



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 PER NUOVE
APPLICAZIONI SPETTROSCOPICHE**

RELATORE: CH.MO PROF. CLAUDIO TONIOLO

CONTRORELATORE: DR.SSA CARLA MAREGA

LAUREANDA: ENRICA VENTURELLI

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

A Matteo

INDICE

<i>Riassunto</i>	iii
<i>Abstract</i>	iv
<i>Abbreviazioni</i>	v
1. <i>INTRODUZIONE</i>	1
1.1. <i>Gli α-amminoacidi C^α-tetrasostituiti</i>	2
1.2. <i>Stereochimica dei peptidi</i>	4
1.3. <i>Preferenze conformazionali degli α-amminoacidi C^α-tetrasostituiti: le strutture elicoidali</i>	6
1.4. <i>Tecniche di analisi conformazionale innovative</i>	8
1.5. <i>Scopo della tesi</i>	10
2. <i>PARTE SPERIMENTALE</i>	
2.1. <i>Materiali e metodi</i>	11
2.1.1. <i>Reagenti e solventi</i>	11
2.1.2. <i>Strumentazioni e metodi</i>	12
2.2. <i>Sintesi e caratterizzazione</i>	14
2.2.1. <i>Sintesi di derivati dell' amminoacido L-Ala</i>	14
2.2.2. <i>Sintesi di derivati dell' amminoacido Aib</i>	15
2.2.3. <i>Sintesi dei peptidi della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl</i>	22
2.2.4. <i>Sintesi dell' amminoacido TOAC</i>	22
2.2.5. <i>Sintesi di derivati dell' amminoacido TOAC</i>	23
2.2.6. <i>Sintesi di omopeptidi costituita da Aib</i>	23
2.2.7. <i>Sintesi di peptidi contenenti l' amminoacido TOAC</i>	27
2.2.8. <i>Sintesi del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe</i>	28
3. <i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	
3.1. <i>Sintesi</i>	32
3.1.1. <i>Preparazione dell' amminoacido TOAC</i>	32
3.1.2. <i>Strategie di sintesi peptidica in soluzione adottate nel presente lavoro di Tesi</i>	34

3.1.3. Gruppi protettori delle funzioni ammidica e carbossilica	35
3.1.4. Metodi di attivazione	37
3.2. Indagini conformazionali sui peptidi della serie Boc-(Aib-L-Ala) _n -OBzl..	43
3.2.1. Assorbimento IR	43
3.2.2. Spettrometria ¹ H NMR	50
3.2.2. Dicroismo Circolare	52
3.3. Indagini conformazionali sui peptidi contenenti TOAC	57
3.3.1. Assorbimento IR	57
3.3.2. Spettrometria ¹ H NMR	66
3.3.3. Diffrazione dei raggi X.....	68
4. CONCLUSIONI.....	70
BIBLIOGRAFIA	71

RIASSUNTO

In questa Tesi si riportano la sintesi, la caratterizzazione e le analisi conformazionali in soluzione di due serie peptidiche:

- a) i tre esapeptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e *p*BrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e
- b) i tre nonapeptidi Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe.

L'interesse per questi peptidi discende dalla loro tendenza ad assumere conformazioni elicoidali stabili, adatte a calibrare tecniche spettroscopiche innovative. In particolare, gli esapeptidi saranno impiegati per studi conformazionali in fase gas dal Dr. Michel Mons (centro di ricerche CEA – Saclay, Francia) mediante la tecnica spettroscopica “IR and UV double resonance spectroscopy”. I nonapeptidi invece saranno sottoposti ad indagine conformazionale mediante spettroscopia EPR ad alta frequenza (95 GHz) sfruttando la tecnica impulsata PELDOR (Prof. Martina Huber, Leiden, Olanda).

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, dicroismo circolare e spettrometria NMR 1D e 2D) è emerso che i peptidi esaminati assumono conformazioni elicoidali destrogire, prevalentemente di tipo 3₁₀. Tale conclusione è supportata dalla risoluzione della struttura tridimensionale allo stato cristallino di Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe, che adotta una struttura elicoidale 3₁₀ regolare.

ABSTRACT

In this Thesis the synthesis, chemical characterization and conformational analysis in solution of two series of peptides is presented:

- a) three hexapeptides Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl and *p*BrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl;
- b) three nonapeptides Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe and Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe.

These peptides, rich in C^α-tetrasubstituted amino acids, generate an ordered helical structure of great stability, that may be used to calibrate new spectroscopic techniques.

In particular, Dr. Michel Mons (CEA – Saclay, France) will study gas phase 3D-structure of hexapeptides, using “IR and UV double resonance spectroscopy”. Nonapeptides will be studied by high frequency (95 GHz) EPR, using PELDOR technique (Prof. Martina Huber, Leiden, The Netherlands).

These peptides were prepared using total solution synthesis, both “step by step” and “fragment condensation” approach.

Conformational analysis in solution (IR, CD, 1D and 2D NMR) confirmed that these peptides adopt a helical conformation, primarily 3₁₀- helical type.

This conclusion is also supported by the crystal structure of Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe, that adopts a 3₁₀-helical structure.

ABBREVIAZIONI

Ac	= acetile
(Ac) ₂ O	= anidride acetica
AcOEt	= acetato di etile
Aib	= acido α -amminoisobutirrico
Ala	= alanina
Boc	= <i>tert</i> -butilossicarbonile
CD	= dicroismo circolare
CH ₃ CN	= acetonitrile
CH ₂ Cl ₂	= diclorometano
CHCl ₃	= cloroformio
DIEA	= diisopropiletliamina
DMSO	= dimetilsolfossido
EDC	= N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide
ESI	= electrospray ionization
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
HPLC	= cromatografia liquida ad alte prestazioni
IR	= infrarosso
MeOH	= metanolo
NMM	= N-metilmorfolina
NMR	= risonanza magnetica nucleare
OBzl	= benzilossi
OMe	= metossi
OSu	= 1-oxy-succinimmide
OXL	= 5(4 <i>H</i>)-ossazolone
pBrBz	= para-bromobenzoile

Rf	= fattore di ritenzione
ROESY	= spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
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
Xxx	= amminoacido generico
Z	= benzilossicarbonile o carbobenzossi

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

1. INTRODUZIONE

La possibilità di progettare e realizzare strutture molecolari la cui disposizione spaziale sia prevedibile con precisione sta assumendo un'importanza crescente in vari settori della chimica. In particolare, le strutture peptidiche rigide (*scaffold*) appaiono come substrati ideali su cui testare e calibrare nuove tecniche di analisi conformazionale. In questo contesto rivestono un ruolo di primo piano gli α -amminoacidi C^α -*tetrasostituiti*, in grado di assumere strutture tridimensionali rigide e prevedibili.¹ Essi sono così denominati perché, a differenza degli α -amminoacidi proteici (C^α -*trisostituiti*), hanno l'atomo di carbonio in α tetrasostituito (Fig. 1.1).

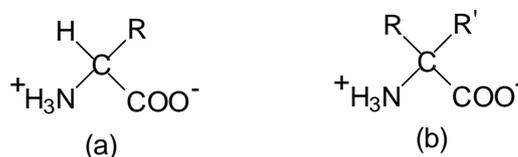


Fig. 1.1. Formula di struttura di un α -amminoacido C^α -tri- (a) ed uno C^α -tetrasostituito (b).

Questo Laboratorio ha un'esperienza trentennale nella chimica e gli studi conformazionali di peptidi ricchi in amminoacidi C^α -tetrasostituiti. Proprio per tale ragione è stato recentemente contattato da due gruppi di ricerca stranieri (dr. Michel Mons e prof. Martina Huber), interessati ad utilizzare tale tipo di molecole come substrato modello per le loro innovative tecniche spettroscopiche. Il gruppo di ricerca del dr. Mons (centro di ricerche CEA – Saclay, Francia) ha sviluppato una nuova tecnica in grado di rilevare la presenza di elementi di struttura secondaria anche in catene peptidiche corte.^{2,3} Il gruppo di ricerca della prof. Huber (Huygens Laboratory – Leiden University – Leiden, The Netherlands) invece, che dispone di strumentazione EPR ad alto campo (94 MHz), intende applicare la tecnica PELDOR (pulsed electron-electron double resonance) allo studio conformazionale di peptidi contenenti sonde paramagnetiche.⁴

Obiettivo primario del presente lavoro di Tesi è dunque la realizzazione di strutture molecolari peptidiche rigide, dotate di opportune sonde o caratteristiche, la cui geometria tridimensionale sia non solo ben definita, ma anche modulabile. Tali sistemi dovrebbero essere infatti dei substrati ideali per le tecniche sopra citate.

In particolare, sono stati ideati e realizzati peptidi elicoidali di tipo 3_{10} , basati sull' α -amminoacido C^α -tetrasostituito Aib (Fig. 1.2), forte promotore di strutture elicoidali. Per il progetto relativo al dr. M. Mons è stata inoltre legata una sonda UV (un gruppo benzilico) all'estremità C-terminale dei peptidi, mentre per il progetto della prof. M. Huber è stato utilizzato come sonda EPR l' α -amminoacido TOAC (Fig. 1.2).

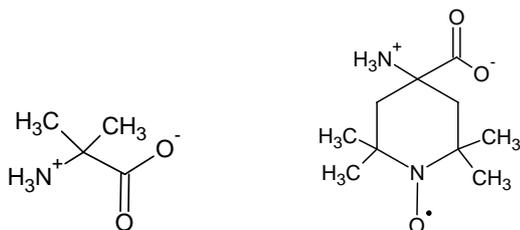


Fig. 1.2. Formula di struttura degli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti Aib (acido α -amminoisobutirrico) e TOAC (acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico).

Alla luce di quanto esposto si ritiene utile nella presente Introduzione fornire alcune informazioni sulle peculiarità degli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti e sulla stereochimica dei peptidi che li contengono. Saranno quindi brevemente illustrate le tecniche spettroscopiche usate dal dr. M. Mons e dalla prof. M. Huber

1.1. Gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti

L'interesse per gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti è motivato da diverse ragioni:

- Alcuni membri di questa famiglia sono presenti in natura nelle sequenze di un importante gruppo di antibiotici peptidici denominati peptaibolici.⁵
- 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 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".⁶

- È possibile sfruttare la notevole stabilità e rigidità delle strutture peptidiche ricche in α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti per costruire *spaziatori*^{7,8} e *templati*^{9,10} molecolari.

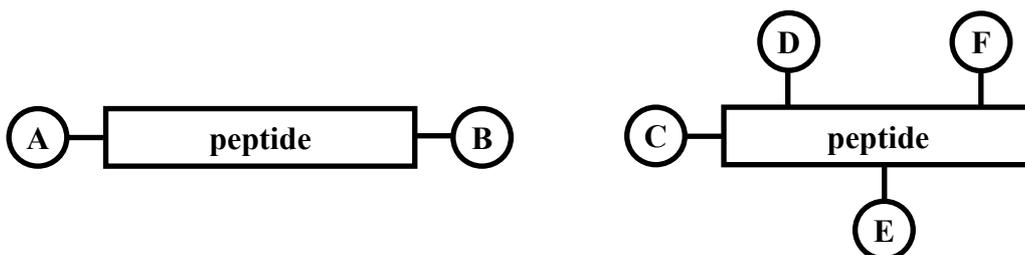


Fig. 1.3. Rappresentazione schematica di uno spaziatore (a sinistra) e un template (a destra).

Gli *spaziatori* (Fig. 1.3) sono sistemi molecolari “lineari” costituiti da peptidi alle cui estremità sono collocate opportune sonde molecolari (A e B in Fig. 1.3), che vengono così a trovarsi separate da una distanza ben definita e modulabile (variando la lunghezza del peptide). Nei *templati*, invece, si sfruttano anche (o solamente) le catene laterali dei singoli residui, ancorando ai peptidi rigidi due o più raggruppamenti chimici in "orientazioni spaziali" e distanze relative definite e variabili (C, D, E e F in Fig. 1.3). Val la pena ricordare che gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti consentono di costruire strutture secondarie stabili e rigide impiegando un numero decisamente minore (6-8) di residui rispetto a quanto sarebbe richiesto utilizzando α -amminoacidi proteici (circa 15).

Rispetto ad altre strutture molecolari (ad es. steroidi, polimeri sintetici) i peptidi offrono alcuni vantaggi nell'impiego come spaziatori e templati. In particolare, essi possono assumere strutture secondarie rigide stabilizzate da legami ad idrogeno intramolecolari. Inoltre, essi consentono di variare discretamente la distanza tra le due estremità dello spaziatore o tra le catene laterali semplicemente variando il numero di amminoacidi.

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. 1.4) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica.¹¹

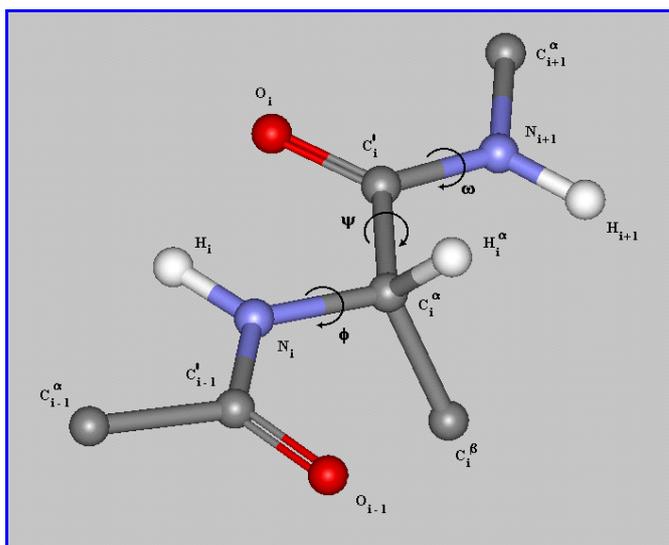


Fig. 1.4. Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ($\phi_i = \psi_i = \omega_i = 180^\circ$) e il residuo centrale è in configurazione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

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 amminoacidi 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} .¹² L' α -elica (Fig. 1.5a) è caratterizzata da 3.63 residui per giro ed è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo $C=O$ di un residuo in posizione i e il gruppo $N-H$ in posizione $i+4$ ($i \leftarrow i+4$) (Fig. 1.6), che formano così cicli di 13 atomi (ripiegamenti α o strutture C_{13}). L'elica 3_{10} (Fig. 1.5b) ha 3.24 residui amminoacidici per giro. È

stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo C=O in posizione i e il gruppo N-H in posizione $i+3$ ($i \leftarrow i+3$) (Fig. 1.6), che formano così cicli di 10 atomi (ripiegamenti $\beta^{13,14}$ o strutture C_{10}). L'elica 3_{10} risulta più stretta (Fig. 1.5c) e allungata rispetto all' α -elica. I parametri che caratterizzano le due strutture sono riportati in Tabella 1.1.¹¹

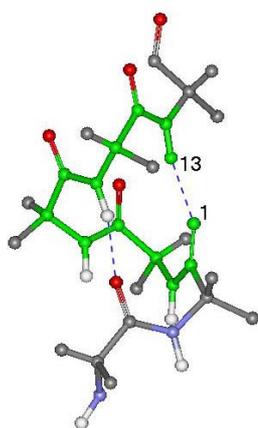


Fig. 1.5a. Elica α destrogira.

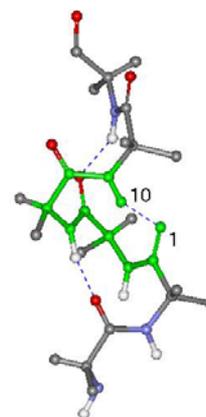


Fig. 1.5b. Elica 3_{10} destrogira.

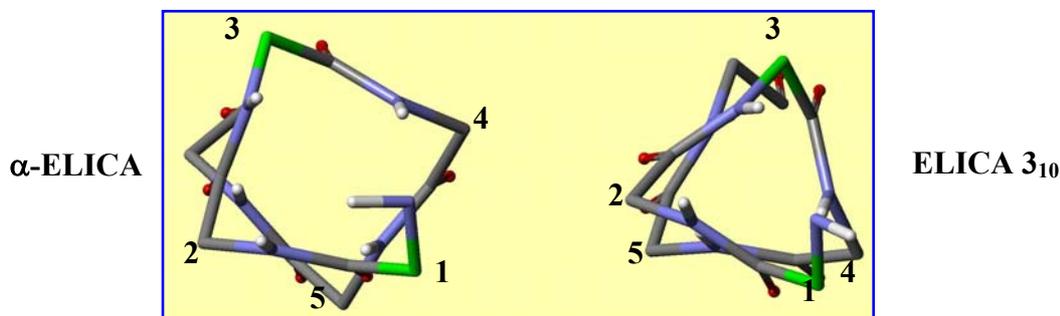


Fig. 1.5c. Proiezioni lungo l'asse dell' α -elica (a sinistra) e dell'elica 3_{10} (a destra).

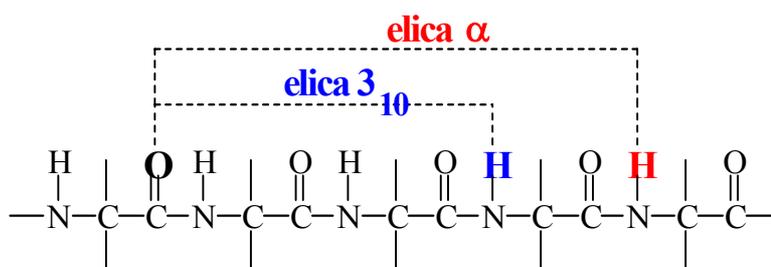


Fig. 1.6. Legami a idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche (α e 3_{10}).

Tabella 1.1 Parametri delle eliche destrogire di tipo 3₁₀ e α .

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

1.3. Preferenze conformazionali degli α -amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti: le strutture elicoidali

Calcoli di energia conformazionale¹⁵⁻¹⁷ sull'Aib (Fig. 1.7), 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. 1.5a) e di tipo 3₁₀ (Fig. 1.5b). 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 3₁₀ è quella preferita dagli omopeptidi dell'Aib.¹⁸⁻²¹

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 3₁₀, di tipo α , o “miste” (un segmento α -elicoidale preceduto e/o seguito da alcune strutture C₁₀). 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.²²

In particolare l' α -elica tende ad essere favorita al crescere della lunghezza di catena e al decrescere del contenuto in Aib (Fig. 1.7), 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} .

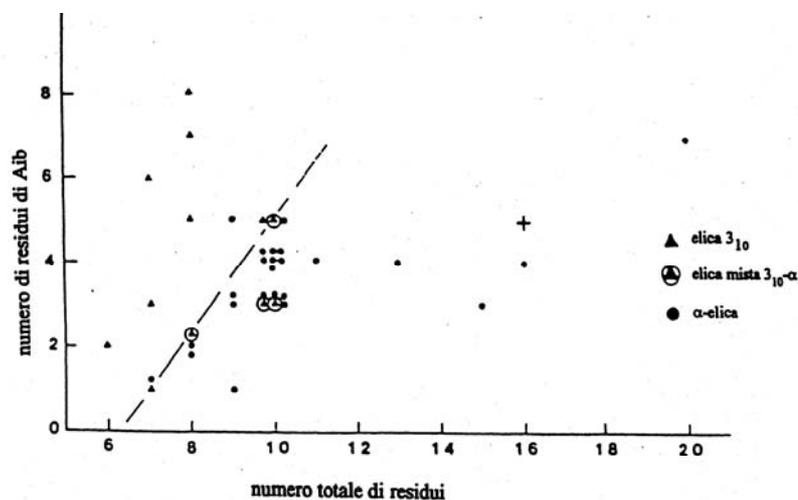


Fig. 1.7. Tipo di elica in funzione del numero totale di residui in un peptide e del numero totale di residui di Aib. La linea tratteggiata che separa le eliche 3_{10} dalle eliche α è stata tracciata arbitrariamente.²²

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 1.8) 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}

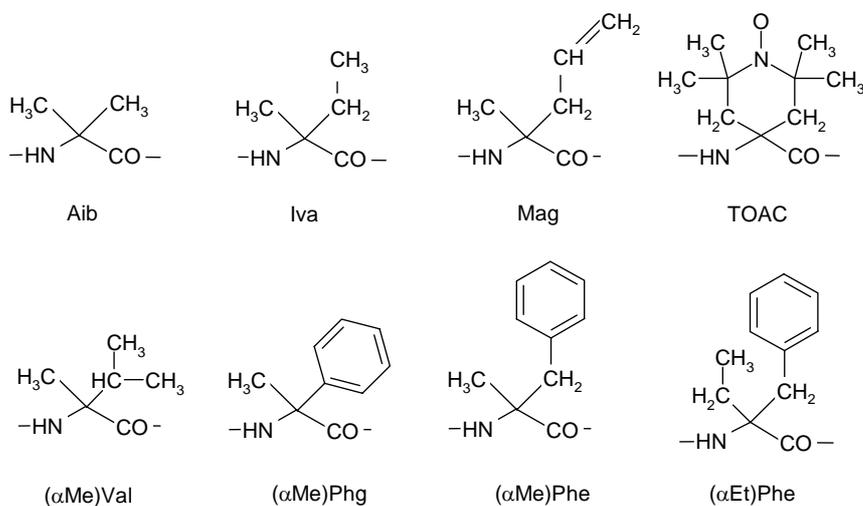


Fig. 1.8. α -Amminoacidi C^α -tetrasostituiti promotori di strutture elicoidali.

