



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea magistrale  
in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

Sintesi e studio di reattività  
degli esteri succinimidilici  
(esteri NHS) derivati dal  
dichetopirrolopirrolo

—  
Ca' Foscari  
Dorsoduro 3246  
30123 Venezia

**Relatore**

Ch. Prof. Ottorino De Lucchi

**Correlatori**

Dott. Giuseppe Borsato

Dott. Emmanuele Ambrosi

**Laureando**

Irene Sacco

Matricola 831830

**Anno Accademico**

**2014 / 2015**



# Indice



# 1. Introduzione

## 1.1. Polimeri supramolecolari

### 1.1.1. Materiali autoriparanti

## 1.2. Fluorofori in biologia

### 1.2.1. Labeling delle proteine

## 1.3. Rosso Ferrari: il Dichetopirrolopirrolo

### 1.3.1. Proprietà chimico fisiche del DPP

## 1.4. Nano e Biomateriali derivanti dal DPP: stato dell'arte

### 1.4.1. Sonde

### 1.4.2. Polimeri supramolecolari

## 1.5. Esteri succinimidilici: una via per la formazione del coupling

ammidico

# 2. Scopo

# 3. Discussione e Risultati

## 3.1. Sintesi di DPP e DPP *N*-BOC protetti

### 3.1.1. Sintesi di DPP bis BOC

### 3.1.2. Monodeprotezione di DPP bis BOC

## 3.2. Sintesi di DPP mono *t*-butilacetato e deprotezione

## 3.3. Sintesi di DPP mono estere NHS

## 3.4. Sintesi di DPP bisterbutilacetato e deprotezione

## 3.5. Sintesi di DPP bis estere NHS

- 3.6. Studio di reattività degli esteri NHS
  - 3.6.1. Sintesi di DPP monocicloesilammide
  - 3.6.2. Sintesi di DPP biscicloesilammide
- 3.7. Sintesi di polimeri supramolecolari N-derivati
  - 3.7.1. Sintesi di bisdodecilammide
  - 3.7.2. Caratterizzazione dei polimeri supramolecolari derivati da DPP bisododecilammide
- 3.8. Sintesi di coniugati dell'amminoacido lisina *N*-BOC protetto
  - 3.8.1. Sintesi di DPP mono *N*-BOC lisina
  - 3.8.2. Sintesi di DPP bis *N*-BOC lisina
- 3.9. Studio del labeling con proteina modello BSA (Bovine Serum Albumin)
  - 3.9.1. Reazione di labeling
  - 3.9.2. SDS-PAGE e imaging
- 4. Conclusioni e Prospettive
- 5. Ringraziamenti
- 6. Parte Sperimentale



## Acronimi e Abbreviazioni

AcOEt	Acetato d'etile
BOC	Benzilossicarbonil
CP	Polimero covalente
DCM	Diclorometano
DIEA	Diisopropiletilammina
DMAP	Dimetilamminopiridina
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DP	Degree of Polymerization
DPP	Dichetopirrolopirrolo
DPPBDA	DPP bisdodecilammide
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimide cloridrato
Et <sub>2</sub> O	Etere dietilico
MCH	Metilcicloesano
MeOH	Metanolo
MI	Imaging molecolare
NaH	Sodio idruro
NHS	N-idrossisuccinimide
NTA	Nitrilotriacetato
PCL	Policaprolattone



ROS	Specie Ossigeno Reattive
SEM	Microscopia a Scansione Elettronica
SDS-PAGE	Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide con Sodio Dodecilsolfato
SP	Polimero supramolecolare
t-BuOK	Tert-butilato di potassio
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxi radicale
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TRIS	Tris(idrossimetil)amminometano
Upy	Ureidopirimidinone



*Ai miei amati mamma, papà*

*Nicola e Andrea*



# **Capitolo 1**

## **Introduzione**

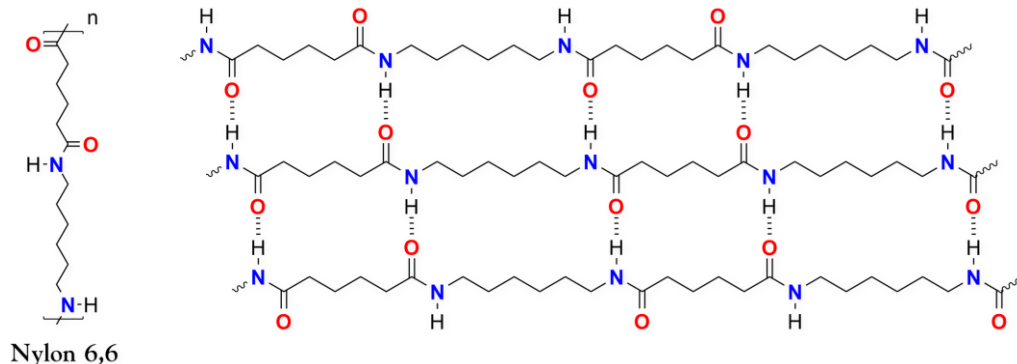


## 1.1. Polimeri supramolecolari

La nascita della scienza dei polimeri risale agli anni '20-'30 del XX secolo. Era infatti il 1931 quando su *Chemical Reviews* veniva pubblicato "*Polymerization*", il famoso articolo di Wallace Carothers contenente le sue interessanti idee riguardo questo tipo di sostanze. Fino ad allora su di esse si era compreso il carattere generico di aggregati molecolari ma non la loro precisa natura. Quello che Carothers intuì, qualche anno dopo Staudinger (con cui però non aveva avuto contatti), era che i polimeri fossero caratterizzati strutturalmente da lunghe catene fatte di una stessa unità ripetente. Egli classificò inoltre i tipi di molecole di grado di polimerizzare e i diversi tipi di polimerizzazioni.

Man mano che il numero di diversi materiali polimerici sintetizzati cresceva, si iniziò a guardare anche alle interazioni intermolecolari fra le macromolecole polimeriche, ovvero le interazioni supramolecolari.

In particolare con il Nylon 6,6, uno dei primi polimeri di sintesi, si iniziò ad avere coscienza dell'importanza rivestita da queste interazioni. Nel caso di questo polimero le proprietà del materiale sono fortemente legate ai ponti idrogeno, evidenziati in figura 1.1, che si formano tra le catene covalenti.



### 1.1 Interazioni non-covalenti su catene di Nylon 6,6

Il primo ad ipotizzare la formazione di polimeri in cui le unità monomeriche fossero tenute assieme attraverso le sole interazioni non-covalenti è stato il Premio Nobel Jean-Marie Lehn, nei primi anni novanta<sup>1</sup>.

L'interazione non-covalente alla base della formazione di polimeri supramolecolari può essere di varia natura: legami idrogeno, interazioni di  $\pi$ - $\pi$  stacking e legami di coordinazione metallo-legante.

In generale data la natura debole di queste singole interazioni, affinché un polimero supramolecolare acquisti proprietà chimico-fisiche paragonabili a quelle di un polimero covalente, è necessario che esse siano complessivamente molto forti e altamente direzionali. Se questo tipo di condizione si verifica, un meccanismo generico di self-assembly può essere definito più propriamente "polimerizzazione supramolecolare"<sup>2</sup>.

La sostanziale differenza tra SP e polimeri covalenti (CP) è intrinseca nella chimica-fisica del processo di formazione dei polimeri (schematizzata in figura 1.2). Mentre un CP si ottiene in condizioni di controllo cinetico, poiché la reazione inversa, cioè la depolimerizzazione, ha un

<sup>1</sup> Fouquey, C.; Lehn, J.-M.; Levelut, A.-M. *Adv. Mater.* **1990**, 2,254-257

<sup>2</sup> Brunsveld, L.; Folmer, B. J. B.; Meijer, E. W.; Sijbesma, R. P., *Chem. Rev.* **2001**, 101, 4071..



potenziale molto maggiore, la formazione di un polimero supramolecolare avviene sempre sotto controllo termodinamico.



Figura 1.2 Meccanismo generico di formazione di polimeri covalenti e di polimeri supramolecolari

Per ottenere SP con elevato peso molecolare definito dal parametro degree of polymerization (DP),<sup>3</sup> è necessario come evidenziato in figura 1.2 che la costante di associazione  $K_a$  sia quanto più elevata possibile, in altre parole che l'equilibrio sia spostato il più possibile verso destra. Questo risultato si raggiunge solamente con già detto, impiegando legami non-covalenti altamente direzionali e forti.

Unire la reversibilità delle interazioni supramolecolari degli SP e le proprietà chimico-fisiche dei CP è un obiettivo importante nella ricerca. Sia i parametri di stato sia quelli dinamici delle architetture supramolecolari, come il degree of polymerization (DP), il tempo di vita e la conformazione della catena, sono funzione dell'interazione non-covalente e questo consente di ottenere materiali con proprietà interessanti e innovative.

Sono noti tre meccanismi di polimerizzazione supramolecolare: il meccanismo isodesmico, quello di nucleazione-elongazione e il meccanismo anello-catena, schematizzati in figura 1.3.

<sup>3</sup> Il DP è numero di unità monomeriche che si ripetono nella catena

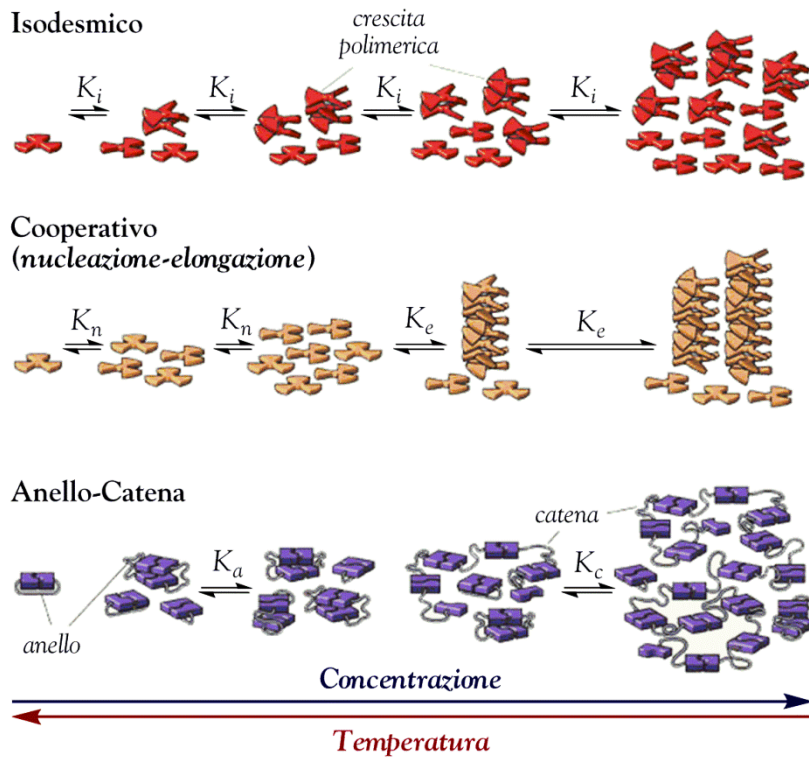


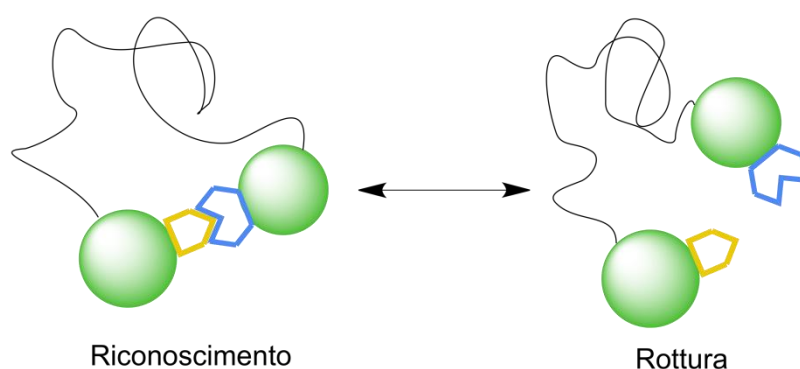
Figura 1.3 Meccanismi di formazione dei polimeri supramolecolari

Nel primo meccanismo la costante di equilibrio  $K_i$  è uguale durante tutto il processo di crescita, nel meccanismo di nucleazione-elongazione si ha invece che la costante associata alla nucleazione  $K_n$  è molto inferiore rispetto a quella legata al processo di elongazione  $K_e$  ( $K_n \ll K_e$ ). Nel terzo meccanismo a seconda del tipo di polimerizzazione si può avere la formazione di anelli o di catene.

Essendo la polimerizzazione supramolecolare governata dalle leggi dell'equilibrio chimico viene da sé che la formazione di SP è favorita da elevate concentrazioni e basse temperature (vedi figura 1.3).

### 1.1.1. Materiali autoriparanti

Negli ultimi anni la tecnologia dei polimeri supramolecolari è stata sfruttata per produrre un gran numero di materiali. Combinare questo tipo di polimeri con i polimeri covalenti convenzionali ha permesso di ottenere composti con caratteristiche inedite. Il riconoscimento che avviene fra due porzioni in grado di dare interazioni supramolecolari è infatti, come si è visto, un processo reversibile, concetto che è schematizzato in figura 1.4, e può essere spostato verso la rottura del legame per effetto di uno stimolo esterno, ad esempio una frattura meccanica, e successivamente, per effetto di un altro stimolo, di nuovo verso la sua ricomposizione cioè la riparazione. Stimoli in grado di indurre la ricomposizione sono ad esempio luce UV, calore, energia elettrica.



**1.4 Reversibilità delle interazioni supramolecolari fra macromolecole polimeriche convenzionali contenenti siti di o politopici**

Se si considera di rompere non una, ma un grandissimo numero di interazioni non-covalenti, come avviene ad esempio quando un materiale bulk viene sottoposto ad uno sforzo di taglio, le due nuove interfacce che si generano nel materiale, come illustrato in figura 1.5, contengono una grande quantità di siti liberi aventi la capacità di riconoscere di nuovo gli opportuni siti complementari (accettori con donatori nei legami a idrogeno, un

sistema  $\pi$  elettron-ricco con un  $\pi$  sistema elettron-povero nelle interazioni di stacking, ecc., a seconda della natura del materiale). La ricombinazione di tutti questi legami implica l'auto-riparazione del sistema a livello macroscopico ed è un processo che avviene, come già detto, in modo reversibile.

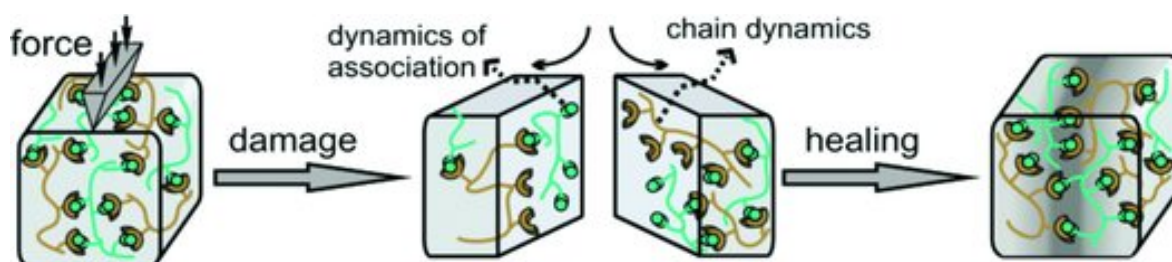


Figura 1.5 Meccanismo dell'autoriparazione<sup>4</sup>

L'autoriparazione o *self-healing* è una proprietà estremamente utile se si pensa che ogni materiale può subire un danno, come ad esempio una frattura, o può più semplicemente andare incontro ad usura. Questo comporta costi per i nuovi materiali con cui riparare o sostituire le parti danneggiate e per la manodopera. Con il *self-healing* questi problemi possono essere superati, dal momento che questo meccanismo non richiede l'aggiunta di ulteriore materiale. In alcuni casi la riparazione avviene finanche senza alcun tipo di stimolo, il *self-healing* viene allora definito autonomo<sup>5</sup>.

Un esempio di materiale in grado di autoripararsi è quello che sfrutta il riconoscimento molecolare prodotto dall'ureidopirimidinone (UPy) illustrato in figura 1.6, sviluppato da Meijer<sup>6</sup>, in cui il sistema a quadruplo legame a idrogeno genera interazioni molto forti e direzionali,

<sup>4</sup> Herbst, F.; Döhler, D.; Michael, P.; Binder, W. H., *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 203.

<sup>5</sup> Scheiner, M.; Dickens, T. J.; Okoli, O., *Polymer* **2016**, *83*, 260..

<sup>6</sup> Bosman, A. W.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W., *Mater. Today* **2004**, *7*, 34.

con una elevata costante di dimerizzazione ( $K_{\text{dim}} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  in toluene). Questo tipo di interazione è stata inizialmente usata per produrre polimeri supramolecolari ad alto grado di polimerizzazione (DP).

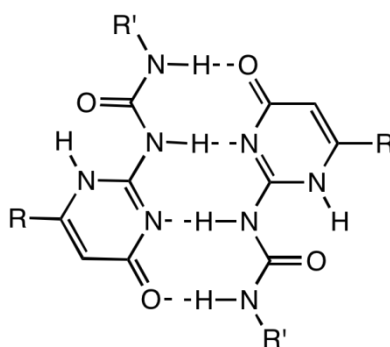


Figura 1.6 Legame a idrogeno quadruplo fra due unità di Ureidopirimidinone

Con l'inserimento di UPy come terminale di catena di un polimero convenzionale come il policaprolattone (PCL), Meijer *et al.*<sup>7</sup> hanno realizzato un nuovo biomateriale per trapianti. Il policaprolattone è infatti biocompatibile poiché viene degradato dall'organismo prima per idrolisi non enzimatica dei gruppi esterei, poi ad opera dei macrofagi e cellule giganti. A queste peculiarità tipiche del policaprolattone si abbinano il comportamento meccanico e le attività modulabili dell'UPy.

La funzionalizzazione delle due estremità di un oligocapolattone con due frammenti UPy, mostrata in figura 1.7, consente di estendere le catene del polimero covalente tramite i legami a idrogeno quadrupli UPy-UPy.

---

<sup>7</sup> Dankers, P. Y. W.; van Leeuwen, E. N. M.; van Gemert, G. M. L.; Spiering, A. J. H.; Harmsen, M. C.; Brouwer, L. A.; Janssen, H. M.; Bosman, A. W.; van Luyn, M. J. A.; Meijer, E. W., *Biomaterials* **2006**, *27*, 5490.

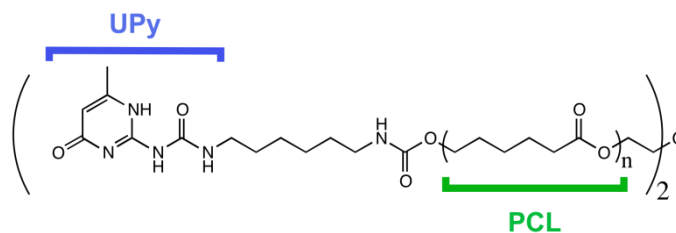


Figura 1.7 Policaprolattone Upy funzionalizzato alle estremità di catena

L'inserimento di altre unità ureidopirimidinoniche al centro delle catene dell'oligomero di PCL, come da figura 1.8, favorisce la formazione di un network tridimensionale cambiando notevolmente proprietà del polimero come l'elasticità, la temperatura di transizione vetrosa e l'entità della deformazione in vivo.

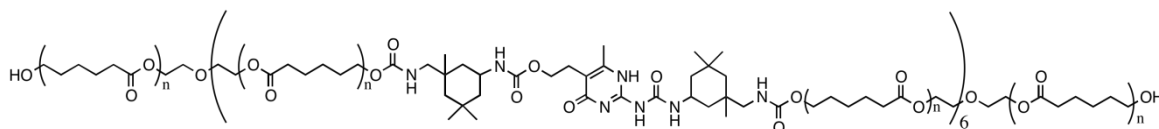
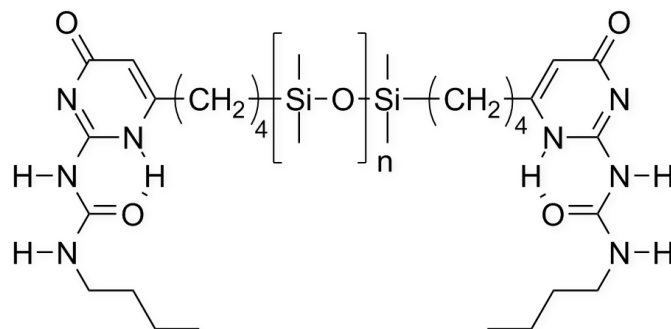


Figura 1.8 Policaprolattone Upy funzionalizzato alle estremità e al centro della catena

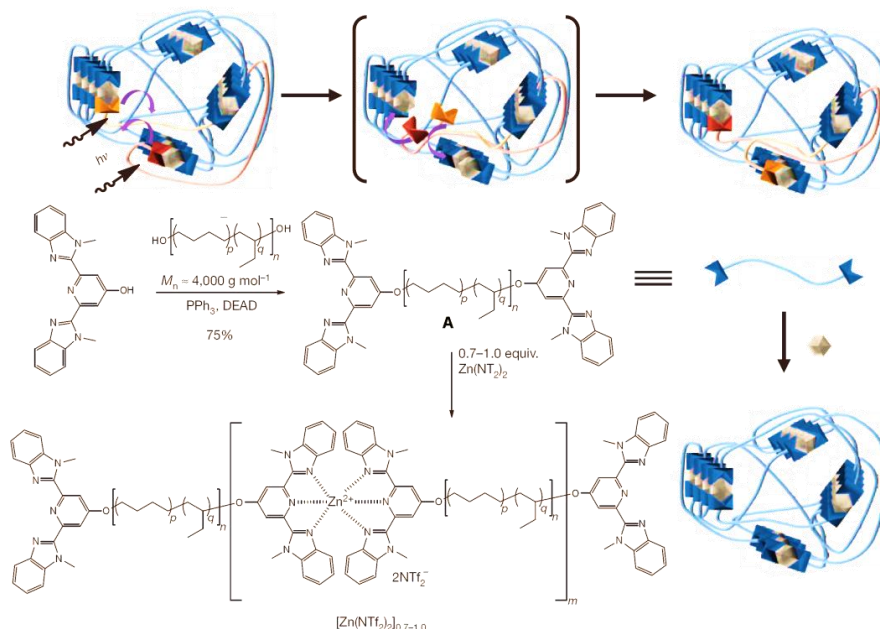
Un'ulteriore vantaggio dato dall'approccio supramolecolare è quello di poter di miscelare facilmente in varie proporzioni i due diversi polimeri, di figura 1.7 e 1.8 per modulare ancora più finemente le proprietà del biomateriale finale. Un altro valido esempio di materiale autoriparante è quello riportato in figura 1.9, sempre dovuto a Meijer<sup>8</sup> in cui il gruppo UPy è presente come terminale di catena su un polisilossano, originando un materiale plastico che è in grado di autoripararsi per effetto termico.

<sup>8</sup> Sijbesma, R. P.; Beijer, F. H.; Brunsveld, L.; Folmer, B. J. B.; Hirschberg, J.; Lange, R. F. M.; Lowe, J. K. L.; Meijer, E. W., *Science* **1997**, 278, 1601.



1.9 Polimero termo-autoriparante

Un esempio di polimero autoriparante tramite irraggiamento UV, sintetizzato da Rowan *et al.*<sup>9</sup> è invece illustrato in figura 1.10. In questo caso il riconoscimento supramolecolare è dato dal legame di coordinazione metallo-legante. Se il materiale viene sottoposto a uno sforzo, questo verrà dissipato a carico dei legami coordinativi, che si romperanno lasciando però intatta la struttura polimerica covalente. In presenza di radiazione UV la struttura può essere successivamente ricompasta.



1.10 Polimero autoriparante attraverso irraggiamento UV

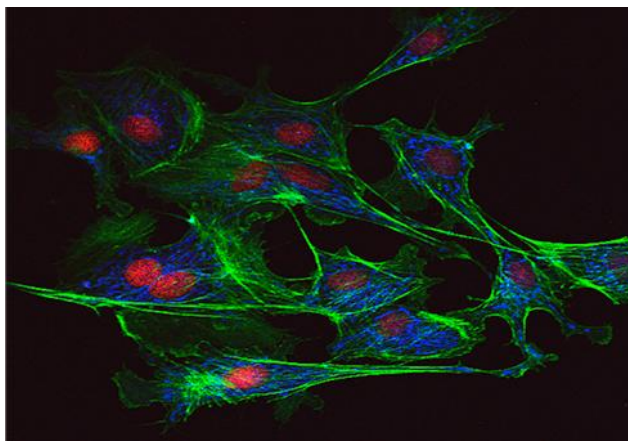
<sup>9</sup> Burnworth, M.; Tang, L.; Kumpfer, J. R.; Duncan, A. J.; Beyer, F. L.; Fiore, G. L.; Rowan, S. J.; Weder, C., *Nature* **2011**, *472*, 334.

## 1.2. Fluorofori in biologia

La microscopia confocale, un tipo di microscopia ottica in cui la messa a fuoco in successione di ogni sezione del campione restituisce immagini molto nitide e tridimensionali, nacque verso la fine degli anni '80. Se applicata a campioni biologici, questa tecnica permette di individuare *in vivo* e con precisione specie responsabili di stati sia fisiologici che patologici, e di studiare processi globali a livello cellulare e subcellulare. In altre parole, consente di fare *imaging molecolare* (MI). Risulta quindi importante disegnare, realizzare e studiare molecole fluorescenti in grado di legarsi covalentemente e selettivamente alle diverse biomolecole, che possano agire da agenti di contrasto ottico, sfruttabili in questo tipo di microscopia.

Per queste motivazioni nelle ultime decadi la ricerca scientifica nel settore della fotochimica organica e inorganica in particolare nella sintesi di nuovi fluorofori ha ricevuto nuovo impulso. La fluorescenza è infatti un fenomeno ottico interessante da osservare con la microscopia confocale sia perché è caratterizzata da una intrinseca sensibilità sia perché si adatta bene all'epi-illuminazione. Infatti in questa modalità la sorgente di energia viene riflessa dal campione rendendo più semplice fare la scansione di un'area rispetto a quanto accade con la transilluminazione, la quale coinvolge una sorgente di energia che attraversa il campione. In figura 1.11 si può vedere un esempio di immagine ottenibile al microscopio confocale quando vengono utilizzati agenti di contrasto fluorescenti su un campione cellulare.





**Figura 1.11** Cellule endoteliali dell'arteria polmonare bovina osservate al microscopio confocale. Mitochondri in rosso marcati con MitoTracker Red CMXRos, F-actina in verde marcata con Alexa Fluor 488 e nuclei in blu marcati con DAPI.

Negli ultimi decenni la medicina ha riconosciuto l'impiego dei biomarker fluorescenti come metodo di preminente importanza per la ricerca e lo studio della presenza, della distribuzione e del metabolismo di specie biologiche.

Nel 2005 infatti il National Cancer Institute of America (NCI) ha raccolto 9,8 milioni di dollari per supportare la ricerca nello sviluppo di marker biologici con l'Early Detection Research Network. Tra gli intenti specifici dell'EDRN c'erano lo sviluppo e il test di promettenti biomarker e tecnologie per la diagnosi precoce del cancro e il raggiungimento di una collaborazione tra i leader del mondo accademico e dell'industria nei campi della biologia molecolare, della genetica, dell'oncologia clinica, dell'informatica e della salute pubblica (<http://edrn.nci.nih.gov/about-edrn/objectives/>)<sup>10</sup>. Attualmente nel sito dell'EDRN sono disponibili moltissime informazioni cliniche su centinaia di biomarker raggruppati per organi target.

---

<sup>10</sup> Fei, X.; Gu, Y., *Prog. Nat. Sci.* **2009**, 19, 1..

Numerosissimi studi scientifici hanno provato e continuano a provare quanto l'uso di biomarker fluorescenti porti a buoni risultati nella ricerca su patologie degenerative come Alzheimer, AIDS, cancro e malattie ischemiche<sup>11,12,13</sup>.

I fluorofori impiegati in biologia si possono dividere in due classi:

- fluorofori legati alla biomolecola target tramite un gruppo attivo
- fluorofori che si inseriscono per affinità strutturale nel corpo del DNA.

Tra le molecole appartenenti alla prima classe spiccano i derivati della rodamina e della fluoresceina (figura 1.12).

