



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Sintesi e caratterizzazione del peptide naturale
Pentadecaibina ed analoghi contenenti nitrossido**

Relatore: Prof.ssa Marta de Zotti

Controrelatore: Prof.ssa Elisabetta Collini

Laureanda: Celeste Quaggia

2028918

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	v
RIASSUNTO.....	vii
INTRODUZIONE.....	1
1.1 Peptidi.....	1
1.2 Peptaibolici.....	2
1.2.1 Pentadecaibina.....	5
1.2.2 Interazione con membrane.....	7
2 SCOPO DELLA TESI.....	9
3 PARTE SPERIMENTALE.....	11
3.1 Materiali e metodi.....	11
3.1.1 Reagenti e solventi.....	11
3.1.2 Strumentazioni e metodi.....	11
3.1.2.1 Cromatografia a media pressione.....	11
3.1.2.2 Dicroismo Circolare (CD).....	12
3.1.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	12
3.1.2.4 Liofilizzatore.....	12
3.1.2.5 Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR).....	13
3.1.2.6 Spettrometria di massa.....	13
3.1.2.7 Citotossicità in vitro dei peptidi.....	13
3.2 Sintesi e caratterizzazione.....	14
3.2.1 SPSS manuale.....	14

3.2.2 Kaiser test.....	16
3.2.3 Purificazione con Isolera Biotage.....	16
3.2.4 Sintesi di Pentadecaibina.....	17
3.2.5 Sintesi di TOAC ¹ -VX.....	18
3.2.6 Sintesi 1 di TOAC ¹¹ -VX.....	20
3.2.7 Sintesi 2 di TOAC ¹¹ -VX.....	21
3.2.8 Sintesi 1 di TOAC ^{1,11} -VX.....	23
3.2.9 Sintesi 2 di TOAC ^{1,11} -VX.....	24
3.2.10 Sintesi 3 di TOAC ^{1,11} -VX.....	24
3.3 Ottimizzazione dello sblocco della resina di TOAC¹¹-VX.....	26
3.4 Loading della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech)	28
3.5 Leakage.....	29
4 RISULTATI E DISCUSSIONI.....	32
4.1 Sintesi peptidica su fase solida.....	32
4.1.1 Resine.....	34
4.1.2 Fmoc-AA-OH.....	35
4.1.3 Attivatori di coupling.....	36
4.1.4 Considerazioni sulla reattività di alcuni amminoacidi.....	38
4.2 Sintesi e caratterizzazione della Pentadecaibina.....	40
4.3 Sintesi e caratterizzazione di analoghi di Pentadecaibina.....	42
4.3.1 TOAC ¹ -VX.....	42
4.3.2 TOAC ¹¹ -VX (Sintesi 1).....	44
4.3.3 TOAC ¹¹ -VX (Sintesi 2).....	48

4.3.4 TOAC ^{1,11} -VX.....	50
4.4 Loading della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech).....	53
4.5 Dicroismo Circolare.....	54
4.6 Spettroscopia EPR.....	57
4.7 Leakage.....	59
4.8 Attività antibatterica ed emolisi.....	63
4.9 Attività antitumorale.....	64
5 CONCLUSIONI.....	66
6 APPENDICE.....	68
7 BIBLIOGRAFIA.....	75

Ringraziamenti

ABBREVIAZIONI

AA = Amminoacido generico

Ac = Acetile

Ac₂O = Anidride acetica

AcOH = Acido acetico

Aib = Acido α -amminoisobutirrico

Ala = Alanina

A549 = Cellule tumorali di adenocarcinoma alveolare

CD = Dicroismo circolare

CCD- 34Lu = Cellule sane di fibroblasti polmonari

CF = 5/6-Carbossifluoresceina

Ch = Colesterolo

DCM = Diclorometano

DES = Senza

DIC = N,N'-Diisopropilcarbodiimmide

DIPEA = Diisopropiletilammina

DMF = N,N-Dimetilformammide

EPR = Risonanza Paramagnetica Elettronica

Et₂O = Etere dietilico

ESI = Electron Spray Ionization

Fmoc = 9-fluorenilmetossicarbonile

Gly = Glicina

Gln = Glutamina

HFIP = 1,1,1,3,3,3-Esafluoroisopropanolo

HPLC = Cromatografia liquida ad alta prestazione

LC-MS = Cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa

Leu = Leucina

MeCN = Acetonitrile

MDA-MB-231 = Cellule tumorali mammarie

MW = Peso molecolare

Oxyma-Pure = Etil cianoidrossi immino acetato

PC = 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

PE = 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

PG = 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)]

Phol = Fenilalaninolo

SDS = Sodio dodecilsolfato

SPPS = Sintesi peptidica su fase solida

SK-OV-3 = Cellule tumorali dell'ovaio

SUV = Vescicole unilamellari piccole

TFA = Acido trifluoroacetico

TFFH = Tetrametilfluoroformamidinio esafluorofosfato

TIS = Triisopropilsilano

TOAC = Acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico

TOF = Analizzatore a tempo di volo (time of flight)

t_R = Tempo di ritenzione

Trt = Trifenilmetil- (gruppo tritile)

Triton X-100 = Polietilenglicole *tert*-octilfeniletere

UV-Vis = Spettroscopia di assorbimento ultravioletto-visibile

Val = Valina

VX = Pentadecaibina

N.B. Nel testo, gli amminoacidi chirali si intendono di configurazione L.

Riassunto

I peptaibolici sono particolari peptidi prodotti da funghi come arma di difesa contro altri microrganismi. Essi sono dotati di conformazioni elicoidali ben definite e resistenza alla proteolisi, entrambe le caratteristiche derivano dalla presenza nella loro sequenza di diversi residui di acido α -amminoisobutirrico (Aib) un aminoacido C $^{\alpha}$ -tetrasostituito.

I peptaibolici di media lunghezza, tipicamente costituiti da 13-15 residui di aminoacidi, sono i meno studiati. Si suppone che essi possano adottare uno tra due possibili meccanismi (a doghe di botte o a tappetto) di interazione peptide-membrana in risposta alla composizione e allo spessore della membrana stessa. Questa possibilità di scelta tra i due meccanismi suggerisce una sorta di bioattività selettiva, che è promettente per la loro applicazione come agenti antimicrobici o antitumorali.

In particolare, la pentadecaibina è un peptaibolico naturale di media lunghezza, prodotto da un fungo della specie *Trichoderma* spp. Caratteristica della sequenza di pentadecaibina rispetto agli altri peptaibolici di media lunghezza è la mancanza del motivo Aib-Pro, comunemente presente.

In questo lavoro di Tesi, è stata sintetizzata in fase solida la pentadecaibina naturale (VX) e alcuni suoi analoghi in cui il residuo C $^{\alpha}$ -tetrasostituito acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico (TOAC) sostituisce il residuo Aib in posizioni selezionate: Aib¹ (TOAC¹-VX), Aib¹¹ (TOAC¹¹-VX) ed Aib^{1,11} (TOAC^{1,11}-VX). Le sequenze sintetizzate sono riportate nella Tabella sottostante.

Tabella i. Sequenze sintetizzate in questo lavoro di Tesi (codice a tre lettere)

Peptide	Sequenza
VX	Ac-Aib ¹ -Gly-Ala-Leu-Aib ⁵ -Gln-Aib-Val-Aib-Ala ¹⁰ - <u>Aib-Aib-Aib</u> -Gln-Phol ¹⁵
TOAC ¹ -VX	Ac-Toac ¹ -Gly-Ala-Leu-Aib ⁵ -Gln-Aib-Val-Aib-Ala ¹⁰ - <u>Aib-Aib-Aib</u> -Gln-Phol ¹⁵
TOAC ¹¹ -VX	Ac-Aib ¹ -Gly-Ala-Leu-Aib ⁵ -Gln-Aib-Val-Aib-Ala ¹⁰ - <u>Toac-Aib-Aib</u> -Gln-Phol ¹⁵
TOAC ^{1,11} -VX	Ac-Toac ¹ -Gly-Ala-Leu-Aib ⁵ -Gln-Aib-Val-Aib-Ala ¹⁰ - <u>Toac-Aib-Aib</u> -Gln-Phol ¹⁵

Come si può vedere dalla Tabella, la sequenza della pentadecaibina contiene tre residui di Aib (poco reattivi), posti in fila. Questa difficoltà sintetica, unita alla necessità di preservare il carattere radicalico della sonda TOAC, hanno richiesto un iniziale, importante lavoro di ottimizzazione della procedura sintetica e della strategia di protezione dei gruppi funzionali presenti. I peptidi sono poi stati sintetizzati con buone rese.

La sostituzione dell'Aib con il TOAC, utile come sonda paramagnetica, in questi analoghi di pentadecaibina, dovrebbe mantenere sostanzialmente inalterata la conformazione del peptide, poiché i due residui condividono la capacità di promuovere conformazioni elicoidali.

Dagli studi conformazionali condotti mediante Dicroismo Circolare in diversi ambienti, gli analoghi sintetizzati si confermano mantenere la struttura elicoidale presentata da pentadecaibina.

Gli studi spettroscopici, svolti tramite Risonanza Paramagnetica Elettronica sui peptidi mono-marcato e sul bi-marcato, hanno confermato la presenza del radicale libero del residuo TOAC.

Gli studi di capacità dei peptidi di modificare la permeabilità di membrane modello (Leakage), hanno dimostrato che sia la pentadecaibina che i suoi analoghi sono membrano-attivi.

Il test preliminare sull'attività antibatterica della pentadecaibina sintetizzata ha confermato che essa è attiva contro tre ceppi batterici Gram-positivi, mentre è inattiva contro i batteri Gram-negativi.

Infine, test preliminari per saggiare l'attività antitumorale di pentadecaibina e dei suoi analoghi TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX, svolti in collaborazione con il Dr. Luca Menilli, hanno mostrato che i peptidi sono attivi contro le linee cellulari MDA-MB-231 (tumore al seno) e SK-OV-3 (tumore all'ovaio).

1 INTRODUZIONE

La biochimica è la disciplina che studia le reazioni chimiche e le molecole complesse alla base della vita: basti pensare ai componenti delle cellule come i carboidrati, le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici.

È dagli anni '60 che la biochimica sperimenta un'incredibile crescita di studi e di scoperte, favorite dallo sviluppo tecnologico, che permette indagini strutturali sempre più accurate. Tra i molteplici settori e classi di molecole a cui si può applicare uno studio biochimico ci sono i peptidi e la loro capacità di adottare determinate strutture tridimensionali, come quelle elicoidali. Una particolare famiglia di peptidi naturali, i peptaibolici, contenenti amminoacidi C^α-tetrasostituiti quali Aib, possiede la peculiarità di adottare strutture elicoidali eccezionalmente rigide, utili ad esempio come substrati su cui testare nuove tecniche di analisi conformazionale¹.

1.1 Peptidi

I peptidi sono delle molecole formate dall'unione di amminoacidi, fino ad un massimo di circa cinquanta. Gli amminoacidi sono legati tra loro attraverso un legame peptidico (Figura 1), tra il gruppo α-amminico e quello α-carbossilico di due amminoacidi, che si forma mediante una reazione di condensazione.

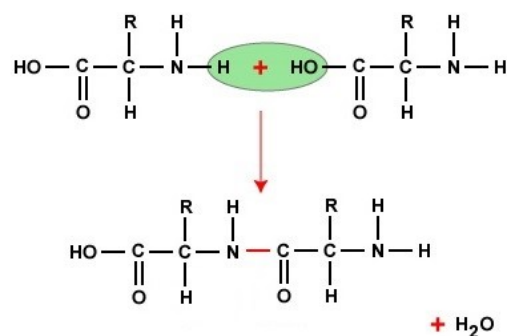


Figura 1: Formazione del legame peptidico.

I peptidi sono molecole naturalmente coinvolte in molte funzioni fisiologiche. Spesso svolgono ruoli cruciali all'interno degli organismi viventi, agendo come ormoni o neurotrasmettitori.² Per questo, rappresentano un'interessante categoria di composti

farmaceutici, che si pone tra le piccole molecole e i biofarmaci come gli anticorpi monoclonali.

Il loro impiego farmaceutico è reso possibile grazie a nuove metodologie all'avanguardia per la loro sintesi e la purificazione, che hanno consentito di velocizzare e semplificare la loro produzione.⁴

I principali punti di forza dei peptidi sono: (i) la loro dimensione, che consente loro di interagire con i sistemi biologici in modo selettivo⁵; (ii) la loro capacità di assumere determinate conformazioni tridimensionali, che ha aperto la strada a svariate applicazioni, ad esempio come sensori⁵; (iii) la biocompatibilità, caratteristica importante per uso terapeutico; (iv) ecosostenibilità: essendo i loro principali metaboliti α -amminoacidi non tossici; infine (v) il costo di sintesi relativamente contenuto rispetto ai biofarmaci, possibile anche grazie alle biotecnologie o alla sintesi su supporto solido.⁶ I peptidi, infatti, possono essere sintetizzati per via chimica, che permette di apportare modifiche alle sequenze peptidiche, o espressi da organismi biologici.²

In particolare, i farmaci peptidici vengono sintetizzati all'85% per via chimica, il restante 15% con la tecnologia del DNA ricombinante.²

I peptidi come farmaci spesso presentano una breve emivita plasmatica. Questo comporta che peptidi naturali non sono quasi mai adatti all'uso come farmaci, poiché presentano una scarsa stabilità nel circolo sanguigno.²

Esistono però numerose strategie per stabilizzare i peptidi in ambiente biologico, ad esempio modificando le estremità del peptide o ciclizzandoli. Anche l'utilizzo di amminoacidi non codificati può allungare l'emivita del peptide, rendendo più difficile l'attacco delle endopeptidasi,³ o l'introduzione di vincoli che promuovano la formazione di una struttura secondaria rigida³.

1.2 Peptaibolici

I peptaibolici sono peptidi non ribosomiali (NRP) presenti in natura e dotati di attività antimicrobica⁸. Essi sono prodotti da microorganismi fungini come componente fondamentale del sistema immunitario.⁹⁻¹⁰ Ad oggi nei funghi sono stati scoperti più di 1000 peptaibolici ed i principali produttori sono *Trichoderma* spp.¹¹

Il nome di questa classe di peptide, in Inglese Pept-aib-ol, deriva dalle caratteristiche della loro struttura primaria¹². Essi presentano in sequenza diversi residui di acido α -amminoisobutirrico (*Aib*), un α -amminoacido non codificato (Figura 2A); in estremità C-

terminale un 1,2-amminoalcol, come il fenilalaninolo (Figura 2B) e all'estremità N-terminale un gruppo acilico, ad esempio un acetile.

