



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.

Dipartimento di Scienze Chimiche

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA

**STUDI SU MACROICLIZZAZIONI
INTRAMOLECOLARI FOTOINDOTTE
SU ELICHE PEPTIDICHE-3₁₀**

Relatore: Prof. Claudio Toniolo

Controrelatrice: Prof.ssa Marilena Di Valentin

Laureanda: Anna Cupani

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

<i>Riassunto</i>	iii
<i>Abbreviazioni</i>	v
1. INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Elementi di stereochimica dei peptidi</i>	2
1.2 <i>Conformazione preferenziale dei peptidi contenenti Aib</i>	5
1.3 <i>Utilità degli α-amminoacidi C^{α}-tetrasostituiti</i>	6
1.4 <i>Fotoeccitazione del Bpa e macrociclizzazione di peptidi</i>	7
1.5 <i>Scopo della Tesi</i>	14
2. PARTE SPERIMENTALE	15
2.1 <i>Materiali e metodi</i>	15
2.1.1 <i>Reagenti e solventi</i>	15
2.1.2 <i>Strumentazione e metodi</i>	16
2.2 <i>Sintesi e caratterizzazione</i>	19
2.2.1 <i>Sintesi di derivati protetti di amminoacidi</i>	19
2.2.2 <i>Sintesi del peptide Boc-Aib-Met-Aib₂-Bpa-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$)</i>	20
2.2.3 <i>Sintesi del peptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib₂-OMe ($i \rightarrow i+2$)</i>	24
2.2.4 <i>Sintesi del peptide Boc-Aib-Bpa-Met-Aib₃-OMe ($i \rightarrow i+1$)</i>	27
2.2.5 <i>Reazione di fotociclizzazione</i>	30
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	31
3.1 <i>Sintesi dei peptidi</i>	31

3.1.1	<i>Strategia di sintesi</i>	31
3.1.2	<i>Metodi di attivazione del gruppo carbossilico</i>	34
3.1.3	<i>Gruppi protettori impiegati</i>	36
3.1.4	<i>Metodiche di caratterizzazione</i>	37
3.2	<i>Indagini conformazionali</i>	
3.2.1	<i>Assorbimento IR</i>	37
3.2.1.1	<i>Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$) e suoi intermedi</i>	37
3.2.1.2	<i>Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$) e suoi intermedi</i>	40
3.2.1.3	<i>Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$) e suoi intermedi</i>	42
3.2.2	<i>Spettrometria $^1\text{H-NMR}$</i>	43
3.3	<i>Reazioni di fotociclizzazione</i>	
3.3.1	<i>Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe</i>	50
3.3.2	<i>Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe (B) e Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe (C)</i>	54
4.	<i>CONCLUSIONI</i>	59
5.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	61

RINGRAZIAMENTI

RIASSUNTO

In questo lavoro di Tesi sono stati progettati, sintetizzati con metodiche classiche di sintesi in soluzione, studiati conformazionalmente e testati in una reazione di fotociclizzazione i seguenti peptidi:

- (1) Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$)
- (2) Boc-Aib-**Bpa**-Aib-**Met**-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$)
- (3) Boc-Aib-**Bpa**-**Met**-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$)

Ci si è proposti di indagare la reazione tra il Bpa (benzoil-fenilalanina) e la catena laterale della Met, quando l'unità benzofenonica del Bpa viene fotoeccitata. Allo scopo, Bpa e Met sono stati inseriti in posizioni diverse lungo la catena peptidica.

Gli studi conformazionali in soluzione, condotti mediante assorbimento IR ed NMR, hanno rivelato che i tre peptidi adottano una struttura elicoidale di tipo 3_{10} . Tale conformazione sembra influenzare notevolmente il decorso della reazione di fotociclizzazione. Infatti, per tutti e tre i peptidi ha luogo la reazione intramolecolare Bpa e Met, ma con esiti molto differenziati. In particolare, la reazione fotoindotta su Boc-Aib-**Bpa**-**Met**-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$) sembra essere la più regioselettiva e quantitativa, in quanto i ottengono quasi esclusivamente i due diastereoisomeri derivanti dalla chiusura del ciclo tra Bpa e ϵ -CH₃ Met.

Pertanto, grazie alla presenza di strutture peptidiche rigide si sono potute ottenere informazioni sugli effetti della distanza reciproca e dell'orientazione (dall'N- al C-terminale o viceversa) di Met e Bpa nei confronti della regio- e stereoselettività della reazione di macrociclizzazione fotoindotta.

ABBREVIAZIONI

AcOEt	=	acetato di etile
AcOH	=	acido acetico
Aib	=	acido α -amminoisobutirrico
Bpa	=	<i>p</i> -Bz-fenilalanina
Boc	=	<i>tert</i> -butilossicarbonile
CH ₂ Cl ₂	=	diclorometano
CHCl ₃	=	cloroformio
DIEA	=	N-etil-diisopropilammina
DEA	=	dietilammina
DMSO	=	dimetilsolfossido
EDC	=	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide
EP	=	etere di petrolio
EtOH	=	etanolo
Et ₂ O	=	etere dietilico
Fmoc	=	fluorenilmetilossicarbonile
FT-IR	=	spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
HOAt	=	1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	=	1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HPLC	=	cromatografia liquida ad alte prestazioni
IR	=	infrarosso
MeOH	=	metanolo
NMR	=	risonanza magnetica nucleare
OMe	=	metossi
ROESY	=	spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
R _f	=	fattore di ritenzione

TDM	=	N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano
TEA	=	triethylammina
TFA	=	acido trifluoroacetico
TLC	=	cromatografia su strato sottile
TMS	=	tetrametilsilano
TOCSY	=	spettroscopia di correlazione scalare
UV-Vis	=	ultravioletto-visibile
Z	=	benzilossicarbonile o carbobenzossi

N.B.: La configurazione degli amminoacidi presenti in questo lavoro di Tesi è sempre L, qualora non venga altrimenti specificata.

1. INTRODUZIONE

Fin dagli anni '80 è noto l'impiego di derivati di chetoni arilici foto-attivabili come reattivi per la funzionalizzazione di legami C-H in siti specifici. Queste applicazioni hanno consentito sia il riconoscimento di specifici siti di legame in interazioni di tipo *ligand-binding*, sia il *photolabeling*, ovvero la marcatura con un composto fotosensibile, di proteine e carboidrati.¹ In questo modo è quindi possibile avere una mappatura delle regioni idrofobiche di proteine trans-membrana e, marcando opportuni siti proteici, studiarne il meccanismo di reazione tramite fluorescenza.

A partire dai primi anni '90 si è sempre più diffuso, in ambito biochimico, l'impiego di derivati di chetoni arilici foto-attivabili come *probe* per l'individuazione di specifici siti di reazione o per monitorare le modifiche conformazionali di alcune proteine durante la loro attività catalitica.^{1,2}

I vantaggi, dal punto di vista chimico, derivanti dall'impiego di benzofenone (BP) e dei suoi derivati sono essenzialmente tre:

- i BP sono composti chimicamente più stabili di altri composti con proprietà fotochimiche analoghe come diazo-esteri e aril-azidi o diazirine;
- si possono maneggiare anche alla luce e vengono attivati a lunghezze d'onda di 350-360 nm, lontane da frequenze dannose per le sequenze proteiche;
- reagiscono di preferenza con legami C-H non reattivi, quindi difficili da studiare, e sono reattivi anche in presenza di acqua e nucleofili relativamente ingombrati;

Molto impiegato è in particolare un analogo fotolabile dell' α -amminoacido fenilalanina: la *p*-benzoil-L-fenilalanina (Bpa, figura 1.1).²⁻⁵ Il Bpa consente una buona efficienza di *labeling* e i vantaggi che offre superano gli inconvenienti dovuti ad un maggior ingombro sterico e ad una maggiore idrofobicità rispetto ad altri composti con caratteristiche analoghe.

In questo lavoro di Tesi verranno utilizzate le proprietà alchilanti (fotoindotte) del Bpa per formare nuovi legami carbonio-carbonio tra catene laterali di peptidi elicoidali. In particolare, sarà messa in relazione la posizione reciproca di un residuo di Bpa ed uno di Met, inseriti nella medesima catena peptidica, con la possibilità o meno di formare un legame covalente tra le due catene laterali.⁵

Poiché Bpa e Met sono ospiti di oligopeptidi basati sull'acido α -aminoisobutirrico (Aib, figura 1.1), un forte induttore di strutture elicoidali, nelle pagine seguenti si forniranno alcune nozioni sulla stereochimica peptidica e le caratteristiche strutturali indotte dall'Aib, prima di introdurre il sistema benzofenonico.

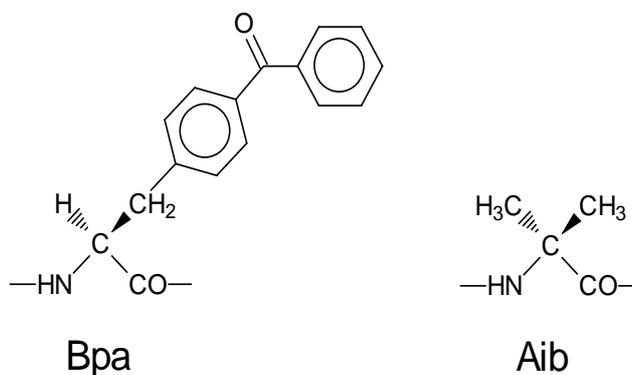


Figura 1.1 Strutture molecolari di Bpa e Aib.

1.1 Elementi di stereochimica dei peptidi

Per comprendere meglio la reattività specifica di una sequenza peptidica, e quindi per avere informazioni più precise e dettagliate sui meccanismi di riconoscimento molecolare alla base dei processi che coinvolgono le funzioni biologiche, è importante conoscere non solo la sequenza amminoacidica (struttura primaria), ma anche e soprattutto la disposizione tridimensionale del peptide in oggetto.

Il primo grado di ordinamento spaziale è detto struttura secondaria. Essa dipende dalla natura dei singoli residui (dalla loro maggiore o minore idrofobicità, dalla lunghezza della catena laterale, ecc) e dai legami idrogeno che si instaurano tra i gruppi carbonilico C=O e amminico N-H dei diversi residui.

Gli angoli torsionali tipici di una struttura sono indicati con ϕ (angolo diedro C $^{\alpha}$ -NH), ψ (angolo diedro C $^{\alpha}$ -CO) e ω (angolo del legame ammidico CO-NH).⁶ In figura 1.2 è riportato un esempio di struttura estesa, con tutti e tre gli angoli diedri di 180°.

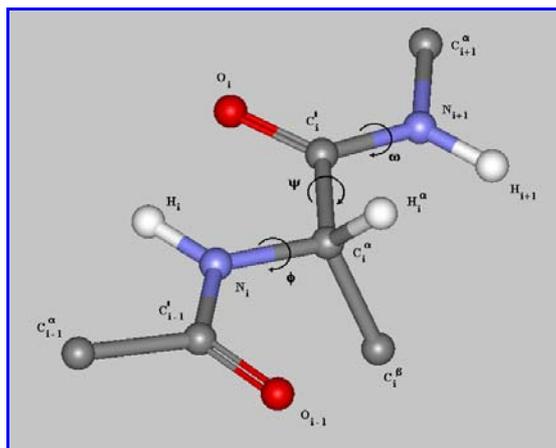


Figura 1.2: rappresentazione schematica di un legame peptidico (due unità peptidiche). Il residuo centrale è delimitato da linee tratteggiate; sono inoltre indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e per gli angoli torsionali.⁶ La catena peptidica è rappresentata nella conformazione estesa ($\Phi_i = \Psi_i = \omega_i = 180^\circ$) e il residuo centrale (i) è in configurazione L.

Il ripiegamento del peptide crea strutture secondarie ordinate di vario tipo. Le più note strutture secondarie sono quelle di tipo elicoidale (α -elica ed elica- 3_{10}), i ripiegamenti- β (β -turn) e strutture dette di β -sheet. I peptidi sintetizzati in questa tesi non formano strutture a β -sheet, che non saranno perciò trattate.

I ripiegamenti β^{7-9} (figura 1.3) sono stati classificati da Venkatachalam⁷ nei tipi I, II, III (ripiegamenti destrogiri) e nei corrispondenti enantiomeri I', II', III', a seconda dei valori degli angoli torsionali assunti dai residui $i+1$ e $i+2$ compresi entro il legame a idrogeno (tabella 1.1). La successione di ripiegamenti- β di tipo III o III' genera eliche- 3_{10} destrogire o sinistrogire, rispettivamente.

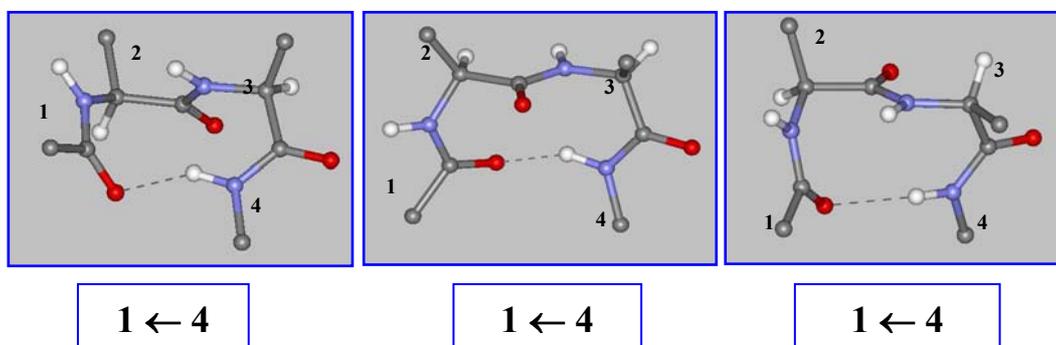


Figura 1.3 Rappresentazione dei tre ripiegamenti- β ideali (I, II, III) aventi il legame peptidico centrale *trans*.

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

Tabella 1.1 Valori degli angoli ϕ e ψ per i residui $i+1$ e $i+2$ nei ripiegamenti- β di tipo I, II e III.

Le strutture elicoidali sono le più comuni strutture secondarie. Si differenziano per il numero di amminoacidi per giro d'elica, per il passo dell'elica, per il numero di atomi del *backbone* coinvolti nel ciclo definito da un legame idrogeno C=O - - - N-H, per l'ampiezza degli angoli torsionali ϕ e ψ . Il legame ammidico, dato il suo carattere di parziale doppio legame, impone la pressoché totale coplanarità dei legami CO e NH, definendo pertanto un angolo ω di 0° o di 180° per tutti i residui. Le eliche peptidiche più note sono l' α -elica e l'elica-3₁₀ (figura 1.4).

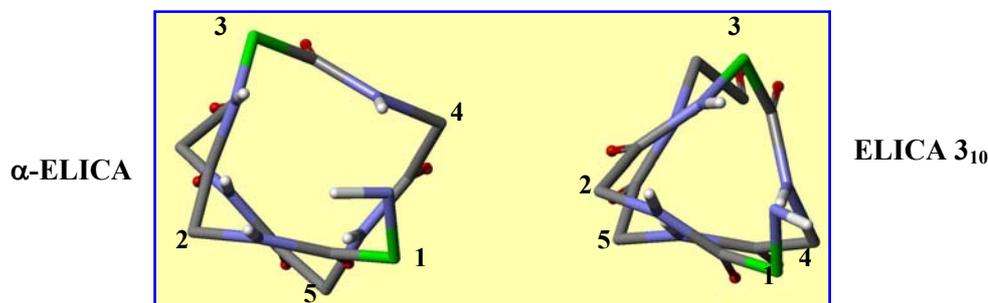


Figura 1.4 Confronto tra elica-3₁₀ ed α -elica, osservate in proiezione lungo l'asse dell'elica.

L' α -elica è caratterizzata da 3.6 residui per giro. I legami idrogeno, responsabili della stabilizzazione della struttura elicoidale, vedono coinvolti il gruppo C=O del residuo i -esimo con il gruppo N-H del residuo $i+4$ (figura 1.5). Gli atomi appartenenti al *backbone* compresi nel ciclo definito da questo legame H sono 13. L'elica-3₁₀ è invece costituita da 3 residui per giro. I legami H intramolecolari che si vengono a formare coinvolgono il gruppo C=O del residuo i -esimo e il gruppo N-H del residuo $i+3$ (figura 1.5).

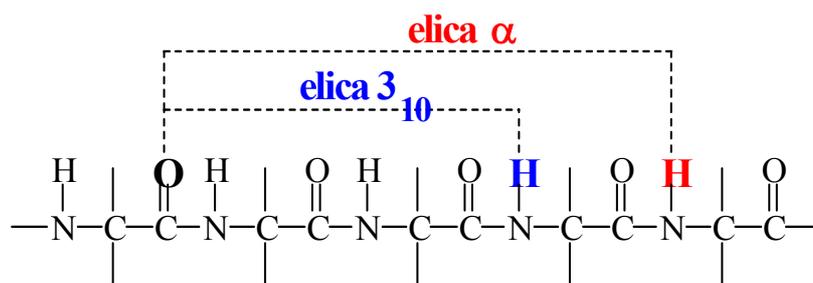


Figura 1.5 Rappresentazione schematica dei legami H intramolecolari di α -elica ed elica-3₁₀.

Rispetto all' α -elica, l'elica-3₁₀ risulta pertanto essere piú stretta (presenta una cavità interna piú piccola) e allungata. In tabella 1.2 vengono riassunti e confrontati i dati caratteristici delle due eliche.¹⁰ Essi sono stati ottenuti da un'analisi statistica di strutture molecolari allo stato cristallino, ottenute per diffrazione dei raggi X.

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

Tabella 1.2 Confronto dei parametri costitutivi di α -elica ed elica-3₁₀.¹⁰

1.2 Conformazione preferenziale dei peptidi contenenti Aib

L'Aib è il piú semplice α -amminoacido C ^{α} -tetrasostituito. Esso è presente in numerosi peptidi naturali, tra cui gli antibiotici *peptaibolici* (antibiotici *peptidici*, ricchi in *Aib*).¹¹ Una caratteristica biologicamente rilevante è la poca suscettibilità all'attacco proteolitico dei legami peptidici coinvolgenti un residuo di Aib.¹²

Pertanto, l'impiego dell'Aib consente di ottenere analoghi di peptidi biologicamente attivi piú resistenti alla degradazione enzimatica.

Calcoli di energia conformazionale hanno dimostrato come la presenza di due gruppi metilici sul C $^{\alpha}$ restringa di fatto le possibili disposizioni spaziali che l'Aib può assumere, limitandole alle conformazioni elicoidali di tipo α e 3 $_{10}$.¹³⁻¹⁶ Questo effetto di “induzione” di struttura secondaria si manifesta sia sugli omopeptidi dell'Aib che su peptidi contenenti anche amminoacidi proteici (C $^{\alpha}$ -trisostituiti).¹⁷⁻²¹ La preferenza conformazionale per la forma α -elica o per quella ad elica-3 $_{10}$ sembra dipendere da diversi fattori quali la lunghezza della catena, la sequenza amminoacidica e il contenuto di residui di Aib. Si è osservato, a partire da studi sulle strutture ai raggi X riportate in letteratura, che la struttura ad α -elica risulta favorita, rispetto a quella ad elica-3 $_{10}$, al crescere della lunghezza della catena e al diminuire del numero di Aib.¹⁹ Nel caso di sequenze di lunghezza relativamente piccola (fino ai 6 residui, come è anche il caso di questo lavoro di Tesi), la preferenza per l'elica-3 $_{10}$ risulta essere nettamente marcata.

1.3 Utilità degli α -amminoacidi C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti

Il ricorso ad α -amminoacidi C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti (di cui l'Aib è il capostipite) nella sintesi peptidica è dettato proprio dal loro essere rigidamente costretti nello spazio, che comporta, di conseguenza, notevoli limitazioni conformazionali alle catene peptidiche di cui sono costituenti. Tale caratteristica ha notevoli ricadute e applicazioni in ambito biochimico e bio-organico. Ad esempio, numerosi residui di Aib compaiono nelle sequenze degli antibiotici peptaibolici,¹¹ noti per la capacità di alterare la permeabilità delle membrane cellulari. Tale proprietà di permeazione è in gran parte dovuta proprio alla capacità dell'Aib di promuovere strutture elicoidali anche in peptidi relativamente corti. Inoltre, sempre la spiccata rigidità strutturale di tali antibiotici ha consentito la crescita di cristalli singoli, adatti allo studio mediante diffrazione dei raggi X. Questi dati hanno facilitato lo studio della correlazione tra struttura tridimensionale e attività biologica.

Oltre che per applicazioni di tipo biologico, la rigidità conformazionale rende i peptidi contenenti α -amminoacidi C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti ottimi candidati per utilizzi di tipo spettroscopico e bio-organico. Essi sono stati infatti utilizzati per costruire spaziatori (ad es. per studi di trasferimento elettronico o di interazione tra cromofori) o per realizzare *templati* in grado di localizzare con precisione nello spazio più gruppi interagenti.²² E' soprattutto in questo ambito che si colloca il lavoro di Tesi qui riportato. Infatti, come si vedrà più avanti, peptidi

basati sull'Aib vengono utilizzati per posizionare nello spazio in modo diverso il gruppo benzofenonico e la catena laterale della Met, partner ideale per la formazione di un legame C-C con il benzofenone fotoeccitato.⁵

1.4 Fotoeccitazione del Bpa e macrociclizzazione di peptidi

L'irraggiamento della sonda benzofenonica con una radiazione di $\lambda = 350$ nm e il conseguente assorbimento di un fotone da parte del gruppo C=O, provoca la promozione di un elettrone da un orbitale n di non-legame dell'O ad un orbitale di antilegame π^* del carbonile (figura 1.6).²³

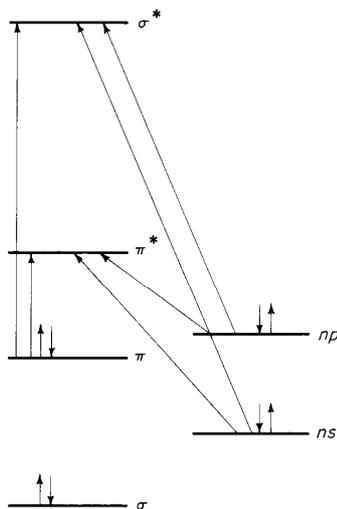
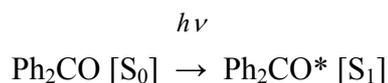
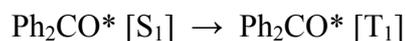


Figura 1.6 Diagramma energetico degli orbitali molecolari del gruppo carbonilico.²³

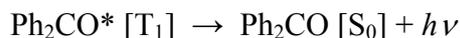
L'irraggiamento provoca il passaggio dallo stato originario di singoletto (S_0) allo stato di singoletto eccitato (S_1):



Si ottiene così un sistema di radicali, in stato di singoletto, che evolve via *inter system crossing* ad uno stato eccitato di tripletto (a minore energia):



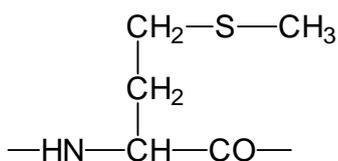
Lo stato di tripletto rilassa quindi allo stato fondamentale con emissione di fosforescenza:



Tuttavia, in presenza di gruppi CH/CH₂/CH₃ entro un volume definito da una sfera di circa 3.1 Å di raggio, centrata sull'atomo di O, un altro processo risulta competere con il rilassamento *via* emissione di fluorescenza. L'atomo di O, divenuto elettrofilo in seguito alla promozione di un elettrone $n \rightarrow \pi^*$, rimuove un atomo di H coinvolto in un legame di tipo σ . Questo processo, definito di *photoquenching* perché “spegne” l'emissione del BP, si osserva, come è prevedibile, solo con CH geometricamente accessibili e che si trovino alla giusta distanza per un tempo sufficiente. Pertanto, sono di gran lunga favorite le reazioni intramolecolari che portano alla formazione di cicli.

In questo Laboratorio è stato recentemente sintetizzato e caratterizzato il peptide di sequenza Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe.⁵

La scelta di posizionare un residuo di Met nelle vicinanze del Bpa è stata dettata dal fatto che la Met (fig. 1.7) è un buon donatore di protoni, data la relativa acidità dei gruppi CH₃ e CH₂ adiacenti all'atomo di zolfo della catena laterale. Pertanto, la Met è un ottimo substrato per formare un legame covalente con un BP fotoeccitato. Essendo inoltre spesso presente in prossimità di siti attivi di proteine, la Met può essere sfruttata per studiare interazioni molecolari o meccanismi di reazioni enzimatiche.



Met

Figura 1.7 Struttura molecolare dell' α -amminoacido Met.

