



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA**

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SINTESI E STUDI CONFORMAZIONALI DI ANALOGHI
DEL PEPTAIBIOTICO TRICOGINA GA IV,
CONTENENTI API E TOAC**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Controrelatore: Prof. Danilo Pedron

Laureanda: Marion Fiscato

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

INDICE

Indice	i
Riassunto	iii
Abbreviazioni	v
1. INTRODUZIONE	1
1.1. Peptaibolici	1
1.1.1. Ionoforici peptidici	1
1.1.2. Stereochimica dei peptidi contenenti Aib	3
1.1.3. Lipopeptaibolici: Tricogina GA IV	8
1.2. Membrane biologiche	16
1.2.1. Principali caratteristiche delle membrane cellulari	16
1.2.2. Differenze tra membrane di cellule sane e tumorali	18
1.2.3. Caratteristiche ideali dei lipopeptaibolici antitumorali	19
1.3. Scopo della tesi	21
2. PARTE SPERIMENTALE	23
2.1. Materiali e metodi	23
2.1.1. Reagenti e solventi	23
2.1.2. Strumentazione e metodi	24
2.2. Sintesi in soluzione e caratterizzazione	31
2.2.1. Sintesi di derivati dell'amminoacido Api	31
2.2.2. Sintesi peptidica step by step	33
2.3. Sintesi in fase solida e caratterizzazione	36
2.3.1. Sintesi peptidica in fase solida	36
2.3.2. Deprotezione dell'Api e rigenerazione del TOAC	37
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	39
3.1. Sintesi in soluzione	39
3.1.1. Sintesi e caratterizzazione dell' α -amminoacido Api	39
3.1.2. Sintesi peptidica step by step	46
3.2. Sintesi in fase solida	48
3.2.1. Strategia di sintesi	48

3.2.2. Gruppi protettori	50
3.2.3. Metodi di attivazione	54
3.3. Metodiche di caratterizzazione	60
3.4. Indagini conformazionali	63
3.4.1. Assorbimento IR in soluzione	63
3.4.2. Spettroscopia ^1H NMR	71
3.4.3. Dicroismo circolare	74
3.5. Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali	79
4. CONCLUSIONI	87
5. BIBLIOGRAFIA	89

RIASSUNTO

La presente Tesi si inserisce in una linea di ricerca che mira alla sintesi di peptaibolici che svolgano un'attività antitumorale selettiva e alla migliore comprensione del meccanismo di interazione tra i peptidi e le membrane cellulari. In particolare, sono stati sintetizzati in fase solida due analoghi della Tricogina GA IV, contenenti un residuo di acido 4-amminopiperidino-4-carbossilico (Api) e la sonda EPR TOAC, di sequenza:



Le indagini conformazionali in soluzione tramite assorbimento infrarosso e dicroismo circolare hanno evidenziato la presenza di strutture elicoidali stabili. Non è stato invece possibile eseguire l'analisi NMR a causa della presenza della funzione radicalica del TOAC. Inoltre, sono stati condotti degli studi preliminari di interazione con membrane modello dai quali si è dedotto che gli analoghi sono in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici.

Studi EPR approfonditi saranno condotti dal gruppo della prof.ssa Anna Lisa Maniero (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova), mentre l'attività antitumorale sarà valutata presso il Dipartimento di Biochimica dell'Università di Bologna.

Sono inoltre riportate le sintesi in soluzione, le caratterizzazioni e gli studi conformazionali (tramite IR e NMR) di alcuni segmenti della Tricogina.

ABBREVIAZIONI

AA	= Amminoacido generico
Ac	= Acetile
AcOEt	= Acetato di etile
AcOH	= Acido acetico
Aib	= Acido α -amminoisobutirrico
Alloc	= Allilossicarbonile
Api	= Acido 4-amminopiperidino-4-carbossilico
Boc	= <i>Tert</i> -butossicarbonile
(Boc) ₂ NH	= Di- <i>tert</i> -butil immidodicarbonato
(Boc) ₂ O	= Di- <i>tert</i> -butil dicarbonato
CD	= Dicroismo circolare
CDCl ₃	= Deuterocloroformio
CF	= Carbossifluoresceina
Ch	= Colesterolo
CHCl ₃	= Cloroformio
CH ₂ Cl ₂	= Diclorometano
CH ₃ CN	= Acetonitrile
DCM	= Diclorometano
DIPEA	= <i>N,N</i> -Diisopropiletilammina
DMAP	= Dimetilammino-piridina
DMF	= <i>N,N</i> -Dimetilformammide
DMSO	= Dimetilsolfossido
EDC·HCl	= <i>N</i> -Etil- <i>N'</i> -(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato
EP	= Etere di petrolio
EPR	= Electron paramagnetic resonance
ESI	= Electrospray ionization
EtOH	= Etanolo
Et ₂ O	= Etere dietilico
Fmoc	= 9-Fluorenilmetossicarbonile
Fmoc-OSu	= <i>N</i> -(9-Fluorenilmetossicarbonilossi)succinimide
FT-IR	= Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
Gly	= Glicina
HATU	= <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HBTU	= <i>O</i> -(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
Hepes	= Acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico
HFIP	= 1,1,1,3,3,3-Esafluoroisopropanolo
HOAt	= 1-Idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	= 1-Idrossi-1,2,3-benzotriazolo

HPLC	= Cromatografia liquida ad alte prestazioni
Ile	= Isoleucina
IR	= Infrarosso
Leu	= Leucina
Lol	= Leucinolo
MeOH	= Metanolo
MS	= Spettrometria di massa
NMM	= <i>N</i> -Metilmorfolina
NMR	= Risonanza magnetica nucleare
<i>n</i> Oct	= <i>n</i> -Ottanoile
<i>n</i> Oct-OH	= Acido <i>n</i> -ottanoico
OEt	= Etossi
OSu	= 1-Ossi-succinimide
PC	= Fosfatidilcolina
PE	= Fosfatidiletanolamina
PG	= Fosfatidilglicerolo
PS	= Fosfatidilserina
Rf	= Fattore di ritenzione
Ser	= Serina
SDS	= Sodio dodecilsolfato
SUV	= Vescicole unilamellari piccole
TEA	= Trietilamina
TFA	= Acido trifluoroacetico
THF	= Tetraidrofurano
TLC	= Cromatografia su strato sottile
TOAC	= Acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-ossil-4-amino-4-carbossilico
TOF	= Analizzatore a tempo di volo
t_r	= Tempo di ritenzione
Triton X-100	= Polietilenglicole <i>tert</i> -octilfeniletere
UV	= Ultravioletto
Z	= Benzilossicarbonile o Carbobenzossi
Z-OSu	= <i>N</i> -benzilossi-carbonilossi-succinimide

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

1. INTRODUZIONE

1.1. Peptaibolici

1.1.1. Ionoforici peptidici

I peptaibolici costituiscono una classe di composti peptidici di origine fungina che, grazie alle particolari caratteristiche che li contraddistinguono, sono noti per esplicare un'attività antibatterica. Essi, infatti, sono peptidi ionoforici in grado di interagire con le membrane biologiche e di modificarne la permeabilità agli ioni. Tale azione comporta un'alterazione degli equilibri intracellulari che porta alla disgregazione, e quindi alla morte, della cellula aggredita.^[1,2]

Gli ionofori agiscono secondo almeno due meccanismi indipendenti: la formazione di canali nelle membrane, (ionofori *channel former*, **Figura 1.1.1.a**), o il trasporto diretto di ioni, (ionofori *carrier*, **Figura 1.1.1.b**). I primi sono generalmente peptidi lineari in grado di auto-assemblarsi nella membrana creando dei pori attraverso i quali gli ioni possono diffondere liberamente; i secondi sono spesso peptidi ciclici capaci di chelare selettivamente ioni metallici formando complessi lipofili che diffondono attraverso il doppio strato lipidico.^[3]

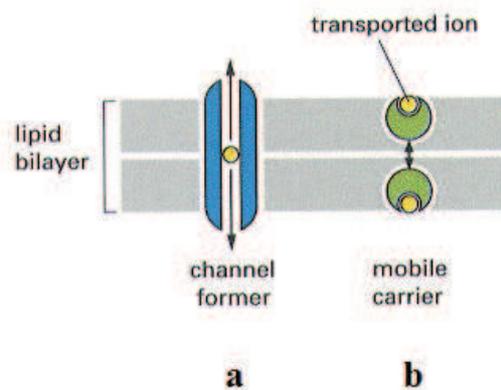


Figura 1.1.1.1. a) Ionoforo *channel former*; **b)** Ionoforo *carrier*.

Gli antibiotici peptaibolici appartengono alla classe di ionofori *channel former* e una selezione rappresentativa di tali composti, con le relative sequenze amminoacidiche, è riportata in **Tabella 1.1.1.1.**^[4]

ANTIBIOTICI PEPTAIBOLICI RAPPRESENTATIVI	
<i>ALAMETICINA</i>	Ac Aib Pro Aib Ala Aib Ala Gln Aib Val Aib Gly Leu Aib Pro Val Aib Aib Glu Gln Fol
<i>TRICORZIANINA</i>	Ac Aib Ala Ala Aib Aib Gln Aib Aib Aib Ser Leu Aib Pro Leu Aib Ile Gln Gln Wol
<i>TRICOTOXINA</i>	Ac Aib Gly Aib Leu Aib Gln Aib Aib Ala Ala Aib Aib Pro Leu Aib Iva Glu Vol
<i>ZERVAMICINA</i>	Ac Trp Ile Glu Iva Val Thr Aib Leu Aib Hyp Gln Aib Hyp Aib Pro Fol
<i>SAMAROSPORINA</i>	Ac Phe Aib Aib Aib Val Gly Leu Aib Aib Hyp Gln Iva Hyp Ala Fol
<i>TRICOVIRINA</i>	Ac Aib Asn Leu Aib Pro Ser Val Aib Pro Aib Leu Aib Pro Lol
<i>CERVININA</i>	Ac Leu Aib Pro Aib Leu Aib Pro Ala Aib Pro Val Lol
<i>ARZIANINA</i>	Ac Aib Asn Leu Ile Aib Pro Iva Leu Aib Pro Lol
<i>TRICOGINA</i>	FA Aib Gly Leu Aib Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
<i>TRICONINGINA KB I</i>	FA Aib Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
<i>TRICONINGINA KB II</i>	FA Iva Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
<i>LP237-F8</i>	FA Aib Pro Phe Aib Gln Gln Aib Etn Gln Ala Lol
<i>TRICODECENINA</i>	FA Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
<i>PEPTAIBOLINA</i>	Ac Leu Aib Leu Aib Fol

FA, (*fatty acid*), indica un acido grasso con un numero di atomi di carbonio compreso tra 8 e 15

Tabella 1.1.1.1. Sequenze amminoacidiche di una selezione rappresentativa di antibiotici peptaibolici.

Il nome **peptaibolici** deriva dal fatto che si tratta di composti lineari di natura **peptidica**, ricchi del residuo amminoacidico C^α-tetrasostituito **Aib**, (acido α-amminoisobutirrico, **Figura 1.1.1.2**), e recanti all'estremità C-terminale un residuo di 1,2-amminoalcol. L'estremità N-terminale è generalmente bloccata da un gruppo acilico; nella maggioranza dei casi si tratta del gruppo acetilico.^[4-6] Nel corso degli ultimi anni sono stati però identificati alcuni peptidi, (Tricogina GA IV,^[7] Triconingine KB I e KB II,^[8] antibiotici LP237-F7,^[9] LP237-F8,^[9,10] e LP237-F5,^[9] Tricodecine I e II,^[11]), che presentano all'estremità N-terminale una catena acilica lineare lunga (**Tabella 1.1.1.1**). Questi composti sono quindi denominati **lipopeptaibolici**.^[12]

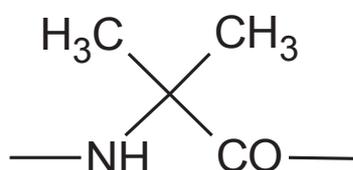


Figura 1.1.1.2. Acido α-amminoisobutirrico, (Aib).

I peptaibolici sono presenti in natura come miscele eterogenee di più componenti le cui sequenze amminoacidiche spesso differiscono per un solo residuo: ciò è probabilmente dovuto alla sintesi non-ribosomiale di questi composti.^[13]

L'attività antibiotica dei peptaibolici si esplica attraverso la modulazione della permeabilità delle membrane biologiche: essi possono dunque avere attività citolitica ed emolitica,^[14] possono disaccoppiare la fosforilazione ossidativa,^[4] e sono in grado di accrescere la permeabilità dei liposomi.^[15] È inoltre noto che alcuni di questi peptidi, come ad esempio l'alameticina, possono creare dei canali voltaggio-dipendenti auto-assemblando un numero variabile di molecole, (da 4 a 12).^[16-19]

La capacità dei peptaibolici di interagire con le membrane cellulari li rende particolarmente interessanti, non solo per le loro proprietà antibiotiche, ma anche per le loro potenzialità come antitumorali. In questa tesi, dunque, verrà discussa la sintesi e la caratterizzazione di due analoghi di un peptide appartenente alla famiglia dei lipopeptaibolici, la Tricogina GA IV, che si pensa potrebbero rivelarsi efficaci nella distruzione delle cellule cancerose. Dettagli riguardanti la Tricogina GA IV, le membrane delle cellule cancerose e le caratteristiche degli analoghi sintetizzati sono discussi nel paragrafo 1.1.3 e nella sezione 1.2.

Nel paragrafo seguente, invece, verrà brevemente riassunto quanto noto circa la conformazione assunta dai peptidi contenenti l'amminoacido Aib, il quale, possedendo particolari propensioni strutturali, influenza la struttura tridimensionale dello scheletro peptidico.^[20] Infatti, negli anni recenti, i peptaibolici sono stati studiati, oltre che dal punto di vista biofisico, anche sul piano conformazionale, al fine di comprendere la relazione esistente tra sequenza peptidica e conformazione e tra questa e l'attività biologica.

1.1.2. Stereochimica dei peptidi contenenti Aib

L'Aib è il più semplice amminoacido C^α-tetrasostituito e possiede una spiccata tendenza a stabilizzare strutture secondarie elicoidali, α-eliche o eliche 3₁₀ (**Figura 1.1.2.1a e b**).^[21,22] Tale proprietà è dovuta alla presenza dei due gruppi metilici sul C^α in grado di indurre una notevole restrizione dello spazio conformazionale, come dimostrato da calcoli di energia conformazionale.^[23-25] Poiché il residuo Aib è achirale, le eliche destrogire e levogire dei suoi oligopeptidi sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. Qualora siano presenti, oltre all'Aib, amminoacidi chirali, il senso di spiralizzazione dell'elica sarà governato dalla chiralità di questi ultimi: gli L-amminoacidi proteici favoriscono eliche destrogire, mentre i D-amminoacidi favoriscono eliche levogire.

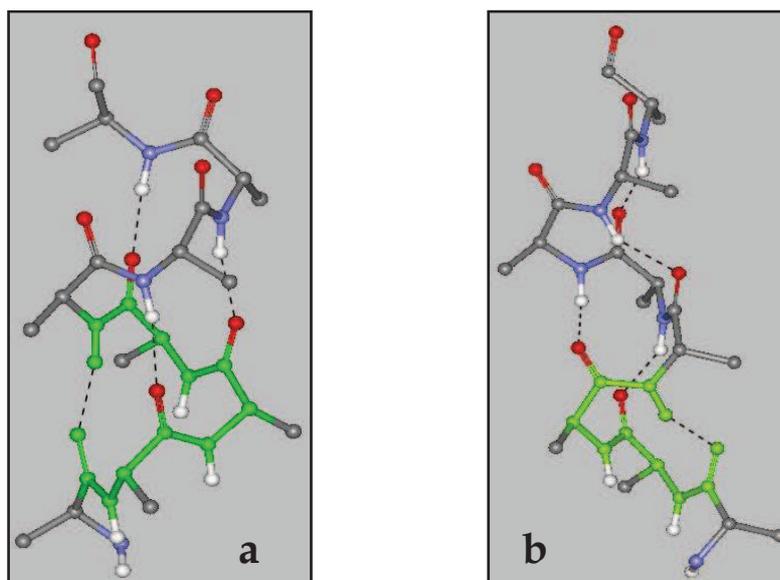


Figura 1.1.2.1. a) α -Elica destrorsa; b) Elica 3_{10} destrorsa.

I parametri più significativi relativi alle eliche destrorse α e 3_{10} sono riportati in **Tabella 1.1.2.1**:

Parametri	Elica α	Elica 3_{10}
ϕ	-63°	-57°
ψ	-42°	-30°
Angolo del legame a idrogeno N-H \cdots O=C	156°	128°
Rotazione per residuo	99°	111°
Traslazione assiale per residuo	1.56 Å	1.94 Å
Numero di residui per giro	3.63	3.24
Passo dell'elica	5.67 Å	6.29 Å

Tabella 1.1.2.1. Parametri principali relativi alle eliche destrorse di tipo 3_{10} e α .^[26]

Per gli angoli torsionali che definiscono la conformazione della catena polipeptidica si utilizza la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la nomenclatura biochimica, (**Figura 1.1.2.2**).^[27]

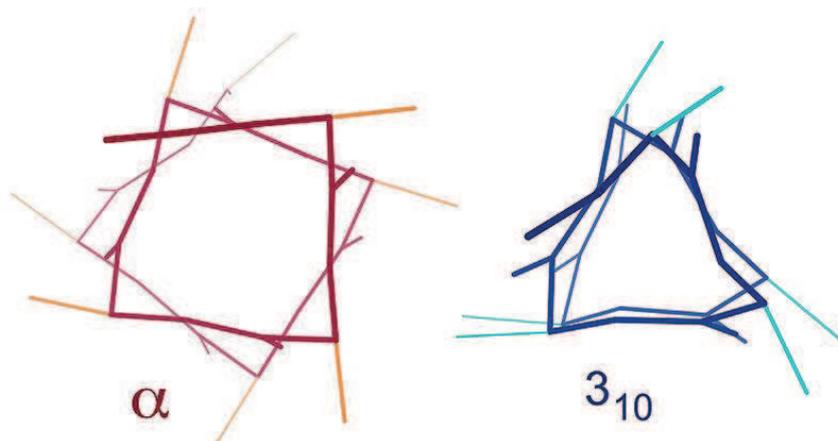


Figura 1.1.2.4. Strutture secondarie ad α -elica, (sinistra), ed elica 3_{10} , (destra), viste dall'alto.

Esistono diversi tipi di ripiegamenti β , piú noti col nome di β -turns, a seconda dei valori degli angoli torsionali assunti dai residui $i+1$ e $i+2$ compresi entro il legame ad idrogeno (Tabella 1.1.2.2): essi sono stati classificati come tipi I, II e III, (ripiegamenti destrogiri, Figura 1.1.2.5), e I', II' e III', (enantiomeri corrispondenti).^[30-34] Una successione di β -turns di tipo III o III' genera eliche 3_{10} destrogire o levogire, rispettivamente.

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

Tabella 1.1.2.2. Valori degli angoli ϕ e ψ per i residui $i+1$ e $i+2$ nei ripiegamenti β di tipo I, II e III.

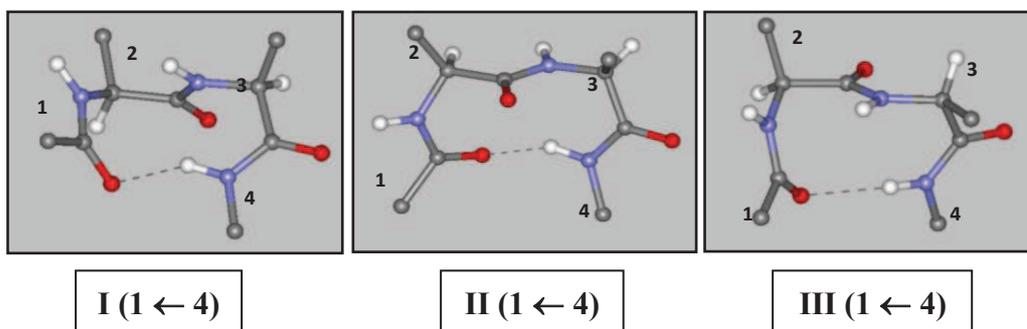


Figura 1.1.2.5. Rappresentazione dei tre tipi di β -turn ideali, (I, II e III), aventi il legame peptidico centrale *trans*.

L'estrema facilità con cui peptidi contenenti Aib forniscono cristalli singoli ha consentito l'analisi mediante diffrazione dei raggi X della serie completa degli

oligopeptidi dell'Aib fino all'undecamero.^[35-46] I tripeptidi N-protetti si ripiegano in un β -turn di tipo III, o III', indipendentemente dalla natura dei gruppi terminali. Tutti gli altri membri superiori della serie formano il numero massimo di strutture C_{10} consecutive di tipo III, o III', compatibile con la lunghezza di catena, generando quindi eliche 3_{10} . A titolo di esempio in **Figura 1.1.2.6** è riportata la struttura del decapeptide $p\text{BrBz}-(\text{Aib})_{10}-\text{OtBu}$.^[43,44]

Indagini conformazionali condotte in soluzione mediante assorbimento IR e spettrometria ^1H NMR indicano che la conformazione elicoidale di tipo 3_{10} prevale nettamente anche in solventi poco polari quale il deuterocloroformio.^[35,47,48]

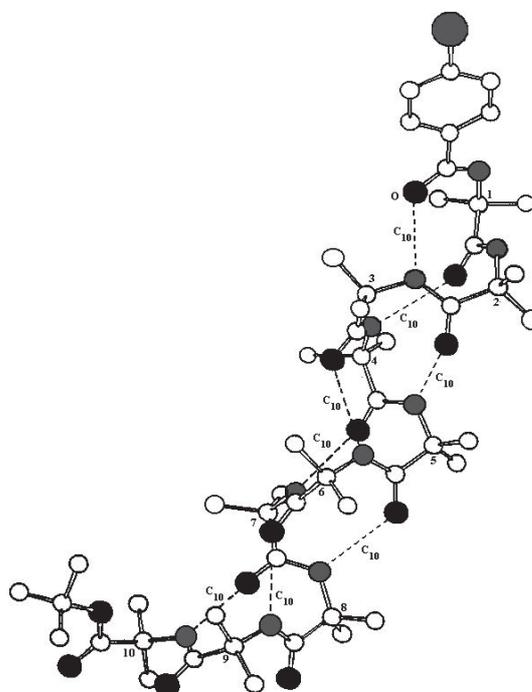


Figura 1.1.2.6. Struttura ai raggi X di $p\text{BrBz}-(\text{Aib})_{10}-\text{OtBu}$; i legami ad idrogeno sono indicati da linee tratteggiate.

Anche nel caso di peptidi contenenti sia residui di Aib, sia residui di amminoacidi proteici C^α -trisostituiti, allo stato cristallino si riscontrano esclusivamente strutture elicoidali. Tali eliche, però, possono essere di tipo 3_{10} , α o “miste”, ossia costituite da un segmento α -elicoidale preceduto e/o seguito da alcune strutture C_{10} . Dall’esame di oltre 40 strutture ai raggi X, riportate in letteratura fino al 1990, di peptidi di lunghezza compresa tra 4 e 16 residui contenenti Aib e amminoacidi proteici emerge che, tra i fattori che concorrono ad orientare la

preferenza conformazionale verso l'una o l'altra struttura elicoidale, vi sono la lunghezza di catena, il contenuto in Aib e la sequenza.^[21,22,49] In particolare, l' α -elica tende ad essere favorita al crescere della lunghezza della catena e al decrescere del contenuto in Aib, anche se le eccezioni sono numerose e il ruolo giocato dalla sequenza è di problematica valutazione.^[50] D'altro canto i peptidi "corti", (fino a sei residui), manifestano una nettissima preferenza per l'elica 3_{10} .

Concludendo, i dati strutturali ottenuti dallo studio sui peptidi contenenti l'acido α -amminoisobutirrico hanno evidenziato l'elevata capacità di tale residuo aminoacidico non proteico di promuovere e stabilizzare i ripiegamenti β e le conformazioni elicoidali.

1.1.3. Lipopeptaibolici: Tricogina GA IV

Gli antibiotici lipopeptaibolici differiscono dagli altri membri della famiglia per la presenza, in posizione N-terminale, di un gruppo acilico di 8-10 atomi di carbonio e per la corta sequenza, (da 7 a 11 residui, includendo l'1,2-amminoalcol C-terminale).^[12]

Non è stato ancora accertato se i lipopeptaibolici siano in grado di formare pori voltaggio-dipendenti in membrane lipidiche planari. È invece documentato che questi peptidi possiedono significativa attività antibiotica contro i batteri Gram-positivi.^[51,52] Inoltre la miscela di LP237-F5,7,8 ha attività citotossica su cellule leucemiche di topo.^[9,16] La Tricogina GA IV e le Triconingine sono in grado di aumentare la permeabilità agli ioni di vescicole fosfolipidiche unilamellari, (SUV), in assenza di un potenziale transmembrana.^[7,8] In particolare, la Tricogina GA IV ha un'attività paragonabile a quella di peptaibolici più lunghi.^[7]

La **Tricogina GA IV** è stato il primo lipopeptaibolico ad essere isolato e, pertanto, è anche il componente di questa famiglia più estesamente studiato. Si tratta di un peptide costituito da 11 residui, la cui sequenza aminoacidica è.^[53]



Indagini conformazionali sono state condotte, in metanolo, mediante ^1H e ^{13}C NMR e CD. Sulla base di questi risultati è stata proposta una conformazione

principalmente α -elicoidale con qualche struttura C_{10} .^[7] Successivamente, è stata risolta la struttura ai raggi X della miscela racemica della Tricogina GA IV, ottenuta facendo co-cristallizzare gli enantiomeri “tutto D” e “tutto L” in quantità equimolari.^[54] Nel cristallo sono presenti due molecole indipendenti per ciascun enantiomero di conformazione molto simile, (**Figura 1.1.3.1a e b**).

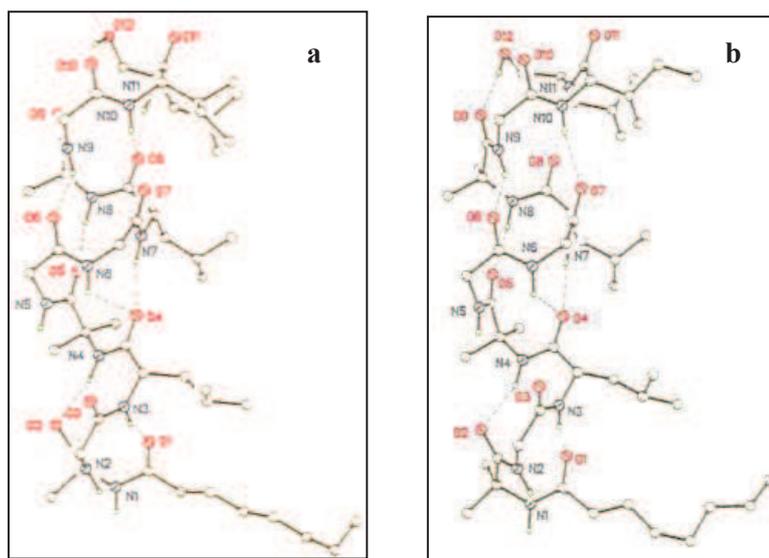


Figura 1.1.3.1. a) Struttura cristallina dell'enantiomero “tutto L” della Tricogina GA IV; **b)** Struttura cristallina dell'enantiomero “tutto D” della Tricogina GA IV. I legami ad idrogeno sono indicati da linee tratteggiate.

Il peptide assume una conformazione elicoidale mista $\alpha/3_{10}$, destrogira per l'enantiomero L e levogira per quello D. In particolare, si riscontra un breve segmento elicoidale 3_{10} nella regione N-terminale, seguito da un segmento più lungo ad α -elica irregolare. Il gruppo ottanoilico N-terminale è orientato perpendicolarmente all'asse dell'elica e la lunghezza della porzione peptidica è circa 16 Å, corrispondente a circa metà dello spessore di una membrana lipidica a doppio strato. Inoltre, il carattere dell'elica è in qualche modo anfifilico, poiché, sebbene manchino residui propriamente idrofilici, i quattro residui di Gly, (l'amminoacido meno idrofobico nella sequenza), sono disposti su una faccia dell'elica, mentre le catene laterali idrofobiche di Leu, Ile, Lol e il gruppo ottanoilico sono disposti sull'altra faccia. Dall'impacchettamento cristallino emerge che tali eliche anfifiliche si dispongono a cerchio a formare un canale in cui sono ospitate molecole d'acqua co-cristallizzate (**Figura 1.1.3.2**). Questo canale si estende all'infinito, in quanto paia

di molecole di uguale senso d'avvolgimento sono connesse testa-coda attraverso legami ad idrogeno intermolecolari.^[54]

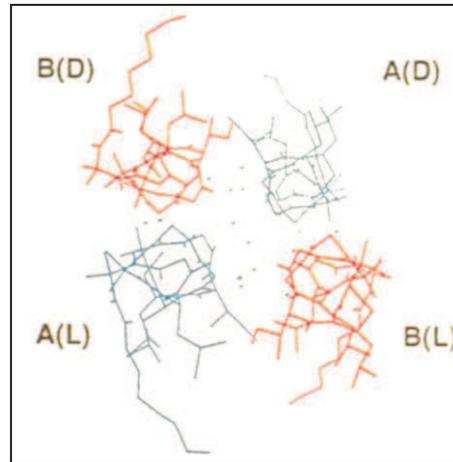


Figura 1.1.3.2. Formazione di canali da parte di eliche di Tricogina GA IV allo stato cristallino, (visione lungo l'asse dell'elica). Le molecole d'acqua sono indicate da punti. Sono indicati inoltre il tipo di enantiomero, (L o D), e di molecola indipendente, (A o B).

È evidente che la Tricogina GA IV, date le sue dimensioni, non è in grado di attraversare da parte a parte la membrana lipidica come fanno, invece, i peptaibolici più lunghi.^[17,19] Di conseguenza, per giustificare la sua attività sulle membrane, occorre invocare un modello di azione diverso.

Esistono almeno due meccanismi indipendenti tramite i quali i peptaibolici elicoidali anfipatici possono modulare la permeabilità delle membrane.^[55,56]

1. **Modello “a doghe di botte”**, in cui un certo numero di eliche peptidiche si associano fra loro inserendosi perpendicolarmente alla membrana e perforandola da parte a parte, dando luogo così alla formazione di un poro (**Figura 1.1.3.3a**);
2. **Modello “a tappeto”**, in cui le eliche peptidiche si dispongono parallelamente alla superficie della membrana e modificano le proprietà fisiche del doppio strato distruggendo l'impaccamento lipidico e/o modificando la curvatura intrinseca di ciascun monostrato, (**Figura 1.1.3.3b**).