1.4. Tecniche di analisi conformazionale innovative

I peptidi sintetizzati nel presente lavoro di Tesi sono stati sottoposti ad analisi conformazionale tramite tecniche spettroscopiche classiche (spettrometria NMR, assorbimento IR e dicroismo circolare). Tuttavia, studi conformazionali preliminari sono già stati condotti dal dr. M. Mons e della prof. M. Huber, mediante le tecniche spettroscopiche innovative che vengono brevemente descritte di seguito.

La tecnica del dr. Mons prevede la vaporizzazione del campione peptidico tramite desorbimento laser, un successivo raffreddamento tramite espansione supersonica e quindi l'analisi tramite spettrometria di massa e spettroscopia laser nelle zone UV e IR. Secondo il dr. Mons con tale strumento è possibile registrare gli spettri IR di tutti i conformeri presenti durante la seconda fase del processo e di distinguerli in base alle proprietà UV. Inoltre, l'efficiente raffreddamento ottenuto con l'espansione supersonica porta ad una maggiore risoluzione sia negli spettri UV che IR; ad esempio, è possibile distinguere le bande di stretching dei vari NH presenti in un peptide. L'unica condizione per poter condurre questi esperimenti laser a doppia risoluzione (UV-IR) è la presenza di un anello aromatico all'interno della molecola. Una volta calibrata, sarà possibile estendere la tecnica anche allo studio di peptidi la cui struttura tridimensionale non sia nota a priori.

Se questo lavoro di Tesi (con le analisi del prof. Mons) avrà successo, è plausibile ritenere che in un futuro non lontano si possa affiancare alla spettrometria NMR, oggi la più utilizzata, una nuova metodologia per indagare la conformazione di peptidi e, auspicabilmente, proteine.

Il gruppo di ricerca della prof. Huber utilizza come tecnica di analisi conformazionale la spettroscopia ESR, in particolare la metodologia PELDOR. Questa tecnica non è nuova, ma si applicherà per la prima volta a peptidi rigidi, in conformazione elicoidale di tipo 3_{10} , utilizzando uno spettrometro ad alto campo (94 MHz). Il PELDOR prevede una particolare sequenza di impulsi (Fig. 1.9) che rendono tale tecnica più sensibile della usuale spettroscopia ESR in onda continua (CW-ESR). 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.

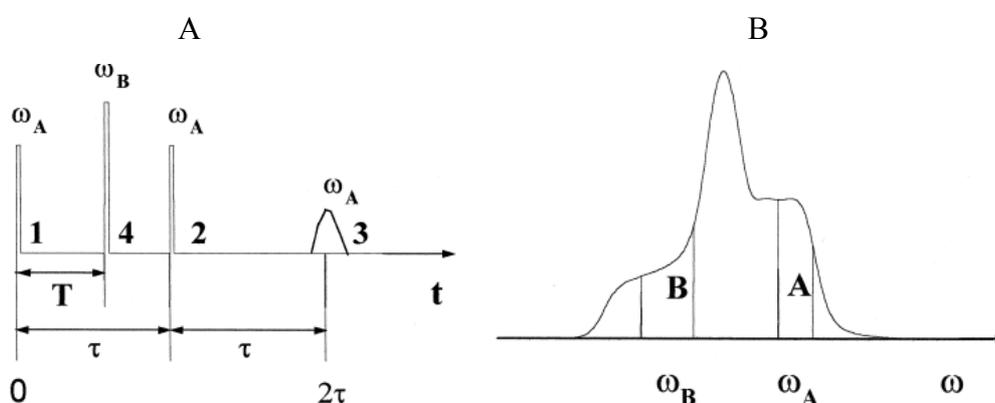


Fig. 1.9. Sequenza di impulsi(A): 1 e 2 “ESE-producing pulse”, 3 segnale ESE, 4 “pumping pulse”. Spettro ESR (B); le aree A e B rappresentano le zone dello spettro eccitate dai differenti impulsi²³.

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 nella 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.²³ 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.

1.5. Scopo della Tesi

Alla luce di quanto esposto nelle pagine precedenti, gli obiettivi che ci si è proposti di perseguire in questa Tesi possono essere schematicamente riassunti nei punti seguenti:

- Sintesi della sequenza peptidica Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, utile come substrato per testare e calibrare la tecnica del dr. M. Mons.
- Sintesi delle sequenze peptidiche Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe, adatte agli studi conformazionali condotti dal gruppo di ricerca della prof. M. Huber.
- Caratterizzazione conformazionale delle due serie peptidiche per determinare la struttura elicoidale assunta.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Materiali e metodi

2.1.1 Reagenti e solventi

Acros Organics (Geel, Belgio):

acido α -amminoisobutirrico, acido trifluoroacetico, L-alanina, alcol benzilico, anidride acetica, carbonato d'ammonio, catalizzatore 10% Pd/C, cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato, 1-idrossi-1H-benzotriazolo, iodio.

Baker (Deventer, Olanda):

acido acetico, piridina.

Carlo Erba (Milano):

acetato di etile, acetone, bisolfato di potassio, cloruro di sodio, cloroformio, diclorometano, dietilere, etere di petrolio (30-50°C), esano, ipoclorito di sodio, solfato di sodio anidro, trietilammina.

Fluka (Buchs, Svizzera):

acetonitrile, idrossido di bario ottaidrato, cianuro di sodio, cloruro di tionile, etanolo, idrossido di litio, N-metilmorfolina, 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazina.

GL Biochem (Shanghai):

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

Iris Biotech (Marktredwitz, Germania):

N-(benzilossicarbonilossi)-succinimide, N-etil-N'-(3-dimetilammino propil)-carbodiimide.

Lab Scan (Dublino, Irlanda):

diossano.

Merck (Darmstadt, Germania):

silice per cromatografia “flash”.

Prolabo (Parigi, Francia)

dimetilformammide, idrossido di sodio, metanolo.

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

acido trifluoroacetico, bicarbonato di sodio, 4-dimetilammino-
piridina, di-tertbutil-dicarbonato, perossido di idrogeno 30%, 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 TDM²⁴ (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.

Misure polarimetriche

Le misure polarimetriche sono state effettuate con il polarimetro Perkin-Elmer modello 241 equipaggiato con termostato Haake modello D8, impiegando una cella di cammino ottico 10 cm.

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 CDCl₃ 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 CDCl₃ sono stati effettuati utilizzando celle (Perkin-Elmer) con cammini ottici di 0.01, 0.1 e 1 cm e finestre di CaF₂.

Dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con il dicrografo Jasco modello J-715, utilizzando celle di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 0.01 cm. I valori sono espressi in ellitticità molare $[\Theta]$ ($\text{gradi} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) e sono stati calcolati dai dati spettrali per mezzo della seguente relazione:

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

dove Θ = ellitticità osservata

PM = peso molecolare totale del peptide

l = lunghezza del cammino ottico in cm.

c = concentrazione in gr/l

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

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

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 (doppietto), t (tripletto), m (multipletto), b (broad, segnale allargato).

2.2 Sintesi e caratterizzazione

Oltre ai prodotti di seguito descritti si è utilizzato il derivato Fmoc-Aib-OH già precedentemente sintetizzato nel nostro laboratorio.

2.2.1 Sintesi di derivati dell'amminoacido L-Ala

Boc-L-Ala-OH

Ad una sospensione di H-Ala-OH (15g, 168 mmol) in acqua si aggiunge TEA (46.8 ml, 336 mmol) e una soluzione di Boc₂O (40.37g, 185 mmol) in CH₃CN. Si lascia reagire per 24 ore. Si segue il decorso della reazione mediante TLC. Si aggiungono alla miscela di reazione NaHCO₃ soluzione acquosa al 5% e Et₂O per eliminare Boc₂O non reagito. Sotto agitazione si porta il pH della fase acquosa a 4 mediante aggiunte di KHSO₄ e si estrae 3 volte con AcOEt. La fase organica viene lavata 3 volte con una soluzione di KHSO₄ al 5%, 3 volte con acqua, anidrificata su Na₂SO₄ ed evaporata. Il prodotto precipita da AcOEt-etere di petrolio.

Resa: 84 %; **p.f.** 82-83 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁: 0.45; **Rf₂:** 0.70; **Rf₃:** 0.30.

[α]₃₆₅²⁰: -89.6°; **[α]₄₃₆²⁰:** -58.2°; **[α]₅₄₆²⁰:** -35.2°; **[α]₅₇₈²⁰:** -30.4° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3383, 1739, 1689, 1519 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 8.64 (sb, 1H, COOH); 5.09-5.07 (d, 1H, NH); 4.37-4.32 (t, 1H, α-CH); 1.45 (s, 12H, 9H Boc-CH₃, 3H β-CH₃ Ala)

Boc-L-Ala-OBzl

In un pallone si scioglie Boc-Ala-OH (8.51g, 45 mmol) in 60 ml di CH₂Cl₂ distillato e si aggiungono DMAP (0.55g, 4.5 mmol) e alcol benzilico (4.5ml, 43 mmol). Il pallone di reazione è raffreddato in bagno acqua-ghiaccio e si aggiunge EDC (9.39g, mmol). Si lascia reagire per 3 ore a 0°C e per 3 ore a temperatura ambiente. Si segue il decorso della reazione mediante TLC. Si elimina il solvente sotto vuoto ed il residuo viene ripreso con AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata 2 volte con soluzione satura di NaHCO₃, due volte con acqua, anidrificata ed evaporata. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia "flash". Si eluisce con etere di petrolio/AcOEt 11:1.

Resa: 62 %; **p.f.** 36-37 °C.

Rf₁: 0.90; **Rf**₂: 0.85; **Rf**₃: 0.65.

[α]₃₆₅²⁰: -115.6°; **[α]**₄₃₆²⁰: -72.4°; **[α]**₅₄₆²⁰: -42.2°; **[α]**₅₇₈²⁰: -36.2° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3422, 3398, 1742, 1714, 1522 cm⁻¹.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.35 (m, 5H, Bzl-fenile CH); 5.21-5.13 (m, 2H, Bzl-CH₂); 5.03 (s, 1H, NH); 4.36 (m, 1H, α-CH); 1.43 (s, 9H, Boc-CH₃); 1.40-1.38 (d, 3H, β-CH₃).

2.2.2 Sintesi di derivati dell'amminoacido Aib

Boc-Aib-OH

In un pallone, posto in bagno acqua-ghiaccio, si sospende H-Aib-OH (15.5g, 150 mmol) in una miscela diossano/NaOH 4N e si aggiunge Boc₂O (11g, 50 mmol). Si lascia reagire per 8 ore a temperatura ambiente. Alla miscela di reazione si aggiunge una soluzione di Boc₂O (11g, 50 mmol) in diossano (20 ml) e si lascia reagire per 8 ore a 60°C. Nel pallone di reazione si aggiunge Boc₂O (11g, 50 mmol) sciolto in diossano (20 ml) e si lascia reagire per 8 ore a temperatura ambiente, 8 ore a 60°C e due giorni a temperatura ambiente. Il pH della soluzione è mantenuto intorno a 10-11 mediante aggiunte di NaOH 2N.

Il solvente viene evaporato sotto vuoto, si aggiunge acqua e si estrae Boc₂O non reagito con Et₂O. Sotto agitazione si porta il pH della fase acquosa a 4 mediante aggiunte di KHSO₄ e si estrae 3 volte con AcOEt. La fase organica viene lavata 3 volte con acqua, anidrificata su Na₂SO₄ ed evaporata. Il prodotto precipita da AcOEt-etero di petrolio

Resa: 61 %; **p.f.** 119-120 °C.

Rf₁: 0.50; **Rf**₂: 0.75; **Rf**₃: 0.30.

IR (KBr): 3311, 1739, 1660, 1545 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 9.37 (sb, 1H, COOH); 5.11 (s, 1H, NH); 1.53 (s, 6H, 2 βCH₃); 1.44 (s, 9H, Boc-CH₃).

Z-Aib-OH

Ad una sospensione di H-Aib-OH (21 g, 200 mmoli) in .60 ml di H₂O si aggiunge sotto agitazione Z-OSu (51 g, 200 mmoli), sciolto in 50 ml di MeCN e TEA (28.4 ml, 200mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione, a temperatura

ambiente, per 3 giorni. Il solvente viene evaporato sotto vuoto e la soluzione diluita con NaHCO_3 al 5 %. Lo Z-OSu non reagito viene estratto con Et_2O e la fase acquosa viene acidificata a pH 3 con KHSO_4 solido. Si estrae il prodotto con AcOEt e si lava la fase organica più volte con acqua. Si anidrifca su Na_2SO_4 , si filtra e si evapora il solvente.

Resa: 75 %; **p.f.** 84-85 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁: 0.65; **Rf₂:** 0.90.

IR (KBr): 3317, 1719, 1674, 1550 cm^{-1} .

¹H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 11.38 (s, 1H, COOH); 7.34 (m, 5H, Z-fenile CH); 5.41 (s, 1H, NH); 5.10 (m, 2H, Z CH_2); 1.58 (s, 6H, 2 βCH_3).

HCl·H-Aib-OMe

Un pallone contenente 120 ml di MeOH viene portato a -14°C. Si aggiunge molto lentamente, sotto agitazione, SOCl_2 (14.2 ml, 195.5 mmol) e H-Aib-OH (17.55 g, 195.5 mmol). La soluzione viene lentamente riportata a temperatura ambiente e successivamente riscaldata a riflusso per 6 ore. Si spegne il riflusso e si lascia raffreddare per qualche ora. Si evapora il solvente sotto vuoto fino a precipitazione del prodotto. Il prodotto viene ricristallizzato da MeOH/etere di petrolio.

Resa: 80 %; **p.f.** 190-192 °C.

Rf₁: 0.35; **Rf₂:** 0.55; **Rf₃:** 0.10.

IR (KBr): 3432, 1754, 1625, 1517 cm^{-1} .

¹H NMR (DMSO-d_6 , 200MHz): δ 8.75 (s, 3H, NH_3^+); 3.74 (s, 3H, OMe); 1.47 (s, 6H, 2 βCH_3).

Fmoc-Aib-F²⁵

Ad una soluzione di Fmoc-Aib-OH (65 mg, 0.2 mmol) in CH_2Cl_2 distillato, si aggiunge 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazina (34 μl , 0.4 mmol) e piridina (16 μl , 0.2 mmol). Si tiene sotto agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. Si diluisce la miscela di reazione con CH_2Cl_2 e si lava velocemente la fase organica con acqua fredda. Si anidrifca su Na_2SO_4 , si filtra e si tira a secco.

Resa: 85 %; **p.f.** 118-120 °C.

I dati spettroscopici sono identici a quelli riportati in letteratura.³⁰

2.2.3 Sintesi dei peptidi della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl

Boc-Aib-L-Ala-OBzl

Ad una soluzione di H-Ala-OBzl (ottenuto per trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 5 g, 17.9 mmol del corrispondente Boc-derivato) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (3 ml, 26.8 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Boc-Aib-OH (5.49 g, 26.8 mmol), EDC·HCl (5.15 g, 26.8 mmol) ed HOAt (3.65 g, 26.8 mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Dopo 3 giorni si evapora il solvente sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia "flash". Si eluisce con etere di petrolio/AcOEt 2:1.

Resa: 86 %; **p.f.** 86-87 °C.

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

[α]₃₆₅²⁰: +66.2°; **[α]₄₃₆²⁰:** +80.8°; **[α]₅₄₆²⁰:** +91.6°; **[α]₅₇₈²⁰:** +94.2° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3321, 1751, 1718, 1688, 1650, 1529 cm⁻¹.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.35 (m, 5H, Bzl-fenile CH); 6.99 (s, 1H, NH); 5.20-5.13 (m, 2H, Bzl-CH₂); 4.86 (s, 1H, NH); 4.62-4.59 (m, 1H, α-CH Ala); 1.49-1.46 (m, 6H, β-CH₃ Aib); 1.43 (s, 9H, Boc-CH₃); 1.41-1.39 (d, 3H, β-CH₃ Ala).

Boc-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl

Ad una soluzione di H-Aib-Ala-OBzl (ottenuto per trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 2.73 g, 7.5 mmol del corrispondente Boc-derivato) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (1.6 ml, 15 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Boc-Ala-OH (2.14 g, 11.3 mmol), EDC·HCl (2.16 g, 11.3 mmol) ed HOAt (1.54 g, 11.3 mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Si lascia reagire per 3 giorni, seguendo il decorso della reazione mediante TLC.

Si aggiunge alla miscela di reazione CH₂Cl₂ (300 ml) e si lava più volte la fase organica con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia "flash". Si eluisce con CH₂Cl₂/MeOH 20:1.

Resa: 55 %; **p.f.** 185-186 °C.

Rf₁: 0.65; **Rf**₂: 0.70; **Rf**₃: 0.35.

[α]₃₆₅²⁰: +22.2°; **[α]**₄₃₆²⁰: +51.2°; **[α]**₅₄₆²⁰: +75.2°; **[α]**₅₇₈²⁰: +80.2° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3403, 3394, 3291, 1744, 1682, 1650, 1529 cm⁻¹.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.35 (m, 5H, Bzl-fenile CH); 7.05 (s, 1H, NH); 6.55 (s, 1H, NH); 5.21-5.10 (m, 2H, Bzl-CH₂); 4.89 (s, 1H, NH); 4.59-4.55 (m, 1H, α-CH Ala); 4.03-3.99 (m, 1H, α-CH Ala); 1.52-1.32 (m, 21H, 6H β-CH₃ Ala, 6H β-CH₃ Aib, 9H Boc-CH₃).

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 436.53; [M+H]⁺_{sper.} = 436.23.

Boc-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl

Ad una soluzione di H-Ala-Aib-Ala-OBzl (ottenuto per trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 2.17 g, 5 mmol del corrispondente Boc-derivato) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (1.1 ml, 10 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Boc-Aib-OH (1.52 g, 7.5 mmol), EDC·HCl (1.44 g, 7.5 mmol) ed HOAt (1 g, 7.5 mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Si lascia reagire per 12 ore, seguendo il decorso della reazione mediante TLC.

Si aggiunge alla miscela di reazione CH₂Cl₂ (250 ml) e si lava più volte la fase organica con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si evapora il solvente ottenendo un precipitato. Si purifica il prodotto grezzo per cromatografia "flash" in AcOEt/etere di petrolio.

Resa: 61 %; **p.f.** 62-64 °C.

Rf₁: 0.50; **Rf**₂: 0.70; **Rf**₃: 0.20.

[α]₃₆₅²⁰: +2.1°; **[α]**₄₃₆²⁰: +31.8°; **[α]**₅₄₆²⁰: +56.2°; **[α]**₅₇₈²⁰: +61.4 (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3320, 1742, 1663, 1527 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.30 (m, 5H, Bzl-fenile CH); 6.60-6.58 (d, 1H, NH); 5.22-5.09 (m, 2H, Bzl-CH₂); 4.92 (s, 1H, NH); 4.60-4.49 (m, 1H, α-CH Ala); 4.17-4.06 (m, 1H, α-CH Ala); 1.54-1.41 (m, 27 H, 6H β-CH₃ Ala, 12H β-CH₃ Aib, 9H Boc-CH₃).

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 521.63; [M+H]⁺_{sper.} = 521.29.

Boc-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl

Ad una soluzione di H-(Aib-Ala)₂-OBzl (ottenuto per trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 2.17 g, 5 mmol del corrispondente Boc-derivato) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (1.5 ml, 6.9 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Boc-Ala-OH (0.53 g, 2.76 mmol), EDC·HCl (0.53 g, 2.76 mmol) ed HOBT (0.38 g, 2.76 mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Si lascia reagire per 12 ore, seguendo il decorso della reazione mediante TLC.

Si aggiunge alla miscela di reazione CH₂Cl₂ (200 ml) e si lava più volte la fase organica con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 63 %; **p.f.** 154-155 °C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.65; **Rf₃:** 0.20.

[α]₃₆₅²⁰: -13.8°; **[α]₄₃₆²⁰:** +24.4°; **[α]₅₄₆²⁰:** +52.6°; **[α]₅₇₈²⁰:** +58.4 (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3304, 1741, 1661, 1534 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.58 (d, 1H, NH); 7.39 (s, 1H, NH); 7.32 (m, 6H, 5 H Bzl-fenile CH e 1H NH); 6.85 (s, 1H, NH); 5.71 (s, 1H, NH); 5.20-5.05 (m, 2H, Bzl-CH₂); 4.60-4.47 (m, 1H, α-CH Ala); 4.22-4.06 (m, 1H, α-CH Ala); 3.94-3.82 (m, 1H, α-CH Ala); 1.52-1.33 (m, 30 H, 9H β-CH₃ Ala, 12H β-CH₃ Aib, 9H Boc-CH₃).

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 592.71 ; [M+H]⁺_{sper.} = 592.32.