In seguito a fotoeccitazione del Bpa, la rimozione di un idrogeno dalle posizioni γ -CH₂ o ϵ -CH₃ della Met risulta essere competitiva con il rilassamento per emissione dello stato eccitato di tripletto. In particolare, fotoeccitando un BP in presenza di Met si possono formare i radicali indicati in figura 1.8.

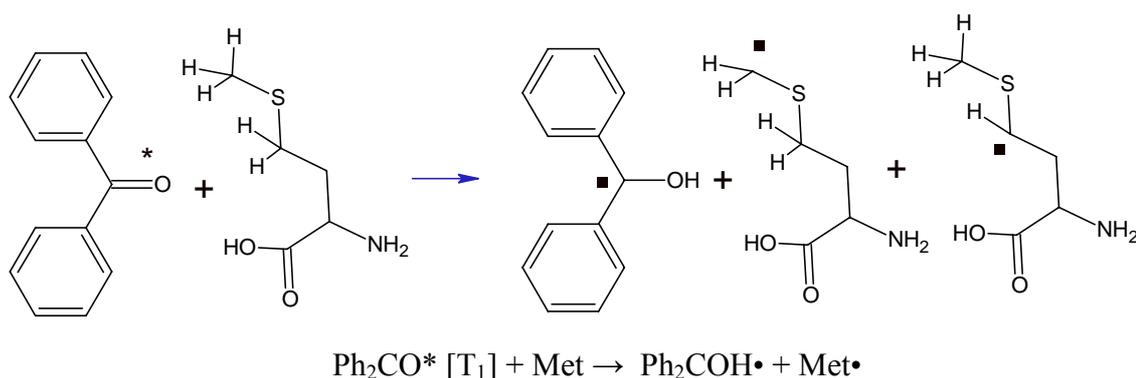


Figura 1.8 Radicali che si formano in seguito a fotoeccitazione di un benzofenone in presenza di Met.

Due specie radicaliche si possono quindi accoppiare per formare un nuovo legame C-C. La funzione carbonilica C=O lascia il posto a quella alcolica C-OH. Si possono tuttavia ottenere due regioisomeri (fig. 1.9), a seconda che venga rimosso un protone dal gruppo metilico ϵ -CH₃ o dal gruppo metilenico γ -CH₂ della Met.

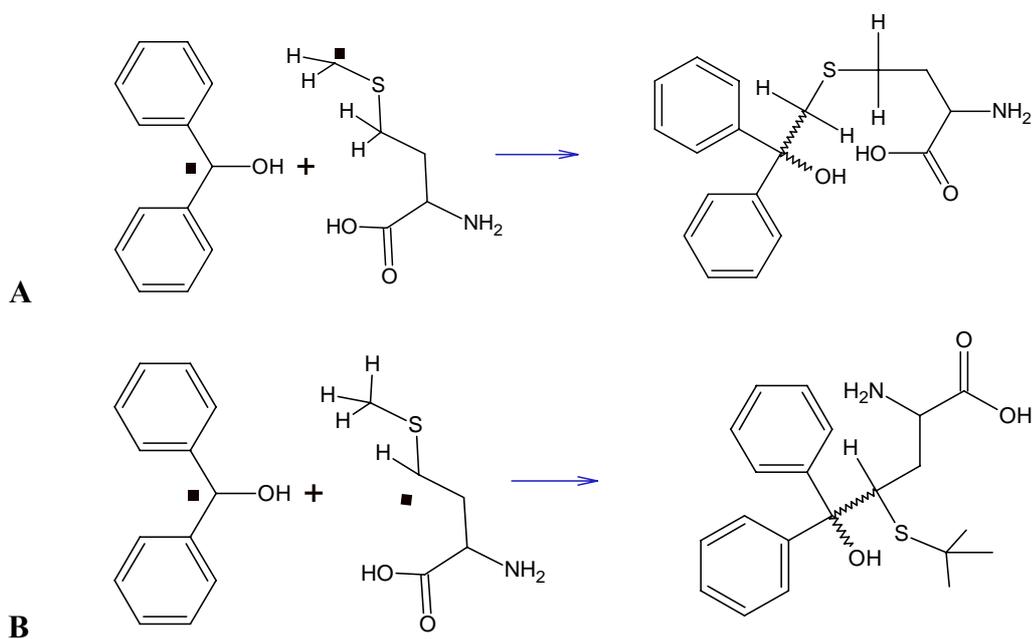


Figura 1.9 Regioisomeri ottenibili per fotoeccitazione di benzofenone in presenza di Met. **A)** Rimozione di un protone dal gruppo metilico ϵ -CH₃; **B)** Rimozione di un protone dal metilene γ -CH₂.

In entrambi i regioisomeri si avrà un nuovo C tetraedrico: il C carbonilico del BP che passa da sp^2 ad sp^3 . Nel caso del Bpa i due anelli aromatici benzofenonici non sono equivalenti.

Pertanto, in seguito all'accoppiamento di due radicali, il nuovo C tetraedrico (l'ex C carbonilico) diviene un centro stereogenico, dando così origine anche a più stereoisomeri: due, se il protone viene rimosso dall' ϵ -CH₃ della Met (fig. 1.9A); quattro, se il protone viene rimosso dal γ -CH₂ (fig. 1.9B), dal momento che anche il γ -CH₂ diventa un centro stereogenico. La situazione è pertanto piuttosto complessa, potendosi originare ben sei diversi isomeri. Nello studio dell'esapeptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe,⁵ sopra citato, la posizione di Bpa e Met (2 e 5 all'interno della catena) è stata scelta tenendo conto del ripiegamento elicoidale di tipo 3₁₀ assunto da una sequenza ricca in Aib. In presenza di tale struttura tridimensionale, le catene laterali di Bpa e Met si vengono a trovare l'una sopra l'altra, dopo un giro d'elica (fig. 1.10).

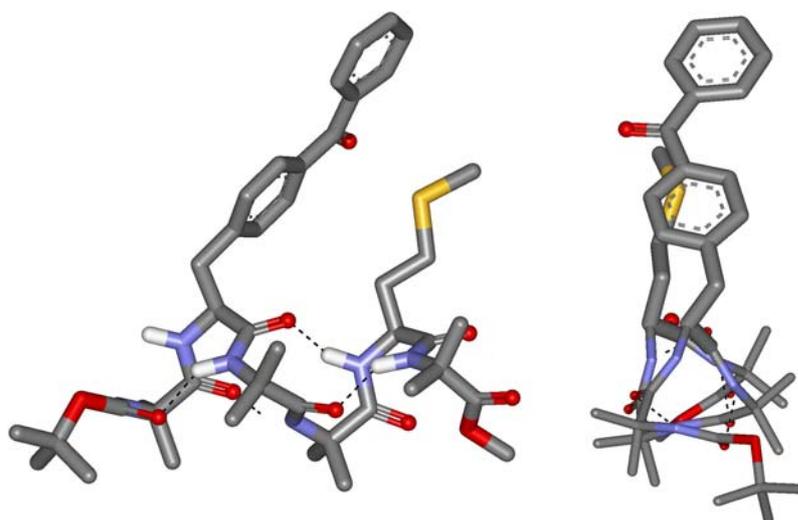


Figura 1.10 Modello molecolare dell'esapeptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe in elica-3₁₀. A sinistra, visione di lato; a destra, visione lungo l'asse dell'elica.

Le possibili reazioni di foto-ciclicizzazione intramolecolare di questo peptide sono illustrate graficamente in figura 1.11.

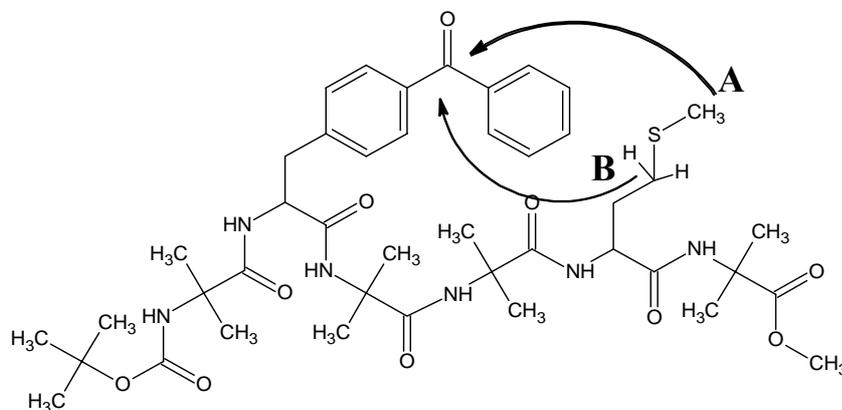


Figura 1.11 Possibili vie di ciclicizzazione: **A**, rimozione di H dall' ϵ -CH₃; **B** rimozione di H dal γ -CH₂.

La figura 1.12 riporta le strutture molecolari dei due stereoisomeri che si ottengono per accoppiamento del radicale benzofenonico con il radicale generato sull' ϵ -CH₃ della Met, mentre in figura 1.13 si può osservare la struttura del regioisomero (quattro stereoisomeri) che si ottiene per accoppiamento con il γ -CH₂ della Met.

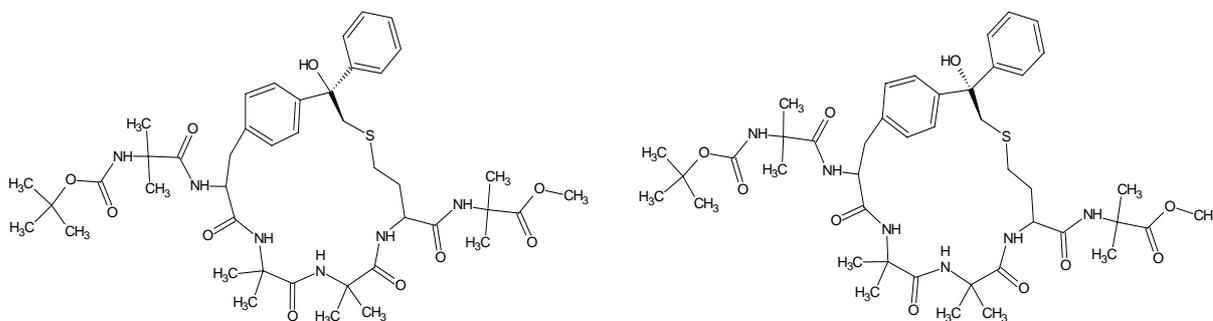


Figura 1.12 Struttura molecolare dei due diastereoisomeri che si generano per rimozione di un H dal gruppo ϵ -CH₃ della Met.

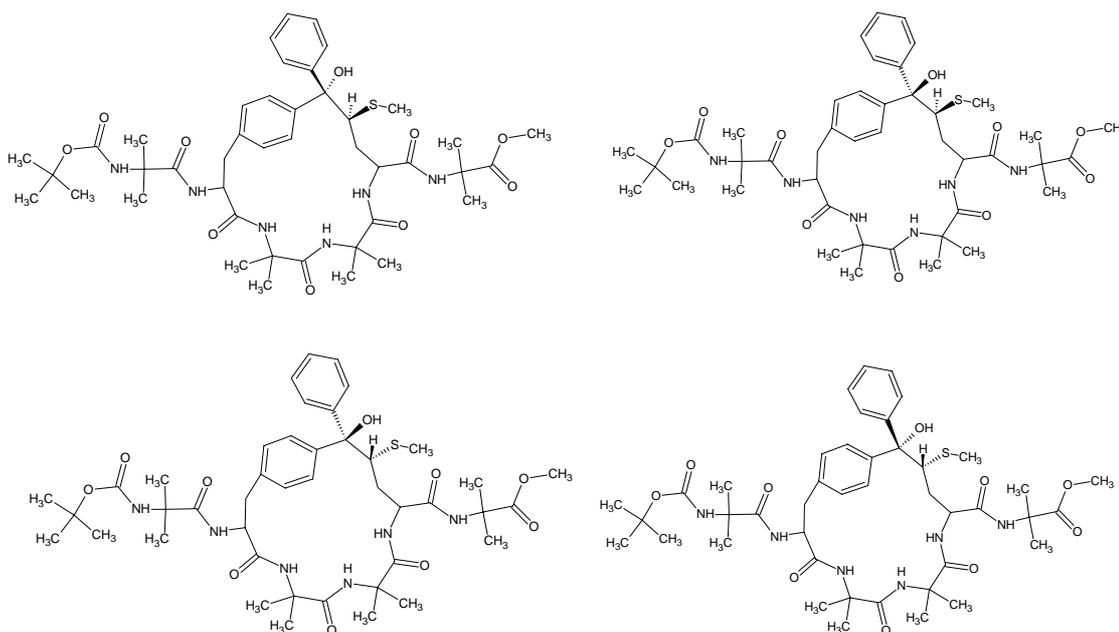


Figura 1.13 Struttura molecolare dei 4 possibili diastereoisomeri che si generano per rimozione di un H dal γ -CH₂ della Met.

La reazione di foto-ciclizzazione dell'esapeptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe è stata condotta in CH₃CN de-ossigenato in condizioni di elevata diluizione (1×10^{-5} M), per evitare il rischio di ciclizzazioni intermolecolari.

Il risultato di questo esperimento è illustrato nei profili HPLC riportati in figura 1.14.⁵

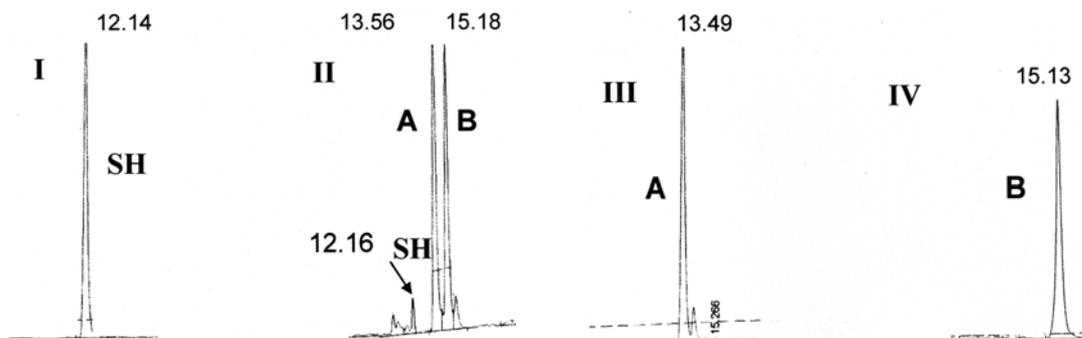


Figura 1.14 Profili HPLC di: **I**, Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe (SH); **II**, miscela di reazione (40 minuti in fotoreattore) con due prodotti principali (A e B) ed SH non ancora reagito; **III** e **IV**, A e B purificati.

I due prodotti ottenuti dalla reazione di fotociclizzazione, isolati e purificati mediante HPLC, sono stati studiati mediante NMR nella regione dei γ -CH₂ ed ϵ -CH₃ della Met e confrontati con l'esapeptide di partenza (fig. 1.15).

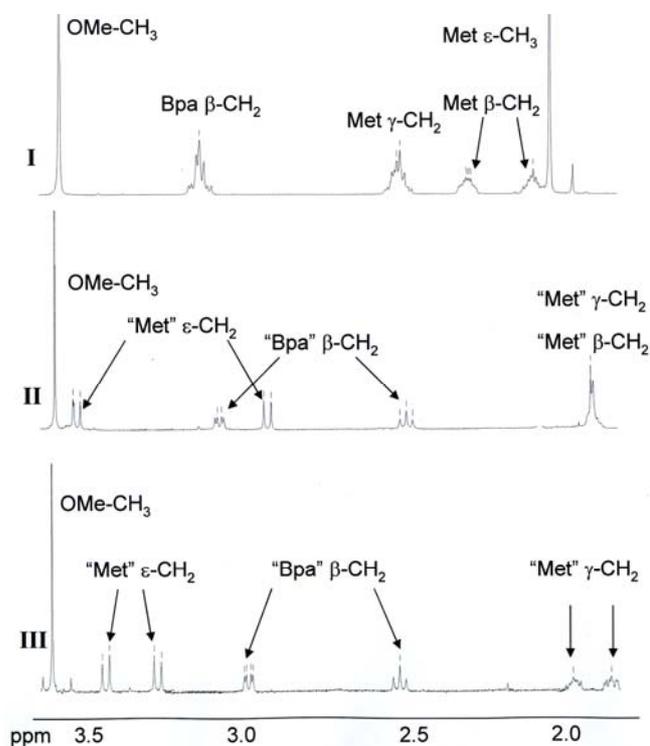


Figura 1.15 Spettri NMR nella regione dei γ -CH₂ ed ϵ -CH₃ della Met per il composto di partenza (**I**), e i due prodotti A (**II**) e B (**III**).

Negli spettri dei due prodotti **A** e **B** è scomparso il segnale relativo al gruppo ϵ -CH₃, che è stato quindi coinvolto nella fotociclizzazione (fig. 1.16).

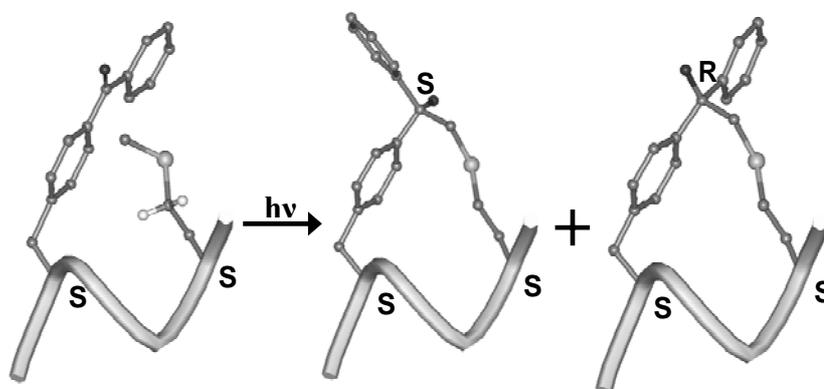


Figura 1.16 Prodotti di reazione della fotociclizzazione di Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe

La risoluzione della struttura allo stato cristallino (figura 1.17) di uno dei due diastereoisomeri (con il nuovo stereocentro in configurazione R), tramite diffrazione dei raggi X, ha confermato l'ipotesi avanzata con lo studio NMR.

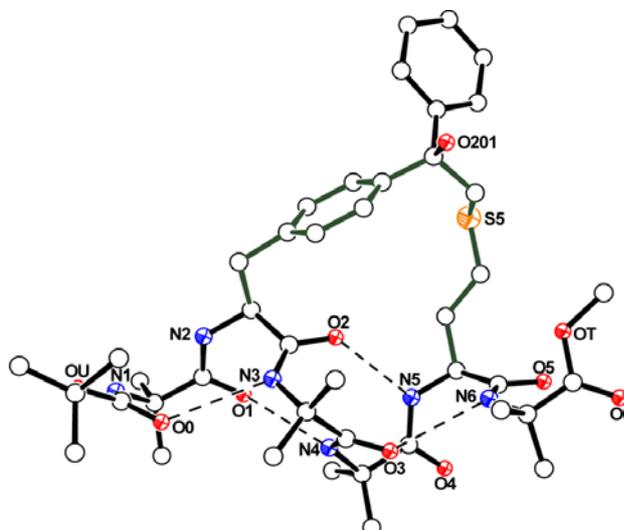


Figura 1.17 Struttura allo stato cristallino di uno dei due diastereoisomeri ottenuti dalla fotociclizzazione di Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe.⁵

In conclusione, gli studi fin qui condotti (sul peptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe)⁵ hanno evidenziato un'ottima regioselettività (ϵ -CH₃ di Met), ma nessuna stereoselettività del processo di fotociclizzazione (i due prodotti si isolano in percentuali uguali).

1.5 Scopo della Tesi

Per meglio identificare i parametri che regolano regio- e stereoselettività, nelle reazioni di fotociclizzazione di peptidi elicoidali contenenti Bpa e Met, in questa Tesi ci si è proposti di studiare in particolare gli effetti:

1. della distanza reciproca Bpa-Met nella sequenza peptidica;
2. dell'orientazione (dall'N- al C-terminale o viceversa) di Bpa e Met nel peptide.

Le sequenze scelte da sintetizzare e studiare sono state le seguenti:

- (1) Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$)
- (2) Boc-Aib-**Bpa**-Aib-**Met**-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$)
- (3) Boc-Aib-**Bpa**-**Met**-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$)

I risultati degli esperimenti si dovranno confrontare con quanto già osservato⁵ per:

- (4) Boc-Aib-**Bpa**-Aib-Aib-**Met**-Aib-OMe ($i \rightarrow i+3$)

Il peptide (1) è analogo al (4), ma le posizioni di Bpa e Met sono invertite. I peptidi (2) e (3) vedono invece variare la distanza e l'orientazione reciproca in catena di Bpa e Met.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Materiali e metodi

2.1.1 Reagenti e solventi

<i>Acros</i> (Geel, Belgio):	acido α -amminoisobutirrico, acido trifluoroacetico, cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato, N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimide cloridrato, trimetilsililcloruro.
<i>Aldrich</i> (Milwaukee, USA):	diisopropil-etil-ammina.
<i>Applied Biosystems</i> (Warrington, GB):	acido trifluoroacetico.
<i>Carlo Erba</i> (Rodano, Milano):	acetato di etile, acetone, acido acetico, acido cloridrico 37%, acido solforico 98%, bicarbonato di sodio, bisolfato di potassio, 1-butanolo, cloroformio, cloruro di metilene, etanolo, etere dietilico, etere di petrolio (30-50° C), diclorometano, ipoclorito di sodio, isopropanolo, metanolo, solfato di sodio anidro, toluene, trietilammina.
<i>Fluka</i> (Buchs, Svizzera):	acetonitrile, catalizzatore 10% Pd/C, dietilammina, N,N-diisopropilettilammina, ninidrina, TDM.
<i>Merck</i> (Darmstadt, Germania):	gel di silice per cromatografia "flash".
<i>Prolabo</i> (Parigi, Francia):	cloruro di sodio.
<i>GL Biochem</i> (Shanghai):	1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, 1-idrossi-1H benzotriazolo.

2.1.2 Strumentazione e metodi

Cromatografia su strato sottile

Le reazioni sono state seguite mediante cromatografia su strato sottile utilizzando gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck). I fattori di ritenzione sono stati determinati utilizzando tre diverse miscele di solventi come eluenti:

$$Rf_1 = \text{CHCl}_3/\text{EtOH } 9:1$$

$$Rf_2 = \text{1-butanolo}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O } 3:1:1$$

$$Rf_3 = \text{toluene}/\text{EtOH } 7:1$$

Per la rivelazione dei prodotti su lastrina cromatografica si sono utilizzate varie procedure:

- (i) una lampada UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) per l'individuazione dei gruppi aromatici (Z, Fmoc, Bpa),
- (ii) l'esposizione ai vapori di iodio e (iii) il trattamento con ipoclorito e TDM per evidenziare i legami ammidici.²⁴

Determinazione dei punti di fusione

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Stuart SMP 10 per una prima determinazione approssimativa del punto di fusione e successivamente con un apparecchio Leitz modello Laborlux 12 munito di tavolino riscaldante.

Cromatografia flash

La "cromatografia flash"²⁵ è stata effettuata usando come fase stazionaria il gel di silice 60 Merck (granulometria 40-63 μm). Nelle varie purificazioni è stato utilizzato di volta in volta uno dei tre seguenti sistemi per caricare in testa alla colonna il composto grezzo da purificare:

- 1) solubilizzazione nella minima quantità dell'eluente prescelto per la separazione;
- 2) solubilizzazione in una piccola quantità di un solvente diverso dalla miscela di eluizione (generalmente il solvente meno polare di quelli costituenti la miscela di eluizione);
- 3) caricamento di una piccola quantità di gel di silice su cui era stato fatto adsorbire il prodotto da purificare.

HPLC

Le analisi HPLC sono state effettuate impiegando uno strumento Pharmacia LKB-LCC, con rivelazione UV a 220 nm. Sono state utilizzate colonne analitiche (250 × 4.6 mm) a fase inversa C₁₈ KROMASIL. Come eluente si è fatto uso di una miscela dei seguenti solventi:

A: H₂O/CH₃CN (9:1) + TFA 0.05%

B: CH₃CN/H₂O (9:1) + TFA 0.05%.

Spettrometria di massa

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

Spettroscopia di assorbimento IR

Gli spettri di assorbimento IR allo stato solido, in pastiglia di KBr, e quelli in cloroformio deuterato (99.8% *d*; Fluka) sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR modello 1720X operante in trasformata di Fourier e celle di cammino ottico di 0.1, 1.0 e 10.0 mm con finestre in CaF₂. Per ogni spettro sono state eseguite 50 scansioni alla risoluzione nominale di 4 cm⁻¹ e con acquisizione digitalizzata del segnale a intervalli di 1 cm⁻¹, utilizzando un "sample shuttle" che consente l'acquisizione alternata del campione e del fondo strumentale. Gli spettri del solvente sono stati ottenuti nelle stesse condizioni ed utilizzando le stesse celle impiegate per i campioni. Allo scopo di minimizzare i contributi del vapore d'acqua atmosferico, il banco ottico ed il vano campioni dello strumento sono stati mantenuti sotto un flusso costante di azoto.