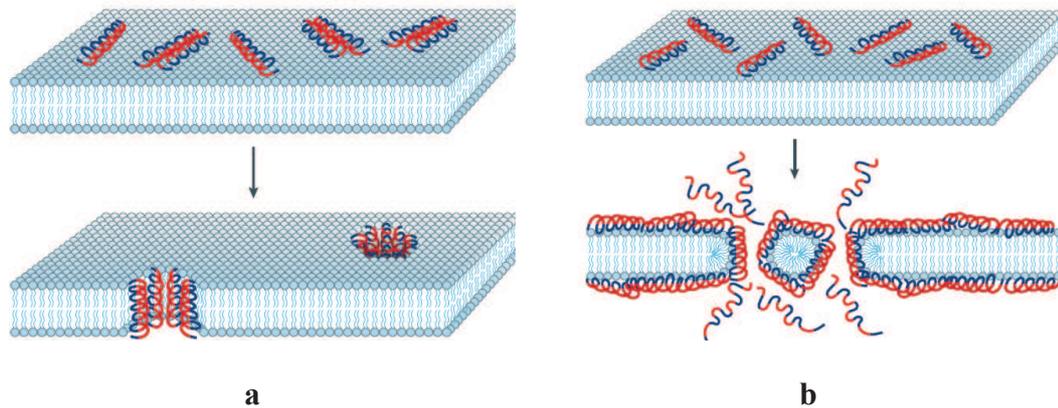


Figura 1.1.3.3. a) Interazione di molecole elicoidali con le membrane cellulari tramite il modello “a doghe di botte”; b) Interazione di molecole elicoidali con le membrane cellulari tramite il modello “a tappeto”.^[57]

Alla luce delle informazioni ricavate dalla struttura cristallina della Tricogina GA IV è stato ipotizzato che questa possa interagire con le membrane secondo un modello a “doghe di botte” modificato (**Figura 1.1.3.4** a destra): le molecole di peptide si legherebbero testa-a-testa in maniera non covalente dando origine a dimeri di lunghezza sufficiente ad attraversare la membrana. Si formerebbe così un canale idrofilico, al cui interno si troverebbero le facce delle eliche ricche di glicine. La funzione del gruppo *n*-ottanoilico potrebbe essere quella di inserirsi tra le facce idrofobiche, governando in qualche misura l'allineamento tra le due metà del poro.

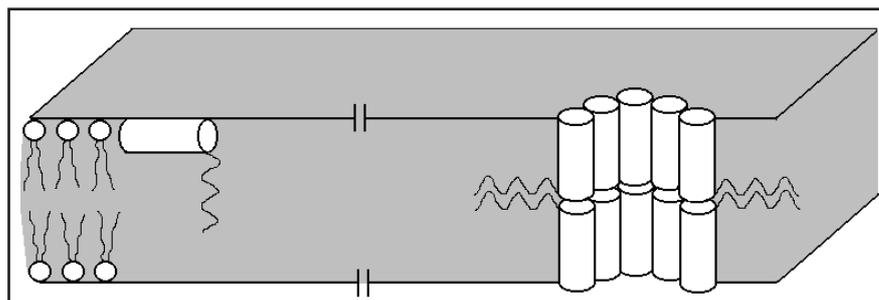


Figura 1.1.3.4. Meccanismo di azione della Tricogina GA IV sulle membrane secondo i modelli “a tappeto”, (sinistra), e “a doghe di botte modificato”, (destra).

La differenza fondamentale tra quest'ultimo modello e quello “a tappeto”, dove la funzione del gruppo ottanoilico sarebbe quella di ancorare la molecola alla superficie della membrana perturbandone l'impaccamento fosfolipidico, consiste nella diversa orientazione del peptide rispetto al piano della membrana.

Per chiarire questo punto nel nostro laboratorio sono stati sintetizzati tre analoghi della Tricogina GA IV, recanti ciascuno un residuo di TOAC, (acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-ossil-4-amino-4-carbossilico, **Figura 1.1.3.5**), in sostituzione dei residui di Aib nelle posizioni 1, 4 e 8 della sequenza.^[58] Il TOAC è un amminoacido C^α-tetrasostituito recante in catena laterale un radicale libero nitrossilico, utile come sonda EPR e quencher di fluorescenza. Esso ha proprietà conformazionali analoghe a quelle dell'Aib: dettagliate analisi hanno infatti dimostrato che il TOAC è un forte induttore di ripiegamenti β e di strutture elicoidali di tipo α e 3₁₀ sia allo stato cristallino che in soluzione.^[22,59-66] Pertanto la sostituzione dell'Aib con il TOAC negli analoghi della Tricogina GA IV mantiene sostanzialmente inalterata la conformazione del peptide.^[22]

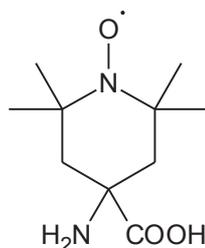


Figura 1.1.3.5. Acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-ossil-4-amino-4-carbossilico, (TOAC).

I risultati dello studio EPR in presenza di liposomi indicano che la Tricogina GA IV si dispone con l'asse elicoidale parallelo alla superficie della membrana lipidica.^[58] Alla stessa conclusione si è giunti operando misure di quenching di fluorescenza da parte dei medesimi peptidi in presenza di membrane lipidiche a doppio strato contenenti sonde fluorescenti a diverse profondità rispetto alla superficie della membrana.^[67] Quanto ottenuto è compatibile con l'ipotesi di un meccanismo di azione della Tricogina GA IV "a tappeto" e non con il meccanismo "a doghe di botte", il quale richiede che l'orientazione del peptide sia perpendicolare al piano della membrana. Và però ricordato che tali risultati sono stati ottenuti in assenza di potenziale transmembrana. Pertanto, essi non sono necessariamente estendibili all'interazione della Tricogina GA IV con una membrana cellulare.

Più recentemente, sempre nel nostro laboratorio, sono stati sintetizzati altri analoghi della Tricogina GA IV contenenti, in opportune posizioni, sonde fluorofore allo scopo di estendere lo studio dell'attività in membrana a tecniche spettroscopiche quali l'assorbimento UV e la fluorescenza.^[68,69] I risultati ottenuti da tali analisi,

condotte su liposomi, hanno portato a concludere che il meccanismo di azione della Tricogina GA IV sui doppi strati sia dominato dall'equilibrio tra una specie inattiva monomeric, che si orienta parallelamente alla superficie del doppio strato, e una forma aggregata, che si inserisce in membrana consentendo il rilascio di marcatori inclusi nei liposomi, (*leakage*). Inoltre, solo il rilascio di sonde di determinate dimensioni, ($r \sim 2$ nm), è risultato favorito; si parla di *size-selective leakage*. Questo dato, assieme al riscontro di una forte correlazione tra concentrazione di aggregato in membrana e perturbazione della membrana stessa, sembrerebbe supportare, al contrario di quanto osservato negli esperimenti EPR, l'ipotesi della formazione di un poro transmembrana, (modello “a doghe di botte”).

Una caratteristica chimica dei lipopeptidici collegabile all'attività nei confronti delle membrane è la presenza della catena acilica in posizione N-terminale. Allo scopo di esaminare il ruolo di questa funzione sulla capacità di modificare la permeabilità delle membrane fosfolipidiche sono stati sintetizzati, nel nostro laboratorio, una serie di [L-Leu¹¹-OMe] analoghi della Tricogina GA IV, recanti una catena acilica di lunghezza variabile da C₂ a C₁₈.^[70] Tutti questi peptidi possiedono un metilestere C-terminale, precursore sintetico dell'amminoalcol, in quanto è stato verificato che la sostituzione del leucinolo, (Lol), C-terminale con Leu-OMe non determina variazioni di attività. Studi conformazionali mediante assorbimento FT-IR, ¹H e ¹³C NMR e CD hanno evidenziato una sostanziale identità conformazionale degli analoghi, fra loro e con il peptide naturale.^[70]

La capacità di modificare la permeabilità delle membrane lipidiche da parte della Tricogina GA IV e dei suoi analoghi è stata esaminata misurando la percentuale di rilascio di una sostanza fluorescente, la carbossifluoresceina, (CF), da vescicole unilamellari, (SUV), costituite da fosfatidilcolina/colesterolo, (PC/Ch), 7:3, per rapporti [peptide]/[lipide] variabili.^[70]

Al crescere della lunghezza della catena lipidica si è osservato un aumento graduale di attività dal C₃ al C₁₀, (il C₂ è sostanzialmente inattivo); quindi una leggera diminuzione andando dal C₁₀ al C₁₄. Gli analoghi C₁₆ e C₁₈ sono praticamente inattivi. Quest'ultimo dato è probabilmente imputabile ad un effetto cinetico dovuto alla minor solubilità in acqua di questi analoghi, se paragonati a quelli recanti catene aciliche più corte; di conseguenza la loro diffusione è più lenta. Infatti, tutte le misure sono state effettuate con un tempo di incubazione di 20 minuti.

Per gli analoghi C₂, C₈ e C₁₆ [L-Leu¹¹-OMe] è stata valutata anche l'attività antibatterica contro lo *Staphylococcus aureus* e quella emolitica su eritrociti umani. I risultati ottenuti combaciano con quanto riscontrato dalle analisi sui liposomi; ovvero l'analogo C₈ e il peptide naturale hanno proprietà identiche, mentre gli analoghi C₂ e C₁₆ sono inattivi.^[70,71]

È dunque evidente che il gruppo alifatico N-terminale svolge un ruolo rilevante nel meccanismo di interazione dei lipopeptaibolici con le membrane cellulari.

Infine, per verificare l'importanza del carattere anfipatico della conformazione elicoidale, è stato sintetizzato un analogo della Tricogina GA IV in cui tutti i residui di glicina sono stati sostituiti da Ser, ([Ser^{2,5,6,9}, L-Leu¹¹-OMe]Tricogina), e ne è stata risolta la struttura ai raggi X.^[72] Dal punto di vista conformazionale, il peptide naturale e l'analogo sono risultati sostanzialmente identici, (**Figura 1.1.3.6**). Invece, la presenza dei quattro residui di Ser allineati su una faccia dell'elica aumenta l'attività emolitica e quella di alterazione della permeabilità delle membrane lipidiche, avendo il peptide un carattere più spiccatamente anfifilico rispetto alla Tricogina GA IV naturale.^[73] Quindi, la conformazione elicoidale anfipatica dei peptaibolici è un'altra caratteristica fondamentale per la loro attività biologica.

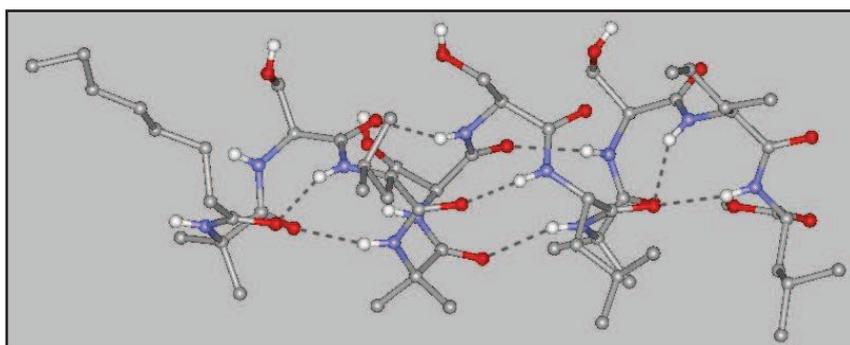


Figura 1.1.3.6. Struttura ai raggi X del [Ser^{2,5,6,9}, L-Leu¹¹-OMe] analogo della Tricogina GA IV. I legami ad idrogeno intramolecolari sono indicati da linee tratteggiate.

Nonostante siano stati chiariti molti aspetti riguardanti l'interazione dei lipopeptaibolici con le membrane batteriche, il meccanismo con cui essi riescono a destabilizzare il doppio strato lipidico non è ancora del tutto definito.

Ciò che rende i peptaibolici particolarmente interessanti per lo sviluppo di farmaci antibiotici e antitumorali è il fatto che, a differenza dei medicinali tradizionali, che hanno come bersagli recettori specifici, la loro azione è semplicemente quella di perturbare le membrane cellulari e risulterebbe dunque molto difficile per le cellule batteriche e cancerose sviluppare meccanismi di resistenza. In aggiunta, la presenza di residui amminoacidici non compresi tra quelli rinvenibili nelle proteine umane ed animali, (i C^{α,α}-disostituiti come l'Aib), conferisce ai peptaibolici un'elevata resistenza agli enzimi proteolitici, favorendo quindi la loro azione antibiotica.^[71,74]

In questo paragrafo sono state delineate le caratteristiche principali della Tricogina GA IV, sia dal punto di vista conformazionale, sia da quello dell'attività antibiotica e si è evidenziata l'utilità di alcune tecniche di analisi che verranno discusse e utilizzate anche in questo lavoro di Tesi. Tuttavia, poiché ci si è prefissi di sintetizzare analoghi della Tricogina GA IV antitumorali e possibilmente selettivi, viene di seguito riportato un breve excursus sulle caratteristiche principali delle membrane cellulari e sulle differenze che intercorrono tra le membrane delle cellule sane e quelle delle cellule tumorali.

1.2. Membrane biologiche

1.2.1. Principali caratteristiche delle membrane cellulari

Le membrane biologiche sono componenti fondamentali delle cellule viventi poiché le delimitano, rendendole sistemi autonomi, ma, al contempo, permettono la comunicazione con l'ambiente esterno prendendo parte a molti processi vitali.^[75]

Un elemento strutturale essenziale delle membrane cellulari è il doppio strato lipidico in cui sono immerse numerose sostanze, come le proteine di membrana, coinvolte nel trasporto attivo o passivo di ioni e altri soluti, e i recettori, coinvolti nella trasmissione dei segnali, (**Figura 1.2.1.1**).

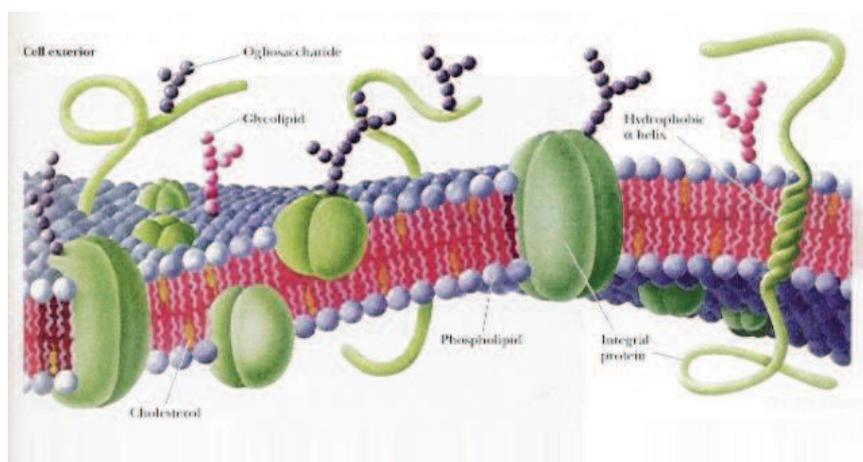


Figura 1.2.1.1. Modello schematico del doppio strato lipidico di una membrana cellulare.^[76]

Il doppio strato lipidico è costituito in larga parte da fosfolipidi, ossia molecole anfipatiche dotate di una testa polare, contenente fosfato, e di una coda idrofobica, composta da due catene di acidi grassi mono- o poli-insaturi.^[77] Quando si trovano in ambiente acquoso, i fosfolipidi risentono dell'effetto idrofobico e si assemblano esponendo le teste polari verso il solvente, mentre le code idrofobiche sono rivolte verso l'interno.^[78] Inoltre, il lato della membrana rivolto verso l'esterno della cellula e quello rivolto verso l'interno non sono simmetrici: il primo è ricco di fosfatidilcolina, (PC, **Figura 1.2.1.2a**), mentre il secondo ha un contenuto maggiore di fosfatidilserina (PS, **Figura 1.2.1.2b**) e fosfatidiletanolamina (PE, **Figura 1.2.1.2c**).^[75] La composizione lipidica del doppio strato varia a seconda del tipo di

cellula e di organismo, ma generalmente le membrane cellulari dei mammiferi presentano una carica netta negativa a pH fisiologico.^[79,80]

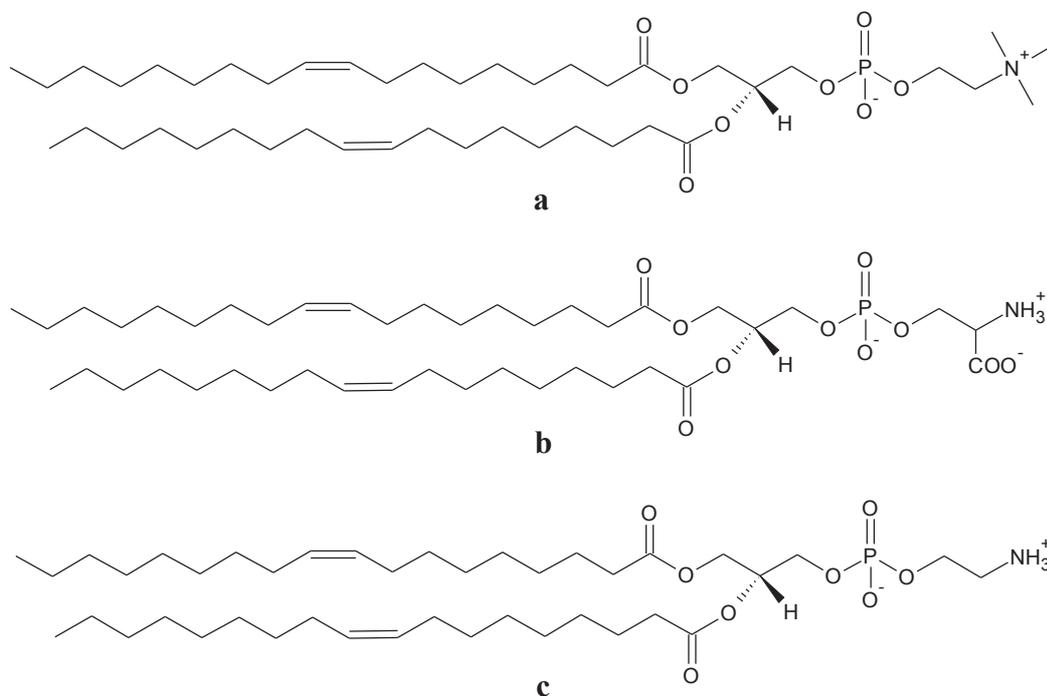


Figura 1.2.1.2. a) 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, (PC); b) 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina, (PS); c) 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanlammina, (PE). Le cariche riportate sono quelle presenti a pH fisiologico.

Una delle funzioni più importanti delle membrane biologiche è il mantenimento di un potenziale elettrico transmembrana, dovuto alla presenza di un gradiente di concentrazione ionica tra l'interno e l'esterno della cellula. Esso viene regolato tramite l'utilizzo di pompe e canali, rispettivamente per il trasporto attivo e passivo degli ioni.^[81,82] Tale potenziale è fondamentale per la vita cellulare in quanto numerosi processi biologici coinvolgono proteine e recettori la cui attivazione dipende dalla concentrazione di determinati ioni. Pertanto, alterando il potenziale transmembrana si può causare la morte della cellula.^[83,84] Proprio questo sembra essere il meccanismo di azione della maggior parte dei peptaibolici: destabilizzano il doppio strato fosfolipidico permettendo il libero passaggio degli ioni da un lato all'altro.^[85]

1.2.2. Differenze tra membrane di cellule sane e tumorali

È stato riscontrato che il contenuto di fosfolipidi nelle membrane delle cellule tumorali può aumentare o diminuire, rispetto a quello mediamente rilevato nelle cellule sane, a seconda del tipo di tumore, dello stadio di avanzamento e del paziente. Inoltre, in tutti i casi la carica netta negativa aumenta.^[75]

I composti che possono contribuire alla carica elettrica di una membrana biologica sono i lipidi, le proteine e gli acidi grassi; in particolare, i fosfolipidi precedentemente elencati, a pH fisiologico, sono zwitterionici (PC e PE) oppure carichi negativamente (PS). La composizione lipidica di una membrana cellulare viene influenzata da molti fattori e una sua variazione può portare ad un'alterazione della fluidità della membrana stessa e della struttura quaternaria dei complessi proteici che vi sono immersi, causando, a sua volta, mutamenti nella loro attività. Conseguentemente, vengono modificati i processi vitali che regolano il ciclo cellulare.^[86] Mentre le membrane delle cellule sane presentano una percentuale più elevata di lipidi contenenti gruppi acidi sul lato interno del doppio strato, nelle cellule cancerose si osserva un aumento di fosfatidilserina sul lato della membrana a contatto con l'ambiente esterno.^[87,88] Quindi, l'aumento di carica netta negativa influenza soprattutto il lato della membrana che deve interagire con eventuali farmaci antitumorali.

Inoltre, il contenuto di colesterolo (**Figura 1.2.2.1**) risulta maggiore nelle membrane delle cellule sane.^[89] esso sembra interferire nell'interazione dei peptaibolici con la membrana cellulare e, di conseguenza, una minor quantità dello stesso all'interno del doppio strato lipidico può contribuire ad aumentare la selettività dei peptaibolici verso le cellule cancerose.^[12]

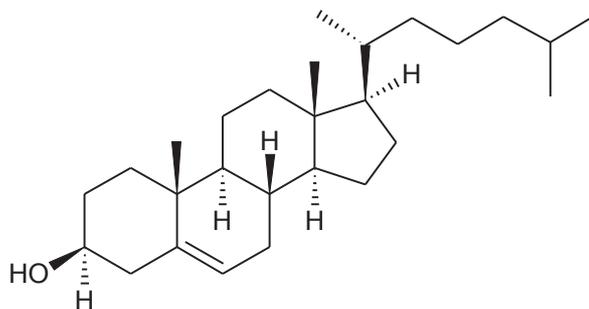


Figura 1.2.2.1. Struttura chimica del colesterolo, (Ch).

1.2.3. Caratteristiche ideali dei lipopeptaibolici antitumorali

I lipopeptaibolici devono la loro capacità di interagire con le membrane biologiche alle loro peculiari caratteristiche strutturali (sezione 1.1):^[12]

1. L'elevato contenuto in Aib determina la preferenza del peptide per una conformazione di tipo elicoidale, la quale favorisce l'interazione con il doppio strato lipidico (molte proteine transmembrana sono ricche di α -eliche);
2. La presenza della catena idrofobica all'estremità N-terminale e dell'1,2-amminoalcol all'estremità C-terminale favorisce l'inserimento del peptide fra le code idrofobiche dei fosfolipidi;
3. La presenza di residui non proteici C ^{α} -disostituiti aumenta la resistenza del peptide alla proteolisi.

Tutte queste caratteristiche devono essere mantenute nella progettazione di analoghi della Tricogina GA IV che possano esplicare un'attività antitumorale, ma bisogna aumentare la loro selettività verso le membrane delle cellule cancerose.

Poiché le cellule tumorali presentano variazioni nella composizione fosfolipidica delle loro membrane e, in particolare, il lato esterno risulta avere una carica netta negativa maggiore rispetto a quello delle cellule sane, si è pensato di inserire nella sequenza un residuo amminoacidico non proteico C ^{α} -tetrasostituito avente una carica positiva in catena laterale. Si tratta dell'**acido 4-amminopiperidino-4-carbossilico (Api, Figura 1.2.3.1)**.

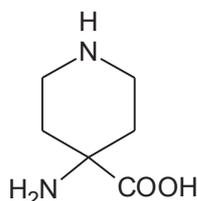


Figura 1.2.3.1. Acido 4-amminopiperidino-4-carbossilico, (Api).

È stato infatti riscontrato che tale α -amminoacido, essendo fortemente ingombrato, stabilizza i ripiegamenti ad elica 3_{10} sia dei suoi oligopeptidi, sia di peptidi contenenti anche residui di Aib e amminoacidi proteici.^[90,91] Inoltre, essendo il gruppo amminico in catena laterale protonato a pH fisiologico,^[90] gli analoghi

contenenti l'Api dovrebbero esibire una certa preferenza per le membrane delle cellule cancerose: è già noto infatti che esso promuove l'attività antibatterica di peptidi che lo contengono.^[92]

1.3. Scopo della tesi

Come precedentemente accennato, lo scopo di questo lavoro di Tesi è la sintesi di analoghi del lipopeptidico Tricogina GA IV che esplicino attività citolitica verso le membrane biologiche e che dimostrino selettività verso quelle delle cellule tumorali.

Si è quindi deciso di inserire nelle sequenze il residuo Api, (**Figura 1.2.3.1**), per le motivazioni elencate nel paragrafo 1.2.3. In particolare, si sono programmate le sintesi di due analoghi della Tricogina GA IV di sequenza:



La presenza della sonda TOAC, che contiene una funzione radicalica, (**Figura 1.1.3.5**), è necessaria per poter investigare, tramite la spettroscopia EPR, le interazioni peptide-membrana in condizioni fisiologiche. TOAC ed Api, amminoacidi C^α-tetrasostituiti promotori di strutture elicoidali, sono stati inseriti al posto di residui di Aib per non modificare la conformazione del peptide.^[22] I peptidici sintetizzati verranno sottoposti a studi conformazionali tramite assorbimento IR e CD per evidenziare analogie e differenze rispetto al loro precursore naturale.

Gli studi EPR saranno condotti dal gruppo della prof.ssa Anna Lisa Maniero (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova), mentre l'attività antitumorale sarà valutata presso il Dipartimento di Biochimica dell'Università di Bologna.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1. Materiali e metodi

2.1.1. Reagenti e solventi

Acros-Janssen (Geel, Belgio): catalizzatore 10% Pd/C, ninidrina.

Astatech (Bristol, USA): acido 1-Boc-piperidin-4-Fmoc-ammino-4-carbossilico.

Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA): 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerolo).

Carbosynth (Berkshire, UK): *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato.

Carlo Erba (Milano): acetato d'ammonio, toluene, trietilamina.

Euriso-Top (St. Aubin, Francia): cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato.

Fluka (Buchs, Svizzera): cianuro di sodio, *N,N*-diisopropiletilamina, dimetilammino-piridina, di-*tert*-butil dicarbonato, 1,1,1,3,3,3-esafluoroisopropanolo, isobutilcloroformiato, *N*-metilmorfolina, polietilenglicole *tert*-octilfenilettere.

GL Biochem (Shanghai, Cina): *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Gly-OH, 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo.

Iris Biotech (Marktredwitz, Germania): *N*-etil-*N'*-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato, *N*-(9-fluorenilmetossicarbonilossi)succinimmide, resina H-L-Lol-2-cloro-tritile.

J. T. Baker (Deventer, Olanda): ammonio carbonato, sodio carbonato.

Macherey-Nagel (Düren, Germania): gel di silice per flash cromatografia.

Merck (Darmstadt, Germania): sodio solfato.

Novabiochem (Svizzera): Boc-Gly-OH, HCl·H-Gly-OEt.

Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA): acetato di etile, acido citrico, acido cloridrico, acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico, acido *n*-ottanoico, acido trifluoroacetico, allilcloroformiato, 1-butanol, 5(6)-carbossifluoresceina, cloroformio, colesterolo, diclorometano, *N,N*-dimetilformammide, 1,2-dimetossietano, 1,4-diosso-8-azaspiro[4,5]decano, etanolo, etere dietilico, etere di petrolio, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, metanolo, piperidina, resina Sephadex G-75, sodio dodecilsolfato, sodio idrossido, soluzione 3N di HCl in metanolo, tetraidrofurano.

VWR International (Leuven, Belgio): acetonitrile, acido acetico, sodio cloruro.

2.1.2. Strumentazione e metodi

Cromatografia su strato sottile

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

CH ₂ Cl ₂ /EtOH 9:1	Rf ₁
1-Butanolo/AcOH/H ₂ O 3:1:1	Rf ₂
Toluene/EtOH 7:1	Rf ₃

I composti contenenti gruppi amminici non protetti sono stati rivelati tramite una soluzione di ninidrina in etanolo, mentre quelli contenenti gruppi protettori aromatici sono stati evidenziati alla lampada UV (254 nm). Si è utilizzata anche l'ossidazione con permanganato.

Flash cromatografia^[93]

La flash cromatografia è stata eseguita utilizzando come fase stazionaria il gel di silice 60 Macherey-Nagel (granulometria 40-63 μm). Il caricamento del campione è avvenuto per adsorbimento su gel di silice.

HPLC

Per le analisi HPLC si è impiegato il cromatografo Agilent Technologies 1200 Series, con rivelazione UV a 226 nm. Sono state utilizzate le colonne analitiche a fase inversa C₁₈ Jupiter 300A (*Phenomenex*) e Zorbax 300A (250 × 4,6 mm; 5 micron).

Come eluente si è fatto uso di una miscela dei seguenti solventi:

A: H₂O 90% - CH₃CN 10% - TFA 0,05% v/v;

B: H₂O 10% - CH₃CN 90% - TFA 0,05% v/v.

Determinazione di punti di fusione

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Stuart modello SMP10 e non sono corretti.

Spettrometria di massa

Gli spettri di massa sono stati registrati con lo spettrometro di massa a tempo di volo Mariner modello ESI-TOF, Perseptive Biosystems, utilizzando 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.

Dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state effettuate con il dicrografo Jasco modello J-715, utilizzando celle di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 0.02 cm. I valori sono espressi in ellitticità molare totale (gradi·cm²·dmol⁻¹):

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

Dove:

- Θ = ellitticità osservata;
- PM = peso molecolare totale del peptide;
- l = lunghezza del cammino ottico in cm;
- c = concentrazione in g/l;
- $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ = differenza tra i coefficienti di estinzione della luce polarizzata levogira e destrogira, rispettivamente.

Spettroscopia di assorbimento IR

Gli spettri di assorbimento FT-IR allo stato solido, in pastiglia di KBr e film su KBr, sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR modello 1720X. Gli spettri di assorbimento FT-IR in soluzione di deuterocloroformio (99,80% d_2 ; *Euriso-Top*) sono stati rilevati utilizzando celle (Perkin-Elmer) con cammino ottico 0.1 e 1 cm e finestre di KBr.

Spettroscopia NMR

Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati con lo spettrometro Bruker modello AC 200. I campioni sono stati disciolti in deuterocloroformio (99,80% d_2 ; *Euriso-Top*) o in dimetilsolfossido deuterato (99,80% d_6 ; *Euriso-Top*). Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione rispetto ai segnali della frazione non deuterata dei solventi. Le molteplicità dei picchi sono espresse come: s – singoletto, d – doppietto, t – tripletto, q – quartetto, dd – doppietto di doppietti, dt – doppietto di tripletti, td – tripletto di doppietti e m – multipletto. La sigla br (“*broad*”) indica un segnale allargato.

Spettroscopia EPR

Gli spettri EPR sono stati eseguiti utilizzando lo spettrometro Bruker ER200D operante a ~ 9.5 GHz (banda X), equipaggiato con cavità rettangolare ER4102ST, dotato di un criostato e con termostato Bruker ER4111VT. La frequenza delle microonde è stata misurata tramite il frequenzimetro HP5342A. Tutti gli spettri sono stati ottenuti impostando i parametri seguenti: potenza delle microonde pari a 5.20 mW (per i campioni degli esperimenti di leakage) o 0.07 mW (per i campioni degli esperimenti di rigenerazione); ampiezza della modulazione pari a 0.05 mT, frequenza della modulazione pari a 100 kHz, costante di tempo di 40 ms; tempo di conversione di 80 ms; ampiezza di scansione pari a 15 mT; 1024 punti; 25 acquisizioni. Tutti gli spettri sono stati eseguiti a temperatura ambiente.