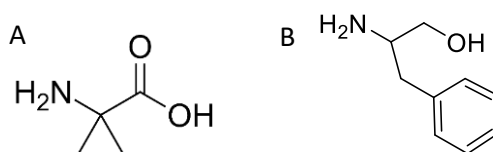


Figura 2: A) Aib (Acido α-aminoisobutirrico); B) l'1,2 amminoalcol Phol.

I peptaibolici naturali sono costituiti da un numero di residui amminoacidici che va da 4 a 21 e il loro peso molecolare spazia da circa 500 Da a circa 2100 Da.¹³

Esistono attualmente due sistemi principali per classificare i peptaibolici. Un sistema ampiamente utilizzato è il metodo di classificazione che si basa sulla lunghezza delle sequenze; i peptaibolici sono classificati come "lunghi", "medi" e "corti". I peptaibolici "lunghi" sono costituiti da 18-20 residui, come l'alameticina; i peptaibolici "corti" sono costituiti da circa 10 residui, come la tricogina GA IV, mentre i peptaibolici "medi" sono costituiti da 13-16 residui e sono i meno studiati. Un altro metodo di classificazione basato sulla somiglianza dei residui e della lunghezza della sequenza è stato proposto da Chugh e Wallace.¹² In questo sistema di classificazione (Figura 3), i peptaibolici sono divisi in nove sottofamiglie (SF), divisi in base alle proprietà fisiche e chimiche, le attività biologiche e i meccanismi.

Subfamily (SF.)	Species	Peptaibols	Sequence
SF1	<i>Trichoderma arundinaceum</i>	alamethicin-F30	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phe-OH
SF2	<i>Emericellopsis microspora</i>	emerimicin_IV	Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Ala-Phe-OH
SF3	<i>Acremonium persicinum</i>	XR586	Ac-Trp-Iva-Gln-Aib-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Pro-Gln-Aib-Hyp-Iva-Pro-Phe-Gly-OH
SF4	<i>Trichoderma arundinaceum</i>	trichorovin_TV_XIIa	Ac-Aib-Asn-Ile-Ile-Aib-Pro-Leu-Leu-Aib-Pro-Ile-OH
SF5	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	trichogin_A IV	Ac-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leuol
SF6	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	ampullosporin	Ac-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Gln-Leu-Aib-Gln-Leu-OH
SF7	<i>Tolyposcladium geodesic</i>	LP 237-F5	Ac-Aib-Pro-Tyr-Aib-Gln-Gln-Aib-EtNor-Gln-Ala-Leu-OH
SF8	<i>Clonostachys</i> sp.	clonostachin	Ac-Aib-Hyp-Leu-Iva-Hyp-Leu-Iva-Hyp-Aib-Iva-Aib-Hyp-Iva-Ile-Mannitol
SF9	<i>Sepedonium</i> spp	peptaibolin	Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phe-OH

Note: Amino acid residues in bold indicate the characteristic residue of each SF.

Figura 3: Le sequenze rappresentative per sottofamiglie da 1 a 9.¹²

I peptaibolici di solito formano strutture tridimensionali elicoidali. Anche quelli molto corti presentano almeno un ripiegamento β. Le loro strutture tridimensionali svolgono un ruolo importante nella loro attività biologica; ad esempio, il peptide alameticina, prodotto dal fungo *Trichoderma viride*, è in grado di formare nelle membrane batteriche canali ionici

voltage-dipendenti, formati dall'aggregazione di singole unità di peptide in agglomerati di eliche, formati da 4 a 12 molecole di peptide.¹⁴

I peptaibolici hanno ricevuto attenzione sia dai biochimici che dai farmacologi a causa della loro elevata bioattività e della variabilità funzionale che può essere generata dalla sostituzione di amminoacidi.¹⁵

Studi hanno evidenziato anche numerose potenzialità antitumorali di questa classe di composti.¹⁴

Questa classe di peptidi naturali presenta resistenza alla proteolisi enzimatica.¹⁶ La sequenza dei peptaibolici infatti, come detto, presenta vari residui di Aib, ed i legami peptidici che coinvolgono questo residuo piuttosto ingombrato hanno una forte resistenza alle proteasi. Le estremità C ed N-terminale, inoltre, sono rispettivamente protette dal residuo di amminoalcol e dalla catena acilica; quindi, sono anch'esse difficilmente raggiungibili dalle proteasi. Questo rende questi peptidi potenzialmente somministrabili anche per via orale.¹⁷

I residui di Aib, amminoacido tetrasostituito sul carbonio α , garantiscono rigidità strutturale, essenziale per assicurare a questi particolari peptidi stabilità e forte attività membranolitica. La presenza di due gruppi metilici sul carbonio in alfa restringe infatti lo spazio conformazionale accessibile a questo residuo.¹⁸ L'Aib è un forte stabilizzatore di strutture secondarie elicoidali come l' α -elica e l'elica 3_{10} ¹⁹ ed è achirale; quindi, il verso delle eliche formate dai peptidi che lo contengono dipende dalla chiralità degli altri amminoacidi presenti: si formano eliche destrorse se sono presenti L-amminoacidi ed eliche levogire se sono presenti D-amminoacidi.

La conformazione a α -elica è stabilizzata dalla presenza di legami a idrogeno intramolecolari tra l'ossigeno del gruppo carbossilico di un residuo e il protone del gruppo ammidico di un residuo che si trova a 4 amminoacidi di distanza (Figura 4).²⁰ L' α -elica è caratterizzata da 3.63 residui per giro, che formano così cicli di 13 atomi (ripiegamenti α o strutture C_{13}).

Anche la conformazione dell'elica 3_{10} è stabilizzata dalla presenza di legami a idrogeno intramolecolari, ma in questo caso vengono coinvolti l'ossigeno del gruppo carbossilico di un residuo e il protone del gruppo ammidico del residuo a 3 amminoacidi di distanza (Figura 4).²⁰ L'elica 3_{10} ha 3.24 residui amminoacidici per giro che formano così cicli di 10 atomi (ripiegamenti β o strutture C_{10}).

L'elica 3_{10} risulta essere più stretta e allungata rispetto all' α -elica. Tutte e due le eliche hanno le catene laterali degli amminoacidi che puntano verso l'esterno dell'elica, ma

nell'elica 3_{10} risultano sovrapposte tra loro (eclissate) mentre nell' α -elica risultano sfalsate (Figura 5).

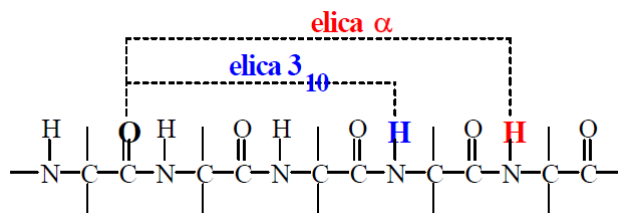


Figura 4: Legami a idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche (α e 3_{10}).

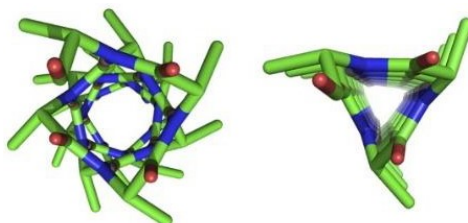


Figura 5: A sinistra, struttura dell' α -elica vista dall'alto;
A destra struttura dell'elica 3_{10} vista dall'alto.

Nei peptaibolici sono spesso presenti o compresenti strutture elicoidali di tipo α e strutture elicoidali di tipo 3_{10} . In particolare, l' α -elica tende ad essere favorita al crescere della sequenza peptidica o al decrescere del contenuto in Aib, mentre l'elica 3_{10} è adottata preferenzialmente da peptidi di sequenza breve (fino a sei residui) o ad elevato contenuto di Aib.²¹

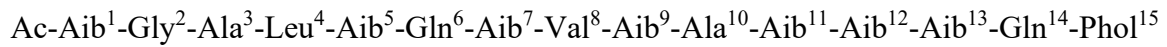
1.2.1 Pentadecaibina

La pentadecaibina è un peptaibolico naturale, prodotto dal fungo del genere *Trichoderma* sp. MMS1255, più specificamente della specie complessa *T. harzianum*²¹⁻²³.

La pentadecaibina è stata scoperta recentemente e di essa sono stati isolati cinque congeneri, la cui struttura primaria è:

Ac-Aib¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib/D-Iva⁵-Gln⁶-Aib/D-Iva⁷-Val/Leu⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-Aib¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Pho¹⁵

Il congenere su cui si è focalizzato questo lavoro di Tesi è la pentadecaibina I la cui struttura primaria è:



Essa è un peptide di media lunghezza, costituita da 15 amminoacidi ed è caratterizzata dalla mancanza del diffuso motivo Aib-Pro, che è generalmente caratteristico dei peptaibolici di media lunghezza prodotti da *Trichoderma spp.* In estremità C-terminale presenta l'1,2-amminoalcol fenilalaninolo e all'estremità N-terminale presenta un gruppo acetile.

La presenza di vari residui di Aib influenza la struttura 3D del peptide e l'interazione con la membrana.

Studi sul ruolo di ciascun residuo di Aib nelle sequenze dei peptaibolici hanno determinato che Aib nelle posizioni 1 e 5, posizionati a una distanza di giro dell'elica, supportano l'inizio della conformazione, mentre i residui di Aib nelle posizioni 7 e 9 contribuiscono alla stabilizzazione della struttura²².

Una caratteristica comune dei peptaibolici di media e lunga lunghezza è Aib nelle posizioni 1 e 5, come le alameticine e le tricobrachine²⁴, mentre Aib nelle posizioni 7 e 9 sono presenti nella sequenza di peptaibolici di media lunghezza come la zervamicina e alcuni cephaibols²⁵.

La conformazione della pentadecaibina naturale, estratta dal fungo, è stata studiata tramite NMR. Essa presenta una struttura elicoidale mista di tipo 3₁₀, stabilizzata da legami idrogeno intramolecolari 4→1 e α, stabilizzata da legami idrogeno intramolecolari 5→1.²¹

Gli spettri CD della pentadecaibina, presentando due massimi negativi a circa 208 e 220 nm e un massimo positivo vicino a 195 nm, hanno confermato la conformazione elicoidale destrorsa di pentadecaibina I.²¹

Il sequenziamento del genoma fungino ha consentito l'identificazione, per la prima volta all'interno di *Trichoderma spp.*, di un gene codificante un enzima responsabile della sintesi del peptaibolico a 15 residui, strettamente correlato alla biosintesi della pentadecaibina.²¹

La pentadecaibina mostra moderata attività antibatterica contro *Stafilococco aureus*.²¹

Ulteriori studi su una classe così promettente di peptidi bioattivi naturali sono ostacolati dalla mancanza di procedure sintetiche efficaci, perché la presenza di numerosi residui Aib di fila spesso si traduce in reazioni di accoppiamento non quantitative e nella produzione di sequenze delete.²²

Negli analoghi di pentadecaibina prodotti in questo lavoro di Tesi uno o due Aib sono sostituiti dall'amminoacido C^α-tetrasostituito Acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico (TOAC) (Figura 6).

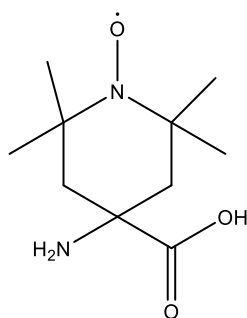


Figura 6: Struttura del TOAC.

Il TOAC, sonda paramagnetica, è un amminoacido non naturale caratterizzato da una struttura eterociclica satura (anello piperidinico), contenente un radicale libero (il gruppo nitrossile) stabilizzato dalla presenza di due atomi di carbonio tetrasostituiti ad esso vicinali. Tale amminoacido ha mostrato tendenze strutturali del tutto analoghe a quelle dell'Aib. Dettagliate analisi conformazionali di peptidi contenenti TOAC hanno infatti rivelato che tale residuo è un forte induttore di ripiegamenti- β e di strutture elicoidali di tipo α e 3_{10} , sia allo stato cristallino che in soluzione.²⁵⁻²⁶

Il gruppo nitrossile si è rivelato estremamente utile e versatile. L'uso di sonde paramagnetiche legate covalentemente a peptidi e proteine consente di ottenere informazioni, tramite EPR, sull'intorno da loro sperimentato e sulla loro mobilità. Tali informazioni permettono di studiare la dinamica locale, l'esposizione o meno al solvente o all'ossigeno molecolare, le collisioni molecolari e l'ordine locale.²⁷ Inoltre, l'interazione tra due sonde paramagnetiche legate covalentemente alla stessa molecola può fornire importanti informazioni sulla conformazione del peptide.²⁸⁻²⁹

1.2.3 Interazione con membrane

In letteratura sono stati ipotizzati essenzialmente due meccanismi di azione dei peptaibolici sulle membrane biologiche: il modello "a tappeto" e quello "a doghe di botte" (Figura 7).

I peptaibolici di media lunghezza si suppone che scelgano tra i due suddetti meccanismi di interazione peptide-membrana in risposta alla composizione e allo spessore della membrana.²²

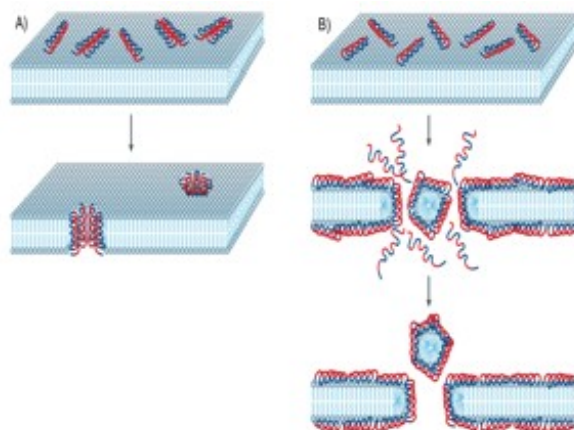


Figura 7: modelli di interazione dei peptaibolici con le membrane,

A) modello a doghe di botte B) modello a tappeto

In blu è indicata la zona fortemente idrofobica del peptide, in rosso quella più idrofila.

Modello a doghe di botte (“barrel-stave model”)³⁰

In questo modello, le eliche del peptaibolico si adagiano sulla membrana, aggregandosi e penetrando all’interno formando dei canali, in cui la parte idrofobica dell’elica interagisce con la membrana, mentre la parte idrofila forma la parete interna del canale. I peptidi, infatti, si assemblerebbero tra loro a formare un canale cavo nella membrana, simile alle doghe di una botte. (Figura 7A)

Modello a tappeto (“carpet model”)³⁰

In questo modello, il peptaibolico interagisce attraverso la faccia più polare con le teste dei fosfolipidi di membrana carichi negativamente. Il modello, quindi, prevede una disposizione del peptide parallela al doppio strato fosfolipidico. Al di sopra di una concentrazione critica, le eliche aggregano e si ha la loro rotazione in modo tale che i residui idrofobici siano rivolti verso il cuore della membrana. Si passa per una situazione intermedia in cui si formano dei buchi che poi disgregano la membrana. (Figura 7B).

