

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**Ammidi conformazionalmente interconnesse: induzione  
asimmetrica remota mediante un trasferimento meccanico di  
informazioni stereochimiche**

Relatore: Prof. Alessandro Moretto

Controrelatore: Prof. Elisabetta Collini

Laureando: Elena Maran

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



# Indice

<i>Abbreviazioni</i> .....	iv
<i>Riassunto</i> .....	vi
<i>Abstract</i> .....	vii
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b> Nozioni generali di stereochimica peptidica .....	<b>1</b>
<b>1.2</b> Gli $\alpha$ -amminoacidi C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti .....	<b>4</b>
<b>1.3</b> Chiarezza ed effetto del senso di spiralizzazione delle eliche peptidiche.....	<b>6</b>
<b>1.4</b> Stereoselettività .....	<b>8</b>
<b>1.5</b> Scopo della Tesi .....	<b>12</b>
<b>2. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b> Reagenti .....	<b>13</b>
<b>2.2</b> Strumentazione e metodi .....	<b>16</b>
<b>2.3</b> Sintesi .....	<b>18</b>
<b>2.3.1</b> Sintesi dell’ <i>Boc-Aib-OH</i> .....	<b>18</b>
<b>2.3.2</b> Sintesi dell’ <i>NCA</i> usando il <i>T<sub>3</sub>P</i> .....	<b>19</b>
<b>2.3.3</b> Sintesi dell’ <i>NCA</i> usando l’ossalil cloruro .....	<b>20</b>
<b>2.3.4</b> Sintesi del polimero achirale .....	<b>21</b>
<b>2.3.5</b> Sintesi del polimero <i>R</i> .....	<b>21</b>
<b>2.3.6</b> Sintesi del polimero <i>S</i> .....	<b>22</b>
<b>2.3.7</b> Funzionalizzazione del polimero achirale .....	<b>23</b>
<b>2.3.8</b> Funzionalizzazione del polimero <i>R</i> .....	<b>24</b>
<b>2.3.9</b> Funzionalizzazione del polimero <i>S</i> .....	<b>25</b>
<b>2.3.10</b> Sintesi di <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc</i> .....	<b>26</b>
<b>2.3.11</b> Rimozione del gruppo <i>Fmoc</i> dal peptide <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc</i> .....	<b>29</b>
<b>2.3.12</b> Funzionalizzazione di <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib</i> .....	<b>30</b>
<b>2.3.13</b> Sintesi di <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib- Gly -Fmoc</i> .....	<b>31</b>
<b>2.3.14</b> Sblocco dei campioni di resina prelevati durante la sintesi di <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc</i> e del campione di resina di <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly-Fmoc</i> .....	<b>32</b>
<b>2.3.15</b> Funzionalizzazione di <i>Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib- Gly -Fmoc</i> .....	<b>32</b>
<b>2.3.16</b> Sintesi del catalizzatore corto .....	<b>33</b>
<b>2.4</b> Prove di reazione.....	<b>34</b>
<b>2.4.1</b> Reazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dalla <i>L</i> -prolina .....	<b>34</b>
<b>2.4.2</b> Reazione tra cicloesanone e 4-clorobenzaldeide catalizzata dalla <i>L</i> -prolina .....	<b>35</b>
<b>2.4.3</b> Reazione tra cicloesanone e 4-carbossibenaldeide catalizzata dalla <i>L</i> -prolina .....	<b>35</b>

2.4.4 Reazione della L-prolina e 4-nitrobenzaldeide, 4-clorobenzaldeide 4-carbossiben- zaldeide .....	36
2.4.5 Reazione di comparazione tra la L-prolina e il catalizzatore corto .....	36
2.4.6 Reazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala- Aib-Ala-Aib funzionalizzato .....	37
2.4.7 Reazione tra cicloesanone e 4-clorobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala- Aib-Ala-Aib funzionalizzato .....	38
2.4.8 Reazione tra cicloesanone e 4-carbossiben- zaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala- Aib-Ala-Aib funzionalizzato .....	38
2.4.9 Reazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala- Aib-Ala-Aib-Gly funzionalizzato.....	39
2.4.10 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero achirale funzionalizzato, in ACN .....	40
2.4.11 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in ACN .....	40
2.4.12 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in ACN .....	41
2.4.13 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in CHCl <sub>3</sub> .....	41
2.4.14 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in CHCl <sub>3</sub> .....	42
2.4.15 Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero achirale funzionalizzato, in ACN .....	43
2.4.16 Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in ACN .....	43
2.4.17 Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in ACN .....	44
2.4.18 Reazione di Strecker sul polimero achirale.....	44
2.4.19 Reazione di Strecker sul polimero R.....	45
2.4.20 Reazione di Strecker sul polimero S.....	46
2.4.21 Reazione di epossidazione del trans-chalcone .....	46
2.4.22 Reazione di epossidazione usando il polimero funzionalizzato R.....	47
2.4.23 Reazione epossidazione usando il polimero funzionalizzato S .....	48
3. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	49
3.1 NCA Sintesi e Polimerizzazione .....	49
3.2 NCA Sintesi e Polimerizzazione di omopeptidi di Aib.....	53
3.3 Preparazione di Aib-NCA .....	53
3.4 Polimerizzazione di Aib-NCA .....	56
3.5 Propagazione della chiralità lungo lo scheletro peptidico .....	59

3.6 Stereoselezione nella reazione di Strecker .....	62
3.7 Stereoselezione nella condensazione aldolica .....	67
3.7.1 Condensazione aldolica usando un polimero supportato .....	71
3.8 Stereoselezione nella epossidazione .....	75
4. CONCLUSIONI .....	81
5. BIBLIOGRAFIA .....	83

## Abbreviazioni

AcOH	= Acido Acetico
ACN	= Acetonitrile
Aib	= acido $\alpha$ -amminoisobutirrico
Boc	= tert-butossicarbonile
CHCl <sub>3</sub>	= Cloroformio
CDCl <sub>3</sub>	= Cloroformio deuterato
DC	= Dicroismo circolare
DCM	= Diclorometano
Dic	= N,N'-diisopropilcarbodiimide
DIPEA	= N-etil-diisopropilammina
DMF	= N,N-Dimetilformammide
DMSO	= Dimetilsolfossido
EtOAc	= Etil acetato
EtOH	= Etanolo assoluto anidro
ESI	= Ionizzazione elettrospray
ESI-TOF	= Ionizzazione elettrospray a tempo di volo
Fmoc	= 9-fluorenilmetossicarbonile
Gly	= Glicina
H <sub>2</sub> O	= Acqua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	= Perossido di idrogeno
HPLC	= Cromatografia liquida ad alta prestazione
MeOH	= Metanolo
NCA	= N-carbossianidride
NMR	= Risonanza magnetica nucleare
T <sub>3</sub> P	= Soluzione di anidride propilfosfonica
TBAB	= Tetra-n-butilammonio bromuro
TEA	= Trietilammina
TFA	= Acido trifluoroacetico
TFE	= 2,2,2-trifluoroetanolo



## *Riassunto*

La stereochimica può essere vista come un mezzo chimico di trasferimento di informazioni specifiche durante un processo sintetico. I metodi convenzionali di sintesi asimmetrica dei composti organici impiegano l'uso di catalizzatori chirali o quantità stechiometriche di substrati chirali. In entrambi i casi, le componenti che reagiscono devono essere in prossimità dell'entità che introduce chiralità nel sistema. L'affidabilità della comunicazione dipende da alcuni di fattori fra essi correlati, ma è chiaro che lo stereo-controllo è eccellente quando la vicinanza e rigidità dei siti di reazione e delle molecole coinvolte sono fra loro ottimizzate. In particolare, in una tipica reazione stereoselettiva, la stereochimica esistente governa la formazione di un nuovo centro stereogenico controllando la direzione di attacco di un reagente o di un catalizzatore in un sito reattivo. In genere è richiesto uno stretto contatto spaziale tra il centro di controllo e il sito di reazione, e ci si può aspettare, che l'induzione 1,2 o 1,3-asimmetrica (dove i due siti sono separati da uno o due legami) dia normalmente elevati livelli di stereoselettività.

In questa tesi vogliamo dimostrare che le informazioni stereochimiche possono essere trasmesse efficientemente attraverso distanze molto maggiori rispetto a quelle comunemente coinvolte nelle sintesi asimmetriche. In particolare, vogliamo determinare sperimentalmente che le informazioni chirali possono essere trasmesse con notevole selettività attraverso numerose connessioni di atomi achirali per dare efficienti eccessi enantiomerici e diastereomerici. Il nostro studio in parte contrasta con l'aspettativa generale secondo cui una diminuzione della selettività deriverebbe da un aumento della separazione del centro che introduce chiralità e il sito di reazione. Questa capacità di fornire asimmetria molecolare su distanze maggiori potrebbe essere utile per la sintesi di nuove molecole chirali altrimenti difficili da ottenere mediante metodi convenzionali. Per studiare la diastereo- e l'enantio-selettività sono stati usati come catalizzatori dei poli-Aib o una loro versione opportunamente modificata, e sono state prese in considerazione tre reazioni chimiche modello: (i) una condensazione aldolica, (ii) una epossidazione e infine, (iii) la reazione di Strecker.

## *Abstract*

Stereochemistry can be viewed as a chemical means of transferring specific information during a synthetic process. Conventional methods of asymmetric synthesis of organic compounds employ the use of chiral catalysts or stoichiometric amounts of chiral substrates. In both cases, the reacting components must be in proximity to the entity that introduces chirality into the system. The reliability of communication depends on some interrelated factors, but it is clear that stereo-control is excellent when the proximity and rigidity of the reaction sites and molecules involved are optimized between them. In particular, in a typical stereoselective reaction, the existing stereochemistry governs the formation of a new stereogenic center by controlling the direction of attack of a reactant or catalyst at a reactive site. Typically, close spatial contact between the control center and the reaction site is required, and it can be expected that 1,2- or 1,3-asymmetric induction (where the two sites are separated by one or two bonds) normally gives high levels of stereoselectivity.

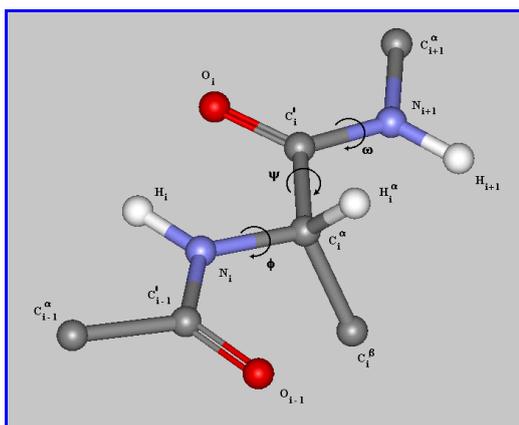
In this thesis we want to demonstrate that stereochemical information can be transmitted efficiently across distances much greater than those commonly involved in asymmetric syntheses. In particular, we want to experimentally determine that chiral information can be transmitted with remarkable selectivity through numerous connections of achiral atoms to give efficient enantiomeric and diastereomeric excesses. Our study partly contrasts with the general expectation that a decrease in selectivity would result from an increase in center separation that introduces chirality and reaction site. This ability to provide molecular asymmetry over longer distances could be useful for the synthesis of new chiral molecules that are otherwise difficult to achieve by conventional methods. To study the diastereo- and enantio-selectivity, poly-Aib or an appropriately modified version of them were used as catalysts, and three model chemical reactions were taken into consideration: (i) an aldol condensation, (ii) an epoxidation and finally, (iii) the Strecker reaction.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Nozioni generali di stereochimica peptidica

Il modo di disporsi di una catena peptidica nello spazio (struttura secondaria) è influenzato soprattutto dalla natura degli  $\alpha$ -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 (**Figura 1**) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica.<sup>1</sup>

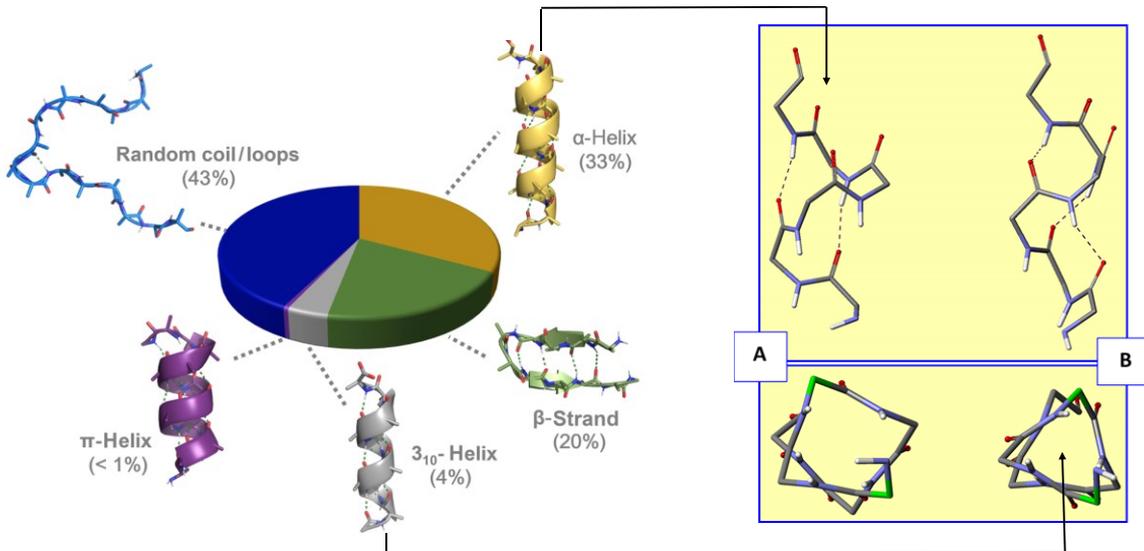


**Figura 1:** Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ( $\Phi_i = \Psi_i = \omega_i = 180^\circ$ ) e il residuo centrale è in configurazione L.

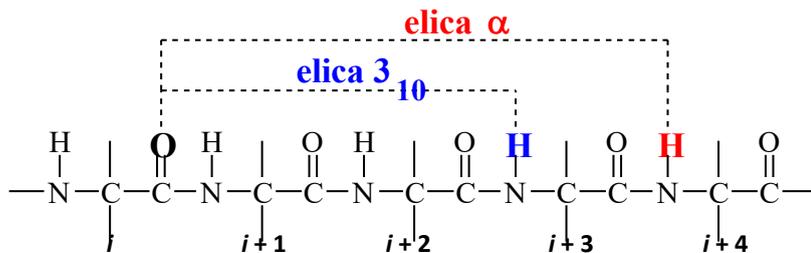
---

Le strutture secondarie più note sono l'elica  $\alpha$ , le strutture  $\beta$ , i ripiegamenti  $\beta$  e l'elica  $3_{10}$ . Fra le strutture secondarie organizzate le strutture elicoidali sono le più comuni. Esse differiscono per il numero di residui di  $\alpha$ -amminoacidi per giro d'elica, per il passo dell'elica, per la grandezza dei cicli formati dai legami a idrogeno intramolecolari C=O · · · H-N e per gli angoli torsionali ( $\phi$  e  $\psi$ ). Le eliche più note sono l'elica  $\alpha$  e l'elica  $3_{10}$ .<sup>2</sup> L' $\alpha$ -elica (**Figura 2a**) 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  $i+4$  ( $i \leftarrow i+4$ ) (**Figura 3**), che formano così cicli di 13 atomi (ripiegamenti  $\alpha$  o strutture  $C_{13}$ ). L'elica  $3_{10}$  (**Figura 2b**) ha 3.24 residui amminoacidici per giro. È stabilizzata da legami ad idrogeno intramolecolari tra il gruppo C=O in posizione  $i$  e il gruppo N-H in

posizione  $i+3$  ( $i \leftarrow i+3$ ) (**Figura 3**), che formano così cicli di 10 atomi (ripiegamenti  $\beta$  o strutture  $C_{10}$ ). L'elica  $3_{10}$  risulta più stretta e allungata rispetto all' $\alpha$ -elica. I parametri che caratterizzano le due strutture sono riportati in Tabella 1.<sup>2</sup>



**Figura 2:** **A)** Elica  $\alpha$  destrogira; **B)** Elica  $3_{10}$  destrogira. Vista laterale (sopra) e vista lungo l'asse dell'elica (sotto).

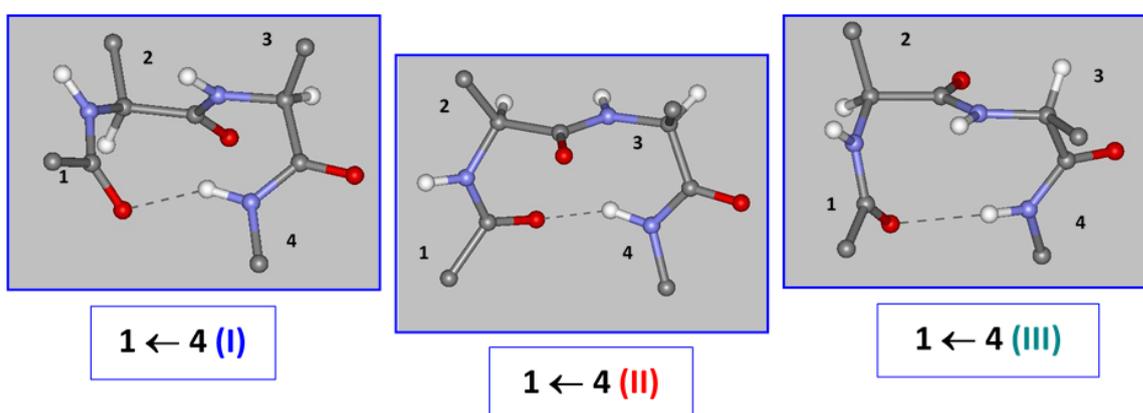


**Figura 3:** Legami a idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche ( $\alpha$  e  $3_{10}$ ).

**Tabella 1** Parametri delle eliche destrogire di tipo  $3_{10}$  e  $\alpha$

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

I ripiegamenti  $\beta^{3-5}$  (**Figura 4**) sono stati classificati da Venkatachalam<sup>3</sup> nei tipi I, II, III (ripiegamenti destrogiri) e nei corrispondenti enantiomeri I', II', III' a seconda dei valori degli angoli torsionali assunti dai residui  $i+1$  e  $i+2$  compresi entro il legame a idrogeno (**Tabella 2**). Tali ripiegamenti rivestono una notevole importanza nello studio della struttura secondaria e terziaria delle proteine. Va anche ricordato che la successione di ripiegamenti- $\beta$  di tipo III o III' genera eliche- $3_{10}$  destrogire o sinistrogire, rispettivamente.



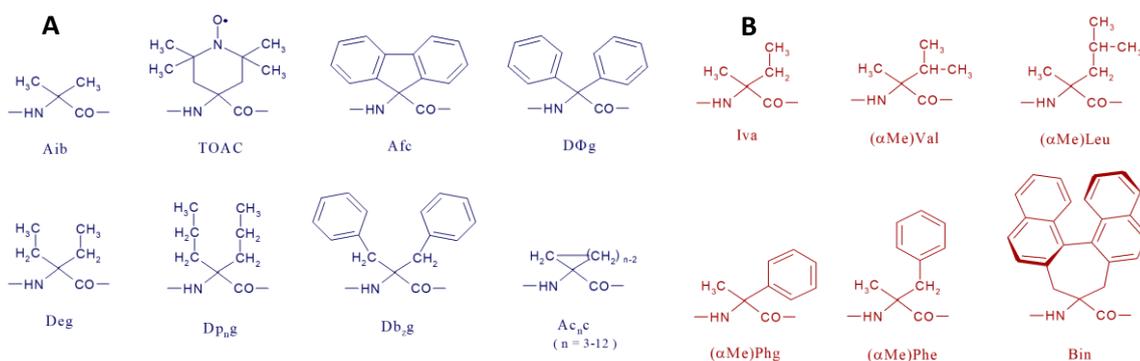
**Figura 4:** Rappresentazione dei tre ripiegamenti  $\beta$  ideali (I, II e III) aventi il legame peptidico centrale trans).

**Tabella 2** Valori degli angoli torsionali per i residui  $i+1$  e  $i+2$  nei ripiegamenti  $\beta$  di tipo I, II e III

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

## 1.2 Gli $\alpha$ -amminoacidi $C^\alpha$ -tetrasostituiti

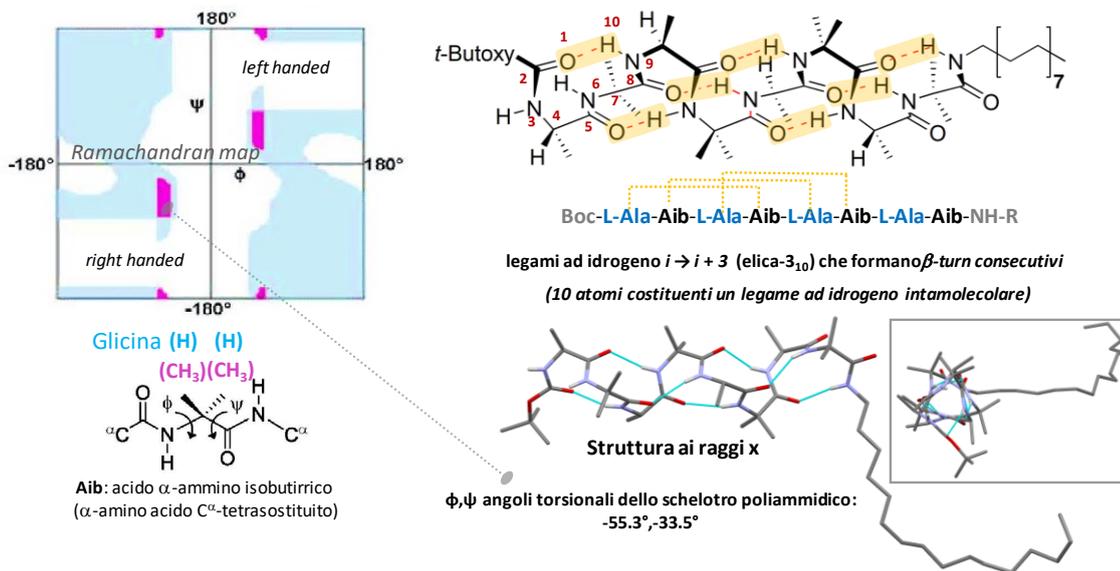
Gli  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti differiscono dagli  $\alpha$ -amminoacidi proteici ( $C^\alpha$ -trisostituiti) in quanto il loro atomo di carbonio in  $\alpha$  è tetrasostituito. Il notevole ingombro sterico risultante restringe considerevolmente le possibili rotazioni attorno ai legami N- $C^\alpha$  e  $C^\alpha$ - $C^1$  (angoli torsionali  $\phi$  e  $\psi$ , rispettivamente) e stabilizza selettivamente alcune strutture secondarie ordinate. Le formule di alcuni amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti, studiati dal nostro gruppo di ricerca, sono riportate nella **Figura 5**.



**Figura 5:** **A)** Esempi di  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti achirali. **B)** Esempi di  $\alpha$ -amminoacidi  $C^\alpha$ -tetrasostituiti chirali.

Calcoli di energia conformazionale<sup>5-8</sup> sull'Aib (acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico) (**Figura 5A**), il più semplice  $\alpha$ -amminoacido  $C^\alpha$ -tetrasostituito, hanno evidenziato che la presenza di due gruppi metilici sul  $C^\alpha$  impone una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile, che risulta essenzialmente confinato alla regione delle conformazioni elicoidali di tipo  $\alpha$  (**Figura 2A**) e di tipo- $3_{10}$  (**Figura 2B**). Poiché il residuo di Aib è achirale le eliche destrogire e sinistrogire dei suoi omopeptidi sono isoenergetiche e quindi





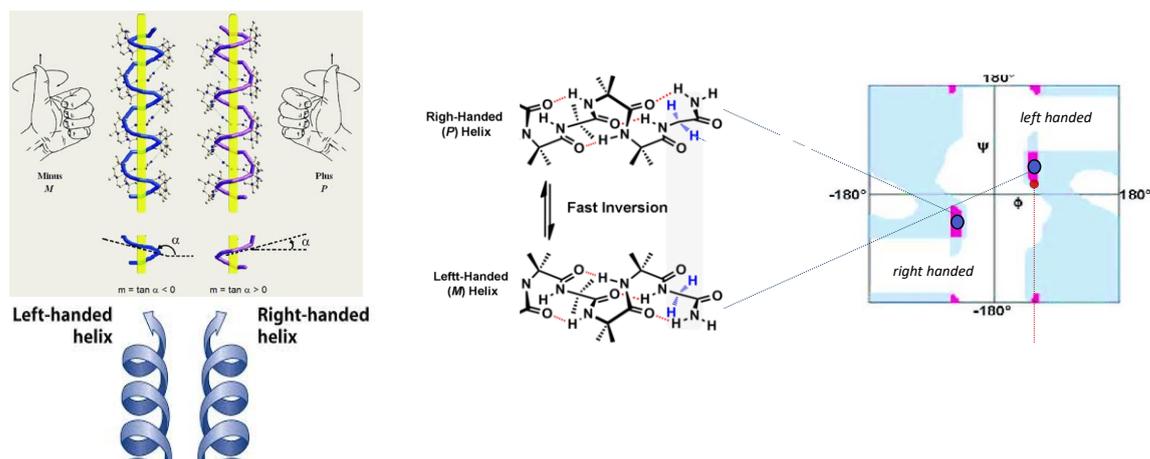
**Figura 7: Sinistra:** Confronto energetico fra Glicina ed Aib. Zone blu accessibili a polipeptidi di Glicina e zone rosse accessibili a polipeptidi di Aib. **Destra:** Struttura chimica e struttura ai raggi-X di un recente peptide sintetizzato nei nostri laboratori.

Come evidenziato nella mappa energetica di Ramachandran, il confronto fra una Glicina (che contiene due idrogeni legati al carbonio in alfa) ed un Aib (che contiene due metili legati al carbonio in alfa) risulta nel restringimento delle possibili opzioni conformazionali dei peptidi che li contengono. Il peptide sintetizzato Boc-(L-Ala-Aib)<sub>4</sub>-NHR (R=C16) infatti presenta una forte restrizione conformazionale che lo ripiega in 6 cicli consecutivi di tipo  $\beta$ -turn che generano un'elica-3<sub>10</sub> destrorsa che fitta in una regione energetica caratterizzata dagli angoli torsionali prossimi a quelli ideali di un'elica-3<sub>10</sub> ( $\Phi = -57^\circ$  e  $\Psi = -30^\circ$ ). Questo dato è in accordo con i dati strutturali di letteratura su peptidi contenenti Aib confermando l'elevata capacità di tale residuo aminoacidico non proteico di promuovere e stabilizzare ripiegamenti  $\beta$  e conformazioni elicoidali  $\alpha$  e 3<sub>10</sub>.

