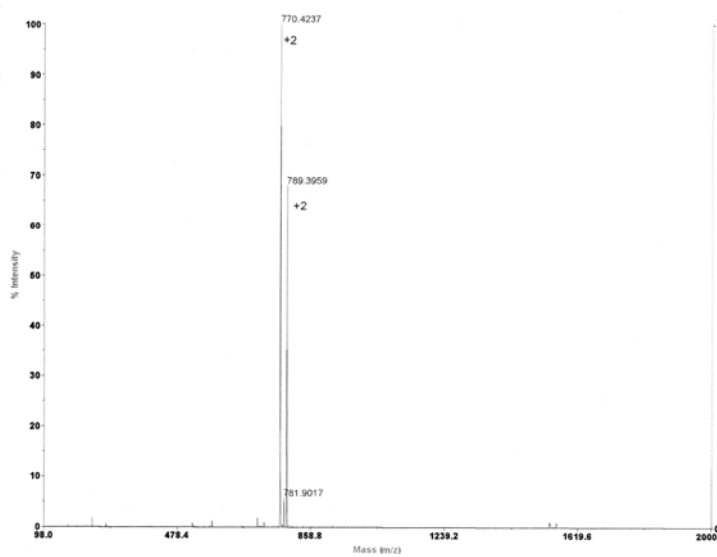


Figura 3.14 Spettro di massa ESI-TOF della tiliopeptina B, sintetizzata su fase solida, in metanolo.

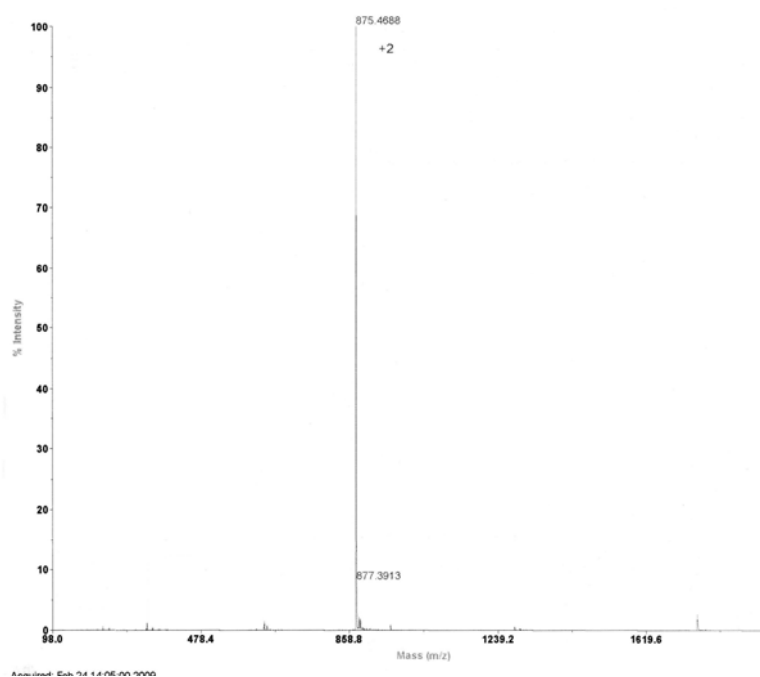


Figura 3.15 Spettro di massa ESI-TOF dell'analogo protetto [Glu(OMe)⁶⁻¹⁴ Ser(Bzl)⁹ Lol(Bzl)¹⁵] tiliopeptina B, sintetizzato in soluzione, in metanolo.

3.2 Indagini conformazionali

3.2.1 Assorbimento IR

La tilopeptina B sintetizzata su fase solida, l'analogo ottenuto in soluzione, i frammenti sintetici più lunghi e le corrispondenti sequenze corte sono stati sottoposti a studi di assorbimento IR in soluzione per indagarne le preferenze conformazionali. 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:

- Segmento **A**: Ac-Trp-Val-Aib-Aib-OBzl;
- Segmento **B**: Boc-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-OBzl;
- Segmento **C**: Boc-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl);
- Segmento **BC**: Boc-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl);
- Peptide **ABC**: Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Glu(OMe)-Ala-Aib-Ser(Bzl)-Aib-Ala-Leu-Aib-Glu(OMe)-Lol(Bzl);
- **Tilopeptina B**: Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol.

Lo studio è stato effettuato in deuterocloroformio (solvente di bassa polarità) negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni [90]:

- $3600-3200\text{ cm}^{-1}$, corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami N-H dei gruppi uretanici e peptidici;
- $1800-1600\text{ cm}^{-1}$, 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 1×10^{-3} M e si è indagato l'effetto della diluizione tra 1×10^{-3} e 1×10^{-4} M. I risultati sono riportati nelle Tabelle 3.2, 3.3 e nelle Figure 3.16-3.22.

Le frequenze dei massimi di assorbimento IR nelle regioni 3500-3200 cm^{-1} e 1800-1600 cm^{-1} dei peptidi **A**, **B**, **C**, **BC**, **ABC**, **tilopectina B**, a differenti concentrazioni, sono riportate nelle Tabelle 3.2 e 3.3.

Tabella 3.2 Frequenze di assorbimento IR dei frammenti **A**, **B**, **C**, **BC**, **ABC** e **tilopectina B** in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
A	<u>3478</u> , <u>3438</u> , <u>3406^a</u> , <u>3308^a</u> , <u>3260^b</u>	<u>1736</u> , <u>1708</u> , <u>1688^a</u> , <u>1672</u> , <u>1658^a</u> , <u>1620</u> , <u>1546</u>
B	<u>3442</u> , <u>3422^a</u> , <u>3394^a</u> , <u>3328^b</u>	<u>1736^a</u> , <u>1724</u> , <u>1700</u> , <u>1670</u> , <u>1520</u>
C	<u>3440^a</u> , <u>3416</u> , <u>3324</u>	<u>1730</u> , <u>1700</u> , <u>1666</u> , <u>1528</u>
BC	<u>3442</u> , <u>3424^a</u> , <u>3308^b</u>	<u>1720</u> , <u>1696^a</u> , <u>1658</u> , <u>1532</u>
ABC	<u>3478</u> , <u>3432^a</u> , <u>3312^b</u>	<u>1732</u> , <u>1708^a</u> , <u>1660^b</u> , <u>1638^a</u> , <u>1540</u>
Tilopectina B	<u>3482^a</u> , <u>3430^a</u> , <u>3412^a</u> , <u>3296^b</u>	<u>1710^a</u> , <u>1682^a</u> , <u>1656^b</u> , <u>1634^a</u> , <u>1542^b</u>

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

Tabella 3.3 Frequenze di assorbimento IR dei frammenti **A**, **B**, **C**, **BC**, **ABC** e **tilopectina B** in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-4} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}
A	<u>3478</u> , <u>3434</u> , <u>3404^a</u> , <u>3370^a</u>
B	<u>3442</u> , <u>3422^a</u> , <u>3396^a</u> , <u>3326^b</u>
C	<u>3440^a</u> , <u>3416</u> , <u>3322</u>
BC	<u>3442</u> , <u>3422^a</u> , <u>3308^b</u>
ABC	<u>3476</u> , <u>3434^a</u> , <u>3316^b</u>
Tilopectina B	<u>3478^a</u> , <u>3432^a</u> , <u>3412^a</u> , <u>3302^b</u>

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

La figura 3.16 mette a confronto le curve di diversi frammenti (**C**, **BC**, **ABC**) per poter valutare il contributo dell'allungamento della catena sulla struttura. La figura 3.17 mostra gli spettri relativi alla tilopectina B, preparata mediante sintesi su fase solida, e al suo analogo, sintetizzato in soluzione.