Procedure generali della sintesi su fase solida

I peptidi sono stati sintetizzati step by step attraverso la sintesi manuale in fase solida.

Si è utilizzata la resina H-L-Lol-2-cloro-tritile (loading pari a 0,50 mmol/g). Si sono impiegati amminoacidi protetti con il gruppo Fmoc all' α -NH, mentre per la protezione della catena laterale dell'Api si è utilizzato il gruppo Boc.

Si è seguito il protocollo seguente:

1. Rigonfiamento della resina con DMF anidro tramite agitazione meccanica per 45 minuti (ripetuto 2 volte).
2. Coupling: si aggiunge alla resina una soluzione di Fmoc-AA-OH (2 o 3 equivalenti), HBTU/HATU (2 o 3 equivalenti) e HOBt/HOAt (2 o 3 equivalenti) in DMF anidro. Si iniettano quindi 4 o 6 equivalenti di DIPEA. Si pone sotto agitazione meccanica per un'ora.
3. Si rimuove l'eccesso di reagenti e si lava la resina 8 volte con DMF anidro.
4. La rimozione del gruppo Fmoc avviene attraverso l'iniezione di una soluzione al 20% di piperidina in DMF anidro. Si pone sotto agitazione meccanica per 5 minuti e, successivamente, si ripete l'operazione agitando per 10 minuti.
5. Si rimuove l'eccesso di reagenti e si lava la resina 8 volte con DMF anidro.
6. Si ripetono le operazioni di coupling e di rimozione dello Fmoc fino al termine della sequenza amminoacidica. I coupling di Aib, Api e dei residui successivi a questi (Leu) vengono ripetuti 2 volte.
7. Per l'attacco dell'ottanoile si prepara una soluzione di acido ottanoico (3 equivalenti), EDC (3 equivalenti), HOAt (3 equivalenti) e DIPEA (3 equivalenti) che viene lasciata reagire per 10-12 minuti prima di essere aggiunta alla resina. Si pone sotto agitazione meccanica per un'ora e, al termine, il coupling viene ripetuto una seconda volta.

8. Si rimuove l'eccesso di reagenti e si lava la resina 10 volte con DMF anidro e 5 volte con DCM anidro. Quindi si pone la resina in essiccatore.
9. Il distacco del peptide dalla resina avviene attraverso l'aggiunta di una soluzione di HFIP/DCM 3:7. Si pone sotto agitazione meccanica per un'ora e 15 minuti e, successivamente, si raccoglie la soluzione e si evapora il solvente tramite un flusso di azoto. Si ripete l'operazione altre 2 volte, ma il terzo sblocco viene protratto fino al giorno successivo.
10. Infine, per verificare di aver staccato tutto il peptide dalla resina, si opera uno sblocco con una soluzione all'1% di TFA in DCM, usando H₂O come scavenger e agitando per un'ora e 30 minuti. Anche in questo caso si raccoglie la soluzione e si evapora il solvente.

Tutte le frazioni sono state caratterizzate tramite spettrometria di massa (ESI/TOF) e HPLC. Si è quindi proceduto alla purificazione del peptide tramite cromatografia a fase inversa utilizzando una colonna Sep-Pak C₁₈ e un'eluizione a gradiente con miscele di H₂O/CH₃CN aventi percentuali crescenti di acetonitrile (dal 10% al 100%) e infine con MeOH. Le frazioni contenenti il prodotto sono state riunite, concentrate e liofilizzate.

Successivamente si è rimosso il gruppo Boc dalla catena laterale dell'Api e si è rigenerato il TOAC tramite trattamento basico (si veda il paragrafo 2.3.2) per ottenere il peptide finale.

Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali

Le misure di modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali sono state eseguite seguendo il rilascio di carbossifluoresceina (CF) da vescicole unilamellari (SUV) di fosfatidilcolina/colesterolo 7:3 e di fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerolo 7:3 preparate secondo le seguenti metodologie.

SUV PC/Ch: si sono aggiunti 25,00 mg di PC solida liofilizzata ad una soluzione di CH₂Cl₂ contenente 5,36 mg di Ch. Si è evaporato il solvente tramite un flusso di azoto e, successivamente, la miscela lipidica (PC/Ch 7:3 in moli) è stata posta in essiccatore sotto vuoto per circa 2 ore. Nel frattempo si è preparata una soluzione di carbossifluoresceina 45 mM aggiungendo a 102,90 mg di CF 4,00 ml di acqua, 1,00 ml di una soluzione di NaOH 1N e 1,00 ml di un tampone acquoso di Hepes 30 mM a pH 7.41. Tale soluzione è stata utilizzata per idratare la miscela lipidica che è stata lasciata riposare a temperatura ambiente e al buio per 15 ore. Il giorno successivo la miscela è stata sonicata a 0 °C per 1 ora e, per separare le vescicole SUV dalla carbossifluoresceina non incapsulata, è stata eseguita una gel filtration su colonna di Sephadex G-75 (diametro 2 cm e altezza della fase stazionaria 30 cm) usando come eluente una soluzione di NaCl 100 mM tamponata con Hepes 5 mM, pH 7.40. Infine si è calcolato il fattore di diluizione per la soluzione lipidica.

SUV PE/PG: si sono aggiunti 9,50 mg di PG solida liofilizzata ad una soluzione di CH₂Cl₂ contenente 21,50 mg di PE. I liposomi sono stati preparati con la stessa procedura sopra descritta per le SUV PC/Ch.

La concentrazione totale di lipidi ([PC+Ch] 0,06 mM e [PG+PE] 0,06 mM) è stata mantenuta costante per tutti gli esperimenti che sono stati eseguiti in cuvette di polistirene (1×1 cm) contenenti 2,50 ml di sospensione lipidica.

La CF rilasciata è stata determinata mediante misure di fluorescenza ripetendo l'esperimento a diversi rapporti:

$$R^{-1} = \frac{[peptide]}{[lipide]}$$

che sono stati ottenuti aggiungendo aliquote di una soluzione metanolica del peptide.

Le misure di fluorescenza sono state eseguite con uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS50B a temperatura ambiente, impostando $\lambda_{exc} = 488$ nm e $\lambda_{em} = 520$ nm (rispettivamente massimi di assorbimento ed emissione, **Figura 2.1.2.1**). La percentuale di CF rilasciata dopo 20 minuti dall'aggiunta è stata determinata come:

$$\%CF = \frac{F_t - F_0}{F_T - F_0} \times 100$$

Dove:

- F_0 = intensità di fluorescenza delle vescicole in assenza del peptide;
- F_t = intensità di fluorescenza al tempo t (20 minuti) in presenza del peptide;
- F_T = intensità totale di fluorescenza determinata distruggendo le vescicole mediante addizione di 50 μ l di una soluzione di Triton X-100 al 10% in acqua.

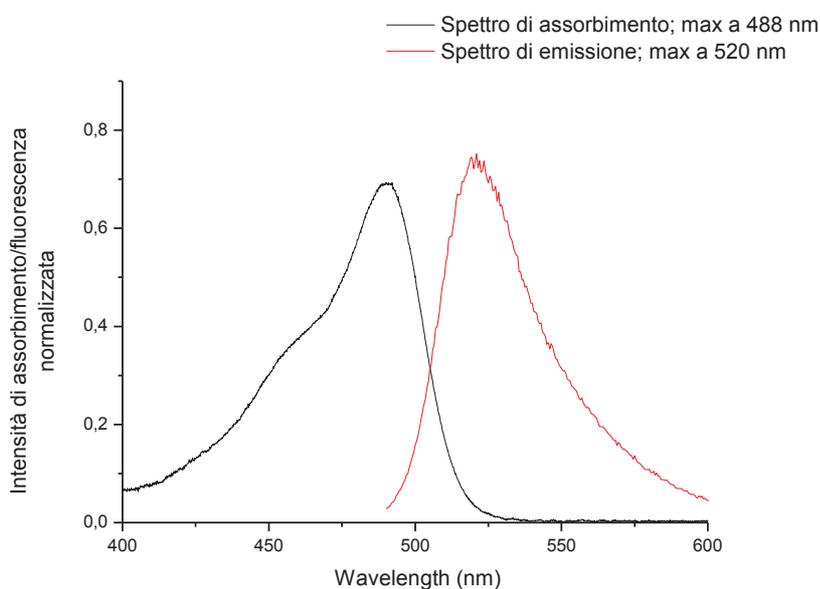


Figura 2.1.2.1. Spettri di assorbimento (curva nera) ed emissione (curva rossa) di una soluzione 50 μ M di 5(6)-carbossifluoresceina in tampone acquoso a pH neutro. Essi sono stati eseguiti a temperatura ambiente rispettivamente con lo spettrofotometro Shimadzu UV-2501PC e con lo spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS50B, impostando $\lambda_{exc} = 488$ nm.

2.2. Sintesi in soluzione e caratterizzazione

2.2.1. Sintesi di derivati dell'amminoacido Api

Piperidina-4-spiro-5'-idantoina^[94]

In un pallone contenente 9,00 ml di 1,4-diosso-8-azaspiro-[4,5]decano (70,21 mmol) si introducono 50 ml di H₂O, 8,80 ml di HCl 12 M (106,27 mmol, 1,5 eq.) e si scalda a riflusso sotto agitazione magnetica per 8 ore. Quindi si lascia tornare la miscela a temperatura ambiente e si aggiungono 18,00 g di (NH₄)₂CO₃ (187,38 mmol, 2,7 eq.), 60 ml di MeOH e 40 ml di una soluzione acquosa contenente 7,40 g di NaCN (150,99 mmol, 2,15 eq.). Si scalda a 50 °C per 24 ore osservando la formazione di un precipitato, quindi si filtra e si lava con H₂O ed Et₂O.

Resa: 74%.

Punto di fusione: carbonizza a 280 °C.

Rf₁ = 0.00; **Rf₂** = 0.45; **Rf₃** = 0.00.

IR (KBr): 3176, 1677, 1654, 1612 cm⁻¹.

¹H NMR (200MHz, DMSO): δ 8.38 [s, 1H, NH]; δ 2.83 [m, 2H, CH₂]; δ 2.67 [m, 2H, CH₂]; δ 1.67 [m, 2H, CH₂]; δ 1.45-1.28 [m, 2H, CH₂].

1-Boc-piperidina-4-spiro-5'-(1',3'-bis-Boc)idantoina^[94]

Si sospendono 1,50 g di piperidina-4-spiro-5'-idantoina (8,87 mmol) in 45 ml di DME e si aggiungono 9,70 g di (Boc)₂O (44,44 mmol, 5 eq.), 0,04 g di DMAP (0,3 mmol, quantità catalitica) e 1,50 ml di TEA (10,78 mmol, 1,2 eq.). Si lascia reagire sotto agitazione magnetica per 48 ore. Quindi si evapora il solvente e si raccoglie il precipitato con CH₂Cl₂; si lava la fase organica con acido citrico 0,5 M, Na₂CO₃ 5% e soluzione satura di NaCl e si anidrifica con Na₂SO₄. Si filtra l'anidrificante, si concentra la soluzione e si precipita con etere di petrolio.

Resa: 89%.

Punto di fusione: carbonizza a 240 °C.

Rf₁ = 0.90; **Rf₂** = 0.95; **Rf₃** = 0.50.

IR (KBr): 1815, 1796, 1777, 1730, 1717, 1684 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 470.2497; [(M - 2Boc)+H]⁺_{sper.} = 270.3683; [(M - Boc)+H]⁺_{sper.} = 370.2081; [M+Na]⁺_{sper.} = 492.2680.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 4.31-3.95 [m, br, 2H, CH₂]; δ 3.75-3.35 [m, br, 2H, CH₂]; δ 2.88-2.56 [m, br, 2H, CH₂]; δ 1.89-1.68 [m, br, 2H, CH₂]; δ 1.58 [s, 9H, Boc CH₃]; δ 1.54 [s, 9H, Boc CH₃]; δ 1.46 [s, 9H, Boc CH₃].

Fmoc-Api(Boc)-OH^[94]

Si sciolgono 1,00 g di 1-Boc-piperidina-4-spiro-5'-(1',3'-bis-Boc)idantoina (2,13 mmol) in 30 ml di DME e si aggiungono 22,50 ml di NaOH 0,2 N (4,50 mmol, circa 2 eq.) Si lascia reagire sotto agitazione magnetica per 5 minuti e si osserva lo sviluppo di CO₂. Si estrae (Boc)₂NH con Et₂O, si raffredda la fase acquosa con un bagno di ghiaccio, la si acidifica fino a pH ≈ 7 con HCl 1 N e si aggiungono 25 ml di DME. Si sciolgono 0,72 g Fmoc-OSu (2,13 mmol, 1 eq.) in 15 ml di DME e si gocciola tale soluzione in quella contenente l'amminoacido. Infine si porta il pH a 8 aggiungendo TEA e si lascia tornare la miscela a temperatura ambiente. Dopo 24 ore si evapora il DME e si acidifica fino a pH ≈ 3 con HCl 1 N: si osserva la formazione di un precipitato che viene estratto con AcOEt. Si lava la fase organica con acido citrico 0,5 M e soluzione satura di NaCl e si anidrifca con Na₂SO₄. Si filtra l'anidrificante e si tira a secco. Si purifica il composto grezzo attraverso flash cromatografia a gradiente utilizzando come eluente di partenza la miscela CH₂Cl₂/EtOH 99:1 con 0,1% AcOH, e come eluente finale la miscela CH₂Cl₂/EtOH 9:1 con 0,1% di AcOH. Si recuperano le frazioni con il prodotto e si rimuove il solvente.

Resa: 30%.

Punto di fusione: 106-112 °C.

Rf₁ = 0.70; **Rf₂** = 0.95; **Rf₃** = 0.15.

IR (KBr): 3326, 1716, 1697, 1670, 1528 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 467.2177; [(M - Boc)+H]⁺_{sper.} = 367.1522; [M+H]⁺_{sper.} = 467.2133; [M+Na]⁺_{sper.} = 489.1965.

HPLC (gradiente: da 20 a 80% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Jupiter 300A): t_r = 23.48 min.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.76 [d, 2H, Fmoc CH aromatici]; δ 7.57 [d, 2H, Fmoc CH aromatici]; δ 7.45-7.28 [m, 4H, Fmoc CH aromatici]; δ 5.11 [s, br, 1H, α-NH]; δ 4.54-4.38 [m, br, 3H, Fmoc CH₂ e CH]; δ 3.98-3.71 [m, br, 2H, Api CH₂]; δ

3.27-2.94 [m, br, 2H, Api CH₂]; δ 2.13-1.80 [m, br, 4H, Api CH₂]; δ 1.46 [s, 9H, Boc CH₃].

2.2.2. Sintesi peptidica step by step

Si riporta di seguito la sintesi del tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt corrispondente ai residui dal 2 al 5 della Tricogina GA IV. Il progetto iniziale prevedeva di utilizzare tale frammento per la sintesi a segmenti di un analogo della Tricogina contenente un residuo di Api in posizione 8, ma, a causa degli elevati tempi di sintesi e dei costi, la parte di sintesi peptidica in soluzione non è stata completata. Si è operata, invece, la sintesi in fase solida, che richiede minori quantità di reagenti e minori tempi di sintesi. I peptidi preparati in soluzione sono comunque stati caratterizzati e ne è stata studiata la conformazione mediante assorbimento IR. Inoltre, del tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt, contenente un ripiegamento β, è stata valutata la capacità di permeare i doppi strati fosfolipidici.

Oltre ai prodotti riportati nella sezione *Reagenti e solventi*, si sono utilizzati i derivati Z-Aib-OH e Z-Leu-OH, precedentemente sintetizzati nel nostro laboratorio.

Z-Aib-Gly-OEt

Si sciolgono 9,38 g di Z-Aib-OH (39,52 mmol) in 60 ml di THF; si raffredda la soluzione tramite un bagno di ghiaccio e sale e si aggiungono 3,90 ml di NMM (35,39 mmol, circa 1 eq.) e 5,20 ml di isobutilcloroformiato (39,79 mmol, 1 eq.). Nel frattempo si prepara una seconda soluzione sciogliendo 6,07 g di HCl·H-Gly-OEt (43,50 mmol, 1,1 eq.) in 50 ml di CHCl₃ e aggiungendo 4,50 ml di NMM (40,84 mmol, circa 1 eq.); anche quest'ultima viene raffreddata in un bagno di ghiaccio. Quindi si gocciola la seconda soluzione nella prima e si lascia tornare la miscela a temperatura ambiente. Dopo 5 ore si evapora il solvente e si raccoglie il precipitato con AcOEt; si lava la fase organica con acido citrico 0,5 M, Na₂CO₃ 5% e soluzione satura di NaCl e si anidifica con Na₂SO₄. Si filtra l'anidrificante, si concentra la soluzione e si precipita con etere di petrolio; si ottiene un olio.

Resa: 61%.

Rf₁ = 0.85; **Rf₂** = 0.85; **Rf₃** = 0.40.

IR (KBr): 3334, 1723, 1664, 1522 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): $[M+H]^+_{\text{calc.}} = 323.1601$; $[M+H]^+_{\text{sper.}} = 323.1744$.

$^1\text{H NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ 7.35 [s, 5H, Z CH fenilici]; δ 6.76 [t, br, 1H, Gly NH]; δ 5,26 [s, 1H, Aib NH]; δ 5,10 [s, 2H, Z CH_2]; δ 4.21 [q, 2H, Et CH_2]; δ 4.01 [d, 2H, Gly α - CH_2]; δ 1.56 [s, 6H, Aib β - CH_3]; δ 1.28 [t, 3H, Et CH_3].

Z-Leu-Aib-Gly-OEt

Si sciolgono 6,57 g di Z-Leu-OH (24,61 mmol) in 50 ml di THF; si raffredda la soluzione tramite un bagno di ghiaccio e sale e si aggiungono 2,80 ml di NMM (25,41 mmol, circa 1 eq.) e 3,00 ml di isobutilcloroformiato (39,79 mmol, circa 1 eq.). Nel frattempo si prepara una seconda soluzione sciogliendo 3,85 g di H-Aib-Gly-OEt (20,44 mmol, circa 1 eq.; ottenuto per idrogenazione catalitica con Pd/C in EtOH del corrispondente Z-derivato) in 20 ml di CH_2Cl_2 e aggiungendo 2,50 ml di NMM (22,69 mmol, circa 1 eq.); anche quest'ultima viene raffreddata in un bagno di ghiaccio. Quindi si gocciola la seconda soluzione nella prima e si lascia tornare la miscela a temperatura ambiente. Dopo 12 ore si evapora il solvente e si raccoglie il precipitato con AcOEt; si lava la fase organica con acido citrico 0,5 M, Na_2CO_3 5% e soluzione satura di NaCl si anidrifca con Na_2SO_4 . Si filtra l'anidrificante, si concentra la soluzione e si precipita con etere di petrolio.

Resa: 57%.

Punto di fusione: 118-119 °C.

$\text{Rf}_1 = 0.75$; $\text{Rf}_2 = 0.95$; $\text{Rf}_3 = 0.30$.

IR (KBr): 3337, 3290, 1758, 1693, 1657, 1527 cm^{-1} .

MS (ESI-TOF): $[M+H]^+_{\text{calc.}} = 436.2442$; $[M+H]^+_{\text{sper.}} = 436.2516$; $[M+\text{Na}]^+_{\text{sper.}} = 458.2298$.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.34 [s, 5H, Z CH fenilici]; δ 6.99 [m, br, 1H, Gly NH]; δ 6.50 [s, 1H, Aib NH]; δ 5.17 [d, 1H, Leu NH]; δ 5,11 [s, 2H, Z CH_2]; δ 4.18 [q, 2H, Et CH_2]; δ 4.05 [m, 1H, Leu α -CH]; δ 3.95 [m, 2H, Gly α - CH_2]; δ 1.65 [m, 3H, Leu β - CH_2 e γ -CH]; δ 1.55 [s, 3H, Aib β - CH_3]; δ 1.52 [s, 3H, Aib β - CH_3]; δ 1.26 [t, 3H, Et CH_3]; δ 0.93 [m, 6H, 2 Leu δ - CH_3].

Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt

Si sciolgono 1,89 g di Boc-Gly-OH (10,79 mmol) in 60 ml di THF; si raffredda la soluzione tramite un bagno di ghiaccio e sale e si aggiungono 1,20 ml di

NMM (10,89 mmol, 1 eq.) e 1,40 ml di isobutilcloroformiato (10,71 mmol, 1 eq.). Nel frattempo si prepara una seconda soluzione sciogliendo 2,90 g di H-Leu-Aib-Gly-OEt (9,63 mmol, circa 1 eq.; ottenuto per idrogenazione catalitica con Pd/C in EtOH del corrispondente Z-derivato) in 30 ml di CH₂Cl₂ e aggiungendo 1,20 ml di NMM (10,89 mmol, circa 1 eq.); anche quest'ultima viene raffreddata in un bagno di ghiaccio. Quindi si gocciola la seconda soluzione nella prima e si lascia tornare la miscela a temperatura ambiente. Dopo 12 ore si evapora il solvente e si raccoglie il precipitato con AcOEt; si lava la fase organica con acido citrico 0,5 M, Na₂CO₃ 5% e soluzione satura di NaCl e si anidrifca con Na₂SO₄. Si filtra l'anidrificante, si concentra la soluzione e si precipita con etere di petrolio.

Resa: 70%.

Punto di fusione: 91-94 °C.

Rf₁ = 0.65; **Rf₂** = 0.95; **Rf₃** = 0.25.

IR (KBr): 3365, 3288, 1742, 1653, 1530 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 459.2813; [M+H]⁺_{sper.} = 459.2750.

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 6.91 [m, br, 1H, Gly⁴ NH]; δ 6.70 [s, 1H, Aib NH]; δ 6.52 [d, 1H, Leu NH]; δ 5.33 [m, br, 1H, Gly¹ NH]; δ 4.35 [m, 1H, Leu α-CH]; δ 4.19 [q, 2H, Et CH₂]; δ 4.00 [m, 2H, Gly α-CH₂]; δ 3.81 [m, 2H, Gly α-CH₂]; δ 1.63 [m, 3H, Leu β-CH₂ e γ-CH]; δ 1.58 [s, 3H, Aib β-CH₃]; δ 1.50 [s, 3H, Aib β-CH₃]; δ 1.45 [s, 9H, Boc CH₃]; δ 1.28 [t, 3H, Et CH₃]; δ 0.93 [m, 6H, 2 Leu δ-CH₃].

2.3. Sintesi in fase solida e caratterizzazione

2.3.1. Sintesi peptidica in fase solida

Oltre ai prodotti riportati nella sezione *Reagenti e solventi*, si è utilizzato il derivato Fmoc-TOAC-OH, precedentemente sintetizzato nel nostro laboratorio.

Oct-TOAC-Gly-Leu-Api(Boc)-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol

Il peptide è stato sintetizzato in modo manuale utilizzando il protocollo generale descritto nel paragrafo 2.1.2, a partire da 100 mg di resina H-L-Lol-2-clorotritile (0,05 mmol). Si è ottenuto il prodotto grezzo con resa del 52%. Esso è stato purificato tramite cromatografia a fase inversa impiegando una colonna Sep-Pak C₁₈ e seguendo la procedura descritta nel medesimo paragrafo.

Resa: 16%.

IR (KBr): 3317, 1658, 1538 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 1319.8787; [M+H]⁺_{sper.} = 1319.8421; [(M - Boc)+2H]⁺⁺_{sper.} = 610.4053.

HPLC (gradiente: da 50 a 100% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A): t_r = 22.77 min.

Oct-TOAC-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Api(Boc)-Gly-Ile-Lol

Il peptide è stato sintetizzato in modo manuale utilizzando il protocollo generale descritto nel paragrafo 2.1.2, a partire da 100 mg di resina H-L-Lol-2-clorotritile (0,05 mmol). Si è ottenuto il prodotto grezzo con resa del 96%. Esso è stato purificato tramite cromatografia a fase inversa impiegando una colonna Sep-Pak C₁₈ e seguendo la procedura descritta nel medesimo paragrafo.

Resa: 29%.

IR (KBr): 3318, 1660, 1537 cm⁻¹.

MS (ESI-TOF): [M+H]⁺_{calc.} = 1319.8787; [M+H]⁺_{sper.} = 1319.8580; [(M - Boc)+2H]⁺⁺_{sper.} = 610.4093.

HPLC (gradiente: da 50 a 100% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A): t_r = 24.54 min.

2.3.2. Deprotezione dell'Api e rigenerazione del TOAC

Oct-TOAC-Gly-Leu-Api-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol

In un pallone contenente 7,60 mg ($5,76 \cdot 10^{-3}$ mmol) di peptide protetto si aggiungono 3,00 ml di una soluzione 3N di HCl in MeOH e si lascia reagire sotto agitazione per 90 minuti. Il distacco del gruppo Boc viene seguito tramite HPLC (gradiente: da 50 a 100% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A). Al termine evapora il solvente e si lava più volte con CH₂Cl₂ anidro. Quindi, si scioglie il solido in 2,00 ml di MeOH e si aggiungono 3,00 ml di una soluzione tampone di CH₃COONH₄ a pH 9.84. Si lascia reagire sotto agitazione per 4 ore seguendo la rigenerazione del TOAC tramite HPLC (gradiente: da 40 a 80% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A; il campione viene preparato prelevando 10 µl dalla miscela di reazione e diluendoli con 20 µl di eluente A). Al termine si evapora il metanolo e si liofilizza.

Resa: 94%.

MS (ESI-TOF): $[M+H]^+_{\text{calc.}} = 1219.8262$; $[M+H]^+_{\text{sp.}} = 1219.7748$; $[M+2H]^{++}_{\text{sp.}} = 610.4134$.

HPLC (gradiente: da 40 a 80% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A): $t_r = 9.72$ min.

Oct-TOAC-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Api-Gly-Ile-Lol

In un pallone contenente 14,10 mg ($1,07 \cdot 10^{-2}$ mmol) di peptide protetto si aggiungono 3,00 ml di una soluzione 3N di HCl in MeOH e si lascia reagire sotto agitazione per 2 ore. Il distacco del gruppo Boc viene seguito tramite HPLC (gradiente: da 50 a 100% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A). Al termine evapora il solvente e si lava più volte con CH₂Cl₂ anidro. Quindi, si scioglie il solido in 2,00 ml di MeOH e si aggiungono 3,00 ml di una soluzione tampone di CH₃COONH₄ a pH 9.84. Si lascia reagire sotto agitazione per 8 ore seguendo la rigenerazione del TOAC tramite HPLC (gradiente: da 40 a 80% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A; il campione viene preparato

prelevando 10 μl dalla miscela di reazione e diluendoli con 20 μl di eluente A). Al termine si evapora il metanolo e si liofilizza.

Resa: 79%.

MS (ESI-TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 1219.8262$; $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sp.}} = 1219.8244$; $[\text{M}+2\text{H}]^{++}_{\text{sp.}} = 610.4117$.

HPLC (gradiente: da 40 a 80% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C_{18} Zorbax 300A): $t_r = 15.09$ min.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Sintesi in soluzione

3.1.1. Sintesi e caratterizzazione dell' α -amminoacido Api

Le metodiche di sintesi degli α -amminoacidi maggiormente utilizzate sono quella di Strecker e quella di Bucherer-Lieb.

La prima prevede l'aggiunta nucleofila di ammoniaca ad un carbonile, aldeidico o chetonico. La successiva eliminazione di H_2O porta alla formazione di un'immina (aldimmina o chetimmina) che reagisce con NaCN dando l'intermedio α -amminonitrile. Quest'ultimo subisce idrolisi acida e viene convertito nell' α -amminoammide corrispondente. Tale composto viene sottoposto ad un'ulteriore idrolisi acida per dare l' α -amminoacido, (**Figura 3.1.1.1**).^[95]

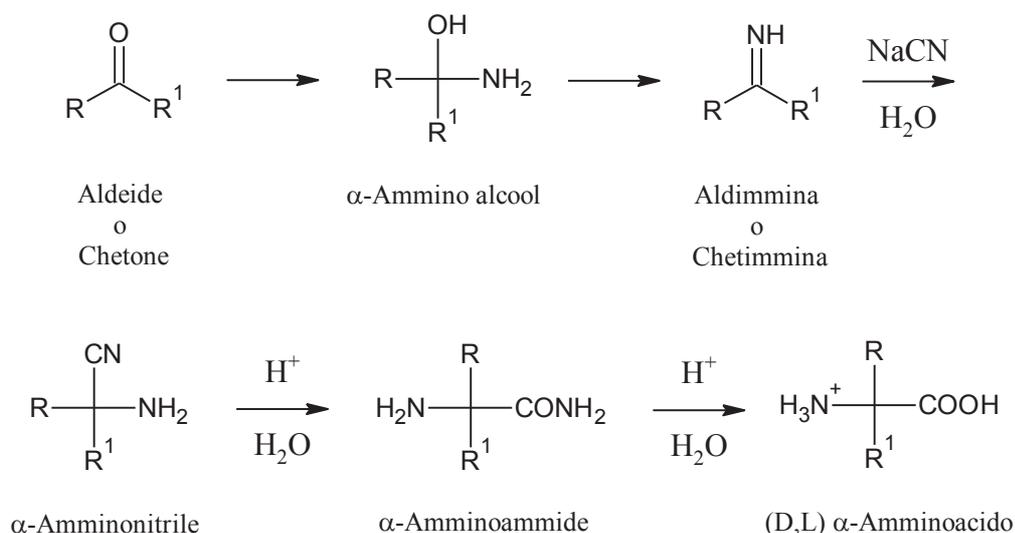


Figura 3.1.1.1. Sintesi di Strecker.

Nella sintesi di Bucherer-Lieb, invece, il carbonile viene trattato con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e NaCN: si forma, ancora una volta, l' α -amminonitrile, il quale reagisce però con la CO_2 che si sviluppa per dare un intermedio stabile, l'idantoina. Quest'ultima, per idrolisi catalizzata da acidi o basi, porta alla formazione dell' α -amminoacido (**Figura 3.1.1.2**).^[96]

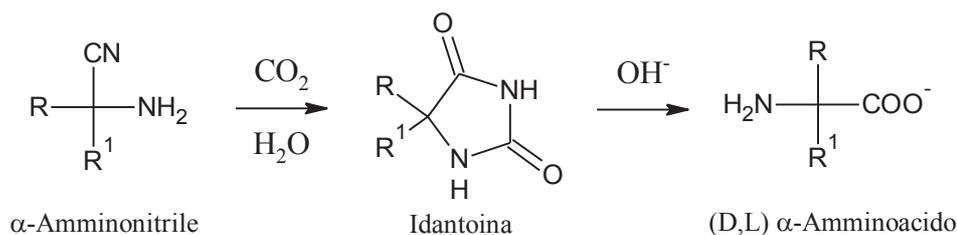


Figura 3.1.1.2. Sintesi di Bucherer-Lieb.