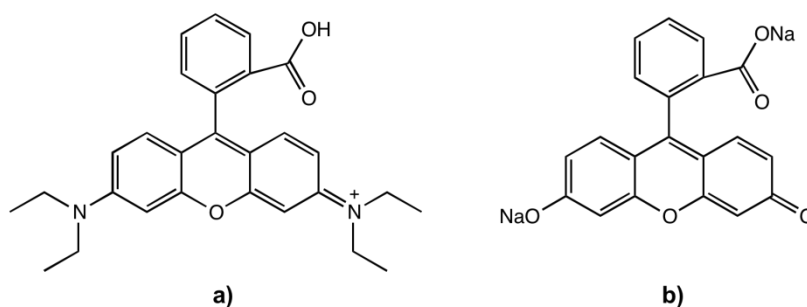


Figura 1.12 a) Rodamina B, b) Fluoresceina in sale sodico

Molto usati per lo scopo sono anche naftalimidi, stilbeni, acridine, fluoreni e loro derivati (figura 1.13).

<sup>11</sup> Chen, X.; Tian, X.; Shin, I.; Yoon, J., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4783..

<sup>12</sup> Verpillot, R.; Esselmann, H.; Mohamadi, M. R.; Klafki, H.; Poirier, F.; Lehnert, S.; Otto, M.; Wiltfang, J.; Jean-Louis, V.; Taverna, M., *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1696.

<sup>13</sup> Wang, H.; Joseph, J. A., *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 612.

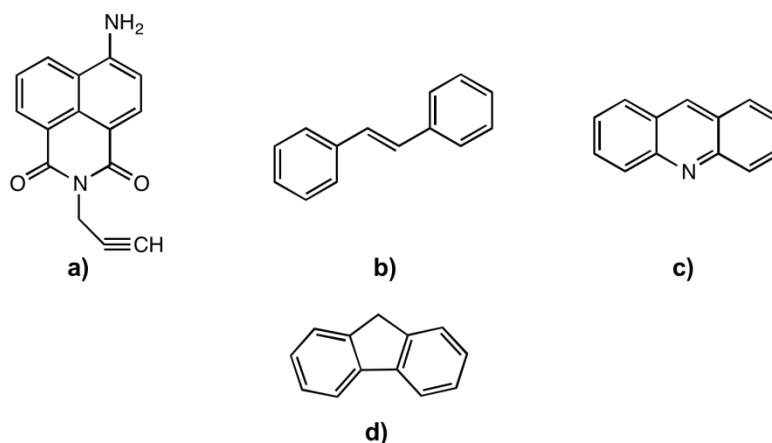


Figura 1.13 a) Naftalimide, b) Stilbene, c) Acridina, d) Fluorene

Alla seconda categoria appartengono invece le cianine come Arancio Tiazolo e Giallo di Ossazolo, mostrate in figura 1.14, che sono fluorofori la cui emissione è molto debole in soluzione, ma può aumentare di centinaia o addirittura migliaia di volte quando essi sono coniugati al DNA, a causa della rotazione impedita intorno al legame congiungente i due anelli aromatici che esclude un percorso non-radiativo e favorisce l'emissione fluorescente.

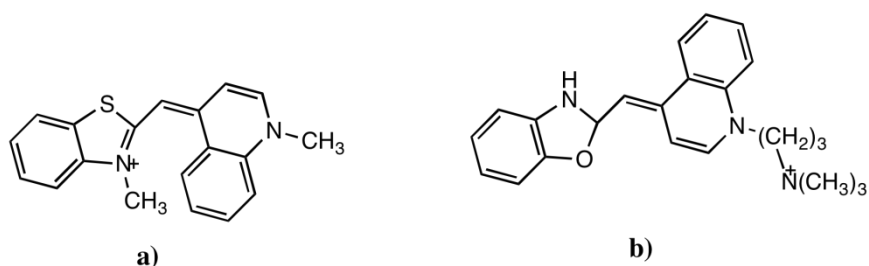


Figura 1.14 a) Arancio tiazolo; b) Giallo ossazolo

### 1.2.1. Labeling delle proteine

In letteratura la formazione di un legame covalente tra una molecola con una porzione fluorofora e una proteina viene detta reazione di *labeling* o semplicemente *labeling*.

A dispetto dei vantaggi generalmente offerti dall'uso di un biomarker fluorescente, che sono stati appena discussi, il *labeling* presenta un punto debole, e cioè la mancanza di specificità intrinseca verso una proteina target.

Tuttavia sono state elaborate diverse tecniche combinate in grado di superare questo limite, come ad esempio l'accoppiamento della tecnica del *labeling* con le tecniche immunochimiche che sfruttano le interazioni antigene-anticorpo altamente specifiche. Marcare un anticorpo a fluorescenza fornisce in effetti un efficiente detector biologico che permette la quantificazione dell'antigene corrispondente (in pratica di una qualunque biomolecola indagata, data l'infinità di coppie antigene-anticorpo). Gli anticorpi marcati a fluorescenza sono mezzi fondamentali in immunoistochimica<sup>14;15,16</sup>, microscopia a fluorescenza, citometria in flusso<sup>17</sup> e Western blot.<sup>18,19,20</sup> Nei metodi immunochimici inoltre l'anticorpo marcato può legarsi direttamente all'antigene indagato o può legarsi come anticorpo secondario alla parte costante di un anticorpo primario legato all'antigene, la figura 1.15 mostra i due risultanti meccanismi di immunofluorescenza diretta e indiretta.

---

<sup>14</sup> Henle, G.; Henle, W., *J. Bacteriol.* **1966**, *91*, 1248.

<sup>15</sup> 12. Abo T, B. C. M., *J. of Immunol.* **1981**, *127* (3), 1024-9.

<sup>16</sup> Branca dell'immunochimica che studia le proteine tissutali.

<sup>17</sup> La citometria in flusso si basa sulla focalizzazione idrodinamica delle cellule di un campione che in un opportuno fluido attraversano così in modo ordinato e distinto una camera di flusso dove vengono investite da un fascio laser. Utilizzando anticorpi marcati sulle cellule esaminate si possono rilevare i segnali di fluorescenza provenienti da membrane, citoplasma o nuclei.

<sup>18</sup> Escribese, M. M.; Conde, E.; Martín, A.; Sáenz-Morales, D.; Sancho, D.; de Lema, G. P.; Lucio-Cazaña, J.; Sánchez-Madrid, F.; García-Bermejo, M. L.; Mampaso, F. M., *BMC Nephrology* **2007**, *8*, 3.

<sup>19</sup> 14. Blake M. S., J. K. H., Russel-Jones G. J., Gotschlich E. C., A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry* **1984**, *136* (1), 175-9.

<sup>20</sup> Il Western blot prevede una preliminare separazione delle proteine, previamente denaturate, con una elettroforesi su gel di poliaccrilammide con sodiododecilsolfato (SDS-PAGE). Successivamente le proteine vengono trasferite dal gel a una membrana di nitrocellulosa mediante corrente elettrica, in modo da mantenere l'organizzazione formatasi nel gel, qui sono poi riconosciute e legate da anticorpi specifici marcati.

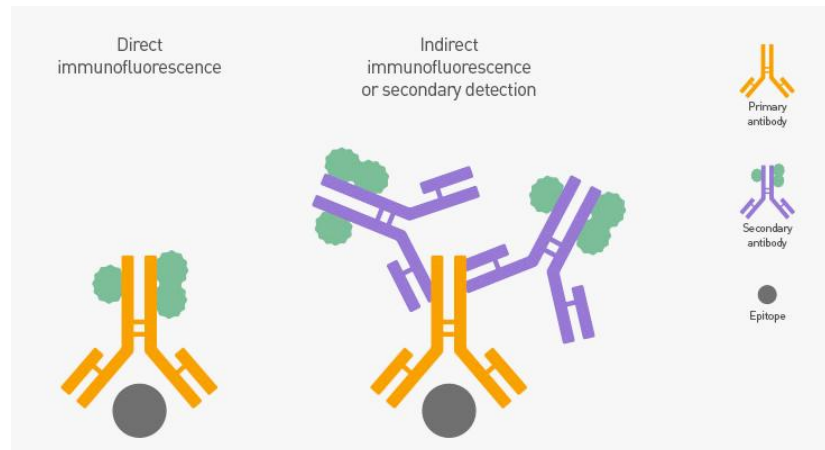
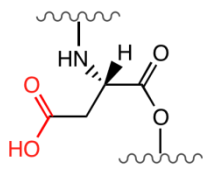


Figura 1.15 Immunofluorescenza diretta e indiretta

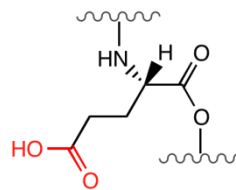
Poter studiare la presenza, la distribuzione e i percorsi metabolici delle proteine è estremamente importante perché esse sono implicate in un vastissimo numero di processi e sono preposte ad un altrettanto grande numero di funzioni: biocatalitica (enzimi), di riserva, contrattile e motoria, di protezione e difesa (anticorpi), ormonale e infine strutturale (ad esempio il collagene). La proteina è inoltre la diretta espressione dell'informazione genetica.

Poiché un anticorpo o una qualunque proteina che si voglia marcare altro non è che una sequenza di amminoacidi legati attraverso legami peptidici  $R_1CO-NHR_2$ , vi sono diversi gruppi funzionali esposti e con cui il fluoroforo si può legare. Di seguito si elencano i gruppi più comuni in cui avviene il *labeling* da parte dei fluorofori.

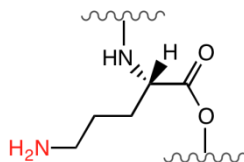
- Il residuo carbossilico nell'acido aspartico e nell'acido glutammico e il gruppo amminico nella lisina, mostrati in figura 1.16.



Acido aspartico



Acido glutammico

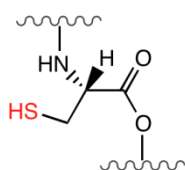


Lisina

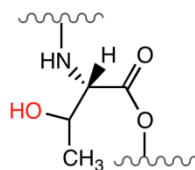
**1.16 Gruppi carbossilici e gruppo amminico disponibili per il labeling**

- I gruppi tiolato nella cisteina e idrossilato in serina e treonina visibili in figura

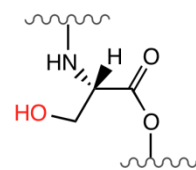
1.17.



Cisteina



Treonina



Serina

**1.17 Gruppi tiolato e idrossilato disponibili per il labeling**

- Il gruppo amidinico e quello imidazolico rispettivamente in arginina e istidina, evidenziati in figura 1.18.



biomolecole si distinguono dalle altre per avere come residuo terminale della catena peptidica sei residui istidinici, chiamati HIS-TAG.

Queste 6-HIS sono state sfruttate da Uchinomiya *et al.*<sup>21</sup> per un labeling specifico che non si basa sulle interazioni antigene-anticorpo, ma su una coordinazione di tipo metallo-legante con il complesso metallico Ni(II)-NTA. Come esemplificato in figura 1.20 in un primo momento il riconoscimento molecolare ad opera dell'azoto istidinico permette l'avvicinamento del fluoroforo alla proteina. Successivamente il buon gruppo uscente tosilato favorisce una reazione di sostituzione nucleofila e consente la formazione di un legame covalente tra l'istidina e il fluoroforo.

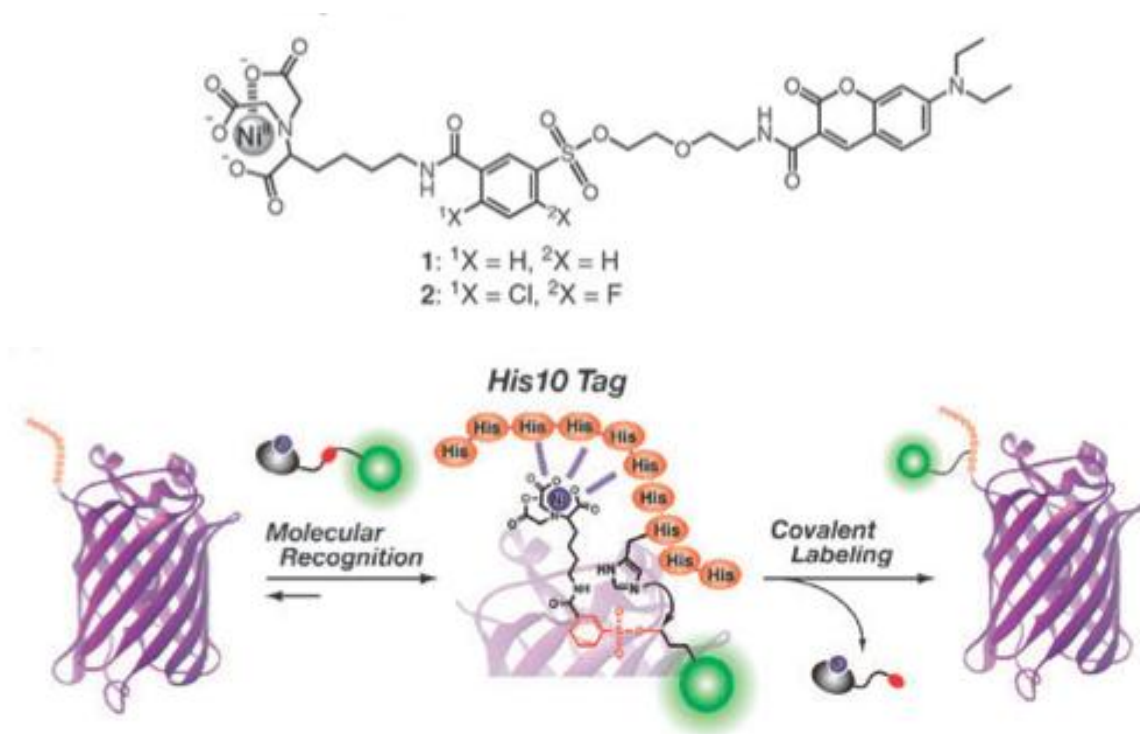


Figura 1.20 In alto: sonda Ni(II)-NTA. In basso: riconoscimento molecolare e labeling dell'His-tag

<sup>21</sup> Uchinomiya, S.-h.; Nonaka, H.; Fujishima, S.-h.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I., *Chem. Comm.* **2009**, (39), 5880..



In generale una proteina che deve essere marcata a fluorescenza deve venire preliminarmente purificata dalle altre specie presenti nel campione biologico. A reazione di *labeling* completata, è necessario un ulteriore passaggio di purificazione della proteina marcata dal colorante libero e non coniugato, mediante dialisi o desalting column.

Nei recenti anni Lundberg *et al.*<sup>22</sup> hanno studiato un protocollo per il *labeling* in fase solida, che permette di limitare il numero di passaggi rispetto al *labeling* classico in soluzione utilizzando puntali di micropipette come quelli di figura 1.21 contenenti una fase solida con una proteina (ad es. proteina A) in grado di interagire per affinità con gli anticorpi da marcare e che agisce a tutti gli effetti da fase stazionaria di una colonna di dimensioni molto piccole.



Figura 1.21 Punte di micropipette con fase solida

La soluzione contenente gli anticorpi viene forzata a passare attraverso la fase solida per centrifugazione, durante questo passaggio solo gli anticorpi vengono trattenuti, mentre altre proteine e impurezze vengono eluite. La soluzione contenente il fluoroforo viene successivamente aggiunta al complesso matrice solida-anticorpo, con cui avviene il *labeling*. A reazione avvenuta, il lavaggio della fase solida con solventi opportuni permetterà di eliminare la porzione di colorante non reagito. Infine gli anticorpi marcati vengono eluiti per aggiunta di una soluzione acida.

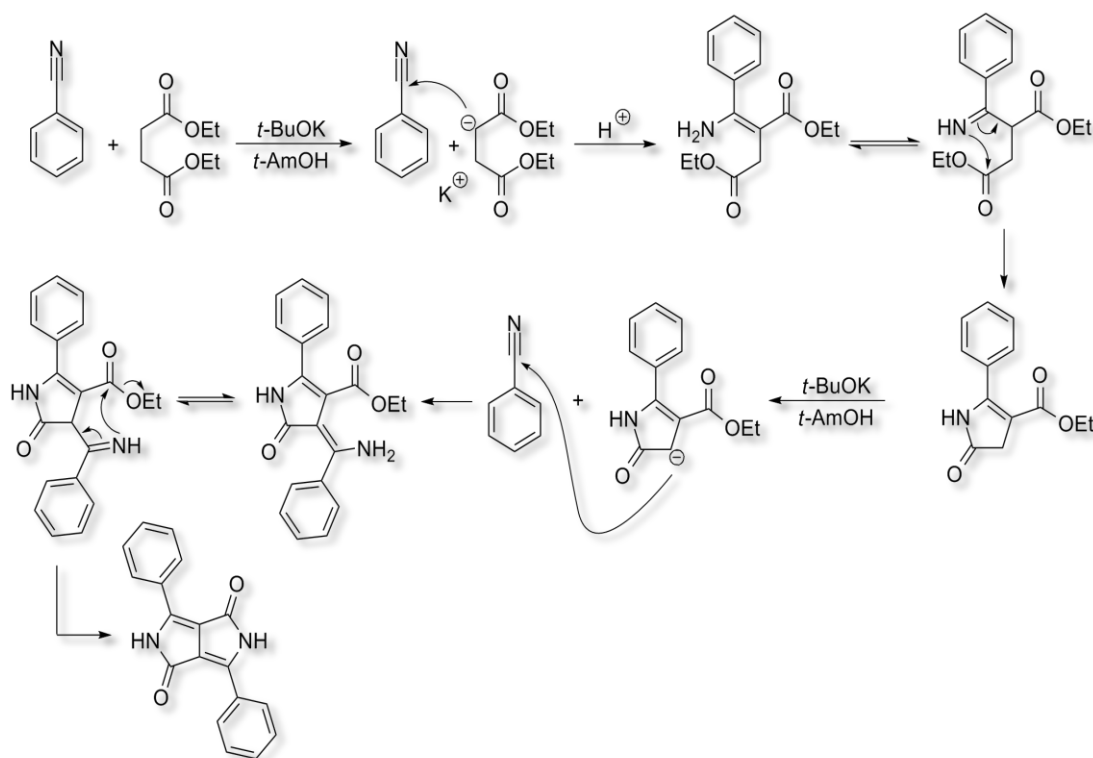
---

<sup>22</sup> Lundberg, E.; Sundberg, M.; Gråslund, T.; Uhlén, M.; Svahn, H. A., *J. Immunol. Methods* **2007**, 322, 40.

L'importanza di questo metodo è notevole perché non richiede purificazioni preliminari degli anticorpi, permette un'efficiente eliminazione del colorante libero dopo la reazione di coupling, è veloce ed è in grado di processare quantità anche molto piccole di anticorpi (i.e. microgrammi).

### 1.3. Rosso Ferrari: il Dichetopirrolopirrolo

Il fluoroforo Dichetopirrolopirrolo, (DPP), chiamato anche *Rosso Ferrari*, fu scoperto casualmente nel 1974 da Farnum *et al.*,<sup>23</sup> impegnati nello studio di una sintesi del 2-azetione.



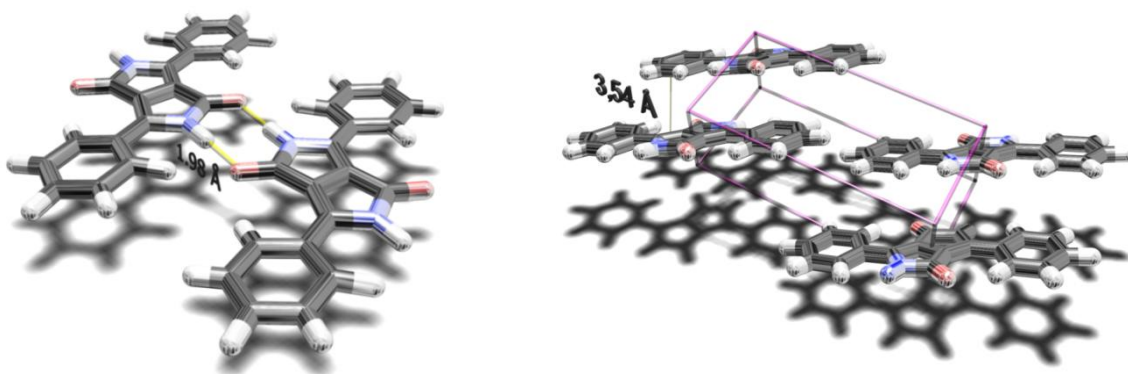
Schema 1.1 Sintesi del 3,6-difenil-1,4-dicheto-pirrolo[3,4-c]pirrolo

<sup>23</sup> Farnum, D. G.; Mehta, G.; Moore, G. G. I.; Siegal, F. P., *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 2549.

Il DPP viene ora sintetizzato industrialmente da benzonitrile e dietilsuccinato in alcol *ter*-amilico e in presenza di basi forti (ad esempio *ter*-butossido di potassio), procedura sviluppata dai ricercatori Ciba. Il meccanismo, riportato nello schema 1.1, è quello di una condensazione *pseudo Stobbe*.

### 1.3.1. Proprietà chimico fisiche del DPP

Il DPP è un sistema biciclico altamente coniugato con 8 elettroni  $\pi$  e due unità lattamiche.<sup>24</sup> Per le sue caratteristiche di forte insolubilità (<110 mg/L in DMF a 25°C), elevato punto di fusione (>350 °C) e coefficiente di estinzione molare di 33000 dm<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>, il DPP può considerarsi un pigmento molto stabile e robusto. Responsabili dell'insolubilità del DPP sono i legami a idrogeno che si formano fra i gruppi carbonilici C=O e i gruppi ammidici N-H dei residui lattamici. Gli anelli aromatici in posizione 1 e 4 danno un ulteriore contributo alle forze di attrazione intermolecolari con interazioni di  $\pi$ - $\pi$  stacking; entrambi questi due tipi di interazioni sono evidenziati dalle analisi diffrattometriche di figura 1.22.



<sup>24</sup> (a) Hao, Z.; Iqbal, A., *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 203; (b) Iqbal, A.; Jost, M.; Kirchmayr, R.; Pfenninger, J.; Rochat, A.; Wallquist, O., *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1988**, 97, 615.

Figura 1.22 Analisi diffrattometrica del DPP

Allo stato solido il DPP è quasi planare, gli anelli fenilici appaiono sfalsati solo di  $7^\circ \pm 1^\circ$  rispetto al sistema eterociclico.

Lo spettro di assorbimento del DPP, riportato in figura 1.23, cade nella regione del visibile con un massimo a 504 nm quando il pigmento è in soluzione e a 538 nm quando si trova allo stato solido, con un coefficiente di estinzione molare pari a  $33000 \text{ (dm}^2\text{mol}^{-1}\text{)}$ . Visivamente il DPP si presenta di un colore rosso vivo allo stato solido mentre in soluzione presenta una colorazione giallo-verde fluorescente.

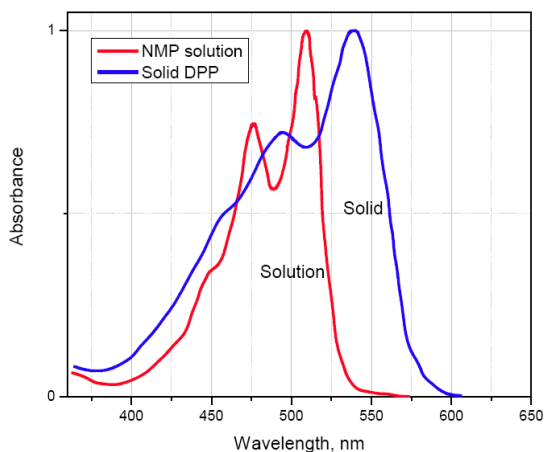


Figura 1.23 Spettri di assorbimento del DPP in soluzione di NMP e in fase solida

Il DPP esibisce *Stokes shift* fra il massimo di assorbimento e il massimo di emissione compresi fra 10 e 15 nm (figura 1.24) e una resa quantica di fluorescenza del 60%. Sostituzioni all'N lattamico generano un aumento sia negli *Stokes shift* sia nella solubilità nei comuni solventi organici.

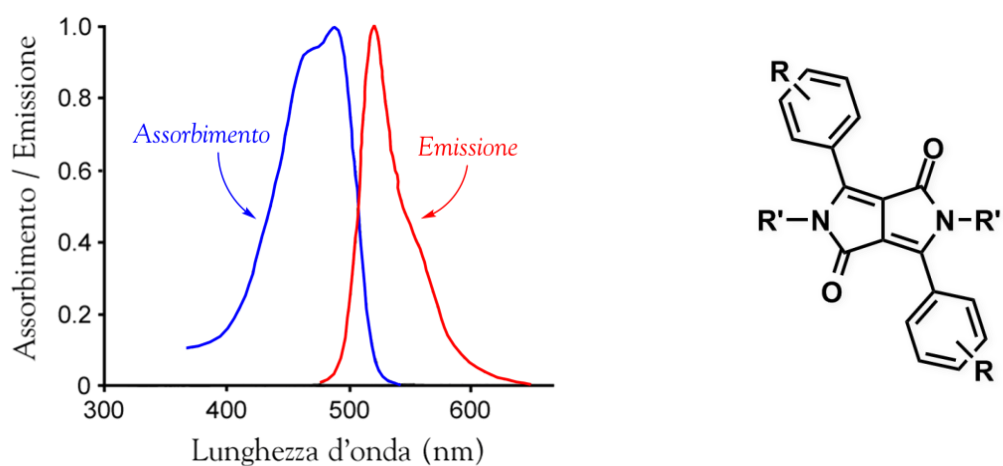


Figura 1..24 Spettri di assorbimento UV-Vis e di emissione in fluorescenza del DPP (R=R'=H, soluzioni in CHCl<sub>3</sub>)

## 1.4. Nano e bio materiali derivanti dal DPP: lo stato dell'arte (BSA e DPP)

### 1.4.1. Sonde

Le buone proprietà spettrali del DPP sono già state sfruttate nella sintesi di sonde per BisFosfonati (BP), classe di composti cui appartengono anche alcuni farmaci per l'osteoporosi. Queste sonde a base di DPP sono infatti indirizzate allo studio in vitro dell'efficacia dei farmaci BisFosfonati rispetto al riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti. L'unità di DPP, con anelli in posizione 1 e 4 sia fenilici sia tiofenici, è in grado di legarsi ai BP attraverso una reazione di *click chemistry* fra un'azide presente nel BP e un acetilene (linker) presente del DPP<sup>25</sup> (vedi figura 1.25).

<sup>25</sup> Favero, A. *Tesi di Laurea 2016*.

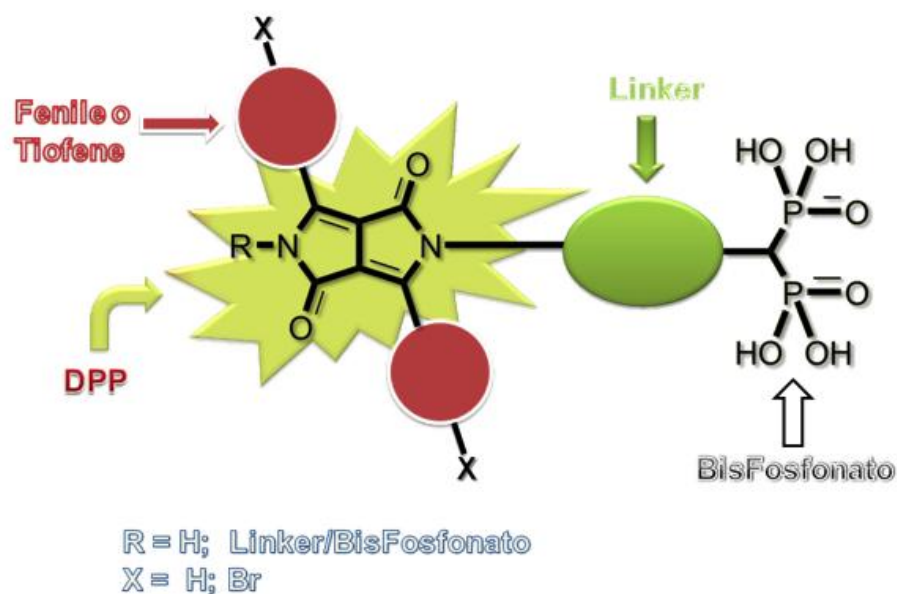


Figura 1.25 Sonde per bisfosfonati a base di DPP

Altre sonde a base di DPP di notevole interesse, mostrate in figura 1.26, sono state sviluppate da Ziessel *et al.*<sup>26</sup> allo scopo di marcare biomolecole tramite idrolisi di gruppi amminici. L'ottenimento del diacido carbossilico N-derivato del pigmento DPP ha consentito la sintesi del derivato acilico per reazione con bromotripirrolidinofosfonio esafluorofosfato (PyBrOP) e diisopropiletilammina, da cui è stato possibile sintetizzare i derivati altamente idrosolubili **2** e **3** per sostituzione nucleofila acilica con il sale di tributilammonio dell'acido 2-amminoetil-1.1'-disolfonico. Il prodotto di mono sostituzione nucleofila **3** ha un gruppo carbossilico disponibile per un'ulteriore derivatizzazione a estere succinimidilico *in situ*, adatto alla bioconiugazione.