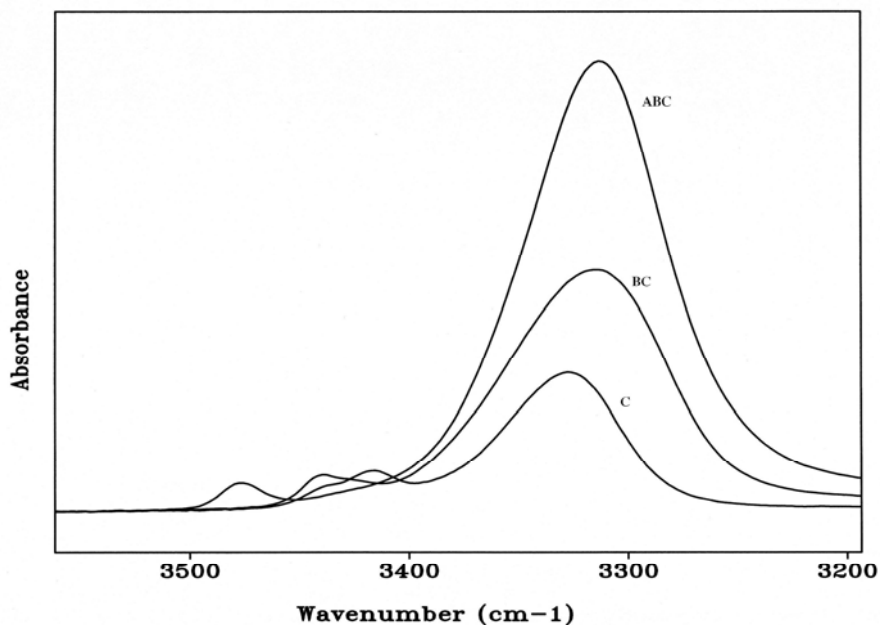


Figura 3.16 Spettri di assorbimento IR dei peptidi **C**, **BC**, **ABC** nella zona di stiramento dei legami N-H, in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

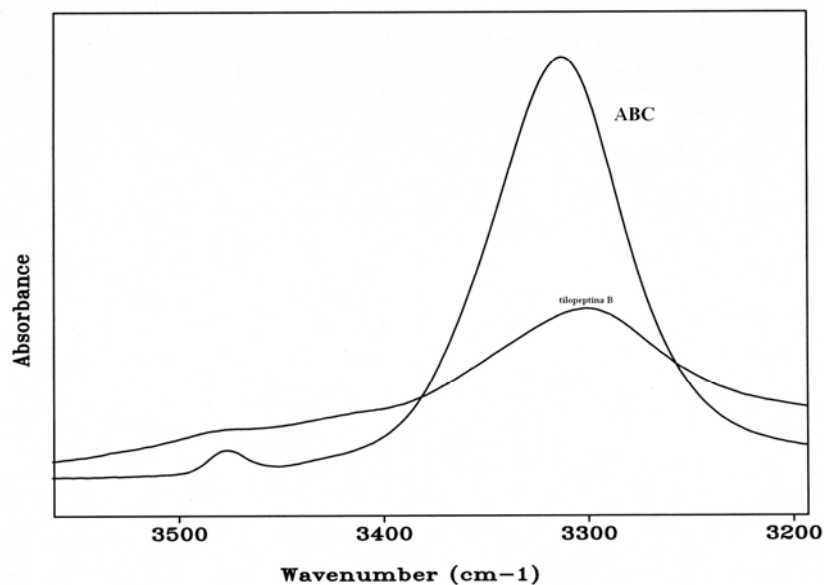


Figura 3.17 Spettri di assorbimento IR della **tilopeptina B** e del suo analogo **ABC** nella regione $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ in CDCl_3 alle concentrazioni 1×10^{-3} M.

Di seguito sono mostrati gli spettri di ciascuno dei peptidi nella regione $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ ottenuti alle concentrazioni 1×10^{-3} e 1×10^{-4} M. Tali spettri sono normalizzati in quanto per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10 si è

utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore (1.0 mm per 1×10^{-3} M e 10.0 mm per 1×10^{-4} M).

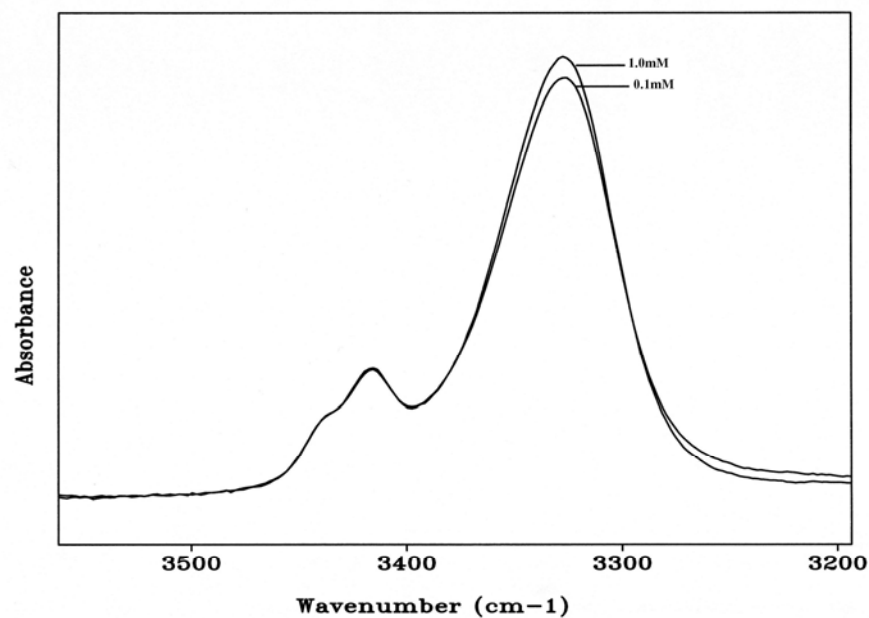


Figura 3.18 Spettri di assorbimento IR del frammento **C** nella regione 3500-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.

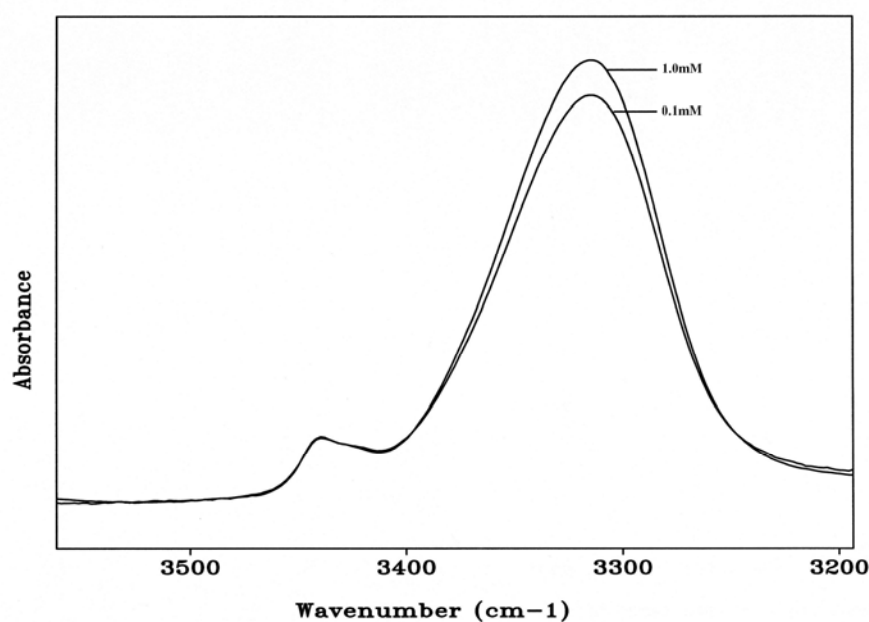


Figura 3.19 Spettri di assorbimento IR del frammento **BC** nella regione 3500-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.

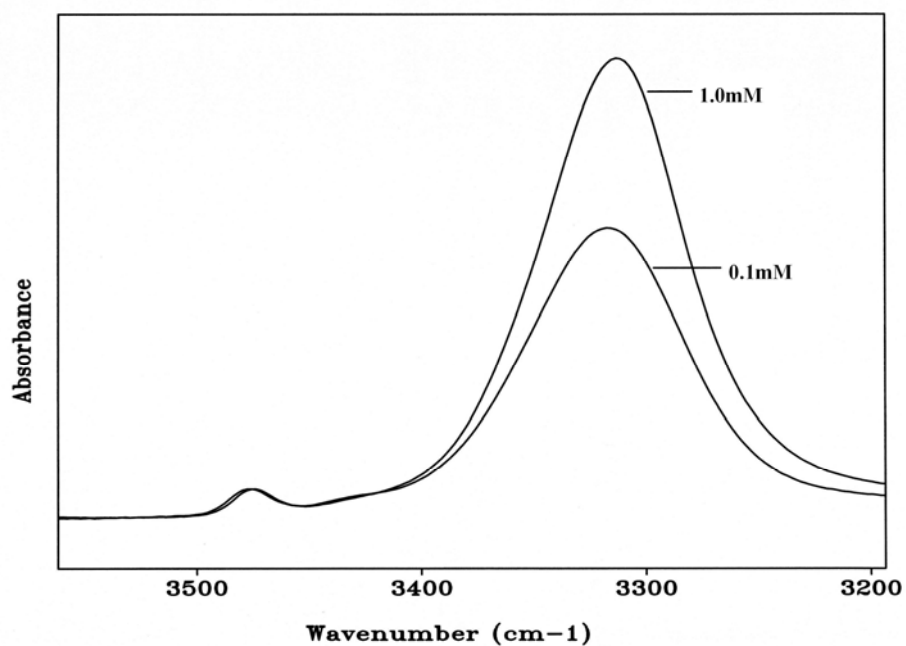


Figura 3.20 Spettri di assorbimento IR del peptide **ABC** nella regione 3500-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1×10⁻³ M e 1×10⁻⁴ M.