Boc-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl

Ad una soluzione di H-Ala-(Aib-Ala)₂-OBzl (ottenuto per trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 655 mg, 1.1 mmol del corrispondente Boc-derivato) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (360 μl, 3.3 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Boc-Aib-OH (345 mg, 1.7 mmol), EDC·HCl (231 mg, 1.7 mmol) ed HOAt (326 mg, 1.7mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Dopo 3 giorni si evapora il solvente sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 79 %; **p.f.** 158-159 °C.

Rf₁: 0.50; **Rf**₂: 0.65; **Rf**₃: 0.15.

[α]₃₆₅²⁰: -0.6°; **[α]**₄₃₆²⁰: +17.4°; **[α]**₅₄₆²⁰: +28.1°; **[α]**₅₇₈²⁰: +30.6 (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3314, 1743, 1664, 1531 cm⁻¹.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.69 (s, 1H, NH Aib³); 7.31 (s, 5H, Bzl-fenile CH); 7.29 (s, 1H, NH Aib⁵); 7.23-7.21 (d, 1H, NH Ala⁴); 7.13-7.11 (d, 1H, NH Ala⁶); 6.58-6.57 (d, 1H, NH Ala²); 5.14-5.05 (m, 2H, Bzl-CH₂); 4.99 (s, 1H, NH Aib¹); 4.73-4.69 (m, 1H, α-CH Ala⁶); 4.47-4.43 (m, 1H, α-CH Ala⁴); 4.06-4.04 (m, 1H, α-CH Ala²); 1.59-1.31 (m, 36 H, 9H β-CH₃ Ala, 18H β-CH₃ Aib, 9H Boc-CH₃)

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 677.81 ; [M+H]⁺_{sp.} = 677.39

Ac-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl

Il prodotto si ottiene dal corrispondente Boc-derivato per rimozione del gruppo Boc (trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 230 mg, 0.34 mmoli) e successiva acetilazione del peptide sbloccato all' N-terminale con (Ac)₂O (al 50% in CH₂Cl₂). Si lascia sotto agitazione per 2 ore a temperatura ambiente e si tira a secco, riprendendo più volte con toluene, per eliminare l'eccesso di (Ac)₂O. Il prodotto precipita da AcOEt/etere di petrolio. Il prodotto viene purificato per cromatografia "flash" in AcOEt/MeOH.

Resa: 57 %; **p.f.** 178-179 °C.

Rf₁: 0.20; **Rf**₂: 0.65; **Rf**₃: 0.05

[α]₃₆₅²⁰: -10.4°; **[α]**₄₃₆²⁰: +13.6°; **[α]**₅₄₆²⁰: +26.2°; **[α]**₅₇₈²⁰: +31.8 (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3317, 1744, 1657, 1533 cm⁻¹.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.62 (s, 1H, NH); 7.56 (s, 1H, NH); 7.46-7.44 (d, 1H, NH); 7.32 (m, 8H, 5H Bzl-fenile CH e 3H NH); 5.15-5.07 (m, 2H, Bzl-CH₂); 4.56-4.53 (m, 1H, α-CH Ala); 4.27 (m, 1H, α-CH Ala); 3.98 (m, 1H, α-CH Ala); 2.04 (s, 3H, CH₃-Ac); 1.56-1.41 (m, 27H, 9H β-CH₃ Ala, 12H β-CH₃ Aib).

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 619.73 ; [M+H]⁺_{sp.} = 619.35

pBrBz-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl

Ad una soluzione di H-(Aib-Ala)₃-OBzl (ottenuto per trattamento con una miscela al 30% di TFA in CH₂Cl₂ di 127 mg, 0.19 mmol del corrispondente Boc-derivato) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (95 μl, 0.86 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio acido

para-bromo-benzoico (115 mg, 0.57 mmol), EDC·HCl (110 mg, 0.57 mmol) ed HOAt (77 mg, 0.57mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Dopo 4 giorni si evapora il solvente sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto. Il prodotto viene ricristallizzato da AcOEt/etere di petrolio.

Resa: 22 %; **p.f.** 207-208 °C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.75; **Rf₃:** 0.15.

[α]₃₆₅²⁰: +30.2°; **[α]₄₃₆²⁰:** +34.8°; **[α]₅₄₆²⁰:** +37.6°; **[α]₅₇₈²⁰:** +39.4 (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3340, 1734, 1649, 1533 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.98 (s, 1H, NH); 7.79-7.45 (3m, 8H, 4H pBrBz-fenile CH e 4H NH); 7.35-7.27 (m, 6H, 5H Bzl-fenile CH e 1H NH); 4.94 (s, 2H, Bzl-CH₂); 4.49-4.42 (m, 1H, α-CH Ala); 4.23-4.16 (m, 1H, α-CH Ala); 4.00-3.97 (m, 1H, α-CH Ala); 1.56-1.33 (m, 27 H, 9H β-CH₃ Ala, 18H β-CH₃ Aib).

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 760.74 ; [M+H]⁺_{sper.} = 761.24.

2.2.4 Sintesi dell'amminoacido TOAC

4-Oxo-TEMPO^{26,27}

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 anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

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

Rf₁: 0.90; **Rf₂:** 0.95.

IR (KBr): 1716 cm⁻¹.

TOAC-idantoina^{27,28}

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-etere di petrolio).

Rf₁: 0.75; **Rf₂:** 0.95.

IR (KBr): 1733, 1723 cm⁻¹.

H-TOAC-OH

Si sospendono TOAC-idantoina (20 g, 83 mmoli) e Ba(OH)₂·8 H₂O (78.5 g, 248 mmoli) in 400 ml di H₂O. Si lascia a riflusso sotto agitazione per 48 ore. Si raffredda la soluzione e si filtra una prima frazione di Ba(OH)₂. Alla soluzione si aggiungono 200 ml di acetone e si lascia riposare a freddo. Si filtra una seconda frazione di Ba(OH)₂ e si ripete questa operazione altre due volte. La soluzione viene acidificata a pH 6 con acido acetico al 50%. Il prodotto, che precipita da tale soluzione a freddo, viene filtrato e lavato con poca acqua fredda ed Et₂O.

Resa: 85 %; **p.f.:** 228-230 °C.

Rf₂: 0.60

IR (KBr): 3430, 1614 cm⁻¹.

2.2.5 Sintesi di derivati dell'amminoacido TOAC

Fmoc-TOAC-OH

Si sospendono H-TOAC-OH (8.21 g, 38.1 mmoli) e NaHCO₃ (3.20 g, 38.1 mmoli) in 150 ml di H₂O. A questa sospensione si aggiunge una soluzione di Fmoc-OSu (10.29 g, 30.5 mmoli) in 100 ml di diossano. Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente e al buio per 72 ore. Si evapora il diossano e si porta il pH a 8 con NaHCO₃. Si estrae Fmoc-OSu (che non ha reagito) con Et₂O. Si acidifica la fase acquosa con KHSO₄ fino a pH 3 e si estrae con AcOEt, lavando la fase organica con una soluzione di KHSO₄ al 10% e, successivamente, più volte con acqua. Si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

Resa: 96 %; **p.f.** 165-166 °C (da AcOEt-etere di petrolio).

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

IR (KBr): 3346, 1722 cm⁻¹.

Fmoc-TOAC-F²⁴

Ad una soluzione di Fmoc-TOAC-OH (0.26 g, 0.6 mmol) in CH₂Cl₂ distillato, si aggiunge 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazina (100 µl, 1.2 mmol) e piridina (50 µl, 0.6 mmol). Si tiene sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. Si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava velocemente la fase organica con acqua fredda. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

Resa: 85 %; **p.f.** 102-104°C.

Rf₁: 0.85.

IR (KBr): 1841 cm⁻¹.

2.2.6 Sintesi di omopeptidi costituiti da Aib

Z-(Aib)₂-OMe

Ad una soluzione di HCl·H-Aib-OMe (3.02 g, 186 mmol) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (6 ml, 558 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Z-Aib-OH (4.4 g, 186 mmol), EDC·HCl (3.6 g, 186 mmol) ed HOBt (2.5 g, 186 mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Dopo 2 giorni si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto. Il prodotto viene ricristallizzato da AcOEt/etere di petrolio.

Resa: 75 %; **p.f.** 110-111°C.

Rf₁: 0.70; **Rf₂:** 0.90; **Rf₃:** 0.30.

IR (KBr): 3365, 3280, 1724, 1712, 1655, 1519 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.36 (m, 5H, Z-fenile CH); 6.89 e 5.27 (2s, 2H, NH); 5.08 (s, 2H, Z CH₂); 3.72 (s, 3H, OMe); 1.51 (m, 12H, 4 βCH₃).

Z-(Aib)₂-OH

Si scioglie Z-(Aib)₂-OMe (1.39 g, 4.1 mmol) in MeOH (14 ml) e si aggiunge una soluzione di LiOH (0.35 g, 8.2 mmol) in H₂O (7 ml). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione per due ore a temperatura ambiente. Si acidifica la soluzione con HCl 1N fino a pH leggermente acido e si evapora il solvente. Si

diluisce la fase acquosa con KHSO_4 5% e si estrae il prodotto con AcOEt. La fase organica viene anidrificata e concentrata fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 94 %; **p.f.** 161-162 °C.

Rf₁: 0.25; **Rf₂:** 0.85.

IR (KBr): 3429, 3297, 1726, 1705, 1660, 1527 cm^{-1} .

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.37 (m, 5H, Z-fenile CH); 7.10 e 5.56 (2s, 2H, 2 NH); 5.15 (s, 2H, Z CH₂); 1.59 e 1.57 (2s, 12H, 4 βCH_3).

Z-(Aib)₂-OXL²⁹

Ad una soluzione ghiacciata di Z-(Aib)₂-OH (1.24 g, 3.8 mmoli) in MeCN (20 ml) si aggiunge EDC·HCl (0.88 g, 4.6 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 KHSO_4 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si tira a secco.

Resa: 85 %; **p.f.** 122-123 °C (da AcOEt/EP).

Rf₁: 0.90.

Z-(Aib)₃-OMe

Ad una soluzione di H-(Aib)₂-OMe (ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH di 1.3 g, 3.5 mmol del corrispondente derivato Z protetto) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge NMM fino a pH 8 (1.2 ml, 10.5 mmol) e estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Z-Aib-OH (345 mg, 1.7 mmol), EDC·HCl (231 mg, 1.7 mmol) ed HOAt (1.24 g, 5.25 mmol). Si mantiene il pH attorno ad 8 aggiungendo NMM. Dopo 3 giorni si evapora il solvente sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si lava più volte con KHSO_4 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄, ed evaporata. Il prodotto precipita da AcOEt/etere di petrolio.

Resa: 64 %; **p.f.** 145-146 °C.

Rf₁: 0.65; **Rf₂:** 0.85; **Rf₃:** 0.25.

IR (KBr): 3361, 1739, 1709, 1678, 1652, 1525 cm^{-1} .

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.36 (s, 5H, Z-fenile CH); 7.25, 6.33 e 5.23 (3s, 3H, NH); 5.10 (s, 2H, Z CH₂); 3.71 (s, 3H, OMe); 1.59-1.43 (m, 18H, 6 βCH_3)

Z-(Aib)₅-OMe

Ad una soluzione contenente H-(Aib)₃-OMe (ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH di 0.85 g, 2 mmoli, del corrispondente peptide Z-protetto) in MeCN anidro si aggiunge Z-(Aib)₂-OXL (0.82 g, 2.7 mmoli). La miscela viene posta a riflusso sotto agitazione per 3 giorni. Si filtra il precipitato e si pongono le acque madri a riflusso per altri 3 giorni. Si filtra il prodotto precipitato che viene lavato con poco MeCN freddo.

Resa: 72 %; **p.f.** 218-220°C.

Rf₁: 0.55; **Rf₂:** 0.75; **Rf₃:** 0.20.

IR (KBr): 3406, 3331, 3305, 3256, 1731, 1701, 1680, 1699, 1650, 1533.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.36 (m, 7H, 5H Z-fenile CH e 2H NH); 7.19, 6.31 e 5.29 (3s, 3H, NH); 5.11 (s, 2H, Z CH₂); 3.67 (s, 3H, OMe); 1.50-1.44 (m, 30H, 10 β CH₃).

Z-(Aib)₇-OMe

In un pallone si sciolgono H-(Aib)₅-OMe (ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH di 0.67 g, 1.1 mmol, del corrispondente peptide Z-protetto) e Z-(Aib)₂-OXL (0.56 g, 1.8 mmol) in MeCN anidro. Si pone la miscela di reazione a riflusso per 3 giorni. Il precipitato presente viene filtrato e lavato con MeCN freddo.

Resa: 72 %; **p.f.** 218-220°C.

Rf₁: 0.55; **Rf₂:** 0.75; **Rf₃:** 0.15.

IR (KBr): 3310, 1730, 1704, 1661, 1528.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃) δ 7.58 (m, 2H, NH); 7.49 (s, 3H, NH); 7.36 (m, 5H, 5H Z-fenile CH); 6.54 e 5.87 (2s, 2H, NH); 5.11 (s, 2H, Z CH₂); 3.66 (s, 3H, OMe); 1.52-1.42 (m, 42H, 14 βCH₃)

Z-(Aib)₉-OMe

Ad una soluzione di H-(Aib)₇-OMe (ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH di 0.2 g, 0.62 mmol, del corrispondente peptide Z-protetto) in MeCN anidro, si aggiunge Z-(Aib)₂-OXL (0.17 g, 0.6 mmol). Si pone la miscela di reazione a riflusso per 4 giorni. Il precipitato presente viene filtrato e lavato con MeCN freddo.

Resa: 89 %; **p.f.** 220-222°C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.70; **Rf₃:** 0.15.

IR (KBr): 3298, 1722, 1700, 1660, 1699, 1534 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.66-7.65 (m, 2H, NH); 7.64 (s, 1H, NH Aib⁸); 7.60 (s, 1H, NH); 7.51 (s, 1H, NH³); 7.49 (s, 1H, NH); 7.37 (s, 5H, Z-fenile CH); 7.36 (s, 1H, NH Aib⁹); 6.45 (s, 1H, NH Aib²); 5.55 (s, 1H, NH Aib¹); 5.13 (s, 2H, Z CH₂); 3.67 (s, 3H, OMe); 1.53-1.44 (m, 54H, 18 βCH_3).

Fmoc-(Aib)₉-OMe

Ad una soluzione di H-(Aib)₇-OMe (ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH di 40 mg, 0.043 mmol, del corrispondente peptide Z-protetto) in MeCN si aggiunge Fmoc-OSu (15 mg, 0.043 mmol) e TEA (8.6 μl , 0.043 mmol). Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 6 giorni, mantenendo il pH a 7 con TEA e aggiungendo ad aliquote ulteriori 1.5 equivalenti di Fmoc-OSu.

Si isola il prodotto mediante cromatografia flash, usando come eluente una miscela $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (16:1).

Resa: 27 %; **p.f.** 219-220°C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂:** 0.75; **Rf₃:** 0.15.

IR (KBr): 3295, 1735, 1703, 1656, 1534 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.19 (s, 1H, NH); 7.92-7.90 (d, 2H, Fmoc CH fluorenilici); 7.84 (s, 1H, NH); 7.75-7.35 (m, 12H, 6H Fmoc CH fluorenilici e 6H NH); 6.02 (1s, 1H, NH); 4.39-4.37 (d, 2H, Fmoc CH₂); 4.27 (m, 1H, Fmoc CH-9); 3.54 (s, 3H, OMe); 1.34 (m, 54H, 18 βCH_3).

MS (ESI-TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 1020.57$; $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sp.}} = 1020.52$

2.2.7 Sintesi di peptidi contenenti l'amminoacido TOAC

Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe

Si scioglie Fmoc-TOAC-F (0.22 g, 0.5 mmol) in CH_2Cl_2 distillato e si aggiunge H-(Aib)₇-OMe (ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH di 0.2 g, 0.25 mmol, del corrispondente peptide Z-protetto). Si lascia sotto agitazione per 3 giorni mantenendo il pH a 7 mediante aggiunte di TEA.

Si isola il prodotto mediante cromatografia flash, usando come eluente una miscela $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (15:1).

Resa: 39 %; **p.f.** 201-203°C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂**: 0.75; **Rf₃**: 0.15.

IR (KBr): 3320, 1737, 1662, 1529.

¹H NMR : Non possibile per la presenza della sonda paramagnetica.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 1047.59 ; [M+H]⁺_{sper.} = 1047.62

Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe

Si scioglie Fmoc-Aib-F (55 mg, 0.17 mmol) in CH₂Cl₂ distillato e si aggiunge H-TOAC-(Aib)₇-OMe (78 mg, 0.09 mmoli; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1). Si lascia sotto agitazione per 3 giorni mantenendo il pH a 7 mediante aggiunte di TEA.

Si isola il prodotto mediante cromatografia flash, usando come eluente una miscela CH₂Cl₂/EtOH (20:1).

Resa: 30 %; **p.f.** 159-161°C.

Rf₁: 0.50; **Rf₂**: 0.75; **Rf₃**: 0.15.

IR (KBr): 3431, 3323, 1662, 1529.

¹H NMR : Non possibile per la presenza della sonda paramagnetica.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 1132.65 ; [M+H]⁺_{sper.} = 1132.63

2.2.8 Sintesi del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe

Fmoc-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di HCl·H-Aib-OMe (5 g, 33 mmol) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge TEA (5 ml, 36 mmol) ed estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Fmoc-TOAC-OH (10.9 g, 25 mmol), EDC·HCl (4.8 g, 25 mmol) ed HOAt (3.4 g, 25 mmol). Dopo 12 ore si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 80 %; **p.f.** 159-161 °C.

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

IR (KBr): 3380, 3304, 1721, 1658, 1526 cm⁻¹.

Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe

Si scioglie Fmoc-Aib-F (9.6 g, 22 mmol) in CH₂Cl₂ distillato e si aggiunge H-TOAC-Aib-OMe (5.3 g, 17 mmoli; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1). Si mantiene il pH attorno a 7 mediante aggiunte di TEA. Dopo due giorni si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 85 %; **p.f.** 94-96 °C.

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

IR (KBr): 3353, 1740, 1706, 1684, 1522 cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di H-Aib-TOAC-Aib-OMe (5.2 g, 13 mmol; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge DIEA (3 ml, 18 mmol) ed estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Fmoc-Aib-OH (5.4 g, 16.7 mmol), EDC·HCl (3.2 g, 16.7 mmol) ed HOAt (2.3 g, 16.7 mmol). Dopo due giorni si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifca su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 55 %; **p.f.** 108-110 °C.

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

IR (KBr): 3339, 1740, 1673, 1525 cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di H-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe (2.5 g, 5.7 mmol; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge DIEA (1.3 ml, 7.5 mmol) ed estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂

raffreddato in bagno di ghiaccio Fmoc-Aib-OH (2.4 g, 7.4 mmol), EDC·HCl (1.4 g, 7.4 mmol) ed HOAt (1 g, 7.4 mmol). Dopo due giorni si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 51 %; **p.f.** 205-207 °C.

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

IR (KBr): 3328, 1733, 1705, 1664, 1527 cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di H-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe (1.2 g, 2.2 mmol; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge DIEA (0.2 ml, 1.1 mmol) ed estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Fmoc-Aib-OH (0.91 g, 2.8 mmol), EDC·HCl (0.54 g, 2.8 mmol) ed HOAt (0.39 g, 2.8 mmol). Dopo due giorni si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 48 %; **p.f.** 133-135 °C.

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

IR (KBr): 3326, 1740, 1665, 1527 cm⁻¹.

Fmoc-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe

Ad una soluzione di H-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe (0.59 g, 0.9 mmol; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1) in CH₂Cl₂ distillato si aggiunge DIEA (0.25 ml, 1.4 mmol) ed estere attivo formato sciogliendo in CH₂Cl₂ raffreddato in bagno di ghiaccio Fmoc-Aib-OH (0.39 g, 1.2 mmol), EDC·HCl (0.23 g, 1.2 mmol) ed HOAt (0.16 g, 1.2 mmol). Dopo tre giorni si diluisce la miscela di reazione con CH₂Cl₂ e si lava più volte con KHSO₄ 5 %, H₂O, NaHCO₃ 5 % e H₂O. Si anidrifica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra fino a precipitazione del prodotto.

Resa: 46 %; **p.f.** 143-145 °C.

Rf₁: 0.80; **Rf**₂: 0.85; **Rf**₃: 0.25.

IR (KBr): 3327, 1740, 1662, 1528 cm⁻¹.

Fmoc-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe

Si scioglie Fmoc-TOAC-F (0.3 g, 0.68 mmol) in CH₂Cl₂ distillato e si aggiunge H-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (0.25 g, 0.34 mmoli; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1). Si lascia sotto agitazione per 3 giorni mantenendo il pH a 7 mediante aggiunte di TEA.

Si isola il prodotto mediante cromatografia flash, usando come eluente una miscela CH₂Cl₂/EtOH.

Resa: 41 %; **p.f.** 157-159 °C.

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

IR (KBr): 3429, 1659, 1533 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 1159.67 ; [M+H]⁺_{sper.} = 1159.58.

Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe

Si scioglie Fmoc-Aib-F (55 mg, 0.17 mmol) in CH₂Cl₂ distillato e si aggiunge H-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (85 mg, 0.09 mmoli; ottenuto per trattamento con una miscela al 50% di DEA in CH₂Cl₂ del corrispondente Fmoc-derivato e successiva purificazione, eluendo su un letto di gel di silice prima con CH₂Cl₂ e successivamente con la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1). Si lascia sotto agitazione per 3 giorni mantenendo il pH a 7 mediante aggiunte di TEA.

Si isola il prodotto mediante cromatografia flash, usando come eluente una miscela CH₂Cl₂/EtOH.

Resa: 40 %; **p.f.** 166-168 °C.

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

IR (KBr): 3323, 1744, 1655, 1530 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 1244.72 ; [M+H]⁺_{sper.} = 1244.63.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi

3.1.1 Preparazione dell'amminoacido TOAC

L'amminoacido non naturale TOAC (acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico) utilizzato in questa Tesi è stato sintetizzato utilizzando la procedura di sintesi mostrata in Figura 3.1.

Il 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-one è stato ossidato con H_2O_2 in presenza di sodio tungstato³¹ a 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ossil-4-one (4-oxo-TEMPO). Dal chetone si è quindi passati alla spiroidantoina mediante sintesi di Bucherer-Lieb.³² Successivamente l'idantoina è stata idrolizzata ad amminoacido con idrossido di bario secondo la variante di Dulog e Wang³³, che prevede il riscaldamento per 24 ore a riflusso, anziché a $150\text{ }^\circ\text{C}$ in autoclave per 90 minuti. L'innalzamento ebullioscopico causato dall'idrossido di bario eleva comunque la temperatura di riflusso a $135\text{ }^\circ\text{C}$.

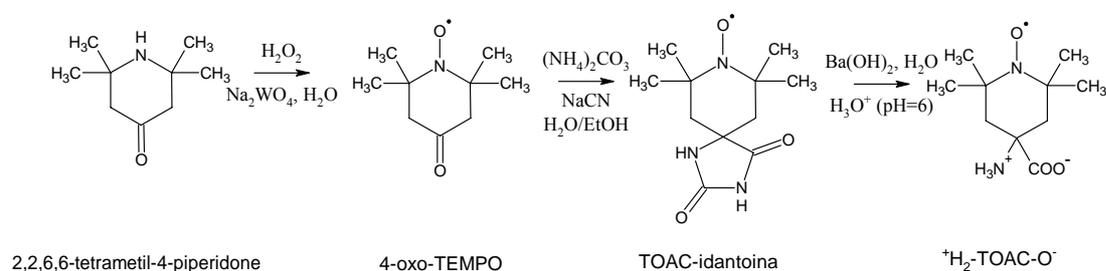
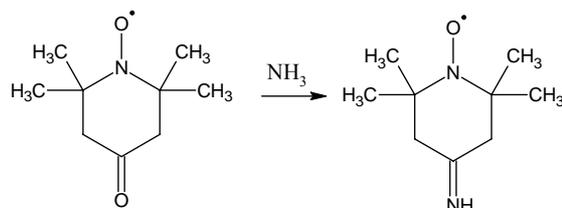


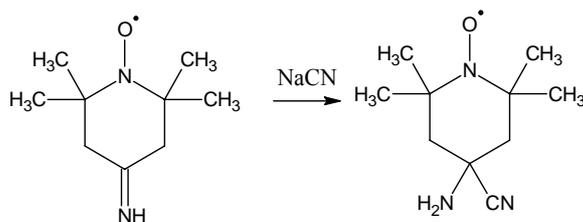
Fig. 3.1. Schema di sintesi dell'amminoacido TOAC.³⁴

Il meccanismo proposto per la sintesi di Bucherer-Lieb è il seguente:

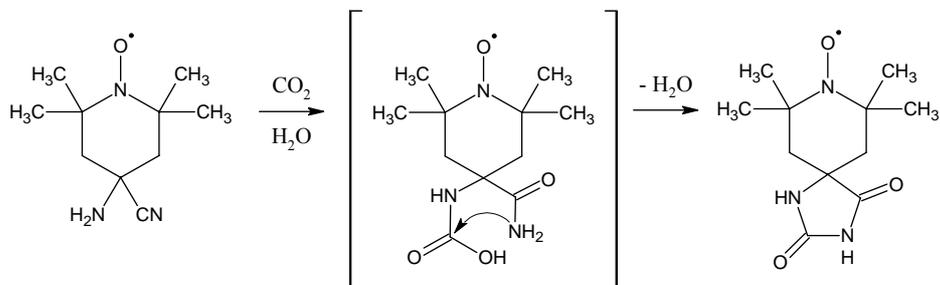
- formazione della base di Schiff o immina;



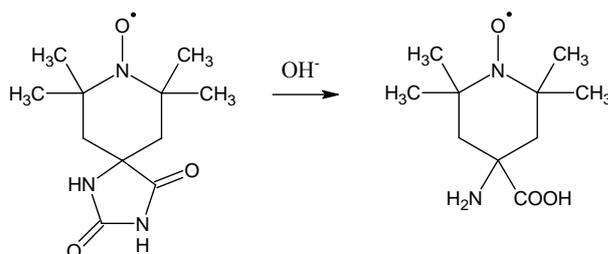
- reazione dell'immina con cianuro di sodio per ottenere l' α -ammino nitrile;



- formazione dell'intermedio idantoina;



- idrolisi dell'idantoina.



La classica sintesi di Strecker (Figura 3.2), che non passa per l'idantoina, non è proponibile per il TOAC. Infatti in questo caso, per idrolizzare l'ammino nitrile intermedio, che si ottiene dal chetone, non si possono usare nè condizioni fortemente acide nè fortemente basiche.

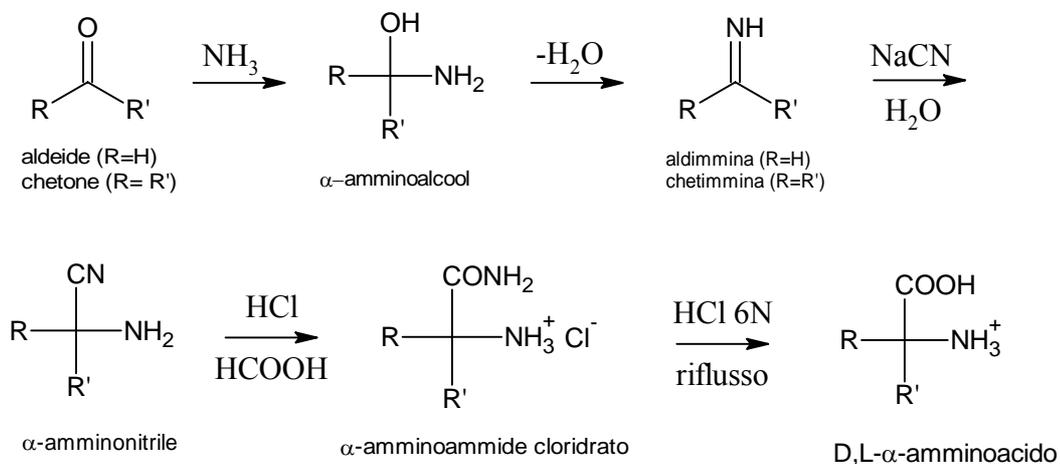


Fig. 3.2. Sintesi di Strecker degli α -amminoacidi.

Nel primo caso la protonazione del radicale libero favorisce il disproporzionamento (Figura 3.3) a derivato dell'idrossilammina e ^{36,37} $>N^+=O$ ione ossoammonio, con conseguente perdita del carattere radicalico. In ambiente fortemente alcalino, invece, l'equilibrio tra chetone e amminonitrile è spostato verso il composto carbonilico, come osservato per altri chetoni stericamente ingombri.

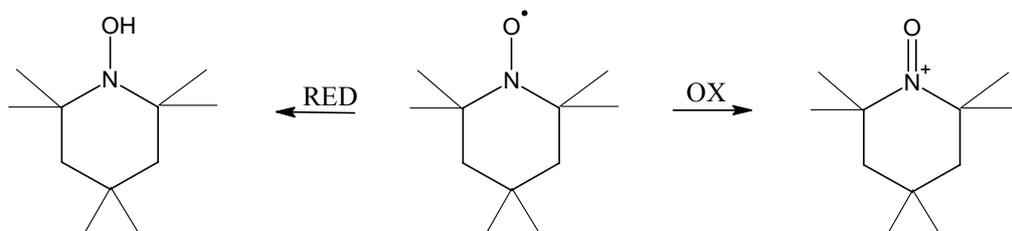


Fig. 3.3. Reazione di disproporzionamento del radicale libero del TOAC.

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

I peptidi descritti nella presente Tesi sono stati preparati con metodiche di sintesi in soluzione. Infatti la scarsa reattività degli amminoacidi C^α-tetrasostituiti, Aib e soprattutto TOAC che è maggiormente ingombro, rende problematico l'uso della tecnica di sintesi in fase solida.

La sintesi di un peptide in soluzione è normalmente condotta in modo sequenziale ("step by step"), cioè aggiungendo un amminoacido per volta partendo dal residuo C-terminale opportunamente protetto alla funzione carbossilica. Questa strategia è stata adottata per la sintesi dei peptidi appartenenti alla serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-Obzl, in quanto consente di minimizzare i rischi di racemizzazione (nel caso dell'amminoacido C^α-trisostituito alanina), soprattutto se l'amminoacido di volta in volta aggiunto è protetto al gruppo amminico da una funzione uretanica. Inoltre permette di preparare facilmente quantitativi rilevanti di peptidi corti. Tuttavia, tale approccio sintetico richiede tempi piuttosto prolungati per portare a termine la sintesi di un peptide.

Un'alternativa valida è rappresentata dalla sintesi per segmenti ("fragment condensation approach"). Questa tecnica è stata impiegata per ottenere i peptidi della serie Z-(Aib)_n-OMe (n= 3-5-7-9) in quanto offre l'indiscutibile vantaggio di ridurre i tempi di sintesi e consente di procedere in parallelo nella preparazione dei segmenti peptidici da condensare. Tuttavia, la condensazione di segmenti presenta maggiori rischi di racemizzazione e, a motivo della ridotta reattività di un segmento rispetto ad

un singolo residuo, richiede sovente condizioni di reazione drastiche che potrebbero compromettere alcune funzionalità dei reagenti. Fortunatamente, entrambi gli inconvenienti non rappresentano una preoccupazione con gli omopeptidi dell'Aib essendo tale amminoacido achirale e piuttosto stabile.

Avendo già a disposizione la sequenza omopeptidica $-(\text{Aib})_7-$, per i peptidi Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe si è utilizzata nuovamente la tecnica sequenziale, condensando Fmoc-TOAC-OH con H-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-OH con H-TOAC-(Aib)₇-OMe. Anche il peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe è stato sintetizzato in modo sequenziale. Infatti, i segmenti incorporanti il TOAC sono molto meno reattivi, per motivi sterici, dei segmenti composti di solo Aib.

3.1.3 Gruppi protettori delle funzioni amminiche e carbossiliche

Come gruppo N^α-protettore, durante la sintesi delle catene peptidiche intermedie di Aib, si è utilizzata la funzione uretanica Z³⁷, essenzialmente per 3 motivi:

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

Sintetizzando i peptidi contenenti TOAC si è passati ad impiegare il protettore uretanico Fmoc³⁸, che è il protettore amminico più impiegato per la sintesi peptidica in fase solida³⁹ (SPPS). La scelta è stata motivata dall'interesse di mantenere intatta l'integrità chimica della funzione radicalica. Infatti le condizioni di rimozione per idrogenolisi catalitica del gruppo Z comportano la riduzione del nitrossile a derivato dell'idrossilammina.

Ciò ha portato i seguenti vantaggi:

1. la possibilità di rimuovere tale protezione in condizioni basiche compatibili con la stabilità della funzionalità radicalica;

2. la presenza di un cromoforo aromatico, notevolmente utile per seguire il decorso delle reazioni mediante TLC.

La scelta di impiegare il protettore Fmoc ha comportato tuttavia anche alcuni problemi. In particolare:

1. le condizioni di coupling (presenza di ammina primaria libera) non sono molto dissimili da quelle di deprotezione, e tale reazione collaterale è inevitabile; la sua entità aumenta anche se vi è un eccesso di ammina terziaria, usata come base.
2. il dibenzofulvene formato per deprotezione del gruppo Fmoc è un blando elettrofilo e va rimosso per cromatografia-flash prima di ogni coupling, aggiungendo un ulteriore stadio alle operazioni richieste.

La funzione carbossilica C-terminale degli omopeptidi dell'Aib e dei peptidi contenenti l'amminoacido TOAC è stata protetta come estere metilico. Questo gruppo protettore è stato scelto in quanto stabile nelle condizioni di rimozione dei gruppi protettori Z e Fmoc.

Per quanto riguarda la serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl come gruppo N^α-protettore è stato utilizzato il Boc (*tert*-butilossicarbonile). La scelta di tale gruppo è stata motivata dalle seguenti proprietà:

1. è ortogonale all'estere benzilico utilizzato come C-protettore;
2. la rimozione in ambiente acido (TFA:CH₂Cl₂ 3:7) è praticamente quantitativa;
3. i sottoprodotti derivati dalla sua rimozione (isobutene e CO₂) si eliminano facilmente data la loro volatilità.

L'estere benzilico, protettore del gruppo carbossilico, è stato impiegato per i seguenti motivi:

1. il gruppo aromatico che assorbe nell'UV permette di seguire il decorso della reazione tramite TLC e di rendere la tecnica del prof. Mons applicabile a queste sequenze;
2. è ortogonale al gruppo Boc qui usato come N-protettore;
3. può venir facilmente rimosso per idrogenazione catalitica.

3.1.4. Metodi di attivazione

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

L'esperienza acquisita in questo Laboratorio nella sintesi di peptidi contenenti amminoacidi stericamente impediti ha portato all'individuazione di due gruppi di metodi di attivazione del gruppo carbossilico idonei a portare a compimento le sintesi "step by step" progettate in questa Tesi:

- i. *via* reagenti di coupling EDC/HOAt⁴⁰ o EDC/HOBt⁴¹

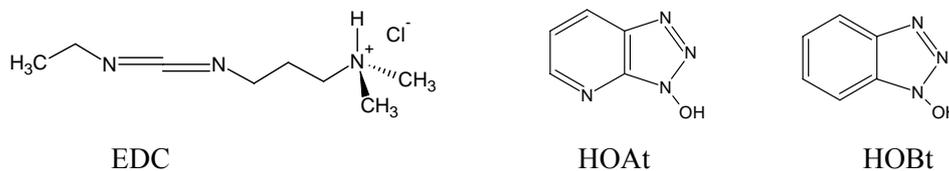


Fig. 3.4. Reagenti di coupling.

Mediante tali metodi si genera un estere attivo che viene immediatamente posto a reagire con il componente amminico, ed i coprodotti del coupling si eliminano dalla miscela di reazione tramite semplici lavaggi acidi o basici. Un coupling condotto utilizzando il presente metodo di attivazione richiede quindi un ridotto numero di operazioni tuttavia, se la reazione non decorre quantitativamente, l'estere attivo rimane in fase organica e si deve purificare il prodotto per precipitazione frazionata, oppure tramite cromatografia-flash.

In generale i coupling *via* EDC/HOAt o HATU risultano più rapidi dei coupling *via* EDC/HOBt. Tuttavia, poiché quest'ultimo reattivo è più economico, per coupling non particolarmente difficili eseguiti su grande scala può essere comunque conveniente usare quest'ultimo sistema. Infatti in molti casi si possono ottenere rese confrontabili lasciando reagire per un tempo più lungo la miscela e favorendo il decorso della reazione con aggiunte di aliquote successive di estere attivo.

- ii. *via* fluoruro acilico⁴²

Nella sintesi dei peptidi Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe è stato necessario impiegare un metodo di attivazione del gruppo

carbossilico più energetico rispetto al metodo via HOAt/EDC. Si è quindi fatto ricorso all'attivazione *via* fluoruro acilico⁴³, la cui elevata efficacia può essere attribuita a diversi fattori^{43,44}:

- (i) le piccole dimensioni del gruppo uscente, lo ione fluoruro;
- (ii) l'alta elettronegatività dell'atomo di fluoro che rende più elettrofilo il carbonio carbonilico;
- (iii) la minor propensione degli amminoacilfluoruri N-protetti, rispetto ad esempio ai corrispondenti cloruri, a reagire intramolecolarmente per dare i corrispondenti 5(4*H*)-ossazoloni (Fig. 3.5). Va ricordato infatti che la formazione di tali eterocicli è altamente favorita negli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti, a motivo dell'effetto *gem*-dialchile^{44,45} derivante dalla doppia catena laterale di tali amminoacidi.

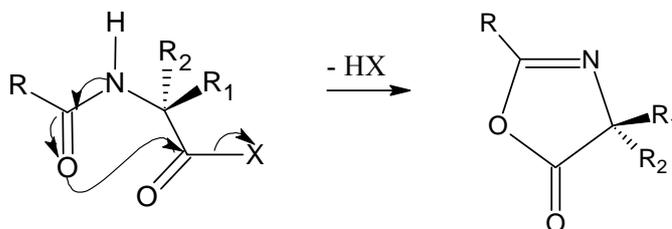


Fig. 3.5. Meccanismo di formazione dell'ossazolone durante la fase di attivazione del gruppo carbossilico.

Fmoc-Aib-F e Fmoc-TOAC-F (Figura 3.6) sono stati preparati dai corrispondenti acidi carbossilico per azione della 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazina (fluoruro di cianurile)⁴².

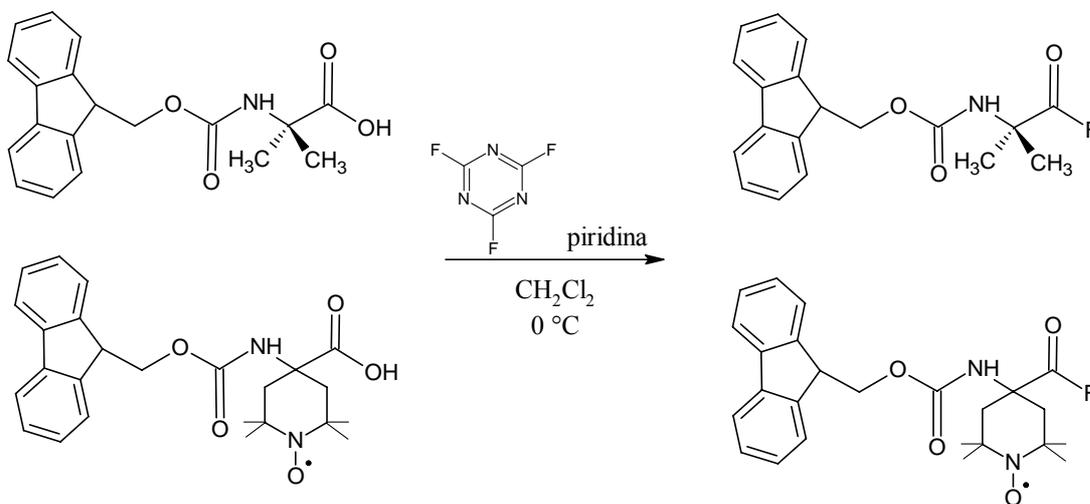


Fig. 3.6. Sintesi di Fmoc-Aib-F e Fmoc-TOAC-F.

I composti Z-Aib_n-OMe (n=3-9) sono stati invece ottenuti mediante sintesi a segmenti, attraverso l'attivazione della funzione carbossilica C-terminale come 5(4*H*)-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. La figura 3.7 illustra graficamente tale processo.

