



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di Laurea Specialistica in Chimica

TESI DI LAUREA IN CHIMICA

PEPTIDI ELICOIDALI RIGIDI CARATTERIZZATI DA SONDE PARAMAGNETICHE PER APPLICAZIONI SPETTROSCOPICHE

Relatore: Ch.mo. Prof. Claudio Toniolo

Controrelatore: Prof. Danilo Pedron

Laureando: Carlo Busato

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

Ai miei genitori, Claudio e Bertilla

INDICE

<i>Riassunto</i>	<i>iii</i>
<i>Abbreviazioni</i>	<i>iv</i>
1. INTRODUZIONE	1
1.1. <i>Gli α-amminoacidi C^α-tetrasostituiti</i>	2
1.2. <i>Stereochimica dei peptidi</i>	3
1.3. <i>Spaziatori e templati</i>	6
1.4. <i>Preferenze conformazionali degli C^α-tetrasostituiti:</i> <i>le strutture elicoidali</i>	8
1.5. <i>Caratterizzazione mediante spettroscopia IR</i>	10
1.6. <i>Tecnica di analisi conformazionale PELDOR</i>	11
1.7. <i>Scopo della tesi</i>	13
2. PARTE SPERIMENTALE	
2.1. <i>Materiali e metodi</i>	15
2.1.1. <i>Reagenti e solventi</i>	15
2.1.2. <i>Strumentazioni e metodi</i>	16
2.2. <i>Sintesi e caratterizzazione</i>	18
2.2.1. <i>Sintesi dell'amminoacido TOAC</i>	18
2.2.2. <i>Sintesi del derivato dell'amminoacido TOAC</i>	19
2.2.3. <i>Sintesi di peptidi contenenti l'amminoacido TOAC</i>	20
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	
3.1. <i>Sintesi</i>	28
3.1.1. <i>Preparazione dell'amminoacido TOAC</i>	28
3.1.2. <i>Strategie di sintesi peptidica in soluzione adottate</i> <i>nel presente lavoro di Tesi</i>	31
3.1.3. <i>Gruppi protettori delle funzioni ammidiche e carbossiliche</i>	31
3.1.4. <i>Metodi di attivazione</i>	33
3.2. <i>Indagini conformazionali</i>	39
3.2.1. <i>Assorbimento IR</i>	39

3.2.2. <i>Spettroscopia EPR</i>	50
4. <i>CONCLUSIONI</i>	53
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	54

RIASSUNTO

In questa Tesi si riportano la sintesi, la caratterizzazione e le analisi conformazionali in soluzione, mediante assorbimento IR e spettroscopia EPR, di due coppie di peptidi, caratterizzate dalla presenza di uno o due residui di TOAC (amminoacido contenente una sonda paramagnetica):

Fmoc-Aib-**TOAC**-Aib-Aib-Aib-**TOAC**-Aib-OMe **A**

Z-Aib---Aib---Aib-Aib-Aib-**TOAC**-Aib-OMe **B**

Fmoc-Aib-**TOAC**--Aib--Aib-Aib-Aib-**TOAC**-Aib-OMe **C**

Z-Aib---Aib----Aib--Aib-Aib-Aib-**TOAC**-Aib-OMe **D**

L'interesse per questi peptidi discende dalla loro tendenza ad assumere conformazioni elicoidali stabili, adatte a calibrare tecniche spettroscopiche innovative. In particolare, i *probe* paramagnetici sono adatti all'utilizzo della tecnica EPR. Alcuni dei peptidi sintetizzati sono stati sottoposti ad una indagine EPR preliminare, qui riportata. Studi più approfonditi, mediante tecniche EPR impulsate ad alta frequenza (95 GHz), saranno condotti dalla Prof. Martina Huber (Leiden, Olanda). Il suo obiettivo è quello di misurare la distanza tra i due *probe* nei peptidi doppiamente marcati.

I peptidi sono stati preparati con tecniche di sintesi in soluzione, utilizzando la sintesi sequenziale e a volte la condensazione di segmenti.

Dalle indagini conformazionali in soluzione (assorbimento IR, spettroscopia EPR) è emerso che i peptidi esaminati assumono conformazioni elicoidali, molto probabilmente di tipo 3_{10} .

ABBREVIAZIONI

Ac	= acetile
(Ac) ₂ O	= anidride acetica
AcOEt	= acetato di etile
Aib	= acido α-amminoisobutirrico
CH ₃ CN	= acetonitrile
CH ₂ Cl ₂	= diclorometano
CHCl ₃	= cloroformio
EDC	= N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide
EP	= etere di petrolio
EPR	= risonanza paramagnetica elettronica
ESR	= risonanza elettronica di spin
EtOH	= etanolo
Et ₂ O	= etere di etilico
Fmoc	= fluorenilmetilossicarbonile
FT-IR	= spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
HOAt	= 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	= 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
IR	= infrarosso
MeOH	= metanolo
NMR	= risonanza magnetica nucleare
OMe	= metossi
OSu	= 1-oxy-succinimmide
OXL	= 5(4 <i>H</i>)-ossazolone
PELDOR	= pulsed electron-electron double resonance
TEA	= trietilammina
TFA	= acido trifluoroacetico
TLC	= cromatografia su strato sottile
TOAC	= acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico
UV-VIS	= ultravioletto-visibile
Z	= benzilossicarbonile o carbobenzossi

1. INTRODUZIONE

La biochimica è quella branca della chimica che studia la struttura e le trasformazioni dei componenti delle cellule, come proteine, carboidrati, lipidi, acidi nucleici e altre biomolecole.

È dagli anni '60 che la biochimica procede con un'incredibile crescita di studi e di scoperte, favorite dallo sviluppo tecnologico che permette indagini strutturali sempre più accurate. Tra i molteplici settori su cui si può applicare uno studio biochimico, noi ci soffermiamo sui peptidi e sulla loro capacità di realizzare strutture molecolari rigide. Questa loro peculiarità ci permette di ottenere, con un'ottima precisione¹, strutture elicoidali rigide (*scaffold*) utili come substrati ideali su cui testare e calibrare nuove tecniche di analisi conformazionale.

Non tutti i tipi di amminoacidi permettono di ottenere strutture rigide e note. Fanno al caso nostro gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti. Si distinguono dagli amminoacidi naturali (α -amminoacidi proteici) per il fatto che al carbonio in posizione α troviamo quattro sostituenti diversi anziché tre.

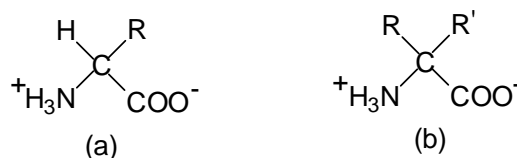


Fig. 1.1 Formule di struttura di un α -amminoacido C^α -trisostituito (a), di uno C^α -tetrasostituito (b).

Un sostituyente diverso dall'idrogeno sul carbonio in α comporta un maggior ingombro sterico nella molecola, limitandone i movimenti (aumento di rigidità). A stabilizzare la struttura secondaria concorrono poi legami idrogeno intramolecolari, che aumentano di numero con l'allungamento della catena. In questo modo la catena diventa una sorta di "spaziatore molecolare" dalla lunghezza variabile in base al numero di amminoacidi che vogliamo inserire.

Questo lavoro di Tesi è nato dalla collaborazione tra il nostro Laboratorio, che ha un'esperienza trentennale nella chimica e negli studi conformazionali di peptidi ricchi in amminoacidi C^α -tetrasostituiti, e il gruppo di ricerca della Prof.ssa Martina Huber (Huygens Laboratory – Leiden University – Leiden, Olanda). La prof.ssa Huber dispone di una strumentazione EPR ad alto campo (94 GHz) che intende

utilizzare per l'analisi strutturale dei nostri peptidi rigidi con innovative tecniche spettroscopiche. In particolare, saranno sfruttate misure PELDOR (Pulsed Electron-electron Double Resonance) per lo studio conformazionale dei peptidi, opportunamente funzionalizzati con sonde paramagnetiche². Pertanto, l'obiettivo primario di questo lavoro di Tesi è la realizzazione, tramite sintesi omogenea, di catene peptidiche elicoidali di tipo 3_{10} dotate di sonde paramagnetiche, la cui geometria tridimensionale sia ben definita e modulabile. Allo scopo, sono stati programmati peptidi elicoidali 3_{10} , basati sull'amminoacido C ^{α} -tetrasostituito Aib (Fig.1.2), un forte promotore di queste strutture elicoidali. Come probe paramagnetico è stato utilizzato l'amminoacido C ^{α} -tetrasostituito TOAC (Fig.1.2).

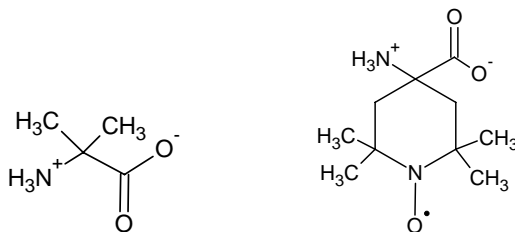


Fig. 1.2. Formula di struttura degli α -amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti Aib (acido α -amminoisobutirrico) e TOAC (acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico).

Nelle pagine seguenti, prima di descrivere dettagliatamente il lavoro di Tesi, saranno fornite informazioni sugli α -amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti e sull'utilità e l'utilizzo dei probe molecolari. Sarà anche illustrata brevemente la tecnica spettroscopica PELDOR.

1.1 Gli α -amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti

Cerchiamo un po' di spiegare il perché di questo grande interesse per tali amminoacidi. Esistono diverse ragioni:

- Alcuni membri di questa famiglia sono presenti in natura nelle sequenze di un importante gruppo di antibiotici peptidici denominati peptaibolici³;
- L'ingombro sterico delle due catene laterali legate al C ^{α} riduce notevolmente lo spazio conformazionale accessibile a questi amminoacidi rispetto a quello consentito agli α -amminoacidi proteici. Per questa ragione i derivati degli α -

amminoacidi C^α-tetrasostituiti e i peptidi che li contengono forniscono con relativa facilità cristalli singoli, adatti alla caratterizzazione delle strutture molecolari mediante indagine *roentgenografica*¹;

- I peptidi contenenti gli α-amminoacidi C^α-tetrasostituiti sono aggrediti con difficoltà dagli enzimi proteolitici. Questa caratteristica consente di utilizzare tali amminoacidi nella progettazione di analoghi di peptidi biologicamente attivi resistenti alla degradazione enzimatica. Inoltre, la limitata flessibilità conformazionale rende più agevole la determinazione della conformazione “attiva”⁴;
- È possibile sfruttare la notevole stabilità e rigidità delle strutture peptidiche ricche in α-amminoacidi C^α-tetrasostituiti per costruire *spaziatori*^{5,6} e *templati*^{7,8} molecolari.

1.2 Stereochimica dei peptidi

Il modo di disporsi di una catena peptidica nello spazio (struttura secondaria) è influenzato soprattutto dalla natura degli α-amminoacidi presenti e dai legami a idrogeno che si instaurano fra i gruppi carbonilici e i protoni ammidici dello scheletro peptidico. Per indicare gli angoli torsionali che definiscono la conformazione di una catena polipeptidica (Fig. 1.3) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica⁹.

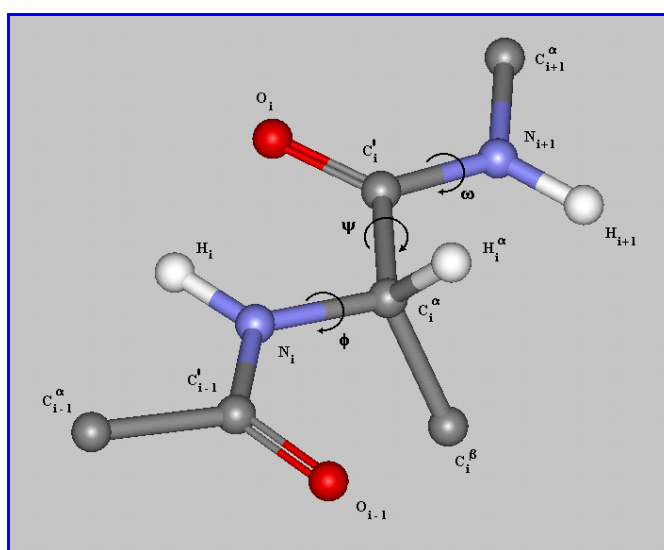


Fig. 1.3. Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ($\phi_i = \psi_i = \omega_i = 180^\circ$) e il residuo centrale è in configurazione L.

Le strutture secondarie più note sono l'elica α , le strutture β , i ripiegamenti β e l'elica 3_{10} . Nei paragrafi che seguono saranno illustrate solamente le due eliche peptidiche più comuni, perché sono quelle adottate da Aib e TOAC, gli aminoacidi utilizzati in questo lavoro Tesi.

Fra le strutture secondarie organizzate le strutture elicoidali sono le più diffuse nei peptidi naturali. Esse differiscono per il numero di residui di α -amminoacido per giro d'elica, per il passo dell'elica, per la grandezza dei cicli formati dai legami a idrogeno intramolecolari $C=O \cdots H-N$ e per gli angoli torsionali (ϕ e ψ). Le eliche più note sono l'elica α e l'elica 3_{10} .¹⁰ L' α -elica (Fig. 1.4a) è caratterizzata da 3.63 residui per giro ed è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo $C=O$ di un residuo in posizione i e il gruppo $N-H$ in posizione $i+4$ ($i \leftarrow i+4$) (Fig. 1.5), che formano così cicli di 13 atomi (ripiegamenti α o strutture C_{13}). L'elica 3_{10} (Fig. 1.4b) ha 3.24 residui amminoacidici per giro. È stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo $C=O$ in posizione i e il gruppo $N-H$ in posizione $i+3$ ($i \leftarrow i+3$) (Fig. 1.5), che formano così cicli di 10 atomi (ripiegamenti β ^{11,12} o strutture C_{10}). L'elica 3_{10} risulta più stretta (Fig 1.4c) e allungata rispetto all' α -elica. I parametri che caratterizzano le due strutture sono riportati in Tabella 1.1.¹⁰

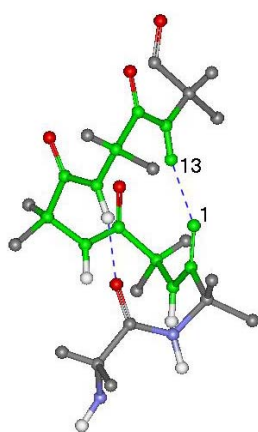


Fig. 1.4a. Elica α destrogira.

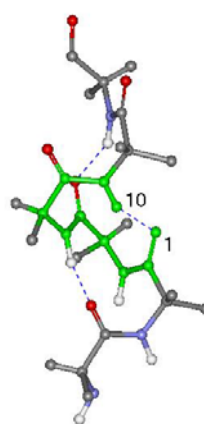


Fig. 1.4b. Elica 3_{10} destrogira.

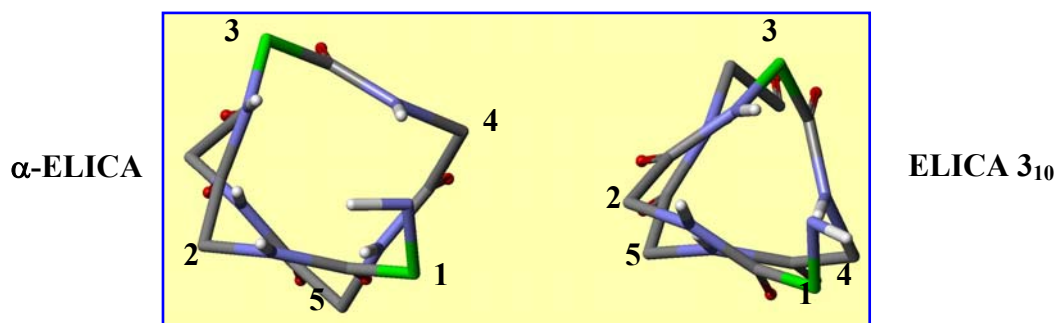


Fig. 1.4c. Proiezioni lungo l'asse dell' α -elica (a sinistra) e dell'elica 3_{10} (a destra).

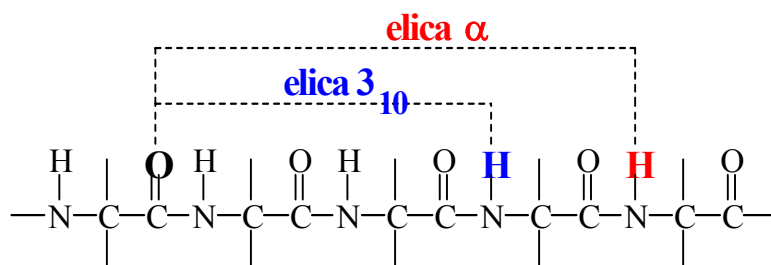


Fig. 1.5. Legami a idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche (α e 3_{10}).

Tabella 1.1 Parametri delle eliche destrorse di tipo 3_{10} e α .

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

1.3 Spaziatori e templati

Gli *spaziatori* molecolari sono strutture “lineari”, che possono essere costituite anche da peptidi, alle cui estremità vengono collocate opportune sonde molecolari (A e B in Fig. 1.6). Questo permette di porre nello spazio a distanze e posizioni note tali sonde. La cosa interessante è che si può decidere a priori quanta distanza interporre tra queste sonde, ma non solo; essendo la struttura peptidica una struttura tridimensionale, non dovremmo solo preoccuparci della distanza nell’ambito bidimensionale, ma si dovrà valutare la struttura in tutte le sue dimensioni.

Ad esempio, se si osserva un’elica peptidica 3_{10} perpendicolarmente all’asse di rotazione, si può notare come le sonde possano trovarsi in tre diversi punti, essendo tale elica ternaria. Quindi si dovrà fare molta attenzione per capire dove inserire i probe molecolari.

I *templati* invece sfruttano le catene laterali degli amminoacidi. Si possono quindi generare peptidi rigidi con più raggruppamenti chimici ed orientazioni diverse (C,D,E ed F in fig. 1.6). I peptidi sintetizzati in questo progetto di Tesi si collocano bene tra i templati, come si può vedere nelle Fig. 1.7a e 1.7b.