### 1.3 Chiarezza ed effetto del senso di spiralizzazione delle eliche peptidiche

L' $\alpha$ -elica è una struttura secondaria limitata in termini di conformazione che accetta variazioni minime nell'intervallo degli angoli torsionali dei legami ammidici costituenti il suo backbone. Rimane energeticamente favorevole grazie alla rete di legami H intra-elicoidali e lo sfalsamento delle catene laterali, che riduce al minimo le

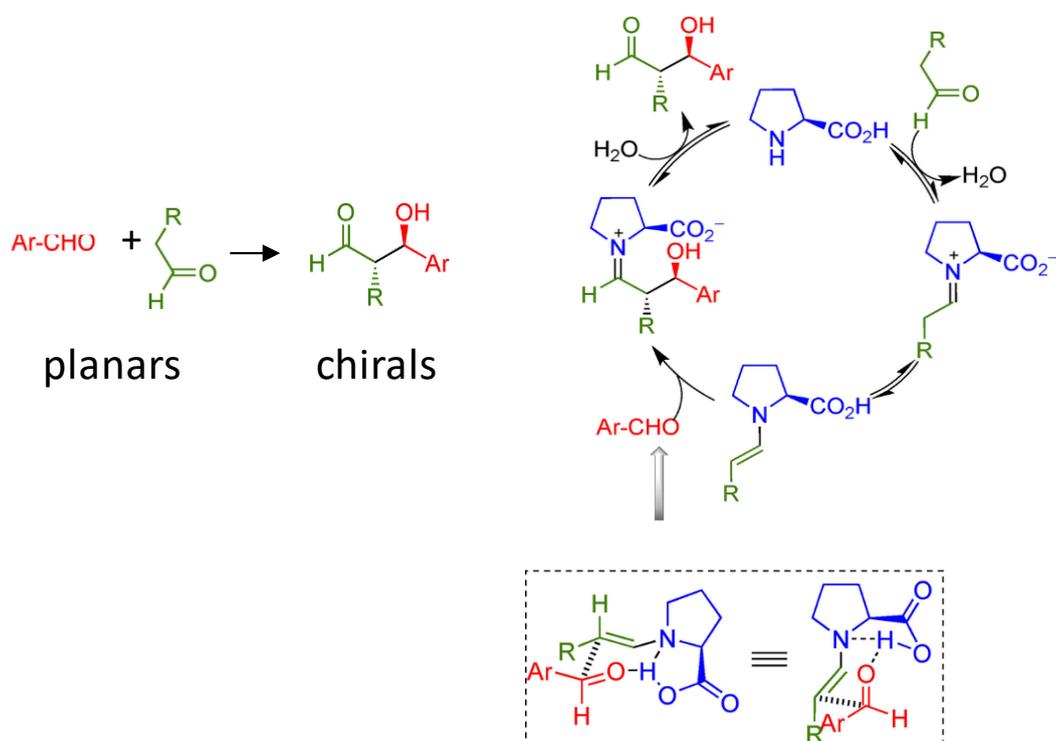
interazioni negative steriche ed elettroniche (**Figura 2A**). Al contrario, le catene laterali delle eliche-3<sub>10</sub> sono disposte in sovrapposizione lungo l'elica, rendendole termodinamicamente meno stabili (**Figura 2B**). Questo è stato ipotizzato come la ragione della minore abbondanza e della minore lunghezza delle eliche-3<sub>10</sub> rispetto alle  $\alpha$ -eliche. Mentre nelle proteine naturali le  $\alpha$ -eliche sono lunghe in media dieci residui, le eliche-3<sub>10</sub> sono significativamente più corte e spesso coinvolgono una singola "spira" elicoidale comprendente solo tre residui.<sup>14</sup> Le eliche-3<sub>10</sub> più lunghe nelle proteine naturali sono formate da tre giri elicoidali con meno di dieci residui, la lunghezza media trovata nelle  $\alpha$ -eliche. Nei funghi naturali sono state segnalate eliche-3<sub>10</sub> più lunghe dei peptidi derivati e sintetici ad alto contenuto di Aib.<sup>15</sup> In particolare, se il peptide è composto solo da Aib, la risultate struttura secondaria elicoidale è caratterizzata dalla copresenza in forma racemica delle due strutture elicoidali spiralizzate in maniera opposta. Tali strutture sono in equilibrio dinamico di interconversione e vanno ad occupare situazioni energetiche peculiari come mostrato in **Figura 8**. Come nomenclatura, la struttura spiralizzata destrorsa prende il nome di elica (*P*) (plus) e quella spiralizzata sinistrorsa di (*M*) (minus).



**Figura 8: Sinistra:** Confronto energetico fra strutture elicoidali raceme. **Destra:** interconversione dinamica delle strutture elicoidali (*P*)/(*M*).

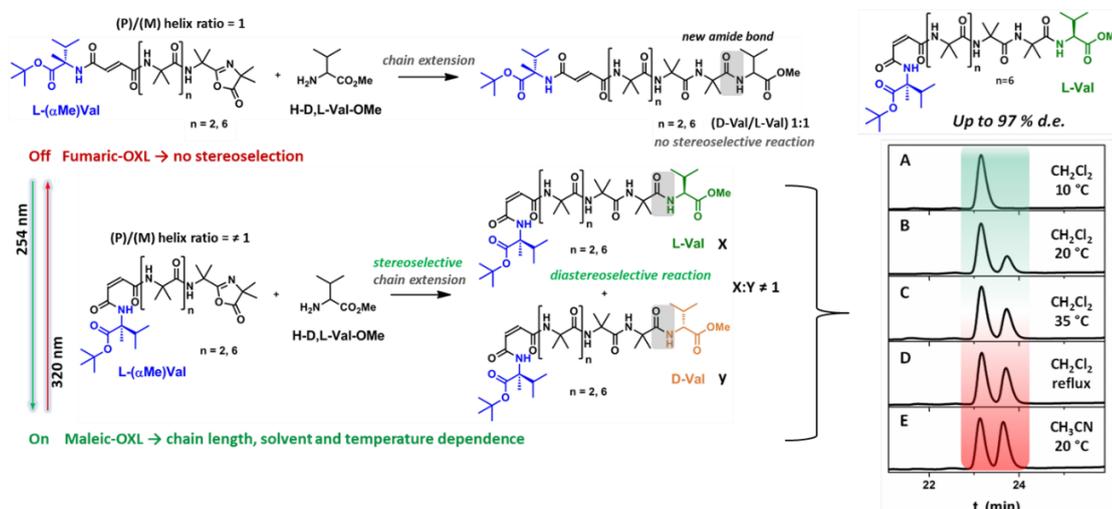
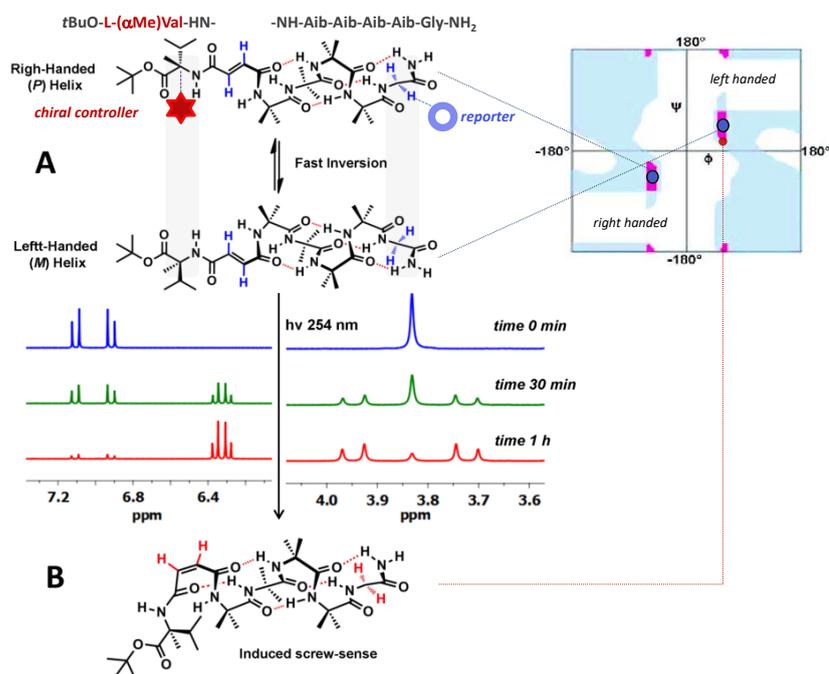
## 1.4 Stereoselettività

La sintesi stereoselettiva, che mira a controllare la configurazione relativa e assoluta nella formazione di nuovi centri stereogenici, ha portato all'assegnazione, nel 2001, del Premio Nobel a tre scienziati nel campo della catalisi asimmetrica<sup>16</sup> confermando che la disciplina della stereoselettività è una delle grandi conquiste della chimica della fine del XX secolo. La stereochimica può essere vista come un mezzo chimico di trasferimento di informazioni specifiche durante un processo sintetico. L'affidabilità della comunicazione dipende da alcuni fattori fra essi correlati, ma è chiaro che lo stereo-controllo è eccellente quando la vicinanza e rigidità dei siti di reazione e delle molecole coinvolte sono fra loro ottimizzate. In particolare, in una tipica reazione stereoselettiva, la stereochimica esistente governa la formazione di un nuovo centro stereogenico controllando la direzione di attacco di un reagente o di un catalizzatore in un sito reattivo. In genere è richiesto uno stretto contatto spaziale tra il centro di controllo e il sito di reazione, e ci si può aspettare, che l'induzione 1,2 o 1,3-asimmetrica (dove i due siti sono separati da uno o due legami) dia normalmente elevati livelli di stereoselettività.<sup>17</sup> L'induzione asimmetrica su distanze maggiori ("induzione asimmetrica remota", a cui di solito si riferisce all'induzione 1,4-asimmetrica e oltre) è possibile, ma solo se la flessibilità della molecola è limitata, solitamente dalla formazione (a volte temporanea) di una struttura ciclica.<sup>18</sup> Come esempio si riporta in **Figura 9** l'effetto sinergico ottimale per la reazione aldolica stereospecifica catalizzata dalla prolina tramite catalisi enammina.



**Figura 9:** Meccanismo proposto per la reazione aldolica catalizzata da prolina tramite catalisi enammina che evidenzia l'ottimizzazione nello stato di transizione fra "prossimità e rigidità" nel trasferimento della chiralità dal catalizzatore alle nuove molecole.

Nel nostro gruppo, abbiamo riportato come l'induzione asimmetrica può essere ottenuta su più di 20 legami di distanza dal centro chirale recante l'informazione stereospecifica in molecole non cicliche utilizzando strutture semirigide in cui le interazioni trasmesse tra una serie di gruppi polarizzati consentono a un centro stereogenico di controllo, di influenzare l'ambiente locale di un sito reattivo remoto.<sup>19</sup> Nel lavoro del nostro laboratorio, **Figura 10**, è stato introdotto un legame fumarammidico insaturo E nella parte N terminale di omopeptidi di Aib mediante metodi di sintesi standard e fotoisomerizzato nel suo isomero Z (maleammide) mediante irradiazione con luce UV. Come risultato della fotoisomerizzazione, si è formato un nuovo contatto via legame ad idrogeno tra i domini peptidici situati su entrambi i lati del legame insaturo. L'uso del linker fumarammide/maleammide per accoppiare un frammento chirale e uno achirale consente una modifica nella rete di legami idrogeno che impone una nuova preferenza conformazionale, inducendo una preferenza di spiralizzazione favorito nel dominio achirale del omopeptide lungo dalla maleammide, senso di spiralizzazione preferenziale che invece è assente nella fumarammide.



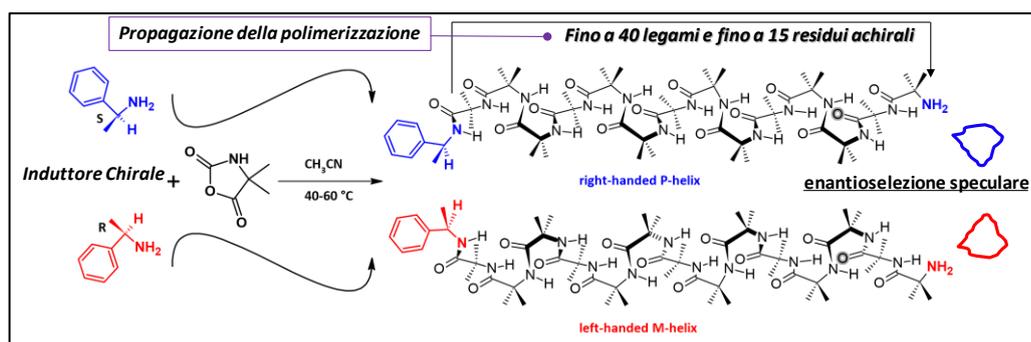
**Figura 10: Sopra:** rappresentazione del sistema off-on per l'attivazione della preferenza conformazionale chirale. **Sotto:** Confronto schematico dell'enatio-selezione fra il sistema racemo ed il sistema chirale.

Il passaggio dalla fumarammide (conformazionalmente isolante) alla maleammide (conformazionalmente conduttrice) consente di attivare la funzione chimica, in questo caso la stereoselettività, fornendo un analogo chimico di un fotodiodo, in cui la luce attiva la comunicazione elettronica. Pertanto, sono state condotte delle reazioni di stereoselettività a distanza di più di 20 legami dal controllore chirale che hanno evidenziato come questo approccio consenta il passaggio su lunghe distanze

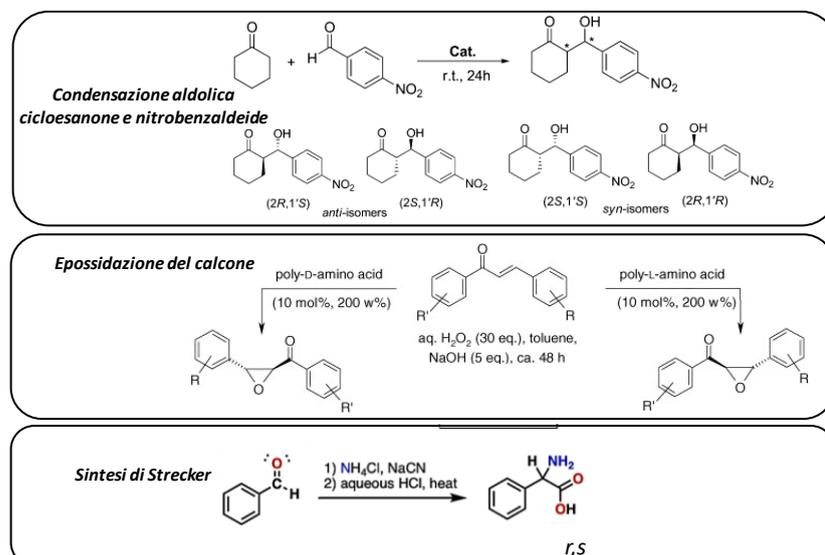
dell'informazione chirale. In altre parole, il sito di reazione risente di una informazione chirale a distanza di circa 1.5 nm.

## 1.5 Scopo della Tesi

In questo lavoro di tesi si vuole esplorare la capacità catalitica di peptidi a base Aib che contengono un solo sito chirale nella porzione C-terminale. Pertanto, si vuole sfruttare la porzione N-terminale per esercitare catalisi stereo-selettiva nei confronti di alcune reazioni chimiche. A tale fine verranno selezionati e studiati diversi induttori di chiralità, e sperimentata una metodologia chimica di sintesi di peptidi in grado di produrre in una sola reazione diverse lunghezze di polipeptidi a base di Aib. Tali polipeptidi conteranno tutti la funzione N-terminale come ammina primaria NH<sub>2</sub>-. La variazione fra essi sarà dunque la distanza fra il centro induttore di chiralità ed il sito di catalisi Schematicamente:



Tale ammina primaria verrà usata in questa forma o in una versione opportunamente modificata come catalizzatore per una serie di reazioni enantio- e distereo-selettive. Le reazioni chimiche che verranno prese in considerazione come modelli di enantio- e stereo-selezione sono: (i) una condensazione aldolica, (ii) una epossidazione e infine, (iii) la reazione di Strecker.



## 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1 Reagenti

In **Tabella 3** sono riportati i reagenti e i solventi utilizzati durante il lavoro di Tesi:

**Tabella 3** Reagenti e solventi utilizzati.

Reagente	Formula	Densità [g/mL]	PM [g/mol]	Produttore
Diclorometano HPLC ( $\geq$ 99.95%)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.33	84.93	Carlo Erba
Cloroformio analisi ( $\geq$ 99.9%)	CHCl <sub>3</sub>	1.474	119.39	Carlo Erba
n-esano ACS ( $\geq$ 99.9%)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0.666	86.18	Carlo Erba
Acetonitrile HPLC ( $\geq$ 99.9%)	CH <sub>3</sub> CN	0.78	41.05	Carlo Erba
Acetonitrile anidro ( $\geq$ 99.9%)	CH <sub>3</sub> CN	0.78	41.05	Carlo Erba
Metanolo HPLC ( $\geq$ 99.9%)	CH <sub>3</sub> OH	0.79	32.042	Carlo Erba
Metanolo Anidro ( $\geq$ 99.9%)	CH <sub>3</sub> OH	0.79	32.042	Carlo Erba
Etanolo assoluto anidro HPLC ( $\geq$ 99.9%)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	0.79	46.07	Carlo Erba
Propan-2-olo HPLC ( $\geq$ 99.9%)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	0.784	60.1	Carlo Erba
n-butanolo	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	0.81	74.12	Sigma- Aldrich
Etil acetato ACS	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0.901	88	Carlo Erba
Toluene anidro	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	0.87	92.14	Sigma- Aldrich

N,N-Dimetilformammide (≥ 99.9%)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NOCH	0.945	73.1	Carlo Erba
1,4-diossano (= 99.8%)	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1.03	88.11	Sigma-Aldrich
Aib-OH (≥ 98%)	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-	103.12	Merck
Idrossido di sodio	NaOH	-	39.997	Carlo Erba
Di-terz-butildicarbonato	[(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COCO] <sub>2</sub> O	-	218.25	Merck
Fmoc-Ala-OH (≥ 98%)	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	-	311.33	Merck
Fmoc-Aib-OH (≥ 98%)	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	-	325.36	Merck
Fmoc-Gly-OH (≥ 98%)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-	75,07	Merck
Resina 2-clorotritilcloruro loading 1.6 mmol Cl-/g resina	-	-	-	Iris
N-etil-diisopropilammina (≥ 99%)	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N	0.742	129.24	Sigma-Aldrich
N,N'-diisopropilcarbodiimide (= 99%)	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	0.815	126.20	Merck
Oxya pure (≥ 99%)	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	142.11	Merck
1,1,1,3,3,3-esafuoro-2-propanolo (≥ 99%)	CF <sub>3</sub> CHOH	1.596	168.04	Sigma-Aldrich
2,2,2-trifluoroetanolo(≥ 99%)	(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	1.38	100.04	Sigma-Aldrich
Boc-Aib-OH (≥ 98%)	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	-	203.24	Merck
Piridina (≥ 99%)	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	0.982	79.1	Sigma-Aldrich

Soluzione di anidride propilfosfonica, T <sub>3</sub> P (= 50%)	C <sub>6</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> P <sub>3</sub>	1.069	318.18	Merck
α-pinene (= 98%)	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub>	0.858	136.238	Merck
Ossalil cloruro (≥ 98%)	C <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.455	126.92	
(S)-(-)-α-Metilbenzilammina	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>	0.94	121.18	Merck
(R)-(+)-α-Metilbenzilammina	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>	0.94	121.18	Merck
Benzilammina	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N	0.98	107.16	Merck
2-carbossibenzaldeide (≥98%)	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1.404	150.13	Alfa Aesar
Acido Acetico Glaciale	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1.05	60.05	Merck
Sodio ciano boroidruo	NaCN(BH <sub>3</sub> )	-	62.84	Lancaster
Cianuro di potassio	KCN	-	65.12	
Ciclopentanone (≥ 99%)	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	0.95	84.12	Merck
Cicloesanone (≥ 99%)	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	0.95	98.14	Merck
4-Nitrobenzaldeide	4-(NO <sub>2</sub> )C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O	-	151.12	Sigma-Aldrich
4-Clorobenzaldeide	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> ClO	-	140.57	Sigma-Aldrich
4-Carbossibenzaldeide	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-	150.13	Fluka
Trans-chalcone	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	208.26	Merck
Acqua ossigenata (30%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.11	34.01	Sigma-Aldrich
Acqua	H <sub>2</sub> O	1	16	-
Acqua MilliQ	H <sub>2</sub> O	1	16	-
Idrogenosolfato di potassio	KHSO <sub>4</sub>	-	136.17	Carlo Erba
Solfato di sodio anidro	NaSO <sub>4</sub>	-	142.05	Carlo Erba
Cloruro di sodio	NaCl	-	58.44	Carlo Erba

Cloroformio deuterato (= 99.80%)	CDCl <sub>3</sub>	1.500	120.38	Sigma- Aldrich
Dimetilsolfossido deuterato (= 99.80%) DMSO-d6	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	1.190	84.17	Sigma- Aldrich
Sabbia per cromatografia	-	-	-	Carlo Erba

## 2.2 Strumentazione e metodi

In **Tabella 4** è elencata la strumentazione utilizzata in questo lavoro di Tesi:

**Tabella 4** Strumentazione utilizzata nel lavoro di tesi.

Strumento	Modello
NMR	Brucker Avance 400 MHz
HPLC	Agilent 1200 (Palo Alto, CA)
HPLC-Massa	Perseptive Biosystem Mariner ESI- ToF5220 (Foster City, CA) ACQUITY UPLC H-Class System con Xevo G2-XS QToF (Waters, USA)
Dicroismo Circolare	J-1500 Jasco CD spectrometer
TLC	Lastrine di gel di silice 60 F254 (Merck)

## Risonanza magnetica nucleare

Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR dei campioni sono stati ottenuti sciogliendo i campioni in CDCl<sub>3</sub> o DMSO-d6. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione rispetto ai segnali della frazione non deuterata dei solventi. Le molteplicità dei picchi sono espresse come: s – singoletto, d – doppietto, t – tripletto, q – quartetto, qui – quintetto, sex – sestetto, dd – doppietto di doppietti e m – multipletto.

### **Cromatografia su strato sottile**

Le reazioni sono state seguite tramite cromatografia su strato sottile utilizzando lastre di gel di silice 60 F254 (Merck). I composti contenenti cromofori sono stati rivelati tramite lampada UV (Upland, modello UVG-54,  $\lambda = 254$  nm, 230 V, 50/60 Hz). Si è utilizzata anche l'ossidazione con acido fosfomolibdico e ninidrina.

- **Ninidrina:** (usato per rilevare ammine/amminoacidi con gruppo amminico primario). Sciogliere 1.5 g di ninidrina in 100 ml di n-butanolo e aggiungere 3 ml di AcOH.
- **Acido Fosfomolibdico:** (usato per rilevare diversi gruppi funzionali). Sciogliere 10 g di PMA in 100 ml di etanolo assoluto.

### **Cromatografia liquida ad alte prestazioni**

Le misure HPLC sono state eseguite utilizzando un rivelatore UV a lunghezza d'onda di 250 nm, diverse colonne e diversi eluenti.

La colonna Kromasil 100-5-phenil 250 x 4.6 mm è stata utilizzata con eluenti: A = 9:1 H<sub>2</sub>O:ACN e B = 1:9 H<sub>2</sub>O:ACN, il gradiente è stato variato in base al composto da analizzare. Mentre la colonna chirale phenomenex Lux i-Cellulose-5 è stata usata con un gradiente isocratico isopropanolo:H<sub>2</sub>O 2:8.

Per l'analisi HPLC dei campioni di polimero e di catalizzatore sono stati sciolti in 1 mL di metanolo ed esafluoropropanolo. Sono stati analizzati sia con la colonna Kromasil 100-5-phenil 250 x 4.6 mm sia con la colonna phenomenex Lux i-Cellulose-5.

I campioni derivanti dallo sblocco della sintesi di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc sono stati diluiti usando 2 mL di metanolo e sono stati iniettati nell'HPLC usando una colonna Kromasil 100-5-phenil 250 x 4.6 mm e un gradiente di 0-100 B in 20 minuti.

### **Spettrometria di massa**

Gli spettri di massa sono stati eseguiti usando due diversi metodi di ionizzazione, il primo mediante ionizzazione elettrospray (ESI), raccolti in modalità positiva e strumento Perseptive Biosystem Mariner ESI-ToF5220 (Foster City, CA); il secondo mediante ESI-QToF e strumento ACQUITY UPLC H-Class System con Xevo G2-XS QToF (Waters, USA).

Per entrambi gli strumenti è stata usata una colonna C18 e un gradiente 0-100 B in 25 minuti o in 40 minuti in base ai composti analizzati, eluente A=9:1 acqua:acetonitrile, 0.05% TFA ed eluente B=1:9 acqua:acetonitrile, 0.05% TFA.

Per l'analisi HPLC-Massa dei campioni di polimero sono stati separati i polimeri di diverso peso molecolare usando HPLC raccogliendo manualmente le singole frazioni. È stato poi evaporato il solvente e i campioni sono stati sciolti in metanolo. È stata anche analizzata la miscela di polimeri e di catalizzatori.

Per l'analisi HPLC-MS i campioni derivanti dallo sblocco della sintesi di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc sono stati diluiti usando 2 mL di metanolo e sono stati iniettati nell'HPLC-MS usando una colonna C-8 e un gradiente di 30-100 di B in 10 minuti.

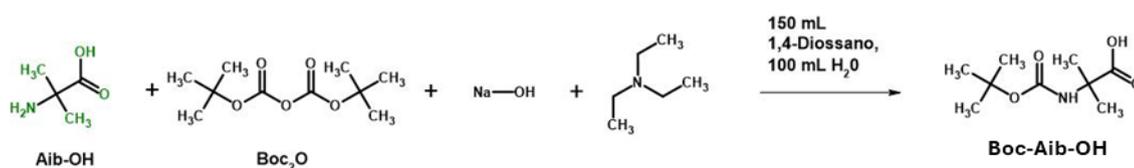
## Dicroismo Circolare

Gli spettri del dicroismo circolare sono stati ottenuti sciogliendo i composti in 2,2,2-trifluoroetano e analizzati con lo spettrometro-CD J-1500 Jasco CD spectrometer.

## 2.3 Sintesi

### 2.3.1 Sintesi dell'Boc-Aib-OH

Il Boc-Aib-OH è stato preparato a partire da 10 g di Aib-OH, 150 mL di 1,4-Diossano, 4.66 g di NaOH, 200 mL di acqua MilliQ, 16.30 g di Di-terz-butil dicarbonato, KHSO<sub>4</sub>, 200 mL di acetato di etile e 200 mL di n-esano. In **Figura 11** è riportata la reazione.



**Figura 11:** Reazione sintesi Boc-Aib-OH.

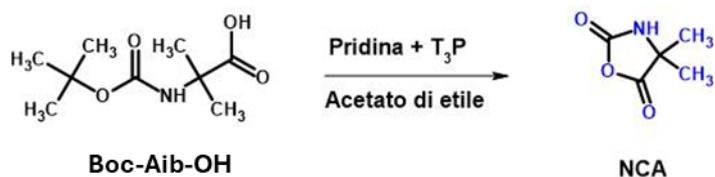
Per la sintesi del Boc-Aib-OH, sono stati pesati 10 g di Aib-OH, che sono stati inseriti in un pallone da 1L con ancoretta e sciolti in 100 mL di 1,4-Diossano, la soluzione è stata messa sotto agitazione magnetica. È stata preparata una soluzione contenente 1.2 equivalenti di NaOH rispetto all'Aib-OH e sono stati sciolti in 100 mL di acqua MilliQ, che

è stata poi inserita nel pallone di reazione. Sono stati sciolti 0.77 equivalenti di  $\text{Boc}_2\text{O}$  rispetto all'Aib-OH in 50 mL di 1,4-Diossano, questa soluzione è poi stata aggiunta al pallone di reazione. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione magnetica per 4-5 giorni.

Dopo 4-5 giorni è stato fatto un work-up concentrando la soluzione fino a metà del suo volume, poi è stata diluita con 100 mL di acqua MilliQ ed è stata portata a  $\text{pH}=4$  usando  $\text{KHSO}_4$ . Una volta raggiunto il pH desiderato la soluzione è stata trasferita in un imbuto separatore e sono state fatte due estrazioni con 100 mL di acetato di etile. La soluzione di acetato di etile è stata poi concentrata evaporando il solvente fino a ottenere circa 50 mL. A questa soluzione è stato aggiunto n-esano sotto agitazione, in questo modo il Boc-Aib-OH è precipitato. Infine, è stata filtrata la soluzione su gouch, e l'Aib-Boc-OH è stato seccato e poi stoccato in frigorifero.

### 2.3.2 Sintesi dell'NCA usando il $\text{T}_3\text{P}$

L'NCA è stata sintetizzata a partire da 10 g Boc-Aib-OH, 38 mL di  $\text{T}_3\text{P}$ , 100 mL di acetato di etile anidro e 3.96 mL di piridina. In **Figura 12** è riportata la reazione.



**Figura 12:** Reazione sintesi NCA utilizzando il  $\text{T}_3\text{P}$ .

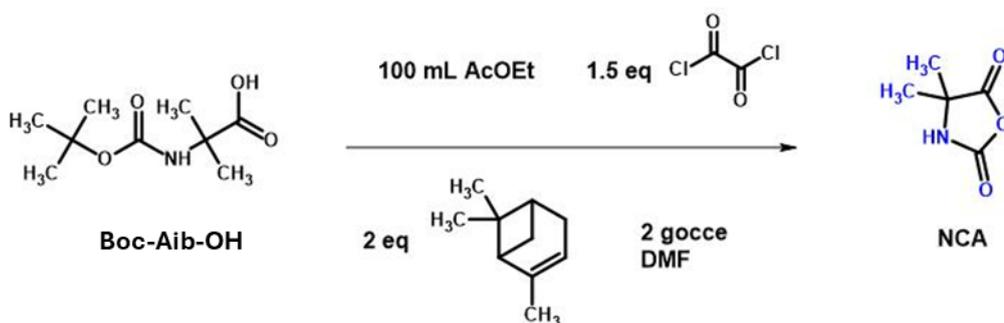
Il Boc-Aib-OH è stato inserito in un pallone da 1 L con ancoretta ed è stato sciolto in 100 mL di acetato di etile. A questa soluzione sono stati aggiunti 1.3 equivalenti di  $\text{T}_3\text{P}$  e 1 equivalente di piridina entrambi rispetto al Boc-Aib-OH, la miscela è stata messa sotto agitazione magnetica. Trascorse 4 ore dall'inizio della reazione la miscela è stata trasferita in un imbuto separatore e sono stati fatti due lavaggi con acqua distillata ghiacciata e un lavaggio con una soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata trasferita in una beuta e anidrificata con solfato di sodio anidro, poi è stata filtrata e trasferita in un pallone da 500 mL. Dopo di che è stato evaporato l'acetato di etile fino a ottenere un volume pari a 50 mL, a questa soluzione vengono aggiunti circa 200 mL di

n-esano sotto agitazione magnetica, in modo da ottenere la precipitazione dell’NCA. Infine, è stata filtrata la miscela su gouch, e NCA è stata stoccata a -20°C.

$$\text{Resa} = 70\%$$

### 2.3.3 Sintesi dell’NCA usando l’ossalil cloruro

L’NCA è stata sintetizzata a partire da 10 g Boc-Aib-OH, 100 mL di acetato di etile anidro, 17 g di  $\alpha$ -pinene e 9 g di ossalil cloruro. In **Figura 13** è riportata la reazione.