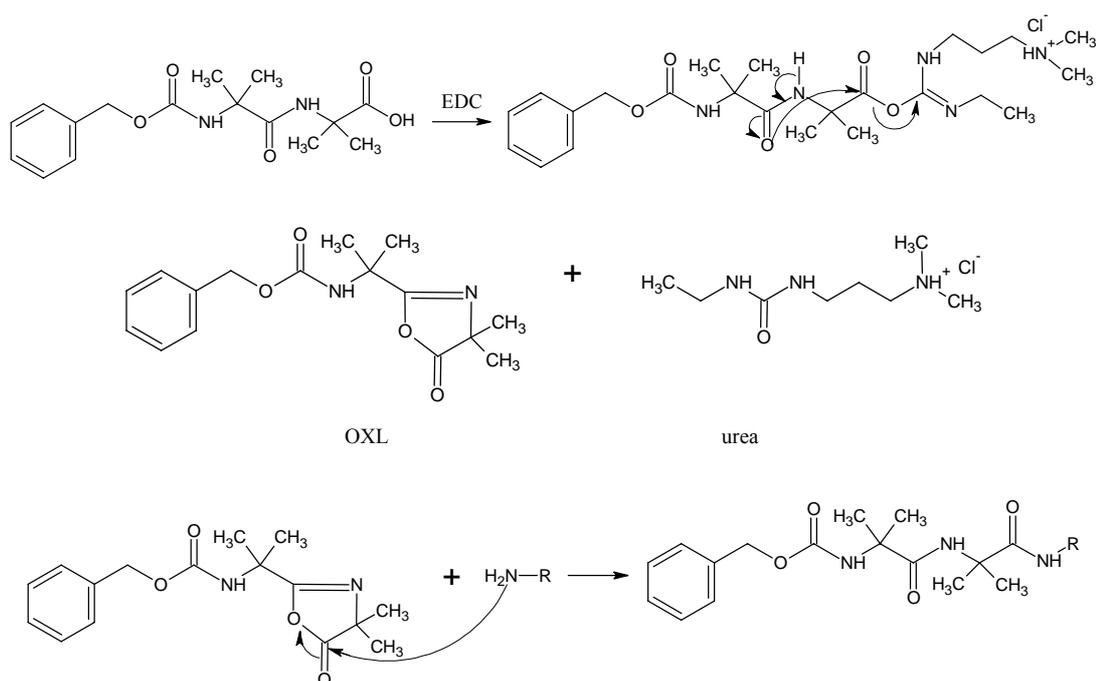
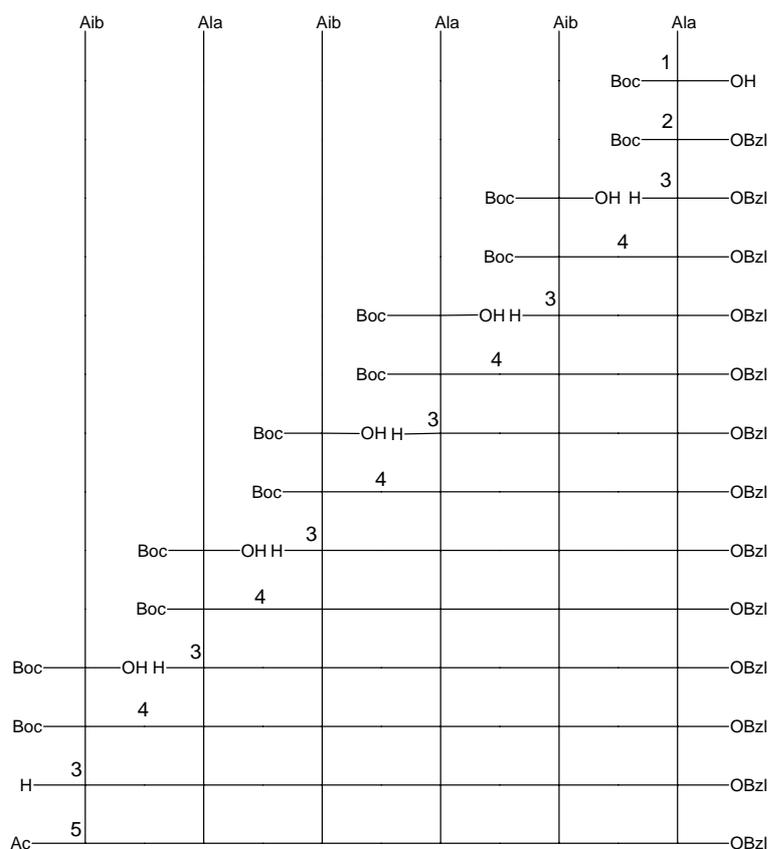


Fig. 3.7. Formazione dell'ossazolone (OXL) di Z(Aib)₂OH e successiva reazione di coupling.

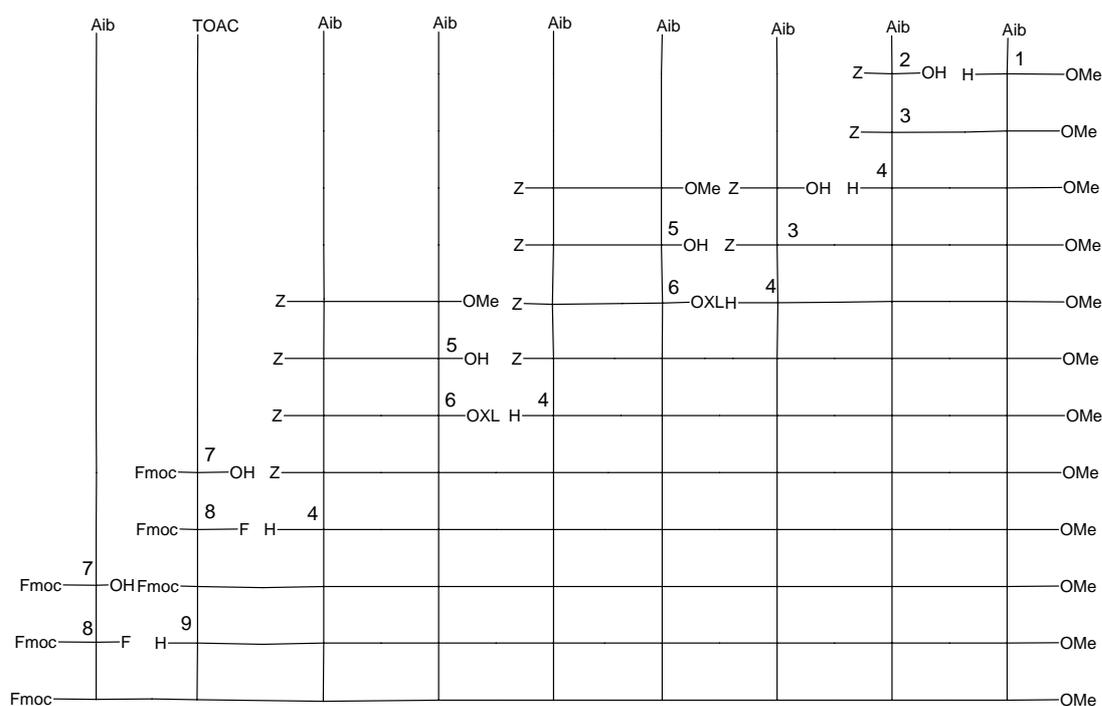
Infine, per facilitare la comprensione delle strategie adottate, gli schemi 3.1, 3.2 e 3.3 riassumono graficamente i percorsi seguiti per sintetizzare i peptidi Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe.

Schema 3.1 Strategia di sintesi del peptide *Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl*



1 = (Boc)₂O; 2 = PhCH₂OH/EDC/DMAP; 3 = TFA/CH₂Cl₂; 4 = EDC/HOAt; 5 = (Ac)₂O

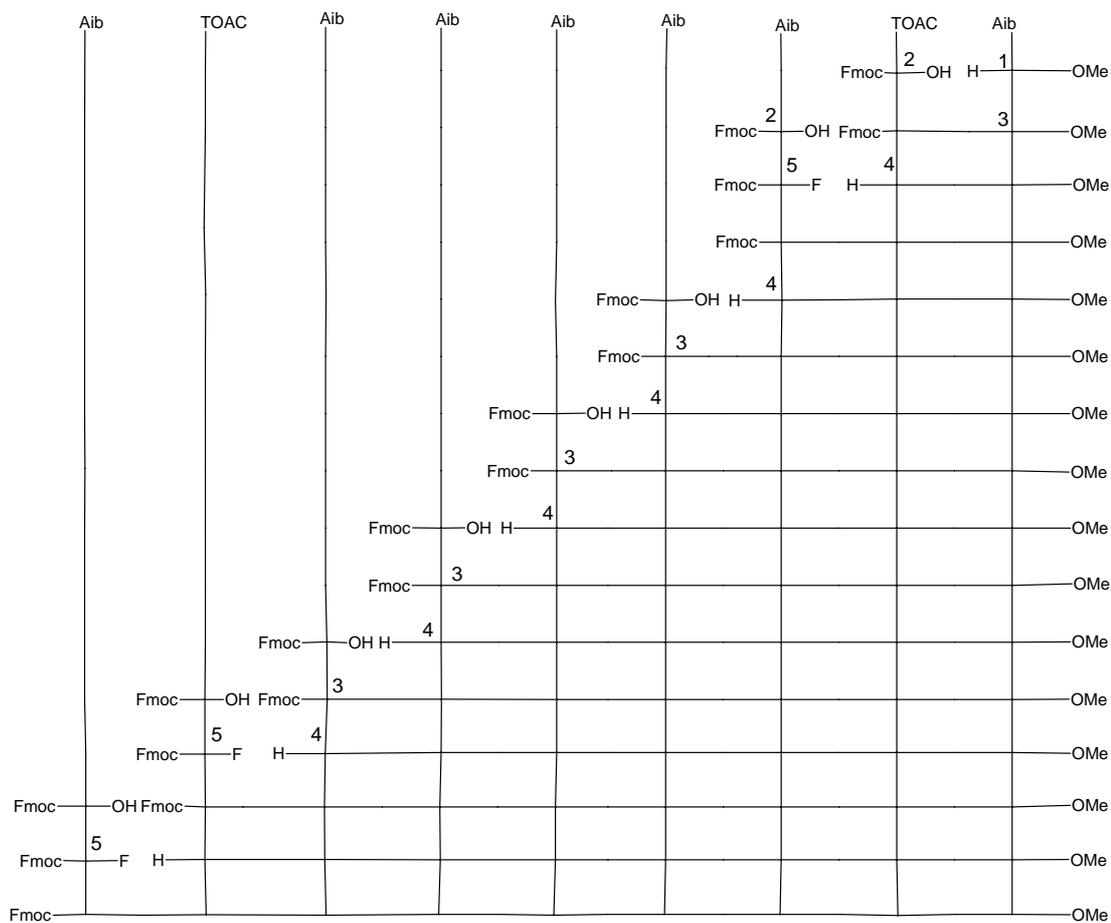
Schema 3.2 Strategia di sintesi del peptide *Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe*



1 = MeOH/SOCl₂; 2 = Z-OSu; 3 = EDC/HOAt; 4 = H₂/Pd; 5 = LiOH; 6 = EDC; 7 = Fmoc-OSu;

8 = 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazina; 9 = 50% DEA in CH₂Cl₂.

Schema 3.3 *Strategia di sintesi del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe*



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

3.2 Indagini conformazionali sui peptidi della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl

Sui peptidi della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl ($n=1-3$) e su Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e *p*BrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl sono state condotte indagini conformazionali mediante assorbimento IR, NMR e dicroismo circolare.

3.2.1 Assorbimento IR

Lo studio mediante assorbimento IR è stato effettuato in deuterochloroformio (un solvente di bassa polarità) negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni⁴⁷:

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

La Tabella 3.1 riporta le frequenze di assorbimento IR delle bande di stiramento N-H e C=O alla concentrazione 1×10^{-3} M per la serie peptidica Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl ($n=1-3$) e per i peptidi Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e *p*BrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl.

Tabella 3.1 Frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl ($n=1-3$) in deuterochloroformio alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Boc-Aib-L-Ala-OBzl	3436	1736, 1720, 1674
Boc-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl	3432, <u>3374</u>	1738, <u>1702</u> , 1664 ^a
Boc-(Aib-L-Ala) ₂ -OBzl	3434, <u>3346</u>	<u>1740</u> , 1708, <u>1680</u> , 1660 ^a
Boc-L-Ala-(Aib-L-Ala) ₂ -OBzl	3440 ^a , 3422, <u>3344</u>	<u>1740</u> , 1706 ^a , <u>1676</u>
Boc-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl	3430, 3360 ^a , <u>3328</u>	<u>1742</u> , 1704, <u>1670</u>
Ac-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl	<u>3442</u> ^a , <u>3426</u> , <u>3328</u>	<u>1742</u> , <u>1710</u> , <u>1668</u>
<i>p</i> BrBz-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl	<u>3462</u> ^a , <u>3436</u> , <u>3332</u>	<u>1740</u> , <u>1664</u> , <u>1602</u>

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 3.8 sono riportati gli spettri della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl (n=1-3), mentre in Figura 3.9 sono posti a confronto gli spettri dei tre esapeptidi (che differiscono per il solo gruppo N-protettore) nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

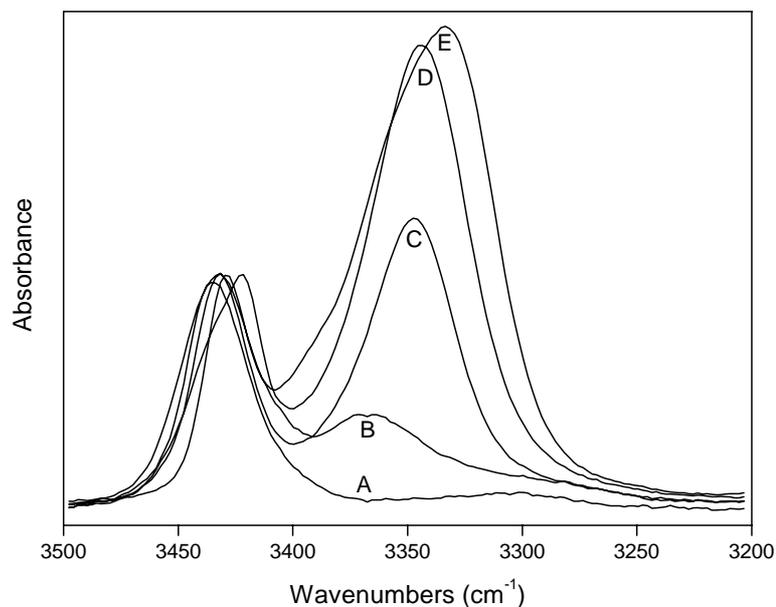


Fig. 3.8. Spettri di assorbimento IR dei peptidi Boc-Aib-L-Ala-OBzl (A), Boc-L-Ala-Aib-L-Ala-OBzl (B), Boc-(Aib-L-Ala)₂-OBzl (C), Boc-L-Ala-(Aib-L-Ala)₂-OMe (D), Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl (E) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

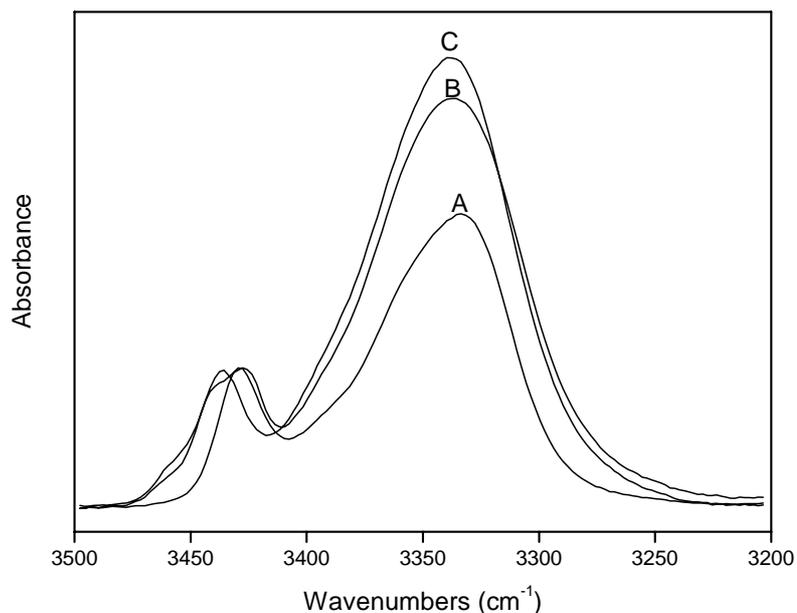


Fig. 3.9. Spettri di assorbimento IR dei peptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl (A), Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl (B) e pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl (C) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

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 3.2, 3.3, 3.4 si riportano le frequenze di assorbimento IR per i peptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, nella regione 3500-3200 cm⁻¹ alle concentrazioni 1 × 10⁻² M, 1 × 10⁻³ M ed 1 × 10⁻⁴ M e nella regione 1800-1600 cm⁻¹ alle concentrazioni 1 × 10⁻² M ed 1 × 10⁻³ M (l'assorbimento dovuto al solvente in tale regione è tale da pregiudicare la misura alla concentrazione di 10⁻⁴ M). In Figura 3.10, 3.11 e 3.12 sono riportati gli spettri di Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, ottenuti alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M e 1×10⁻⁴ M. Tali spettri sono normalizzati in quanto per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10 si è utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore (0.1 mm per 1×10⁻² M, 1.0 per 1×10⁻³ M e 10.0 mm per 1×10⁻⁴ M).

Tabella 3.2 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Boc-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl (10 ⁻² M)	3430, 3358 ^a , <u>3328</u>	<u>1742</u> , 1704, <u>1670</u>
Boc-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl (10 ⁻³ M)	3430, 3360 ^a , <u>3328</u>	<u>1742</u> , 1704, <u>1670</u>
Boc-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl (10 ⁻⁴ M)	3430, 3360 ^a , <u>3328</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 3.3 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in deuterocloroformio alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Ac-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl (10 ⁻² M)	<u>3438</u> ^a , <u>3428</u> , <u>3318</u>	<u>1742</u> , <u>1664</u>
Ac-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl (10 ⁻³ M)	<u>3442</u> ^a , <u>3426</u> , <u>3328</u>	<u>1742</u> , <u>1710</u> , <u>1668</u>
Ac-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl (10 ⁻⁴ M)	<u>3442</u> ^a , <u>3426</u> , <u>3328</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 $p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ in deuterochloroformio alle concentrazioni $1 \times 10^{-2} \text{ M}$, $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
$p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ (10^{-2} M)	<u>3436</u> , 3382 ^a , <u>3328</u>	<u>1742</u> , <u>1662</u> , <u>1604</u>
$p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ (10^{-3} M)	<u>3462</u> ^a , <u>3436</u> , <u>3332</u>	<u>1740</u> , <u>1664</u> , <u>1602</u>
$p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ (10^{-4} M)	<u>3460</u> ^a , <u>3436</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.

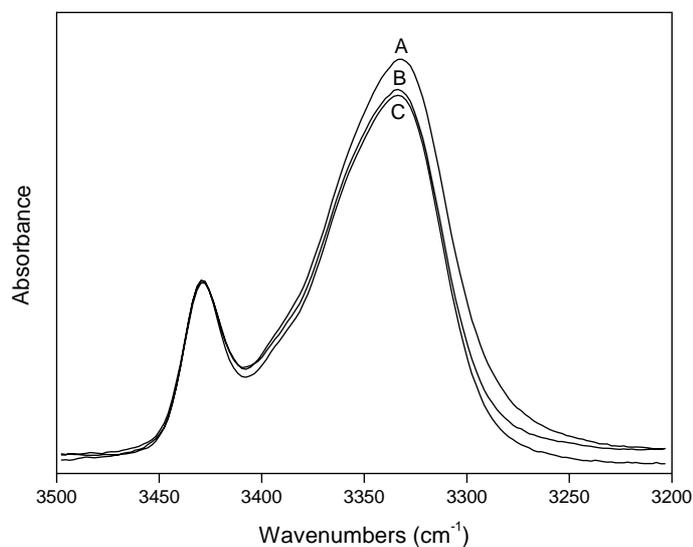


Fig. 3.10. Spettri di assorbimento IR di $\text{Boc}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ in deuterochloroformio alle concentrazioni $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ (A), $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ (B) e $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (C) nella regione $3500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$.

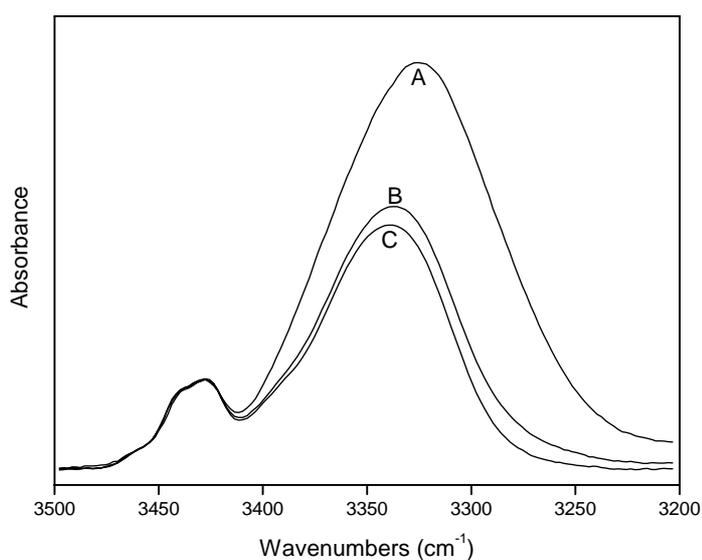


Fig. 3.11. Spettri di assorbimento IR di $\text{Ac}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ in deuterochloroformio alle concentrazioni $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ (A), $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ (B) e $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (C) nella regione $3500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$.

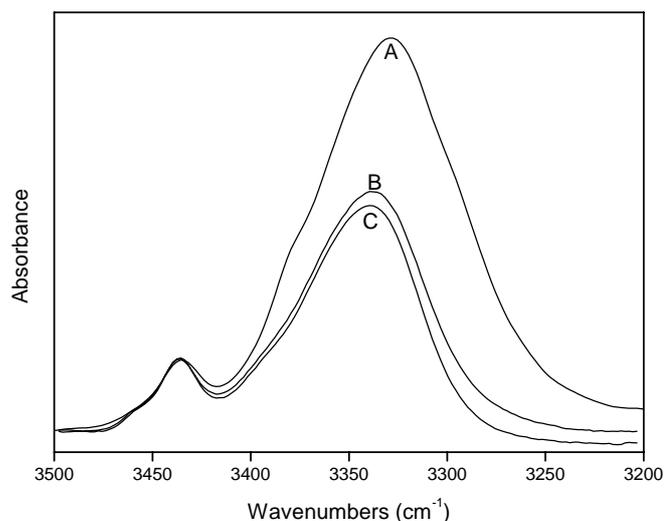


Fig. 3.12. Spettri di assorbimento IR di $p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-2} M (A), 1×10^{-3} M (B) e 1×10^{-4} M (C) nella regione $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$.

