



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SINTESI E STUDI CONFORMAZIONALI DI α -OMO-PEPTIDI
COMPLETAMENTE TIONATI**

RELATORE: Prof. Ferdinando Formaggio

CONTRORELATRICE: Prof. Dolores Fregona

LAUREANDO: Bresolin Sebastiano

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Indice

| | |
|---|-----|
| Riassunto | iii |
| Abbreviazioni..... | v |
| | |
| 1. INTRODUZIONE | |
| 1.1. Le tioammidi | 2 |
| 1.2 I tiopeptidi..... | 3 |
| 1.3 Strutture secondarie degli α -peptidi..... | 5 |
| 1.4 Agenti tionanti per gruppi ammidici | 10 |
| 1.5 Introduzione alla “ <i>Sonochemistry</i> ” | 14 |
| | |
| 2. PARTE SPERIMENTALE | |
| 2.1. Materiali e metodi | 17 |
| 2.2. Strumentazione e metodi | 17 |
| 2.3. Sintesi in soluzione e caratterizzazione..... | 19 |
| | |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONE | |
| 3.1. Sintesi | 29 |
| 3.1.1. Gruppi protettori dei peptidi | 29 |
| 3.1.2. Metodi di attivazione..... | 29 |
| 3.2. Tionazione del legame peptidico | 31 |
| 3.3. Indagini conformazionali..... | 35 |
| 3.3.1 Assorbimento IR in soluzione..... | 35 |
| 3.3.2 Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ | 44 |
| 3.3.3 Dicroismo circolare | 51 |
| 3.4. Spettri NMR bidimensionali | 55 |
| | |
| 4. CONCLUSIONI | 69 |
| | |
| 5. APPENDICE | 71 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA..... | 75 |
| Ringraziamenti | 79 |

Riassunto

Questo lavoro di Tesi riporta la sintesi e lo studio della conformazione in soluzione, attraverso assorbimento IR, NMR mono e bidimensionale e dicroismo circolare, di α -omo-peptidi di Gly, Ala e Nleu, fino al tetramero, completamente tionati. Essi sono α -peptidi formati da uno stesso tipo di amminoacido e con i legami ammidici sostituiti dal gruppo isosterico tioammidico rappresentato dal simbolo “- Ψ [CS-NH]-”. In queste molecole il legame uretanico del gruppo protettore N-terminale e quello estereo del C-terminale rimangono inalterati. Gli omopeptidi della serie delle Gly sono stati ottenuti con tecniche di sintesi peptidica in soluzione, mentre gli altri sei peptidi (serie dell’Ala e della Nleu) erano già disponibili nel nostro Laboratorio. La tionazione è stata condotta mediante il Reagente di Lawesson in THF sia a temperatura ambiente che a riflusso. Tuttavia, per poter tionare gli omopeptidi delle Nleu si è dovuto ricorrere alla P_2S_5 con l’ausilio di ultrasuoni. In letteratura non sono presenti sintesi di alfa-peptidi con più di due legami tionati.

I peptidi preparati sono:

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe

Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe

Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe

L’indagine conformazionale di assorbimento IR in soluzione ($CDCl_3$) indica che la sostituzione dell’O ammidico con S impartisce strutturazione di tipo elicoidale e maggiore solubilità agli omopeptidi di Gly, Ala e Nleu. L’effetto sembra più marcato nella serie tio-omopeptidica dell’Ala.

L’analisi 1H -NMR, condotta valutando l’effetto dell’aggiunta di DMSO e TEMPO a soluzioni peptidiche in $CDCl_3$ indica una probabile strutturazione, anche se il confronto con i dati dell’indagine IR non consente di assegnare con certezza il tipo di struttura. Pertanto, saranno necessari ulteriori studi spettroscopici per individuare la conformazione preferita da questi tiopeptidi.

Abbreviazioni

AcOEt = acetato di etile

Ala = Alanina

Boc = ter-butylcarbammato

CD = dicroismo circolare

COSY = "CORrelation SpectroscopY" NMR

DCM = diclorometano

DMF = dimetilformammide

DMSO = dimetilsolfossido (o dimetilsolfossido- d_6 per l'NMR)

EDC = N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide

EtPetr = eteri di petrolio

EtOH = etanolo

Gly = Glicina

HOBT = 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo

HMBC = "*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy*"

HMQC = "*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectroscopy*"

i-BCF = isobutilcloroformiato

IR = spettroscopia di assorbimento infrarosso

MeOH = metanolo

MS = spettrometria di massa

MS-ESI = spettrometria di massa a "*electro spray ionization*"

MW = microonde

NMM = N-metilmorfolina

Nleu = Nor-Leucina

NMR = risonanza magnetica nucleare

NOESY = spettroscopia di correlazione dipolare

OMe = Gruppo metossi

OSu = 1-ossi-succinimide

R_f = fattore di ritenzione

RL = Reagente di Lawesson, (2,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetane-2,4-disulfide)

rpm = giri al minuto

rt = "*room temperature*"

TEA = trietilammina

TEMPO = "*(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxidanyl*"

TFE = 2,2,2-trifluoroetanolo

THF = tetraidrofurano

TLC = cromatografia su strato sottile

TMS = tetrametilsilano

TOCSY = spettroscopia di correlazione scalare omonucleare tipo Hartmann-Hahn

TOF = analizzatore a tempo di volo, "*time of flight*"

US = ultrasuoni

UV = ultravioletto

Z = benzilossicarbonile

Δ = sistema a riflusso

·))) = sistema catalizzato da ultrasuoni

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

1. Introduzione

Questo lavoro di Tesi riporta la sintesi e lo studio della conformazione di tre serie di α -omo-peptidi completamente tionati, cioè α -peptidi formati da uno stesso tipo di amminoacido e con i legami ammidici sostituiti dal gruppo isosterico tioammidico. In queste molecole il legame uretanico del protettore all'N-terminale e il gruppo estereo al C-terminale rimangono inalterati. In figura 1.1 viene mostrato un esempio di tetrapeptide tionato.

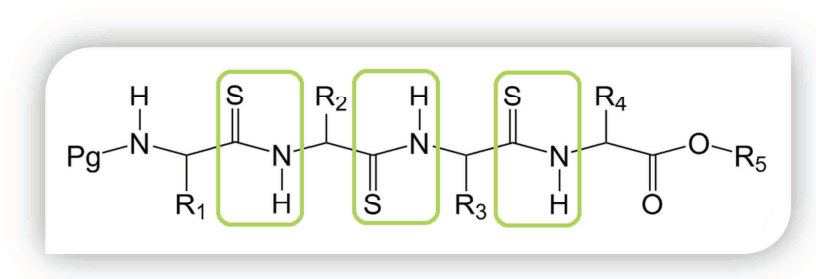


Figura 1.1 Omo-tetrapeptide tionato nei tre legami ammidici che uniscono i quattro residui ($R_1 = R_2 = R_3 = R_4$). Con Pg si intende il gruppo protettore.

Negli ultimi anni sono stati fatti diversi tentativi al fine di migliorare l'attività biologica o di aumentare la resistenza alla degradazione enzimatica di peptidi e proteine. Sono state introdotte molte modifiche dello scheletro peptidico, alcune di queste miravano a sostituire il gruppo ammidico con unità isosteriche.^[1,2]

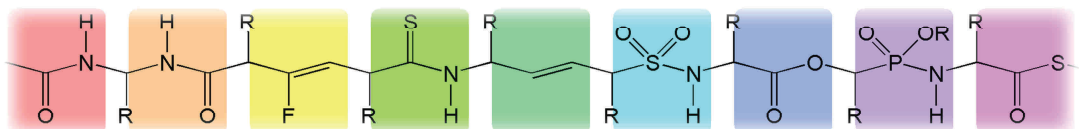


Figura 1.2 Peptide immaginario presentante i più importanti gruppi isosterici del legame ammidico; da sinistra a destra troviamo il gruppo ammidico, retro-ammidico, fluorovinilico, tioammidico, (E)-vinilico, sulfonammidico, estereo, fosfonammidato e tioestereo.^[2]

L'introduzione di gruppi isosterici può modificare molte proprietà di un peptide, dai parametri chimico-fisici, alla struttura tridimensionale, dalla resistenza alla degradazione enzimatica all'attività biologica. E' pertanto necessario studiare approfonditamente ed estesamente le singole variazioni per determinare gli effetti dati dal gruppo isosterico introdotto. In particolare, in questo lavoro di Tesi si vuole affrontare lo studio delle preferenze conformazionali degli α -peptidi poli-tionati. Non sono, infatti, disponibili dati significativi in letteratura. Pertanto, le sezioni seguenti di questa Introduzione forniscono informazioni di base su tioammidi e tiopeptidi e sulla stereochemica peptidica. Sono quindi illustrati brevemente reagenti e metodologie sintetiche utilizzabili per la sintesi di tiopeptidi.

1.1 Le tioammidi

La tioammide, isostericamente dell'amide, è un'amide con l'atomo di ossigeno sostituito da uno di zolfo. È rappresentato dal simbolo “-Ψ[CS-NH]-” quando essa sostituisce un normale legame ammidico all'interno di una catena peptidica.^[1] Tra i gruppi isosterici elencati in figura 1.2 è probabilmente quello più simile al gruppo ammidico, anche se ci sono differenze piuttosto rilevanti. C'è una maggiore acidità del protone NH nella tioammide, che può pertanto formare legami a idrogeno più forti. Al contrario, S è un accettore più debole di legami a idrogeno.^[2-5] Come l'amide, il gruppo tioammidico adotta principalmente una configurazione Z planare.^[6]

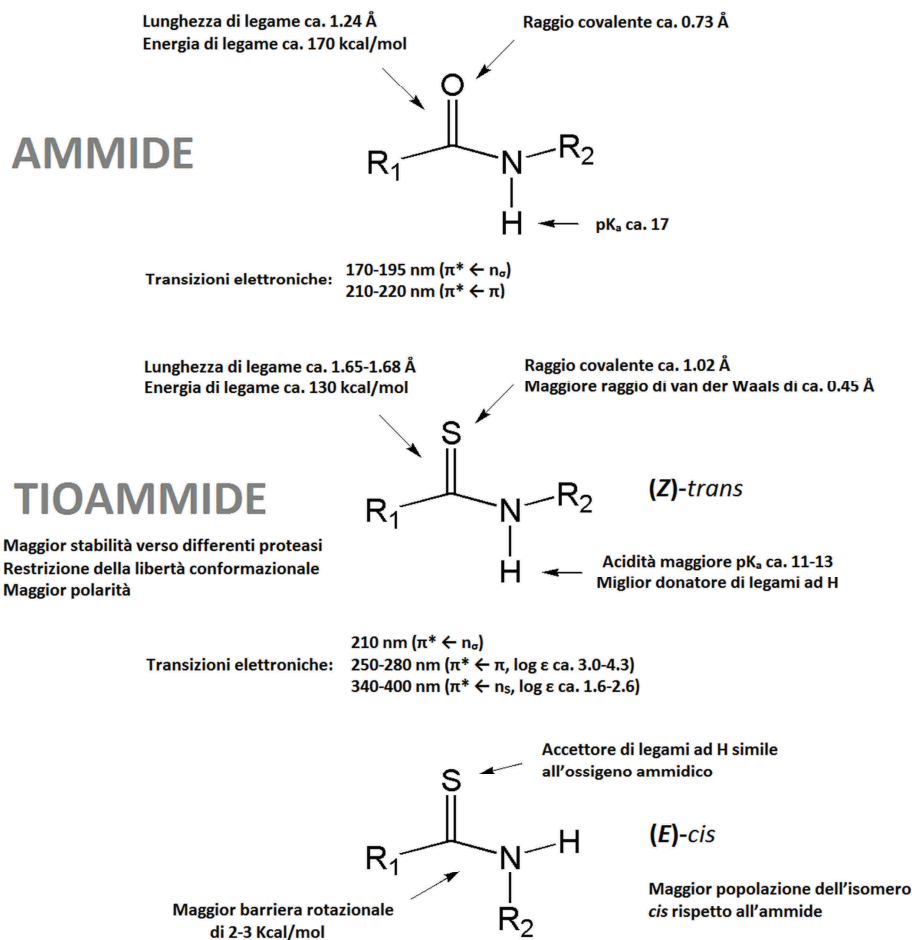


Figura 1.3 Confronto tra le principali proprietà del legame ammidico e di quello tioammidico.^[6]

La barriera rotazionale (*cis/trans*) attorno al legame C-N è superiore nella tioammide a causa del maggiore raggio di van der Waals dell'atomo di S e del più elevato trasferimento di carica da N ad S.^[5,7,8] Dall'altro lato le maggiori dimensioni del CS consentono una più ampia disponibilità di accesso da parte di solventi verso il gruppo tioammidico del peptide causando un aumento di solubilità.^[6]

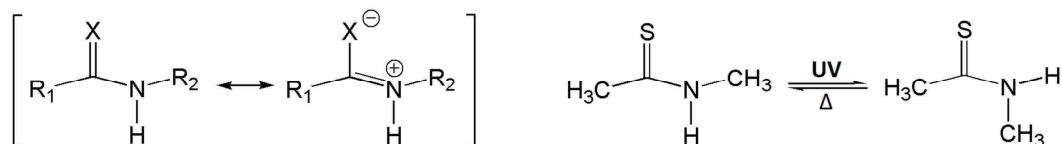


Figura 1.4 (a) Formula di risonanza dove $X=O, S$. Nella tioammide ($X=S$) c'è un maggior contributo dello zwitterione a destra.^[9] (b) Isomerizzazione attraverso irraggiamento del legame tioammidico (250-280 nm, $\pi^* \leftarrow \pi$).^[10,11]

Nella tioammide, rispetto all'ammide, vi è un contributo maggiore della formula di risonanza zwitterionica (figura 1.4a), poiché l'atomo di zolfo può delocalizzare meglio la carica negativa. Il gruppo tioammidico presenta anche altre interessanti caratteristiche dal punto di vista biofisico. Esso può isomerizzare da *trans* a *cis* se irradiato a circa 250-280 nm, lunghezza d'onda d'assorbimento della transizione $\pi^* \leftarrow \pi$.^[7] Inoltre, può essere utilizzato come *quencher* di fluorescenza.^[12] Incidentalmente, questa proprietà rende più agevole la rivelazione dei composti in *TLC* nelle fasi di sintesi e purificazione dei tiopeptidi, potendoli rivelare tramite lampada UV. Alcune molecole possono presentare odori sgradevoli dopo essere state tionate.^[13]

1.2 I tiopeptidi

Secondo uno studio di letteratura sembra che vi siano solo 5 molecole tioammidiche (figura 1.5) nelle 170000 sostanze naturali analizzate fino ad ora.^[14]

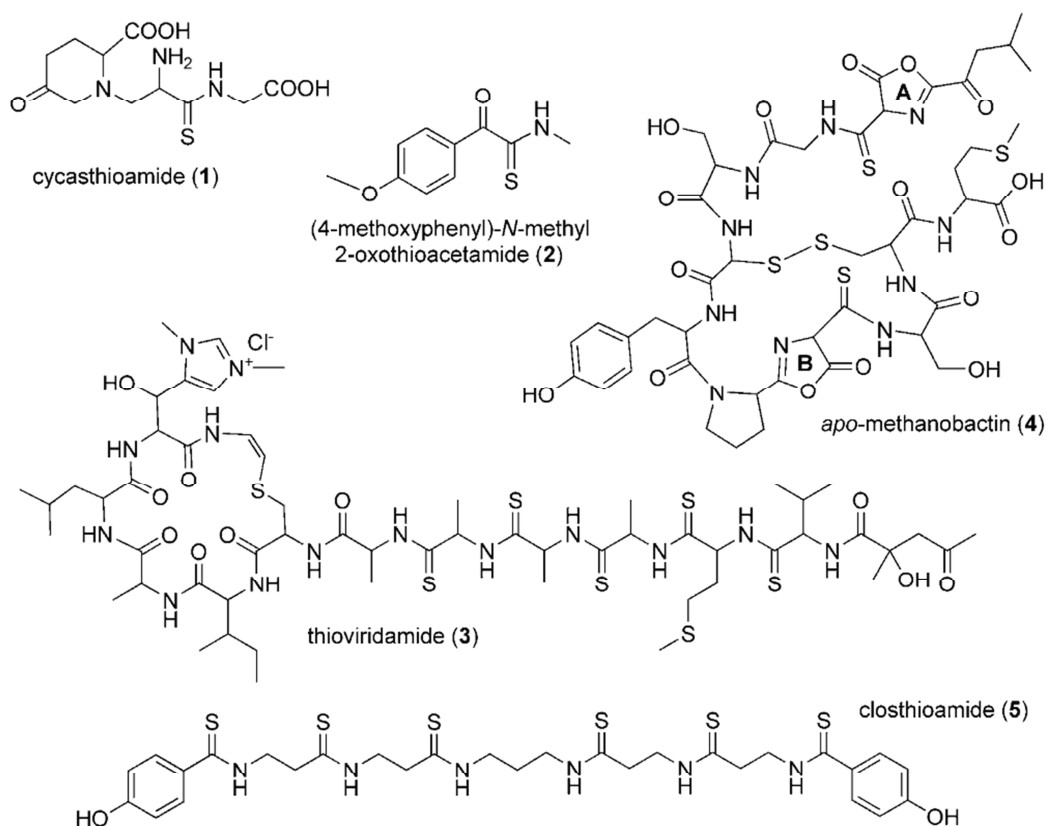


Figura 1.5 Le 5 sostanze naturali tionate conosciute secondo Süssmuth *et al.*^[14] (1) e (2) sono di origine vegetale, anche se (2) è sospettata di essere un artefatto dell'estrazione, mentre (3), (4) e (5) sono di origine batterica.

La Thioviridamide (**3**) è una molecola prodotta dal batterio *Streptomyces olivoviridis* ed è stata identificata come una possibile sostanza anti-tumorale.^[15] È importante far notare come questa molecola di origine batterica presenti ben quattro Ala con i legami tra loro tionati.

Molti studi hanno mirato a determinare l'influenza della tioammide sulla struttura tridimensionale dei peptidi. Gli studi computazionali indicano una minore libertà conformazionale per i residui peptidici che precedono e seguono una tioammide.^[16] Tali indicazioni sono state confermate da numerosi lavori sperimentali: i peptidi contenenti tioammidi assumono le stesse conformazioni delle ammidi equivalenti e in alcuni casi aumentano la stabilità termica di eliche peptidiche.^[5,6,17-19] Tuttavia, ci sono casi in cui la tioammide destabilizza strutture α -elicoidali.^[20]

Alcuni studi dimostrano sia la maggiore resistenza alla degradazione enzimatica sia, in alcuni casi, la maggiore attività biologica di molecole contenenti il gruppo tioamidico paragonate alle analoghe non tionate.^[4,20]

Anche nel Nostro Laboratorio, in precedenza, sono stati condotti studi su peptidi tionati. In particolare, recentemente sono stati sintetizzati antibiotici peptaibolici^[21] contenenti un singolo gruppo tioamidico in differenti posizioni dello scheletro peptidico per poterne migliorare la resistenza alla degradazione enzimatica. Gli antibiotici peptaibolici sono composti di natura peptidica che esplicano la loro attività antibatterica alterando la permeabilità nelle membrane degli organismi patogeni.^[22]

Nonostante l'ampia letteratura disponibile sui peptidi tionati, pochissimi sono gli studi che affrontano il tema della politionazione. Seebach^[6] riporta un interessante studio su sintesi e determinazione strutturale di un β -esapeptide contenente ben tre tioammidi: esso adotta una struttura secondaria alquanto simile all'analogo β -esapeptide non tionato (elica 3_{14}). Inoltre, è in corso di stampa uno studio sulla struttura secondaria di β -omo-tiopeptidi della β -Prolina.^[23]

Esempi di studi sistematici su α -peptidi poli-tioamidati non sono invece noti. Una delle ragioni di ciò potrebbe risiedere nella mancanza di un metodo sufficientemente efficace per tionare gli α -peptidi. Si potrebbe ipotizzare un impedimento sterico da parte delle catene laterali degli amminoacidi più ingombranti verso il reagente tionante (per esempio il Reagente di Lawesson), che non consentirebbe l'accesso all'ossigeno dell'ammide.

1.3 Strutture secondarie degli α -peptidi

I peptidi possono assumere un diverso numero di conformazioni in base ai residui che ne compongono la catena e della lunghezza di quest'ultima. In questo lavoro di Tesi sono state sintetizzate e studiate tre diverse serie di omopeptidi, fino al tetramero, al fine di identificare il ruolo del gruppo tioamidico nella conformazione del tiopeptide e di confrontare quest'ultimo con l'analogo non tionato. Solitamente la rappresentazione della struttura primaria di un peptide o di una proteina non fornisce informazioni sufficienti su come la molecola si distribuisca realmente nello spazio. I peptidi contenenti α -amminoacidi sono stati studiati a fondo e sono state definite un certo numero di conformazioni possibili utilizzando gli angoli torsionali (o angoli diedri) per poterle definire. I valori degli angoli diedri, secondo la notazione IUPAC-IUB del 1970^[24], sono inclusi nell'intervallo $\pm 180^\circ$. I tre angoli ϕ , ψ e ω sono mostrati in figura 1.6. Il legame ammidico è solitamente in conformazione *trans* tra il CO e l'NH, per cui il relativo angolo ω risulta di 180° per almeno il 95% dei peptidi. Di conseguenza si possono descrivere la maggior parte delle conformazioni attraverso i soli angoli diedri ϕ e ψ .

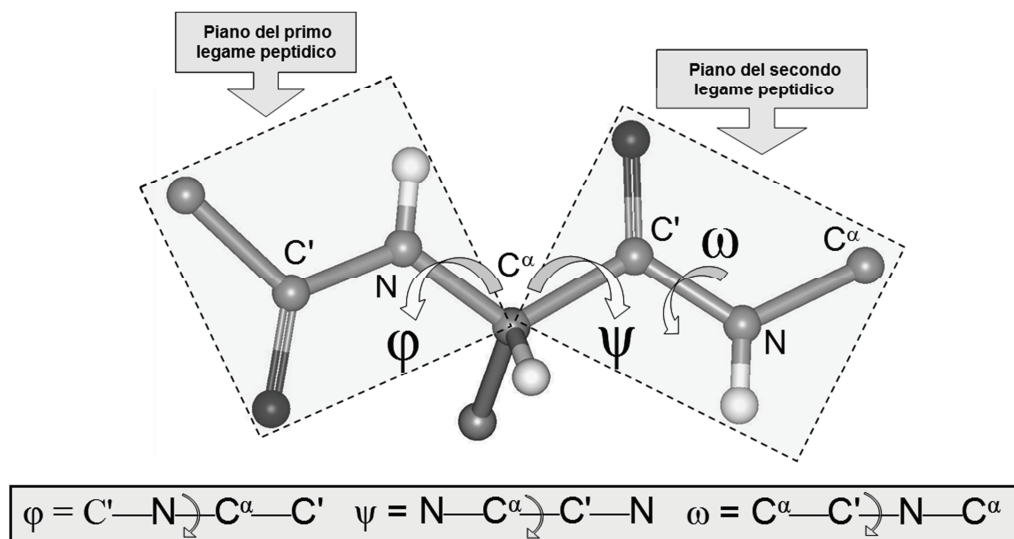


Figura 1.6 Immagine centrata su un carbonio α di un amminoacido facente parte di un peptide o una proteina, dove sono evidenziati gli angoli diedri utilizzati per definirne la struttura secondaria.

Se uno stesso set di angoli torsionali ϕ e ψ si ripete lungo la catena, allora possiamo definire diverse tipologie di strutture elicoidali. In natura le principali strutture secondarie riscontrabili sono l' α -elica, le strutture β (dette anche β -sheets da non confondere con i ripiegamenti- β o β -turn) e l'elica 3_{10} .^[25] I parametri caratteristici delle strutture elicoidali, oltre agli angoli diedri, sono il numero (n) di residui per giro d'elica, la traslazione assiale per residuo (d , *axial traslation*) espressa in Å e il passo dell'elica (p , *pitch*) ottenuto da ($n \cdot d$), espresso in Å. Altri parametri utilizzati sono anche l'angolo del legame a idrogeno e la rotazione per residuo.

Le stabilizzazioni delle strutture elicoidali avvengono solitamente tra il carbonile del residuo i -esimo e l'NH del residuo $(i \pm n)$. Possiamo definire i ripiegamenti (comunemente anche *turn*, in inglese) stabilizzati intra-molecolarmente con questa nomenclatura^[26]:

| Tipo di ripiegamento | Residui coinvolti nel ripiegamento |
|----------------------|------------------------------------|
| α -turn | $i \rightarrow i \pm 4$ |
| β -turn | $i \rightarrow i \pm 3$ |
| γ -turn | $i \rightarrow i \pm 2$ |
| δ -turn | $i \rightarrow i \pm 1$ |
| π -turn | $i \rightarrow i \pm 5$ |

Tabella 1.1 Tipologie di ripiegamento secondo la nomenclatura^[26]

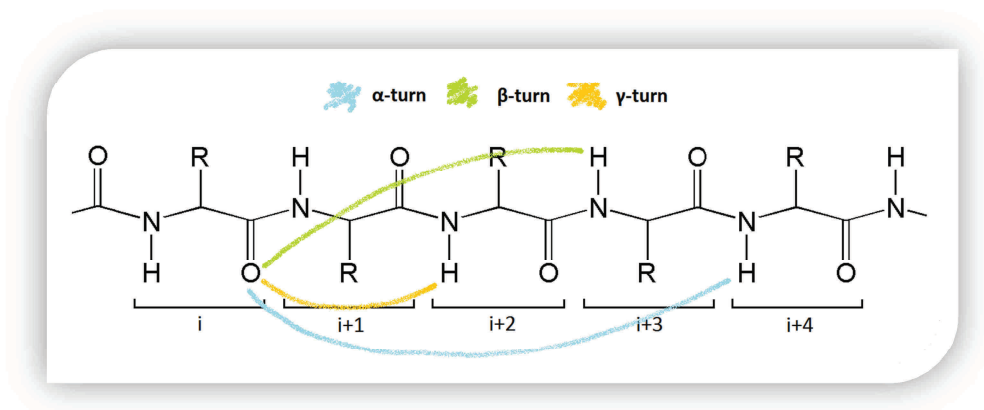


Figura 1.7 Esempio di catena peptidica evidenziando i tre tipi di interazioni intramolecolari tipiche che causano i relativi ripiegamenti e successivamente danno la possibilità di creare strutture elicoidali.

α -Elica

Questo tipo di ripiegamento presenta legami a idrogeno intramolecolari che stabilizzano la struttura coinvolgendo 13 atomi (per questo viene anche chiamata C_{13}) e include 3.63 residui per giro.

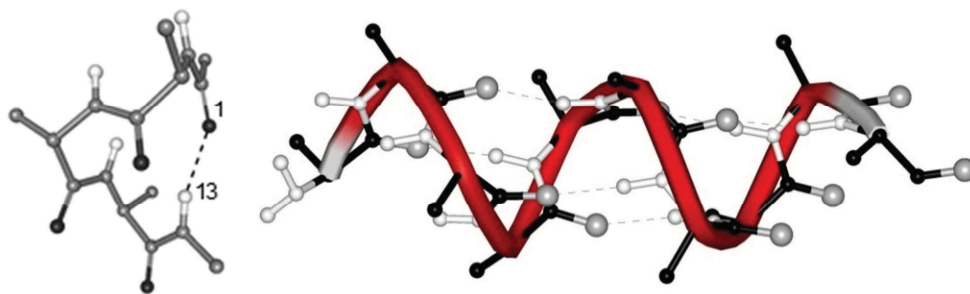


Figura 1.8 (a) La prima immagine in alto a sinistra evidenzia il legame a idrogeno tra l'ossigeno, identificato come l'atomo numero 1, e il protone dell'NH che si incontra attraversando i 12 legami covalenti nella catena peptidica e per questo identificato come l'atomo numero 13; (b) in alto a destra è stato colorato di rosso lo scheletro di un'elica destrorsa per mostrarne in bello stile il ripiegamento.

L' α -elica destrorsa è stabilizzata dal legame ad idrogeno del tipo $i \leftarrow (i+4)$, coinvolgente il carbonile dell'amminoacido (i) -esimo e l'NH dell' $(i+4)$ -esimo. Tutti i legami peptidici sono in conformazione *trans* ($\omega=180^\circ$).^[27] Esistono residui che possono promuovere l' α -elica come Ala, Leu, Glu, Lys, Met, Phe e Tyr.^[28]

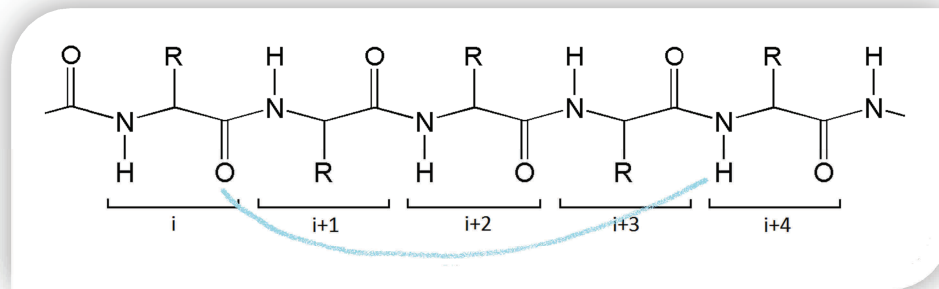


Figura 1.9 Struttura primaria di un peptide generico dove R rappresenta la catena laterale dell'amminoacido e il legame a idrogeno intramolecolare viene raffigurato con il colore azzurro, nel caso di una α -elica.

Elica 3_{10}

Essa presenta questa nomenclatura poiché il legame a idrogeno intramolecolare, atto a stabilizzarne la struttura, coinvolge 10 atomi e si hanno 3 residui per giro d'elica. Tutti i legami peptidici sono in conformazione *trans* ($\omega=180^\circ$) e il legame a idrogeno è del tipo $i \leftarrow (i+3)$. I residui elicoidali 3_{10} rappresentano circa il 10% dei residui elicoidali nelle proteine globulari.^[29] L'elica 3_{10} ha come elemento strutturale un tipo di ripiegamento- β (*type III β -turn*) che sarà descritto in seguito.

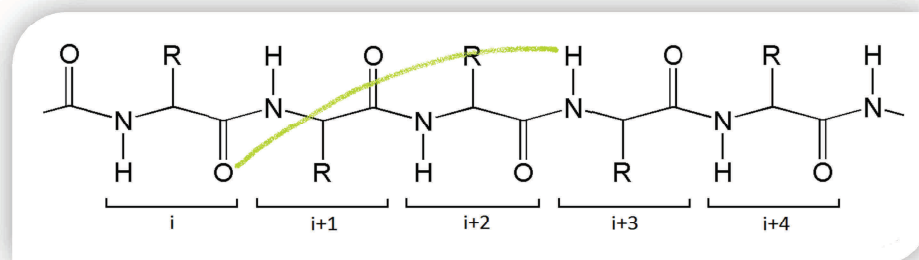
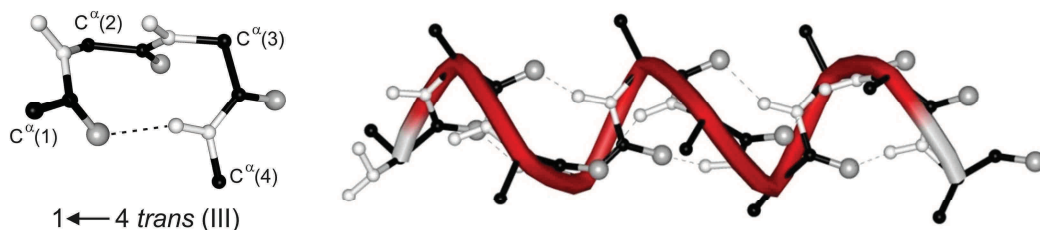


Figura 1.10 (a) La prima immagine in alto a sinistra mostra il ripiegamento- β del tipo III, elemento strutturale dell'elica 3_{10} ; (b) in alto a destra è stato colorato di rosso lo scheletro dell'elica 3_{10} destrogira per mostrarne in bello stile il ripiegamento; (c) struttura primaria di un peptide generico dove R rappresenta la catena laterale dell'amminoacido e il legame a idrogeno intramolecolare è raffigurato col colore verde.

La maggior parte delle eliche 3_{10} sono corte (3-4 residui) e sono principalmente localizzate nella zona N-terminale oppure C-terminale delle α -eliche; ne sono state anche osservate di lunghezza pari a 7-12 residui. Inoltre, le eliche 3_{10} sono state proposte come intermedi nei processi di aggregazione delle α -eliche nelle proteine globulari.^[29] Nella tabella sono messi a confronto i principali parametri delle due strutture elicoidali mentre nella figura vengono confrontate in base alle proiezioni lungo l'asse.

| Parametro | elica 3_{10} | α -elica |
|---|----------------|-----------------|
| Numero di residui per giro (n) | 3.24 | 3.63 |
| Traslazione assiale per residuo (d) | 1.94 Å | 1.56 Å |
| Passo dell'elica (p) | 6.29 Å | 5.67 Å |
| ϕ | -57° | -63° |
| ψ | -30° | -42° |
| Angolo del legame idrogeno (NH...O=C) | 128° | 156° |
| Rotazione per residuo | 111° | 99° |

Tabella 1.2 Confronto di alcuni parametri che identificano le due più comuni strutture elicoidali.^[25]

Di seguito vengono espone due proiezioni lungo l'asse dell'elica 3_{10} e dell' α -elica:

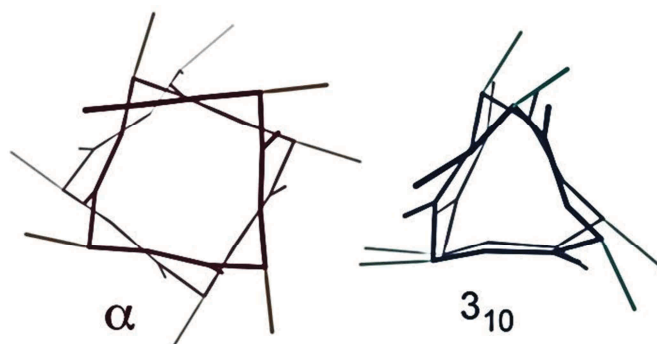


Figura 1.11 Proiezioni lungo l'asse dell' α -elica (a sinistra) e dell'elica 3_{10} (a destra).

Ripiegamenti- β

I ripiegamenti- β ^[30-32], noti anche come β -turns, sono stabilizzati da legami a idrogeno $i \leftarrow (i+3)$, talvolta indicati come $1 \leftarrow 4$. Sono stati classificati da Venkatachalam^[30] nei tipi I, II, III (ripiegamenti destrogiri) e nei corrispondenti enantiomeri I', II', III' in base ai valori degli angoli torsionali assunti dai residui (i+1) e (i+2) compresi entro il legame a idrogeno.

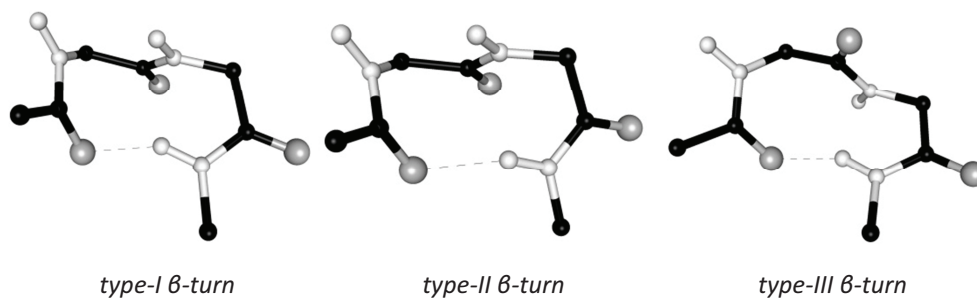


Figura 1.12 Principali tipologie di ripiegamenti β indicate con la nomenclatura in inglese.