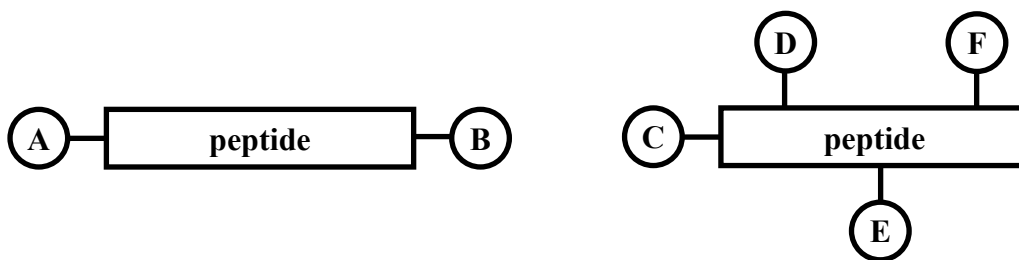


Fig. 1.6. Rappresentazione schematica di uno spaziatore (a sinistra) e un template (a destra).

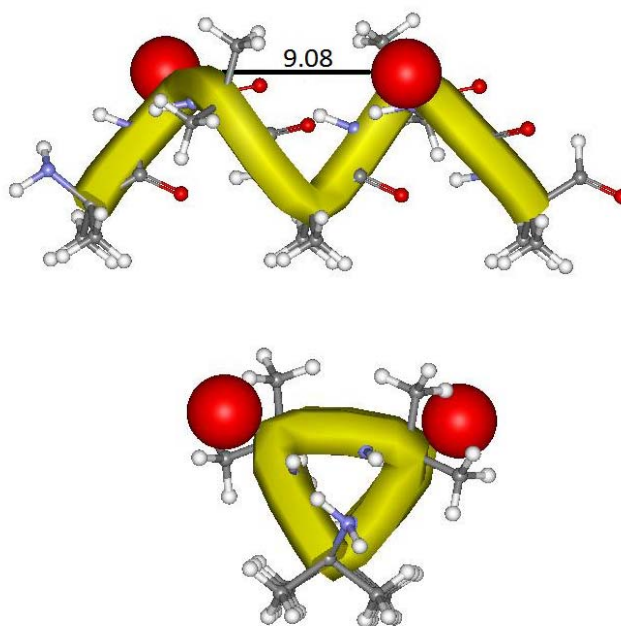


Fig. 1.7a. Rappresentazione in conformazione elicoidale 3_{10} (vista laterale e lungo l'asse) dell'eptapeptide contenente due residui di TOAC (palline rosse), sintetizzato in questo lavoro di Tesi.

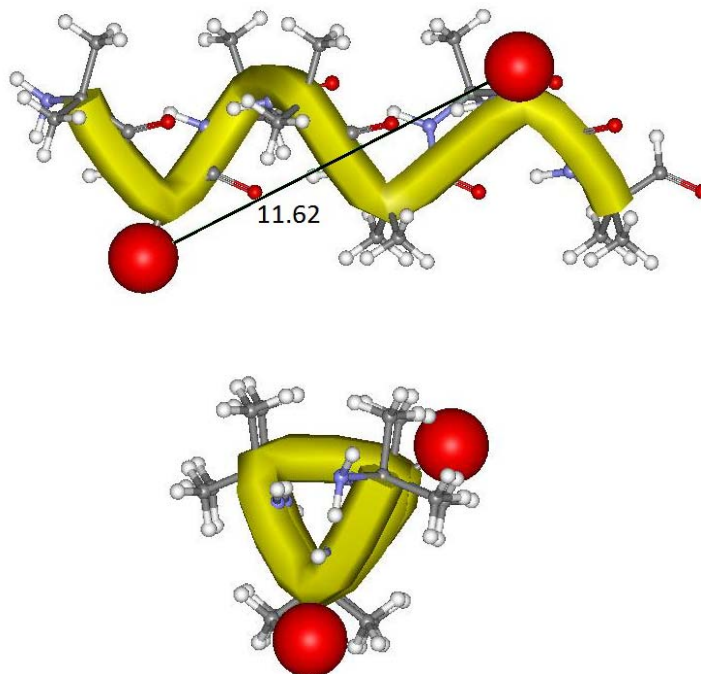


Fig. 1.7b. Rappresentazione in conformazione elicoidale 3_{10} (vista laterale e lungo l'asse) dell'ottapeptide contenente due residui di TOAC (palline rosse), sintetizzato in questo lavoro di Tesi.

1.4 Preferenze conformazionali degli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti: le strutture elicoidali

Calcoli di energia conformazionale¹³⁻¹⁵ sull'Aib (Fig. 1.8), il più semplice α -amminoacido C^α -tetrasostituito, hanno evidenziato che la presenza di due gruppi metilici sul C^α impone una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile, che risulta essenzialmente confinato alla regione delle conformazioni elicoidali di tipo α (Fig. 1.4a) e di tipo 3_{10} (Fig. 1.4b). Poiché il residuo di Aib è achirale, eliche destrogire e sinistrogire dei suoi omopeptidi sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. Le indagini conformazionali in soluzione (mediante assorbimento IR e spettrometria ^1H NMR) e allo stato cristallino (diffrazione dei raggi X) indicano che la conformazione elicoidale di tipo 3_{10} è quella preferita dagli omopeptidi dell'Aib¹⁶⁻¹⁹.

Nel caso di peptidi contenenti residui di Aib e residui di amminoacidi proteici (C^α -trisostituiti) allo stato cristallino si riscontrano in larghissima prevalenza strutture elicoidali. Tali eliche possono essere di tipo 3_{10} , di tipo α , o "miste" (un segmento α -elicoidale preceduto e/o seguito da alcune strutture C_{10}). Dall'esame delle oltre 40 strutture ai raggi X riportate in letteratura fino al 1990 di peptidi di lunghezza compresa tra 4 e 16 residui contenenti Aib e amminoacidi proteici, emerge che tra i fattori che concorrono ad orientare la preferenza conformazionale verso l'una o l'altra struttura elicoidale vi sono la lunghezza di catena, il contenuto in Aib e la sequenza.²⁰

In particolare l' α -elica tende ad essere favorita al crescere della lunghezza di catena e al decrescere del contenuto in Aib (Fig. 1.8), anche se le eccezioni sono numerose e il ruolo giocato dalla sequenza è di problematica valutazione. D'altro canto i peptidi molto corti (fino a sei residui) manifestano una nettissima preferenza per l'elica 3_{10} .

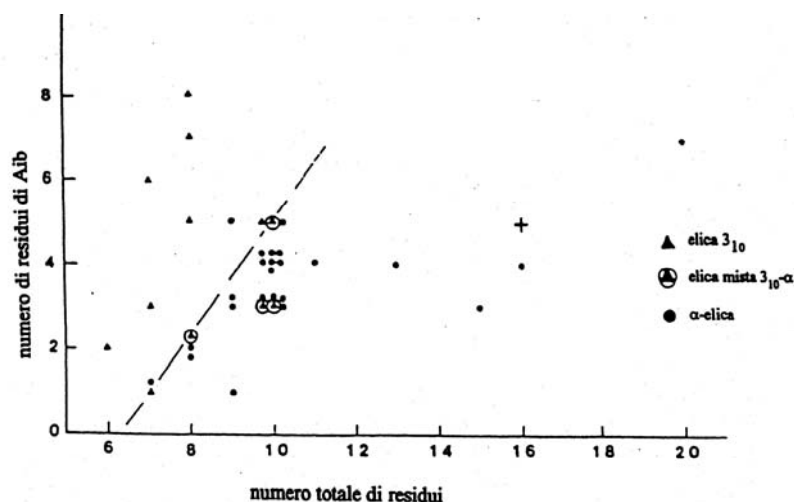


Fig. 1.8. Tipo di elica in funzione del numero totale di residui in un peptide e del numero totale di residui di Aib. La linea tratteggiata che separa le eliche 3_{10} dalle eliche α è stata tracciata arbitrariamente.²⁰

Complessivamente, la notevole mole di dati strutturali su peptidi contenenti Aib ha evidenziato l'elevata capacità di tale residuo amminoacidico non proteico di promuovere e stabilizzare ripiegamenti β e conformazioni elicoidali α e 3_{10} .

Molti altri α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti (Figura 1.9) manifestano tendenze del tutto analoghe a quelle riscontrate per l'Aib. I risultati di numerose analisi conformazionali, sia teoriche che sperimentali, condotte su loro omopeptidi e peptidi modello, indicano che anch'essi sono forti promotori di ripiegamenti β e strutture 3_{10} -elicoidali.^{1c}

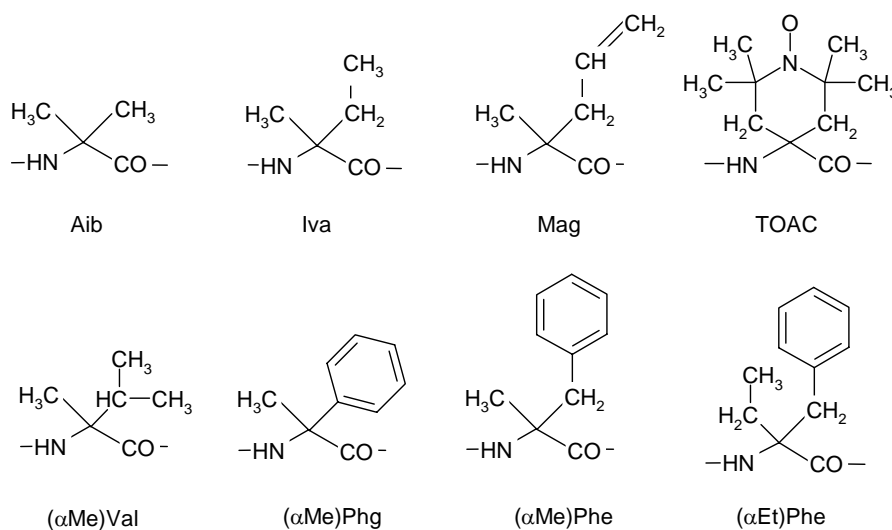


Fig. 1.9. α -Amminoacidi C^α -tetrasostituiti promotori di strutture elicoidali.

L'amminoacido C^α-tetrasostituito TOAC (Fig. 1.2) è caratterizzato da una struttura eterociclica satura (anello piperidinico), contenente un radicale libero (il gruppo nitrossile) stabilizzato dalla presenza di due atomi di carbonio tetrasostituiti ad esso vicinali. Tale amminoacido ha mostrato tendenze strutturali del tutto analoghe a quelle dell'Aib. Dettagliate analisi conformazionali di peptidi contenenti TOAC hanno infatti rivelato che tale residuo è un forte induttore di ripiegamenti-β e di strutture elicoidali di tipo α e 3₁₀, sia allo stato cristallino che in soluzione.²¹⁻²⁶

Il gruppo nitrossile si è rivelato estremamente utile e versatile. È stato possibile studiare peptidi contenenti TOAC mediante tecniche ESR,^{21,23,25,27-31} voltammetria ciclica,²¹ CD³² e analisi del "quenching" di fluorescenza.^{33,34}

L'uso di sonde paramagnetiche legate covalentemente a peptidi e proteine consente di ottenere informazioni, tramite ESR, sull'intorno da loro sperimentato e sulla loro mobilità. Tali informazioni permettono di studiare la dinamica locale, l'esposizione o meno al solvente o all'ossigeno molecolare, le collisioni molecolari e l'ordine locale.^{35,36} Inoltre, l'interazione tra due sonde paramagnetiche legate covalentemente alla stessa molecola può fornire importanti informazioni sulla conformazione del peptide. Tale tecnica è stata sfruttata anche nello studio della conformazione assunta, in solventi organici e in presenza di liposomi, dalla tricogina GA IV, un peptide attivo sulle membrane biologiche e ricco di α-amminoacidi C^α-tetrasostituiti.^{27,28} Considerando l'effetto della polarità dell'ambiente sulla costante iperfine è stato anche possibile concludere che la tricogina si dispone con l'asse elicoidale parallelo alla superficie della membrana lipidica.³⁷

1.5 Caratterizzazione mediante spettroscopia IR

La spettroscopia IR è molto utilizzata nello studio della conformazione di molecole biologiche. Con questa tecnica è possibile ottenere informazioni riguardanti la conformazione molecolare imposta dalla presenza di forze intra e intermolecolari nei e tra i peptidi. Chiaramente il numero di questi legami idrogeno aumenterà con l'aumento del numero di residui lungo la catena peptidica.

Le bande IR più diagnostiche per la struttura secondaria di un sistema peptidico sono *l'ammide A* (3500-3200 cm⁻¹, stiramento N-H ammidico) e *l'ammide I* (1600-1800

cm⁻¹, stiramento C=O dei legami peptidici). Saranno queste ad essere prese in esame nella discussione di questa Tesi.

1.6 Tecnica di analisi conformazionale PELDOR

Tecniche strumentali come FRET (fluorescence resonance energy transfer), NMR (nuclear magnetic resonance) ed EPR (electron paramagnetic resonance) sono utili per ottenere informazioni strutturali in soluzione liquida o congelata, riproducendo le condizioni biologiche.

La spettroscopia EPR permette di determinare le distanze a lungo raggio (ad esempio nei biopolimeri) sfruttando l'accoppiamento dipolare di elettroni spaiati presenti nella molecola. Un esempio pratico dell'utilizzo di questa tecnica può essere l'ottenimento della struttura *foldata* dell'RNA, riuscito grazie all'inserimento nella struttura primaria di appositi centri di spin e misurandone la loro distanza³⁸.

Negli ultimi anni sono sempre più utilizzati metodi EPR pulsati (PELDOR), che garantiscono con un'altissima precisione la misura di distanze significativamente grandi, cosa impossibile con le tecniche EPR in onda continua (CW-EPR). Il PELDOR infatti può misurare distanze tra radicali a partire da circa 15 Å fino a 60 Å (qualcuno dice anche di più). Questa tecnica impulsata non è nuova, ma si applicherà per la prima volta a peptidi rigidi, in conformazione elicoidale di tipo 3₁₀, utilizzando uno spettrometro ad alto campo (94 MHz).

Il PELDOR prevede una particolare sequenza di impulsi (Fig. 1.10) che lo rendono più sensibile rispetto al CW-EPR. In particolare vengono applicati due impulsi nella regione delle microonde alla frequenza ω_A , separati da un intervallo di tempo τ . Al tempo T , viene applicato un terzo impulso (pumping pulse) alla frequenza ω_B . All'interno del campione sono presenti due tipi di spin: spin A risuonano alla frequenza ω_A e spin B che sono eccitati dalla frequenza ω_B . Il terzo impulso induce una transizione tra i livelli di Zeeman degli spin di tipo B, che fa variare il campo magnetico locale risentito dagli spin A. Ciò rende il segnale ESE (electron spin-echo) alla frequenza ω_A meno intenso ed è quindi possibile studiare la variazione dell'ampiezza del segnale PELDOR al variare di T . Generalmente il segnale decade secondo $T \approx 1/\omega_D$, dove ω_D è il valore caratteristico del coupling dipolare di spin. La tecnica PELDOR presenta inoltre il vantaggio che il segnale ESE osservato non

viene influenzato da effetti di dinamica o altri meccanismi di rilassamento non indotti da interazioni tra spin elettronici.

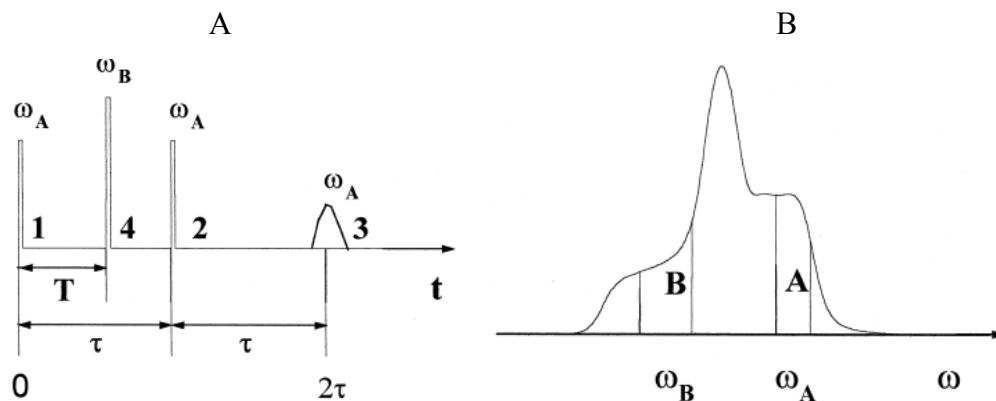


Fig. 1.10. Sequenza di impulsi (A): 1 e 2 “ESE-producing pulse”, 3 segnale ESE, 4 “pumping pulse”. Spettro ESR (B); le aree A e B rappresentano le zone dello spettro eccitate dai differenti impulsi³⁹.

Il segnale PELDOR può essere rappresentato come il prodotto, $V(T) = V(T)_{\text{intra}} V(T)_{\text{inter}}$; dove $V(T)_{\text{intra}}$ è dovuta all'interazione tra spin presenti nello stessa sequenza peptidica, mentre $V(T)_{\text{inter}}$ deriva dall'interazione tra spin di molecole diverse. La determinazione delle due componenti avviene studiando la variazione del segnale PELDOR al variare della concentrazione.³⁹ In particolare, nel caso di peptidi che tendano ad aggregare, la componente *intermolecolare* si indebolisce all'aumentare della percentuale di peptide non marcato (cioè senza sonda paramagnetica) rispetto a quella di peptide marcato presente nel campione, mentre la componente *intramolecolare* rimane invariata.

L'applicabilità della tecnica è legata quindi alla presenza di una sonda paramagnetica all'interno della sequenza peptidica. La scelta di utilizzare come sonda l'amminoacido non naturale TOAC è motivata dal fatto che quest'ultimo, a differenza di altre sonde, presenta una notevole rigidità strutturale. Ciò permette di ottenere delle misure affidabili da cui ricavare l'esatta distanza tra sonde e la loro orientazione. In futuro sarà inoltre possibile estendere l'utilizzo della tecnica PELDOR ad alto campo anche a substrati di importanza biologica ed ottenere informazioni sia di tipo strutturale che di dinamica.