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è la sintesi totale e la caratterizzazione della pentadecaibina naturale e di alcuni suoi analoghi contenenti l'acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossil-4-ammino-4-carbossilico (TOAC) al posto di uno o due residui di Aib in posizioni selezionate: Aib¹¹, Aib¹ ed Aib^{1,11}.

La sequenza della pentadecaibina è: Ac-Aib¹-Gly-Ala-Leu-Aib⁵-Gln-Aib-Val-Aib-Ala¹⁰-Aib-Aib-Aib-Gln-Phol¹⁵. Questo peptaibolico naturale di media lunghezza recentemente scoperto è particolarmente promettente come potenziale farmaco a base peptidica perché (i) è resistente alla degradazione enzimatica; (ii) ha una struttura elicoidale stabile e ben sviluppata; (iii) la sua lunghezza è tale da consentirgli di adottare un diverso meccanismo di interazione con membrane di composizione e spessore diversi, offrendo un potenziale di selettività all'azione biologica; (iv) la peculiare assenza di motivi Aib-Pro, notoriamente acido-labili e tipici dei peptaibolici naturali di media lunghezza, rende la sua sintesi eventualmente scalabile ed automatizzabile.

La sostituzione dell'Aib con il TOAC permetterà l'impiego della spettroscopia EPR per studiare il meccanismo di interazione di questo peptide con membrane a diversa composizione e diverso spessore.

Lo scopo principale di questo lavoro è quindi trovare una procedura di sintesi e una strategia di protezione delle catene laterali di Gln efficace e potenzialmente automatizzabile, limitando le reazioni incomplete e la produzione di sequenze delete, tipicamente presenti in sequenze comprendenti vari residui tetrasostituiti, notoriamente poco reattivi.

Per verificare che la presenza di TOAC, in sostituzione all'Aib, non comporti modificazioni alla struttura elicoidale, si eseguiranno studi conformazionali attraverso la tecnica del Dicroismo Circolare in diversi ambienti.

La verifica della presenza del radicale libero del residuo TOAC sugli analoghi verrà fatta attraverso la tecnica della Risonanza Paramagnetica Elettronica, in collaborazione con il Prof. Antonio Barbon.

Su tutti i peptidi saranno poi eseguiti dei saggi di Leakage su membrane modello di diversa composizione, per verificare se essi siano membrano-attivi e se la sostituzione di Aib con TOAC modifichi l'interazione con le membrane del peptide nativo.

Infine, l'attività antimicrobica della pentadecaibina sintetizzata sarà analizzata grazie alla collaborazione con la dott.ssa Filomena Sannio presso il dipartimento di Biotecnologie Mediche – Università di Siena.

L'attività antitumorale di pentadecaibina e degli analoghi TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX sarà saggiata dal dottore Luca Menilli presso il dipartimento di Biologia - Università di Padova.

3 PARTE SPERIMENTALE

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Reagenti e solventi

Carlo Erba	Acetonitrile per HPLC; MeOH per HPLC; Trietilammina
Honeywell	Diclorometano; Dietil etere; DMF; Piperidina
Iris Biotech	DIPEA; resina H-L-Phol-2-clorotritile; Fmoc-AA-OH; Oxyma-Pure; DIC
Sigma	Acetone; Acido Acetico; Kit Kaiser Test; NaOH; Solfato di Sodio; TFA; HCl; Metanolo; HFIP; SDS
Fluorochem	Fmoc-Aib-OH
Chem Impex	resina H-L-Phol-2-clorotritile
Novabiochem	TFFH

3.1.2 Strumentazioni e metodi

3.1.2.1 Cromatografia a media pressione

I peptidi sintetizzati sono stati purificati utilizzando la cromatografia a fase inversa a media pressione. Si utilizza il cromatografo Isolera Prime Biotage con rilevatore funzionante contemporaneamente a due lunghezze d'onda comprese fra 260 e 206nm. Si carica il campione in una colonna C₁₈ Duo Sfar, scelta a seconda della quantità di prodotto grezzo da purificare, attraverso una cartuccia di caricamento (Cartridge). Il flusso è impostato in base alla colonna: 12mL/min per la colonna piccola (12g, caricamento massimo 500 mg di prodotto grezzo), 25 mL/min per quella grande (30g). La colonna presenta un volume morto di 15 mL per la 12g (33mL per la 30g). Gli eluenti utilizzati sono: A) H₂O MilliQ + 0,05% TFA e B) 10% H₂O MilliQ, 90% MeCN + 0,05% TFA. Nel caso di peptidi contenuti il TOAC si usano gli eluenti senza presenza di acido. Per la procedura di purificazione si veda il paragrafo 3.2.3.

3.1.2.2 Dicroismo Circolare (CD)

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con il dicrografo Jasco modello J-1500, utilizzando una cella di quarzo con cammino ottico 0.1 cm (Hellma). Le misure sono state eseguite a 25°C, acquisendo 16 scansioni, nell'intervallo tra 290 e 190 nm su campioni di concentrazione 10^{-4} M.

I solventi utilizzati sono CH₃OH e una soluzione di sodio dodecilsolfato (SDS) 100 mM in milliQ di acqua (ambiente membrano-mimetico).

I valori sono espressi in ellitticità molare totale $[\Theta]_T$ ($\text{gradi} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$):

$$[\Theta]_T = \frac{(PM \cdot \Theta)}{(l \cdot c)} = 3298 \cdot \Delta\varepsilon$$

Dove:

Θ = ellitticità osservata;

PM = peso molecolare totale del peptide;

l = lunghezza del cammino ottico in cm;

c = concentrazione in g/l;

$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D$ = differenza tra i coefficienti di estinzione della luce polarizzata levogira e destrogira.

Utilizzando il programma JASCO Spectra Manager, si è operata la sottrazione dello spettro del bianco, la riduzione del rumore e la normalizzazione secondo la concentrazione.

3.1.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

I cromatogrammi HPLC sono stati registrati con un Cromatografo Pharmacia Biotech con detector funzionante contemporaneamente a tre lunghezze d'onda comprese fra 260 e 205 nm.

Si utilizza una colonna a fase inversa: Agilent Zorbax RX-C₁₈ 5 μ m con flusso 1 mL/min.

Si usano i seguenti eluenti: A) 90% H₂O MilliQ, 10% MeCN + 0,05% TFA e B) 10% H₂O MilliQ, 90% MeCN + 0,05% TFA. Nel caso di peptidi contenuti il TOAC si usano gli eluenti senza presenza di acido. L'H₂O MilliQ viene precedentemente degassata per limitare l'insorgenza di bolle.

3.1.2.4 Liofilizzatore

Lo strumento è Edwards Modulyo, il quale è costituito da un modulo in cui è contenuto un compressore refrigerato ad aria e una camera di condensazione in acciaio inossidabile. Possiede otto porte, a cui vengono collegati palloni o boccette in opportuni adattatori, precedentemente congelati utilizzando ghiaccio secco e acetone. Attraverso le valvole poste nelle porte, viene portato il vuoto all'interno dei palloni o boccette.

3.1.2.5 Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR)

Per le analisi EPR si è utilizzato uno spettrometro ELEXSYS- E580 Bruker, Q-Band, con cavità dielettrica da 5mm. Si utilizzano 30 μ L di campione di peptide marcato con TOAC in soluzione di MeOH (concentrazione: 10^{-4} M), inseriti in un tubo 2*1, previo gorgogliamento con gas inerte per eliminare l'ossigeno.

Condizioni Sperimentali: Frequenza Modulazione, 100 kHz; Potenza microonde, 20 mW; Tempo di Conversione (CT), 20 ms; Sweep time, CT*1024; Ampiezza Modulazione, 1.0 G.

3.1.2.6 Spettrometria di massa

Sono stati utilizzati due analizzatori di massa: un LC-MS e un HRMS (HR, high resolution).

LC-MS

Lo strumento è un Agilent 1600 ed accoppia un cromatografo HPLC ad un analizzatore di massa. La colonna utilizzata dal cromatografo è una C18. Gli eluenti usati sono: A) 90% H₂O MilliQ, 10% MeCN + 0,05% TFA e B) 10% H₂O MilliQ, 90% MeCN + 0,05% TFA. Nel caso di peptidi contenenti il TOAC si usano gli eluenti senza presenza di acido. Il detector rileva le lunghezze d'onda 220nm e 280 nm. L'output è composto da due cromatogrammi alle due lunghezze d'onda e un cromatogramma con i dati relativi all'analisi di massa.

Lo spettrometro di massa utilizza una sorgente ESI (Electrospray ionization) e un analizzatore a singolo quadrupolo.

HRMS

Lo spettrometro di massa ad alta risoluzione Micromass ESI-TOF (TOF, time of flight) Micro è stato sempre impiegato in modalità positiva.

3.1.2.7 Citotossicità *in vitro* dei peptidi

La citotossicità dei peptidi si è valutata con il test MTS (CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Milano, Italia) in cellule tumorali di adenocarcinoma alveolare (A549), fibroblasti polmonari (linea sana CCD-34Lu), tumore al seno triplo negativo (MDA-MB-231) e carcinoma ovarico (SK-OV-3), esposte a concentrazioni crescenti dei peptidi per 24 ore. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e dopo 24 ore il terreno è stato sostituito con uno nuovo contenente i peptaibolici. Per il saggio MTS, il terreno è stato sostituito con 100 µL di terreno privo di siero e 20 µL di CellTiter 96 ®reagente. Dopo 60-90 minuti, l'assorbanza a 492 nm è stata misurata con un lettore di piastre Multiskan Go (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA, USA) e la vitalità cellulare è stata espressa in funzione dell'assorbanza rispetto a quella delle cellule di controllo (considerate come 100% di vitalità). I valori di IC₅₀ per ciascun trattamento con peptide sono stati estrapolati dalle relative curve dose-risposta ottenute con il software GraphPad Prism 9.5.

3.2 Sintesi e caratterizzazione

3.2.1 SPPS Manuale

La sintesi di peptidi in fase solida (SPPS) consiste di una serie di passaggi che si ripetono sistematicamente. L'approccio di SPPS impiegato in questo lavoro è quello di Wang, utilizzando la protezione Fmoc in catena principale e la rimozione del peptide dalla resina in ambiente acido:

1. Si pesa la quantità desiderata di resina all'interno di una siringa da sintesi in fase solida di dimensioni adeguate. Le siringhe da sintesi in fase solida sono dei piccoli reattori muniti di un setto poroso in grado di trattenere i granelli di resina sui quali cresce la sequenza peptidica e lasciare invece scorrere i liquidi.
2. Si procede quindi con il rigonfiamento della resina con DMF: si ricopre la resina con il solvente e la si agita per circa mezz'ora. Si ripete questo passaggio due volte per

garantire il totale rigonfiamento della resina e quindi la completa esposizione dei siti attivi sui quali deve accrescere il peptide che si sta sintetizzando. La DMF viene eliminata per filtrazione.

3. *Coupling*: In una boccetta, si pesano 3 equivalenti, rispetto al *loading* della resina (millimoli/grammo di resina), dell'amminoacido entrante Fmoc-protetto e si sciolgono nella minima quantità necessaria di DMF degassata. Si aggiungono poi 3 equivalenti di Oxyma-Pure e di DIC oppure 3 equivalenti di TFFH e 6 equivalenti di DIPEA. Si inserisce la soluzione nella siringa di reazione e si lascia reagire, agitando, per circa 60 minuti o 24 ore. Quando la reazione coinvolge un residuo tetrasostituito, le reazioni da 60 minuti vengono ripetute due volte (doppio *coupling*) per garantire l'attacco completo dell'amminoacido.
4. Lavaggi con DMF per rimuovere tutti i reagenti in eccesso per semplice filtrazione (per circa 6 volte).
5. Deprotezione del gruppo Fmoc dall'amminoacido appena legato. Nella siringa si inserisce una soluzione di piperidina in DMF al 20% e si lascia reagire per 5 minuti. Si filtra la soluzione e si ripete il passaggio lasciando reagire per 10 minuti.
6. 8 lavaggi con DMF per rimuovere completamente sottoprodotti e la piperidina residua. Questo passaggio deve essere eseguito con cura.

La sintesi del peptide prosegue alternando la reazione di *coupling* con la rimozione del gruppo protettore Fmoc fino a terminare la sequenza di amminoacidi.

7. Finita la sequenza, si lega l'eventuale gruppo bloccante. Nel nostro caso l'acetile (Ac) è stato introdotto mediante una soluzione di acetilazione formata da Ac₂O/DIPEA (4:1) in DMF. Si inserisce la soluzione nella siringa di reazione e si lascia reagire, agitando, per circa 45 minuti. Si ripete questo passaggio 2 volte per garantire l'attacco completo. In alternativa si lega l'acetile (Ac) con dei *coupling*, con AcOH, Oxyma-Pure, DIC e la quantità necessaria di DMF degassata; le quantità utilizzate sono presenti al paragrafo 3.2.5.
8. 7 lavaggi con DMF per semplice filtrazione, per rimuovere tutti i reagenti in eccesso.
9. Durante la sintesi è possibile verificare la sequenza del peptide in crescita, prelevando pochi granelli di resina, che vengono lavati 7 volte con DCM, in modo da eliminare tutta la DMF residua. In questo modo i granelli di resina si seccano. È possibile eseguire un Kaiser Test (paragrafo 3.2.2) sulla resina o staccare il peptide (questo procedimento è detto sblocco in piccolo) e analizzarlo con analisi di MS o di HPLC.

Lo sblocco del peptide dalla resina avviene grazie all'utilizzo di HFIP, debolmente acido, in una soluzione di DCM 3:7, che permette di mantenere gruppi protettori acido labili in catena laterale. Nella siringa si inserisce questa soluzione e si lascia sotto agitazione per circa un'ora. Al termine si raccoglie il liquido filtrato in una boccetta, si lava la resina con DCM e si evapora il solvente sotto flusso di azoto.

10. Al termine della sequenza peptidica si procede con lo sblocco in grande. Lo sblocco del peptide dalla resina è medesimo a quello descritto nel punto (9). Per ottenere sia lo sblocco dalla resina che la rimozione del gruppo protettore Trt dai residui di Gln, si utilizza invece un acido forte, TFA, in una soluzione di DCM/TFA/TIS e/o H₂O. Le quantità utilizzate sono riportate nel paragrafo (3.3).
11. Dopo aver rimosso il peptide dalla resina, si può procedere con dei lavaggi in Et₂O del peptide. Il peptide risulta insolubile in Et₂O e precipita. Si centrifuga a 5500 rpm per 10 minuti per separare completamente il peptide dall'Et₂O. Si rimuove il solvente e si ripete il passaggio altre due volte, per rimuovere tutte le impurezze idrofobiche presenti.
12. Infine, si esegue l'analisi MS e HPLC, per poi procedere alla purificazione del peptide (paragrafo 3.2.3).