<sup>26</sup> Heyer, E.; Lory, P.; Leprince, J.; Moreau, M.; Romieu, A.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2995.

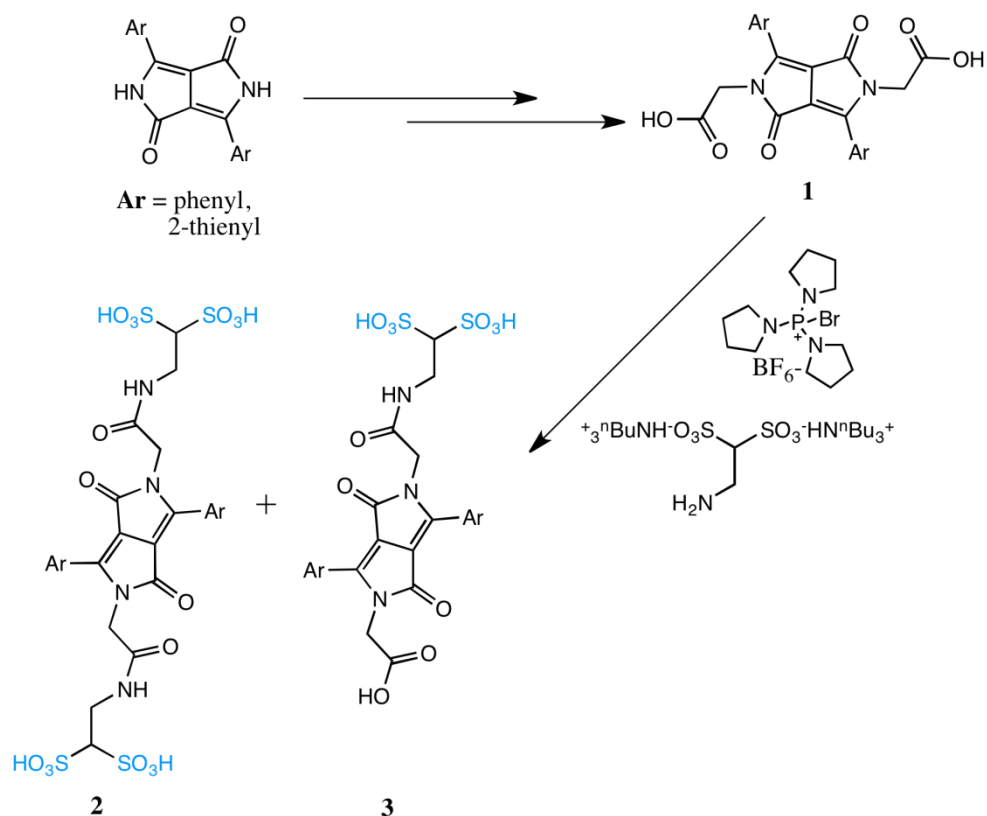


Figura 1.26 Sintesi di derivati water-soluble del DPP per la bioconiugazione

## 1.4.2. Polimeri supramolecolari

La capacità del DPP di dare notevoli interazioni supramolecolari dovute a legami a idrogeno e  $\pi$ - $\pi$  stacking è stata esplorata, nello stesso gruppo di ricerca in cui si è svolta questa tesi, nello studio di R. Beninatto<sup>27</sup>, attraverso la sintesi dei derivati di figura 1.27, detti *Longchains* DPP (a) e *mono-Longchains* DPP (b).

<sup>27</sup> Beninatto, R. *Tesi di Dottorato* 2013.

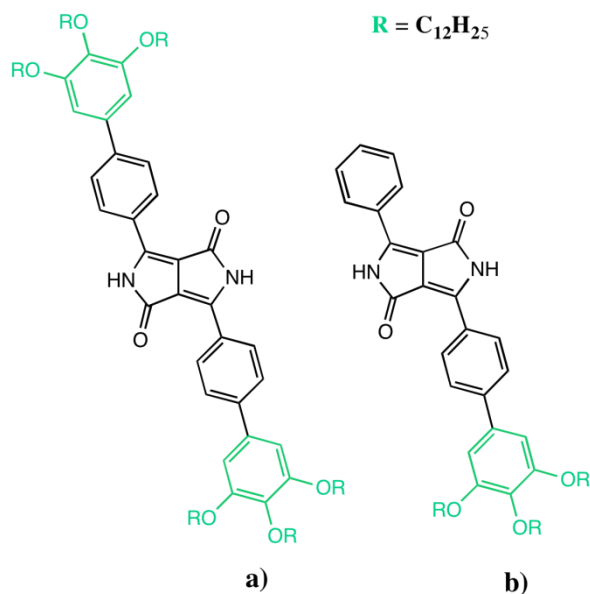
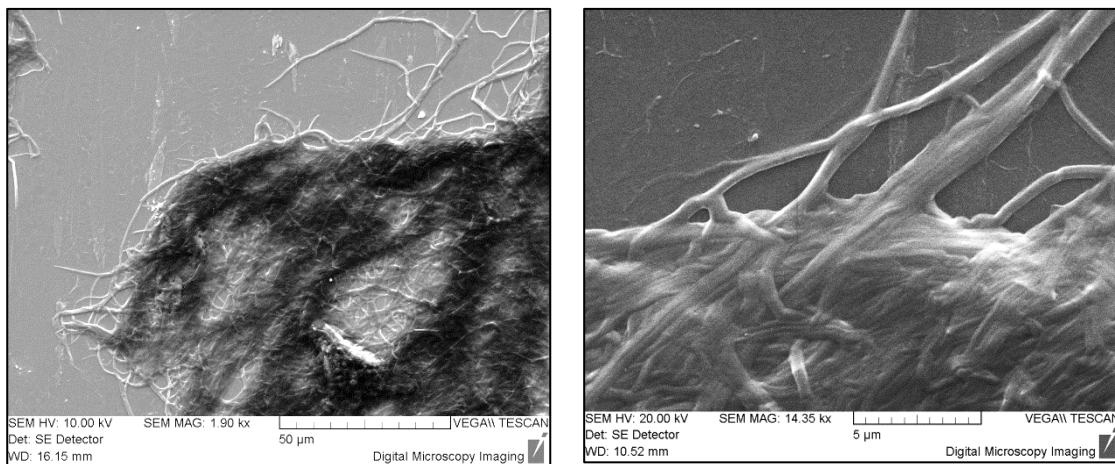


Figura 1.27 Longchains DPP (a) e mono-Longchains DPP (b)

I gruppi tridodecilossifenil (posizione 1, 4 in **a**, 1 in **b**), inseriti nell'unità di DPP tramite cross-coupling di Suzuki-Miyaura, sono gruppi solubilizzanti che inducono la struttura ad autoaggregare in modo particolare, conferendo anche proprietà liquido-cristalline.

Lo studio tramite spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile del *Longchains* DPP in metilcicloesano (MCH), solvente il cui carattere apolare ha favorito l'organizzazione del composto tramite legami a idrogeno e stacking  $\pi$ - $\pi$ , ha rilevato un meccanismo di aggregazione cooperativo (nucleazione-elongazione). A temperatura ambiente, per concentrazioni inferiori a  $1.4 \times 10^{-5}$  M il  $DP_n$  è di 1000 molecole, e aumenta esponenzialmente per concentrazioni superiori, a conferma della robustezza delle interazioni supramolecolari prodotte dal DPP. Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM) hanno evidenziato come da un punto di vista microscopico l'aggregazione conduca al formarsi di lunghe fibre supramolecolari, ben evidenti dalle immagini di figura 1.28.





1.28 Immagini SEM del Longchains-DPP depositato su silicio da DCM

## 1.5. Esteri succinimidilici: una via per la formazione del coupling ammidico

Da sempre i protocolli sintetici atti a produrre il coupling ammidico rivestono un ruolo fondamentale in sintesi organica. Il legame ammidico è alla base delle complesse strutture che compongono le più diverse proteine dei sistemi viventi, ma è anche un'unità essenziale nelle molecole farmacologicamente attive.

In natura la formazione di un legame ammidico fra carbossilato e ammina primaria avviene in modo altamente efficiente ad opera di sistemi complessi come gli enzimi. Riprodurre lo stesso tipo di chimica, senza avere a disposizione tali catalizzatori, non è una questione semplice.

Infatti la reazione diretta fra un acido carbossilico e un'ammina primaria a formare un'ammido è inibita dalla reazione acido-base che porta alla formazione di un sale stabile. Questo significa che l'equilibrio nella reazione è molto più spostato verso l'idrolisi piuttosto che verso la formazione del legame peptidico (figura 1.29).

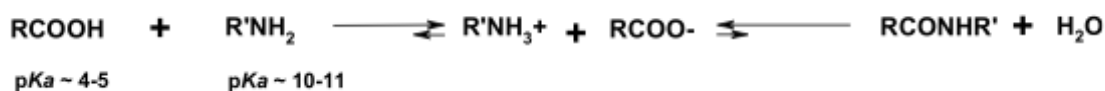


Figura 1.29 Equilibrio acido base ed equilibrio di idrolisi/formazione dell'ammide

Per superare questo fastidioso inconveniente termodinamico, occorre attivare il carbossile trasformando il residuo ossidrilico in un buon gruppo uscente realizzando, come in figura 1.30, un estere attivo.

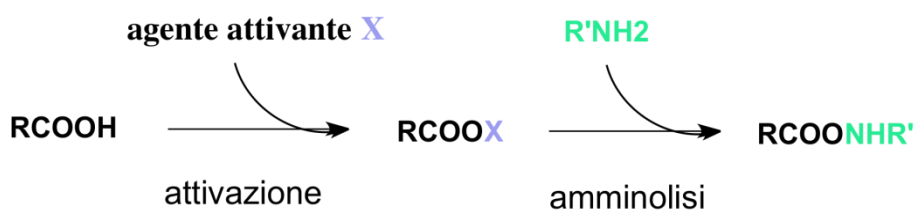


Figura 1.30 Schema generale dell'attivazione di gruppi carbossilici verso la formazione di ammidi

Gli esteri succinimidilici o esteri NHS sono tra i più largamente impiegati per il crosslinking e il labeling di gruppi carbossilici con ammine primarie. La risonanza del lone pair sull'atomo di azoto rende gli esteri succinimidilici più reattivi rispetto agli esteri alchilici verso l'attacco nucleofilo da parte dell'ammina, sia per la bontà dell'N-idrossisuccinimide come gruppo uscente, sia per l'effetto elettroattrattore che accentua il carattere elettrofilo del C estereo<sup>28</sup>.

Vi sono molti altri gruppi in grado di formare precursori attivi per la formazione di ammidi, come isocianati e isotiocianati, sulfonil cloruri, aldeidi, carbodiimmidi, acil azidi, anidridi, esteri fluorofenilici, gliossali, ecc.. Gli esteri succinimidilici importanti sintoni per la

<sup>28</sup> Christian A. G. N. Montalbetti, V. F. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 61, 10827.

loro elevata efficienza di conversione, le blande condizioni di reazione richieste e la buona biocompatibilità. Inoltre il leaving group N-idrossisuccinimide è idrosolubile e può facilmente essere allontanato nello step di purificazione di una reazione di coupling.

La sintesi degli esteri succinimidilici avviene per azione di una carbodiimide come 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimide cloridrato (EDC) e N-idrossisuccinimide, come da figura 1.31. La reazione comincia con la formazione di un intermedio O-acilisourea che subisce facilmente attacco nucleofilo da parte dell'alcol per dare l'estere e una isourea come sottoprodotto<sup>29</sup>.

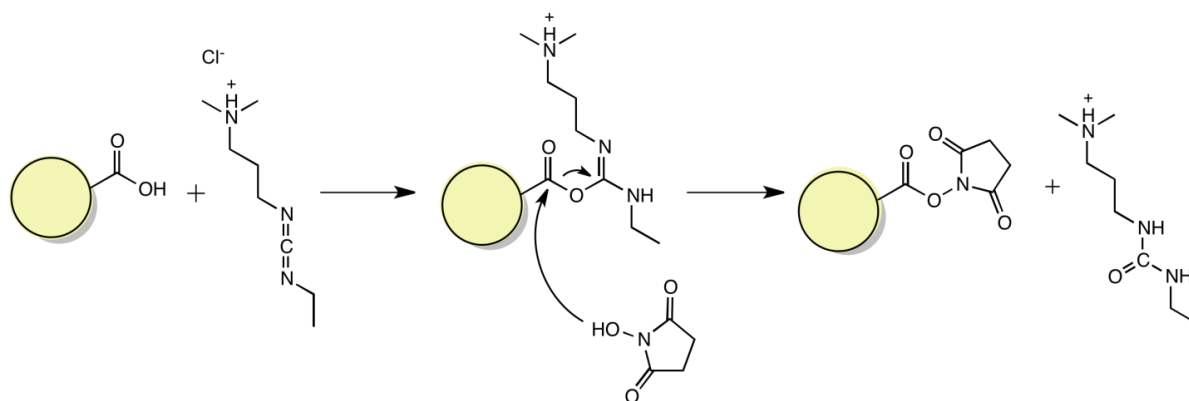


Figura 1.31 Sintesi degli esteri succinimidilici

<sup>29</sup> Deepak Sehgal, I. K. V. *Anal. Biochem.* **1993**, 218, 87-91.



# **Capitolo 2**

## **Scopo**



Con il presente lavoro di tesi si intende realizzare come primo obiettivo una metodica che permetta di sintetizzare e isolare gli esteri attivi NHS del DPP sia asimmetrico **A** che simmetrico **B** di figura 2.1.

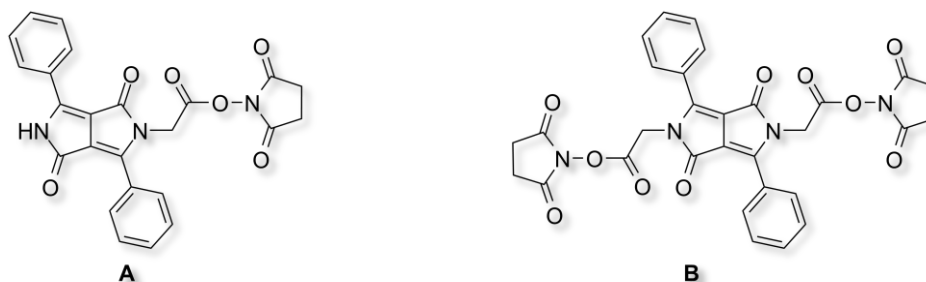
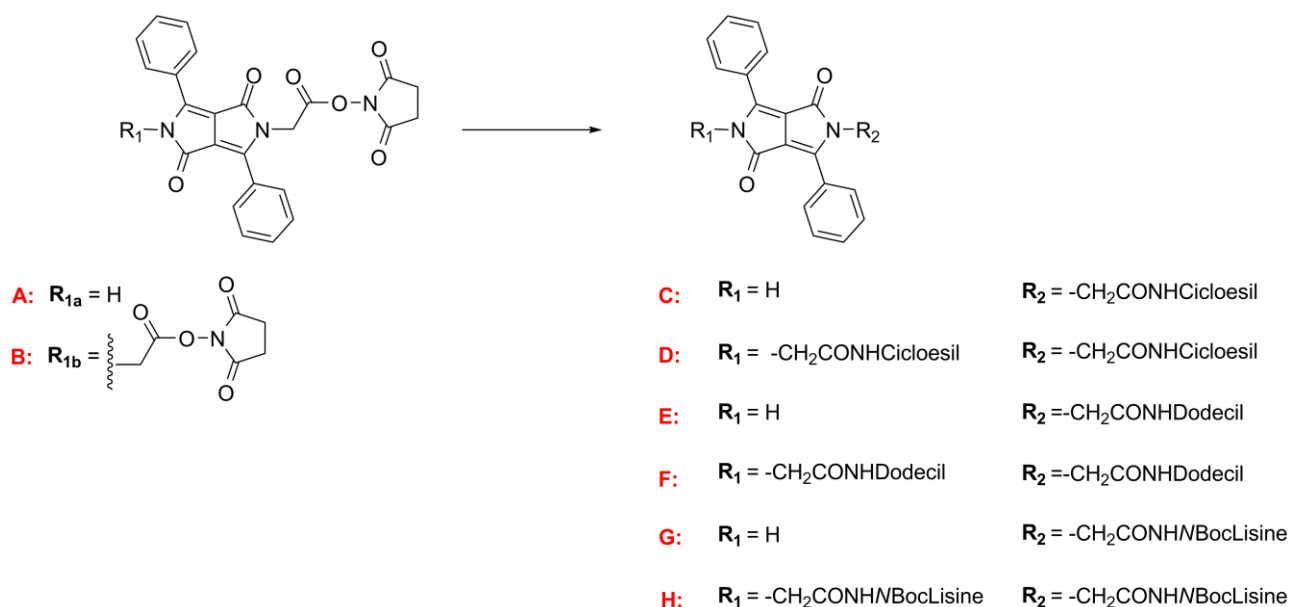


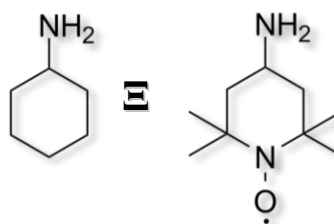
Figura 2.1 Esteri asimmetrico **A** e simmetrico **B**

In un secondo momento si intende testarne la reattività nel coupling ammidico con le ammine: cicloesilammina, dodecilammina e con l'amminoacido lisina *N*-Boc come da schema 2.1:



Schema 2.1 Reattività NHS Esteri DPP con ammine

La scelta delle ammine ha lo scopo preciso di verificare se le molecole **A** e **B** possono essere impiegate per sviluppo di futuri progetti di ricerca. Seguendo questa logica infatti, ad esempio la cicloesilammina rappresenta un equivalente sintetico (dal punto di vista sterico) del 4-aminoTEMPO come si può apprezzare in figura 2.2:



Schema 2.2 Cicloesilammina e 4-aminoTEMPO

Questo radicale stabile, se introdotto nello scheletro del DPP, dovrebbe alterarne le proprietà di fluorescenza, nello specifico “spegnendo” il fluoroforo. Se questa situazione si verificasse, questa nuova molecola potrebbe essere impiegata in biologia come detector per specie ossigeno reattive in particolare per il radicale ossidrilico, il quale interagendo con la sonda dovrebbe “riaccenderne” la fluorescenza.<sup>11,30</sup>

La dodecilammina è stata scelta perché può portare a nuovi polimeri supramolecolari che sfruttano lo scheletro del DPP. In particolare il *Longchains DPP* e il *mono-Longchains DPP* descritti nella fase introduttiva sfruttano le “naturali” interazioni non-covalenti prodotte dal pigmento. Come descritto nella sezione introduttiva l’interazione supramolecolare in soluzione è garantita per introduzione nella posizione para degli anelli aromatici dei gruppi solubilizzanti, come si può apprezzare in figura 2.3:

<sup>30</sup> (a) Kaur, M.; Choi, D. H., *Chem. Soc. Rev.* **2014**.



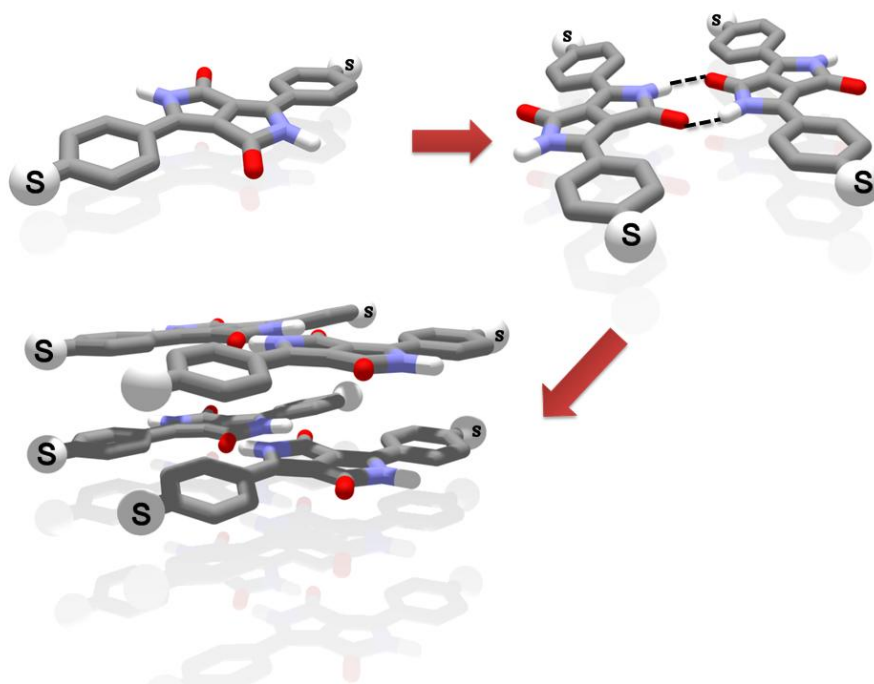


Figura 2.3 Arrangiamenti supramolecolari di il *Longchains DPP*

Questo tipo di soluzione porta alla formazione di un network di legami idrogeno nel piano, ed ad una interazione  $\pi$ - $\pi$  perpendicolare. In questa tesi con le molecole **E** e **F** si intende esplorare la possibilità di dirigere entrambe le interazioni non covalenti perdicolarmente al piano del DPP come si vede in figura 2.4, attraverso l'introduzione dei gruppi solubilizzanti dal lato dell'azoto. Si intende anche esaminare le differenze prodotte a livello optoelettronico sull'aggregato supramolecolare prodotto attraverso spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile.

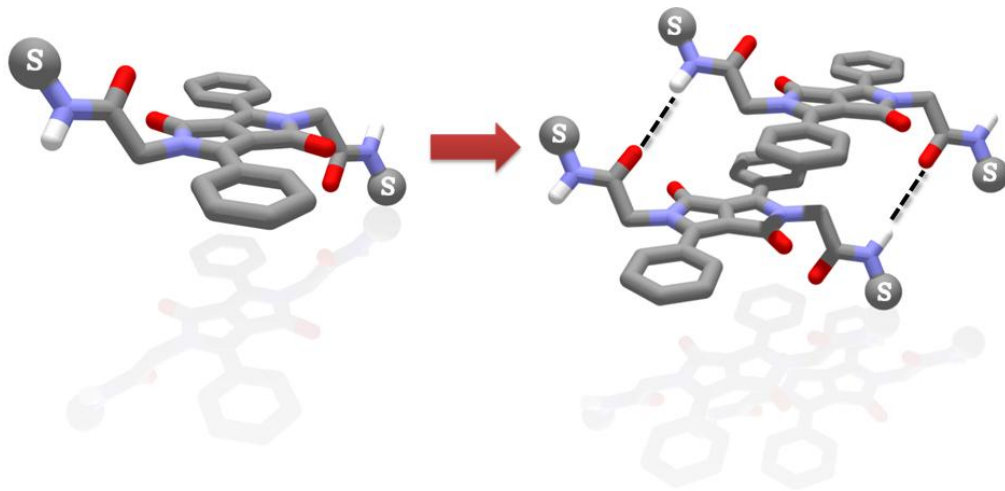


Figura 2.4 Arrangiamenti supramolecolari di F

Infine la scelta dell'amminoacido lisina è dovuta al fatto che sia **A** che **B** possono essere potenziali *biomarkers* per proteine, le quali si legano con le sonde proprio con questo tipo di residui aminoacidici. Se lo studio di reattività andrà a buon fine la molecola **A** sarà testata come biomarker con la proteina modello Bovine Serum Albumin (BSA).

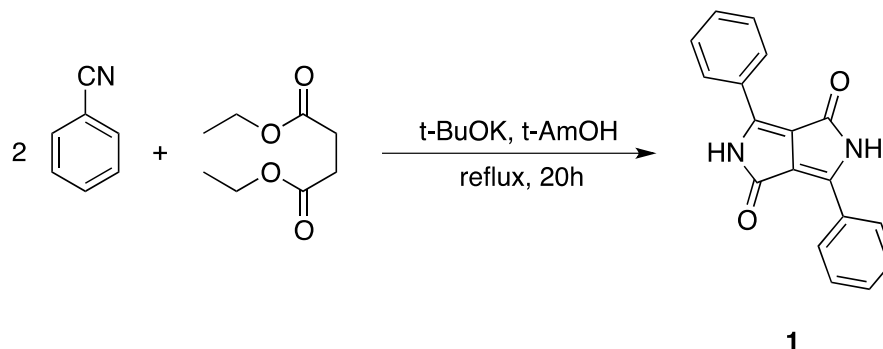
# **Capitolo 3**

## **Discussione e Risultati**



### 3.1. Sintesi di DPP e DPP *N*-Boc protetti

La sintesi del substrato di partenza DPP **1** descritta nel capitolo 1 è stata condotta secondo lo schema di reazione 3.1.

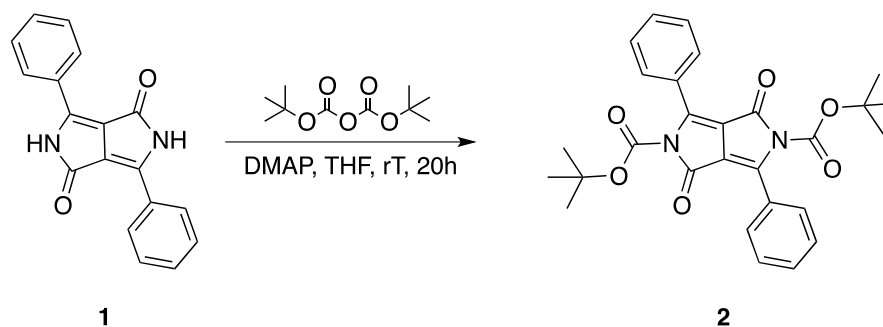


Schema 3.1 Sintesi del DPP

Il pigmento **1** è stato isolato come solido rosso dal grezzo di reazione per precipitazione con metanolo (MeOH) e HCl al 37%, con una resa pari al 52%

#### 3.1.1. Sintesi di DPP bis BOC

Il prodotto **2** si ottiene dalla reazione del DPP con di-*tert*-butildicarbonato in THF e in presenza di dimetilamminopiridina (DMAP) in quantità catalitica.

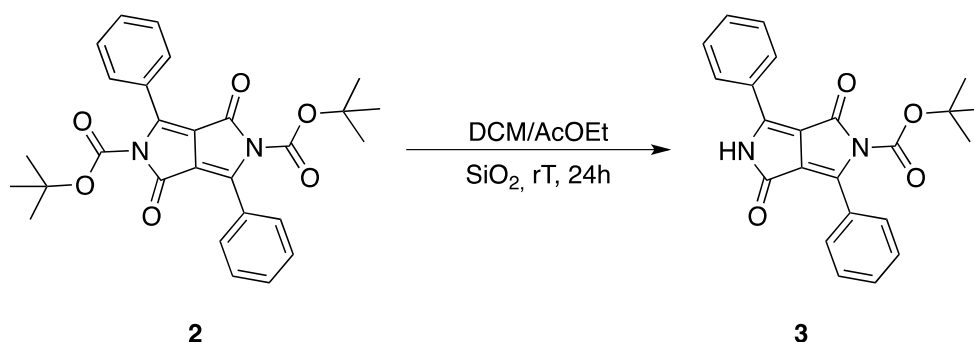


Schema 3.2 Protezione degli N lattamici del DPP

La reazione permette di ottenere in resa quantitativa il prodotto, che può essere usato per lo step successivo senza bisogno di purificazioni. La presenza dei gruppi protettori rende il DPP notevolmente più solubile nei comuni solventi organici, rompendo le interazioni non covalenti dovute ai legami a idrogeno e  $\pi$ - $\pi$  stacking e ne aumenta la reattività.

### 3.1.2. Monodeprotezione di DPP bis BOC

La monodeprotezione di un azoto pirrolidinico del substrato **2**, mostrata nello schema 3.3, fornisce il prodotto asimmetrico **3**.