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

Tabella 1.3 Valori degli angoli torsionali per i residui (i+1) e (i+2) nei ripiegamenti β di tipo I, II e III

Tali ripiegamenti rivestono una notevole importanza nello studio della struttura secondaria e terziaria delle proteine andando a costituire i *loop*, tratti flessibili che consentono cambi di direzione alla catena. La successione di ripiegamenti- β di tipo III e III' genera eliche 3_{10} destrorse e sinistorse, rispettivamente.

Ripiegamenti- γ

Ci sono due tipi di γ -turn per gli L-amminoacidi. Il γ -turn "normale" ($\phi = 70^\circ$; $\psi = -70^\circ$) è meno stabile e presenta la catena R in posizione assiale. L'*inverse* γ -turn ($\phi = -70^\circ$; $\psi = +70^\circ$) è dotato di maggiore stabilità e la catena R è in posizione equatoriale (come si può notare in figura 1.12). Entrambi sono di forma pseudociclica, interessano 7 atomi e il legame intramolecolare è molto forte ed è del tipo $i \leftarrow (i+2)$, indicato anche con $1 \leftarrow 3$. Il legame CO-NH interno è in conformazione *trans*. Gli angoli torsionali ω deviano leggermente dal valore di 180° corrispondente al planare.^[26]

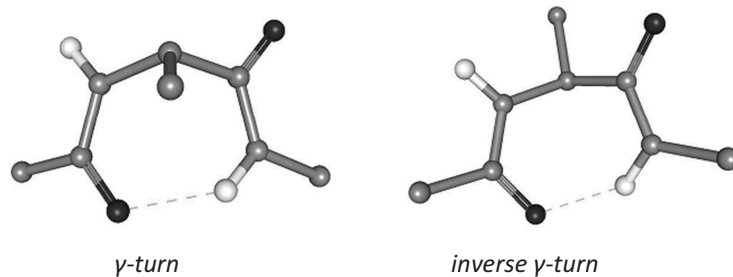


Figura 1.13 Rappresentazione delle due tipologie possibili di γ -turn per L-amminoacidi

I ripiegamenti- γ possono dare luogo a strutture elicoidali come le 2_7 , più rare delle note α -eliche ed eliche 3_{10} .^[33]

Foglietti- β

I foglietti- β , detti anche β -sheets, sono la seconda più comune struttura secondaria ordinata nelle proteine globulari. Questo gruppo si può dividere in *pleated-sheet* β -structures (le più stabili, dove ogni residuo è esteso) e *flat-sheet* β -structures (dove ogni residuo è completamente esteso $\phi = \psi = 180^\circ$ e non ci sono interazioni né intra- né inter-molecolari). Le *pleated-sheet* β -structures possono essere parallele o antiparallele^[34] secondo la direzionalità del legame delle catene tra loro interagenti.

Le antiparallele sono le più stabili e le più comuni e, nella figura sottostante, sono messe a confronto con le parallele evidenziando la direzionalità dei legami e riportando alcune distanze caratteristiche delle due strutture.

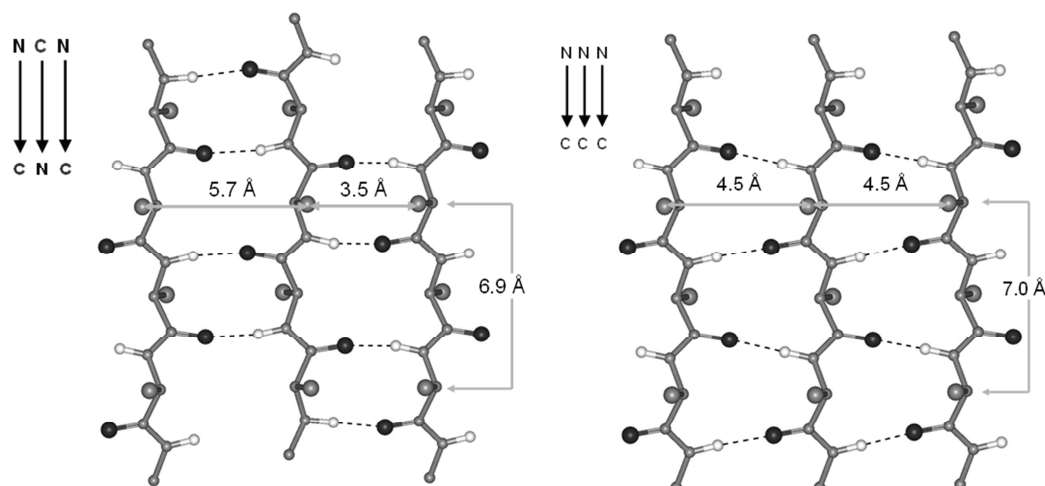


Figura 1.14 Confronto tra *pleated-sheet* β -structures antiparallele (parte sinistra) e parallele (parte destra). Per ogni immagine è presenta una piccola legenda che indica la direzionalità delle catene tra N-terminale e C-terminale.

| Parametro | Antiparallele | Parallele |
|---|---------------|-----------|
| Numero di residui per giro (n) | 2 | 2 |
| Traslazione assiale per residuo (d) | 3.47 Å | 3.50 Å |
| Passo dell'elica (p) | 6.94 Å | 7.00 Å |
| ϕ | -139° | -119° |
| ψ | 135° | 113° |

Tabella 1.4 Parametri principali delle *pleated-sheet* β -structures antiparallele e parallele.

Un altro tipo di conformazione particolare è l'elica 2.0_5 , ottenuta con residui aventi catene laterali R molto ingombranti. Essa è caratterizzata da angoli torsionali ϕ , $\psi \approx 180^\circ$. Il legame a idrogeno intramolecolare è del tipo $i \leftarrow i$, in quanto avviene intra-residuo tra il carbonile e l'NH, che chiude così uno pseudociclo di 5 atomi, per questo motivo detta struttura C_5 .^[35]

1.4 Agenti tionanti per gruppi ammidici

I reagenti più comunemente utilizzati in letteratura come agenti tionanti del gruppo carbonilico sono il pentasolfuro di fosforo (P_2S_5), chiamato anche decasolfuro di fosforo (P_4S_{10}) in quanto è presente come dimero allo stato solido (figura 1.14), e il Reagente di Lawesson (*2,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetane-2,4-disulfide*), indicato con la sigla RL. Entrambi i reagenti sono utilizzati in diverse tipologie di reazioni anche molto differenti da quelle di tionazione.

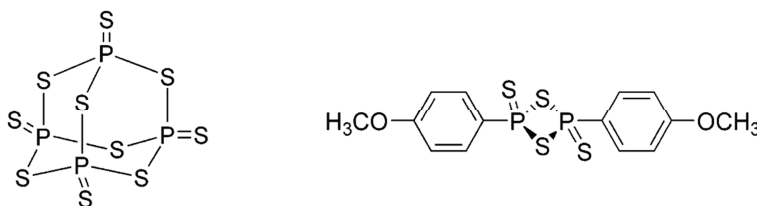


Figura 1.15 P_2S_5 a sinistra, nella forma in cui è aggregata allo stato solido, e RL a destra.

In generale si ritiene che il Reagente di Lawesson abbia dei vantaggi rispetto alla P_2S_5 in termini di minor consumo di reagente e ridotti tempi di reazione. Tuttavia vengono utilizzati entrambi poiché possono esserci vantaggi o svantaggi a seconda del tipo di reazione e delle condizioni. Oltre a questi due reagenti è descritto in letteratura anche l'uso del solfuro d'idrogeno, che fornisce tuttavia risultati più modesti nell'ationazione.^[36,37]

Il pentasolfuro di fosforo (P_2S_5)

La P_2S_5 è un solido giallo intenso, dal tipico odore sulfureo, scoperto dal grande chimico svedese Jóns Jacob Berzelius (1779-1848), considerato uno dei padri della chimica moderna. E' rimasto il reagente più utilizzato per le tionazioni dalla metà del novecento fino alla comparsa del RL alla fine degli anni settanta. In figura 1.15 è mostrato il meccanismo di dissociazione di P_4S_{10} , sino a dare la specie reattiva P_2S_5 .^[38,39]

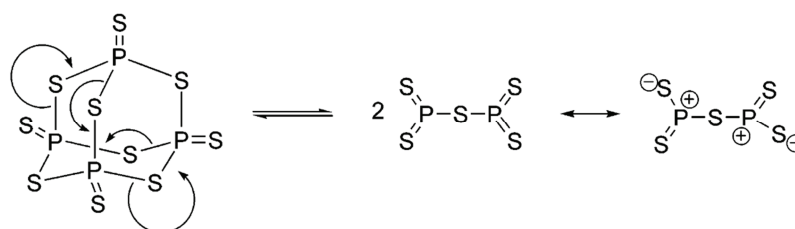


Figura 1.16 Meccanismo di dissociazione di P_2S_5 in soluzione.

Il Reagente di Lawesson (RL)

La prima sintesi del Reagente di Lawesson (RL) è del 1956. Si ottenne per reazione della P_2S_5 con gruppi aromatici.^[40] Il RL un solido giallognolo dall'odore sulfureo. Non è stato molto utilizzato fino allo studio sistematico del 1978 da parte di Lawesson^[41] e collaboratori. E' ora un reagente commerciale e ampiamente utilizzato nella sintesi organica. Nel corso degli anni si sono sviluppati diversi analoghi di quest'ultimo, che prevedono sostituenti differenti dall'anisolo e mantengono intatto il centro fosfetanico.^[36]

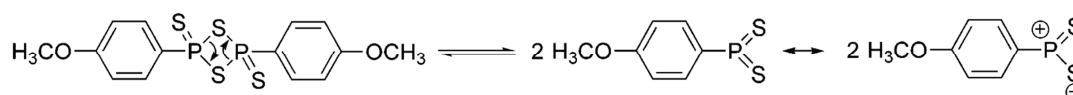


Figura 1.17 Meccanismo di dissociazione del Reagente di Lawesson in soluzione.

Meccanismo di reazione

Sia il RL sia la P_2S_5 agiscono mediante il medesimo meccanismo di reazione nelle tionazioni. Nella figura 1.17 la specie reattiva, proveniente dalla dissociazione della P_2S_5 o del RL, attacca il carbonio carbonilico attraverso lo zolfo elettrone-ricco e contemporaneamente l'ossigeno si coordina al fosforo elettrone-povero. Si formerà un intermedio a 4 atomi molto simile all'intermedio ossafosfetanico delle ben note reazioni di Wittig^[42] e si otterrà il prodotto tionato nello *step* successivo.^[36,37,43]

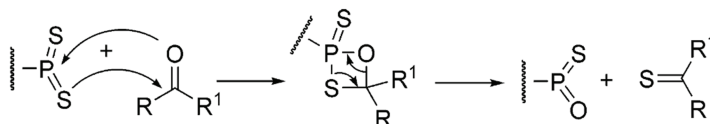


Figura 1.18 Meccanismo di reazione comune alla P_2S_5 e al RL verso un carbonile generico.

Tionazione del legame ammidico con il Reagente di Lawesson

Il RL è stato utilizzato per la tionazione del legame ammidico in diversi peptidi data la maggiore reattività dell'ammidico rispetto a chetoni ed esteri. L'ordine di reattività del RL riportato da Nishio^[44] è il seguente:

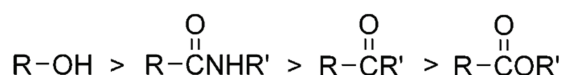


Figura 1.19 Ordine di reattività del Reagente di Lawesson nei confronti di alcuni gruppi funzionali.^[44]

La tionazione con il RL, comunque, è stata condotta con uretani, chetoni, esteri e gruppi idrossilici. In letteratura, oltre agli esempi già citati, esiste un numero elevato di procedure per tionare legami ammidici. Il RL può essere utilizzato con diversi solventi come THF, HMPA, toluene, DME, diossano, xilene, benzene, CH_2Cl_2 , etc. sia a refluxo sia a temperatura ambiente.^[36] Uno studio^[45] sulla reattività di due peptidi modello Boc-Ala-Aib-Ala-OMe (**1**) e Ac-Ala-Aib-Ala-OMe (**2**) riporta le seguenti conclusioni: la reazione con RL in toluene a $100^\circ C$ per 45 minuti dà una miscela di (**3**) (27%) e (**4**) (14%). Facendo reagire (**2**), che presenta un metile al posto di un gruppo *ter*-butossi, con RL in THF a temperatura ambiente per una notte, si ottiene (**5**), cioè la tionazione dell'ammidico periferica. Il gruppo uretanico è rimasto sempre intatto. Reazioni simili con peptidi di diversa lunghezza sono state riportate in letteratura.^[46-54]

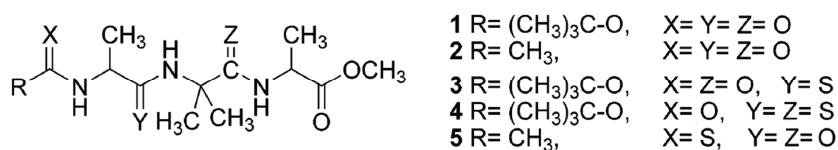


Figura 1.20 Studio sulla reattività di due peptidi modello (**1**) e (**2**). I due C^α delle Ala sono in configurazione S. [O387]

Data la presenza di differenti gruppi funzionali lungo una catena peptidica, è necessaria un'adeguata protezione prima di tionare la molecola. Una reazione curiosa è quella in cui il RL è stato utilizzato come agente di *coupling* in un peptide non protetto al C-terminale.

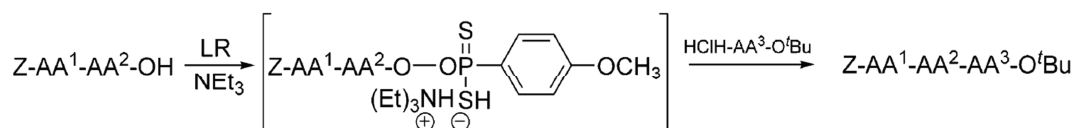


Figura 1.21 Reazione di *coupling* dove un amminoacido o peptide N-protetto è stato disciolto in CH₂Cl₂ e trietilamina con successiva aggiunta del RL a -15°C nel primo step.

Tionazione del legame ammidico con P₂S₅

Le reazioni di tionazione tramite P₂S₅ di ammidi e lattami sono state eseguite anche in presenza di esteri, piridina, *Boc*, ammine, gruppo nitro e ciano. Sono state condotte in diversi solventi come toluene, xilene, benzene, THF, CH₂Cl₂, CHCl₃, diossano, esametilfosforammide, acetonitrile e DME, con temperatura da -20 °C a riflusso. In alcuni casi la reazione è stata condotta in condizioni basiche con NaHCO₃, Na₂CO₃, Et₃N, KF, NaF, K₂S e Dabco.^[37,55] Esistono casi che riportano l'utilizzo di catalizzatori in combinazione con la P₂S₅ come esametildisilossano^[56], dimeticone^[57], Al₂O₃^[39], PSCl₃/H₂O/Et₃N^[58,59], tiourea^[60], solfuro di ammonio acquoso^[61] e piridina^[62]. Altri riportano l'ausilio di microonde^[59,63-65] e ultrasuoni per catalizzare le reazioni con ottimi risultati.

Uno studio molto interessante riguarda il lavoro svolto da Raucher *et al.*^[66] in cui vengono tionate delle ammidi disciolte in THF anidro, P₂S₅ e l'ausilio di un bagno a ultrasuoni a temperatura ambiente. L'utilizzo di questa procedura è stato ampliato in seguito da Venkataramanarao *et al.*^[43] che hanno tionato numerosi dipeptidi. L'articolo mostra come si ottengono ottime conversioni in tempi brevi (15-45 minuti) per tionare il legame peptidico tra i due residui.

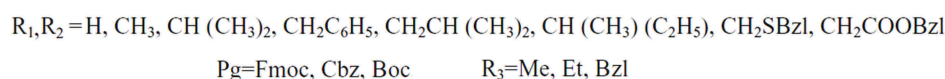
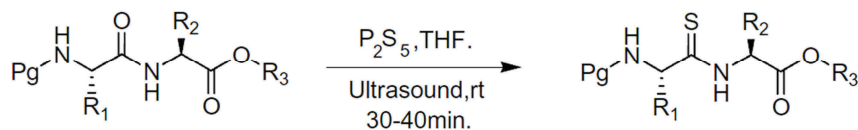


Figura 1.22 Metodologia di reazione condotta da Venkataramanarao *et al.*^[43]

L'utilizzo di quest'ultima procedura appare molto conveniente rispetto alle convenzionali, come mostrato in figura 1.22, in cui sono messe a confronto sei tipologie di tionazione. L'utilizzo della P₂S₅ può evitare la formazione di sottoprodotti che si possono avere con il RL e il costo del reagente è inferiore. Inoltre la reazione viene condotta a temperatura ambiente, limitando la formazione di sottoprodotti dati da condizioni di riflusso, e in un comune bagno ad ultrasuoni, facilmente reperibile in un laboratorio di chimica.

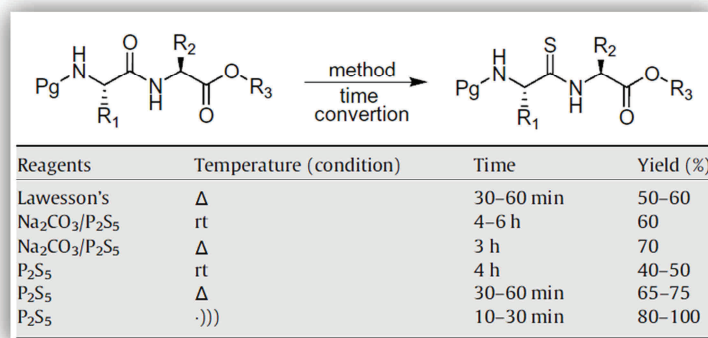


Figura 1.23 Confronti tra diverse metodologie di reazione condotte da Venkataramanarao *et al.* ^[43], il solvente utilizzato in tutte le procedure è THF e il dipeptide presenta i protettori Pg, R₃ e le catene R₁, R₂ definite dalla figura 1.21. Il simbolo “:)))” indica l'utilizzo degli ultrasuoni.

1.5 Introduzione alla “Sonochemistry”

Normalmente il suono viene associato alla musica e alla comunicazione verbale, raramente si pensa ad esso come ad una forma di energia. Può essere accolto con sorpresa che le onde sonore abbiano la capacità di sterilizzare l'acqua, migliorare la galvanostegia, aiutare nella cura del cancro, *etc.* Questi effetti sono prodotti dall'energia rilasciata dalle bolle di cavitazione generate in un liquido dalle onde sonore stesse. Attraverso il fenomeno della cavitazione, generata usualmente da ultrasuoni, si può attingere a un tipo di energia che può essere utilizzato per un ampio spettro di reazioni chimiche. Gli ultrasuoni sono definiti come quelle frequenze non udibili dall'uomo poiché presentano valori superiori alla soglia di udibilità dei 20 kHz (l'ampiezza udibile è compresa tra 16 Hz – 20 kHz). Essi si suddividono in “Power Ultrasounds” nel range 20-100 kHz, dove operano i noti bagni ad ultrasuoni capaci di influenzare processi chimici, e “Diagnostic Ultrasounds” (5-10 MHz, usati nella scansione fetale) che non presentano sufficiente potenza per produrre cavitazione.

L'uso degli ultrasuoni in reazioni chimiche prende il nome di “Sonochemistry”. Lo sviluppo di quest'ultima nella sintesi chimica organica ha fornito nuove soluzioni rispetto alle tecniche tradizionali aumentando velocità di reazione e rese. In alcuni casi si sono osservate nuove vie sintetiche, poiché si ottenevano prodotti diversi rispetto alla sintesi tradizionale. Gli ultrasuoni si propagano attraverso una serie di compressioni e rarefazioni delle onde indotte nelle molecole presenti nel mezzo. A una potenza sufficientemente elevata il ciclo di rarefazione può vincere le forze di attrazione intermolecolari del mezzo liquido causando bolle di cavitazione. Queste bolle possono crescere inglobando vapori o gas dal liquido sino a raggiungere una dimensione paragonabile alla lunghezza d'onda delle vibrazioni. Alcune di queste bolle si espandono sino a raggiungere una dimensione critica e collassano violentemente.

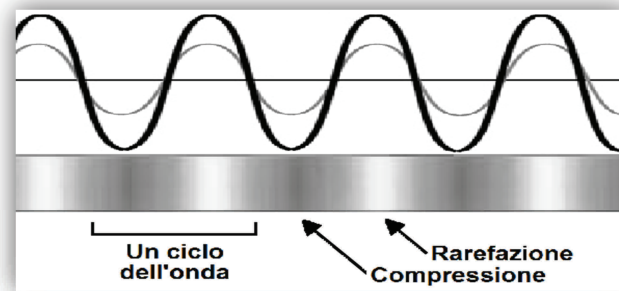


Figura 1.24 Cicli di rarefazione e compressione di un'onda sonora.

La maggiore reattività chimica in una fase inizialmente omogenea (considerata *pseudo-omogenea* durante la sonicazione), cioè nel *bulk* della soluzione, può essere spiegata dalle condizioni estreme sia all'interno sia all'interfaccia delle bolle di cavitazione. Possono essere raggiunte temperature e pressioni elevate (sino a 5000°C e 2000 atm). Il movimento del liquido risulta parzialmente impedito nei pressi di una superficie solida. Il successivo collasso asimmetrico delle bolle avviene tramite un'iniezione dal *bulk* del liquido, dalla zona opposta alla superficie solida (figura 1.24).

Questo crea dei microgetti che impattano verso la parete, accelerando sino a raggiungere una velocità di $100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. L'effetto meccanico è equivalente a quello di getti ad alta pressione ed è per questa ragione che gli ultrasuoni sono comunemente usati per pulire la vetreria nei laboratori.

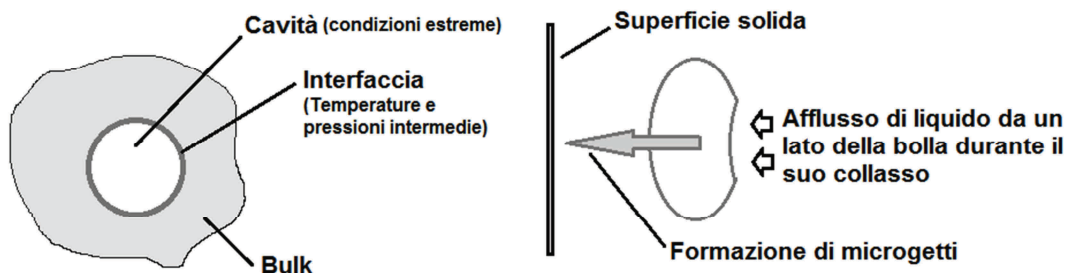


Figura 1.25 (a) cavitazione in un sistema omogeneo; (b) cavitazione in un sistema eterogeneo vicino ad una superficie solida.

Questo meccanismo è valido in fase eterogenea e vicino alle pareti del contenitore. Può attivare superfici catalitiche, aumentare sia il trasferimento di massa sia di calore verso le superfici rompendo i legami all'interfaccia.^[67,68] I meccanismi e gli effetti della *Sonochemistry* sono tuttora in fase di approfondimento. E' necessario tenere presente che potrebbe esserci la possibilità di avere fenomeni indesiderati, sia nell'erosione di superfici, sia nel favorire differenti meccanismi chimici e quindi incontrare prodotti secondari inaspettati.^[69]

Possiamo affermare che, assieme alle microonde, la *Sonochemistry* è una via molto curiosa e facile da esplorare per diverse tipologie di reazioni che non danno risultati soddisfacenti con i metodi tradizionali.

2. Parte sperimentale

2.1 Materiali e metodi

Reagenti e solventi utilizzati in laboratorio:

Acros-Janssen (Geel, Belgio): metanolo per spettroscopia, 2,2,2-trifluoroetano per spettroscopia, THF, catalizzatore 10% Pd/C, 1-idrossi-1H-benzotriazolo.

Aldrich Chem. Co. (Winston-Salem, USA): acetato di etile, THF anidro, metanolo anidro, N-metilmorfolina, Reagente di Lawesson, P₂S₅.

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

Fluka (Buchs, Svizzera): catalizzatore 10% Pd/C.

GL Biochem (Shanghai, Cina): 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo (HOBt).

Iris Biotech (Marktredwitz, Germania): N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide cloridrato (EDC), benzilossicarbonil-N-idrossisuccinimide (ZOSu).

Lancaster Synthesis (Lancashire, Inghilterra): isobutilcloroformiato.

Merck (Darmstadt, Germania): gel di silice per cromatografia "flash" 80 mesh.

Prolabo (Parigi, Francia): HCl 35%, cloruro di sodio.

2.2 Strumentazione e metodi

Cromatografia su strato sottile (TLC)

Ogni reazione è stata seguita tramite cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando lastre di gel di silice *Merck* 60 F₂₅₄.

Per ogni composto sintetizzato sono stati determinati tre diversi tempi di ritenzione in miscele-eluenti differenti:

R_{f1} : CH₂Cl₂/EtOH 9:1

R_{f2} : n-Butanolo/AcOH/H₂O 3:1:1 (detto "Partridge")

R_{f3} : Toluene/EtOH 7:1

Per la rivelazione dei prodotti in TLC sono state usate una lampada UV per molecole con gruppi aromatici e tioamidici e una soluzione di KMnO₄ per rivelare le macchie restanti.

Cromatografia "flash"

La "cromatografia flash"^[70] è stata utilizzata per purificare i composti sintetizzati utilizzando come fase stazionaria il gel di silice 60 *Merck* a granulometria 40-63 µm. Ogni miscela da purificare è stata portata a secco con una ridotta porzione di gel di silice e caricata in testa alla colonna; per ogni

colonna è stata utilizzata la miscela-eluyente opportuna scegliendo un $rf \approx 0.3-0.5$ per ogni macchia interessata nelle TLC di prova.

Determinazione dei punti di fusione

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

Dicroismo circolare (CD)

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con un dicrografo *Jasco* modello J-715, utilizzando celle di quarzo (*Hellma*) con cammino ottico di 0.1 e 0.02 cm. I valori sono espressi in ellitticità molare ($\text{gradi} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$):

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

Θ = Ellitticità osservata

PM = Peso molecolare totale del peptide

l = Lunghezza del cammino ottico in cm.

c = Concentrazione in $\text{g MM} \cdot \text{l}^{-1}$

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

Spettrometria di massa (MS)

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

Spettroscopia di assorbimento infrarosso (IR)

Gli spettri di assorbimento IR allo stato solido, in pastiglia di KBr, sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro *Perkin-Elmer* FT-IR modello 1720X operante in trasformata di Fourier. Con lo stesso strumento sono stati registrati anche gli spettri in soluzione di cloroformio deuterato (99.8% d_2 ; *Fluka*), usando celle con finestre in CaF_2 e cammino ottico di 0.1, 1.0 e 10.0mm. Per ogni spettro sono state eseguite 50 scansioni alla risoluzione nominale di 4 cm^{-1} con l'acquisizione digitalizzata del segnale a intervalli di 1 cm^{-1} , utilizzando uno "sample shuttle" che consente l'acquisizione alternata del campione e del fondo strumentale. Gli spettri del solvente sono stati ottenuti nelle stesse condizioni. 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 aiutandosi osservando la derivata seconda dello spettro.

Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e bidimensionali omocorrelati ed eterocorrelati (TOCSY, COSY, NOESY, HMBC, HSQC) sono stati registrati con gli spettrometri *Bruker AC200* e *Advance DRX400*. Per ogni spettro è specificato lo strumento utilizzato. I solventi adoperati sono cloroformio deuterato (99.96% *euriso-top*), acetonitrile (99.8%- d_3 *Cambridge Isotope Laboratories*) e dimetilsolfossido- d_6 (99.96%- d_6 *Cambridge Isotope Laboratories*). Gli spostamenti chimici sono espressi in parti per milione (δ , ppm) rispetto al segnale del tetrametilsilano (TMS). Le costanti di accoppiamento sono misurate in Hertz (Hz). Le molteplicità dei picchi sono espresse attraverso le sigle: “s” (singoletto), “d” (doppio), “t” (tripletto), “q” (quartetto) e “m” (multipletto); “br” assume il significato di “broad” per evidenziare quando un picco non è affilato ma a “panettone”.

La siringa utilizzata per le aggiunte NMR è una *Hamilton Microliter* da 25 μl .

Le aggiunte di $\text{DMSO-}d_6$ prevedono, inizialmente, di registrare lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del peptide disciolto in CDCl_3 ; successivamente si aggiunge una aliquota prefissata di $\text{DMSO-}d_6$ e si raccoglie nuovamente lo spettro. Si ripete questa operazione dopo ogni aggiunta (in serie: 5, 5, 5, 10, 10 e 25 μl) di $\text{DMSO-}d_6$. Si annotano i relativi picchi NH al procedere delle aggiunte.

Per il metodo delle aggiunte della molecola paramagnetica TEMPO sono state preparate due soluzioni all'1% p/v (50mg di TEMPO in 5 ml) e al 5% p/v (250mg di TEMPO in 5 ml) in CDCl_3 . Si annota la larghezza dei picchi degli NH a metà altezza ($\Delta\nu/h^{1/2}$ espressa in Hz) in funzione della quantità di TEMPO aggiunta. Si effettuano aggiunte di 5, 5 e 5 μl di soluzione all'1% e successivamente 5, 5 e 10 μl della soluzione al 5%.

Bagno ad ultrasuoni

Il modello del bagno ad ultrasuoni utilizzato è *Elma Transsonic 460/H* operante a 35kHz.

2.3 Sintesi in soluzione e caratterizzazione

Gli omopeptidi della serie $(\text{Ala})_n$ ($n = 1-4$) e $(\text{Nleu})_n$ ($n = 1-4$) erano già stati sintetizzati nel Nostro Laboratorio. Sono stati invece sintetizzati i composti della serie omopeptidica della Gly e tutti i tiopeptidi attraverso metodi di sintesi in soluzione.

Z-Gly-OH

Sono stati sospesi 5g di Gly ($6.67 \cdot 10^{-2}$ mol) in 35ml di H_2O . Sono stati aggiunti 9.3ml di TEA ($6.67 \cdot 10^{-2}$ mol) e, in seguito, una soluzione composta da 16.2g di Z-OSu ($6.67 \cdot 10^{-2}$ mol) in 35ml di acetonitrile. È stato lasciato il tutto sotto agitazione per una notte. L'acetonitrile è stato evaporato a pressione ridotta e il pH portato a 8 con NaHCO_3 . È stato estratto l'eventuale Z-OSu non reagito con 20 ml Et_2O . Il pH è stato portato a 2 aggiungendo una soluzione al 10% di KHSO_4 . Sono state effettuate tre

estrazioni con imbuto separatore da 20ml ciascuna con AcOEt. La fase organica è stata lavata 10 volte con H₂O, anidrificata con MgSO₄ e portata a secco a pressione ridotta.

Resa: 84%.

Punto di fusione: 118-122°C

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

IR (KBr): 3330, 1730, 1712, 1695, 1681, 1638 cm⁻¹.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ7.35 [m, Z CH], 6.58 [br, 1H, NH], 6.01 [br, 1H, OH], 5.14 [s, 2H, Z CH₂], 4.05 [d, 2H, Gly CH₂].

HCl·H-Gly-OMe

A 100 ml di MeOH anidro, raffreddato a -10° C in un bagno di acqua e sale, lentamente e sotto agitazione sono stati aggiunti 8 ml di SOCl₂ (0.11 mol) e, in seguito, 7.9 g di H-Gly-OH (0.11 mol). Il pallone è stato quindi chiuso con un tubo a CaCl₂ e la miscela è stata lasciata sotto agitazione per 1 ora a temperatura ambiente. Il sistema è stato portato a riflusso per circa 20 ore. Il decorso della reazione è stato seguito mediante TLC con "Partridge" come miscela-eluyente. Il solvente è stato quindi rimosso a pressione ridotta, riprendendo più volte con Et₂O. Il prodotto è stato precipitato da Et₂O come solido bianco.

Resa: 76%.

Punto di fusione: 173-177°C

Rf₁: 0.20, **Rf₂:** 0.35, **Rf₃:** 0.

IR (KBr): 3183, 1760, 1758, 1710, 1574, 1557, 1497, 1489 cm⁻¹.

Z-(Gly)₂-OMe

Ad una soluzione di Z-Gly-OH (3g, 1.34·10⁻² mol) in 30ml di THF anidro sono stati aggiunti, sotto agitazione a -15°C, 1.5ml di NMM (1.34·10⁻² mol) e 1.75ml di isobutilcloroformiato (1.34·10⁻² mol). Dopo 10 minuti è stata aggiunta una sospensione di 2g di HCl·H-Gly-OMe in una soluzione composta da 1.5ml di NMM e 20ml di CH₂Cl₂. Il pH è stato portato a 8 con qualche goccia di NMM e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per un giorno circa. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta, il tutto ripreso con AcOEt e lavato, in serie, con diverse aliquote di una soluzione acquosa di KHSO₄ al 10% per 3 volte, lavaggio acquoso, una soluzione acquosa di NaHCO₃ al 5% per 3 volte, lavaggio acquoso. È stato anidrificato con MgSO₄, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto è stato cristallizzato da AcOEt/Eteri di petrolio.

Resa: 66%.

Punto di fusione: 63-64°C.

Rf₁: 0.70, **Rf₂:** 0.85, **Rf₃:** 0.20.

IR (KBr): 3333, 3291, 1744, 1736, 1692, 1660, 1542 cm⁻¹.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ7.35 [m, Z CH], 6.50 [br, 1H, NH Gly²], 5.41 [br, 1H, NH Gly¹], 5.14 [s, 2H, Z CH₂], 4.06 [d, 2H, Gly CH₂], 3.92 [d, 2H, Gly CH₂], 3.76 [s, 3H, OCH₃].

Z-(Gly)₃-OMe

Sono stati sciolti 2.00g di Z-(Gly)₂-OMe ($7.14 \cdot 10^{-3}$ mol) in CH₃OH (50ml) in un pallone con gorgogliatore, disareato con N₂ per 5 minuti, ed è stato introdotto il 10% m/m di Pd/C (0.20 g). E' stato lasciato reagire per circa 30 minuti sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC (CH₂Cl₂/EtOH 90:10). A fine reazione è stato filtrato via il catalizzatore su celite e il filtrato tirato a secco in un pallone (1). La miscela è stata ripresa con 2-3 ml di acetonitrile ed evaporata a pressione ridotta per due volte per eliminare ogni traccia di CH₃OH. E' stato aggiunto CHCl₃ anidro (25ml) e la miscela è stata portata a 0°C.

In un secondo pallone (2) sono stati disciolti 1.51g di Z-Gly-OH ($6.78 \cdot 10^{-3}$ mol) in 10ml di THF e aggiunti 0.750ml di NMM ($6.78 \cdot 10^{-3}$ mol), sotto agitazione e in atmosfera inerte (con flusso di azoto), tappando il pallone con tubo a CaCl₂. Quest'ultimo è stato posto in un bagno di ghiaccio e sale a -15°C e sono stati aggiunti lentamente 0.89ml di isobutilcloroformiato ($6.78 \cdot 10^{-3}$ mol).

Dopo 10 minuti dal termine dell'aggiunta dell'isobutilcloroformiato è stata aggiunta la sospensione del pallone 1 al pallone 2 e lasciato sotto agitazione a temperatura ambiente. Il pH è stato corretto con pochi ml di NMM a 8 e la reazione è stata lasciata nelle medesime condizioni durante la notte.

E' stata evaporata la miscela di solventi a pressione ridotta, il tutto è stato ripreso con AcOEt (100ml) e la miscela è stata lavata una volta con una soluzione acquosa al 10% di KHSO₄ (10ml), H₂O (10ml), soluzione acquosa al 5% di NaHCO₃ (10ml), H₂O (10ml). La separazione tra le 2 fasi è difficoltosa poiché crea una interfase composta da bolle che richiede molta pazienza e tempo al fine di "romperle" ed avere una separazione efficiente. La fase organica è stata anidrificata su MgSO₄, filtrata e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto è stato cristallizzato da CH₃OH-Eteri di petrolio.

Resa: 29%.

Punto di fusione: 151-155°C.

Rf₁: 0.45, **Rf₂:** 0.70, **Rf₃:** 0.10.