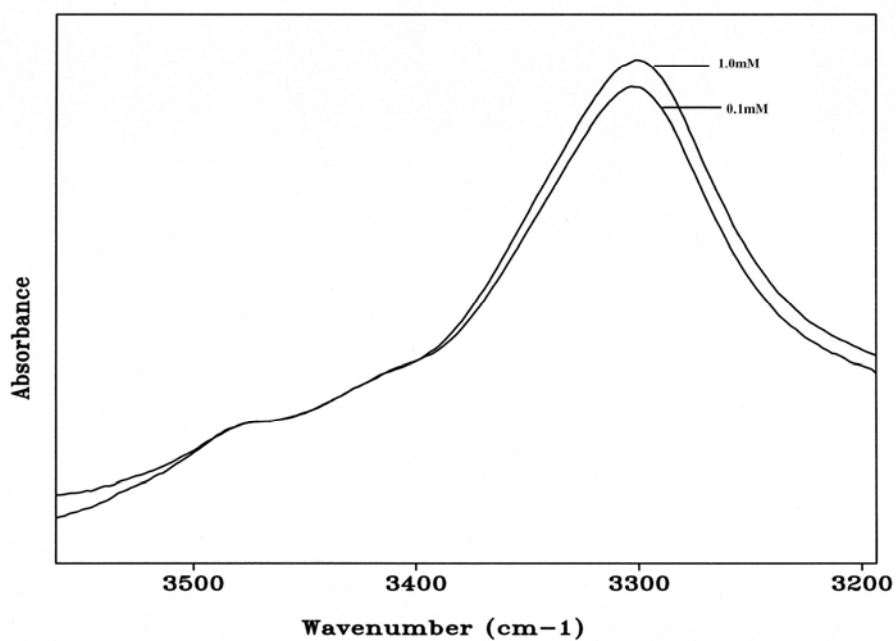


Figura 3.21 Spettri di assorbimento IR della **tilopectina B** nella regione 3500-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1×10⁻³ M (A) e 1×10⁻⁴ M (B).

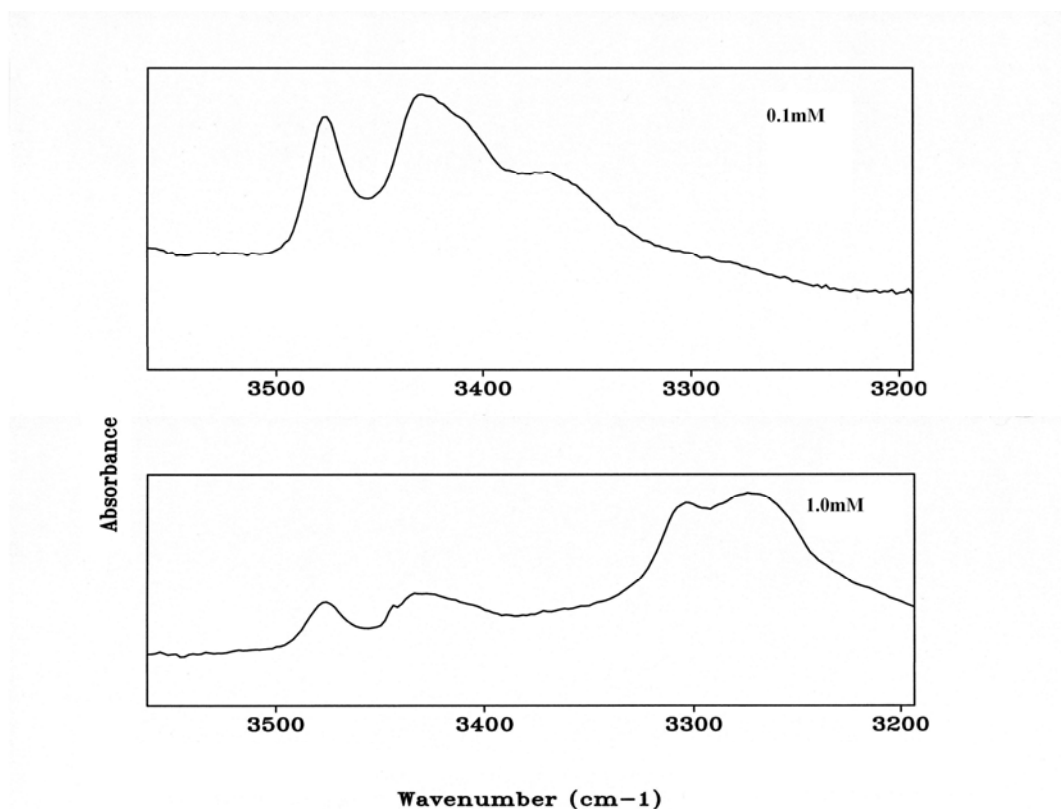


Figura 3.22 Spettri di assorbimento IR del frammento A nella regione 3500-3200 cm^{-1} in CDCl_3 alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.

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

- Nella regione spettrale 3500-3200 cm^{-1} tutti i peptidi esaminati (eccetto il frammento A) 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 a idrogeno^[91-93]. La banda intorno a 3478 cm^{-1} , che si osserva negli spettri della **tilopeptina B**, del peptide **ABC** e del segmento **A** e che è assente negli altri peptidi, è attribuibile allo stiramento del gruppo NH del Trp (Figura 3.16). Per quanto riguarda lo spettro della **tilopeptina B**, va ricordato che lo stiramento asimmetrico e simmetrico dei due gruppi ammidici primari liberi e solvatati delle Gln^[90] cade nella stessa zona. L'eventuale presenza delle corrispondenti bande di assorbimento dei gruppi ammidici primari legati non è identificabile in quanto tali bande, se presenti, sarebbero coperte dalla banda larga e intensa dovuta ai gruppi N-H peptidici legati.

- 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. Il confronto tra **ABC** (sequenza con il residuo Lol protetto) con la **tilopeptina B** (Figura 3.17) evidenzia che lo spettro di quest'ultima è molto allargato: probabilmente questa caratteristica è dovuta al fatto che i peptidi sintetizzati in fase solida hanno un contenuto d'acqua superiore agli altri. L'individuazione della posizione esatta del massimo di assorbimento del legame O-H del Lol non è pertanto possibile.
- Lo studio degli effetti della diluizione porta a ritenere che i legami idrogeno osservati sugli N-H peptidici siano prevalentemente di tipo *intramolecolare*^[91-93], ad eccezione del frammento **A**: in tutti i casi infatti l'intensità delle bande fra 3340-3300 cm⁻¹ diminuisce debolmente con la diluizione da 1×10⁻³ M a 1×10⁻⁴ M. Una variazione leggermente più marcata è riscontrabile per il peptide **ABC**. Lo spettro del frammento **A** alla concentrazione di 1×10⁻³ M (Figura 3.22), a differenza degli altri, mostra una banda molto intensa a 3260 cm⁻¹. A tale frequenza si trovano usualmente gli *stretching* di N-H ammidici coinvolti in legami a idrogeno *intermolecolari*, come ad esempio nel caso delle strutture β. Il segmento A, pertanto, adotta probabilmente una struttura β, come dimostrato dal fatto che diluendo il peptide tale banda scompare. A supporto di tale conclusione sta anche l'osservazione che la solubilità del segmento **A** è molto modesta alla concentrazione di 1×10⁻³ M.
- In Figura 3.16 si osserva che con l'elongazione della catena peptidica aumenta l'intensità della banda degli NH legati e il massimo di assorbimento si sposta a frequenze d'onda minori. Ciò significa che, a mano a mano che i segmenti diventano più lunghi, la catena peptidica si organizza in una struttura secondaria stabilizzata da legami a idrogeno *intramolecolari*.
- Per quanto riguarda la regione spettrale 1800-1600 cm⁻¹ (Tabelle 3.2 e 3.3), nella zona 1710-1740 cm⁻¹ cadono i picchi di assorbimento delle vibrazioni di stiramento dei gruppi C=O estere (benzilico e metilico) e dei gruppi C=O uretanici.^[91-93] I gruppi C=O peptidici e ammidici (banda ammidici I) risuonano nell'intervallo spettrale 1685 - 1659 cm⁻¹.^[91-93] Negli spettri dei peptidi più lunghi il massimo di assorbimento della banda ammidici I è localizzato a 1660-1656 cm⁻¹. Tale massimo è prossimo alla posizione canonica della banda ammidici I delle strutture elicoidali di

tipo α (1658 cm^{-1}) e 3_{10} (1662 cm^{-1}). Oltre a queste bande, il frammento **A** presenta un picco a 1620 cm^{-1} , che è da attribuire alla presenza di struttura β : questo è in accordo con le considerazioni fatte sulla zona degli NH.