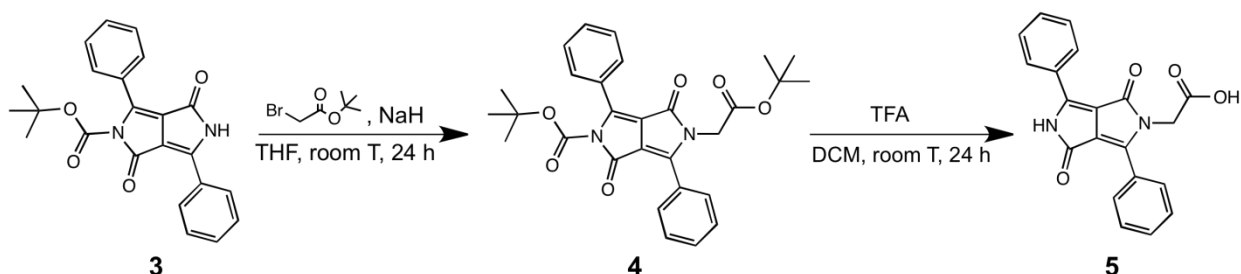
Schema 3.3 Monodeprotezione del DPP bis BOC

L'eliminazione di un gruppo protettore *t*-BOC avviene per aggiunta di 100 equivalenti di silice al substrato **2** disciolto nel minimo volume di DCM seguita da evaporazione del solvente a pressione ridotta. Il carattere debolmente acido della silice consente in 24 ore in alto vuoto la monodeprotezione di uno dei due gruppi BOC. La purificazione del prodotto avviene su colonna cromatografica con una miscela eluente 9:1 diclorometano/acetato d'etile. Si ottiene il prodotto **3** con una resa del 56%, insieme a due sottoprodotti: il substrato di

partenza **2** e il pigmento **1**, prodotto della duplice deprotezione, che rimane intrappolato nella silice.

### 3.2. Sintesi di DPP mono terbutilacetato e deprotezione

La sintesi del precursore **4**, indicata nello schema 3.4, prevede la deprotonazione del substrato **3** con sodio idruro, seguita dall' attacco nucleofilo ad opera dell'anione sul terbutil bromoacetato.



Schema 3.4 Sintesi di DPP mono terbutilacetato e deprotezione

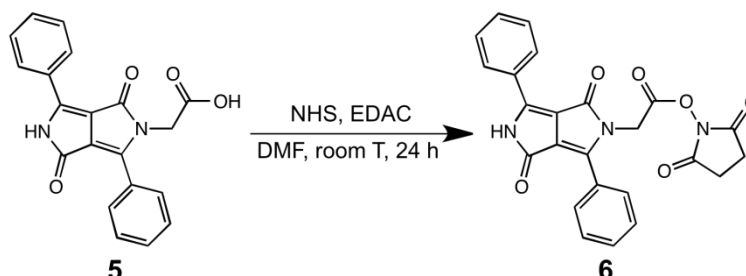
Il prodotto viene isolato per estrazione con acetato d'etile con una resa del 60%.

Il corrispettivo acido **5** si ottiene per azione di acido trifluoroacetico (TFA) in quantità catalitica in DCM, che permette di rimuovere il gruppo protettore BOC e il gruppo tert-butilico a temperatura ambiente nell'arco di una notte, con una resa pari al 99%. Il prodotto si utilizza tal quale e non necessita di purificazioni.

### 3.3. Sintesi di DPP mono estere NHS

Il derivato carbossilico **5** ottenuto secondo procedura descritta nel paragrafo precedente viene impiegato per la sintesi dell'estere NHS **6**, illustrata nello schema 3.5. La

reazione avviene ad opera di EDAC e NHS in DMF secondo il meccanismo descritto nella sezione introduttiva.



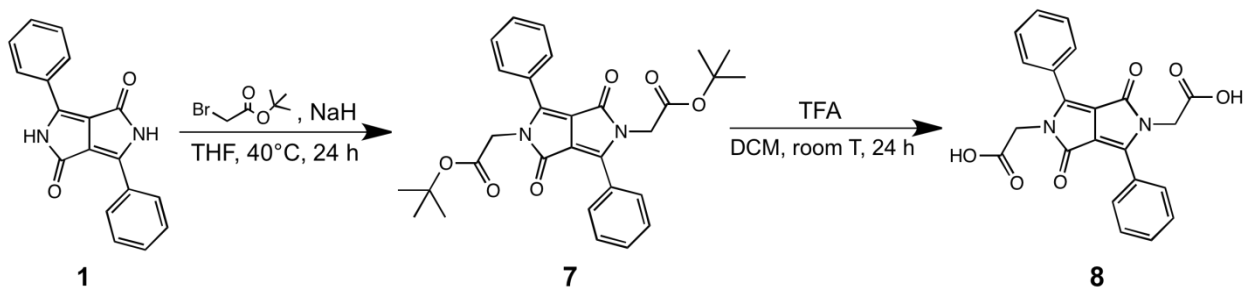
**Schema 3.5 Sintesi di DPP mono estere NHS**

Il prodotto di esterificazione viene isolato come solido rosso dal grezzo di reazione per semplice precipitazione con acqua con una resa del 79%. L'estere attivo **6** risulta stabile e non richiede particolari cautele nella conservazione. L'identità di **6** è confermata dalla completa caratterizzazione attraverso analisi  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR e ESI-MS come descritto nella parte sperimentale. È importante sottolineare come l'ottenimento di **6** porti a compimento uno dei principali obiettivi del presente lavoro di tesi.

### 3.4. Sintesi di DPP bis terbutilacetato e deprotezione

Gli ottimi risultati ottenuti nella sintesi di **5** e **6** ci hanno spinto ad esplorare la possibilità di ottenere gli equivalenti esteri di tipo simmetrico, impiegando analoghe procedure sperimentali. La produzione del DPP bis-terbutilacetato **7**, non richiede una preventiva protezione con *t*-BOC e si ottiene in un unico passaggio sintetico a partire dal DPP **1**, come illustrato nello schema 3.6.



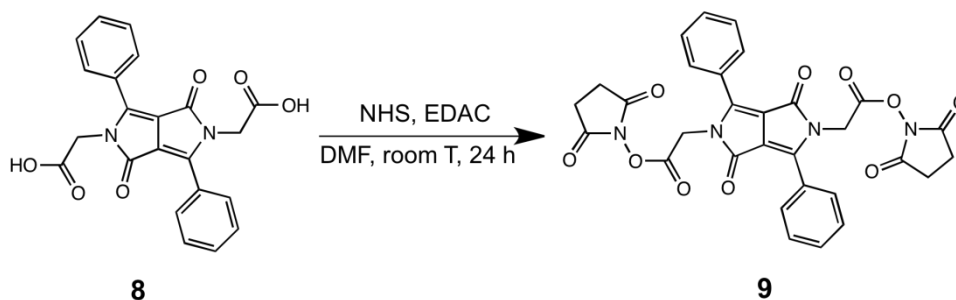


Schema 3.6 Sintesi di DPP bis tertutilacetato e deprotezione

Il prodotto si ottiene come solido rosso per estrazione dalla miscela di reazione con DCM, con una resa del 99%. Il derivato dicarbossilico **8** si ottiene facilmente per deprotezione dei due gruppi tertutilici con TFA in quantità catalitica in DCM. La reazione decorre a temperatura ambiente e permette di ottenere dopo una notte il prodotto **8** senza bisogno di purificazioni e con una resa del 99%.

### 3.5. Sintesi di DPP bis estere NHS

Il corrispettivo disostituito del DPP mono estere NHS, si ottiene a partire dal diacido carbossilico **8**, la cui sintesi è descritta nel paragrafo precedente, per reazione con EDAC e NHS in DMF, come da schema 3.7.



Schema 3.7 Sintesi di DPP bis estere NHS

Per precipitazione con acqua si recupera il prodotto di esterificazione simmetrico **9**, un solido arancio, con resa dell'88%, che è stato caratterizzato tramite spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR ESI-MS come discusso nella Parte Sperimentale.

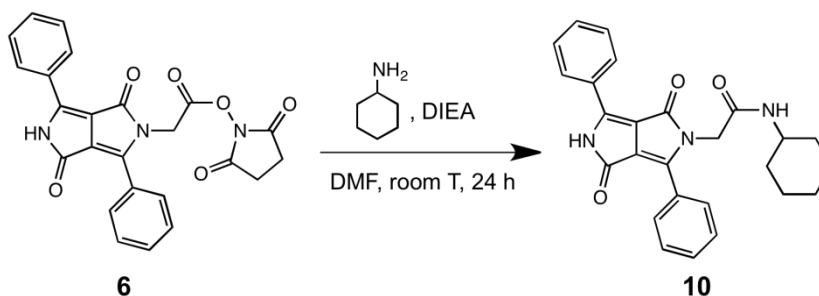
L'ottenimento dell'estere simmetrico **9** oltre a quello asimmetrico **6** completa il primo obiettivo di questo lavoro.

### 3.6. Studio di reattività degli esteri NHS

#### 3.6.1. Sintesi di DPP monocicloesilammide

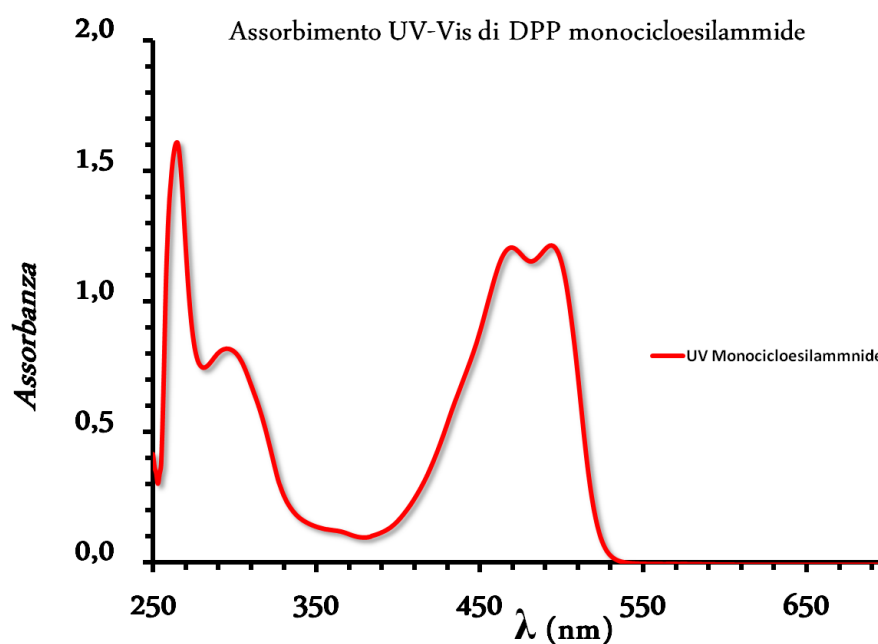
La reattività dell'estere NHS del DPP mono sostituito **6** è stata testata in prima battuta con la cicloesilammina, secondo lo schema 3.8. La reazione è stata effettuata in DMF con un'eccesso di cicloesilammina e in presenza della base diisopropiletilammina (DIEA). Quest'ultimo reagente ha lo scopo di fungere da "scavenger" di  $\text{H}^+$ , prodotti dal gruppo uscente NHS, promuovendo la formazione del legame peptidico in **10**.

Per semplice precipitazione si ottiene come prodotto un solido rosso, con una resa dell'83%, come descritto nella Parte Sperimentale.



Schema 3.8 Sintesi di DPP monocicloesilammide

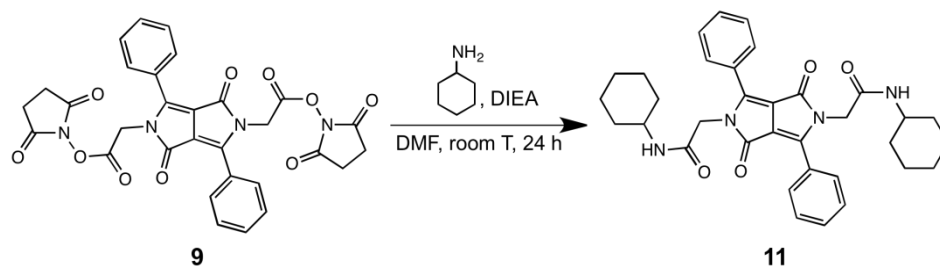
Il prodotto di sintesi **10** è stato compiutamente caratterizzato tramite spettroscopia  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, ESI-MS, i cui spettri sono riportati in Parte Sperimentale. In figura 3.1 si riporta inoltre lo spettro UV-Vis di **10** in DMSO, che presenta due massimi di assorbimento a 494 nm e a 469 nm.



3.1 Spettro UV-Vis di DPP monocicloesilammide in DMSO

### 3.6.2. Sintesi di DPP biscicloesilammide

Con un'identica procedura sintetica, è stato possibile convertire anche l'estere simmetrico **9** nell'ammide **11**, secondo lo schema 3.9. Anche in questo caso il prodotto puro, un solido giallo, si ottiene per precipitazione da una miscela metanolo/HCl 0.1 M, con resa del 47%.



Schema 3.9 Sintesi di DPP bis(cicloesilammide)

Il prodotto disostituito **11** è stato caratterizzato tramite spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  ed ESI-MS, non è stato possibile eseguire la caratterizzazione con analisi  $^{13}\text{C-NMR}$  a causa della scarsa solubilità del prodotto nei principali solventi NMR.

Di seguito si riporta lo spettro UV-Vis dell'ammide **11** (figura 3.2) che presenta un massimo di assorbimento a 464 nm.

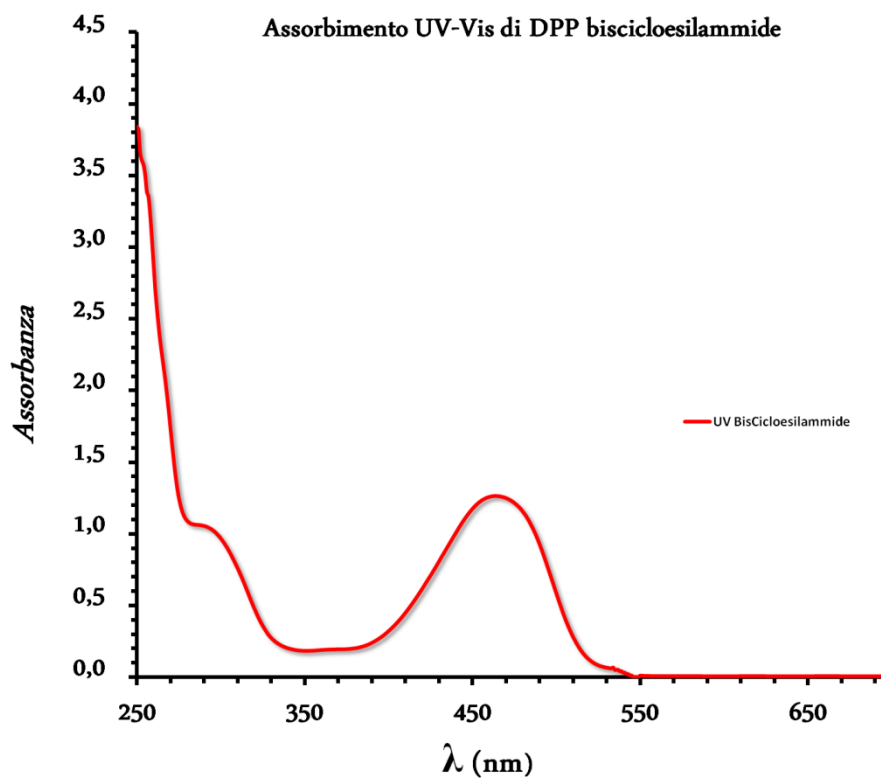


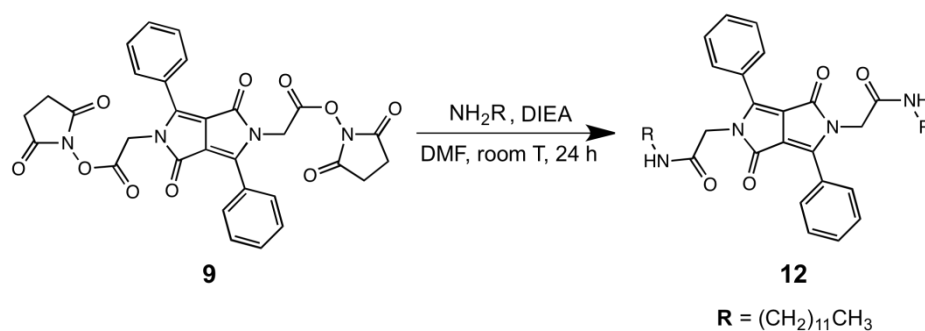
Figura 3.2 Assorbimento UV-Vis di DPP bis(cicloesilammide) in DMSO

Le sintesi delle ammidi **10** e **11** portano a compimento il secondo obiettivo del presente lavoro di tesi, che prevede la verifica della reattività di questi substrati verso la cicloesilammina, che si può considerare dal punto di vista sterico un equivalente sintetico del 4-amino-TEMPO, come descritto nello Scopo della Tesi.

### 3.7. Sintesi di polimeri supramolecolari N-derivati

#### 3.7.1. Sintesi di DPP bisdodecilammide

Sulla base dei buoni risultati ottenuti con l'ammido ciclico si è intrapresa la sintesi del prodotto simmetrico DPP bisdodecilammide (DPPBDA) **12** utilizzando un eccesso di dodecilammina in presenza di DIEA in DMF, come da schema 3.10, secondo la procedura descritta nel precedente paragrafo.



Schema 3.10 Sintesi di DPP bisdodecilammide

Il prodotto **12** è stato ottenuto come solido giallo per estrazione con DCM, in resa del 93%. Come premesso nello Scopo della Tesi la lunga catena  $\text{C}_{12}$  della dodecilammina funge da gruppo solubilizzante in solventi apolari, in più il residuo ammidico fornisce un'ulteriore interazione supramolecolare sinergica che dovrebbe sommarsi a quelle di  $\pi$ - $\pi$  stacking prodotte dal DPP.

Purtroppo la reazione fra il monoestere e la dodecilammina ha prodotto una miscela di difficile caratterizzazione e purificazione, per questo la sintesi del derivato monosostituito è stata momentaneamente accantonata.

### **3.7.2. Caratterizzazione dei polimeri supramolecolari derivati da DPP bis dodecilammide**

In questo lavoro di tesi si è anche intrapreso uno studio preliminare volto a confermare le proprietà di self-assembly di **12**. La tecnica più semplice per dimostrare il riconoscimento molecolare è attraverso spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile, poiché come descritto in fase di introduzione, alzando la temperatura si favorisce la specie monomera rispetto a quella polimerica, quindi si dovrebbero osservare variazioni nello spettro di assorbimento. In figura 3.3 sono rappresentati i diversi spettri UV-Vis di **12** in soluzione di metilcicloesano (MCH) registrati alle diverse temperature. La scelta del MCH è dovuta al fatto che l'apolarietà di questo solvente è in grado di "forzare" le interazioni supramolecolari promuovendo l'aggregazione.

Sono visibili chiaramente due punti isosbastici che sono sintomo di più specie presenti all'equilibrio. Inoltre la specie polimerica presenta il massimo di assorbimento nel visibile a 514 nm con uno shift batocromico di 48 nm rispetto al monomero che è invece a 466 nm.

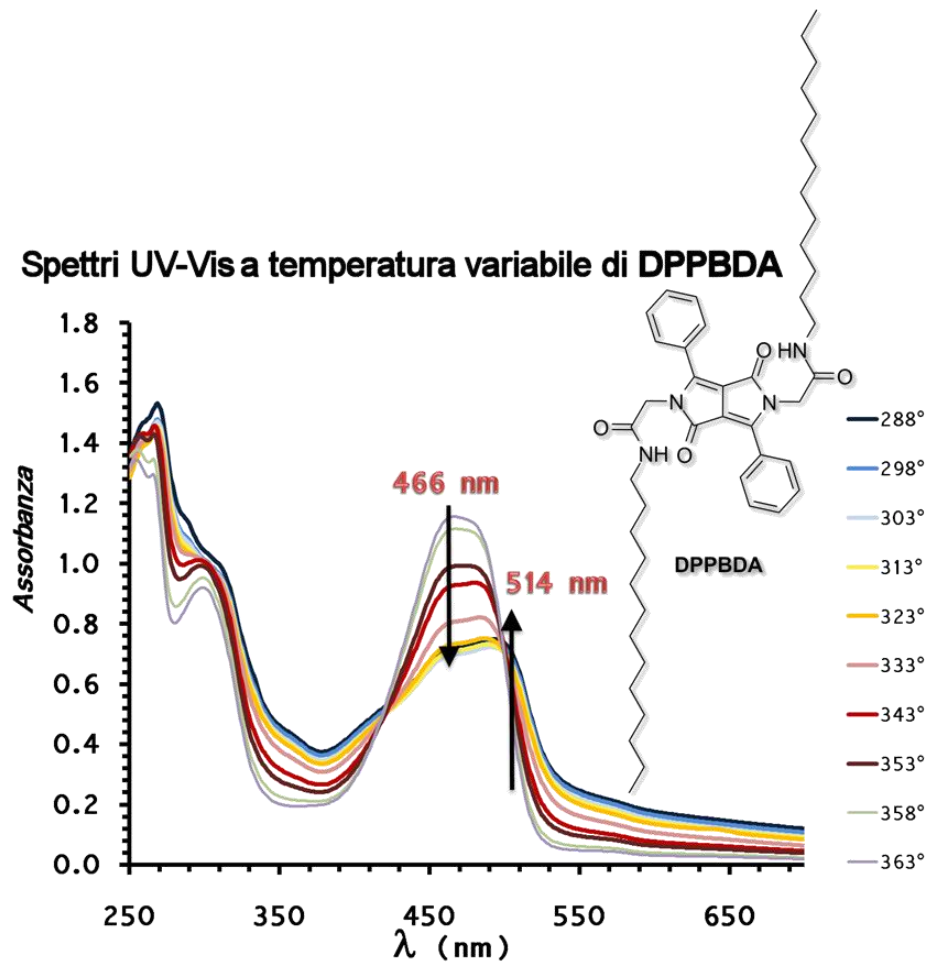
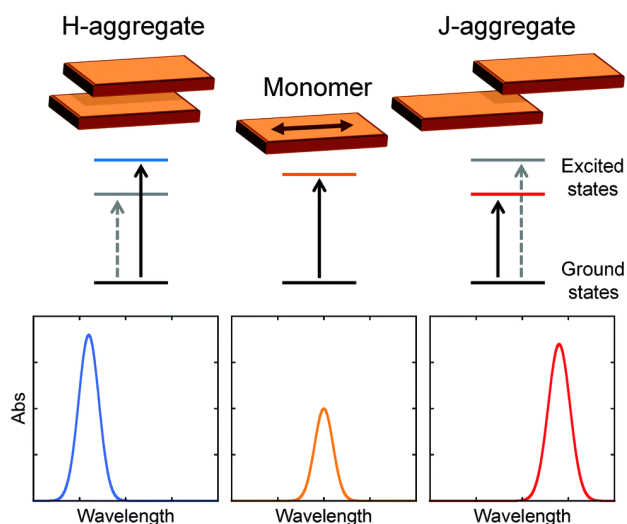


Figura 3.3 Spettro UV-Vis a temperatura variabile di 12 in MCH

Questo tipo di fenomeno indica la formazione di specie aggregate di tipo J,<sup>31</sup> nelle quali i cromofori sono allineati in un arrangiamento tipo “testa coda” il quale provoca lo shift batocromo come da figura 3.4.

<sup>31</sup> Würthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha-Möller, C. R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3376.



### 3.4 Arrangiamento "testa coda" di DPPBDA

In figura 3.5 si può invece apprezzare la variazione normalizzata dei massimi di assorbimento a 466 nm e 514 nm. Il grafico mostra un andamento speculare indice della comparsa-scomparsa di una specie rispetto ad un'altra. A questo livello di indagine non si può però stabilire con certezza se il tipo di meccanismo di aggregazione sia cooperativo o isodesmico, anche se la distribuzione dei dati fa propendere per il primo piuttosto che per il secondo.

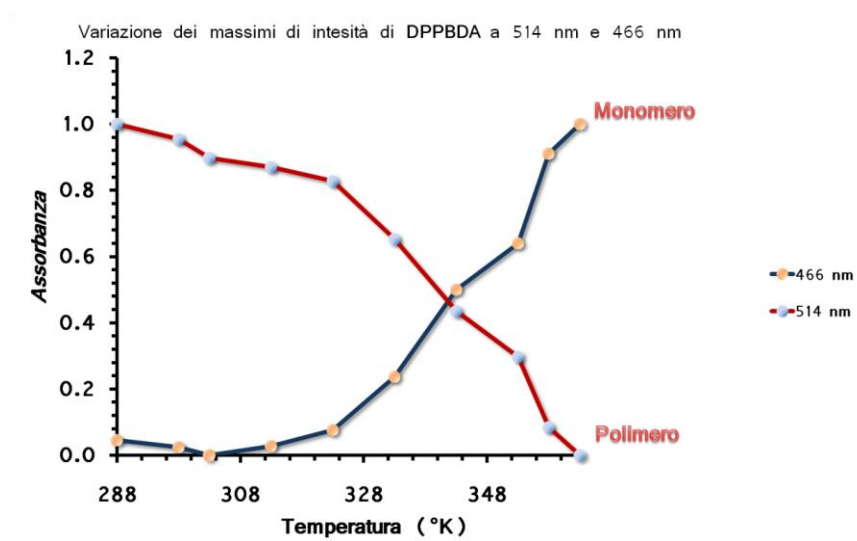


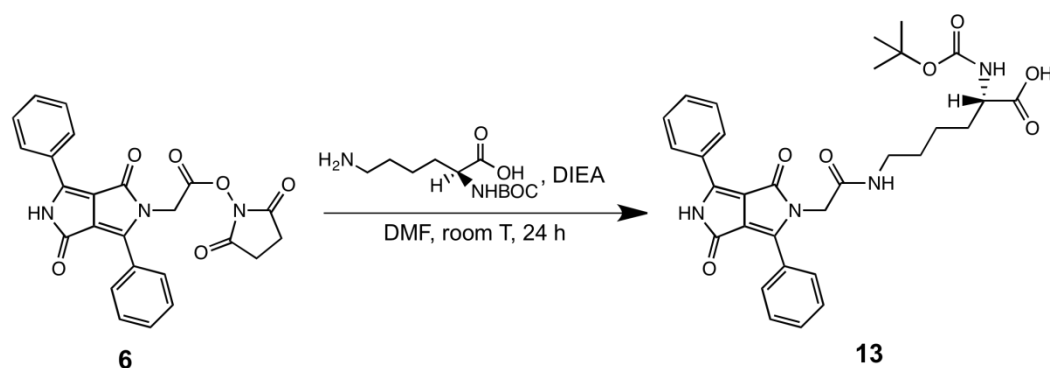
Figura 3.5 Variazioni normalizzate dei massimi di assorbimento UV-Vis di DPPBDA con la temperatura



### 3.8. Sintesi di coniugati dell'amminoacido lisina *N*-BOC protetto

#### 3.8.1. Sintesi di DPP mono *N*-BOC lisina

Come accennato nello Scopo, si è testata la reattività degli esteri NHS del DPP nei confronti del gruppo amminico  $\epsilon$  della lisina *N*-BOC. Anche in questo caso la presenza di DIEA come base favorisce la formazione del legame ammidico a temperatura ambiente, per dare il prodotto **13**, secondo lo schema di reazione 3.11.

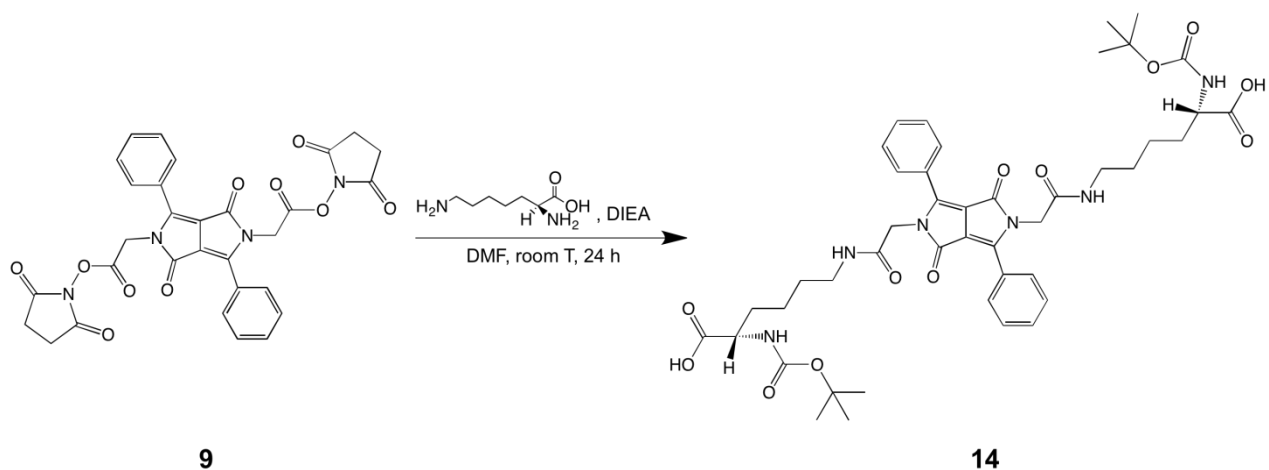


Schema 3.11 Sintesi di DPP mono *N*-BOC lisina

Vista la polarità di **13**, i tentativi di isolarlo in forma pura attraverso le usuali tecniche cromatografiche in fase diretta si sono rivelati complessi, e la sua identità è stata confermata solo mediante analisi ESI-MS (vedi figura 3.6)

#### 3.8.2. Sintesi di DPP bis *N*-BOC lisina

Con un numero doppio di equivalenti rispetto alla sintesi precedentemente descritta e partendo dall'estere NHS simmetrico si è ottenuto anche il prodotto di bis sostituzione **14**, come da schema 3.12.