Le posizioni dei massimi di assorbimento, di spalle e di bande parzialmente sovrapposte sono state determinate con l'ausilio della derivata seconda. Le elaborazioni spettrali (sottrazione del solvente e derivatizzazione) sono state effettuate con il programma SpectraCalc della Galactic (Salem, USA).

Spettroscopia NMR

Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati con gli spettrometri Bruker modelli AC 200, AC 250, Advance DRX 400 e DMX 600 MHz. Come solventi sono stati usati il cloroformio deuterato (99.96% d_3 ; Euriso-Top) e il dimetilsolfossido (99.96 d_6 , Euriso-Top). Gli spostamenti chimici sono espressi in parti per milione (δ) rispetto al segnale del tetrametilsilano. Le costanti di accoppiamento sono misurate in Hertz. Le molteplicità dei picchi sono espresse come s (singoletto), d (doppio), t (tripletto), dd (doppio di doppietti), m (multipletto), mentre b (“broad”) indica un segnale allargato.

2.2 Sintesi e caratterizzazione

2.2.1 Sintesi di derivati protetti di amminoacidi

Fmoc-Aib-OH²⁶

Si sospendono in 150 ml di CH₂Cl₂ anidro 9.52 g (0.092 mol) di H-Aib-OH. Si lascia sotto flusso di N₂ per alcuni minuti e quindi si aggiunge TMSCl (4.95 g, pari a 0.039 mol). Si porta a riflusso sotto agitazione. Si lascia a riflusso per circa 8 ore. La soluzione si presenta lattiginosa. Si stacca il riflusso e si aggiungono 23.86 g di DIEA (0.18 mol, pari a 32.15 mL). Si osserva la formazione di fumo bianco (vapori di HCl) e si mantiene la miscela sotto agitazione allontanando i vapori con un flusso di N₂. Si aggiungono quindi 23.87 g (pari a 0.092 mol) di FmocCl. Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 24 ore.

Si tira a secco il solvente a pressione ridotta e si aggiunge al residuo una soluzione acquosa di NaHCO₃ al 10%. Si effettuano quindi 3 estrazioni da 50 ml ciascuna con Et₂O. La fase acquosa viene acidificata, lentamente e sotto continua agitazione, con l'aggiunta di KHSO₄ solido fino a circa pH 2. Si estrae con AcOEt (4 x 100 ml), si riuniscono le fasi organiche, si anidrificano su Na₂SO₄ e si filtrano. Si rimuove il solvente a pressione ridotta.

Resa: 79 %.

Punto di fusione: 178-180 (da AcOEt/etere di petrolio) °C.

Rf₁: 0.30 ; **Rf₂:** 0.96; **Rf₃:** 0.21;

IR (KBr): 3299, 1690, 1541 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.76 (d, 2H, Fmoc CH ar.), 7.59 (d, 2H, Fmoc CH ar.), 7.44-7.28 (m, 4H, Fmoc CH ar.), 5.33 (s, 1H, Aib NH), 4.44 (d, 2H, Fmoc CH₂), 4.22 (t, 1H, Fmoc CH), 1.56 (s, 6, Aib 2CH₃).

HCl·H-L-Met-OMe²⁷

Si trasferiscono su pallone da 500 ml 10 g di H-L-Met-OH (pari a 0.067 mol) e si aggiungono circa 200 ml di MeOH. Mantenendo sotto agitazione il pallone immerso in un bagno acqua/ghiaccio si aggiungono lentamente 9.72 ml di SOCl₂. Si lascia tornare la miscela a temperatura ambiente e quindi la si porta a riflusso per circa 6 ore. Si rimuove il solvente a pressione ridotta e si riprende con etere etilico. Si filtra il solido isolato su gooch.

Resa: 98 %

Punto di fusione: 143-145 °C (MeOH/etere etilico).

Rf₁: 0.56; **Rf₂:** 0.50; **Rf₃:** 0.21;

IR (KBr): 3425, 2936. 1745. 1598. 1571 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.72 (m, 3H, NH₃⁺), 4.21 (t, 1H, αCH), 3.70 (s, 3H, OMe), 2.63 (m, 2H, γCH₂), 1.99-1.93 (m, 5H, βCH₂ e SCH₃).

2.2.2 Sintesi del peptide Boc-Aib-L-Met-Aib-Aib-L-Bpa-Aib-OMe (*i* → *i*+3)

Fmoc-L-Bpa-Aib-OMe

Si prepara una soluzione di estere attivo di Fmoc-L-Bpa-OH (0.60 g, 1.22 mmol) con HOBt (0,165 g, 1,22 mmol) e EDC (0,234 g, 1,22 mmol) in CH₂Cl₂ (15 ml circa). A questa si aggiunge una soluzione di HCl·H-Aib-OMe (0,373 g, 2,44 mmol) in diclorometano e DIEA (0,6375 ml, 3.66 mmol). Si lascia in agitazione fino al giorno seguente. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende con AcOEt. Si lava la fase organica con KHSO₄ al 10% (50 ml × 3 lavaggi), H₂O distillata (50 ml), NaHCO₃ al 5% (50 ml × 3 lavaggi) ed una soluzione acquosa satura di NaCl (50 ml). Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄, si filtra su carta la soluzione e si tira a secco a pressione ridotta.

Si scioglie quindi nella minima quantità di AcOEt e si aggiunge etere di petrolio fino a intorbidimento della soluzione. La si lascia in frigo per una notte e si raccoglie il precipitato filtrandolo su gooch. Si raccoglie il solido e lo si pone in essiccatore. Si isola quindi una massa di 0.577 g

Resa: 80.0 %.

Punto di fusione: 109-110 °C.

Rf₁: 0.95; **Rf₂:** 0.98; **Rf₃:** 0.61;

IR (KBr): 3406, 3341, 1738, 1690, 1657 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.78-7.30 (m, 17H, 8H Fmoc CH ar., 9H Bpa CH ar), 6.29 (s, 1H, Aib NH), 5.35 (d, 1H, Bpa NH), 4.44 (m, 3H, Bpa αCH, 2H Fmoc CH₂), 4.20 (t, 1H, Fmoc CH), 3.71 (s, 3H OMe), 3.16 (m, 2H, Bpa βCH₂), 1.47 (s+s, 6H Aib 2CH₃).

Boc-Aib-L-Bpa-Aib-OMe

Si prepara una soluzione di estere attivo di Boc-Aib-OH (0.363 g, 1.78 mmol) con HOBt (0.242 g, 1.78 mmol) e EDC (0.343 g, 1.78 mmol) in CH₂Cl₂ (15 ml circa). Si lascia sotto agitazione questa miscela in un bagno di acqua e ghiaccio fino a completo dissolvimento dei reagenti. Viene quindi aggiunta ad una soluzione di H-L-Bpa-Aib-OMe (0.240 g, 0.651 mmol) ottenuti in seguito allo sblocco di Fmoc-L-Bpa-Aib-OMe in una soluzione al 20% di DEA in CH₂Cl₂ e successiva purificazione *via* “flash chromatography”) in diclorometano e DIEA (0.467 ml, 2.68 mmol). Si lascia in agitazione fino al giorno seguente, monitorando la reazione *via* TLC.

Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende con AcOEt. Si lava la fase organica con KHSO₄ al 10% (50 ml × 4 lavaggi), H₂O distillata (50 ml), NaHCO₃ al 5% (50 ml × 4 lavaggi) ed una soluzione acquosa satura di NaCl (50 ml). Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄, si filtra su carta la soluzione e si tira a secco a pressione ridotta. Si isola un olio.

Per ottenere un precipitato si decide quindi di sciogliere nella minima quantità di AcOEt e aggiungendo etere di petrolio fino a intorbidimento della soluzione. La si lascia in frigo per una notte e si raccoglie il precipitato filtrandolo su gooch. Si raccoglie il solido e lo si pone in essiccatore. Si isola una massa di 0.324 g

Resa: 90 %.

Punto di fusione: 163-165 °C.

Rf₁: 0.85; **Rf₂:** 0.97; **Rf₃:** 0.43;

IR (KBr): 3359, 3337, 1732, 1688, 1670, 1654 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.77-7.33 (m, 10H, 9H Bpa CH ar., 1H NH), 6.76 (m, 1H, Bpa NH), 5.23 (s, 1H, Aib¹ NH), 4.74 (m, 1H, Bpa αCH), 3.72 (s, 3H OMe), 3.28 (m, 2H, Bpa βCH₂), 1.51-1.44 (s+s+s+s, 12H, Aib CH₃), 1.36 (s, 9H Boc CH₃).

Boc-Aib-Aib-L-Bpa-Aib-OMe

Si prepara una soluzione di estere attivo di Boc-Aib-OH (0.209 g, 1.026 mmol) con HOBt (0.139 g, 1.026 mmol) e EDC (0.197 g, 1.026 mmol) in CH₂Cl₂ (15 ml circa). Si lascia sotto agitazione questa miscela in un bagno di acqua e ghiaccio fino a completo dissolvimento dei reagenti. Viene quindi aggiunta ad una soluzione di H-Aib-L-Bpa-Aib-OMe (ottenuto in seguito alla deprotezione di 0.284 g (0.513 mmol) di Boc-Aib-L-Bpa-Aib-OMe con TFA) in diclorometano e DIEA (0.357 ml, 2.052 mmol). Si lascia in agitazione per circa 36 ore, monitorando la reazione *via* TLC.

Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende con AcOEt. Si lava la fase organica con KHSO_4 al 10% ($50 \text{ ml} \times 3$ lavaggi), H_2O distillata (50 ml), NaHCO_3 al 5% ($50 \text{ ml} \times 3$ lavaggi) ed una soluzione acquosa satura di NaCl (50 ml). Si anidrifca la fase organica con Na_2SO_4 , la si filtra su carta e la si tira a secco a pressione ridotta. Si isola un olio. Si purifica *via* “flash chromatography” il campione impiegando come eluente una miscela AcOEt/etere di petrolio in rapporto 2:1. Si evapora il solvente e si lascia il pallone in essiccatore una notte. Si isolano 0.165 g.

Resa: 50 %.

Punto di fusione: 112-115 °C.

Rf₁: 0.75; **Rf₂:** 0.95; **Rf₃:** 0.33;

IR (KBr): 3327, 1742, 1660, 1607 cm^{-1} .

¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.78-7.32 (m, 11H, 9H Bpa CH ar., 2H NH), 6.38 (s, 1H, Aib NH), 4.92 (s, 1H, Aib NH), 4.81 (m, 1H, Bpa, αCH), 3.74 (s, 3H OMe), 3.66 e 3.03 (m, 2H, Bpa βCH_2), 1.56-1.46 (s+s+s+s, 18H, Aib CH_3), 1.38 (s, 9H Boc CH_3).

Fmoc-L-Met-Aib-Aib-L-Bpa-Aib-OMe

Si procede allo sblocco del tetrapeptide Boc-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe con una miscela di TFA al 50% in CH_2Cl_2 . Si verifica che lo sblocco sia andato a completezza monitorando la reazione *via* TLC. Si rimuove quindi il solvente a pressione ridotta e si riprende due volte con etere etilico per allontanare completamente l'acido trifluoroacetico. Si fa gorgogliare N_2 nel pallone di reazione monitorando l'acidità dei vapori con cartina al tornasole bagnata d'acqua.

Si prepara una soluzione di estere attivo sciogliendo Fmoc-L-Met-OH (0.161 g, 0.423 mmol), HOBT (0.061 g 0.423 mmol) ed EDC*HCl (0.081 g, 0.423 mmol) in circa 8 ml di CH_2Cl_2 e mantenendo la miscela in un bagno di acqua e ghiaccio.

Si aggiunge quindi la soluzione di estere attivo al peptide sbloccato e si basifica la soluzione con 0.072 ml di DIEA.

Al termine della reazione si eseguono i lavaggi con soluzione acida di H_2SO_4 al 10%, H_2O , soluzione basica di NaHCO_3 al 5% e con soluzione satura di NaCl . Si purifica quindi il prodotto *via* “flash chromatography” con eluente $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ in proporzione 98:2 e successivamente 95:5. Si evapora quindi il solvente e si raccoglie una massa di 0.110 g.

Resa: 58 %;

Punto di fusione: 108-112 °C.

Rf₁: 0.78; **Rf₂:** 0.97; **Rf₃:** 0.36;

IR (KBr): 3414, 3336, 1736, 1707, 1658 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.79-7.30 (m, 19H, 9H Bpa CH ar., 8H Fmoc ar., 2H NH), 6.83 (s, 1H, NH), 6.72 (s, 1H, NH), 6.21 (d, 1H, Met NH), 4.68-4.19 (m, 4H, 2H Fmoc CH_2 , 1H Fmoc CH^9 , 1H Met αCH), 3.70 (s, 3H OMe), 3.58 (m, 1H, Bpa βCH_2), 3.10 (m, 1H, Bpa, βCH_2), 3.01 (m, 1H, Bpa αCH), 2.60 (m, 2H Met γCH_2), 2.10 (s, 3H, S- CH_3), 1.84 (m, 2H, Met βCH_2), 1.56-1.41 (s+s+s, 18H, Aib CH_3).

Boc-Aib-L-Met-Aib-Aib-L-Bpa-Aib-OMe

Si procede alla rimozione di Fmoc in soluzione di DEA in CH_2Cl_2 al 20%. Si monitora la reazione *via* TLC, si aggiunge della soluzione fresca dopo circa due ore e quindi si interrompe la reazione. Si isola il peptide sbloccato tramite “flash chromatography” impiegando come eluente una miscela di $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ in proporzione variabile (da 99:1 a 94:6) creando quindi un gradiente di polarità. Si evapora il solvente a pressione ridotta assicurandosi di aver eliminato tutto l’etanolo.

Si fa partire la reazione di *coupling* aggiungendo al peptide sbloccato 1 eq di estere attivo ottenuto sciogliendo in poco CH_2Cl_2 Boc-Aib-OH (0.020 g, 0.1 mmol), HOBt (0.014 g, 0.1 mmol) ed EDC·HCl (0.020 g, 0.1 mmol). Si aggiungono 2 eq di base alla miscela di reazione e si segue la reazione *via* TLC. Si aggiunge quindi un ulteriore quantitativo di estere attivo (0.5 eq) preparato di fresco e si segue la reazione fino a completezza.

Si effettuano quindi i lavaggi con soluzione acida di KHSO_4 al 10% (50 ml \times 3 volte), H_2O (50 ml), soluzione basica di NaHCO_3 al 5% (50 ml \times 3 volte) e con soluzione satura di NaCl (50 ml). Si evapora il solvente a pressione ridotta e si isola un olio vetrificato alle pareti del pallone, che si pone in essiccatore. Si isola quindi una massa di solido pari a 63 mg.

Resa: 70 %;

Punto di fusione: 115-118° C.

Rf₁: 0.82; **Rf₂:** 0.98; **Rf₃:** 0.32;

IR (KBr): 3329, 1740, 1659 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.13 (s, 1H, Aib³ NH), 7.74-7.53 (m, 12H, 9H Bpa CH ar., 3H Met² NH, Bpa⁵ NH, Aib⁶ NH), 7.25 (s, 1H, Aib⁴ NH), 5.08 (s, 1H, Aib¹ NH), 4.72 (m, 1H, Bpa αCH), 4.18 (m, 1H, Met αCH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.65 e 3.06 (2m, 2H, Bpa βCH_2), 2.65 (m, 2H, Met γCH_2), 2.16 (s, 3H, SCH₃), 2.11-2.18 (m, 2H, Met βCH_2), 1.56-1.40 (m, 18H, Aib CH_3), 1.48 (s, 9H, Boc CH_3), 1.26 (s, 3H, Aib CH_3) 1.16 (s, 3H, Aib CH_3).

Massa: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc.= 855.07; $[\text{M}+\text{H}]^+$ sper.= 855.45;

2.2.3 Sintesi del peptide Boc-Aib-L-Bpa-Aib-L-Met-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$)

Z-Aib-Aib-OMe²⁸

Si prepara una soluzione di estere attivo di Z-Aib-OH (3.109 g, 0.0131 mol) con HOBt (1.771 g, 0.0131 mol) e EDC (2.512 g, 0.0131 mol) in CH₂Cl₂ (25 ml circa). Si lascia la miscela in un bagno acqua/ghiaccio fino a completo dissolvimento dei prodotti.

Si prepara una soluzione di HCl-H-Aib-OMe (4 g, 0.0262 mol) e DIEA (4.564 ml, 0.0262 mol) in CH₂Cl₂. Si aggiunge la soluzione di estere attivo a quest'ultima soluzione, si aggiunge un altro equivalente di base (2.282 ml) e si lascia procedere la reazione per 36 ore circa.

Si evapora quindi il solvente e si riprende con AcOEt e KHSO₄ trasferendo quindi il tutto su imbuto separatore. Si lava la fase organica con una soluzione acida di KHSO₄ al 10% (50 ml × 3 lavaggi), con H₂O (50 ml), con una soluzione basica di NaCO₃ al 5% (50 ml × 3 lavaggi), ed infine con una soluzione satura di NaCl (50 ml). Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄, quindi la si filtra su carta e la si evapora a pressione ridotta. Si fa quindi precipitare il prodotto da una miscela AcOEt/etere di petrolio.

Resa: 61%

Punto di fusione: 110-111°C.

Rf₁: 0.70; **Rf₂:** 0.92; **Rf₃:** 0.40;

IR (KBr): 3380, 3363, 3317, 3278, 1726, 1712, 1656, 1521 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.35 (m, 5H, Z-CH ar), 6.91 (s, 1H, Aib² NH), 5.26 (s, 1H, Aib¹, NH), 5.10 (s, 2H, Z-CH₂), 3.72 (s, 3H, OMe), 1.52.1.51 (s+s, 12H, Aib CH₃).

Fmoc-L-Met-Aib-Aib-OMe

Si prepara una soluzione dell'estere attivo di Fmoc-L-Met-OH (0.912 g, 2.451 mmol) con HOBt (0.332 g, 2.451 mmol) ed EDC·HCl (0.470 g, 2.451 mmol) e si aggiungono al dipeptide H-Aib-Aib-OMe, ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH del corrispondente dipeptide Z-protetto (0.550 g, 1.63 mmol). Si aggiunge la base *N*-etil-diisopropilammina (0.855 ml, 4.902 mmol). Si evapora il solvente a pressione ridotta e si riprende con AcOEt. Si effettuano i lavaggi con una soluzione acida di KHSO₄ al 10% (50 ml × 3 volte), H₂O (50 ml), soluzione basica NaHCO₃ al 5% (50 ml × 3 volte) ed infine una soluzione satura di NaCl acquosa. Si evapora il solvente dalla fase organica.

Il prodotto in fase organica non si presenta pulito e si rende necessaria una separazione su colonna CHCl₃/EtOH 95:5. Si isolano 0.522 g di prodotto pulito.

Resa: 60 %.

Punto di fusione: 168-170 °C.

Rf₁: 0.82; **Rf₂:** 0.96; **Rf₃:** 0.42;

IR (KBr): 3382, 1676, 1522 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.76 (d, 2H, CH ar), 7.57 (d, 2H, CH ar), 7.45-7.28 (m, 4H, CH ar), 7.04 (s, 1H, NH), 6.81 (s, 1H, NH), 5.75 (d, 1H, Met NH), 4.41-4.22 (m, 4H, 2H Fmoc CH₂, 1H Fmoc CH⁹, 1H Met αCH), 3.70 (s, 3H, OMe), 2.56 (m, 2H, Met γCH₂), 2.11 (s, 3H, SCH₃), 2.01 (m, 2H, Met βCH₂), 1.55-1.52 (m, 12H, Aib CH₃).

Fmoc-Aib-L-Met-Aib-Aib-OMe

Si rimuove il gruppo protettore Fmoc da Fmoc-L-Met-Aib-Aib-OMe con una soluzione al 20% di DEA in CH₂Cl₂ monitorando la reazione *via* TLC. Dopo circa un'ora si aggiunge della soluzione fresca di base. Si separa mediante *flash chromatography* l'ammina libera.

Si prepara una soluzione dell'estere attivo sciogliendo in poco CH₂Cl₂ Fmoc-Aib-OH (0.293 g pari a 0.899 mmol), HOBT (0.122 g pari a 0.899 mmol), e EDC·HCl (0.172 g, 0.899 mmol). Si lascia la miscela sotto agitazione in un bagno di acqua e ghiaccio e poi si aggiunge l'estere attivo così preparato all'ammina libera. Si aggiungono 0.157 ml di DIEA (pari a 0.899 mol) e si monitora il decorso di reazione mediante TLC. Dopo circa 24 ore si aggiungono ulteriori 0.4 equivalenti di estere attivo preparato di fresco. Si lascia a reagire un'altra notte.

Si evapora quindi il solvente a pressione ridotta, si riprende con AcOEt e si effettuano i lavaggi con soluzione acida (KHSO₄ al 10%, 50 ml × 3 volte), H₂O (50 ml), soluzione basica (NaHCO₃ al 5%, 50 ml × 3 volte), soluzione di NaCl satura (50 ml). Le fasi organiche vengono riunite e il solvente allontanato sotto pressione. Il prodotto viene purificato con *flash chromatography* (eluente AcOEt/EP 2:1). Si isolano 0.325 g di prodotto pulito.

Resa: 62%

Punto di fusione: 158-160°C.

Rf₁: 0.70; **Rf₂:** 0.97; **Rf₃:** 0.35;

IR (KBr): 3352, 1738, 1704, 1665, 1524 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.78 (d, 2H, CH ar), 7.57 (d, 2H, CH ar), 7.46-7.33 (m, 6H, 4H CH ar, 2H, NH), 7.07 (s, 1H, NH), 5.08 (d, 1H, Met NH), 4.54-4.20 (m, 4H, 2H Fmoc CH₂, 1H Fmoc CH⁹, 1H Met αCH), 3.67 (s, 3H, OMe), 2.57 (m, 2H, Met γCH₂), 2.11 (m, 2H, Met βCH₂), 2.07 (s, 3H, SCH₃), 1.56-1.50 (m, 18H, Aib CH₃).

Fmoc-L-Bpa-Aib-L-Met-Aib-Aib-OMe

Si rimuove il gruppo protettore Fmoc da Fmoc-Aib-L-Met-Aib-Aib-OMe con una soluzione al 20% di DEA in CH₂Cl₂ monitorando la reazione *via* TLC. Dopo circa un'ora si aggiunge della soluzione fresca di base. Si separa mediante *flash chromatography* l'ammina libera.

Si prepara una soluzione dell'estere attivo sciogliendo in poco CH₂Cl₂ Fmoc-L-Bpa-OH (0.299 g pari a 0.609 mmol), HOBt (0.082 g pari a 0.609 mmol), e EDC·HCl (0.117 g, 0.609 mmol). Si lascia la miscela sotto agitazione in un bagno di acqua e ghiaccio e poi si aggiunge l'estere attivo così preparato all'ammina libera. Si aggiungono 0.106 ml di DIEA (pari a 0.609 mol) e si monitora il decorso di reazione mediante TLC. Si lascia a reagire per il fine settimana. Si controlla l'andamento di reazione *via* TLC.

Si evapora quindi il solvente a pressione ridotta, si riprende con AcOEt e si effettuano i lavaggi con soluzione acida (KHSO₄ al 10%, 50 ml × 3 volte), H₂O (50 ml), soluzione basica (NaHCO₃ al 5%, 50 ml × 3 volte), soluzione di NaCl satura (50 ml). Le fasi organiche vengono riunite e il solvente allontanato sotto pressione. Il prodotto viene purificato con *flash chromatography*.

Resa: 40%.

Punto di fusione: 116-118° C.

Rf₁: 0.70; **Rf₂:** 0.95; **Rf₃:** 0.30;

IR (KBr): 3335, 3060, 1735, 1660 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.83-7.27 (m, 20H, 9H Bpa CH ar., 8H Fmoc ar., 3H NH), 7.00 (s, 1H, NH), 6.07 (m, 1H, Bpa NH), 4.51-4.12 (m, 5H, 2H Fmoc CH₂, 1H Fmoc CH⁹, 2H αCH), 3.70 (s, 3H OMe), 3.20 (m, 2H, Bpa βCH₂), 2.54 (m, 2H Met γCH₂), 2.20 (m, 2H, Met βCH₂), 2.05 (s, 3H, S-CH₃), 1.55-1.48 (m, 18H, Aib CH₃).