3.2.2 Kaiser test

Pochi granelli di resina possono essere prelevati in qualsiasi momento della sintesi peptidica in fase solida per verificare la presenza di ammine libere.

I granelli di resina vengono lavati con DCM. Ciò permette di eliminare la DMF presente e seccare la resina stessa. In una provetta contenente la resina seccata si aggiungono 20 µL di cianuro di potassio in piperidina, 20 µL di fenolo 80% in etanolo (EtOH) e 20 µL di ninidrina 6% in EtOH.

Si scalda per pochi secondi la provetta con la pistola termica fino a raggiungere una temperatura di circa 100°C. Dopo un paio di minuti si verifica, dunque, il colore della resina: se i granelli di resina si colorano di blu il test risulta essere positivo e ciò significa che sono presenti delle ammine libere, quindi si rifà il *coupling*, se i granelli di resina non cambiano colore e rimangono gialli/arancio il test è negativo, e si può continuare la sintesi.

3.2.3 Purificazione con Isolera Biotage

La purificazione si esegue con cromatografia a media pressione su uno strumento Isolera Biotage (3.1.2.1).

Per la purificazione si imposta un gradiente da 0% a 100% di eluente B, in cui sia previsto almeno un volume di colonna per ogni variazione del 10% di B.

Per rendere la purificazione efficace, il gradiente a scalini è da preferire, in modo da separare al meglio il prodotto dalle impurezze presenti. Per costruire i vari gradini del gradiente ci si aiuta con un cromatogramma HPLC fatto in precedenza.

Prima di caricare il campione si equilibra la colonna facendo eluire 4 colonne di eluente B, 4 colonne 50% A e 50% B e infine 4 colonne di eluente A. Quindi si carica il campione nel cartridge, utilizzando al massimo 1 mL di CH₃OH. Si inserisce il cartridge in colonna e si avvia il gradiente impostato.

Al termine del gradiente, le frazioni raccolte in provette vengono analizzate tramite HPLC. In particolare si analizza prima il cuore del picco che corrisponde al prodotto, poi le code e le teste cioè le frazioni vicino al prodotto. Questo passaggio serve per recuperare tutte le frazioni che abbiano una percentuale di purezza simile. Le frazioni si uniscono in un pallone ed il solvente organico (acetonitrile) è portato a secco con il rotavapor. Poi si liofilizza, con il liofilizzatore (3.1.2.4), per eliminare l'acqua.

3.2.4 Sintesi di pentadecaibina

Sequenza peptide: Ac-Aib¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-Aib¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 50 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech), con *loading* (numero di mmoli di siti attivi per grammo di resina) di 0.4 mmol/g, corrispondenti a 0.019 mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido, si eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e DIC, per 60 min. Per inserire Aib¹¹, Aib¹² e Aib¹³, si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 minuti), per 24 ore. Per l'acetilazione viene usata una miscela di Ac₂O : DIPEA (4:1) in DMF, per 45 minuti, per due volte. Per questa sintesi si utilizza la Gln con gruppo protettore Trt.

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,70
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297,30
Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11
DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
Ac ₂ OH	102,90

Il peptide si sblocca con HFIP 30% in DCM per 1 ora, successivamente per la rimozione dei Trt si utilizza una miscela in pallone al 5% TFA e 2,5% TIS in DCM per 7 ore.

Il peptide si purifica attraverso cromatografia a fase inversa (paragrafo 3.2.3). Gli eluenti usati sono: A) H₂O milliQ con 0.05% TFA, B) MeCN:H₂O milliQ 9:1 con 0.05% TFA.

Resa prodotto grezzo: 28 %

Resa prodotto: 2,4 % , Purezza 90%.

LC-MS in CH₃OH - gradiente da 40 a 100 % B in 18 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - t_R =15,29 min

HRMS (ESI-TOF) del peptide pentadecaibina [MW_{calc}: 1455,84]; [M+H]⁺=1456,8385 m/z
[M+ 2H]²⁺= 728,9089 m/z massa frammentata: 605,34+850,48=1455,82

3.2.5 Sintesi di Toac¹-VX

Sequenza peptide: Ac-TOAC¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-Aib¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 150 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Chem Impex), con *loading* di 0.53 mmol/g, corrispondenti a 0.161mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido, si eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e DIC, per 60 min. Per inserire Aib¹¹, Aib¹² e Aib¹³, si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 minuti), per 24 ore.

Per ogni *coupling* di TOAC¹ (riportati nella tabella sottostante) si esegue una pre-attivazione di 15 minuti:

N° <i>Coupling</i>	Reagenti	Equivalenti	Tempo
1	Fmoc-TOAC-OH	3	24 ore
	TFFH	3	
	DIPEA	6	
2	Fmoc-TOAC-OH	0,3	24 ore
	TFFH	0,3	
	DIPEA	0,6	
3	Fmoc-TOAC-OH	0,6	24 ore
	TFFH	0,6	
	DIPEA	0,12	

L'acetilazione si esegue con le seguenti condizioni:

Reazione	Reagenti	Equivalenti	Tempo
1	AcOH	4	1 ora e 30 minuti
	Oxyma-Pure	4	
	DIC	4	
2	AcOH	4	1 ora e 30 minuti
	Oxyma-Pure	4	
	DIC	4	
3	AcOH	3	1 ora
	Oxyma-Pure	3	
	DIC	3	
4	AcOH	3	2 ore
	Oxyma-Pure	3	
	DIC	3	

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln-OH	368,38
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297,30
Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11
DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
AcOH	60,05

Il peptide si sblocca con HFIP 30% in DCM per 1 ora. Il peptide si purifica attraverso cromatografia a fase inversa (paragrafo 3.2.3). Si utilizzano i seguenti eluenti: A) H₂O milliQ, B) MeCN:H₂O milliQ 9:1.

Resa prodotto grezzo: 54 %

Resa prodotto: 12 %, Purezza 93%.

LC-MS in CH₃OH - gradiente da 5 a 95 % B in 40 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - t_R =39,28 min

HRMS (ESI-TOF) del peptide TOAC¹ [MW_{calc}: 1567,92]; [M+H]⁺=1568,9043 m/z [M+2H]²⁺= 784,8954 m/z massa frammentata: 605,35 + 962,56=1567,88

3.2.6 Sintesi 1 di Toac¹¹-VX

Sequenza peptide: Ac-Aib¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-TOAC¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 130 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech), con *loading* di 0.4 mmol/g, corrispondenti a 0.325 mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido si

eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e DIC, per 60 min. Per inserire TOAC¹¹, Aib¹² e Aib¹³, si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 min), per 24 ore. Per l'acetilazione viene usata una miscela formata da Ac₂O : DIPEA (4:1) in DMF, per 45 minuti, per due volte. Per questa sintesi si utilizza la Gln con gruppo protettore Trt.

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,70
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297,30
Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11
DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
Ac ₂ OH	102,90

Nel paragrafo (3.3) si spiega come si è proceduto successivamente.

3.2.7 Sintesi 2 di Toac¹¹-VX

Sequenza peptide: Ac-Aib¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-TOAC¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 100 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Chem Impex), con *loading* di 0.53 mmol/g, che corrispondono a 0.053 mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido si eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e

DIC, per 60 min. Per inserire TOAC¹¹, Aib¹² e Aib¹³, si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 minuti), per 24 ore.

L'acetilazione si ottiene dopo la seguente serie di reazioni ripetute:

Reazione	Reagenti	Equivalenti	Tempo
1	AcOH	4	1 ora e 30 minuti
	Oxyma-Pure	4	
	DIC	4	
2	AcOH	4	1 ora e 30 minuti
	Oxyma-Pure	4	
	DIC	4	
3	AcOH	3	1 ora
	Oxyma-Pure	3	
	DIC	3	
4	AcOH	3	2 ore
	Oxyma-Pure	3	
	DIC	3	

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln-OH	368,38
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297,30
Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11
DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
AcOH	60,05

Il peptide si sblocca con HFIP 30% in DCM per 1ora. Il peptide si purifica attraverso cromatografia a fase inversa (paragrafo 3.2.3). Si utilizzano i seguenti eluenti: A) H₂O milliQ , B) MeCN:H₂O milliQ 9:1.

Resa prodotto grezzo: 56%

Resa prodotto: 7 % , Purezza 94%.

HPLC in CH₃OH - gradiente da 5 a 95 % B in 60 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - t_R = 54,52 min.

HRMS (ESI-TOF) del peptide TOAC¹¹ [MW_{calc}: 1567,92]; [M+H]⁺=1568,8882 m/z [M+2H]²⁺= 784,9156 m/z.

3.2.8 Sintesi 1 di Toac^{1,11}-VX

Sequenza peptide: Ac-TOAC¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-TOAC¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 100 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech), con *loading* di 0.4 mmol/g, corrispondenti a 0.040 mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido si eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e DIC, per 60 min. Per inserire TOAC¹¹, Aib¹², Aib¹³ e TOAC¹ si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 minuti), per 24 ore. Per l'acetilazione viene usata una miscela formata da Ac₂O : DIPEA (4:1) in DMF, per 45 minuti, per due volte. Per questa sintesi si utilizza la Gln con gruppo protettore Trt.

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,70
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297.30

Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11
DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
Ac ₂ O	102,90

Si esegue uno sblocco in piccolo del peptide con HFIP 30% in DCM per 1 ora.

3.2.9 Sintesi 2 di Toac^{1,11}-VX

Sequenza peptide: Ac-TOAC¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-TOAC¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 100 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech), con *loading* di 0.4 mmol/g, corrispondenti a 0.040 mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido, anche per TOAC¹, si eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e DIC, per 60 min. Per inserire TOAC¹¹, Aib¹² e Aib¹³, si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 minuti), per 24 ore. Per l'acetilazione viene usata una miscela di Ac₂O : DIPEA (4:1) in DMF, per 45 minuti, per due volte. Per questa sintesi si utilizza la Gln con gruppo protettore Trt.

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,70
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297,30
Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11

DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
Ac ₂ OH	102,90

Si fa uno sblocco in piccolo del peptide con HFIP 30% in DCM per 1 ora.

3.2.10 Sintesi 3 di Toac^{1,11}-VX

Sequenza peptide: Ac-TOAC¹-Gly²-Ala³-Leu⁴-Aib⁵-Gln⁶-Aib⁷-Val⁸-Aib⁹-Ala¹⁰-TOAC¹¹-Aib¹²-Aib¹³-Gln¹⁴-Phol¹⁵

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 3.2.1.

Si sono pesati 100 mg della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Chem Impex), con *loading* di 0.53 mmol/g, che corrispondono a 0.053 mmol (1 equivalente). Per ciascun amminoacido si eseguono 2 *coupling* con 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto, Oxyma-Pure e DIC, per 60 min. Per inserire TOAC¹¹, Aib¹² e Aib¹³, si utilizzano invece 3 equivalenti del corrispondente AA N-protetto e TFFH in presenza di 6 equivalenti di DIPEA (necessaria pre-attivazione di 15 minuti), per 24 ore.

Per ogni *coupling* di TOAC¹ (riportati nella tabella sottostante) si esegue una pre-attivazione di 15 minuti:

N° <i>Coupling</i>	Reagenti	Equivalenti	Tempo
1	Fmoc-TOAC-OH	3	24 ore
	TFFH	3	
	DIPEA	3	
2	Fmoc-TOAC-OH	0,3	24 ore
	TFFH	0,3	
	DIPEA	0,3	
3	Fmoc-TOAC-OH	0,6	24 ore
	TFFH	0,6	
	DIPEA	0,6	

L'acetilazione si esegue attraverso i seguenti step:

Reazione	Reagenti	Equivalenti	Tempo
1	AcOH	4	1 ora e 30 minuti
	Oxyma-Pure	4	
	DIC	4	
2	AcOH	4	1 ora e 30 minuti
	Oxyma-Pure	4	
	DIC	4	
3	AcOH	3	1 ora
	Oxyma-Pure	3	
	DIC	3	
4	AcOH	3	2 ore
	Oxyma-Pure	3	
	DIC	3	

Reagente	MW (g/mol)
Fmoc-Gln-OH	368,38
Fmoc-Aib-OH	325,36
Fmoc-Ala-OH	311,33
Fmoc-Val-OH	339,39
Fmoc-Leu-OH	353,40
Fmoc-Gly-OH	297,30
Fmoc-TOAC-OH	437,55
Oxyma-Pure	142,11
DIC	126,20
DIPEA	129,24
TFFH	264,12
AcOH	60,05

Il peptide si sblocca con HFIP 30% in DCM per 1 ora. Il peptide si purifica attraverso cromatografia a fase inversa (paragrafo 3.2.3). Si utilizzano i seguenti eluenti: A) H₂O milliQ , B) MeCN:H₂O milliQ 9:1.

Resa prodotto grezzo: 56%

Resa prodotto purificato: non è stato possibile calcolarla a causa di perdita accidentale del prodotto.

Purezza: 75%.

LC-MS in CH₃OH - gradiente da 5 a 95 % B in 60 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - t_R = 47,42 min.

HRMS (ESI-TOF) del peptide TOAC¹¹ [MW_{calc}: 1680,00]; [M+H]⁺=1680,9651 m/z

[M+ 2H]²⁺= 840,9655 m/z

3.3 Ottimizzazione dello sblocco dalla resina di Toac¹¹-VX

Si è cercato di fare un'ottimizzazione dello sblocco del peptide dalla resina, soprattutto focalizzandosi sulla rimozione del gruppo protettore, Trt, in catena laterale dell'amminoacido Gln.

Si eseguono varie prove su un batch di peptide preparato precedentemente nel laboratorio, dividendole in due gruppi principali.

Il primo gruppo costituito da 11 prove in piccolo, rappresentate nella tabella "1". Per ogni prova, Si prelevano pochi granelli di resina, si inseriscono in una siringa e si seccano con DCM. Si prepara la soluzione in boccetta, la quale verrà inserita nella siringa e si lascia reagire, agitando, per il tempo riportato.

Numero sblocco	Acido (TFA)	Scavenger (TIS o H ₂ O)	Tempo (ore)
1	20%	2,5 % (H ₂ O)	2 e 30 min
2	20%		2 e 30 min
3	10%		24
4	10%	5% (TIS)	5
5	10%	2,5% (TIS) e 5% (H ₂ O)	24
6	10%	2,5%(TIS) e 2,5%(H ₂ O)	16
7	5%	2,5% (TIS) e 2,5%(H ₂ O)	24
8	10%	2,5% (TIS)	14
9	5%	2,5%(TIS)	9

10	5%	2,5% (TIS)	7
11	5%	2,5%(TIS) e 1% (H ₂ O)	7

Tabella 1: primo gruppo di prove per ottimizzazione sblocco TOAC¹¹-VX.