**Schema 3.12 Sintesi di DPP bis *N*-BOC lisina**

Anche in questo caso, come già evidenziato per il prodotto asimmetrico **13** la purificazione si è dimostrata complessa, e in questa fase della ricerca non è stato possibile isolare il prodotto in forma pura. La sua identità è stata confermata attraverso analisi ESI-MS. In questo caso per confermare la formazione di **14** è stata anche effettuata un'analisi dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  della miscela di reazione. Come si può infatti evidenziare in figura 3.7, nella quale si confrontano gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  dell'amminoacido e di **14**, si può vedere chiaramente come la principale impurezza presente nel grezzo di reazione sia dovuta alla lisina *N*-BOC non reagita.

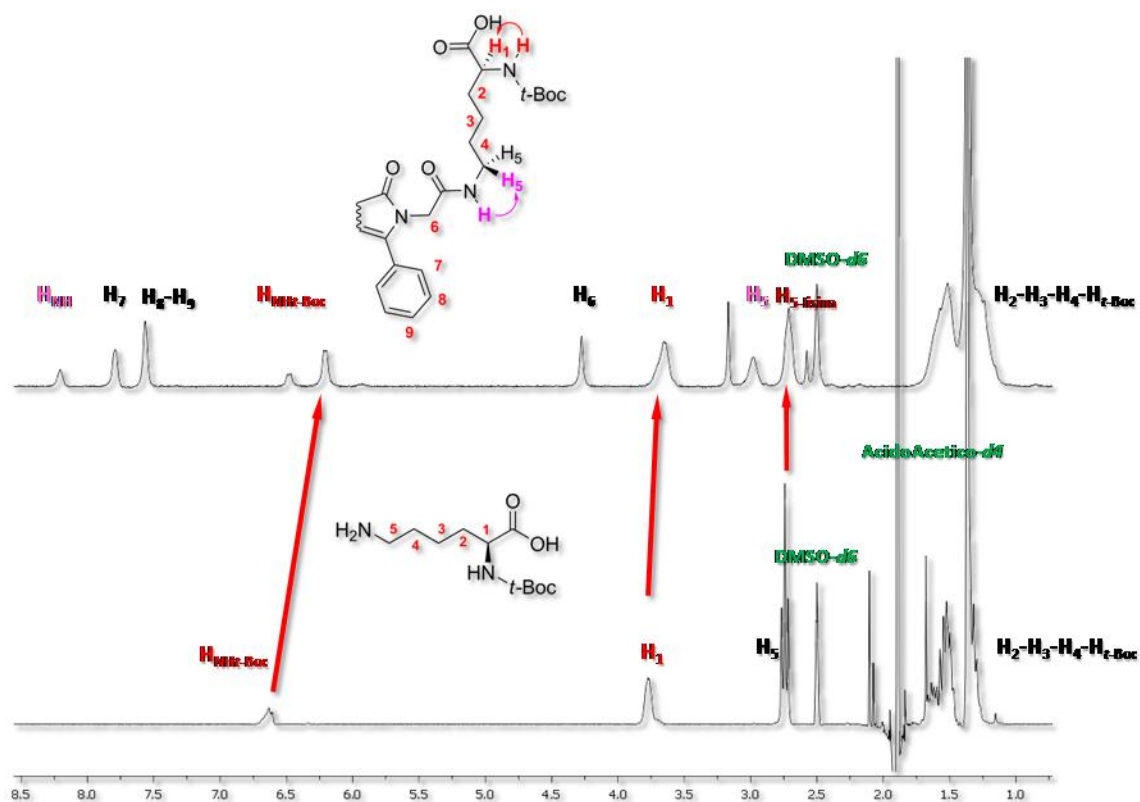
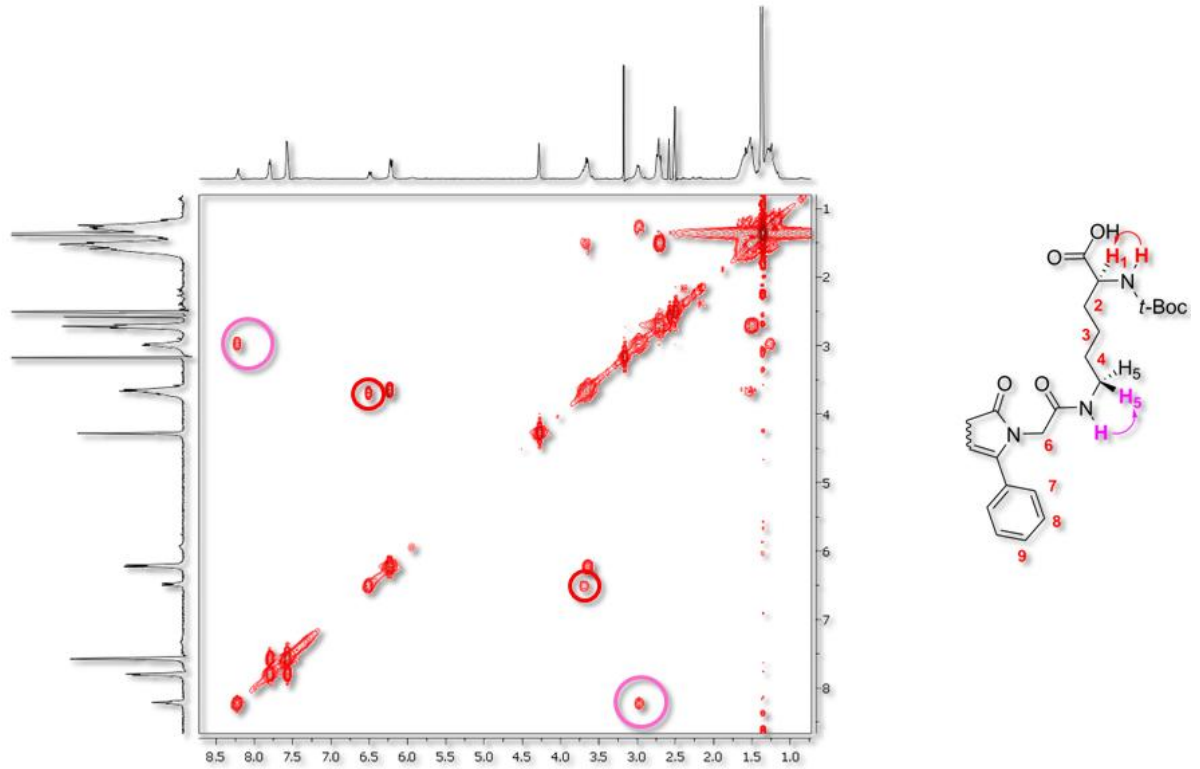


Figura 3.7 Spettri <sup>1</sup>H NMR di **14** e *N*-Boc-Lisina

Le differenze di chemical shift riscontrate sono da ascrivere alla lieve quantità di acido acetico deuterato aggiunto alla lisina *N*-BOC con lo scopo di spostare il segnale dell'acqua presente sia nel reagente che nel DMSO-*d*<sub>6</sub>, che impediva la visualizzazione di H<sub>1</sub> e H<sub>5</sub>.

Come si può inoltre apprezzare dalla spettrometria bidimensionale NMR-COSY rappresentata in figura 3.8, l'identità di **14** è ulteriormente confermata sia dall'interazione scalare fra il tripletto dell'ammide formatasi (risuonante a δ 7.99 ppm) e il protone contrassegnato come H<sub>5</sub> del residuo lisinico (risuonante a δ 2.76 ppm), che

dall'interazione fra il NH-BOC (risuonante a  $\delta$  6.27 ppm) e il protone contrassegnato come H<sub>1</sub> (risuonante a  $\delta$  3.45 ppm).



3.8 Spettro bidimensionale NMR-COSY di DPP bis

### 3.9. Studio del labeling con proteina modello BSA (Bovine Serum Albumin)

Gli esiti positivi delle due reazioni appena descritte hanno suggerito di testare la reattività con i residui lisinici estrusi dalla BSA, illustrata in figura 3.8: si tratta di una proteina con un peso molecolare di 67 kD e un numero di gruppi amminici primari di residui lisinici compreso fra 30 e 35.

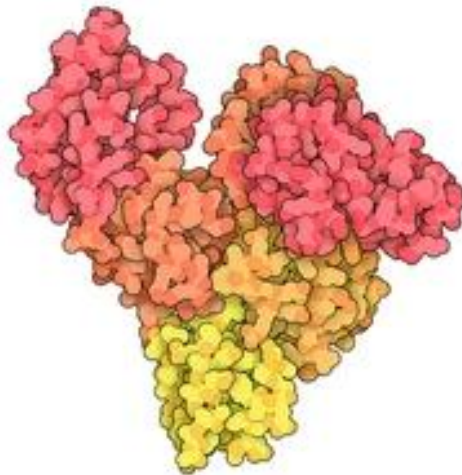


Figura 3.8 Struttura terziaria della BSA

### 3.9.1. Reazione di labeling

Come descritto nello Scopo, per la reazione di labeling si è impiegato preferibilmente l'estere NHS asimmetrico **6** rispetto al corrispondente simmetrico, per evitare che una molecola bifunzionale si leghi con due proteine portando a prodotti di mono e disostituzione.

La reazione di labeling (o coupling) è stata eseguita in un buffer acquoso contenente NaCl 100 mM e  $H_3BO_3$  35 mM, partendo dal DPP mono estere NHS aggiunto al buffer in soluzione di dimetilsolfossido (DMSO) fino a una concentrazione finale di 30  $\mu$ M e BSA in concentrazione di 2 mg/mL. L'  $H_3BO_3$  impartisce al buffer un pH basico (8.3).

In parallelo si è testato un "mock coupling" usando BSA e DMSO in buffer senza DPP mono estere NHS, riproducendo le concentrazioni della reazione autentica, per poter osservare eventuali variazioni a carico della struttura terziaria della proteina indotte dal DMSO o dal pH.

La reazione di *labeling* è stata monitorata nel tempo prelevando campioni a 0', 30', 60', 120' e overnight. Per fermare la reazione, i diversi campioni prelevati sono stati diluiti in 10  $\mu$ L di Trizma™ base<sup>32</sup> 1 M (pH = 8.8) e conservati a 4°C fino alla fase di analisi.

### 3.9.2. SDS-PAGE e imaging

I campioni sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide con di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Preliminarmente sono stati analizzati 3 campioni-riferimento:

- un campione di BSA in buffer privo di DMSO e di colorante (1)
- un campione di DPP in buffer (2)
- il campione del mock coupling (BSA in buffer contenente DMSO) (3)

In figura 3.9 si può vedere il gel di poliacrilammide relativo a questi tre campioni, nel primo pozzetto è stato caricato il campione 1, nel secondo pozzetto è stato caricato il riferimento<sup>33</sup> contenente proteine a diversi pesi molecolari, nel terzo e nel quarto pozzetto sono stati caricati rispettivamente i campioni 2 e 3.

L'analisi evidenzia che: (i) la proteina in buffer presenta la stessa corsa elettroforetica sia in assenza che in presenza di DMSO, questo significa che essa non subisce variazioni strutturali dovute al DMSO, (ii) il DPP mono estere NHS in buffer e DMSO cade nella zona a bassi pesi molecolari, ben distinta da quella della BSA, quindi la presenza di fluorescenza in corrispondenza della proteina non può essere dovuta a DPP mono estere NHS libero, (iii) la

---

<sup>32</sup> tris(idrossimetil)-amminometano (TRIS)

<sup>33</sup> SDS-PAGE molecular weight standards, broad range (BIO RAD)

fluorescenza è unicamente associata alla presenza del DPP mono NHS estere e non ad anomalie nel gel.

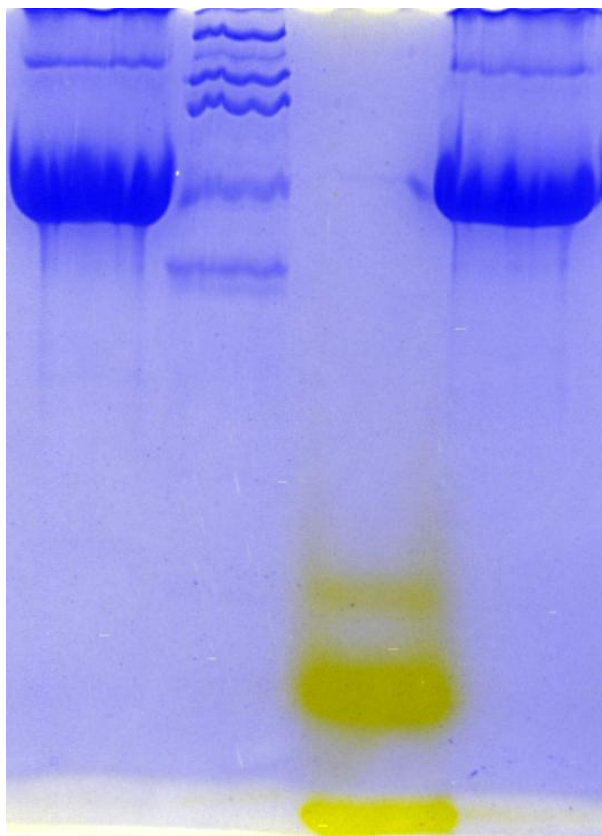


Figura 3.9 Gel di poliacrilammide in falsi colori con campioni-riferimento

L'analisi SDS-PAGE dei campioni della reazione di *labeling* è mostrata invece in figura 3.10. Le bande più alte mostrano che la reazione avviene rapidamente e in modo efficiente. Le bande fluorescenti sul bordo inferiore del gel sono invece dovute al DPP mono estere NHS non reagito.

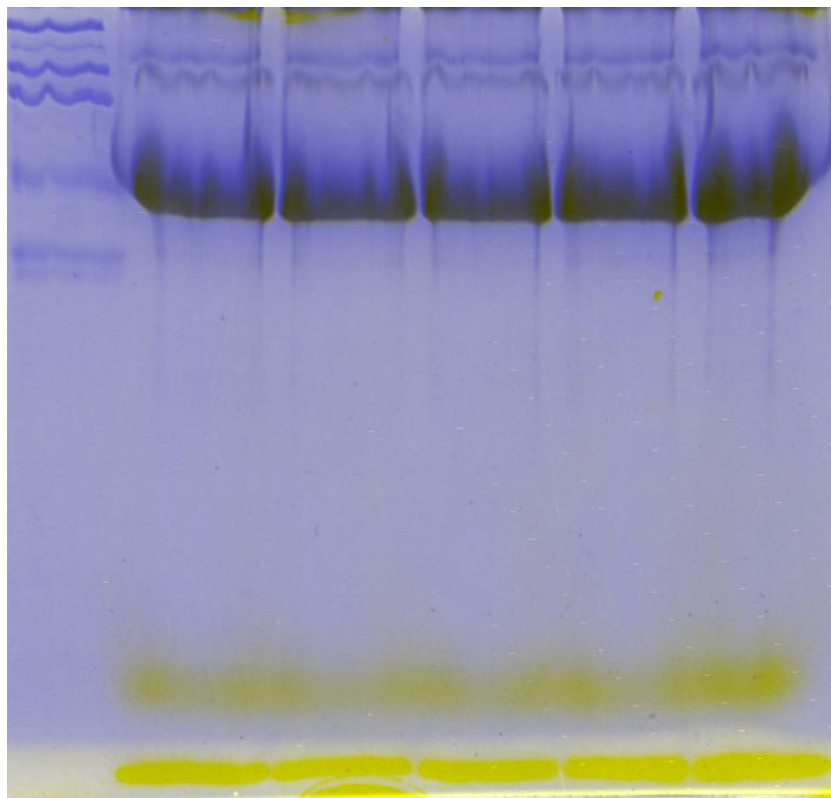


Figura 3.10 Gel di poliacrilammide in falsi colori con campioni della reazione di labeling prelevati a tempi differenti

L'uniforme intensità di fluorescenza dei diversi campioni è probabilmente dovuta ad un inefficiente bloccaggio della reazione ad opera del TRIS, ulteriori studi sono in corso di svolgimento per chiarire questo punto.



# **Capitolo 4**

# **Conclusioni**



I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi possono essere riassunti nei seguenti punti:

- La sintesi, purificazione e caratterizzazione degli esteri NHS simmetrici e asimmetrici **6** e **9**. La procedura adottata presenta il vantaggio della semplice purificazione del prodotto d'interesse per precipitazione con acqua. Gli esteri NHS **6** e **9** risultano stabili nel tempo allo stato solido e conservabili senza particolari precauzioni
- Lo studio di reattività di **6** e **9** ha prodotto le rispettive ammidi **10** e **11** con buona resa. Questo risultato sarà sfruttato in futuro come accennato in Scopo della Tesi per realizzare i derivati con il 4-AminoTEMPO da impiegare come sonde per ROS
- Lo studio di reattività del NHS estere simmetrico **9** ha prodotto un monomero in grado di fornire un interessante polimero supramolecolare, il quale produce un arrangiamento differente rispetto a quelli osservati per il *Longchains-DPP*. Il preliminare studio del riconoscimento molecolare prodotto da **12** è stato effettuato mediante spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile in MCH.
- Si è verificata la reattività degli esteri **6** e **9** con l'aminoacido *N*-Boc lisina. La reazione di amidazione ha prodotto i prodotti d'interesse **13** e **14**. L'identità dei composti è stata confermata attraverso analisi NMR bidimensionale COSY

e ESI-MS. Purtroppo la natura polare dei prodotti **13** e **14** ci ha impedito di isolarli in forma pura attraverso le usuali tecniche cromatografiche.

- Impiego dell'estere asimmetrico **6** come biomarker con la proteina BSA. La formazione del legame fra **6** e BSA, ovvero il successo della reazione di *labeling* è stata confermata attraverso un'elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Ulteriori studi con HPLC in fase inversa sono in corso per isolare la proteina marcata dal buffer di reazione
- I buoni risultati raggiunti durante questo preliminare studio porteranno alla realizzazione dei due nuovi biomarkers di seconda generazione derivati dal DPP ( vedi figura 4.1). La funzionalità solfonica presente in queste due nuove sonde incrementerà la loro solubilità in acqua facilitando la reazione di *labeling* con la proteina.

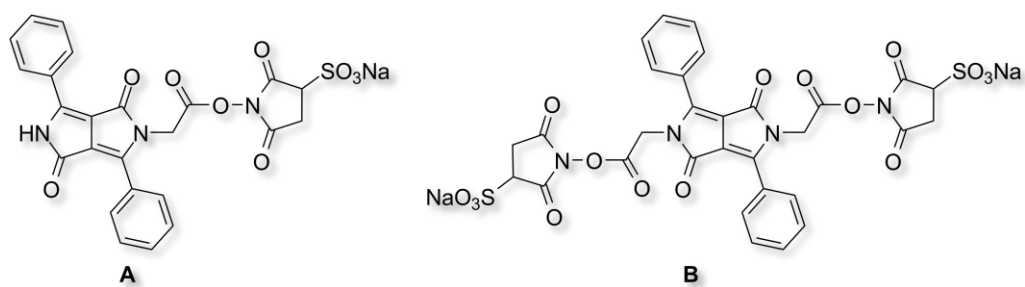


Figura 4.1: Sulfonamide esteri del DPP come biomarkers di II generazione

# 5. Ringraziamenti

*“Quello che abbiamo non è comunque nostro”*

Arrivata alla fine di questo faticoso intenso bello sfaccettatissimo lavoro, mi porto dietro tanto sonno, un mucchio di conoscenze nuove, tanta pratica, un po' di parolacce, un po' più di soddisfazioni e un cuore pieno.

Per tutto quello che ho vissuto e imparato in questi mesi, di cui sono estremamente orgogliosa e che non avrei mai raggiunto da sola, devo ringraziare veramente moltissime persone. Per questo, un sincero grazie:

Al prof De Lucchi e al prof. Fabris per gli insegnamenti, l'aiuto e la disponibilità, mai fatti mancare nel momento del bisogno e offerti anche quando il bisogno si nascondeva per timidezza.

A Beppe, che mi ha insegnato non so che razza di quantità gigantesca di cose, che mi ha iniziato all'HPLC, che mi ha guidato fino a qui, sempre con grande pazienza e con la sua innata capacità di alleggerire le delusioni e i fallimenti, perché dopotutto ogni tanto “è solo la chimica che ce l'ha con noi”.

A Ester, Mattia, Giacomo, Michele, Edo, Thomas e tutti i ragazzi dello studio del terzo piano da cui ho imparato tanto e con cui mi sono fatta una barca di risate e infinite moke di caffè.

Alle donne del laboratorio, Alice, Marta, Sara, Monica e Rosalia, con cui si riusciva a parlare del modo migliore di impaccare una colonna come delle tecniche per riuscire a farsi i

capelli mossi con la piastra, così, con una bellissima naturalezza. Grazie di tutte le risate, del sostegno, dei momenti folli, della forza che mi avete sempre infuso.

Ad Alessandro, la persona meravigliosa che ho la fortuna di avere al mio fianco, che mi ha fatto rialzare in piedi tante volte e che non mi ha mai fatto mancare il suo sostegno, giorno dopo giorno.

Alla mia mamma e al mio papà, a cui voglio tantissimo bene. A voi devo tutto il meglio di me, si sa.

Ai miei amici di casa, Fra, Elvy, Alice, Anna, Giovanne, Marchi, e il resto della banda. Con loro ho condiviso vacanze, momenti comici, attimi di disperazione, tanti festeggiamenti con una grande comune: l'autenticità.

# **Capitolo 6**

## **Parte Sperimentale**





## 5.1. Strumentazione, reagenti e solventi

Il grado di avanzamento delle reazioni viene verificato attraverso TLC POLYGRAM® SIL G/UV254 di 0.25 mm di spessore e con spettrometria NMR. Le cromatografie flash sono eseguite servendosi di gel di silice MERK 60, 0.04-0.063 mm / 230-400 mesh, seguendo il metodo e la tecnica proposti da Still.<sup>34</sup> Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR sono stati acquisiti a 298 K con un spettrometro NMR Bruker AVANCE 300, operante a 300,15 MHz. E' stato scelto come riferimento esterno il SiMe<sub>4</sub>.

Tutti i reagenti e i solventi commerciali sono impiegati senza ulteriori purificazioni. I solventi definiti "anidri" vengono purificati secondo procedure riportate in letteratura.<sup>35</sup>

Gli spettri UV-Vis sono stati acquisiti con lo spettrometro Lambda 35 della Perkin Elmer, per le rampe di temperatura è stato usato un Peltier Temperature Programmer PTP 6. I campioni sono stati analizzati in soluzione di DMSO o MCH in concentrazione 10<sup>-4</sup> M.

L'analisi SDS-PAGE è stata eseguita con un gel ad una concentrazione di acrilammide al 12% con una macchina Bio Rad mini-PROTEAN (R) Tetra Cell. Le immagini del gel sono state acquisite con un Geliance 600 della Perkin Elmer.

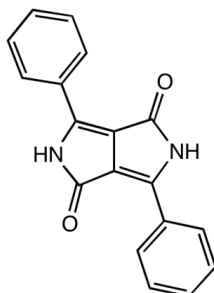
---

<sup>34</sup> Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A., *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.

<sup>35</sup> W. L. F. Armarego, D. D. Perrin, D. R. Perrin, *Vol. 213*, Second Edition ed., Pergamon, Oxford, **1981**.

## 5.2. Procedure sperimentali

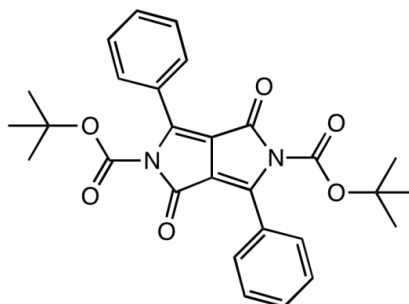
### 3,6-diphenylpyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione (DPP) (1)



In un pallone a tre colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti t-BuOK (43 g, 0.38 mmol) e 2-metil-2-butanolo anidro (225 mL). La soluzione viene portata a 130°C fino ad avere il riflusso di solvente. Si aggiunge quindi benzonitrile (16.4 mL, 0.16 mmol) e dietil succinato (13.3 mL, 0.08 mmol) tramite syringe pump nell'arco di 8 ore e 30 minuti. Si lascia procedere la reazione a riflusso per 10 ore, quindi si porta la temperatura a 60°C. Si aggiungono 200 mL di MeOH mediante imbuto gocciolatore nell'arco di 1h e poi HCl al 37% (20 mL in 180 mL di H<sub>2</sub>O) in 30 minuti. Il prodotto ottenuto viene filtrato su Buchner e lavato con H<sub>2</sub>O bollente, MeOH e infine Et<sub>2</sub>O. Il solvente adsorbito viene rimosso tramite essiccatore in pompa per una notte fornendo **1** come solido rosso intenso. (11.45 g, resa: 52%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400 MHz), δ(ppm): 11.34 (2H, s), 8.52-8.45 (4H, m), 7.63-7.55 (6H, m).

### di-*tert*-butyl 1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-c]pyrrole-2,5(1*H*,4*H*)-dicarboxylate (2)



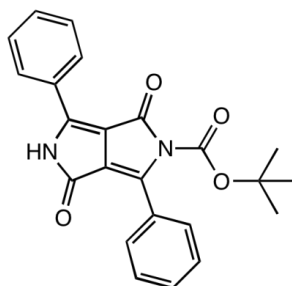
In un pallone a due colli dotato di refrigerante, agitazione magnetica e flusso d'Ar si mettono 3,9 g di **DPP** (13,6 mmol), 166 mg di DMAP (1,36 mmol) e 335 mL di THF anidro. Si lascia agitare la miscela di reazione a temperatura ambiente per 30 minuti, dopodiché si aggiungono 15,6 mL di di-*tert*-butildicarbonato (68 mmol) e si lascia andare la reazione a 35°C per 48 ore. La miscela di reazione viene filtrata su cotone e il solvente viene allontanato a pressione ridotta a 45°C per circa 4 ore insieme all'eccesso di di-*tert*-butildicarbonato. Si ottiene **2** come solido giallo (6.57 g, resa: 98%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ(ppm): 7.75-7.73 (4H, m), 7.50-7.46 (6H, m), 1.40 (18H, s).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz), δ(ppm): 159.55, 148.18, 146.44, 131.68, 128.60, 128.51, 128.43, 112.34, 85.36, 27.63.

*tert*-butyl 1,4-dioxo-3,6-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2(1*H*)-carboxylate

(3)

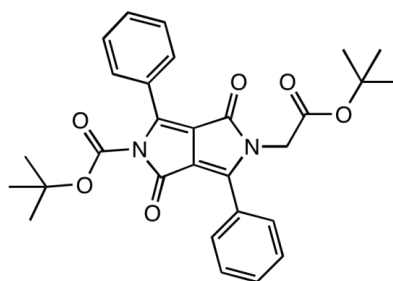


In un pallone a un collo si pesano 3 g di **2** (2 mmol), si aggiungono 36,9 g di silice 63-200 µm (200 mmol) e si discioglie nel minimo volume di DCM. Si allontana il solvente a pressione ridotta e si lascia essiccare ulteriormente il solido sotto vuoto per 24 ore. Il prodotto viene purificato su colonna cromatografica in eluizione isocratica DCM:AcOEt 9:1. Si ottiene **3** come solido rosso (1.33 g, resa: 56%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ(ppm): 8.38 (1H, s), 8.23-8.21 (2H, m), 7.80-7.77 (2H, m), 7.57-7.54 (3H, m), 7.52-7.49 (3H, m), 1.43 (9H, s).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz), δ(ppm): 163.83, 159.70, 148.65, 146.38, 144.89, 132.82, 131.37, 129.39, 128.88, 128.64, 128.44, 127.25, 115.16, 108.09, 85.12, 27.68.