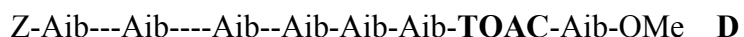
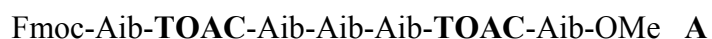
1.7 Scopo della tesi

Prima di questo lavoro di Tesi, nel nostro Laboratorio erano stati sintetizzati i seguenti peptidi:



Adottando essi la struttura elicoidale 3_{10} , i due residui di TOAC vengono a trovarsi in entrambi i peptidi sulla stessa faccia dell'elica,⁴⁰ ma distanziati di uno e due giri d'elica, rispettivamente. Infatti, un giro d'elica viene completato con circa 3 residui. La rigidità dei due peptidi li rende adatti a fungere da "righelli molecolari" per tarare le informazioni spettroscopiche ottenibili, ad esempio, da misure EPR. In questo lavoro di Tesi si è mirato a completare il set di peptidi rigidi da mettere a disposizione della prof. Martina Huber, sintetizzando sequenze aventi i due residui di TOAC in posizioni intermedie tra uno e due giri d'elica, e quindi non necessariamente localizzati sulla stessa faccia dell'elica (Fig. 1.11).

Sono stati sintetizzati quattro peptidi elicoidali 3_{10} , basati sugli amminoacidi C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti Aib e TOAC. Sono due coppie di peptidi, ognuna con singola e doppia marcatura:



I peptidi singolarmente marcati servono come composto di riferimento. Le distanze che separano le due sonde paramagnetiche si collocano in una posizione dove il CW-EPR comincia ad essere poco sensibile e il PELDOR inizia invece ad essere utilizzabile. Proprio per questo il set di peptidi **A-D**, assieme ai due precedentemente sintetizzati, costituiranno un valido strumento per verificare le potenzialità del PELDOR e, allo stesso tempo, per calibrare i dati spettroscopici.

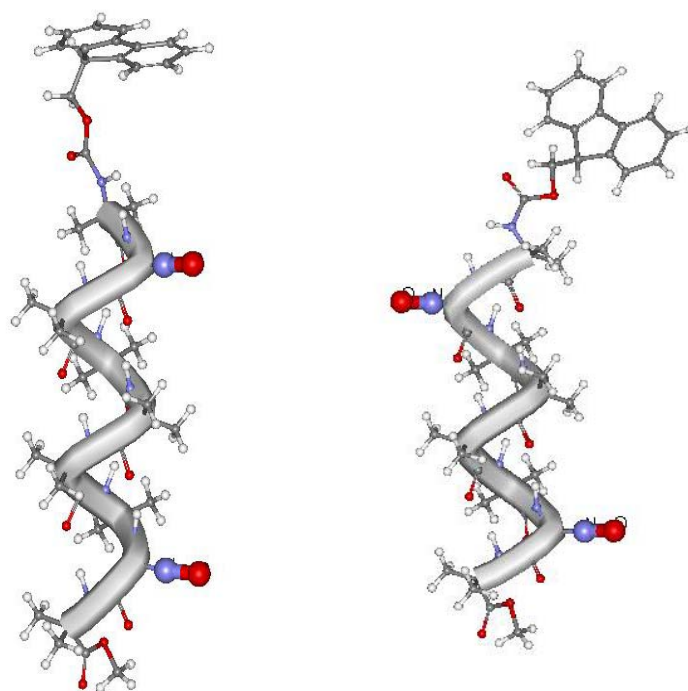


Fig.1.11. *A sinistra: nonapeptide con due TOAC separati da due giri d'elica 3_{10} (sintetizzato precedentemente in questo laboratorio). A destra: ottapeptide C, sintetizzato in questo lavoro di Tesi. Da notare la diversa disposizione dei nitrossidi del TOAC (palline rosse per l'ossigeno e violetto per l'azoto).*

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 *Materiali e metodi*

2.1.1 Reagenti e solventi

Acros Organics (Geel, Belgio):

acido trifluoroacetico, cloroformio deuterato, 1-idrossi-1H-benzotriazolo, iodio.

Carlo Erba (Milano):

acetato di etile, acetone, cloroformio, diclorometano, dietiletere, etere di petrolio (30-50°C), ipoclorito di sodio, solfato di sodio anidro.

Fluka (Buchs, Svizzera):

acetonitrile, idrossido di bario ottaidrato, cianuro di sodio, etanolo, trietilammina.

GL Biochem (Shanghai):

1-idrossi-7-aza-1H-benzotriazolo.

Iris Biotech (Marktredwitz, Germania):

N-(benzilossicarbonilossi)-succinimmide, *N*-etil-*N'*-(3-dimetilammino propil)-carbodiimmide.

Lab Scan (Dublino, Irlanda):

diossano.

Merck (Darmstadt, Germania):

silice per cromatografia “flash”.

Prolabo (Parigi, Francia)

metanolo.

Sigma-Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA):

acido trifluoroacetico, bicarbonato di sodio, 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidone, tungstato di sodio diidrato.

2.1.2 Strumentazione e metodi

Cromatografia su strato sottile (TLC)

Le lastre utilizzate sono al gel di silice di tipo 60 F₂₅₄ (Merck) e gli indici di ritenzione corrispondono a tre diverse miscele di eluenti:

Rf₁ = CHCl₃/EtOH, 9:1

Rf₂ = butanolo/AcOH/H₂O 3:1:1

Rf₃ = toluene/EtOH 7:1

La rilevazione dei composti è stata fatta con una lampada UV (per evidenziare gruppi aromatici) vapori di iodio o iodio su silice, ipoclorito – reattivo al TDM⁴¹ (per evidenziare i gruppi ammidici) o il reattivo alla ninidrina per evidenziare i gruppi amminici primari.

Cromatografia flash

La cromatografia flash è stata effettuata usando come fase stazionaria il gel di silice 60 Merck (granulometria 40-63 µm). Nelle varie purificazioni è stato utilizzato uno dei tre seguenti sistemi di caricamento:

- 1) caricamento diretto del prodotto da purificare, disciolto nell'eluente prescelto per la separazione, in testa alla colonna;
- 2) caricamento diretto del prodotto disciolto in una piccola quantità di un solvente diverso dalla miscela di eluizione;
- 3) caricamento dopo aver adsorbito il prodotto da purificare su gel di silice.

Determinazione dei punti di fusione

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

Spettrometria di massa

Gli spettri sono stati registrati con uno spettrometro di massa a tempo di volo, *time of flight* (Mariner modello ESI-TOF, Perspective Biosystem), usando come tecnica di ionizzazione l'ESI.

Spettroscopia di assorbimento IR

Gli spettri di assorbimento FT-IR, in pastiglie di KBr e in soluzione di CDCl_3 sono stati raccolti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer 1720 X interfacciato a un personal computer. Per le elaborazioni spettrali delle misure in soluzione (sottrazione del solvente e derivatizzazione) è stato utilizzato il software SpectraCalc della Galactic. Gli spettri di assorbimento FT-IR in soluzione di CDCl_3 sono stati effettuati utilizzando celle (Perkin-Elmer) con cammini ottici di 0.01, 0.1 e 1 cm e finestre di CaF_2 .

Spettrometria $^1\text{H-NMR}$

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati con gli spettrometri Bruker AC200, AC250 e AM400. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione rispetto al segnale del TMS (tetrametilsilano). Le molteplicità dei picchi sono indicate con: s (singoletto), d (doppio), t (tripletto), m (multipletto), b (broad, segnale allargato).

Spettroscopia EPR

Gli spettri EPR sono stati registrati grazie allo strumento Bruker (Karlsruhe, Germania) ER 200D X-band (9.4GHz). Il campionamento è stato effettuato sotto flusso di azoto, controllato dal criostato Bruker BVT 2000. Lo spettro EPR è stato acquisito con una modulazione dell'ampiezza di campo di 0.05mT e potenza delle microonde di 1mW.

2.2 Sintesi e caratterizzazione

Oltre ai prodotti descritti sono stati utilizzati i derivati Fmoc-Aib-OH, HCl·H-Aib-OMe, Z-(Aib)₅-OH e Z-(Aib)₃-OXL già precedentemente sintetizzati nel nostro laboratorio.

2.2.1 Sintesi dell'amminoacido TOAC

4-Oxo-TEMPO^{42,43}

Si sospende 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidone cloridrato (40 g, 258 mmoli) in 250 ml di H₂O, si raffredda a -4 °C e si aggiunge Na₂WO₄·2 H₂O (3.74 g, 11.3 mmoli). Si gocciola lentamente e sotto agitazione H₂O₂ al 30% (100 ml, 774 mmoli). Si porta la soluzione a temperatura ambiente e quindi si lascia sotto agitazione al buio per 24 ore. Si satura la soluzione con Na₂CO₃ solido e si estrae più volte la fase acquosa con Et₂O. Si lava la fase organica con poca acqua, si anidifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

Resa: 90 %; **p.f.:** 36-37 °C (da Et₂O-etero di petrolio).

Rf₁: 0.90; **Rf₂:** 0.95.

IR (KBr): 1716 cm⁻¹.

TOAC-idantoina^{44,45}

Si sciolgono 4-oxo-TEMPO (39.5 g, 232 mmoli) e (NH₄)₂CO₃ (44.6 g, 464 mmoli) in 200 ml di una miscela H₂O/EtOH 2:3. In questa soluzione si gocciolano 60 ml di una soluzione acquosa di NaCN (11.4 g, 232 mmoli) e si lascia reagire sotto agitazione a 50°C per 24 ore. Si concentra e si filtra a freddo il prodotto, lavando il precipitato con poca acqua fredda ed Et₂O.

Resa: 80 %; **p.f.:** 241-242 °C (da CH₂Cl₂-etero di petrolio).

Rf₁: 0.75; **Rf₂:** 0.95.

IR (KBr): 1733, 1723 cm⁻¹.

H-TOAC-OH

Si sospendono TOAC-idantonia (15.05g, 0.062moli), in un pallone da 500ml, con $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (58.91g, 0.186moli) e 375ml di H_2O . Si lascia a riflusso per 48 ore, sotto agitazione. Si raffredda la soluzione in un bagno di acqua e ghiaccio per poi filtrare su gooch una prima frazione di Ba(OH)_2 e lavando con acetone. Successivamente vengono aggiunti 200ml di acetone, si raffredda in frigorifero e si filtra nuovamente Ba(OH)_2 (solido bianco).

Il filtrato viene concentrato con evaporatore rotante e acidificato con 10ml di acido acetico al 50%, fino a raggiungere un pH pari a 6.

Si lascia precipitare lentamente il solido giallo formatosi, che poi viene filtrato e lavato con poca acqua fredda e un po' di Et_2O . Le acque madri vengono concentrate e lasciate in frigo per permettere una seconda precipitazione.

Resa: 60%; **p.f.:** 228-230°C

Rf₁: 0.60

IR (KBr): 3430, 1614 cm^{-1}

2.2.2 Sintesi del derivato dell'amminoacido TOAC

Fmoc-TOAC-OH

Si sospendono H-TOAC-OH (3.05g, 0.0142moli) in 30ml di H_2O e si aggiungono 1.1 equivalenti di trietilammina (TEA) (2.1ml, 0.015moli). A parte si prepara Fmoc-OSu (5.23g, 0.0155moli) sciolto nella giusta quantità di acetonitrile (15ml ogni 1.7g di Fmoc-OSu).

L'aggiunta di Fmoc-OSu viene suddivisa nel tempo di 2 giorni in 3 porzioni da 1.7g circa ciascuna. Questo è importante per permettere di reagire con la maggior quantità di H-TOAC-OH possibile. Si lascia reagire il tutto per 24 ore.

Si evapora attentamente tutto l'acetonitrile presente in soluzione, sempre restando attenti a non scaldare sopra i 35°C, altrimenti si rischia di denaturare l'amminoacido. Successivamente vengono effettuati 3 lavaggi con 25ml di Et_2O per portare via lo Fmoc-OSu in eccesso. Si corregge il pH usando NaHCO_3 e portandolo a 8 se necessario.

Si acidifica la fase acquosa con KHSO_4 solido, portandola a pH 2 e si estrae l'amminoacido protetto con AcOEt (3 estrazioni da 80ml). Si eseguono 3 lavaggi acidi con una soluzione di KHSO_4 5% (25ml ciascuna) e poi 6 lavaggi con 25ml di

H₂O deionizzata. Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 68.8%; **p.f.** 165-166°C (da AcOEt-etere di petrolio).

Rf₁: 0.35; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.95.

IR (KBr): 3346, 1722cm⁻¹.

2.2.3 Sintesi di peptidi contenenti l'amminoacido TOAC

Fmoc-TOAC-Aib-OMe

Per prima cosa si prepara l'estere attivo partendo da Fmoc-TOAC-OH (2.03g, 0.0046moli) sciolti in 20ml di CH₂Cl₂ anidro e si aggiungono HOAt (0.63g, 0.0046moli) ed EDC (0.95g, 0.0049moli). A parte si prepara HCl·H-Aib-OMe (0.76g, 0.0050moli) in 15ml di CH₂Cl₂ anidro con TEA (765µl, 0.0055moli). Si versano l'uno sull'altro e si lascia reagire per 1 notte sotto agitazione.

Si controlla il pH in modo che sia circa 8, correggendolo con TEA.

Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt.

Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo.

Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 70.5%; **p.f.** 159-161°C.

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

IR (KBr): 3379, 3304, 1722, 1658, 1526cm⁻¹.

Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-TOAC-Aib-OMe (1.62g, 0.0030moli) sciolto in 10ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 4ml di DEA e dopo un'ora e mezza altri 2ml. Questo procedimento serve ad ottenere H-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su un letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1. A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-Aib-OH (1.07g, 0.0033moli) con HOAt (0.45g, 0.0033moli) ed EDC (0.77g, 0.004moli) in 15ml di CH₂Cl₂ anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la

reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo.

Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 32.5%; **p.f.** 94-96°C.

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

IR (KBr): 3347, 2985, 2945, 1704cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe (0.40g, 0.64mmoli) sciolto in 6ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 4ml di dietilammina e lascio reagire per 90 minuti. Questo procedimento serve ad ottenere H-Aib-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1. A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-Aib-OH (0.18g, 0.55mmoli) con HOAt (0.08g, 0.55mmoli) ed EDC (0.12g, 0.60mmoli) in 10ml di CH₂Cl₂ anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo. Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 51.6%; **p.f.** 108-110°C.

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

IR (KBr): 3342, 2984, 2943, 1700, 1674cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe (0.57 0.81mmoli) sciolto in 8ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 2ml di dietilammina e lascio reagire per 2 ore. Questo procedimento serve ad ottenere H-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1.

A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-Aib-OH (0.27g, 0.82mmoli) con HOAt (0.12g, 0.82mmoli) ed EDC (0.17g, 0.90mmoli) in 10ml di CH₂Cl₂ anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo.

Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 53.7%; **p.f.** 205-207°C.

Rf₁: 0.80; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.30.

IR (KBr): 3331, 2986, 2941, 1794, 1667cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe (0.19g, 0.24mmoli) sciolto in 8ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 2ml di dietilammina e lascio reagire per 2 ore. Questo procedimento serve ad ottenere H-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1. A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-Aib-OH (0.08g, 0.25mmoli) con HOAt (0.035g, 0.25mmoli) ed EDC (0.056g, 0.27mmoli) in 10ml di CH₂Cl₂ anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo. Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 49.1%; **p.f.** 133-135°C.

Rf₁: 0.80; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.30.

IR (KBr): 3316, 2985, 2943, 1660cm⁻¹.

Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe (0.12g, 0.15mmoli) sciolto in 8ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 2ml di dietilammina e lascio reagire per 2 ore. Questo procedimento serve ad ottenere H-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e

dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl_3 e successivamente con la miscela $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 9:1.

A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-TOAC-OH (0.066g, 0.15mmoli) con HOAt (0.022g, 0.15mmoli) ed EDC (0.033g, 0.17mmoli) in 10ml di CH_2Cl_2 anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO_4 5%, H_2O , NaHCO_3 5%, H_2O e NaCl saturo. Si anidrifica con Na_2SO_4 , si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 57.3%; **p.f.** 146-147°C

Rf₁: 0.80; **Rf₂:** 0.80; **Rf₃:** 0.25.

IR (KBr): 3331, 2985, 2935, 1669 cm^{-1} .

Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe (0.027g, 0.028mmoli) sciolto in 8ml di CH_2Cl_2 anidro si aggiungono 2ml di dietilammina e lascio reagire per 2 ore. Questo procedimento serve ad ottenere H-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl_3 e successivamente con la miscela $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 9:1.

A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-Aib-OH (0.009g, 0.03mmoli) con HOAt (0.004g, 0.03mmoli) ed EDC (0.006g, 0.033mmoli) in 5ml di CH_2Cl_2 anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO_4 5%, H_2O , NaHCO_3 5%, H_2O e NaCl saturo.

Si anidrifica con Na_2SO_4 , si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 38.2%; **p.f.** 154-155°C.

Rf₁: 0.75; **Rf₂:** 0.80; **Rf₃:** 0.25.

IR (KBr): 2923, 1664 cm^{-1} .

Fmoc-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe (0.10g, 0.11mmoli) sciolto in 8ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 2ml di dietilammina e lascio reagire per 2 ore. Questo procedimento serve ad ottenere H-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1.

A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-TOAC-OH (0.05g, 0.12mmoli) con HOAt (0.017g, 0.12mmoli) ed EDC (0.025g, 0.15mmoli) in 10ml di CH₂Cl₂ anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo.

Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 37.4%; **p.f.** 150-152°C;

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

IR (KBr): 3322, 2984, 2931, 1663cm⁻¹.

Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di Fmoc-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe (0.037g, 0.032mmoli) sciolto in 8ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiungono 2ml di dietilammina e lascio reagire per 2 ore. Questo procedimento serve ad ottenere H-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1.

A parte, si prepara l'estere attivo miscelando Fmoc-Aib-OH (0.012g, 0.035mmoli) con HOAt (0.005g, 0.035mmoli) ed EDC (0.008g, 0.040mmoli) in 10ml di CH₂Cl₂ anidro. Si mescola l'estere attivo con il peptide sbloccato e si lascia reagire per 48 ore tenendo controllato il pH in modo che sia circa 8, altrimenti si corregge con TEA. Si ferma la reazione tirando a secco all'evaporatore e riprendendo il tutto con AcOEt. Si lava più volte con KHSO₄ 5%, H₂O, NaHCO₃ 5%, H₂O e NaCl saturo. Si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco. Per ultimo si cristallizza la soluzione con AcOEt ed etere di petrolio.

Resa: 28.2%; **p.f.** 160-162°C.