IR (KBr): 3330, 3298, 1748, 1690, 1651, 1552 cm⁻¹.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.36 [m, Z CH], 6.73 [br, 1H, NH Gly], 6.60 [br, 1H, NH Gly], 5.41 [br, 1H, NH Gly¹], 5.14 [s, 2H, Z CH₂], 4.05-4.00 [m, 4H, 2Gly CH₂], 3.91 [d, 2H, Gly CH₂], 3.76 [s, 3H, OCH₃].

¹H-NMR (200 MHz, CD₃CN): δ 7.38 [m, Z CH], 7.02 [br, 2H, 2NH Gly], 6.03 [br, 1H, NH Gly], 5.10 [s, 2H, Z CH₂], 3.88 [d, 2H, Gly CH₂], 3.81 [d, 2H, Gly CH₂], 3.74 [d, 2H, Gly CH₂], 3.76 [s, 3H, OCH₃].

Z-(Gly)₄-OMe

Sono stati sciolti 1.00g di Z-(Gly)₃-OMe ($2.97 \cdot 10^{-3}$ mol) in DMF anidra (50ml) in un pallone con gorgogliatore disareato con N₂ per 5 minuti ed è stato introdotto il 10% m/m di Pd/C (0.10 g). E' stato lasciato reagire per circa 30 minuti sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC (1.Et₂O; 2.CH₂Cl₂/EtOH 90:10). A fine reazione è stato filtrato via il catalizzatore su celite. Il tutto è stato concentrato a pressione ridotta (pallone 1).

Ad una soluzione di Z-Gly-OH (0.70 g; $3.12 \cdot 10^{-3}$ mol) e HOBt (0.40 g; $2.97 \cdot 10^{-3}$ mol) in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro raffreddata a 0 °C sono stati aggiunti (0.57 g; $2.97 \cdot 10^{-3}$ mol) di EDC·HCl in un pallone (pallone 2). La miscela del pallone 2 viene aggiunta al pallone 1 e il pH viene portato a 8 con pochi ml di TEA e lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per circa un giorno. La miscela ha presentato una sorta di gel che è stato ripreso con acetonitrile e trasferito in provettoni. E' stato aggiunto Et_2O per favorire la precipitazione di solido, è stato centrifugato a 5600 rpm per 8 minuti. Il supernatante è stato trattato con il medesimo procedimento al fine di far precipitare un solido che è stato unito al precipitato precedente. Il solido è stato ripreso con Et_2O e filtrato su gooch.

Resa: 67%.

Punto di fusione: 220°C (Decomposto).

Rf₁: 0.15, **Rf₂:** 0.55, **Rf₃:** 0.

IR (KBr): 3297, 1748, 1692, 1649, 1552 cm^{-1} .

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d_6): δ 8.24-8.10 [3t, 3H, NH], 7.46 [t, 1H, NH Gly¹], 7.34 [m, Z CH], 5.02 [s, 2H, Z CH₂], 3.83-3.67 [4d, 8H, Gly CH₂], 3.61 [s, 3H, OCH₃].

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Z-(Gly)₂-OMe ($7.14 \cdot 10^{-4}$ mol) in 10ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 50ml. Successivamente sono stati aggiunti 173mg di RL ($4.28 \cdot 10^{-4}$ mol, 0.6eq). La reazione è stata monitorata tramite TLC (AcOEt/EtPetr 1:1). La miscela reazione è stata tirata a secco a pressione ridotta dopo 1 ora. E' stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente AcOEt/EtPetr 1:1.

Resa: 35%.

Punto di fusione: 92-95°C.

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

IR (KBr): 3396, 3364, 3295, 3269, 1748, 1717, 1706, 1548, 1528, 1511 cm^{-1} .

MS-ESI⁺: 297.09 (M+H)⁺.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.44 [br, 1H, CSNH Gly²], 7.36 [m, Z CH], 5.45 [br, 1H, NH Gly¹], 5.14 [s, 2H, Z CH₂], 4.40 [d, 2H, Gly CH₂], 4.29 [d, 2H, Gly CH₂], 3.81 [s, 3H, OCH₃].

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 200.01 [CS], 168.93 [COOMe], 156 [Z CO], 135.86-128.59-128.36-128.17 [Z], 67.56 [Z CH₂], 52.71 [OCH₃], 52.16 [Gly CH₂], 46.81 [Gly CH₂].

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Z-(Gly)₃-OMe ($5.93 \cdot 10^{-4}$ mol) in 18ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 50ml. Successivamente sono stati aggiunti 288mg di RL ($7.16 \cdot 10^{-4}$ mol, 1.2eq). La reazione è stata monitorata tramite TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH} 95:5$). Dopo 24 ore sono stati aggiunti altri 144mg di RL ($3.56 \cdot 10^{-4}$ mol, 0.6eq) per spingere la reazione verso completezza. La reazione è stata evaporata a pressione ridotta dopo 30 ore. E' stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH} 98:2$.

Resa: 57%.

Punto di fusione: 100-103°C.

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

IR (KBr): 3294, 3185, 1718, 1541, 1518 cm⁻¹.

MS-ESI⁺: 370.09 (M+H)⁺.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 9.01 [br, 1H, CSNH Gly²], 8.19 [br, 1H, CSNH Gly³], 7.36 [m, Z CH], 5.46 [br, 1H, NH Gly¹], 5.16 [s, 2H, Z CH₂], 4.65 [d-br, 2H, Gly² CH₂], 4.40 [d, J = 3.48Hz, 2H, Gly³ CH₂], 4.31 [d, J = 5.68Hz, 2H, Gly¹ CH₂] e 3.82 [s, 3H, OCH₃].

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 199.40 [CS Gly¹], 197.32 [CS Gly²], 168.77 [COOMe], 156.95 [Z CO], 135.87-128.60-128.35-128.15 [Z], 67.64 [Z CH₂], 54.03 [Gly² CH₂], 52.88 [OCH₃], 52.32 [Gly¹ CH₂], 47.06 [Gly³ CH₂].

Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Z-(Gly)₄-OMe (5.07·10⁻⁴ mol) in 30ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 100ml. Successivamente sono stati aggiunti 615mg di RL (1.52·10⁻³ mol, 3eq) e la miscela è stata lasciata nelle medesime condizioni durante il fine settimana. La reazione è stata monitorata tramite TLC (CHCl₃/MeOH 97:3). La reazione è stata evaporata a pressione ridotta dopo 3 giorni. E' stata fatta una colonna flash a gradiente di eluizione utilizzando come eluente di partenza CHCl₃/ MeOH 97:3 e poi CHCl₃/ MeOH 94:6.

Resa: 56%.

Rf₁: 0.90, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.40.

IR (KBr): 3358, 3252, 1735, 1664, 1585, 1561, 1536, 1501 cm⁻¹.

MS-ESI⁺: 443.08 (M+H)⁺.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.93 [br, 2H, CSNH Gly² CSNH Gly³], 8.06 [br, 1H, CSNH Gly⁴], 7.37 [m, Z CH], 5.55 [br, 1H, NH Gly¹], 5.17 [s, 2H, Z CH₂], 4.72 [d, 2H, Gly² CH₂], 4.65 [d, J = 3.56Hz, 2H, Gly³ CH₂], 4.41 [d, J = 4.64Hz, 2H, Gly⁴ CH₂], 4.33 [d, J = 6.00Hz, 2H, Gly¹ CH₂] e 3.82 [s, 3H, OCH₃].

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 200.13 [CS], 196.95 [CS], 196.78 [CS], 168.90 [COOMe], 156.95 [Z CO], 135.77-128.62-128.41-128.15 [Z], 67.72 [Z CH₂], 54.51 [Gly² Gly³ CH₂], 52.86 [OCH₃], 52.39 [Gly¹ CH₂], 46.92 [Gly⁴ CH₂].

Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Boc-(Ala)₂-OMe (7.27·10⁻⁴ mol) in 10ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 50ml. Successivamente sono stati aggiunti 176mg di RL (4.36·10⁻⁴ mol, 0.6eq). La reazione è stata monitorata tramite TLC (CHCl₃/EtOH 95:5e AcOEt/EtPetr 1:2). Dopo 20 ore sono stati aggiunti altri 176mg di RL (4.36·10⁻⁴ mol, 0.6eq) per spingere la reazione verso completezza. La reazione è stata evaporata a pressione ridotta dopo 30 ore. E' stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente AcOEt/EtPetr 1:3.

Resa: 67%.

Rf₁: 0.90, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.80.

IR (KBr): 3261, 1746, 1689, 1509 cm⁻¹.

MS-ESI+: 291.13 (M+H)⁺.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.37 [br, 1H, CSNH Ala²], 5.12 [br, 1H, NH Ala¹], 5.09 [m, 1H, α-CH], 4.45 [m, 1H, α-CH], 3.79 [s, 3H, OCH₃], 1.54 [d, 3H, CH₃Ala], 1.54 [d, 3H, CH₃Ala], 1.45 [s, 9H, 3CH₃Boc].

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 205.27 [CS], 172.60 [COOMe], 155.90 [COBoc], 79.50 [C₄ Boc], 68.34 [Ala¹ CH], 53.30 [Ala² CH], 52.84 [OCH₃], 28.44 [3CH₃ Boc], 21.65 [Ala¹ CH₃], 17.17 [Ala² CH₃].

Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe

Sono stati sciolti 110mg di Boc-(Ala)₂-OMe ($3.18 \cdot 10^{-4}$ mol) in 5ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 50ml. Successivamente sono stati aggiunti 231mg di RL ($5.72 \cdot 10^{-4}$ mol, 1.8eq). La reazione è stata monitorata tramite *TLC* (CH₂Cl₂/EtOH 90:10). Dopo 3 giorni sono stati aggiunti 77mg di RL ($1.90 \cdot 10^{-4}$ mol, 0.6eq) e dopo 4 giorni sono stati aggiunti altri 77mg di RL ($1.90 \cdot 10^{-4}$ mol, 0.6eq) per spingere la reazione verso completezza. La reazione è stata evaporata a pressione ridotta dopo 8 giorni. E' stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente CH₂Cl₂/EtOH 97:3.

Resa: 10%.

Punto di fusione: 115-117°C.

Rf₁: 0.90, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.80.

IR (KBr): 3262, 1726, 1691, 1595, 1515 cm⁻¹.

MS-ESI+: 378.15 (M+H)⁺.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.96 [d-br, J = 5.72Hz, 1H, CSNH Ala²], 8.17 [d-br, J = 5.20Hz, 1H, CSNH Ala³], 5.30 [m, 1H, α-CH Ala²], 5.14 [br, 1H, NH Ala¹], 5.06 [m, 1H, α-CH Ala³], 4.47 [m, 1H, α-CH Ala¹], 3.80 [s, 3H, OCH₃], 1.56 [d, J = 6.64Hz, 3H, CH₃Ala²], 1.52 [d, J = 7.12Hz, 3H, CH₃Ala³], 1.47 [d, J = 6.96Hz, 3H, CH₃Ala¹], 1.44 [s, 9H, 3CH₃Boc].

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 203.65 [CS Ala¹], 202.65 [CS Ala²], 172.21 [COOMe], 155.12 [CO Boc], 80.53 [C₄ Boc], 59.19 [α-CH], 57.20 [α-CH], 53.41 [α-CH], 52.83 [OCH₃], 28.32 [CH₃ Boc], 21.61 [CH₃Ala], 20.76 [CH₃Ala], 19.95 [CH₃Ala].

Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe

Sono stati parzialmente sciolti 200mg di Boc-(Ala)₄-OMe ($4.79 \cdot 10^{-4}$ mol) in 20ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 100ml. Successivamente sono stati aggiunti 582mg di RL ($1.44 \cdot 10^{-3}$ mol, 3eq). La reazione è stata monitorata tramite *TLC* (CH₂Cl₂/EtOH 90:10). Dopo 7 giorni sono stati aggiunti 116mg di RL ($2.87 \cdot 10^{-4}$ mol, 0.6eq) per spingere la reazione verso completezza. La reazione è stata evaporata a pressione ridotta dopo 9 giorni. E' stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente CHCl₃/MeOH 97:3.

Resa: 49%.

Punto di fusione: 150-151°C.

Rf₁: 0.90, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.80.

IR (KBr): 3259, 1730, 1691, 1595, 1516 cm^{-1} .

MS-ESI+: 465.16 (M+H)⁺.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.91 [br, 1H, CSNH Ala²], 8.70 [d-br, J = 5.72Hz, 1H, CSNH Ala³], 8.15 [d-br, J = 5.92Hz, 1H, CSNH Ala⁴], 5.26 [m, 2H, α -CH Ala² α -CH Ala³], 5.18 [br, 1H, NH Ala¹], 5.07 [m, 1H, α -CH Ala⁴], 4.48 [m, 1H, α -CH Ala¹], 3.80 [s, 3H, OCH₃], 1.58 [2d, J = 6.04Hz, 6H, CH₃ Ala² CH₃ Ala³], 1.54 [d, J = 7.16Hz, 3H, CH₃ Ala⁴], 1.48 [d, J = 6.92Hz, 3H, CH₃ Ala¹], 1.44 [s, 9H, 3CH₃ Boc],

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 203.81 [CS Ala¹], 202.22 [CS Ala³], 201.26 [CS Ala²], 172.21 [COOMe], 155.47 [COBoc], 80.75 [C₄ Boc], 59.19 [2 α -CH], 57.44 [α -CH], 53.53 [α -CH], 52.84 [OCH₃], 28.32 [CH₃ Boc], 21.52 [CH₃Ala], 20.78 [2CH₃Ala], 16.97 [CH₃Ala].

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Boc-(Nleu)₂-OMe ($5.52 \cdot 10^{-4}$ mol) in 10ml di THF anidro sotto agitazione e flusso di N₂ in un pallone da 50ml. Successivamente sono stati aggiunti 223mg di RL ($5.52 \cdot 10^{-4}$ mol, 1eq) e la reazione è stata lasciata procedere a riflusso. La reazione è stata monitorata tramite TLC ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 99:1e AcOEt/EtPetr 1:9). Dopo 3 giorni sono stati aggiunti altri 223mg di RL ($5.52 \cdot 10^{-4}$ mol, 1eq) per spingere la reazione verso completezza. Durante il settimo giorno sono stati aggiunti 5ml di THF per compensare l'evaporazione. La reazione è stata evaporata a pressione ridotta dopo 9 giorni. E' stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente AcOEt/EtPetr 1:9. E' stato ottenuto un olio.

Resa: 17%.

Rf₁: 0.95, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.85.

IR (KBr): 3274, 1748, 1690, 1503 cm^{-1} .

MS-ESI+: 375.24 (M+H)⁺.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.24 [d-br, J = 7.26Hz, 1H, CSNH Nleu²], 5.14 [m, 1H, α -CH], 5.12 [br, 1H, NH Nleu¹], 4.29 [m, 1H, α -CH], 3.77 [s, 3H, OCH₃], 1.44 [s, 9H, 3CH₃Boc], 2.04 [m, 4H, 2Nleu β -CH₂], 1.35-1.26 [m, 8H, 2Nleu γ -CH₂, δ -CH₂], 0.89 [m, 9H, 2CH₃ Nleu].

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 205.13 [CS], 172.60 [COOMe], 155.90 [COBoc], 80.21 [C₄Boc], 61.48 [α -CH Nleu], 57.62 [α -CH Nleu], 52.62 [OCH₃], 35.13 [2 Nleu β -CH₂], 28.44 [3CH₃Boc], 28.01 [Nleu γ -CH₂], 27.23 [Nleu γ -CH₂], 22.53 [2Nleu δ -CH₂] e 13.93 [2CH₃ Nleu].

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Boc-(Nleu)₃-OMe ($4.23 \cdot 10^{-4}$ mol) in 5ml di THF anidro sotto flusso di N₂ in un provettone pyrex da 100ml circa. Successivamente sono stati aggiunti 226mg di P₂S₅ ($1.02 \cdot 10^{-3}$ mol, 2.4eq) e ulteriori 2ml di THF e la reazione è stata lasciata procedere in un bagno a ultrasuoni a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata tramite TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 e AcOEt/EtPetr 2:8). Dopo 1 ora e 20 minuti sono stati aggiunti 113mg di P₂S₅ ($5.08 \cdot 10^{-4}$ mol, 1.2eq) per spingere la reazione verso completezza, mentre la temperatura del bagno ha raggiunto autonomamente i 45°C che manterrà costanti in futuro. Dopo 2 ore e 40 minuti sono stati aggiunti

56mg di P_2S_5 ($2.54 \cdot 10^{-4}$ mol, 0.6eq). Dopo 3 ore la reazione è stata fermata. Il giorno seguente è stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente AcOEt/EtPetr 1:9 a gradiente sino a AcOEt/EtPetr 2:8. E' stato ottenuto un olio arancione.

Resa: 27%.

Rf₁: 0.95, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.90.

IR (KBr): 3295, 1731, 1691, 1510 cm^{-1} .

MS-ESI+: 504.29 (M+H)⁺.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.54 [d-br, J = 7.04Hz, 1H, CSNH], 8.02 [d-br, J = 7.56Hz, 1H, CSNH], 5.27 [m, 1H, α -CH], 5.10 [m, 1H, α -CH], 5.10 [br, 1H, NH NLeu¹], 4.29 [m, 1H, α -CH], 3.78 [s, 3H, OCH₃], 2.01 [m, 2H, NLeu² β -CH₂], 2.00 [m, 2H, NLeu³ β -CH₂], 1.93 [m, 2H, NLeu¹ β -CH₂], 1.94 [m, 2H, NLeu² γ -CH₂], 1.84 [m, 2H, NLeu³ γ -CH₂], 1.71 [m, 2H, NLeu¹ γ -CH₂], 1.44 [s, 9H, 3CH₃Boc], 1.34 [m, 2H, NLeu² δ -CH₂], 1.32 [m, 4H, NLeu¹ NLeu³ δ -CH₂], 0.89 [m, 9H, 3CH₃NLeu].

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 204.01 [CS Ala¹], 202.16 [CS Ala²], 171.60 [COOMe], 155.57 [COBoc], 80.21 [C₄Boc], 64.18 [α -CH NLeu], 63.94 [α -CH NLeu], 61.59 [α -CH NLeu], 52.62 [OCH₃], 35.14 [NLeu β -CH₂], 34.43 [NLeu β -CH₂], 30.70 [NLeu β -CH₂], 28.34 [3CH₃Boc], 27.83 [NLeu γ -CH₂], 27.30 [2NLeu γ -CH₂], 22.27 [3NLeu δ -CH₂] e 13.90 [3CH₃NLeu].

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe

Sono stati sciolti 200mg di Boc-(Nleu)₄-OMe ($3.414 \cdot 10^{-4}$ mol) in 7ml di THF anidro sotto flusso di N₂ in un provettone pyrex da 100ml circa. Successivamente sono stati aggiunti 273mg di P_2S_5 ($1.229 \cdot 10^{-3}$ mol, 3.6eq), la reazione è stata lasciata procedere in un bagno a ultrasuoni a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata tramite TLC (CHCl₃/MeOH 95:5 e AcOEt/EtPetr 2:8). In seguito sono state aggiunte diverse aliquote di P₂S₅ per spingere la reazione. Sono stati aggiunti in serie 1.8eq dopo 50', 1.2eq (120'), 1.2eq (150'), 0.6eq (250') e 1.2eq (300'). Dopo un'ora circa la temperatura del bagno ha raggiunto autonomamente i 45°C che manterrà costanti in futuro. Dopo 5 ora e mezza la reazione è stata fermata. Il giorno seguente è stata fatta una colonna flash utilizzando come eluente AcOEt/EtPetr 1:9 a gradiente sino a AcOEt/EtPetr 2:8. E' stato ottenuto un olio arancione.

Resa: 33%.

Rf₁: 0.95, **Rf₂:** 1, **Rf₃:** 0.90.

IR (KBr): 3286, 1729, 1690, 1511 cm^{-1} .

MS-ESI+: 633.33 (M+H)⁺.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.64 [br, 1H, CSNH Nleu²], 8.37 [d-br, J = 7.00Hz, 1H, CSNH Nleu³], 8.06 [d-br, J = 5.18Hz, 1H, CSNH Nleu⁴], 5.23 [m, 2H, α -CH Nleu² α -CH Nleu³], 5.16 [br, 1H, NH Nleu¹], 5.13 [m, 1H, α -CH Nleu⁴], 4.31 [m, 1H, α -CH Nleu¹], 3.78 [s, 3H, OCH₃], 1.98 [m, 2H, NLeu² β -CH₂], 2.01 [m, 2H, NLeu³ β -CH₂], 2.00 [m, 2H, NLeu⁴ β -CH₂], 1.93 [m, 2H, NLeu¹ β -CH₂], 1.90 [m, 2H, NLeu² γ -CH₂], 1.91 [m, 2H, NLeu³ γ -CH₂], 1.83 [m, 2H, NLeu⁴ γ -CH₂], 1.71 [m, 2H, NLeu¹ γ -CH₂], 1.44 [s, 9H,

3CH₃Boc], 1.31 [m, 2H, NLeu³ δ-CH₂], 1.30 [m, 4H, NLeu¹ NLeu⁴ γ-CH₂], 1.28 [m, 2H, NLeu² δ-CH₂], 0.89-0.88 [m, 12H, 4CH₃ NLeu].

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 203.86 [CS], 201.81 [CS], 201.25 [CS], 171.59 [COOMe], 155.57 [COBoc], 80.33 [C4Boc], 64.18 [α-CH Nleu], 63.94 [α-CH Nleu], 61.59 [α-CH Nleu], 57.60 [α-CH Nleu], 52.62 [OCH₃], 35.07 [NLeu β-CH₂], 34.41 [2NLeu β-CH₂], 30.87 [NLeu β-CH₂], 28.44 [3CH₃Boc], 27.83 [NLeu γ-CH₂], 27.40 [NLeu γ-CH₂], 27.29 [NLeu γ-CH₂], 27.20 [NLeu γ-CH₂], 22.35 [4Nleu δ-CH₂] e 13.81 [4CH₃ NLeu].

3. Risultati e discussione

3.1 Sintesi

Nel Laboratorio erano già presenti quantità sufficienti delle serie degli omopeptidi di Ala e NLeu (verificata la purezza tramite TLC e $^1\text{H-NMR}$, codice di riferimento laboratorio^[71,72]). La serie omopeptidica della Gly è stata invece sintetizzata attraverso metodi di sintesi in soluzione principalmente per isolare e caratterizzare tutte le sequenze intermedie, in modo da valutare l'effetto della lunghezza della catena sulla conformazione del peptide. Inizialmente è stato sintetizzato il dipeptide Z-(Gly)₂-OMe, poi il tripeptide Z-(Gly)₃-OMe ed infine il tetrapeptide Z-(Gly)₄-OMe. E' bene specificare che con "analoghi tionati" ci si riferisce a peptidi aventi tutti i gruppi ammidici convertiti a tioamidici, escludendo quindi i carbonili uretanici (verso l'N-protettore) ed esterei (verso il C-protettore) che presentano minore reattività del legame peptidico alla tionazione (vedi figura 1.19).

3.1.1 Gruppi protettori dei peptidi

I peptidi sintetizzati in questo lavoro di Tesi sono omopeptidi della Gly aventi Z (benzilossicarbonile) come gruppo N-protettore. E' stato scelto perché molto stabile e aiuta a seguire in TLC il decorso delle reazioni, i composti sono visibili alla lampada UV. La scelta del gruppo C-protettore è ricaduta sull'estere metilico per far sì che la serie fosse simile alle altre due disponibili (Ala e Nleu). Gli omopeptidi dell'Ala e della Nleu presentano il Boc come N-protettore.

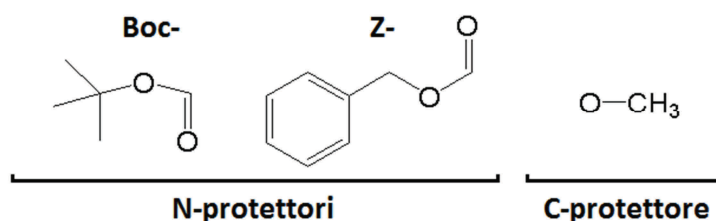


Figura 3.1 Strutture chimiche dei gruppi N- e C-protettori utilizzati in questo Lavoro di Tesi.

3.1.2 Metodi di attivazione

I metodi di attivazione utilizzati per le reazioni di coupling sono la via EDC/HOBt^[73], seguita per Z-(Gly)₄-OMe, e la via dell'isobutilcloroformiato (i-BCF)^[74], usate per le sintesi di Z-(Gly)₂-OMe e Z-(Gly)₃-OMe.

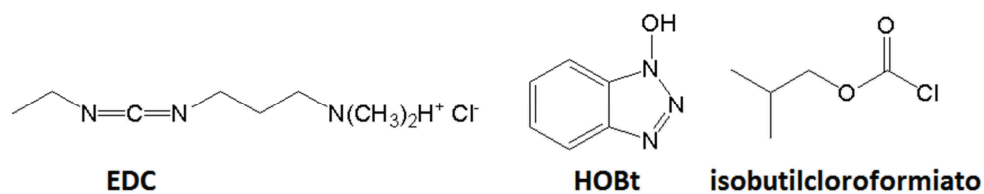


Figura 3.2 Reagenti utilizzati nelle reazioni di coupling degli omopeptidi della Gly.

Di seguito viene mostrato il meccanismo di attivazione di Z-Gly-OH mediante i-BCF (figura 3.3): si forma un'anidride mista che subisce l'attacco del nucleofilo (azoto dell'amminoacido o del peptide N-deprotetto).

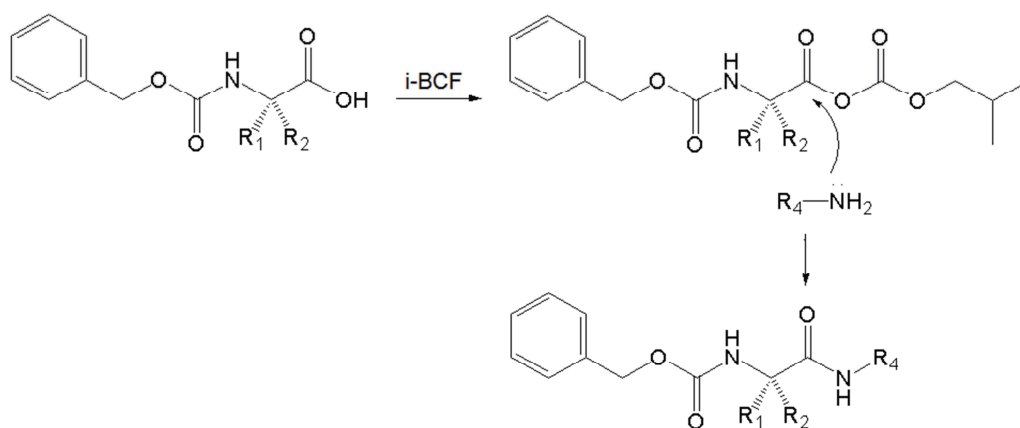


Figura 3.3 Meccanismo di attivazione tramite i-BCF e successiva reazione di coupling.

Nella procedura di attivazione via EDC/HOBT (figura 3.4), la carbodiimmide (EDC) promuove la formazione di un intermedio estere attivo con il peptide deprotetto al C-terminale. Poi si ha l'attacco nucleofilo da parte del peptide con l'N-terminale deprotetto verso il carbonile attivato dall'EDC a dare l'ammide e una urea.

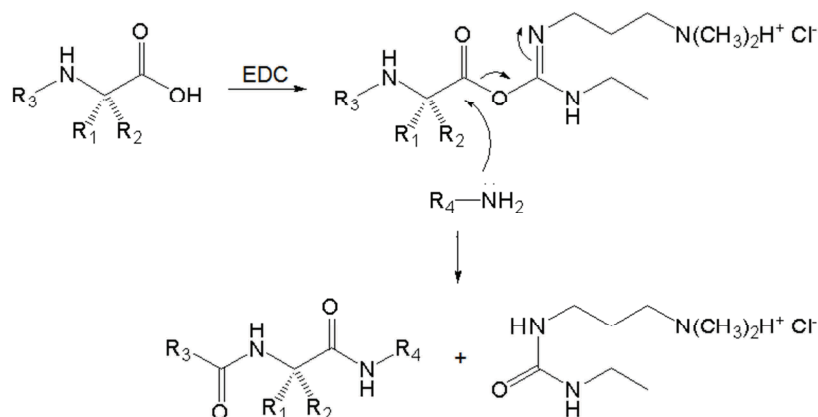


Figura 3.4 Meccanismo della via con EDC/HOBT.

L'HOBt aiuta a sopprimere la racemizzazione e al tempo stesso favorisce la reazione di acilazione. In realtà le Gly non possono racemizzare poiché non sono chirali. L'HOBt comunque catalizza il processo di coupling ed evita la formazione dell'ossazolone, composto ciclico poco reattivo (molecola in basso a sinistra in figura 3.5).

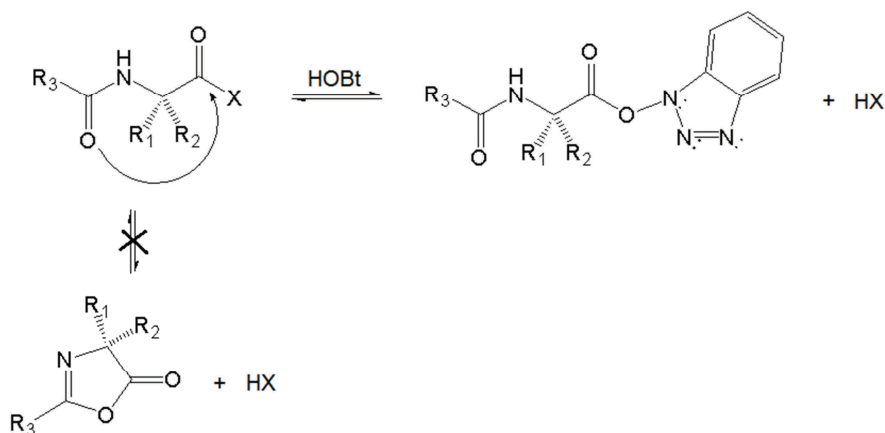


Figura 3.5 Interazione tra il C-terminale di un peptide (dove X = possibile gruppo uscente) e HOBt al fine di sfavorire la formazione del composto eterociclico chiamato ossazolone (in basso). L'intermedio formato con l'HOBt a destra risulta essere attivato per l'attacco nucleofilo.

3.2 Tionazione del legame peptidico

Per la reazione di tionazione è stato scelto inizialmente il Reagente di Lawesson, noto in letteratura per queste procedure, in THF anidro sia a temperatura ambiente, sia a reflusso.^[6,36,40] Tale reagente ha funzionato in maniera accettabile nel caso degli omopeptidi di Gly e Ala. Successivamente, per effettuare la tionazione dei peptidi delle Nleu, stericamente ingombrati, si è individuato un metodo più efficace: P₂S₅ in THF e trattamento con ultrasuoni.^[43]

Procedura di tionazione con il Reagente di Lawesson

Si è inizialmente proceduto con la tionazione degli omopeptidi di Ala e Nleu, poichè già disponibili in laboratorio. La tionazione di Boc-(Ala)₂-OMe (RL, THF, rt) è stata conseguita con una resa del 67% in un tempo pari a 30 ore.

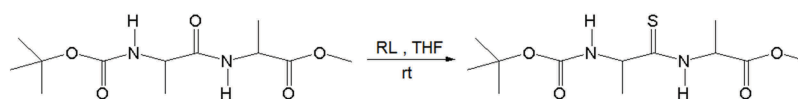


Figura 3.6 Reazione di Boc-(Ala)₂-OMe in THF, con RL e ad rt a dare l'analogo tionato Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe, resa 67%.

La tionazione di Boc-(Ala)₃-OMe (RL, THF, rt poi Δ), nelle medesime condizioni, non procedeva inizialmente. Nonostante la scelta di portare in seguito a riflusso il sistema (~66°C), è stato ottenuto un prodotto sporco e con resa molto scarsa dopo purificazione in colonna. Dalla sovrapposizione degli spettri ¹H-NMR delle varie frazioni ottenute dopo separazione cromatografica su colonna di gel di silice, si notano molti picchi nella zona dove risuonano i protoni del gruppo C-protettore O-CH₃. E' plausibile ritenere che i vari sottoprodotti siano tutti tripeptidi aventi tionazioni differenziate o altri tipi di trasformazioni. Pertanto, si conferma che il reagente di Lawesson in un sistema a riflusso, come riportato già da altri, porta a molteplici reazioni secondarie.^[36,39] Per quanto riguarda la serie delle Nleu, non si sono avuti risultati accettabili con la medesima procedura sopra descritta. Dalla tionazione di Boc-(Nleu)₂-OMe (RL, THF, Δ) è stato ottenuto il prodotto desiderato con una resa del 17% dopo ben nove giorni a riflusso. Mentre per quanto riguarda la tionazione di Boc-(Nleu)₃-OMe (RL, THF, Δ, 4 giorni) non si è nemmeno riusciti ad ottenere il prodotto ditionato cercato, ma solamente il monotionato sul carbonile del residuo Nleu¹ (vedi NMR bidimensionale) con resa pessima (5%).

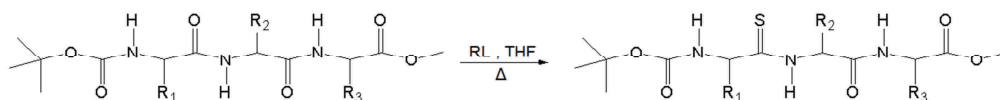


Figura 3.7 Reazione di Boc-(Nleu)₃-OMe in THF, con RL e a riflusso a dare l'analogo monotionato Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Nleu-OMe invece del ditionato cercato. Per R_{1,2,3} = -(CH₂)₃CH₃. Resa 5%.

Dopo questo riscontro negativo è stata vagliata l'ipotesi di sintetizzare la serie delle Gly, ipotizzando che la riuscita non ottimale della tionazione degli omopeptidi di Ala e Nleu fosse causata dall'ingombro sterico dei gruppi alchilici legati al C^α. L'ipotesi può essere confermata: con la stessa procedura sopra descritta (RL, THF, rt) sono stati sintetizzati gli analoghi completamente tionati di Z-(Gly)₂-OMe, Z-(Gly)₃-OMe e Z-(Gly)₄-OMe senza riscontrare grossi problemi e con rese accettabili. E' stato fatto un tentativo anche su Z-(Gly)₅-OMe, ma non si è riusciti a tionarlo poiché risulta fortemente impaccato ed insolubile nella maggior parte dei solventi organici. Anche Z-(Gly)₃-OMe e Z-(Gly)₄-OMe risultano avere una solubilità ridotta in molti solventi organici (incluso THF). Inizialmente sono stati posti nel pallone di reazione sotto forma di sospensione. Tuttavia, la piccola quantità solubilizzata veniva convertita gradualmente nel peptide tioammidato, più solubile del corrispondente ossigenato, portando a completa solubilizzazione la sospensione iniziale.

Procedura di tionazione con ultrasuoni e P₂S₅

Dopo un'accurata ricerca bibliografica sono stati trovati alcuni interessanti articoli riguardanti l'utilizzo di ultrasuoni^[43,66] e microonde^[13,65] come catalizzatori nelle reazioni di tionazione. E' stato scelto di servirsi degli ultrasuoni in quanto la strumentazione era già presente nel laboratorio mentre il microonde non era disponibile nell'immediato e, soprattutto, c'era il rischio di inquinare uno

strumento utilizzato per altra tipologia di reazioni. Infatti, lo zolfo avvelena molti catalizzatori, come da me stesso verificato: ho dovuto condurre le idrogenazioni catalitiche (H_2 su Pd/C) in un laboratorio diverso da quello in cui utilizzavo il RL. Una ragione in più alla scelta degli ultrasuoni sta nel fatto che con tale procedura sono stati ottenuti dipeptidi stericamente ingombrati^[43] con ottime rese, utilizzando P_2S_5 come agente tionante. Infatti, la tionazione di Boc-(Nleu)₄-OMe su tutti e tre i legami ammidici è stata conseguita con successo in un tempo più che ragionevole (5 ore e mezza).