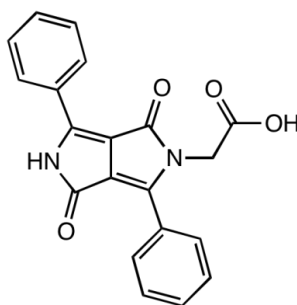
***tert*-butyl 5-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4-dioxo-3,6-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2(1*H*)-carboxylate (4)**



In un pallone a due colli anidrificato e dotato di agitazione magnetica si mettono 0,688 mg di NaH (dispersione al 60% in olio minerale, 6,7 mmol), che viene ulteriormente anidrificato e lavato con pentano in flusso d'Ar al fine di rimuovere la dispersione oleosa. Si aggiungono poi 1,3 g di **3** (3,3 mmol) e 100 mL di THF anidro e si lascia procedere la reazione a temperatura ambiente. Dopo 6 ore si aggiungono 980 µL di *tert*-butil bromoacetato (6,7 mmol) e si lascia decorrere la reazione per una notte. In seguito il solvente viene evaporato dalla miscela e il prodotto viene estratto con AcOEt/H<sub>2</sub>O. La fase organica viene anidrificata con MgSO<sub>4</sub> e filtrata, infine il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Si ottiene **4** come solido rosso (990 mg, resa: 60%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ(ppm): 7.79-7.77 (2H, m), 7.74-7.71 (2H, m), 7.55-7.51 (3H, m), 7.49-7.46 (3H, m), 4.41 (2H, s), 1.40 (9H, s), 1.37 (9H, s).

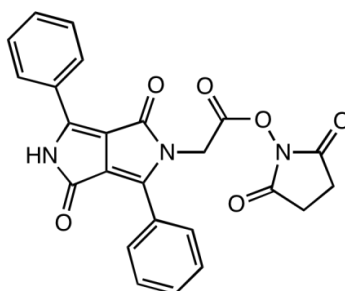
**1,4-dioxo-3,6-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2(1*H*)-carboxylic acid (5)**



In un pallone a un collo dotato di agitazione magnetica si mettono 920 mg di **4** (1,83 mmol), si discioglie il solido con 350 mL di DCM e si aggiungono 10,3 mL di TFA (0,27 mmol). Si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per una notte. Il solvente viene evaporato a pressione ridotta dalla miscela di reazione che viene successivamente lavata per tre volte con DCM e tre volte con Et<sub>2</sub>O. Si ottiene **5** come solido rosso (630 mg, resa 99%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400 MHz), δ(ppm): 11.39 (1H, s, OH), 8.49-8.45 (2H, m), 7.79-7.78 (2H, m), 7.62-7.61 (3H, m), 7.59-7.58 (3H, m), 4.50 (2H, s).

**2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(1,4-dioxo-3,6-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2(1*H*)-yl)acetate (6)**

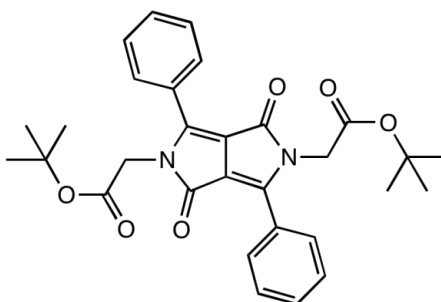


In un pallone a due colli anidrificato e dotato di agitazione magnetica si mettono 174 mg di **5** (0,5 mmol), 94 mg di N-idrossisuccinimide (0,6 mmol) e 70 mg di EDAC (0,6 mmol) e 19,4 mL di DMF anidra. Si lascia procedere la reazione a temperatura ambiente per 4 ore e 30 minuti. Dopodiché si aggiungono 15,5 mg di EDAC (0,1 mmol) e si lascia andare la reazione

per una notte. Il prodotto viene fatto precipitare dalla miscela di reazione con ghiaccio, filtrato su buchner e ripreso con DCM. Si evapora infine il solvente a pressione ridotta ottenendo **6** come solido rosso. (151 mg, resa: 69%).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 8.49-8.46 (2H, m), 7.81-7.78 (2H, m), 7.64-7.62 (3H, m), 7.62-7.60 (3H, m), 5.00 (2H, s), 2.82 (4H, s).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 100MHz),  $\delta$ (ppm): 169.7, 165.4, 162.5, 160.8, 147.4, 132.7, 131.4, 129.1, 129.0, 128.4, 128.0, 127.2, 126.9, 107.2, 41.4, 25.4.

di-*tert*-butyl 2,2'-(1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2,5(1*H*,4*H*)-diyl)diacetate (**7**)

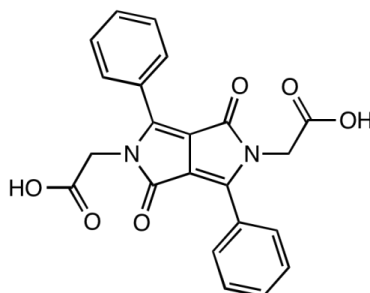


In un pallone a tre colli anidrificato e dotato di refrigerante a bolle e agitazione magnetica si aggiungono 831 mg di NaH (dispersione al 60% in olio minerale, 20,8 mmol), si anidrifca il solido e lo si lava con pentano in flusso d'Ar al fine di rimuovere la dispersione oleosa. Successivamente si aggiungono 1,5 g di DPP (5,2 mmol) e 150 mL di THF anidro. Si lascia agitare e refluare la miscela di reazione a 60°C. Dopo 1 ora si aggiungono 3,07 mL di *tert*butil bromoacetato (20,8 mmol) e si fa procedere la reazione a 40°C per una notte. La dispersione del pigmento si scioglie progressivamente in una soluzione giallo-arancio, sintomo della formazione del prodotto. La miscela di reazione viene essiccata a pressione ridotta ed estratta con DCM/H<sub>2</sub>O. La fase organica viene anidrificata con MgSO<sub>4</sub> e filtrata su

cotone e il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Si ottiene **7** come solido giallo (2.66 g, resa 99%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ(ppm): 7.78-7.76 (4H, m), 7.51-7.49 (6H, m), 4.42 (4H, s), 1.37 (18H, s). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz), δ(ppm): 167.5, 162.3, 148.3, 131.4, 128.9, 128.6, 127.8, 109.6, 82.4, 44.2, 27.9.

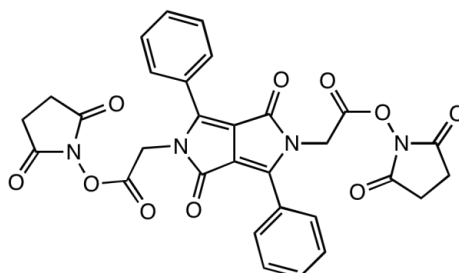
**2,2'-(1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2,5(1*H*,4*H*)-diyl)diacetic acid (**8**)**



In un pallone a un collo dotato di agitazione magnetica si mettono 800 mg di **7** (1,55 mmol) e 400 mL di DCM. Si aggiungono 18 mL di TFA (0,23 mmol) e si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per una notte. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si lava il prodotto per 3 volte con DCM e 3 volte con Et<sub>2</sub>O. Si ottiene **8** come solido giallo (620 mg, resa: 99%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ(ppm): 7.82-7.79 (4H, m), 7.62-7.60 (6H, m), 4.45 (4H, s). **<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 100MHz), δ(ppm): 169.8, 161.5, 147.6, 131.5, 129.0, 128.5, 127.3, 108.1, 82.4, 43.1, 27.4.

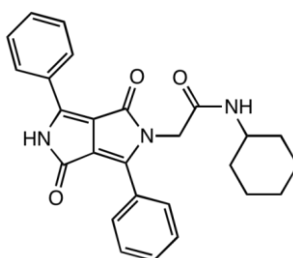
bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 2,2'-(1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-  
2,5(1*H*,4*H*-diyl)diacetate (9)



In un pallone a due colli anidrificato e dotato di agitazione magnetica si pesano 250 mg di **8** (0,62 mmol), 230 mg di EDAC (1,48 mmol), 170,3 mg di N-idrossisuccinimide (1,48 mmol) e 22 mL di DMF anidra. Si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per 4 ore e 30 minuti, poi si aggiungono 39 mg di EDAC (0,25 mmol). La reazione viene fatta procedere per una notte. Infine il prodotto viene precipitato con ghiaccio, filtrato su buchner, ridisciolto in DCM e essiccato a pressione ridotta. Si ottiene **9** come solido arancione (326 mg, resa: 88%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 7.83-7.78 (4H, m), 7.65-7.61 (6H, m), 4.99 (4H, s), 2.81 (8H, s). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO, 100MHz),  $\delta$ (ppm): 169.7, 165.2, 160.9, 147.7, 132.0, 129.2, 128.6, 126.4, 108.5, 41.3, 25.4, 25.2.

*N*-cyclohexyl-2-(1,4-dioxo-3,6-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2(1*H*)-  
yl)acetamide (10)

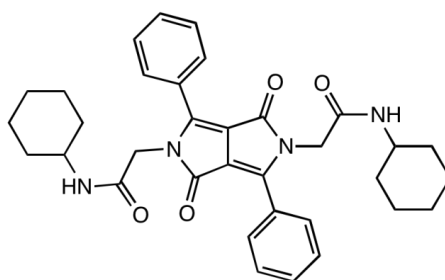




In un pallone a due colli anidrificato dotato di agitazione magnetica e imbuto gocciolatore si aggiunge 1 mL di DMF anidra, 26  $\mu$ L di cicloesilammina (0,22 mmol) e 40  $\mu$ L di DIEA (0,22 mmol). In un secondo pallone si anidrificano 50 mg di **8** (0,11 mmol) e si disciolgono con 6 mL di DMF anidra, la soluzione viene poi prelevata con una siringa e gocciolata sulla miscela di reazione. Dopo l'aggiunta la reazione viene lasciata decorrere per una notte a temperatura ambiente. Si allontana la DMF dall'ambiente di reazione in alto vuoto e per centrifugazione si precipita il prodotto da una soluzione MeOH/HCl 0,1 M 8:2. Il solido rosso **10** che si ottiene viene ripreso con DCM ed essiccato a pressione ridotta (39 mg, resa: 83%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 11.29 (1H, s), 8.47-8.46 (2H, m), 8.06-8.03 (1H, d), 7.79 (2H, m), 7.61-7.54 (6H, m), 4.32 (2H, s), 1.62 (2H, m), 1.24-1.12 (4H, m). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  166.4, 162.8, 161.8, 146.6, 146.2, 132.6, 131.3, 129.5, 129.1, 128.9, 128.2, 111.1, 108.6, 48.2, 44.7, 32.5, 25.5, 24.8. **ESI-MS** (m/z) 428.2 (M).

**2,2'-(1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2,5(1*H*,4*H*)-diyl)bis(*N*-cyclohexylacetamide) (11)**

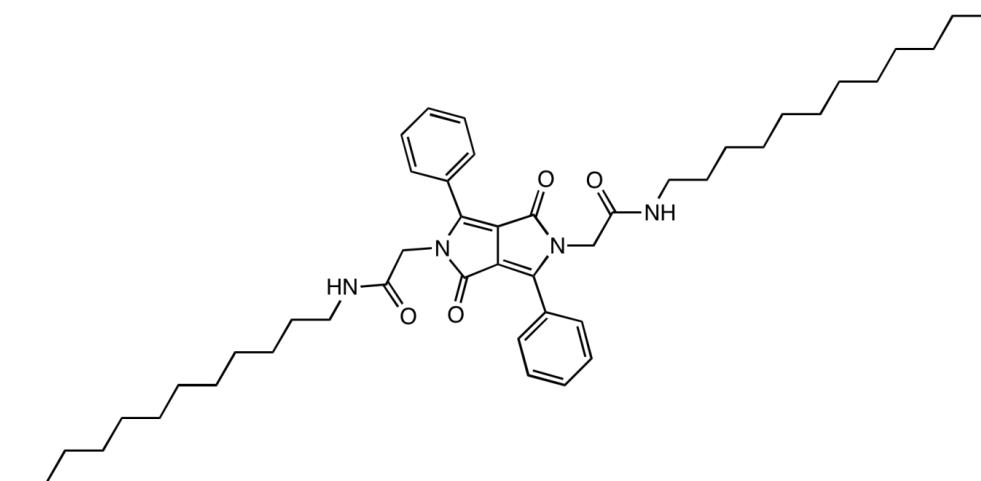


In un pallone a due colli anidrificato dotato di agitazione magnetica e imbuto gocciolatore si aggiunge 1 mL di DMF anidra, 38  $\mu$ L di cicloesilammina (0,33 mmol) e 56,5  $\mu$ L di **DIEA** (0,33 mmol). In un secondo pallone si anidrificano 50 mg di **9** (0,083 mmol) e disciolti con 6 mL di DMF anidra, la soluzione viene poi prelevata con una siringa, trasferita nell'imbuto e gocciolata sulla miscela di reazione. Dopo l'aggiunta la reazione viene lasciata decorrere per

una notte a temperatura ambiente. Si allontana la DMF dall'ambiente di reazione in alto vuoto e per centrifugazione si precipita il prodotto da una soluzione MeOH/HCl 0,1 M 8:2. Il solido giallo **11** che si ottiene viene ripreso con DCM ed essiccato a pressione ridotta (22 mg, resa: 47%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 8.05-8.02 (2H, d), 7.81-7.78 (4H, m), 7.58-7.55 (6H, m), 4.28 (4H, s), 1.64-1.61 (2H, m), 1.50 (2H, m), 1.28-1.07 (2H, m). **ESI-MS** (m/z) 567.2.

**2,2'-(1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2,5(1*H*,4*H*)-diyl)bis(*N*-dodecylacetamide) (12)**

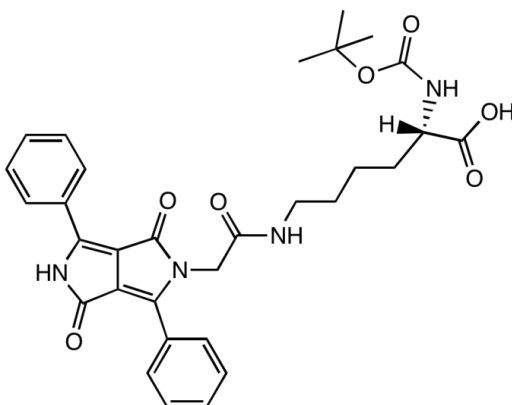


In un pallone a due colli anidrificato dotato di agitazione magnetica e imbuto gocciolatore si aggiungono 3 mL di DMF anidra, 185  $\mu$ L di dodecilammina (0,8 mmol) e 137  $\mu$ L di DIEA (0,8 mmol). In un secondo pallone si anidrificano 120 mg di **9** (0,2 mmol) e si aggiungono 17 mL di DMF anidra. La soluzione viene prelevata con una siringa, trasferita nell'imbuto e gocciolata sulla miscela di reazione che viene poi fatta procedere per una notte a temperatura ambiente. Si allontana la DMF dall'ambiente di reazione e si estrae il prodotto con DCM/HCl 0,1 M. La fase organica viene lavata con H<sub>2</sub>O, anidrificata su MgSO<sub>4</sub> e filtrata.

Si evapora il solvente a pressione ridotta ottenendo **12** come solido giallo (139 mg, resa: 93%).

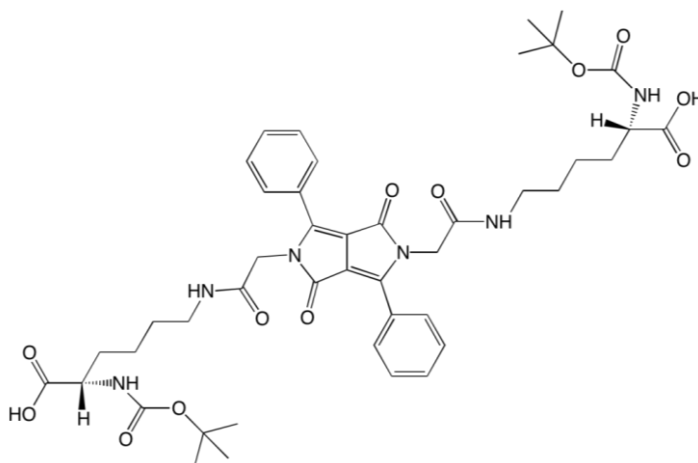
**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 8.08-7.99 (4H, m), 7.58-7.56 (6H, m), 6.50 (2H, t), 4.34 (4H, s), 3.29-3.27 (4H, q), 1.51 (4H, m), 1.27 (10H, m), 0.90 (6H, t). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  167.6, 163.1, 149.4, 132.1, 129.4, 129.2, 127.1, 97.9, 46.8, 39.8, 29.6-29.5 (8C), 29.3, 22.7, 14.0.

**(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6-(2-(1,4-dioxo-3,6-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2(1*H*)-yl)acetamido)hexanoic acid (**13**)**



In un pallone a due colli anidrificato dotato di agitazione magnetica e imbuto gocciolatore si aggiungono 54,2 mg di lisina *N*-Boc (0,22 mmol), 1 mL di DMF anidra e 33  $\mu$ L di DIEA (0,22 mmol). In un secondo pallone si anidrificano 50 mg di **8** (0,11 mmol) e si aggiungono 6 mL di DMF anidra. La soluzione viene prelevata con una siringa, trasferita nell'imbuto e gocciolata sulla miscela di reazione che viene poi fatta procedere per una notte a temperatura ambiente. Si allontana la DMF dall'ambiente di reazione in alto vuoto. **ESI-MS** *m/z* 573.

(2*S*,2'*S*)-6,6'-((2,2'-(1,4-dioxo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-*c*]pyrrole-2,5(1*H*,4*H*)-diyl)bis(acetyl))bis(azanediy))bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexanoic acid) (14)

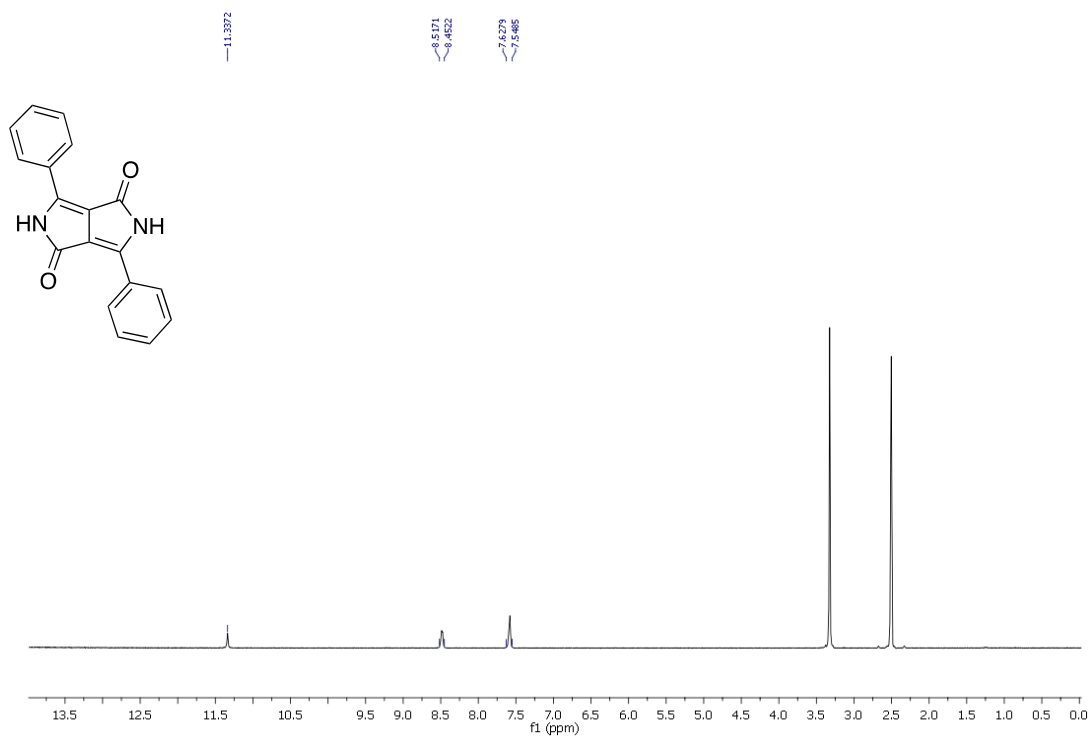


In un pallone a due colli anidrificato dotato di agitazione magnetica e imbuto gocciolatore si aggiungono 81,3 mg di lisina *N*-Boc (0,33 mmol), 1 mL di DMF anidra e 39  $\mu$ L di DIEA (0,33 mmol). In un secondo pallone si anidrificano 50 mg di **9** (0,083 mmol) e si aggiungono 6 mL di DMF anidra. La soluzione viene prelevata con una siringa, trasferita nell'imbuto e gocciolata sulla miscela di reazione che viene poi fatta procedere per una notte a temperatura ambiente. Si allontana la DMF dall'ambiente di reazione in alto vuoto.

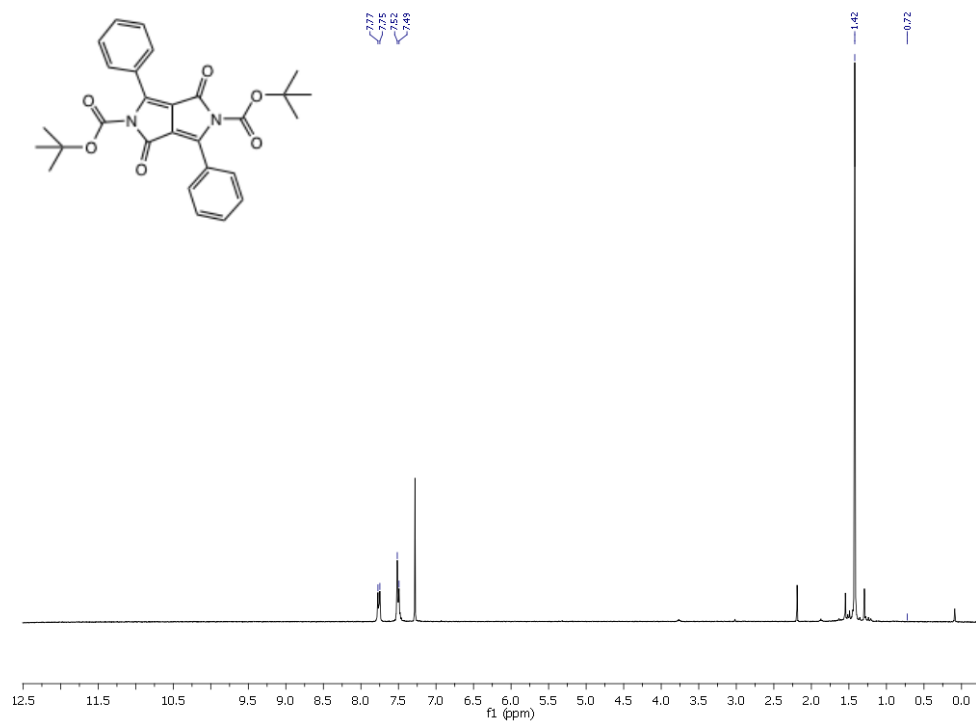
**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 8.21 (2H, t), 7.81-7.80 (4H, m), 7.58-7.57 (6H, m), 6.50-6.49 (??, d), 6.23-6.21 (??, d), 4.28 (4H, s), 3.67-3.65 (4H, q). **ESI-MS** m/z 883.3 (M+Na).

### 5.3. Spettri principali

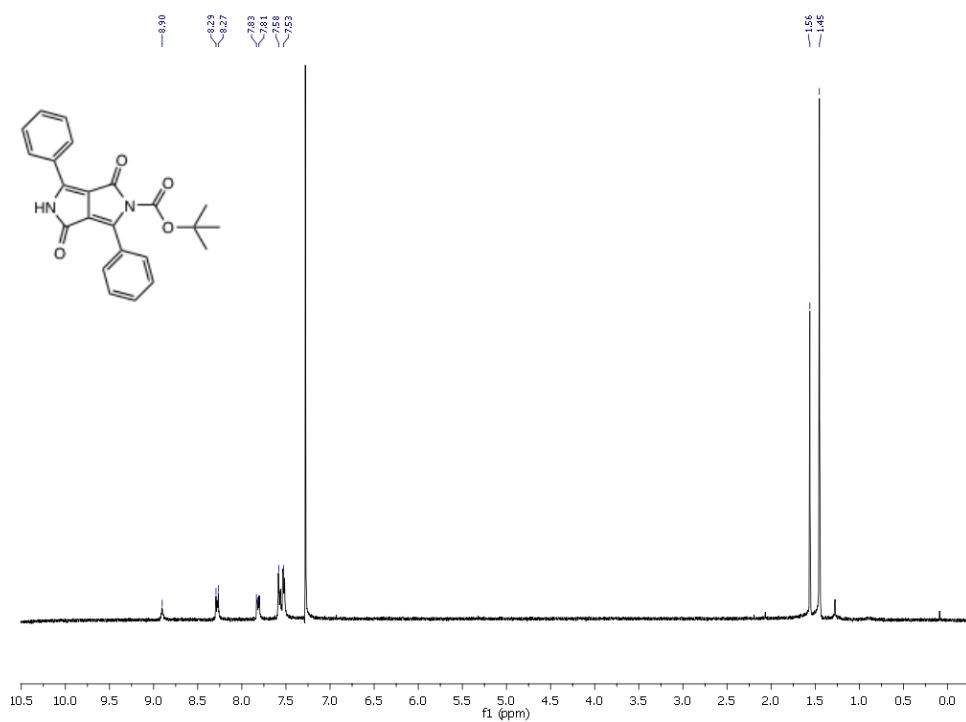
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400 MHz),  $\delta$ (ppm): 11.34 (2H, s), 8.52-8.45 (6H, m), 7.63-7.55 (6H, m).



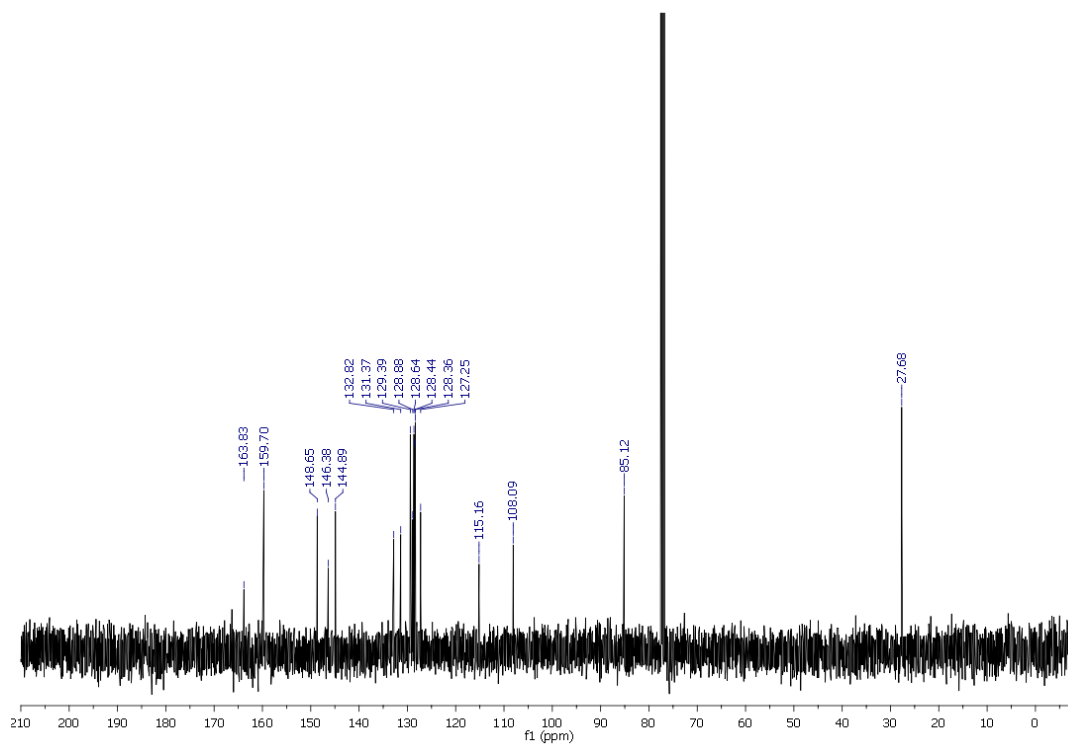
2.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$ (ppm): 7.75-7.73 (4H, m), 7.50-7.46 (6H, m), 1.40 (18H, s).