Rf₁: 0.75; **Rf**₂: 0.80; **Rf**₃: 0.20.

IR (KBr): 3306, 2924, 1659cm⁻¹.

Z-(Aib)₃-OXL

Ad una soluzione ghiacciata di Z-(Aib)₃-OH (0.04g, 0.01mmoli) in CH₂Cl₂ (10 ml) si aggiunge EDC·HCl (0.03g, 0.011mmoli). Si lascia sotto agitazione per 1 ora a temperatura ambiente. Si evapora il solvente sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si lava con KHSO₄ 10 % e H₂O molto velocemente. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

Resa: 98 %; **p.f.** 123-124 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁= 0.90.

IR (KBr): 3433, 3403, 1803, 1722, 1681 cm⁻¹.

Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe

Si parte da Fmoc-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe (0.064g, 0.09mmol) che vengono sciolti in 6ml di CH₂Cl₂ anidro con 2ml di DEA. Si lascia reagire per 2 ore seguendo la reazione tramite TLC. Questo procedimento serve ad ottenere H-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1.

In un altro pallone si prepara la soluzione di Z-(Aib)₃-OXL (0.04g, 0.1mmol) in 4ml di MeCN anidro, posta in un pallone da 100ml con tubo refrigerante a bolle e tappo con CaCl₂ per mantenere l'ambiente anidro il più possibile.

Si introduce H-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe nel pallone e si porta la soluzione a riflusso (60°C tramite isomantello) per 2 giorni. Al termine si tira a secco la soluzione con l'evaporatore rotante, si riprende con AcOEt e si esegue un lavaggio acido con KHSO₄ al 5%. Si anidrifica con NaSO₄ e si precipita un solido giallo aggiungendo etere di petrolio.

Resa: 27.2%; **p.f.** 219-221 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁= 0.90.

IR (KBr): 3322, 1712, 1664cm⁻¹.

Z-(Aib)₅-OH

Si scioglie Z-(Aib)₅-OtBu (0.06g, 0.09 mmoli) in una miscela di TFA e CH₂Cl₂ distillato 1:1 (4 ml) e si lascia sotto agitazione per 2 ore a temperatura ambiente. Si rimuove il solvente fino a secchezza, si riprende e si evapora più volte con Et₂O fino a comparsa di un solido. Si filtra da Et₂O.

Resa: 93 %; **p.f.** 197-198 °C.

Rf₁= 0.05; **Rf₂**= 0.70.

IR (KBr): 3420, 3357, 3284, 1736, 1705, 1680, 1646, 1533, 1512 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO, 200 MHz): δ 11.86 (s, 1H, COOH); 7.60 (s, 1H, 1 NH); 7.58 (2s, 2H, 2 NH); 7.73–7.31 (m, 5H, Z-fenile CH); 1.29 e 1.28 (2s, 18H, 6 βCH₃).

Z-(Aib)₅-OXL

Ad una soluzione ghiacciata di Z-(Aib)₅-OH (0.053g, 0.0845 mmoli) in CH₂Cl₂ (10 ml) si aggiunge EDC·HCl (0.019 g, 0.11 mmoli). Si lascia sotto agitazione per 1 ora a temperatura ambiente. Si evapora il solvente sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si lava con KHSO₄ 5 % e H₂O molto velocemente. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

Resa: 98 %; **p.f.** 123-124 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁= 0.90.

IR (KBr): 3433, 3403, 1803, 1722, 1681 cm⁻¹.

Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe

Si parte da Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe (0.07 g, 0.15 mmol) che vengono sciolti in 6ml di CH₂Cl₂ anidro con 2ml di DEA. Si lascia reagire per 2 ore seguendo la reazione tramite TLC. Questo procedimento serve ad ottenere H-Aib-TOAC-Aib-OMe e dibenzofulvene. Quest'ultimo viene rimosso tramite eluizione su letto di gel di silice prima solamente con CHCl₃ e successivamente con la miscela CHCl₃/EtOH 9:1.

In un altro pallone si prepara la soluzione di Z-(Aib)₅-OXL (0.05 g, 0.081 mmol) in 4ml di MeCN anidro, posta in un pallone da 100ml con tubo refrigerante a bolle e tappo con CaCl₂ per mantenere l'ambiente anidro il più possibile.

Si introduce H-Aib-TOAC-Aib-OMe nel pallone e si porta la soluzione a riflusso (60°C tramite isomantello) per 2 giorni. Al termine si tira a secco la soluzione con l'evaporatore rotante, si riprende con AcOEt e si esegue un lavaggio acido con KHSO₄ al 5%. Si anidrifica con NaSO₄ e si precipita un solido giallo aggiungendo etere di petrolio.

Resa: 6.5%; **p.f.** 222-224 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁ = 0.90.

IR (KBr): 3318, 1712, 1662cm⁻¹.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi

3.1.1 Preparazione dell'amminoacido TOAC

TOAC è un amminoacido non naturale ottenuto dalla sintesi del 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-one a 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ossil-4-one (4-oxo-TEMPO) tramite ossidazione con H_2O_2 in presenza di Na_2WO_4 (sodio tungstato⁴⁶). Il passaggio successivo si esegue mediante sintesi di Bucherer-Lieb⁴⁷ che ci permette di passare dal chetone alla spiroidantoina.

L'ultima operazione è quella di idrolizzare l'idantoina ad amminoacido utilizzando $\text{Ba}(\text{OH})_2$ in acqua secondo la variante di Dulog e Wang⁴⁵, che richiede il riscaldamento a riflusso di 135°C per 48ore, anziché a 150°C in autoclave per 90 minuti. La presenza di $\text{Ba}(\text{OH})_2$ causa l'innalzamento ebullioscopico fino ai 135°C .

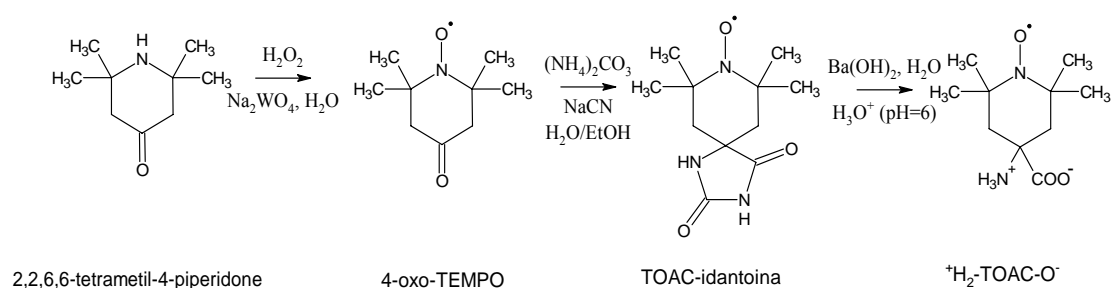
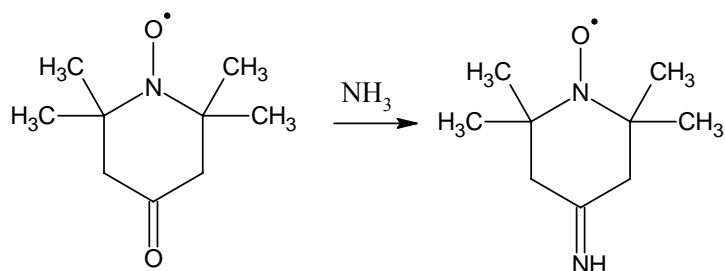


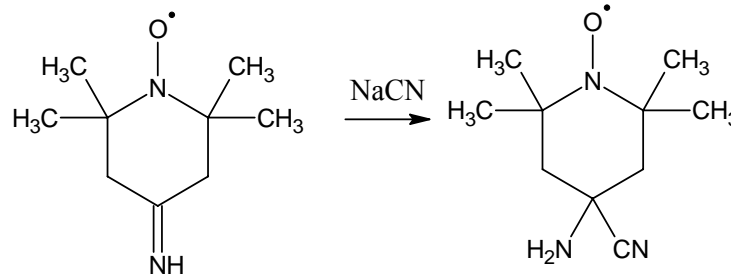
Fig. 3.1. Schema di sintesi dell'amminoacido TOAC⁴⁸.

Il meccanismo della Sintesi di Brucherer-Lieb è il seguente:

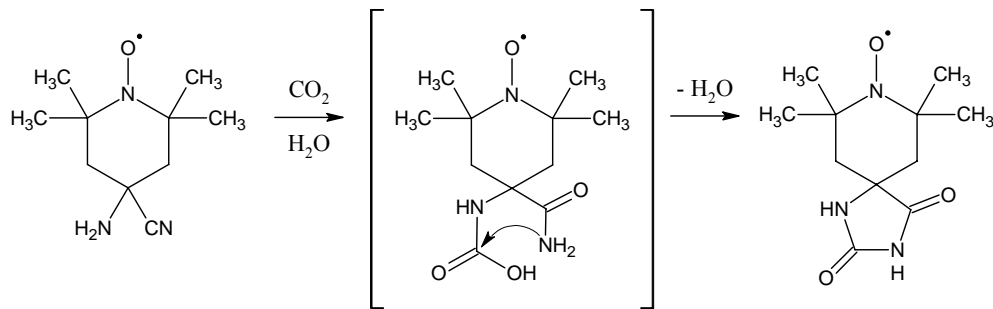
- formazione della base di Schiff o immina;



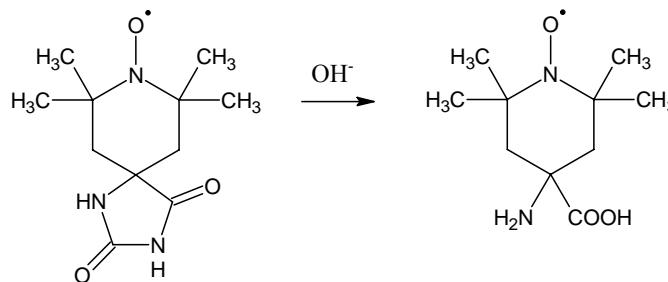
- reazione dell'immina con cianuro di sodio per ottenere l' α -ammino nitrile;



- formazione dell'intermedio idantoina;



- idrolisi dell'idantoina.



Si potrebbe pensare alla sintesi di Strecker (Fig. 3.2), in modo da non passare per la formazione dell'idantoina, ma tale reazione non è proponibile per il TOAC a causa delle condizioni in cui viene svolta la sintesi; infatti ambienti troppo acidi o troppo basici tenderebbero a modificare la natura del TOAC.

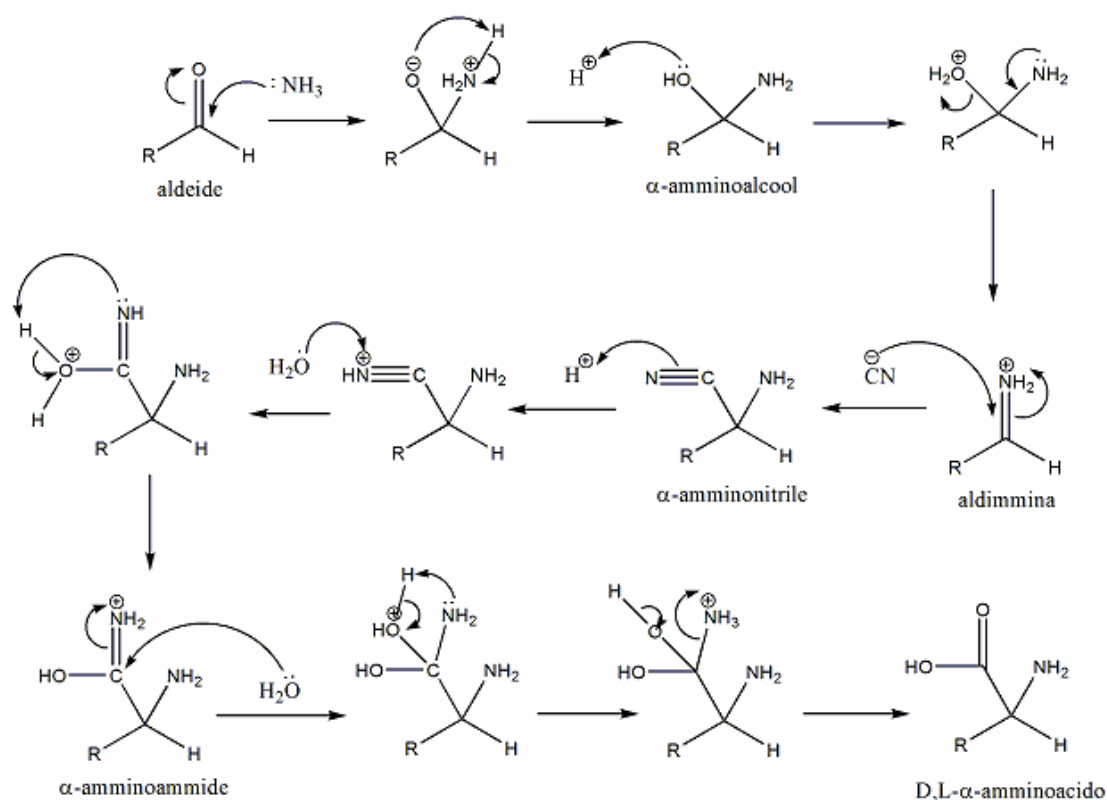


Fig. 3.2. Sintesi di Strecker degli α -amminoacidi.

Un esempio è il passaggio per idrolizzare l'ammino nitrile intermedio, ottenuto dal chetone, si userebbe un ambiente troppo acido per il TOAC.

Nel primo caso la protonazione del radicale libero favorisce il disproportionamento (vedi Fig. 3.3) a derivato dell'idrossilammina $e_{>\text{N}=\text{O}}^{49,50}$, ione ossoammonio, con conseguente perdita del carattere radicalico.

Contrariamente se ci trovassimo in un ambiente fortemente alcalino, l'equilibrio esistente tra chetone e amminonitrile verrebbe spostato verso il composto carbonilico, come spesso accade per chetoni stericamente ingombranti.

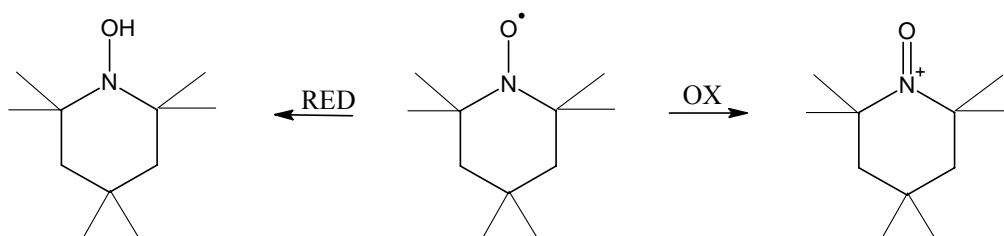


Fig. 3.3. Reazione di disproportionamento del radicale libero del TOAC.

3.1.2 Strategie di sintesi peptidica in soluzione adottate nel presente lavoro di Tesi

Tutti i peptidi descritti nella presente Tesi sono stati preparati tramite sintesi in soluzione.

Non è stato possibile seguire il metodo di sintesi in fase solida a causa dell'utilizzo di amminoacidi C^α-tetrasostituiti. Tali amminoacidi, come Aib e TOAC, presentano una scarsa reattività a causa del loro elevato ingombro sterico (TOAC in particolare).

La sintesi di un peptide in soluzione viene eseguita in modo "step by step", cioè sequenziale. Il tutto si traduce nell'aggiunta volta per volta di un amminoacido al residuo N-terminale opportunamente protetto alla funzione carbossilica. Va inoltre tenuto conto che catene più lunghe hanno tempi di reazione più lunghi e con minor rese.

Tale procedura è utile per ottenere ogni volta grandi quantitativi di frazioni di peptidi, ma a discapito di tempi relativamente lunghi per l'ottenimento.

Nel nostro caso si è potuto ricorrere alla sintesi per segmenti ("fragment condensation approach"), cioè preparare lunghe catene di Aib e poi inserire gli amminoacidi desiderati, solo nella preparazione dei due bianchi.

Fortunatamente l'utilizzo di amminoacidi come TOAC e Aib, che non sono chirali, ci ha permesso di non avere alcun problema di racemizzazione, cosa da tenere molto in considerazione in caso contrario.

3.1.3 Gruppi protettori delle funzioni amminiche e carbossiliche

Come gruppo N^α-protettore si è utilizzato lo Fmoc (fluorenilmetilossicarbonile) per la produzione dei peptidi con due TOAC, mentre per i bianchi abbiamo utilizzato lo Z (benzilossicarbonile).

Lo Fmoc (Fig. 3.4) è un protettore uretanico⁵¹, maggiormente utilizzato nella protezione peptidica in sintesi a fase solida (SPPS). La scelta è motivata dall'interesse di mantenere intatta l'integrità chimica della funzione radicalica del TOAC. Infatti, nel caso avessimo utilizzato Z⁵² (Fig. 3.5) come protettore, le sue condizioni di rimozione tramite idrogenolisi catalitica comporterebbero la riduzione del nitrossile a derivato dell'idrossilammina.

Possiamo elencare i seguenti vantaggi, ottenuti dall'utilizzo dello Fmoc:

- possibilità di rimozione del protettore in condizioni basiche compatibili con la stabilità del radicale;
- presenza di un cromoforo aromatico, molto utile per seguire il decorso delle reazioni mediante TLC;

Vediamo invece gli svantaggi:

- le condizioni di coupling (presenza di ammina primaria libera) non sono molto dissimili da quelle di de protezione, e tale reazione collaterale è inevitabile. La sua entità aumenta anche se vi è un eccesso di ammina terziaria usata come base;
- dalla deprotezione si ottiene dibenzofulvene come sottoprodotto, il quale è un blando elettrofilo e va rimosso tramite cromatografia flash prima di ogni coupling, aggiungendo un'ulteriore passaggio di lavoro e allungando i tempi.

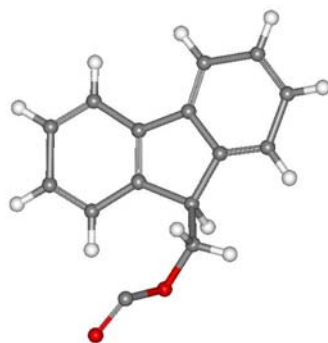


Fig.3.4. Esempio di struttura del gruppo protettore Fmoc.