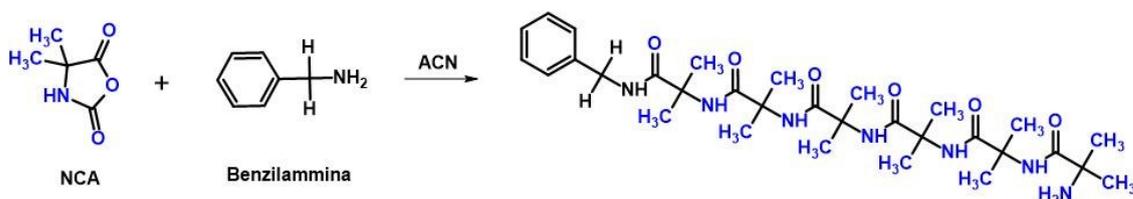
**Figura 13:** Reazione sintesi NCA usando l’ossalil cloruro.

Il Boc-Aib-OH è stato inserito in un pallone da 1 L con ancorotta, è stato sciolto in 100 mL di acetato di etile e messo sotto agitazione magnetica. A questa soluzione sono stati aggiunti 17 g di  $\alpha$ -pinene (2 equivalenti rispetto al Boc-Aib-OH), 9 g di ossalil cloruro (1.5 equivalente rispetto al Boc-Aib-OH) e 2 gocce di DMF. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 4 ore. Trascorse le 4 ore è stato flussato azoto nel pallone di reazione e la miscela è stata concentrata evaporando il solvente fino a dimezzare il volume. Sono stati aggiunti circa 200 mL di n-esano sotto agitazione magnetica e la miscela è stata filtrata su gouch. Il solido ottenuto è stato trasferito in un pallone da 250 mL, sciolto nel minimo volume di acetato di etile e precipitato sotto agitazione con n-esano, poi la sospensione ottenuta è stata filtrata su gouch e il solido è stato seccato. L’NCA è stata stoccata a -20°C.

$$\text{Resa} = 78\%$$

### 2.3.4 Sintesi del polimero achirale

Il polimero achirale è stato sintetizzato a partire da 1 g di NCA, 100  $\mu$ L di benzilammina e 5 mL di acetonitrile anidro. In **Figura 14** è riportata la reazione.

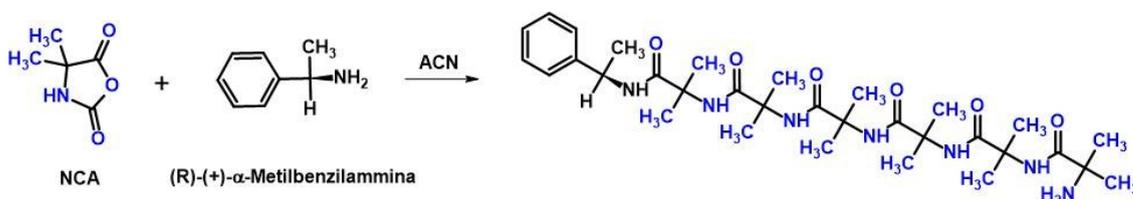


**Figura 14:** Reazione sintesi polimero achirale.

L’NCA è stata inserita in una vial da 20 mL munita di ancoretta. In una vial da 8 mL è stata preparata una soluzione sciogliendo 100  $\mu$ L di benzilammina in 5 mL di acetonitrile anidro, questa soluzione è stata poi inserita nella vial contenente l’NCA. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione magnetica, con il passare delle ore si forma un solido bianco. Dopo 48 ore dall’inizio della reazione, la miscela è stata trasferita in falcon da 15 mL e centrifugata in modo da separare il polimero dall’acetonitrile. Il solido è stato lavato due volte con acqua, una volta con acetonitrile e una volta con metanolo. Infine, il polimero è stato lasciato sotto cappa ad asciugare.

### 2.3.5 Sintesi del polimero R

Il polimero R è stato sintetizzato a partire da 1 g di NCA, 100  $\mu$ L di (R)-(+)- $\alpha$ -Metilbenzilammina e 5 mL di acetonitrile anidro. In **Figura 15** è riportata la reazione.



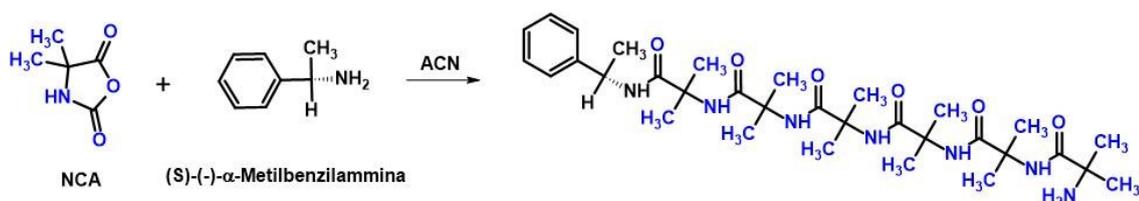
**Figura 15:** Reazione sintesi polimero R.

L’NCA è stata inserita in una vial da 20 mL munita di ancoretta. In una vial da 8 mL è stata preparata una soluzione sciogliendo 100  $\mu$ L di (R)-(+)- $\alpha$ -Metilbenzilammina in 5 mL di acetonitrile anidro, questa soluzione è stata poi inserita nella vial contenente l’NCA. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione magnetica, con il passare delle ore si

forma un solido bianco. Dopo 48 ore dall'inizio della reazione, la miscela è stata trasferita in falcon da 15 mL e centrifugata in modo da separare il polimero dall'acetonitrile. Il solido è stato lavato due volte con acqua, una volta con acetonitrile e una volta con metanolo. Infine, il polimero è stato lasciato sotto cappa ad asciugare.

### 2.3.6 Sintesi del polimero S

Il polimero S è stato sintetizzato a partire da 1 g di NCA, 100  $\mu$ L di (S)-(-)- $\alpha$ -Metilbenzilammina e 5 mL di acetonitrile anidro. In **Figura 16** è riportata la reazione.

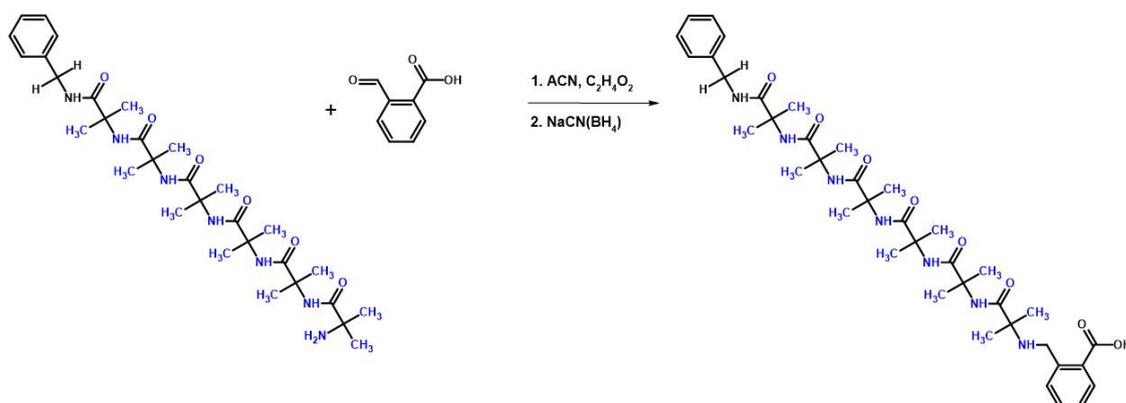


**Figura 16:** Reazione sintesi polimero S.

L'NCA è stata inserita in una vial da 20 mL munita di ancoretta. In una vial da 8 mL è stata preparata una soluzione sciogliendo 100  $\mu$ L di (S)-(-)- $\alpha$ -Metilbenzilammina in 5 mL di acetonitrile anidro, questa soluzione è stata poi inserita nella vial contenente l'NCA. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione magnetica, con il passare delle ore si forma un solido bianco. Dopo 48 ore dall'inizio della reazione, la miscela è stata trasferita in falcon da 15 mL e centrifugata in modo da separare il polimero dall'acetonitrile. Il solido è stato lavato due volte con acqua, una volta con acetonitrile e una volta con metanolo. Infine, il polimero è stato lasciato sotto cappa ad asciugare.

### 2.3.7 Funzionalizzazione del polimero achirale

Il polimero achirale è stato funzionalizzato a partire da 5 mL di metanolo anidro, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60  $\mu$ L di acido acetico glaciale e 60 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>). In **Figura 17** è riportata la reazione.



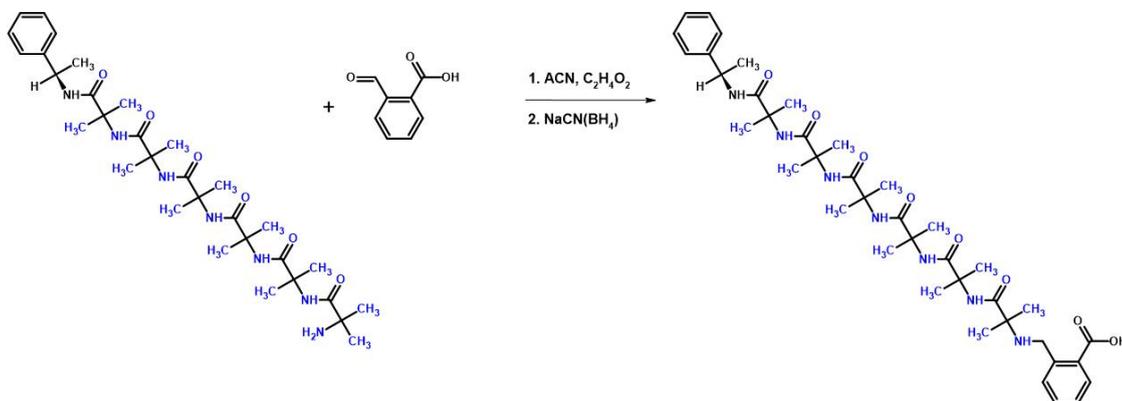
**Figura 17:** Reazione funzionalizzazione polimero achirale.

Il polimero achirale è stato trasferito in una vial da 20 mL con ancoretta, sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 5 mL di metanolo anidro, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60  $\mu$ L di acido acetico glaciale. La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, il polimero non si scioglie per questo la miscela risulta biancastra. Alla miscela di reazione, dopo 30 minuti, sono stati aggiunti 60 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>). Dopo circa 3 ore dall'inizio della reazione la miscela di reazione è stata trasferita in due falcon da 15 mL ed è stata centrifugata in modo da separare il metanolo dal solido. Il solido è stato lavato due volte con circa 7 mL di acqua deionizzata, le acque vengono raccolte in un vial e separate dal solido. Il solido è stato lasciato sotto cappa ad asciugare.

### 2.3.8 Funzionalizzazione del polimero R

Il polimero R è stato funzionalizzato a partire da 5 mL di metanolo anidro, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60  $\mu$ L di acido acetico glaciale e 60 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>). In

**Figura 18** è riportata la reazione.

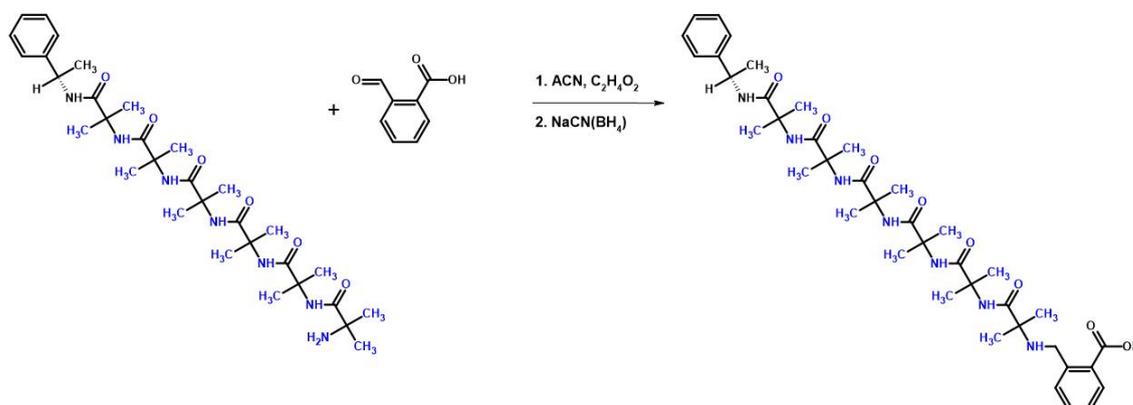


**Figura 18:** Reazione funzionalizzazione polimero R.

Il polimero R è stato trasferito in una vial da 20 mL con ancoretta, sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 5 mL di metanolo anidro, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60  $\mu$ L di acido acetico glaciale. La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, il polimero non si scioglie per questo la miscela risulta biancastra. Alla miscela di reazione, dopo 30 minuti, sono stati aggiunti 60 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>). Dopo circa 3 ore dall'inizio della reazione la miscela di reazione è stata trasferita in due falcon da 15 mL ed è stata centrifugata in modo da separare il metanolo dal solido. Il solido è stato lavato due volte con circa 7 mL di acqua deionizzata, le acque vengono raccolte in un vial e separate dal solido. Il solido è stato lasciato sotto cappa ad asciugare.

### 2.3.9 Funzionalizzazione del polimero S

Il polimero S è stato funzionalizzato a partire da 5 mL di metanolo anidro, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60  $\mu\text{L}$  di acido acetico glaciale e 60 mg di  $\text{NaCN}(\text{BH}_3)$ . In **Figura 19** è riportata la reazione.

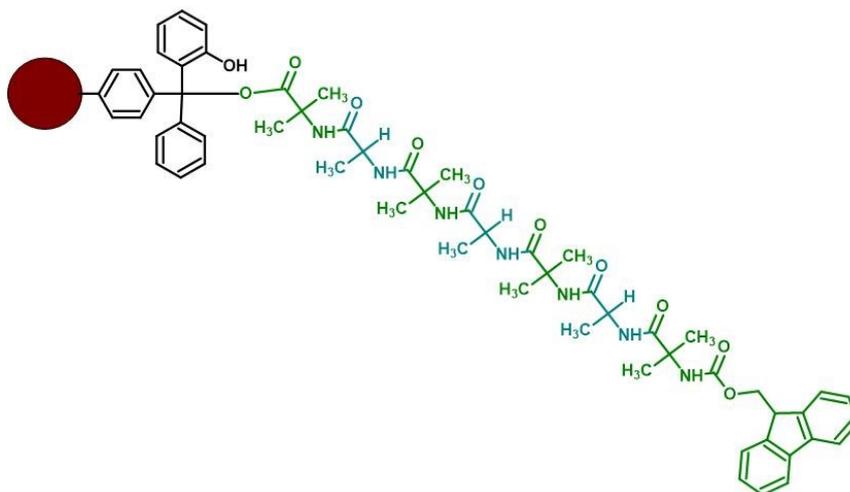


**Figura 19:** Reazione funzionalizzazione polimero S.

Il polimero S è stato trasferito in una vial da 20 mL con ancoretta, sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 5 mL di metanolo anidro, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60  $\mu\text{L}$  di acido acetico glaciale. La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, il polimero non si scioglie per questo la miscela risulta biancastra. Alla miscela di reazione, dopo 30 minuti, sono stati aggiunti 60 mg di  $\text{NaCN}(\text{BH}_3)$ . Dopo circa 3 ore dall'inizio della reazione la miscela di reazione è stata trasferita in due falcon da 15 mL ed è stata centrifugata in modo da separare il metanolo dal solido. Il solido è stato lavato due volte con circa 7 mL di acqua deionizzata, le acque vengono raccolte in un vial e separate dal solido. Il solido è stato lasciato sotto cappa ad asciugare.

### 2.3.10 Sintesi di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc

Per la sintesi del peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc (**Figura 20**) è stata utilizzata la sintesi su fase solida.



**Figura 20:** Peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc.

Il peptide è stato sintetizzato a partire da 2.5 g di resina 2-clorotriptylcloruro loading 1.6 mmol Cl<sup>-</sup>/g resina che sono stati inseriti in un reattore e rigonfiati con 20 mL di DMF per 30 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Trascorsi 30 minuti è stato rimosso il solvente ed è stata aggiunta una soluzione composta da 2.4402 g di Fmoc-Aib-OH sciolti in 15 mL di DMF e 1.2838 mL di DIPEA. La miscela di reazione è stata lasciata agitare nel reattore per 30 minuti, la resina rimane di colore giallo, questo passaggio è stato ripetuto due volte. Dopo è stata rimossa la miscela di reazione e la resina è stata lavata 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, poi è stata aggiunta una soluzione composta da 15 mL di DMF, 5 mL di metanolo e 600 mL di DIPEA, questa soluzione è stata lasciata a contatto con la resina per 10 minuti. Una volta terminati i 10 minuti la resina è stata lavata due volte per 5 minuti con 15 mL di DMF e poi è stata asciugata sotto un flusso di azoto. A questo punto è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido con 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina durante questo passaggio è rimasta di colore giallo, la soluzione di reazione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione dal reattore, successivamente la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti ed è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Successivamente è stato attaccato il secondo amminoacido della sequenza preparando una soluzione composta da 3.1133 g di Fmoc-L-Ala-OH, 1.262 g di oxyma in 15 mL di DMF, a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 1.5 mL di Dic. La soluzione è stata lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 1 ora, la resina è diventata di colore rosso. Poi è stata rimossa la soluzione, è stata lavata la resina a cui è attaccato il dipeptide due volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 15 mL di diclorometano per 5 minuti e una volta con 15 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione. Poi è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è tornata di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Poi è stato attaccato il terzo amminoacido della sequenza preparando una soluzione composta da 3.2536 g di Fmoc-Aib-OH, 1.262 g di oxyma in 15 mL di DMF a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 1.5 mL di Dic. La soluzione è stata lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 1 ora, la resina è rimasta di colore giallo. Poi è stata rimossa la soluzione, la resina a cui è attaccato il tripeptide è stata lavata due volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 15 mL di diclorometano per 5 minuti e una volta con 15 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione. Poi è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è tornata di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Successivamente è stato attaccato il quarto amminoacido della sequenza preparando una soluzione composta da 3.1133 g di Fmoc-L-Ala-OH, 1.262 g di oxyma in 15 mL di DMF, a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 1.5 mL di Dic. La soluzione è stata

lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 1 ora, la resina è diventata di colore giallo-arancione. Poi è stata rimossa la soluzione, la resina a cui è attaccato il tetrapeptide è stata lavata due volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 15 mL di diclorometano per 5 minuti e una volta con 15 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione. Poi è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è tornata di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Poi è stato attaccato il quinto amminoacido della sequenza preparando una soluzione composta da 3.2536 g di Fmoc-Aib-OH, 1.262 g di oxyma in 15 mL di DMF a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 1.5 mL di Dic. La soluzione è stata lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 1 ora, la resina è rimasta di colore giallo. Poi è stata rimossa la soluzione, la resina a cui è attaccato il pentapeptide è stata lavata due volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 15 mL di diclorometano per 5 minuti e una volta con 15 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione. Poi è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è rimasta di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Successivamente è stato attaccato il sesto amminoacido della sequenza preparando una soluzione composta da 3.1133 g di Fmoc-L-Ala-OH, 1.262 g di oxyma in 15 mL di DMF a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 1.5 mL di Dic. La soluzione è stata lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 1 ora, la resina è diventata di colore giallo scuro. Poi è stata rimossa la soluzione, la resina a cui è attaccato l'esapeptide è stata lavata due volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 15 mL di diclorometano

per 5 minuti e una volta con 15 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione. Poi è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è tornata di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Infine, è stato attaccato il settimo amminoacido della sequenza preparando una soluzione composta da 3.2536 g di Fmoc-Aib-OH, 1.262 g di oxyma in 15 mL di DMF a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 1.5 mL di Dic. La soluzione è stata lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 1 ora, la resina è rimasta di colore giallo. Poi è stata rimossa la soluzione, la resina a cui è attaccato l'eptapeptide è stata lavata due volte con 15 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 15 mL di diclorometano per 5 minuti e una volta con 15 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione. Poi è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è tornata di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 15 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

$$Resa = 50\%$$

Durante un passaggio il flusso di azoto ha fatto fuoriuscire metà della resina per quello la resa è bassa.

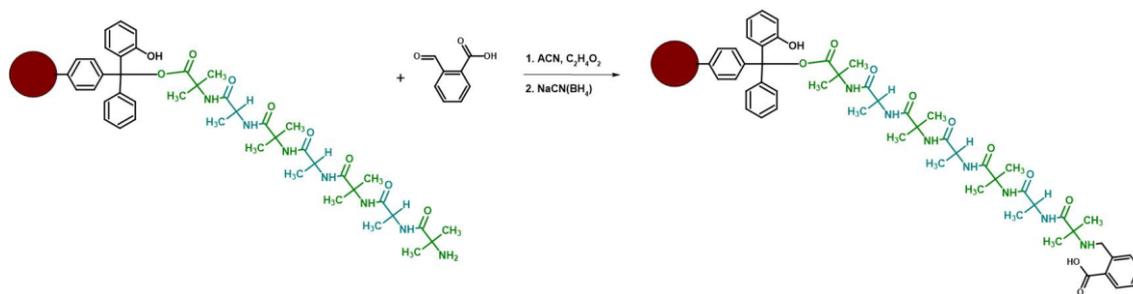
### **2.3.11 Rimozione del gruppo Fmoc dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc**

Per rimuovere il gruppo protettore Fmoc del settimo peptide della sequenza sono stati prelevati 2 g di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc, e sono stati inseriti in un reattore. La resina è stata rigonfiata con 15 mL di DMF

per 30 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Dopo è stata rimossa la DMF dal reattore ed è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 15 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è rimasta di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 15 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 5 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto per un'ora. La resina a cui è attaccato il peptide è rimasta gialla ed è stata stoccata in frigorifero.

### 2.3.12 Funzionalizzazione di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib

Il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib è stato funzionalizzato a partire da 500 mg di resina a cui è attaccato il peptide, 18 mL di DMF, 3 mL di iso-propanolo, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60 µL di acido acetico, 100 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>) e 15 mL di etere etilico. In **Figura 21** è riportata la reazione.

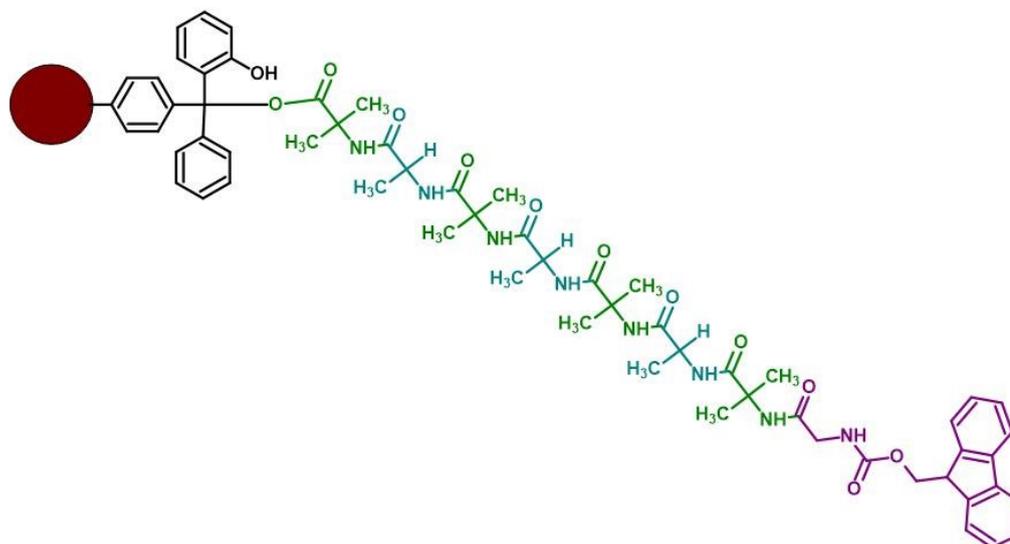


**Figura 21:** Reazione di funzionalizzazione del peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib.

Per la funzionalizzazione del peptide sono stati pesati 500 mg di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib, e sono stati inseriti in un reattore. La resina è stata rigonfiata con 3 mL di DMF ed è stata lasciata sotto agitazione per circa 15 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Dopo nel reattore sono stati aggiunti 3 mL di iso-propanolo, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60 µL di acido acetico, la miscela di reazione è stata messa sotto agitazione per 30 minuti. Poi sono stati inseriti nel reattore 100 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>), la miscela di reazione è stata agitata con attenzione per successivi 45 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Dopo è stata rimossa la soluzione, la resina è stata lavata per 3 volte con 5 mL di DMF per 5 minuti e 3 volte con

5 mL di etere etilico per 5 minuti. Successivamente la resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stata stoccata in frigorifero.

### 2.3.13 Sintesi di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib- Gly -Fmoc



**Figura 22:** Peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly-Fmoc.

Per la sintesi di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc sono stati prelevati 500 mg di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc (**Figura 22**), e sono stati inseriti nel reattore. La resina è stata rigonfiata con 5 mL di DMF per 30 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Dopo è stata rimossa la DMF dal reattore ed è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 5 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è rimasta di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 5 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 5 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto per un'ora. La resina a cui è attaccato il peptide è rimasta gialla.

Successivamente è stato aggiunto l'amminoacido Fmoc-Gly-OH preparando una soluzione composta da 300 mg di Fmoc-Gly-OH, 0.143 g di oxyma in 5 mL di DMF a questa soluzione, sono stati aggiunti anche 158  $\mu$ L di Dic. La soluzione è stata lasciata a contatto con la resina sotto agitazione per 2 ore, la resina è rimasta di colore giallo.

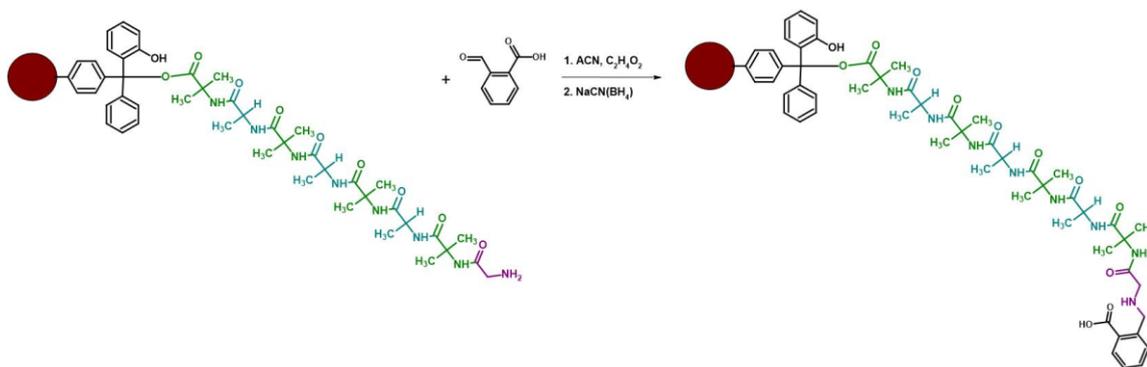
Poi è stata rimossa la soluzione, la resina a cui è attaccato il peptide è stata lavata due volte con 5 mL di DMF per 5 minuti, una volta con 5 mL di diclorometano per 5 minuti e una volta con 5 mL di DMF per 15 minuti. La resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stato prelevato un campione.

### 2.3.14 Sblocco dei campioni di resina prelevati durante la sintesi di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Fmoc e del campione di resina di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly-Fmoc

Per lo sblocco dei campioni di peptide, ossia la rimozione della resina da questi ultimi, prelevati durante la sintesi su fase solida è stata usata una soluzione 7:3 di diclorometano ed esafluoropropanolo. La soluzione è stata preparata direttamente nella vial contenente il campione da sbloccare. La soluzione è stata lasciata a contatto con il campione per 30 minuti, mescolando di tanto in tanto, durante questo passaggio il campione è passato da giallo a rosso. Poi è stata filtrata la miscela di reazione usando un filtro per siringa, il liquido è stato raccolto in una vial da 4 mL e il solvente è stato fatto evaporare con un flusso di azoto.

### 2.3.15 Funzionalizzazione di Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly-Fmoc

Il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly-Fmoc è stato funzionalizzato a partire da 500 mg di resina a cui è attaccato il peptide, 18 mL di DMF, 3 mL di iso-propanolo, 150 mg di 2-carbossibenzoaldeide e 60  $\mu$ L di acido acetico, 100 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>) e 15 mL di etere etilico. La reazione è riportata in **Figura 23**.