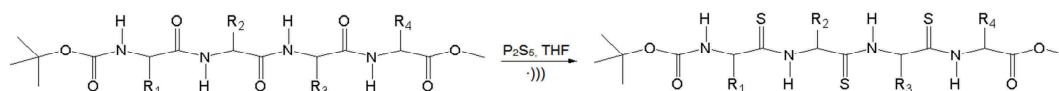


Figura 3.8 Reazione di Boc-(Nleu)₄-OMe in THF, con P_2S_5 e a riflusso a dare l'analogo tionato Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe. Per $R_{1,2,3} = -(CH_2)_3CH_3$. Resa 33%.

Le reazioni sono state seguite tramite *TLC*. Comparivano macchie con *rf* crescenti, poi associate ai tiopeptidi, al procedere delle reazioni. Per ogni reazione è stata richiesta una purificazione tramite colonna di gel di silice "flash" con l'eluente adeguato. Quest'ultima è stata eseguita con facilità poiché i composti da separare presentavano in *TLC* *rf* sufficientemente differenti anche tra mono- e di-tionati (quando intermedi nella reazione).

Solubilità dei poliopeptidi

Come riportato da Seebach *et al.* per quanto riguarda i β -tiopeptidi^[6], anche gli α -peptidi tionati presentano una solubilità maggiore rispetto agli omologhi ossigenati. Questo si è osservato quando, al procedere delle reazioni di tionazione con RL, la sospensione iniziale costituita dal peptide ossigenato diventava limpida. Esempio è stato il caso del tetrapeptide Z-(Gly)₄-OMe, insolubile o poco solubile in THF. La ridotta solubilità è probabilmente dovuta ad una struttura secondaria tipo β -sheets, come sembra indicare lo spettro IR in soluzione sia a 10^{-3} sia a 10^{-4} M in $CDCl_3$ (vedi sezione seguente).

Stabilità dei poliopeptidi

Sono risultati stabili per la conservazione in frigorifero Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe, Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe, Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe, Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe e Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe. Infatti, gli spettri ¹H-NMR del composto solido conservato in frigorifero e del composto in soluzione (contenuto nel tubo NMR) non hanno subito nessuna variazione apprezzabile anche a distanza di un mese.

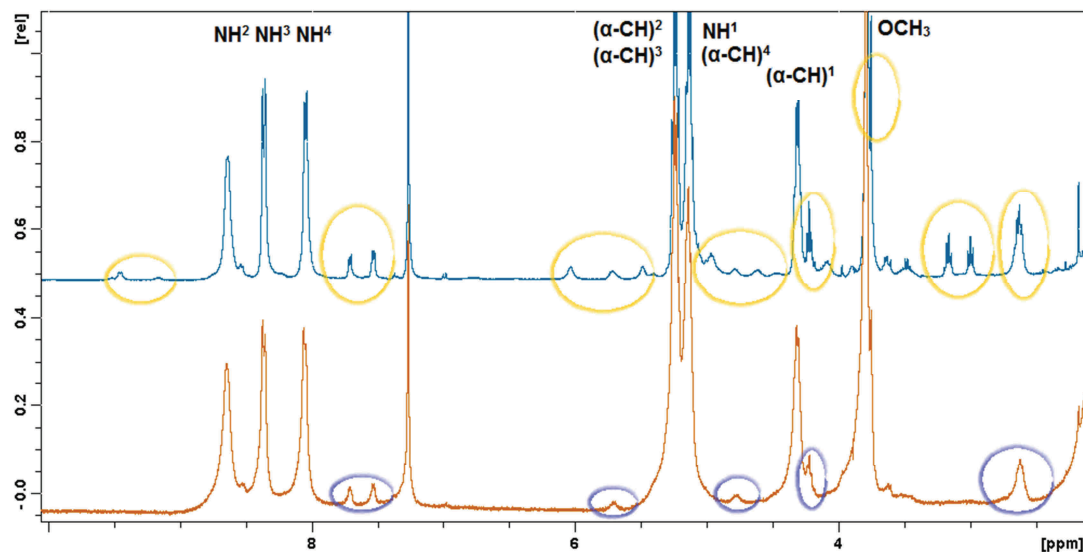


Figura 3.9 Spettro $^1\text{H-NMR}$ di Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe in CDCl_3 osservato 3 giorni dopo la sintesi (arancione) e 20 giorni dopo (blu).

Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe, purificato tramite colonna *flash* e trasferito in *vial* (a secco da metanolo), ha mostrato negli spettri $^1\text{H-NMR}$ un elevato numero di picchi sovrapposti al composto desiderato nell'analisi eseguita dopo 20 giorni circa. Nella relativa TLC, al singolo *spot* presente a fine purificazione se n'erano aggiunti diversi altri ad *rf* sia maggiori che minori.

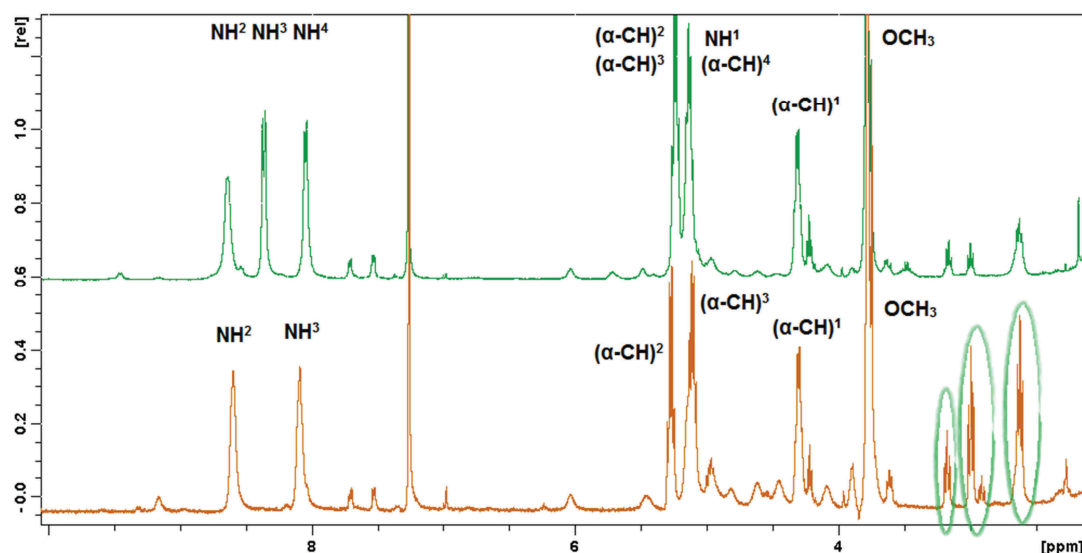


Figura 3.10 Confronto tra gli spettri $^1\text{H-NMR}$ del tripeptide (dopo 30 giorni, in arancione) e il tetrapeptide (dopo 20 giorni, in verde) tionati in CDCl_3 . In evidenza 3 segnali "indesiderati" molto forti ed in comune tra le due molecole, a 2.50-3.30 ppm.

Il simile composto Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe è risultato anch'esso in fase di decomposizione dopo circa un mese dalla purificazione in colonna. Curiosamente, i diversi picchi in comune potrebbero indicare uno stesso meccanismo di decomposizione.

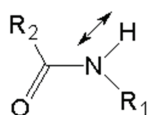
3.3 Indagini conformazionali

3.3.1 Assorbimento IR in soluzione

La spettrofotometria di assorbimento infrarossa ci permette di ricavare interessanti informazioni sulla struttura tridimensionale di un peptide, indagando principalmente gli assorbimenti del gruppo ammidico. E' utile analizzare le variazioni degli assorbimenti al crescere della catena peptidica con lo scopo di associare la presenza di gruppi NH liberi (da legami a idrogeno) e legati a particolari conformazioni assunte dai peptidi.^[75,76] Sono stati condotti studi conformazionali IR in soluzione sugli omopeptidi e i loro analoghi tionati per valutare l'entità dei legami a idrogeno tra gli NH e i C=O ammidici o i C=S tioammidici. Attraverso queste analisi si possono formulare ipotesi circa la natura dei legami, distinguendo inoltre tra legami *inter-* o *intra-*molecolari confrontando soluzioni a differente concentrazione (10^{-3} e 10^{-4} M). Lo studio è stato svolto in cloroformio deuterato, solvente di bassa polarità.^[77]

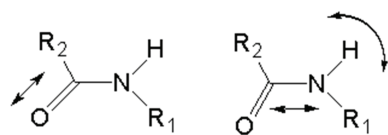
Nella zona $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ si possono incontrare gli assorbimenti dovuti alle vibrazioni di stiramento dei legami NH dei gruppi uretanici, ammidici e tioammidici. Nell'intervallo $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ troviamo invece le vibrazioni di stiramento dei legami C=O esterei, uretanici e peptidici. Nei peptidi, classicamente, vengono utilizzati i seguenti modi vibrazionali per interpretare le bande IR:

Ammide A (*Stretching* NH, $3600-3200\text{ cm}^{-1}$)



In questa zona spettrale cadono gli assorbimenti dovuti agli *stretching* degli NH ammidici (banda ammidice A), che variano molto a seconda della presenza e dell'intensità di legami ad idrogeno che impegnino questo gruppo. Un legame a idrogeno esplica una forza attrattiva verso il protone andando ad indebolire il legame NH che necessiterà di minore energia per entrare in risonanza. Gruppi NH liberi assorbono a frequenze di $\sim 3420\text{ cm}^{-1}$, mentre gli NH legati assorbono a minore frequenza (e quindi minore energia). La frequenza di assorbimento dell'ammide A, che dipende dall'intensità del legame a idrogeno, darà indicazioni sul tipo di struttura tridimensionale adottata da un peptide. Ad esempio, una conformazione completamente estesa sarà caratterizzata da frequenze maggiori ($\sim 3360\text{ cm}^{-1}$) rispetto al β -sheet ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$) o ad un'elica ($\sim 3330\text{ cm}^{-1}$). La frequenza di assorbimento dell'ammide A in un'elica α oppure 3_{10} varia al variare della lunghezza della catena peptidica. Le frequenze tipiche di un'elica iniziano a vedersi con una catena di lunghezza minima di tre residui, numero indispensabile per ottenere un primo avvolgimento (β -turn), ma all'aumentare del numero di residui si ottiene un rafforzamento della struttura elicoidale, in funzione del maggior numero di ponti a H, ed uno spostamento del massimo di assorbimento ad energie inferiori. Pertanto, le varie conformazioni si possono distinguere dalla posizione delle bande di assorbimento degli stretching NH, influenzate dalla presenza o meno di legami a H.^[74,75,78]

Ammide I e II (1800-1500 cm^{-1})



Nell'intervallo di frequenze compreso tra 1800 e 1500 cm^{-1} si possono osservare gli assorbimenti detti ammido I e II.

L'assorbimento ammido I è dovuto principalmente allo *stretching* C=O (80%) con contributo di *bending* NH (10%) e di *stretching* CN (10%). Si incontra a frequenze tra i 1660 e i 1620 cm^{-1} . Un segnale a 1660 cm^{-1} può indicare un' α -elica mentre a 1640-1630 cm^{-1} un β -turn. L'ammido II è invece costituita da un 40% di *stretching* CN e un 60% di *bending* NH e si può normalmente osservare a frequenze che vanno dai 1570 ai 1480 cm^{-1} . Anche questi modi sono influenzati dalla struttura secondaria e permettono di fare un'analisi qualitativa della conformazione assunta dal peptide.^[78]

Modi vibrazionali nelle tioammidi

Le bande di assorbimento relative agli *stretching* NH delle tioammidi sono relativamente facili da assegnare. Più problematica risulta, invece, l'assegnazione degli assorbimenti del gruppo C=S, per i quali non c'è un'uniformità di vedute in letteratura. Lo *stretching* C=S cade in una regione (1525-1485 cm^{-1}) dove altri modi di vibrazione danno origine ad assorbimenti intensi. Anche per un semplice tripeptide il compito è arduo.^[54] Per analogia con le ammidi, anche nelle tioammidi sono stati assegnati modi di vibrazione denominati *tioammide I* (1570 - 1395 cm^{-1} , forte, δ NH + C=S), *tioammide II* (1420 - 1260 cm^{-1} , variabile), *tioammide III* (1140 - 940 cm^{-1} , variabile).^[79] Tali denominazioni sono correntemente usate^[80] anche se un diverso tipo di nomenclatura (A, B, C... invece di I, II, III...) è stato proposto, per sottolineare la differenza notevole con le ammidi.^[81] Questi autori sostengono anche che lo *stretching* C=S di una tioammide non compaia neppure nel suo spettro di assorbimento IR. Infatti, la vibrazione C=S negli spettri delle tioammidi ha prevalentemente un carattere di singolo legame e quindi dovrebbe essere assegnata alla regione 600-800 cm^{-1} (talvolta indicata come tioammide IV). Altri autori^[14] ritengono che lo *stretching* C=S cada nella zona 1120 \pm 20 cm^{-1} . Alla luce delle difficoltà espresse, in questo studio di Tesi si commenterà solamente lo *stretching* NH tioamidico, che assorbe nella regione dell'ammido A, per quanto riguarda le tioammidi, tralasciando ogni altro modo vibrazionale di non facile assegnazione. L'indagine di assorbimento IR in soluzione è stata effettuata alle concentrazioni di 10⁻³ M e 10⁻⁴ M. Le frequenze dei massimi di assorbimento IR nelle regioni 3600-3200 cm^{-1} e 1800-1500 cm^{-1} sono riportate nella tabella seguente:

| Nome composto | Valori Soluzioni 10 ⁻⁴ M 3600-3200 cm ⁻¹ | Valori Soluzioni 10 ⁻³ M 3600-3200 cm ⁻¹ | Valori Soluzioni 10 ⁻³ M 1800-1500 cm ⁻¹ |
|---|--|---|--|
| Z-(Gly) ₂ -OMe | <u>3446</u> , 3422 ^a | <u>3443</u> , 3428 ^a | 1746, <u>1723^a</u> , 1690, <u>1531^a</u> , 1504 ^b |
| Z-(Gly) ₃ -OMe | <u>3443</u> , 3419 ^a , <u>3361^a</u> | <u>3439</u> , 3371 ^a | 1750, <u>1711</u> , 1679, <u>1516^a</u> , <u>1499</u> , <u>1482^a</u> |
| Z-(Gly) ₄ -OMe | <u>3441</u> , <u>3407</u> , 3327 ^a , <u>3291^b</u> | 3327 ^a , <u>3292^b</u> | 1711, 1690, <u>1647^b</u> , <u>1552</u> , <u>1546</u> |
| Z-Gly-ψ[CSNH]-Gly-OMe | 3443, 3404 ^a , <u>3357</u> | 3444, <u>3356</u> | <u>1745</u> , 1709 ^a , 1531 ^a , 1512, <u>1498^a</u> |
| Z-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-OMe | 3443, 3396 ^a , <u>3356</u> , <u>3253^b</u> | 3444, 3391 ^a , <u>3356</u> , <u>3248^b</u> | <u>1745</u> , <u>1733^a</u> , <u>1711^a</u> , 1528 ^a , <u>1515^b</u> |
| Z-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-OMe | 3442, 3392 ^a , <u>3357</u> , <u>3252^b</u> | 3444, 3389 ^a , <u>3357</u> , <u>3247^b</u> | 1744 ^b , <u>1730^a</u> , <u>1711</u> , 1528 ^a , <u>1511^b</u> |
| Boc-(Ala) ₂ -OMe | 3436, 3420 ^b | 3437, 3420 ^b | 1740, <u>1711</u> , 1679, 1519 ^a , 1497 |
| Boc-(Ala) ₃ -OMe | 3428, <u>3359^b</u> | 3428, <u>3351^b</u> | 1740, <u>1711</u> , <u>1690^a</u> , <u>1668^a</u> , <u>1529^a</u> , <u>1498^b</u> |
| Boc-(Ala) ₄ -OMe | 3427, 3343 ^b | 3427, <u>3361^a</u> , 3342 ^b | <u>1752^a</u> , <u>1737^b</u> , <u>1711</u> , 1683 ^b , <u>1670^b</u> , <u>1521^b</u> , <u>1499^b</u> |
| Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe | <u>3436</u> , 3384 ^a , <u>3362</u> , 3341 ^a | <u>3437</u> , 3390 ^a , <u>3360</u> , 3342 ^a | <u>1739</u> , 1706, <u>1686^a</u> , 1519 ^a , 1489 ^b |
| Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe | <u>3437</u> , 3404 ^a , 3387, <u>3357</u> , <u>3262^b</u> | <u>3427</u> , 3360 ^a , <u>3341^a</u> , <u>3261^b</u> | <u>1737^a</u> , <u>1711</u> , 1599, 1571, 1513 ^b , 1500 ^a , <u>1482^a</u> |
| Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe | 3434, 3386 ^a , <u>3355</u> , <u>3262^b</u> | 3437, 3382 ^a , <u>3356</u> , <u>3265^b</u> , 3156 | <u>1738^a</u> , <u>1711</u> , 1521 ^a , 1509 ^b , 1500 ^a |
| Boc-(Nleu) ₂ -OMe | 3440, 3421 ^a | 3440, 3421 ^a | 1740, 1706 ^b , 1678 ^b , 1520 ^a , 1497 |
| Boc-(Nleu) ₃ -OMe | 3439, 3422 ^a , <u>3365^b</u> | 3439, 3422 ^a , <u>3365^b</u> | 1740, 1707 ^a , 1687 ^a , <u>1668^b</u> , <u>1524^a</u> , <u>1498</u> |
| Boc-(Nleu) ₄ -OMe | 3433, <u>3337^b</u> | 3433, <u>3337^b</u> | 1740, 1706, <u>1678</u> , <u>1664^a</u> , <u>1540^a</u> , <u>1520^a</u> , <u>1497^a</u> |
| Boc-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-OMe | <u>3439</u> , *3402 ^a , <u>3389^a</u> , <u>3361^b</u> , 3338 ^a | <u>3439</u> , 3389 ^a , <u>3361^b</u> , 3338 ^a | 1739 ^b , <u>1710</u> , <u>1572^a</u> , 1517 ^a , 1497 |
| Boc-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-OMe | <u>3551</u> , <u>3524</u> , <u>3439</u> , 3409, <u>3385^a</u> , <u>3362</u> , 3280 ^b | <u>3551</u> , <u>3524</u> , <u>3439</u> , 3409, <u>3385^a</u> , <u>3362</u> , 3280 ^b | <u>1739^b</u> , <u>1710</u> , <u>1689^a</u> , <u>1579^a</u> , <u>1573^a</u> , <u>1548^a</u> , <u>1510^b</u> |
| Boc-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-OMe | 3439, 3385 ^a , <u>3362</u> , <u>3275^b</u> | 3439, 3385 ^a , <u>3362</u> , <u>3275^b</u> | 1738, 1704, <u>1572^a</u> , <u>1507^b</u> |

Tabella 3.1 Valori dei massimi di assorbimento IR per i composti indicati nelle regioni dell'Ammide A, Ammide I e Ammide II. NOTA: ^aspalla, ^bbanda larga. I valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...), intense (—) e molto intense (—).

*Ottenuto tramite "fitting".

Dalla tabella 3.1 (colonna a destra) notiamo che negli spettri dei peptidi tionati e normali i C=O uretanici ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) ed esterei ($1700\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$) presentano valori simili. Di seguito, sono riportati gli spettri di assorbimento IR più significativi, relativi ai dati della tabella 3.1. Nella figura 3.11 sono riportati gli spettri di Z-(Gly)₂-OMe e Z-(Gly)₃-OMe e le relative deconvoluzioni. E' opportuno specificare che le aree sottese ottenute dal fitting dello spettro sono da ritenersi solo qualitative in quanto gli ϵ tra NH liberi, legati e CSNH liberi e legati sono tutti differenti tra loro.

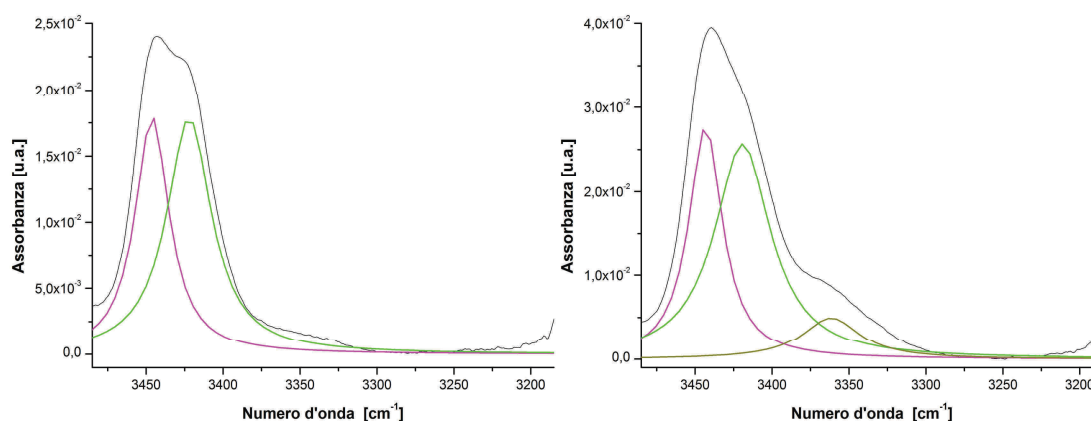


Figura 3.11 Spettri di Z-(Gly)₂-OMe (a sinistra) e Z-(Gly)₃-OMe (a destra) nella zona $3480\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$ e relative deconvoluzioni. Concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ in CDCl_3 .

| | | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|------|------|------|
| Z-(Gly) ₂ -OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3446 | 3422 | |
| | Area sottesa | 1.00 | 1.32 | |
| Z-(Gly) ₃ -OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3443 | 3419 | 3361 |
| | Area sottesa | 1.00 | 1.54 | 0.31 |

Tabella 3.2 Valori delle bande e delle aree sottese, ottenuti attraverso *fitting* gaussiano degli spettri di figura 3.9.

Le bande tra $3450\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ indicano NH non legati. La banda meno intensa a 3361 cm^{-1} nel tripeptide è assegnabile ad un NH legato in β -turn. Il tetrapeptide Z-(Gly)₄-OMe mostra nettamente la formazione di legami ad H intermolecolari, tipo β -sheets, avendo due bande al di sotto dei 3300 cm^{-1} . Nella figura sottostante vengono confrontati due spettri a concentrazione differente.

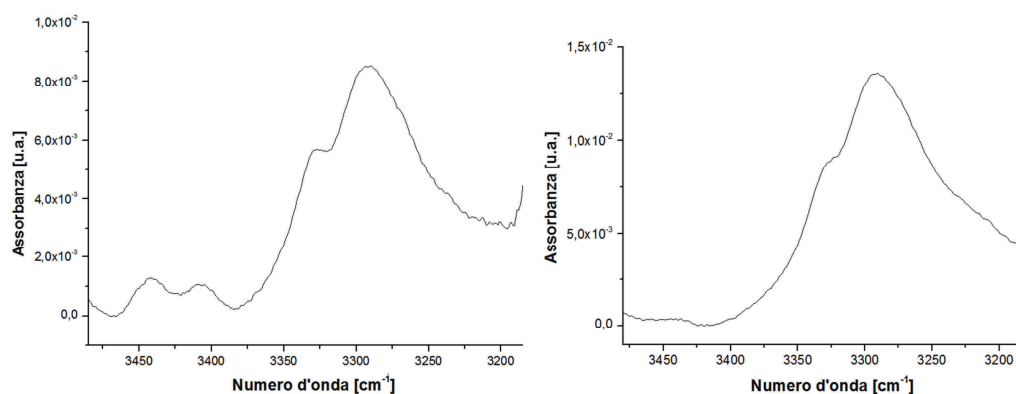


Figura 3.12 Spettro della Z-(Gly)₄-OMe in soluzione di CDCl_3 a 10^{-4} M (a sinistra) e 10^{-3} M (a destra) nella zona $3480\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$.

Nella soluzione più diluita (10^{-4} M) il peptide mostra delle bande tra $3450-3400\text{ cm}^{-1}$ che potrebbero ragionevolmente indicare degli NH liberi. Riassumendo, in Z-(Gly)₃-OMe vi è una modesta popolazione di β -turn, mentre Z-(Gly)₄-OMe è aggregato in struttura β . Esaminiamo ora gli spettri degli analoghi tionati di Z-(Gly)₂-OMe, Z-(Gly)₃-OMe e Z-(Gly)₄-OMe, riportati in figura 3.13. Le relative deconvoluzioni sono riportate in figura 3.14, 3.15 e 3.16.

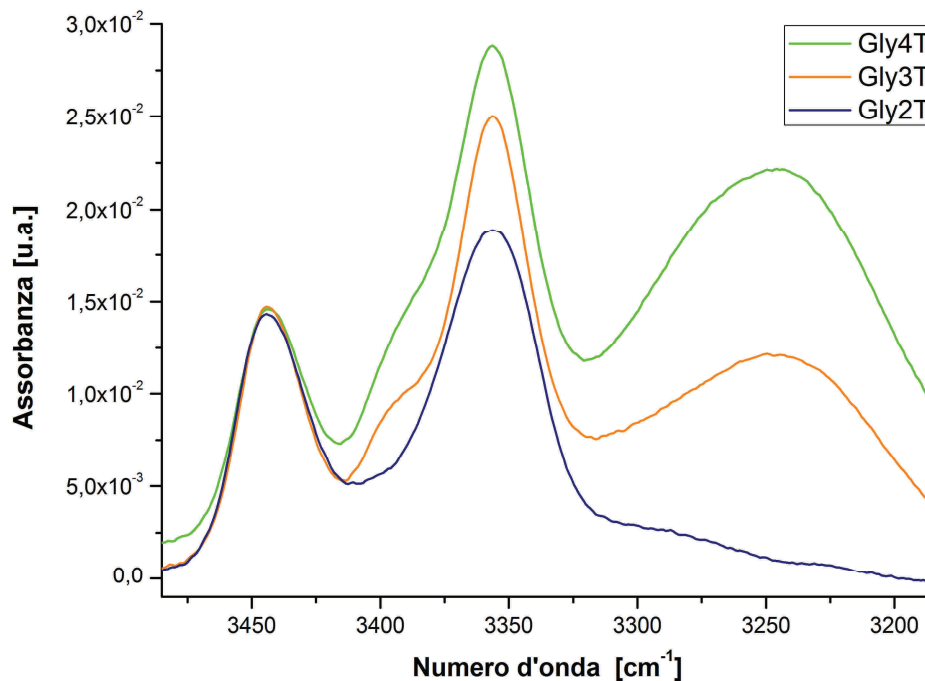


Figura 3.13 Confronto tra Z-Gly- ψ [CSNH]-Gly-OMe (Gly2T), Z-Gly- ψ [CSNH]-Gly- ψ [CSNH]-Gly-OMe (Gly3T) e Z-Gly- ψ [CSNH]-Gly- ψ [CSNH]-Gly- ψ [CSNH]-Gly-OMe (Gly4T), a $1 \cdot 10^{-4}$ M in CDCl_3 , nella zona $3480-3180\text{ cm}^{-1}$. Gli spettri sono stati normalizzati a $\sim 3440\text{ cm}^{-1}$.

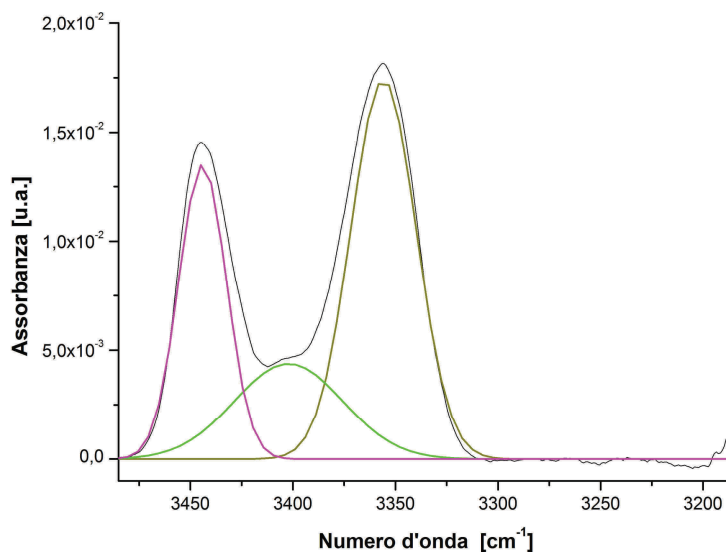


Figura 3.14 Spettro e relative deconvoluzione di Z-Gly- ψ [CSNH]-Gly-OMe nella zona $3480-3180\text{ cm}^{-1}$. Concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ M in CDCl_3 .

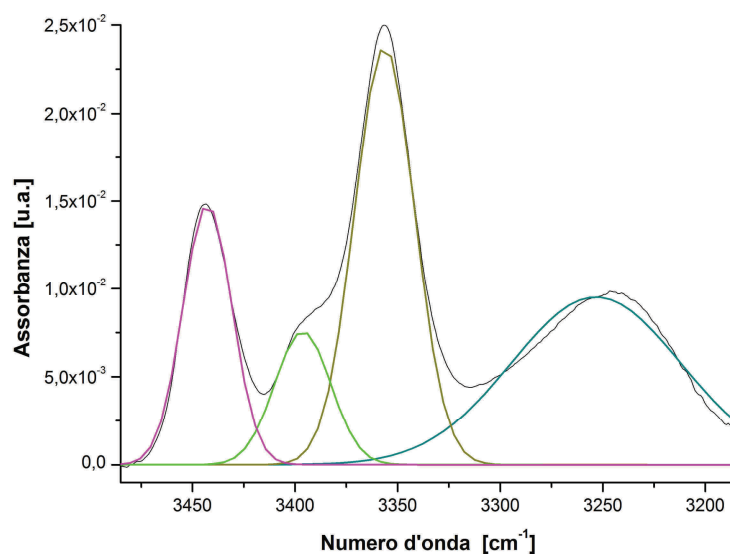


Figura 3.15 Spettro e relativa deconvoluzione di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe nella zona 3480-3180 cm^{-1} . Concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ M in CDCl_3 .

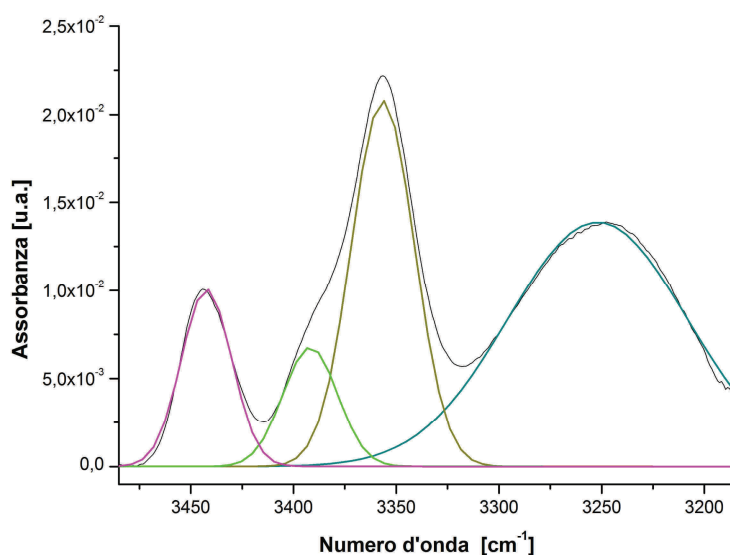


Figura 3.16 Spettro e relativa deconvoluzione di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe nella zona 3480-3180 cm^{-1} . Concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ M in CDCl_3 .

| | | | | | |
|---|-----------------------------------|------|------|------|------|
| Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3444 | 3402 | 3356 | |
| | Area sottesa | 1.00 | 0.74 | 1.79 | |
| Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3443 | 3396 | 3356 | 3253 |
| | Area sottesa | 1.00 | 0.59 | 2.00 | 2.25 |
| Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3442 | 3392 | 3357 | 3252 |
| | Area sottesa | 1.00 | 0.74 | 2.58 | 4.87 |

Tabella 3.3 Valori delle bande e delle aree sottese dei tioeptidi della serie delle Gly, ottenuti attraverso *fitting* gaussiano.

Va innanzitutto ricordato che lo stretching NH di una tioammide è spostato a energie più basse di circa 100 cm^{-1} , rispetto al corrispondente ammidico: circa 3350 cm^{-1} se libero e circa 3250 cm^{-1} se legato in legame ad H. Le bande tra $3450\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ sono assegnabili ad NH non legati. In questo

caso possiamo sostenere sia l'NH uretanico, essendo l'unico legato ad un C=O. Le bande a circa 3350 cm^{-1} indicano invece la presenza di CSNH liberi, mentre quella a circa 3250 cm^{-1} CSNH legati in legame ad H. Il dipeptide non presenta CSNH legati (sotto dei 3300 cm^{-1}) a differenza di tri- e tetrapeptide. Rispetto al tripeptide, il tetrapeptide evidenzia una banda ad intensità maggiore sotto ai 3300 cm^{-1} : aggiungendo un residuo ed un legame tioamidico cresce la percentuale di N-H legato. Tale andamento è tipico di una struttura elicoidale. Pertanto, il tio-tetrapeptide forma probabilmente una successione di due β -turn, mentre il tetrapeptide normale (ossigenato) aggrega in β -sheet. Anche nel tripeptide tionato si nota una maggiore propensione al β -turn rispetto all'omologo ossigenato. Tale conclusione è supportata da un'ispezione dei relativi spettri e, con le dovute cautele, dal rapporto delle aree NH-legato/NH-libero, pari a 0.2 nel tripeptide e 1.1 nel tio-tripeptide.

In conclusione, negli omo-peptidi della Gly, appare evidente la tendenza alla strutturazione impartita dalla sostituzione dell'ossigeno ammidico con lo zolfo.

Andamento del tutto analogo si osserva per gli omo-peptidi di Ala e Nleu. Infatti, al di sotto di 3300 cm^{-1} i tetrapeptidi presentano bande di intensità maggiore di quelle dei tripeptidi, mentre i dipeptidi non la presentano. Pertanto, anche per Ala e Nleu l'inserimento della tioammide aumenta la propensione dei peptidi per i ripiegamenti β e quindi le strutture elicoidali.

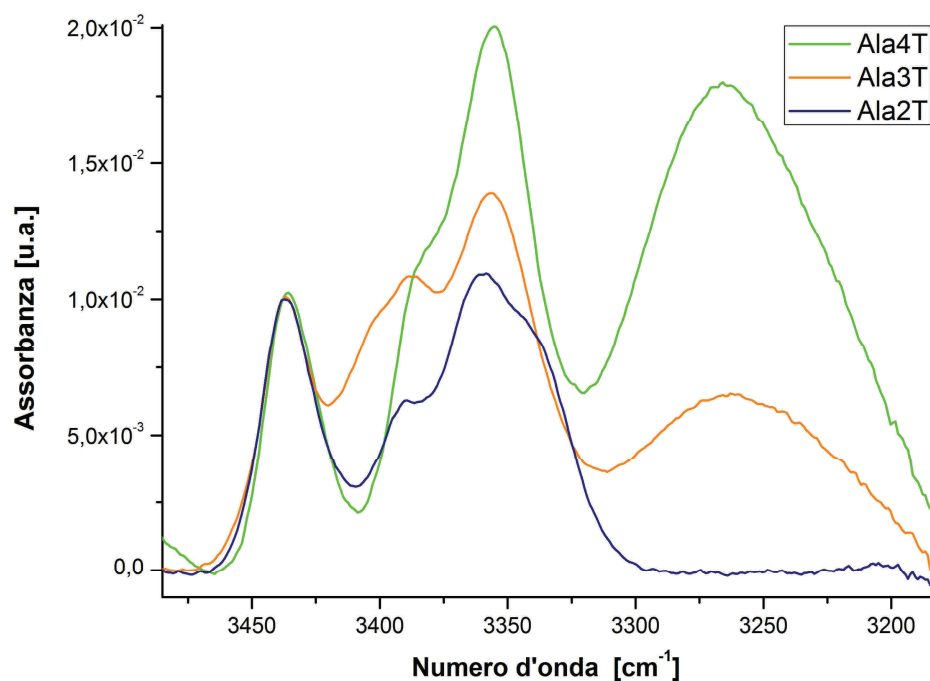


Figura 3.17 Confronto tra Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (Ala2T), Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (Ala3T) e Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (Ala4T), alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M in CDCl_3 , nella zona 3480-3180 cm^{-1} . Gli spettri sono stati normalizzati a ~ 3440 cm^{-1} .

| | | | | | |
|--|-----------------------------------|------|------|------|------|
| Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3436 | 3385 | 3341 | |
| | Area sottesa | 1.00 | 1.23 | 1.23 | |
| Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3437 | 3405 | 3357 | 3262 |
| | Area sottesa | 1.00 | 1.00 | 2.50 | 2.75 |
| Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3434 | 3386 | 3355 | 3262 |
| | Area sottesa | 1.00 | 0.98 | 2.44 | 6.63 |

Tabella 3.4 Valori delle bande e delle aree sottese dei tiopeptidi della serie delle Ala, ottenuti attraverso *fitting* gaussiano.