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

1. Nella regione spettrale $3500 - 3200\text{ cm}^{-1}$ degli spettri della serie peptidica $\text{Boc}-(\text{Aib-L-Ala})_n\text{-OBzl}$ ($n=1\text{-}3$) e dei peptidi $\text{Ac}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ e $p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$, le bande a $3440 - 3404\text{ cm}^{-1}$ sono assegnabili alle vibrazioni di stiramento di gruppi N-H liberi e solvatati, mentre quelle comprese nell'intervallo $3374\text{-}3328\text{ cm}^{-1}$ sono assegnabili alle vibrazioni di stiramento di gruppi N-H impegnati in legame a idrogeno^{48,49} (Tabella 3.1 e Fig. 3.8 e 3.9).
2. Per $\text{Boc}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ lo studio degli effetti della diluizione porta a ritenere che i legami idrogeno coinvolgenti gli N-H peptidici siano in grandissima preponderanza di tipo intramolecolare.^{48,49} La variazione di concentrazione determina infatti una modesta diminuzione delle bande di stiramento degli N-H legati (Figura 3.10).

Per i peptidi $\text{Ac}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$ e $p\text{BrBz}-(\text{Aib-L-Ala})_3\text{-OBzl}$, la diluizione da 1×10^{-2} M a 1×10^{-3} M determina una diminuzione marcata dell'intensità delle bande di stiramento degli N-H legati, mentre l'ulteriore diluizione a 1×10^{-4} M ha effetti pressoché trascurabili (Fig. 3.11 e 3.12). Si può quindi concludere che anche questi due peptidi possiedono molti legami idrogeno *intramolecolari*, ma che alla concentrazione maggiore (1×10^{-2} M) vi sia un contributo significativo di

legami ad H *intermolecolari*.^{48,49} E' anche plausibile ritenere che ciò sia dovuto alla possibilità di aggregazione attraverso l'NH del primo residuo. Infatti, l'ingombro sterico del gruppo Boc ostacola molto più tale aggregazione rispetto al piccolo gruppo acetile o addirittura all'anello aromatico del *p*BrBz.

3. Nella regione spettrale 1800-1600 cm^{-1} la banda tra 1742 e 1738 cm^{-1} è attribuibile alla banda di stiramento del gruppo C=O dell'estere benzilico mentre quella tra 1708 e 1702 cm^{-1} al gruppo C=O uretanico.

I gruppi C=O peptidici (banda ammidici I) risuonano invece nell'intervallo spettrale 1680 - 1664 cm^{-1} ⁴⁸⁻⁵⁰. Negli spettri dei peptidi più lunghi il massimo di assorbimento della banda ammidici I è localizzato a 1670 cm^{-1} per Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, a 1664 cm^{-1} per Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e a 1668 cm^{-1} per *p*BrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, molto prossimo alla posizione canonica della banda ammidici I delle strutture elicoidali di tipo 3₁₀ (1662 cm^{-1}).

Riassumendo, i risultati dell'indagine di assorbimento IR inducono a ritenere che in soluzione di CDCl₃ i peptidi della serie Boc-(Aib-L-Ala)_n-OBzl assumano conformazioni ripiegate stabilizzate da un numero crescente di legami a idrogeno intramolecolari, di tipo N-H...O=C, al crescere del numero di residui della catena peptidica. Gli esapeptidi adottano con tutta probabilità una conformazione elicoidale, anche se i dati qui riportati non consentono di stabilire con certezza se si tratti di eliche- α , eliche-3₁₀ o di combinazioni delle due.

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

Gli studi conformazionali mediante spettrometria $^1\text{H-NMR}$ dell'esapeptide Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl sono stati effettuati in deuterochloroformio.

E' stato dapprima registrato lo spettro bidimensionale ROESY per assegnare tutti i segnali osservati, utilizzando le connettività nello spazio di tipo $\text{NH}(i)\rightarrow\text{NH}(i+1)$ e $\text{NH}(i)\rightarrow\text{C}^\alpha\text{H}(i)$.

Successivamente sono stati analizzati gli effetti determinati sui segnali N-H dall'aggiunta di percentuali crescenti di DMSO, un forte accettore di legami ad idrogeno⁵¹, e del radicale libero paramagnetico TEMPO⁵² alla soluzione del peptide in CDCl_3 . Infatti i protoni ammidici non impegnati in legami idrogeno intramolecolari, che stabilizzano strutture secondarie elicoidali, sono molto sensibili all'aggiunta sia di DMSO che di TEMPO.

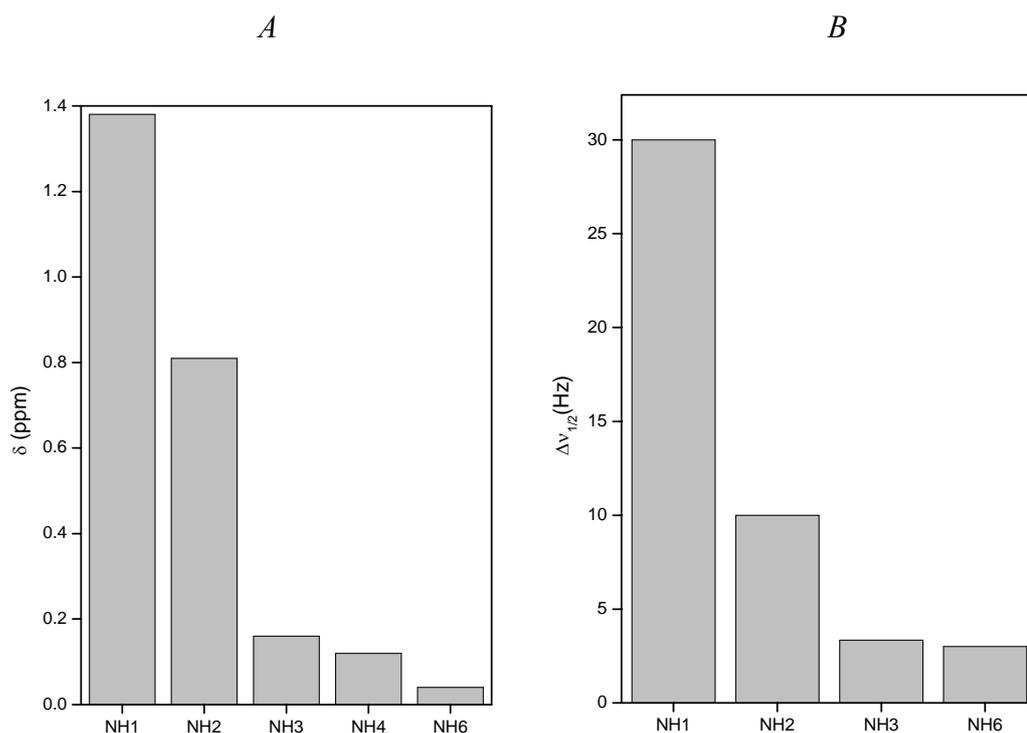


Fig. 3.13. Variazione degli spostamenti chimici (A) e delle larghezze dei picchi (B) dei protoni NH dell'esapeptide Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in funzione dell'aggiunta di DMSO e TEMPO, rispettivamente.

Come si può notare in Figura 3.13 l'effetto del DMSO e del radicale TEMPO è marcato solo sui protoni NH dei residui in posizione 1 e 2, mentre sui restanti protoni NH l'effetto è molto modesto. Tale comportamento sembra indicare che in questo peptide solo i protoni NH in posizione 1 e 2 siano liberi e quindi accessibili al

solvente. Va qui precisato che l'NH in posizione 5 nell'esperimento con il DMSO non è riportato perché mascherato da protoni aromatici. Tuttavia, la sua risonanza non varia significativamente all'aggiunta di DMSO perché altrimenti sarebbe emerso dal picco predominante dei protoni aromatici. Nel caso dell'esperimento con il TEMPO sono invece le risonanze degli NH 4 e 5 ad essere coperte dal segnale dei protoni aromatici.

Riassumendo, si può affermare che in CDCl_3 sia predominante una conformazione elicoidale di tipo 3_{10} , in presenza della quale le risonanze dei primi due NH risulterebbero appunto perturbate da DMSO e TEMPO.

3.2.3 Dicroismo circolare

Le preferenze conformazionali degli esapeptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, sintetizzati in questa Tesi, sono state investigate anche mediante dicroismo circolare (CD). Come solvente per l'analisi è stato usato metanolo. L'analisi CD in CDCl₃, solvente utilizzato per le misure di assorbimento IR, è preclusa dal forte assorbimento di tale solvente nella zona spettrale dove assorbe il cromoforo ammidico (180-250 nm). Le misure sono state effettuate anche in soluzione di trifluoroetanolo, in quanto è noto che tale solvente è in grado di accrescere il contenuto elicoidale nelle regioni strutturate.

Le misure sono state condotte a temperatura ambiente e alla concentrazione 10⁻³ M. Si è studiata la zona tra 195 nm e 250 nm, dove si trovano le bande corrispondenti alle transizioni n→π* e π→π* del cromoforo peptidico.

Per il peptide pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl si è studiata la zona tra 195 e 300 nm. Infatti il cromoforo *p*-bromobenzammidico fornisce un intenso splitting eccitonico (dovuto all'interazione tra momenti di transizione simili, in questo caso tra il BrBz e l'ammide adiacente) nella zona tra 220 nm e 300 nm caratterizzato da un massimo negativo e da uno positivo.

Per poter essere studiato mediante CD, un composto deve essere otticamente attivo. A tale fine esso deve possedere dei cromofori intrinsecamente chirali o che diventino tali per induzione da parte di centri asimmetrici vicini. Le transizioni del cromoforo peptidico sono otticamente inattive, ma la presenza di centri chirali nelle vicinanze (i C^α degli amminoacidi trisostituiti) e di strutture secondarie chirali della catena peptidica le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD.

Conformazioni peptidiche diverse danno origine a spettri CD nettamente differenziati. Le posizioni canoniche per le bande dicroiche di una α-elica sono 222 e 208 nm e la loro intensità è paragonabile (il rapporto $R = [\Theta]^{222}/[\Theta]^{208}$ è circa 1). In un'elica destrogira tali bande sono inoltre negative [vedi CD della poli(Lys)_n, Fig.3.14].^{53,54,55}

Molto diverso è lo spettro della conformazione β antiparallela. Nel caso della poli(Lys)_n⁵⁶ esso è caratterizzato da una banda negativa a 216-217 nm, corrispondente alla transizione n→π*, e da una banda positiva a 195 nm dovuta alla transizione ammidica π→π* (Fig. 3.14).

Infine, la struttura estesa è generalmente caratterizzata da una banda positiva molto debole a circa 218 nm e da una banda negativa molto intensa a 197 nm, corrispondenti rispettivamente alle transizioni ammidiche $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

Utili informazioni possono essere tratte sia dalla forma degli spettri che dall'intensità delle bande dicroiche. In questo caso la seconda possibilità è preclusa dalla presenza del gruppo benzile che assorbe nel medesimo intervallo di lunghezze d'onda del legame ammidico.

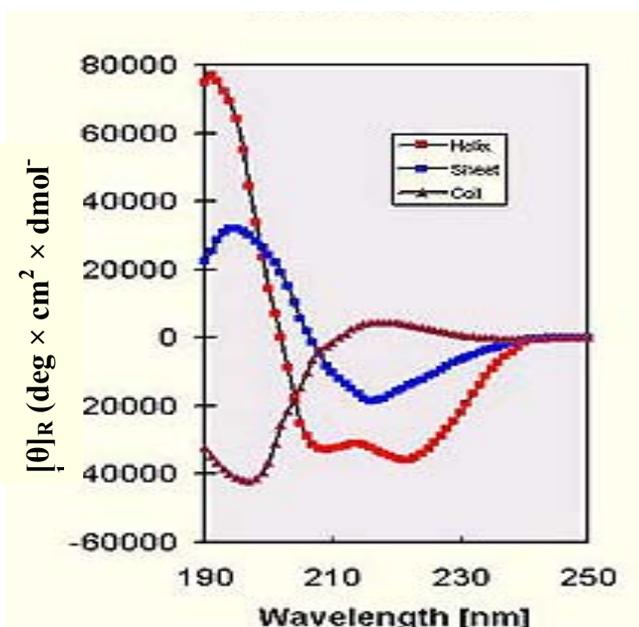


Fig. 3.14. Spettro CD della poli(Lys)_n a pH >10.5 e temperatura ambiente (curva rossa), a pH >10.5 e 50°C (curva blu) e a pH < 10.5 (curva viola).⁵⁶

Alcuni anni fa il nostro Laboratorio ha proposto lo spettro CD di Ac-[(α Me)Val]₈-OtBu in TFE come spettro modello di un'elica 3_{10} (Fig. 3.15).⁵⁷

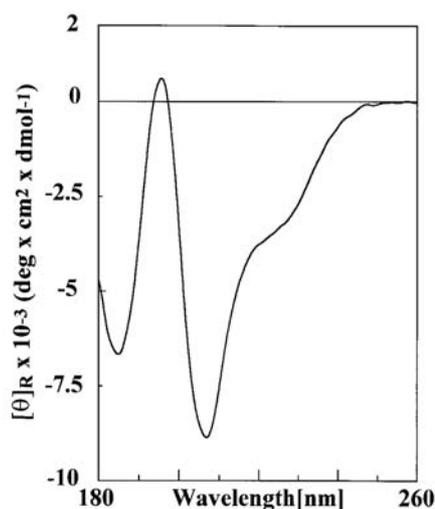


Fig. 3.15. Spettro CD del peptide Ac-[(α Me)Val]₈-OtBu in TFE.⁵⁷

Sulla base di calcoli teorici⁵⁸ è stato proposto come possibile criterio di distinzione tra strutture elicoidali di tipo α e 3_{10} l'intensità relativa delle bande a 222 e 208 nm. Nell'elica 3_{10} la banda a 222 nm è molto meno intensa di quella a 208 nm (il rapporto $R = [\Theta]_T^{222}/[\Theta]_T^{208}$ è circa 0.3 secondo tali calcoli). Per Ac-[(α Me)Val]₈-OtBu il rapporto $R = [\Theta]_T^{222}/[\Theta]_T^{208}$ è 0.4, in buon accordo con i calcoli teorici.⁵⁸

Nelle Figure 3.16 e 3.17 sono riportati, rispettivamente, gli spettri CD dei peptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in MeOH e TFE alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-3}$ M.

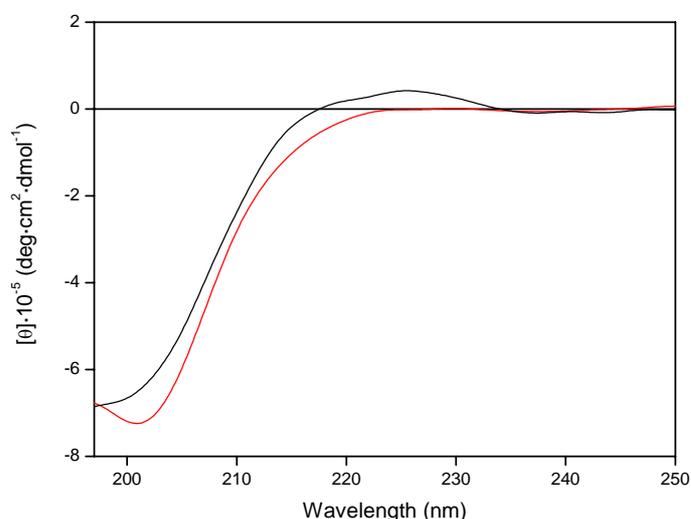


Fig. 3.16. Spettri CD dell' esapeptide Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in MeOH (curva nera) ed in TFE (curva rossa) alla concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M

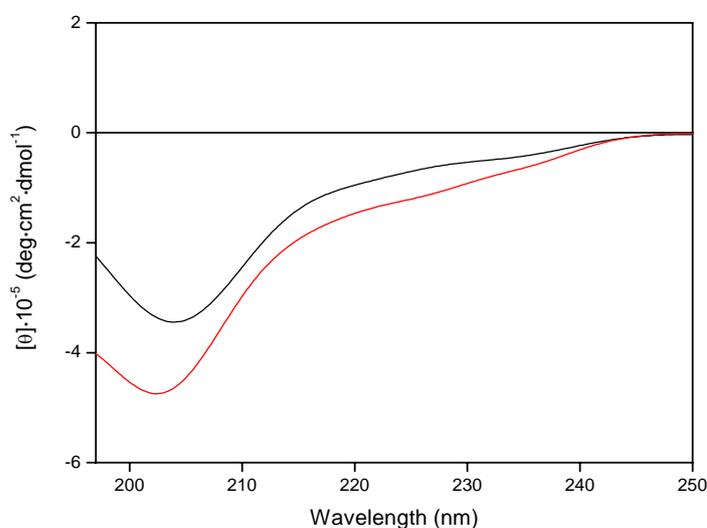


Fig. 3.17. Spettri CD dell' esapeptide Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl OBzl in MeOH (curva nera) ed in TFE (curva rossa) alla concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Come si nota dalle Figure 3.16 e 3.17 gli esapeptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl sembrano assumere in soluzione conformazioni elicoidali, probabilmente di tipo 3₁₀. Va tuttavia osservato che il massimo negativo prossimo a 200 nm sembra scendere più sotto nel caso del Boc-esapeptide e che per quest'ultimo la banda n→π* (a circa 222 nm) è pressoché nulla.

Poiché nell'elica 3₁₀ la transizione π→π* tende a scendere sotto i 208 nm, si è scelto di calcolare i valori di R non come rapporto $[\Theta]^{222}/[\Theta]^{208}$ ma come $[\Theta]^{222}/[\Theta]_{\max \text{ neg.}}$, dove $[\Theta]_{\max \text{ neg.}}$ rappresenta l'elletticità molare della transizione π→π* (componente parallela) nella sua posizione di massima intensità. Sulla base di queste considerazioni i valori di R per Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl (Tab. 3.5), ricavati dagli spettri di Fig. 3.17, sono a favore di una struttura elicoidale di tipo 3₁₀, in quanto i valori di R sono tutti inferiori a 0.4.^{57,59}

Tabella 3.5 Posizione delle bande dicroiche, valori di ellitticità molare e rapporti R del peptide Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl.

Peptide	λ (nm) ([Θ] · 10 ⁻⁵)	R
Ac-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl in MeOH	204 (-3.4) 222 (-0.84)	0.25
Ac-(Aib-L-Ala) ₃ -OBzl in TFE	202 (-4.7) 222 (-1.3)	0.27

Va infine osservato che passando da MeOH a TFE la variazione di profilo è modesta. Ciò indica una notevole stabilità della struttura secondaria formatasi promossa dai tre residui di Aib.

Nella Figura 3.18 è riportato lo spettro CD del peptide pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in MeOH e TFE. Lo splitting eccitonico mostra che i peptidi danno eliche destrorse (massimo negativo a λ inferiore, massimo positivo a λ maggiore), in accordo con i precedenti spettri. Il massimo negativo a 230 nm ha un'intensità maggiore del massimo positivo a 250 nm in quanto la banda dello splitting eccitonico si somma a quella dovuta al segnale a 222 nm (π→π* componente parallela), tipico delle strutture elicoidali α o 3₁₀.

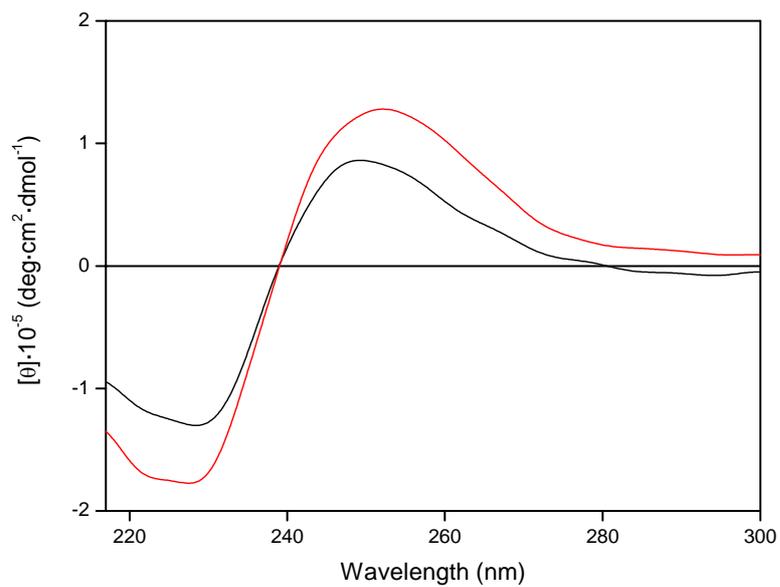


Fig. 3.18. Spettri CD dell' esapeptide pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl in MeOH (curva nera) e TFE (curva rossa) alla concentrazione 10⁻³ M.