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

3.2.2 Spettrometria NMR

Mediante spettrometria NMR è stato possibile indagare la conformazione della tilopectina B, sintetizzata in fase solida, e del suo analogo protetto ottenuto mediante sintesi in soluzione. Per entrambi i peptidi gli spettri bidimensionali sono stati acquisiti in CD₃OH, in modo da poter fare un confronto con i risultati ottenuti dal dicroismo circolare nello stesso solvente.

Tutte le risonanze protoniche sono state assegnate, per entrambi i peptidi (Tabelle 3.4 e 3.5, rispettivamente) usando le procedure descritte da Wüthrich^[94] (Figura 3.23).

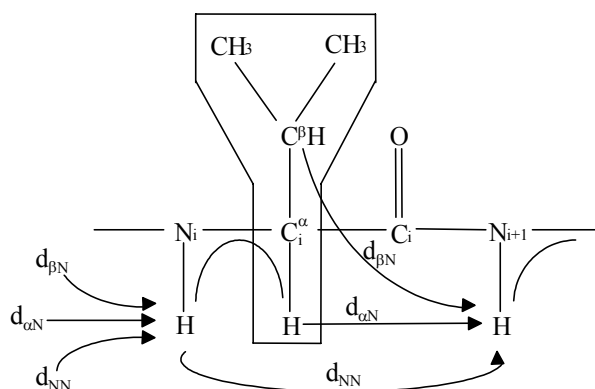


Figura 3.23 Porzione della catena peptidica con indicazione delle correlazioni C^αH-NH COSY (linee) e delle correlazioni ROESY sequenziali (frecce).

Tabella 3.4 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per la tilopectina B (600 MHz, 6.6 mM in CD₃OH, 298K).

Residuo	NH	αH	βH	γH	δH	Altri
Ac		2.044				
Trp ¹	8.185	4.502	3.252			εNH 10.415; H-2 7.227; H-4 7.514; H-5 6.988; H-6 7.088; H-7 7.334
Val ²	7.594	3.570	1.923	0.895, 0.715		
Aib ³	7.569		1.416, 1.430			
Aib ⁴	7.881		1.477, 1.509			
Ala ⁵	8.024	4.040	1.503			
Gln ⁶	8.243	4.088	2.207, 2.308	2.485		δNH 6.712, 7.413
Ala ⁷	7.856	3.999	1.506			
Aib ⁸	8.242		1.507, 1.565			
Ser ⁹	7.855	4.045	3.910, 4.002			OH 5.173
Aib ¹⁰	8.144		1.486, 1.581			
Ala ¹¹	7.872	4.108	1.511			
Leu ¹²	8.172	4.019	1.634, 1.892	1.874	0.931	
Aib ¹³	8.017		1.507, 1.550			
Gln ¹⁴	7.520	4.179	2.287, 2.133	2.535, 2.400		δNH 6.819, 7.502
Lol ¹⁵	7.575	4.008	1.338, 1.609	1.744	0.914	β ² -CH ₂ OH 3.557; OH 5.351

Tabella 3.5 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per la tiliopeptina (400 MHz, 5.0 mM in CD₃OH, 298K).

Residuo	NH	α H	β H	γ H	δ H	Altri
Ac		2.038				
Trp ¹	8.164	4.496	3.249			ϵ NH 10.415; H-2 7.224 ; H-4 7.521; H-5 6.987; H-6 7.092; H-7 7.334
Val ²	7.581	3.550	1.904	0.725, 0.880		
Aib ³	7.505		1.379, 1.427			
Aib ⁴	7.813		1.460, 1.505			
Ala ⁵	7.984	3.998	1.426			
Glu(OMe) ⁶	8.091	3.970	2.121, 2.295	2.541		
Ala ⁷	7.791	4.028	1.495			
Aib ⁸	8.038		1.482, 1.578			
Ser(OBzl) ⁹	8.038	4.151	3.889, 4.147			CH ₂ -Bzl 5.190; Ph-Bzl 7.36-7.24
Aib ¹⁰	8.247		1.482, 1.581			
Ala ¹¹	7.869	4.064	1.507			
Leu ¹²	7.976	4.098	1.656, 1.899	1.905	0.863, 0.924	
Aib ¹³	7.737		1.502, 1.520			
Glu(OMe) ¹⁴	7.622	4.218	2.140, 2.272	2.447, 2.604		
Lol(OBzl) ¹⁵	7.482	4.141	1.593, 1.395	1.761	0.866, 0.912	β^2 -CH ₂ OBzl 3.462; CH ₂ -Bzl 4.526; Ph-Bzl 7.36-7.24

In Figura 3.24 si riporta la regione dello spettro ROESY (*Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)^[95,96] in cui cadono le risonanze dei protoni ammidici.

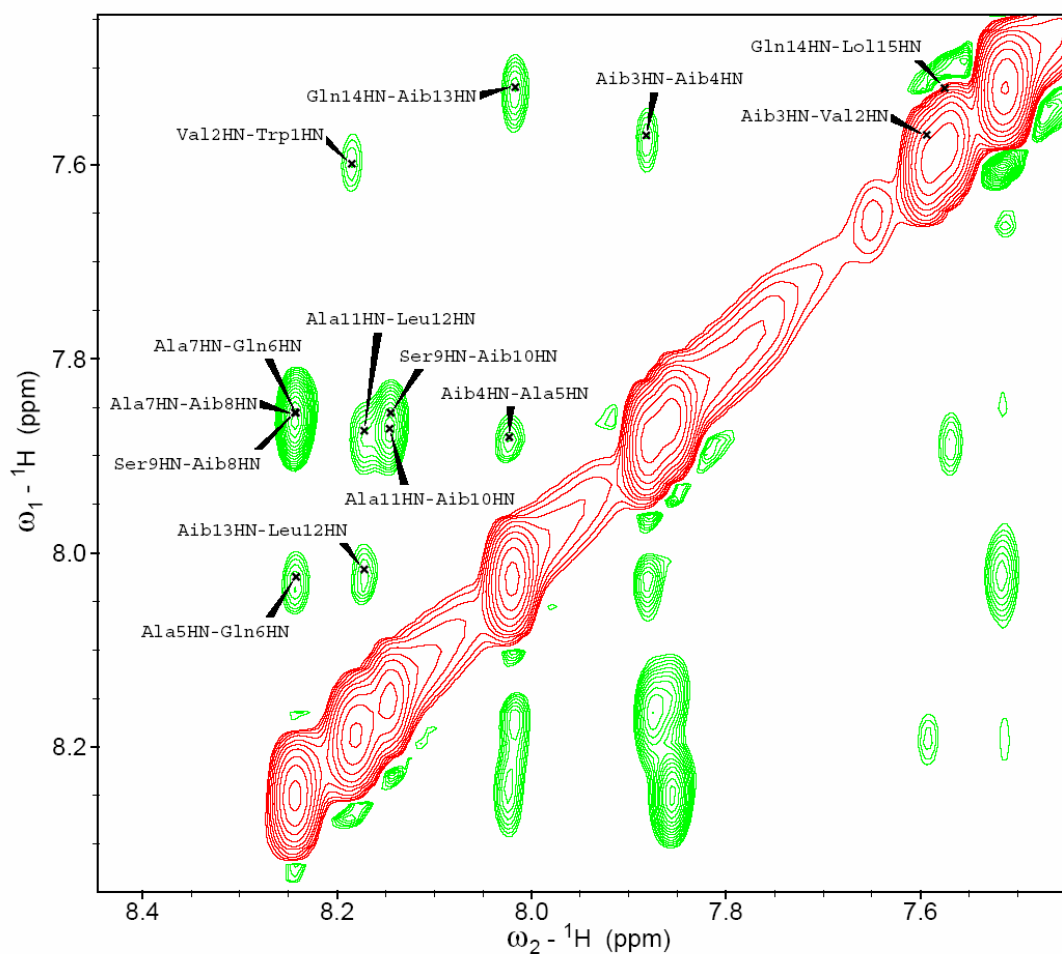


Figura 3.24 Regione dei protoni ammidici dello spettro ROESY della tilopeptina B (6.6 mM in CD_3OH , 298K, 600 MHz).