L'acido 4-amminopiperidino-4-carbossilico (**Figura 3.1.1.3**) possiede un'ammina secondaria in catena laterale che risulta protonata a pH fisiologico e costituisce una delle caratteristiche per cui si è deciso di utilizzare l'Api in analoghi della Tricogina GA IV che possano svolgere un'azione antitumorale (si veda *Introduzione*).

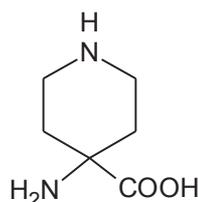


Figura 3.1.1.3. Acido 4-amminopiperidino-4-carbossilico, (Api).

Durante la sintesi peptidica la protezione dei due gruppi amminici deve essere ortogonale: il gruppo protettore dell'NH della catena laterale deve essere stabile nelle condizioni di rimozione del gruppo protettore dell' α -NH.

La strategia di sintesi utilizzata permette di ottenere l'amminoacido protetto all'NH laterale con un *tert*-butossicarbonile, (Boc, **Figura 3.1.1.4a**), e all' α -NH con un 9-fluorenilmetossicarbonile, (Fmoc, **Figura 3.1.1.4b**). Questo derivato è ottimale in quanto il gruppo Boc si rimuove in condizioni acide blande,^[97] mentre il gruppo Fmoc in condizioni basiche.^[98]

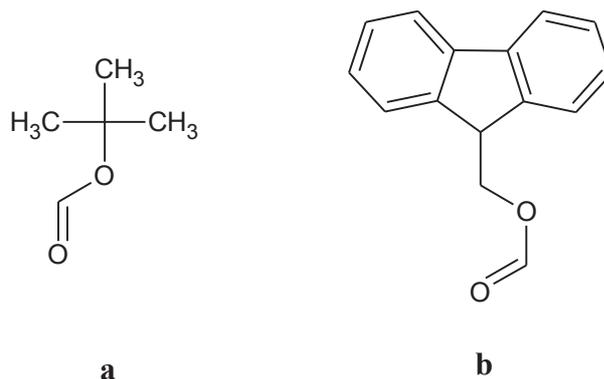


Figura 3.1.1.4. a) *Tert*-butossicarbonile, (Boc); **b)** 9-Fluorenilmetossicarbonile, (Fmoc).

Il derivato Fmoc-Api(Boc)-OH è stato sintetizzato utilizzando la seguente procedura (**Figura 3.1.1.5**):^[94] per idrolisi acida dell'1,4-diosso-8-azaspiro-[4,5]decano (**I**), commercialmente disponibile, si ottiene il 4-piperidone cloridrato (**II**). A questo punto, utilizzando il metodo di Bucherer-Lieb, si sintetizza l'idantoina (**III**) e si proteggono tutti gli atomi di azoto con il gruppo Boc (**IV**). Tale operazione permette la protezione dell'NH laterale, migliora la solubilità dell'idantoina in solvente organico e, soprattutto, ne aumenta la reattività nella successiva idrolisi basica ad acido 1-Boc-piperidin-4-ammino-4-carbossilico (**V**). Quest'ultimo non viene isolato, ma viene posto subito a reagire, previo aggiustamento del pH, con Fmoc-OSu per dare l'acido 1-Boc-piperidin-4-Fmoc-ammino-4-carbossilico (**VI**). L'isolamento di tale derivato avviene attraverso protonazione del carbossilato (che rende la molecola neutra e insolubile in acqua) ed estrazione con AcOEt.

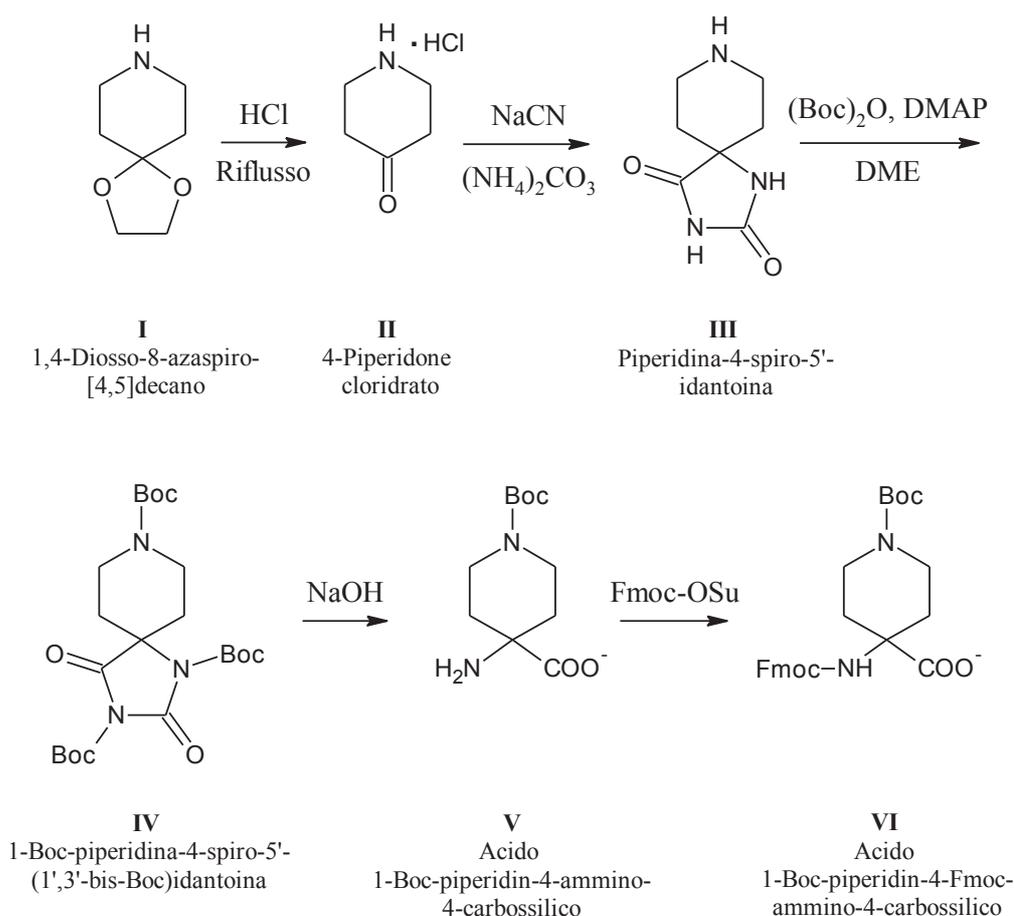


Figura 3.1.1.5. Sintesi dell'acido 1-Boc-piperidin-4-Fmoc-ammino-4-carbossilico, (Fmoc-Api(Boc)-OH).^[94]

McLaughlin e collaboratori non hanno proposto un meccanismo per l'idrolisi basica dell'idantoina tri-protetta (**IV**) che possa spiegare il distacco di entrambi i gruppi Boc legati agli azoti dello scheletro idantoico. L'ipotesi è basata sull'isolamento di un sottoprodotto, $(\text{Boc})_2\text{NH}$, isolato e caratterizzato anche in questo lavoro di Tesi (**Figura 3.1.1.6**).^[94] $(\text{Boc})_2\text{NH}$ deve essere rimosso dall'ambiente di reazione perché, essendo un'ammina secondaria, può provocare il distacco del gruppo protettore Fmoc.^[98]

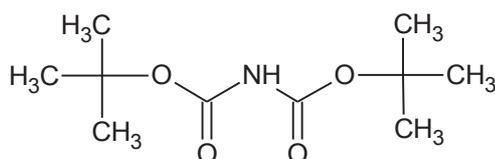


Figura 3.1.1.6. Di-*tert*-butil immidodicarbonato, $(\text{Boc})_2\text{NH}$; $^1\text{H NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ 6.75 [s, br, 1H, NH]; δ 1.47 [s, 18H, 2 Boc CH_3]; **MS (ESI-TOF)**: $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 218.1387$; $[\text{2M}+\text{Na}]^+_{\text{spet.}} = 457.2483$.

Fino all'ottenimento dell'idantoina tri-protetta non si sono riscontrati problemi o differenze rispetto all'operato di McLaughlin e collaboratori. Invece, per quanto riguarda lo stadio di idrolisi basica e di successiva protezione con Fmoc, la resa è stata molto modesta rispetto ai dati di letteratura,^[94] nonostante i numerosi tentativi in diverse condizioni di reazione. Nei paragrafi seguenti sono riportati brevemente i più significativi.

Nell'articolo di McLaughlin viene suggerito di aggiustare il pH a 9-9.5 con HCl 12 N prima dell'aggiunta di Fmoc-OSu per evitare il distacco del gruppo protettore: si è supposto che tale pH fosse ancora troppo basico e si è quindi optato per un aggiustamento a pH neutro, poi riportato a 8 con trietilammina (compatibile con il gruppo Fmoc). Inoltre, come acidificanti si sono utilizzati HCl 3 N oppure KHSO₄, al posto di HCl 12 N, per evitare che si creasse un pH locale troppo acido al momento dell'aggiunta, con distacco del gruppo Boc legato all'azoto del ciclo a sei. Poiché in alcuni casi si sono isolati dei sottoprodotti del gruppo Fmoc oppure lo stesso Fmoc-OSu, si è ipotizzato che una maggiore quantità di solvente acquoso a discapito di quello organico (circa 7:1 secondo l'articolo) potesse causare la distruzione o l'inattività del reagente. Pertanto si sono esplorati vari rapporti H₂O/solvente organico e solventi diversi dal DME, quali il diossano e l'acetonitrile. Tutte queste modifiche della procedura hanno comportato un aumento di resa molto limitato.

Talvolta è stato isolato il derivato Fmoc-Api-OH (**Figura 3.1.1.7a**), da cui è stato possibile ottenere Fmoc-Api(Alloc)-OH (**Figura 3.1.1.7b e c**). Si è dunque compreso che, sorprendentemente, il gruppo Boc legato all'azoto del ciclo a sei subisce idrolisi e viene staccato nelle condizioni di reazione utilizzate, nonostante l'ambiente sia basico.

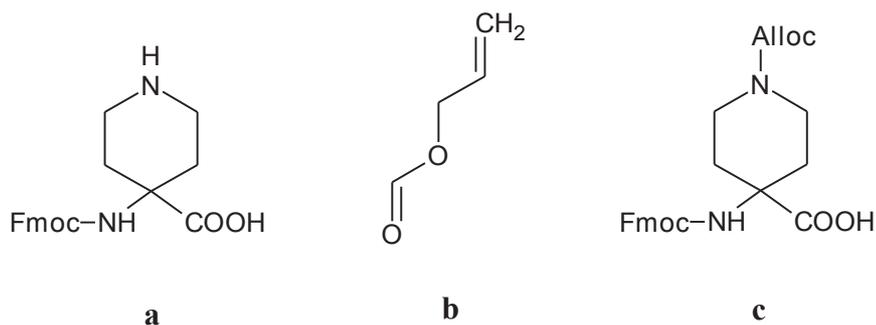


Figura 3.1.1.7. a) Acido piperidin-4-Fmoc-ammino-4-carbossilico, (Fmoc-Api-OH; $^1\text{H NMR}$ (200MHz, DMSO): δ 7.90 [d, 2H, Fmoc CH aromatici]; δ 7.63 [d, 2H, Fmoc CH aromatici]; δ 7.46-7.30 [m, 4H, Fmoc CH aromatici]; δ 4.35-4.21 [m, 3H, Fmoc CH₂ e CH]; δ 3.70-3.52 [m, 2H, Api CH₂]; δ 3.50-3.31 [m, 2H, Api CH₂]; δ 2.02-1.80 [m, 2H, Api CH₂]; δ 1.58-1.36 [m, 2H, Api CH₂]; **MS (ESI-TOF):** $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 367.1652$; $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sper.}} = 367.1660$); **b)** Allilossicarbonile, (Alloc)^[99]; **c)** Acido 1-Alloc-piperidin-4-Fmoc-ammino-4-carbossilico, (Fmoc-Api(Alloc)-OH; $^1\text{H NMR}$ (200MHz, CDCl₃): δ 7.77 [d, 2H, Fmoc CH aromatici]; δ 7.58 [d, 2H, Fmoc CH aromatici]; δ 7.45-7.28 [m, 4H, Fmoc CH aromatici]; δ 6.11-5.88 [m, 1H, Alloc CH olefinico]; δ 5.50-5.32 [m, 2H, Alloc CH₂ olefinico]; δ 4.83 [dt, 2H, Alloc CH₂ alifatico]; δ 4.48 [d, 2H, Fmoc CH₂]; δ 4.26 [t, 1H, Fmoc CH]; δ 4.11-3.74 [m, br, 2H, Api CH₂]; δ 3.50-3.33 [m, 2H, Api CH₂]; δ 2.02-1.74 [m, 2H, Api CH₂]; δ 1.70-1.51 [m, 2H, Api CH₂]; **MS (ESI-TOF):** $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 451.1864$; $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sper.}} = 451.1861$).

Si è quindi deciso di provare ad accorciare la durata della reazione di idrolisi e di diminuire il numero di equivalenti di NaOH utilizzati (26 ore e 9 eq. nell'articolo): si è osservato che, per minimizzare la rimozione del Boc in catena laterale e aumentare così la resa, bisogna ridurre drasticamente i tempi di reazione. Le due procedure che si sono rivelate più promettenti sono state:

1. 30 minuti di idrolisi con 5 eq. di NaOH: resa pari al 10%;
2. 5 minuti di idrolisi con 2 eq. di NaOH: resa pari al 30%, (procedura riportata nella *Parte Sperimentale*).

Nel secondo caso è stata osservata in TLC la presenza di tris-Boc idantoina non reagita; si ritiene dunque che un'ulteriore riduzione dei tempi di reazione non comporterebbe un aumento di resa. Non è stato possibile chiarire il motivo per il quale il gruppo Boc legato alla catena laterale dell'Api subisca idrolisi basica.

Un altro aspetto da sottolineare è l'isomeria *cis/trans* rispetto al legame CO-NH dell'uretano, avendo quest'ultimo, come le ammidi, un parziale carattere di doppio legame.^[100,101] La tris-Boc idantoina ottenuta sembra effettivamente

possedere due o più isomeri dovuti alla presenza di ben tre gruppi uretanici. Infatti, nello spettro ^1H NMR i segnali dei CH_2 dell'anello a sei sono complessi e i metili dei tre gruppi Boc danno origine a più di tre picchi (**Figura 3.1.1.8**). Tuttavia, la parziale sovrapposizione dei segnali dei metili ha reso impossibile la valutazione del numero di isomeri presenti e del rapporto tra isomeri *cis* e *trans*.

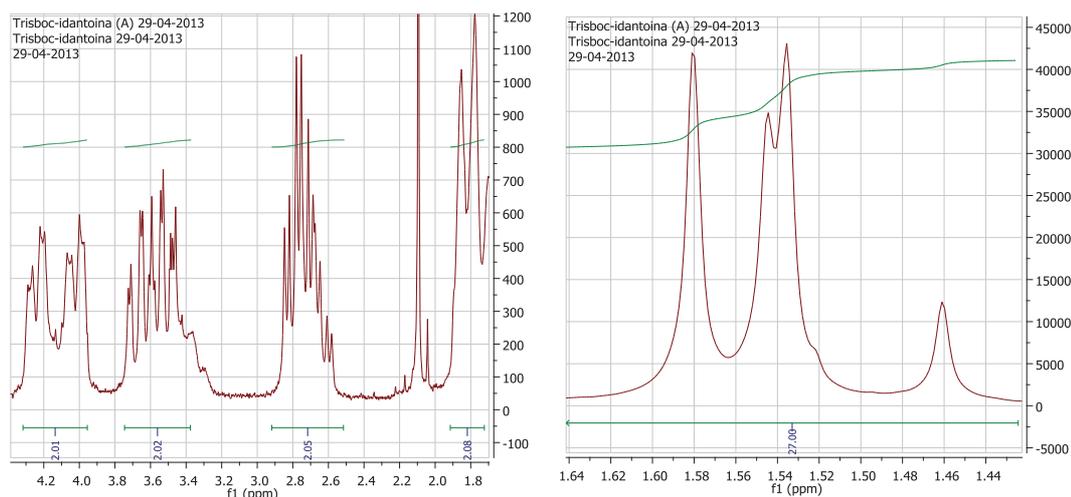


Figura 3.1.1.8. Ingrandimenti dello spettro ^1H NMR della tris-Boc idantoina nelle zone dei segnali dei CH_2 dell'anello a sei, (a sinistra), e dei protoni *tert*-butilici, (a destra). Tutti i segnali sono integrati.

Inoltre, McLaughlin e collaboratori hanno dimostrato, tramite studi di NMR bidimensionale, che l'idantoina tri-protetta è un composto spiro in cui il movimento di flipping dell'anello a sei risulta parzialmente impedito a causa dell'ingombro dei sostituenti legati agli atomi di azoto, (**Figura 3.1.1.9**).^[102] Si può supporre, quindi, che si abbia la formazione prevalente di un isomero caratterizzato da un elevato ingombro sterico in vicinanza del gruppo Boc legato all'azoto del ciclo a sei, il quale risulterebbe quindi più labile, tanto da essere rimosso in condizioni basiche. Si tratta però di un'ipotesi priva di riscontri, in quanto le condizioni che potrebbero favorire la formazione di quel particolare isomero non sono state chiarite e McLaughlin e collaboratori non riportano di aver riscontrato lo stesso problema.

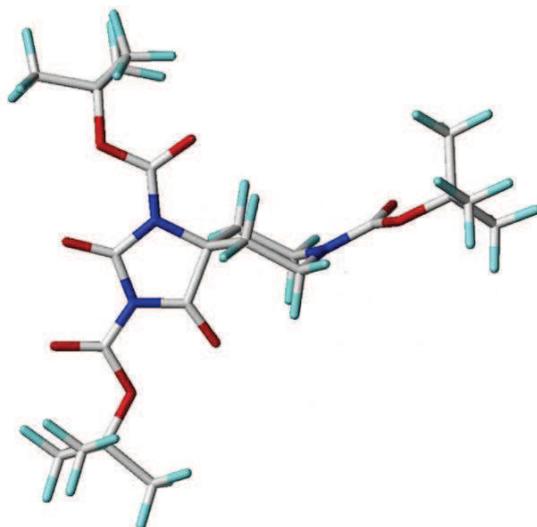


Figura 3.1.1.9. Modello molecolare della tris-Boc idantoina in soluzione.

3.1.2. Sintesi peptidica step by step

Si è operata la sintesi in soluzione del tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt corrispondente ai residui dal 2 al 5 della Tricogina GA IV. Il progetto iniziale prevedeva di utilizzare tale frammento per la sintesi a segmenti di un analogo della Tricogina contenente un residuo di Api in posizione 8. Tuttavia, i lunghi tempi di sintesi e, soprattutto, le difficoltà incontrate nel sintetizzare grosse quantità (richieste per la sintesi in soluzione) di derivati dell'Api hanno imposto di ricorrere alla sintesi in fase solida.

La scelta iniziale di operare in soluzione derivava dalla possibilità di isolare e caratterizzare tutte le sequenze intermedie, in modo da valutare l'effetto della lunghezza della catena sulla conformazione del peptide. Il tetrapeptide ottenuto e i suoi segmenti intermedi sono stati comunque caratterizzati e sottoposti a indagini conformazionali.

La sintesi viene condotta dall'estremità C-terminale del peptide verso quella N-terminale per minimizzare il rischio di racemizzazione.^[103,104] Per esigenze della strategia di sintesi che avrebbe dovuto seguire dopo il tetrapeptide, quest'ultimo presenta il Boc come gruppo N-protettore (**Figura 3.1.1.4a**). Per i suoi precursori si è scelto di utilizzare il gruppo benzilossicarbonile (Z, **Figura 3.1.2.1a**) poiché molto stabile, facilmente rimovibile e utile per seguire il decorso delle reazioni

tramite TLC, rendendo i composti visibili alla lampada UV.^[105] L'estremità C-terminale è stata protetta con l'estere etilico (**Figura 3.1.2.1b**).

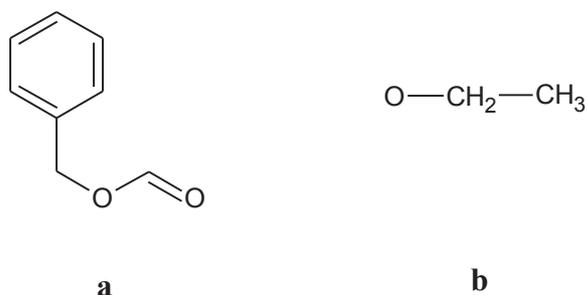


Figura 3.1.2.1. a) Benzilossicarbonile, (Z); **b)** Etossi, (OEt).

Per quanto riguarda l'attivazione del gruppo carbossilico, si è utilizzato l'isobutilcloroformiato: esso permette la formazione di un'anidride mista che subisce l'attacco del nucleofilo, ossia dell'azoto terminale dell'amminoacido o del peptide N-deprotetto (**Figura 3.1.2.2**).^[104,106,107]

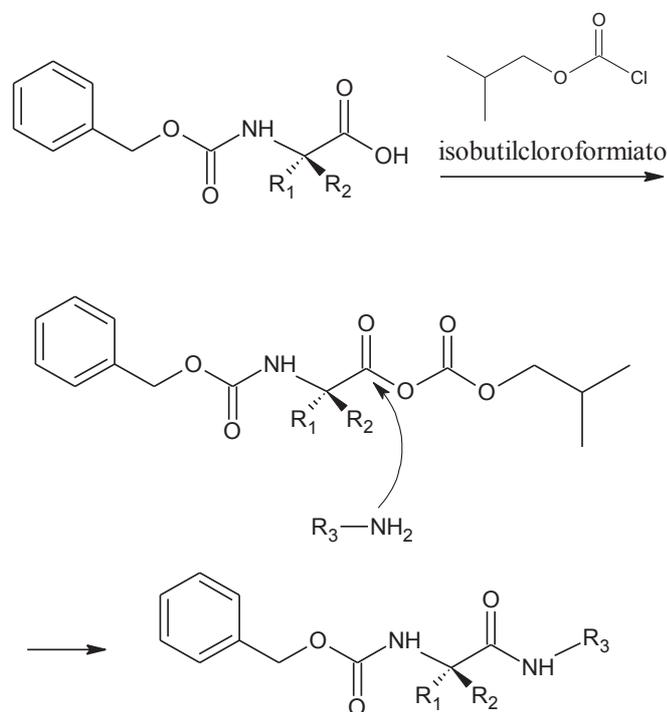


Figura 3.1.2.2. Meccanismo di attivazione del carbonile tramite isobutilcloroformiato e successiva reazione di coupling.

3.2. Sintesi in fase solida

3.2.1. Strategia di sintesi

La tecnica di sintesi peptidica in fase solida è stata introdotta da Merrifield nel 1963 e rappresenta un metodo rapido ed efficace per sintetizzare peptidi di piccole e medie dimensioni.^[108] Rispetto alla sintesi in soluzione, presenta tre principali vantaggi.^[109]

1. Possibilità di utilizzare un eccesso dei reagenti solubili, facilmente eliminabili per filtrazione, in modo da portare a completezza la reazione di coupling;
2. Possibilità di rimozione dei sottoprodotti indesiderati, sempre per filtrazione, con conseguente semplificazione della fase di purificazione;
3. Possibilità di automazione.

Il metodo prevede l'ancoraggio del residuo C-terminale della sequenza peptidica, opportunamente protetto in corrispondenza dell' α -NH, ad una resina costituita da un copolimero di stirene contenente l'1-2% di divinilbenzene, il quale funge da reticolante, rendendo il supporto insolubile nei solventi organici. L'accrescimento della catena peptidica, però, non avviene propriamente sulla superficie del polimero solido, ma all'interno del "gel" che si crea quando esso entra in contatto con il solvente in cui sono sciolti i reagenti. Per tale ragione il livello di reticolazione non può superare il 2% ed è inoltre necessario il preventivo rigonfiamento della resina per favorire la penetrazione e l'uscita dei reagenti all'interno dei granuli e rendere più efficienti le reazioni di coupling. Per far sì che l'ancoraggio del peptide alla resina sia reversibile, tra l'amminoacido C-terminale e il polimero è inserito un linker.^[110] L'allungamento del peptide avviene in direzione C→N terminale, aggiungendo ad ogni stadio un residuo amminoacidico avente il gruppo amminico e l'eventuale catena laterale opportunamente protetti, e il gruppo carbossilico attivato. La sintesi prevede, quindi, l'esecuzione ripetuta di una serie di operazioni, quali lo sblocco del gruppo N^α-protettore e la reazione di coupling con l'amminoacido successivo, (**Figura 3.2.1.1**). Terminata la sintesi, il peptide viene rimosso dalla resina mediante un trattamento appropriato.^[109]

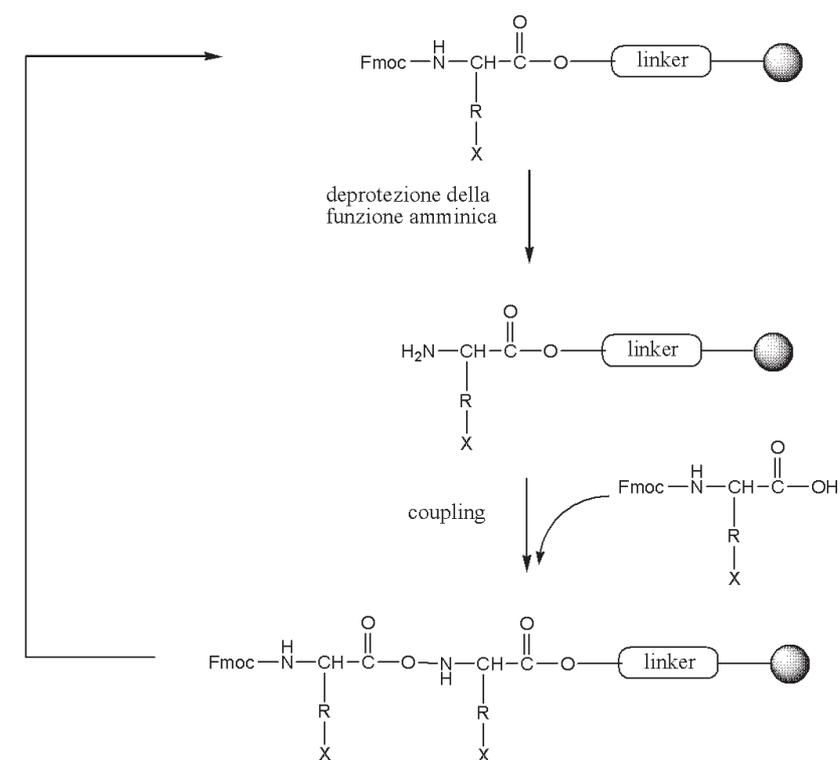


Figura 3.2.1.1. Schema generale di un ciclo di sintesi peptidica in fase solida.

Volendo ottenere il peptide finale con una funzione alcolica all'estremità C-terminale, si è utilizzata una resina di polistirene-divinilbenzene (1%) con un linker 2-cloro-tritile, (**Figura 3.2.1.2**), a cui è già ancorato il residuo di leucinolo C-terminale.^[111] Tale supporto è *iper-sensibile* all'ambiente acido e consente di rimuovere il peptide con HFIP al 30% in DCM.^[112]

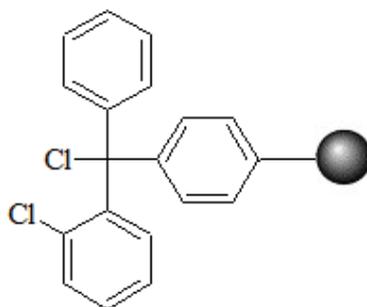


Figura 3.2.1.2. Resina con linker 2-cloro-tritile.

Le sequenze di sintesi operate sono riportate nello schema seguente, (**Tabella 3.2.1.1**):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Oct	TOAC	Gly	Leu	Api(Boc)	Gly	Gly	Leu	Aib	Gly	Ile	Lol-R
Oct	TOAC	Gly	Leu	Aib	Gly	Gly	Leu	Api(Boc)	Gly	Ile	Lol-R

Tabella 3.2.1.1. Schema di sintesi in fase solida degli analoghi della Tricogina GA IV con il residuo Api in posizione 4 e 8 rispettivamente; R: resina, : doppio coupling con HATU.

I residui C ^{α} -disostituiti sono poco reattivi a causa dell'ingombro sterico delle catene laterali, quindi tutti i coupling degli amminoacidi Aib, Api, TOAC e dei residui successivi a questi sono stati eseguiti due volte.^[113,114] Inoltre, in tutte le reazioni si è utilizzato un eccesso di reagenti, (2 o 3 equivalenti), i quali sono stati poi eliminati per filtrazione. I peptidi grezzi sono stati purificati tramite cromatografia a fase inversa, come descritto nel paragrafo 2.1.2. Per ottenere i peptidi finali è stato necessario deproteggere la catena laterale dell'Api, (si veda il paragrafo 3.2.2 riguardante i gruppi protettori impiegati durante la sintesi).

L'Api e il TOAC, (**Figure 3.1.1.3 e 1.1.3.5**), sono stati inseriti, in entrambi gli analoghi, in posizioni che, nella sequenza della Tricogina GA IV, sono occupate da Aib in modo da mantenere pressoché inalterata la struttura secondaria elicoidale del peptide, favorita appunto dai residui C ^{α} -tetrasostituiti.^[115,116] Sono stati eseguiti studi conformazionali sui peptidi finali per verificare la veridicità di tale ipotesi.