Boc-Aib-L-Bpa-Aib-L-Met-Aib-Aib-OMe

Si rimuove il gruppo protettore Fmoc da Fmoc-L-Bpa-Aib-L-Met-Aib-Aib-OMe con una soluzione al 20% di DEA in CH₂Cl₂ monitorando la reazione *via* TLC. Dopo circa un'ora si aggiunge della soluzione fresca di base. Si separa mediante *flash chromatography* l'ammina libera. Si raccolgono le provette contenenti lo sbloccato e si evapora. Si riprende con etere etilico.

Si prepara l'estere attivo sciogliendo in poco CH₂Cl₂ Boc-Aib-OH (0.022 g pari a 0.11 mmol), HOAt (0.014 g pari a 0.11 mmol) e EDC·HCl (0.021 g pari a 0.11 mmol). Si aggiunge

l'estere attivo allo sbloccato e si basifica con DIEA (0.032 ml). Si segue la reazione mediante TLC.

Si rimuove il CH_2Cl_2 a pressione ridotta e si riprende con AcOEt. Si eseguono i lavaggi con soluzione di KHSO_4 al 10% (20 ml \times 3 volte), quindi H_2O (20 ml), soluzione di NaHCO_3 al 5% (20 ml \times 3 volte), soluzione satura di NaCl (20 ml). Si anidrificano le fasi organiche raccolte e si filtra su carta per rimuovere Na_2SO_4 , quindi si evapora AcOEt.

Resa: 48%.

Punto di fusione: 104-107 °C.

Rf₁: 0.65; **Rf₂:** 0.97; **Rf₃:** 0.28;

IR (KBr): 3313, 1739, 1659, 1538 cm^{-1} .

¹H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8.62-7.30 (m, 12H, 9H Bpa CH ar., 3H Aib³ NH, Met⁴ NH, Aib⁵ NH), 7.16 (s, 1H, Aib⁶ NH), 6.63 (d, 1H, Bpa NH), 4.89 (s, 1H, Aib¹ NH), 4.34 (m, 1H, Bpa α CH), 4.17 (m, 1H, Met α CH), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.25 (2m, 2H, Bpa β CH₂), 2.65-2.55 (m, 2H, Met γ CH₂), 2.28 e 2.08 (2m, 2H, Met β CH₂), 2.06 (s, 3H, SCH₃), 1.58-1.51 (m, 18H, Aib CH₃), 1.45 e 1.41 (2s, 6H, Aib CH₃), 1.34 (s, 9H, Boc CH₃).

Massa: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc.= 855.07; $[\text{M}+\text{H}]^+$ sper.= 855.44;

2.2.4 Sintesi del peptide Boc-Aib-L-Bpa-L-Met-Aib-Aib-Aib-OMe (*i*→*i+1*)

Z-Aib-Aib-Aib-OMe²⁸

Si prepara una soluzione dell'estere attivo con Z-Aib-OH (1.813 g pari a 7.643 mmol), HOBt (1.032 g, pari a 7.643 mmol) ed EDC·HCl (1.465 g pari a 7.643 mmol). La si aggiunge ad una soluzione di H-Aib-Aib-OMe, ottenuto per idrogenazione catalitica in MeOH del corrispondente dipeptide Z-protetto (1.714 g pari a 5.095 mmol). Si aggiungono 2.6 ml di DIEA e si lascia sotto agitazione per il fine settimana. Si verifica il decorso di reazione mediante TLC. Si evapora il solvente a pressione ridotta. Si riprende con AcOEt e si effettuano i lavaggi acidi con soluzione di KHSO_4 al 10% (50 ml \times 3 volte), con H_2O (50 ml), con soluzione di NaHCO_3 al 5% (50 ml \times 3 volte) e con soluzione satura di NaCl (50 ml). Si anidrificano le fasi organiche raccolte con Na_2CO_3 e si filtra su carta. Quindi si rimuove il solvente a pressione ridotta. Si scioglie l'olio rimasto nella minima quantità di AcOEt e si aggiunge etere di petrolio fino ad intorbidire stabilmente la soluzione.

Si osserva la formazione di un precipitato bianco dall'aspetto aghiforme. Si decantano le acque madri e si isola il solido ottenuto. Si tirano nuovamente a secco le acque madri per effettuare una seconda precipitazione. Si formano dei piccoli cristalli bianchi. Vengono isolati 1.25 g di prodotto.

Resa: 57%.

Punto di fusione: 145-146 °C.

Rf₁: 0.64; **Rf₂:** 0.83; **Rf₃:** 0.35;

IR (KBr): 3361, 1739, 1710, 1677, 1652 1525 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.36 (m, 6H, 5H Z-CH ar, 1H NH), 6.34 (s, 1H, NH), 5.13 (s, 1H, NH), 5.11 (s, 2H, Z-CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 1.51-1.42 (s+s+s, 18H, Aib CH₃).

Fmoc-Met-Aib-Aib-Aib-OMe

Si rimuove con idrogenazione catalitica il gruppo protettore Z da 1g di Z-(Aib)₃-OMe. Si allontana il metanolo e si riprende un paio di volte con CH₃CN. Al peptide così sbloccato si aggiunge l'estere attivo ottenuto sciogliendo in poco CH₂Cl₂ Fmoc-Met-OH (1.057 g pari a 2.847 mmol), HOBT (0.358 g pari a 2.847 mmol), EDC·HCl (0.546 g pari a 2.847 mmol). Si aggiungono quindi 0.6 ml di DIEA e si segue il decorso di reazione *via* TLC.

Il giorno successivo la miscela di reazione si presenta torbida. Si decide di filtrare il solido su gooch lavandolo più volte con CH₂Cl₂ freddo. Si effettuano comunque i lavaggi sulla miscela di reazione, evaporando CH₂Cl₂ e riprendendo con AcOEt. Si lava la miscela di reazione con soluzione acida di KHSO₄ al 10% (50 ml × 3 volte), con H₂O (50 ml), con soluzione basica di NaHCO₃ al 5% (50 ml × 3 volte) e quindi con soluzione satura di NaCl. Si ottiene un composto oleoso. Si fa precipitare il prodotto da AcOEt per aggiunta di etere di petrolio. Si isolano 1.122 g di prodotto.

Resa: 74%.

Punto di fusione: 153-154°C.

Rf₁: 0.59; **Rf₂:** 0.96; **Rf₃:** 0.33;

IR (KBr): 3357, 3292, 1722, 1700, 1658, 1531 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO, 200 MHz): δ 8.56 (s, 1H, NH), 7.91-7.25 (m, 10H, 8H Fmoc CH ar, 2H, NH), 7.00 (m, 1H, NH), 4.39-4.00 (m, 4H, 2H Fmoc CH₂, 1H Fmoc CH⁹, 1H αCH), 3.25 (s, 3H, OMe), 2.50 (m, 2H, Met γCH₂), 2.08 (m, 2H, Met βCH₂), 2.06 (s, 3H, SCH₃), 1.29-1.21 (m, 18H, Aib CH₃).

Fmoc-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe

Si procede allo sblocco di 0.400 g di Fmoc-Met-Aib₃-OMe (pari a 0.624 mmol) in una soluzione di DEA al 20% in CH₂Cl₂. Data la scarsa solubilità si aggiunge DMF. Al termine dello sblocco, si evapora il solvente a pressione ridotta e si rimuove il dibenzofulvene mediante colonna cromatografica.

Al peptide sbloccato viene aggiunto l'estere attivo ottenuto sciogliendo in poco CH₂Cl₂ Fmoc-Bpa-OH (0.368 g pari a 0.75 mmol), HOBt (0.101 g pari a 0.75 mmol) ed EDC·HCl (0.144 g pari a 0.75 mmol). Alla miscela di reazione si aggiungono 0.13 ml di base N-etil-diisopropilammina e si monitora la reazione di *coupling* mediante TLC.

Si elimina quindi il solvente a pressione ridotta, si riprende con AcOEt, e si eseguono i lavaggi con soluzione acida di KHSO₄ al 10% (50 ml × 3 volte), con H₂O (50 ml), con soluzione basica di NaHCO₃ al 5% (50 ml × 3 volte), con soluzione satura di NaCl (50 ml). Il composto in fase organica viene purificato mediante *flash chromatography*. Si isolano 0.330 g di pentapeptide.

Resa: 61%

Punto di fusione: 203-206 °C.

Rf₁: 0.59; **Rf₂:** 0.99; **Rf₃:** 0.35;

IR (KBr): 3344, 1728, 1660, 1526 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.83-7.31 (m, 20H, 9H Bpa CH ar., 8H Fmoc ar., 3H NH), 6.93 (s, 1H, NH), 5.78 (m, 1H, Bpa NH), 4.47-4.20 (m, 5H, 2H Fmoc CH₂, 1H Fmoc CH^o, 2H αCH), 3.70 (s, 3H OMe), 3.30-3.15 (m, 4H, 2H Bpa βCH₂, 2H Met γCH₂), 2.52 (m, 2H, Met βCH₂), 2.05 (s, 3H, S-CH₃), 1.56-1.47 (m, 18H, Aib CH₃).

Boc-Aib-L-Bpa-L-Met-Aib-Aib-Aib-OMe

Si procede allo sblocco di Fmoc-Bpa-Met-Aib₃-OMe sciogliendolo in 10 ml di soluzione di DEA al 20%. Si monitora lo sblocco mediante TLC. Si purifica lo sbloccato mediante *flash chromatography* e a questo si aggiunge l'estere attivo preparato sciogliendo in CH₂Cl₂ anidro Boc-Aib-OH (0.076 g, pari a 0.373 mmol), HOAt (0.051 g, pari a 0.373 mmol), EDC·HCl (0.071 g, pari a 0.373 mmol). Si aggiungono alla miscela di reazione 0.120 ml di DIEA. Al termine della reazione di *coupling*, stimato mediante TLC, si evapora il solvente a pressione ridotta e si effettuano i lavaggi. Si riprende con AcOEt e si effettuano i lavaggi acidi (soluzione di KHSO₄ al 10%, 50 ml × 3 volte), con H₂O (50 ml), basici (soluzione di

NaHCO₃ al 5%, 50 ml × 3 volte), con soluzione satura di NaCl (50 ml). Si anidrifica la fase organica e si allontana il solvente a pressione ridotta. Si isolano 0.220 g.

Resa: 84%

Punto di fusione: 106-108 °C.

Rf₁: 0.53; **Rf₂:** 0.94; **Rf₃:** 0.31;

IR (KBr): 3320, 1784, 1739, 1660, 1606 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.81-7.30 (m, 12H, 9H Bpa CH ar., 3H Met³ NH, Aib⁴ NH, Aib⁶ NH), 6.61 (2s, 2H, Bpa² NH, Aib⁵ NH), 4.89 (s, 1H, Aib¹ NH), 4.47 (m, 1H, Bpa αCH), 4.37 (m, 1H, Met αCH), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.31 (d, 2H, Bpa βCH₂), 2.50 (m, 1H, Met γCH₂), 2.41 (m, 1H, Met γCH₂), 2.24 (m, 1H, Met βCH₂), 2.06 (s, 3H, SCH₃), 1.93 (m, 1H, Met βCH₂), 1.52-1.35 (m, 24H, Aib CH₃), 1.33 (s, 9H, Boc CH₃).

Massa: [M+H]⁺ calc.= 855.07; [M+H]⁺ sper.= 855.43;

2.2.5 Reazione di fotociclizzazione

Le reazioni di fotociclizzazione sono state condotte in CH₃CN. Tipicamente, 15 mg di peptide sono stati sciolti in 70 ml di CH₃CN, così da avere una soluzione diluita (circa 0.25 mM) che consentisse di evitare reazioni intermolecolari. Si è pure gorgogliato azoto per 30 min circa, prima dell'irraggiamento, per rimuovere ogni traccia di ossigeno.

La soluzione così ottenuta è stata trasferita in un tubo di quarzo, che è stato immerso in un fotoreattore con 16 lampade monocromatiche irradianti alla lunghezza d'onda di 350 nm. Si è irradiato il campione per 1 ora. Successivamente, la soluzione è stata concentrata ed il residuo purificato *via* HPLC con un gradiente di soluzione B (CH₃CN/H₂O in rapporto 9:1) in soluzione A (CH₃CN/H₂O in rapporto 1:9) dal 30 al 100 % in 25 minuti.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi dei peptidi

3.1.1 Strategia di sintesi

La metodica usata per preparare i tre esapeptidi oggetto di questo lavoro è la sintesi in soluzione. Si fa ricorso a questa strategia sintetica anziché alla più rapida sintesi su fase solida, perché è possibile, in questo modo, isolare, purificare e caratterizzare i singoli intermedi (in questo caso di-, tri-, tetra- e penta-peptidi).

Nell'ambito della sintesi in soluzione si può procedere o per aggiunta progressiva di ogni singolo amminoacido alla catena (metodo detto di sintesi “*step-by-step*”) o per condensazione di frammenti più lunghi (metodo detto di “*segment condensation*”).

Nel primo caso si conduce la sintesi a partire dal residuo C-terminale, la cui funzione carbossilica viene opportunamente protetta preventivamente. In questo modo si limitano i rischi di epimerizzazione che si incontrano qualora si abbia a che fare con amminoacidi C^α-trisostituiti. Tuttavia, sono richiesti tempi relativamente lunghi per portare a termine la sintesi.

Nel caso di sintesi per condensazione è possibile ottenere in tempi più brevi sequenze più lunghe. Si sintetizzano frammenti brevi di pochi residui del peptide di interesse e li si condensa quindi per ottenere il prodotto finale.

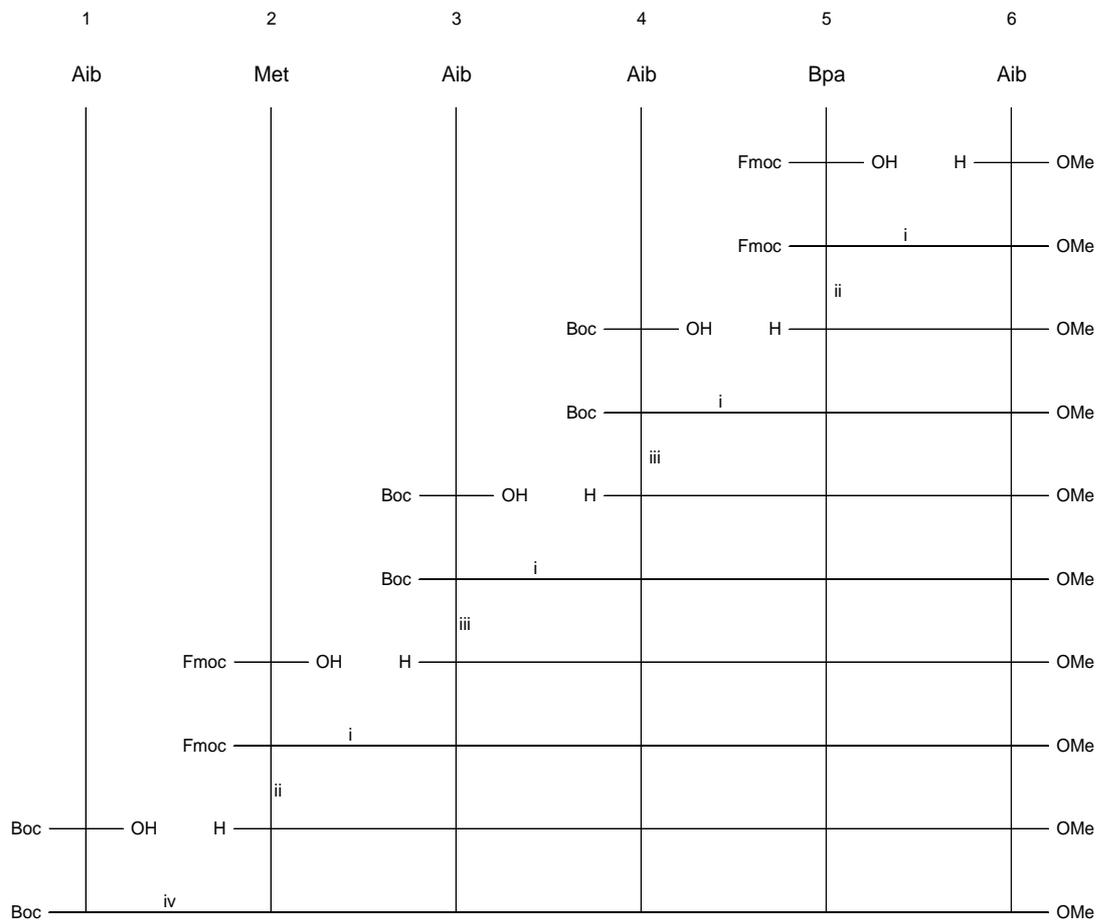
In questo lavoro di Tesi sono state sintetizzate le seguenti sequenze peptidiche:

- (1) Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$)
- (2) Boc-Aib-**Bpa**-Aib-**Met**-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$)
- (3) Boc-Aib-**Bpa**-**Met**-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$)

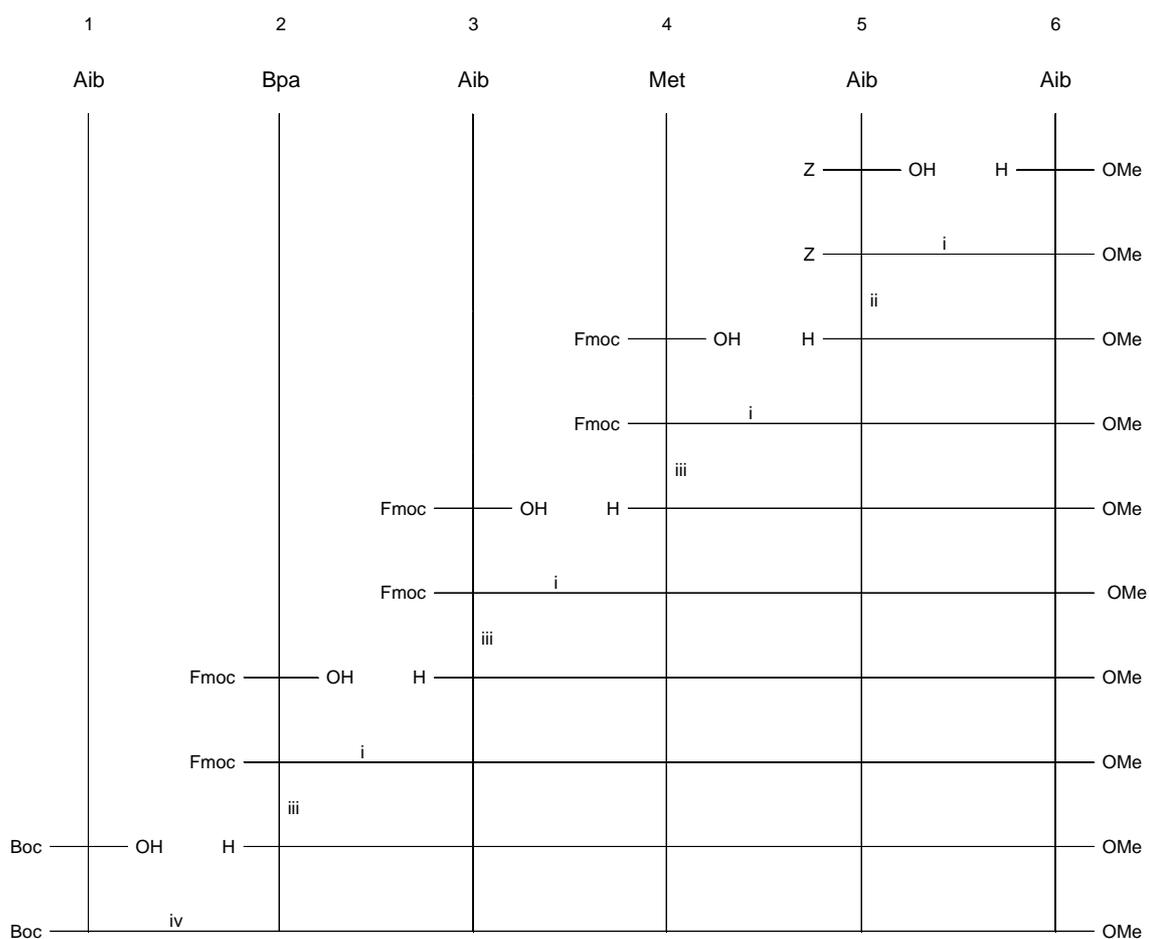
La strategia sintetica a cui si è fatto ricorso è stata quella di sintesi sequenziale, *step-by-step*, isolando i singoli intermedi e caratterizzandoli di volta in volta.

In questo modo è possibile valutare gli effetti del progressivo allungamento della catena sulla conformazione del peptide.

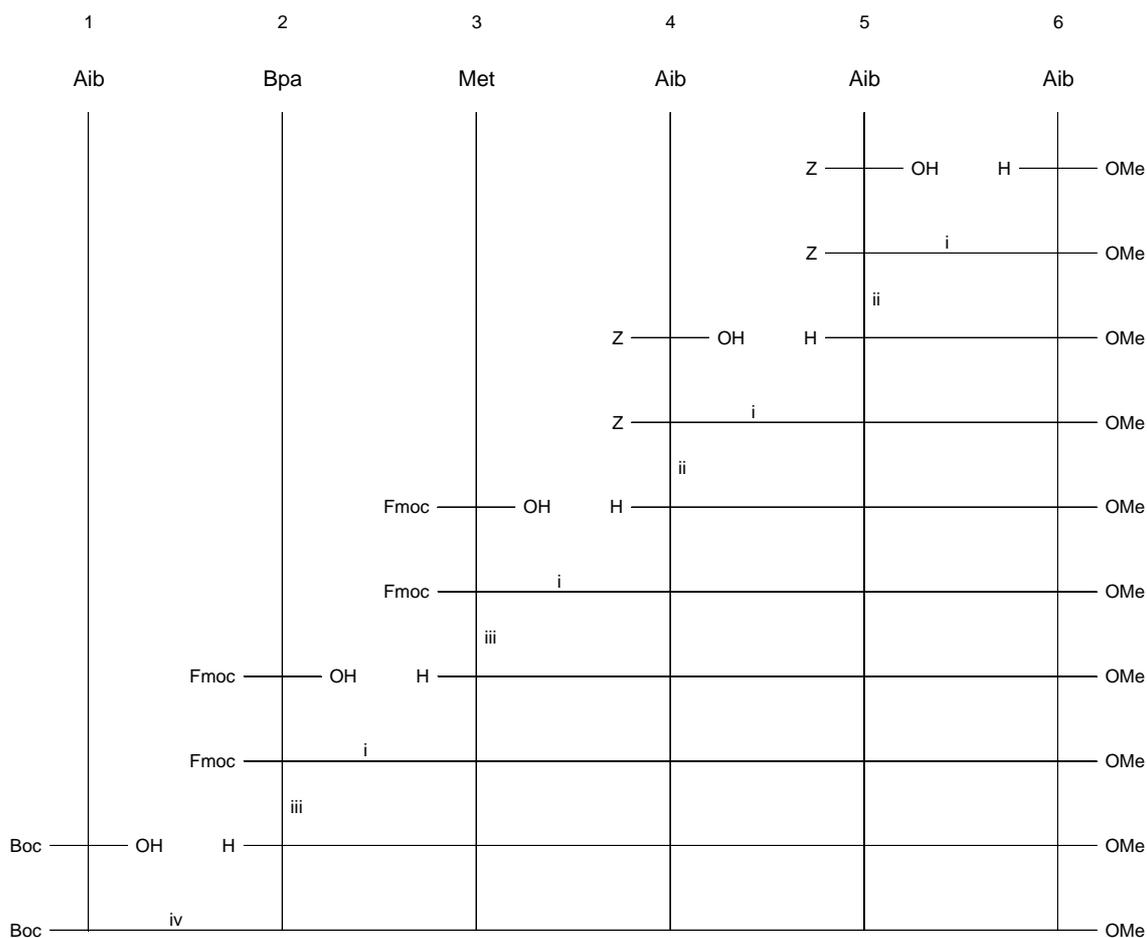
Gli Schemi 3.1, 3.2 e 3.3 riassumono graficamente i percorsi sintetici seguiti per ottenere i tre esapeptidi sopra riportati.