Il secondo gruppo è costituito da 9 reazioni, rappresentate nella tabella “2”. Per ogni prova, si preleva la quantità di resina riportata, si inserisce in una siringa e si secca con DCM. Si fa lo sblocco della resina con HFIP 30% in DCM per 1 ora. Si porta a secco con il flusso di N₂. Il peptide grezzo si inserisce in un pallone con la soluzione precedentemente preparata in boccetta e si lascia reagire, agitando, per il tempo riportato. Finito il tempo di reazione si aggiunge CH₃OH, in un volume doppio rispetto a quello utilizzato per la reazione e si tira a secco con il rotavapor.

Nome Reazione	Massa iniziale resina prelevata (mg)	Massa (mg) dopo 1h di trattamento con 30% HFIP in DCM	Miscela di deprotezione delle catene laterali	Tempo di reazione in pallone
A	10	4	5%(TFA) 2,5%(TIS)	9 ore
B	5	2	5%(TFA) 2,5%(TIS)	7 ore
C	50	24(introdotti 5 mg nel pallone)	5% (TFA) 2,5%(TIS)	5 ore
C2 (partendo da C)		4	30% (HFIP)	weekend
D (partendo da C)		3	5% (TFA) 2,5% (TIS)	6 ore

E (partendo da C)		4	5%(TFA) 2,5% (TIS) 1%(H ₂ O)	7 ore
F (partendo da C)		3	5%(TFA) 2,5% (TIS) 2,5%(H ₂ O)	7 ore
G (partendo da C2)		4	5% (TFA) 2,5%(TIS)	7 ore
H	50	23	5% (TFA) 2,5%(TIS)	7 ore

Tabella 2: secondo gruppo di prove per ottimizzazione sblocco TOAC¹¹-VX, con preventivo sblocco dalla resina e successiva deprotezione delle catene laterali.

3.4 Loading della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Irish Biotech)

Per il calcolo del *loading* (numero di mmoli di siti attivi per grammo di resina) della resina, si preleva 11,24 mg di resina con *loading* 0,4 mmol/g, si segue la procedura descritta al paragrafo “3.2.1”, facendo un solo *coupling* di 3 equivalenti di un amminoacido (Fmoc-Gly-OH), Oxyma-Pure e DIC. Le soluzioni delle deprotezioni si mettono in un matraccio da 10 ml ed i lavaggi della siringa si eseguono sempre nel matraccio, fino ad arrivare a volume.

Dopo questa procedura si ricava l'assorbanza dell'addotto formatosi tra dibenzofulvene e DIPEA, tramite l'utilizzo dello spettrofotometro UV-Visibile, poiché assorbe ad una lunghezza d'onda (λ) di 288,97 nm.

Per la misura, si utilizza una cella di quarzo con un cammino ottico di 1 cm, contenente un volume pari a 3ml della soluzione.

Dal valore di assorbanza si potrà calcolare il Loading della resina.

3.5 Leakage

Per le SUV di tipo PC/Ch:

In un provettone a sfondo sferico si pesano 25.1 mg di PC (MW: 768.93 g/mol) che corrispondono a 32.6 μmol . Si aggiungono quindi 5.4 mg di Ch (MW: 386.7 g/mol) che corrispondono a 14 μmol . Si scioglie il tutto con DCM, ottenendo quindi una soluzione 7:3 di PC/Ch. Si evapora il solvente sotto flusso di azoto ottenendo un film omogeneo e si pone il provettone in essiccatore per un'ora e mezza.

Nel frattempo, si prepara una soluzione di CF 50.2 mM, sciogliendo 113.4 mg di CF in 4 mL di H₂O, 1 mL di NaOH 1M e 1 mL di una soluzione Hepes 30 mM a pH 7.40.

Si idrata il film fosfolipidico con questi 6 mL di soluzione di CF, avendo cura di mescolare bene per staccare i fosfolipidi dal fondo del provettone. Si ottiene un rapporto CF/lipidi totali di 6/1. Si lascia incubare la miscela a temperatura ambiente, al buio, per una notte. Si ottengono così liposomi multilamellari.

Il giorno seguente si sonica la miscela al buio in bagno di ghiaccio per 30 minuti.

Si procede quindi a eliminare la CF non inglobata nelle SUV utilizzando cromatografia a esclusione dimensionale. Si usa una colonna Sephadex G-75 (5.6g). Come eluente si utilizza una soluzione NaCl 100 mM tamponata con Hepes 5 mM a un pH di 7.40, precedentemente degassata.

Supponendo di aver raccolto la totalità dei lipidi, si porta a 250 mL con l'eluente la miscela di SUV per ottenere una soluzione di circa 0.06 mM. Questa miscela è mantenuta al buio in bagno di ghiaccio.

Per le SUV di tipo PE/PG:

In un provettone a sfondo sferico si pesano 21.51mg di PE (MW: 768.0 g/mol) che corrispondono a 28 μmol . Si aggiungono quindi 9.59mg di PG. (MW: 797.04 g/mol) che corrispondono a 12 μmol . Si scioglie con DCM. Si ottiene quindi una soluzione 7:3 di PE/PG. Si evapora il solvente con flusso di azoto e si pone in essiccatore per un'ora e mezza.

Nel frattempo si prepara una soluzione di CF 50.2 mM, sciogliendo 113.4 mg di CF in 4 mL di H₂O, 1 mL di NaOH 1M e 1 mL di una soluzione Hepes 30 mM a pH 7.40.

Si idrata il film fosfolipidico con questi 6 mL di soluzione di CF, avendo cura di mescolare bene per staccare i fosfolipidi dal fondo del provettone. Si ottiene un rapporto CF/lipidi

totali di 6/1. Si lascia incubare la miscela a temperatura ambiente, al buio, per una notte. Si ottengono così liposomi multilamellari.

Il giorno seguente si sonica la miscela al buio in bagno di ghiaccio per 30 minuti. Questo passaggio serve per ottenere vescicole unilamellari. Si procede quindi a eliminare la CF non inglobata nelle SUV utilizzando cromatografia a esclusione dimensionale. Si usa una colonna Sephadex G-75 (5.6 g). Come eluente si utilizza una soluzione NaCl 100 mM tamponata con Hepes 5 mM a un pH di 7.40, precedentemente degassata.

Supponendo di aver raccolto la totalità dei lipidi, si porta a 100 mL con l'eluente la miscela di SUV per ottenere una soluzione di 0.4 mM. Si portano quindi 37.5 mL di questa soluzione a 250 mL, per ottenere una concentrazione di 0.06 mM. Questa miscela è mantenuta al buio in bagno di ghiaccio.

Misure di intensità di fluorescenza:

Si procede quindi con la misurazione di rilascio della CF dalle SUV indotta dai peptidi, attraverso esperimenti d'intensità di fluorescenza in cuvette usa e getta di polistirene con cammino ottico di 1 cm, contenenti 2.5 mL di sospensione lipidica. Le misure sono state eseguite utilizzando il fluorimetro Perkin-Elmer LS50B a temperatura ambiente, eccitando a 488 nm e leggendo l'emissione di fluorescenza a 520 nm.

Si inseriscono diverse aliquote di peptide sciolto in CH₃OH con concentrazione 10⁻³M, 10⁻⁴M e 10⁻⁵M, per ottenere valori crescenti di rapporto peptide/lipide (R⁻¹). Si determina l'intensità massima di fluorescenza distruggendo le vescicole con 50 µL di una soluzione di Triton X-100 al 10% in acqua.

La percentuale di CF rilasciata dalle vescicole ai diversi valori di R⁻¹ viene calcolata attraverso la seguente relazione: $\%CF = \frac{F_{20} - F_0}{F_T - F_0} \times 100$

Con: F₀= intensità di fluorescenza delle SUV in assenza del peptide; F₂₀= intensità di fluorescenza in presenza del peptide dopo 20 minuti; F_T = intensità totale di fluorescenza, dopo trattamento con Triton X.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Sintesi peptidica su fase solida

Nel 1963 nasce la Sintesi Peptidica su Fase Solida (SPPS-solid phase peptide synthesis), grazie all'idea rivoluzionaria del biochimico Merrifield,³¹ che grazie a questa invenzione vinse nel 1984 il premio Nobel.

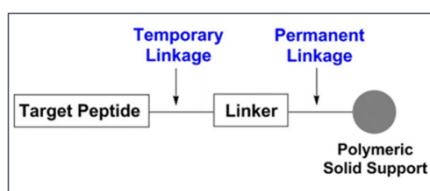


Figura 8: Immobilizzazione del peptide su un supporto solido tramite linker.

Questa tecnica prevede l'utilizzo di una resina, che ha la funzione di un supporto solido inerte, insolubile e spugnoso che si rigonfia con il solvente. Nelle cavità della resina, su siti predisposti, il peptide cresce un amminoacido per volta.³¹

Il peptide è legato alla resina covalentemente all'estremità C-terminale e la sintesi procede in maniera sequenziale utilizzando amminoacidi attivati ed N^α-protetti.³²

La crescita avviene quindi in senso opposto rispetto a quanto si verifica in natura. Questa scelta permette di minimizzare il rischio di epimerizzazione della catena peptidica per via della formazione dell'addotto 5(4*H*) ossazolone (figura 9).³² In condizioni basiche, quando l'azoto dell'amminoacido attivato alla funzione carbossilica (-X) è acilato (come quando è coinvolto in un legame peptidico), la formazione di questo composto ciclico per reazione intramolecolare è favorita dalla presenza del buon gruppo uscente (-X). Siccome con la procedura sopra descritta ad essere attivato è un singolo amminoacido, protetto alla posizione α -amminica da un gruppo uretanico, questo processo è fortemente limitato.³³ La formazione dell'ossazolone è disincentivata e la presenza dell'ossigeno uretanico sembra portare anche ad una destabilizzazione dell'intermedio carico negativamente che si forma durante la racemizzazione, impedendola ulteriormente.

L'epimerizzazione durante la sintesi peptidica può avvenire anche per enolizzazione diretta attraverso tautomerizzazione cheto-enolica (Figura 9).³⁴

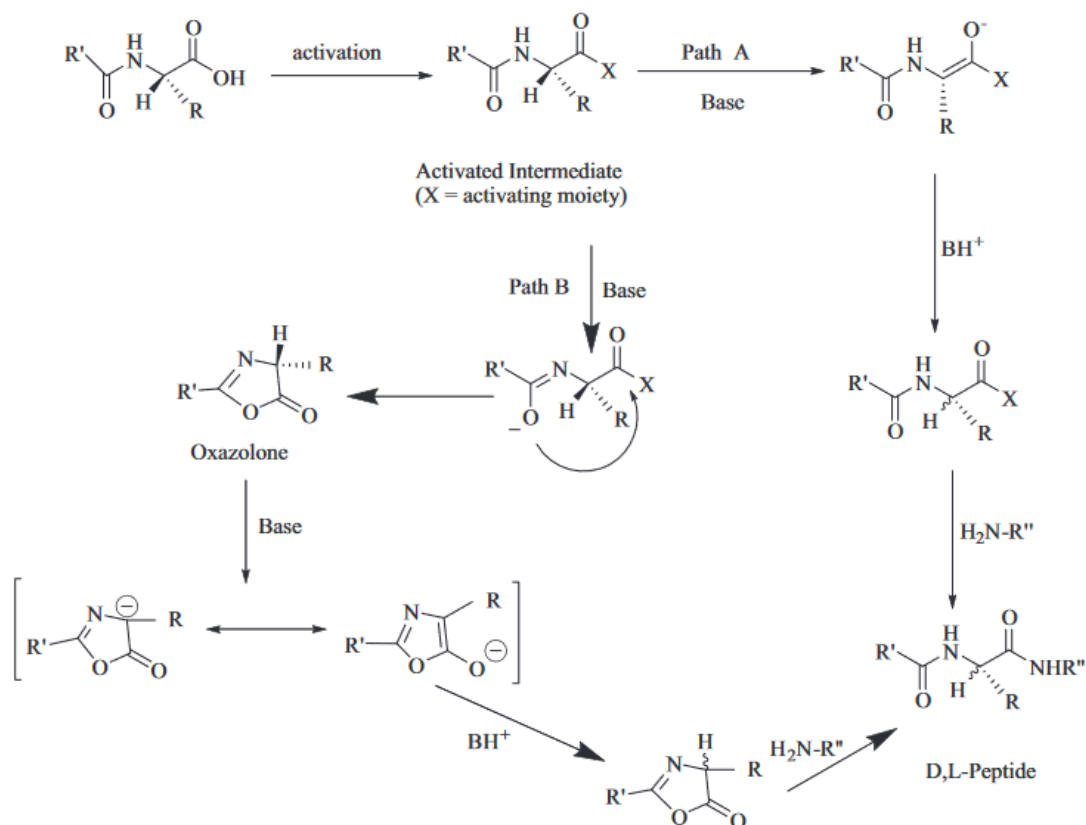


Figura 9: Path A: racemizzazione per enolizzazione diretta. Path B: racemizzazione attraverso la formazione di 5(4H)ossazolone.

I vantaggi della sintesi in fase solida sono molteplici. La sintesi è costituita da una serie di passaggi ripetitivi (step di accoppiamento peptidico, seguito da lavaggi; deprotezione della funzione α -amminica, seguita da lavaggi) e per questo è automatizzabile. Si utilizza un largo eccesso di amminoacido attivato e dei reagenti. Il processo avviene in unico recipiente, una siringa per fase solida che ha la funzione di un reattore, l'eccesso di reagenti impiegato si elimina per semplice filtrazione, dato che il peptide cresce sul supporto insolubile. Infatti, grazie all'uso di un setto poroso, permeabile ai liquidi, ma impermeabile alla resina, è possibile allontanare i solventi, i reattivi e i sottoprodotti disciolti per filtrazione. In questo modo non si rischia di perdere il prodotto nei vari passaggi della sintesi, in quanto il peptide rimane saldamente ancorato alla resina per tutta la procedura.

Alcune limitazioni di questa tecnica, invece, riguardano soprattutto l'impossibilità di un controllo diretto dei vari passaggi di sintesi. Per il controllo puntuale si deve prelevare una piccola quantità di granelli di resina e staccare il prodotto, ma questo procedimento richiede tempo ad ogni singolo passaggio e diminuisce le rese finali. Altri svantaggi di questo tipo di sintesi sono: (i) il costo elevato delle resine, che però può essere sostenibile per la

produzione di prodotti farmaceutici; (ii) l'utilizzo di un elevato eccesso di reagenti, soprattutto durante i *coupling*; e (iii) la possibilità di formazione di sequenze con amminoacidi in più o in meno oppure sottoprodotti derivanti da reazioni collaterali.

4.1.1 Resine

La resina è un supporto solido, inerte, insolubile e con porosità tale da garantire la crescita della catena e l'accesso dei reagenti. In commercio esistono diversi tipi di resine, la più comune è costituita da sferette di un polimero di polistirene reticolato con l'1-2% di divinilbenzene³¹ (Figura 10). Quest'ultimo crea dei cross-link, reticolazioni, tra le catene del polistirene aumentandone la resistenza meccanica, senza comprometterne la capacità di rigonfiamento.