Analizzando tramite *fitting* gaussiano le aree sottese dalle bande degli NH tioammidici, possiamo concludere che la serie delle Ala sia quella che presenta una maggior percentuale di NH legato e quindi di strutturazione. Infatti, nei tio-tetrapeptidi il rapporto delle aree NH-legato/NH-libero è pari a 1.9 per la Gly, 2.7 per l'Ala e 1.3 per la Nleu.

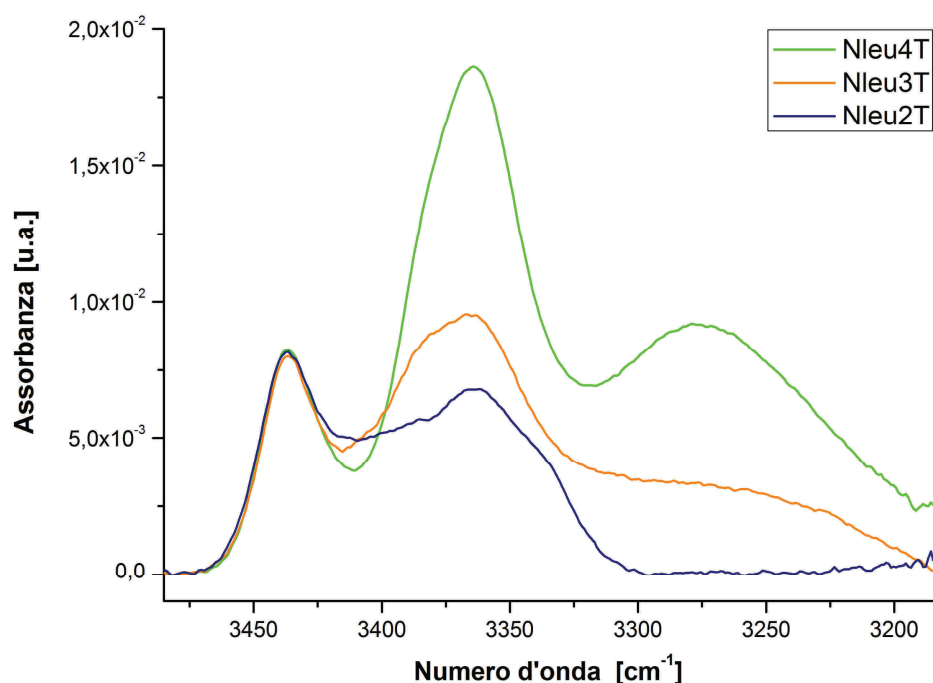


Figura 3.18 Confronto tra Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe (Nleu2T), Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe (Nleu3T) e Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe (Nleu4T) a $1 \cdot 10^{-4}$ M nella zona $3480\text{-}3180 \text{ cm}^{-1}$, gli spettri sono stati normalizzati a $\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$.

| | | | | | |
|--|-----------------------------------|------|------|------|------|
| Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3438 | 3403 | 3361 | |
| | Area sottesa | 1.00 | 2.16 | 1.29 | |
| Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3437 | | 3373 | 3275 |
| | Area sottesa | 1.00 | | 3.33 | 2.11 |
| Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe | Valore picco [cm^{-1}] | 3435 | | 3368 | 3275 |
| | Area sottesa | 1.00 | | 3.55 | 4.82 |

Tabella 3.5 Valori delle bande e delle aree sottese dei tiopeptidi della serie delle Nleu, ottenuti attraverso *fitting* gaussiano.

Per confermare che i legami ad H osservati siano di tipo intramolecolare, sono state fatte misure a due concentrazioni di peptide. La diluizione non apporta grandi differenze confrontando gli spettri a 10^{-3} e 10^{-4} M dei tetrapeptidi tionati (Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe, Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe e Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe), come mostrato nelle figure che seguono.

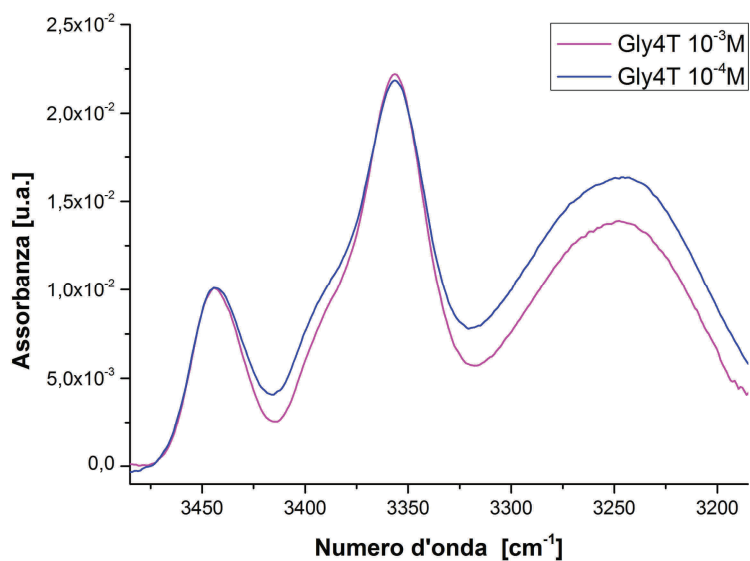


Figura 3.19 Confronto tra spettri di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe a differenti concentrazioni (10^{-3} e 10^{-4} M), nella zona $3480-3180\text{ cm}^{-1}$, in CDCl_3 .

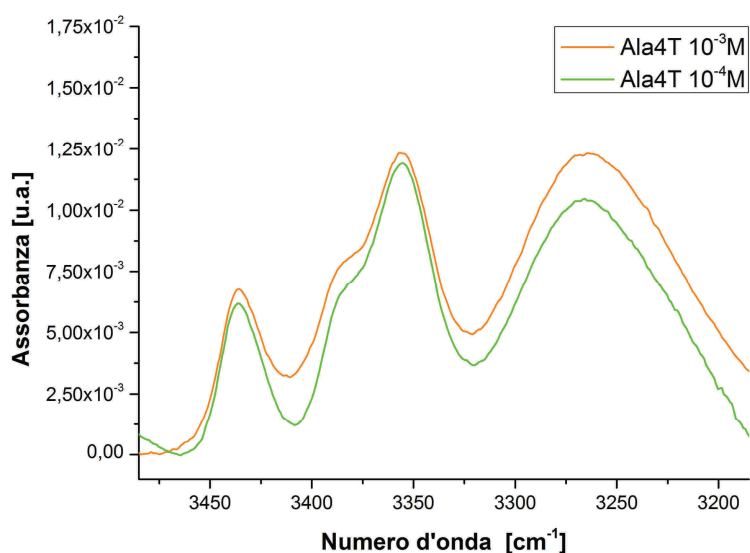


Figura 3.20 Confronto tra spettri di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe a differenti concentrazioni (10^{-3} e 10^{-4} M) nella zona $3480-3180\text{ cm}^{-1}$, in CDCl_3 .

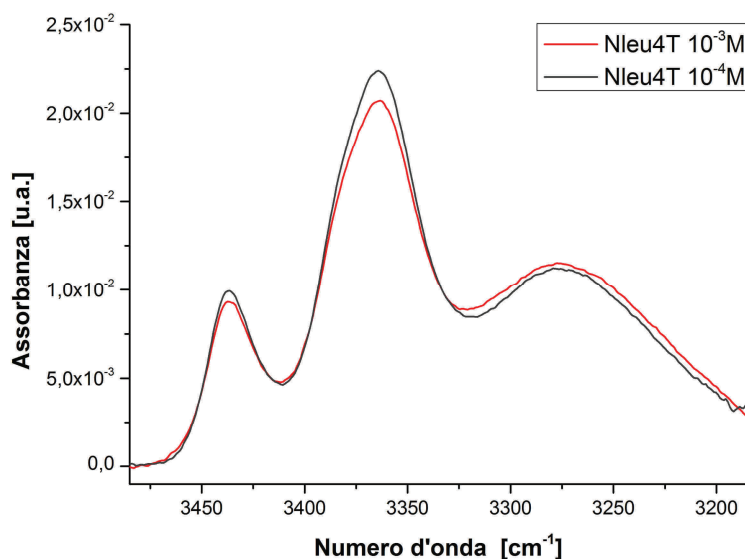


Figura 3.21 Confronto tra spettri di Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe a differenti concentrazioni (10^{-3} e 10^{-4} M) nella zona $3480\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$, in CDCl_3 .

Riassumendo, l'analisi di assorbimento IR qui riportata indica che la sostituzione dell'O ammidico con S impartisce strutturazione di tipo elicoidale e maggiore solubilità agli omopeptidi di Gly, Ala e Nleu. L'effetto sembra più marcato nella serie tio-omopeptidica dell'Ala.

3.3.2 Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

Spettri $^1\text{H-NMR}$ monodimensionali: effetto delle aggiunte di DMSO e TEMPO

L'analisi della conformazione assunta dai peptidi in cloroformio deuterato è stata condotta anche mediante spettroscopia NMR. È possibile sfruttare la diversa accessibilità dei protoni ammidici e tioammidici a seconda che siano impegnati in legami ad H o meno. Nella conformazione completamente estesa^[82] tutti i protoni NH sono impegnati in legami idrogeno *intraresiduo* e risultano quindi non disponibili a formare legami a idrogeno con agenti esterni. La struttura a elica, invece, non impegna tutti i protoni ammidici in ponti a idrogeno, ma lascia liberi quelli dei primi due residui nell'elica 3_{10} e dei primi tre nell' α -elica.

Osservando lo spostamento dei *chemical shift* degli NH nello spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 all'aumentare del volume di $\text{DMSO-}d_6$ aggiunto, è possibile valutare la conformazione dei peptidi. Il DMSO è un forte accettore di legami a idrogeno che ha la possibilità di portare i picchi degli NH accessibili a campi più bassi nello spettro $^1\text{H-NMR}$. Gli NH legati in legami ad H non dovrebbero invece subire variazioni.^[83-86]

Un metodo del tutto simile prevede l'aggiunta di una molecola paramagnetica chiamata TEMPO, cioè (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxidanyl. Questa molecola paramagnetica può avvicinarsi agli NH ed influenzarne il picco relativo nello spettro $^1\text{H-NMR}$ allargandolo.

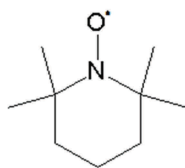


Figura 3.22 Molecola denominata in sigla TEMPO

Un'importante osservazione, negli spettri $^1\text{H-NMR}$, riguarda il protone del CSNH che risuona a campi più bassi rispetto a quello dell'amide. Attraverso questo discernimento è possibile assegnare con facilità l'NH uretanico poiché cade a campi più alti degli NH tioammidici. Tuttavia, l'assegnazione certa delle risonanze è stata condotta mediante esperimenti di NMR bidimensionale, come descritto nella sezione che segue.

La sensibilità degli NH ammidici o tioammidici alle aggiunte di DMSO e TEMPO è stata misurata, ove possibile, per i tri e tetra peptidi, tionati e non.

In appendice vengono riportati i dati ottenuti dagli esperimenti eseguiti, mentre in questa sezione vengono solo riportati i relativi grafici.

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Poiché Z-(Gly) $_3$ -OMe era solo parzialmente solubile in CDCl_3 , il peptide è stato disciolto in 5 μl di DMSO e in seguito è stato aggiunto CDCl_3 . Pertanto, in questo caso manca il valore di *chemical shift* in solo CDCl_3 .

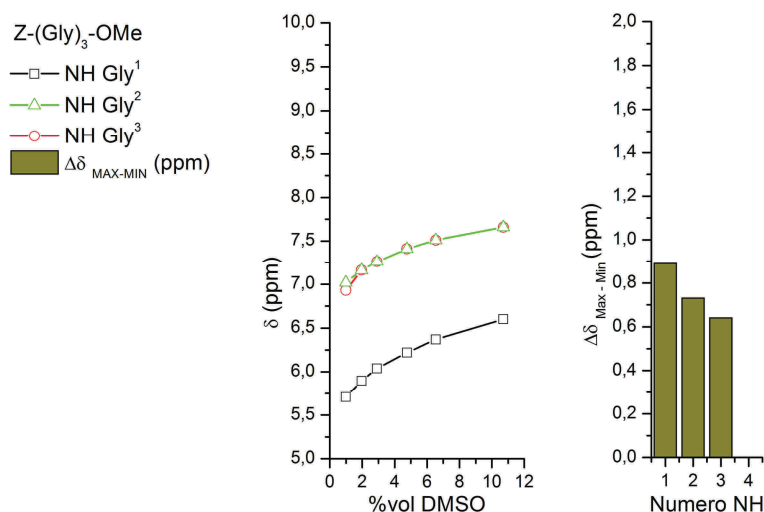


Figura 3.23 Aggiunte di DMSO in una soluzione ~ 1.5 mM di Z-(Gly) $_3$ -OMe ottenuta pesando 0.5mg poi disciolti in 500 μl di CDCl_3 .

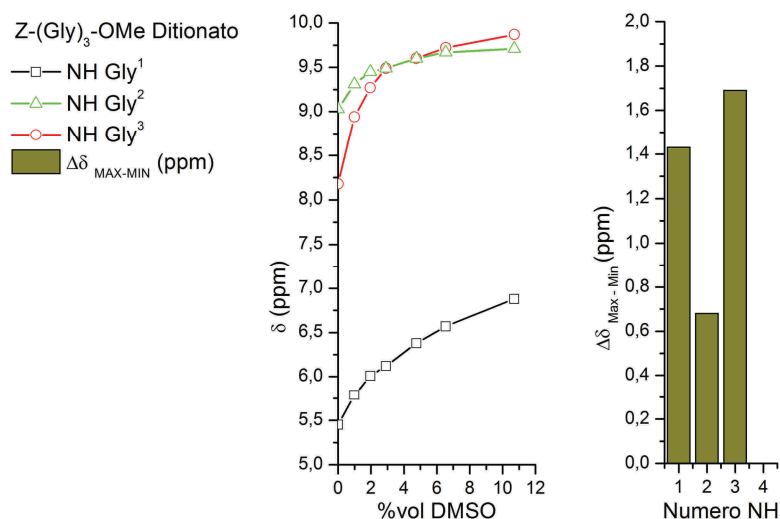


Figura 3.24 Aggiunte di DMSO in una soluzione ~1.5 mM di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe ottenuta pesando 0.5 mg poi disciolti in 500 μ l di CDCl₃.

Dal confronto tra i due omo-tripeptidi della Gly possiamo notare come gli NH si spostino maggiormente nel caso del tiopeptide (NH maggiormente acidi). Il tripeptide normale non sembra avere legami ad H, in accordo con l'analisi IR in soluzione (stesso solvente). Infatti, l'aggiunta di DMSO fa variare in maniera simile i tre NH lungo lo spettro. Il tripeptide tionato presenta, invece, una netta differenza di spostamento dell'NH del residuo Gly², come se questo fosse coinvolto in legame ad H maggiormente degli NH Gly¹ e Gly³. Se vi fosse una significativa popolazione di β -turn, come sembra indicare l'analisi IR, dovrebbe essere NH di Gly³ a risentire meno dell'aggiunta di DMSO. Per il momento quindi, si può solo concludere che l'NH del residuo Gly² è probabilmente meno accessibile degli altri due verso il DMSO.

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

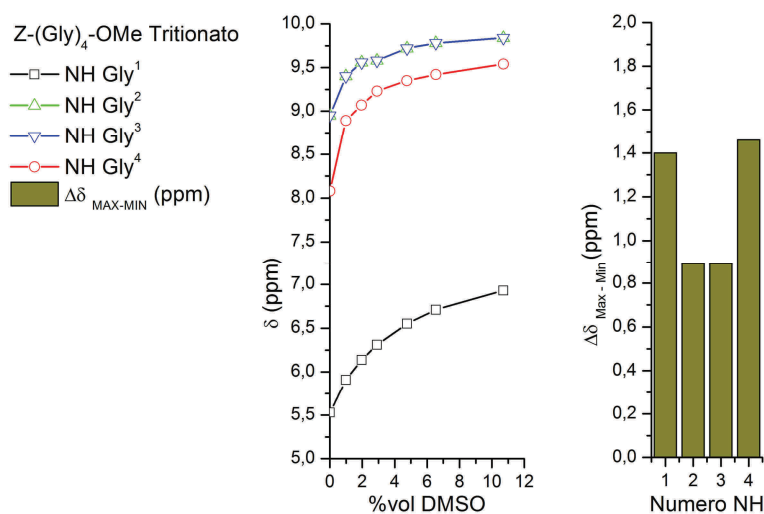


Figura 3.25 Aggiunte di DMSO in una soluzione ~1.1 mM di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe ottenuta pesando 0.5 mg poi disciolti in 500 μ l di CDCl₃.

Il tetrapeptide ossigenato non è stato analizzato perché completamente insolubile in CDCl_3 . L'esperimento sul tetrapeptide tionato mostra che gli NH dei due residui interni (Gly^2 e Gly^3) sono meno sensibili degli altri due all'aggiunta del DMSO. Primo e quarto NH sono più esposti al solvente.

Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe

Boc-(Ala) $_3$ -OMe ha un comportamento analogo a Z-(Gly) $_3$ -OMe. Il parallelismo continua anche con i peptidi tionati. In Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe vi è un minor spostamento, come nel caso del tripeptide tionato della Gly, da parte dell'NH del residuo Ala 2 . La determinazione del primo punto dell'NH del residuo Ala 1 è incerta in quanto tale NH, uretanico, cade nella stessa zona degli α -CH e presenta un picco *broad*. Pertanto, la variazione di *chemical shift* riportata ha un discreto margine d'errore.

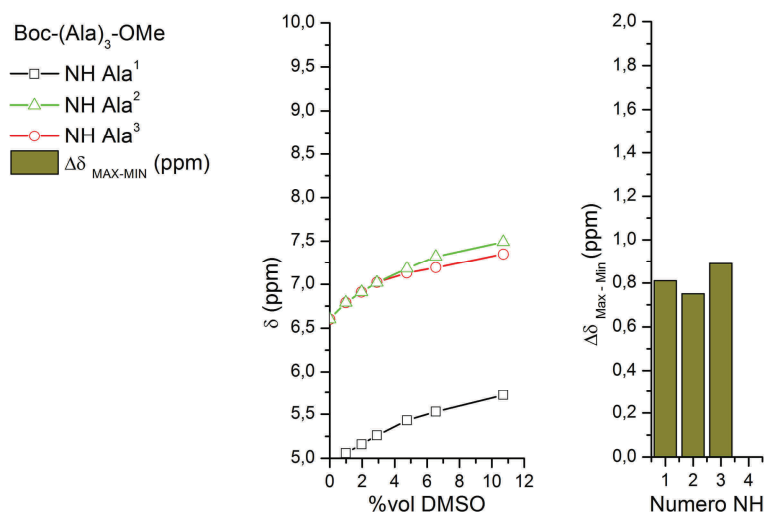


Figura 3.26 Aggiunte di DMSO in una soluzione ~ 1.3 mM di Boc-(Ala) $_3$ -OMe ottenuta pesando 0.5 mg poi disciolti in 500 μl di CDCl_3 .

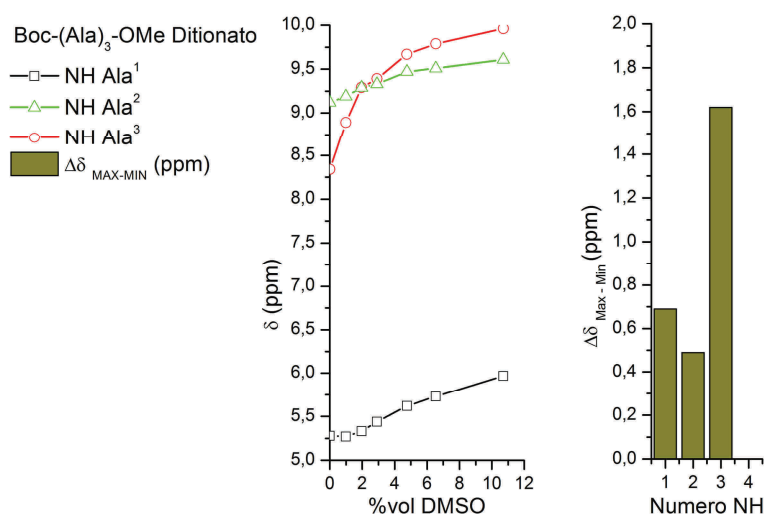


Figura 3.27 Aggiunte di DMSO in una soluzione ~ 1.3 mM di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe.

Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe

Boc-(Ala)₄-OMe, sciolto in CDCl₃ con molta difficoltà, mostra uno spostamento poco accentuato nei *chemical shift* degli NH. Il tetratonato dell'Ala è differente da quello delle Gly (Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe) per quanto riguarda il primo residuo; secondo, terzo e quarto presentano, invece, andamenti analoghi nei due casi, con l'NH del quarto residuo maggiormente esposto al solvente. Lo stesso comportamento si osserva con l'aggiunta di TEMPO. In questo caso, non è possibile rilevare l'allargamento della risonanza dell'NH uretanico in quanto è sovrapposta a quelle degli α -CH.

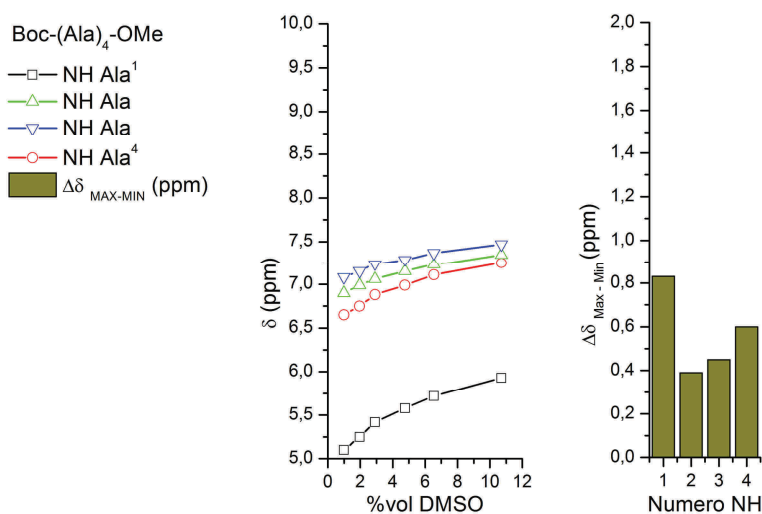


Figura 3.28 Aggiunte di DMSO in una soluzione ~1.2 mM di Boc-(Ala)₄-OMe ottenuta pesando 0.5 mg poi disciolti in 500 μ l di CDCl₃.

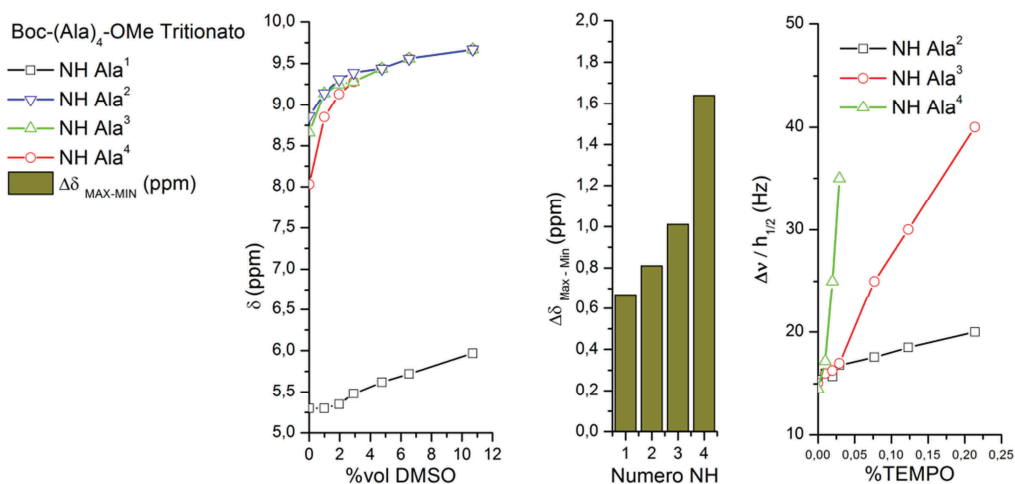


Figura 3.29 Aggiunte di DMSO (a sinistra) e TEMPO (a destra) in una soluzione ~1.1 mM di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe.

Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe

Nel caso del tripeptide normale delle Nleu abbiamo lo stesso fenomeno osservato per le due serie precedenti. Il tripeptide tionato invece è simile al tripeptide delle Ala.

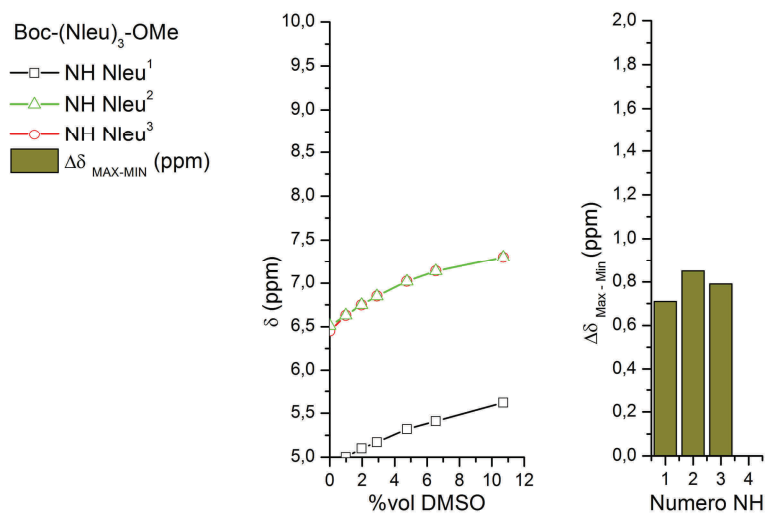


Figura 3.30 Aggiunte di DMSO ad una soluzione ~1.0 mM di Boc-(Nleu)₃-OMe.

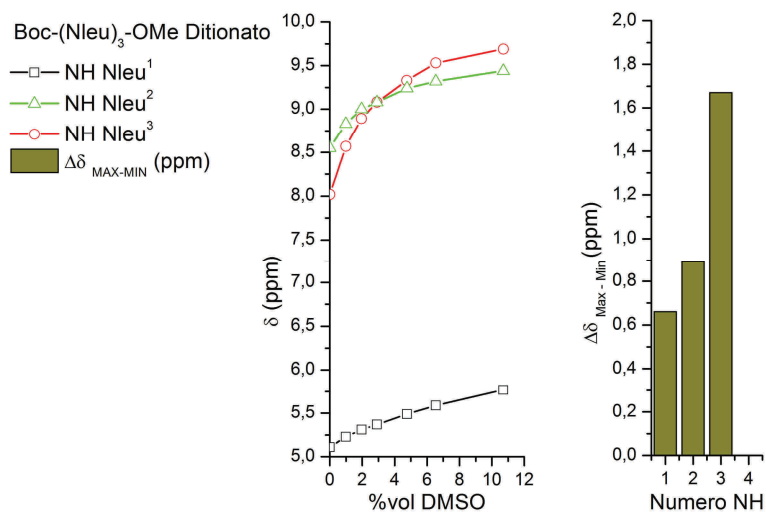


Figura 3.31 Aggiunte di DMSO ad una soluzione ~1.0 mM di Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe.

Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe

L'andamento dell'omo-tetrapeptide tionato della Nleu è del tutto analogo a quello dell'Ala. Per quanto riguarda l'analogo normale non si è riusciti a scioglierlo adeguatamente in CDCl₃.

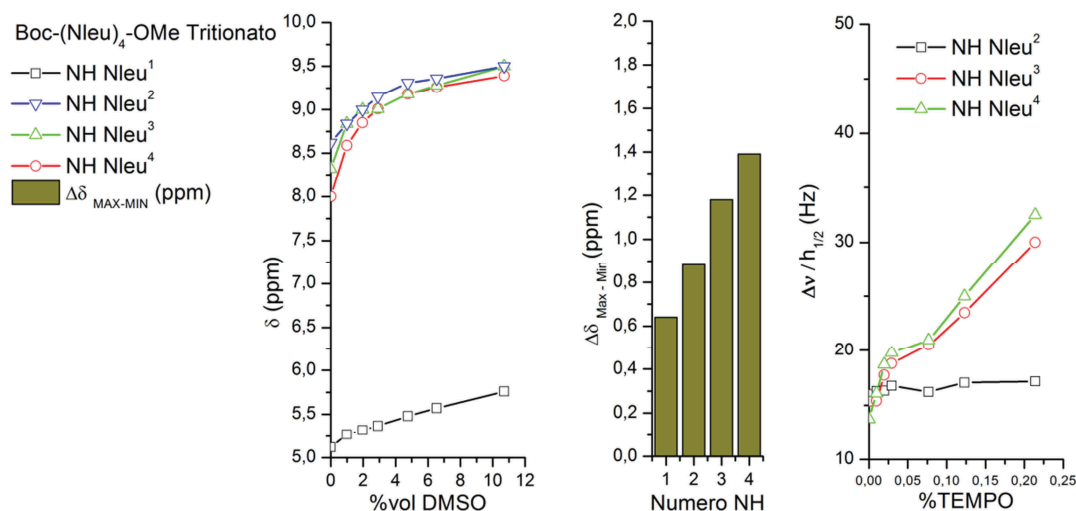


Figura 3.32 Aggiunte di DMSO (a sinistra) e TEMPO (a destra) in una soluzione ~1.6 mM di Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe.

In conclusione, l'analisi NMR condotta valutando l'effetto dell'aggiunta di DMSO e TEMPO a soluzioni peptidiche in CDCl_3 indica che:

- i. nei peptidi normali gli NH hanno la stessa esposizione al solvente, segno di scarsa strutturazione;
- ii. nei peptidi tonati gli NH centrali sono meno esposti al solvente, indicando una possibile strutturazione (come emerso anche dall'analisi IR).

Tuttavia, il minor spostamento di *chemical shift* dei residui centrali non è compatibile con l'ipotesi della formazione di uno o due (nei tetra) β -turn. Infatti, l'NH del residuo 3 o del 4 (nei tetra) dovrebbe essere molto meno sensibile agli agenti perturbanti. Pertanto, sono necessari ulteriori studi spettroscopici per chiarire la ragione di tale comportamento.

3.3.3 Dicroismo Circolare

Le preferenze conformazionali di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe, Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-OMe e dei corrispondenti peptidi ossigenati, Boc-(Ala)₄-OMe e Boc-(Nleu)₄-OMe, sono state esaminate anche mediante dicroismo circolare (CD) in MeOH e TFE. Le misure sono state condotte a temperatura ambiente. Si è studiata la regione tra 200 nm e 250 nm, dove si trovano le bande corrispondenti alle transizioni $\pi^* \leftarrow \pi$ e $\pi^* \leftarrow n$ del cromoforo peptidico. Inoltre, i tiopeptidi sono stati analizzati anche tra 250 nm e 400 nm dove cadono gli assorbimenti relativi alle transizioni $\pi^* \leftarrow \pi$ (circa 265 nm) e $\pi^* \leftarrow n$ (circa 335 nm) del cromoforo tioammidico.^[87] Le transizioni del cromoforo ammidico e tioammidico sono otticamente inattive, ma la presenza di centri chirali nelle vicinanze del legame peptidico (come i C $^{\alpha}$ degli amminoacidi chirali) e/o la sua appartenenza a strutture secondarie elicoidali (intrinsecamente dissimetriche) le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD. Per lo stesso motivo non sono state fatte misure sui peptidi della Gly in quanto non presentano centri chirali. Dalla forma delle curve spettrali e dalla posizione delle bande dicroiche si possono in genere ottenere utili informazioni sul grado e sul tipo di strutturazione di peptidi in soluzione. Tuttavia, per peptidi molto corti come quelli da noi esaminati le curve CD possono essere poco significative o difficili da interpretare.

Di seguito vengono riportati le analisi CD in metanolo e, successivamente, in TFE:

Spettri CD in metanolo

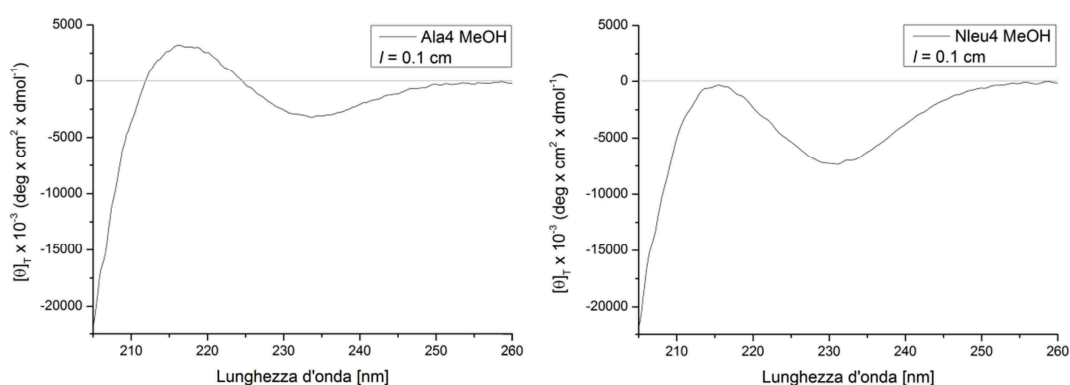


Figura 3.33 Spettri CD riguardanti Boc-(Ala)₄-OMe e Boc-(Nleu)₄-OMe in metanolo, concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M, nella regione 205-260 nm.

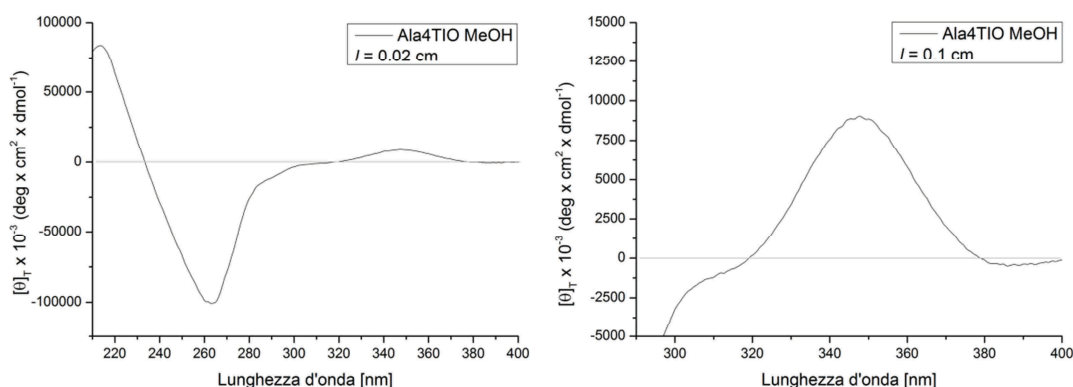


Figura 3.34 Spettri CD di Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe in metanolo, concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M; a sinistra spettro nella regione 210-400 nm con cammino ottico $l = 0.02$ cm; a destra spettro nella regione 290-400 nm con cammino ottico $l = 0.1$ cm.