Schema 3.1: sintesi del peptide Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe. (i) EDC/HOBt/DIEA; (ii) DEA 25% in CH₂Cl₂; (iii) TFA 50% in CH₂Cl₂; (iv) EDC/HOAt/DIEA



Schema 3.2: sintesi del peptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe. (i) EDC/HOBt/DIEA; (ii) H₂, Pd/C, MeOH; (iii) DEA al 25% in CH₂Cl₂; (iv) EDC/HOAt/DIEA



Schema 3.3: sintesi del peptide Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe. (i) EDC/HOBt/DIEA; (ii) H₂, Pd/C, MeOH; (iii) DEA al 25% in CH₂Cl₂; (iv) EDC/HOAt/DIEA

3.1.2 Metodi di attivazione del gruppo carbossilico

Per quanto riguarda la scelta del metodo di formazione del legame ammidico è opportuno tenere conto della scarsa reattività degli α -amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti nella formazione del legame peptidico, a causa dell'ingombro sterico sul C ^{α} . Tale influenza negativa si fa sentire maggiormente sul gruppo amminico che su quello carbossilico.

L'esperienza acquisita in questo Laboratorio nella sintesi di peptidi contenenti α -amminoacidi stericamente impediti ha suggerito di ricorrere, a motivo della sua efficacia, al metodo di attivazione del gruppo carbossilico *via* EDC/HOAt (figura 3.1).²⁹

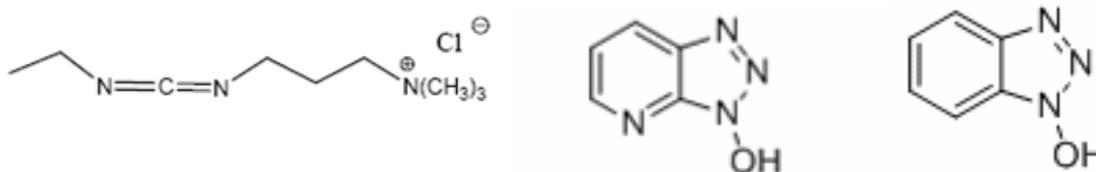


Figura 3.1 Formule di struttura di EDC, HOAt e HOBt.

L'additivo HOAt viene impiegato perché in grado di accelerare l'attacco del gruppo carbossilico da parte dell'ammina. Tramite formazione di un estere attivo coinvolgente il carbonio carbonilico è infatti possibile renderlo maggiormente soggetto all'attacco nucleofilo ad opera della funzione amminica.

Nell'attivazione *via* EDC/HOAt la carbodiimmide promuove la formazione di questo intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell' α -amminoacido N^o-protetto e l'HOAt. L'effetto catalitico si esplica mediante l'assistenza anchimerica che gli atomi di azoto in posizione 2 e 7 forniscono all'attacco nucleofilo del gruppo amminico. È stato dimostrato che la conformazione preferita allo stato cristallino dagli azabenzotriazolil-esteri prevede la perpendicolarità del piano dell'eterociclo rispetto a quello del gruppo carbossilico.³⁰

Se tale disposizione tridimensionale si conserva in soluzione, il gruppo amminico reagente con l'estere trova assistenza su entrambe le facce da parte dell'atomo di azoto in posizione 2 o 7 del gruppo OAt (figura 3.2).

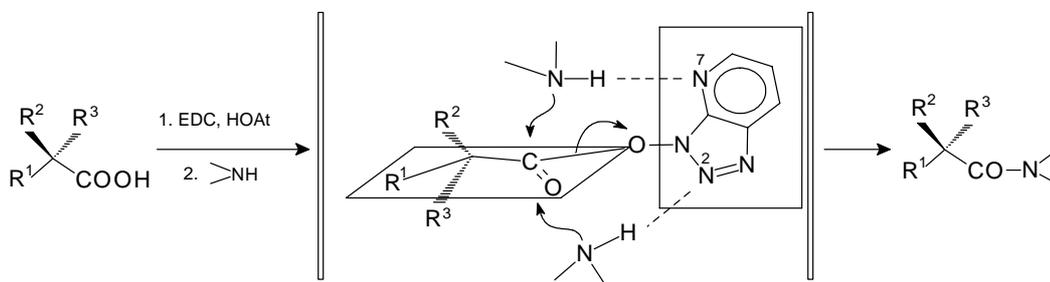


Figura 3.2: Attacco nucleofilo assistito nella formazione del legame ammidico sull'estere attivo formatosi per attivazione del gruppo carbossilico con HOAt.

L'impiego dell'additivo HOAt è stato limitato a poche reazioni di coupling a motivo del costo e, soprattutto, della sua scarsa disponibilità commerciale. Per le altre sintesi si è usato

l'additivo HOBt (figura 3.1). L'assenza dell'atomo di N sull'anello aromatico non consente l'effetto di assistenza anchimerica, diminuendo sensibilmente l'efficacia di questo additivo nella sintesi e portando ad un calo in termini di resa.

3.1.3 Gruppi protettori impiegati

Per la protezione della funzione amminica sono stati utilizzati tre diversi gruppi protettori:

- Z (benzilossicarbonile) per peptidi contenenti solo i residui Aib;
- Boc (*tert*-butilossicarbonile) per peptidi contenenti anche il residuo Bpa;
- Fmoc (fluorenilmetilossicarbonile) per peptidi contenenti il residuo Met.

La scelta del gruppo protettore è dettata dalle caratteristiche dei residui di cui il peptide è costituito e dalle condizioni di rimozione del gruppo protettore.

Il gruppo Z presenta i seguenti vantaggi:

- una buona stabilità chimica e fisica;
- facilità di rimozione dei sottoprodotti (toluene e CO₂) generati durante la reazione di idrogenolisi catalitica, data la loro volatilità;
- presenza di un cromoforo aromatico (benzile) che aiuta notevolmente a seguire il decorso delle reazioni mediante TLC.

La rimozione dello Z per mezzo dell'idrogenazione catalitica non è però compatibile con Bpa (riduzione del carbonile) e Met (avvelenamento del catalizzatore). Pertanto, lo Z è stato usato solo in pochi casi.

Il gruppo protettore Boc costituisce una valida alternativa allo Z. Anch'esso ha una buona stabilità chimica e fisica e i sottoprodotti della sua rimozione in ambiente acido (isobutene e CO₂) si rimuovono facilmente perché gassosi. Tuttavia, il trattamento acido (usualmente TFA al 50% in CH₂Cl₂) può danneggiare la catena laterale della Met.

Pertanto, in presenza di Met si è fatto ricorso al gruppo protettore Fmoc. La sua rimozione (trattamento con un'ammina secondaria) è piuttosto laboriosa nella sintesi in soluzione, ma le condizioni impiegate sono compatibili con la presenza sia di Bpa che di Met.

Per la protezione della funzione carbossilica C-terminale si è impiegato l'estere metilico (OMe). Questo gruppo protettore è stato scelto in quanto stabile (ortogonale) nelle condizioni di rimozione dei gruppi protettori delle funzioni N-terminali.

3.1.4 Metodiche di caratterizzazione

Per determinare la purezza dei peptidi finali e dei loro intermedi si è fatto ricorso a tecniche cromatografiche, mentre la loro identità è stata verificata principalmente mediante $^1\text{H-NMR}$ e spettrometria di massa.

Tutti i composti sono stati caratterizzati anche mediante determinazione del punto di fusione, del comportamento cromatografico (TLC) in uno o più sistemi eluenti e dell'assorbimento IR.

3.2 Indagini conformazionali

3.2.1 Assorbimento IR

I peptidi sintetizzati sono stati sottoposti a studi conformazionali mediante spettroscopia di assorbimento IR. Tali indagini sono state effettuate in cloroformio deuterato (un solvente di bassa polarità) negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni³¹ e a diverse concentrazioni. Le regioni spettrali analizzate sono state le seguenti:

- 3600-3200 cm^{-1} , corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami N-H dei gruppi uretanici, peptidici e ammidici (*ammide A*);
- 1800-1600 cm^{-1} , corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami C=O esterei, uretanici, peptidici e ammidici (*ammide I*).

3.2.1.1 Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$) e suoi intermedi

In figura 3.3 sono riportati gli spettri IR di Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe e di tutti i suoi intermedi sintetici, registrati alla concentrazione di 1×10^{-3} M, nella regione dello *stretching* N-H (3500-3200 cm^{-1}). La posizione precisa delle bande di assorbimento si può leggere in tabella 3.1, dove sono pure riportati i valori relativi agli assorbimenti nella regione di stiramento del carbonile.

Nella regione dell'ammide A si rilevano due bande di assorbimento: una prima, debole e di intensità pressochè costante in tutti gli intermedi della serie, tra 3458 e 3418 cm^{-1} , attribuibile agli N-H liberi e solvatati; una seconda, nella zona compresa tra 3348 e 3314 cm^{-1} , corrispondente ai gruppi N-H impegnati in legami idrogeno.³²⁻³⁴ Quest'ultima cresce d'intensità con l'allungarsi della catena, dal dipeptide all'esapeptide. Tale andamento è attribuibile all'aumento del numero di legami H intramolecolari, compatibile con la formazione di una struttura elicoidale via via più lunga.

E' anche interessante notare che la banda degli N-H legati è assente nello spettro del dipeptide, ma comincia a vedersi già nel tripeptide, che può formare un β -turn. Per inciso, si ricorda che una successione di β -turn porta ad una struttura elicoidale di tipo 3_{10} .

Lo spostamento del massimo di assorbimento della banda degli N-H legati verso numeri d'onda minori fa supporre inoltre un effetto cooperativo nella formazione dei legami H. Va infine osservato che nello spettro del pentapeptide Fmoc-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe (**5** in figura 3.3) compaiono due bande (3450 e 3418 cm^{-1}) per gli N-H liberi. Questo dato potrebbe essere imputabile ad un maggior grado di flessibilità dell'estremità N-terminale, quella dove si trovano gli N-H liberi, in quanto il residuo N-terminale è una Met e non l'elicogenico Aib.

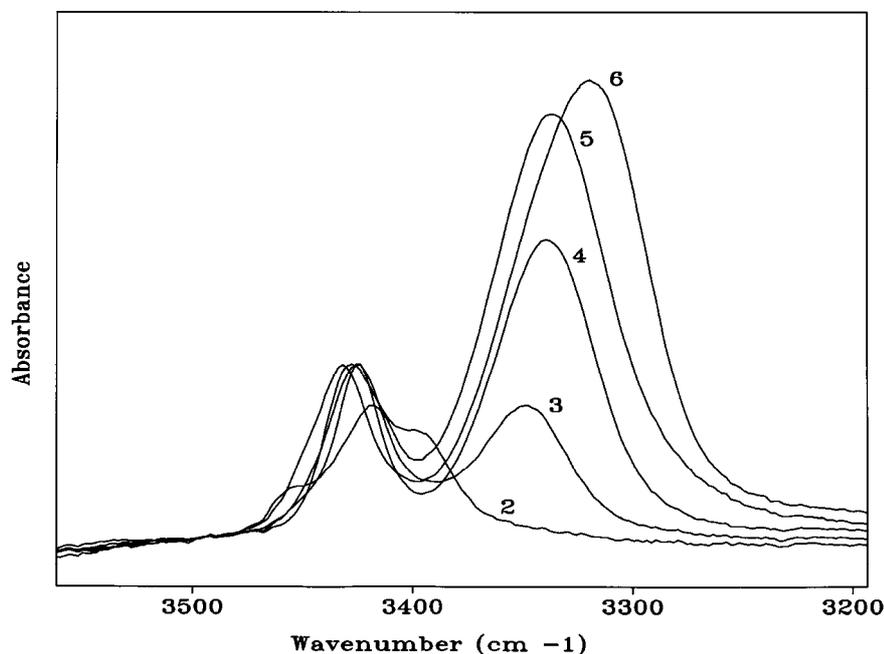


Figura 3.3: Spettri di assorbimento IR di Fmoc-Bpa-Aib-OMe (2), Boc-Aib-Bpa-Aib-OMe (3), Boc-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe (4), Fmoc-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe (5), Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe (6), registrati alla concentrazione di 1×10^{-3} M in CDCl_3 nella regione amide A.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Fmoc-Bpa-Aib-OMe	<u>3430</u> , 3394 ^a	1736 ^b , 1680, 1656, 1624
Boc-Aib-Bpa-Aib-OMe	3426, 3348	1736 ^a , 1708, 1688 ^a , <u>1658</u>
Boc-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe	3426, <u>3340</u> ^b	1736, 1704, <u>1680</u> ^a , <u>1656</u>
Fmoc-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe	3458 ^b , 3418, <u>3336</u>	1734 ^a , 1718, 1676 ^a , <u>1660</u>
Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe	3432, <u>3314</u> ^b	1736, 1702, <u>1658</u>

Tabella 3.1 Frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) di Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe e dei suoi intermedi in CDCl₃ alla concentrazione 1×10⁻³ M. Note: ^a spalla; ^b banda larga; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (....), intense (—) e molto intense (==); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Per confermare che i legami idrogeno osservati siano effettivamente *intramolecolari* (pressoché indipendenti dalla concentrazione) e non *intermolecolari* (fortemente dipendenti dalla concentrazione) si sono raccolti tre spettri a tre concentrazioni diverse per il peptide più lungo della serie, quello cioè più soggetto ad aggregazioni. Gli spettri dell'esapeptide nella regione ammidica A, alle concentrazioni 1×10⁻² M, 1×10⁻³ M e 1×10⁻⁴ M sono riportati in figura 3.4.

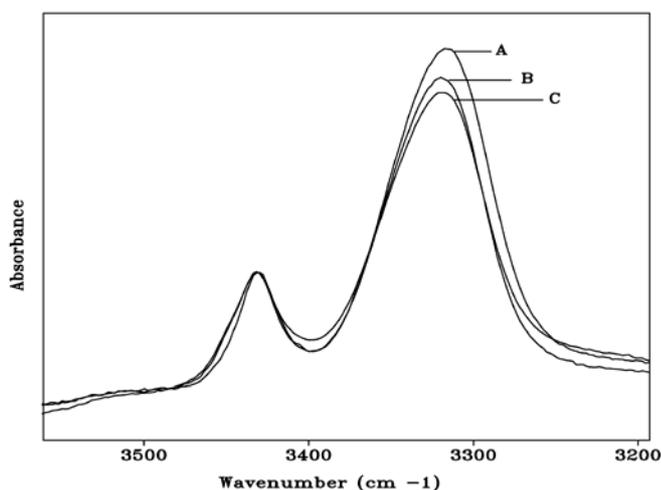


Figura 3.4 Spettri di assorbimento IR di Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe registrati alle concentrazioni di 1×10⁻² M (A), 1×10⁻³ M (B), 1×10⁻⁴ M (C) in CDCl₃ nell'intervallo spettrale 3500-3200 cm⁻¹.

Tali spettri sono normalizzati usando una cella di cammino ottico 10 volte maggiore per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10 (cella da 0.1 mm per campione in concentrazione di 1×10⁻² M, da 1.0 mm per soluzione 1×10⁻³ M e da 10.0 mm per soluzione 1×10⁻⁴ M). La variazione di concentrazione non determina alterazioni significative delle bande

degli N-H legati. E' pertanto ragionevole ritenere che i legami H nei quali sono coinvolti gli N-H peptidici siano in grandissima preponderanza di tipo *intramolecolare*. In particolare, tra il gruppo C=O del residuo *i*-esimo e il gruppo N-H del residuo *i+3*-esimo nell'ipotesi, molto probabile, che il peptide adotti una struttura elicoidale 3_{10} .

Nella regione spettrale 1800-1600 cm^{-1} , le bande tra 1736 e 1702 cm^{-1} sono attribuibili allo stiramento dei gruppi C=O dell'estere metilico e dell'uretano, mentre i gruppi C=O ammidici e peptidici (ammide I) assorbono tra 1688 e 1656 cm^{-1} . Negli spettri dei peptidi più lunghi (tetra-, penta- ed esapeptide) il massimo di assorbimento della banda ammidice I è localizzato a 1656-1660 cm^{-1} . Tale massimo è prossimo alle posizioni canoniche della banda ammidice I delle strutture elicoidali di tipo α (1658 cm^{-1}) e 3_{10} (1662 cm^{-1}).³⁵

Il segnale relativo al bending del legame N-H e allo stretching del gruppo C-N, avente parziale carattere di doppio legame, (ammide II) è localizzato a circa 1520 cm^{-1} .

3.2.1.2 Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe (*i* → *i+2*) e suoi intermedi

In figura 3.5 sono riportati gli spettri IR di Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe e di alcuni suoi intermedi sintetici, registrati alla concentrazione di 1×10^{-3} M, nella regione dello *stretching* N-H (3500-3200 cm^{-1}). Non è stato possibile registrare lo spettro di Fmoc-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe perché poco solubile a queste concentrazioni. La posizione precisa delle bande di assorbimento si può leggere in tabella 3.2, dove sono pure riportati i valori relativi agli assorbimenti nella regione di stiramento del carbonile.

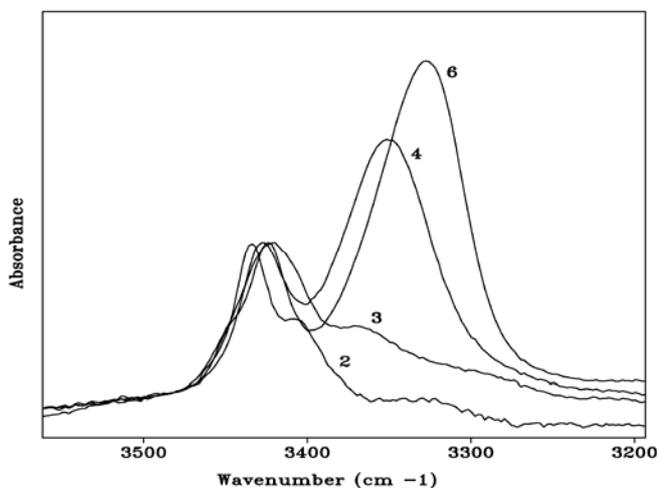


Figura 3.5: Spettri di assorbimento IR di Z-Aib-Aib-OMe (2), Fmoc-Met-Aib-Aib-OMe (3), Fmoc-Aib-Met-Aib-Aib-OMe (4) e Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe (6), alla concentrazione di 1×10^{-3} M in CDCl_3 nella regione di *stretching* del legame N-H.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
Z-Aib-Aib-OMe	3463, 3317	1726, 1712, 1656, 1521
Fmoc-Met-Aib-Aib-OMe	3454, <u>3426</u> ^b , 3366	1736 ^a , 1720, 1678 ^a , 1664 ^a
Fmoc-Aib-Met-Aib-Aib-OMe	3430 ^a , <u>3350</u>	1738 ^a , 1716, <u>1676</u> , 1624
Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe	3466, <u>3313</u>	1739, <u>1659</u> , 1528

Tabella 3.2: Frequenze di assorbimento IR (cm⁻¹) di Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe e suoi intermedi, alla concentrazione 1×10⁻³ M in CDCl₃. Note: ^a spalla; ^b banda larga; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (....), intense (—) e molto intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

Anche per questa serie valgono le osservazioni riportate sopra per l'esapeptide Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe e i suoi intermedi sintetici. Al crescere della catena peptidica aumenta la strutturazione di tipo elicoidale (figura 3.5). Vi è tuttavia una differenza notevole a livello di tripeptide. In questa seconda serie infatti (figura 3.5) il tripeptide (Fmoc-Met-Aib-Aib-OMe) presenta una percentuale di β-turn molto inferiore. Tale risultato è facilmente razionalizzabile considerando che il residuo N-terminale è una Met, anziché un Aib.

Anche per Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe, gli spettri registrati a tre concentrazioni (figura 3.6) confermano la natura *intramolecolare* dei legami idrogeno.

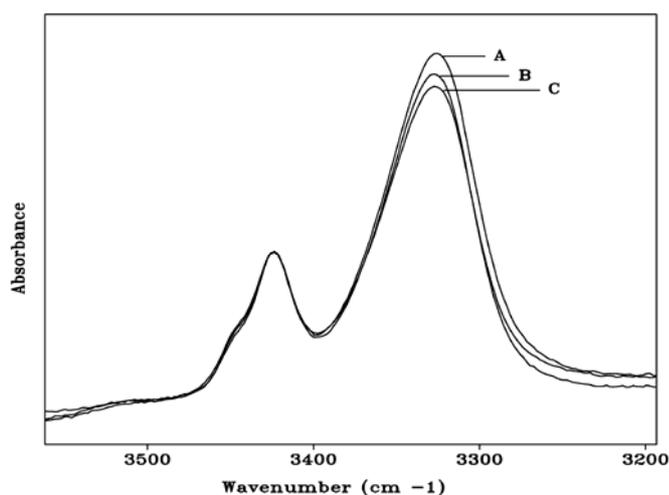


Figura 3.6 Spettri di assorbimento IR di Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe registrati alle concentrazioni di 1×10⁻² M (A), 1×10⁻³ M (B), 1×10⁻⁴ M (C) in CDCl₃ nell'intervallo spettrale 3500-3200 cm⁻¹.

3.2.1.3 Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$) e suoi intermedi

Anche per Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe e alcuni suoi intermedi sintetici è stato condotto uno studio mediante assorbimento IR, analogo a quello eseguito sulle due serie peptidiche precedenti. Non è stato possibile registrare lo spettro di Fmoc-Met-Aib-Aib-Aib-OMe perché poco solubile a queste concentrazioni. I risultati, riportati nelle figure 3.7 e 3.8 e nella tabella 3.3, indicano anche per questa serie peptidica l'adozione di strutture elicoidali, molto probabilmente di tipo 3_{10} .

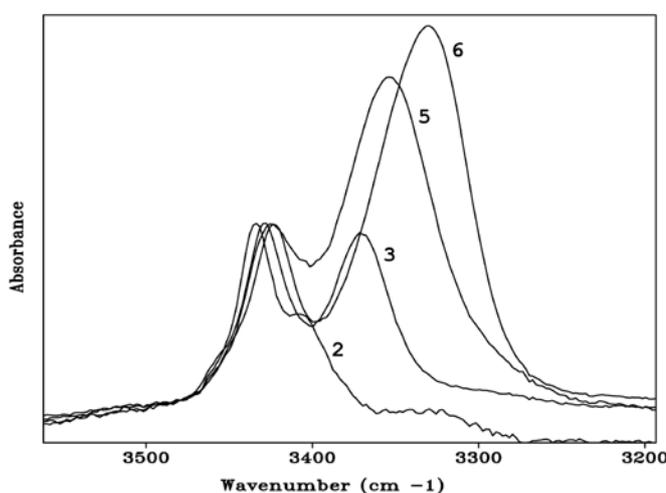


Figura 3.7 Spettri di assorbimento IR di Z-Aib-Aib-OMe (2), Z-Aib-Aib-Aib-OMe (3), Fmoc-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe (5), Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe (6), alla concentrazione di 1×10^{-3} M in CDCl_3 nella regione di *stretching* del legame N-H.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
Z-Aib-Aib-OMe	3463, 3317	1726, 1712, 1656, 1521
Z-Aib-Aib-Aib-OMe	3460 ^a , <u>3430^b</u> , <u>3370</u>	1738 ^a , <u>1716</u> , 1684 ^a , 1662 ^a
Fmoc-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe	3428, <u>3352</u>	1736, 1716, 1680, <u>1658</u>
Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe	3424, <u>3326</u>	<u>1734</u> , 1698 ^a , 1672 ^a , <u>1659</u>

Tabella 3.3: Frequenze di assorbimento IR (cm^{-1}) di Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe e alcuni suoi intermedi, alla concentrazione 1×10^{-3} M in CDCl_3 . Note: ^a spalla; ^b banda larga; i valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (...), intense (—) e molto intense (—); i valori che non sono sottolineati, invece, si riferiscono a bande di media intensità.

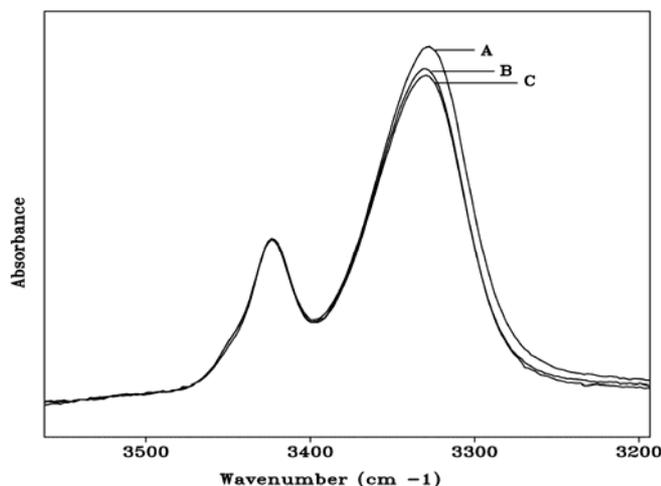


Figura 3.8 Spettri di assorbimento IR di Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe registrati alle concentrazioni di 1×10^{-2} M (A), 1×10^{-3} M (B), 1×10^{-4} M (C) in CDCl_3 nell'intervallo spettrale 3500-3200 cm^{-1} .