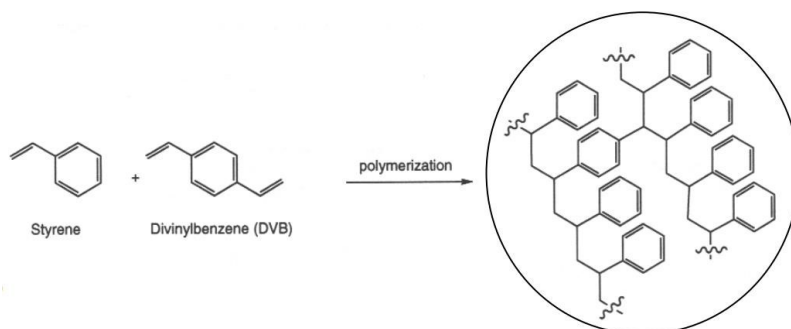


Figura 10: Struttura delle resine di tipo stirene/divinilbenzene.

Il primo amminoacido della catena peptidica è legato alla resina attraverso un *linker*. Il *linker* determina le condizioni di distacco del peptide, le quali devono risultare ortogonali a quelle di rimozione del gruppo protettore della funzione amminica della catena principale.

Il numero di *linker* determina il *loading* della resina, in mmol/g, cioè quante moli di peptide sono in grado di legarsi ad ogni grammo di resina. Questo valore non deve essere troppo elevato per garantire che l'accesso dei reagenti non venga ostacolato da un numero elevato di catene.

La resina utilizzata per questo lavoro di Tesi è la Phol-2-clorotritile (Figura 11A) con *linker* 2-CloroTritile³⁴.

In particolare, la resina è commercialmente disponibile avente già legato il residuo di fenilalaninolo (Phol) C-terminale, l'amminoalcol presente nella forma nativa di pentadecaibina. Questa resina è detta super acido labile in quanto per staccare il peptide dal

supporto è sufficiente un trattamento con alcoli fluorurati come HFIP al 30% o con una percentuale molto bassa di TFA, in DCM (Figura 11 B-C) .

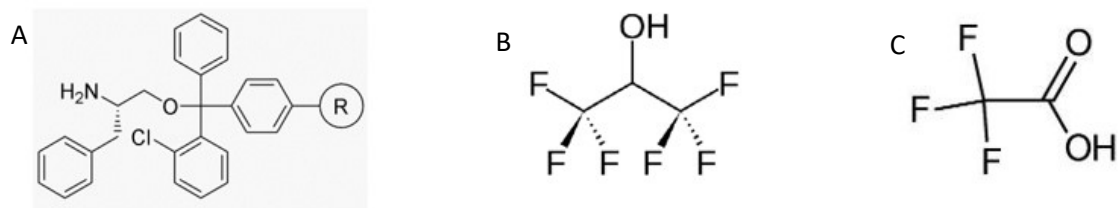


Figura 11: A) Resina Phol-2-clorotritile; B) struttura del HFIP; C) struttura del TFA.

4.1.2 Fmoc-AA-OH

Nella sintesi in fase solida, si utilizzano amminoacidi protetti con un gruppo uretanico. Questo gruppo è un elettronnattrattore in grado di impoverire la densità elettronica sull'atomo di ossigeno carbonilico e sull'azoto. Esso deve essere facilmente eliminabile in condizioni ortogonali rispetto a quelle utilizzate per rimuovere il peptide dalla resina e con meccanismi privi di reazioni collaterali ed essere inerte nelle condizioni di *coupling*. Il gruppo protettore uretanico inoltre contribuisce a preservare l'integrità del centro chirale in α .

Gli amminoacidi utilizzati in questo lavoro di sintesi sono protetti dal gruppo protettore Fmoc, 9-Fluorenilmetossicarbonile (Figura 12),

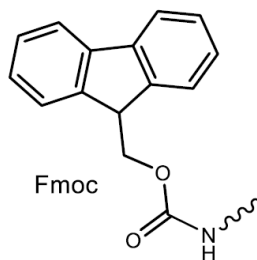


Figura 12: gruppo protettore Fmoc.

Il gruppo Fmoc è molto stabile in condizioni acide, ma si elimina facilmente in ambiente debolmente basico, in presenza di ammine secondarie³⁵. Per la sua rimozione si utilizza di solito una soluzione di piperidina al 20% in DMF, che porta alla formazione di CO₂ e del dibenzofulvene, un composto fortemente solubile in solvente organico che reagisce con la piperidina a formare un addotto stabile, facilmente eliminabile dall'ambiente di reazione grazie a dei lavaggi con DMF seguiti da filtrazione .

Il meccanismo di rimozione dello Fmoc è descritto in Figura 13.

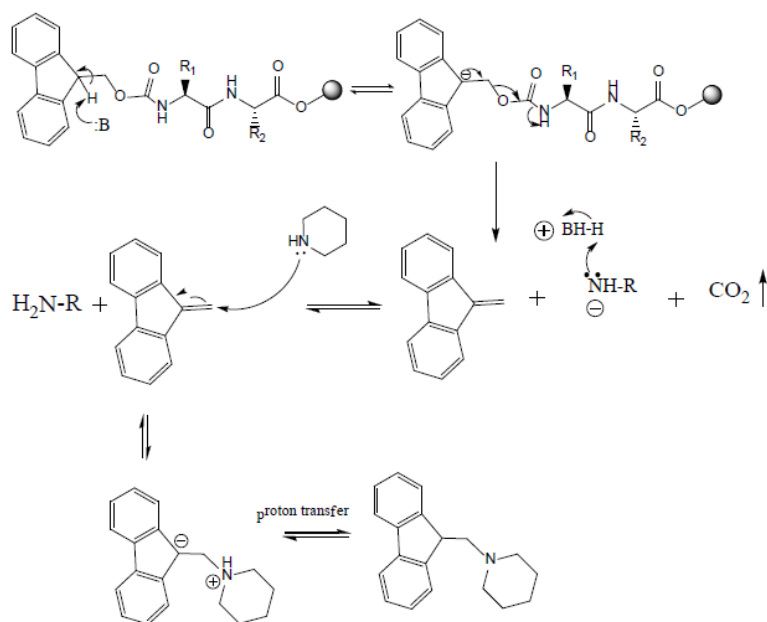


Figura 13: Meccanismo di rimozione dello Fmoc³⁵ e formazione dell' addotto tra dibenzofulvene e piperidina.

La rimozione del gruppo Fmoc è una reazione veloce a temperatura ambiente, di tipo E1cb, che passa per la formazione di un anione stabilizzato per delocalizzazione a formare dibenzofulvene e anidride carbonica. La piperidina è quindi in grado di reagire con la molecola di dibenzofulvene che si forma, ottenendo un addotto. Questo addotto impedisce al dibenzofulvene di formare sottoprodotti insolubili di difficile eliminazione.³⁵

4.1.3 Attivatori di *coupling*

La formazione del legame peptidico tra due amminoacidi avviene con una reazione di *coupling* (Figura 14), che non avviene spontaneamente a temperatura ambiente e necessita di un'attivazione della funzione α -carbossilica, con inserimento di un buon gruppo uscente.³⁶

L'attivazione della funzione α -carbossilica rende possibile ed efficace l'attacco nucleofilo della funzione α -amminica sul carbonio carbonilico, che risulta essere molto più elettropositivo³⁷.

Inoltre, l'attivazione non deve portare alla formazione di sottoprodotti non eliminabili e non deve compromettere la purezza ottica del carbonio adiacente.

In questo lavoro di Tesi, per la sintesi in fase solida, si sono scelti gli attivatori di *coupling* (Figura 15) Oxyma-Pure insieme alla DIC e TFFH insieme alla DIPEA (ammina terziaria).

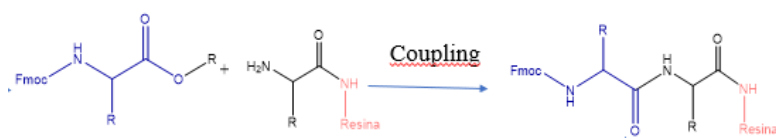


Figura 14: Formazione del legame peptidico durante il *coupling*

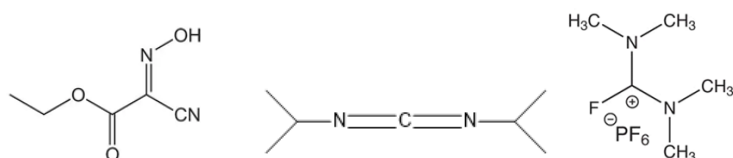


Figura 15: Attivatori di *coupling* a) Oxyma-Pure; b) DIC; c) TFFH.

La DIC, una carbodiimmide, reagisce con l'amminoacido entrante portando alla formazione di O-acilisourea, una specie molto reattiva e che può fare reazioni secondarie non desiderate. Per questo motivo si utilizza l'Oxyma-Pure, in grado di reagire con l'O-acilisourea, formando un intermedio meno reattivo, ma in grado di favorire il *coupling*, chiamato estere attivo. Il sottoprodotto che si forma dopo l'attivazione è solubile in DMF e può essere eliminato attraverso una serie di lavaggi, seguiti da filtrazione.

La procedura per formazione dell'estere attivo consiste nel mettere nella siringa per primo l'amminoacido Fmoc-protetto, poi Oxyma-Pure e infine la DIC. In questo modo, appena si forma l'O-acilisourea viene immediatamente trasformata in estere attivo, per la presenza dell'Oxyma-Pure.

Il meccanismo di attivazione seguito da *coupling* è descritto nella Figura 16 .

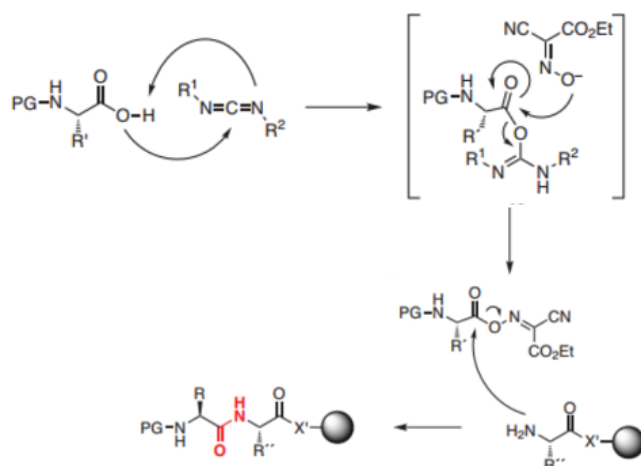


Figura 16: Meccanismo di attivazione seguito dal *coupling*³⁸.

Il TFFH (Tetrametilfluoroformamidinio esafluorofosfato) un sale non igroscopico stabile alla manipolazione sotto condizioni ordinarie, è un conveniente reagente per la conversione *in situ* di un acido carbossilico nel corrispondente fluoruro acilico, anche su amminoacidi N-protetti durante la sintesi di peptidi³⁹.

Gli amminoacidi Fmoc-protetti reagiscono con TFFH in presenza di una base come la DIPEA, per formare i fluoruri acilici, con rilascio di tetrametilurea. Per l'attivazione dell'amminoacido è necessario inserire il doppio degli equivalenti di base rispetto all'amminoacido e al TFFH.⁴⁰

In presenza di DMF come solvente, servono almeno 7 minuti di pre-attivazione³⁹ in boccetta, in modo da attivare il carbossile, prima della reazione di *coupling*.

Il meccanismo di attivazione seguito dal *coupling* è descritto in Figura 17.

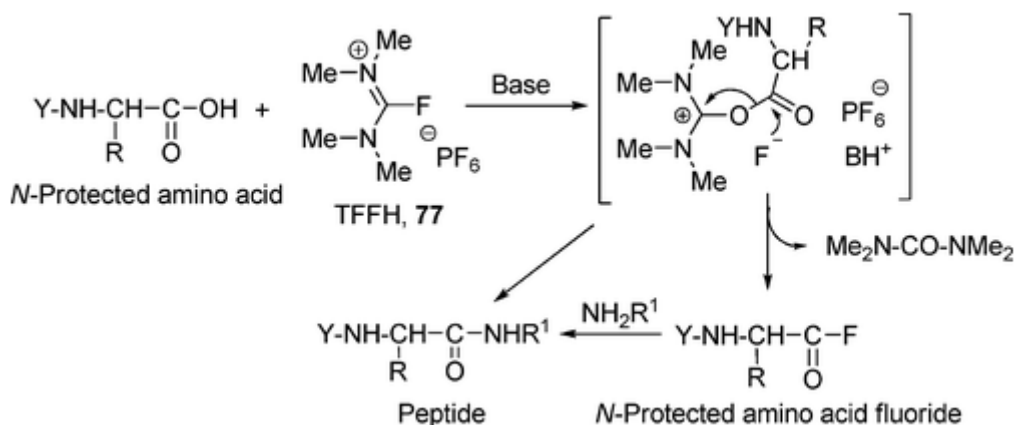


Figura17: Meccanismo di attivazione con TFFH seguito dal *coupling*³⁹.

4.1.4 Considerazioni sulla reattività di alcuni amminoacidi

Quando nella sintesi peptidica è coinvolto un amminoacido con un gruppo funzionale in catena laterale sensibile alle condizioni di reazione o che può competere con la formazione del legame peptidico è necessario utilizzare uno o più gruppi protettori.³³

Essi devono essere ortogonali al gruppo protettore Fmoc, quindi risultare stabili in condizioni basiche.

Gln

I peptidi sintetizzati in questo lavoro contengono l'amminoacido Glutamina (Gln), che presenta in catena laterale una funzione ammidica. Anche se il gruppo ammidico è uno

scarso nucleofilo, viene protetta con il gruppo protettore Tritile (Trt) (Figura 18A). Il quale viene rimosso utilizzando un acido, l'acido trifluoroacetico (TFA) in DCM, in presenza di uno o due *scavenger* (TIS e H₂O) (Figura 18B).

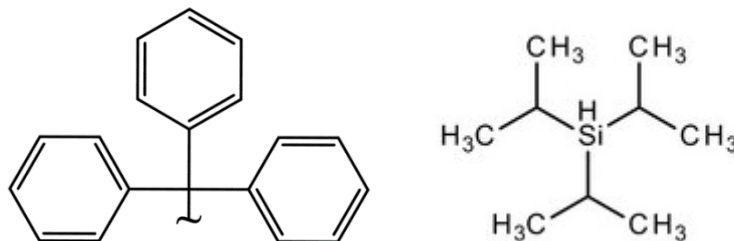


Figura 18: A) Struttura del gruppo tritile (Trt); B) Struttura del TIS.