Di seguito elenchiamo invece i vantaggi dell'utilizzo di Z come gruppo protettore, sfruttandone anche in questo caso la funzione uretanica:

- la buona stabilità chimico-fisica degli Z-derivati;
- la facilità con la quale questa protezione può essere rimossa attraverso idrogenolisi catalizzata eterogeneamente, ottenendo sottoprodotti volatili e quindi eliminabili agevolmente per evaporazione;
- la presenza di un cromoforo aromatico, notevolmente utile per seguire il decorso delle reazioni mediante TLC.

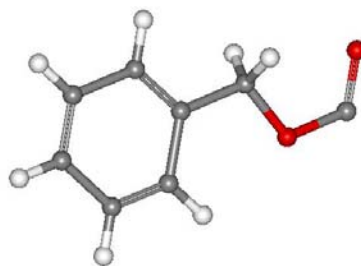


Fig.3.5. Esempio di struttura del gruppo protettore Z.

La funzione carbossilica C-terminale di tutte le sequenze è stata protetta come estere metilico (-OCH₃). Questo gruppo protettore è stato scelto in quanto:

1. aiuta la solubilità dei peptidi nei solventi organici;
2. è stabile nelle condizioni di rimozione del gruppo Fmoc.

3.1.4 Metodi di attivazione

Partiamo dalla considerazione del fatto che gli α -amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti sono poco reattivi nella formazione del legame peptidico a causa dell'ingombro sterico sul C ^{α} . Tale influenza negativa si fa sentire in modo maggiore sul gruppo amminico piuttosto che su quello carbossilico. Questa difficoltà fa sì che vengano utilizzati degli appositi “attivanti” che servono a funzionalizzare (attivare) il gruppo che vogliamo fare reagire.

In questo lavoro di Tesi abbiamo utilizzato la coppia EDC/HOAt⁵³ o EDC/HOBt⁵⁴.

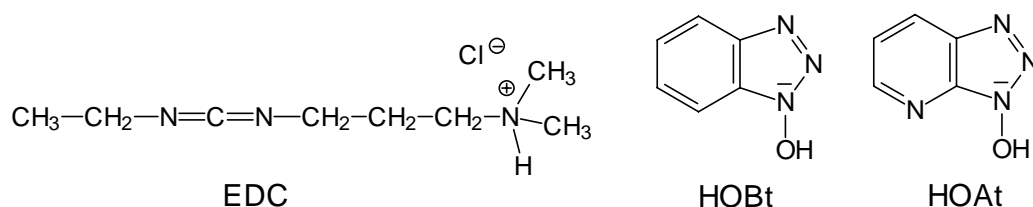


Fig. 3.6. Formule di struttura di EDC, HOBt e HOAt.

Questi attivanti permettono di ottenere un così detto “*estere attivo*” partendo dall'amminoacido protetto. Tale estere attivo reagisce direttamente con il gruppo amminico del peptide sbloccato per dare l'ammide. Ovviamente alla fine della

reazione rimangono in soluzione sottoprodotti vari facilmente eliminabili con lavaggi di natura acida e poi basica.

Questo metodo è molto comodo perché la reazione è pressoché diretta, ma presenta alcuni problemi. Innanzitutto può rimanere in soluzione dell'estere attivo che non ha reagito e che bisognerà estrarre o tramite cromatografia-flash o con una comoda precipitazione frazionata. Poi l'utilizzo di EDC in eccesso tende a diminuire il "pH", quindi bisogna controllarlo costantemente e nel caso "aggiustarlo" con qualche aggiunta di base terziaria.

Potremmo anche considerare la coppia EDC/HOBt al posto di EDC/HOAt, ma dalle prove effettuate in laboratorio si è visto che la reattività diminuisce sensibilmente. Pertanto, nonostante che l'HOAt sia più costoso dell'HOBt e difficilmente reperibile, abbiamo preferito utilizzare HOAt visto la sua altissima efficienza e le buone rese. Possiamo anche dare una spiegazione a come HOAt riesca a favorire la reazione di coupling^{55,56}.

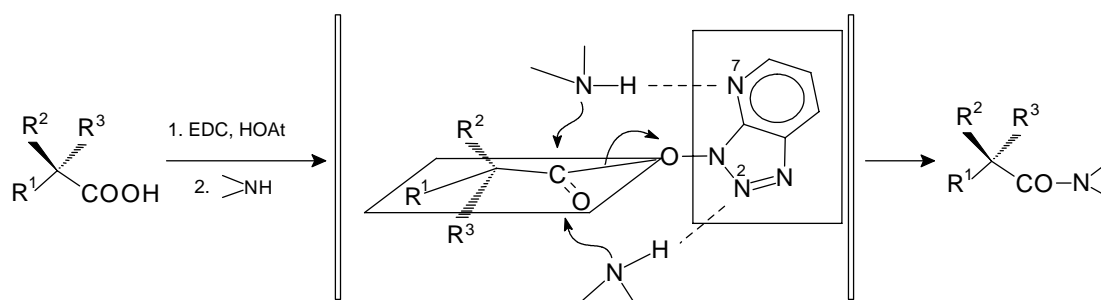


Fig. 3.7. Attacco nucleofilo assistito nella formazione del legame ammidico via attivazione del gruppo carbossilico con HOAt.

Dalla Fig.3.7 si può notare come la presenza di un azoto in più in posizione 2, rispetto all'HOBt, permetta di avere un'assistenza (tramite la formazione di legami idrogeno con gli idrogeni del gruppo amminico) per formare il legame ammidico anche dalla parte inferiore del piano dell'estere attivo. Ciò favorisce di molto l'attacco nucleofilo da parte del gruppo amminico, riducendo anche il rischio di racemizzazione qualora questa sia possibile (non nel nostro caso).

L'uso dei soppressori di racemizzazione permette di ottenere prodotti migliori e più puri. Un peptide è ottenibile anche in altri modi, ad esempio trattando l'O-acilisourea

con un altro acido carbossilico si ottiene un'anidride simmetrica, che successivamente forma il legame ammidico per attacco del gruppo amminico di un altro amminoacido. Normalmente l'anidride simmetrica si prepara facendo reagire due equivalenti di acido carbossilico con un equivalente di carbodiimmide. In questo modo rimane un equivalente di acido libero che attacca l'O-acilisourea per dare l'anidride simmetrica.

Nonostante il meccanismo della reazione della carbodiimmide con gli ausiliari HOBt o HOAt sia oramai noto nei dettagli, non sono invece ancora pienamente compresi gli effetti del solvente⁵⁷ sulla reazione di *coupling* promossa dalle carbodiimmidi. Si è visto che in solventi come cloroformio o diclorometano la reazione proceda bene, mentre in altri solventi il decorso è meno facilmente prevedibile.

Per quanto riguarda la scelta del tipo di carbodiimmide⁵⁸ gli aspetti chimico-fisici sono quelli maggiormente presi in considerazione nelle sintesi di laboratorio. Su scala industriale invece anche il costo e la sicurezza dei reagenti assumono notevole importanza. La DCC è ancora la carbodiimmide più economica. Tuttavia, nelle sintesi di laboratorio in soluzione si usa spesso l'EDC (vedi Fig. 3.6) nonostante costi almeno 50 volte di più. Infatti, la presenza dello ione ammonio consente di rimuovere facilmente l'urea risultante come sottoprodotto (EDCU) mediante semplici estrazioni in imbuto separatore (EDCU in acqua, peptide protetto in fase organica).

I composti Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe e Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe sono stati invece ottenuti mediante sintesi a segmenti, attraverso l'attivazione della funzione carbossilica C-terminale come 5(4H)-ossazolone. Questo eterociclo è un blando agente acilante. Tuttavia, facendo decorrere la reazione per tempi prolungati alla temperatura di ebollizione del solvente (CH₃CN) si sono ottenute rese soddisfacenti, in alcuni casi superiori all'80%.⁵⁹⁻⁶¹

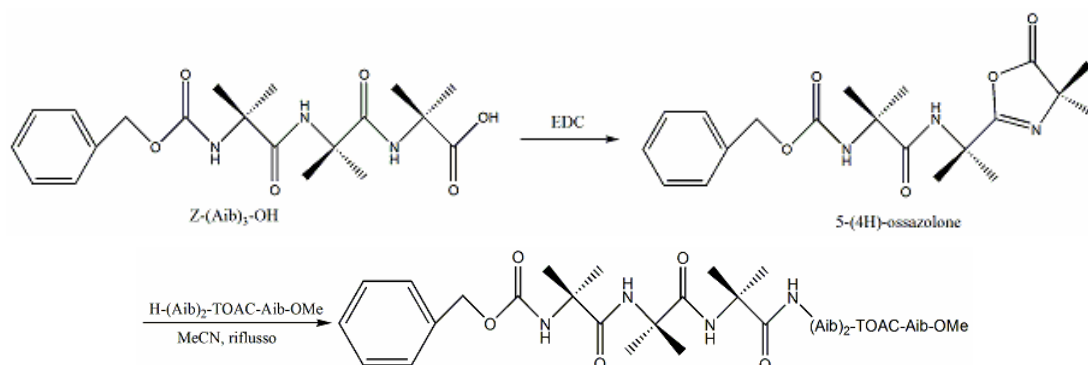
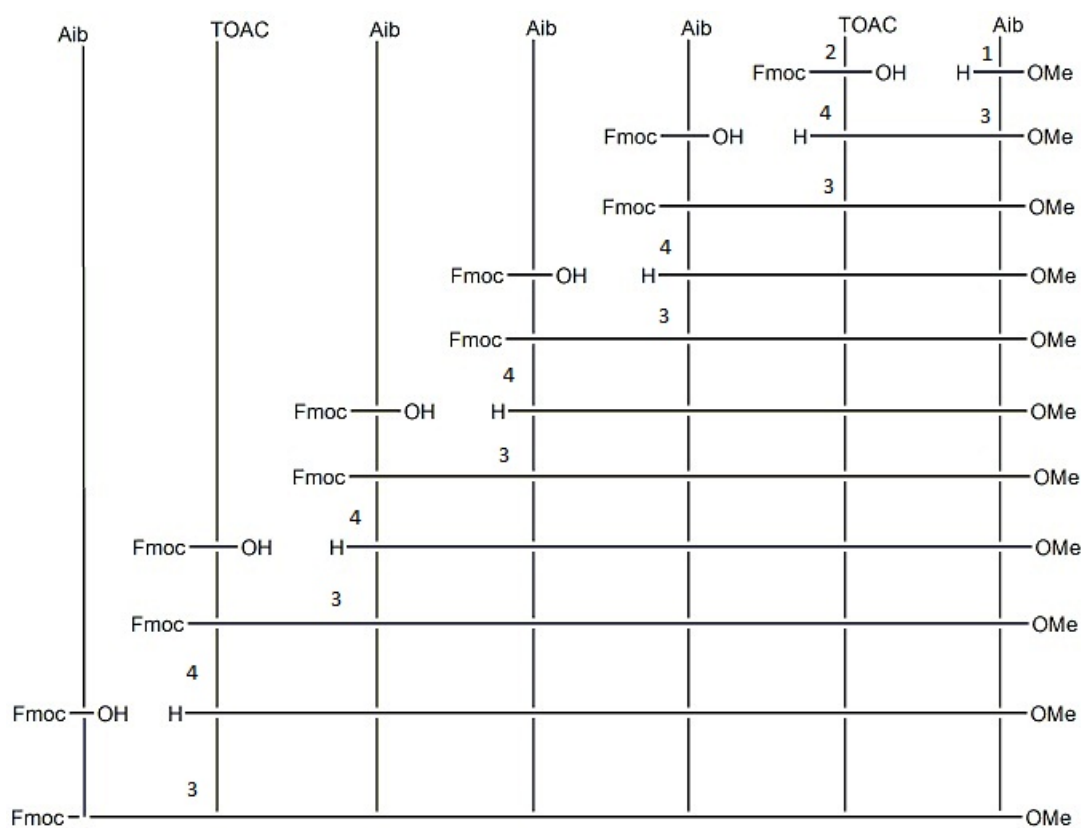
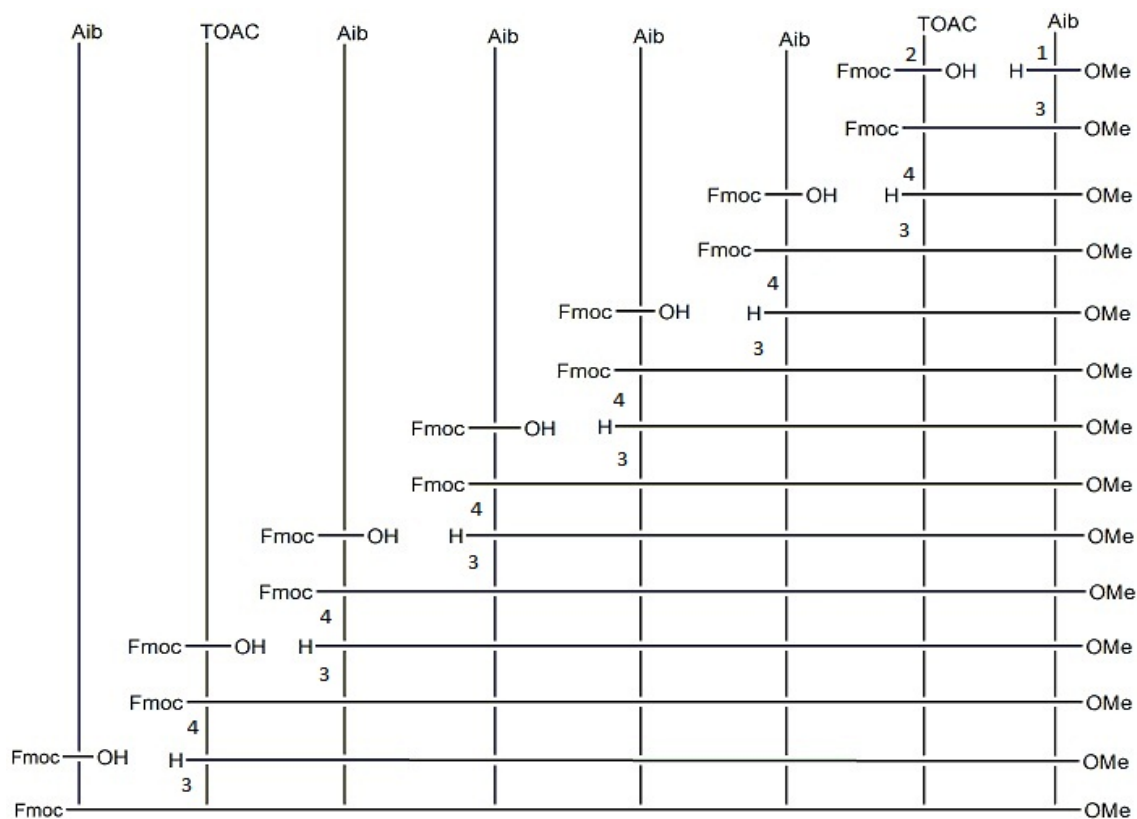
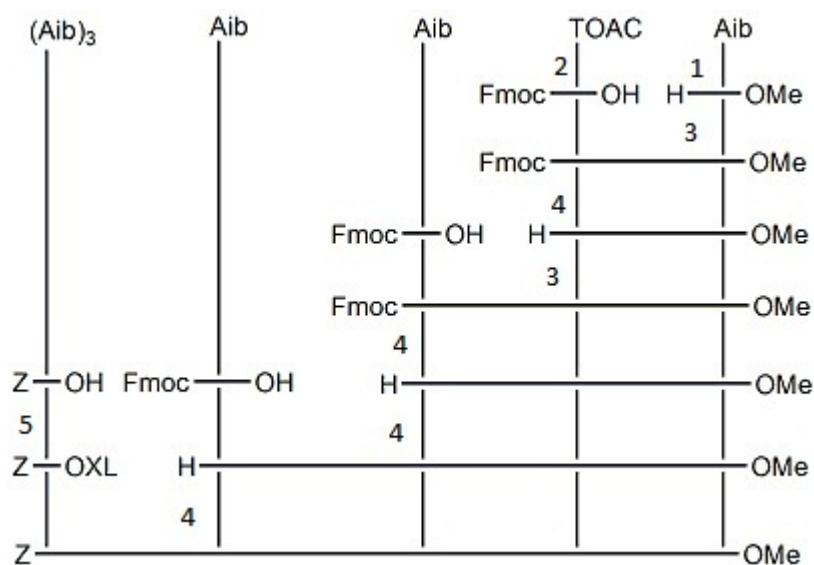


Fig. 3.8. Esempio di reazione per formare ossazolone e successivo coupling della sequenza Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe.

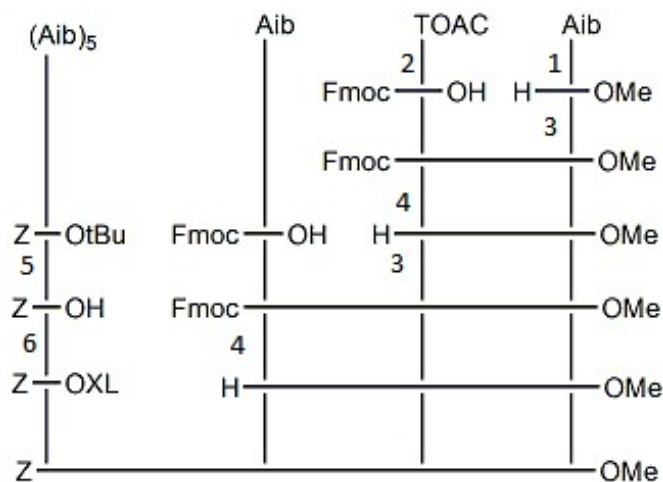
Infine per facilitare la comprensione delle strategie adottate, gli schemi 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 riassumono graficamente i percorsi seguiti per sintetizzare i peptidi Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe, Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe e Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe.

Schema 3.1. Sintesi del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe.



Schema 3.2. Sintesi del peptide *Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe*.**Schema 3.3.** Sintesi del peptide *Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe*.

Schema 3.4. Sintesi del peptide Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe.



1 = MeOH/SOCl₂; 2 = Fmoc-OSu; 3 = EDC/HOAt; 4 = 50% DEA in CH₂Cl₂; 5 = TFA/CH₂Cl₂; 6 = EDC.