3.2.2 Spettrometria ¹H-NMR

Lo studio conformazionale delle tre sequenze peptidiche Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe (1), Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe (2) e Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe (3) è stato esteso anche alla spettrometria ¹H-NMR, nello stesso solvente impiegato per l'analisi di assorbimento IR (CDCl_3).

L'esame si è concentrato sui segnali dei protoni NH i cui spostamenti chimici sono particolarmente sensibili al tipo di struttura presente e alla natura del solvente. In particolare il loro comportamento è strettamente influenzato dalla partecipazione o meno a legami a idrogeno.

L'assegnazione dei protoni ammidici è stata realizzata combinando le informazioni ottenute da spettri bidimensionali TOCSY³⁶ (che identificano i sistemi di spin collegati per accoppiamento scalare) con quelle ottenute da spettri ROESY³⁷ (che individuano le interazioni spaziali).

Per l'assegnazione dei segnali dei residui di Aib si sono utilizzate le connettività ROESY attraverso lo spazio di tipo $\text{NH}(i) \rightarrow \text{C}^\beta\text{H}(i)$ (tabelle 3.4, 3.5 e 3.6).

Residuo	NH	α H	β H	γ H	Altri
Aib ¹	5.080		1.581		Boc 1.480
Met ²	7.690	4.182	2.106, 2.182	2.608, 2.643	ϵ CH ₃ 2.165
Aib ³	8.131		1.550, 1.611		
Aib ⁴	7.254		1.243, 1.591		
Bpa ⁵	7.575	4.725	3.057, 3.657		Aromatici: 7.565, 7.729, 7.665, 7.898, 7.782, 7.837, 7.500, 7.748
Aib ⁶	7.683		1.631, 1.676		OMe 3.718

Tabella 3.4 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per Boc-Aib-Met-(Aib)₂-Bpa-Aib-OMe in CDCl₃ (4.2mM, 298 K, 400 MHz).

Residuo	NH	α H	β H	γ H	Altri
Aib ¹	4.862		1.317, 1.456		Boc 1.324
Bpa ²	6.631	4.343	3.247		Aromatici: 7.308, 7.372, 7.506, 7.616, 7.761, 7.812, 8.377, 8.619
Aib ³	7.730		1.423, 1.578		
Met ⁴	7.399	4.175	2.088, 2.284	2.547, 2.654	ϵ CH ₃ 2.056
Aib ⁵	7.301		1.541, 1.562		
Aib ⁶	7.160		1.511, 1.525		OMe 3.697

Tabella 3.5 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-(Aib)₂-OMe in CDCl₃ (4.5mM, 298 K, 400 MHz).

Residuo	NH	α H	β H	γ H	Altri
Aib ¹	4.890		1.353, 1.443		Boc 1.326
Bpa ²	6.613	4.471	3.311		Aromatici: 7.312, 7.508, 7.613, 7.767, 7.815
Met ³	7.703	4.374	1.926, 2.241	2.409, 2.503	ϵ CH ₃ 2.060
Aib ⁴	7.273		1.501		
Aib ⁵	6.606		1.502		
Aib ⁶	7.399		1.516		OMe 3.697

Tabella 3.6 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per Boc-Aib-Bpa-Met-(Aib)₃-OMe in CDCl₃ (5.5mM, 298 K, 400 MHz).

Un primo tipo di analisi è consistito nell'indagare l'effetto, sui segnali N-H, dell'aggiunta di percentuali crescenti di DMSO (un forte accettore di legami a idrogeno) ad una soluzione peptidica 10^{-3} M in CDCl_3 .³⁸ Normalmente l'effetto del DMSO è poco marcato per i protoni ammidici coinvolti nella formazione di legami H *intracatena*, che stabilizzano le strutture peptidiche secondarie e che sono quindi meno accessibili al solvente. Invece, i protoni non impegnati in legami H *intramolecolari* sono più sensibili all'aggiunta del DMSO. Quest'ultimo tipo di protoni interagisce con il DMSO aggiunto alla soluzione, formando legami H di tipo $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{S}$ tra il peptide e il solvente. Conseguentemente il loro segnale si sposta a campi più bassi. Quando un peptide assume una struttura elicoidale di tipo α o 3_{10} , gli N-H dei primi tre o due residui, rispettivamente (partendo da quello N-terminale), non sono coinvolti nello schema dei legami H *intramolecolari*.

Gli effetti dell'aggiunta di DMSO a soluzioni in CDCl_3 dei tre esapeptidi sintetizzati in questa Tesi, sono riportati in figura 3.9. Purtroppo, i segnali dei protoni aromatici benzofenonici si sovrappongono a quelli di molti NH ammidici. Pertanto, pur avendone individuato la posizione mediante gli esperimenti bidimensionali, non è stato possibile per molti di loro seguire gli spostamenti sullo spettro, conseguenti all'aggiunta di DMSO. E' comunque interessante notare che, tra gli NH individuati, solo quelli in posizione 1 o 2 sono sensibili all'aggiunta di DMSO. Tale osservazione è compatibile con l'ipotesi che i peptidi adottino strutture elicoidali, probabilmente di tipo 3_{10} , come già concluso dall'analisi conformazionale condotta mediante assorbimento IR.

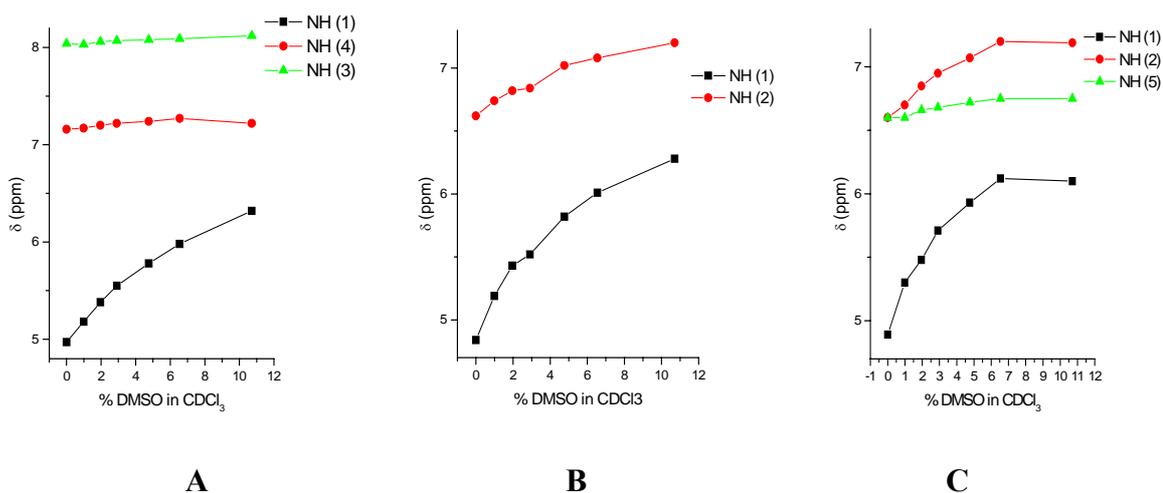


Figura 3.9 Variazione degli spostamenti chimici dei protoni NH di Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe (A), Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe (B) e Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe (C) in funzione dell'aggiunta di DMSO ad una soluzione peptidica 10^{-3} M in CDCl_3 .

L'indagine si è quindi estesa agli spettri bidimensionali ROESY, le cui connettività attraverso lo spazio sono estremamente importanti per estrarre informazioni di tipo conformazionale. Nelle figure 3.10, 3.11 e 3.12 sono mostrate le regioni ammidiche degli spettri ROESY dei tre esapeptidi Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-(Aib)₂-OMe, Boc-Aib-Met-(Aib)₂-Bpa-Aib-OMe e Boc-Aib-Bpa-Met-(Aib)₃-OMe in CDCl₃. La presenza di tutte le correlazioni sequenziali NH(*i*)→NH(*i*+1) è diagnostica della presenza di una struttura di tipo elicoidale.³⁹ Dato che i peptidi esaminati sono protetti all'estremità N-terminale come Boc, la risonanza protonica del protone uretanico (Aib¹) cade a campi alti (circa 5 ppm). Per ognuno dei tre peptidi esaminati, la correlazione NH(1)→NH(2) è riportata in un riquadro contenuto nella figura della corrispondente zona ammidica.

E' interessante a questo proposito notare come la presenza del residuo di Bpa schermi in modo significativo alcuni protoni del residuo a lui precedente. Quando il Bpa occupa la posizione 2 della sequenza, ad esempio, la risonanza del protone uretanico (Aib¹) è spostata al di sotto dei 5 ppm. Il peptide Boc-Aib-Met-(Aib)₂-Bpa-Aib-OMe, avendo il residuo Bpa in posizione 5, è l'unico a presentare la risonanza del protone uretanico Aib¹ sopra i 5 ppm (posizione normale) ed è l'unico in cui i protoni di uno dei gruppi metilici dell'Aib⁴ risuonano invece a campi insolitamente alti (1.24 ppm). Uno studio sistematico di questo fenomeno potrebbe permettere di stimare la posizione dei gruppi aromatici del Bpa rispetto ai gruppi di protoni che risentono della schermatura.

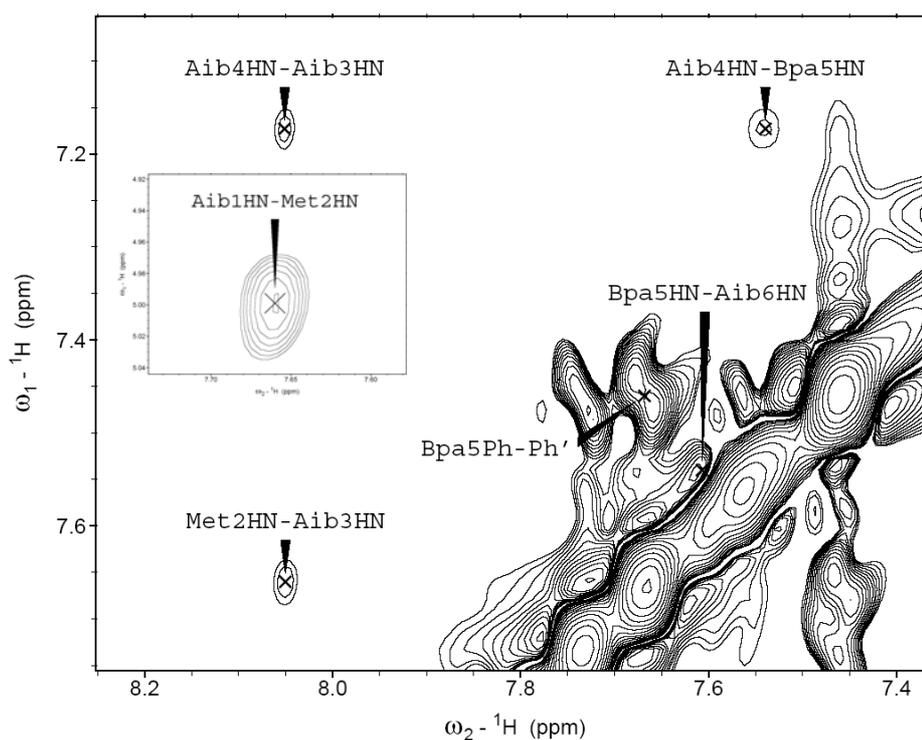


Figura 3.10 Regione ammidica dello spettro ROESY (4.2mM, 298 K, 400 MHz) di Boc-Aib-Met-(Aib)₂-Bpa-Aib-OMe in CDCl₃.

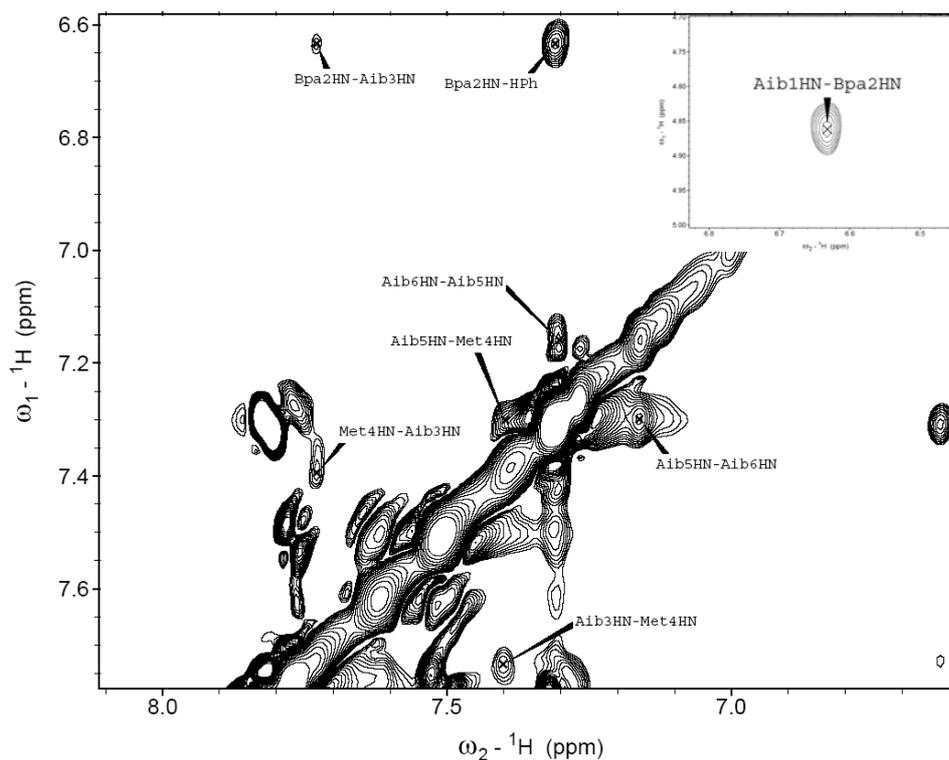


Figura 3.11 Regione ammidica dello spettro ROESY (4.5mM, 298 K, 400 MHz) di Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-(Aib)₂-OMe in CDCl₃.

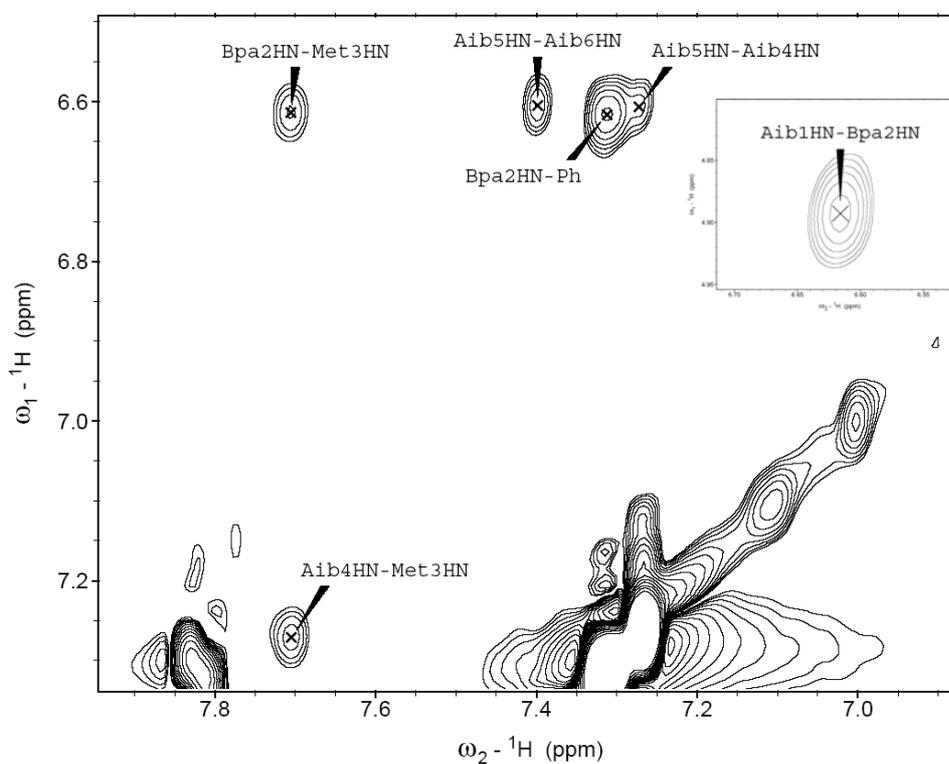


Figura 3.12 Regione ammidica dello spettro ROESY (5.5mM, 298 K, 400 MHz) di Boc-Aib-Bpa-Met-(Aib)₃-OMe in CDCl₃.

Informazioni rilevanti dal punto di vista strutturale si possono ricavare anche dallo studio della zona *fingerprint* degli spettri ROESY (figure 3.13, 3.14 e 3.15). In tale regione si collocano le correlazioni $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+n)$, utili per definire il tipo di conformazione adottata dal peptide analizzato. Ad esempio, correlazioni $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+2)$ sono diagnostiche della presenza di una struttura elicoidale 3_{10} , correlazioni $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+4)$ sono indicative della presenza di un'elica α , mentre correlazioni di tipo $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+3)$ sono compatibili con entrambe le conformazioni elicoidali α o 3_{10} .³⁹ E' evidente che questi segnali sono visibili solo per i due residui proteici (che quindi possiedono un protone in posizione α) Met e Bpa.

Nelle figure 3.13, 3.14 e 3.15 sono osservabili quasi esclusivamente correlazioni $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+2)$, tipiche di eliche di tipo 3_{10} . Non sono invece presenti correlazioni $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+4)$ diagnostiche di strutture α -elicoidali. Pertanto, i peptidi studiati sembrano assumere una struttura elicoidale prevalentemente di tipo 3_{10} in soluzione di $CDCl_3$.

In conclusione, lo studio conformazionale mediante NMR conferma la propensione dei tre esapeptidi ad adottare strutture elicoidali in cloroformio, come già osservato con l'analisi di assorbimento IR.

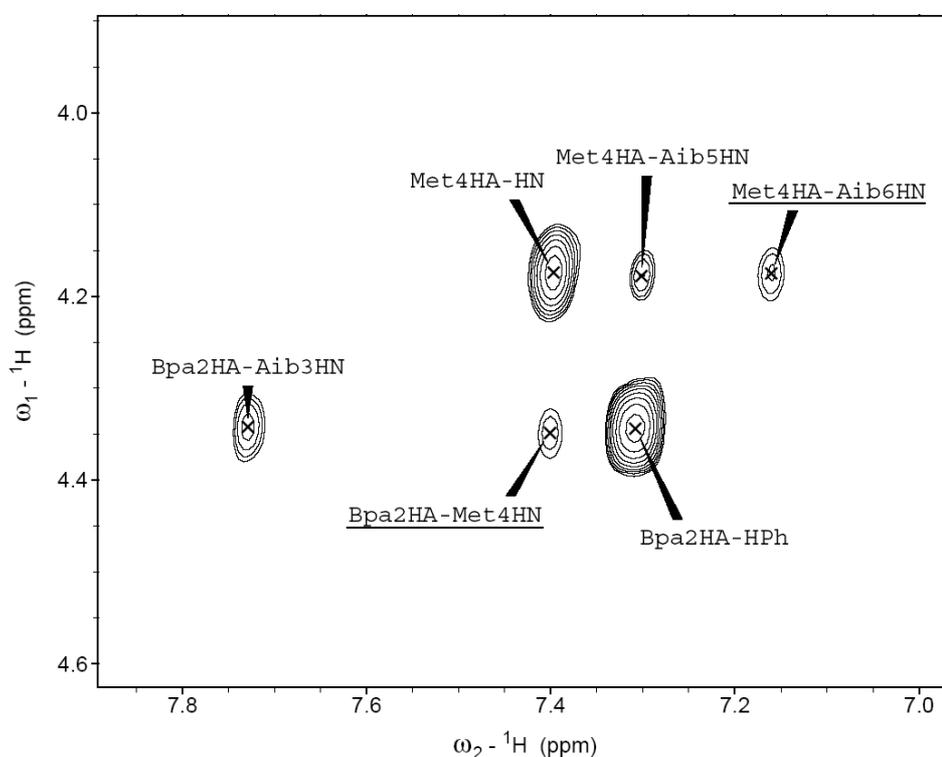


Figura 3.13: Regione *fingerprint* dello spettro ROESY (4.5mM, 298 K, 400 MHz) di Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-(Aib)₂-OMe in $CDCl_3$. Sono evidenziate le interazioni a medio raggio di tipo $i \rightarrow i+2$ (sottolineate).

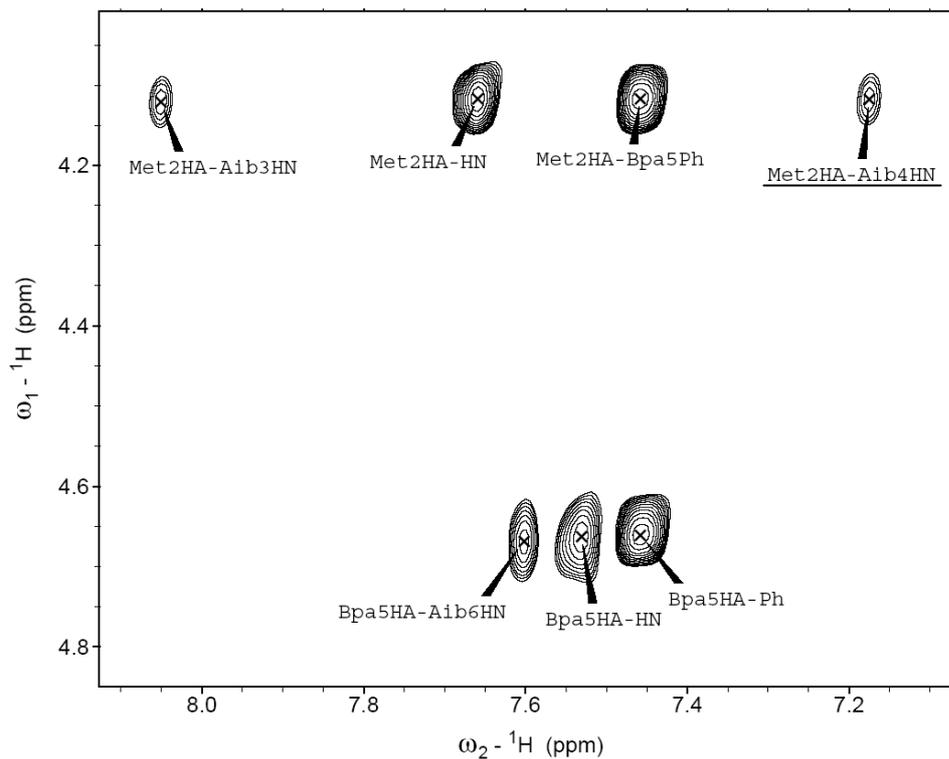


Figura 3.14: Regione fingerprint dello spettro ROESY (4.2mM, 298 K, 400 MHz) di Boc-Aib-Met-(Aib)₂-Bpa-Aib-OMe in CDCl₃. L'interazione a medio raggio di tipo $i \rightarrow i+2$ è sottolineata.

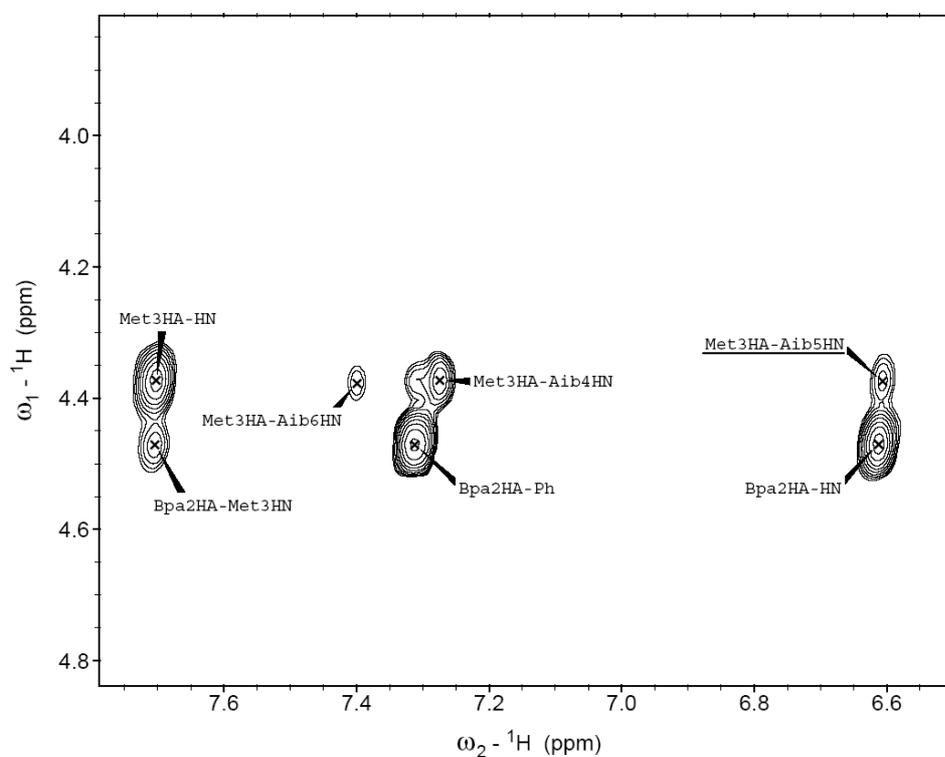


Figura 3.15: Regione fingerprint dello spettro ROESY (5.5mM, 298 K, 400 MHz) di Boc-Aib-Bpa-Met-(Aib)₃-OMe in CDCl₃. Sono evidenziate le interazioni a medio raggio di tipo $i \rightarrow i+2$ (sottolineate) e $i \rightarrow i+3$ (tratteggiate).