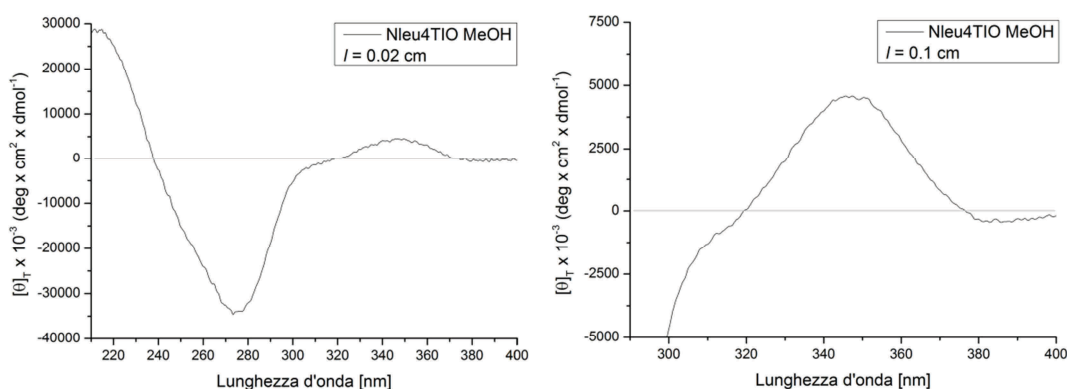


Figura 3.35 Spettri CD riguardanti Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe in metanolo, concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M; a sinistra spettro nella regione 210-400 nm con cammino ottico $l = 0.02$ cm; a destra spettro nella regione 290-400 nm con cammino ottico $l = 0.1$ cm.

Dall'osservazione degli spettri in metanolo:

- i. I peptidi normali (ossigenati) di Ala e Nleu presentano curve simili che indicano quindi l'adozione di analoghe strutture, probabilmente di tipo non ordinato.^[88]
- ii. Anche i tiopeptidi presentano curve simili tra loro, dominate dagli assorbimenti delle transizioni del cromoforo tioammidico. Non è possibile assegnarle ad una specifica conformazione, tuttavia, esse sono del tutto simili a quelle di decapeptidi elicoidali, contenenti legami tioammidico, recentemente studiate nel nostro Laboratorio.^[22] Per analogia possiamo affermare che i nostri tio-omopeptidi siano probabilmente ripiegati con senso di spiralizzazione destrogiro.

Spettri CD in TFE

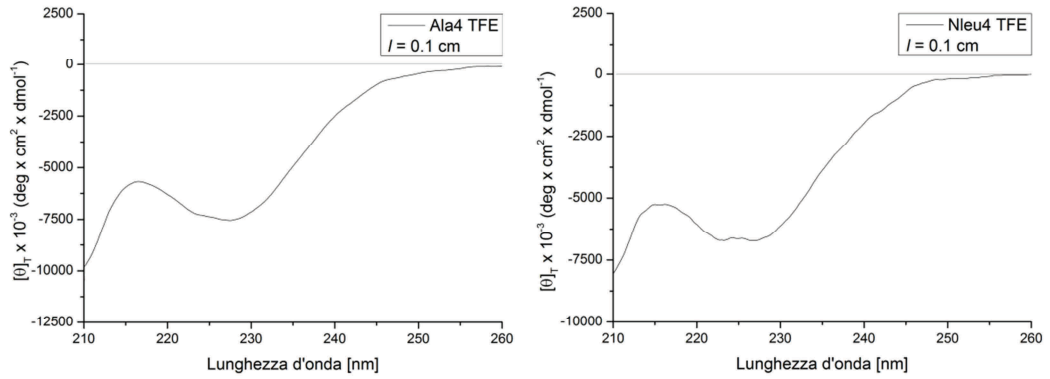


Figura 3.36 Spettri CD riguardanti Boc-(Ala)₄-OMe e Boc-(Nleu)₄-OMe in TFE, concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M, nella regione 205-260 nm con cammino ottico $l = 0.1$ cm.

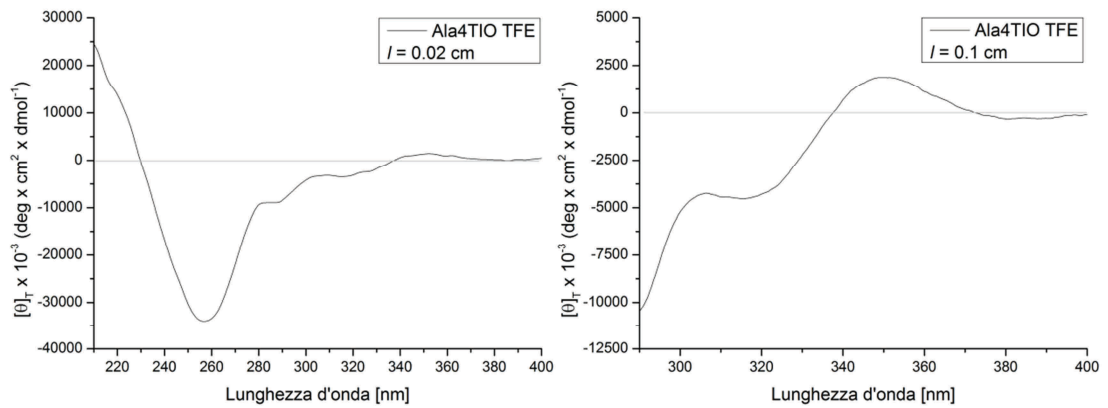


Figura 3.37 Spettri CD riguardanti Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe in TFE, concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M; a sinistra spettro nella regione 210-400 nm con cammino ottico $l = 0.02$ cm; a destra spettro nella regione 290-400 nm con cammino ottico $l = 0.1$ cm.

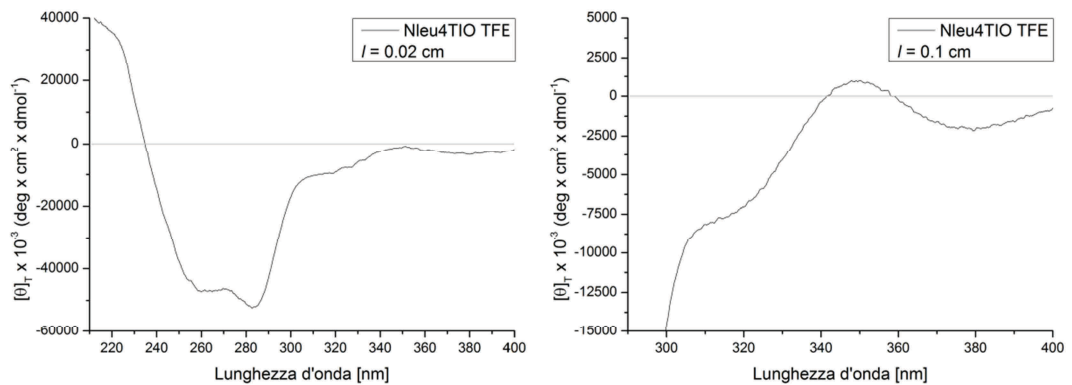


Figura 3.38 Spettri CD riguardanti Boc-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-ψ[CSNH]-Nleu-OMe in TFE, concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M; a sinistra spettro nella regione 210-400 nm con cammino ottico $l = 0.02$ cm; a destra spettro nella regione 290-400 nm con cammino ottico $l = 0.1$ cm.

Gli spettri dicroici in TFE, induttore di strutture elicoidali, si discostano da quelli in MeOH, anche se in maniera non rilevante. Ancora una volta è difficile associarli ad una ben precisa conformazione. Si può notare come il cambio di solvente abbia un effetto marcato soprattutto verso il tiopeptide della Nleu.

In conclusione, l'analisi CD non consente di avere informazioni precise sul tipo di struttura adottata dai tiopeptidi, soprattutto perché mancano studi computazionali e non ci sono neppure spettri dicroici di riferimento. Tuttavia, la minor sensibilità del tiopeptide dell'Ala, rispetto a quello della Nleu, alla variazione di solvente fa pensare che esso possa avere una struttura tridimensionale più stabile e definita.

3.4 Spettri NMR bidimensionali

L'assegnazione di tutti i segnali NMR è stata possibile grazie a esperimenti TOCSY, HMBC (CO selettivo) e NOESY. Di seguito vengono riportate alcune sezioni di spettri, dei tri- e tetrapeptidi tionati, ritenute più interessanti per l'assegnazione dei segnali ^1H -NMR e per avere informazioni sulla conformazione dei peptidi. Tri- e tetrapeptidi tionati di una stessa serie presentano in genere spettri molto simili. Pertanto, si è scelto di illustrare in dettaglio gli spettri dei tripeptidi che presentano meno sovrapposizioni di segnali.

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Sono stati acquisiti spettri HMQC, HMBC, NOESY e TOCSY per caratterizzare la molecola in modo completo. Come si spiegherà più avanti, il parametro NMR L_1 , collegato al mixing time, ha conseguenze inattese sugli spettri TOCSY degli omo-tiopeptidi della Gly.

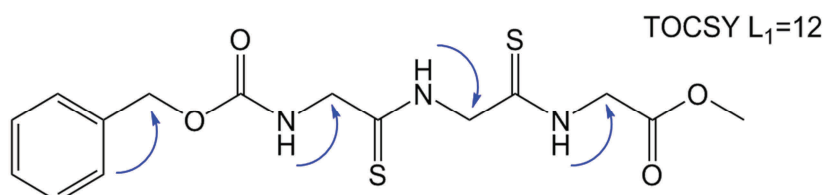


Figura 3.39 Correlazioni osservate nello spettro TOCSY di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe ($L_1 = 12$, 400MHz, CDCl_3).

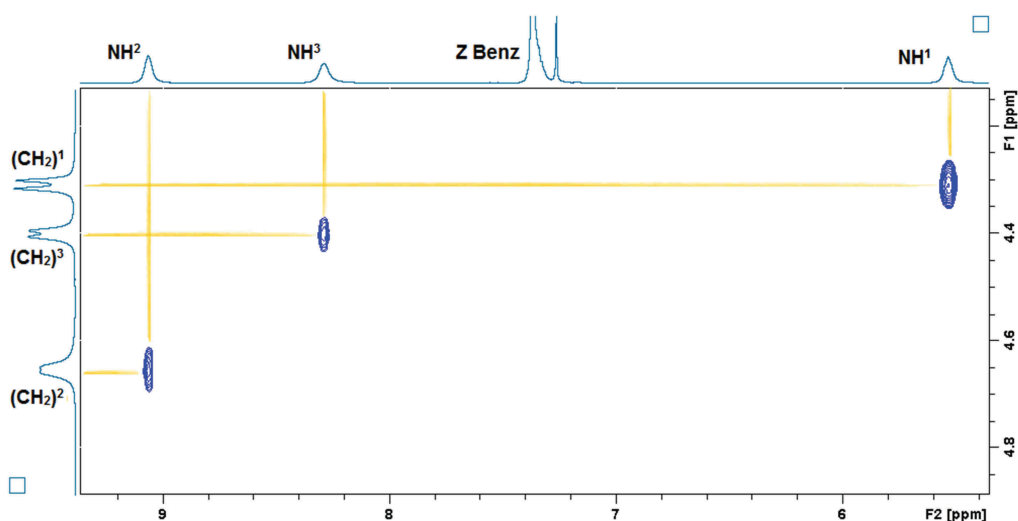


Figura 3.40 Porzione dello spettro TOCSY di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe ($L_1 = 12$, 400MHz, CDCl_3).

Al fine di confermare l'assegnazione dei segnali NMR, sono stati acquisiti gli spettri eterocorrelati HMBC e HMQC; di seguito vengono riportate le sezioni più significative. L'HMQC è utile nell'assegnazione completa dei picchi del ^{13}C -NMR, mentre l'HMBC, che mostra le correlazioni $(\text{CH}_2)^1 \rightarrow (\text{Z-CO})$ e $(\text{CH}_2)^3 \rightarrow (\text{COOMe})$, conferma l'assegnazione ai vari residui. I picchi dei C tioammidici ($\text{C}=\text{S}$) cadono a campi significativamente più bassi rispetto a quelli dei C ammidici.

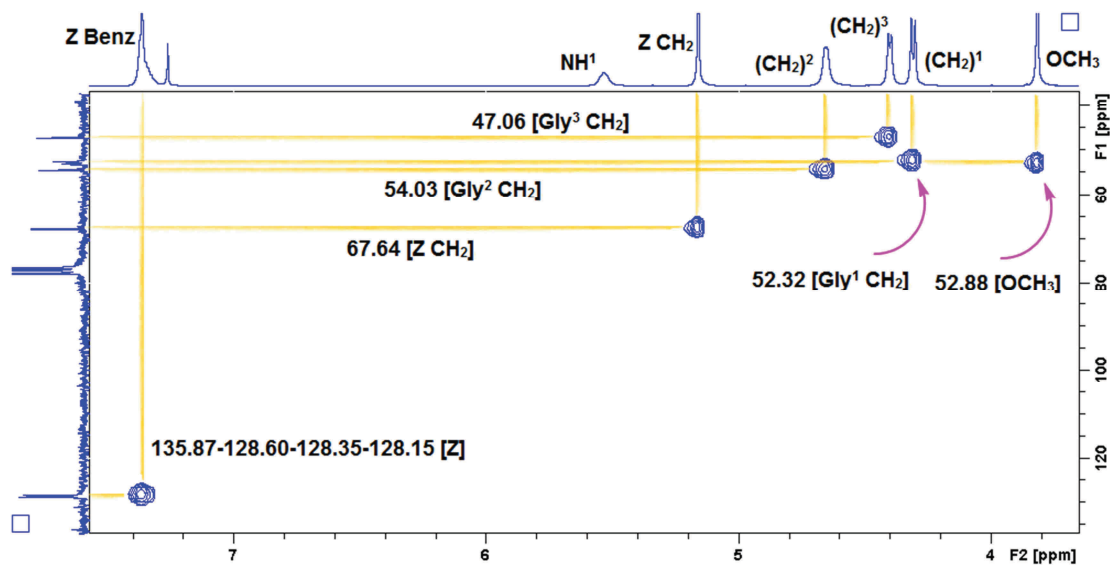


Figura 3.41 Porzione dello spettro HMQC di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe (400MHz, CDCl₃) nella zona a campi alti del ¹³C.

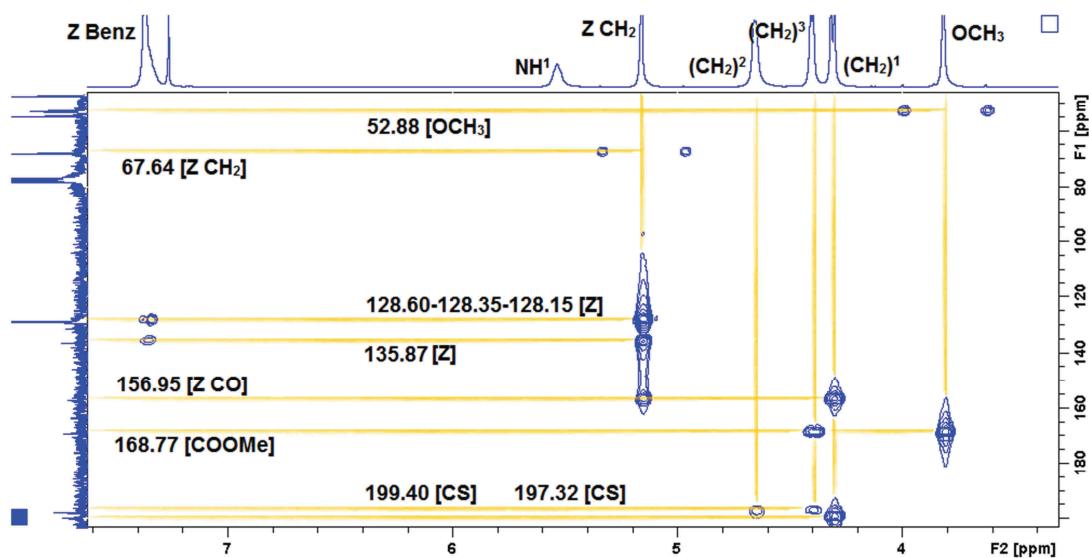


Figura 3.42 Porzione dello spettro HMBC (400MHz, CDCl₃) di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe a campi bassi del ¹³C.

E' stato misurato anche uno spettro NOESY per trovare indicazioni sul tipo di struttura tridimensionale del peptide tionato. Si sono osservate le seguenti correlazioni tra i protoni:

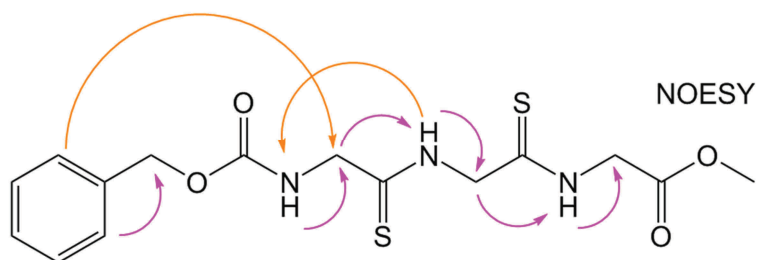


Figura 3.43 Correlazioni osservate nello spettro NOESY di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe (400MHz, CDCl₃). Le frecce arancioni rappresentano segnali meno intensi.

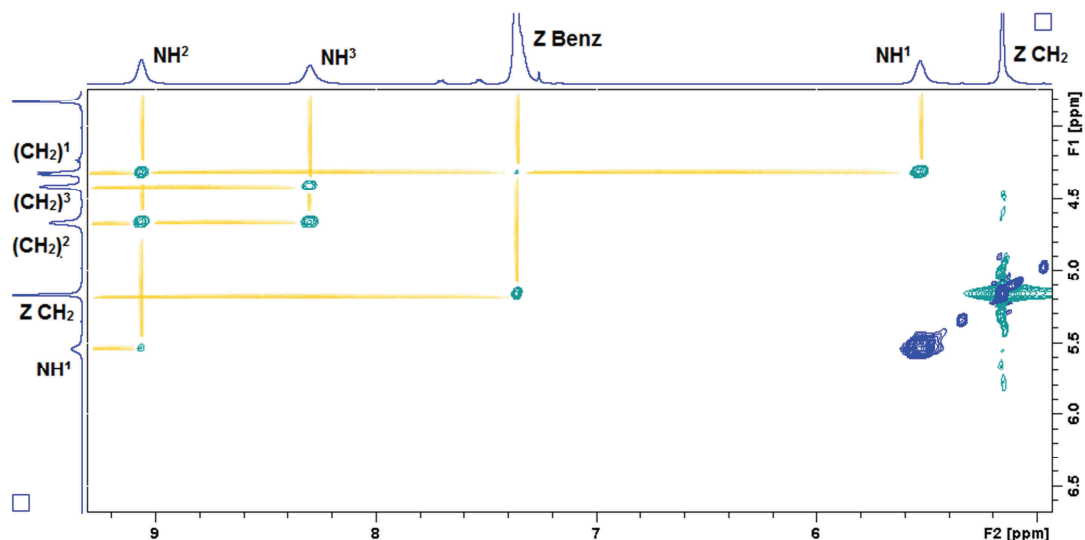


Figura 3.44 Porzione dello spettro NOESY ($L_1 = 20$, 400MHz, CDCl_3) di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe.

Sono presenti le correlazioni $\text{NH}(i) \rightarrow \text{CH}_2(i)$ e $\text{NH}(i) \rightarrow \text{CH}_2(i-1)$, con una intensità tra loro paragonabile. Si può anche osservare un picco di intersezione di debole intensità tra NH_1 e NH_2 e tra gli aromatici dello Z e il $(\text{CH}_2)^1$. Tutte queste correlazioni sono compatibili con una struttura ripiegata della molecola. Dall'analisi IR era infatti emersa una certa popolazione di strutture ripiegate. Tuttavia, bisogna precisare che:

- i. I tempi dell'analisi IR sono molto corti (10^{-9} s) mentre quelli dell'analisi NMR sono più lunghi (10^{-3} s). Pertanto, l'IR "fotografa" una molecola nella conformazione in cui si trova, mentre l'NMR vede una media di conformazioni. Durante la misurazione (della durata dei millisecondi) una molecola ha la possibilità di cambiare struttura.
- ii. È plausibile ritenere che in un certo istante la percentuale di molecole ripiegate, probabilmente in β -turn, sia piuttosto bassa.

Alla luce di queste informazioni, appare evidente che l'NMR potrebbe non essere in grado di rivelare la presenza di piccole percentuali di strutture ripiegate in un tripeptide.

Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

I picchi $^1\text{H-NMR}$ del tetrapeptide Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]- Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe sono stati assegnati grazie agli esperimenti TOCSY e NOESY. L'assegnazione è stata fatta in modo del tutto analogo al tripeptide tionato. Qui di seguito si riportano le correlazioni osservate dallo spettro NOESY e da una sezione di quest'ultimo che mostra le correlazioni tra $\text{NH}^1 \rightarrow \text{NH}^2$ e $\text{NH}^3 \rightarrow \text{NH}^4$; la correlazione $\text{NH}^2 \rightarrow \text{NH}^3$ non è stata osservata poiché i segnali cadono a valori simili e quindi il loro picco intersezione risiede sulla diagonale dello spettro. I picchi delle correlazioni $\text{NH}(i) \rightarrow \text{CH}_2(i)$ e $\text{NH}(i) \rightarrow \text{CH}_2(i-1)$ sono di intensità tra loro confrontabile, come nel caso precedente.

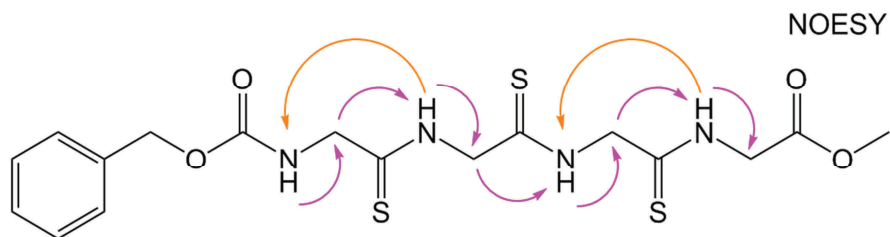


Figura 3.45 Correlazioni osservate nello spettro NOESY di Z-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-OMe (400MHz, CDCl₃). Le frecce arancioni rappresentano segnali meno intensi.

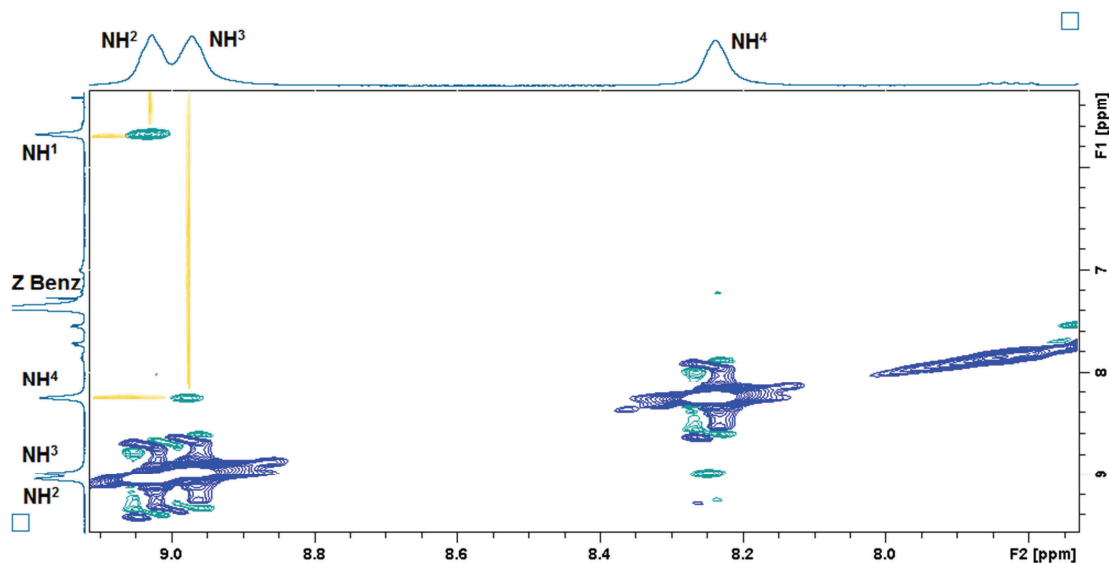


Figura 3.46 Porzione dello spettro NOESY di Z-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-ψ[CSNH]-Gly-OMe (L₁ = 20, 400MHz, CDCl₃), nella zona NH-NH.

Le connettività attraverso lo spazio sono estremamente importanti per estrarre informazioni di tipo conformazionale. In particolare, la presenza di correlazioni sequenziali NH(*i*)→NH(*i*+1) è diagnostica della presenza di una struttura di tipo elicoidale.^[89] Questo è proprio il caso del tetrationato della Gly. Pertanto, questi dati NMR sembrano supportare la presenza in soluzione di una struttura ripiegata, stabilizzata da legami ad H intramolecolari, come già visto mediante analisi IR.

Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe

I dati più rilevanti degli spettri TOCSY e NOESY di Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe sono riportati nelle figure che seguono.

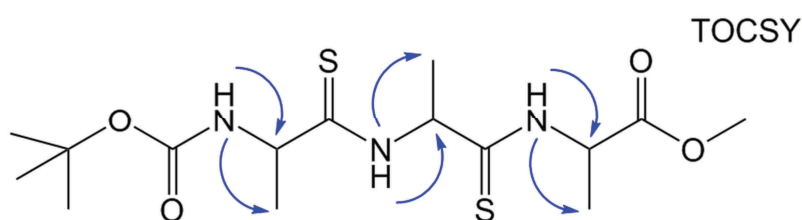


Figura 3.47 Correlazioni osservate nello spettro TOCSY della molecola Boc-Ala-ψ[CSNH]-Ala-ψ[CSNH]-Ala-OMe (L₁ = 20, 400MHz, CDCl₃).

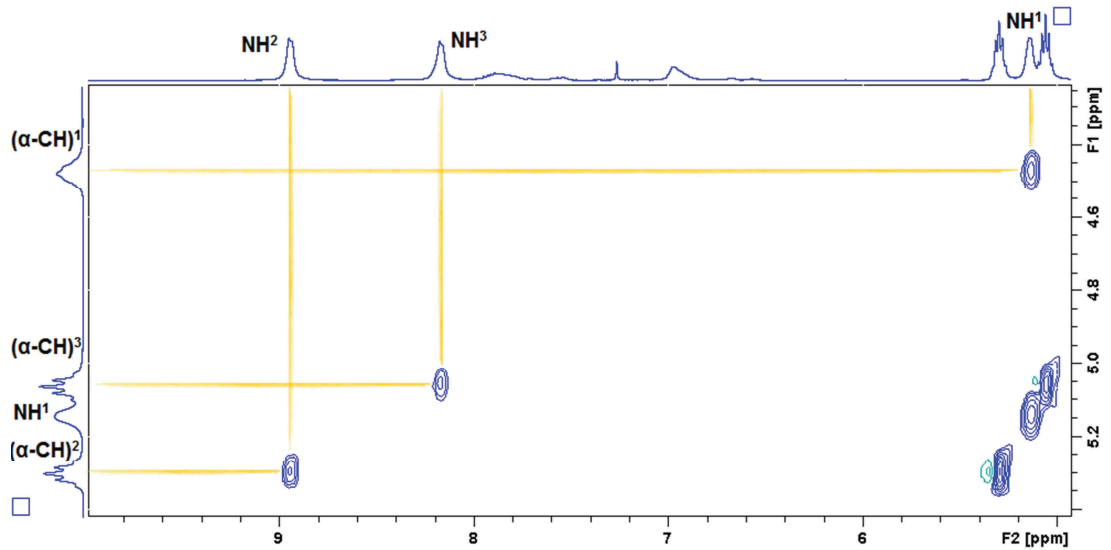


Figura 3.48 Porzione dello spettro TOCSY ($L_1 = 20$, 400MHz, CDCl_3) zona NH-(α -CH) di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe.

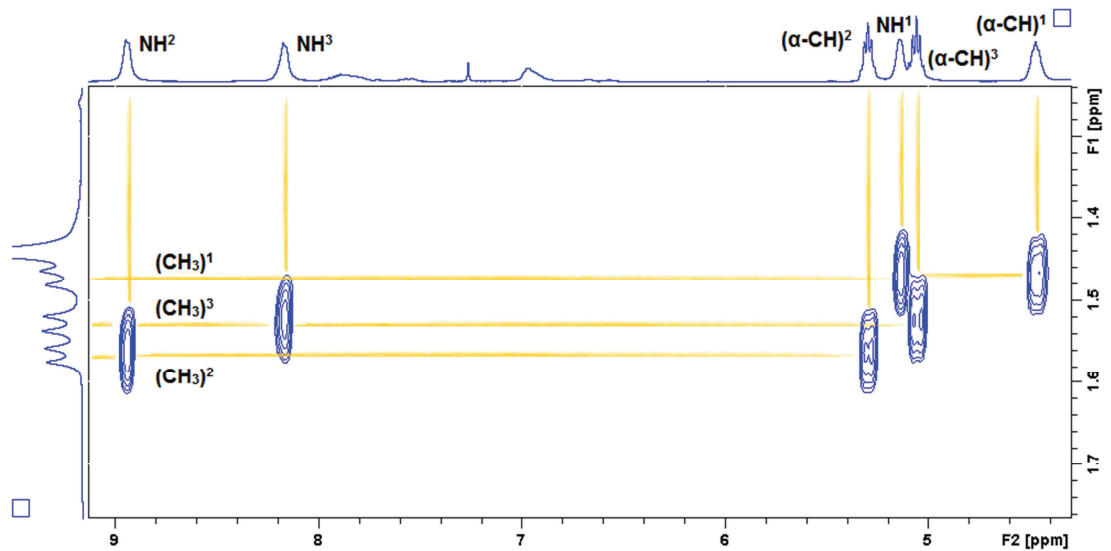


Figura 3.49 Porzione dello spettro TOCSY di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe ($L_1 = 20$, 400MHz, CDCl_3), nella zona CH_3 - (α -CH).

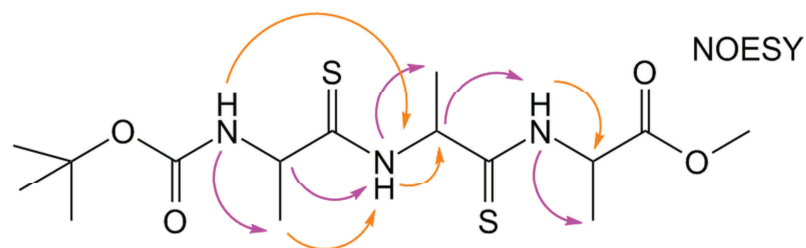


Figura 3.50 Correlazioni osservate nello spettro NOESY della molecola Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (400MHz, CDCl_3). Le frecce viola rappresentano segnali più intensi. Sono state omesse volontariamente le correlazioni α -CH \rightarrow CH_3 per semplificare la figura.

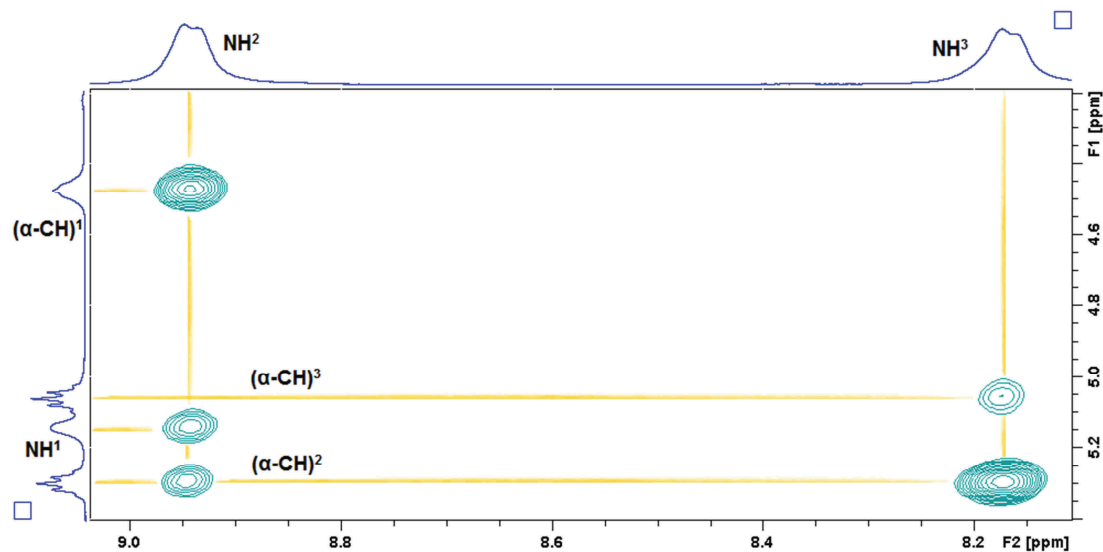


Figura 3.51 Porzione dello spettro NOESY di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (400MHz, CDCl_3), zona NH-(α -CH).

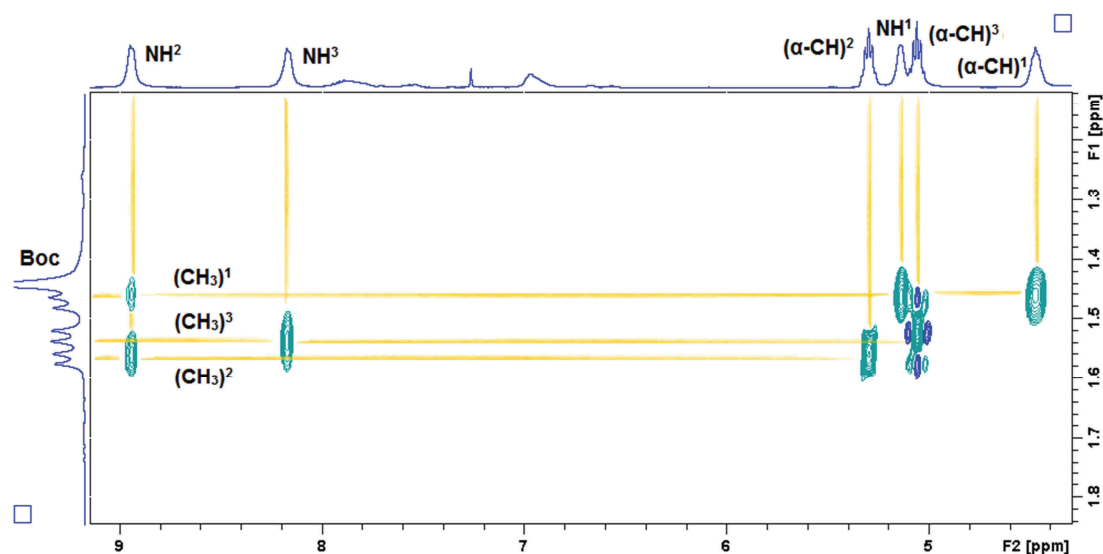


Figura 3.52 Porzione dello spettro NOESY di Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (400MHz, CDCl_3), zona CH_3 - (α -CH).

In questo tio-tripeptide osserviamo un andamento analogo a quello del tio-tripeptide della Gly. In particolare si nota la presenza di un picco intersezione tra NH_1 e NH_2 . In questo caso, il picco presenta un'intensità maggiore, confermando la maggior percentuale di struttura ripiegata per il tio-tripeptide dell'Ala, come già evidenziato dall'analisi IR.

Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe

Dell'omo-tiopeptide Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe si riporta solamente una sezione dello spettro NOESY e un grafico riassuntivo di tutti i segnali NOE osservati. Sono presenti tutte le tre correlazioni sequenziali $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$, tipiche di una struttura ripiegata ad elica. Inoltre, si osserva che le correlazione $\text{NH}(i) \rightarrow \alpha\text{-CH}(i-1)$ sono più intense delle $\text{NH}(i) \rightarrow \alpha\text{-CH}(i)$. Questo dato sembrerebbe indicare una struttura estesa^[82] ed è pertanto in contrasto con quanto

implicherebbero le correlazioni $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$. E' evidente che sono necessari ulteriori studi per chiarire questi dati sperimentali.