3.2 Indagini conformazionali

Le preferenze conformazionali in soluzione dei peptidi sintetizzati sono state indagate in soluzione mediante assorbimento IR. Le indagini NMR sono poco utili per questi peptidi. Infatti, il nitrossido del TOAC, paramagnetico, allarga notevolmente (fino anche a farli sparire) la maggior parte dei segnali in un raggio di 7-8 Å.

3.2.1 Assorbimento IR

Lo studio mediante assorbimento IR è stato effettuato in deuterocloroformio (un solvente di bassa polarità molto usato per studi conformazionali di peptidi) e tramite pastiglie di KBr, negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni⁶²:

(i) 3600-3200 cm^{-1} (detta *ammide A*), corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami N-H dei gruppi uretanici e peptidici;

(ii) 1800-1600 cm^{-1} (detta *ammide I*), corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami C=O esterei, uretanici, ftaloilici e peptidici.

In deuterocloroformio è possibile ottenere informazioni sugli N-H ammidici impegnati in legami ad idrogeno intra- o intermolecolari e su quelli liberi (solvatati) e conseguentemente, sulla struttura tridimensionale adottata dal peptide in soluzione. La scarsa polarità di questo solvente, infatti, non altera la posizione delle bande di assorbimento degli N-H ammidici. Al contrario, solventi a polarità maggiore possono formare legami ad idrogeno con gli N-H ammidici liberi, spostandone l'assorbimento nella regione in cui si trovano anche le bande degli N-H legati intramolecolarmente e responsabili della conformazione del peptide. Pertanto, in solventi a elevata polarità non risulta possibile distinguere tra N-H legati con il solvente e N-H legati intramolecolarmente a carbonili ammidici.

Le Tabelle 3.1 e 3.2 riportano le frequenze di assorbimento IR delle bande di stiramento N-H e C=O alla concentrazione 1×10^{-3} M per l'intera serie dell'eptapeptide *Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe* e dell'ottapeptide *Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe*.

Tabella 3.1 Frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) della serie Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-TOAC-Aib-OMe	<u>3434</u> , 3402 ^a , <u>3320</u>	<u>1736</u> , 1706 ^a , 1674, <u>1509</u>
Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe	3444 ^a , 3418, <u>3362</u>	1738 ^a , <u>1718</u> , 1688, <u>1498</u>
Fmoc-(Aib) ₂ -TOAC-Aib-OMe	3450 ^a , 3424, <u>3356</u>	<u>1736</u> ^a , <u>1710</u> , 1682, 1502
Fmoc-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe	3424, <u>3342</u>	<u>1736</u> ^a , <u>1714</u> , <u>1674</u> , 1527
Fmoc-TOAC-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe	<u>3424</u> , <u>3336</u>	1736 ^a , 1710, <u>1670</u> , 1526
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe	<u>3415</u> , <u>3339</u>	<u>1736</u> ^a , <u>1710</u> , 1672, 1512

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande intense (—) o deboli (...); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.2 Frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) della serie Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-TOAC-Aib-OMe	<u>3434</u> , 3402 ^a , <u>3320</u>	<u>1736</u> , 1706, 1674, <u>1509</u>
Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe	3444 ^a , 3418, <u>3362</u>	1738 ^a , <u>1718</u> , 1688, <u>1498</u>
Fmoc-(Aib) ₂ -TOAC-Aib-OMe	3450 ^a , 3424, <u>3356</u>	<u>1736</u> ^a , <u>1710</u> , 1682, 1502
Fmoc-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe	3424, <u>3342</u>	1736 ^a , <u>1714</u> , <u>1674</u> , 1527
Fmoc-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe	3424, <u>3330</u>	1736 ^a , <u>1714</u> , <u>1670</u> , 1528
Fmoc-TOAC-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe	<u>3422</u> , <u>3326</u>	<u>1736</u> ^a , <u>1714</u> , <u>1664</u> , 1531
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe	<u>3440</u> , <u>3414</u> , <u>3324</u>	1732 ^a , <u>1710</u> , <u>1664</u> , 1527

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande intense (—) o deboli (...); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

In Figura 3.10 sono riportati gli spettri della serie Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, mentre in Figura 3.11 ci sono quelli della serie Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe.

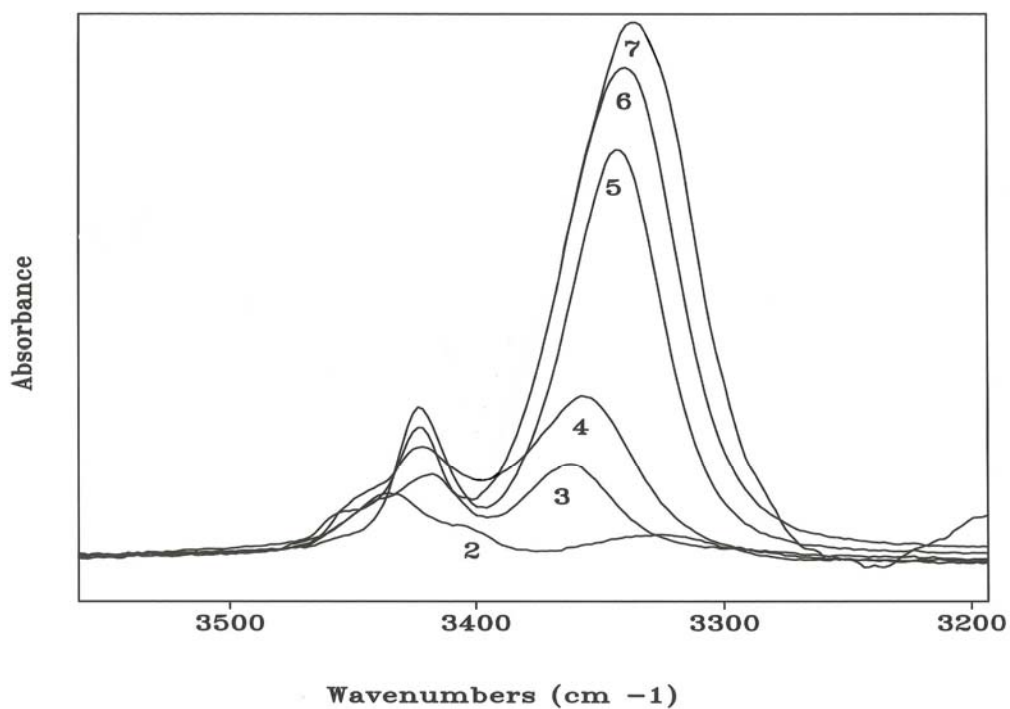


Fig. 3.10. Spettri di assorbimento IR dell'eptapeptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe (7) e delle sue sequenze corte C-terminali in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

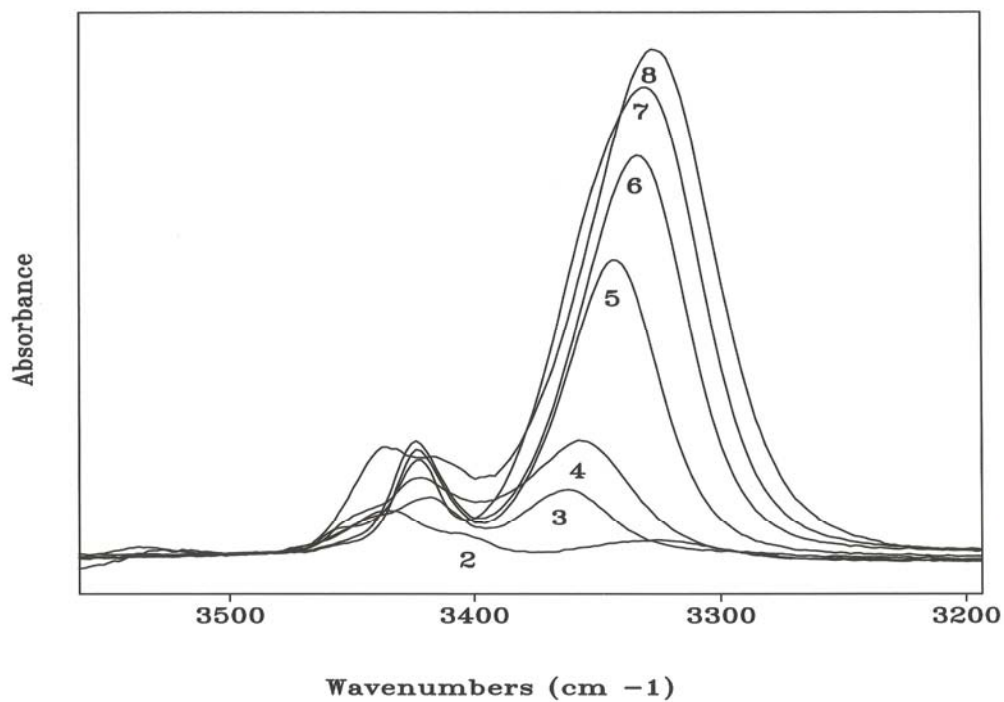


Fig. 3.11. Spettri di assorbimento IR dell'ottapeptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe (8) e delle sue sequenze corte C-terminali in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

Misurare spettri a concentrazioni diverse è utile per distinguere effetti di interazioni *intermolecolari* (fortemente dipendenti dalla concentrazione) ed *intramolecolari* (pressoché indipendenti dalla concentrazione). Nelle Tabelle da 3.3 a 3.8 si riportano le frequenze di assorbimento IR per i peptidi Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe, nelle regioni 3500-3200 cm⁻¹ e 1800-1600 cm⁻¹, alle concentrazioni 1 × 10⁻³ M ed 1 × 10⁻⁴ M (l'assorbimento dovuto al solvente in tale regione è tale da pregiudicare la misura alla concentrazione di 10⁻⁴ M). Nelle Figure da 3.12 a 3.17 sono riportati gli spettri degli stessi peptidi, ottenuti alle concentrazioni 1×10⁻³ M (curva A) e 1×10⁻⁴ M (curva B). Tali spettri sono normalizzati in quanto per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10 si è utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore (1.0 per 1×10⁻³ M e 10.0 mm per 1×10⁻⁴ M).

Tabella 3.3 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Fmoc-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻³ M)	3423, <u>3345</u>	<u>1734</u> ^a , 1714, <u>1672</u>
Fmoc-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻⁴ M)	3423, <u>3345</u>	-----

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.4 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe in eutero cloroformio alle concentrazioni 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Fmoc-TOAC-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻³ M)	<u>3422</u> , <u>3339</u>	<u>1732</u> ^a , 1713, <u>1672</u>
Fmoc-TOAC-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻⁴ M)	<u>3422</u> , <u>3338</u>	-----

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.5 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe (10^{-3} M)	<u>3415</u> , <u>3339</u>	<u>1736</u> , <u>1710</u> , <u>1672</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe (10^{-4} M)	<u>3415</u> , <u>3339</u>	-----

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.6 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) del peptide Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe (10^{-3} M)	<u>3421</u> , <u>3333</u>	<u>1735</u> ^a , <u>1718</u> , <u>1671</u>
Fmoc-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe (10^{-4} M)	<u>3421</u> , <u>3333</u>	-----

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.7 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) del peptide Fmoc-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-TOAC-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe (10^{-3} M)	<u>3422</u> , <u>3332</u>	<u>1738</u> ^a , <u>1718</u> , <u>1633</u>
Fmoc-TOAC-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe (10^{-4} M)	<u>3422</u> , <u>3332</u>	-----

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.8 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe (10^{-3} M)	<u>3435</u> , <u>3325</u>	<u>1727</u> ^a , <u>1709</u> , <u>1663</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe (10^{-4} M)	<u>3433</u> , <u>3323</u>	-----

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

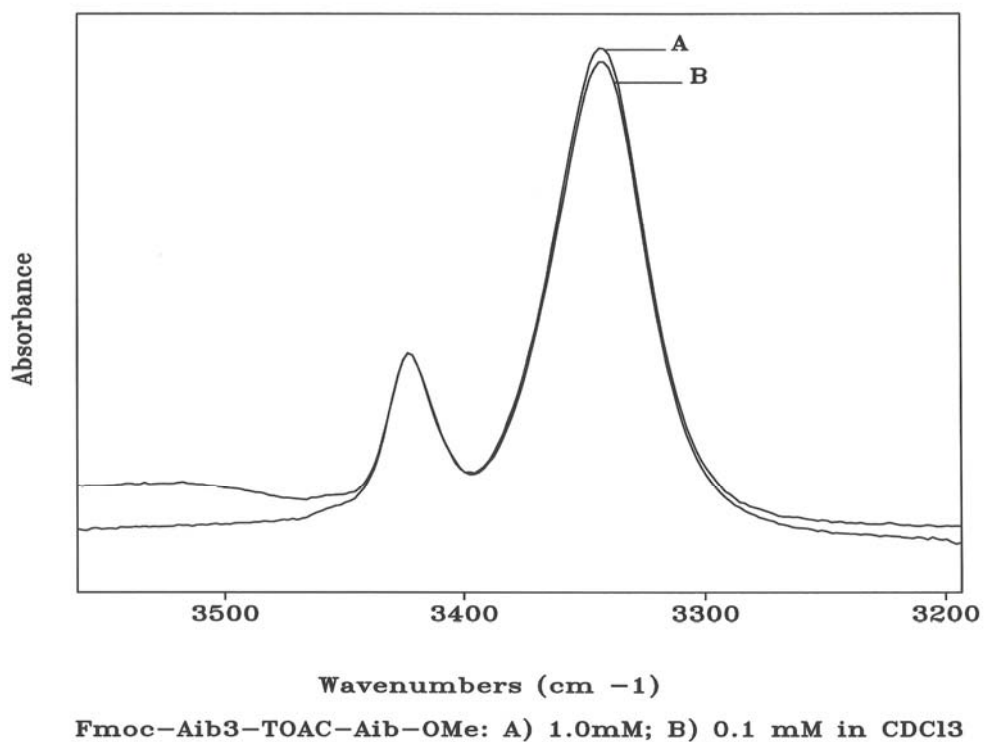


Fig. 3.12. Spettri di assorbimento IR di *Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe* in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione $3500-3200$ cm⁻¹.

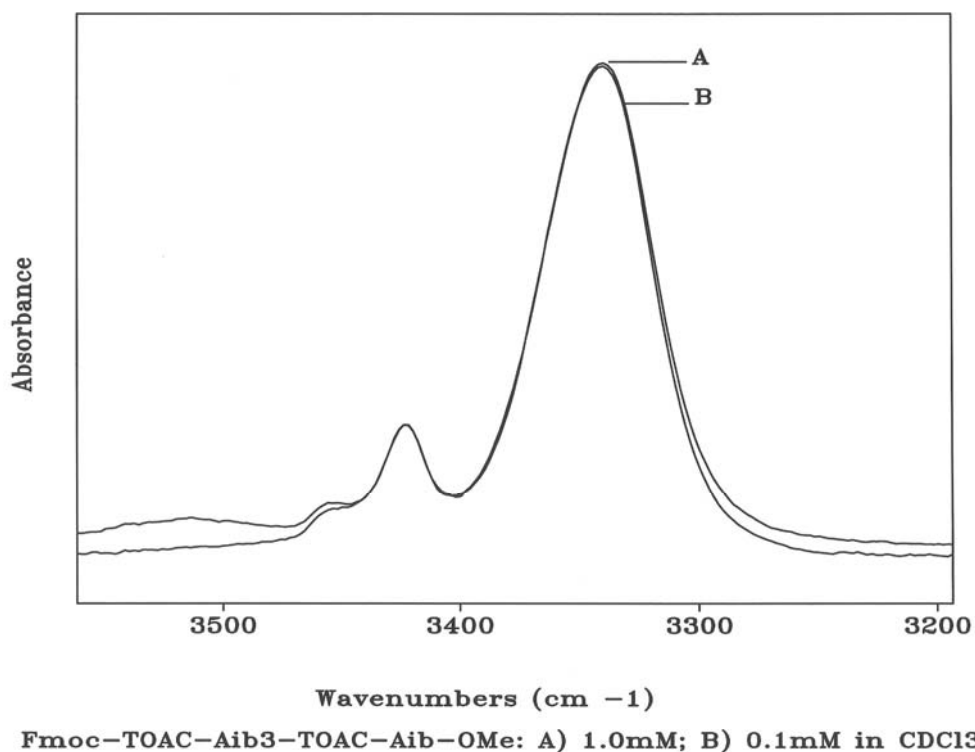
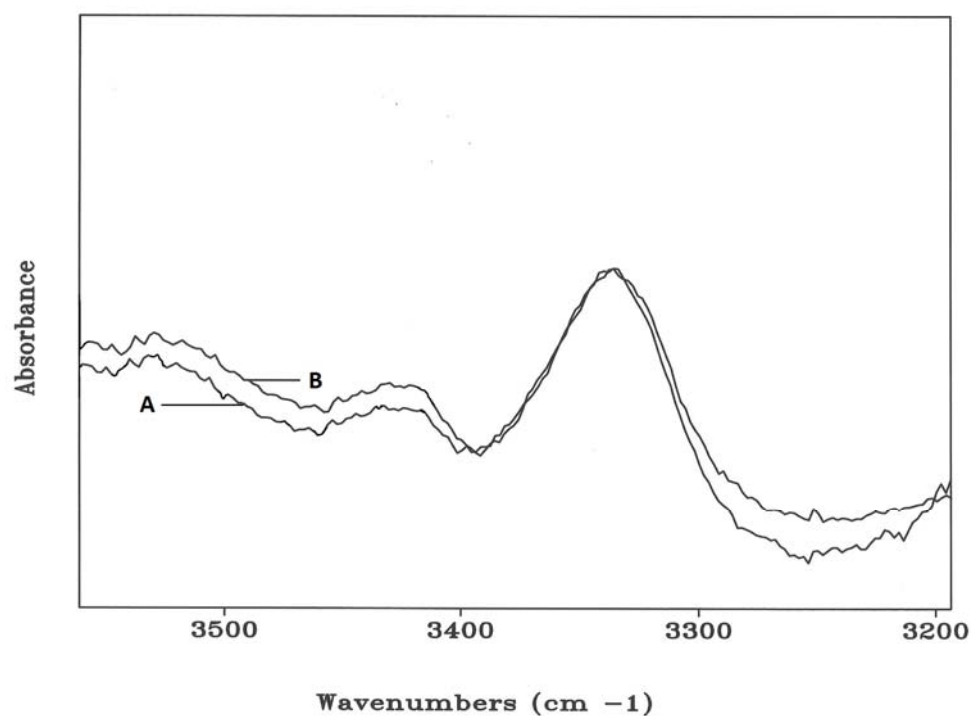
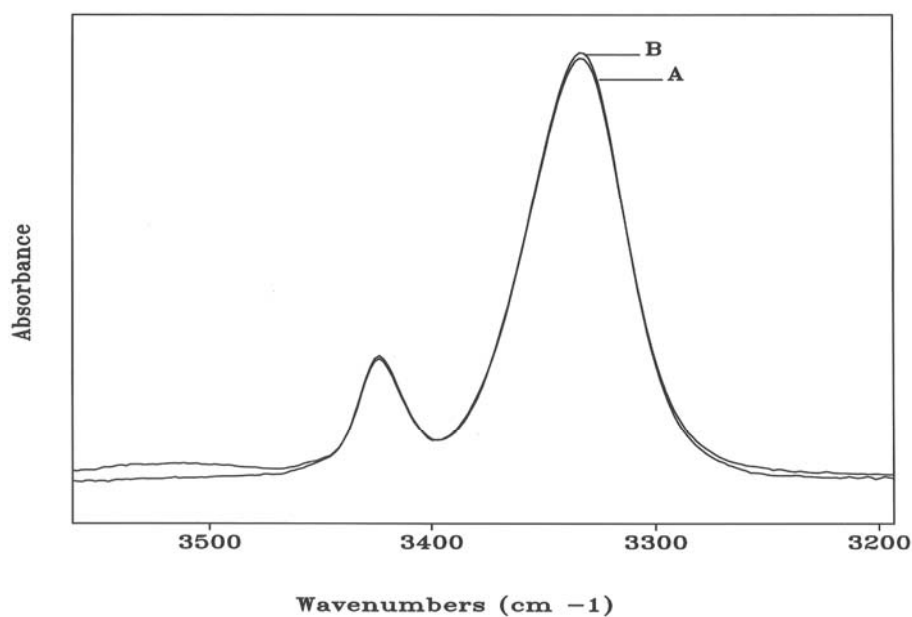


Fig. 3.13. Spettri di assorbimento IR di *Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe* in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione $3500-3200$ cm⁻¹.