Dato che il *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) dipende dalla distanza tra due protoni, la presenza di un *cross-peak* tra segnali appartenenti a protoni di residui diversi è diagnostica della loro vicinanza spaziale. La probabilità di trovare un picco di correlazione sarà massima per protoni di residui non troppo distanti nella struttura primaria. I residui vicini sono pertanto identificabili mediante *cross-peak* sequenziali di tipo $(i) \rightarrow (i+1)$. Nelle Figure 3.24 e 3.25 si possono osservare tutti i cross-picchi $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$ per i due peptidi esaminati. Queste correlazioni sono tipiche di strutture elicoidali.

La sovrapposizione dei segnali di alcuni protoni ammidici ha complicato il lavoro di assegnazione sequenziale, soprattutto per i residui di Aib. Le ambiguità sono state risolte grazie allo studio dello spettro eterocorrelato (${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$) HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), non riportato in questa Tesi.^[97]

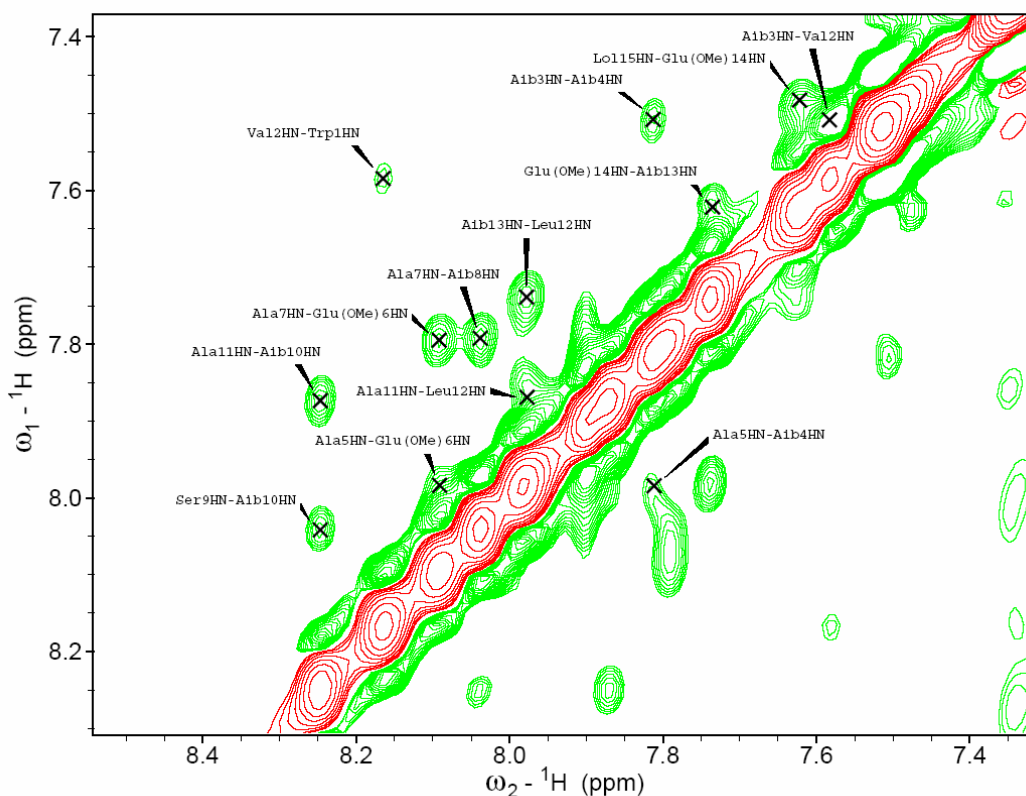


Figura 3.25 Regione dei protoni ammidici dello spettro ROESY della tiloeptina **ABC** (5.0 mM in CD_3OH , 298K, 400 MHz).

Informazioni rilevanti dal punto di vista strutturale si possono ricavare anche dallo studio della zona *fingerprint* degli spettri ROESY. In tale regione si collocano le correlazioni $\text{C}^\alpha\text{H}(i) \rightarrow \text{NH}(i+n)$, utili per definire il tipo di conformazione adottata dal peptide analizzato (Figure 3.26 e 3.27). Ad esempio, correlazioni $\text{C}^\alpha\text{H}(i) \rightarrow \text{NH}(i+2)$ sono diagnostiche della presenza di una struttura elicoidale 3_{10} , correlazioni $\text{C}^\alpha\text{H}(i) \rightarrow \text{NH}(i+4)$ sono indicative della presenza di un'elica α , mentre correlazioni di tipo $\text{C}^\alpha\text{H}(i) \rightarrow \text{NH}(i+3)$ sono compatibili con entrambe le conformazioni elicoidali α o 3_{10} .^[94]

Nelle Figure 3.26 e 3.27 sono osservabili sia correlazioni $\text{C}^\alpha\text{H}(i) \rightarrow \text{NH}(i+2)$, tipiche di eliche di tipo 3_{10} , sia $\text{C}^\alpha\text{H}(i) \rightarrow \text{NH}(i+4)$ diagnostiche di strutture α -elicoidali.^[94]

Pertanto, è ragionevole concludere che entrambi i peptidi studiati assumano una conformazione elicoidale in soluzione di metanolo. In questa fase dell'analisi non è tuttavia possibile stabilire se le strutture elicoidali siano di tipo α , 3_{10} o miste. Saranno necessari ulteriori approfondimenti, mediante calcoli conformazionali e/o studi di dinamica molecolare, per assegnare compiutamente il tipo di struttura secondaria

adottata dai due peptidi. E' comunque interessante rilevare che anche in metanolo, solvente in grado di competere nella formazione di legami a idrogeno, i due peptidi mantengono la predilezione per le strutture elicoidali già osservata in cloroformio mediante analisi di assorbimento IR.