3.2.2. Gruppi protettori

Per la protezione della funzione N ^{α} -amminica durante la sintesi in fase solida si è utilizzato il gruppo Fmoc, (**Figura 3.1.1.4**).^[98] Per la rimozione si è utilizzata una soluzione di piperidina al 20% in DMF, la quale permette di eliminare il dibenzofulvene che si forma come sottoprodotto di reazione, (**Figura 3.2.2.1**).^[117]

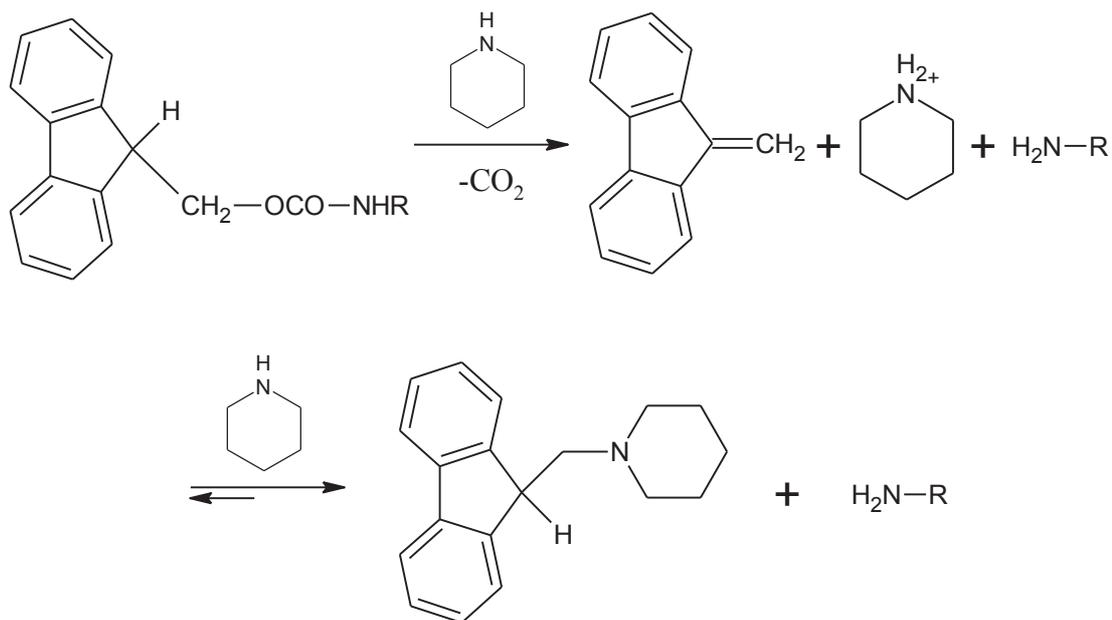


Figura 3.2.2.1. Meccanismo di rimozione del gruppo protettore Fmoc ad opera della piperidina.

La catena laterale dell'Api è stata protetta con un gruppo Boc, (**Figura 3.1.1.4**), il quale si comporta in modo ortogonale allo Fmoc ed è inoltre risultato resistente alle condizioni di distacco del peptide dalla resina.^[97] La sua rimozione è stata effettuata utilizzando HCl in metanolo.^[118] In tali condizioni, però, il gruppo nitrossile del TOAC può subire protonazione ed eventualmente disproporzionare ad idrossilammina e ione ossoammonio perdendo la funzione radicalica, (**Figura 3.2.2.2**). È stato quindi necessario sottoporre i peptidi ad un trattamento basico a pH ~ 9-11 per rigenerare il radicale.^[119,120] La reazione è stata seguita tramite HPLC e la presenza del gruppo paramagnetico è stata verificata tramite spettroscopia EPR, (**Figure 3.2.2.3-3.2.2.6**).

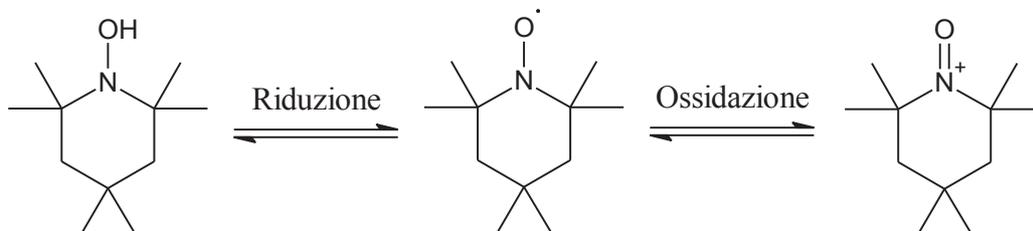


Figura 3.2.2.2. Reazione di disproporzionamento del gruppo nitrossile in ambiente acido.

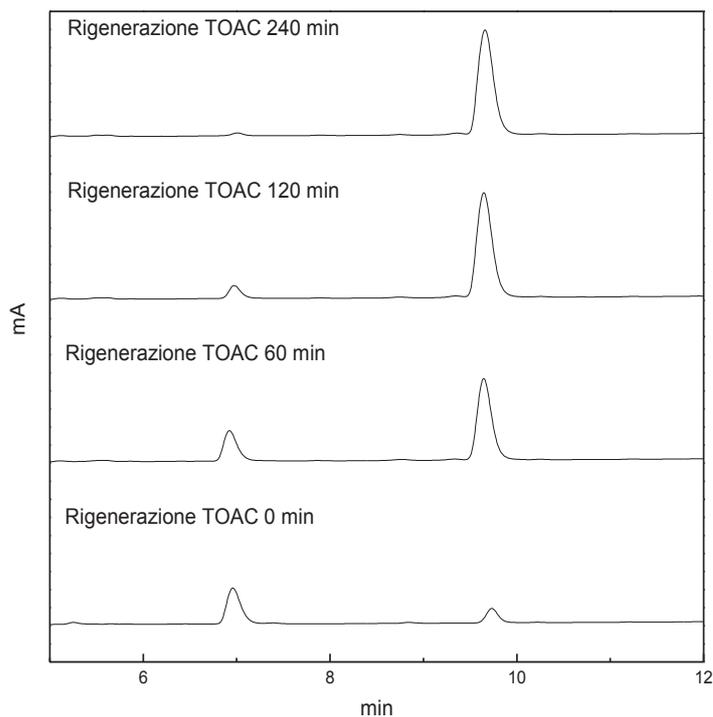


Figura 3.2.2.3. Cromatogrammi HPLC della reazione di rigenerazione della funzione radicalica del residuo TOAC nell'analogo della Tricogina con l'Api in posizione 4, (gradiente: da 40 a 80% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C_{18} Zorbax 300A). L'intervallo di tempo riportato va dai 5 a 12 minuti e le posizioni dei picchi sono rispettivamente 6.97 min. per il reagente e 9.65 min. per il prodotto.

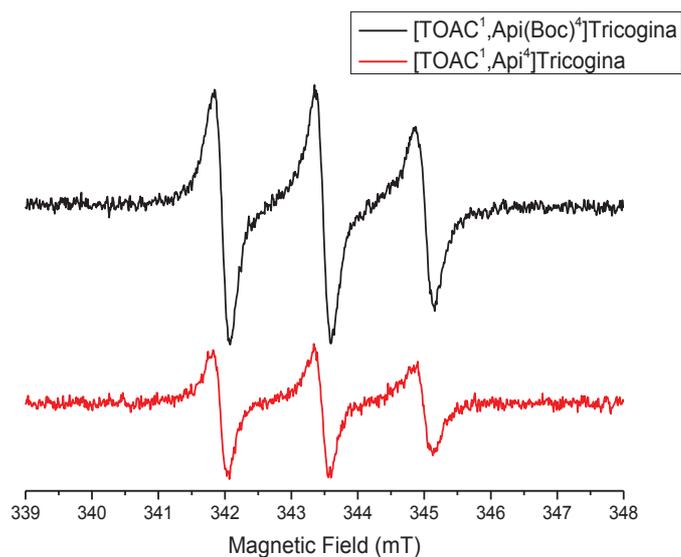


Figura 3.2.2.4. Spettri EPR a temperatura ambiente dei peptidi $[\text{TOAC}^1, \text{Api}(\text{Boc})^4]\text{Tricogina}$ e $[\text{TOAC}^1, \text{Api}^4]\text{Tricogina}$ in MeOH alla concentrazione di $2 \cdot 10^{-4}$ M prima e dopo la rigenerazione del nitrossido.

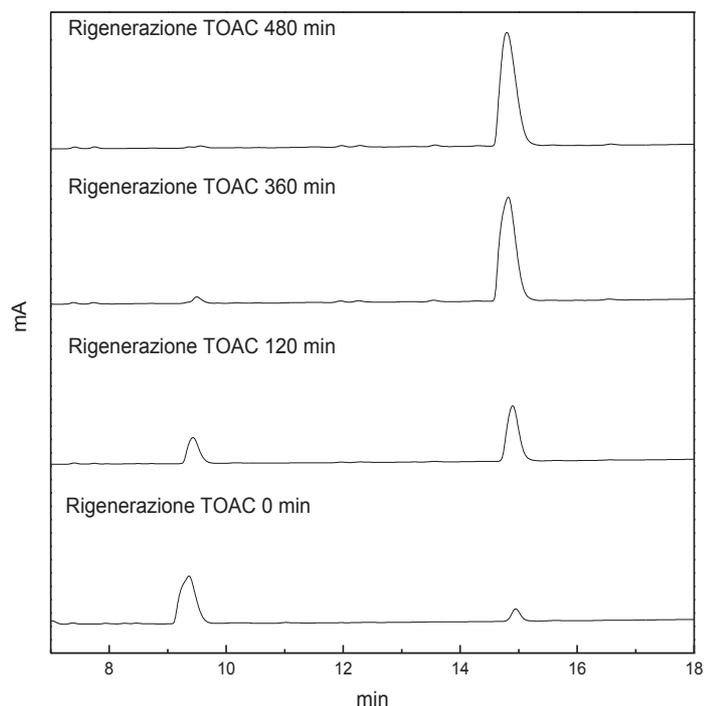


Figura 3.2.2.5. Cromatogrammi HPLC della reazione di rigenerazione della funzione radicalica del residuo TOAC nell'analogo della Tricogina con l'Api in posizione 8, (gradiente: da 40 a 80% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C_{18} Zorbax 300A). L'intervallo di tempo riportato va dai 7 a 18 minuti e le posizioni dei picchi sono rispettivamente 9.51 min. per il reagente e 14.90 min. per il prodotto.

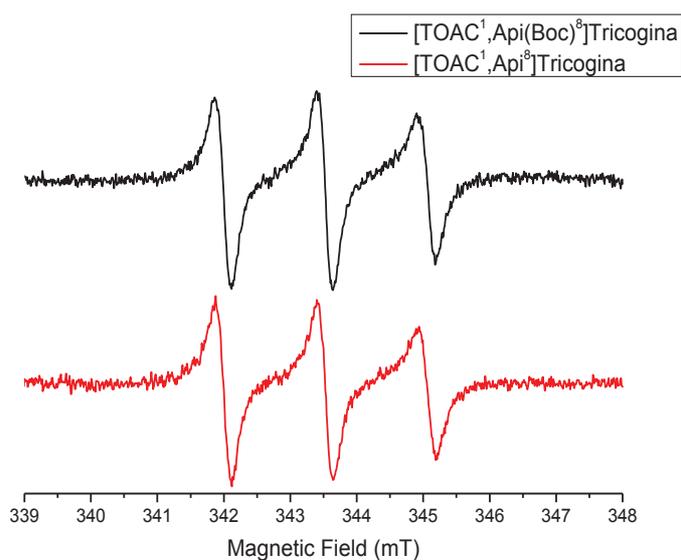


Figura 3.2.2.6. Spettri EPR a temperatura ambiente dei peptidi $[\text{TOAC}^1, \text{Api}(\text{Boc})^8]\text{Tricogina}$ e $[\text{TOAC}^1, \text{Api}^8]\text{Tricogina}$ in MeOH alla concentrazione di $2 \cdot 10^{-4}$ M prima e dopo la rigenerazione del nitrossido.

Nei cromatogrammi HPLC (**Figure 3.2.2.3 e 3.2.2.5**) si nota la progressiva scomparsa del picco a sinistra dovuto al peptide avente il nitrossido protonato e, contemporaneamente, l'aumento di intensità del picco a destra dovuto al prodotto contenente il radicale rigenerato. La corretta assegnazione dei picchi HPLC deriva dall'analisi EPR del prodotto finale: le **Figure 3.2.2.4 e 3.2.2.6** riportano infatti gli spettri EPR degli analoghi prima dello sblocco del Boc (curve nere) e dopo la rigenerazione del TOAC (curve rosse). Poiché il segnale, dovuto al radicale nitrossido, è presente prima e dopo le procedure di sblocco e rigenerazione, si deduce che il prodotto finale, corrispondente al picco HPLC avente tempi di ritenzione maggiori, sia effettivamente quello del peptide con il TOAC rigenerato e che la rigenerazione sia andata a buon fine vista la totale scomparsa del reagente nei cromatogrammi.

Negli spettri EPR del radicale nitrossido il segnale è splittato in più righe in quanto lo spin elettronico risente dell'interazione con il momento angolare di spin nucleare (I) dell'atomo di azoto: poiché quest'ultimo è pari a 1 e la molteplicità si calcola come $2I+1$, si osservano tre righe. Se la funzione radicalica ha un'elevata libertà conformazionale si osserva una media di tutte le possibili orientazioni rispetto al campo magnetico e le righe nello spettro sono strette; se invece il nitrossido è sottoposto a restrizioni conformazionali, a seguito all'interazione con altri sistemi molecolari o in stato solido, si osserva un allargamento di riga. Negli spettri riportati le righe risultano allargate quasi certamente a causa della non completa solubilità dei prodotti in metanolo, con conseguente presenza di aggregati.

3.2.3. Metodi di attivazione

La formazione di un legame ammidico tra due amminoacidi è una reazione endotermica e richiede temperature elevate, (160-180 °C), solitamente incompatibili con la presenza di altri gruppi funzionali.^[121,122] Per poter eseguire la sintesi peptidica a temperatura ambiente ottenendo prodotti enantiomericamente puri in alte rese è necessario adottare un metodo di attivazione rapido ed efficiente.^[103,109] Il processo di attivazione avviene in corrispondenza del gruppo carbossilico dell'amminoacido N^{α} -protetto e modifica la densità elettronica attorno al carbonile rendendolo più elettrofilo e quindi maggiormente suscettibile all'addizione nucleofila del gruppo amminico terminale della catena legata al supporto.^[122] È inoltre opportuno

sottolineare che gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti sono poco reattivi nella formazione del legame peptidico a causa dell'ingombro sterico sul C^α . Tale influenza incide maggiormente sulla reattività del gruppo amminico rispetto a quello carbossilico.^[113]

Nel presente lavoro di Tesi si è utilizzato il metodo degli esteri attivi, che prevede la reazione del gruppo carbossilico dello Fmoc-amminoacido con i sali di uronio *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato e *O*-(7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato, (HBTU e HATU rispettivamente, **Figura 3.2.3.1a e b**). Si produce così un intermedio reattivo che forma, a sua volta, un estere attivato con l'1-Idrossi-1,2,3-benzotriazolo o l'1-Idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo (HOBt e HOAt rispettivamente **Figura 3.2.3.1c e d**). Quest'ultimo reagisce, velocemente e senza rischio di racemizzazione, con la funzione amminica terminale del peptide in crescita, essendo gli anioni ⁻OBt e ⁻OAt ottimi gruppi uscenti, (**Figura 3.2.3.2**).^[122-127] Il gruppo carbossilico deve essere preventivamente deprotonato tramite un'ammina terziaria.

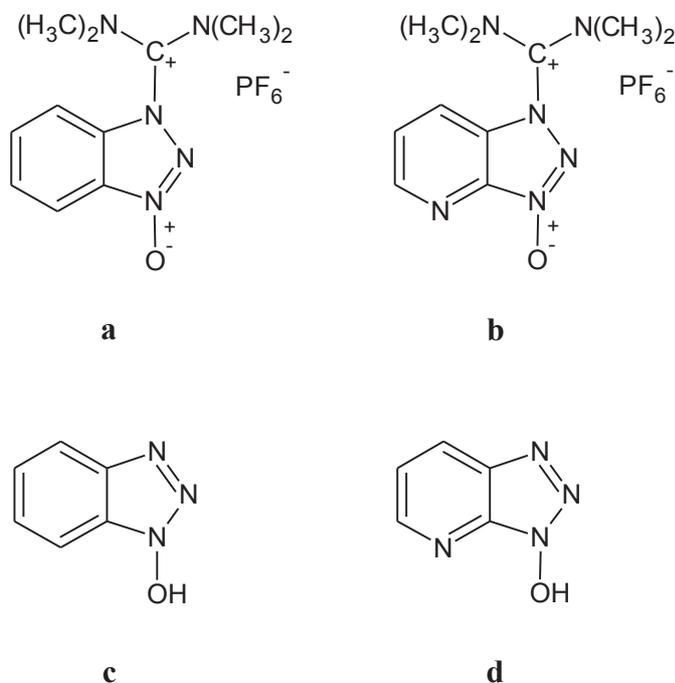


Figura 3.2.3.1. a) *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato, (HBTU); **b)** *O*-(7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato, (HATU); **c)** 1-Idrossi-1,2,3-benzotriazolo, (HOBt); **d)** 1-Idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, (HOAt).^[128]

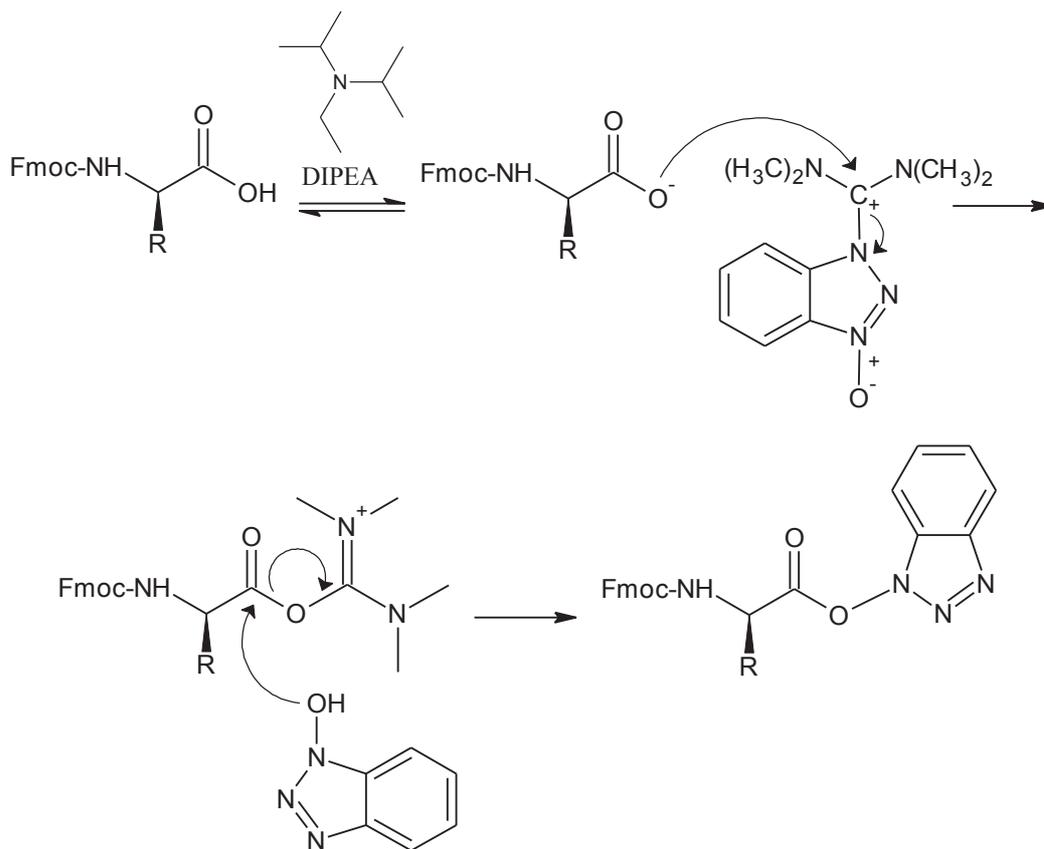


Figura 3.2.3.2. Meccanismo di attivazione del gruppo carbossilico attraverso la formazione di esteri attivi assistita da sali di uronio.

È stato dimostrato che, allo stato cristallino, gli esteri attivi si dispongono con il gruppo aromatico perpendicolare a quello carbossilico.^[129,130] Sembra che tale conformazione venga mantenuta anche in soluzione: infatti l'attacco del gruppo amminico al carbonile è guidato dagli atomi di azoto del gruppo aromatico. L'HOAt presenta due atomi di azoto, in posizioni 2 e 7, che possono favorire l'attacco nucleofilo, il quale trova assistenza su entrambe le facce del carbonile (**Figura 3.2.3.3**); mentre l'HOBt dispone solo dell'azoto in posizione 2 e riesce a guidare l'attacco da un lato soltanto.^[131,132] Per tale ragione l'HOAt risulta molto più efficiente ed è in grado di promuovere efficacemente il coupling dei residui C^{α,α}-disostituiti.^[113] Lo stesso concetto vale per i sali di uronio HATU e HBTU.^[131] Quindi, per i coupling coinvolgenti amminoacidi C^α-trisostituiti si sono utilizzati gli agenti attivanti HBTU/HOBt; mentre i reagenti HATU/HOAt sono stati impiegati per i coupling coinvolgenti i residui C^α-tetrasostituiti e i residui successivi a questi.

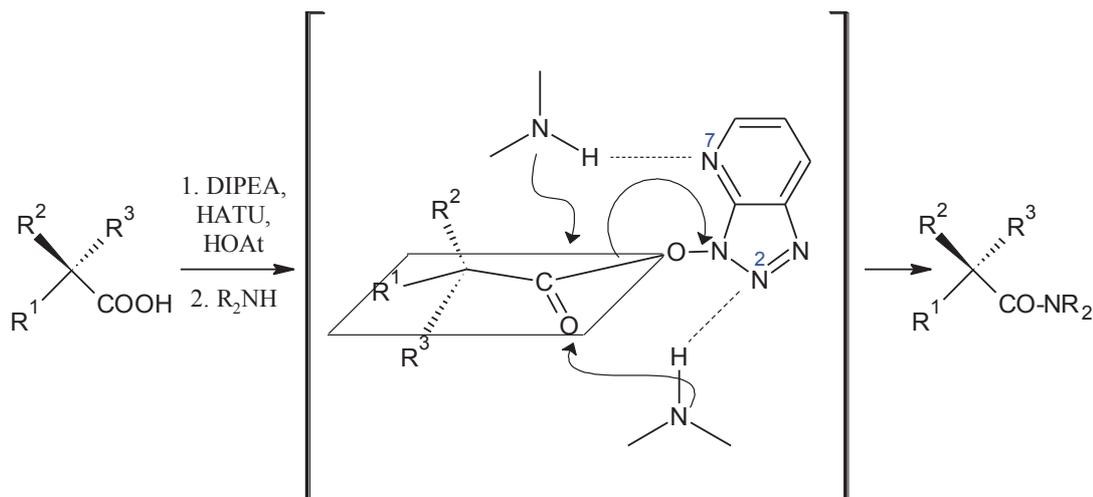


Figura 3.2.3.3. Assistenza dell'HOAt all'attacco nucleofilo del gruppo amminico durante la formazione del legame peptidico.

Il coupling dell'ottanoile, invece, è stato eseguito impiegando le carbodiimmidi, in particolare l'EDC, per l'attivazione della funzione carbonilica, (**Figura 3.2.3.4**).

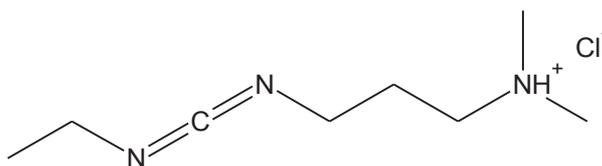


Figura 3.2.3.4. *N*-Etil-*N'*-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato, (EDC-HCl).

Il gruppo carbossilico dell'amminoacido N^α-protetto reagisce con la carbodiimmide per dar luogo alla formazione di una serie di prodotti isolabili. Infatti, a seconda delle condizioni, della natura degli amminoacidi coinvolti e del tipo di N^α-protezione, si possono formare le anidridi (**II**), le *N*-aciluree (**III**), il peptide desiderato (**IV**) e i derivati 5(4*H*)-ossazoloni (**V**), (**Figura 3.2.3.5**). Questo avviene perché l'*O*-acilisourea (**I**) è un intermedio poco stabile che reagisce rapidamente con i nucleofili presenti senza nessuna selettività. Di conseguenza, la reazione di ammonolisi che porta alla formazione del legame peptidico è in competizione con altre reazioni collaterali, le quali risultano favorite quando le condizioni promuovono maggiormente l'attacco nucleofilo intramolecolare rispetto a quello intermolecolare.^[124,132-135]

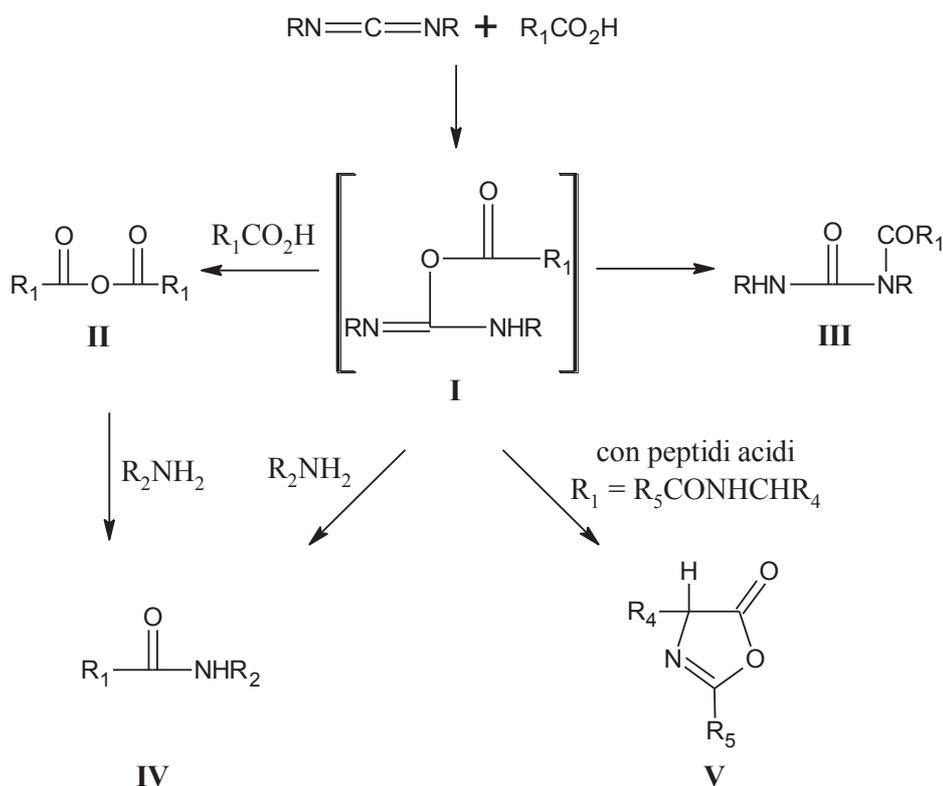


Figura 3.2.3.5. Prodotti generati in seguito all'attivazione della componente carbossilica di un aminoacido N^α-protetto con le carbodiimmidi.

La formazione dell'intermedio ciclico 5(4*H*)-ossazolone è responsabile della racemizzazione degli aminoacidi e dei peptidi attivati al carbonile: infatti, si può avere la sottrazione dell'idrogeno in α con conseguente perdita dell'integrità chirale.^[103,132] Ciò accade particolarmente quando l'amminoacido attivato è un residuo C^α-tetrasostituito perché l'effetto *gem*-dialchile, derivante dalla doppia sostituzione in posizione α con gruppi metilici, favorisce la formazione dell'ossazolone; l'eterociclo così formato mette a repentaglio la purezza ottica dell'amminoacido che precede il residuo in questione, (**Figura 3.2.3.6**).^[22]

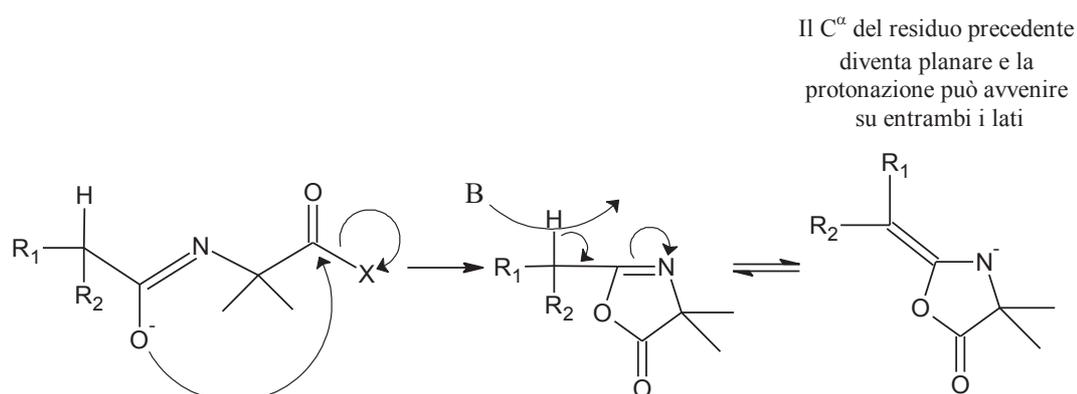


Figura 3.2.3.6. Meccanismo di racemizzazione via ossazolone del penultimo residuo della catena peptidica.

Per evitare l'epimerizzazione si utilizza l'HOAt che reagisce velocemente con l'*O*-acilisourea formando l'estere attivo, il quale porta all'ottenimento del legame peptidico mediante ammonolisi, (**Figura 3.2.3.3**). L'HOAt, pertanto, previene la formazione dell'ossazolone e catalizza inoltre la reazione di coupling. La carbodiimmide, invece, ha il compito di attivare la funzione carbossilica, analogamente ai sali di uronio.^[131]

3.3. Metodiche di caratterizzazione

I composti isolabili sono stati caratterizzati mediante la determinazione dei punti di fusione, (se solidi), e del comportamento cromatografico, (TLC in diversi eluenti o HPLC). Si sono inoltre registrati gli spettri IR in stato solido, gli spettri ^1H NMR, (tranne per i peptidi contenenti il TOAC), e gli spettri di massa. In questi ultimi si è potuto osservare il picco dello ione molecolare protonato con carica unitaria, avente $m/z = [M+H]^+$, (dove M rappresenta la massa esatta del composto calcolata con le masse esatte degli isotopi prevalenti di ciascun elemento), e il picco coinvolgente lo ione sodio, ossia $[M+Na]^+$. Per i segmenti più lunghi si è rilevato anche il picco dello ione molecolare a doppia carica $[M+2H]^{++}$, con $m/z = (M+2)/2$.

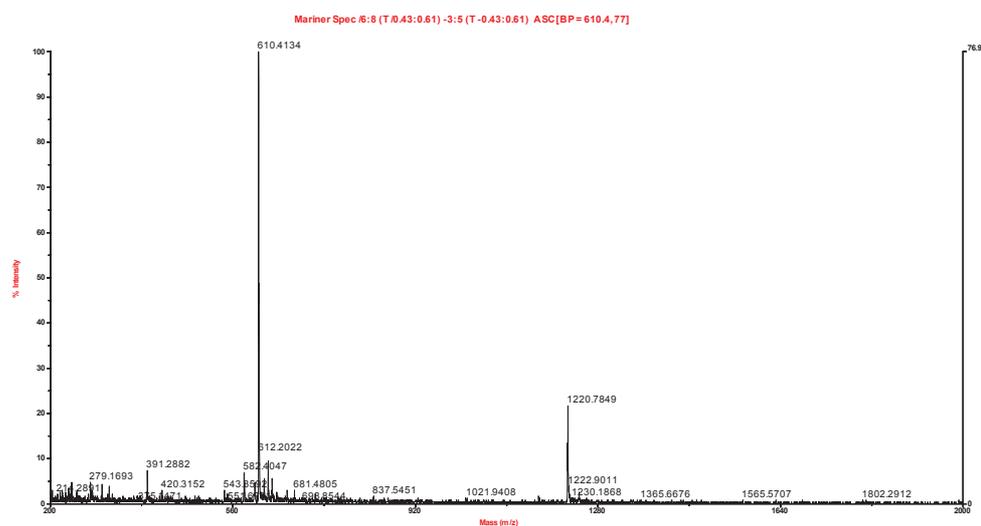


Figura 3.3.1. Spettro di massa ESI-TOF dell'analogo della Tricogina con l'Api in posizione 4 sintetizzato in fase solida, in metanolo.