3.3 Reazioni di fotociclizzazione

3.3.1 Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$)

In questo peptide i residui di Bpa e Met si trovano in posizioni invertite rispetto all'analogo Boc-Aib-**Bpa**-Aib-Aib-**Met**-Aib-OMe già studiato presso questo laboratorio.⁵

Si vuole ora valutare l'eventuale effetto indotto dal cambio di orientazione reciproca di questi residui sull'andamento della reazione di ciclizzazione. Sperimentalmente si è proceduto come descritto nel capitolo di sintesi e caratterizzazione.

In figura 3.16 viene mostrato il profilo HPLC in fase inversa della miscela di reazione al termine dell'irraggiamento.

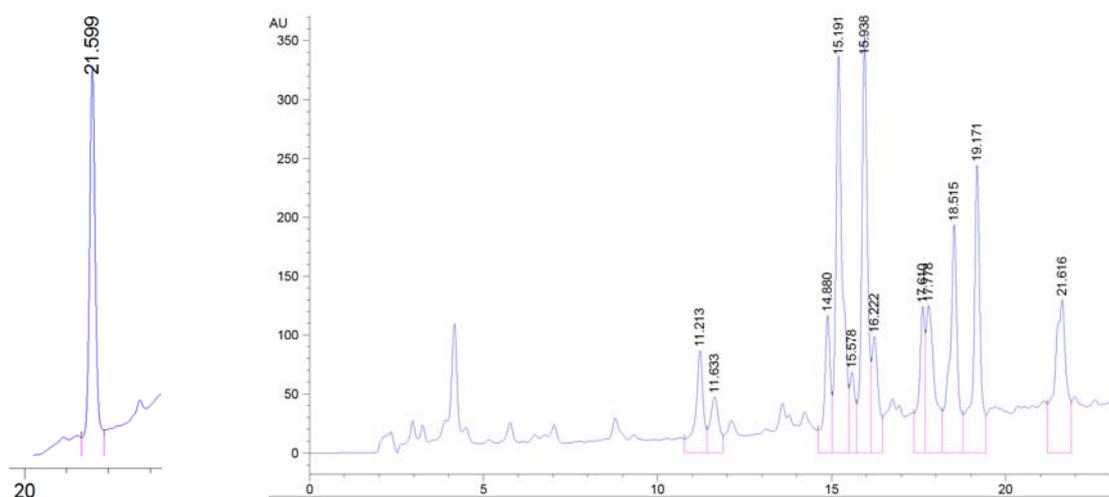


Figura 3.16 Profili HPLC dell'esapeptide Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe prima (figura a sinistra) e dopo (figura a destra) l'irraggiamento nel foto-reattore.

Il picco a t_r 21.61 minuti è il segnale relativo al peptide Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe non reagito, mentre i picchi osservabili a t_r pari a 15.19, 15.94, 17.61, 17.77, 18.52 e 19.17 minuti sono relativi ai prodotti di foto-ciclizzazione. Si osserva innanzitutto che, rispetto alla reazione già studiata per l'analogo rovesciato di questo peptide, in questo caso si ha la formazione di un numero più elevato di composti.

Si è proceduto quindi all'identificazione dei vari prodotti. Purtroppo non è stato possibile separare mediante HPLC preparativo i singoli composti a causa della loro sovrapposizione durante la corsa. La loro separazione tramite *flash chromatography* su gel di silice è risultata più efficace, anche se comunque piuttosto difficile, data la vicinanza dei fattori di ritenzione dei diversi composti.

Il risultato della separazione è illustrato in figura 3.17.

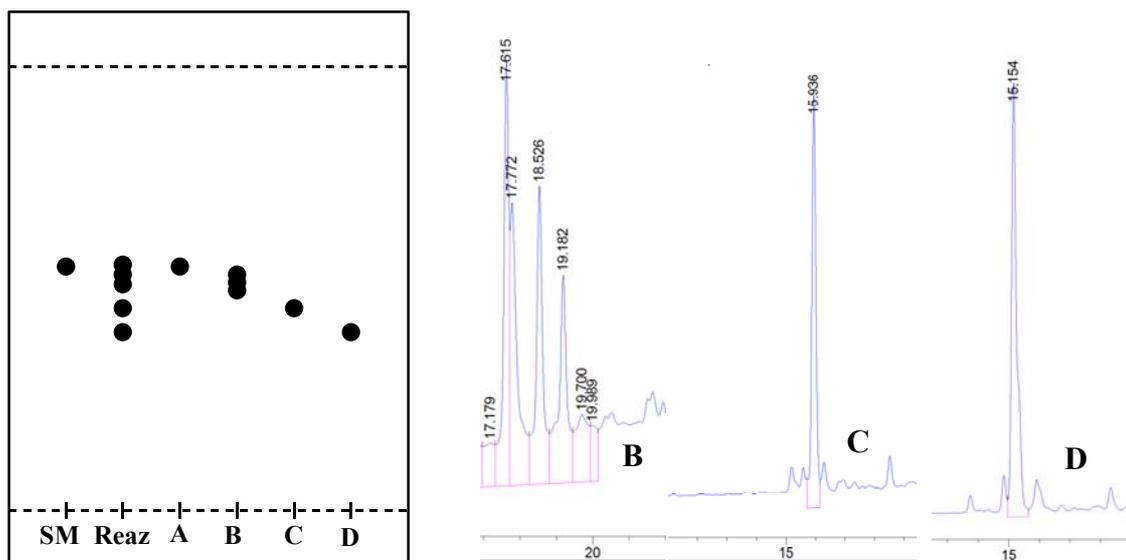


Figura 3.17 Sinistra, TLC riportante **SM** (Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe), **Reaz** (miscela della reazione dopo fotociclizzazione), **A**, **B**, **C**, **D** quattro frazioni dopo purificazione tramite *flash chromatography*. Destra HPLC delle 3 frazioni **B**, **C**, **D**. La frazione **A** è Boc-Aib-Met-Aib-Aib-Bpa-Aib-OMe non reagito.

Sulle frazioni separate è stata condotta una prima analisi tramite spettrometria di massa. Per i picchi a t_r 15.19, 15.94, 17.61, 17.77, 18.52 e 19.17 minuti si è ottenuta la stessa massa (855), compatibile con la formazione di isomeri ciclici intramolecolari.

Dalla frazione **B**, isolata per mezzo di *flash chromatography*, sono stati raccolti i 4 composti illustrati nel profilo del cromatogramma a destra della TLC (figura 3.17). In prima ipotesi si suppone trattarsi dei 4 diastereoisomeri originati dalla reazione intramolecolare tra il Bpa e il gruppo γ -CH₂ della Met.

Per verificare la validità o meno di questa ipotesi è stato registrato lo spettro ¹H-NMR di questa miscela (figura 3.18).

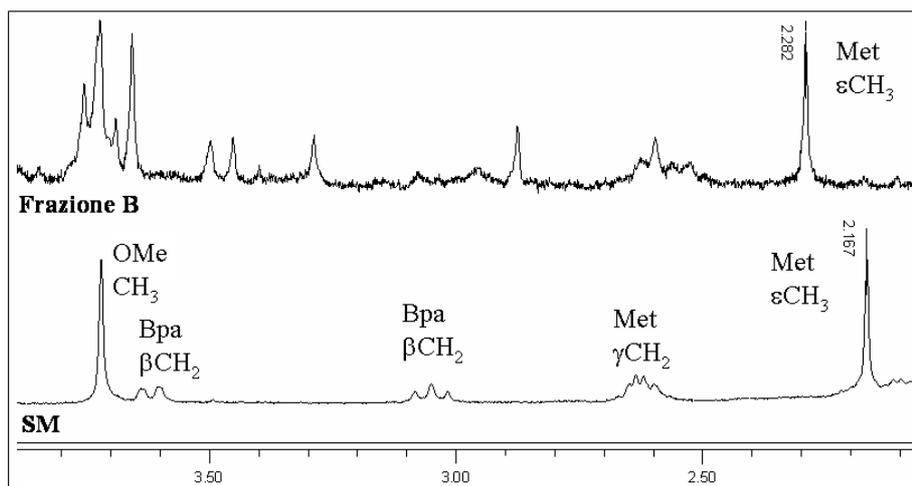


Figura 3.18 Spettri $^1\text{H-NMR}$ di SM e della frazione B.

Tale spettro evidenzia la presenza del segnale relativo ai protoni del gruppo $\epsilon\text{-CH}_3$ della Met spostato ad un valore di *chemical shift* leggermente più alto e la contemporanea scomparsa dei segnali relativi ai $\gamma\text{-CH}_2$, come atteso. In figura 3.19 vengono esemplificate le formule di struttura dei 4 diastereoisomeri ottenuti.

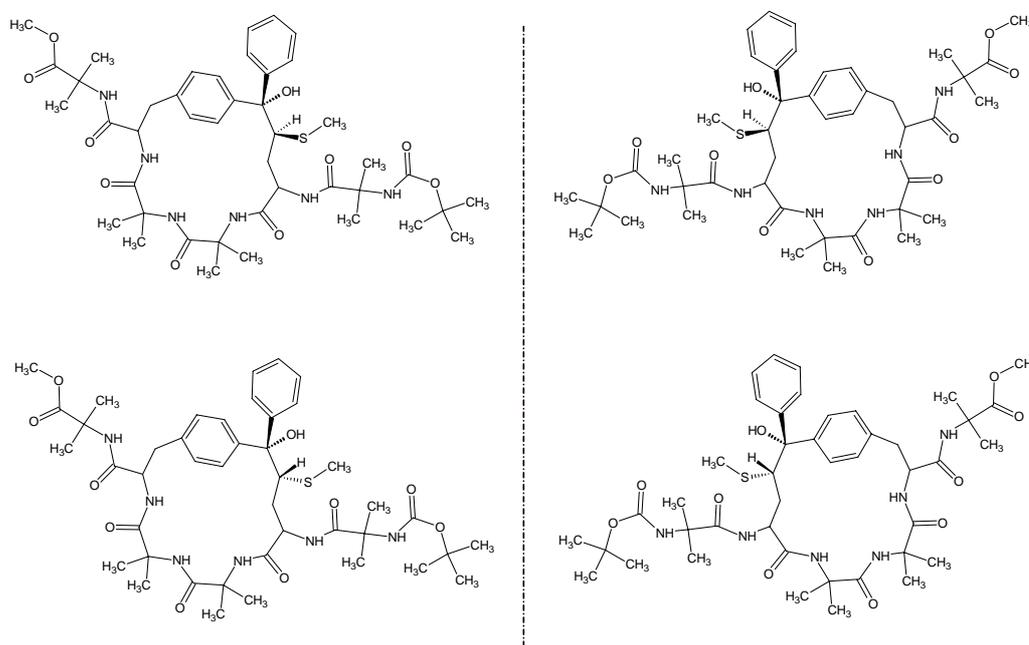


Figura 3.19: Formule di struttura dei 4 diastereoisomeri prodotto di reazione tra Bpa e i protoni $\gamma\text{-CH}_2$ di Met.

In entrambe le frazioni C e D, separate mediante *flash chromatography*, si osserva la presenza di un solo composto (figura 3.17) con tempi di ritenzione t_r di 15.94 e 15.15 minuti, rispettivamente. Questi due picchi, nel cromatogramma della miscela di reazione, risultano

essere di pari intensità. Questo dato è compatibile con l'ipotesi di formazione dei due diastereoisomeri ciclici prodotto di reazione tra il Bpa e il gruppo ε -CH₃ della Met. Per valutare la correttezza di questa ipotesi, sono stati registrati gli spettri ¹H-NMR di queste due frazioni, poi messi a confronto, in figura 3.20, con il composto di partenza. Da tale confronto si evidenzia la scomparsa del segnale di singoletto relativo all' ε -CH₃ della Met.

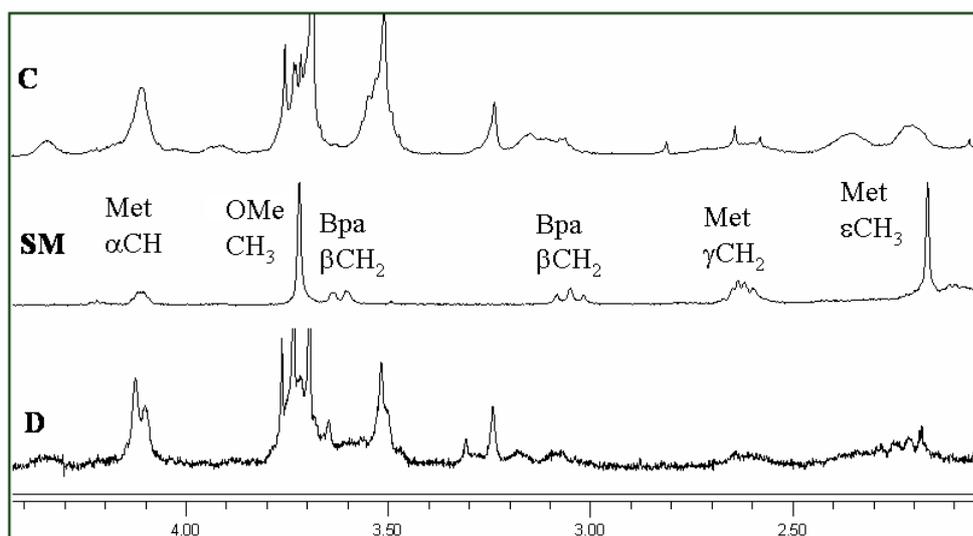


Figura 3.20 Spettri ¹H-NMR di SM e delle frazioni C e D.

In figura 3.21 sono rappresentate le formule di struttura di questi due diastereoisomeri separati.

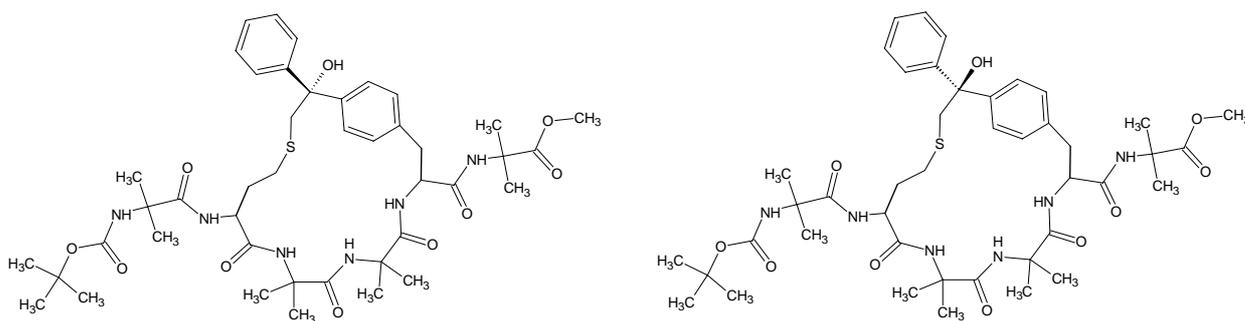


Figura 3.21: Formule di struttura dei 2 diastereoisomeri prodotto di reazione tra Bpa e i protoni ε -CH₃ di Met.

3.3.2 Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$) e Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$)

Con lo studio preliminare di questi 2 peptidi si vuole valutare l'effetto dell'orientamento e della distanza tra Bpa e Met sulla ciclizzazione confrontandolo con l'analogo peptide Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe già studiato presso questo laboratorio.

Nei peptidi in esame, supposto il ripiegamento elicoidale in base a quanto illustrato precedentemente, i due residui di Bpa e Met non si trovano più allineati uno sopra l'altro lungo l'asse dell'elica-3₁₀ (figura 3.22).

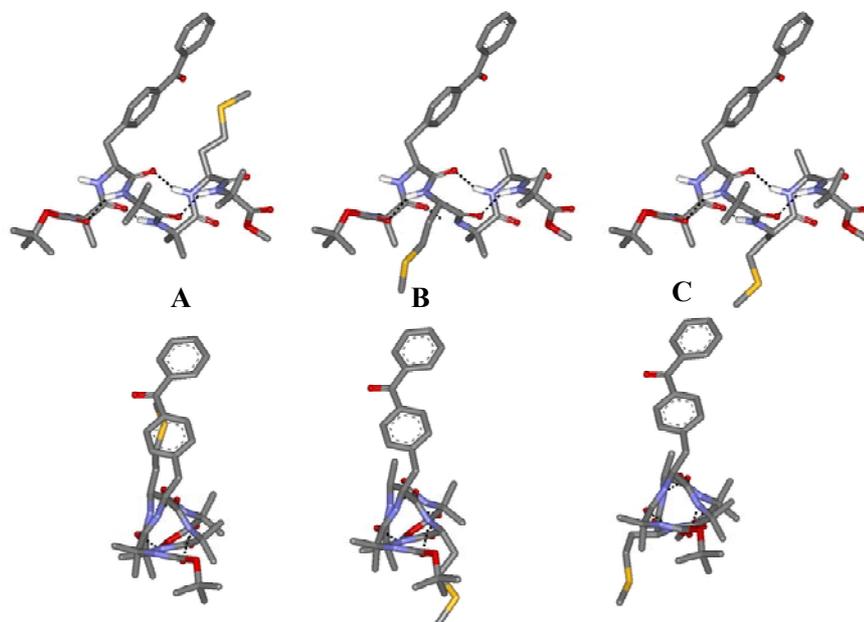


Figura 3.22 Proiezioni tridimensionali esemplificative delle orientazioni e delle distanze tra Bpa e Met. **A:** Boc-Aib-Bpa-Aib-Aib-Met-Aib-OMe; **B:** Boc-Aib-Bpa-Met-Aib-Aib-Aib-OMe; **C:** Boc-Aib-Bpa-Aib-Met-Aib-Aib-OMe.

Come si può osservare, la catena laterale della Met è orientata per **B** e **C** dalla parte opposta dell'elica rispetto alla catena laterale del Bpa, costituita dal benzofenone. Nel peptide **C**, inoltre, la distanza tra le due catene laterali è maggiore rispetto al peptide **B**.

Per la ciclizzazione si è proceduto come descritto nel capitolo di sintesi e caratterizzazione. Si riporta in figura 3.23 il profilo cromatografico HPLC in fase inversa dei due peptidi aperti (**B** e **C**) e delle due corrispondenti miscele di reazione al termine dell'irraggiamento.

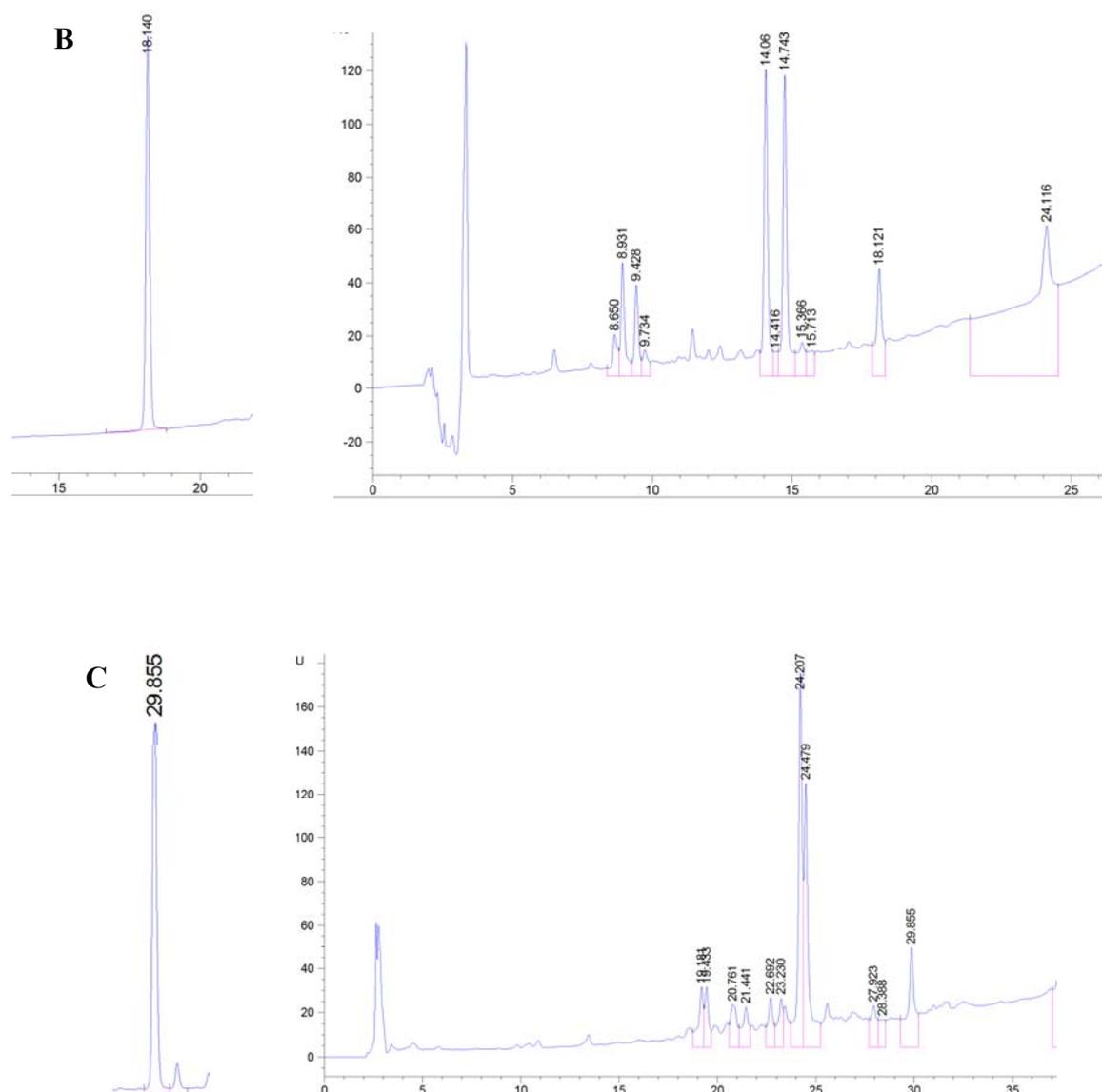


Figura 3.23 Profili HPLC dei due esapeptidi **B** e **C** prima (figure a *sinistra*) e dopo (figure a *destra*) l'irraggiamento nel foto-reattore.

Nel caso del composto **B** il picco a $t_r = 18.12$ minuti è il segnale relativo al peptide Boc-Aib-**Bpa**-Met-Aib-Aib-Aib-OMe non reagito, come confermato dal confronto con l'analogo segnale registrato per il composto prima della reazione. I picchi osservabili a $t_r = 8.65$, 8.93, 9.43, 9.73, 14.06 e 14.74 minuti sono invece relativi ai prodotti di foto-ciclizzazione. Anche in questo caso, come per il peptide descritto sopra, si rileva la presenza di numerosi segnali, indice di una molteplicità di prodotti. Confrontando le intensità relative, tuttavia, si possono identificare due principali prodotti di reazione, con tempi di ritenzione t_r pari a 14.06 e 14.74 minuti, rispettivamente.

I diversi prodotti sono stati raccolti tramite HPLC analitico e caratterizzati con spettrometria di massa. Per tutti i picchi raccolti si è ottenuta la stessa massa (855), compatibile con l'ipotesi di formazione di isomeri ciclici intramolecolari. I quattro segnali a tempi di ritenzione più bassi (t_r 8.65, 8.93, 9.43, 9.73) si ipotizzano appartenenti ai quattro diastereoisomeri ottenuti per reazione tra Bpa e il gruppo γ -CH₂ della Met (figura 3.24).