Il TFA⁴¹ viene solitamente impiegato ad alta concentrazione (90-95%). La presenza del TOAC, il cui radicale è sensibile agli acidi, comporta che in questo lavoro di Tesi si è cercato di usarlo invece in piccole quantità. Gli *scavenger* vengono utilizzati per ridurre al minimo le reazioni secondarie di alchilazione che si possono verificare con residui sensibili ai carbocationi che si liberano nella rimozione del gruppo protettore.

Il tritile che si libera dalla deprotezione della catena laterale ha un'elevata idrofobicità⁴¹, per questo si sfruttano lavaggi con etere etilico per eliminarlo. Nel caso di sequenze peptidiche particolarmente idrofobiche, tuttavia, come le pentadecaibine, può succedere che esso non venga completamente rimosso dal prodotto grezzo. Il tritile possiede un'elevata assorbanza UV e la sua presenza anche in piccole quantità può compromettere l'analisi HPLC del peptide grezzo.⁴² Nel caso di peptidi con un amminoalcol C-terminale, come la pentadecaibina, l'uso di TFA può portare alla formazione di un estere trifluoroacetico C-terminale, con il TFA quindi legato alla sequenza peptidica. Per rimuoverlo, si deve aver cura di versare la miscela di sblocco in una quantità doppia in volume di CH₃OH rispetto al TFA utilizzato. In questo modo si ottiene il peptide grezzo non esterificato.

Aib

L'amminoacido Aib (Figura 2A), il più semplice α -amminoacido C ^{α} -tetrasostituito, è caratterizzato dalla presenza di due gruppi metilici sul C ^{α} , che impongono una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile, che risulta essenzialmente confinato alla regione delle conformazioni elicoidali di tipo α e di tipo 3₁₀.¹⁹

Un aspetto da tener presente nell'ottimizzazione della sintesi è la sua scarsa reattività nella reazione di *coupling*, che è data dall'ingombro sterico causato dai due gruppi metili geminali.

L'ingombro influenza la reattività sia del gruppo amminico sia della funzione carbossilica, anche se in misura diversa (la reattività del gruppo amminico è maggiormente compromessa). Grazie all'uso degli attivatori di *coupling* selezionati, Oxyma-Pure e DIC (Paragrafo 4.1.3), è sufficiente ripetere due volte la reazione di *coupling* con reattivi freschi sia per l'inserimento dell'Aib stesso, sia per quello dell'amminoacido successivo, mentre per l'inserimento in serie di Aib si utilizza l'attivatore di *coupling* TFFH (Paragrafo 4.1.3), con una sola reazione di *coupling* di 24 ore.

TOAC

L'amminoacido C^α-tetrasostituito, radicalico, TOAC (Figura 6) è caratterizzato da una struttura eterociclica satura (anello piperidinico), contenente un radicale libero (il gruppo nitrossile) stabilizzato dalla presenza di due atomi di carbonio tetrasostituiti ad esso vicinali.²⁵⁻²⁶

Il gruppo nitrossile è una sonda estremamente utile e versatile per studi EPR. La scelta di utilizzare come sonda l'amminoacido non naturale TOAC è motivata dal fatto che quest'ultimo, a differenza di altre sonde, presenta una notevole rigidità strutturale. Ciò permette di ottenere delle misure affidabili da cui ricavare l'esatta distanza tra sonde e la loro orientazione.

L'amminoacido TOAC è utilizzato in sostituzione dei residui di Aib nelle posizioni della sequenza: Aib¹, Aib¹¹ e Aib^{1,11}.

Pertanto la sostituzione dell'Aib con il TOAC in questi analoghi della pentadecaibina è attesa mantenere sostanzialmente inalterata la conformazione del peptide.

Invece, un aspetto da tener presente nell'ottimizzazione della sintesi è la sua scarsa reattività nella reazione di *coupling*, che è data dall'ingombro sterico dell'anello. Grazie all'uso dell'attivatore di *coupling* TFFH (Paragrafo 4.1.3), si può inserire efficacemente il TOAC con un unico *coupling*, oppure una serie di *coupling* con reattivi freschi.

4.2 Sintesi e caratterizzazione della pentadecaibina

La sintesi di questo peptide è stata svolta in due modi diversi. Per entrambe le sintesi si è utilizzata la procedura in fase solida (Paragrafo 3.2.1). La resina è la 2-Clorotritile-Fenilalaninolo.

La struttura del peptide è riportata in Figura 19.

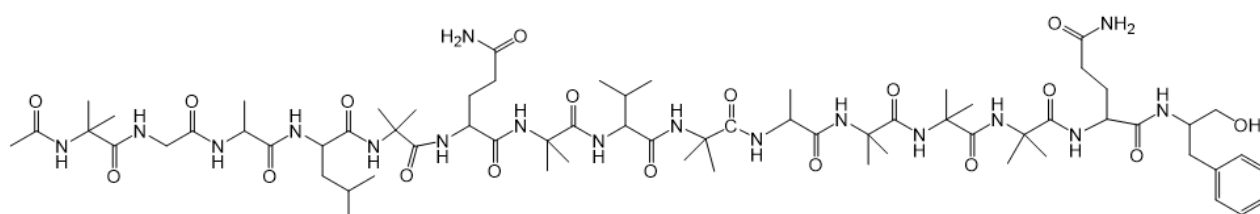


Figura 19: Struttura della pentadecaibina

Nella prima sintesi del peptide, utilizzando come reattivi di *coupling* sempre DIC e Oxyma-Pure, si è riscontrata la formazione inevitabile di sequenze delete, contenenti un numero inferiore di Aib rispetto all'atteso a livello della sequenza di tre Aib in fila presente nella parte C-terminale del peptide. Le sequenze delete vengono indicate come 'des-Aib'. Per questo motivo, si è pensato di utilizzare un nuovo metodo di sintesi sfruttando come attivatore TFFH e formando quindi il corrispondente fluoruro acilico *in situ* (paragrafo 3.2.4). Questa modifica ha eliminato la formazione di sequenze delete, come riportato nello spettro di massa ESI-TOF del prodotto grezzo (Figura 20). Questa sintesi ha portato ad ottenere il prodotto con una purezza del 90% e una resa del 4,3%. La resa bassa può essere attribuita ad un problema nel *loading* dichiarato della resina impiegata, come spiegato nel paragrafo 4.4. La purezza al 90% è dovuta alla presenza di basse quantità di impurezze di difficile separazione.

Il peptide ottenuto è stato caratterizzato attraverso analisi HRMS ESI-TOF (Figura 21) e LC-MS (Figura 22). Nello spettro di massa si osservano i picchi relativi allo ione molecolare con $m/z = [M+H]^+$ e il picco dello ione molecolare a doppia carica $[M+2H]^{2+}$. Si riscontra anche la massa frammentata.

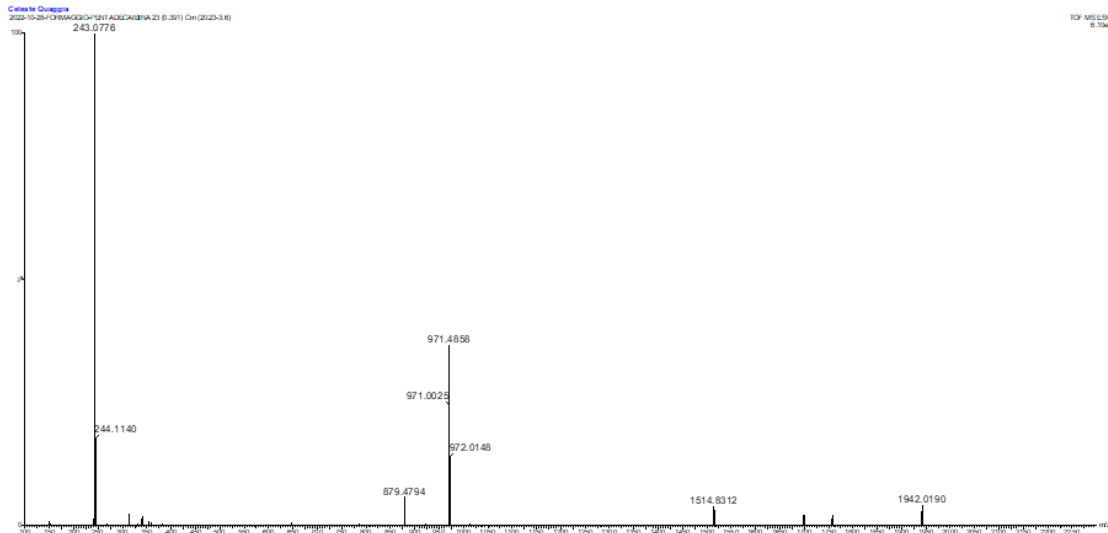


Figura 20: Spettro di HRMS ESI-TOF del peptide pentadecaibina grezzo, protetto in catena laterale: $[MW(\text{con } 2\text{Trt})_{\text{calc}}]$: 1940.0641; m/z : $[M+H]_{\text{sp}}^+ = 1941,0190$; $[M+2H]^{2+} = 971,0025$; $[Tritile] = 243,0776$.

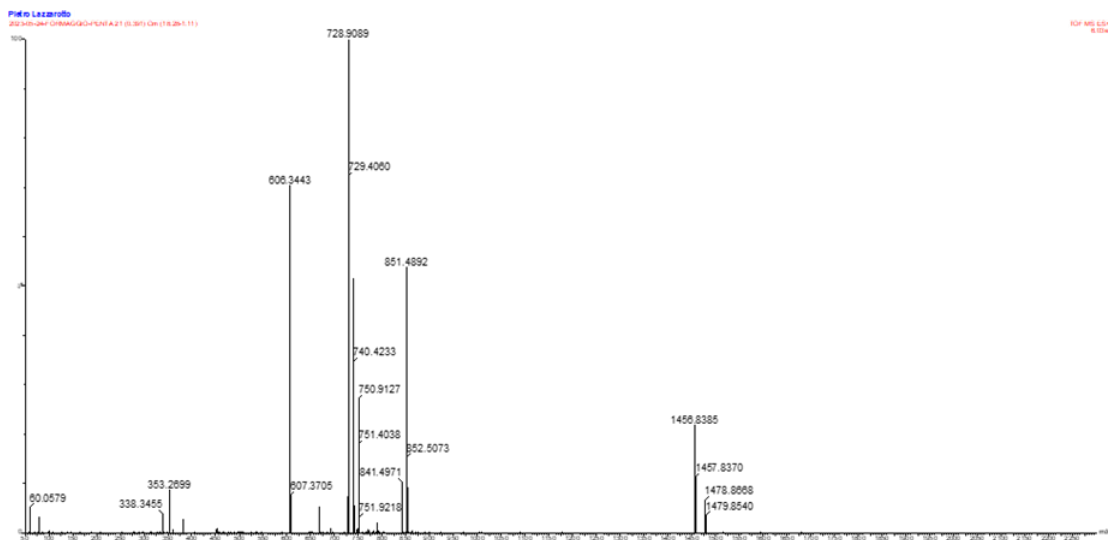


Figura 21: Spettro di HRMS ESI-TOF del peptide pentadecaibina $[MW_{\text{calc}}: 1455,8449]$; m/z sperimentali: $[M+H]^+ = 1456,8385$; $[M+ 2H]^{2+} = 728,9089$; massa frammentata: $605,34+850,48=1455,82$

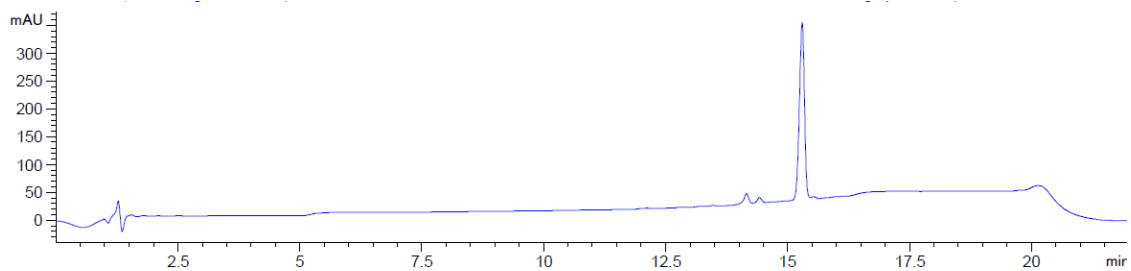


Figura 22: Cromatogramma LC-MS del peptide Pentadecaibina dopo purificazione gradiente: da 40 a 100 % B in 18 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - $t_R = 15,29$ min - Purezza 90%.

4.3 Sintesi e caratterizzazione di analoghi di pentadecaibina

4.3.1 TOAC¹-VX

La sintesi di questo peptide è stata svolta in due modi diversi. Per entrambe le sintesi si è utilizzata la procedura in fase solida (Paragrafo 3.2.1). La resina è la 2-Clorotritile-Fenilalaninolo.

La struttura del peptide è riportata in Figura 23.

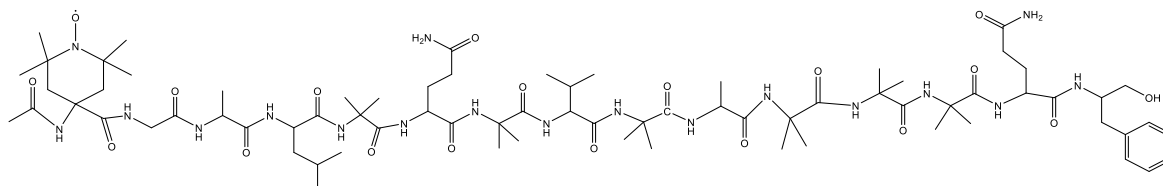


Figura 23: Struttura di TOAC¹-VX, analogo di pentadecaibina.

Come per la pentadecaibina, anche in questo caso l'uso di DIC/Oxyma-Pure come attivatori per tutti gli step sintetici ha prodotto sequenze 'des-Aib'. Per questo motivo, si è utilizzato il nuovo metodo di sintesi impiegando l'attivatore TFFH, che ha eliminato il problema. Poiché la presenza del TOAC ha comportato l'insorgenza di altre problematiche sintetiche, è stato inoltre necessario usare la Gln senza gruppo protettore, ideare una nuova procedura di *coupling* per il TOAC¹ e infine una diversa strategia di acetilazione. I motivi per cui questi interventi sono stati necessari sono descritti nei paragrafi 4.3.3 e 4.3.4. La sintesi ottimizzata ha portato ad ottenere il prodotto con una purezza del 93% e una resa del 12%. La resa moderata è dovuta anche alla perdita di prodotto causata dalla purificazione.

Il peptide ottenuto è stato caratterizzato attraverso analisi di HRMS ESI-TOF (Figura 24) e HPLC (Figura 25). Nello spettro di massa si osservano i picchi relativi allo ione molecolare con $m/z = [M+H]^+$ e il picco dello ione molecolare a doppia carica $[M+2H]^{2+}$. Si riscontra anche la massa frammentata.