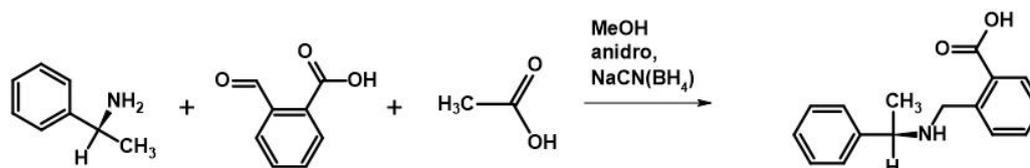
**Figura 23:** Reazione di funzionalizzazione del peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly.

Per la funzionalizzazione del peptide si prelevano 500 mg di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly-Fmoc, che sono stati inseriti in un reattore. La resina è stata rigonfiata con 5 mL di DMF per 30 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Dopo è stata rimossa la DMF dal reattore ed è stato rimosso il gruppo Fmoc dell'amminoacido utilizzando 5 mL di soluzione di piperidina al 20% in DMF, la resina è rimasta di colore giallo. La soluzione è stata lasciata nel reattore per 20 minuti agitando la resina, poi è stata rimossa e sostituita con altri 5 mL di soluzione nuova che è stata lasciata per altri 20 minuti nel reattore. Dopo è stata rimossa la soluzione e la resina è stata lavata per 3 volte con 5 mL di DMF per 5 minuti e successivamente è stata asciugata sotto un flusso di azoto.

Successivamente nel reattore sono stati aggiunti 1 mL di DMF e 1 mL di iso-propanolo, 150 mg di 2-carbossibenzaldeide e 60 µL di acido acetico, la miscela di reazione è stata messa sotto agitazione per 30 minuti. Poi sono stati inseriti nel reattore 62.8 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>), la miscela di reazione è stata agitata con attenzione per i successivi 45 minuti, la resina è rimasta di colore giallo. Dopo è stata rimossa la soluzione, la resina è stata lavata per 3 volte con 5 mL di DMF per 5 minuti, 3 volte con 5 mL di etanolo per 5 minuti e una volta con 5 mL di etere etilico per 5 minuti. Successivamente la resina è stata asciugata sotto un flusso di azoto ed è stata stoccata in frigorifero.

### 2.3.16 Sintesi del catalizzatore corto

Il catalizzatore corto è stato sintetizzato a partire da 300 µL di S-α-metil-benzil-ammina, 5 mL di metanolo anidro, 335 mg di 2-carbossibenzaldeide, 127 µL acido acetico glaciale e 156 mg di NaCN(BH<sub>3</sub>). La reazione è riportata in **Figura 24**.



**Figura 24:** Reazione di sintesi catalizzatore corto.

Per la sintesi del catalizzatore corto sono stati inseriti in una vial da 20 mL con ancoretta magnetica, 300 µL di S-α-metil-benzil-ammina, 5 mL di metanolo anidro in modo da

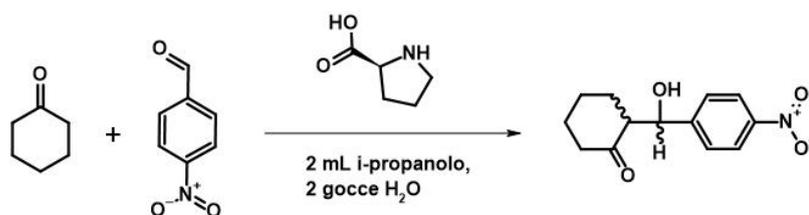
avere una concentrazione 0.5 M, 335 mg di 2-carbossibenzaldeide e 127  $\mu$ l acido acetico glaciale. La miscela di reazione è stata messa sotto agitazione magnetica, sono stati poi aggiunti 156 mg di  $\text{NaCN}(\text{BH}_3)$ .

Trascorse 4 ore la reazione è stata portata a secco evaporando il solvente ed è stato ottenuto un olio di colore giallo. Per eliminare il cianuro sono stati poi aggiunti 7 mL di cloroformio, la soluzione ottenuta è stata trasferita in una falcon da 15 mL che è stata centrifugata per 10 minuti e sono stati separati il solido dal liquido. Il liquido ottenuto è stato purificato usando una colonna di silice e un eluente 8:2 cloroformio:etanolo e sono state raccolte le frazioni contenenti il prodotto puro. Il prodotto è poi stato trasferito in un pallone ed è stato evaporato il solvente, è stato ottenuto un olio giallo.

$$\text{Resa} = 94\%$$

## 2.4 Prove di reazione

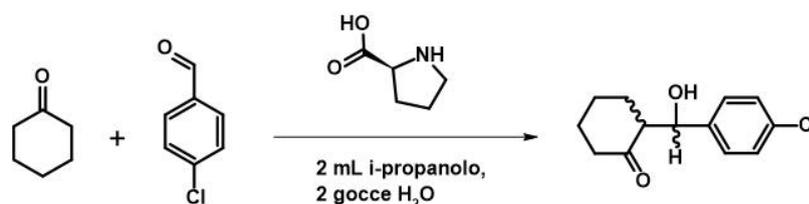
### 2.4.1 Reazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dalla L-prolina



**Figura 25:** Reazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dalla L-prolina.

Per la reazione di condensazione aldolica tra il cicloesanoone e la 4-nitrobenzaldeide, **Figura 25**, sono stati pesati 50 mg di L-prolina e sciolti in una vial da 8 mL con ancoretta con 2 mL di isopropanolo e due gocce d'acqua. A questa soluzione sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di cicloesanoone e 56 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata termostata a 25°C.

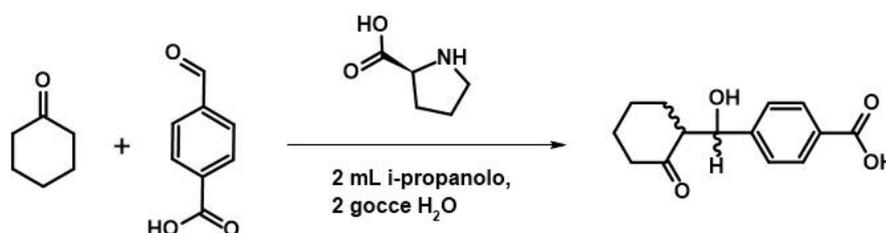
#### 2.4.2 Reazione tra cicloesanoone e 4-clorobenzaldeide catalizzata dalla L-prolina



**Figura 26:** Reazione tra cicloesanoone e 4-clorobenzaldeide catalizzata dalla L-prolina.

Per la reazione di condensazione aldolica tra il cicloesanoone e la 4-clorobenzaldeide, **Figura 26**, sono stati pesati 50 mg di L-prolina e sciolti in una vial da 8 mL con ancoretta con 2 mL di isopropanolo e due gocce d'acqua. A questa soluzione sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di cicloesanoone e 52 mg di 4-clorobenzaldeide. La reazione è stata termostata a 25°C.

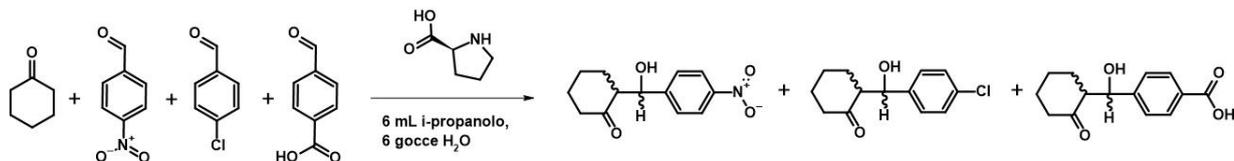
#### 2.4.3 Reazione tra cicloesanoone e 4-carbossibenaldeide catalizzata dalla L-prolina



**Figura 27:** Reazione tra cicloesanoone e 4-carbossibenaldeide catalizzata dalla L-prolina.

Per la reazione di condensazione aldolica tra il cicloesanoone e la 4-carbossibenaldeide, **Figura 27**, sono stati pesati 50 mg di L-prolina e sciolti in una vial da 8 mL con ancoretta con 2 mL di isopropanolo e due gocce d'acqua. A questa soluzione sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di cicloesanoone e 56 mg di 4-carbossibenaldeide. La reazione è stata termostata a 25°C.

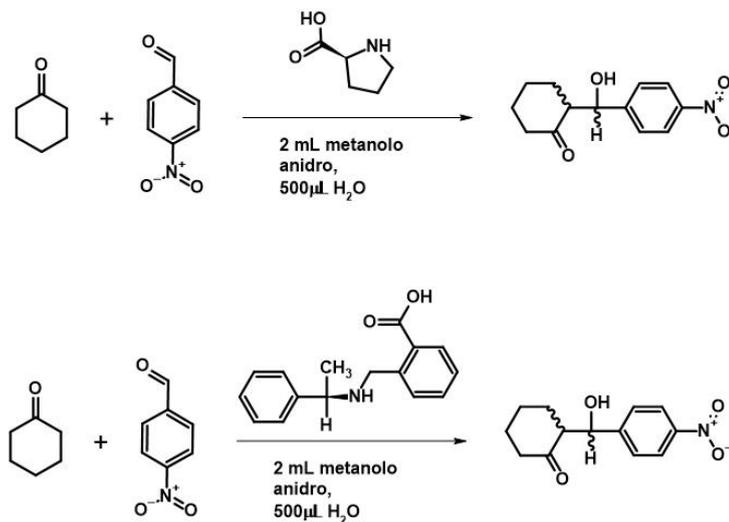
#### 2.4.4 Reazione della L-prolina e 4-nitrobenzaldeide, 4-clorobenzaldeide 4-carbossibenzaldeide



**Figura 28:** Reazione tra cicloesano e 4-nitrobenzaldeide, 4-clorobenzaldeide 4-carbossibenzaldeide catalizzata dalla L-prolina.

Per la reazione di condensazione aldolica tra il cicloesano e la 4-nitrobenzaldeide, la 4-clorobenzaldeide e la 4-carbossibenzaldeide, **Figura 28**, sono stati pesati 150 mg di L-prolina e sciolti in una vial da 8 mL con ancoretta con 6 mL di isopropanolo e 6 gocce d'acqua. A questa soluzione sono stati aggiunti 600  $\mu$ l di cicloesano, 56 mg di 4-nitrobenzaldeide, 52 mg di 4-clorobenzaldeide e 56 mg di 4-carbossibenzaldeide. La reazione è stata termostata a 25°C.

#### 2.4.5 Reazione di comparazione tra la L-prolina e il catalizzatore corto



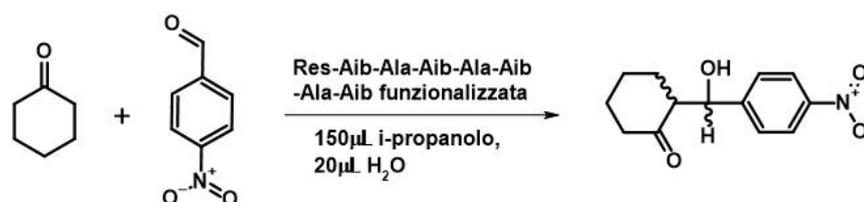
**Figura 29:** Reazione di comparazione tra la L-prolina e il catalizzatore corto.

Per controllare la stereoselezione del catalizzatore corto e la sua velocità di reazione si usano due reazioni in parallelo, una usando il catalizzatore corto e l'altra usando la L-prolina, per fare ciò i due catalizzatori devono essere equi molar. Sono stati pesati 60 mg di L-prolina e sciolti in una vial di 12 mL con 2 mL di metanolo anidro con ancoretta

magnetica, a questa soluzione sono stati aggiunti 765  $\mu\text{L}$  di cicloesano e 500  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata. Una volta sciolta la prolina sono stati aggiunti 295 mg di 4-nitrobenzaldeide.

Per il catalizzatore corto è stato fatto un procedimento analogo con la differenza che sono stati pesati 133 mg di catalizzatore corto.

#### 2.4.6 Reazione tra cicloesano e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato

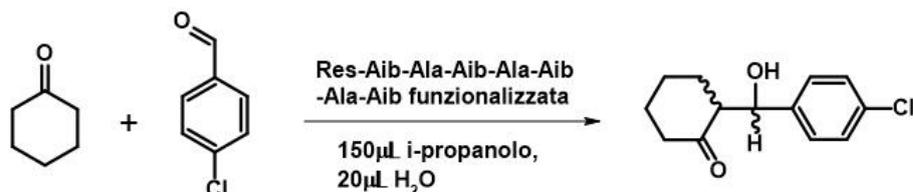


**Figura 30:** Reazione tra cicloesano e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato.

Per la reazione tra il cicloesano e la 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato, **Figura 30**, sono stati inseriti all'interno di una siringa di 3 mL per coupling 50 mg di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato, 150  $\mu\text{L}$  di isopropanolo, 150  $\mu\text{L}$  di cicloesano e 20  $\mu\text{L}$  di acqua. Poi all'interno della siringa sono stati inseriti 20 mg di 4-nitrobenzaldeide e la reazione è stata lasciata agitare. Passate 4 ore sono stati prelevati 10  $\mu\text{L}$  di soluzione e analizzati attraverso HPLC, inoltre sono stati aggiunti 3  $\mu\text{L}$  di TEA, la soluzione da gialla diventa arancione. La reazione è proseguita per altre 12 ore a temperatura ambiente.

Trascorse le 12 ore, la soluzione di reazione è stata raccolta in una vial da 1 mL e analizzate attraverso HPLC.

### 2.4.7 Reazione tra cicloesanoone e 4-clorobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato

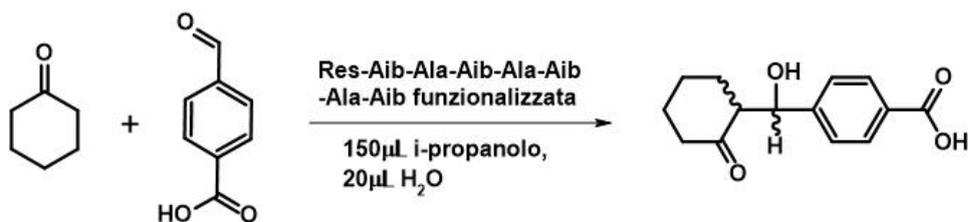


**Figura 31:** Reazione tra cicloesanoone e 4-clorobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato.

Per la reazione tra il cicloesanoone e la 4-clorobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato, **Figura 31**, sono stati inseriti all'interno di una siringa di 3 mL per coupling 50 mg di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato, 150 µL di isopropanolo, 150 µL di cicloesanoone e 20 µL di acqua. Poi all'interno della siringa sono stati inseriti 20 mg di 4-clorobenzaldeide e la miscela è stata lasciata agitare. Passate 4 ore sono stati prelevati 10 µL di soluzione e analizzati attraverso HPLC, inoltre sono stati aggiunti 3 µL di TEA, la soluzione è rimasta di colore giallo. La reazione è proseguita per altre 12 ore a temperatura ambiente.

Trascorse le 12 ore, la soluzione di reazione è stata raccolta in una vial da 1 mL e analizzate attraverso HPLC.

### 2.4.8 Reazione tra cicloesanoone e 4-carbossibenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato



**Figura 32:** Reazione tra cicloesanoone e 4-carbossibenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato.

Per la reazione tra il cicloesanoone e la 4-carbossibenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato, **Figura 32**, sono stati inseriti all'interno di una siringa di

3 mL per coupling 50 mg di resina a cui è attaccato il peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib funzionalizzato, 150  $\mu$ l di isopropanolo, 150  $\mu$ l di cicloesano e 20  $\mu$ l di acqua. Poi all'interno della siringa sono stati inseriti 20 mg di 4-carbossibenaldeide e la miscela di reazione è stata lasciata agitare. Passate 4 ore sono stati prelevati 10  $\mu$ l di soluzione e analizzati attraverso HPLC, inoltre sono stati aggiunti 3  $\mu$ l di TEA, la soluzione è rimasta di colore giallo. La reazione è proseguita per altre 12 ore a temperatura ambiente.

Trascorse le 12 ore, la soluzione di reazione è stata raccolta in una vial da 1 mL e analizzate attraverso HPLC.

#### 2.4.9 Reazione tra cicloesano e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly funzionalizzato



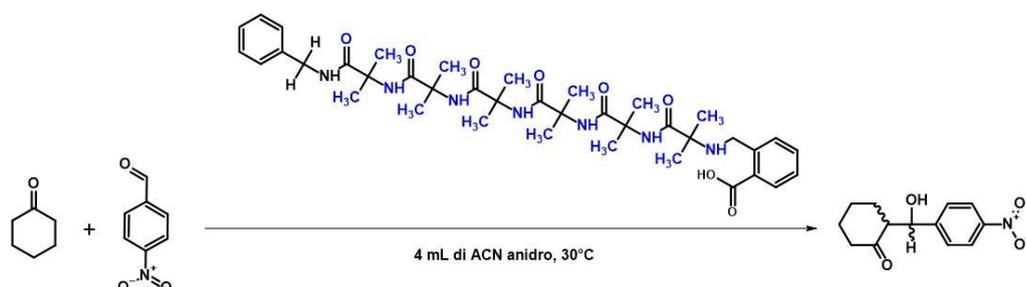
**Figura 33:** Reazione tra cicloesano e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly funzionalizzato.

Per la reazione tra il cicloesano e la 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly funzionalizzato, **Figura 33**, è stata preparata una soluzione all'interno di una vial di 4 mL composta da 1 mL di DCM, 1 mL di iso-propanolo, 15 mg di 4-nitrobenzaldeide e 100  $\mu$ l di cicloesano. La soluzione è stata aggiunta alla siringa da 10 mL per coupling contenente la resina con il peptide funzionalizzato ed è stata lasciata agitare per 20 ore circa, poi è stata controllata con una TLC e alla soluzione sono stati aggiunti poi 10  $\mu$ l di TEA.

Trascorse altre 2 ore, la soluzione di reazione è stata raccolta in una vial da 4 mL e analizzate attraverso HPLC.

#### 2.4.10 Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero achirale funzionalizzato, in ACN

Per la reazione di condensazione aldolica sono stati pesati 40 mg di polimero achirale funzionalizzato, 4 mL di acetonitrile anidro, 400  $\mu$ L di cicloesanoone e 40 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è riportata in **Figura 34**.

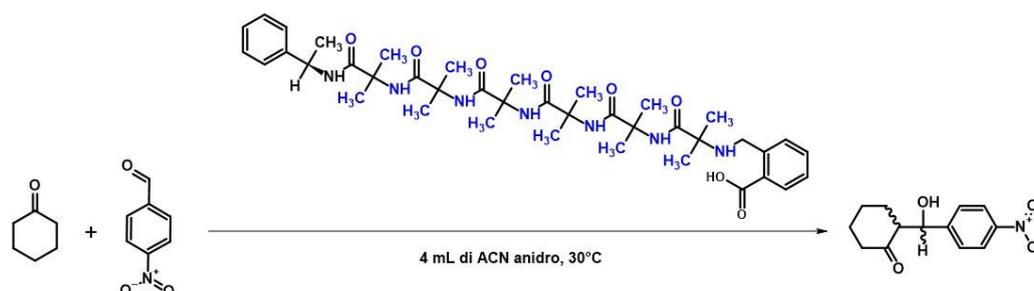


**Figura 34:** Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero achirale funzionalizzato, in ACN.

Il polimero achirale funzionalizzato è stato sciolto in una vial con ancoretta usando l'acetonitrile, a questa soluzione si aggiunge prima il cicloesanoone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata condotta a 30°C ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.11 Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in ACN

Per la reazione di condensazione aldolica sono stati pesati 40 mg di polimero R funzionalizzato, 4 mL di acetonitrile anidro, 400  $\mu$ L di cicloesanoone e 40 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 35**.

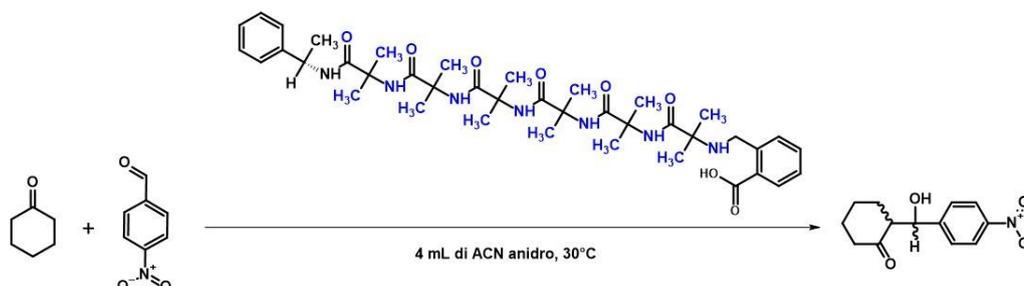


**Figura 35:** Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in ACN.

Il polimero R funzionalizzato è stato sciolto in una vial con ancoretta usando l'acetonitrile, a questa soluzione si aggiunge prima il cicloesanone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata condotta a 30°C ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.12 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in ACN

Per la reazione di condensazione aldolica sono stati pesati 40 mg di polimero S funzionalizzato, 4 mL di acetonitrile anidro, 400 µL di cicloesanone e 40 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 36**.

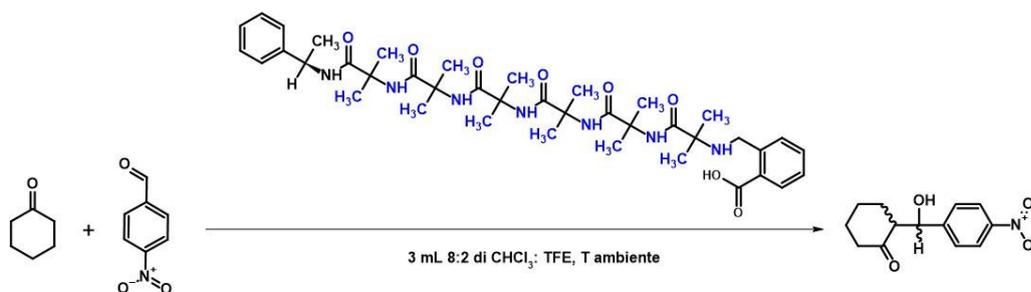


**Figura 36:** Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in ACN.

Il polimero S funzionalizzato è stato sciolto in una vial con ancoretta usando l'acetonitrile, a questa soluzione si aggiunge prima il cicloesanone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata condotta a 30°C ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.13 Reazione di condensazione tra cicloesanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in CHCl<sub>3</sub>

Per la reazione di condensazione aldolica sono stati pesati 20 mg di polimero R funzionalizzato, 3 mL di una soluzione 8:2 di cloroformio e trifluoroetano, 200 µL di cicloesanone e 30 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 37**.

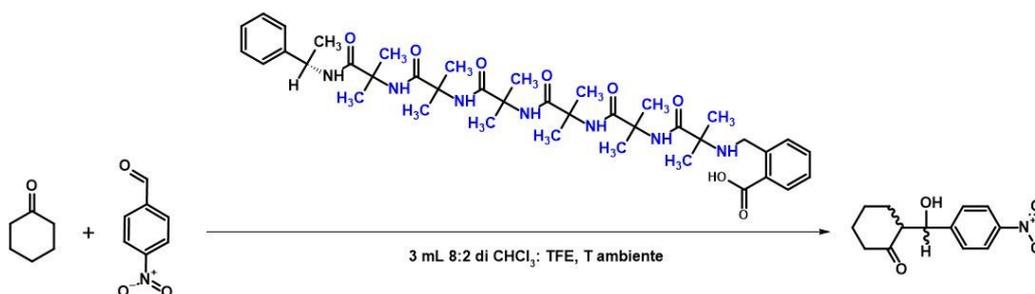


**Figura 37:** Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in  $\text{CHCl}_3$ .

Il polimero R funzionalizzato è stato sciolto in una vial con ancoretta usando la soluzione di cloroformio e trifluoroetano, a questa soluzione si aggiunge prima il cicloesanoone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.14 Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in $\text{CHCl}_3$

Per la reazione di condensazione aldolica sono stati pesati 20 mg di polimero S funzionalizzato, 3 mL di una soluzione 8:2 di cloroformio e trifluoroetano, 200  $\mu\text{L}$  di cicloesanoone e 30 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 38**.

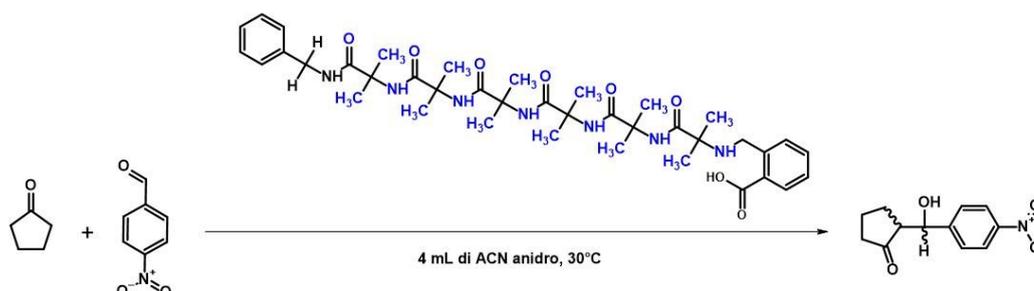


**Figura 38:** Reazione di condensazione tra cicloesanoone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in  $\text{CHCl}_3$ .

Il polimero S funzionalizzato è stato sciolto in una vial con ancoretta usando la soluzione di cloroformio e trifluoroetano, a questa soluzione si aggiunge prima il cicloesanoone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.15 Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero achirale funzionalizzato, in ACN

Per la reazione di condensazione aldolica servono circa 40 mg di polimero achirale funzionalizzato, 4 mL di acetonitrile anidro, 400  $\mu$ L di ciclopentanone e 40 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 39**.

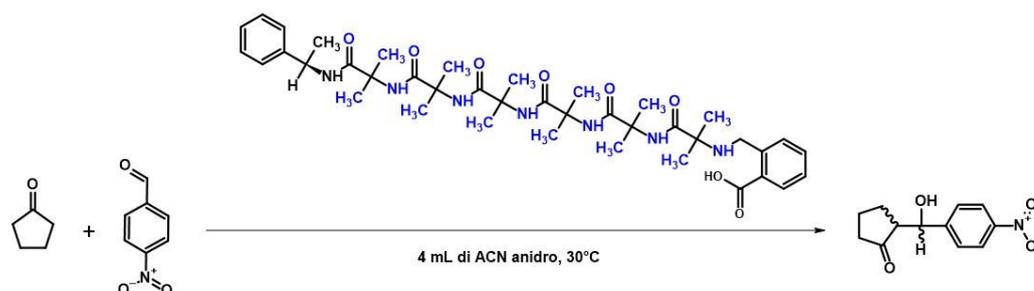


**Figura 39:** Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero achirale funzionalizzato, in ACN.

Il polimero achirale funzionalizzato viene sciolto in una vial con ancoretta usando l'acetonitrile, a questa soluzione si aggiunge prima il ciclopentanone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione viene eseguita a 30°C ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.16 Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in ACN

Per la reazione di condensazione aldolica servono circa 40 mg di polimero R funzionalizzato, 4 mL di acetonitrile anidro, 400  $\mu$ L di ciclopentanone e 40 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 40**.

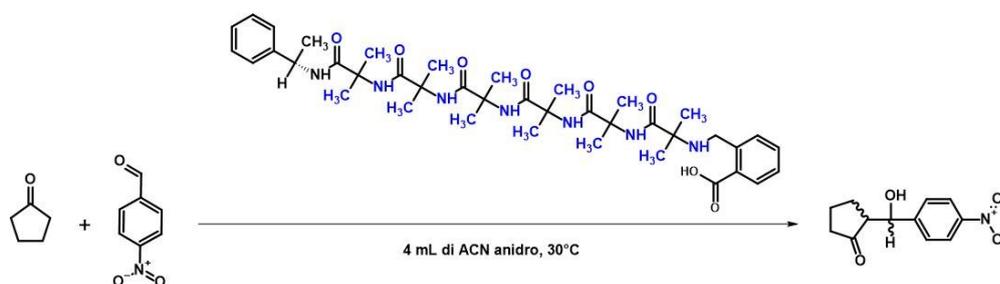


**Figura 40:** Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero R funzionalizzato, in ACN.

Il polimero R funzionalizzato viene sciolto in una vial con ancoretta usando l'acetonitrile, a questa soluzione si aggiunge prima il ciclopentanone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione viene eseguita a 30°C ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.17 Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in ACN

Per la reazione di condensazione aldolica servono circa 40 mg di polimero S funzionalizzato, 4 mL di acetonitrile anidro, 400 µL di ciclopentanone e 40 mg di 4-nitrobenzaldeide. La reazione è stata riportata in **Figura 41**.