3.3 Indagini conformazionali sui peptidi contenenti TOAC

Sui peptidi della serie Z-(Aib)_n-OMe (*n*= 3-5-7-9), Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe sono state effettuate indagini conformazionali mediante assorbimento IR e NMR.

3.3.1 Assorbimento IR

Anche lo studio di questi peptidi mediante assorbimento IR è stato effettuato in deuterochloroformio, negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni (3600-3200 e 1800-1600 cm⁻¹).⁴⁸

La Tabella 3.6 riporta le frequenze di assorbimento IR delle bande di stiramento N-H e C=O per i peptidi Z-(Aib)_n-OMe (*n*=3-5-7-9), Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe alla concentrazione 1×10⁻³ M. In Figura 3.19 sono riportati gli spettri degli omopeptidi della serie Z-(Aib)_n-OMe (*n*=3-5-7-9) nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M. Nelle Figure 3.20 e 3.21 sono messi a confronto gli spettri della serie Z-(Aib)_n-OMe (*n*=3-5-7) con Fmoc-(Aib)₉-OMe e con Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe rispettivamente.

Tabella 3.6. Frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) dei peptidi della serie Z-(Aib)_n-OMe (*n*= 3-5-7-9), Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe in deuterochloroformio alla concentrazione di 1×10⁻³ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Z-(Aib) ₃ -OMe	<u>3430</u> , <u>3370</u>	1738 ^a , <u>1716</u> , 1686, 1664
Z-(Aib) ₅ -OMe	<u>3428</u> , <u>3348</u>	<u>1736</u> , 1714, <u>1678</u> , 1654 ^a
Z-(Aib) ₇ -OMe	<u>3426</u> , <u>3330</u>	<u>1734</u> , <u>1714</u> , <u>1668</u>
Z-(Aib) ₉ -OMe	<u>3426</u> , <u>3318</u>	<u>1734</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>
Fmoc-(Aib) ₉ -OMe	<u>3424</u> , <u>3318</u>	1734 ^a , 1714, <u>1662</u>
Fmoc-TOAC-(Aib) ₇ -OMe	<u>3456</u> , <u>3424</u> , <u>3326</u>	<u>1738</u> , <u>1716</u> , <u>1666</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₇ -OMe	<u>3446</u> , <u>3418</u> , <u>3326</u>	<u>1734</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>

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.

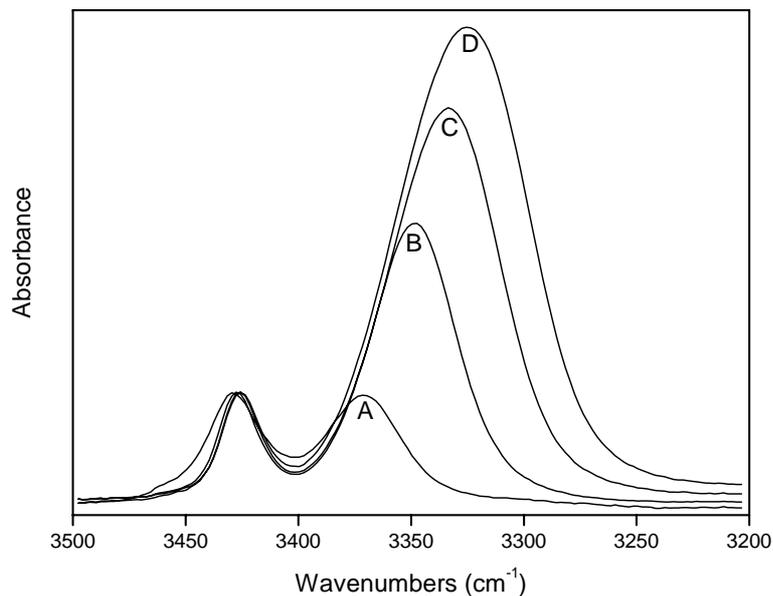


Fig. 3.19 Spettri di assorbimento IR dei peptidi Z-(Aib)₃-OMe (A), Z-(Aib)₅-OMe (B), Z-(Aib)₇-OMe (C), Z-(Aib)₉-OMe (D) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

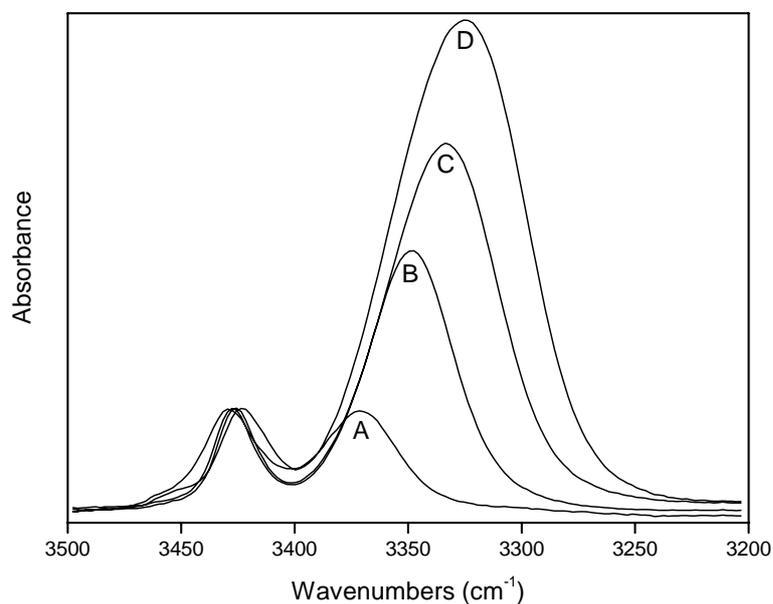


Fig. 3.20. Spettri di assorbimento IR dei peptidi Z-(Aib)₃-OMe (A), Z-(Aib)₅-OMe (B), Z-(Aib)₇-OMe (C), Fmoc-(Aib)₉-OMe (D) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

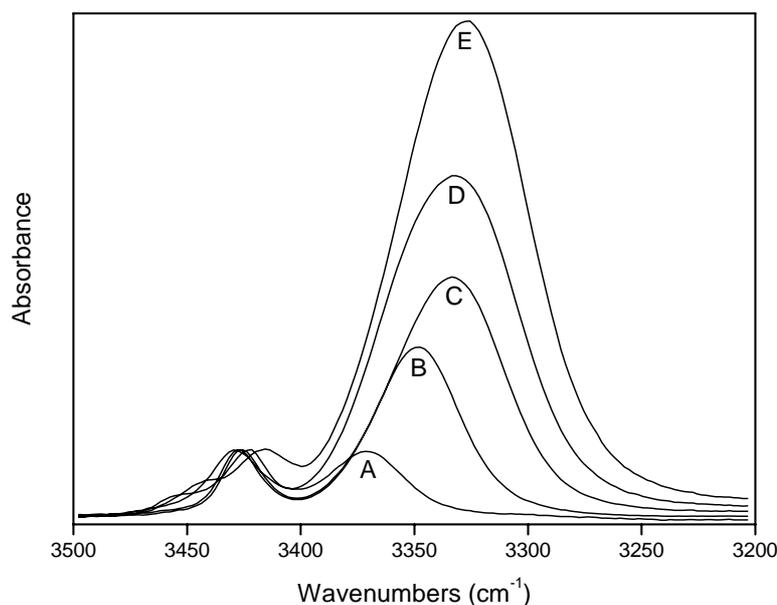


Fig. 3.21. Spettri di assorbimento IR dei peptidi Z-(Aib)₃-OMe (A), Z-(Aib)₅-OMe (B), Z-(Aib)₇-OMe (C), Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe (D), Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe (E) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M.

In tabella 3.7 sono riportate le frequenze di assorbimento IR delle bande N-H e C=O alla concentrazione 5×10⁻⁴ M per il peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe e le relative sequenze intermedie alla concentrazione 1×10⁻³ M. In figura 3.22 sono riportati gli spettri dei peptidi della serie nella regione 3500-3200 cm⁻¹.

Tabella 3.7. Frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alla concentrazione di 5×10⁻⁴ M e dei relativi peptidi intermedi di sintesi alla concentrazione 1×10⁻³ M.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Fmoc-TOAC-Aib-OMe	<u>3438</u> , <u>3402</u> ^a	<u>1738</u> , <u>1708</u> ^a , <u>1674</u>
Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe	<u>3420</u> , <u>3360</u>	<u>1738</u> , <u>1716</u> , <u>1688</u> , <u>1668</u> ^a
Fmoc-(Aib) ₂ -TOAC-Aib-OMe	<u>3452</u> ^a , <u>3424</u> , <u>3356</u>	<u>1736</u> , <u>1712</u> , <u>1682</u>
Fmoc-(Aib) ₃ -TOAC-Aib-OMe	<u>3424</u> , <u>3342</u>	<u>1736</u> , <u>1714</u> , <u>1674</u>
Fmoc-(Aib) ₄ -TOAC-Aib-OMe	<u>3424</u> , <u>3330</u>	<u>1736</u> , <u>1714</u> , <u>1668</u>
Fmoc-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe	<u>3424</u> , <u>3322</u>	<u>1736</u> , <u>1710</u> , <u>1664</u>
Fmoc-TOAC-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe	<u>3434</u> , <u>3418</u>	<u>1736</u> , <u>1714</u> ^a , <u>1662</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe	<u>3444</u> ^a , <u>3416</u> , <u>3320</u>	<u>1736</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>

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.

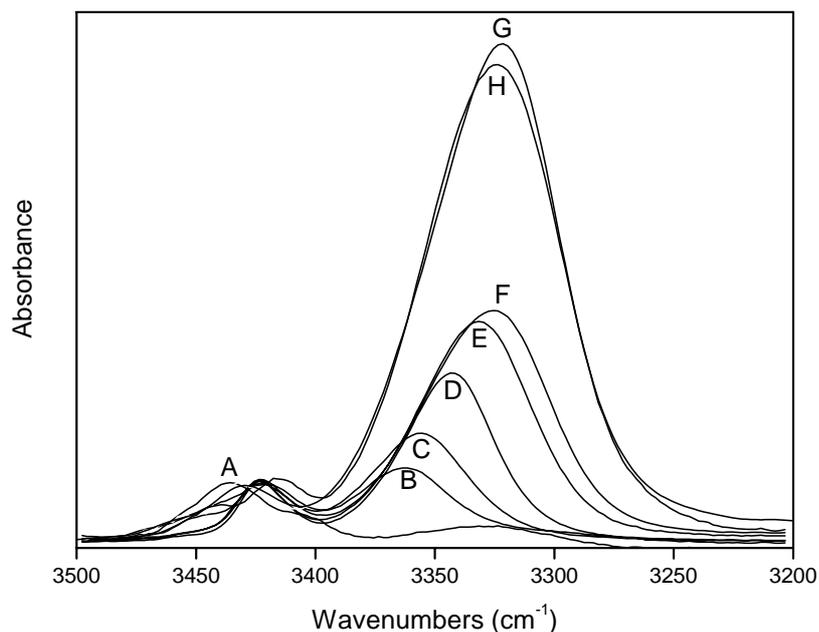


Fig. 3.22. Spettri di assorbimento IR dei peptidi Fmoc-TOAC-Aib-OMe (A), Fmoc-Aib-TOAC-Aib-OMe (B), Fmoc-(Aib)₂-TOAC-Aib-OMe (C), Fmoc-(Aib)₃-TOAC-Aib-OMe (D), Fmoc-(Aib)₄-TOAC-Aib-OMe (E), Fmoc-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (F), Fmoc-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (G) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 1×10⁻³ M e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (H) in CDCl₃, nella regione 3500-3200 cm⁻¹, alla concentrazione 5×10⁻⁴ M.

Per stabilire se le bande nella regione 3500-3200 cm⁻¹ fossero assegnabili a N-H legati *intramolecolarmente* o *intermolecolarmente* si sono registrati a diverse concentrazioni gli spettri di Z-(Aib)₉-OMe, Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe, i peptidi potenzialmente più suscettibili di auto-associazione. È stato infatti ampiamente verificato che la tendenza all'auto-associazione di peptidi contenenti residui amminoacidici C^α-tetrasostituiti cresce parallelamente al crescere della lunghezza della catena peptidica. Nelle Tabelle 3.8, 3.9, 3.10 si riportano, rispettivamente, le frequenze di assorbimento IR delle bande di stiramento N-H e C=O per i peptidi Z-(Aib)₉-OMe, Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe alle concentrazioni 1 × 10⁻² M, 1 × 10⁻³ M e 1 × 10⁻⁴ (per quest'ultima concentrazione sono elencate le sole bande di stiramento N-H in quanto l'assorbimento del solvente preclude l'esame della zona carbonilica). In tabella 3.11 si riportano le frequenze di assorbimento IR delle bande di stiramento N-H e C=O per il peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe alle concentrazioni 5 × 10⁻³ M, 5 × 10⁻⁴ M e 5 × 10⁻⁵ (per quest'ultima concentrazione sono elencate le sole bande di stiramento N-H in quanto l'assorbimento del solvente

preclude l'esame della zona carbonilica). Sono quindi riportati gli spettri di Z-(Aib)₉-OMe (Figura 3.23), Fmoc-(Aib)₉-OMe (Figura 3.24) e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe (Figura 3.25) e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe (Figura 3.26) nella zona 3500-3200 cm⁻¹.

Tabella 3.8 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Z-(Aib)₉-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴.

Peptide		3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Z-(Aib) ₉ -OMe	(10 ⁻² M)	<u>3426</u> , 3364 ^a , <u>3302</u>	<u>1728</u> , <u>1710</u> , <u>1694</u> , <u>1660</u> , 1640 ^a
Z-(Aib) ₉ -OMe	(10 ⁻³ M)	<u>3426</u> , <u>3318</u>	<u>1734</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>
Z-(Aib) ₉ -OMe	(10 ⁻⁴ M)	<u>3426</u> , <u>3320</u>	

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

Tabella 3.9 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) del peptide Fmoc-(Aib)₉-OM in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide		3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Fmoc-(Aib) ₉ -OMe	(10 ⁻² M)	<u>3426</u> , 3348 ^a , <u>3326</u> , <u>3284</u>	<u>1734</u> , <u>1706</u> , <u>1656</u> , 1632 ^a
Fmoc-(Aib) ₉ -OMe	(10 ⁻³ M)	<u>3424</u> , <u>3318</u>	1734 ^a , 1714, <u>1662</u>
Fmoc-(Aib) ₉ -OMe	(10 ⁻⁴ M)	<u>3424</u> , <u>3320</u>	

Note: ^a spalla; i valori sottolineati si riferiscono a bande molto intense (—), intense (—) o deboli (...); 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 Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M, 1×10⁻⁴ M.

Peptide		3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₇ -OMe	(10 ⁻² M)	<u>3444</u> , <u>3418</u> , <u>3318</u>	<u>1734</u> , <u>1712</u> , <u>1660</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₇ -OMe	(10 ⁻³ M)	<u>3446</u> , <u>3418</u> , <u>3326</u>	<u>1734</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₇ -OMe	(10 ⁻⁴ M)	<u>3446</u> , <u>3418</u> , <u>3326</u>	

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 3.11 Confronto delle frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) del peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 5×10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 5×10^{-5} M.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe (10^{-3} M)	<u>3444</u> ^a , <u>3416</u> , <u>3320</u>	<u>1736</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe (10^{-4} M)	<u>3444</u> ^a , <u>3416</u> , <u>3320</u>	<u>1736</u> , <u>1712</u> , <u>1662</u>
Fmoc-Aib-TOAC-(Aib) ₅ -TOAC-Aib-OMe (10^{-5} M)	<u>3444</u> ^a , <u>3416</u> , <u>3318</u>	

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.

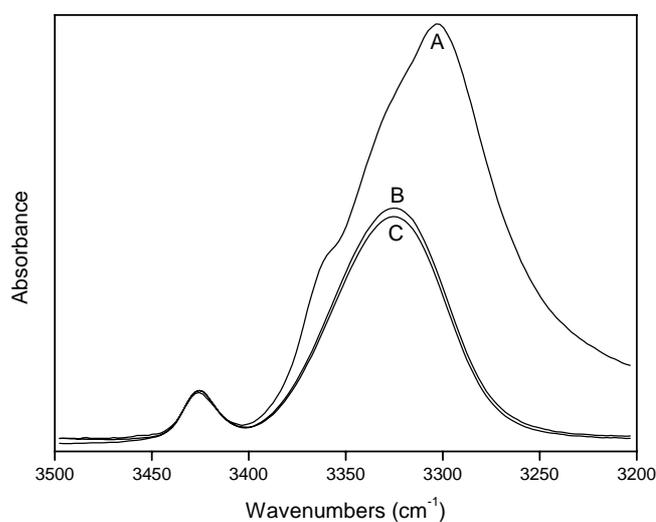


Fig. 3.22. Spettri di assorbimento IR di Z-(Aib)₉-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-2} M (A), 1×10^{-3} M (B) e 1×10^{-4} M (C) nella regione 3500-3200 cm^{-1} .

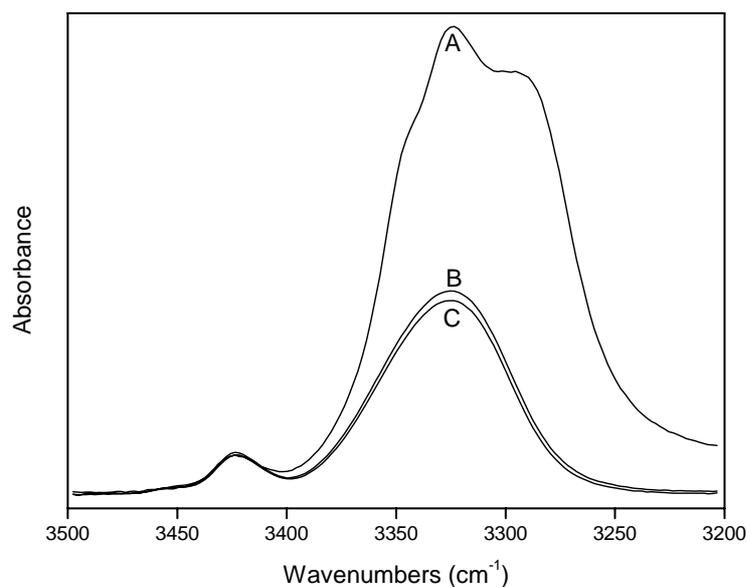


Fig. 3.23. Spettri di assorbimento IR di Fmoc-(Aib)₉-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-2} M (A), 1×10^{-3} M (B) e 1×10^{-4} M (C) nella regione 3500-3200 cm^{-1} .

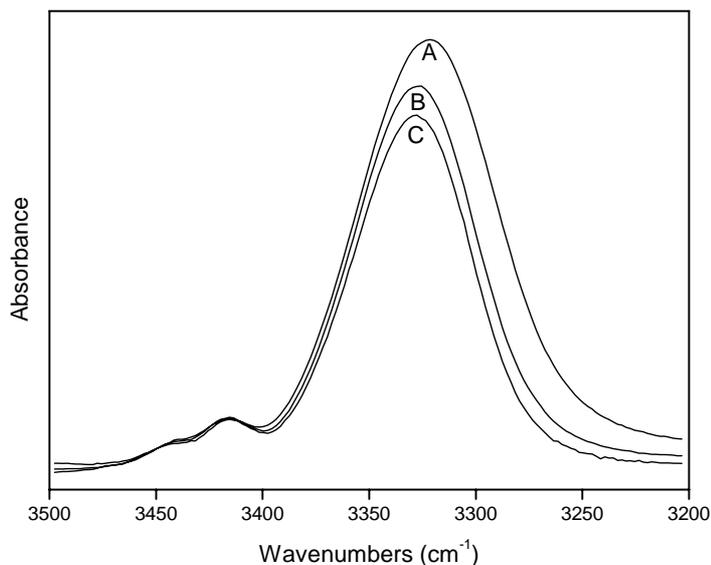


Fig. 3.24. Spettri di assorbimento IR di Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 1×10^{-2} M (A), 1×10^{-3} M (B) e 1×10^{-4} M (C) nella regione 3500-3200 cm^{-1} .

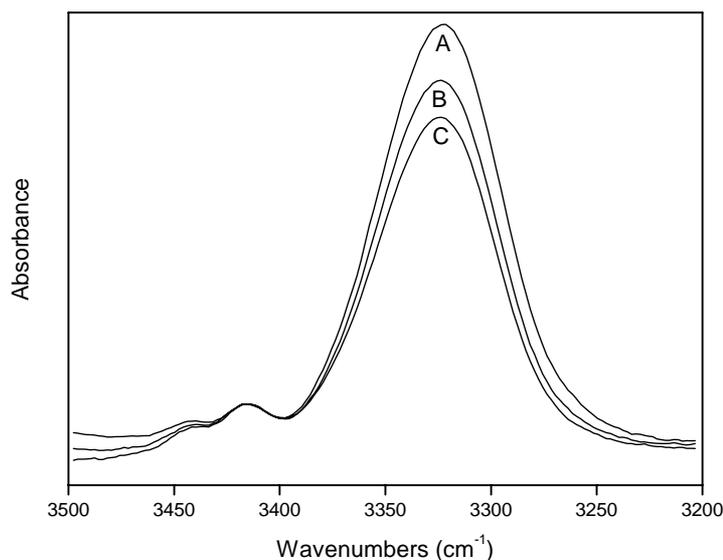


Fig. 3.25. Spettri di assorbimento IR di Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe in deuterochloroformio alle concentrazioni 5×10^{-3} M (A), 5×10^{-4} M (B) e 5×10^{-5} M (C) nella regione 3500-3200 cm^{-1} .