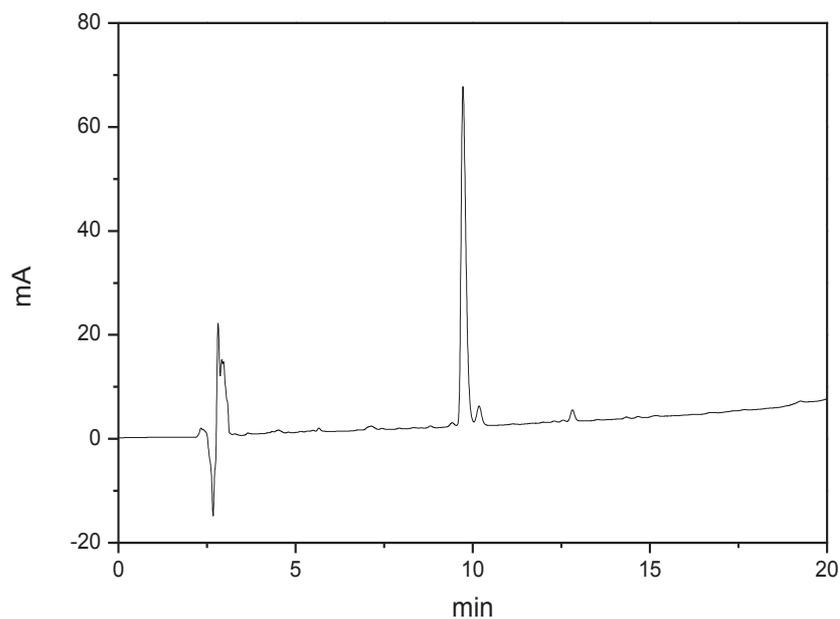


Figura 3.3.2. Cromatogramma HPLC dell'analogo della Tricogina con l'Api in posizione 4 in metanolo, (gradiente: da 40 a 80% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A).

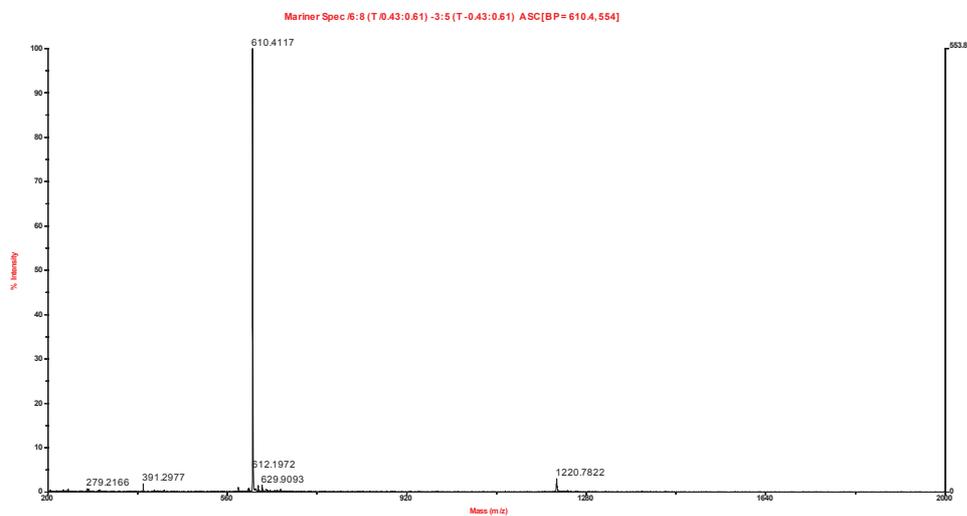


Figura 3.3.3. Spettro di massa ESI-TOF dell'analogo della Tricogina con l'Api in posizione 8 sintetizzato in fase solida, in metanolo.

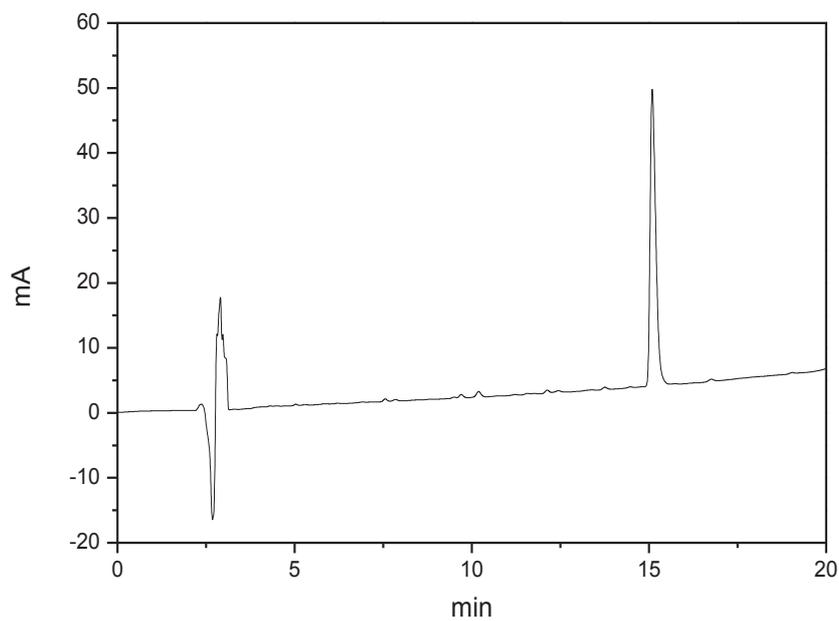


Figura 3.3.4. Cromatogramma HPLC dell'analogo della Tricogina con l'Api in posizione 8 in metanolo, (gradiente: da 40 a 80% CH₃CN/H₂O 9:1 + 0,05% TFA in 30 minuti; flusso: 1 ml/min; colonna a fase inversa C₁₈ Zorbax 300A).

3.4. Indagini conformazionali

3.4.1. Assorbimento IR in soluzione

La spettrofotometria di assorbimento infrarosso permette di ricavare informazioni sulla struttura tridimensionale di un peptide, indagando gli assorbimenti del gruppo ammidico.^[136] È utile analizzare le variazioni degli assorbimenti al crescere della catena peptidica con lo scopo di associare alla presenza di gruppi NH coinvolti o meno in legami a idrogeno, (legati o liberi rispettivamente), particolari conformazioni assunte dai peptidi.^[137,138] Si possono inoltre distinguere i legami *intra*-molecolari da quelli *inter*-molecolari registrando gli spettri a due diverse concentrazioni di campione, ($1 \cdot 10^{-3}$ e $1 \cdot 10^{-4}$ M). Sono stati condotti studi conformazionali IR in soluzione sia sui peptidi corti Z-Aib-Gly-OEt, Z-Leu-Aib-Gly-OEt e Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt, sia sugli analoghi della Tricogina GA IV sintetizzati in fase solida.

Lo studio è stato svolto in cloroformio deuterato, solvente poco polare, e gli intervalli di frequenza presi in considerazione sono:^[139-141]

1. La zona dell'**Ammide A**, compresa tra i 3600 e i 3200 cm^{-1} , corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami N-H dei gruppi uretanici e peptidici. Le loro frequenze di stretching variano, infatti, a seconda della presenza e dell'intensità di legami ad idrogeno che impegnino tali gruppi, in quanto l'atomo accettore (l'ossigeno carbonilico nel caso dei peptidi) attrae il protone indebolendo il legame NH che, di conseguenza necessita di minore energia per entrare in risonanza. Pertanto, mentre i gruppi NH liberi assorbono a frequenze di $\sim 3420 \text{ cm}^{-1}$, le vibrazioni degli NH legati cadono a frequenze inferiori. Poiché la frequenza di stretching dell'ammide A dipende dall'intensità del legame ad idrogeno, e quest'ultima dipende, a sua volta, dalla struttura secondaria e dalla sua stabilità, si possono ottenere informazioni riguardanti la struttura tridimensionale adottata da un peptide. Le frequenze di vibrazione tipiche di una conformazione elicoidale si aggirano intorno ai 3330 cm^{-1} e sono intermedie tra quelle della conformazione completamente estesa, ($\sim 3360 \text{ cm}^{-1}$), e quelle del β -sheet,

($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$). Inoltre gli stretching si spostano al variare della lunghezza della catena peptidica: quando sono presenti amminoacidi fortemente elicogenici, come gli Aib, sono sufficienti tre residui, numero indispensabile per ottenere un primo avvolgimento a β -turn, per osservare, negli spettri IR in soluzione, le bande degli NH legati; ma, all'aumentare del numero di residui, si ottiene un rafforzamento della struttura elicoidale, in funzione del maggior numero di ponti a H, e si riscontra uno spostamento del massimo di assorbimento ad energie inferiori. Pertanto, le varie conformazioni si possono distinguere dalla posizione delle bande di assorbimento degli stretching NH.^[48,142-144]

2. La zona delle *Ammidi I e II*, compresa tra i 1800 e 1500 cm^{-1} , corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami C=O esterei, uretanici e peptidici. Anche questi modi vibrazionali sono influenzati dalla struttura secondaria e permettono di fare un'analisi qualitativa della conformazione assunta dal peptide. L'assorbimento ammidico I è dovuto principalmente allo stretching C=O (80%) con il contributo del bending NH (10%) e dello stretching CN (10%) e si incontra a frequenze tra i 1660 e i 1620 cm^{-1} . Un segnale a 1660 cm^{-1} può indicare una struttura elicoidale, mentre il β -sheet presenta una banda a $1640\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$. L'ammide II è invece costituita da un 40% di stretching CN e un 60% di bending NH e si osserva tipicamente a frequenze che vanno dai 1570 ai 1480 cm^{-1} .^[145-147]

Sono di seguito riportate, per tutti i composti analizzati, le frequenze dei massimi di assorbimento IR nelle regioni $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ e $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, (**Tabella 3.4.1.1**):

Nome composto	$1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ 10^{-3} M	$3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ 10^{-3} M	$3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ 10^{-4} M
Z-Aib-Gly-OEt	1740 ^b , 1724 ^b , <u>1698</u> , 1676, <u>1628</u> , 1600, <u>1512</u>	<u>3432</u> , <u>3394</u>	<u>3432</u> , <u>3394</u>
Z-Leu-Aib-Gly-OEt	1742 ^b , 1720 ^b , 1698 ^b , 1666 ^b , <u>1626</u> , , 1500	<u>3432</u> , 3376	<u>3432</u> , 3372
Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt	1740 ^b , 1720 ^b , 1692 ^a , <u>1676</u> ,	3456 ^a , <u>3438</u> , 3376	3456 ^a , <u>3428</u> , 3372
Tric. Api ⁴	<u>1654</u> , , 1542	<u>3412</u> , <u>3320</u>	<u>3414</u> , <u>3322</u>
Tric. Api ⁸	<u>1656</u> , , 1542	<u>3414</u> , <u>3324</u>	<u>3414</u> , <u>3326</u>

Tabella 3.4.1.1. Frequenze di assorbimento IR in CDCl_3 dei peptidi Z-Aib-Gly-OEt, Z-Leu-Aib-Gly-OEt, Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt e degli analoghi della Tricogina con l'Api in posizione 4, (Tric. Api⁴), e 8, (Tric. Api⁸), nelle regioni $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, (soluzioni a concentrazione $1\cdot 10^{-3}$ e $1\cdot 10^{-4}\text{ M}$), e $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, (soluzioni a concentrazione $1\cdot 10^{-3}\text{ M}$). Legenda: ^(a) spalla, ^(b) banda larga, (.....) bande deboli, (____) bande intense.

Per quanto riguarda il tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt e i suoi precursori, si riportano di seguito gli spettri di ciascuno di essi registrati alle concentrazioni $1\cdot 10^{-3}$ e $1\cdot 10^{-4}\text{ M}$ nella regione $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, (**Figure 3.4.1.1-3.4.1.3**). Tali spettri sono normalizzati in quanto, per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10, si è utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore. Infine, la **Figura 3.4.1.4** mette a confronto le curve dei tre peptidi per poter valutare il contributo dell'allungamento della catena.

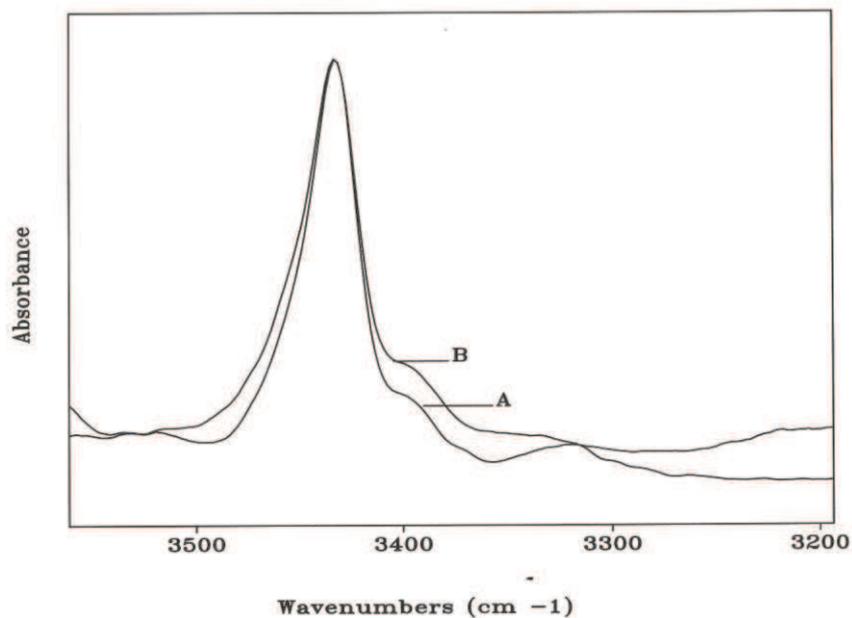


Figura 3.4.1.1. Spettri di assorbimento IR del peptide Z-Aib-Gly-OEt nella regione 3550-3200 cm^{-1} in CDCl_3 alle concentrazioni $1 \cdot 10^{-3}$ M (curva B) e $1 \cdot 10^{-4}$ M (curva A).

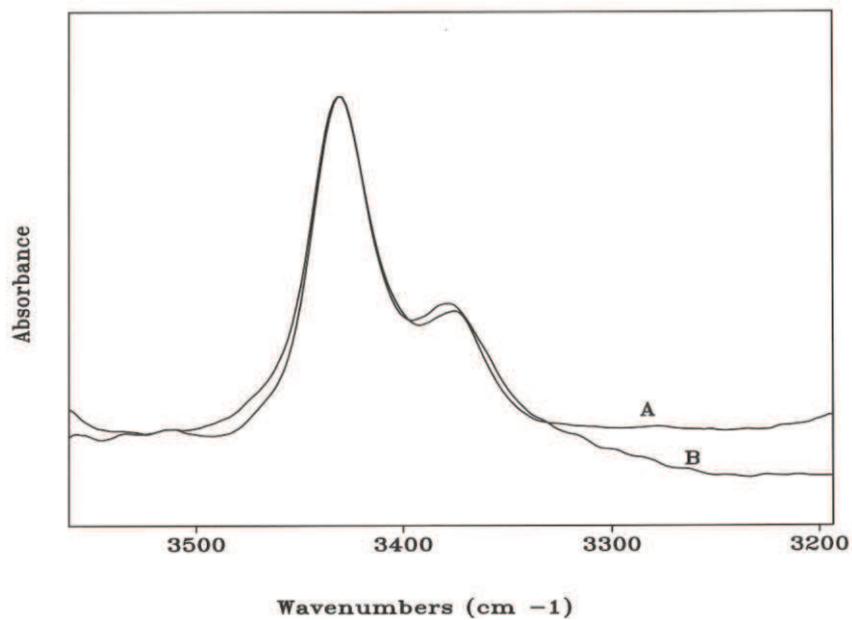


Figura 3.4.1.2. Spettri di assorbimento IR del peptide Z-Leu-Aib-Gly-OEt nella regione 3550-3200 cm^{-1} in CDCl_3 alle concentrazioni $1 \cdot 10^{-3}$ M (curva B) e $1 \cdot 10^{-4}$ M (curva A).

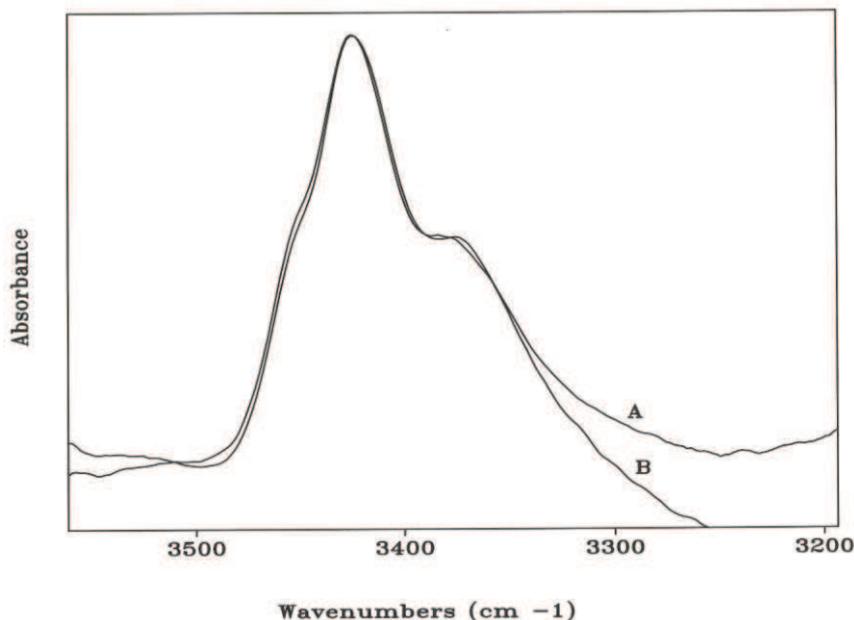


Figura 3.4.1.3. Spettri di assorbimento IR del peptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt nella regione 3550-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1·10⁻³ M (curva B) e 1·10⁻⁴ M (curva A).

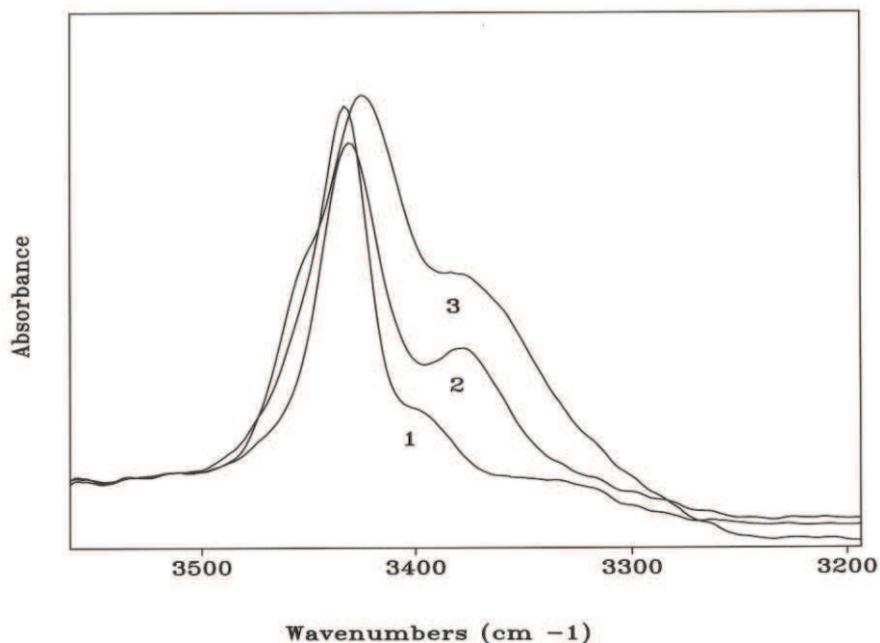


Figura 3.4.1.4. Spettri di assorbimento IR dei peptidi Z-Aib-Gly-OEt (curva 1), Z-Leu-Aib-Gly-OEt (curva 2) e Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt (curva 3) nella regione 3550-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alla concentrazione 1·10⁻³ M.

Dall'indagine di assorbimento IR in soluzione si può dedurre che:

1. Nella zona spettrale compresa tra i 3600 e i 3200 cm⁻¹ tutti e tre i peptidi presentano una banda intensa nella regione degli NH liberi (numeri d'onda superiori a 3400 cm⁻¹). Il dipeptide Z-Aib-Gly-OEt mostra una banda molto

debole a $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ che però non corrisponde alle vibrazioni di stiramento di gruppi NH coinvolti in strutture a elica in quanto sono necessari almeno tre residui per avere un ripiegamento a β -turn. Essa potrebbe essere dovuta alla configurazione completamente estesa, che può essere adottata dalla glicina,^[148] oppure ad altre interazioni intermolecolari. Il tripeptide Z-Leu-Aib-Gly-OEt e il tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt mostrano invece, nella zona degli NH legati, una banda a circa 3370 cm^{-1} corrispondente ad una struttura ripiegata: per il tripeptide può trattarsi soltanto di un β -turn, ossia un giro di elica 3_{10} , mentre per il tetrapeptide non è possibile distinguere se si tratti di un β -turn o di un α -turn, ossia un giro di elica α . Per quanto riguarda la spalla presente a 3456 cm^{-1} nello spettro del tetrapeptide, si suppone sia dovuta alle glicine terminali che, essendo amminoacidi poco ingombrati, conferiscono un'elevata libertà conformazionale alla struttura.

2. Lo studio degli effetti della diluizione porta a ritenere che i legami ad idrogeno coinvolgenti gli NH peptidici siano prevalentemente di tipo intramolecolare, ad eccezione del dipeptide Z-Aib-Gly-OEt: infatti, mentre l'intensità delle bande tra $3380\text{-}3330\text{ cm}^{-1}$ non varia con la diluizione da $1\cdot 10^{-3}$ a $1\cdot 10^{-4}$ M, l'intensità della banda debole a 3394 cm^{-1} diminuisce con la concentrazione, (**Figura 3.4.1.1**).
3. Con l'elongazione dei segmenti aumenta l'intensità della banda degli NH legati, segno che la catena peptidica tende ad organizzarsi in una struttura secondaria stabilizzata da legami ad idrogeno intramolecolari (**Figura 3.4.1.4**). La banda degli NH liberi rimane però molto intensa poiché, nonostante la presenza del residuo elicogenico Aib, la conformazione ripiegata è stabilizzata solo da uno o due legami ad H: al momento della transizione vibrazionale, che avviene in tempi inferiori a quelli impiegati dalla rotazione dei legami, (10^{-15} e 10^{-11} s rispettivamente),^[147] una buona percentuale dei peptidi presenti in soluzione adotta una configurazione disordinata e i loro protoni ammidici risuonano tutti nella regione degli NH liberi.
4. Nella zona spettrale compresa tra i 1800 e i 1500 cm^{-1} (spettri non riportati) si possono osservare le vibrazioni di stiramento dei gruppi C=O esterei e uretanici nell'intervallo $1710\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ e dei gruppi C=O ammidici, (banda **Ammide I**), nell'intervallo $1685\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$.^[145] Tutti e tre i peptidi presentano

una banda di assorbimento intorno a 1670 cm^{-1} , la cui intensità aumenta con l'aumentare del numero di residui nella catena. Tale massimo si avvicina alla posizione canonica dell'assorbimento ammidico I delle conformazioni elicoidali, ($\sim 1660\text{ cm}^{-1}$), ed è caratteristico di strutture ad elica corte e instabili.^[145]

Riassumendo, i risultati dell'indagine di assorbimento IR in soluzione di CDCl_3 indicano che il dipeptide assume una conformazione disordinata, mentre tripeptide e tetrapeptide cominciano a ripiegarsi in strutture elicoidali stabilizzate da legami ad idrogeno intramolecolari.

Per i due analoghi della Tricogina ottenuti in fase solida, si sono potuti registrare soltanto gli spettri IR di quelli aventi la catena laterale dell'Api protetta col gruppo Boc in quanto i peptidi aventi l'Api deprotetto non sono solubili in CDCl_3 . Si riportano di seguito gli spettri di ciascuno di essi registrati alle concentrazioni $1\cdot 10^{-3}$ e $1\cdot 10^{-4}$ M nella regione $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, (**Figure 3.4.1.5 e 3.4.1.6**), che, anche in questo caso, sono normalizzati.

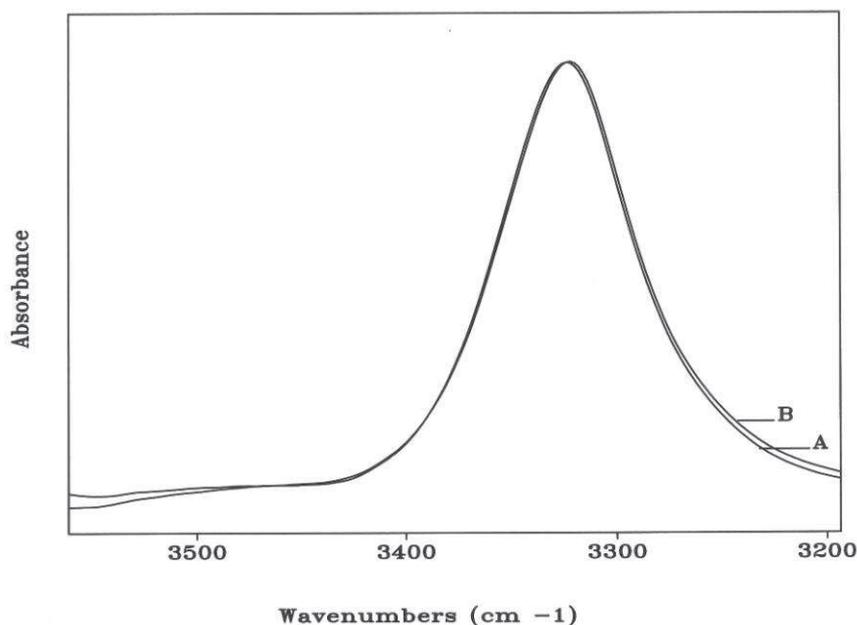


Figura 3.4.1.5. Spettri di assorbimento IR dell'analogo della Tricogina GA IV con l'Api(Boc) in posizione 4 nella regione $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ in CDCl_3 alle concentrazioni $1\cdot 10^{-3}$ M (curva B) e $1\cdot 10^{-4}$ M (curva A).

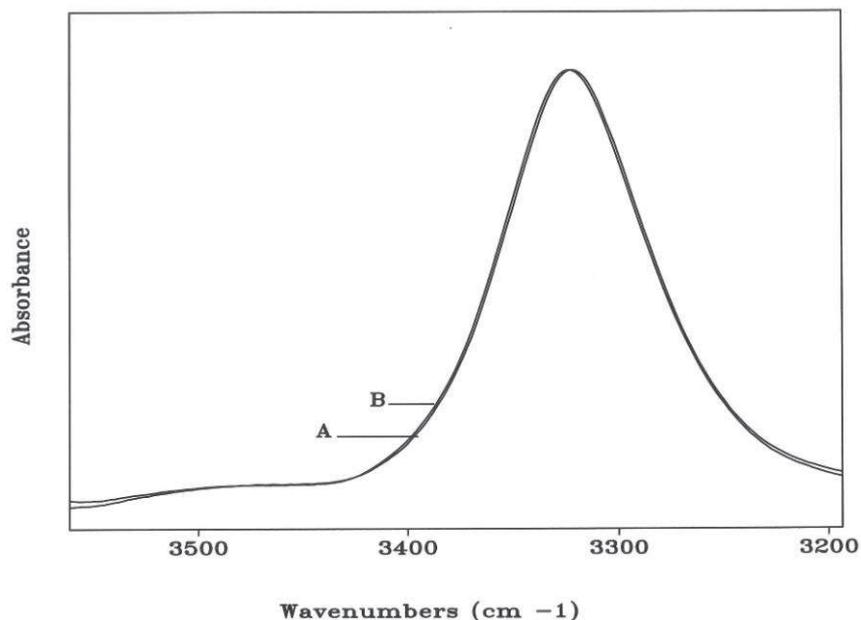


Figura 3.4.1.6. Spettri di assorbimento IR dell'analogo della Tricogina GA IV con l'Api(Boc) in posizione 8 nella regione 3550-3200 cm^{-1} in CDCl_3 alle concentrazioni $1 \cdot 10^{-3}$ M (curva B) e $1 \cdot 10^{-4}$ M (curva A).

I dati più interessanti sono i seguenti:

1. Nella zona spettrale compresa tra i 3600 e i 3200 cm^{-1} tutti e due i peptidi presentano una banda intensa nella regione degli NH legati (numeri d'onda inferiori a 3400 cm^{-1}). Ciò significa che entrambi assumono una struttura secondaria ordinata molto stabile. Dalla posizione dei massimi di assorbimento, (intorno a 3322 cm^{-1}), si può dedurre che si tratta di una conformazione elicoidale; non è possibile però distinguere tra l' α -elica e l'elica 3_{10} .
2. Lo studio degli effetti della diluizione porta a ritenere che i legami ad idrogeno coinvolgenti gli NH peptidici siano intramolecolari, in quanto non si riscontrano variazioni nell'intensità delle bande al diminuire della concentrazione.
3. La zona spettrale compresa tra i 1800 e i 1500 cm^{-1} (spettri non riportati) conferma l'ipotesi di una strutturazione elicoidale dei due analoghi, in quanto la banda ammide I risuona intorno a 1655 cm^{-1} , posizione intermedia tra quella della conformazione ad α -elica (~ 1650 cm^{-1}) e quella della conformazione ad elica 3_{10} (~ 1660 cm^{-1}).^[145,147]

Riassumendo, i risultati dell'indagine di assorbimento IR in soluzione di CDCl_3 inducono ad ipotizzare che gli analoghi della Tricogina GA IV sintetizzati in fase solida si ripieghino in strutture secondarie elicoidali molto stabili. Non è possibile, con questa tecnica, individuare con certezza il tipo di elica.

3.4.2. Spettroscopia ^1H NMR

E' stata condotta un'analisi conformazionale mediante spettroscopia NMR sui peptidi Z-Leu-Aib-Gly-OEt e Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt in soluzione di cloroformio deuterato. Non è invece possibile usare tale spettroscopia con i peptidi più lunghi poiché contengono il TOAC. Il paramagnetismo del nitrossido ostacola infatti la raccolta degli spettri.