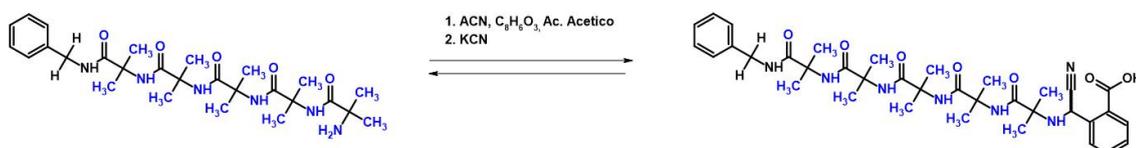


**Figura 41:** Reazione di condensazione tra ciclopentanone e 4-nitrobenzaldeide con polimero S funzionalizzato, in ACN.

Il polimero S funzionalizzato viene sciolto in una vial con ancoretta usando l'acetonitrile, a questa soluzione si aggiunge prima il ciclopentanone e poi la 4-nitrobenzaldeide. La reazione viene eseguita a 30°C ed è stata seguita attraverso HPLC.

#### 2.4.18 Reazione di Strecker sul polimero achirale

Il polimero achirale è stato fatto reagire con 100 mg di 2-carbossibenzaldeide, 50 µL di acido acetico glaciale e una punta di spatola di KCN. In **Figura 42** è riportata la reazione.

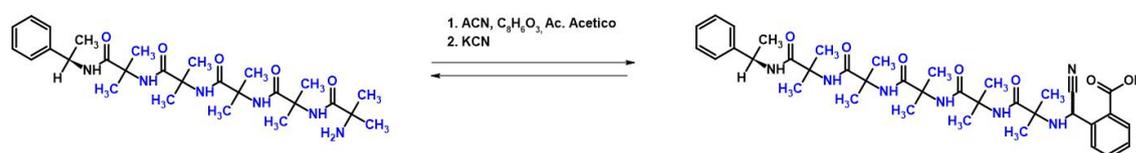


**Figura 42:** Reazione di Strecker sul polimero achirale.

Il polimero achirale è stato trasferito in una vial da 20 mL con ancoretta, sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 5 mL di iso-propanolo, 100 mg di 2-carbossibenzaldeide e 50  $\mu$ L di acido acetico glaciale. La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, il polimero non si scioglie per questo la miscela risulta biancastra. Alla miscela di reazione, dopo 5 minuti, è stata aggiunta una punta di spatola di KCN. Dopo circa 2 ore dall'inizio della reazione la miscela di reazione è stata trasferita in due falcon da 15 mL ed è stata centrifugata in modo da separare l'iso-propanolo dal solido. Il solido è stato lavato due volte con circa 5 mL di acqua deionizzata, le acque vengono raccolte in un vial e separate dal solido.

#### 2.4.19 Reazione di Strecker sul polimero R

Il polimero R è stato fatto reagire con 100 mg di 2-carbossibenzaldeide, 50  $\mu$ L di acido acetico glaciale e una punta di spatola di KCN. In **Figura 43** è riportata la reazione.

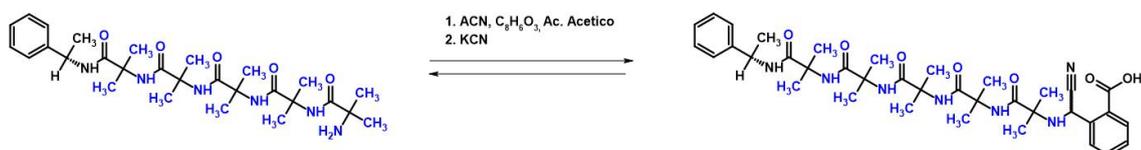


**Figura 43:** Reazione di Strecker sul polimero R.

Il polimero R è stato trasferito in una vial da 20 mL con ancoretta, sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 5 mL di iso-propanolo, 100 mg di 2-carbossibenzaldeide e 50  $\mu$ L di acido acetico glaciale. La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, il polimero non si scioglie per questo la miscela risulta biancastra. Alla miscela di reazione, dopo 5 minuti, è stata aggiunta una punta di spatola di KCN. Dopo circa 2 ore dall'inizio della reazione la miscela di reazione è stata trasferita in due falcon da 15 mL ed è stata centrifugata in modo da separare l'iso-propanolo dal solido. Il solido è stato lavato due volte con circa 5 mL di acqua deionizzata, le acque vengono raccolte in un vial e separate dal solido.

### 2.4.20 Reazione di Strecker sul polimero S

Il polimero S è stato fatto reagire con 100 mg di 2-carbossibenzaldeide, 50  $\mu\text{L}$  di acido acetico glaciale e una punta di spatola di KCN. In **Figura 44** è riportata la reazione.

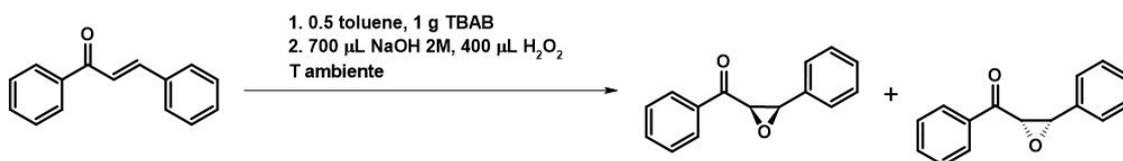


**Figura 44:** Reazione di Strecker sul polimero S.

Il polimero S è stato trasferito in una vial da 20 mL con ancoretta, sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 5 mL di iso-propanolo, 100 mg di 2-carbossibenzaldeide e 50  $\mu\text{L}$  di acido acetico glaciale. La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, il polimero non si scioglie per questo la miscela risulta biancastra. Alla miscela di reazione, dopo 5 minuti, è stata aggiunta una punta di spatola di KCN. Dopo circa 2 ore dall'inizio della reazione la miscela di reazione è stata trasferita in due falcon da 15 mL ed è stata centrifugata in modo da separare l'iso-propanolo dal solido. Il solido è stato lavato due volte con circa 5 mL di acqua deionizzata, le acque vengono raccolte in un vial e separate dal solido.

### 2.4.21 Reazione di epossidazione del trans-chalcone

Per la reazione di epossidazione servono 0.5 mL di toluene, 100 mg di trans-chalcone, 1 g di TBAB, 700  $\mu\text{L}$  di NaOH 2 M e 400  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%. La reazione è stata riportata in **Figura 45**.



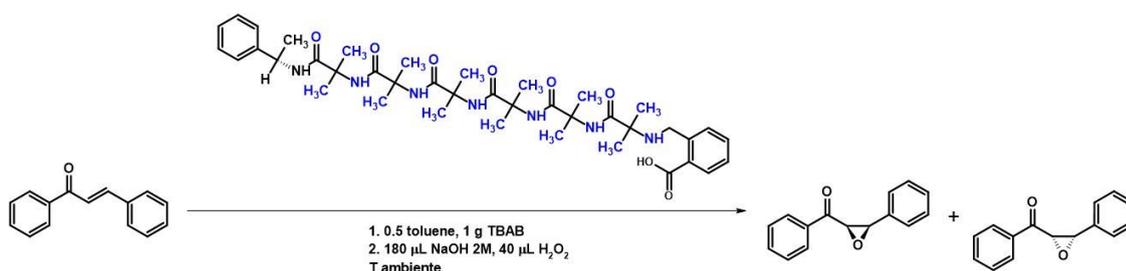
**Figura 45:** Reazione di epossidazione del trans-chalcone.

Il trans-chalcone viene inserito in una vial da 12 mL con ancoretta magnetica e viene sciolto in toluene, a questa soluzione si aggiunge il TBAB. La soluzione viene lasciata agitare per mezzora poi si aggiunge una soluzione formata da NaOH e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reazione



### 2.4.23 Reazione epossidazione usando il polimero funzionalizzato S

Per la reazione di epossidazione servono circa 15 mg di polimero S funzionalizzato, 0.5 mL di toluene, 8 mg di trans-chalcone, 1 g di TBAB, 180  $\mu\text{L}$  di NaOH 2 M e 40  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%. La reazione è stata riportata in **Figura 47**.



**Figura 47:** Reazione di epossidazione del trans-chalcone utilizzando il polimero R funzionalizzato.

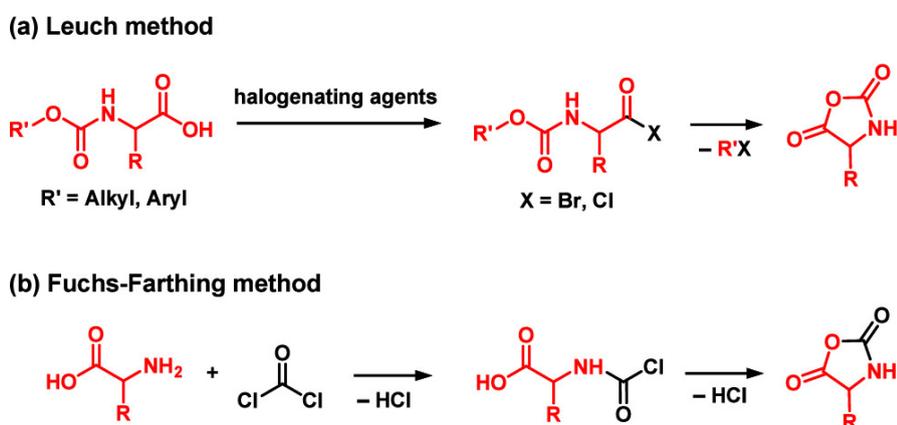
Il polimero S funzionalizzato viene inserito in un pallone da 25 mL con ancoretta magnetica e viene sciolto in toluene, a questa soluzione si aggiungono il trans-chalcone, il TBAB. La soluzione viene lasciata agitare per mezzora poi si aggiunge una soluzione formata da NaOH e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 24 ore ed è stata seguita attraverso HPLC.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 NCA Sintesi e Polimerizzazione

I polipeptidi hanno strutture tridimensionali uguali o simili a quelle delle proteine e dei peptidi, il che li rende molecole interessanti dal punto di vista biologico e dei materiali. La polimerizzazione con apertura dell'anello delle N-carbossianidridi degli aminoacidi (NCA) è stata la strategia più efficiente per la preparazione dei polipeptidi, con continui progressi nella progettazione di iniziatori, catalizzatori e condizioni di reazione. Al fine di ottenere polipeptidi con lunghezze di catena regolabili e pesi molecolari controllabili, numerosi gruppi di ricerca hanno, e continuano, dato importanti contributi ai metodi di polimerizzazione con apertura dell'anello NCA migliorando la velocità di polimerizzazione e la capacità di controllo della polimerizzazione.

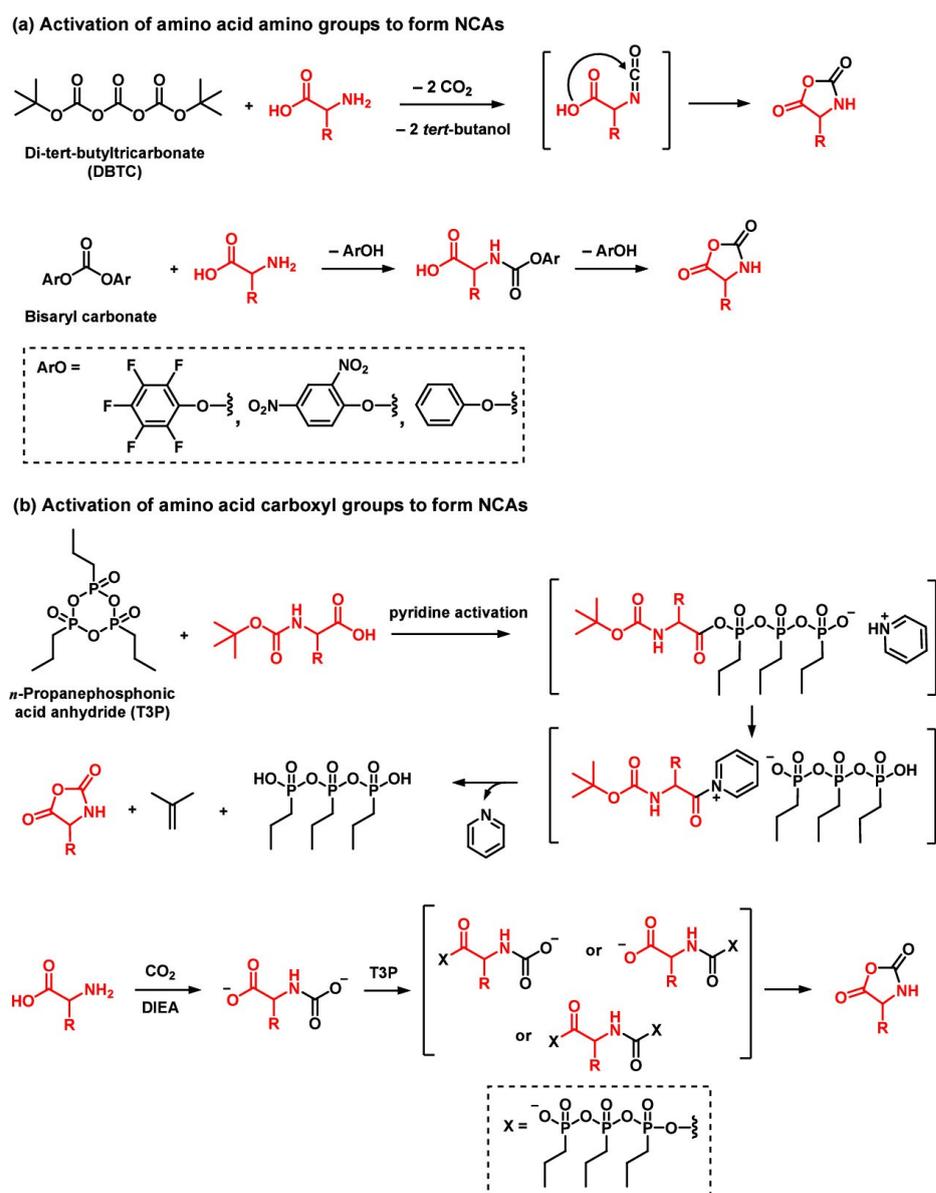
Le NCA degli  $\alpha$ -amminoacidi sono anidridi a cinque membri altamente reattive ma instabili. Sono suscettibili all'apertura dell'anello da parte di impurità come l'acqua, e quindi di solito richiedono rigide condizioni di reazione anidra per la loro preparazione.<sup>20</sup> Gli NCA furono sintetizzati per la prima volta da Hermann Leuchs nel 1906 riscaldando aminoacidi N-alcossicarbonilici con agenti alogenanti (ad esempio  $\text{PBr}_3$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{SOCl}_2$ ) nel vuoto a 50-70 °C.<sup>21</sup> Pertanto, le NCA divennero note come anidride di Leuchs (**Figura 48a**).



**Fig. 48:** Metodo per la sintesi di monomeri NCA, comprendente (a) il metodo Leuch e (b) il metodo Fuchs-Farthing.

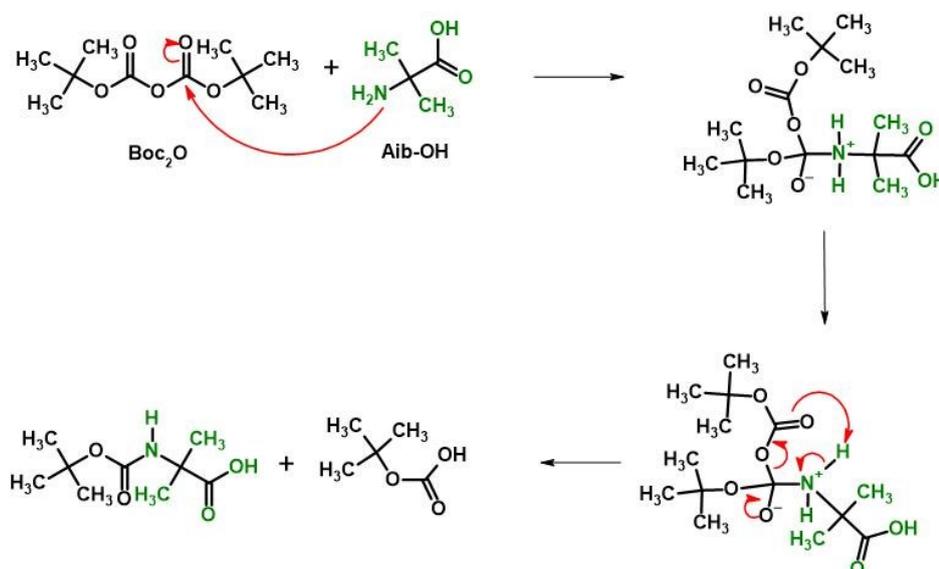
Attualmente, il metodo prevalente per la sintesi delle NCA è il "metodo Fuchs-Farthing", che non è stato sostituito da quasi un secolo (**Figura 48b**).<sup>22</sup> Questo metodo prevede la

reazione di amminoacidi con fosgene o sostituti non gassosi del fosgene (difosgene, trifosgene) sotto riscaldamento. Il trifosgene, che consente la generazione in situ di fosgene attraverso reazioni con nucleofili, reagisce con gli amminoacidi per produrre un intermedio altamente reattivo del cloruro di acile che poi subisce la chiusura dell'anello intramolecolare per generare monomeri NCA.<sup>23</sup> È importante sottolineare che qualsiasi fosgene intermedio prodotto viene rapidamente consumato durante il processo. Esistono anche metodi per sintetizzare NCA senza usare fosgene oltre al metodo Leuch (**Figura 49**), ad esempio, di-terz-butiltricarbonato (DBTC),<sup>24</sup> bis-Aril carbonato,<sup>25,26</sup> anidride dell'acido n-propanofosfonico (T<sub>3</sub>P), cloruro cianurico,<sup>27</sup> ecc.



**Fig. 49:** Metodi sintetici per generare NCA senza l'utilizzo di trifosgene.

Tra questi, DBTC può attivare i gruppi amminici degli amminoacidi per formare NCA. La funzione carbonilica di DBTC viene attaccata nucleoficamente dalla frazione amminica di un amminoacido per formare un intermedio isocianato, che viene convertito nel corrispondente NCA mediante ciclizzazione intramolecolare (**Figura 49a**). Tuttavia, questo metodo è applicabile a pochi monomeri, ha basse rese, ad eccezione di  $\gamma$ -benzil-L-glutammato NCA (BLG NCA), e può produrre reazioni di condensazione intermolecolare. In alternativa, il T<sub>3</sub>P può attivare il gruppo acido carbossilico degli amminoacidi. Il T<sub>3</sub>P ha permesso agli amminoacidi protetti da Boc di generare i corrispondenti esteri attivi catalizzati dalla piridina, che poi subiscono ciclizzazione intramolecolare per produrre i rispettivi NCA (**Figura 49b**).<sup>28</sup> Il metodo di cui sopra richiede che il gruppo amminico N-terminale del substrato sia protetto da Boc, il cui meccanismo di protezione è visibile nella **Figura 50**.

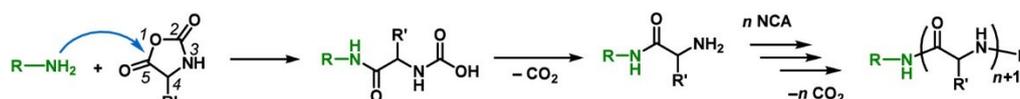


**Fig. 50** Meccanismo protezione Aib con il Boc<sub>2</sub>O.

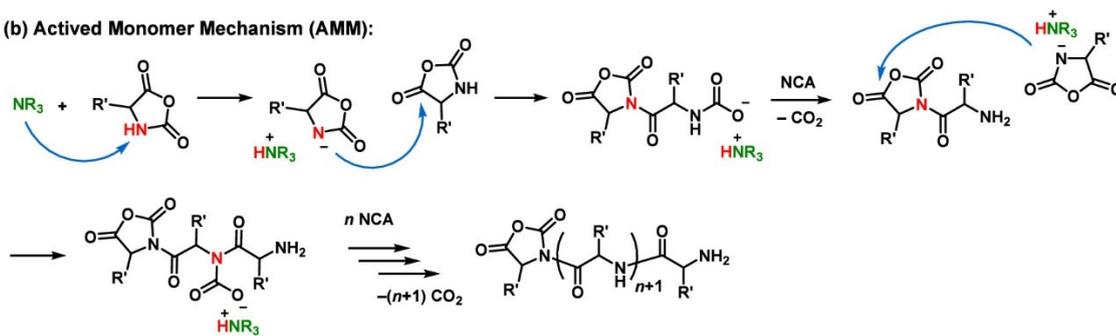
Questo problema è stato risolto utilizzando basi voluminose, come la diisopropiletilammina (DIEA), che consente al gruppo amminico degli amminoacidi di formare un carbammato con CO<sub>2</sub>.<sup>29</sup> Poiché il T<sub>3</sub>P si degrada rapidamente in soluzione acquosa, l'NCA può essere purificato mediante una procedura di lavorazione organico-acquosa. L'anello NCA possiede un sito carbonilico elettrofilo attivo (5-CO) e due siti nucleofili (3-NH e 4-CH).<sup>30</sup> Esistono due meccanismi di reazione classici riconosciuti per la polimerizzazione ad apertura dell'anello NCA, il meccanismo amminico normale (NAM) e il meccanismo monomero attivato (AMM).<sup>31</sup> Per il meccanismo NAM,

l'iniziatore è solitamente un reagente nucleofilo come ammine primarie, alcoli e gruppi sulfidrilici, che subisce l'addizione nucleofila sul 5-CO dell'NCA. I passaggi successivi comportano l'apertura dell'anello NCA e il trasferimento di protoni, formando un intermedio acido carbammico instabile. Questo intermedio subisce una decarbossilazione, rilasciando anidride carbonica, per fornire un'ammina primaria che agisce come centro di reazione per sostenere la reazione di polimerizzazione (**Figura 51a**).

(a) Normal Amine Mechanism (NAM):



(b) Activated Monomer Mechanism (AMM):



**Figura 51:** Meccanismo di polimerizzazione NCA classico, comprendente (a) il meccanismo dell'ammina normale (NAM) e (b) il meccanismo del monomero attivato (AMM)

La polimerizzazione delle NCA avviata da ammina primaria è il metodo più ampiamente utilizzato, che non solo produce polimeri ben definiti, ma consente anche la formazione di strutture macromolecolari complesse per soddisfare i requisiti di varie applicazioni.<sup>32</sup> Tuttavia, il normale meccanismo di propagazione della polimerizzazione inizializzato dall'ammina è limitato da due barriere energetiche, l'addizione nucleofila e la decarbossilazione,<sup>33</sup> che determinano una polimerizzazione lenta e la difficoltà di preparare polipeptidi con una lunga lunghezza della catena. Per il meccanismo AMM viene utilizzato come iniziatore una base composta da ammine terziarie al fine di deprotonare preferibilmente il sito 3-NH sull'anello della NCA per generare un anione-NCA, che quindi attacca il 5-CO di un altro monomero di NCA per produrre un dimero. Successivamente, questo dimero reagisce con un terzo monomero di NCA per creare un nuovo anione in grado di attaccare il dimero di cui sopra, facilitando così la crescita della catena (**Figura 51b**).<sup>34</sup> La polimerizzazione NCA avviata da ammine terziarie produce

polipeptidi con pesi molecolari elevati. Tuttavia, i gruppi terminali di questi polipeptidi sono costituiti da residui NCA reattivi, che sono suscettibili a reazioni collaterali che portano ad ampie distribuzioni del peso molecolare.<sup>35</sup>

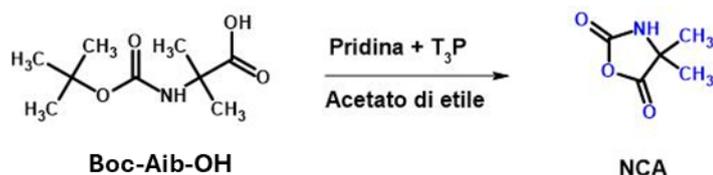
### 3.2 NCA Sintesi e Polimerizzazione di omopeptidi di Aib

Mentre gli amminoacidi “convenzionali” ( $\alpha$ -monosostituiti) che portano un centro chirale in posizione  $C^\alpha$  sono ben studiati sia nella sintesi NCA, nella successiva polimerizzazione ROP, gli amminoacidi  $C^{\alpha,\alpha}$ -disostituiti sono stati poco studiati in questo processo di polimerizzazione a causa della loro bassa reattività chimica (grosso ingombro sterico sia nel carbossile che nella ammina). Poiché l’Aib è un amminoacido achirale, il senso di spiralizzazione dell’elica negli oligomeri  $(Aib)_n$ , con  $n < 10$  può essere indotto dagli amminoacidi adiacenti, guidando l’orientamento in un’elica nel senso sinistrorsa o destrorsa seguendo il principio del sergente-soldato.

In questa tesi presentiamo la polimerizzazione ad apertura di anello di NCA-Aib consentendo per la prima volta la preparazione di omo-polimeri Aib che portano un gruppo di testa chirale, il quale induce un senso elicoidale nei poli $(Aib)_n$ . A differenza di molti altri amminoacidi facilmente polimerizzati in poli-amminoacidi tramite ROP delle rispettive NCA, la ROP per le NCA-Aib non è stata ancora studiata in dettaglio.

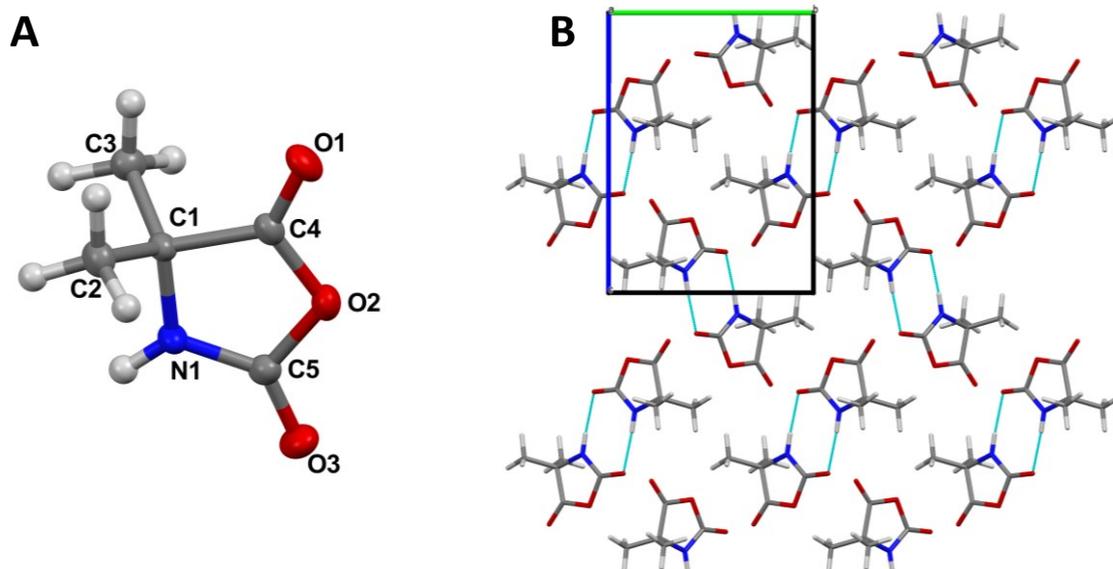
### 3.3 Preparazione di Aib-NCA

Come precedentemente accennato, i metodi più comuni per preparare NCA coinvolgono il fosgene, ma l’elevata tossicità del fosgene e le restrizioni legali sul suo utilizzo, che possono causare il rilascio di HCl gassoso corrosivo, rendono tali metodi difficili per utilizzarli in sicurezza. Pertanto, sebbene non riportato in letteratura per la formazione di Aib-NCA abbiamo deciso di applicare un processo “mild” non acido già riportato in letteratura per la sintesi di NCA di  $\alpha$ -amminoacidi da derivati di  $\alpha$ -amminoacidi protetti da N-Boc che utilizza  $T_3P$  come reagente attivante.<sup>36</sup> Dopo varie prove ed ottimizzazione del metodo sintetico abbiamo trovato che la seguente procedura sintetica conduce alla formazione della corrispondente NCA in buone rese e senza impurezza, come mostrato e riportato nella **Figura 52**. Nel dettaglio:



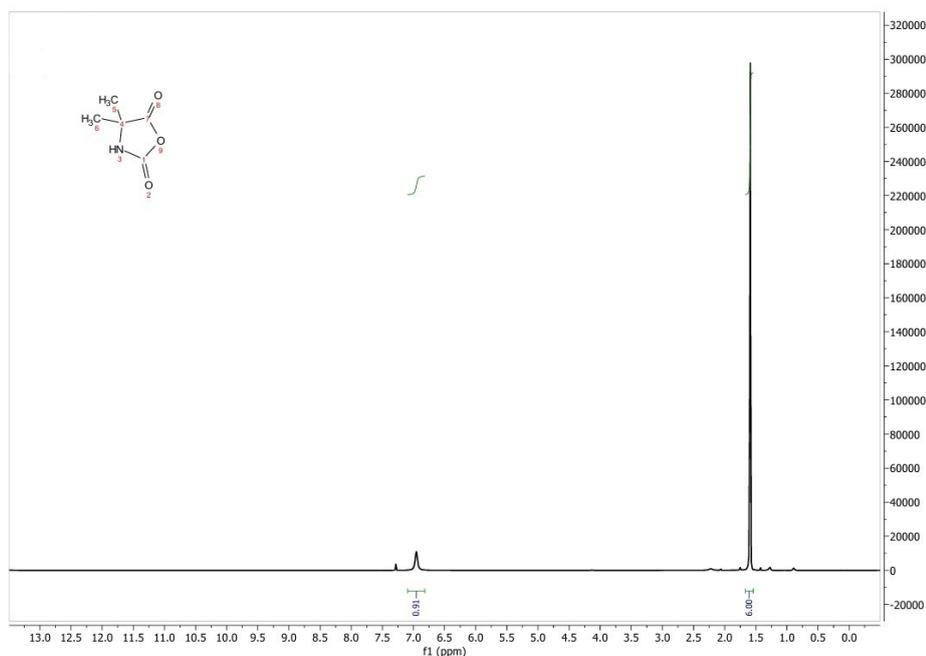
**Figura 52:** Sintesi Aib-NCA usando il T<sub>3</sub>P. L’NCA è stata sintetizzata a partire da 10 g Boc-Aib-OH, 38 mL di T<sub>3</sub>P, 100 mL di acetato di etile anidro, 3.96 mL di piridina. Il Boc-Aib-OH è stato inserito in un pallone da 1 L con ancorotta ed è stato sciolto in 100 mL di acetato di etile. A questa soluzione sono stati aggiunti 1.3 equivalenti di T<sub>3</sub>P e 1 equivalente di piridina entrambi rispetto al Boc-Aib-OH, la miscela è stata messa sotto agitazione magnetica. Trascorse 4 ore dall’inizio della reazione la miscela è stata trasferita in un imbuto separatore e sono stati fatti due lavaggi con acqua distillata ghiacciata e un lavaggio con una soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata trasferita in una beuta e anidrificata con solfato di sodio anidro, poi è stata filtrata e trasferita in un pallone da 500 mL. Dopo di che è stato evaporato l’acetato di etile fino a ottenere un volume pari a 50 mL, a questa soluzione vengono aggiunti circa 200 mL di n-esano sotto agitazione magnetica, in modo da ottenere la precipitazione dell’NCA. Infine, è stata filtrata la miscela su gouch, e NCA è stata stoccata in frizzer a -20°C, con una resa complessiva del 70% nella reazione ottimizzata.