I risultati più interessanti si possono così riassumere:

- (i) I peptidi della serie R-(Aib)_n-OMe ($n = 3-5-7-9$, R = Z; $n = 9$, R = Fmoc) presentano una banda di assorbimento debole tra 3430 e 3426 cm^{-1} , la zona degli NH liberi e solvatati.^{48,49} Nella zona tra 3394 e 3340 cm^{-1} , corrispondente ai gruppi N-H impegnati in legami idrogeno^{48,49}, tutti i peptidi della serie mostrano un'intensa banda di assorbimento tra 3370 e 3318 cm^{-1} . I peptidi Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe presentano due

bande di assorbimento deboli a 3456-3418 cm^{-1} ed una intensa a 3326 cm^{-1} , le prime assegnabili alle vibrazioni di stiramento degli NH liberi e solvatati, mentre la seconda corrisponde ai gruppi N-H impegnati in legami idrogeno (Tabella 3.6).

Il peptide Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe e le relative sequenze intermedie presentano una banda di assorbimento debole tra 3452 e 3438 cm^{-1} corrispondente ai gruppi N-H liberi e solvatati. Nella zona tra 3418 e 3320 cm^{-1} è presente un' intensa banda di assorbimento attribuibile ai gruppi N-H impegnati in legami ad idrogeno.

- (ii) Per Z-(Aib)₉-OMe e Fmoc-(Aib)₉-OMe la diluizione da 1×10^{-2} M a 1×10^{-3} M determina una netta diminuzione dell'intensità integrata delle bande di stiramento degli N-H legati, mentre l'ulteriore diluizione a 1×10^{-4} M ha effetti pressoché trascurabili (Figure 3.22 e 3.23); si può quindi ritenere che a concentrazioni elevate ci sia una significativa autoassociazione attraverso legami ad H di tipo *intermolecolare*, che si sovrappongono a quelli di tipo *intramolecolare*.

Per i peptidi Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe lo studio degli effetti di diluizione porta a ritenere che i legami ad H coinvolgenti gli N-H peptidici siano essenzialmente di tipo *intramolecolare*. La variazione di concentrazione determina infatti una diminuzione modesta delle bande di stiramento degli N-H legati (Figura 3.24 e 3.25).

- (iii) Nella regione spettrale 1800-1600 cm^{-1} la banda tra 1738 e 1712 cm^{-1} è attribuibile alla sovrapposizione della banda di stiramento del gruppo C=O dell'estere metilico e del gruppo C=O uretanico. I gruppi C=O peptidici (ammide I) risuonano tra 1688 e 1662 cm^{-1} .^{48,50} Negli spettri dei peptidi più lunghi il massimo di assorbimento della banda ammidica I è localizzato a 1662 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 CDCl_3 , i peptidi Z-(Aib)_n-OMe ($n=3-5-7-9$), Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe assumano conformazioni ripiegate stabilizzate da legami idrogeno *intramolecolari*. I nonapeptidi adottano con tutta probabilità una struttura elicoidale di tipo 3₁₀.

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

Gli studi conformazionali mediante spettrometria $^1\text{H-NMR}$ del nonapeptide Z-(Aib) $_9$ -OMe sono stati effettuati in deuterochloroformio.

Anche in questo caso è stato dapprima registrato lo spettro bidimensionale ROESY e poi sono stati analizzati gli effetti determinati sui segnali N-H dall'aggiunta di percentuali crescenti di DMSO e di TEMPO alla soluzione del peptide in CDCl_3 . La figura 3.26 illustra i risultati ottenuti.

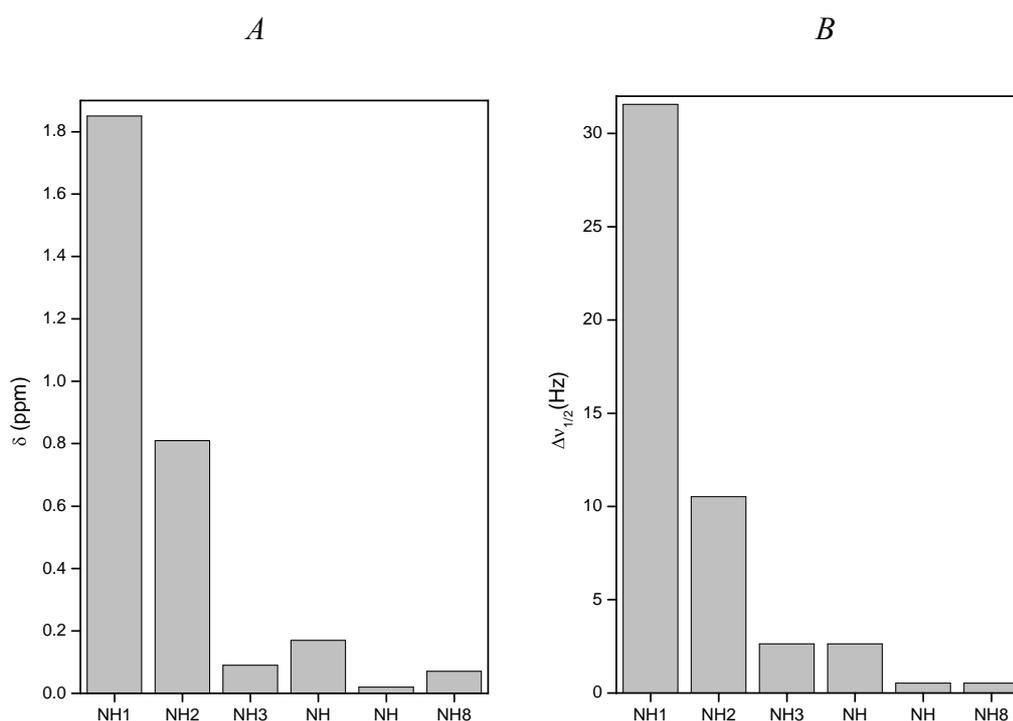


Fig. 3.26. Variazione degli spostamenti chimici (A) e delle larghezze dei picchi (B) dei protoni NH del nonapeptide Z-(Aib) $_9$ -OMe in funzione dell'aggiunta di DMSO e TEMPO, rispettivamente.

Dallo spettro ROESY non è stato possibile assegnare tutti i segnali N-H a causa delle numerose sovrapposizioni. Le indagini conformazionali condotte permettono comunque di affermare che solo i protoni in posizione 1 e 2 sono liberi in quanto perturbati dall'azione del DMSO e del radicale TEMPO.

Si è inoltre analizzato l'effetto della concentrazione (da 10^{-2} a 10^{-3} M) sullo spostamento chimico dei protoni ammidici, il cui comportamento è strettamente influenzato dalla partecipazione o meno a legami a idrogeno. Tutte le risonanze dei protoni ammidici si spostano verso campi più bassi al crescere della concentrazione, ma in misura diversa. In particolare variazioni elevate degli spostamenti sono

generalmente da ritenersi indicative di NH ammidici non saldamente impegnati in legami ad idrogeno. Come si può osservare dalla figura 3.27 solo per i protoni NH(1) e NH(2) l'effetto della concentrazione sugli spostamenti chimici è marcato, mentre sui restanti protoni è quasi nullo.

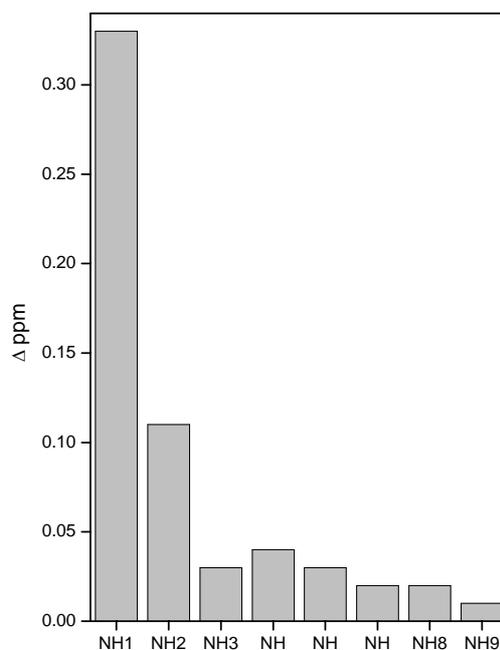


Fig. 3.27. Variazione degli spostamenti chimici dei protoni NH del nonapeptide Z-(Aib)₉-OMe in funzione della concentrazione.

I dati sono quindi compatibili con la presenza in CDCl₃ di una conformazione elicoidale di tipo 3₁₀, in presenza della quale solo i primi due NH non sono impegnati in legami ad idrogeno.

3.3.3 Diffrazione dei raggi X

Sono attualmente in corso tentativi di cristallizzazione di tutti i peptidi sintetizzati, al fine di ottenere cristalli singoli, utili per la determinazione della struttura mediante diffrazione dei raggi X. Tali esperimenti hanno finora dato esito positivo per l'ottapeptide Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe. La struttura è stata risolta dal Dr. M. Crisma (Istituto di Chimica Biomolecolare, CNR, Padova). Di seguito ne vengono illustrati gli aspetti più significativi dal punto di vista conformazionale.

Il peptide achirale Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe cristallizza in un gruppo spaziale dotato di centro di simmetria. Pertanto nel cristallo sono presenti molecole con entrambi i sensi di spiralizzazione. Di seguito viene descritta la molecola di spiralizzazione destrorsa, scelta come unità asimmetrica.

Nella struttura di Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe (Fig. 3.28) sono presenti sei legami a idrogeno intramolecolari aventi come donatori i gruppi N-H del terzo, quarto, quinto, sesto, settimo e ottavo residuo amminoacidico, e come accettori gli atomi di ossigeno del carbonile uretanico N-terminale e dei gruppi carbonilici del primo, secondo, terzo, quarto e quinto residuo, rispettivamente, che stabilizzano sei strutture C₁₀ consecutive. I valori degli angoli torsionali ϕ, ψ sono riportati in Tabella 3.12.

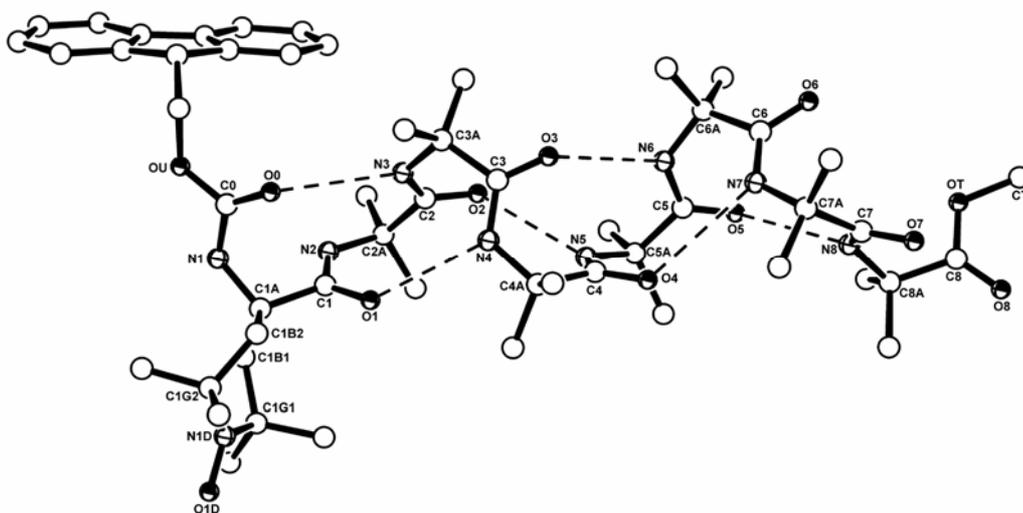


Fig. 3.28. Struttura ai raggi X di Fmoc-TOAC-(Aib)₇-OMe. I legami idrogeno intramolecolari sono indicati da linee tratteggiate.

Tabella 3.12 Valori degli angoli torsionali ($^{\circ}$) dello scheletro peptidico nella struttura ai raggi X di Fmoc-TOAC- (Aib)₇-OMe

	TOAC ¹	Aib ²	Aib ³	Aib ⁴	Aib ⁵	Aib ⁶	Aib ⁷	Aib ⁸
ϕ	-54.9	-60.0	-48.1	-48.8	-57.8	-58.1	-66.2	-54.0
ψ	-41.7	-18.3	-36.7	-40.7	-29.9	-29.4	-21.9	-55.4

L'esame delle coppie degli angoli torsionali ϕ, ψ evidenzia che tutte le strutture C₁₀ sono di tipo III.¹⁶ Complessivamente la struttura è descrivibile come un'elica 3₁₀ destrogira. Il residuo C-terminale, sebbene esterno alla struttura elicodale, mantiene una conformazione ripiegata con lo stesso senso di spiralizzazione dei residui che li precedono.

La distanza di legame N-O del gruppo nitrossilico del residuo di TOAC (1.281 Å) conferma che nel corso della sintesi è stata preservata l'integrità del radicale libero.

Il valore medio della coppia degli angoli torsionali dei sette residui amminoacidici interni all'elica ($\phi = -56.2^{\circ}$, $\psi = -31.2^{\circ}$) è sostanzialmente coincidente con quello dell'elica 3₁₀ ideale (-57° , -30°)¹², sebbene a livello di singolo residuo siano riscontrabili deviazioni fino a 12°.

In definitiva, la struttura allo stato cristallino qui riportata supporta le conclusioni tratte dall'analisi conformazionale in soluzione. Questa infatti indica per i peptidi Aib/TOAC strutture elicoidali, molto probabilmente di tipo 3₁₀.

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:

- l'esapeptide elicoidale Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, risulta idoneo allo studio conformazionale in fase gas tramite “IR and UV double resonance spectroscopy” (dr. Michel Mons);
- i peptidi Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe sono invece ottimi substrati rigidi, di tipo 3_{10} elicoidale, da sottoporre a studi conformazionali tramite la tecnica EPR detta PELDOR, eseguita su uno strumento ad alta frequenza.

Le conclusioni più interessanti ottenute possono essere così riassunte:

- L'indagine conformazionale in soluzione, condotta mediante assorbimento IR, spettrometria NMR e dicroismo circolare, ha indicato che i peptidi Boc-(Aib-L-Ala)₃-OBzl, Ac-(Aib-L-Ala)₃-OBzl e pBrBz-(Aib-L-Ala)₃-OBzl assumono in prevalenza conformazioni elicoidali.
- I peptidi Fmoc-(Aib)₉-OMe, Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₇-OMe e Fmoc-Aib-TOAC-(Aib)₅-TOAC-Aib-OMe hanno una forte tendenza a ripiegarsi in strutture elicoidali di tipo 3_{10} allo stato cristallino ed in soluzione.
- La presenza di differenti gruppi protettori alle estremità N- e C-terminali dello spaziatore peptidico non sembra alterare significativamente la conformazione elicoidale adottata dal peptide, anche se vi sono influenze sull'autoassociazione. 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 e funzionalità prestabilita.

In conclusione, viene confermata la necessità di disporre di sistemi conformazionalmente ben definiti, modulabili e sintetizzabili con relativa facilità,

come 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 in combinazione con α -amminoacidi proteici. Nonostante le difficoltà sintetiche, la rigidità strutturale di tali peptidi fa di essi degli eccellenti candidati per la progettazione e realizzazione di sistemi molecolari a conformazione controllata e funzionalità prestabilite.

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. Chin, W.; Dognon, J.-P.; PiuZZi, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I.; Mons, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 707 (2005).
3. Gloaguen, E.; Pagliarulo, F.; Brenner, V.; Chin, W.; PiuZZi, F.; Tardivel, B.; Mons, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 4491 (2007).
4. Owenius, R., Engström, M., Lindgren, M., Huber, M., *J. Phys. Chem. A*, **105**, 10967 (2001).
5. (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).
6. (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).
7. (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).
8. Yasutomi, S., Morita, T., Imanisci, Y., Kimura, S., *Science*, **304**, 1944 (2004).
9. Wen, X., Linton, R. W., Formaggio, F., Toniolo, C. e Samulski, E. T. *J. Phys. Chem. A*, **108**, 9673-9681 (2004).
10. (a) Bianco, A., Gasparrini, 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).

11. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, 3471 (1970).
12. Toniolo, C. e Benedetti, E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
13. Venkatachalam, C.M., *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968).
14. 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).
15. Marshall, G. R., in "*Intra-Science Chemistry Reports*", Vol. 5, Kharasch, N., Ed., Gordon e Breach, New York, p. 305 (1971).
16. Venkataram Prasad, B.V. e Sasisekharan, V., *Macromolecules*, **12**, 1107 (1979).
17. Paterson, Y., Rumsey, S. M., Benedetti, E., Némethy, G. e Scheraga, H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947 (1981).
18. 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).
19. Paterson, Y., Stimson, E. R., Evans, D. J., Leach, S. J. e Scheraga, H. A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982).
20. 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).
21. Gessmann, R., Brückner, H., Petratos, K., *J. Pept. Sci.*, **9**, 753 (2003).
22. (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).
23. Milov, D. A., Tsvetkov, Yu. D., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Raap J., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3784 (2001).
24. Von Arx, E., Faupel, M. e Brugger, M., *J. Chromatogr.*, **120**, 224 (1976).
25. Carpino, L.A., Sadat-Aalae, D., Chao, H. G., DeSelms, R. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9651 (1990).
26. a) Neiman, M.B., Rozantsev, E.G., Mamedova, Y.G., *Nature*, **196**, 472 (1962). b) *ibid.*, **200**, 256 (1963).
27. Seidemann, R. e Dulog, L., *Makromol. Chem.*, **187**, 2545 (1986).
28. Bucherer, H.T. e Lieb, V.A., *J. Prakt. Chem.* **141**, 5 (1934).
29. McGahren W.J. e Goodman M., *Tetrahedron*, **23**, 2017 (1967).
30. Wenschuh, H., Bayermann, M., Krause E., Brudel, M., Winter, R., Schumann, M., Carpino, L.A., Bienert, M., *J. Org. Chem.*, **59**, 3275 (1994).
31. Dulog, L. e Wang, W., *Liebigs Ann. Chem.*, 301 (1992).
32. Seidemann, R. e Dulog, L., *Makromol. Chem.*, **187**, 2545 (1986).
33. Bucherer, H.T. e Lieb, V.A., *J. Prakt. Chem.* **141**, 5 (1934).

34. Rassat, A. e Rey, P., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 815 (1967).
35. Rozantsev, E.G., in "Free Nitroxyl Radicals", Ulrich, H., Ed., Plenum Press, New York, (1970).
36. Weinkam, R.J. e Jorgensen, E.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 7028 (1971).
37. Bergmann, M., Zervas, L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65**, 1192 (1932).
38. Carpino, L. A., Han, G. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5748 (1970).
39. Carpino, L. A., Han, G. Y., *J. Org. Chem.*, **37**, 3404 (1972).
40. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).
41. König, W., Geiger, R., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **103**, 788; **103**, 2024 (1970).
42. Carpino, L.A., Sadat-Aalae, D., Chao, H. G., DeSelms, R. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9651 (1990).
43. Carpino, L.A., Beyermann, M., Wenschuh, H., Bienert, M., *Acc. Chem. Res.*, **29**, 268 (1996).
44. Sapia, A.C., Slomczynska, U., Marshall, G.R., *Lett. Pept. Sci.*, **1**, 283 (1994).
45. Beesley, R.M., Ingold, C.K. e Thorpe, J.F., *J. Chem. Soc.*, **107**, 1080 (1915).
46. Sammes, P.G. e Weller, D.J., *Synthesis*, 1205 (1995).
47. Bellamy, M., in "The Infra-Red Spectra of Complex Molecules", Methuen, London (1956).
48. 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).
49. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
50. Kennedy, D.F., Crisma, M., Toniolo, C. e Chapman, D., *Biochemistry*, **30**, 6541 (1991).
51. a) Martin, R. e Hautal, G., "Dimethyl Sulphoxide", Van Nostran-Reinhold, Wokingham, U.K., (1975); b) Pitner, T. P. e Unry, D. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1399 (1972).
52. Kopple, K. D., e Schamper, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3664 (1972).
53. Beychok, S., in "Poly- α -Amino Acids", Vol. 1, Fasman, G.D. Ed., Dekker, New York, pp. 293-337 (1967).
54. Woody, A.W. e Tinoco, I. Jr., *J. Chem. Phys.*, **46**, 4927 (1967).
55. Sudha, T.S., Vijayakumar, E.K.S. e Balaram, P., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **22**, 464 (1983).
56. Greenfield, N., Fasman, G., *Biochemistry*, **8**, 4108 (1969).
57. Toniolo, C., Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M. e Kamphuis, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2744 (1996).
58. Manning, M.C. e Woody, R.W., *Biopolymers*, **31**, 569 (1991).

59. Yoder, A., Polese, A., Silva, R. A. G. D., Formaggio, F., Crisma, M., Broxterman, Q.B., Kamphuis, J., Toniolo, C. e Keiderling, T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10278 (1997).