È possibile sfruttare la diversa accessibilità dei protoni ammidici a seconda che siano impegnati o meno in legami ad idrogeno: la struttura elicoidale non impegna tutti i protoni NH in ponti a idrogeno, ma lascia liberi quelli dei primi due residui nell'elica 3_{10} e dei primi tre nell' α -elica. Si può quindi valutare lo spostamento dei chemical shift degli NH nello spettro ^1H NMR registrato in CDCl_3 in seguito alle aggiunte di volumi noti di DMSO deuterato: quest'ultimo è un forte accettore di legami ad idrogeno ed interagisce con i protoni ammidici non coinvolti in strutture secondarie spostando i loro picchi a campi più bassi. Gli NH legati, invece, non dovrebbero subire variazioni.^[149-151]

Si riportano di seguito i grafici relativi agli esperimenti eseguiti, (**Figure 3.4.2.1 e 3.4.2.2**): quello a sinistra riporta i valori di chemical shift degli protoni NH in funzione della percentuale di DMSO, mentre quello a destra riporta lo spostamento totale definito come la differenza fra il chemical shift al termine delle aggiunte di dimetilsolfossido, (max), e il chemical shift prima delle aggiunte, (min).

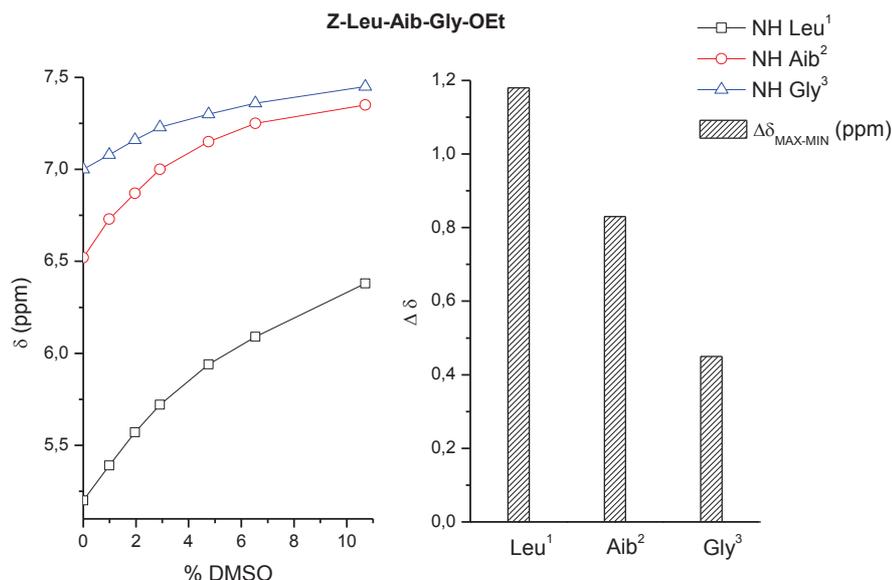


Figura 3.4.2.1. Variazione degli spostamenti chimici dei protoni NH del peptide Z-Leu-Aib-Gly-OEt in seguito all'aggiunta di DMSO. Soluzione $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ M in CDCl_3 .

Si può notare in **Figura 3.4.2.1** che l'NH della glicina in posizione 3 subisce uno spostamento molto minore rispetto agli altri due protoni ammidici: tale risultato è in accordo con il fatto che si abbia un ripiegamento a β -turn. Tuttavia, lo spostamento non è infinitesimo e ciò significa che una frazione non trascurabile di peptidi in soluzione assume una conformazione disordinata: poiché i tempi delle transizioni NMR sono maggiori di quelli della rotazione dei legami, (10^{-3} e 10^{-11} s rispettivamente),^[147] l'esperimento permette di osservare una media pesata tra i chemical shift delle varie conformazioni presenti.

Quindi, mentre l'esperimento IR in soluzione fotografa la molecola nel suo stato conformazionale al momento della transizione vibrazionale individuando la frazione di peptidi che, in quel preciso istante, assume o meno una struttura secondaria definita, l'esperimento NMR dà un'idea dell'equilibrio che si instaura fra varie conformazioni. Se, ad esempio, il peptide assumesse un ripiegamento stabile e, dunque, lo mantenesse per la maggior parte del tempo, la variazione di chemical shift della Gly in posizione 3 sarebbe molto minore perché la media osservata avrebbe un contributo marginale da parte di altre conformazioni.

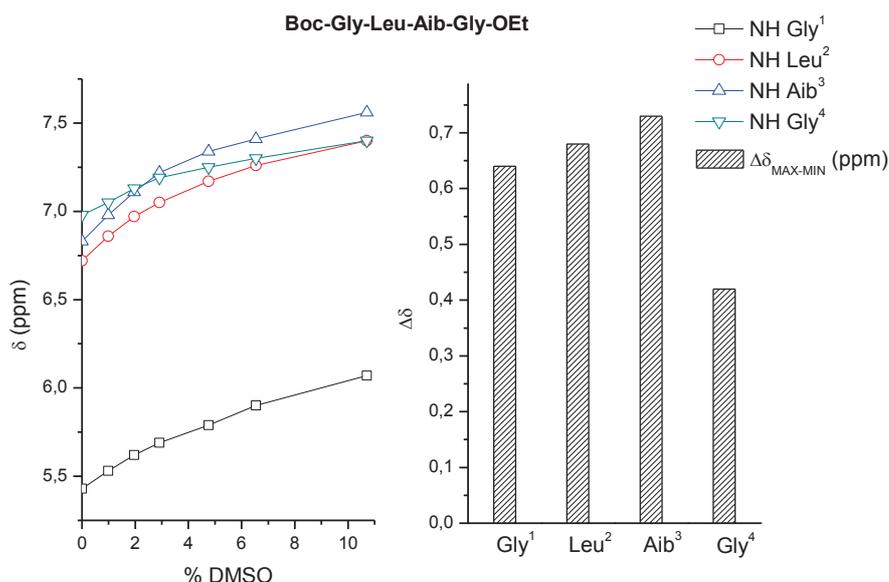


Figura 3.4.2.2. Variazione degli spostamenti chimici dei protoni NH del peptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt in seguito all'aggiunta di DMSO. Soluzione $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ M in CDCl_3 .

Per quanto riguarda il tetrapeptide, (**Figura 3.4.2.2**), mentre il protone ammidico della glicina in posizione 4 presenta una variazione di chemical shift più contenuta rispetto agli altri NH, quello dell'Aib³ risulta essere il protone avente la mobilità più elevata. Di conseguenza, la struttura secondaria maggioritaria assunta dal peptide non può certamente essere un β -turn, ma deve trattarsi di un α -turn. Rispetto alla spettrofotometria infrarossa, la spettroscopia NMR ha il vantaggio di permettere l'identificazione dei residui coinvolti nella formazione di ponti ad idrogeno. Poiché, anche in questo caso, lo spostamento dell'NH della Gly⁴ non è infinitesimo e valgono le stesse considerazioni fatte per il tripeptide, la conformazione ordinata non è molto stabile e si trova in equilibrio con altre disordinate.

Riassumendo, l'analisi NMR, condotta in CDCl_3 , conferma le quanto dedotto dagli spettri IR, registrati nello stesso solvente: ossia, tri- e tetrapeptide assumono strutture ripiegate, ma in equilibrio con conformazioni disordinate.

3.4.3. Dicroismo circolare

Le preferenze conformazionali in soluzione degli analoghi della Tricogina sintetizzati in fase solida sono state esaminate anche mediante dicroismo circolare a temperatura ambiente. Le analisi sono state condotte in metanolo, per tutti i peptidi, e in una soluzione di sodio dodecilsolfato 100 mM in H₂O (SDS, ambiente membranomimetico, **Figura 3.4.3.1a e b**) per i peptidi aventi l'Api deprotetto. Le concentrazioni oscillano intorno a $8 \cdot 10^{-4}$ M. Tuttavia, per l'analogo contenente l'Api deprotetto in posizione 4 è probabile che vi sia un significativo errore sulla concentrazione data la scarsa solubilità di questo peptide nei solventi utilizzati. Pertanto, non verranno presi in considerazione i valori assoluti di ellitticità molare, ma soltanto i loro rapporti all'interno della stessa curva, in quanto l'attendibilità degli stessi dipende dalla conoscenza precisa della concentrazione.

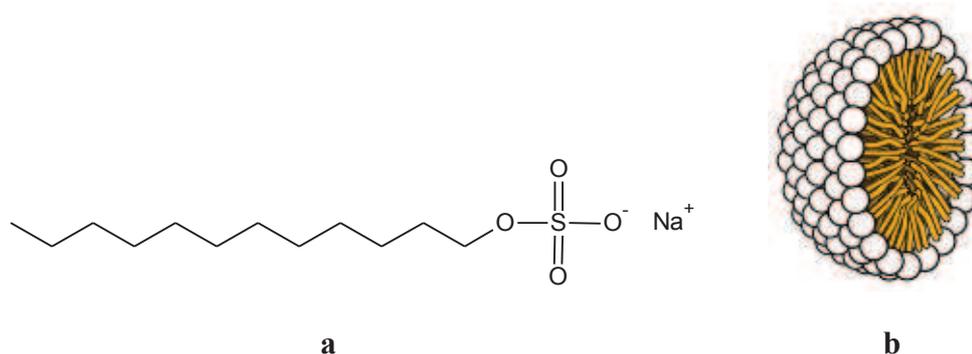


Figura 3.4.3.1. a) Sodio dodecilsolfato, (SDS); **b)** Esempio di struttura micellare formata dal sodio dodecilsolfato in ambiente acquoso con le teste polari rivolte verso il solvente e le code idrofobiche rivolte verso l'interno.^[152]

Si è presa in considerazione la zona spettrale compresa tra i 192 e i 260 nm, dove sono presenti le bande relative alle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del cromoforo peptidico. Queste transizioni sarebbero otticamente inattive, ma la presenza di centri chirali nelle vicinanze del legame peptidico, quali i C ^{α} degli amminoacidi chirali, e/o la loro appartenenza a strutture secondarie elicoidali, intrinsecamente asimmetriche, le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD. Dalla forma delle curve e dalla posizione delle bande è possibile ottenere informazioni riguardanti il tipo di strutturazione dei peptidi in soluzione.

Gli analoghi sintetizzati contengono entrambi il gruppo nitrossilico, il quale presenta due bande di assorbimento: una nella zona del visibile, a circa 400-500 nm, e una a circa 240 nm nella zona di assorbimento del cromoforo ammidico. È stato però dimostrato che l'assorbimento del cromoforo peptidico è dominante rispetto a quello del TOAC e che dunque quest'ultimo ha un'influenza marginale nella zona spettrale di interesse.^[153]

Le curve registrate non presentano variazioni rilevanti nei due solventi utilizzati e sono sempre caratterizzate da due massimi negativi a circa 208 e 222 nm, (Figure 3.4.3.2-3.4.3.4). Spettri dicroici di questo tipo si possono osservare in strutture elicoidali destrogire sia di tipo α che 3_{10} .^[154-156]

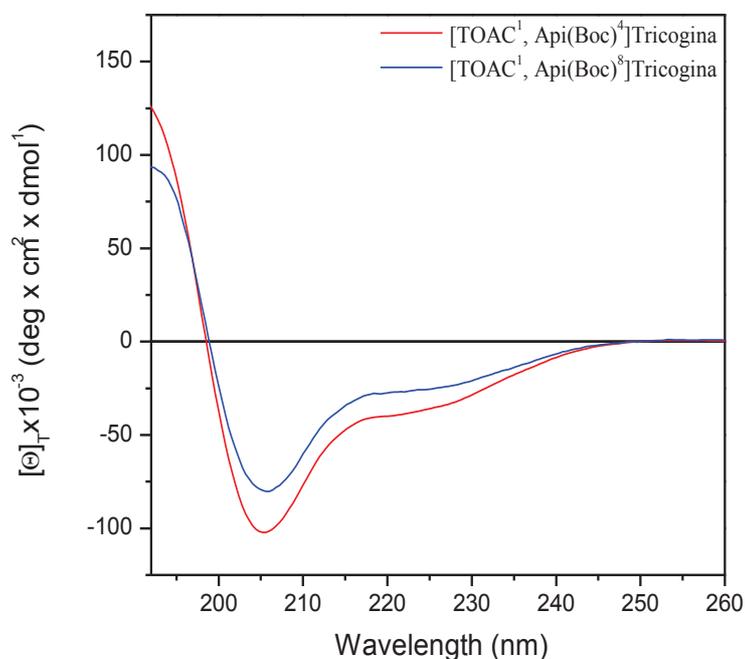


Figura 3.4.3.2. Spettri CD degli analoghi [TOAC¹, Api(Boc)⁴]Tricogina e [TOAC¹, Api(Boc)⁸]Tricogina in MeOH. Cammino ottico: 0.02 cm; concentrazione peptidica: $7,7 \cdot 10^{-4}$ M e $7,1 \cdot 10^{-4}$ M rispettivamente.

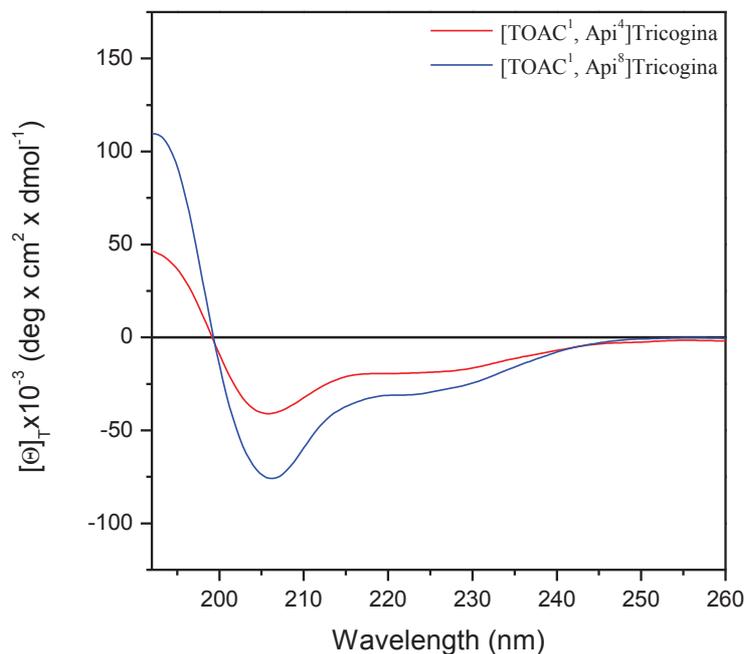


Figura 3.4.3.3. Spettri CD degli analoghi [TOAC¹, Api⁴]Tricogina e [TOAC¹, Api⁸]Tricogina in MeOH. Cammino ottico: 0.02 cm; concentrazione peptidica: $7,2 \cdot 10^{-4}$ M (teorica, ma non effettiva data la scarsa solubilità) e $8,7 \cdot 10^{-4}$ M rispettivamente.

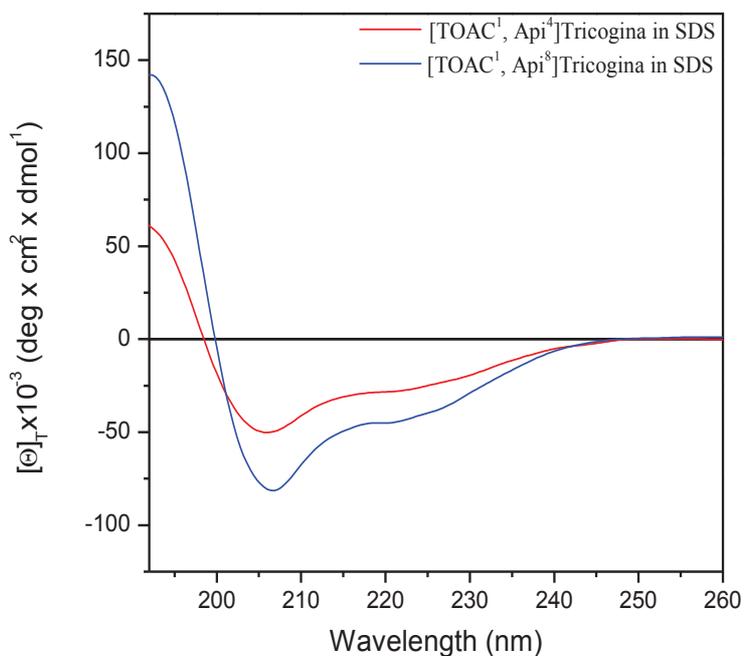


Figura 3.4.3.4. Spettri CD degli analoghi [TOAC¹, Api⁴]Tricogina e [TOAC¹, Api⁸]Tricogina in SDS 100 mM. Cammino ottico: 0.02 cm; concentrazione peptidica: $7,2 \cdot 10^{-4}$ M (teorica, ma non effettiva data la scarsa solubilità) e $8,7 \cdot 10^{-4}$ M rispettivamente.

Inoltre è noto che, mentre nell' α -elica destrogira i due massimi negativi centrati a 208 nm, (transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, componente parallela), e a 222 nm, (transizione $n \rightarrow \pi^*$), sono circa di pari intensità, nell'elica 3_{10} la transizione $n \rightarrow \pi^*$ presenta un'intensità decisamente ridotta rispetto alla $\pi \rightarrow \pi^*$ e tende a spostarsi a lunghezze d'onda leggermente inferiori.^[157,158] Quindi, un valore del rapporto $R = [\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ inferiore a 0.4 è ritenuto diagnostico di una conformazione elicoidale di tipo 3_{10} , mentre valori prossimi all'unità vengono considerati tipici dell' α -elica, anche se non esiste al riguardo consenso unanime.^[156] Valori intermedi indicano una coesistenza, in soluzione, dei due tipi di conformazione elicoidale.^[159] In **Tabella 3.4.3.1** sono riportati i valori di R per ciascun peptide nei solventi utilizzati:

Peptide	Solvente	$[\Theta]_{\lambda} \cdot 10^{-3}$ [λ (nm)]	$[\Theta]_{\lambda} \cdot 10^{-3}$ [λ (nm)]	$R = [\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$
[TOAC ¹ , Api(Boc) ⁴]Tricogina	MeOH	-102.15 [205.2]	-38.81 [222]	0.38
[TOAC ¹ , Api(Boc) ⁸]Tricogina	MeOH	-80.30 [205.6]	-27.01 [222]	0.34
[TOAC ¹ , Api ⁴]Tricogina	MeOH	-41.01 [205.6]	-19.27 [222]	0.47
	SDS	-50.20 [206]	-27.65 [222]	0.55
[TOAC ¹ , Api ⁸]Tricogina	MeOH	-75.88 [206]	-30.95 [222]	0.41
	SDS	-81.34 [206.4]	-45.07 [220]	0.55

Tabella 3.4.3.1. Ellitticità molare ($\text{gradi} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) e rapporto $R = [\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ per i tre peptidi alle lunghezze d'onda corrispondenti ai due massimi negativi delle curve dicroiche nei due solventi utilizzati.

I risultati ottenuti indicano che i peptidi assumono prevalentemente una conformazione ad elica 3_{10} destrogira. Infatti, i valori di R sono tutti prossimi a 0.4 e, per gli analoghi aventi l'Api protetto, sono addirittura inferiori. La conformazione si sposta leggermente verso l' α -elica in SDS, ma il contributo dell'elica 3_{10} rimane significativo. Va pure sottolineato che questi analoghi della Tricogina adottano una conformazione elicoidale molto stabile. Infatti, la struttura rimane saldamente elicoidale al variare del solvente (MeOH e SDS). Questo dato conferma la notevole capacità dei residui amminoacidici C ^{α} -tetrasostituiti di promuovere strutture elicoidali.

In conclusione, l'indagine CD permette di confermare quanto dedotto dall'analisi IR in soluzione, ossia che i peptidi sintetizzati si ripiegano in strutture secondarie elicoidali molto stabili. In particolare, si può evidenziare una preferenza per l'elica 3_{10} , la quale risulta accentuata negli analoghi aventi l'Api protetto con il gruppo Boc.

3.5. Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali

Allo scopo di verificare le capacità dei peptidi sintetizzati in fase solida di alterare la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici è stato eseguito un test preliminare di interazione con membrane. Le attività misurate sono state confrontate con quelle della Tricogina GA IV e del tetrapeptide sintetizzato in soluzione.

L'esperimento può essere riassunto nei seguenti passaggi (**Figura 3.5.1**):^[7]

1. Sintesi di doppi strati fosfolipidici artificiali che mimino le membrane delle cellule sane, costituite prevalentemente da fosfolipidi zwitterionici e contenenti colesterolo, e le membrane delle cellule tumorali, aventi una carica netta negativa maggiore e un minor contenuto di steroli. Allo scopo, si sono scelte miscele lipidiche di fosfatidilcolina/colesterolo 7:3, per simulare le membrane cellulari sane, e di fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerolo 7:3 per simulare quelle cancerose, (**Figura 3.5.2**).
2. Incubazione delle miscele in presenza di una sostanza fluorescente, la carbossifluoresceina (**Figura 3.5.3a**), che viene inglobata all'interno di vescicole multilamellari di liposomi. Tali strutture sono costituite da più doppi strati fosfolipidici concentrici e vengono ridotte a vescicole unilamellari, chiamate SUV e costituite da un solo strato liposomiale, tramite sonicazione.
3. Separazione delle vescicole dall'eccesso di carbossifluoresceina e conservazione delle stesse in soluzione acquosa tamponata con HEPES (**Figura 3.5.3b**), a pH pressoché neutro.
4. Aggiunta di quantità note di peptide ad una soluzione a concentrazione nota di liposomi e misura della fluorescenza dopo 20 minuti. Se la CF rimane completamente inglobata nelle membrane fosfolipidiche integre, l'emissione di fluorescenza è modesta: si verifica infatti il fenomeno dell'auto-quenching dovuto all'elevata concentrazione di sostanza fluorescente all'interno delle vescicole. Se invece, il peptide introdotto rende più permeabile la membrana fosfolipidica, la CF fuoriesce dalle vescicole, diluendosi nell'ambiente circostante con conseguente aumento di fluorescenza. Il valore di massima fluorescenza viene ricavato aggiungendo un tensioattivo, il Triton, (**Figura**

3.5.3c), alla soluzione lipidica; esso opera la completa disgregazione delle membrane causando, in questo modo, il rilascio totale della CF.

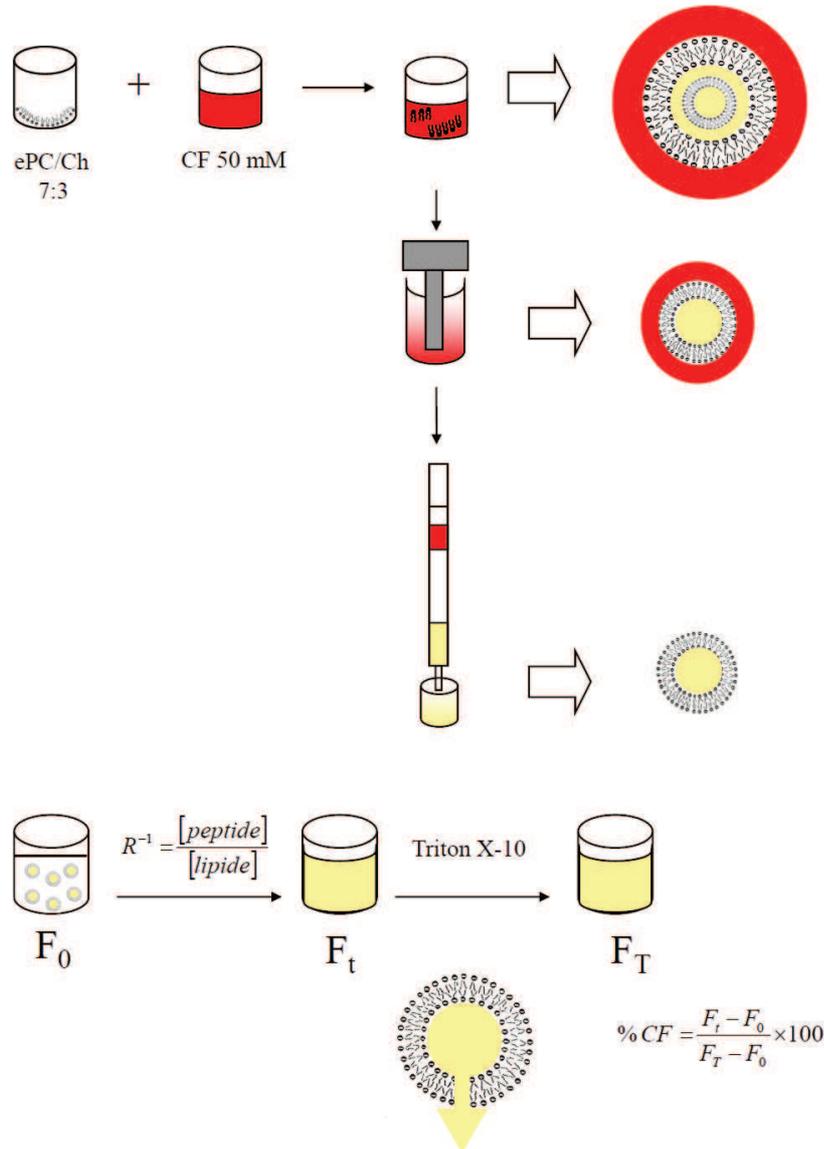


Figura 3.5.1. Modello schematico dell'esperimento di modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali, (*leakage*).

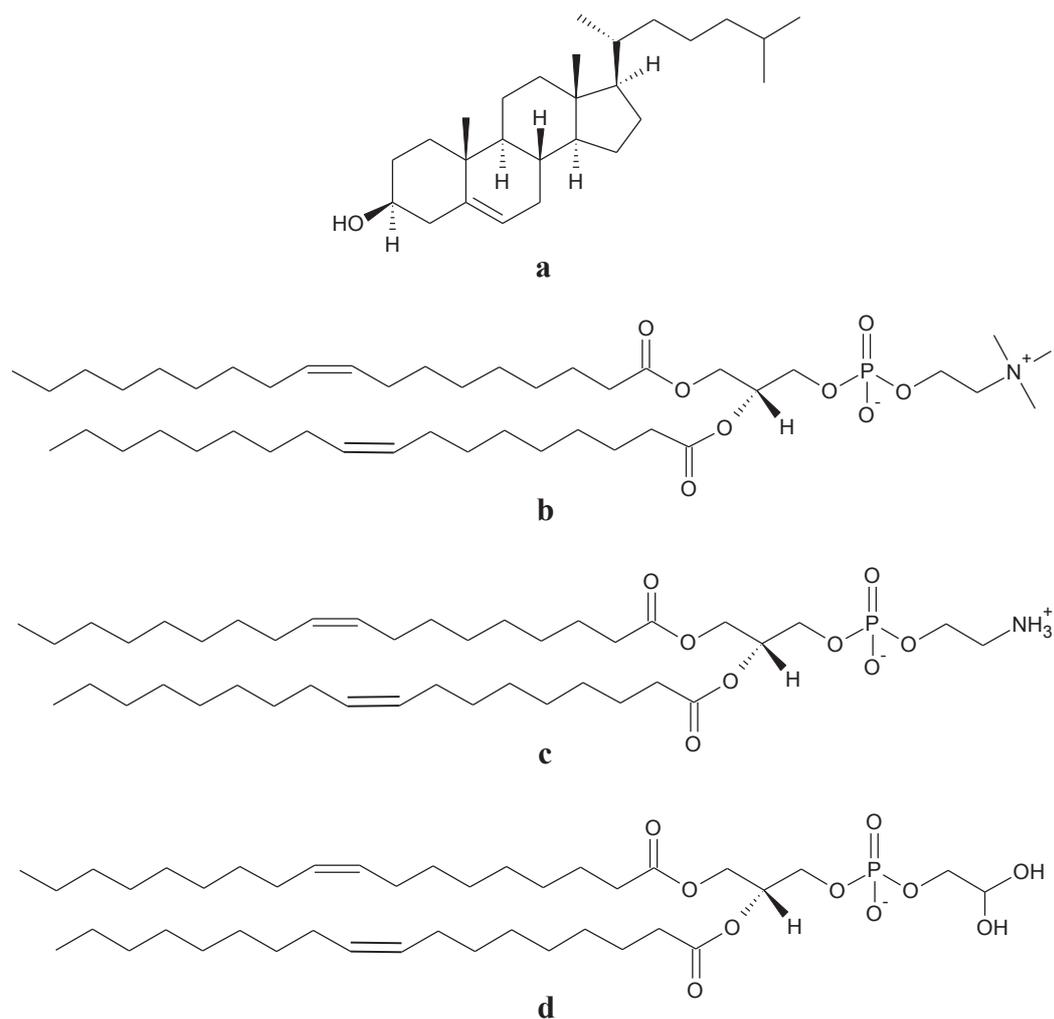


Figura 3.5.2. **a**) Colesterolo, (Ch); **b**) 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, (PC); **c**) 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanamina, (PE); **d**) 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerolo), (PG). Le cariche riportate sono quelle presenti a pH fisiologico.

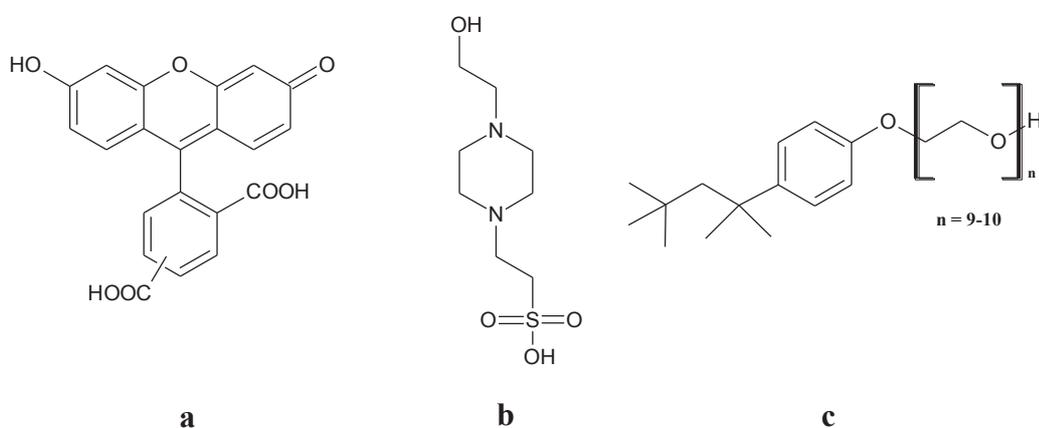


Figura 3.5.3. **a**) 5(6)-Carbossifluoresceina, (CF); **b**) Acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico, (Hepes); **c**) Polietilenglicole *tert*-octilfenilettere, (Triton X-100).

I dati ottenuti sono stati plottati come descritto nella *Parte Sperimentale*, ossia in grafici aventi come ascissa i rapporti $R^{-1} = ([\text{peptide}]/[\text{lipide}]) \cdot 10^3$ e come ordinata la percentuale di carbossifluoresceina rilasciata dopo 20 minuti dall'aggiunta del peptide. Tale dato è stato ottenuto dalla misura di fluorescenza normalizzata rispetto alla fluorescenza in assenza del peptide, (F_0), e alla fluorescenza totale dovuta all'aggiunzione del tensioattivo, (F_{TOT}). I risultati degli esperimenti condotti sono riportati di seguito in **Figura 3.5.4**, per i fosfolipidi costituiti da PC/Ch 7:3, e in **Figura 3.5.5**, per le vescicole di PE/PG 7:3.