La struttura molecolare dell’Aib NCA, come determinato dall’analisi di diffrazione dei raggi X a cristallo singolo, è illustrata nella **Figura 53A** con la numerazione degli atomi. Gli atomi dell’unità 1,3-ossazolidina-2,5-dione sono coplanari entro 0.0055(12) Å. I due gruppi metilici sono quasi equamente spostati dal piano medio dell’ossazolidina [C2 di 1,2388(14) Å su un lato e C3 di 1,2978(13) Å sul lato opposto]. Il legame N1-C1, 1,4541(14) Å, è più lungo del legame N1-C5, 1,3212(15) Å, in accordo con la natura lattamica di quest’ultimo. Una differenza minore, 0,02 Å, è osservata tra le distanze di legame a O2 [O2-C4 1,3702(15) Å, mentre O2-C5 1,3996(15) Å]. Nel complesso, queste caratteristiche molecolari sono ben confrontabili con quelle delle strutture cristalline pubblicate di anidridi N-carbossiliche da α-amminoacidi C<sup>α</sup>-tetrasostituiti. Nella modalità di impaccamento, si osserva un legame H intermolecolare tra il gruppo N1-H e l’equivalente di simmetria (-x+2, -y, -z+1) dell’atomo di ossigeno carbonilico O3, dando origine a dimeri centrosimmetrici con doppio legame H (Figura B). Le separazioni N...O e H...O sono rispettivamente 2.9887(15) Å e 2,19 Å e l’angolo N-H...O è 153.6°.



**Figura 53. A:** Struttura di diffrazione ai raggi X dell'anidride N-carbossilica di Aib con numerazione degli atomi. Gli ellissoidi di spostamento anisotropici per gli atomi non-H sono tracciati al livello di probabilità del 30%. **B:** Modalità di impacchettamento dell'anidride N-carbossilica Aib osservata lungo la direzione a. I legami H intermolecolari sono indicati da linee tratteggiate.

L'Aib-NCA è stata caratterizzata anche attraverso  $^1\text{H}$  NMR il cui spettro è riportato in **Figura 54**.

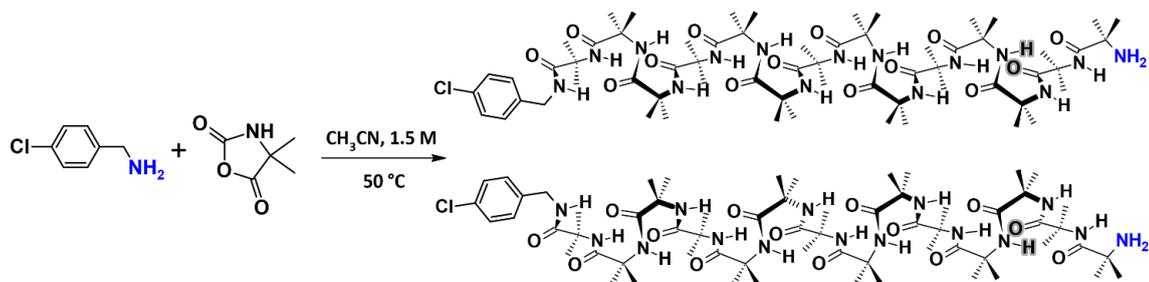


**Fig. 54** Spettro  $^1\text{H}$  NMR dell'Aib-NCA in  $\text{CDCl}_3$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.59 (s, 6H), 6.50 (s, 1H).

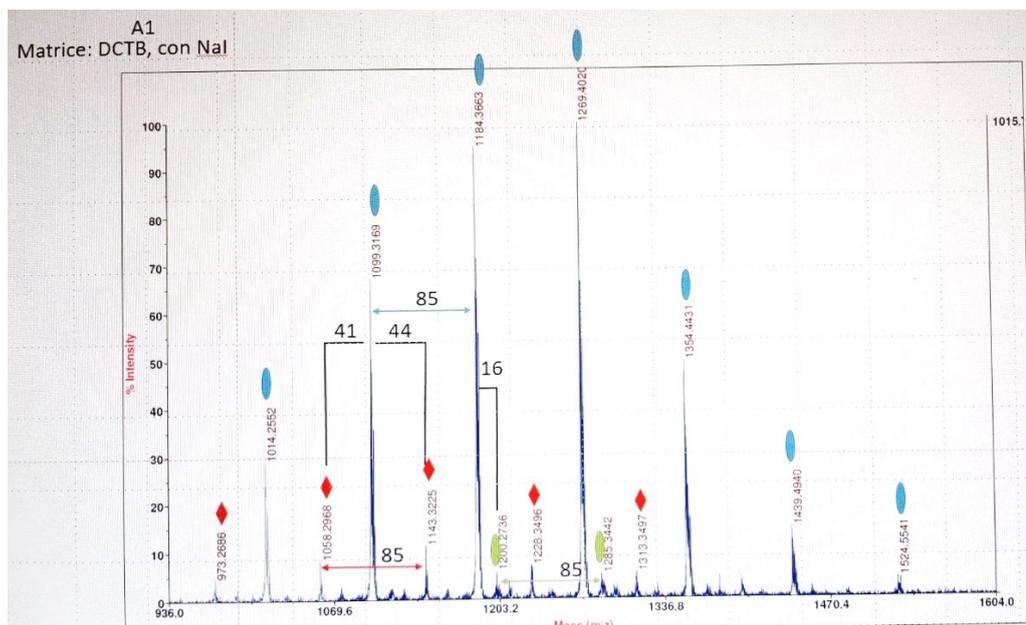
### 3.4 Polimerizzazione di Aib-NCA

Al fine di studiare la polimerizzazione del monomero di Aib-NCA abbiamo scelto la metodologia che prevede utilizzo di ammina primaria. Inizialmente abbiamo condotto una serie di esperimenti con diversi rapporti monomero/iniziatore. L'iniziatore utilizzato è stata la *p*-cloro-benzilammina, **Figura 55**.



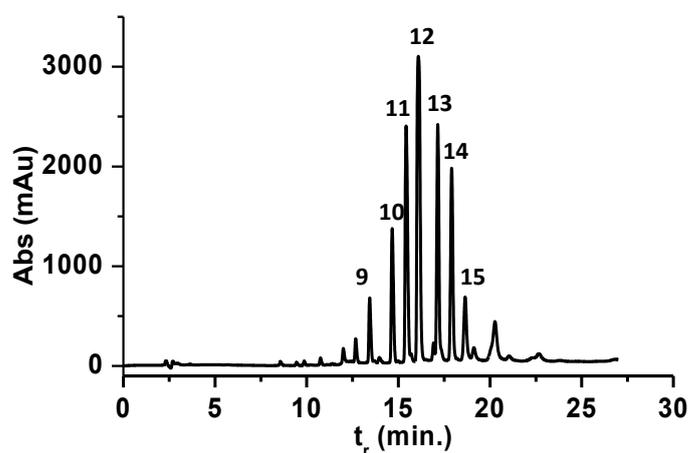
**Figura 55:** Ottimizzazione della reazione di polimerizzazione Aib-NCA/*p*-clorobenzilammina.

Come condizioni ottimali abbiamo trovato la possibilità di ottenere omopeptidi solubili con buone lunghezze a partire da Aib-NCA/ *p*-cloro-benzilammina con rapporti molari 10:1. In particolare, abbiamo ottenuto oligomeri con lunghezze comprese fra 11-14 unità di Aib. Dallo spettro di massa MALDI riportato in **Figura 56** si conferma una distribuzione di pesi molecolari degli oligomeri solubili ottenuti compresa fra 1099-1354 D.



**Figura 56:** Spettro di massa MALDI. I pesi molecolari 1099, 1184, 1269 e 1354 appartengono rispettivamente a  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{11}\text{-NH-clorobenzilammina}$ ,  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{12}\text{-NH-clorobenzilammina}$ ,  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{13}\text{-NH-clorobenzilammina}$  e,  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{14}\text{-NH-clorobenzilammina}$ , con una differenza in massa di 85 che è la massa di un Aib.

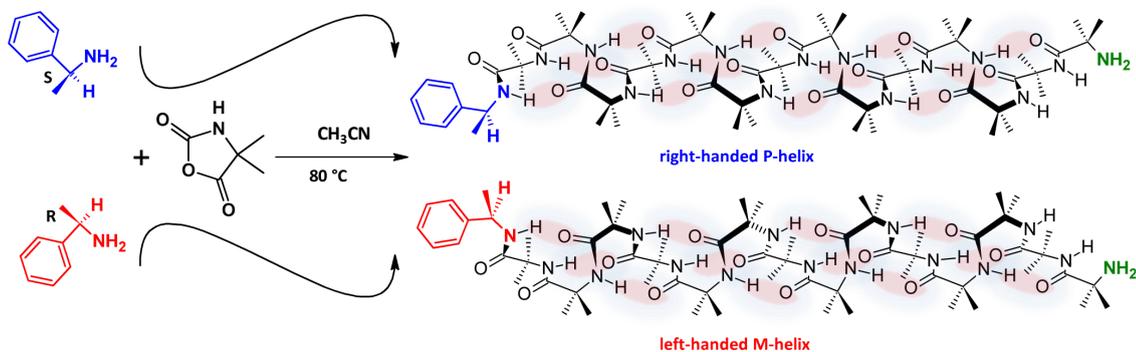
La solubilità e la presenza degli oligomeri e la loro abbondanza relativa è stata verificata via HPLC. Il cromatogramma dello stesso campione del MALDI è riportato in **Figura 57**.



**Figura 57:** Cromatogramma HPLC a fase inversa della miscela polimerica ottenuta. Si evidenzia la distribuzione in termine di abbondanza relativa degli oligomeri solubili ottenuti. I numeri sopra i picchi indicano in contenuto di Aib.

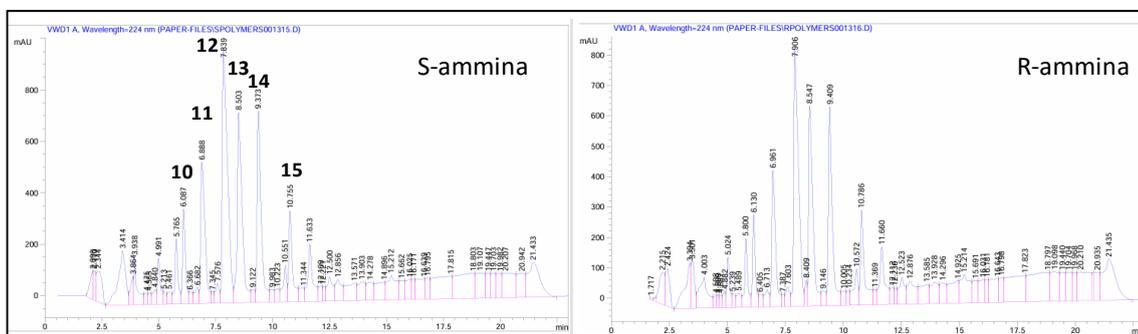
L'utilizzo di monomeri achirali e di un iniziatore achirale ci ha consentito con successo di ottenere una miscela racemica di eliche destrorse e sinistrorse con lunghezze ben

definite. Abbiamo così deciso di utilizzare iniziatori amminici con chiralità opposte al fine di generare strutture elicoidali con chiralità contrapposte anche se completamente formate da aminoacidi achirali. Sostituendo la *p*-cloro-benzilammina con la (S)-(-)- $\alpha$ -metill-benzilammina o la (R)-(+)- $\alpha$ -metill-benzilammina abbiamo riprodotto l'esperimento di polimerizzazione sopra citato per la *p*-cloro-benzilammina (**Figura 58**).



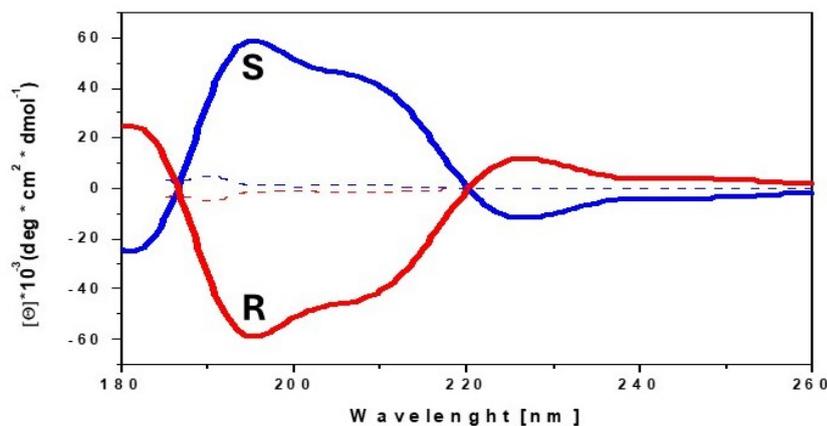
**Figura 58:** Ottimizzazione della reazione di polimerizzazione Aib-NCA/[*(S)*-(-)- $\alpha$ -metill-benzilammina] o [*(R)*-(+)- $\alpha$ -metill-benzilammina].

In questo caso, a causa dell'ingombro sterico delle ammine chirali rispetto alla *p*-cloro-benzilammina abbiamo condotto le polimerizzazioni ad una temperatura più alta (80°C), complessivamente abbiamo raggiunto lo stesso risultato in termine di lunghezze degli oligomeri. Dal confronto dei cromatogrammi **Figura 59** si vede come i due iniziatori generano la stessa tipologia di distribuzione di oligomeri, con lunghezze comprese fra 10-14 unità di Aib.



**Figura 59:** Ottimizzazione della reazione di polimerizzazione Aib-NCA/[*(S)*-(-)- $\alpha$ -metill-benzilammina] o [*(R)*-(+)- $\alpha$ -metill-benzilammina]. I due cromatogrammi a partire dalla ammina S o R rivelano la stessa distribuzione relativa degli oligomeri. I numeri sopra i picchi evidenziano il numero di Aib per oligomero.

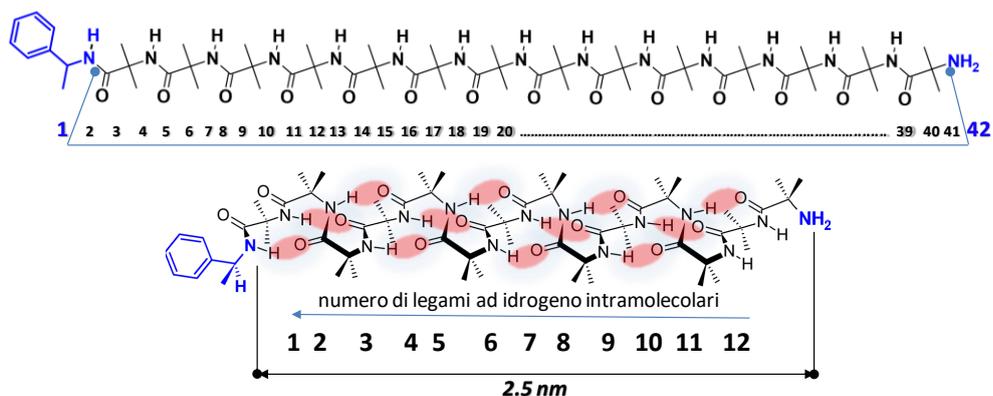
Le due miscele polimeriche sono state esaminate tramite il dicroismo circolare al fine di determinare l'eventuale chiralità opposte degli oligomeri ottenuti con le due diverse ammine **Figura 60**. Dal confronto dei due spettri CD in TFE alla concentrazione di 3 mg/ml si vede chiaramente che presentano un andamento di assorbimenti speculari nel range di lunghezze d'onda fra 180-260 nm, regione in cui assorbe il legame ammidico.



**Figura 60:** Confronto degli spettri dicroici per i polimeri ottenuti a partire dalla (S)-(-)- $\alpha$ -metill-benzilammina (curva etichettata in blu) o la (R)-(+)- $\alpha$ -metill-benzilammina (curva etichettata in rosso). Le linee tratteggiate si riferiscono alle due ammine (S)-(-)- $\alpha$ -metill-benzilammina (curva etichettata in blu) o la (R)-(+)- $\alpha$ -metill-benzilammina (curva etichettata in rosso)

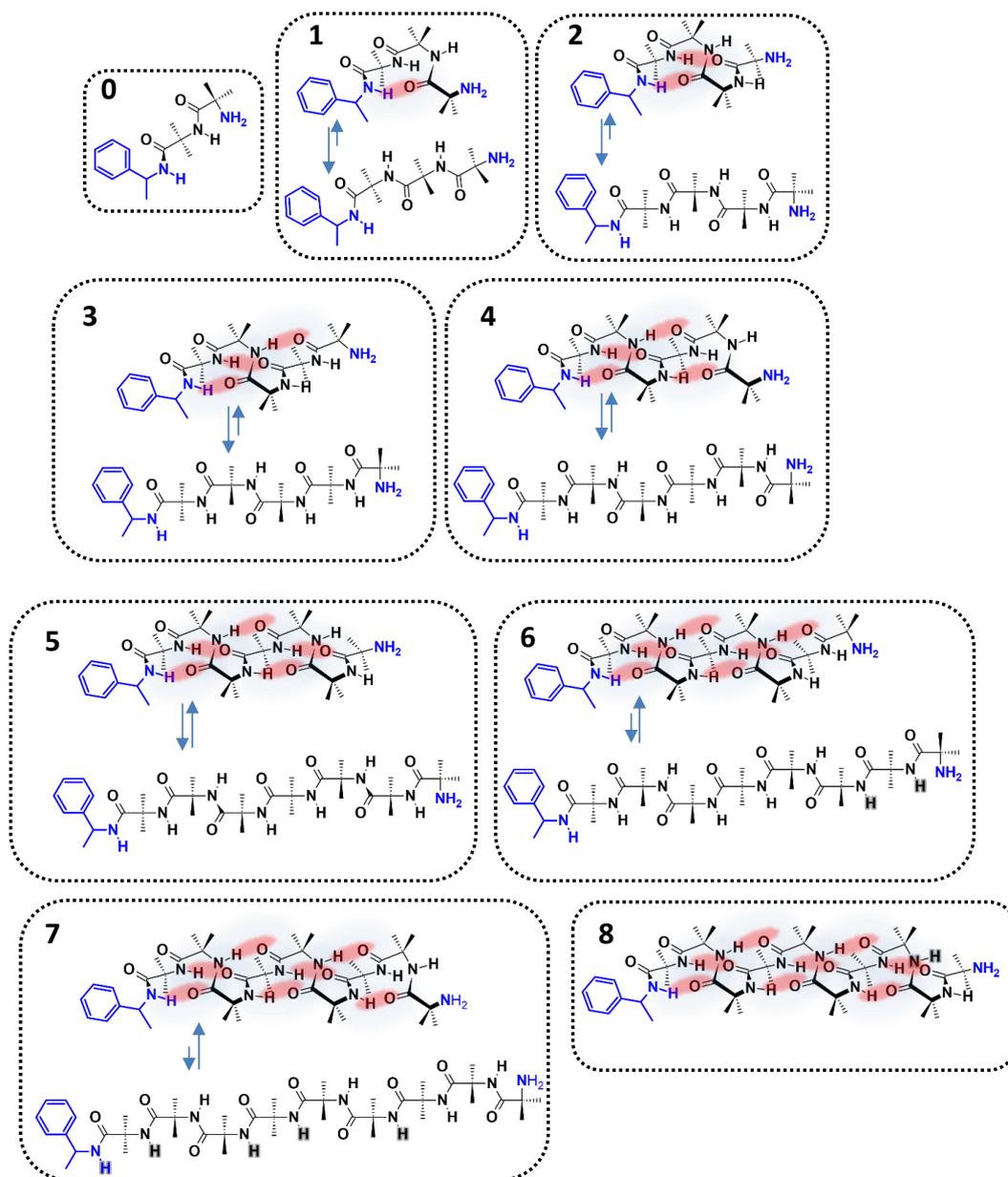
### 3.5 Propagazione della chiralità lungo lo scheletro peptidico

Considerando l'oligomero  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{14}\text{-}[\alpha\text{-metill-benzilammina}]$  riportato in **Figura 61** nella sua struttura estesa si vuole riportare il numero di legami  $\sigma$  e  $\pi$  (ammidici) che separano l'iniziatore chirale dalla funzione amminica del peptide. In particolare, si evidenzia che sono presenti ben 42 legami complessivi che separano il controllore chirale dalla funzione amminica. Il peptide presenta però una struttura secondaria elicoidale, che lo contrae ad una lunghezza finale di circa 2.5 nm.



**Figura 61:** Evidenza della separazione in termini di numero di legami, numero di legami ad idrogeno intramolecolari, e distanza complessiva fra il controllore chirale e funzione amminica.

Questa contrazione nasce dal susseguirsi di legami and idrogeno intramolecolari che cooperativamente rinforzano la struttura elicoidale. Nel caso della **Figura 61** si evidenziano bel 12 legami ad idrogeno che seppur non coinvolgendo l'ammina terminale probabilmente la rilegano saldamente in una conformazione fissa impartendogli una natura chirale a causa del senso di spiralizzazione preferenziale della struttura elicoidale. Nella **Figura 62** sotto riportata, si vuole illustrare l'effetto della stabilit  della struttura elicoidale in funzione dell'allungamento della catena omo-polipeptidica, nella rappresentazione schematica si riporta il sistema  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[\alpha\text{-metill-benzilammina}]$  con  $n=2\text{-}10$ .



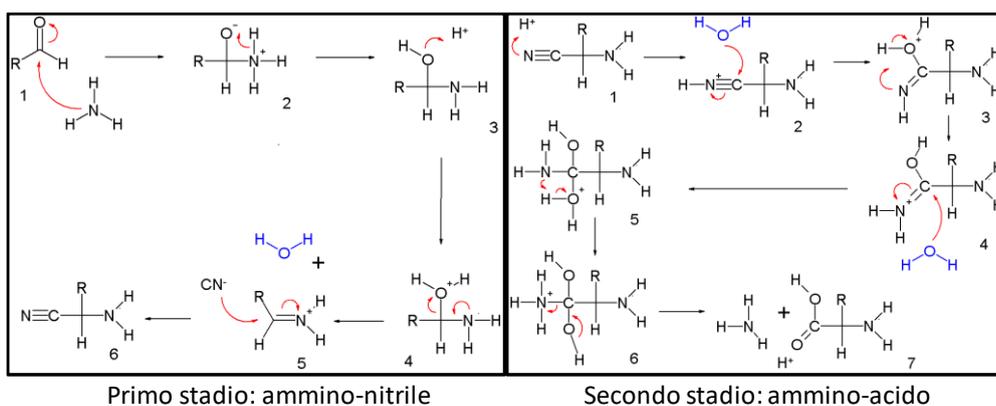
**Figura 62:** Differenza nelle popolazioni disordinate e strutturate in funzione del numero di legami ad idrogeno intramolecolare per la serie  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[\alpha\text{-metill-benzilammina}]$  con  $n=2\text{-}10$ . I numeri sulle figure rappresentano il numero di legami ad idrogeno possibili in strutture pseudo-cicliche racchiuse fra 10 atomi.

Il peptide  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_2\text{-}[\alpha\text{-metill-benzilammina}]$  non ha la possibilità di formare un legame ad idrogeno intramolecolare che contenga 10 atomi in un ciclo (0). Pertanto, il peptide in questione non avrà una struttura tridimensionale strutturata. La successiva serie  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{2-5}\text{-}[\alpha\text{-metill-benzilammina}]$  potrà disporre di una serie crescente di legami ad idrogeno intramolecolari (rispettivamente da 1-4) che consentiranno di avere parti dei vari sistemi più o meno popolate da strutture elicoidali e strutture disordinate.

All'aumentare della lunghezza la serie  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{6-9}$ -[ $\alpha$ -metil-benzilammina] il più altro numero di legami ad idrogeno consecutivi (da 5 a 7) andrà a favorire cooperativamente le strutture elicoidali piuttosto che quelle disordinate. Infine, nel sistema  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{10}$ -[ $\alpha$ -metil-benzilammina] gli 8 legami ad idrogeno possibili dovrebbero garantire la presenza delle sole strutture elicoidali. Pertanto, ci aspettiamo che solo i peptidi più lunghi blocchino la conformazione dell'ammina terminale in una posizione tale da risentire dell'effetto chirale dell'ammina iniziatrice della polimerizzazione.

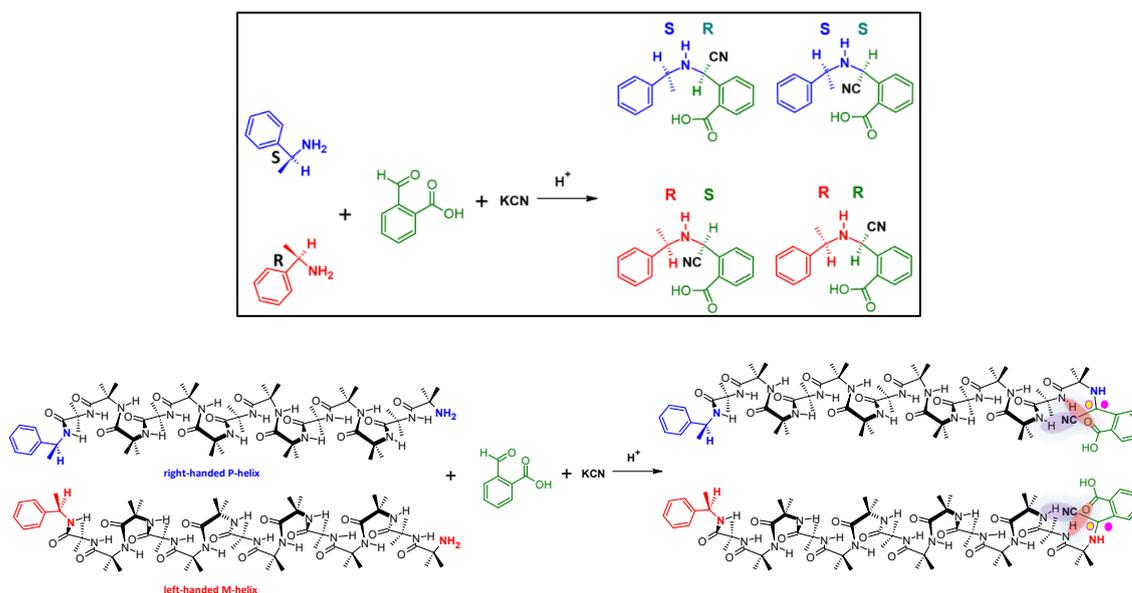
### 3.6 Stereoselezione nella reazione di Strecker

La sintesi di Strecker degli amminoacidi, messa a punto da Adolph Strecker, è una serie di reazioni chimiche che produce un aminoacido partendo da un'aldeide (o un chetone). L'aldeide viene condensata con cloruro d'ammonio in presenza di cianuro di potassio a dare un  $\alpha$ -amino nitrile, che viene successivamente idrolizzato nell'amminoacido corrispondente **Figura 63**.