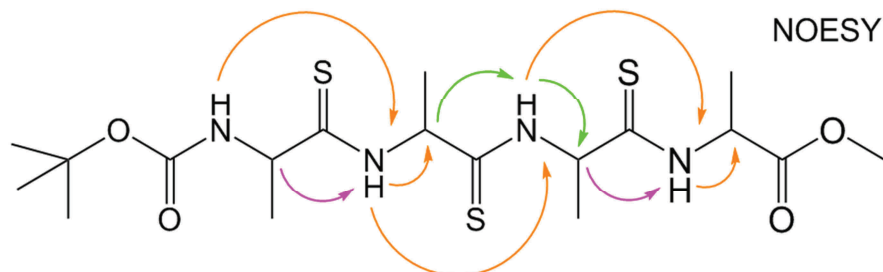


Figura 3.53 Correlazioni osservate nello spettro NOESY della molecola Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe (400MHz, CDCl_3). Le frecce viola rappresentano segnali più intensi, le frecce verdi indicano segnali di cui non si riesce a stimare l'intensità poiché sovrapposti. Sono state omesse volontariamente le correlazioni con i CH_3 per semplificare la figura.

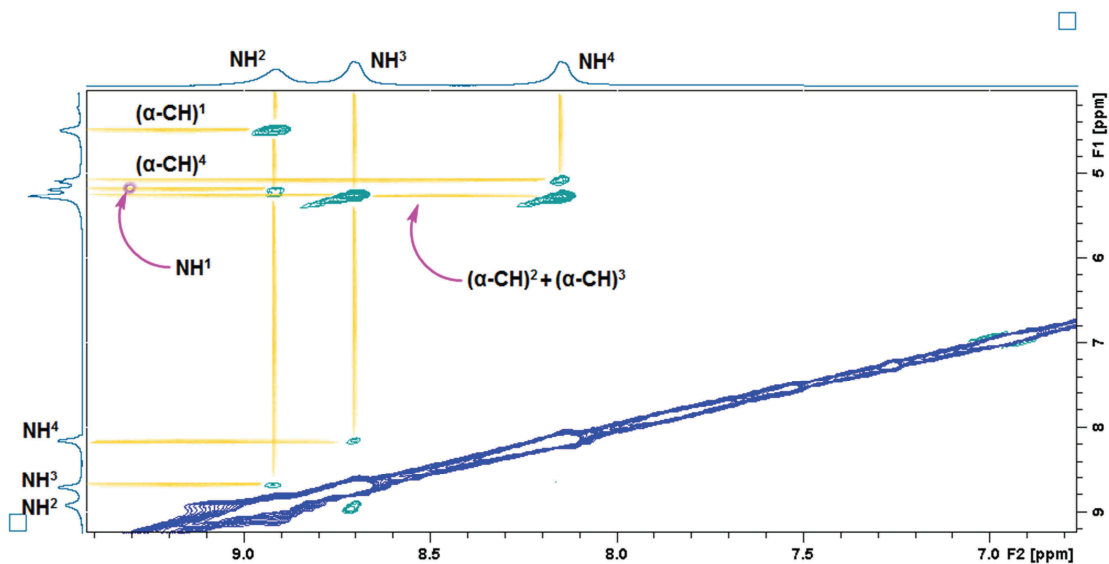


Figura 3.54 Porzione dello spettro NOESY di Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe (400MHz, CDCl_3), zona NH-(α -CH) e NH-NH.

Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe e

Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe

I dati più significativi degli spettri TOCSY e NOESY dei tri- e tetrapeptide tionati della serie della Nleu sono riportati nelle figure che seguono. Dall'analisi di queste informazioni emerge un buon parallelismo con i tiopeptidi dell'Ala. In particolare si notano negli spettri NOESY picchi NOE apparentemente in contrasto: le correlazioni sequenziali $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$, tipiche di strutture ripiegata ad elica, e le correlazione $\text{NH}(i) \rightarrow \alpha\text{-CH}(i-1)$ più intense delle $\text{NH}(i) \rightarrow \alpha\text{-CH}(i)$, osservabili in strutture estese.

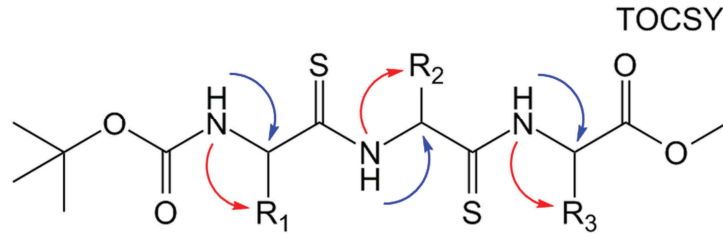


Figura 3.55 Correlazioni osservate nello spettro TOCSY della molecola Boc-Nleu- ψ [CSNH]-Nleu- ψ [CSNH]-Nleu-OMe ($L_1 = 20$, 400MHz, $CDCl_3$). Le frecce rosse rappresentano le correlazioni tra gli NH e i protoni delle catene laterali dove $R_1 = R_2 = R_3 = -(CH_2)_3-CH_3$.

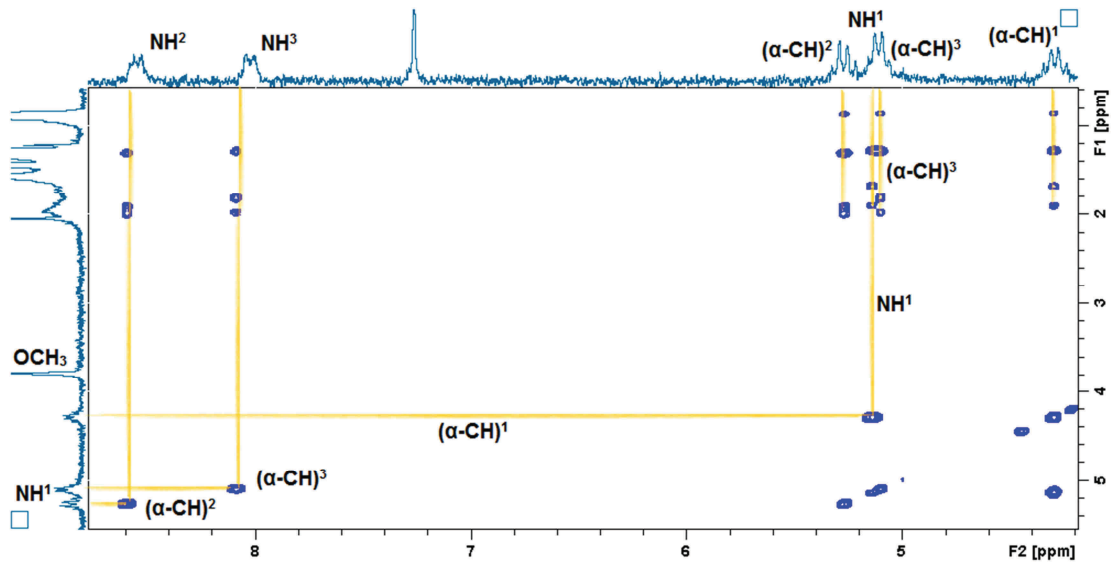


Figura 3.56 Porzione dello spettro TOCSY di Boc-Nleu- ψ [CSNH]-Nleu- ψ [CSNH]-Nleu-OMe ($L_1 = 20$, 400MHz, $CDCl_3$), zona NH-(α -CH). Nella figura viene evidenziata la zona di correlazione tra NH e α -CH con la catena laterale (0.8-2 ppm).

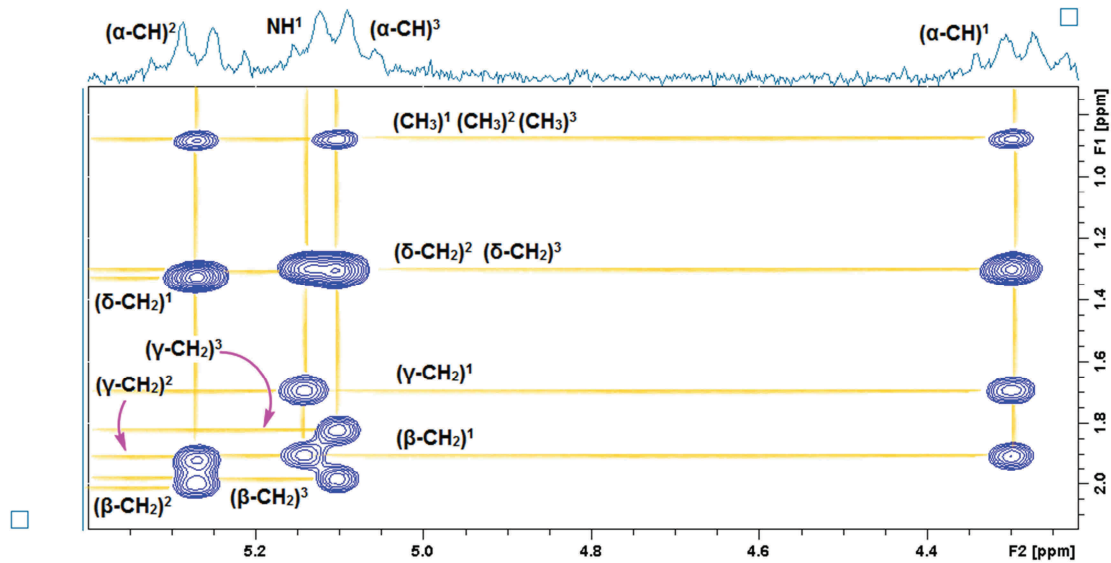


Figura 3.57 TOCSY ($L_1 = 20$, 400MHz, $CDCl_3$) zona NH-(α -CH) di Boc-Nleu- ψ [CSNH]-Nleu- ψ [CSNH]-Nleu-OMe. Nella figura viene evidenziata la zona di correlazione tra α -CH con la catena laterale (0.8-2ppm). Alcuni picchi possono risultare parzialmente sovrapposti.

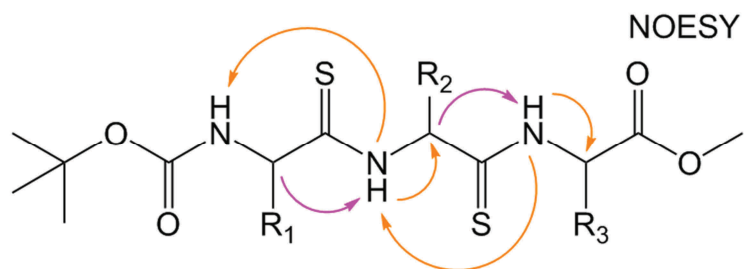


Figura 3.58 Correlazioni osservate nello spettro NOESY della molecola Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe (400MHz, CDCl₃). Le frecce viola rappresentano segnali più intensi. Sono state omesse volontariamente le correlazioni con la catena laterale per semplificare la figura.

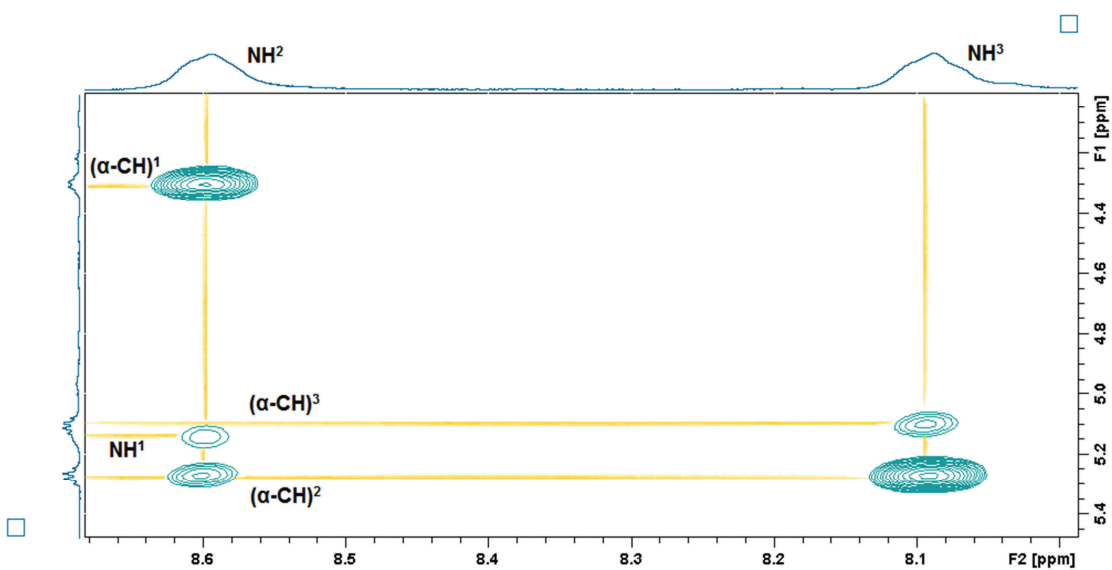


Figura 3.59 NOESY (400MHz, CDCl₃) zona NH-(α-CH) di Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe.

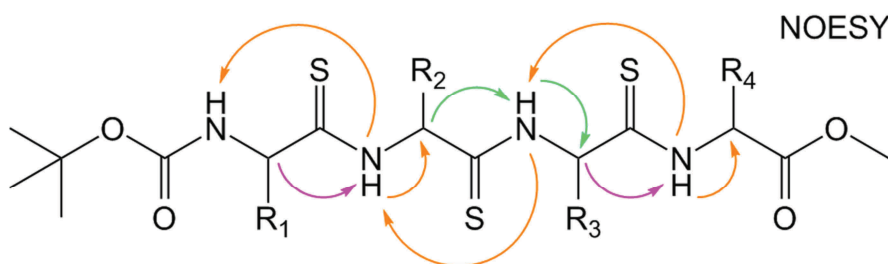


Figura 3.60 Correlazioni osservate nello spettro NOESY della molecola Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe (400MHz, CDCl₃). Le frecce viola rappresentano segnali più intensi, le frecce di color verde acqua indicano correlazioni non certe poichè (α-CH)² e (α-CH)³ sono segnali coincidenti. Sono state omesse volontariamente le correlazioni con la catena laterale per semplificare la figura. R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = -(CH₂)₃-CH₃.

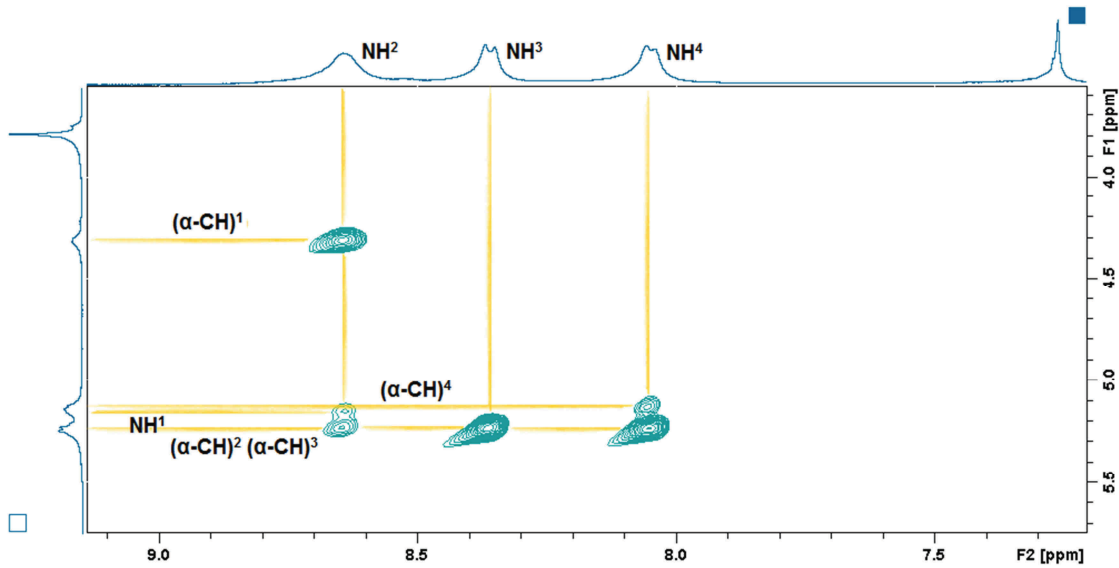


Figura 3.61 Porzione dello NOESY (400MHz, CDCl₃) di Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe, zona NH-(α-CH).

Osservazione sul TOCSY dei peptidi tionati della serie delle Gly

Nello spettro TOCSY dei tio-omopeptidi della Gly abbiamo riscontrato una particolarità. E' stata utilizzata una sequenza di impulsi del tipo "clean TOCSY" (*pulse program = "clmlevphpr"*), che solitamente elimina qualsiasi segnale che possa essere dovuto a interazioni spaziali tra protoni. Nonostante ciò, sono state osservate diverse correlazioni *inter-residuo*; con gli stessi parametri di acquisizione (in particolare con $L_1=20$), il peptide non tionato Z-(Gly)₃-OMe non mostrava alcuna correlazione diversa da quelle *intra-residuo* proprie di ogni sistema di spin. Al diminuire del parametro di acquisizione L_1 i segnali *inter-residuo* si attenuavano fino a scomparire (intensità dei segnali paragonabile al rumore di fondo) con $L_1 = 12$.

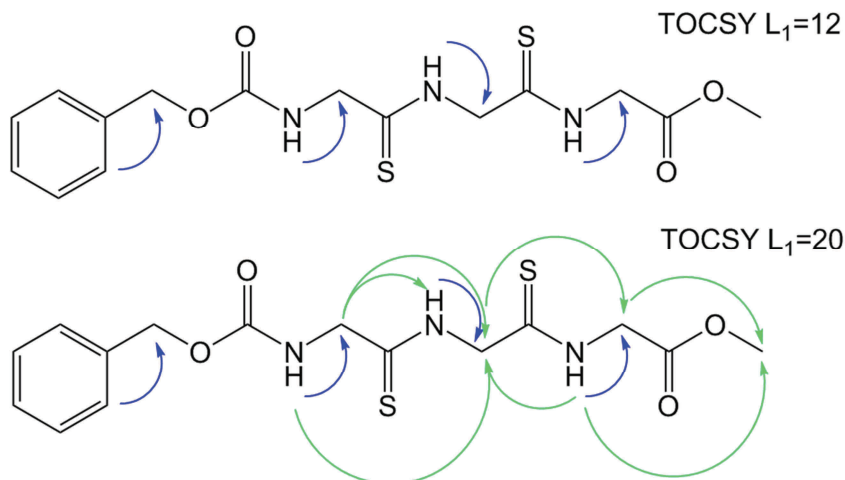


Figura 3.62 Correlazioni osservate nello spettro TOCSY della molecola Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe (400MHz, CDCl₃), con due diversi valori di L_1 . Le frecce in azzurro chiaro rappresentano le correlazioni non osservabili con $L_1=12$.

Il parametro L_1 è direttamente correlato con il *mixing time* usato nell'esperimento TOCSY. In particolare, $L_1=20$ corrisponde ad un *mixing time* di 70000 msec, $L_1=12$ corrisponde ad un *mixing time* di 50000 msec).

Di seguito sono mostrati gli spettri TOCSY con indicato il tempo L_1 e con le assegnazioni ai vari protoni. Per $L_1 = 12$ i segnali che correlano $(CH_2)^2 \rightarrow (CH_2)^3$ e $(CH_2)^2 \rightarrow (CH_2)^1$ sono presenti ma le intensità sono paragonabili al rumore di fondo, mentre con $L_1 = 18$ si possono osservare chiaramente. Addirittura con $L_1 = 20$ si possono associare $(CH_2)^2 \rightarrow NH^1$ e $(CH_2)^3 \rightarrow OCH_3$.

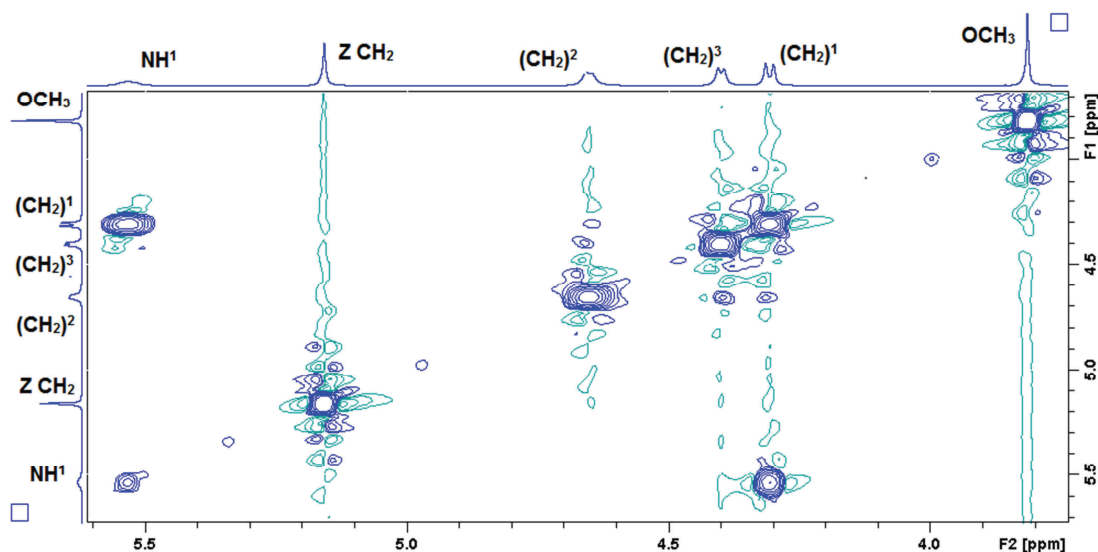


Figura 3.63 Porzione dello spettro TOCSY di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe ($L_1 = 12$, $P_1 = 7.88$, $P_6 = 23.35$, 400MHz, $CDCl_3$) nella zona dei CH_2 .

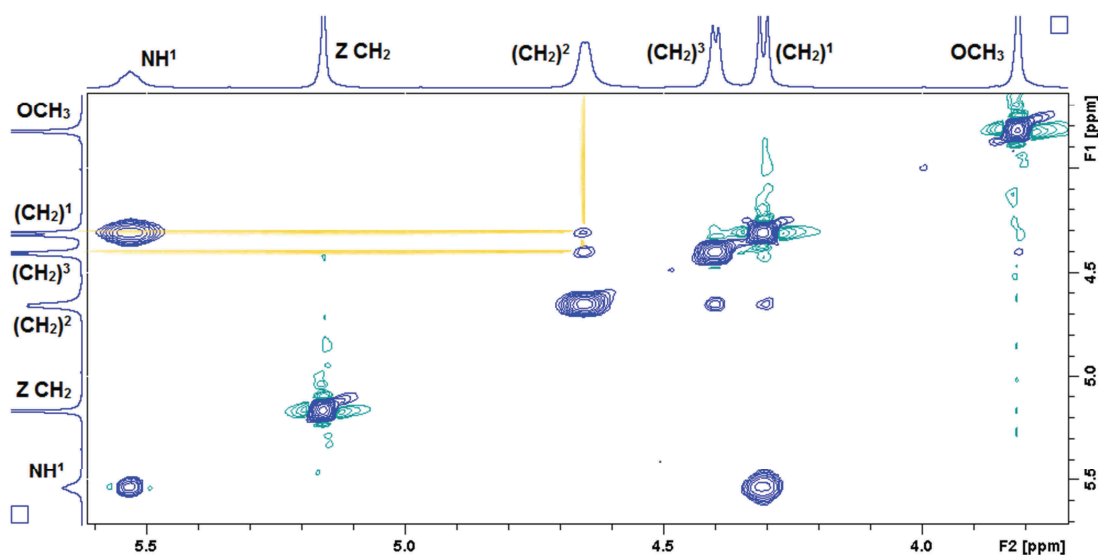


Figura 3.64 Porzione dello spettro TOCSY di Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe ($L_1 = 18$, $P_1 = 7.88$, $P_6 = 23.35$, 400MHz, $CDCl_3$) nella zona dei CH_2 .

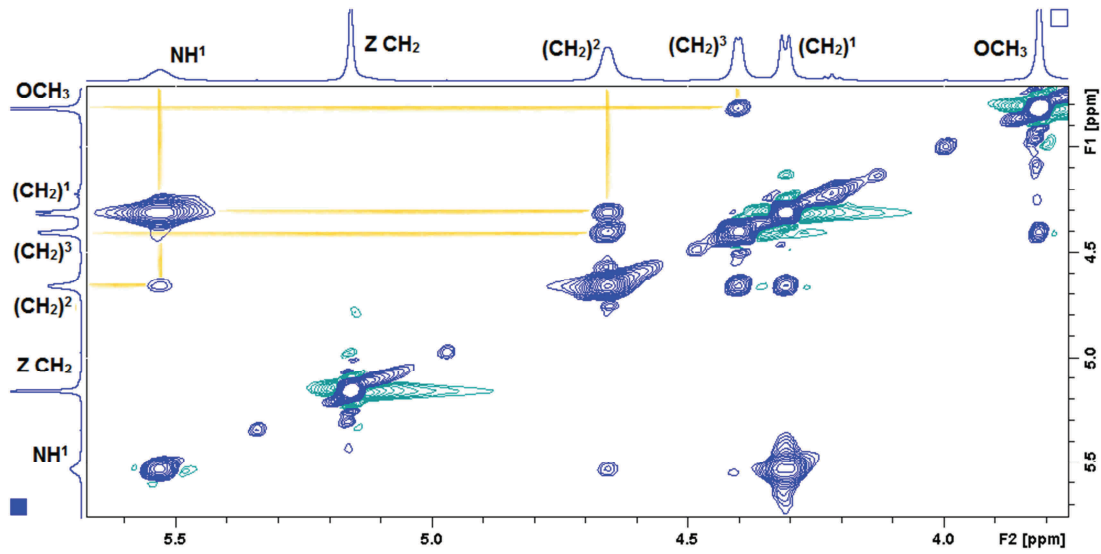


Figura 3.65 Porzione dello spettro TOCSY di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe ($L_1 = 20$, $P_1 = 7.75$, $P_6 = 25.25$, 400MHz, $CDCl_3$) nella zona dei CH_2 .

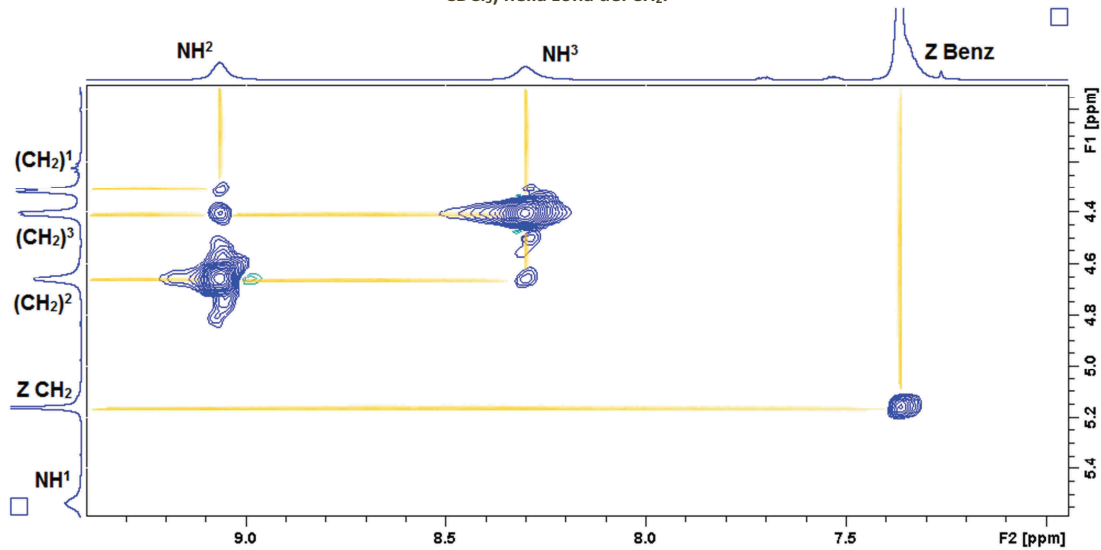


Figura 3.66 Porzione dello spettro TOCSY di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe ($L_1 = 20$, $P_1 = 7.75$, $P_6 = 25.25$, 400MHz, $CDCl_3$) nella zona CSNH.

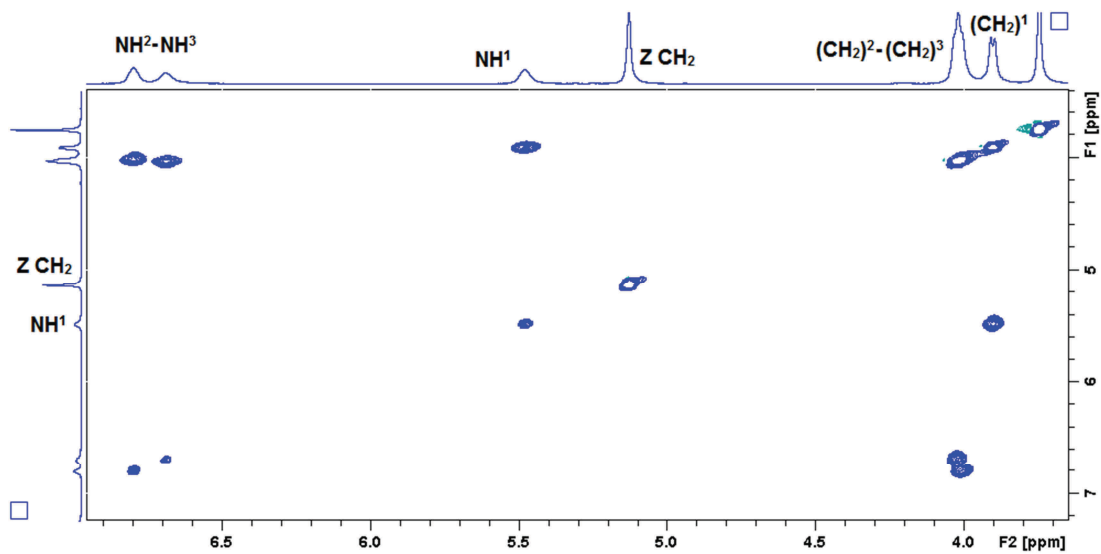


Figura 3.67 Porzione dello spettro TOCSY ($L_1 = 20$, 400MHz, $CDCl_3$) di Z-(Gly)₃-OMe.

Lo spettro di Z-(Gly)₃-OMe (con L₁=20) non presenta alcuna correlazione *inter-residuo*, come ci si aspetterebbe da un "clean TOCSY".

Lo stesso fenomeno si presenta quando si analizza lo spettro TOCSY del tetrapeptide della stessa serie Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe. Si notano facilmente le correlazioni CH₂(i) → CH₂(i+1), come nel caso del tripeptide tionato, per L₁ = 20. Inoltre anche in questo caso è presente la correlazione NH¹ → (CH₂)² e pure (CH₂)⁴ → OCH₃.

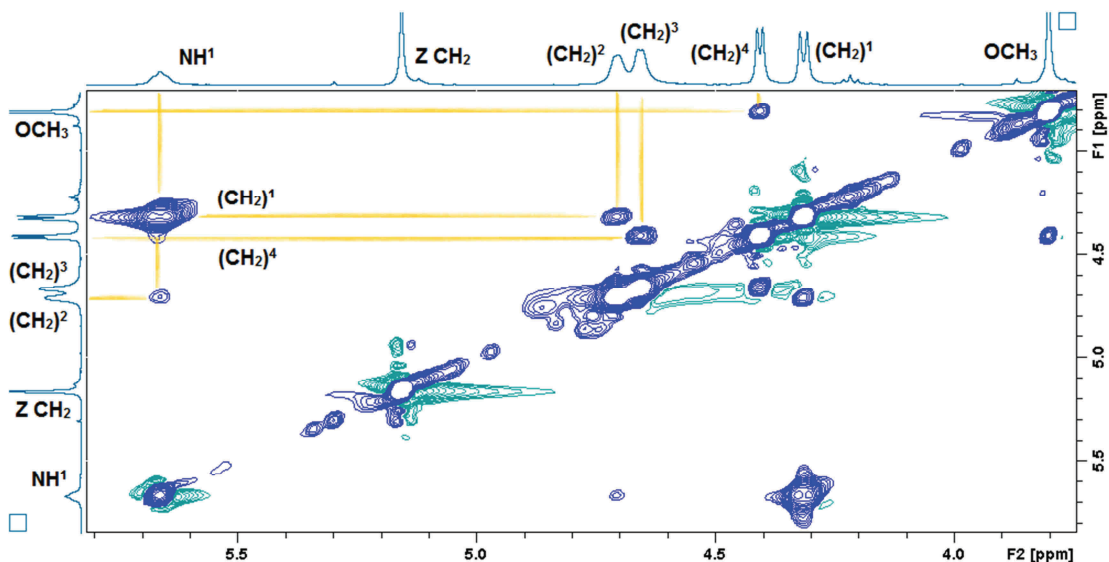


Figura 3.68 Porzione dello spettro TOCSY di Z-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-Ψ[CSNH]-Gly-OMe (L₁ = 20, 400MHz, CDCl₃), nella zona dei CH₂.

Questo fenomeno non si è riscontrato negli spettri TOCSY dei tiopeptidi dell'Ala e della Nleu. Pertanto, in attesa di studi più approfonditi, le conclusioni che si possono trarre sono che l'assenza di catena laterale nella Gly favorisce il passaggio del segnale al residuo successivo attraverso il legame tioammidico; si può ipotizzare che il legame tioammidico favorisca il passaggio della magnetizzazione da un residuo all'altro a causa di un maggior carattere di doppio legame esistente tra C ed N nella tioammide.

In Conclusione, l'analisi NMR ha evidenziato la presenza di strutture ripiegate nei tio-omopeptidi, probabilmente stabilizzate da legami ad H. Tale dato è in accordo con l'analisi IR nello stesso solvente. Tuttavia, non è possibile, con i dati sin qui raccolti, assegnare una conformazione ben definita ai tiopeptidi analizzati. Vi sono infatti picchi d'intersezione negli spettri 2D non compatibili con strutture ripiegate tipiche (ad es. β -turn) degli α -peptidi.

4. Conclusioni

Il lavoro di sintesi riportato in questa Tesi ha consentito di ottenere, per la prima volta, α -peptidi contenenti tre legami tioamidici consecutivi negli omopeptidi di Gly, Ala e Nleu. Inoltre, si è appurato che P_2S_5 , in combinazione con gli ultrasuoni, produce rese più elevate e meno sottoprodotti, rispetto al reagente di Lawesson. I tiopeptidi si sono mostrati più solubili degli analoghi non tionati in diversi solventi organici, sia per la presenza dello zolfo sia per la maggiore strutturazione impartita dai legami tioamidici, come rivelato dall'analisi conformazionale condotta mediante assorbimento IR. In particolare, la strutturazione sembra essere più marcata nella serie tio-omopeptidica dell'Ala.

L'analisi NMR condotta valutando l'effetto dell'aggiunta di DMSO e TEMPO a soluzioni peptidiche in $CDCl_3$ indica che nei peptidi normali gli NH hanno la stessa esposizione al solvente, segno di scarsa strutturazione, e che nei peptidi tionati gli NH centrali sono meno esposti al solvente, indicando una possibile strutturazione (come emerso anche dall'analisi IR).

Tuttavia, il minor spostamento di *chemical shift* dei residui centrali non è compatibile con l'ipotesi della formazione di uno o due (nei tetra) β -turn. Infatti, l'NH del residuo 3 o del 4 (nei tetra) dovrebbe essere molto meno sensibile agli agenti perturbanti. Pertanto, sono necessari ulteriori studi spettroscopici per chiarire le ragioni di tale comportamento.

Per quanto riguarda l'analisi CD, i tiopeptidi presentano curve simili tra loro, dominate da transizioni del cromoforo tioamidico. Non è possibile assegnarle ad una specifica conformazione. Tuttavia, riteniamo che i nostri tio-omopeptidi siano ripiegati con senso di spiralizzazione destrogiro, per analogia con gli spettri CD di decapeptidi elicoidali con un legame tioamidico, recentemente studiati nel nostro Laboratorio.