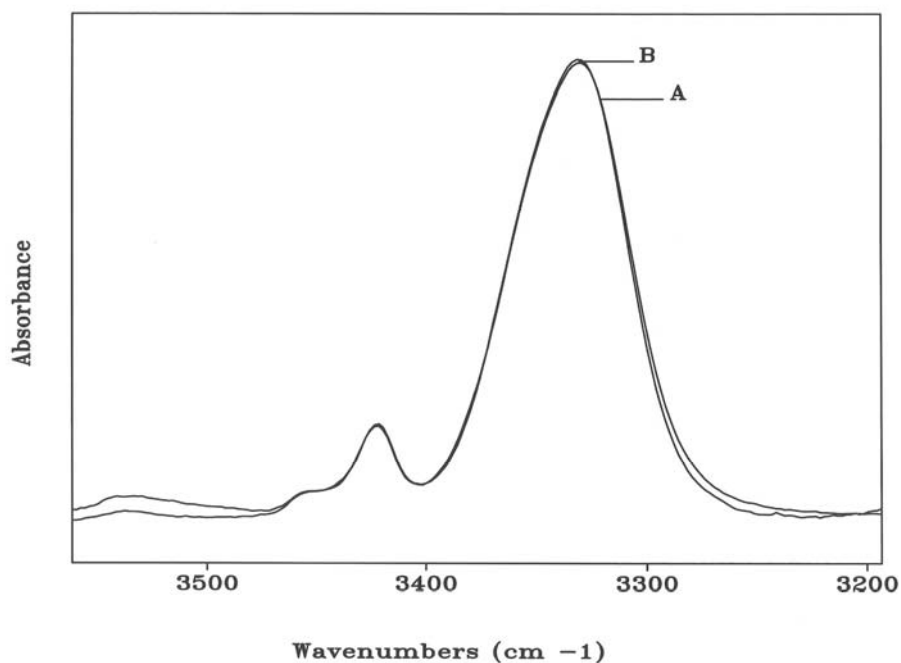
Fmoc-Aib-TOAC-Aib₃-TOAC-Aib-OMe: A) 1mM; B) 0.1mM in CDCl₃

Fig. 3.14. Spettri di assorbimento IR di *Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe* in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione $3500-3200$ cm^{-1} .



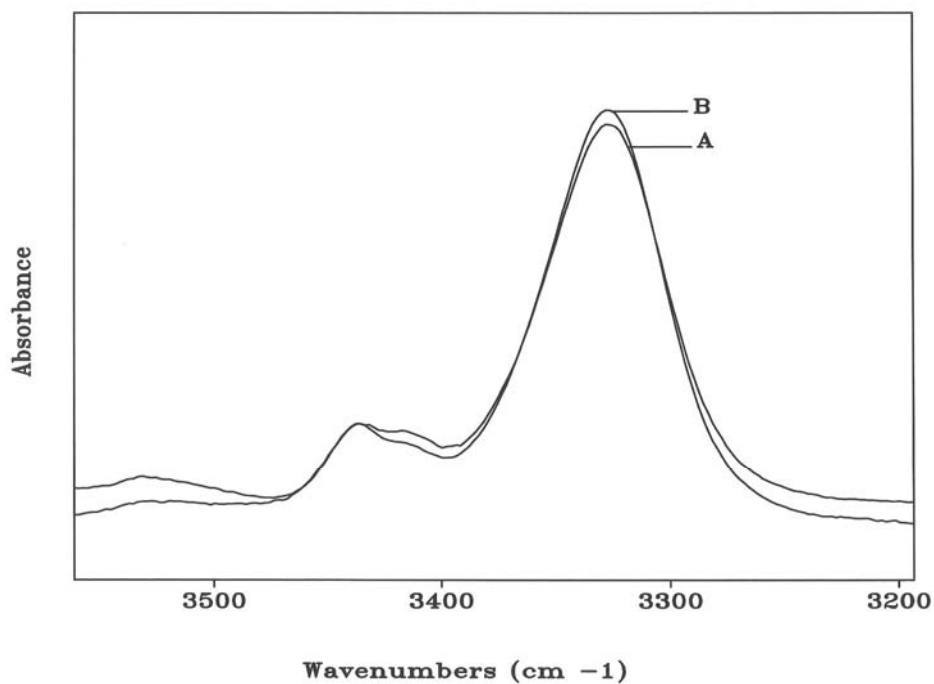
Fmoc-Aib₄-TOAC-Aib-OMe: A) 1.0mM; B) 0.1mM in CDCl₃

Fig. 3.15. Spettri di assorbimento IR di *Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe* in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione $3500-3200$ cm^{-1} .



Fmoc-TOAC-Aib₄-TOAC-Aib-OMe: A) 1.0mM; B) 0.1mM in CDCl₃

Fig. 3.16. Spettri di assorbimento IR di *Fmoc-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe* in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-2} M (A), 1×10^{-3} M (B) e 1×10^{-4} M (C) nella regione $3500-3200$ cm^{-1} .



Fmoc-Aib-TOAC-Aib₄-TOAC-Aib-OMe: A) 1.0mM; B) 0.1mM in CDCl₃

Fig. 3.17. Spettri di assorbimento IR di *Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe* in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione $3500-3200$ cm^{-1} .

I risultati più interessanti si possono così riassumere:

- I peptidi della serie Fmoc-(Aib)_n-TOAC-Aib-OMe (n = 1-2-3-4) presentano una banda di assorbimento debole tra 3450 e 3418 cm⁻¹, la zona degli NH liberi e solvatati.^{63,64} Nella zona tra 3374 e 3330 cm⁻¹, corrispondente ai gruppi N-H impegnati in legami idrogeno^{63,64}, tutti i peptidi della serie mostrano un'intensa banda di assorbimento, che si affievolisce al decrescere della lunghezza del peptide. Il peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe presenta una debole banda di assorbimento tra 3430 e 3400cm⁻¹ ed una intensa a 3330 : la prima è assegnabile alle vibrazioni di stiramento degli N-H liberi e solvatati, mentre la seconda corrisponde ai gruppi N-H impegnati nel legame idrogeno (tabella 3.5).
- Il peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe e le relative sequenze corte C-terminali presentano una banda di assorbimento debole tra 3444 e 3414 cm⁻¹ corrispondente ai gruppi N-H liberi e solvatati. Nella zona tra 3400 e 3240cm⁻¹ è presente un'intensa banda di assorbimento attribuibile ai gruppi N-H impegnati nei legami idrogeno.
- Per tutti i peptidi più lunghi, riportati nelle figure da 3.12 a 3.17, la diluizione da 1 × 10⁻³ M a 1 × 10⁻⁴ M determina una trascurabile diminuzione dell'intensità integrata delle bande di stiramento degli N-H legati. Si può quindi ritenere che a concentrazioni elevate non ci sia una significativa auto-associazione attraverso legami ad H di tipo *intermolecolare*, che si sovrappongono a quelli di tipo *intramolecolare*. Pertanto, si può ritenere che i legami ad H coinvolgenti gli N-H peptidici siano essenzialmente di tipo *intramolecolare*.
- Per quanto riguarda la regione spettrale 1800-1600 cm⁻¹ le bande tra 1738 e 1706 cm⁻¹ sono attribuibili agli stiramenti del gruppo C=O dell'estere metilico e del gruppo C=O uretanico. I gruppi C=O peptidici assorbono tra 1688 e 1664 cm⁻¹.^{63,65} Negli spettri dei peptidi più lunghi il massimo di assorbimento della banda ammidica I è localizzato a 1664 cm⁻¹, in accordo con la posizione canonica della banda ammidica I delle strutture elicoidali di tipo 3₁₀.

I risultati dell'indagine di assorbimento IR inducono ad ipotizzare che, in soluzione di CDCl₃, i peptidi Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-

(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe assumano conformazioni ripiegate stabilizzate da legami idrogeno *intramolecolari*. Gli epta ed ottapeptidi adottano con tutta probabilità una struttura elicoidale di tipo 3₁₀.

Per quanto riguarda i due “bianchi”, cioè le due catene peptidiche Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe e Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe, l'indagine conformazionale mediante assorbimento IR porta alle stesse conclusioni riscontrate per i peptidi visti sopra. Per quanto riguarda il peptide Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (tabella 3.9) si osserva un'intensa banda a 3322 cm⁻¹ per gli N-H impegnati nei legami idrogeno ed una più debole a 3426 cm⁻¹ per lo stiramento dei gruppi N-H liberi. Per quanto riguarda la regione spettrale 1800-1600 cm⁻¹ le bande tra 1736 e 1694 cm⁻¹ sono attribuibili agli stiramenti del gruppo C=O dell'estere metilico e del gruppo C=O uretanico. I gruppi C=O peptidici assorbono a 1664 cm⁻¹.^{63,65}

L'ottapeptide Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe (tabella 3.10) presenta una forte banda a 3318 cm⁻¹ per gli N-H impegnati nei legami idrogeno ed una debole a 3426cm⁻¹ relativa agli N-H liberi. Per gli stiramenti C=O dell'estere metilico e del gruppo uretanico vediamo le bande a 1736 e 1712 cm⁻¹, mentre per i C=O peptidici la banda è a 1662cm⁻¹.

Tabella 3.9 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Z-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻³ M)	<u>3426</u> , <u>3322</u>	<u>1736</u> ^a , 1712, <u>1664</u>
Z-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻⁴ M)	<u>3426</u> , <u>3322</u>	-----

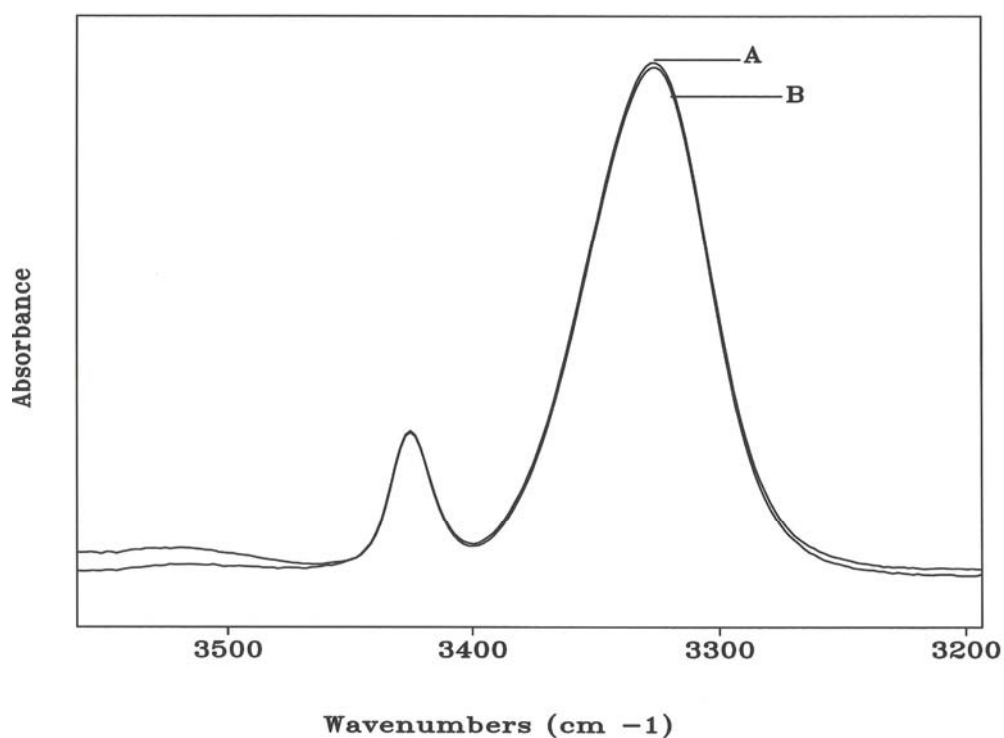
Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (..) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Tabella 3.10 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Z-(Aib) ₆ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻³ M)	<u>3426</u> , <u>3318</u>	<u>1736</u> ^a , 1712, <u>1662</u>
Z-(Aib) ₆ -TOAC-Aib-OMe (10 ⁻⁴ M)	<u>3426</u> , <u>3318</u>	-----

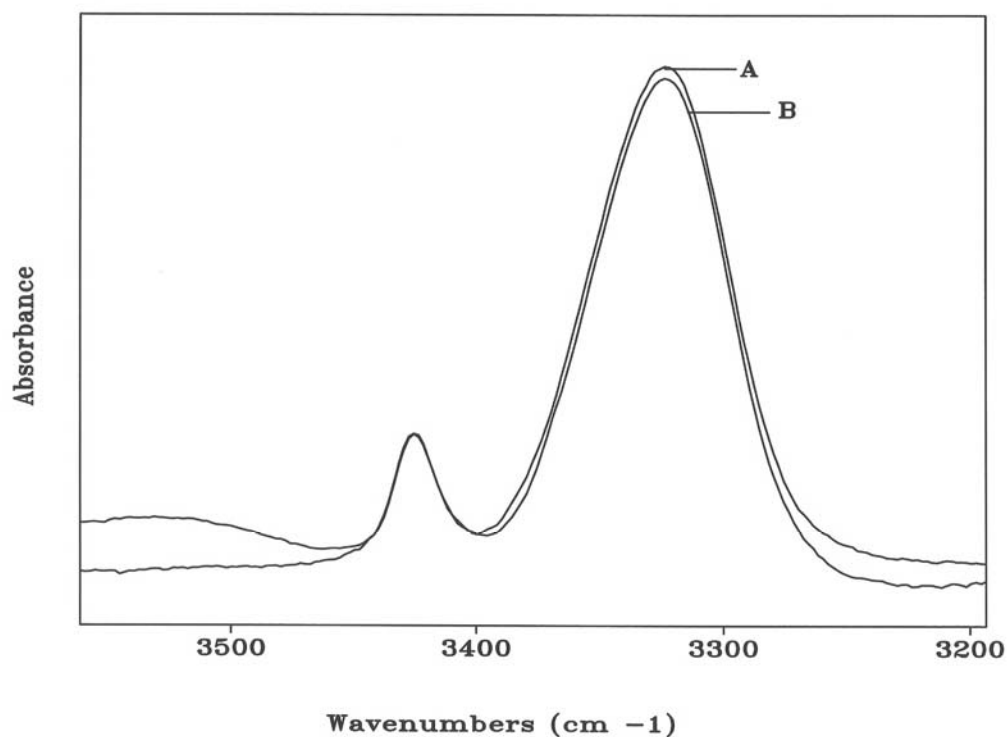
Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (..) od intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Nelle figure 3.18 e 3.19 si riportano gli spettri sovrapposti per i due peptidi alle concentrazioni 1×10^{-3} e 1×10^{-4} M. Come si potrà notare, il cambio di concentrazione influisce poco o nulla sull'assorbimento. Questo risultato implica che, alle concentrazioni misurate, anche per questi due peptidi le interazioni *intermolecolari* sono trascurabili.



Z-Aib₅-TOAC-Aib-OMe: A) 1.0mM; B) 0.1mM in CDCl₃

Fig. 3.18. Spettri di assorbimento IR di Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione $3500-3200$ cm⁻¹.



Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe: A) 1.0mM; B) 0.1mM in CDCl₃

Fig. 3.19. Spettri di assorbimento IR di Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10^{-3} M (A) e 1×10^{-4} M (B) nella regione 3500-3200 cm^{-1} .

3.2.2 Spettroscopia EPR

La caratterizzazione all'EPR ci è sembrata doverosa, visto il vero utilizzo dei nostri peptidi. Essa è stata condotta dal prof. Antonio Toffoletti (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova), che ha una notevole esperienza sugli studi EPR di peptidi contenenti sonde paramagnetiche.^{66,67} Sono state eseguite due analisi, a scopo dimostrativo, per due peptidi, uno contenente un solo TOAC e l'altro contenente due TOAC. Il motivo è semplice: vedere che differenza c'è quando un elettrone risente di un secondo elettrone relativamente vicino.

Per le analisi sono stati scelti i peptidi Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe. Riportiamo qui di seguito gli spettri ottenuti.