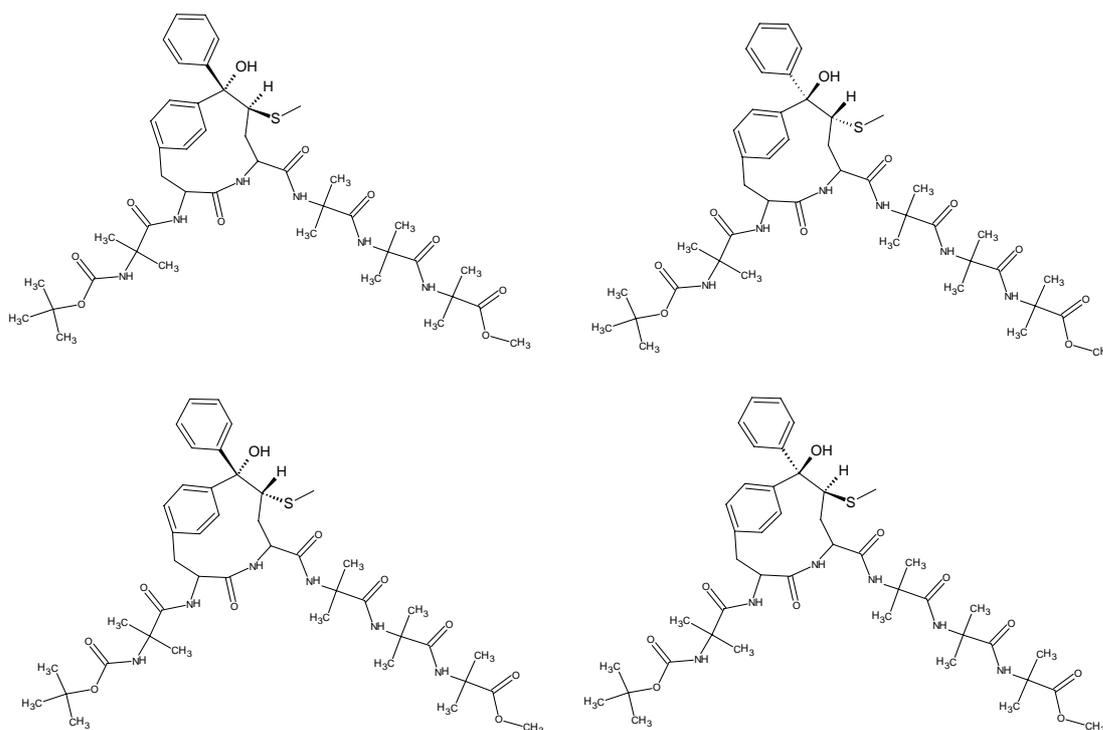


Figura 3.24 Formule di struttura dei 4 diastereoisomeri prodotto di reazione tra Bpa e i protoni γ -CH₂ di Met.

I due picchi principali, si possono ragionevolmente attribuire ai 2 diastereoisomeri ottenuti per reazione tra il Bpa e il gruppo ϵ -CH₃ della Met (figura 3.25).

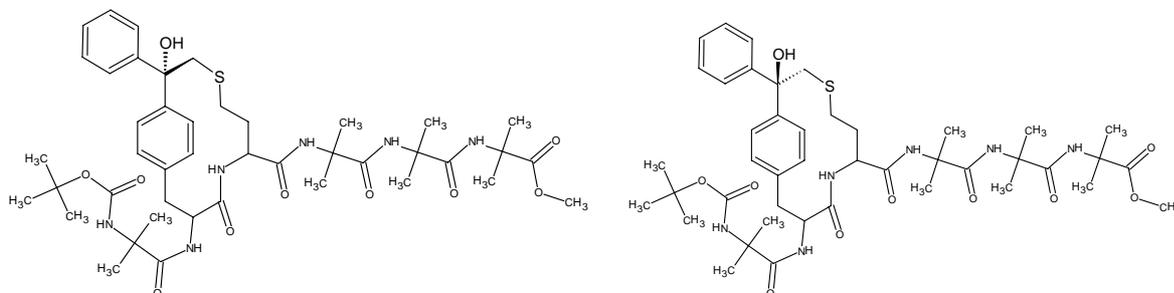


Figura 3.25 Formule di struttura dei 2 diastereoisomeri prodotto di reazione tra Bpa e i protoni ϵ -CH₃ di Met.

E' attualmente in corso l'analisi ¹H-NMR dei composti per confermare tale attribuzione.

Nel caso del peptide **C** dal cromatogramma della miscela di reazione si rilevano due picchi preponderanti ($t_r = 24.21$ e 24.48 minuti), seppur non ben risolti sulla linea di base, di diversa intensità. Questo cromatogramma non fornisce un chiarimento immediato sulla natura dei prodotti formati a seguito dell'irraggiamento. Si riportano in figura 3.26 le rappresentazioni grafiche delle strutture dei possibili prodotti di questa reazione intramolecolare.

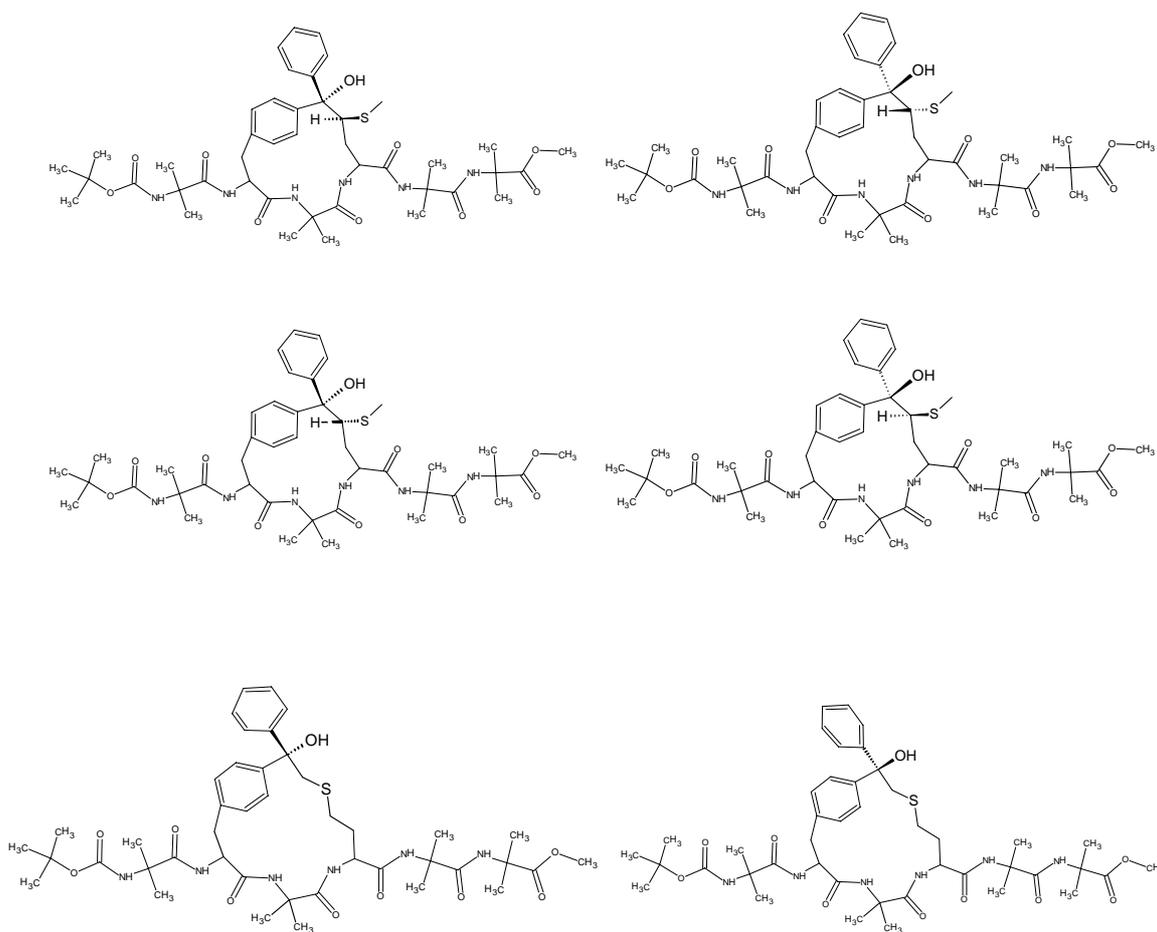


Figura 3.26 *Sopra*: Formule di struttura dei 4 diastereoisomeri prodotto di reazione tra Bpa e i protoni γ -CH₂ di Met. *Sotto*: formule di struttura dei 2 diastereoisomeri prodotto di reazione tra Bpa e i protoni ϵ -CH₃ di Met.

Un tentativo per fare luce sulla natura dei prodotti di reazione è stato fatto registrando lo spettro ¹H-NMR della miscela di reazione (figura 3.27). Come si vede dalla zona spettrale 4-1.6 ppm, nella miscela di reazione è presente il gruppo estere metilico a circa 3.7 ppm, in analogia con il composto di partenza, mentre è assente il gruppo ϵ -CH₃ della Met. Queste preliminari informazioni conducono a ritenere che si siano formati esclusivamente i due diastereoisomeri ottenuti per reazione tra il Bpa e il gruppo ϵ -CH₃ della Met.

Il fatto, inoltre, che i prodotti ottenuti non siano in quantità equimolari fa pensare ad un qualche processo di stereoselezione. Esso è probabilmente pilotato dall'orientamento specifico delle due catene laterali, che la sequenza peptidica costringe in posizione $i \rightarrow i+2$.

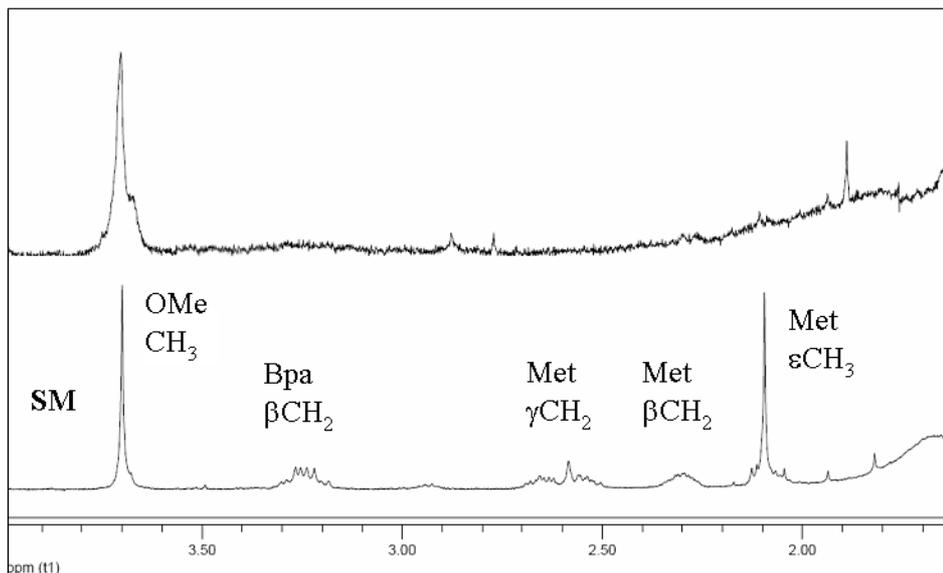


Figura 3.27 Spettri $^1\text{H-NMR}$ di Boc-Aib-**Bpa**-Aib-**Met**-Aib-Aib-OMe (*sotto*) e della sua miscela di reazione dopo irraggiamento (*sopra*).

I risultati di questi esperimenti evidenziano che:

- per tutti e tre i peptidi studiati nel corso di questa Tesi ha luogo la reazione intramolecolare tra il Bpa e la Met;
- la reazione del peptide Boc-Aib-**Bpa**-**Met**-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$) sembra essere la più regioselettiva e quantitativa, in quanto si ottengono quasi esclusivamente i due diastereoisomeri derivanti dalla chiusura del ciclo tra Bpa e $\epsilon\text{-CH}_3$ Met;
- la reazione di fotociclizzazione di Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe, al contrario di quella di Boc-Aib-**Bpa**-Aib-Aib-**Met**-Aib-OMe, porta alla formazione, in buone rese, anche dei quattro stereoisomeri derivanti dalla chiusura del ciclo tra Bpa e $\gamma\text{-CH}_2$ Met, oltre che dei due derivanti dall'interazione con l' $\epsilon\text{-CH}_3$;
- i dati preliminari per Boc-Aib-**Bpa**-Aib-**Met**-Aib-Aib-OMe sembrano mostrare la formazione privilegiata di uno dei possibili diastereoisomeri derivanti dalla chiusura del ciclo tra Bpa e $\epsilon\text{-CH}_3$ Met.

4. CONCLUSIONI

Questo lavoro di Tesi ha posto importanti basi per comprendere la reazione tra il Bpa e la catena laterale della Met, quando l'unità benzofenonica del Bpa viene fotoeccitata. In particolare, le strutture peptidiche rigide ed elicoidali sintetizzate hanno consentito di concludere che regio- e stereoselettività della reazione di macrociclizzazione fotoindotta dipendono dai seguenti parametri:

- distanza Met/Bpa;
- orientazione reciproca delle catene laterali di Met e Bpa;
- allineamento parallelo o antiparallelo della coppia Met/Bpa rispetto all'asse longitudinale dell'elica peptidica.

Tutti e tre gli esapeptidi sintetizzati, ognuno contenente Met e Bpa in posizioni reciproche diverse lungo la catena, hanno dato prodotti di macrociclizzazione, ma con esiti molto diversi.

La reazione fotoindotta su Boc-Aib-**Bpa-Met**-Aib-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+1$) sembra essere la più regioselettiva e quantitativa, in quanto si ottengono quasi esclusivamente i due diastereoisomeri derivanti dalla chiusura del ciclo tra Bpa ed il gruppo ϵ -CH₃ della Met.

Ulteriori studi sono necessari per identificare e caratterizzare con maggiore precisione i diastereoisomeri che si formano nel caso di Boc-Aib-**Bpa**-Aib-**Met**-Aib-Aib-OMe ($i \rightarrow i+2$) e Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe ($i \leftarrow i+3$).

Appaiono tuttavia evidenti le notevoli differenze tra le fotoreazioni di Boc-Aib-**Met**-Aib-Aib-**Bpa**-Aib-OMe e Boc-Aib-**Bpa**-Aib-Aib-**Met**-Aib-OMe, studiato in precedenza. Tali differenze sembrano suggerire un effetto del momento di dipolo dell'elica peptidica sull'andamento della reazione o un allineamento preferenziale (parallelo o antiparallelo) dell'unità benzofenonica lungo l'asse dell'elica.

BIBLIOGRAFIA

1. Dormán, G. e Prestwich, G. D., *Biochemistry*, **33**, 5661 (1994).
2. a) Kauer, J. C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H. R., Jr. e De Grado, W. F., *J. Biol. Chem.*, **261**, 10695 (1986); b) Fillion, D., Deraët, M., Holleran, B. J. e Escher, E., *J. Med. Chem.*, **49**, 2200 (2006); c) Huang, L.-Y., Umanah, G., Hauser, M., Son, C., Arshava, B., Naidler, F. e Becker, J. M., *Biochemistry*, **47**, 5638 (2008); d) Monaghan, D., Thomas, B. E., Woznica, I., Wittelsberger, A., Mierke, D. F. e Rosenblatt, M., *Biochemistry*, **47**, 5889 (2008).
3. Sartori, E., Toffoletti, A., Rastrelli, F., Corvaja, C., Bettio, A., Formaggio, F., Oancea, S. e Toniolo, C., *J. Phys. Chem. A*, **107**, 6905 (2003).
4. Saviano, M., Improta, R., Benedetti, E., Carrozzini, B., Cascarano, G. L., Didierjean, C., Toniolo, C. e Crisma, M., *ChemBioChem*, **5**, 541 (2004).
5. Moretto, A., Crisma, M., Formaggio, F., Huck, L. A., Mangion, D., Leigh, W. J. e Toniolo C., *Chem. Eur. J.*, **15**, 67 (2009).
6. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, 3471 (1970).
7. Venkatachalam, C.M., *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968).
8. Rose, G.D., Gierasch, L.M. e Smith, J.A., *Adv. Protein Chem.*, **37**, 1 (1985).
9. Toniolo, C., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 1 (1980).
10. Toniolo, C. e Benedetti, E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
11. Toniolo, C. e Brückner, H., *Peptaibiotics: Fungal Peptides Containing α -Dialkyl α -Amino Acids*. Zürich, Switzerland: Verlag Helvetica Chimica Acta e Weinheim, Germany: Wiley-VCH (2009).
12. a) Nguyen, H.-H., Imhof, D., Kronen, M., Schlegel, B., Härtl, A., Gräfe, U., Gera, L. e Reissmann, S., *J. Med. Chem.*, **45**, 2781 (2002); b) Yamaguchi, H., Kodama, H., Osada, S., Kato, F., Jelokhani-Niaraki, M. e Kondo, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2269 (2003); c) Sagan, S., Karoyan, Ph., Lequin, O., Chassaing, G. e Lavielle, S., *Curr. Med. Chem.*, **11**, 2533 (2004); d) Sadowsky, J. D., Murray, J. K., Tomita, Y. e Gellman, S. H., *ChemBioChem*, **8**, 903 (2007); e) Zikou, S., Koukkou, A.-I., Mastora, P., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Drainas, C. e Panou-Pomonis, E., *J. Pept. Sci.*, **13**, 481 (2007); f) Miranda, L. P., Winters, K. A., Gegg, C.V., Patel, A., Aral, J., Long, J., Zhank, J., Diamond, S., Guido, M., Stanislaus, S., Ma, M., Li, H., Rose, M. J., Poppe, L. e Véniant, M. M., *J. Med.Chem.*, **51**, 2758 (2008); g) De Zotti, M., Biondi, B., Formaggio, F., Toniolo, C., Stella, L., Park, Y. e Hahm, K.-S., *J. Pept. Sci.*, **15**, 615 (2009).

13. Marshall, G.R., in *Intra-Science Chemistry Reports*, Vol. 5, Kharasch, N. Ed., Gordon and Breach, New York, pp. 305-316 (1971).
14. Venkataram Prasad, B.V. e Sasisekharan, V., *Macromolecules*, **12**, 1107 (1979).
15. Paterson, Y., Rumsey, S.M., Benedetti, E., Némethy, G. e Scheraga, H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947 (1981).
16. Improta, R., Rega, N., Aleman, C. e Barone, V., *Macromolecules*, **34**, 7550 (2001).
17. Paterson, Y., Stimson, E.R., Evans, D.J., Leach, S.J. e Scheraga, H.A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982).
18. a) Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Crisma, M., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2437 (1982); b) Toniolo, C., Bonora, G.M., Barone, V., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Grimaldi, P., Lelj, F., Pavone, V. e Pedone, C., *Macromolecules*, **18**, 895 (1985).
19. Karle, I.L. e Balaram, P., *Biochemistry*, **29**, 6747 (1990).
20. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. e Peggion, C., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **60**, 396 (2001).
21. Geßmann, R., Brückner, H. e Petratos, K., *J. Pept. Sci.*, **9**, 753 (2003).
22. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Broxterman, Q. B. e Kaptein, B., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **76**, 162 (2004).
23. Shizuka, H., Yamaji, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73**, 267 (2000).
24. Von Arx, E., Faupel, M. e Brugger, M., *J. Chromatogr.*, **120**, 224 (1976).
25. Still, W.C., Khan, M. e Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978).
26. a) Meienhofer, J., Waki, M., Heimer, E.P., Lambros, T.J., Makofske, R.C. e Chang, C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **13**, 35 (1978); b) Valle, G. Bonora, G.M. e Toniolo, C., *Can. J. Chem.*, **62**, 2661 (1984).
27. Hofmann, K., Johl, A., Furlenmeier, A.E. e Kappeler, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1638 (1957).
28. Leplawy, M. T., Jones, D. S., Kenner, G. W. e Sheppard, R. C., *Tetrahedron*, **11**, 39 (1960).
29. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).
30. a) Toniolo, C., Crisma, M. e Formaggio, F., *Biopolymers (Pept.Sci)*, **40**, 627 (1996); b) Crisma, M., Valle, G., Moretto, V., Formaggio, F., Toniolo, C. e Albericio, F., *Lett. Pept. Sci.*, **5**, 247 (1998).
31. Bellamy, M., in *"The Infra-Red Spectra of Complex Molecules"*, Methuen, London (1956).
32. Palumbo, M., Da Rin, S., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *Makromol. Chem.*, **177**, 1477 (1976).
33. Bonora, G. M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R. R. e Stevens, E. S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 179 (1984).
34. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
35. Kennedy, D.F., Crisma, M., Toniolo, C. e Chapman, D., *Biochemistry*, **30**, 6541 (1991).

-
36. Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K. e Ernst, R.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7870 (1998).
 37. (a) Bax, A. e Davis, D., *J. Magn. Reson.*, **65**, 207 (1985); (b) Bothner, A.A., Stephens, R.L., Lee, J., Warren, C.D. e Jeanloz, R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984).
 38. a) Martin, R. e Hauthal, G., *"Dimethyl Sulphoxide"*, Van Nostrand-Reinhold, Wokingham, U.K., (1975); b) Pitner, T.P. e Urry, D.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1399 (1972).
 39. K. Wüthrich, *NMR of Protein and Nucleic Acids*, Wiley, New York (1986).

Ringraziamenti

Se al termine di questi mesi di lavoro sono arrivata a confezionare questa Tesi il merito è, naturalmente, di tutti coloro che, con me, hanno collaborato al suo concretizzarsi.

In primo luogo, un ringraziamento sentito va al prof. Toniolo, che in questi mesi ha seguito il mio lavoro, interrogandomi sulle mie sintesi e valutando con me gli esiti talvolta oscuri delle mie reazioni. Lavorare nel suo gruppo di ricerca mi ha insegnato molto sulla “vita di laboratorio” ed è stata un’opportunità che spero di aver saputo cogliere.

Ringrazio di cuore il prof. Formaggio per la disponibilità e la pazienza che ha sempre dimostrato nel rispondere, con precisione e competenza impagabili, alle mie domande estemporanee e alle mie richieste di “illuminazione” di fronte al mistero di una reazione andata storta o di uno spettro anomalo. Il suo supporto di fronte al mio scetticismo è stato davvero importante.

La professoressa Di Valentin si è sempre dimostrata molto disponibile e interessata al mio lavoro, cosa di cui le sono sinceramente grata: discutere con lei delle mie sintesi mi ha spinto a rivedere a e ad approfondire anche ciò che davo per scontato.

Un ringraziamento enorme va al mio “mentore” sotto cappa, il dott. Moretto, per essere stato, letteralmente, al mio fianco in questi mesi, per avermi insegnato quel po’ che sono stata capace di imparare sulle sintesi organiche e sulla vita di laboratorio, per avermi fatto lavorare bene, per avermi incoraggiata nei momenti di sconforto e di stanchezza e per avermi divertita in tutti gli altri.

Ringrazio per l’insostituibile “supporto tecnico (e non solo)” la dott.ssa Peggion e la dott.ssa De Zotti che hanno dato forma ai miei spettri NMR, la dott.ssa Biondi per gli spettri di massa e per la prontezza con cui mi ha illuminato in un paio di questioni oscure. A Salvatore Spatola un ringraziamento particolare per la grande cortesia e disponibilità di fronte alle mie continue richieste di spettri IR, sempre nuovi e sempre migliori.

A Gema un grazie speciale per tutto lo che hay aprendido (avrò scritto bene?) in questi mesi, di chimica e di altro, dentro e fuori dal dipartimento. Grazie per gli spritz che non abbiamo bevuto e per i gelati che ancora ci aspettano!

Difficile è naturalmente trovare le parole giuste per descrivere quale importantissimo e insostituibile aiuto mi abbiano dato in questi mesi tutti coloro con i quali mi sono sfogata e divertita. A cominciare da Edoardo e Vanessa (e la nostra nuova collega Paola), che hanno reso questi mesi di laboratorio intensi e felici, al di là di quanto possano immaginare. Lavorare con loro è stato un piacere e a loro va il mio In bocca al lupo per tutto quello che faranno in futuro.

Non posso citare naturalmente tutti coloro che, al di là e al di qua del corridoio, del cortile, delle Alpi e dell’Oceano sono stati al mio fianco ascoltando i miei sproloqui, sopportando i miei silenzi e soprattutto facendomi ridere e risolleandomi l’umore quando di questo avevo bisogno.

I loro nomi li so a memoria e a memoria me li tengo, certa che prima o poi saprò ricambiarli!

Un grazie gigantesco va a Giulia, per la quale non saprò mai trovare parole adeguate.

Mi ha sopportata e supportata in questi mesi (e anche in tutti quelli che li hanno preceduti) come nessun’ altro avrebbe saputo fare, capendo sempre tutto ciò che c’era da capire.

Un grazie enorme, infine, ai miei genitori, che credono in me, si fidano di questa figlia testarda, per avermi sempre incoraggiata e avermi cresciuta Libera.