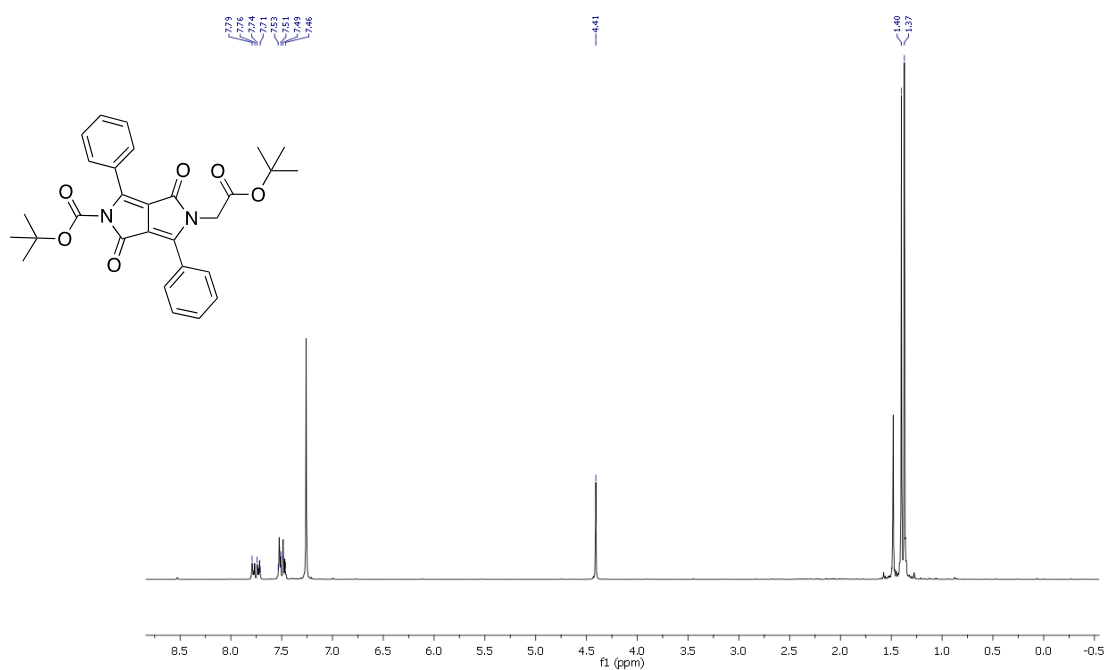
3. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ(ppm): 8.38 (1H, s), 8.23-8.21 (2H, m), 7.80-7.77 (2H, m), 7.57-7.54 (3H, m), 7.52-7.49 (3H, m), 1.43 (9H, s).



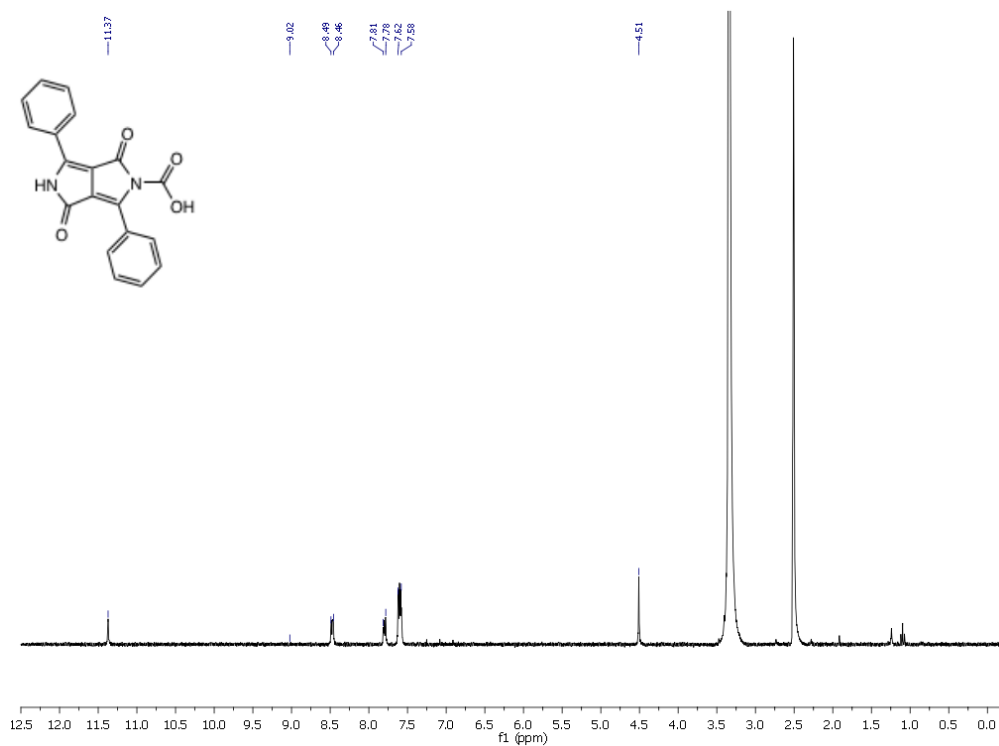
3. <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz), δ(ppm): 163.83, 159.70, 148.65, 146.38, 144.89, 132.82, 131.37, 129.39, 128.88, 128.64, 128.44, 127.25, 115.16, 108.09, 85.12, 27.68.



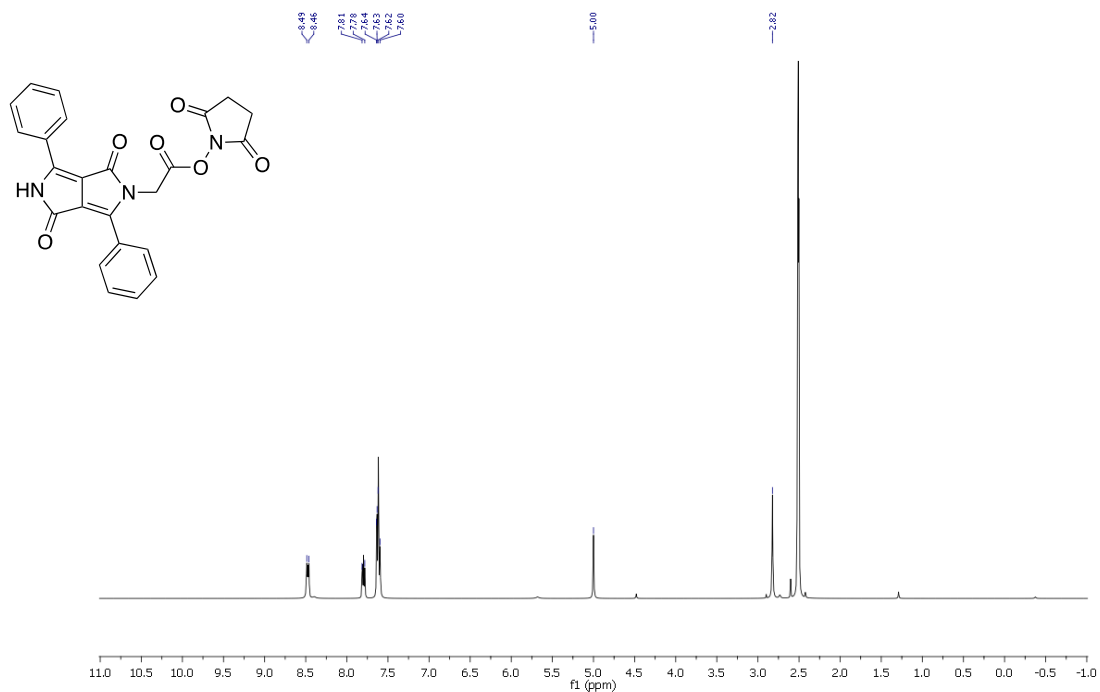
4.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$ (ppm): 7.79-7.77 (2H, m), 7.74-7.71 (2H, m), 7.55-7.51 (3H, m), 7.49-7.46 (3H, m), 4.41 (2H, s), 1.40 (9H, s), 1.37 (9H, s).



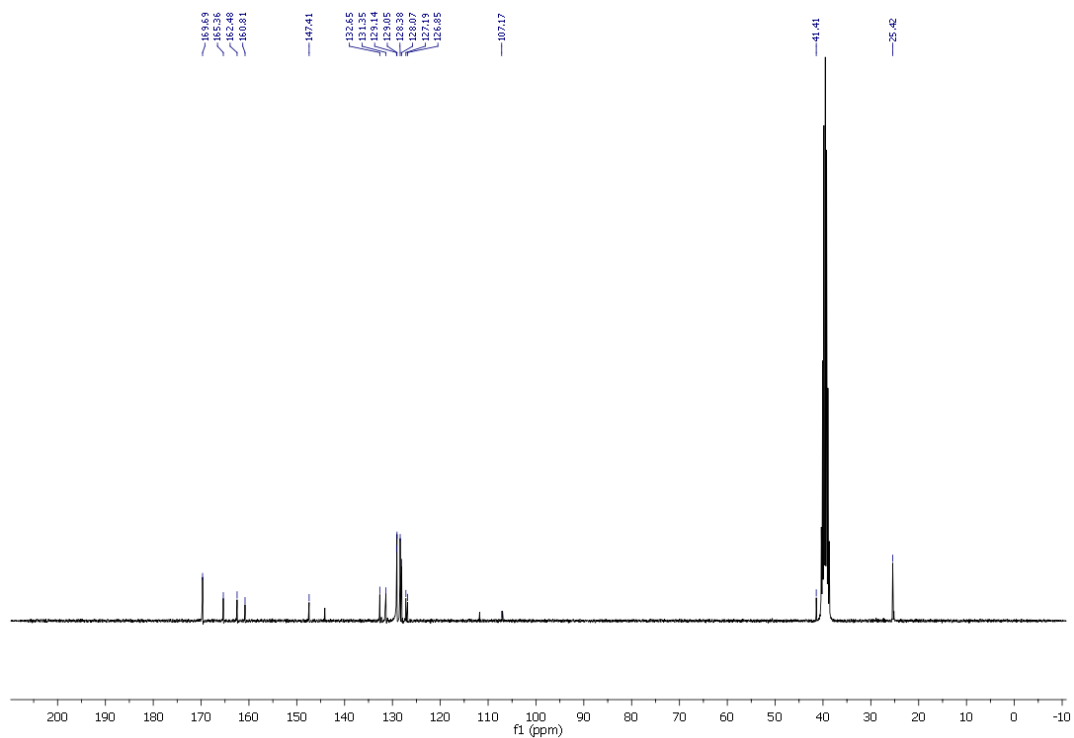
5.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}$ , 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 11.39 (1H, s, OH), 8.49-8.45 (2H, m), 7.79-7.78 (2H, m), 7.62-7.61 (3H, m), 7.59-7.58 (3H, m), 4.50 (2H, s).



**6.** <sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz), δ(ppm): 8.49-8.46 (2H, m), 7.81-7.78 (2H, m), 7.64-7.62 (3H, m), 7.62-7.60 (3H, m), 5.00 (2H, s), 2.82 (4H, s).

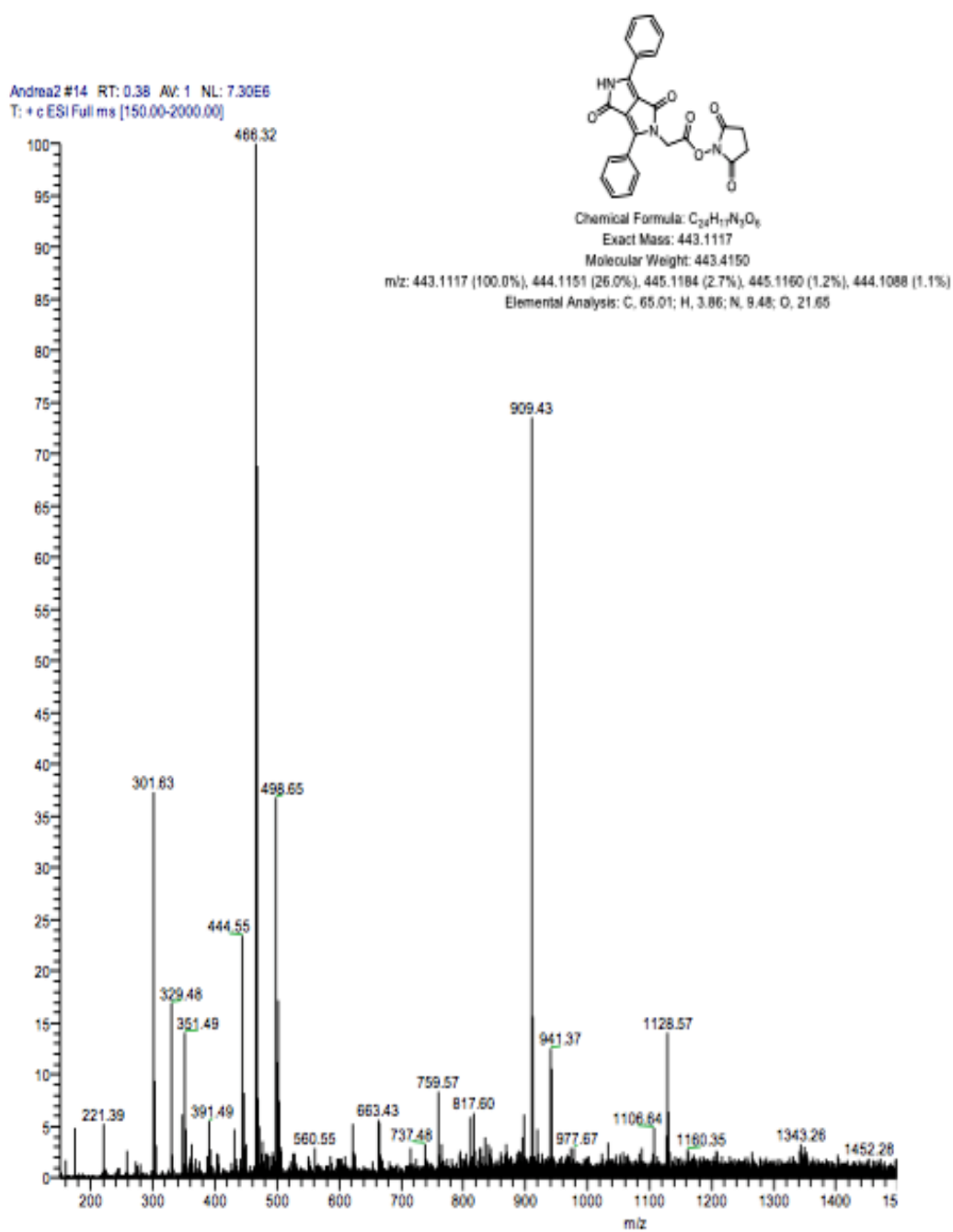


**6.** <sup>13</sup>C-NMR (DMSO, 100MHz), δ(ppm): 169.7, 165.4, 162.5, 160.8, 147.4, 132.7, 131.4, 129.1, 129.0, 128.4, 128.0, 127.2, 126.9, 107.2, 41.4, 25.4.

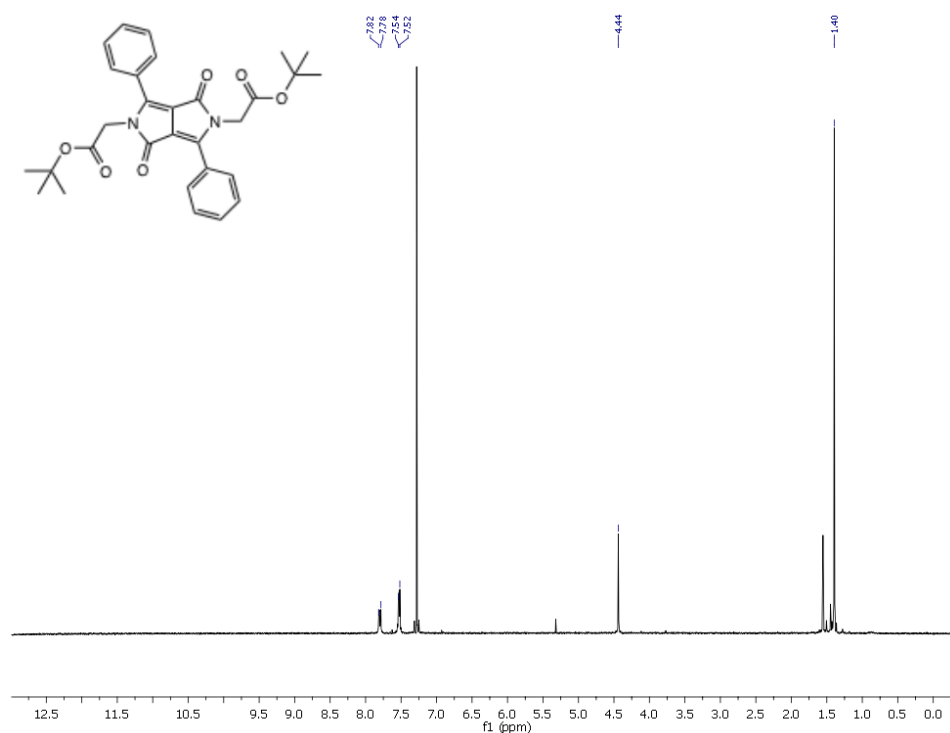




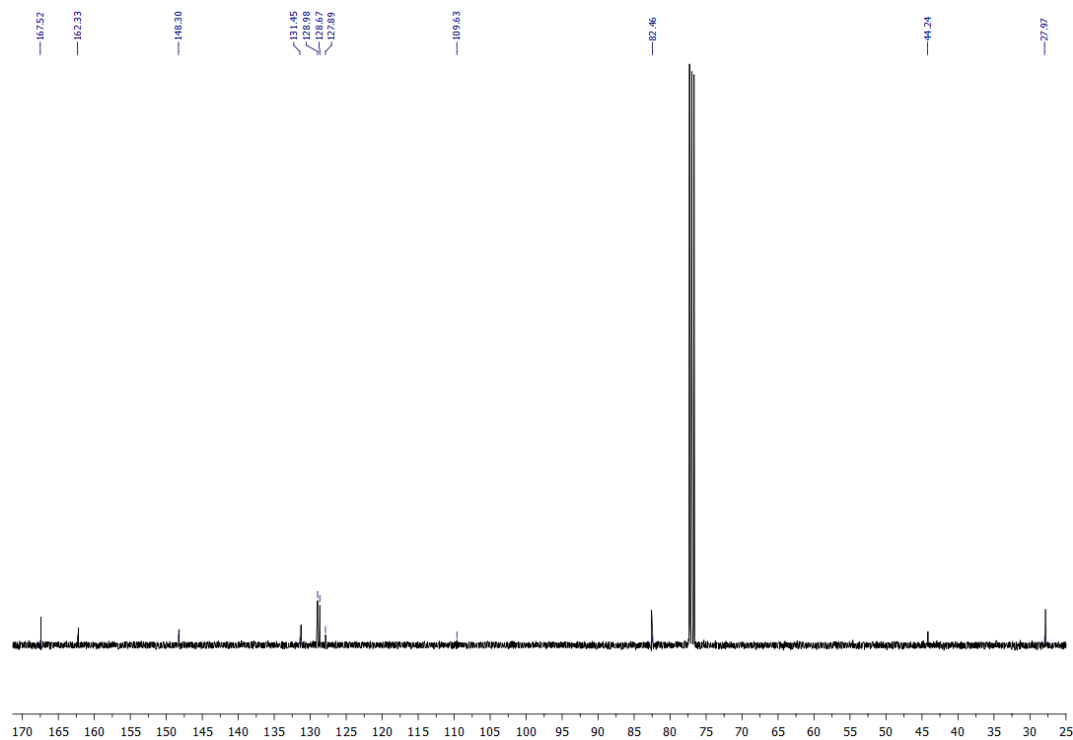
## 6. ESI-MS



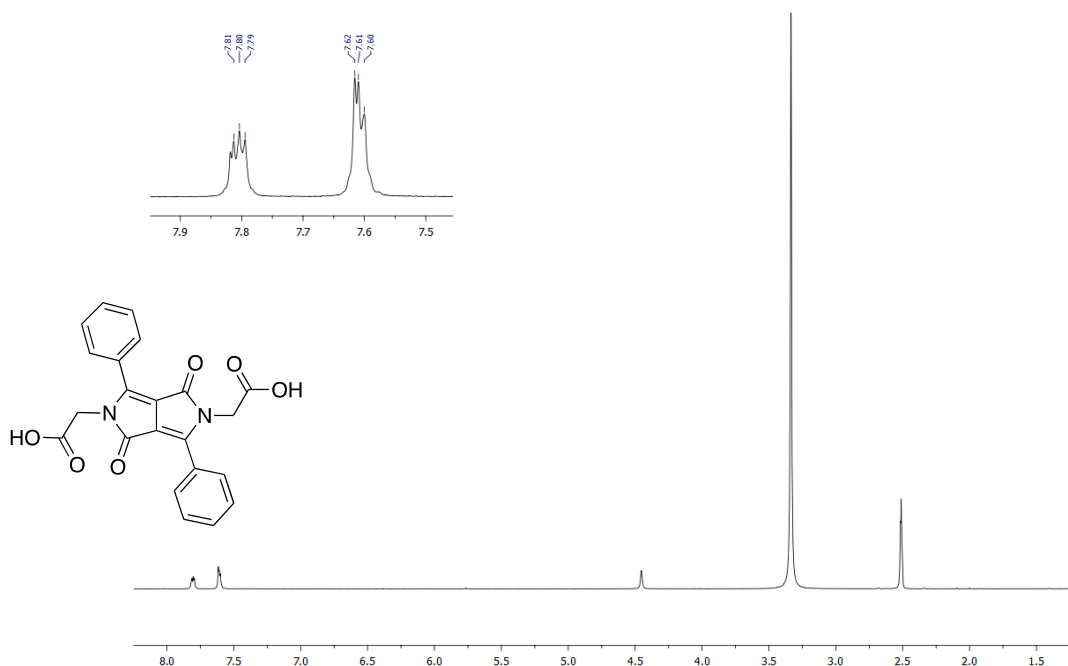
7  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 7.78-7.76 (4H, m), 7.51-7.49 (6H, m), 4.42 (4H, s), 1.37 (18H, s).



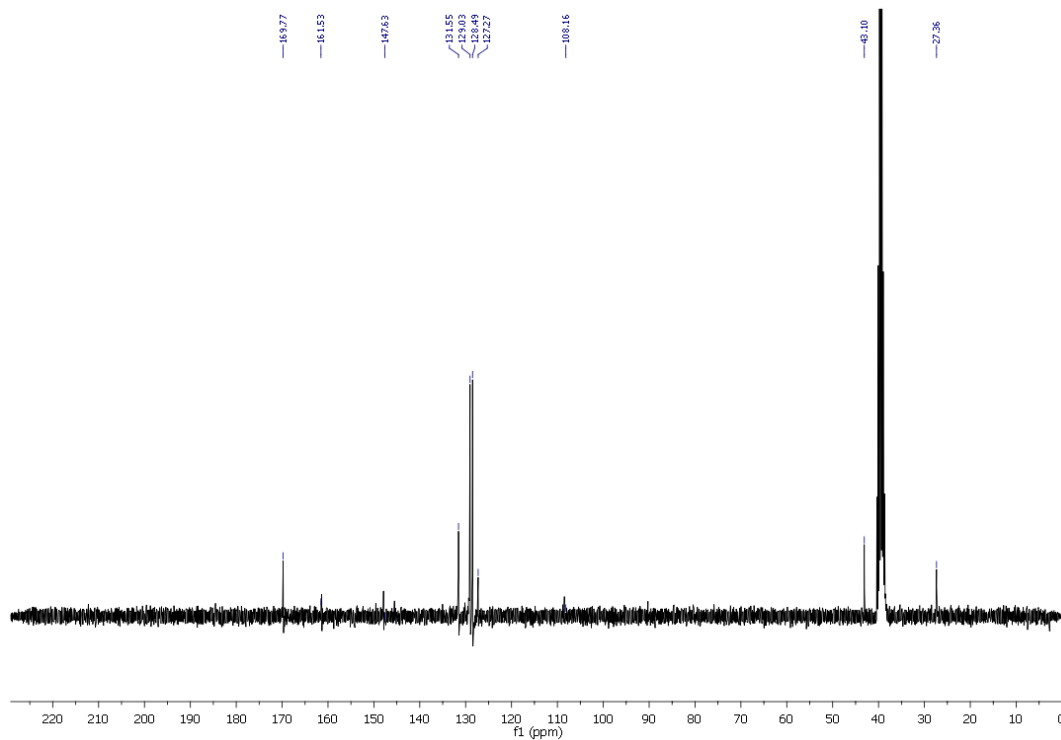
7.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz),  $\delta$ (ppm): 167.5, 162.3, 148.3, 131.4, 128.9, 128.6, 127.8, 109.6, 82.4, 44.2, 27.9.



8.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400 MHz),  $\delta(\text{ppm})$ : 7.82-7.79 (4H, m), 7.62-7.60 (6H, m), 4.45 (4H, s).

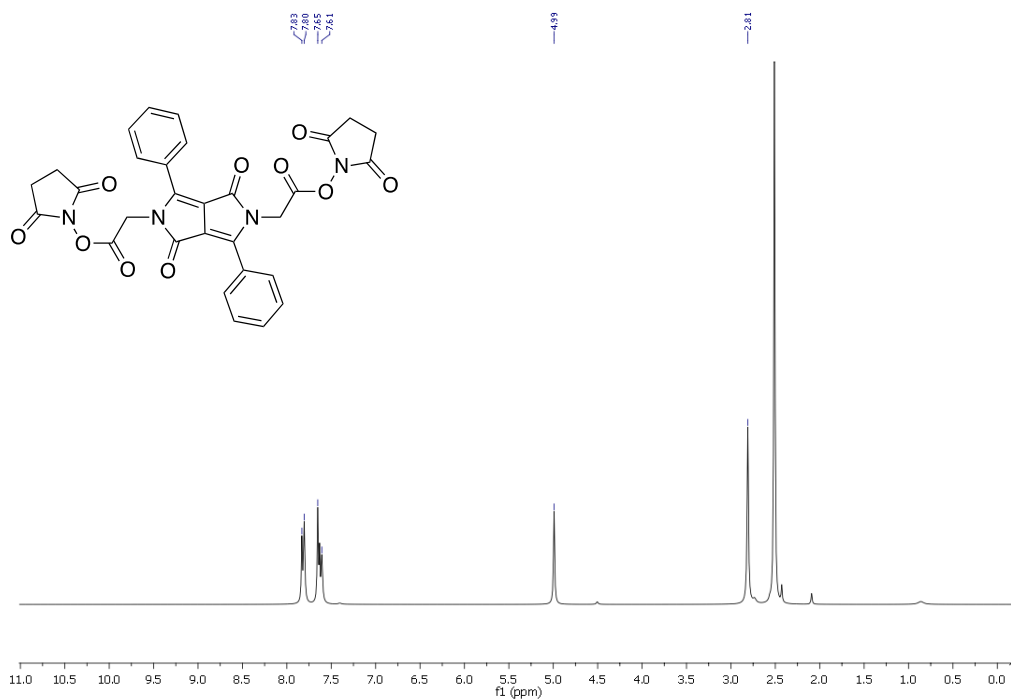


8.  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 100MHz),  $\delta(\text{ppm})$ : 169.8, 161.5, 147.6, 131.5, 129.0, 128.5, 127.3, 108.1, 82.4, 43.1, 27.4.



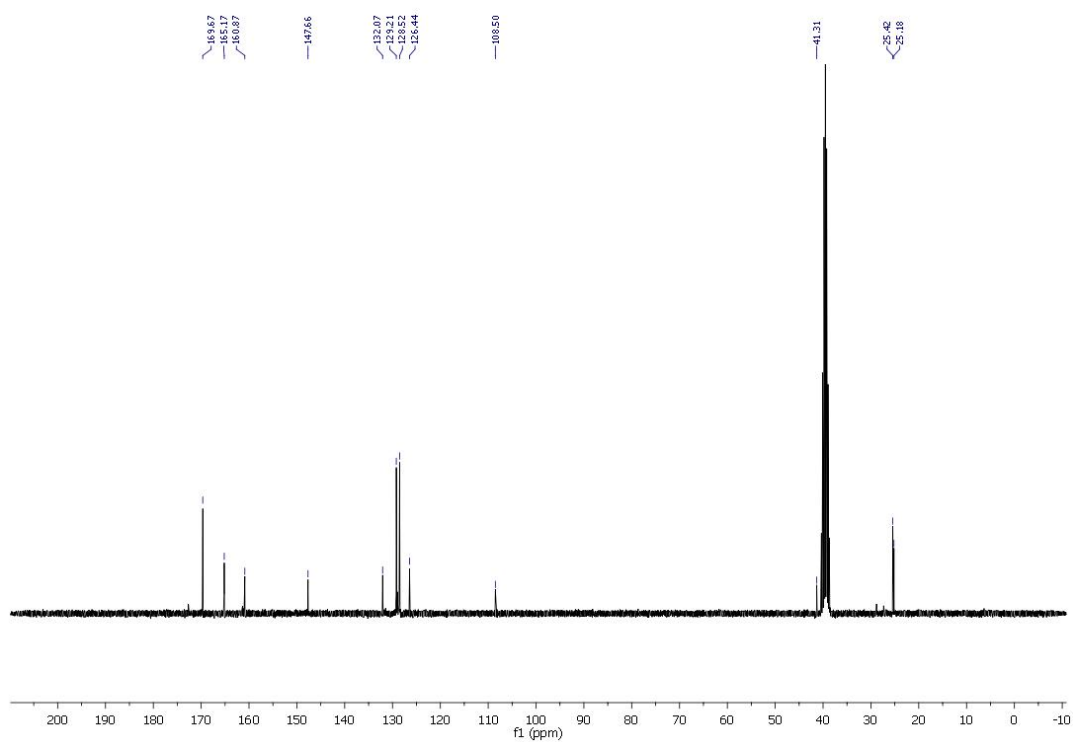
9. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz), δ(ppm): 7.83-7.78 (4H, m), 7.65-7.61 (6H, m), 4.99 (4H, s), 2.81

(8H, m).