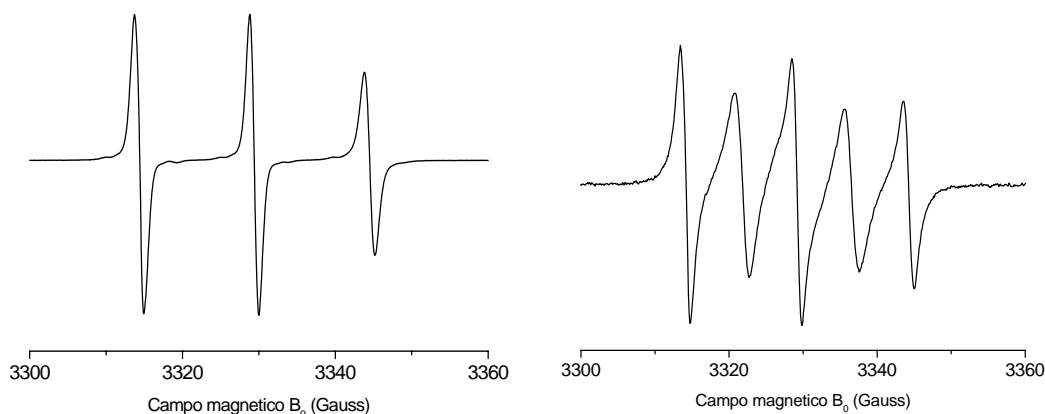


Fig. 3.20. Spettri EPR per *Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe* e *Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe*, rispettivamente, in cloroformio alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Analizzando gli spettri ottenuti possiamo dire come effettivamente si noti un cambiamento tra i due. I picchi che possiamo vedere sono in realtà delle derivate dei classici picchi che siamo abituati a vedere nell’NMR. Per il peptide con un solo TOAC vediamo 3 picchi; questi sono dovuti all’interazione iperfine dell’elettrone spaiato dell’ossigeno con il nucleo di ^{14}N . Sono 3 per il fatto che ^{14}N presenta un numero quantico di spin I pari a 1 e $m_I = -1, 0$ e $+1$ e di conseguenza l’interazione iperfine deve dare 3 segnali.

Per il peptide contenente i due TOAC, cioè *Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe*, abbiamo uno spettro a 5 picchi. Si può notare come siano emersi due picchi intermedi all’interno dei 3 principali che avevamo visto prima. Questo fenomeno è dovuto al fatto che questa volta l’elettrone spaiato di un TOAC risente anche dell’elettrone spaiato sull’altro TOAC (interazione di scambio J) e viceversa. Allo stesso tempo, esso risente anche dell’altro nucleo di ^{14}N , dando così origine agli altri 2 picchi.

L’interazione iperfine è caratterizzata dalla costante a_N per l’interazione dell’elettrone con ^{14}N , e pari a circa 15.06 G (sia per il penta che per l’esapeptide). Ciò conferma che stiamo guardando sempre lo stesso sistema elettrone – ^{14}N . Sono visibili nello spettro anche delle piccole coppie di righe dovute all’interazione iperfine con due nuclei ^{13}C con costante $a_{^{13}\text{C}} = 8.13$ G e con altri due nuclei ^{13}C con costante $a_{^{13}\text{C}} = 5.40$ G.

Un’altra considerazione è che abbiamo solamente interazione J intramolecolari e non intermolecolari. Infatti gli spettri mostrano un sistema di segnali intensi e ben separati, ma non influenzati dalla possibile interazione tra TOAC di altre molecole.

Per concludere, dagli spettri EPR si nota come la distanza tra i due TOAC sia sufficientemente vicina per dare un ottimo segnale, senza che questo risulti eccessivamente alto o troppo debole. Questo perché se i due TOAC fossero troppo vicini vedremmo un solo picco, estremamente intenso, senza riuscire a vedere quelli interni. Nel caso invece fossero troppo lontani non avremmo le 5 righe, ma solamente tre. Se l'esapeptide (con due TOAC) fosse in conformazione estesa, la distanza tra i due nitrossidi sarebbe superiore ai 12 Å, limite oltre il quale non sarebbe possibile rilevare le 5 righe. Pertanto, anche se queste misure CW-EPR sono preliminari, si può ragionevolmente concludere che il peptide è ripiegato in una struttura elicoidale (probabilmente di tipo 3_{10}), in accordo con i risultati dell'indagine conformazionale condotta mediante assorbimento IR.

4. CONCLUSIONI

Il lavoro riportato in questa Tesi conferma che i peptidi elicoidali rigidi progettati e sintetizzati, basati su α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti, sono ottimi composti modello per testare e “calibrare” nuove metodologie spettroscopiche di indagine conformazionale. In particolare, i peptidi Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe sono ottimi substrati rigidi, di tipo 3₁₀ elicoidale, da sottoporre a studi conformazionali tramite la tecnica EPR detta PELDOR.

In sintesi, le conclusioni principali di questo lavoro sono le seguenti:

- La presenza di differenti gruppi protettori alle estremità dello spaziatore peptidico non sembra alterare significativamente la conformazione elicoidale adottata dal peptide. Pertanto, le sequenze peptidiche contenenti o basate su α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti si confermano essere degli ottimi candidati per la costruzione di strutture tridimensionali a conformazione controllata.
- L'indagine conformazionale in soluzione, condotta mediante assorbimento IR, ha indicato che i peptidi Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe, Z-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe e Z-(Aib)₆-TOAC-Aib-OMe assumono in prevalenza conformazioni elicoidali.
- Dall'indagine preliminare EPR, condotta solamente su Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe e Fmoc-TOAC-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe, si può concludere che le interazioni osservate tra residui di TOAC sono di tipo *intramolecolare*. Questo risultato è possibile solo se il peptide è ripiegato in struttura elicoidale, in accordo con l'analisi conformazionale condotta mediante assorbimento IR.

La necessità di disporre di sistemi conformazionalmente ben definiti, modulabili e sintetizzabili con relativa facilità, sta emergendo con evidenza in settori quali le analisi spettroscopiche e la chimica supramolecolare. E' quindi facile prevedere un ruolo importante per gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti, nonostante le difficoltà sintetiche.

BIBLIOGRAFIA

1. (a) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Valle, G., Cavicchioni, G., Précigoux, G., Aubry, A. e Kamphuis, J., *Biopolymers*, **33**, 1061 (1993); (b) Toniolo, C., Crisma, M. e Formaggio, F., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 627 (1996); (c) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. e Peggion, C., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **60**, 396 (2001).
2. Owenius, R., Engström, M., Lindgren, M., Huber, M., *J. Phys. Chem. A*, **105**, 10967 (2001).
3. (a) Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. e Bonora, G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7951 (1982); (b) Brückner, H. e Graf, H., *Experientia*, **39**, 528 (1983); (c) Nagaraj, R. e Balaram, P., *Acc. Chem. Res.*, **14**, 356 (1981); (d) Sansom, M. S. P., *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **55**, 139 (1991); (e) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Epand, R.F. e Epand, R.M., *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 1179 (2001).
4. (a) Toniolo, C., Formaggio, F., Crisma, M., Valle, G., Boesten, W. H. J., Schoemaker, H. E., Kamphuis, J., Temussi, P. A., Becker, E. L. e Précigoux, G., *Tetrahedron*, **49**, 3641 (1993); (b) Mossel, E., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Sonke, T., Roos, E. C., Broxterman, Q. B. e Kamphuis, J., *Lett. Pept. Sci.*, **5**, 43 (1998); (c) Rovero, P., Pellegrini, M., Di Fenza, A., Meini, S., Quartara, L., Maggi, C. A., Formaggio, F., Toniolo, C. e Mierke, D. F., *J. Med. Chem.*, **44**, 274 (2001); (d) Spisani, S., Traniello, S., Cavicchioni, G., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *J. Pept. Sci.*, **8**, 56 (2002).
5. (a) Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M., Valle, G., Toniolo, C., Bonora, G. M., Broxterman, Q. B. e Kamphuis, J., *Chem. Eur. J.*, **2**, 1104 (1996). (b) Polese, A., Mondini, S., Bianco, A., Toniolo, C., Scorrano, G., Guldi, D. M. e Maggini, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3446 (1999); (c) Oancea, S., Formaggio, F., Campestrini, S., Broxterman, Q. B., Kaptein, B. e Toniolo, C., *Biopolymers (Biospectroscopy)*, **72**, 105 (2003); (d) Antonello, S., Formaggio, F., Moretto, A., Toniolo, C. e Maran, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2874 (2003).
6. Yasutomi, S., Morita, T., Imanisci, Y., Kimura, S., *Science*, **304**, 1944 (2004).
7. Wen, X., Linton, R. W., Formaggio, F., Toniolo, C. e Samulski, E. T. *J. Phys. Chem. A*, **108**, 9673-9681 (2004).
8. (a) Bianco, A., Gasparri, F., Maggini, M., Misiti, D., Polese, A., Prato, M., Scorrano, G., Toniolo, C. e Villani, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7550 (1997); (b) Bianco, A., Corvaja, C., Crisma, M., Guldi, D.M., Maggini, M., Sartori, E. e Toniolo, C., *Chem. Eur. J.*, **8**, 1544 (2002).
9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, 3471 (1970).
10. Toniolo, C. e Benedetti, E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
11. Venkatachalam, C.M., *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968).

12. Toniolo, C., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 1 (1980). (b) Rose, G. D., Gierasch, L. M. e Smith, J. A., *Adv. Protein Chem.*, **37**, 1 (1985).
13. Marshall, G. R., in "*Intra-Science Chemistry Reports*", Vol. 5, Kharasch, N., Ed., Gordon e Breach, New York, p. 305 (1971).
14. Venkataram Prasad, B.V. e Sasisekharan, V., *Macromolecules*, **12**, 1107 (1979).
15. Paterson, Y., Rumsey, S. M., Benedetti, E., Némethy, G. e Scheraga, H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947 (1981).
16. Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Crisma, M., Bonora, G. M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2437 (1982).
17. Paterson, Y., Stimson, E. R., Evans, D. J., Leach, S. J. e Scheraga, H. A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982).
18. Toniolo, C., Bonora, G. M., Barone, V., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Grimaldi, P., Lelj, F., Pavone, V. e Pedone, C., *Macromolecules*, **18**, 895 (1985).
19. Gessmann, R., Brückner, H., Petratos, K., *J. Pept. Sci.*, **9**, 753 (2003).
20. (a) Karle, I. L. e Balaram, P., *Biochemistry*, **29**, 6747 (1990); (b) Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Santini, A., Crisma, M. e Toniolo, C., in "*Molecular Conformation and Biological Interactions*", Balaram, P. e Ramaseshan, S., Eds., Indian Academy of Sciences, Bangalore, p. 497 (1991).
21. Toniolo, C., Valente, E., Formaggio, F., Crisma, M., Piloni, G., Corvaja, C., Toffoletti, A., Martinez, G.V., Hanson, M.P., Millhauser, G.L., George, C. e Flippen-Anderson, J.L., *J. Pept. Sci.*, **1**, 45 (1995).
22. Smythe, M.L., Nakaie, C.R. e Marshall, G.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10555 (1996).
23. Hanson, P., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7618 (1996).
24. Flippen-Anderson, J.L., George, C., Valle, G., Valente, E., Bianco, A., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **47**, 231 (1996).
25. Hanson, P., Martinez, G., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Vita, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 271 (1996).
26. Hanson, P., Martinez, G., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Vita, C., *Mol. Phys.*, **95**, 957 (1998).
27. Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P., Millhauser, G.L., George, C., Deschamps, J.R. e Flippen-Anderson, J.L., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 119 (1999).
28. Anderson, D.J., Hanson, P., McNulty, J., Millhauser, G., Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6919 (1999).
29. Polese, A., Anderson, D. J., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Marchiori, F. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11071 (1999).

30. Corvaja, C., Sartori, E., Toffoletti, A., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Mazaleyrat, J.-P. e Wakselman, M., *Chem. Eur. J.*, **6**, 2775 (2000).
31. Milov, A.D., Tsvetkov, Yu.D., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Raap, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3843 (2000).
32. Bui, T. T. T., Formaggio, F., Crisma, M., Monaco, V., Toniolo, C., Hussain, R. e Siligardi, G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1043 (2000).
33. Toniolo, C., Formaggio, F., Crisma, M., Mazaleyrat, J.-P., Wakselman, M., George, C., Deschamps, J.R., Flippen-Anderson, J.L., Pispisa, B., Venanzi, M. e Palleschi, A., *Chem. Eur. J.*, **5**, 2254 (1999).
34. Epand, R.F., Epand, R.M., Monaco, V., Stoia, S., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1021 (1999).
35. Hideg, K. e Hankovszky, O.H., in “*Spin Labeling: Theory and Applications*”, Biological Magnetic Resonance series, Vol. 8, Berliner, L.J. e Reuben, J., Eds., Plenum Press, New York, p. 427 (1989).
36. Rozantsev, E.G., in “*Free Nitroxyl Radicals*”, Ulrich, H., Ed., Plenum Press, New York, (1970).
37. Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P. e Millhauser, G.L., *Biopolymers*, **50**, 239 (1999).
38. Sheh-Yi Sheu, Dah-Yen Yang, H. L. Selzle, and E. W., “*Energetics of hydrogen bonds in peptides*”, *PNAS*, **22**, Vol.100, 12683-12687, (2003).
39. Milov, D. A., Tsvetkov, Yu. D., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Raap J., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3784 (2001).
40. Sartori, E., Corvaja, C., Oancea, S., Formaggio, F., Crisma, M. and Toniolo, C., *ChemPhysChem*, **6**, 1472-1475 (2005).
41. Von Arx, E., Faupel, M. e Brugger, M., *J. Chromatogr.*, **120**, 224 (1976).
42. Neiman, M.B., Rozantsev, E.G., Mamedova, Y.G., *Nature*, **196**, 472 (1962).
b) *ibid.*, **200**, 256 (1963).
43. Seidemann, R. e Dulog, L., *Makromol. Chem.*, **187**, 2545 (1986).
44. Bucherer, H.T. e Lieb, V.A., *J. Prakt. Chem.* **141**, 5 (1934).
45. Dulog, L. e Wang, W., *Liebigs Ann. Chem.*, 301 (1992).
46. Seidemann, R. e Dulog, L., *Makromol. Chem.*, **187**, 2545 (1986).
47. Bucherer, H.T. e Lieb, V.A., *J. Prakt. Chem.* **141**, 5 (1934).
48. Rassat, A. e Rey, P., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 815 (1967).
49. Rozantsev, E.G., in “*Free Nitroxyl Radicals*”, Ulrich, H., Ed., Plenum Press, New York, (1970).
50. Weinkam, R.J. e Jorgensen, E.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 7028 (1971).
51. a) Carpino, L. A, Han, G. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5748 (1970). b) Carpino, L. A., Han, G. Y., *J. Org. Chem.*, **37**, 3404 (1972).
52. Bergmann, M., Zervas, L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65**, 1192 (1932).
53. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).

54. König, W., Geiger, R., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **103**, 788; **103**, 2024 (1970).
55. Toniolo, C.; Crisma, M. e Formaggio, F., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 627 (1996).
56. Crisma, M.; Valle, G.; Moretto, V.; Formaggio, F.; Toniolo, C. e Albericio, F., *Lett. Pept. Sci.*, **5**, 247 (1998).
57. Sheehan, J., Cruickshank, P. e Boshart, G., *Journal of Organic Chemistry*, **26**, 2525-2528 (1989).
58. Rich, D.H. e Singh, J., *The carbodiimide method* (1979), *In the peptides*, Vol.1 (ed. E. Gross e J. Meienhofer), Capitolo 5, Academic Press, Londra.
59. McGahren W.J. e Goodman M., *Tetrahedron*, **23**, 2017 (1967).
60. Jones, D.S., Kenner, G.W., Preston, J. e Sheppard, R.C., *J. Chem. Soc.*, 6227 (1965).
61. Formaggio, F., Broxterman, Q.B. e Toniolo, C., in "*Synthesis of peptides*", Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C., Eds., Thieme, Stuttgart, Houben-Weil: Methods of Organic Chemistry, Vol 22b, cap 10.3 (2002).
62. Bellamy, M., in "*The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*", Methuen, London (1956).
63. a) Palumbo, M., Da Rin, S., Bonora, G. M. e Toniolo, C. *Makromol. Chem.*, **177**, 1477 (1976); b) Bonora, G. M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R. R. e Stevens, E. S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 179 (1984).
64. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
65. Kennedy, D.F., Crisma, M., Toniolo, C. e Chapman, D., *Biochemistry*, **30**, 6541 (1991).
66. Wright, K., Sarciaux, M., de Castries, A., Wakselman, M., Mazaleyrat, J.P., Toffoletti, A., Corvaja, C., Crisma, M., Peggion, C., Formaggio, F. and Toniolo, C. *Eur. J. Org. Chem.*, **19**, 3133-3144 (2007).
67. Wright, K., Wakselman, M., Mazaleyrat, J.P., Franco, L., Toffoletti, A., Formaggio, F. and Toniolo, C. *Chem. Eur. J.*, **16**, 11160-11166 (2010).

Ringraziamenti

Ringrazio inizialmente il prof. Toniolo per avermi concesso di lavorare con lui e tutto il suo gruppo di ricercatori.

Un grazie particolare al prof. Formaggio per avermi pazientemente seguito fino alla fine di questo lungo percorso ed avermi incoraggiato fino in fondo.

Un altro grazie va ai miei carissimi compagni e colleghi di laboratorio che mi hanno aiutato e allietato per questo intero anno, in particolare a Matteo De Poli che mi ha seguito sin dall'inizio; Edoardo Longo, che è sempre stato di grande aiuto; ad Alessandro Moretto, saggio e dai consigli esperti; a Marta De Zotti, che mi ha aiutato a preparare il TOAC e non solo; a Cristina Peggion, che mi ha gentilmente ospitato nel suo ufficio per scrivere questa tesi ed era pronta ad ogni mia domanda; poi ringrazio Claudia, per le nostre chiacchierate; Haleh, per la simpatia e l'aver condiviso la cappa; Ilaria, per il sostegno reciproco per concludere questa Tesi.

Ringrazio inoltre per l'aiuto pratico e fondamentale nelle analisi strumentali: Barbara Biondi per "le masse", il prof. Antonio Toffoletti per gli spettri EPR e Renato Schiesari per gli spettri IR.

Un grazie particolare va anche ad Alessia, che mi è sempre stata vicina in ogni momento difficile.

Infine dedico tutti i miei sforzi e questa Tesi ai miei genitori, che più di chiunque altro mi è stato vicino e ha condiviso questa mia esperienza. Un grazie sincero.