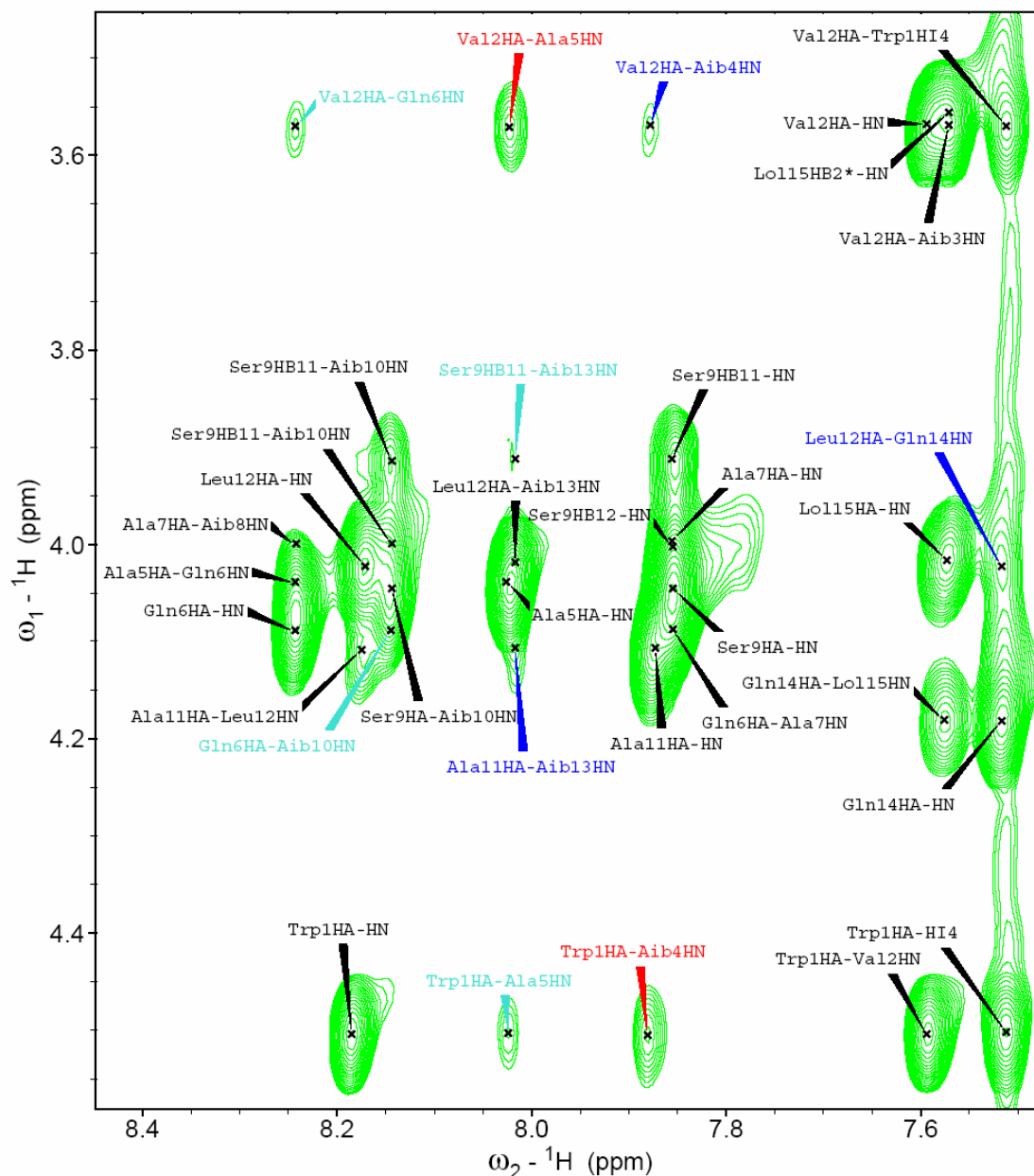


Figura 3.26 Regione *fingerprint* dello spettro ROESY della tilopeptina B (6.6 mM in CD_3OH , 298K, 600 MHz). Sono evidenziate le interazioni a medio raggio di tipo $i \rightarrow i+2$ (in blu), $i \rightarrow i+3$ (in rosso) e $i \rightarrow i+4$ (in celeste).

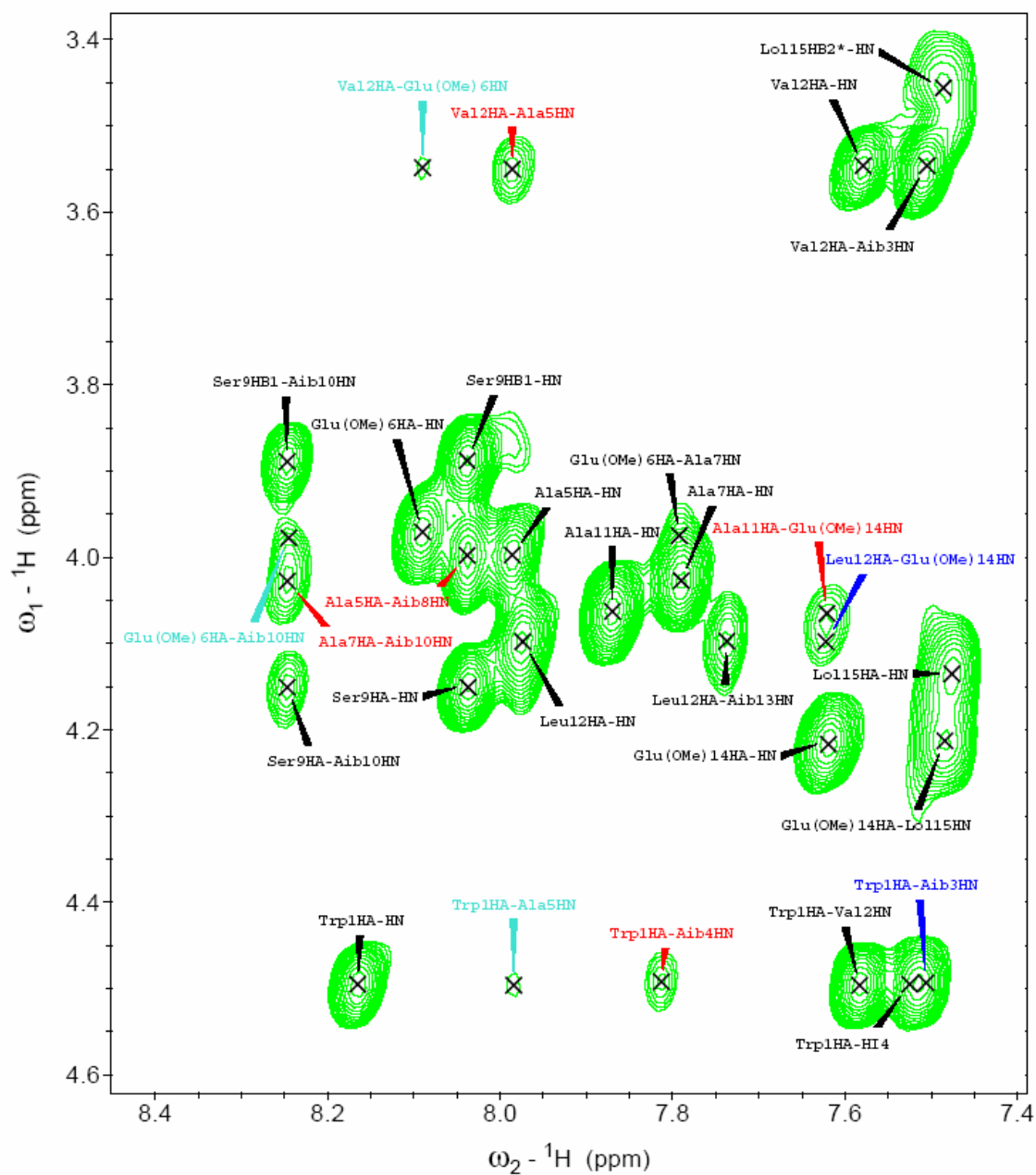


Figura 3.27 Regione *fingerprint* dello spettro ROESY della tilopeptina ABC (5.0 mM in CD₃OH, 298K, 400 MHz) Sono evidenziate le interazioni a medio raggio di tipo $i \rightarrow i+2$ (in blu), $i \rightarrow i+3$ (in rosso) e $i \rightarrow i+4$ (in celeste).

3.2.3 Dicroismo circolare

Le preferenze conformazionali della tilopeptina B e dell'analogo [Glu(OMe)⁶⁻¹⁴Ser(Bzl)⁹Lol(Bzl)¹⁵] tilopeptina B, sintetizzati in questa Tesi, sono state investigate anche mediante dicroismo circolare (CD). Come solventi per l'analisi sono stati utilizzati 2,2,2-trifluoroetano (TFE), metanolo e SDS 30 mM in acqua. Il TFE è un solvente che promuove ripiegamenti elicoidali; il metanolo è lo stesso solvente impiegato negli studi ¹H-NMR e questo ne permette il confronto; l'SDS crea un ambiente membrano-mimetico. L'analisi CD in CDCl₃, solvente utilizzato per le misure di assorbimento IR, è preclusa dal forte assorbimento di tale solvente nella zona spettrale dove assorbe il cromoforo ammidico (180-250 nm).

Le misure sono state condotte a temperatura ambiente e alla concentrazione 1×10^{-4} M. Si è studiata in particolare la zona tra 190 nm e 260 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 (i C^α degli amminoacidi) e di strutture elicoidali (intrinsecamente dissimetriche) le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD. Le concentrazioni effettive dei peptidi nelle varie soluzioni sono state calcolate dagli spettri di assorbimento UV, prendendo come riferimento il massimo di assorbimento del Trp a 278.4nm. Gli spettri della tilopeptina B e dell'analogo sono riportati nelle figure 3.28 e 3.29.

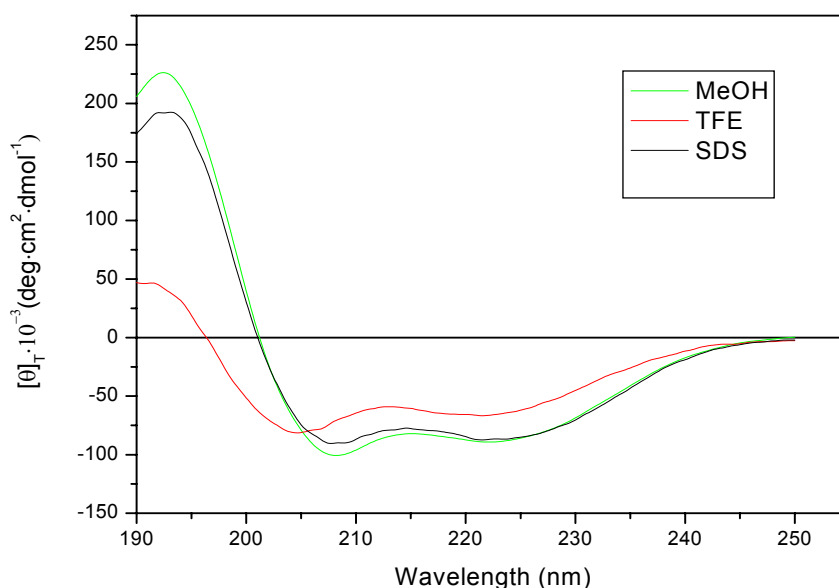


Figura 3.28 Spettri CD della tilopeptina B alla concentrazione 1×10^{-4} M.