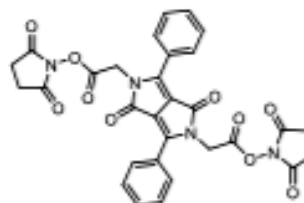
9. <sup>13</sup>C-NMR (DMSO, 100MHz), δ(ppm): 169.7, 165.2, 160.9, 147.7, 132.0, 129.2, 128.6, 126.4,

108.5, 41.3, 25.4, 25.2.

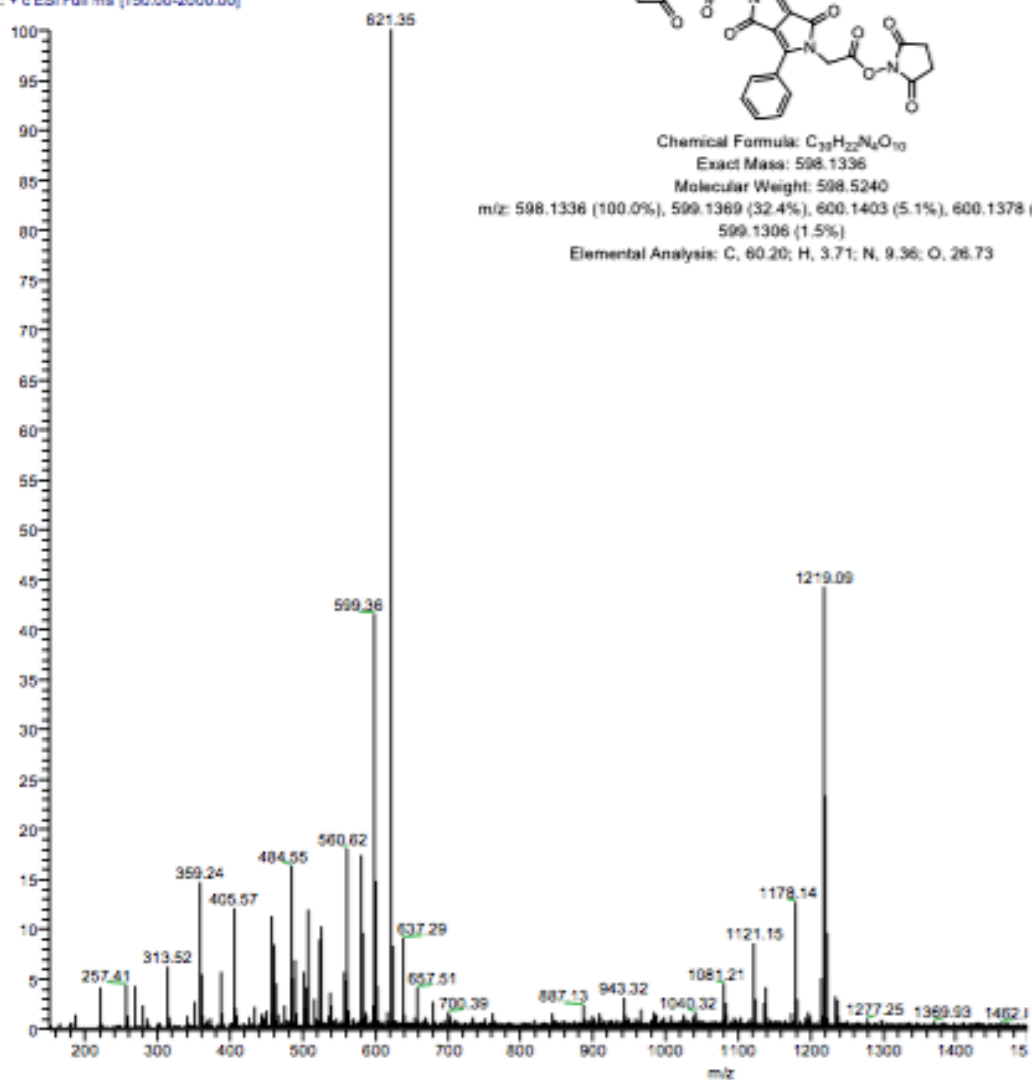


## 9. ESI-MS

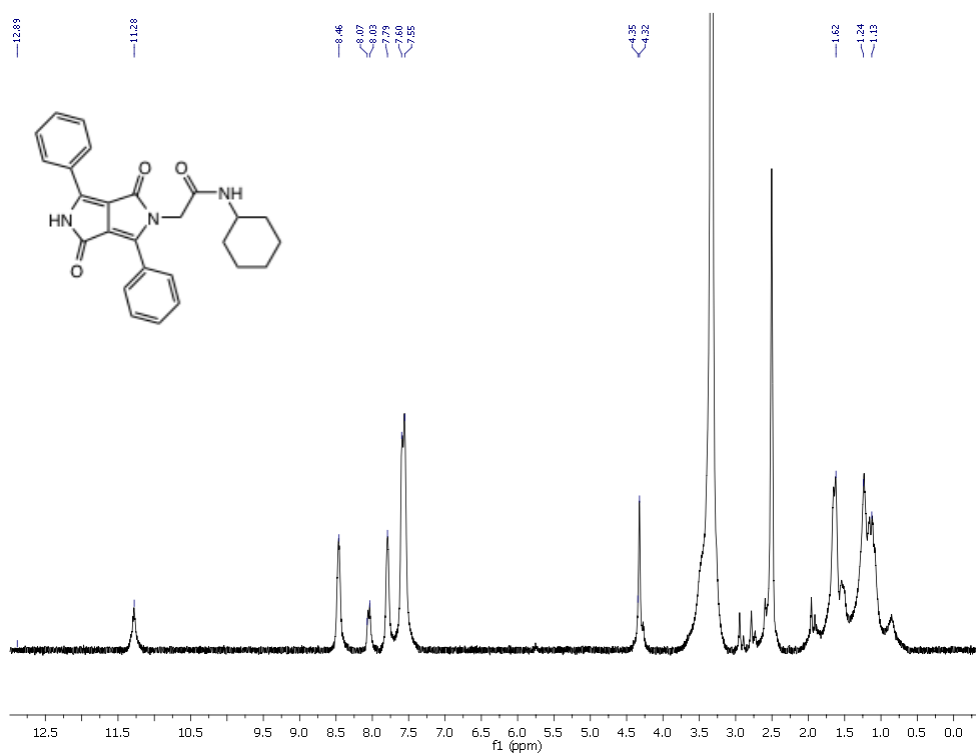
Andrea1 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 4.30E7  
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



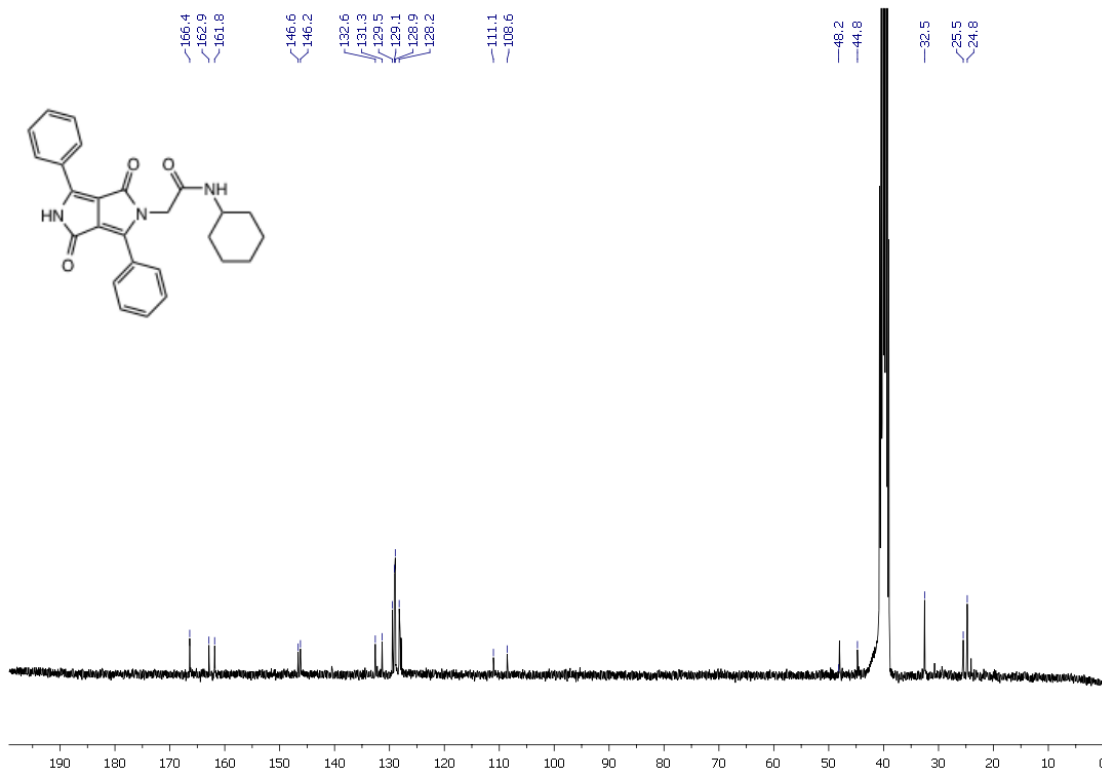
Chemical Formula:  $C_{33}H_{22}N_4O_{10}$   
Exact Mass: 598.1336  
Molecular Weight: 598.5240  
m/z: 598.1336 (100.0%), 599.1369 (32.4%), 600.1403 (5.1%), 600.1378 (2.1%),  
599.1306 (1.5%)  
Elemental Analysis: C, 60.20; H, 3.71; N, 9.36; O, 26.73



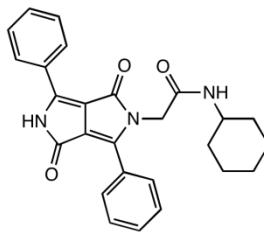
10. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz), δ(ppm): 11.29 (1H, s), 8.47-8.46 (2H, m), 8.06-8.03 (1H, d), 7.79 (2H, m), 7.61-7.54 (6H, m), 4.32 (2H, s), 1.62 (2H, m), 1.24-1.12 (4H, m).



10. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.4, 162.8, 161.8, 146.6, 146.2, 132.6, 131.3, 129.5, 129.1, 128.9, 128.2, 111.1, 108.6, 48.2, 44.7, 32.5, 25.5, 24.8.



## 10. ESI-MS

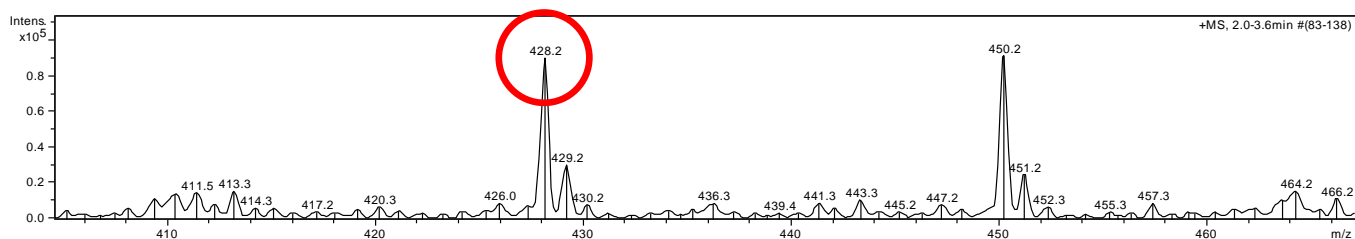


Chemical Formula:  $C_{26}H_{25}N_3O_3$

Exact Mass: 427,19

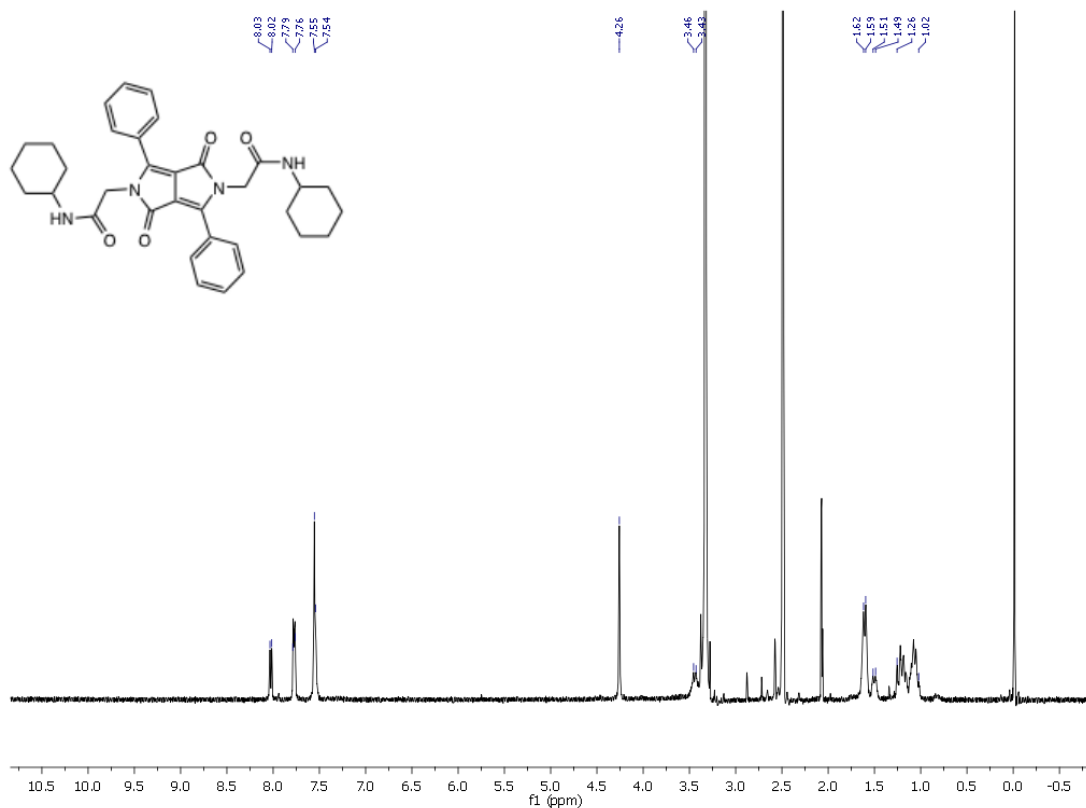
Molecular Weight: 427,50

m/z: 428.2 (M), 429.2 (M+1), 430.2 (M+2), 450.2 (M+Na)

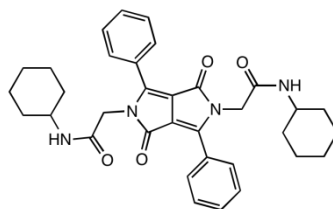


11.  $^1H$ -NMR (DMSO, 300 MHz),  $\delta$ (ppm): 8.03-8.02 (2H, d), 7.79-7.76 (4H, m), 7.55-7.54 (6H, m),

4.26 (4H, s), 3.46-3.43 (2H, m), 1.62-1.59 (2H, m), 1.51-1.49 (2H, m), 1.26-1.02 (2H, m).



## 11. ESI-MS

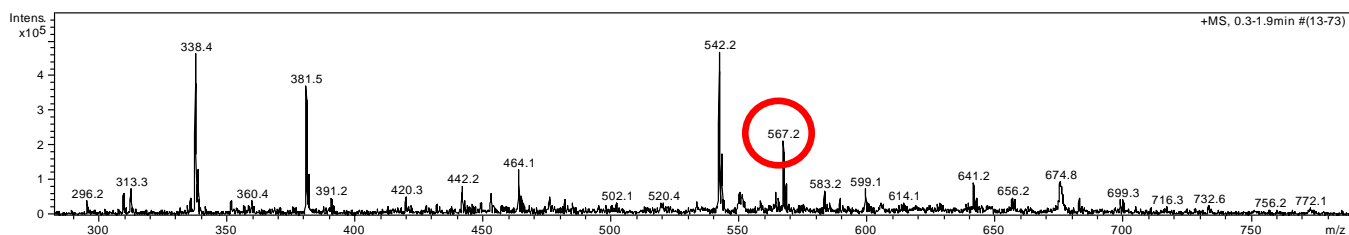


Chemical Formula: C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

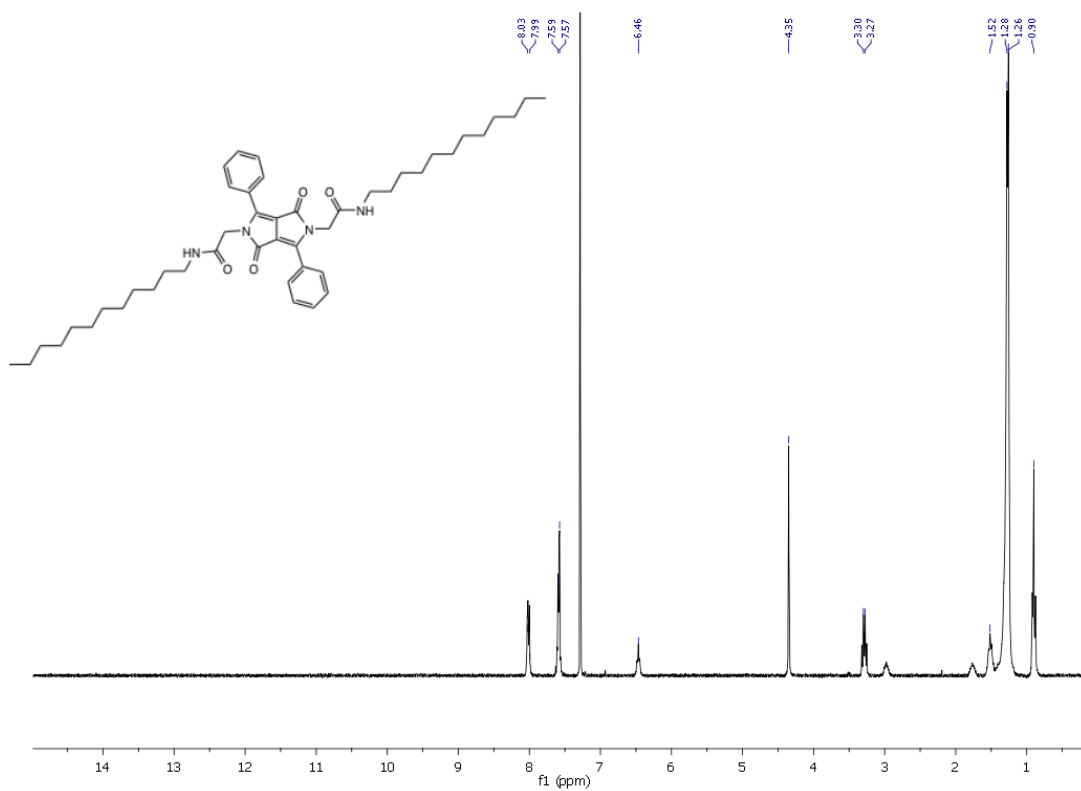
Exact Mass: 566,29

Molecular Weight: 566,69

m/z: 567.2 (M)



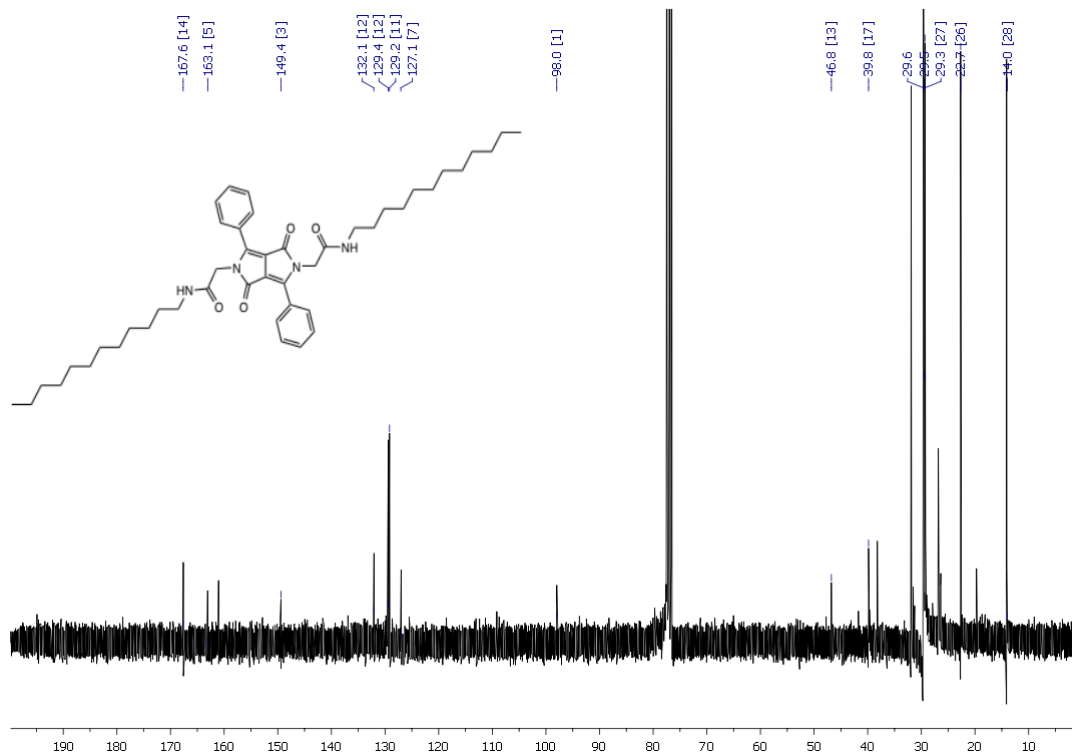
**12. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz), δ(ppm):** 8.08-7.99 (4H, m), 7.58-7.56 (6H, m), 6.50 (2H, t), 4.34 (4H, s), 3.29-3.27 (4H, q), 1.51 (4H, m), 1.27 (10H, m), 0.90 (6H, t)



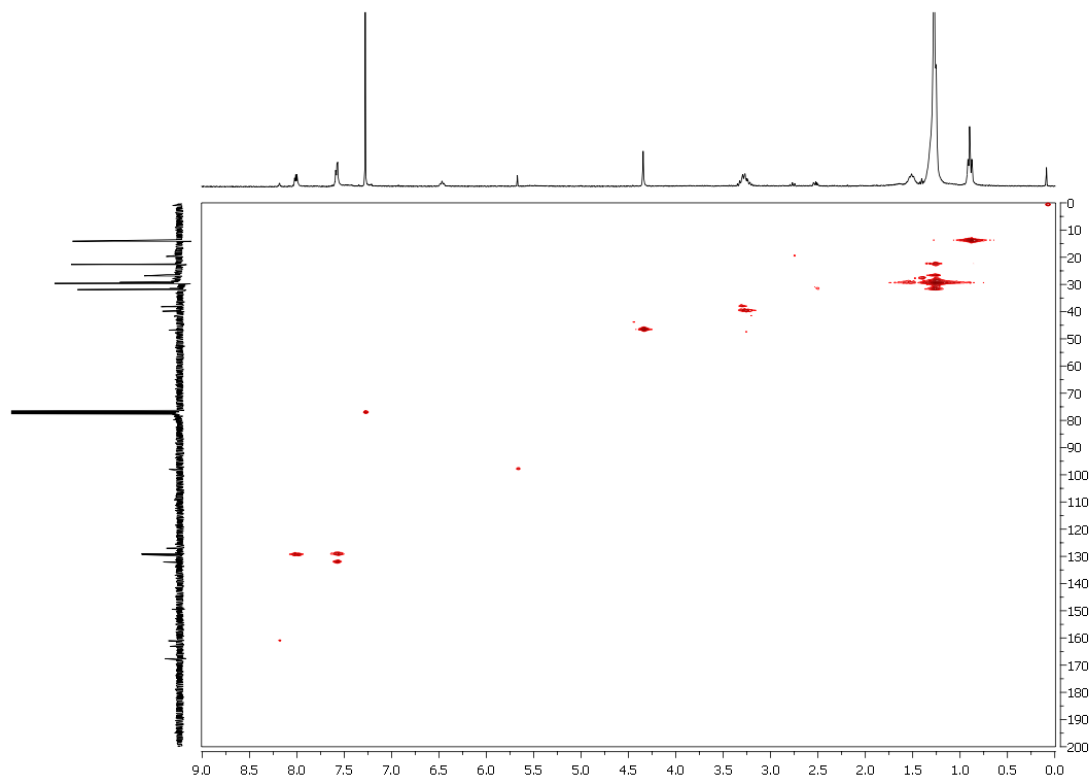


12. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.6, 163.1, 149.4, 132.1, 129.4, 129.2, 127.1, 97.9, 46.8, 39.8, 29.6-29.5

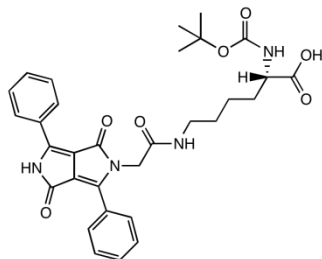
(8C), 29.3, 22.7, 14.0



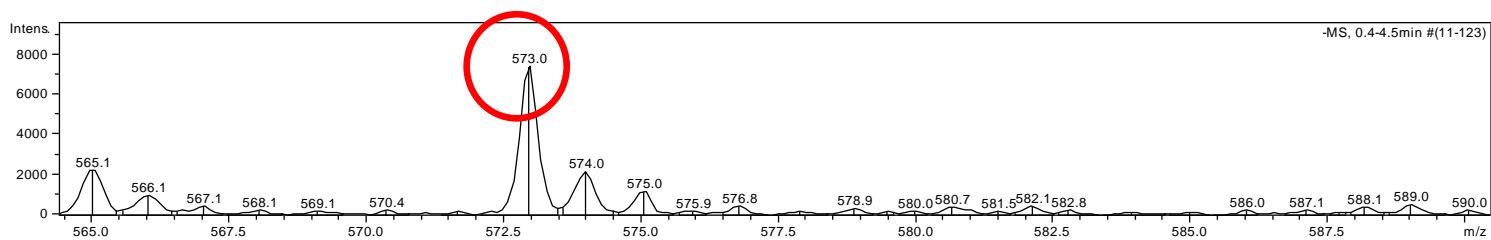
## 12. NMR-HMQC



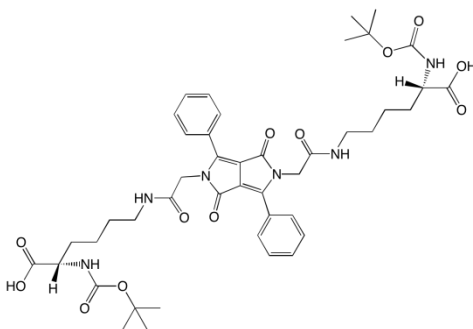
### 13. ESI-MS



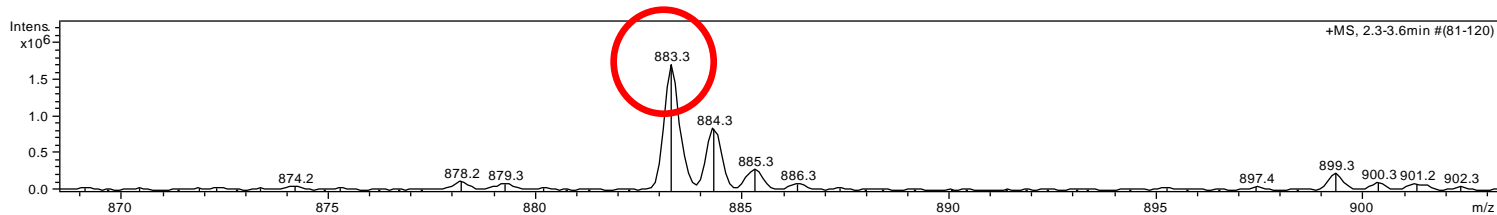
Chemical Formula:  $C_{31}H_{34}N_4O_7$   
Exact Mass: 574,24  
Molecular Weight: 574,62  
m/z: 573 (M), 574 (M+1), 575 (M+2)



### 14 ESI-MS



Chemical Formula:  $C_{44}H_{56}N_6O_{12}$   
Exact Mass: 860,40  
Molecular Weight: 860,95  
m/z 883.3 (M+Na), 884.3 (M+1+Na), 885.3 (M+2+Na)



## 14. NMR-COSY