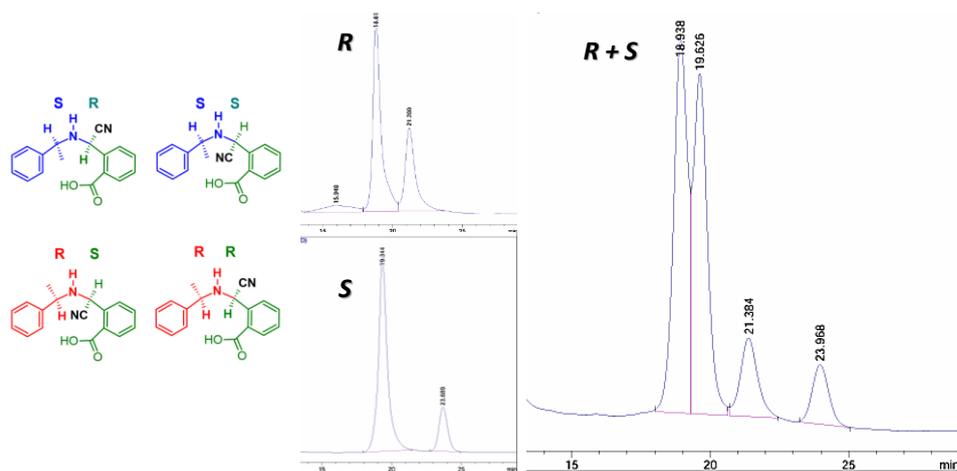
**Figura 63:** La sintesi di Strecker degli amminoacidi

L'uso di sali di ammonio produce amminoacidi non sostituiti, ma la reazione può essere condotta anche con ammine primarie o secondarie a dare amminoacidi N-sostituiti. La sintesi originale diede  $\alpha$ -ammino nitrili racemi, e successivamente l'utilizzo di ausiliari o catalizzatori chirali ha consentito di condurre sintesi asimmetriche. In questo contesto abbiamo pensato di utilizzare i polipeptidi enantiomerici per valutare la possibilità di selezionare preferenzialmente un enantiometro rispetto all'altro in funzione della lunghezza del peptide e del suo senso di spiralizzazione. Schematicamente, in **Figura 64**, si riporta il design degli esperimenti che si vuole condurre.



**Figura 64:** Design della sintesi di Strecker utilizzando: sopra (i) le due ammine chirali utilizzate come iniziatori delle polimerizzazioni e sotto (ii) le eliche peptidiche, entrambe come fonte di ammine primarie chirali.

Inizialmente siamo andati a cercare se esistesse una stereoselezione preferenziale a livello delle ammine chirali. Queste sono state poste a reagire con la 2-carbossibenaldeide in presenza di KCN e  $H^+$  in isopropanolo. Dall'analisi HPLC su fase inversa a colonna non chirale si vede che la reazione ha proceduto rapidamente con la formazione dei corrispondenti ammino nitrili diastereoisomerici, la coppia S-R e S-S nel caso della (S)-(-)- $\alpha$ -metil-benzilammina e la coppia R-S e R-R nel caso della (R)-(+)- $\alpha$ -metil-benzilammina. Dai cromatogrammi si ottengono rapporti relativi e tempi di ritenzione identici per entrambe le ammine utilizzate sopra **Figura 65**. Al fine di valutare la differenza nella separazione delle coppie di enantiomeri, le stesse soluzioni sono state analizzate mediante HPLC a fase diretta utilizzando una colonna chirale. In questo caso si vedono le differenze fra gli enantiomeri nelle reazioni singole e nella co-eluzione delle due reazioni (diversi tempi di ritenzione).



**Figura 65:** Molecole formate nelle due reazioni S-R e S-S nel caso della (S)-(-)- $\alpha$ -metilbenzilammina e la R-S e R-R nel caso della (R)-(+)- $\alpha$ -metilbenzilammina. Co-eluzione che conferma la formazione delle due coppie enantiomeriche.

Pertanto, in conclusione, si nota che in entrambi i casi si ha una diastereoselezione di circa 4:1 e che i sistemi delle due ammine sono fra loro enantiomerici. Avendo gli strumenti per seguire l'evoluzione della stereoselezione (si possono osservare i diastereoisomeri e gli enantiomeri), siamo passati a studiare l'effetto remoto dell'induzione chirale sulla stereoselezione dei polipeptidi. L'utilizzo della serie  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metilbenzilammina]}$  o della serie  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metilbenzilammina]}$  risulta, a seguito della reazione di Strecker in presenza della 2-carbissibenaldeide e del cianuro di potassio, nella formazione di un ammino nitrile N,N disostituito chirale (evidenziato nella **Figura 64** con due pallini colorati gialli e viola). Il design dell'esperimento vuole dimostrare la possibilità di avere enantio- e diastereoselezione nella formazione del prodotto finale. Poiché il centro chirale negli omopetidi è posto a notevole distanza, si vuole vedere se l'effetto della struttura secondaria chirale possa dare luogo a stereoselezione. Le possibili reazioni prevedono la formazione di 4 stereoisomeri, di cui le coppie dello stesso colore sono enantiomeri.

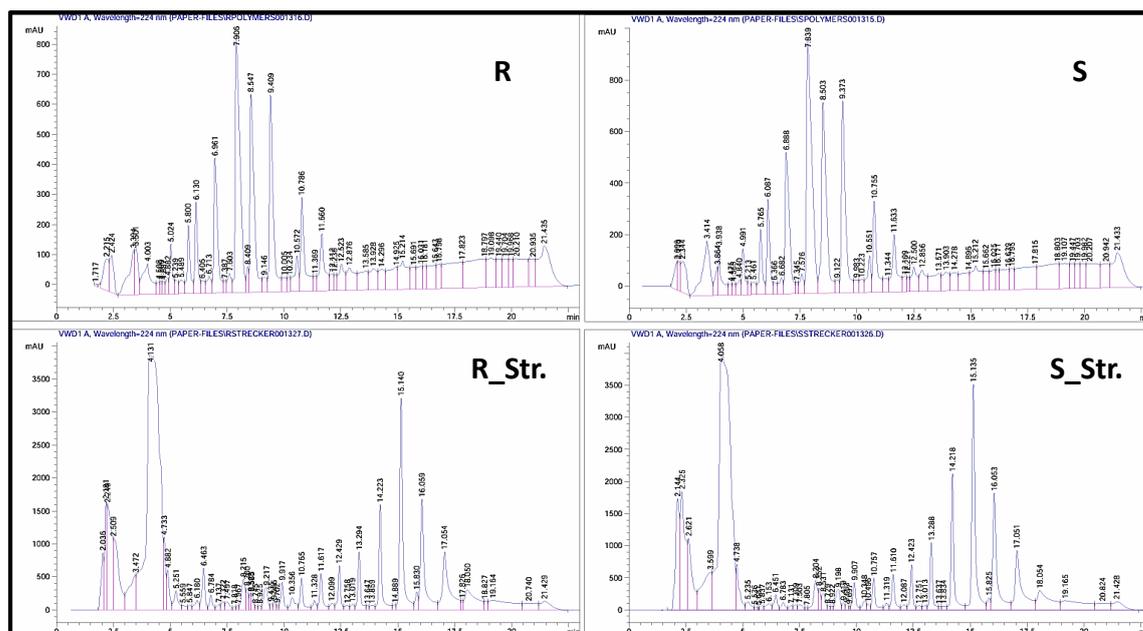
Per i polimeri di  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metilbenzilammina]}$ :



Per i polimeri di  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metilbenzilammina]}$ :



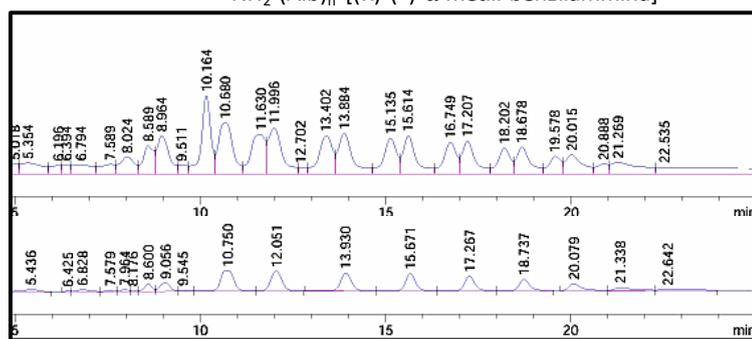
Nella **Figura 66** sono riportati per confronto gli HPLC dei due polimeri e prima e dopo la reazione di Strecker.



**Figura 66:** Design della sintesi di Strecker utilizzando: sopra (i) le due ammine chirali utilizzate come iniziatori delle polimerizzazioni e sotto (ii) le eliche peptidiche, entrambe come fonte di ammine primarie chirali.

La formazione dell'ammino nitrile in entrambi i casi porta alla formazione di un polimero con una distribuzione più affilata e spostata a tempi di ritenzione maggiori rispetto alla controparte amminica. Gli HPLC di partenza e quelli finali dopo la reazione di Strecker sono del tutto equivalenti per i due sistemi studiati. Questi cromatogrammi in prima battuta comprovano che la reazione è avvenuta, ma non dimostrano quale sia stata la stereoselezione. Avendo gli stessi tempi di ritenzione si può ipotizzare che le due serie degli ammino nitrili siano di tipo enantiomerico piuttosto che di tipo diastereoisomerico. L'utilizzo di una colonna chirale con fase stazionaria proteica, in condizioni di fase inversa, ci ha consentito di analizzare il dettaglio la tipologia di prodotti ottenuti nelle due reazioni che coinvolgono i polimeri con sensi di spiralizzazione opposti. In condizione di eluizione isocratica con una miscela isopropanolo/H<sub>2</sub>O 2:8, un microloop per iniezione di 1 µl, ed un flusso di 0.4 ml/min si è riusciti a separare i picchi visti in fase inversa con la colonna non chirale e dimostrare che i prodotti ottenuti nelle due reazioni sono fra loro enantiomerici. I risultati sono riportati in **Figura 67**.

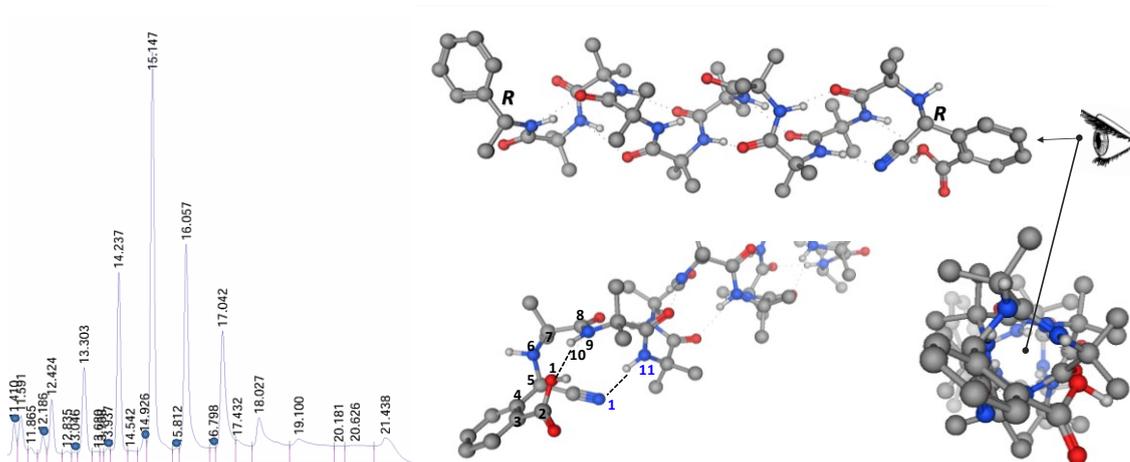
Coeluzione da:  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$   
 $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$



Reazione di Strecker a partire da:  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$

**Figura 67:** Nella parte sotto della figura il cromatogramma dei prodotti ammino-nitrilici ottenuti a partire dal polimero  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$ . Nella parte sopra della figura la co-eluzione dei prodotti ottenuti nelle due reazioni.

Dal confronto dei cromatogrammi, si vede chiaramente come i prodotti ottenuti dalle due reazioni siano di tipo enantiomerico, e sembra non ci siano tracce di prodotti diastereomerici. Questo implica che è avvenuta una stereoselezione prossima al 100% per un enantiomero preferenziale ed in maniera opposta per le due tipologie elicoidali di polipeptidi. Per razionalizzare questo risultato, abbiamo costruito dei modelli per cercare di individuare interazioni favorevoli verso la selezione preferenziale di enantiomero piuttosto che l'altro. In primo luogo, da una accurata analisi degli HPLC già mostrati in **Figura 68** si possono notare in entrambi i casi dei piccoli picchi cromatografici accanto ai picchi principali più intensi, e questo avviene per entrambe le reazioni. Questi picchi potrebbero essere dovuti in entrambi i casi alla formazione della coppia diastereomerica. Da notare comunque che sono presenti in tracce (pallini in **Figura 68**).

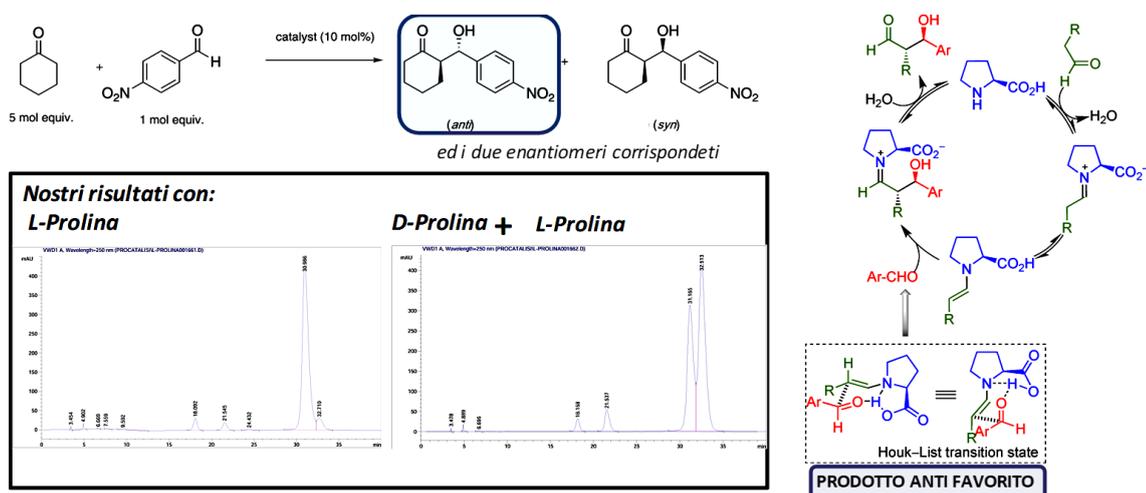


**Figura 68:** Cromatogramma HPLC che rivela tracce della presenza del prodotto diastereoisomerico. Modelli tridimensionali ottimizzati a partire da  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  che mostrano le interazioni intramolecolari favorevoli che occorrono solo nel caso della configurazione R dell'ammino nitrile risultate per questo modello.

Un dato molto interessante emerge invece dal modello tridimensionale ottimizzato su di  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_{10}\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$ . La risultate struttura dell'ammino nitrile corrispondente è in grado di stabilizzare l'intera struttura tridimensionale elicoidale solo se il nuovo centro chirale prodotto è in configurazione R. In questa configurazione assoluta, sia il nitrile che il carbossile sono in grado di legare con legami ad idrogeno intramolecolari due siti ammidici liberi presenti nel polimero di partenza. Questa extra stabilizzazione, crediamo sia la driving force per la riguardevole stereoselezione effettuata a così lunga distanza. In conclusione i polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  generano esclusivamente i corrispondenti R-ammino nitrili mentre i polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(S)\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  generano esclusivamente i corrispondenti S-ammino nitrili. Si è comprovata la comunicazione dell'informazione chirale, a lungo raggio, tramite l'uso di uno spacer achirale ma dotato di struttura secondaria ben definita.

### 3.7 Stereoselezione nella condensazione aldolica

Verificato che la chiralità viene trasferita dal controllore alla funzione amminica lungo il backbone peptidico si è valutata la possibilità di mimare la proprietà la catalisi della Prolina verso l'enantio- e diastereo-selezione quando usata nelle reazioni di condensazione aldolica **Figura 69**.



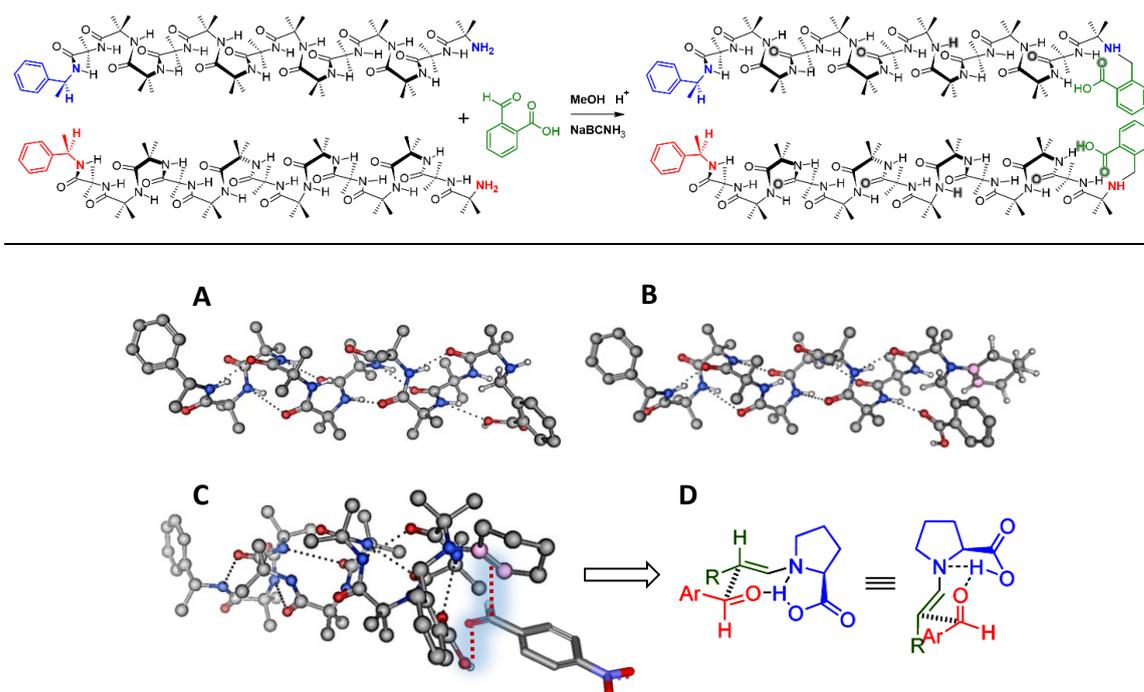
**Figura 69:** Reazione di condensazione aldolica fra cicloesانونe e *p*-nitrobenzaldeide catalizzata dalla prolina(L o D), con formazione dei due diastereoisomeri *anti* e *syn*. Dallo stato di transizione a destra si vede come il prodotto di addizione *anti* sia favorito dall'interazione del catalizzatore con entrambi i substrati. L'eccesso enantiomerico del prodotto anti è determinato dalla chiralità del catalizzatore. Nel riquadro gli HPLC su fase stazionaria chirale che mostrano la stereoselezione e l'enantioselezione della L-Prolina e una coeluzione dei prodotti della L-Prolina con D-Prolina.

Abbiamo riprodotto un esperimento<sup>40</sup> di letteratura al fine di verificare l'eccesso diastereoisomerico ed enantiomerico da parte della L-Prolina e della D-Prolina quando usati come catalizzatori nella reazione fra cicloesانونe e *p*-nitro-benzaldeide. Questa reazione porta alla formazione come descritto in figura di due centri chirali. Questi due centri chirali sono determinati dalla stereochimica del catalizzatore. L'addizione fra i substrati può avvenire in condizioni *anti* o *syn*, e l'addizione *anti* è favorita dallo stato di transizione mostrato in **Figura 69**.

Il risultato dei due esperimenti è stato ottenuto mediante utilizzo di HPLC con fase stazionaria chirale. Per entrambi gli enantiomeri della Prolina si evince la formazione di un rapporto diastereoisomerico di 9:1 a favore dell'addizione *anti*, ed un eccesso enantiomerico del 90%. I risultati sono mostrati in **Figura 69**, dove inoltre si riporta la coeluzione dei prodotti delle sue reazioni che mostrano entrambi gli enantiomeri preferenziali.

Per valutare una eventuale stereoselezione dei nostri polipeptidi in questo tipo di condensazione aldolica, si è proceduto alla modificazione della ammina primaria. Per

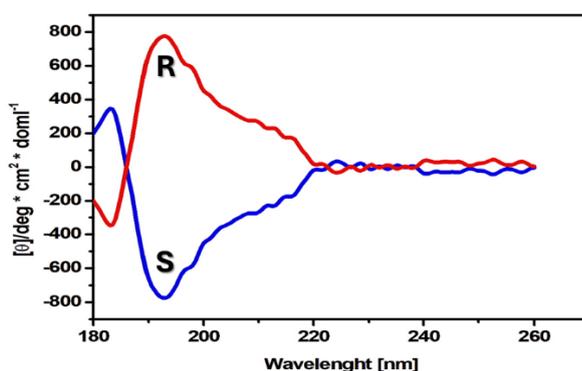
renderla simile alla ammina secondaria della prolina, che è ciclica, abbiamo pensato di eseguire una amminazione riduttiva utilizzando la 2-carbossibenzaldeide, che precedentemente abbiamo osservato nella reazione di Strecker poter partecipare con la funzione carbossilica ad un eventuale legame ad idrogeno intramolecolare in grado di stabilizzare la struttura secondaria del polipeptide ed al tempo stesso vincolare il sito catalitico in una posizione rigida. Nella parte superiore della **Figura 70** viene riportato lo schema dell'amminazione riduttiva per i due polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  e  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(S)\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$ .



**Figura 70:** Parte sopra, reazione di amminazione riduttiva per il polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  e  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(S)\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  con formazione dei rispettivi derivati amminici secondari. Parte sotto. **A:** Modello computazionale con minimizzazione energetica per il derivato amminico secondario a partire da  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  che mostra l'irrigidimento conformazionale della ammina secondaria a seguito della reazione di amminazione riduttiva. **B:** Modello computazionale con minimizzazione energetica per il derivato amminico secondario a partire da  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  che ha reagito con il cicloesano per formare la corrispondente enammina (il doppio legame sul cicloesano è evidenziato in viola). **C:** Modello della coordinazione della *p*-nitro benzaldeide nel polipeptide enamminico. **D:** Modello di confronto della coordinazione della prolina per la diastereoselettività *syn/anti*.

Come si vede nel modello computazionale con minimizzazione energetica il derivato amminico secondario (**Figura 70 A**), a partire da  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{R})\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$ , mostra un marcato irrigidimento conformazionale nella regione spaziale dove risiede l'ammina secondaria. Questo irrigidimento è causato dal ripiegamento conformazionale della nuova parte molecolare aggiunta, tramite la formazione di un nuovo legame ad idrogeno intramolecolare fra la funzione carbossilica della *o*-carbossi benzaldeide e la penultima ammido del polipeptide. Ci si aspetta che tale derivato possa sommare un chetone, cicloesanone, per generare l'adotto enamminico descritto nella **Figura 70 B**. Successivamente, ci si aspetta che la *p*-nitrobenzaldehyde possa coordinarsi come nello stato di trazione della prolina, per la stessa reazione (**Figura 70D**), per operare in modo selettivo nella formazione di eccessi stereoisomerici (**Figura 70C**).

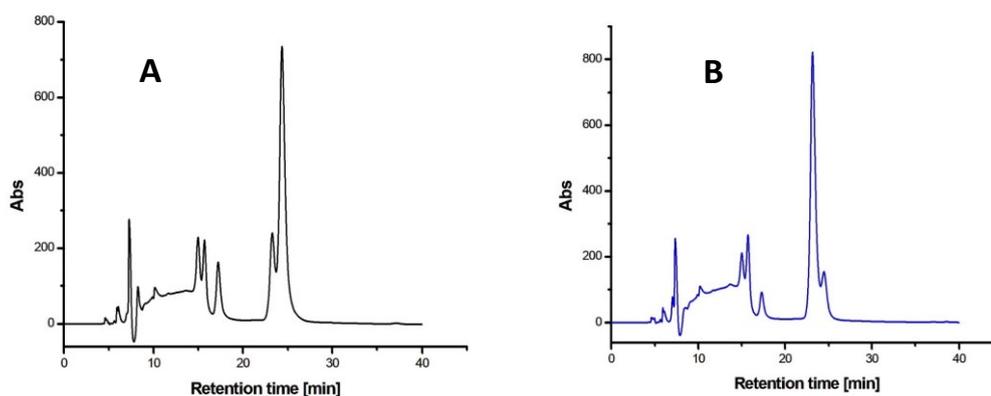
Le due miscele dei polimeri funzionalizzati  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{S})\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  o la  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{R})\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  sono state esaminate tramite il dicroismo circolare al fine di determinare l'eventuale chiralità opposte degli oligomeri ottenuti con le due diverse ammine **Figura 71**. Dal confronto dei due spettri CD in TFE alla concentrazione di 3 mg/ml si vede chiaramente che presentano un andamento di assorbimenti speculari nel range di lunghezze d'onda fra 180-260 nm, regione in cui assorbe il legame ammidico.



**Figura 71:** Confronto degli spettri dicroici per i polimeri funzionalizzati  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{S})\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  (curva etichettata in blu) o polimeri funzionalizzati  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{R})\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  (curva etichettata in rosso).

Dopo una serie di ottimizzazioni nella scelta dei solventi, temperature, tempi e concentrazioni, abbiamo riscontrato che le reazioni presentano un marcato effetto nella diastereo- ed enantio-selezione. I risultati sono illustrati nella **Figura 72**. In dettaglio 50

mg dei due polimeri funzionalizzati sono stati messi a reagire con 500 mg di cicloesano in 5 ml di una miscela di  $\text{CHCl}_3$ /isopropanolo 8:2. Come si vede dai cromatogrammi da HPLC con fase stazionaria chirale, in entrambi i casi abbiamo riscontrato un grande eccesso diastereoisomerico a favore della reazione *anti* (rapporto di circa 7:1). Inoltre abbiamo riscontrato un eccesso enantiomerico importante (fra 70 e 80 %) a favore di (i) il polimero funzionalizzato  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  mostra un eccesso enantiomerico in favore dello stesso enantiomero generato dalla D-Prolina, e (ii) il polimero funzionalizzato  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(S)\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  mostra un eccesso enantiomerico in favore dello stesso enantiomero generato dalla L-Prolina.

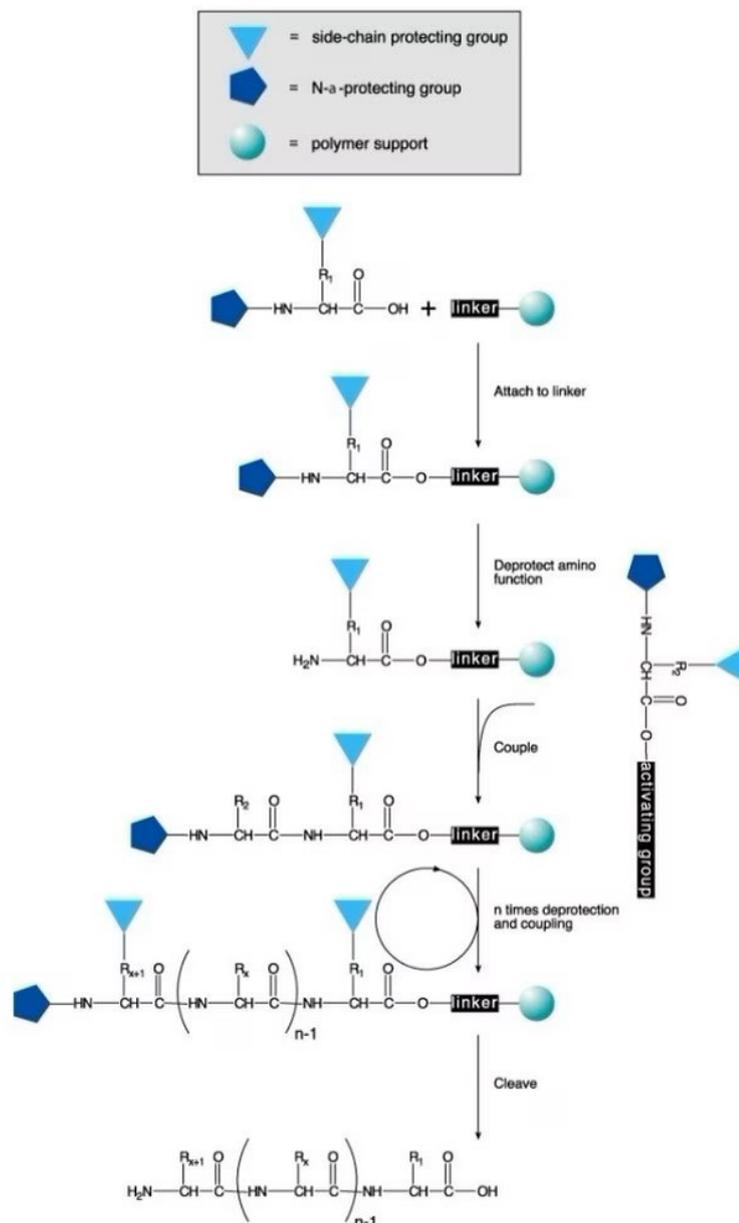


**Figura 72. A:** Cromatogramma per il polimero funzionalizzato  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(R)\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  che mostra un marcato eccesso enantiomerico in favore dello stesso enantiomero generato dalla L-Prolina. **B:** Cromatogramma per il polimero funzionalizzato  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(S)\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  che mostra un marcato eccesso enantiomerico in favore dello stesso enantiomero generato dalla D-Prolina.