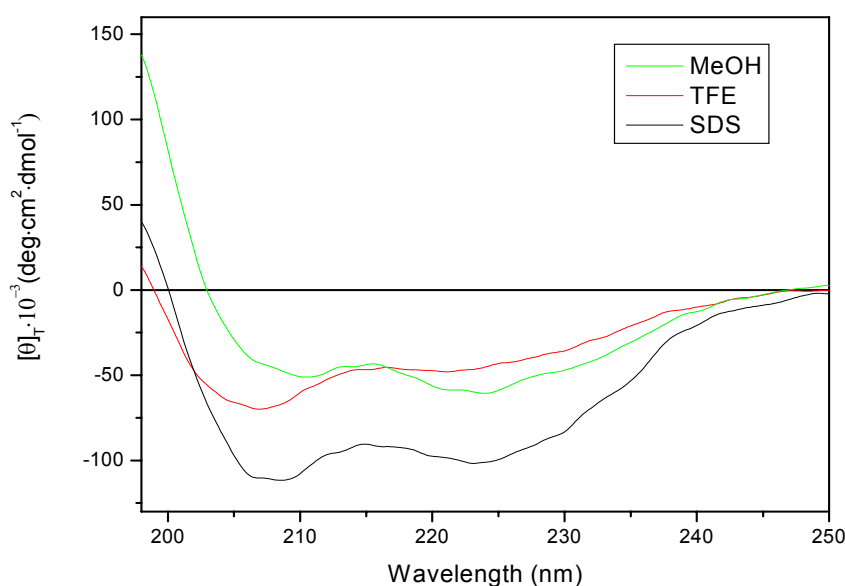


Figura 3.29 Spettri CD dell'analogo ABC alla concentrazione 1×10^{-4} M.

Andamenti di questo tipo si riscontrano in strutture elicoidali destrogire sia di tipo α che 3_{10} .^[98-100] In particolare, le posizioni canoniche per le bande dicroiche di una α -elica sono 222 e 208 nm e il rapporto tra le loro intensità ($R = [\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$) è circa pari a 1. Inoltre, in un'elica destrogira tali bande sono negative. Sulla base di studi computazionali^[101] è stato suggerito che un possibile criterio di distinzione tra strutture elicoidali di tipo α e 3_{10} si basi non tanto sulle posizioni delle bande, che sono molto simili per le due strutture, quanto piuttosto sulle intensità relative delle bande stesse. Nell'elica 3_{10} , infatti, la banda a circa 222 nm è meno intensa di quella a circa 208 nm ed R risulta inferiore o uguale a 0.4.

Tabella 3.6 Rapporti $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ per i peptidi di Figura 3.28 e di Figura 3.29.

Peptide	solvente	$[\Theta]_T 10^{-3}$ (λ , nm)	R
Tilopeptina B	MeOH	-100.7 (208.2) -89.2 (222.0)	0.88
	TFE	-81.3 (204.6) -66.7 (222.0)	0.82
	SDS	-98.4 (207.8) -87.4 (221.4)	0.89
[Glu(OMe) ⁶⁻¹⁴ Ser(Bzl) ⁹ Lol(Bzl) ¹⁵] tilopeptina B	MeOH	-51.1 (210.6) -60.4 (223.6)	1.18
	TFE	-69.9 (207.0) -48.0 (221.0)	0.69
	SDS	-111.7 (208.6) -101.7 (223.2)	0.91

Esaminando la Tabella 3.6, che riassume i parametri principali delle curve CD riportate nelle figure 3.28 e 3.29, si può ragionevolmente concludere che entrambi i peptidi adottano strutture elicoidali destrorse di tipo α , in tutti gli ambienti in cui sono state effettuate le misure. I valori di R, infatti, sono sempre prossimi ad 1. Questo risultato indica che la tilopeptina B e il suo analogo hanno una forte propensione intrinseca a stare ripiegati in elica, essendo trascurabile l'influenza dell'ambiente. Non è una conclusione sorprendente, bensì l'ennesima conferma che l'Aib (5 residui su 14 totali nella tilopeptina B) promuove e stabilizza strutture elicoidali nei peptidi in cui si trovi inserito.

Nonostante questa generale tendenza verso l' α -elica, alcune differenze si possono comunque evidenziare. In particolare, le curve CD della tilopeptina B in MeOH ed SDS sono tipicamente α -elicoidali, mentre sembra che in TFE esistano regioni a struttura 3_{10} -elicoidale. Tale possibilità è stata evidenziata anche dall'analisi NMR, pur se condotta in MeOH.

Un po' più complesso è il caso dell'analogo della tilopeptina. In particolare, lo spettro in MeOH presenta un valore di R superiore ad 1. In genere, tale situazione è interpretata con la formazione di aggregati. Poiché tuttavia l'analisi NMR condotta nello stesso solvente esclude tale fenomeno, si è più inclini a ritenere che negli spettri CD di questo peptide vi sia un contributo non trascurabile da parte degli anelli aromatici (indolo di Trp e due fenili benzilici su Ser e Lol). Essi non sono intrinsecamente chirali, ma diventano otticamente attivi per induzione da parte dell'elica peptidica cui sono legati. Pertanto, pur ritenendo che il peptide sia elicoidale, confortati in questo anche dall'analisi NMR, non riteniamo di poter speculare molto sugli spettri di figura 3.29 avendo il sospetto che anche i cromofori aromatici contribuiscano al segnale dicroico nella regione 190-250 nm.

In conclusione, questa indagine mediante CD consente di affermare che gli analoghi sintetizzati assumono prevalentemente una struttura α -elicoidale, di notevole stabilità. Tale dato è in accordo con i risultati degli studi di assorbimento IR e spettrometria NMR riportati in questa Tesi.

3.3 Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali

La tilopeptina B e il suo analogo [Glu(OMe)^{6,14}Ser(Bzl)⁹Lol(Bzl)¹⁵] tilopeptina B, sintetizzati in questa Tesi, sono stati saggiati in un test preliminare al fine di verificare se posseggano la capacità di alterare la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici. Come termine di confronto cui rapportare le attività misurate è stata usata la tricogina, un peptaibolico studiato a lungo in questo Laboratorio.^[102]

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, 30 e 50 minuti (50 minuti solo per la tilopeptina ottenuta su fase solida) dall'aggiunta del peptide alla soluzione dei liposomi. Una rappresentazione schematica dell'esperimento è riportata in Figura 3.30.

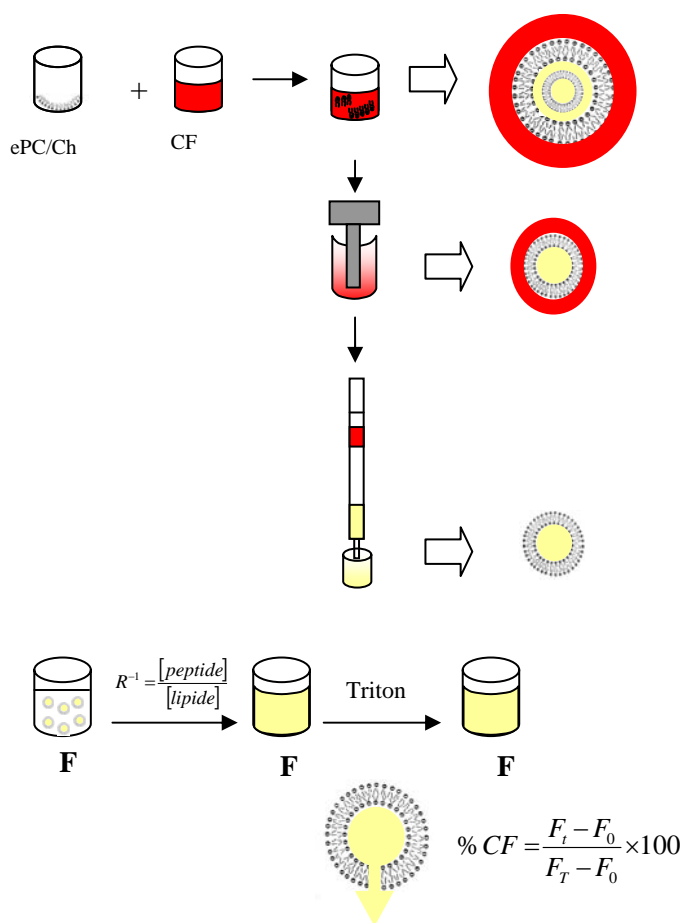


Figura 3.30 Schema dell'esperimento "leakage".