5. Appendice

Tabelle relative ai dati ottenuti dalle aggiunte di DMSO

In questa parte dell'appendice vengono riportati tutti i valori osservati negli spettri $^1\text{H-NMR}$ in funzione del volume di $\text{DMSO-}d_6$ aggiunto. Solamente nella prima tabella vengono riportati dei dati esempio per quanto riguarda il peptide $\text{Z-(Gly)}_3\text{-OMe}$ (da destra a sinistra) la percentuale di $\text{DMSO-}d_6$ aggiunto, il volume (vol) espresso in μl , la massa relativa (m) in mg (tenendo conto della densità del $\text{DMSO-}d_6 = 1.190 \text{ g/ml}$), il numero di moli (n) (calcolato con $\text{MM} = 84.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), la concentrazione in mol/l e gli equivalenti rispetto alla concentrazione del peptide (differente per ognuno).

| Z-(Gly) ₃ -OMe (1.5mM, $7.5 \cdot 10^{-7}$ mol in 500 μl) | | | |
|--|-------------|----------------------------|-----------|
| n DMSO (mol) | m DMSO (mg) | vol DMSO (μl) | %vol DMSO |
| 7,07E-05 | 5,95 | 5,00 | 0,99 |
| 1,41E-04 | 11,90 | 10,00 | 1,96 |
| 2,12E-04 | 17,85 | 15,00 | 2,91 |
| 3,53E-04 | 29,75 | 25,00 | 4,76 |
| 4,95E-04 | 41,65 | 35,00 | 6,54 |
| 8,48E-04 | 71,40 | 60,00 | 10,71 |

Tabella 5.1 Esempio dei calcoli relativi per ottenere gli equivalenti di $\text{DMSO-}d_6$ aggiunto nella soluzione da 500 μl del peptide $\text{Z-(Gly)}_3\text{-OMe}$.

| Z-(Gly) ₃ -OMe (1.5mM) | | | |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0,99 | 5,71 | 6,93 | 7,02 |
| 1,96 | 5,90 | 7,16 | 7,16 |
| 2,91 | 6,04 | 7,26 | 7,26 |
| 4,76 | 6,22 | 7,41 | 7,41 |
| 6,54 | 6,37 | 7,51 | 7,51 |
| 10,71 | 6,60 | 7,66 | 7,66 |

Tabella 5.2 Dati relativi alle aggiunte di $\text{DMSO-}d_6$ ad una soluzione da 500 μl del peptide $\text{Z-(Gly)}_3\text{-OMe}$ in CDCl_3 .

| Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe (1.5mM) | | | |
|---|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0 | 5,45 | 8,18 | 9,03 |
| 0,99 | 5,79 | 8,94 | 9,31 |
| 1,96 | 6,01 | 9,27 | 9,45 |
| 2,91 | 6,12 | 9,49 | 9,49 |
| 4,76 | 6,38 | 9,60 | 9,60 |
| 6,54 | 6,57 | 9,72 | 9,67 |
| 10,71 | 6,88 | 9,87 | 9,71 |

Tabella 5.3 Dati relativi alle aggiunte di $\text{DMSO-}d_6$ ad una soluzione da 500 μl del peptide $\text{Z-Gly-}\Psi$ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe in CDCl_3 .

| Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe (1.1mM) | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 4 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0 | 5,53 | 8,08 | 8,95 | 8,95 |
| 0,99 | 5,91 | 8,89 | 9,40 | 9,40 |
| 1,96 | 6,14 | 9,07 | 9,56 | 9,56 |
| 2,91 | 6,31 | 9,23 | 9,58 | 9,58 |
| 4,76 | 6,55 | 9,35 | 9,72 | 9,72 |
| 6,54 | 6,71 | 9,42 | 9,78 | 9,78 |
| 10,71 | 6,93 | 9,54 | 9,84 | 9,84 |

Tabella 5.4 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe in $CDCl_3$.

| Boc-(Ala) $_3$ -OMe (1.3mM) | | | |
|-----------------------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0,00 | 4,91 | 6,60 | 6,60 |
| 0,99 | 5,06 | 6,79 | 6,79 |
| 1,96 | 5,16 | 6,91 | 6,91 |
| 2,91 | 5,26 | 7,02 | 7,02 |
| 4,76 | 5,43 | 7,13 | 7,18 |
| 6,54 | 5,53 | 7,19 | 7,32 |
| 10,71 | 5,72 | 7,35 | 7,49 |

Tabella 5.5 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-(Ala) $_3$ -OMe in $CDCl_3$.

| Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe (1.3mM) | | | |
|---|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0,00 | 5,28 | 8,34 | 9,12 |
| 0,99 | 5,27 | 8,89 | 9,19 |
| 1,96 | 5,33 | 9,29 | 9,29 |
| 2,91 | 5,44 | 9,39 | 9,33 |
| 4,76 | 5,62 | 9,67 | 9,47 |
| 6,54 | 5,73 | 9,79 | 9,51 |
| 10,71 | 5,97 | 9,96 | 9,61 |

Tabella 5.6 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-Ala- Ψ [CSNH]-Ala- Ψ [CSNH]-Ala-OMe in $CDCl_3$.

| Boc-(Ala) $_4$ -OMe (1.2mM) | | | | |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 4 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0,99 | 5,10 | 6,65 | 6,90 | 7,08 |
| 1,96 | 5,25 | 6,75 | 6,99 | 7,15 |
| 2,91 | 5,42 | 6,88 | 7,06 | 7,24 |
| 4,76 | 5,58 | 6,99 | 7,15 | 7,29 |
| 6,54 | 5,72 | 7,11 | 7,23 | 7,37 |
| 10,71 | 5,93 | 7,25 | 7,35 | 7,47 |

Tabella 5.7 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-(Ala) $_4$ -OMe in $CDCl_3$.

| Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe (1.1mM) | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 4 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0 | 5,53 | 8,08 | 8,95 | 8,95 |
| 0,99 | 5,91 | 8,89 | 9,40 | 9,40 |
| 1,96 | 6,14 | 9,07 | 9,56 | 9,56 |
| 2,91 | 6,31 | 9,23 | 9,58 | 9,58 |
| 4,76 | 6,55 | 9,35 | 9,72 | 9,72 |
| 6,54 | 6,71 | 9,42 | 9,78 | 9,78 |
| 10,71 | 6,93 | 9,54 | 9,84 | 9,84 |

Tabella 5.8 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-Ψ[CSNH]-Ala-OMe in CDCl₃.

| Boc-(Nleu) ₃ -OMe (1.0mM) | | | |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0,00 | 4,91 | 6,45 | 6,51 |
| 0,99 | 5,00 | 6,63 | 6,63 |
| 1,96 | 5,10 | 6,75 | 6,75 |
| 2,91 | 5,17 | 6,85 | 6,85 |
| 4,76 | 5,32 | 7,02 | 7,02 |
| 6,54 | 5,41 | 7,14 | 7,14 |
| 10,71 | 5,62 | 7,30 | 7,30 |

Tabella 5.9 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-(Nleu)₃-OMe in CDCl₃.

| Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe (1.0mM) | | | |
|--|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0,00 | 5,11 | 8,02 | 8,55 |
| 0,99 | 5,23 | 8,57 | 8,83 |
| 1,96 | 5,31 | 8,89 | 9,00 |
| 2,91 | 5,37 | 9,08 | 9,08 |
| 4,76 | 5,49 | 9,33 | 9,24 |
| 6,54 | 5,59 | 9,53 | 9,32 |
| 10,71 | 5,77 | 9,69 | 9,44 |

Tabella 5.10 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe in CDCl₃.

| Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe (1.6mM) | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|
| %vol DMSO | NH 1 (ppm) | NH 4 (ppm) | NH 3 (ppm) | NH 2 (ppm) |
| 0 | 5,53 | 8,08 | 8,95 | 8,95 |
| 0,99 | 5,91 | 8,89 | 9,40 | 9,40 |
| 1,96 | 6,14 | 9,07 | 9,56 | 9,56 |
| 2,91 | 6,31 | 9,23 | 9,58 | 9,58 |
| 4,76 | 6,55 | 9,35 | 9,72 | 9,72 |
| 6,54 | 6,71 | 9,42 | 9,78 | 9,78 |
| 10,71 | 6,93 | 9,54 | 9,84 | 9,84 |

Tabella 5.11 Dati relativi alle aggiunte di DMSO- d_6 ad una soluzione da 500 μ l del peptide Boc-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-Ψ[CSNH]-Nleu-OMe in CDCl₃.

Analisi 2D-NMR di Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-Nleu-OMe

Per poter caratterizzare questo peptide monotonato ($MS-ESI = 488.31 (M+H)^+$) uscito come prodotto maggioritario da una reazione non andata a completezza (RL, THF, Δ , 4 giorni, resa = 5%) sono sufficienti un COSY ed un NOESY. Il picco a 8.39 ppm è sicuramente il CSNH (NH^2) e quello a 5.17 ppm è l'uretanico (NH^1). Il picco a 8.39 correla al NOESY con il suo α -CH e con l' α -CH a 4.3 ppm (del residuo 1, in quanto correlato all'uretanico). E' interessante notare come le correlazioni $NH(i) \rightarrow \alpha-CH(i-1)$ siano più intense di $NH(i) \rightarrow \alpha-CH(i)$.

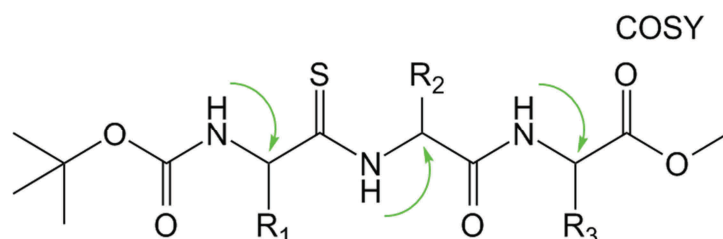


Figura 5.1 Correlazioni osservate nello spettro COSY della molecola Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-Nleu-OMe (400MHz, $CDCl_3$).

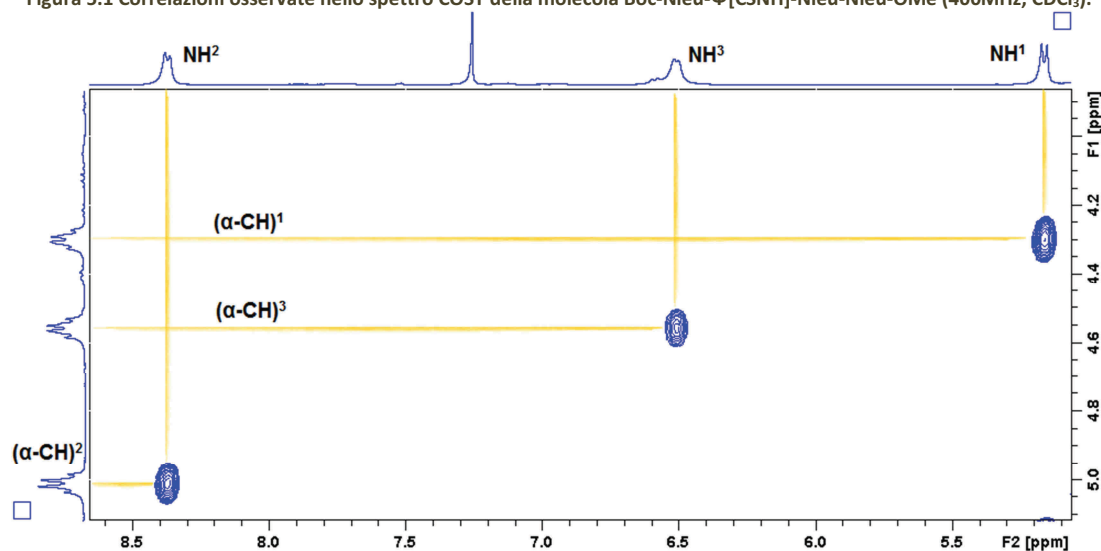


Figura 5.2 Porzione di COSY (400MHz, $CDCl_3$) zona NH-(α -CH) di Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-Nleu-OMe.

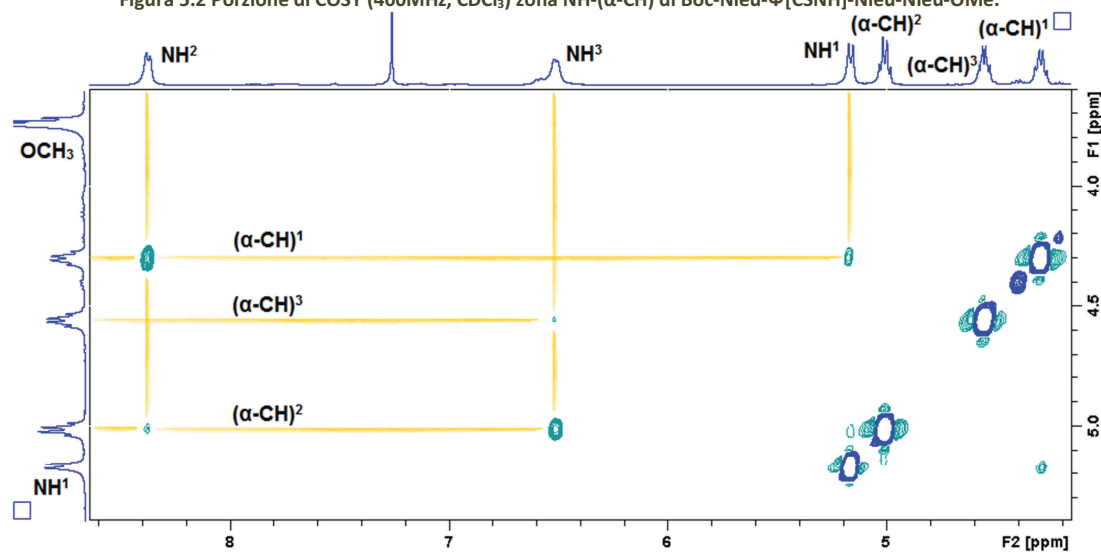


Figura 5.3 Porzione di NOESY (400MHz, $CDCl_3$) zona NH-(α -CH) di Boc-Nleu- Ψ [CSNH]-Nleu-Nleu-OMe.

Bibliografia

- [1] A. F. Spatola, in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Vol. 7, Weinstein, B., Ed., Dekker, New York, **1983**, 267-357.
- [2] P. Chen, J. Qu, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 2994.
- [3] (a) C. Alemán, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 6717.
- [4] H.-J. Lee, Y.-S. Choi, K.-B. Lee, J. Park, C.-J. Yoon, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 7010.
- [5] (a) R. Bardi, A. M. Piazzesi, C. Toniolo, O. E. Jensen, R. S. Omar, A. Senning, *Biopolymers*, **1988**, 27, 747; (b) C. Toniolo, R. Bardi, A. M. Piazzesi, O. E. Jensen, T. P. Andersen, R. S. Omar, A. Senning, T. F. La Cour, in *Second Forum on Peptides*, M. Aubry, B. Marraud, Eds., John Libbey, **1989**, 371-374.
- [6] T. Sifferlen, M. Rueping, K. Gademann, B. Jaun and D. Seebach, *Helvetica Chimica Acta*, **1999**, 82, 2067-2093.
- [7] (a) V. Cervetto, P. Hamm, J. Helbing, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 8398-8405; (b) H. Bregy, H. Heimgartner, J. Helbing, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 1756.
- [8] (a) K. B. Wiberg, P. R. Rablen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 2201; (b) K. B. Wiberg, D. J. Rush, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 2038.
- [9] R. C. Neuman Jr, L. B. Young, *J. Phys. Chem.*, **1965**, 69, 1777.
- [10] a) I. Harada, M. Tasumi, *Chem. Phys. Lett.*, **1980**, 70, 279; b) S. Ataka, H. Takeuchi, I. Harada, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88, 449; c) C. Kato, H. Hamaguchi, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 407.
- [11] a) M. Jakob, S. Füssel, F. Thuncke, G. Fischer, M. Schutkowski, *unpublished results presented at the "Third Lausanne Conference on Bioorganic Chemistry"*, Lausanne, 4 ± 5 March, **1999**; b) M. Jakob, Diss. Max-Planck Research Unit, Halle, Germany, **1999**.
- [12] J. M. Goldberg, S. Batjargal, J. E. Petersson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 14718.
- [13] A. Pawelczyk, L. Zaprutko, *Flavour Fragr. J.*, **2011**, 26, 101-106.
- [14] S. Banala, R. D. Süßmuth, *ChemBioChem*, **2010**, 11, 1335-1337.
- [15] Y. Hayakawa, K. Sasaki, H. Adachi, K. Furihata, K. Nagai, K. Shin-ya, *J. Antibiot.*, **2006**, 59(1), 1-5.
- [16] (a) D. R. Artis, M. A. Lipton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12200; (b) T. T. Tran, J. Zeng, H. Treutlein, A. W. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 5222; (c) T. T. Tran, J. Zeng, H. Treutlein, A. W. Burgess, *Protein Eng. Des. Sel.*, **2006**, 19, 401.
- [17] (a) J. H. Miwa, A. K. Patel, N. Vivatrat, S. M. Popek, A. M. Meyer, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 3373; (b) J. H. Miwa, L. Pallivathucal, S. Gowda, K. E. Lee, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 4655.
- [18] V. Cervetto, R. Pfister, C. Kolano, H. Bregy, H. Heimgartner, J. Helbing, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 9004.

- [19] R. Bardi, A. M. Piazzesi, C. Toniolo, O. E. Jensen, T. P. Andersen, A. Senning, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 761.
- [20] A. Reiner, D. Wildemann, G. Fischer, T. Kiefhaber, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8079.
- [21] C. Toniolo, H. Brückner, *Peptaibiotics*, Wiley, Weinheim, **2009**.
- [22] H. Fathi, *Tesi di Laurea Specialistica in Chimica, Università degli Studi di Padova*, **2011**.
- [23] Y. Otani, T. Hori, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *Tetrahedron*, Article in press, **2012**.
- [24] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains, tentative rules (1969)*, *Biochemistry*, **1970**, 9, 3471-3479.
- [25] C. Toniolo, E. Benedetti, *Trends Biochem. Sci.*, **1991**, 16, 350-353.
- [26] G. Némethy, M. P. Printz, *Macromolecules*, **1972**, 5(6), 755.
- [27] V. Pavone, G. Gaeta, A. Lombardi, F. Nastro, O. Meglio, C. Isernia, M. Saviano, *Biopolymers*, **1996**, 38, 705-721.
- [28] E. R. Blout, *The dependence of the conformation of polypeptides and proteins upon amino acid composition*, in *Polyamino Acids, Polypeptides, and Proteins*, M. A. Stahmann (Ed), The University of Wisconsin Press, Madison, WI, **1962**, 275-279.
- [29] G. L. Millhauser, *Biochemistry*, **1995**, 34, 3873-3877.
- [30] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers*, **1968**, 6, 1425.
- [31] C. Toniolo, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **1980**, 9, 1.
- [32] G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.*, **1985**, 37, 1.
- [33] A. I. Jiménez, G. Ballano, C. Cativiela, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2005**, 44, 396-399.
- [34] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1951**, 37, 729-740.
- [35] M. Crisma, G. Valle, G. M. Bonora, C. Toniolo, F. Lelj, V. Barone, F. Fraternali, P. M. Hardy, H. L. S. Maia, *Biopolymers*, **1991**, 31, 637.
- [36] T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 5210-5278.
- [37] T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3419-3478.
- [38] (a) L. Henry, *Ann. Chem. Pharm.*, **1869**, 148, 152; (b) J. Z. Wislicenus, *Chem.*, **1869**, 324.
- [39] V. Polshettiwar, M.P. Kaushik, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 6255-6257.
- [40] (a) H. Z. Lecher, R. A. Greenwood, K. C. Whitehouse, T. H. Chau, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 5018; (b) J. Perregaard, S. Scheibye, H. J. Meyer, I. Thomsen, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1977**, 86, 679; (c) H. Oshida, A. Ishii, J. Nakayama, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 1331; (d) P. Fay, H. P. Lankelma, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 4933.
- [41] (a) S. Scheibye, B. S. Pedersen, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87, 229; (b) B. S. Pedersen, S. Scheibye, N. H. Nilson, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87, 223; (c) S. Scheibye, B. S. Pedersen, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87, 299; (d) B. S. Pedersen, S. Scheibye, N. H. Nilson, K. Clausen, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87, 293.
- [42] A. D. Baker, R. E. Engel, *Chimica Organica*, **1995**, 710-711.

- [43] V. V. Sureshbabu, G. Nagendra, R. Venkataramanarao, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2008**, 15, 927–929.
- [44] M. Ori, T. Nishio, *Heterocycles*, **2000**, 52, 111.
- [45] O. E. Jensen, A. Senning, *Tetrahedron*, **1986**, 42, 6555.
- [46] L. Wang, O. Phanstiel, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1442;
- [47] D. B. Sherman, A. F. Spatola, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 433.
- [48] F. S. Guziec, L. M. Wasmund, *J. Chem. Res. Synop.*, **1989**, 155.
- [49] M. Hollosi, Z. Majer, M. Zewdu, F. Ruff, M. Kajtar, K. E. Kover, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 195.
- [50] Z. Majer, M. Zewdu, M. Hollosi, J. Seprodi, Z. Vadasz, I. Teplan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 150, 1017.
- [51] D. W. Brown, M. M. Campbell, M. S. Chambers, C. V. Walker, *Tetrahedron*, **1987**, 28, 2171.
- [52] M. Kajtar, M. Hollosi, J. Kajtar, Z. S. Majer, K. E. Kover, *Tetrahedron* **1986**, 42, 3931.
- [53] K. Cho, *Anal. Biochem.*, **1987**, 164, 284.
- [54] O. E. Jensen, S.-O. Lawesson, *Tetrahedron*, **1985**, 41, 5595.
- [55] M. A. Shalaby, C. W. Gtote, H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, **1966**, 61, 9045–9048.
- [56] T. J. Curphey, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 6461.
- [57] D. Cho, J. Ahn, K. A. De Castro, H. Ahn, H. Rhee, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 5583–5588.
- [58] L. V. Bezgubenko, S. E. Pipko, A. D. Sinitsa, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2008**, 78, 1341.
- [59] U. Pathak, L. K. Pandey, R. Tank, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 2890–2893.
- [60] E. Aparna, K. M. Lokanatharai, M. Sureshbabu, R. L. Jagadish, S. L. Gaonkar, *J. Mater. Sci.*, **2006**, 41, 1391.
- [61] A. B. Charette, M. Grenon, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 5792.
- [62] J. Bergman, B. Pettersson, V. Hasimbegovic, P. H. Svensson, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 1546–1553.
- [63] P. M. Weintraub, *Int. J. Sulfur Chem.*, **1973**, 8, 321.
- [64] J. Nakayama *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, 70, 509.
- [65] H. R. Lagiakos, A. Walker, M. I. Aguilar, P. Perlmutter, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 5131–5132.
- [66] S. Raucher, P. Klein, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 3558–3559.
- [67] T. J. Mason, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, 26, 443–451.
- [68] C. Leonelli, T. J. Mason, *Chemical Engineering and Processing*, **2010**, 49, 885–900.
- [69] T. J. Mason, A. J. Coble, J. E. Graves, D. Morgan, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2011**, 18, 226–230.
- [70] W. C. Still, M. Khan, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2923.
- [71] G.M. Bonora, D. Nisato, C. Toniolo, *Makromol. Chem.*, **1975**, 176, 2535–2545.
- [72] G.M. Bonora, C. Toniolo *Makromol. Chem.*, **1978**, 179, 1453–1463.
- [73] W. Konig, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788.
- [74] G. Washington Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89 (19), 5012–5017.

- [75] a) M. Palumbo, S. Da Rin, G. M. Bonora, C. Toniolo, *Makromol. Chem.*, **1976**, 177, 1477; b) G. M. Bonora, C. Mapelli, C. Toniolo, R. R. Wilkening, E. S. Stevens, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1984**, 6, 179.
- [76] S. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, R. Souda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 270.
- [77] M. Bellamy, "*The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*", Methuen, London, **1956**.
- [78] M. Hiroaki, B. Gema, C. Toniolo, G. Nien-Hui, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 5168.
- [79] IRSCOT, *Infrared Structural Correlation Tables*, Heyden and Son, London, **1966**.
- [80] A. J. Abdulghani, N. M. Abbas, *Bioinorg. Chem. Appl.*, ID 706262, **2011**.
- [81] K. A. Jensen, P. H. Nielsen, *Acta Chem. Scand.*, **1966**, 597.
- [82] C. Peggion, M. Crisma, F. Formaggio, C. Toniolo, A solvent-dependent peptide spring unraveled by 2D-NMR, *Tetrahedron*, Article in press, **2012**.
- [83] R. Martin, G. Hauthal, *Dimethyl Sulphoxide*, Van Nostrand-Reinhold, Wokingham, U.K., **1975**.
- [84] T.P. Pitner, D.W. Urry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 1399.
- [85] C. Toniolo, F. Formaggio, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, *Synlet*, **2006**, 1295.
- [86] B. V. V. Prasad, P. Balaram, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **1984**, 16, 307.
- [87] D. Wildemann, C. Schiene-Fischer, T. Aumüller, A. Bachmann, T. Kiefhaber, C. Lücke, G. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4910.
- [88] N. Sreerama, R. W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd Edit., Eds. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, Wiley-VCH, New York, **2000**, 601-619.
- [89] K. Wüthrich, *NMR of Protein and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.

Ringraziamenti

Inanzitutto desidererei ringraziare il prof. Fernando Formaggio per la grandissima disponibilità e per l'avermi lasciato dialogare liberamente con la mia lingua più confidenziale, il dialetto. Me lo ricorderò sempre per essere stato un autorevole professore sia dal lato accademico sia da quello umano. Un grazie in più anche per l'avermi appoggiato nella coraggiosa scelta di tornare indietro e ripercorrere l'insolita strada di rifare completamente il lavoro di Tesi. Fino ad ora non mi sono mai pentito di questa scelta anche grazie a tutto il gruppo del prof. Claudio Toniolo, il quale ha saputo mettere insieme persone con le quali è stato possibile lavorare e confrontarsi apertamente ricreando un ambiente sereno. Tra questi vorrei ringraziare la Dott. Cristina Peggion per avermi dato una mano nel prendere confidenza con l'NMR. Un ringraziamento ad Ale "Fonzie" Moretto per i diversi consigli durante le sintesi e i goliardici racconti di vita passata. Grazie anche a Marta e Barbara per gli aiuti che mi sono stati dati durante il percorso.

Un grazie a tutti i compagni di avventure a partire dal fido Ale "The Swedish Alpine Lover" De Nicolò, per il tempo passato a ricordarci e dimenticarci continuamente cosa stavamo facendo; uno "special thanks to" Asta per i bei momenti trascorsi davanti alla macchinetta e per la professionalità con cui percolava il "lithuanian coffee"; un grazie a Luigi "Luiggi" Grassi e al pollo crudo, ad Alberto Meroni, ad Andrea Orlandin e alla Haleh Fatih.

Un ringraziamento ai compagni di corso che si sono susseguiti nel corso del tempo, tra questi gli storici compari in laboratorio didattico come Giorgio "Mengele" Schileo, Michele "Orso" Boarini, Lorenzo Perini, Tommaso "Ilcitolfo" Meneghetti (ricordando Pedron) e Bruno 'Mbotchack; di fondamentale aiuto per rintracciare dispense e appunti vari è stata la segretaria Beatrice "Bea" Fon. Un saluto a Mattia "Tregnago" Anselmi, alla Patrizia De Paoli, ad Alberto Steffani e agli esperimenti casalinghi, ad Andrea Lovato, e ai goliardici Mine e Tobia.

Dato che la Tesi segna la fine di un periodo fondamentale desidero ringraziare i compagni di avventure che hanno attraversato con me questo periodo all'università. Un grazie alla VannoZZo da bere, ai coinquilini tutti, alla BST, ai miei classe, al grande WLF, ai B-Zona e ai Mastegabrodo. Tra questi un grazie enorme ai tanti personaggi che ho incontrato: il sempreverde Francesco "Giuliano"- "Frenci"- "ilTozo"- "Dusi" Dusi, Emanuele "Batta Babuchka Simio" Battagin, MariaChiara e Luigi, il conquilino di sempre Luca "DiodiDio" Varini, Paolo "Paolino" Cappa, il Ponta e gli indimenticabili scleri, la nuova leva Marco Cappa, Ludovico "M.l'O." detto anche "Labbestia" Esposito, Fabio "Radio" ovvero il Morando nazionale, Alberto Indrigo e le feste in cantina e come si vestiva, Mattia Serafini il capitano, la Fede, la Mara, il grande Hugo e il suo "Bacio Nero", Renato detto anche "Vincenzo" e i peperoni, lo zingarone bresciano in rom-mobile Maickol e la Ross, Gianmaria "Mario-Maria-Mario"

detto "Johnny" Camardo, la "non sono una poco di bbbuono" Claudia, Michele l'"Ingegniere" e il 22 Maggio, ai fratelli Marco "Saponaz", Ale "Q" e Ivan "Miroslav" Cuscov, Stefano "Ancora Latte" Cervo, alla Giulia "Lady Violet" Beltrame, al bar degli interisti presieduto da Diego e Daniel, alla classi delle superiori tutte (BS e BST), Andrea Cremasco e le porchettate, Andrea "Marzio" Massenz, Lorenzo Longo, il grande Diogo detto "O Feio", il fedele Herculès e la "Macheoooo" Fabi, la Marta, l'ospitale Amilcar, il compare Alvaro, Lucas, Riccardo "Rich e no parchè xe pien de schei", la Chiaretta, Fox, il Farinati e l'Adriana, ai classe Michele "il classe" Marcolongo, Riccardo "Chucky" Busnardo, Daniele "Tini" Albertini, Laura Bertapelle, ai paesani Flo detto "il contrada" e Mocio e a tutti i componenti dei Mastegabrodo. *(Mi scuso per le eventuali mancanze ma sono in ritardo con la stampa della Tesi poichè dovrò consegnarla entro 20 ore).*

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori che hanno creduto in me anche quando io stesso non mi sarei dato "mezzo franco" per procedere lungo questo percorso che, alla fine e non senza intoppi, ha dato buoni frutti.

6. Addendum al Lavoro di Tesi

Raggi X del tiopeptide Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe

Sono stati ottenuti cristalli singoli del tripeptide ditionato Z-Gly- Ψ [CSNH]-Gly- Ψ [CSNH]-Gly-OMe (per lenta evaporazione da metanolo), adatti all'indagine mediante diffrazione dei raggi X, e la struttura è stata risolta dal Dr. M. Crisma (ICB-CNR, Padova) (vedi figura 6.1).

Nel gruppo tioammidico il legame C'=S è nettamente più lungo (1.66 Å) del corrispondente legame C'=O peptidico (1.20 Å), mentre il legame C'-N nella tioammide (1.31 Å) è leggermente più corto che nel gruppo ammidico (1.34 Å). Quest ultimo dato suggerisce che nel legame C'-N della tioammide il carattere di parziale doppio legame è leggermente più pronunciato rispetto al gruppo peptidico. Questi parametri geometrici sono in buon accordo con quelli riportati in letteratura per il gruppo tioammidico.

Nella struttura entrambi i legami tioammidici, quello uretanico e l'estere sono nella disposizione *trans*, con modeste deviazioni dalla planarità.

La conformazione adottata dai tre residui di Gly è descritta dai seguenti angoli torsionali:

| | Gly(1) | Gly(2) | Gly(3) |
|--------|--------|--------|--------|
| ϕ | -86° | 169° | -159° |
| ψ | -3° | -160° | 168° |

Il primo residuo si colloca pertanto nella regione "bridge" della mappa conformazionale, mentre gli altri due assumono una conformazione sostanzialmente estesa, con i segni di ϕ e ψ rovesciati tra il secondo e il terzo residuo. A livello del secondo e del terzo residuo sono presenti due legami a idrogeno di tipo C₅, uno tra il gruppo N2-H2 e l'atomo di zolfo dello stesso residuo (S2), e l'altro tra il gruppo N3-H3 e l'ossigeno carbonilico del gruppo estereo C-terminale. Nella prima struttura C₅ le distanze N2...S2 e H2...S2 hanno i valori di 2.935 Å e 2.44 Å, rispettivamente, mentre l'angolo N2-H2...S2 è 118°. Nella seconda struttura C₅ le distanze N3...O3 e H3...O3 hanno i valori di 2.711 Å e 2.38 Å, rispettivamente, mentre l'angolo N3-H3...O3 è 103°.

Complessivamente la struttura è simile a una "L", con il C^α della Gly(1) che funge da angolo tra il gruppo benzilossicarbonile N-terminale e il segmento C-terminale.

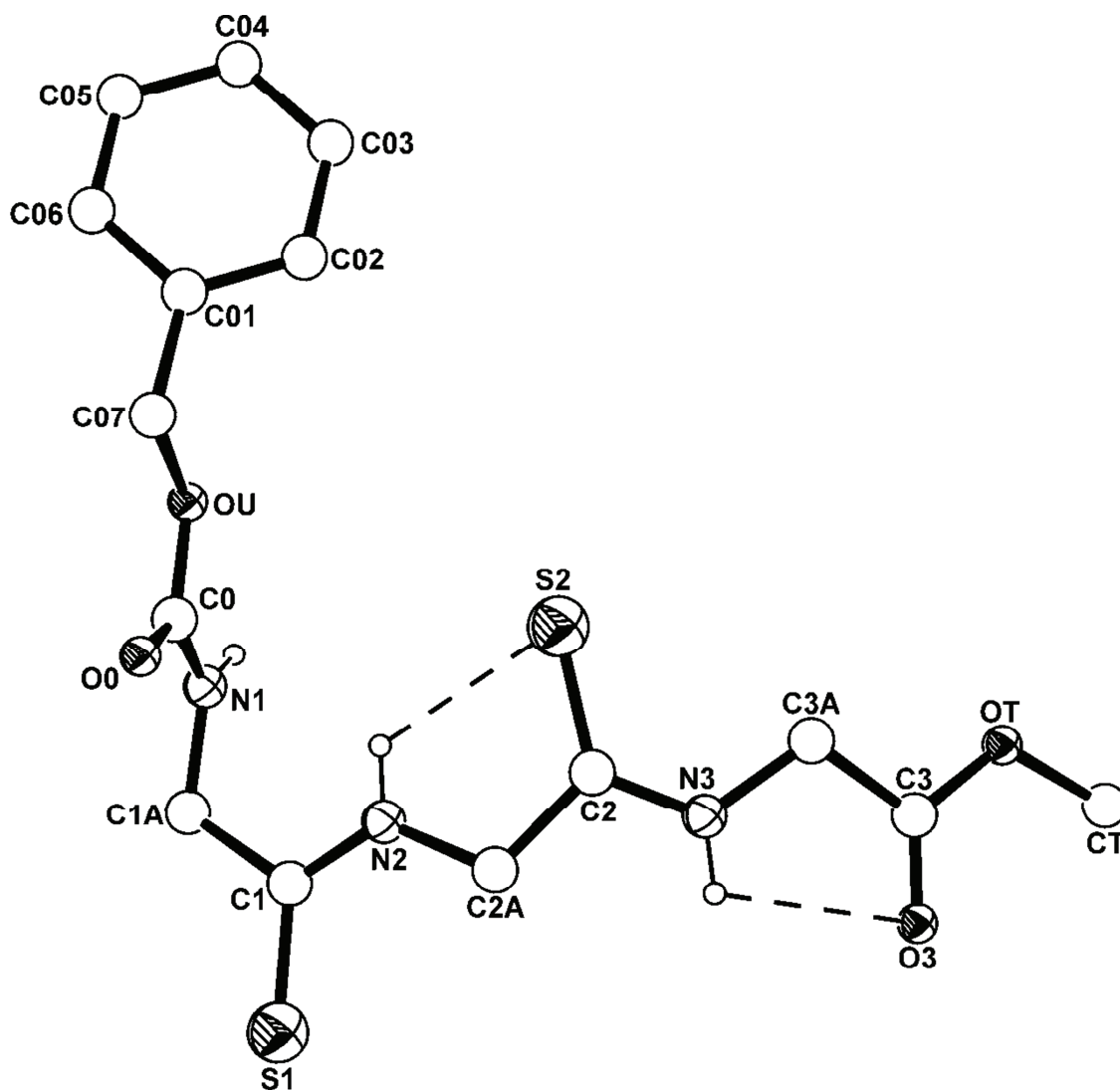


Figura 6.1 Strutturata dei cristalli di Z-Gly- ψ [CSNH]-Gly- ψ [CSNH]-Gly-OMe, ottenuti mediante diffrazione a raggi X.