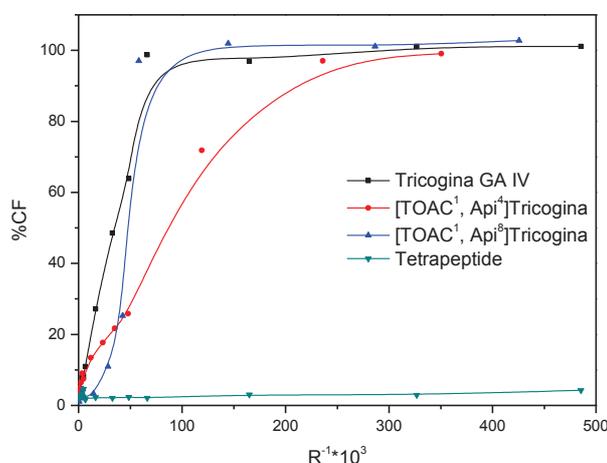


Figura 3.5.4. Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch 7:3 dopo 20 minuti dall'aggiunta di diversi rapporti $[\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dai peptidi Tricogina GA IV, [TOAC¹, Api⁴]Tricogina, [TOAC¹, Api⁸]Tricogina e Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt.

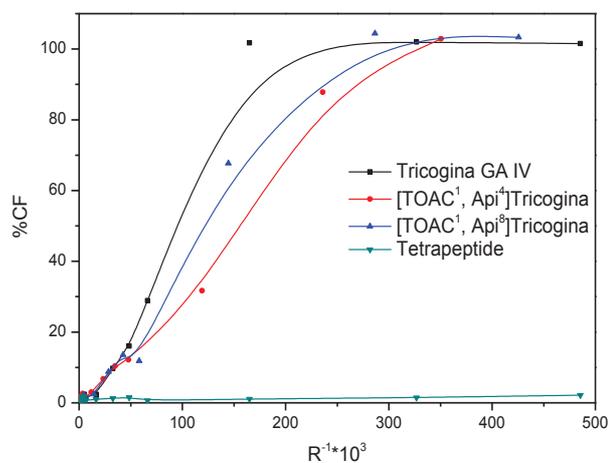


Figura 3.5.5. Rilascio di CF da vescicole di PE/PG 7:3 dopo 20 minuti dall'aggiunta di diversi rapporti $[\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dai peptidi Tricogina GA IV, [TOAC¹, Api⁴]Tricogina, [TOAC¹, Api⁸]Tricogina e Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt.

Nonostante l'inserimento di Api e TOAC, gli analoghi testati mantengono l'attività membrano-litica della Tricogina. Le curve ottenute mostrano un andamento a sigmoide, che sembra essere leggermente accentuato per gli analoghi sintetici rispetto alla Tricogina naturale. Tale dato è indicativo di un meccanismo di azione di tipo cooperativo, secondo il quale è richiesta una concentrazione minima di peptide per formare gli aggregati responsabili del processo di permeazione dei doppi strati fosfolipidici.

Si può notare che il tetrapeptide Boc-Gly-Leu-Aib-Gly-OEt non è in grado di permeare le membrane lipidiche. Nonostante questo risultato fosse prevedibile, lo studio su tale segmento corto è stato condotto per dimostrare che la lunghezza della catena e il ripiegamento in strutture elicoidali stabili sono caratteristiche essenziali per promuovere la permeabilità dei doppi strati.

Va anche qui ricordata l'incertezza sulla concentrazione del peptide con Api in posizione 4 deprotetto, causata dalla solubilizzazione difficoltosa. Ad essa si potrebbe imputare la minore potenza osservata per tale peptide. Non si può tuttavia escludere che l'ingombro sterico di Api e TOAC, spaziati da un solo giro d'elica, impedisca parzialmente la formazione degli aggregati necessari per innescare la permeazione delle vescicole.

Ponendo a confronto i due tipi di liposomi si nota una minor affinità dei peptidi per la miscela PE/PG 7:3 rispetto alla miscela PC/Ch 7:3 analogamente a quanto avviene con la Tricogina naturale, (**Tabella 3.5.1**).

Peptide	$R^{-1}_{(50\% CF)}$ da PC/Ch	$R^{-1}_{(50\% CF)}$ da PE/PG
Tricogina GA IV	0.04	0.09
[TOAC ¹ , Api ⁴]Tricogina	0.09	0.16
[TOAC ¹ , Api ⁸]Tricogina	0.05	0.12

Tabella 3.5.1. Rapporto R^{-1} al quale si ha un rilascio di carbossifluoresceina pari al 50% dalle vescicole fosfolipidiche di PC/Ch 7:3 e PE/PG 7:3, in seguito all'aggiunta dei peptidi Tricogina GA IV, [TOAC¹, Api⁴]Tricogina e [TOAC¹, Api⁸]Tricogina.

Quindi l'inserimento in sequenza di un residuo carico positivamente non sembra aver incrementato l'attrazione per i fosfolipidi aventi carica netta negativa maggiore, come invece si sperava inizialmente per aumentare la selettività verso le membrane delle cellule tumorali. Bisogna però sottolineare che le membrane

biologiche sono alquanto diverse dai modelli utilizzati per tale saggio preliminare, a causa della presenza di numerose proteine transmembrana e recettori che costituiscono quasi il 50% dei componenti delle membrane.^[86] Per una valutazione più approfondita dell'attività antitumorale degli analoghi peptidici sarà pertanto necessario effettuare degli esperimenti su colture cellulari *in vitro*.

Infine, allo scopo di mettere a punto le condizioni per i futuri studi EPR su questi peptidi, il gruppo della prof.ssa Anna Lisa Maniero ha eseguito preliminari spettri EPR delle soluzioni di liposomi contenenti gli analoghi sintetizzati: in particolare si sono scelte quelle aventi il rapporto peptide/lipide maggiore, pari a circa 0.40, per ottenere spettri con un buon rapporto segnale/rumore di fondo (**Figure 3.5.6 e 3.5.7**). In queste condizioni, però, le vescicole sono state tutte disgregate e i peptidi risultano liberi in soluzione in quanto il segnale del nitrossido non presenta gli allargamenti di riga caratteristici di una limitazione nella libertà conformazionale del TOAC. Le quantità sintetizzate non erano sufficienti per eseguire spettri a rapporti peptide/lipide inferiori (ai quali si sarebbe probabilmente osservata la coesistenza della specie libera con quella interagente con le membrane) che dessero un segnale accettabile. Si sarebbero dovute infatti preparare delle soluzioni ad una più elevata concentrazione di peptide rispetto a quelle utilizzate per il *leakage* perché si potesse vedere un buon segnale EPR. Per tale ragione è stata riprogrammata, nel nostro laboratorio, una sintesi su più larga scala di questi peptidi. Presso l'Università di Bologna saranno condotti successivamente degli esperimenti con colture cellulari.

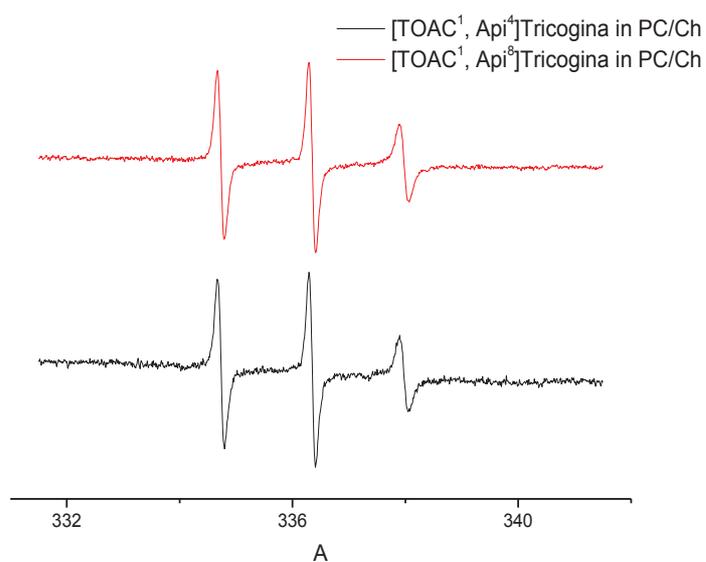


Figura 3.5.6. Spettri EPR a temperatura ambiente dei peptidi [TOAC¹, Api⁴]Tricogina e [TOAC¹, Api⁸]Tricogina nella soluzione tampone dei liposomi PC/Ch 7:3. Il rapporto peptide/lipide è pari a circa 0.40.

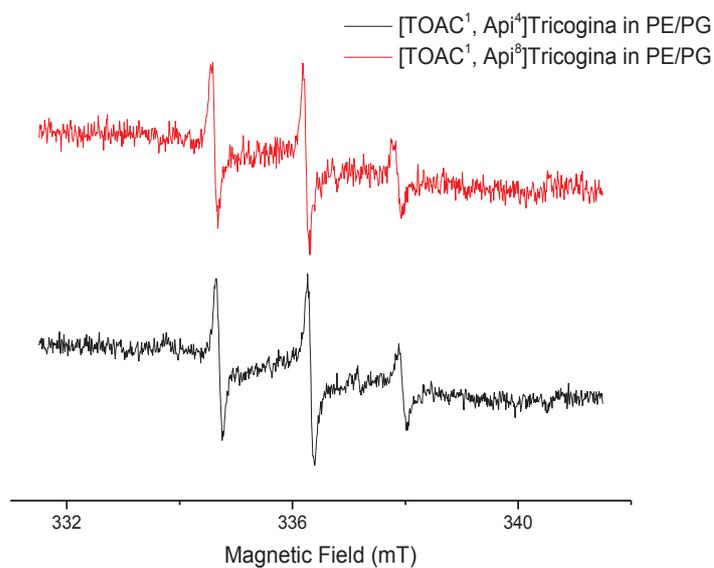


Figura 3.5.7. Spettri EPR a temperatura ambiente dei peptidi [TOAC¹, Api⁴]Tricogina e [TOAC¹, Api⁸]Tricogina nella soluzione tampone dei liposomi PE/PG 7:3. Il rapporto peptide/lipide è pari a circa 0.40.

4. CONCLUSIONI

Il lavoro riportato in questa Tesi ha permesso di mettere a punto opportune strategie di sintesi su fase solida che consentono di preparare analoghi della Tricogina GA IV contenenti l'amminoacido Api e la sonda EPR TOAC. In particolare si è verificata la possibilità di rigenerare efficacemente la funzione radicalica del TOAC a seguito del trattamento acido necessario per rimuovere il gruppo protettore della catena laterale dell'Api.

L'indagine conformazionale in soluzione, condotta mediante spettroscopia di assorbimento IR e dicroismo circolare, ha consentito di concludere che i peptidi ottenuti assumono conformazioni elicoidali in cloroformio deuterato, metanolo e in soluzione di sodio dodecilsolfato. In particolare, l'analisi CD ha rivelato il prevalere di strutture di tipo 3_{10} in soluzione alcolica, mentre in SDS compare un contributo significativo di strutture α -elicoidali.

Studi preliminari di interazione con membrane modello, che imitano le membrane delle cellule sane e quelle delle cellule cancerose, hanno mostrato che gli analoghi sintetizzati sono in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici con un'attività paragonabile a quella della Tricogina GA IV.

Si sono riscontrate notevoli difficoltà nella preparazione di derivati dell'Api. Nonostante si siano individuate condizioni di reazione che portano a rese accettabili, i limitati tempi a disposizione non hanno consentito la sintesi in soluzione dei peptidi programmati, che sono stati invece sintetizzati su fase solida. Sono stati comunque preparati in soluzione, con rese soddisfacenti, alcuni segmenti corti della Tricogina GA IV che, a seguito di indagini conformazionali tramite IR e NMR, hanno rivelato un incipiente livello di strutturazione elicoidale anche se limitata.

5. BIBLIOGRAFIA

1. R. W. Roeske, S. J. Kennedy, "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins" Vol. 7, B. Weinstein Ed., Dekker, New York (1983) 205-265.
2. R. M. Epand, *Biochim. Biophys. Acta* **1376** (1998) 353-368.
3. R. Nagaraj, P. Balaram, *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 356-362.
4. M. K. Mathew, P. Balaram, *Mol. Cell. Biochem.* **50** (1983) 47-64.
5. E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, G. M. Bonora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982) 7951-7954.
6. H. Brückner, H. Graf, *Experientia* **39** (1983) 528-530.
7. C. Auvin-Guette, S. Rebuffat, Y. Prigent, B. Bodo, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 2170-2174.
8. C. Auvin-Guette, S. Rebuffat, I. Vuidepot, M. Messias, B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2** (1993) 249-255.
9. Y. S. Tsantrizos, S. Pischos, F. Sauriol, P. Widden, *Can. J. Chem.* **74** (1996) 165-172.
10. Y. S. Tsantrizos, S. Pischos, F. Sauriol, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 2118-2121.
11. T. Fujita, S. Wada, A. Iida, T. Nishimura, M. Kanai, N. Toyama, *Chem. Pharm. Bull.* **42** (1994) 489-494.
12. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, R. F. Epand, R. M. Epand, *Cell. Mol. Life Sci.* **58** (2001) 1179-1188.
13. H. Kleinkauf, H. V. Döhren, *Eur. J. Biochem.* **192** (1990) 1-15.
14. G. Jung, H. Brückner, H. Schmitt, "Structure and Activity of Natural Peptides" W. Voelter, G. Weitzel Ed., Gruyter, Berlin (1981).
15. T. Le Doan, M. El Hajji, S. Rebuffat, M. R. Rajesvari, B. Bodo, *Biochim. Biophys. Acta* **858** (1986) 1-5.
16. P. Mueller, D. O. Rudin, *Nature* **217** (1968) 713-719.
17. R. C. Pandey, J. C. J. Cook, K. L. J. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 8469-8483.

18. M. K. Mathew, P. Balaram, *FEBS Lett.* **157** (1983) 1-5.
19. G. Menestrina, K. P. Voges, G. Jung, G. Boheim, *J. Membrane Biol.* **93** (1986) 111-132.
20. C. Toniolo, E. Benedetti, *Macromolecules* **24** (1991) 4004-4009.
21. I. L. Karle, P. Balaram, *Biochemistry* **29** (1990) 6747-6755.
22. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, *Biopolymers* **60** (2001) 396-419.
23. B. V. Venkataram Prasad, V. Sasisekharan, *Macromolecules* **12** (1979) 1107-1110.
24. Y. Paterson, S. M. Rumsey, E. Benedetti, G. Nemethy, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 2947-2955.
25. R. Improta, N. Rega, C. Aleman, V. Barone, *Macromolecules* **34** (2001) 7550-7557.
26. C. Toniolo, E. Benedetti, *Trends Biochem. Sci.* **16** (1991) 350-353.
27. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry* **9** (1970) 3471-3479.
28. M. Crisma, G. Valle, F. Formaggio, C. Toniolo, *Z. Kristallogr.* **213** (1998) 599-604.
29. J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **34** (1981) 167-339.
30. C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **6** (1968) 1425-1436.
31. P. Y. Chou, G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* **115** (1977) 135-175.
32. C. Toniolo, *Crit. Rev. Biochem.* **9** (1980) 1-44.
33. G. D. Rose, Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **37** (1985) 1-109.
34. C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **203** (1988) 221-232.
35. E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, M. Crisma, G. M. Bonora, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 2437-2444.
36. C. Toniolo, G. Valle, G. M. Bonora, M. Crisma, F. Formaggio, A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, *Biopolymers* **25** (1986) 2237-2253.

37. G. Valle, M. Crisma, C. Toniolo, R. Beißwenger, A. Rieker, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1989 (1989) 337-343.
38. G. Valle, M. Crisma, C. Toniolo, *Z. Kristallogr.* **188** (1989) 261-269.
39. M. Souhassou, G. D. Smith, M. T. Leplawy, G. R. Marshall, *Acta Crystallogr. A* **46**, (1990) suppl. C-140 PS-04.01.16.
40. V. Pavone, B. Di Blasio, C. Pedone, A. Santini, E. Benedetti, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, *Gazz. Chim. Ital.* **121** (1991) 21-27.
41. B. Di Blasio, A. Santini, V. Pavone, C. Pedone, E. Benedetti, V. Moretto, M. Crisma, C. Toniolo, *Struct. Chem.* **2** (1991) 523-527.
42. A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, G. M. Bonora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 1988-1992.
43. V. Pavone, B. di Blasio, A. Santini, E. Benedetti, C. Pedone, C. Toniolo, M. Crisma, *J. Mol. Biol.* **214** (1990) 633-635.
44. C. Toniolo, M. Crisma, G. M. Bonora, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, A. Santini, *Biopolymers* **31** (1991) 129-138.
45. R. Geßmann, H. Brückner, M. Kokkinidis, *Acta Crystallogr. B* **54** (1998) 300-307.
46. R. Geßmann, H. Brückner, K. Petratos, *J. Pept. Sci.* **9** (2003) 753-762.
47. Y. Paterson, E. R. Stimson, D. J. Evans, S. J. Leach, H. A. Scheraga, *Int. J. Pept. Protein Res.* **20** (1982) 468-480.
48. C. Toniolo, G. M. Bonora, V. Barone, A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, P. Grimaldi, F. Lelj, V. Pavone, C. Pedone, *Macromolecules* **18** (1985) 895-902.
49. E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, A. Santini, C. Crisma, C. Toniolo, "Molecular Conformation and Biological Interactions" P. Balaram, S. Ramaseshan Ed., Indian Academy of Science, Bangalore (1991) 497-502.
50. K. A. Bolin, G. L. Millhauser, *Acc. Chem. Res.* **32** (1999) 1027-1033.
51. C. Auvin-Guette, S. Rebuffat, Y. Prigent, B. Bodo, "Peptides 1990" E. Giralt, D. Andreu Ed., ESCOM, Leiden (1991) 428-429.
52. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, L. Pirrone, G. M. Bonora, S. Mammi, C. Peggion, "Peptides 1992" C. H. Schneider, A. N. Eberle Ed., ESCOM, Leiden (1993) 613-614.

53. C. Peggion, F. Formaggio, M. Crisma, R. F. Epand, R. M. Epand, C. Toniolo, *J. Pept. Sci.* **9** (2003) 679-689.
54. C. Toniolo, C. Peggion, M. Crisma, F. Formaggio, X. Shui, D. S. Eggleston, *Nature: Struct. Biol.* **1** (1994) 908-914.
55. R. M. Epand, Y. Shai, J. P. Segrest, G. M. Anantharamaiah, *Biopolymers* **37** (1995) 319-338.
56. K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **3** (2005) 238-250.
57. K. A. Brogden, *Nature* **3** (2005) 238-250.
58. V. Monaco, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, P. Hanson, G. L. Millhauser, *Biopolymers* **50** (1999) 239-253.
59. C. Toniolo, E. Valente, F. Formaggio, M. Crisma, G. Pilloni, C. Corvaja, A. Toffoletti, G. V. Martinez, M. P. Hanson, G. L. Millhauser, C. George, G. L. Flippen-Anderson, *J. Pept. Sci.* **1** (1995) 45-57.
60. M. Crisma, A. Bianco, F. Formaggio, C. Toniolo, J. Kamphuis, *Lett. Pept. Sci.* **2** (1995) 187-189.
61. M. L. Smythe, C. R. Nakaie, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 10555-10562.
62. J. L. Flippen-Anderson, C. George, G. Valle, E. Valente, A. Bianco, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **47** (1996) 231-238.
63. P. Hanson, G. Martinez, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, C. Vita, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 271-272.
64. P. Hanson, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 7618-7625.
65. P. Hanson, G. Martinez, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, C. Vita, *Mol. Phys.* **95** (1998) 957-966.
66. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, *Biopolymers* **47** (1998) 153-158.
67. R. F. Epand, R. M. Epand, V. Monaco, S. Stoia, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, *Eur. J. Biochem.* **266** (1999) 1021-1028.
68. L. Stella, C. Mazzuca, M. Venanzi, A. Palleschi, M. Didonè, F. Formaggio, C. Toniolo, B. Pispisa, *Biophys. J.* **86** (2004) 936-945.

69. C. Mazzuca, L. Stella, M. Venanzi, F. Formaggio, C. Toniolo, B. Pispisa, *Biophys. J.* **88** (2005) 3411-3421.
70. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, V. Monaco, C. Goulard, S. Rebuffat, B. Bodo, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 4952-4958.
71. M. De Zotti, B. Biondi, F. Formaggio, C. Toniolo, L. Stella, Y. Park, K. S. Hahm, *J. Pept. Sci.* **15** (2009) 615-619.
72. D. S. Eggleston, X. Shui, V. Monaco, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, "Peptides: Chemistry, Structure and Biology" P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges Ed., Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford (1996) 436-437.
73. R. F. Epand, R. M. Epand, F. Formaggio, M. Crisma, H. Wu, R. Lehrer, C. Toniolo, *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) 703-712.
74. S. Wada, H. Tsuda, T. Okada, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 5688-5691.
75. B. Szachowicz-Petelska, I. Dobrzyńska, Z. Figaszewski, S. Sulkowski, *Mol. Cell. Biochem.* **238** (2002) 41-47.
76. Immagine tratta da: www.labiologiaumana.altervista.org; data di accesso 17/09/2013.
77. P. R. Cullis, M. J. Hope, "Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes" D.E. Vance, J. Vance Ed., Amsterdam (1991) 1-41.
78. D. Chandler, *Nature* **437** (2005) 640-647.
79. H. G. Heidrich, R. Stahn, K. Hannig, *J. Cell Biol.* **46** (1970) 137-150.
80. L. Wojtczak, M. J. Nałęcz, *Eur. J. Biochem.* **94** (1979) 99-107.
81. L. B. Chen, *Annu. Rev. Cell Biol.* **4** (1988) 155-181.
82. K. A. Nalecz, *Postepy Biochem.* **35** (1989) 437-467.
83. Y. Okada, G. Editor, *J. Membr. Biol.* **209** (2006) 1-2.
84. R. Franco, C. D. Bortner, J. A. Cidlowski, *J. Membr. Biol.* **209** (2006) 43-58.
85. T. N. Kropacheva, J. Raap, *Biochim. Biophys. Acta* **1567** (2002) 193-203.
86. A. A. Spector, M. A. Yorek, *J. Lipid Res.* **26** (1985) 1015-1035.
87. T. Utsugi, A. J. Schroit, J. Connor, C. D. Bucana, I. J. Fidler, *Cancer Res.* **51** (1991) 3062-3066.

88. S. L. Sand, J. Nissen-Meyer, O. Sand, T. M. Haug, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (2013) 249-259.
89. M. Reynier, H. Sari, M. D'Anglebermes, E. A. Kye, L. Pasero, *Cancer Res.* **51** (1991) 1270-1277.
90. J. Cho, M. Tanaka, S. Sato, K. Kinbara, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 13176-13178.
91. T. S. Yokum, M. G. Bursavich, T. Gauthier, R. P. Hammer, M. L. McLaughlin, *Chem. Commun.* **17** (1998) 1801-1802.
92. T. S. Yokum, P. H. Elzer, M. L. McLaughlin, *J. Med. Chem.* **39** (1996) 3603-3605.
93. W. C. Still, M. Khan, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **43** (1978) 2923-2925.
94. C. L. Wysong, T. S. Yokum, G. A. Morales, R. L. Gundry, M. L. McLaughlin, R. P. Hammer *J. Org. Chem.* **61** (1996) 7650-7651.
95. A. Strecker, *Eur. J. Org. Chem.* **75** (1850) 27-45.
96. H. T. Bucherer, V. A. Lieb, *J. Prakt. Chemie* **141** (1934) 5-43.
97. A. I. Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455-2504.
98. L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **37** (1972) 3404-3409. L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **37** (1972) 3404-3409.
99. F. Guibé, *Tetrahedron* **54** (1998) 2967-3042.
100. N. Niklas, A. Zahl, R. Alsfasser, *Dalton Trans.* **1** (2007) 154-162.
101. M. M. Bhadbhade, R. Kishore, *Biopolymers* **97** (2011) 73-82.
102. Y. Fu, Z. Zhou, P. Hazendonk, A. D. Bain, F. R. Fronczek, J. Escobedo, M. L. McLaughlin, R. P. Hammer, *J. Mol. Struct.* **687** (2004) 65-72.
103. S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **60** (2004) 2447-2467.
104. G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 5012-5017.
105. M. Bergmann, L. Zervas, *Eur. J. Inorg. Chem.* **65** (1932) 1192-1201.
106. A. Chaudhary, M. Girgis, M. Prashad, B. Hu, D. Har, O. Repič, T. J. Blacklock, *Tetrahedron Letters* **44** (2003) 5543-5546.

107. E. P. Johnson, W. R. Cantrell, T. M. Jenson, S. A. Miller, D. J. Parker, N. M. Reel, L. G. Sylvester, R. J. Szendroi, K. J. Vargas, J. Xu, J. A. Carlson, *Org. Proc. Res. Dev.* **2** (1998) 238-244.
108. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2149-2154.
109. M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **33** (2006) 239-254.
110. I. W. James, *Tetrahedron* **55** (1999) 4855-4946.
111. K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **37** (1991) 513-520.
112. R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **22** (1994) 2559-2560.
113. M. De Zotti, B. Biondi, C. Peggion, Y. Park, K. S. Hahm, F. Formaggio, C. Toniolo, *J. Pept. Sci.* **17** (2011) 585-594.
114. M. De Zotti, B. Biondi, Y. Park, K. S. Hahm, M. Crisma, C. Toniolo, F. Formaggio, *Amino Acids* **43** (2012) 1761-1777.
115. M. Crisma, V. Monaco, F. Formaggio, C. Toniolo, C. George, J. L. Flippen-Anderson *Lett. Pept. Sci.* **4** (1997) 213-218.
116. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, R. F. Epand, R. M. Epand, *Cell. Mol. Life Sci.* **58** (2001) 1179-1188.
117. J. E. Sheppeck, H. Kar, H. Hong, *Tetrahedron Letters* **41** (2000) 5329-5333.
118. M. De Zotti, B. Biondi, C. Peggion, F. Formaggio, Y. Park, K. S. Hahmb, C. Toniolo, *Org. Biomol. Chem.* **10** (2012) 1285-1299.
119. R. Marchetto, S. Schreier, C. R. Nakaie, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 11042-11043.
120. C. R. Nakaie, E. G. Silva, E. M. Cilli, R. Marchetto, S. Schreier, T. B. Paiva, A. C. M. Paiva, *Peptides* **23** (2002) 65-70.
121. R. V. Ulijn, B. D. Moore, A. E. M. Janssen, P. J. Halling, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2002) 1024-1028.
122. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827-10852.
123. W. Konig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **103** (1970) 788-798.
124. D. Hudson, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 617-624.

125. L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 3561-3564.
126. G. Jou, I. Gonzalez, F. Albericio, P. Lloyd-Williams, E. Giralt, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 354-366.
127. Y. Basel, A. Hassner, *Tetrahedron Letters* **43** (2002) 2529-2533.
128. F. Albericio, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** (2004) 211-221.
129. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, *Biopolymers* **40** (1996) 627-651.
130. M. Crisma, G. Valle, V. Moretto, F. Formaggi, C. Toniolo, F. Albericio, *Lett. Pept. Sci.* **5** (1998) 247-258.
131. L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 4397-4398.
132. T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Chem. Soc.* **16** (2012) 97-116.
133. F. Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, *Chem. Rev.* **67** (1967) 107-152.
134. A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.* **81** (1981) 589-636.
135. T. Iwasawa, P. Wash, C. Gibson, J. Rebek, *Tetrahedron* **63** (2007) 6506-6511.
136. W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, D. Chapman, *Biochemistry* **32** (1993) 389-394.
137. S. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, T. Sugita, E. Kato, E. Kondo, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 1330-1333.
138. S. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, R. Souda, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 270-271.
139. M. Bellamy, "*The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*" Methuen, London (1956).
140. S. C. Yasui, T. A. Keiderling, F. Formaggio, G. M. Bonora, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 4988-4993.
141. H. Maekawa, G. Ballano, C. Toniolo, N. H. Ge, *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 5168-5182.
142. P. Rao, R. Nagaraj, C. N. R. Rao, P. Balaram, *FEBS Lett.* **100** (1979) 244-248.
143. G. M. Bonora, C. Toniolo, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, E. Benedetti, I. Lingham, P. Hardy, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 8152-8156.

144. M. Tanaka, N. Imawaka, M. Kurihara, H. Suemune, *Helv. Chim. Acta* **82** (1999) 494-510.
145. D. F. Kennedy, M. Crisma, C. Toniolo, D. Chapman, *Biochemistry* **30** (1991) 6541-6548.
146. R. A. G. D. Silva, S. C. Yasui, J. Kubelka, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **65** (2002) 299-243.
147. Z. Ganim, H. S. Chung, A. W. Smith, L. P. Deflores, K. C. Jones, A. Tokmakoff, *Acc. Chem. Res.* **41** (2008) 432-441.
148. C. Peggion, M. Crisma, C. Toniolo, F. Formaggio, *Tetrahedron* **68** (2012) 4429-4433.
149. R. Martin, G. Hauthal, "Dimethyl Sulphoxide" Van Nostrand-Reinhold, Wokingham (1975).
150. T. P. Pitner, D. W. Urry, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 1399-1400.
151. M. Iqbal, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 5548-5552.
152. Immagine tratta da: it.wikipedia.org/wiki/Micella; data di accesso 17/09/2013.
153. T. T. T. Bui, F. Formaggio, M. Crisma, V. Monaco, C. Toniolo, R. Hussain, G. Siligardi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2000) 1043-1046.
154. R. W. Woody, I. Tinoco, *J. Chem. Phys.* **46** (1967) 4927-4945.
155. S. Padmanabhan, S. Marqusee, T. Ridgeway, T. M. Laue, R. L. Baldwin, *Nature* **344** (1990) 268-270.
156. P. Wallimann, R. J. Kennedy, D. S. Kemp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1290-1292.
157. M. C. Manning, R.W. Woody, *Biopolymers* **31** (1991) 569-586.
158. C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 2744-2745.
159. T. S. Sudha, E. K. S. Vijayakumar, P. Balaram, *Int. J. Pept. Protein Res.* **22** (1983) 464-468.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare prima di tutto il Prof. F. Formaggio per avermi coinvolta ed assistita in questo progetto di Tesi e il Prof. D. Pedron per l'attenzione e i suggerimenti.

Ringrazio il Dott. A. Moretto per i preziosi consigli e l'aiuto nella sintesi dell'Api. Ringrazio la Dott.ssa B. Biondi e la Dott.ssa M. De Zotti per avermi assistita nella sintesi in fase solida. Ringrazio la Dott.ssa C. Peggion per la disponibilità e il Dott. R. Schiesari per il supporto con gli spettri IR.

Ringrazio di cuore tutti i miei compagni di laboratorio con i quali ho condiviso le gioie e i dolori della sintesi organica (poveretti quanta pazienza hanno portato!).

Ringrazio in modo particolare i miei genitori per avermi sempre sostenuta e tutte le persone che ho avuto la fortuna di incontrare e che rendono più felice la mia esistenza.