### 3.7.1 Condensazione aldolica usando un polimero supportato

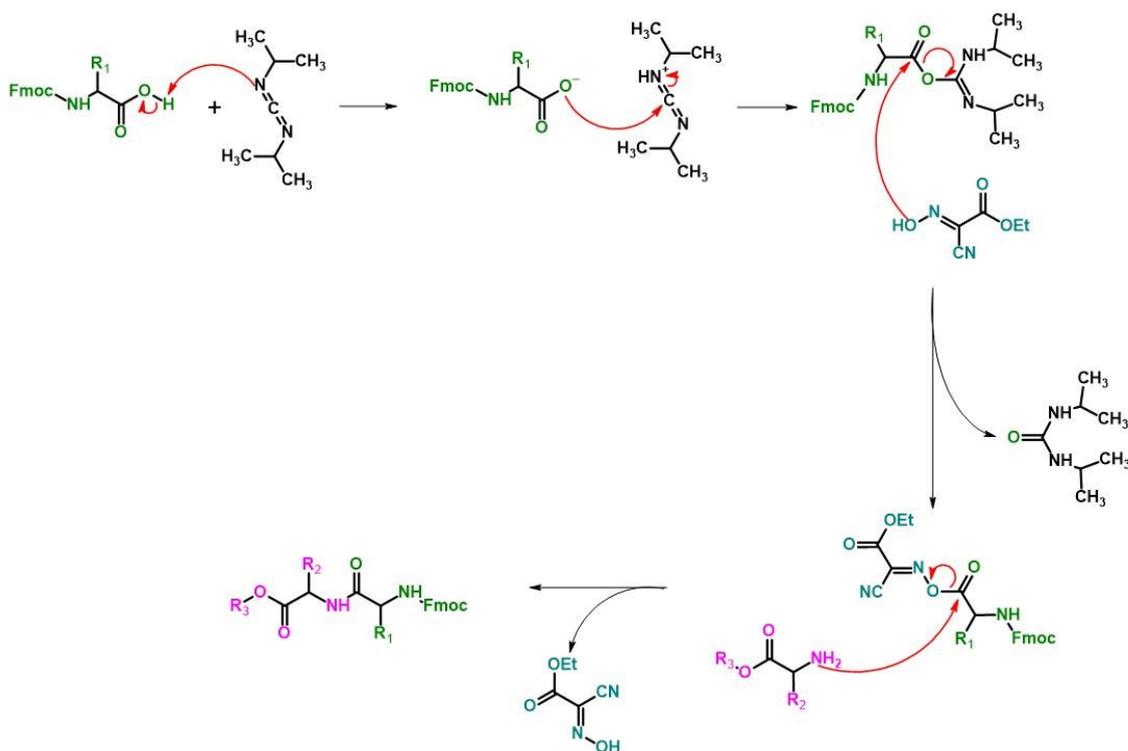
Ci siamo chiesti se fosse possibile condurre la reazione di condensazione aldolica usando un polimero attaccato a una resina, questo per semplificare la separazione dei prodotti dai reagenti. Per fare ciò è stato sintetizzato il peptide Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib, la presenza della L-Alanina serve per dare il senso di spiralizzazione in quanto il peptide risulta essere corto. La sintesi su fase solida è una tecnica che permette di semplificare la sintesi e la purificazione dei peptidi. Inoltre, sfrutta l'ortogonalità dei gruppi protettori per avere la selettività tra gli amminoacidi ed evitare le reazioni

collaterali. La tecnica prevede l'uso di un supporto solido insolubile, una resina, a cui viene attaccata la catena peptidica durante il processo, l'accrescimento avviene dall'estremità C termina verso la N terminale, questo per evitare l'epimerizzazione della catena. Uno dei vantaggi della sintesi su fase solida è la possibilità di usare la filtrazione per eliminare le soluzioni di reazione mantenendo la catena peptidica attaccata al supporto, in questo modo è molto più semplice la purificazione. Gli amminoacidi sono attaccati uno alla volta attivando la funzione carbossilica mentre la funzione amminica è protetta. <sup>41</sup> Lo schema generale della sintesi è visibile nella **Figura 73**.



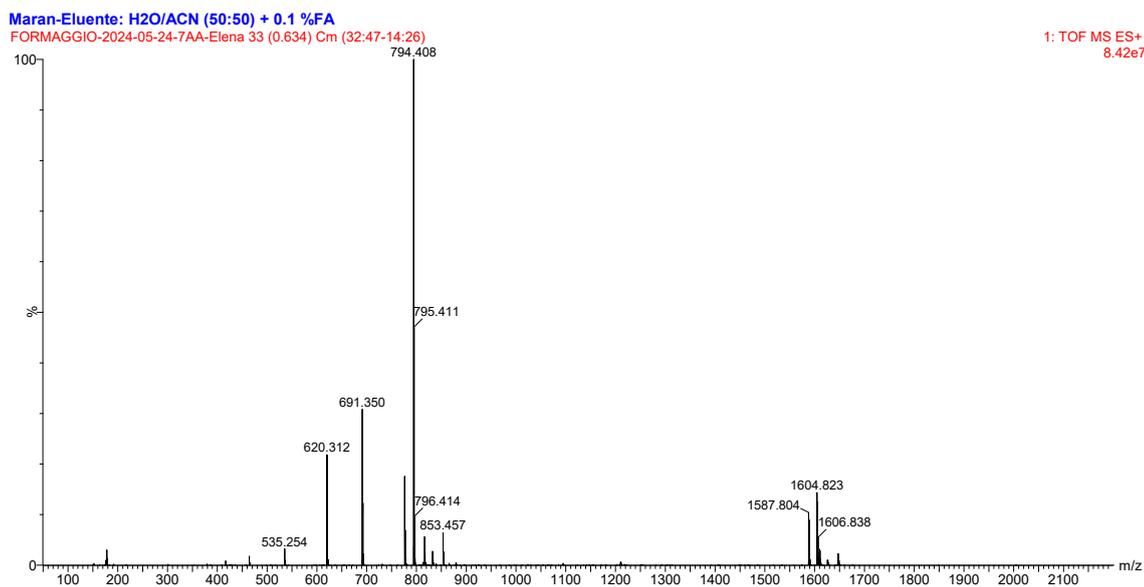
**Figura 73.** Schema generale sintesi su fase solida

Per la sintesi su fase solida esistono diversi attivanti nel lavoro di tesi è stata usata la DIC (N,N'-Diisopropilcarbodiimide) e il reagente Oxyma Pure ossia etil (2Z)-2-ciano-2-idrossiiminoacetato che da un attacco nucleofilo all'aminoacido attivato come acil isourea, trasformandolo in un estere attivato che andrà a reagire con la catena peptidica, il meccanismo è visibile nella **Figura 74**.



**Figura 74.** Meccanismo di attivazione e coupling tramite DIC e Oxyma

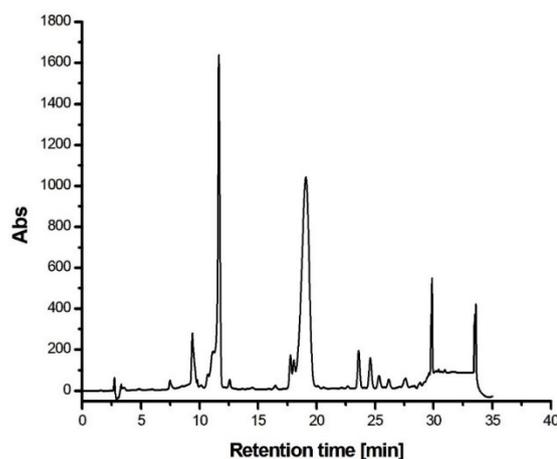
Lo spettro di massa del peptide è visibile nella **Figura 75**.



**Figura 75.** Spettro MS (ESI-TOF) peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib

Il picco a 794.480 m/z corrisponde al  $[M-H]^+$ , dove M corrisponde al peptide Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib.

Successivamente alla sequenza peptidica di Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib è stata aggiunta una glicina, sempre usando la sintesi su fase solida, l'ammina libera della glicina è stata resa simile alla ammina secondaria della prolina, che è ciclica, eseguendo una amminazione riduttiva utilizzando la 2-carbossi-benzaldeide. In questo modo è stato possibile condurre la reazione di condensazione aldolica tra il cicloesanone e la 4-nitrobenzaldeide, il cromatogramma è riportato in **Figura 76**.

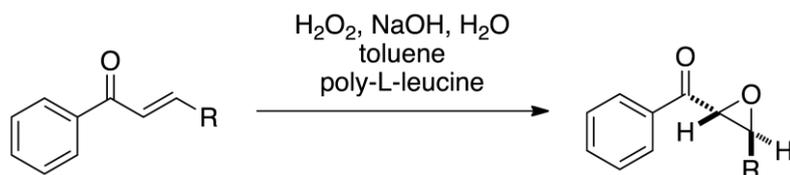


**Figura 76.** Cromatogramma della reazione condensazione aldolica tra cicloesano e 4-nitrobenzaldeide catalizzata dal peptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Gly funzionalizzato, i due picchi dei prodotti sono a 24 e a 24.5 minuti.

Dal cromatogramma si nota che la reazione risulta possibile anche usando un peptide funzionalizzato supportato, essendo un peptide diverso dai polimeri funzionalizzati  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$  e dai polimeri funzionalizzati  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$  non è però possibile fare confronti sulla velocità di reazione o sulla stereoselezione ed enantioselezione.

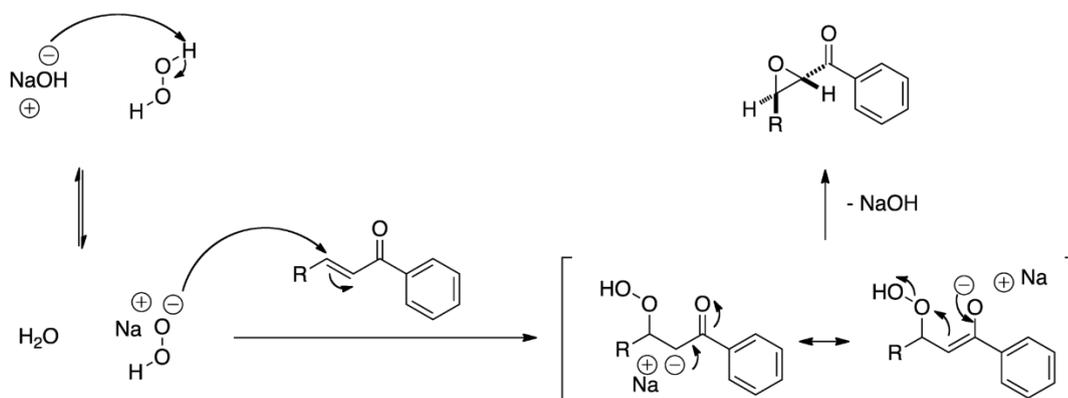
### 3.8 Stereoselezione nella epossidazione

La reazione di epossidazione Juliá-Colonna è un'eossidazione nucleofila asimmetrica catalizzata da poli-L-Leucina (PLL) di olefine carenti di elettroni in un sistema trifasico, per questo motivo è stata presa in considerazione per valutare l'enantio- e la stereoselezione dei catalizzatori da noi creati. L'enantioselettività della poli-L-Leucina è data dalla sua struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica in cui il residuo N-terminale risulta essere conformazionalmente bloccato dai legami idrogeno presenti nell'elica, inoltre la massima enantioselettività si è ottenuta con poli-L-Leucine contenenti 30 residui amminoacidici. Nello specifico la reazione riportata in letteratura comporta epossidazione di un calcone generico ed è visibile nella **Figura 77**.<sup>37</sup>



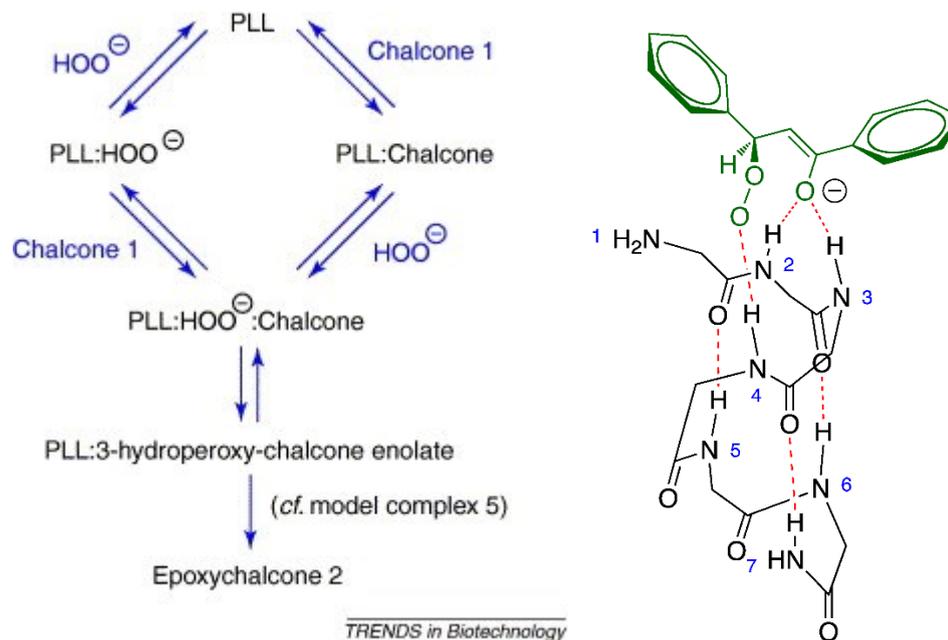
**Figura 77:** Reazione di epossidazione di Juliá–Colonna di un calcone procede con poli-L-leucina e perossido di idrogeno in condizioni trifasiche generiche.

Il meccanismo generale delle epossidazioni nucleofile è riportato in **Figura 78**.



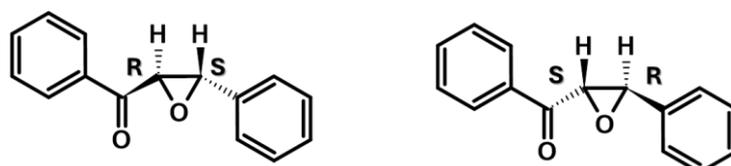
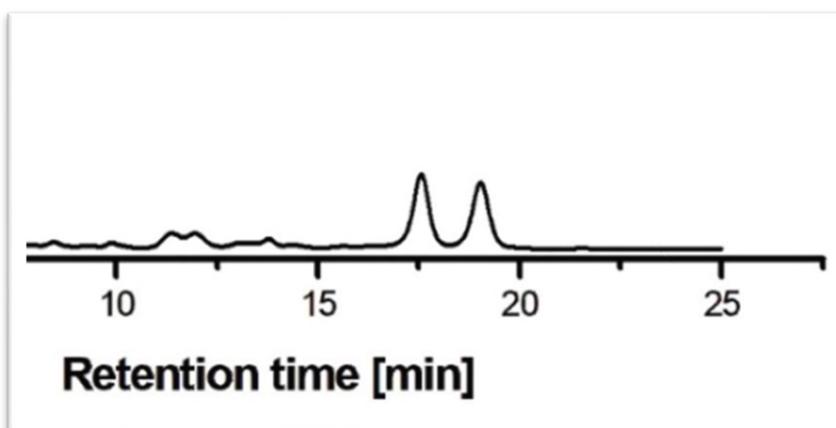
**Figura 78:** Meccanismo generale delle epossidazioni nucleofile

Nel caso dell'eossidazione di Juliá–Colonna il meccanismo è controllato dal catalizzatore poli-L-Leucina, si ha la formazione di un complesso composto da poli-L-Leucina, calcone e anione idroperossido, per poi reagire per formare un intermedio enolato di perossido. Quest'ultimo viene successivamente chiuso per formare il prodotto. Da studi cinetici <sup>38</sup>, si evince che si ha preferenzialmente prima il legame tra poli-L-Leucina e idroperossido e successivamente si ha la formazione del complesso ternario con l'aggiunta del calcone. Poi si ha un rapido equilibrio che porta alla formazione dell'enolato di perossido, è importante ricordare che è necessario che il calcone e l'anione idroperossido si leghino prima al catalizzatore. In **Figura 79** è riportato lo schema generale di formazione del complesso ternario e il modello del complesso.



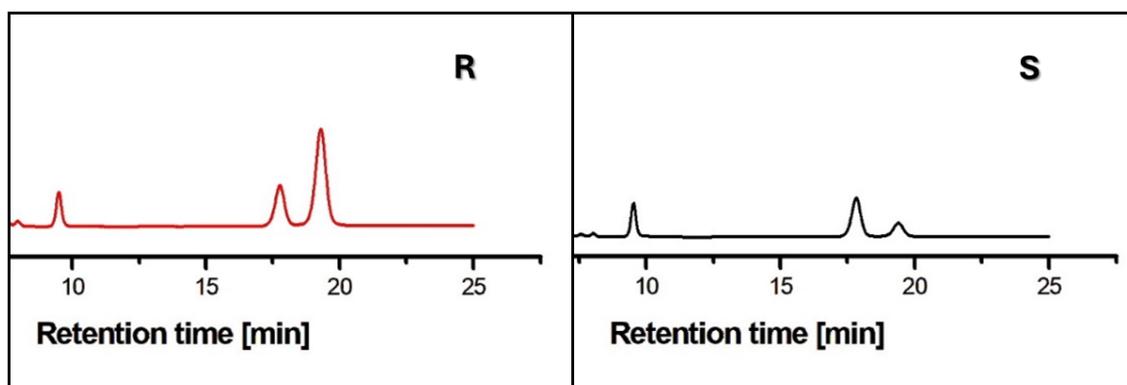
**Figura 79:** A **sinistra** si ha lo schema generale di formazione del complesso e successivamente dell'eossidazione; a **destra** si ha l'immagine del complesso (in verde si ha il calcone).

Abbiamo riproposto un esperimento di letteratura <sup>39</sup> per verificare se potevamo determinare analiticamente la formazione dei veri prodotti. Nella **Figura 80** si riporta il cromatogramma della reazione di eossidazione del trans-chalcone con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, è stata usata la colonna chirale ed eluizione isocratica con una miscela isopropanolo/H<sub>2</sub>O 2:8, un microloop per iniezione di 1 µl, ed un flusso di 0.4 ml/min con cui è possibile separare i prodotti (fenil-[(2S,3R)-3-fenilossiran-2-il]metanone e fenil-[(2R,3S)-3-fenilossiran-2-il]metanone) ottenuti nelle due reazioni, e dimostrare che sono fra loro enantiomerici.



**Figura 80:** **Sopra:** cromatogramma eseguito con la colonna chirale della reazione di epossilazione del trans-calcone con non  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; **sotto:** i prodotti fenil-[(2R,3S)-3-fenilossiran-2-il]metanone e fenil-[(2S,3R)-3-fenilossiran-2-il]metanone.

Abbiamo poi riprodotto l'esperimento della reazione di epossidazione del trans-calcone sostituendo alla poli-L-Leucina i polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$  e  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$ , in modo da controllare la stereo- e l'enantioselezione dei due polimeri in questa reazione. Nella **Figura 81** si riporta il cromatogramma della reazione di epossidazione del trans-chalcone rispettivamente del polimero R e del polimero S. Al fine di valutare l'eccesso enantiomerico è stata usata una HPLC chirale.



**Figura 81:** Cromatogrammi delle reazioni di epossidazione del trans-calcone a sinistra utilizzando come catalizzatore i polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(R)-(+)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$  e a destra i  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-[(S)-(-)-}\alpha\text{-metil-benzilammina]}$ .

Dal confronto dei cromatogrammi, in **Figura 80 e 81** si vede chiaramente come i prodotti ottenuti dalle tre reazioni portino all'ottenimento di due prodotti enantiomerici (picchi a 17 e 19 minuti). Si nota che per la reazione senza catalizzatore l'eccesso enantiomerico è prossimo al 50% mentre per le due reazioni con polimeri  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{R})\text{-}(+)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  e  $\text{NH}_2\text{-(Aib)}_n\text{-}[(\text{S})\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metil-benzilammina}]$  si ha un eccesso enantiomerico diverso dal 50%. In particolare, si nota che la reazione avvenuta con i polimeri R ha un eccesso enantiomerico di -44,171 % mentre quella avvenuta con i polimeri S ha un eccesso enantiomerico di 45,733 %. Questo implica che si ha la formazione di un enantiomero in via preferenziale e ciò risulta essere influenzato dalla struttura secondaria che assume l'elica dei poli-Aib.



## 4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi abbiamo valutato se si potesse avere una stereoselezione, in particolare diastereo-selezione ed enantio-selezione a lunga distanza, fino a 40 legami e 2.5 nm di distanza, attraverso la comunicazione fra un controllore remoto di chiralità connesso a dei polipeptidi achirali. Questo lavoro di tesi ha visto la sintesi di polimeri di Aib per una loro policondensazione che è stata iniziata da delle ammine chirali di chiralità opposta. I due sistemi fra loro enantiomerici, formati da strutture elicoidali di tipo  $3_{10}$  e terminati con una funzione amminica sono stati utilizzati come catalizzatori o substrati per tre reazioni modello che vedono la formazione di prodotti diastereoisomerici e/o enantiomerici, per studiarne l'effetto a lunga distanza sulla stereoselezione.

Mediate l'uso di varie metodologie sintetiche, seguite da caratterizzazioni chimico-fisiche quali l'utilizzo della spettrometria NMR, spettrometria di massa atomica, cristallografia, dicroismo circolare, HPLC in fase inversa ed HPLC in fase diretta con colonne chirali, si è stati in grado di determinare in modo non equivoco che i sistemi riportati in questa tesi sono in grado di produrre altissimi livelli di stereoselettività e nel caso specifico di diastereo- ed enantio-selettività. La grande distanza fra il centro chirale e la funzione catalitica è compensata dalla strutturazione tridimensionale dei catalizzatori polipeptidici utilizzati. Questa organizzazione tridimensionale vede la cooperazione di molti legami ad idrogeno intramolecolari che si susseguono ordinatamente nel polipeptide, generando strutture elicoidali che bloccano il sito catalitico in un intorno chirale e pseudo-ciclico, di chiralità opposta dipendendo dall'iniziatore della polimerizzazione utilizzato.



## 5. BIBLIOGRAFIA

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **1970**, *9*, 3471.
2. Toniolo C.; Benedetti E., *Trends Biochem. Sci.*, **1991**, *16*, 350.
3. Venkatachalam C.M., *Biopolymers*, **1968**, *6*, 1425.
4. Toniolo C., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **1980**, *9*, 1.
5. Rose G.D.; Gierasch L.M.; Smith J.A., *Adv. Protein Chem.*, **1985**, *37*, 1.
6. Marshall G.R., "Intra-Science Chemistry Reports", Kharasch N. (Ed.), Gordon and Breach, **1971**, *5*, 305.
7. Venkataram Prasad B.V.; Sasisekharan V., *Macromolecules*, **1979**, *12*, 1107.
8. Paterson Y.; Rumsey S.M.; Benedetti E.; Némethy G.; Scheraga H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2947.
9. Benedetti E.; Bavoso A.; Di Blasio B.; Pavone V.; Pedone C.; Crisma M.; Bonora G.M.; Toniolo C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 2437.
10. Paterson Y.; Stimson E.R.; Evans D.J.; Leach S.J.; Scheraga H.A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1982**, *20*, 468.
11. Toniolo C.; Bonora G.M.; Barone V.; Bavoso A.; Benedetti E.; Di Blasio B.; Grimaldi P.; Lelj F.; Pavone V.; Pedone C., *Macromolecules*, **1985**, *18*, 895.
12. Karle I.L. Balaram P., *Biochemistry*, **1990**, *29*, 6747.
13. Benedetti E.; Di Blasio B.; Pavone V.; Pedone C.; Santini A.; Crisma M.; Toniolo, C., "Molecular Conformation and Biological Interactions", Balaram P.; Ramaseshan, S (Ed), *Indian Academy of Sciences*,., Eds., Bangalore , **1991**, p. 497.
14. Kumar P; Paterson NG; Clayden J; Woolfson DN, *Nature*, **2022**, *607*, 387–92.
15. Gessmann R; Brückner H; Petratos K, *J Pept Sci*, **2003**, *9*, 753–62.
16. Knowles W.S.; *Angew. Chem.*, Intl Ed. **2002**, *41*, 1998. Noyoi R., *Angew. Chem.*, Intl Ed. **2002**, *41*, 2008. Sharpless K.B., *Angew. Chem.*, Intl Ed., **2002**, *41*, 2024.
17. Eliel E.L.; Wilen S.H.; "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley, **1994**.
18. Mikami K. M.; Shimizu M.H.-C.; Zhang H.-C B.E.; Maryanoff B.E.; *Tetrahedron*, **2001**, *57*:2917.

19. Mazzier D.; Crisma M.; De Poli M.; Marafon G.; Peggion C.; Clayden J.; Moretto A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 8007–8018.
20. Tian Z.; Zhang Z.; Wang S.; Lu H., *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 5810.
21. Kricheldorf, H. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5752–5784.
22. Daly W. H.; Poché D., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 5859–5862.
23. Nagai A.; Sato D.; Ishikawa J.; Ochiai B.; Kudo H.; Endo T.A, *Macromolecules*, **2004**, *37*, 2332–2334.
24. Fujita, Y.; Koga, K.; Kim, H.-K.; Wang, X.-S.; Sudo, A.; Nishida, H.; Endo, T. Phosgene-Free Synthesis of N-Carboxyanhydrides of  $\alpha$ -Amino Acids Based on Bisarylcarbonates as Starting Compounds. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2007, *45* (22), 5365–5370.
25. Koga K.; Sudo A.; Endo T., *Polym. Chem.*, **2010**, *48*, 4351–4355.
26. Enomoto H.; Nottelet B.; Halifa S. A.; Enjalbal C.; Dupré M.; Tailhades J.; Coudane J.; Subra G.; Martinez J.; Amblard M., *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 409–411.
27. Laconde G.; Amblard M.; Martinez J., *Org. Lett.*, **2021**, *23*, 6412–6416.
28. Tran T. V.; Shen Y.; Nguyen H. D.; Deng S.; Roshandel H.; Cooper M. M.; Watson J. R.; Byers J. A.; Diaconescu P. L.; Do L.H., *GreenChem.*, **2022**, *24*, 9245–9252.
29. Pickel D. L.; Politakos N.; Avgeropoulos A.; Messman J. M., *Macromolecules*, **2009**, *42*, 7781–7788.
30. Hadjichristidis N.; Iatrou H.; Pitsikalis M.; Sakellariou G., *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 5528–5578.
31. Hharalambous B. M.; Feavers I. M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **2000**, *191*, 45–50.
32. Liu J.; Ling J., *J. Phys. Chem.*, **2015**, *119*, 7070–7074.
33. Deming T. J., *Adv. Mater.*, **1997**, *9*, 299–311.
34. Brulc B.; Žagar E.; Gadzinowski M.; Słomkowski S.; Žigon M., *Macromol. Chem. Phys.*, **2011**, *212*, 550–562.
35. Yan J.; Liu K.; Li W.; Shi H.; Zhang A., *Macromolecules*, **2016**, *49*, 510–517.
36. O. G. Lacond; M. Amblard; J. Martinez, *Org. Lett.*, **2021**, *23*, 6412–6416.
37. Julih S.; Guixer J.; Masana J.; Rocas J.; Colonna S.; Annuziata R.; Henriette Molinari H, *J. CHEM. SOC.*, **1982**, 1317–1323.

38. Carrea G.; Colonna S.; Kelly D.R.; Lazcano A.; Ottolina G.; Roberts S. M.; *TRENDS in Biotechnology*, **2005**, *23*, 507-513.
39. Julih S.; MasanaJ.; Vega J. C.; *Angewandte Chemie*, **1980**, *19*, 929-931.
40. Emma M. G.; Tamburrini A.; Martinelli A.; Lombardo M.; Quintavalla A.; Trombini C., *Catalysts*, **2020**, *10*, 649.
41. Anderson G. W.; Zimmerman J. E.; Callahan F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 5012 – 5017.