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 3.31 sono riportati i risultati della misure di rilascio di CF da liposomi, ottenuti con le modalità sopra descritte. Si può osservare come l'andamento a sigmoide delle curve sia 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 aumenti con l'aumentare dell'idrofobicità totale del peptide: la tilopeptina B (spps), che presenta la funzionalità ammidica primaria della Gln e quelle alcoliche (non protette) di Ser e Lol, risulta essere un po' meno attiva dell'analogo totalmente protetto. Questo può essere dovuto ad una maggiore affinità dell'analogo della tilopeptina 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 peptidici. Infatti, le membrane delle cellule batteriche sono alquanto diverse dal modello qui utilizzato. Sarà pertanto necessario attendere l'esito degli studi antibatterici che saranno condotti su questi peptidi.

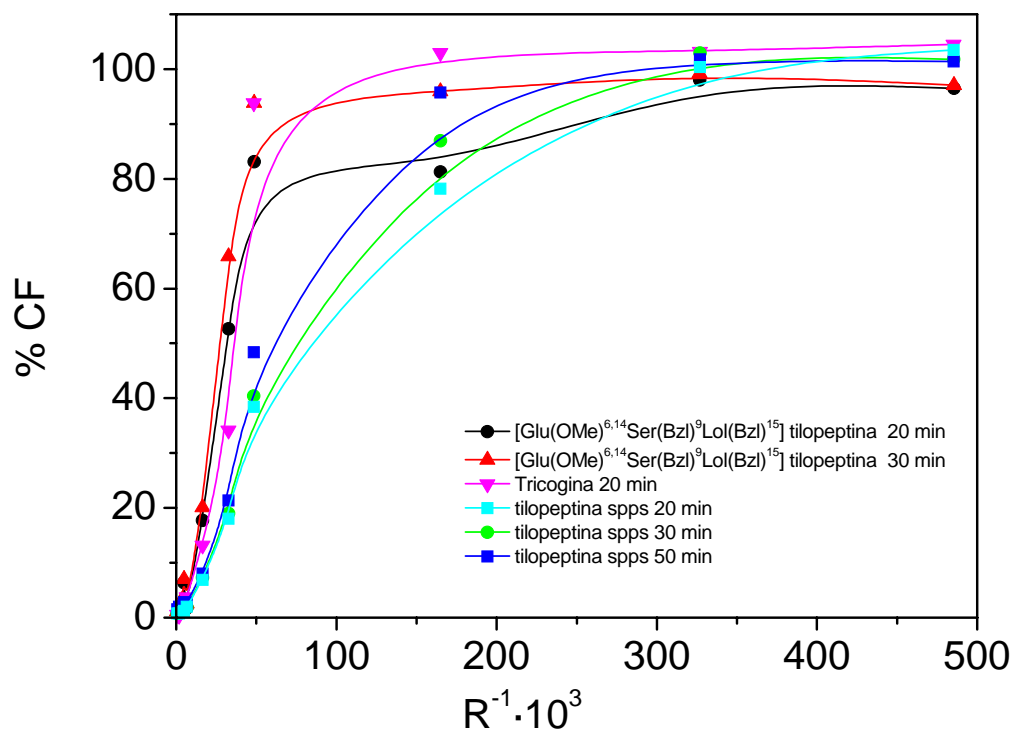


Figura 3.31 Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch (7:3) dopo 20, 30 e 50 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto da tricogina-OMe, tilopeptina B (tilopeptina spps), $[\text{Glu}(\text{OMe})^{6,14}\text{Ser}(\text{Bzl})^9\text{Lol}(\text{Bzl})^{15}]$ tilopeptina B.

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 la tilopeptina B. In entrambi i metodi di sintesi sono stati affrontati e superati i problemi posti dalla scarsa reattività dei residui di Aib.

In particolare, la strategia di condensazione di segmenti consente di poter programmare e preparare quantità discrete di peptidi intermedi, opportunamente funzionalizzati con sonde di varia natura (fluorofori, radicali liberi, sonde NMR, gruppi chelanti). In tal modo sarà relativamente facile e veloce assemblare analoghi della tilopeptina B, 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 α -elicoidali.

Studi preliminari di interazione con membrane modello, vescicole formate da fosfatidilcolina e colesterolo, indicano che la tilopeptina B e il suo analogo protetto sono in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici.

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., Epand, R. F. e Epand, 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. Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 18949 (1995).
 71. Wada, S., Iida, A., Akimoto, N., Kanai, M., Toyama, N., Fujita, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 910 (1995).
 72. Wada, S., Iida, A., Asami, K., Fujita, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2275 (1996).
 73. Iida, A., Senekata, M., Wada, S., Fujita, T., Tanaka, H., Enoki, A., Fuse, G., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 392 (1995).
 74. Menestrina, G., Voges, K., Jung, G., Boheim, G., *J. Membr. Biol.*, **93**, 111 (1986).
 75. S.-J. Lee, B.-S. Yun, D.-H. Cho, I.-D. Yoo, *J. Antibiot.*, **52**, 998 (1999).
 76. T. Neuhof, A. Berg, H. Besl, T. Schwecke, R. Dieckmann, H. Von Döhren, *Chemistry & Biodiversity* **4**, 1103 (2007).
 77. Hjørringgaard, C. U., Pedersen, J. M., Voosegard, T., Nielsen, N. C., Skrydstrup, T., *J. Org. Chem.*, **74**, 1329 (2009).
 78. Toson, E., *Tesi di Laurea in Chimica*, Dipartimento di Chimica Organica, Università di Padova, A. A. 2002/03.
 79. Still, W.C., Khan, M. e Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978).
 80. Paterson, Y., Stimson, E. R., Evans, D. J., Leach, S. J., Scheraga, H. A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982).
 81. Ten Kortenaar, P., Van Dijk, B. G., Marjolijn Peeters, J., Raaben, B. J., Adams, P. J. H., Tesser, G. I., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **27**, 398 (1986)]
 82. Voelter et al., *Tetrahedron*, **28**, 5963 (1972).
 83. (a) Wester, H., Schottelius, M., Scheidhauer, K., Reubi, J. C., Wolf, I., Schwaiger, M., *Eur. J. Nuc. Med.*, **29**, 28 (2002) ; (b) Bailey, J. L., *Techniques in protein chemistry*, Elsevier, New York, 2°ed, p 235 (1968)
 84. Czernecki, S., Georgoulious, C., Provelenghiou, C., *Tetrahedron Letters*, **39**, 3535 (1976).
 85. Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).

86. Bodanszky, M., Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, pp. 199-200 (1984).
87. Franzen, H., et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1699 (1984).
88. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).
89. (a) Toniolo, C., Crisma, M. e Formaggio, F., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 627 (1996); (b) Crisma, M., Valle, G., Moretto, V., Formaggio, F., Toniolo, C. e Albericio, F., *Lett. Pept. Sci.*, **5**, 247 (1998).
90. Bellamy, M., in *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London (1956).
91. Palumbo, M., Da Rin, S., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *Makromol. Chem.*, **177**, 1477 (1976).
92. Bonora, G. M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R. R. e Stevens, E. S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 179 (1984).
93. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
94. K. Wüthrich, *NMR of Protein and Nucleic Acids*, Wiley, New York (1986).
95. A.A. Bothner-By, R.L. Stephens, J. Lee, C.D. Warren e R.W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984).
96. D. Bax, e D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **63**, 207 (1985).
97. N.M. Bernassau e J.M. Nuzillard *J. Magn. Reson. Ser. B*, **103**, 77 (1994).
98. Beychok, S., in *"Poly- α -Amino Acids"*, Vol. 1, Fasman, G.D. Ed., Dekker, New York, pp. 293-337 (1967).
99. Woody, A.W. e Tinoco, I. Jr., *J. Chem. Phys.*, **46**, 4927 (1967).
100. Sudha, T.S., Vijayakumar, E.K.S. e Balaram, P., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **22**, 464 (1983).
101. Manning, M.C., Woody, R.W., *Biopolymers*, **31**, 569 (1991).
102. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Monaco, V., Goulard, C., Rebuffat, S., Bodo, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4952 (1996).