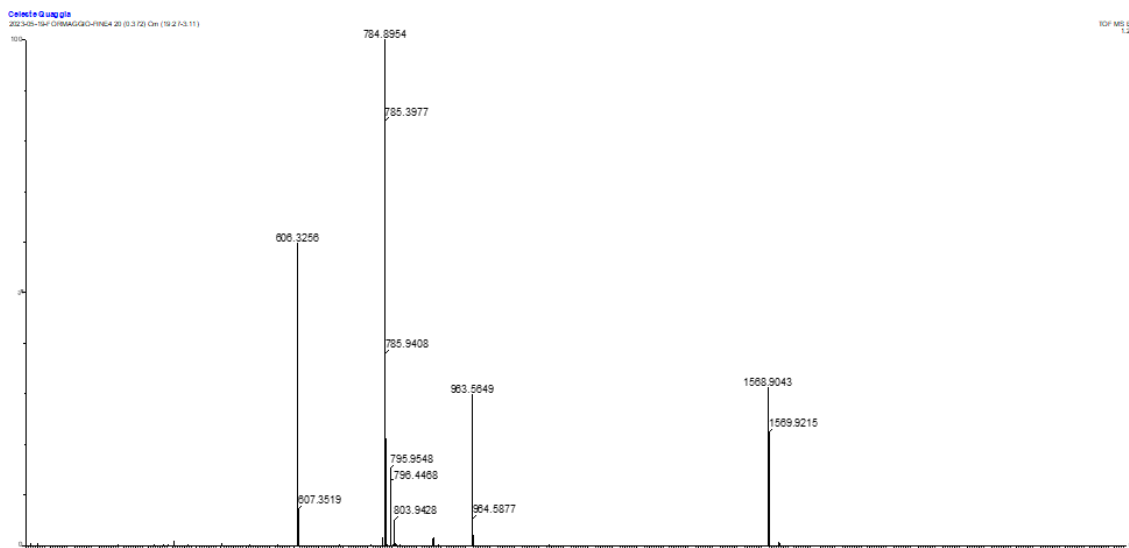


Figura 24 : Spettro di HRMS ESI-TOF del peptide TOAC¹-VX [MW_{calc}:1567,92]; m/z sperimentali:[M+H]⁺=1568,9043; [M+ 2H]²⁺= 784,8954; frammenti creati in massa:605,32+962,56=1567,88

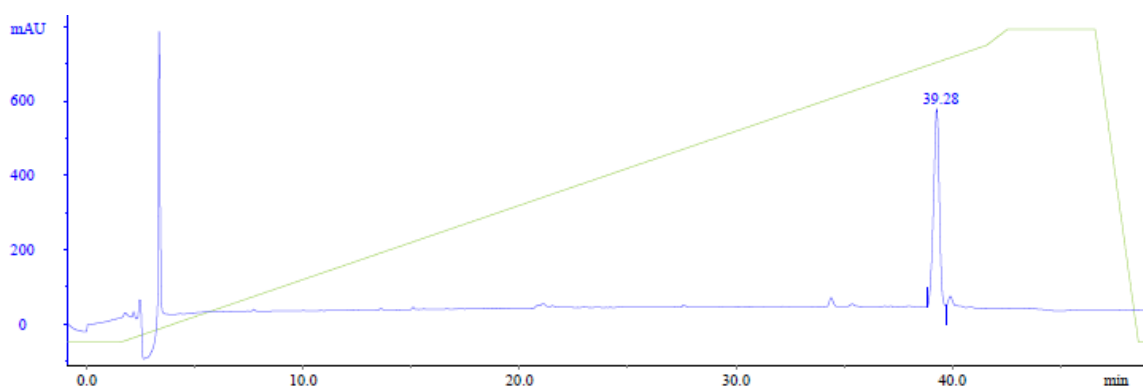


Figura 25 : Cromatogramma HPLC del peptide TOAC¹-VX - gradiente: da 5 a 95%B in 40 minuti - colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - t_R =39,28 min – Purezza 93%.

4.3.2 TOAC¹¹-VX (sintesi 1)

La sintesi di questo peptide si trova al Paragrafo 3.2.6. Per la sintesi si è utilizzata la procedura in fase solida (Paragrafo 3.2.1).La resina è la 2-Clorotritile-Fenilalaninolo. La struttura del peptide è riportata in Figura 26.

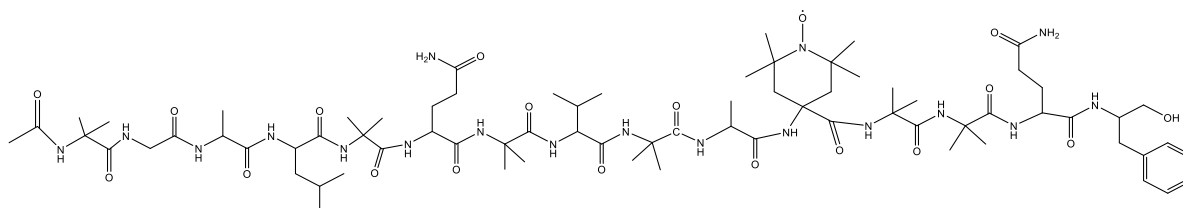


Figura 26: Struttura di TOAC¹¹-VX, analogo di pentadecaibina.

Per questa sintesi, è stata necessaria l'ottimizzazione della reazione di sblocco della resina e della rimozione del gruppo protettore, Trt, da Gln, come descritto al paragrafo 3.3. Infatti, a fronte di un grezzo di reazione del peptide finito e ancora protetto molto pulito (spettro di massa ad alta risoluzione riportato in Figura 27), ogni tentativo in piccolo di rimuovere i gruppi protettori su Gln ha dato formazione di molti sottoprodotti. I primi tentativi, svolti impiegando le condizioni standard di letteratura per la rimozione dei gruppi tritili da Gln, sono addirittura risultati nella scomparsa totale sia del reagente (peptide protetto) che del prodotto (peptide voluto).

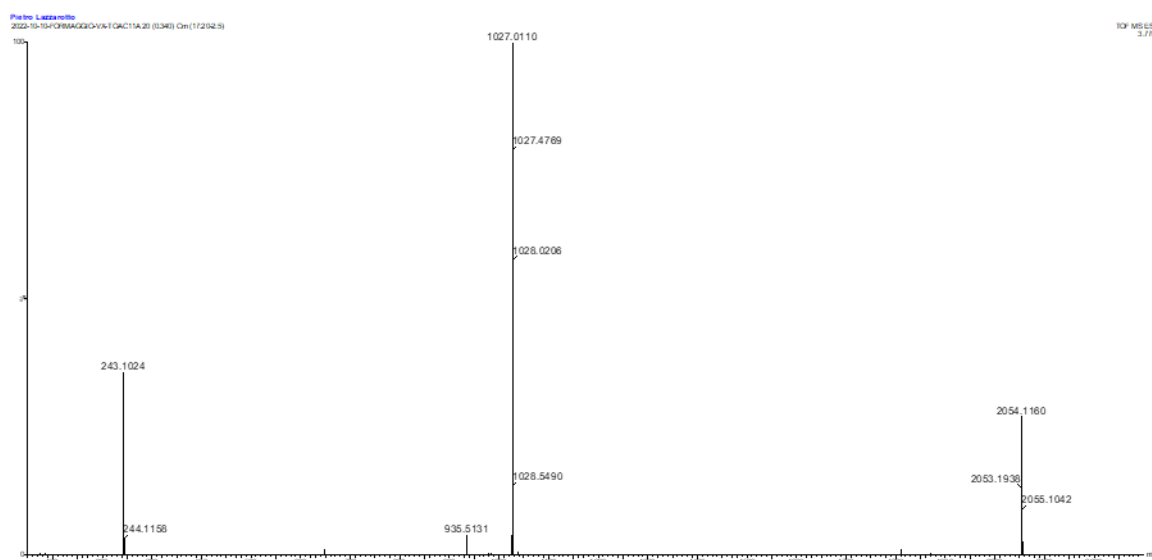


Figura 27. Spettro di massa ad alta risoluzione (HRMS) registrato per il peptide TOAC¹¹-VX al termine della sintesi, dopo sblocco con HFIP 30% in DCM per un'ora.

$$[\text{MW con (2 Trt)}]_{\text{calc}}:2052,14] \quad [(\text{M}+\text{H})^+]=2053,1936 \text{ m/z} \quad [(\text{M}+2\text{H})^{2+}] = 1027,0110 \text{ m/z}$$

Nelle molte prove sono stati testati due approcci: (1) sblocco contemporaneo del peptide dalla resina e del gruppo protettore tritile dai residui di Gln, mediante reazione con TFA in DCM a varie percentuali e in presenza/assenza di *scavengers*, direttamente in siringa da fase solida. (2) procedura in due step consistente in (i) sblocco dalla resina del peptide protetto con tritile, mediante trattamento con HFIP 30% in DCM per un'ora; (ii) rimozione dei gruppi protettori mediante trattamento con soluzioni di TFA in DCM a varie percentuali e in presenza o assenza di *scavengers*.

I risultati delle varie prove, riportati nelle tabelle 1 e 2, sono stati analizzati attraverso la spettrometria di massa ESI-TOF. In tutti gli spettri di massa, il peptide (trattato con TFA) si presenta con il radicale protonato del residuo TOAC (MW = 1568,92) e dovrà essere

rigenerato prima della purificazione tramite trattamento con una soluzione acquosa di NH_4OH al 33%.

Dalle prove di sblocco con solo TFA, senza *scavengers*, si può vedere (ad esempio nello spettro riportato in Figura 28) la presenza di molti addotti e l'assenza del peptide prodotto; dalle prove con TFA, e H_2O e TIS come *scavenger*, negli spettri non c'è la presenza di prodotto e si presentano sempre due picchi a m/z $[\text{M}-651]^+ = 917,6$ e $[\text{M}-1109,6]^+ = 459,2$, come in Figura 29; difficile spiegare a cosa corrispondano. La ricerca in letteratura non ha fornito suggerimenti e le differenze di massa non sono riconducibili agli amminoacidi utilizzati. Le prove del primo gruppo (Tabella 1) si riferiscono tutte al trattamento con TFA direttamente in siringa e per tutte si ha la presenza di molti sottoprodotti, come riportato a titolo esemplificativo in figura 28 e 30. L'analisi di massa di tutti i peptidi trattati con TFA per rimuovere il gruppo protettore tritile evidenzia inoltre la presenza di uno o entrambi dei seguenti due picchi caratteristici: $[(\text{M}-58)+2\text{H}]^{2+} = 756,4$ e $[(\text{M}-18)+2\text{H}]^{2+} = 776,4$, in quantità percentuali differenti (ad esempio, si vedano gli spettri di massa riportati nelle Figure 30 e 31). Abbiamo ipotizzato che i due picchi siano collegati tra loro: $[\text{M}-18]$ potrebbe infatti derivare dalla disidratazione di una Gln con formazione di nitrile e $[\text{M}-58]$ coincide con la perdita (secondo un meccanismo non identificato) del gruppo ammidico e sembra conseguente (anche temporalmente) alla disidratazione di una Gln e formazione del nitrile. Queste ipotesi sono state fatte anche in base a quanto riportato in letteratura per l'amminoacido omologo Asparagina, nonostante in letteratura non sia mai riportato lo stesso tipo di reazioni secondarie per Glutamina.

Tutti gli altri spettri di massa relativi alle prove riportate nelle Tabelle 1 e 2 si trovano nell'appendice 6.

Il miglior risultato in termini di resa, ma soprattutto in termini di purezza del peptide grezzo, è derivato dalla procedura che prevede lo sblocco preliminare del peptide protetto dalla resina, con 1 ora di trattamento con HFIP 30% in DCM, e successiva reazione con una miscela 5%TFA e 2,5% TIS (senza acqua) in DCM per 7 ore, come riportato in Figura 30.

Come si può osservare, tutte le prove con questo tipo di approccio [sblocco con HFIP 30% in DCM (quindi peptide protetto)], riportate in Tabella 2, hanno dato una resa in prodotto molto bassa. Per questo motivo, si è pensato di verificare il *loading* della resina dichiarato dal produttore, come descritto al paragrafo 3.4 e al paragrafo 4.4, trovando che il *loading* effettivo della resina era di dieci volte inferiore a quanto dichiarato dal produttore. Si è quindi utilizzata una resina fornita da un altro produttore per le successive sintesi.

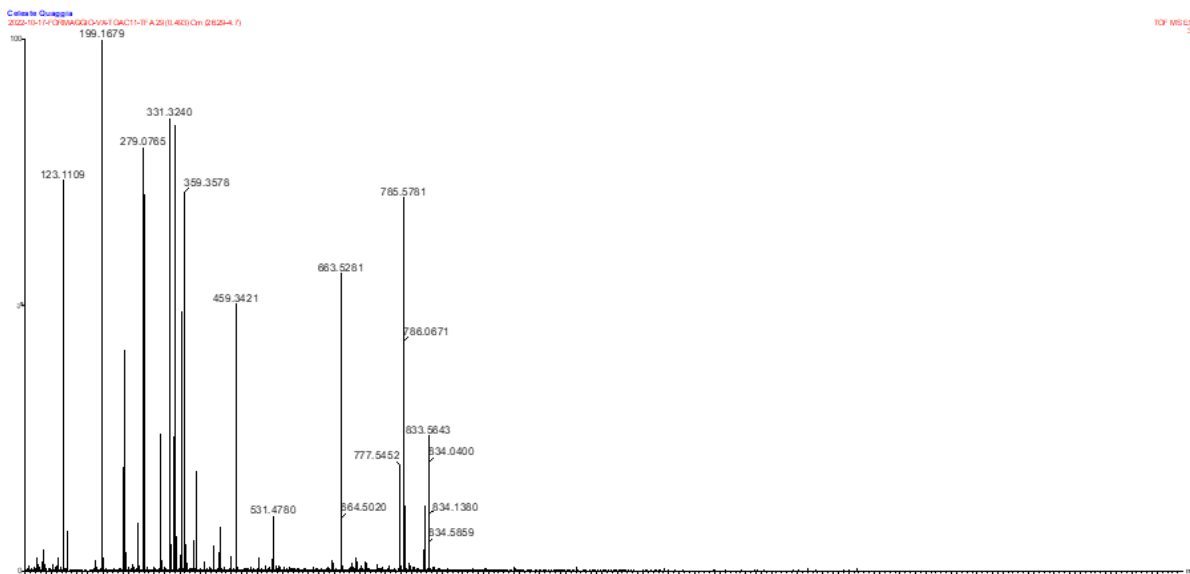


Figura 28: Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco con 20% TFA in DCM, tempo di reazione: 2 ore e 30 minuti. $[MW_{\text{calc}}=1568.92]$; $[M+2H]_{\text{spes}}^{2+}=785,5781$ m/z

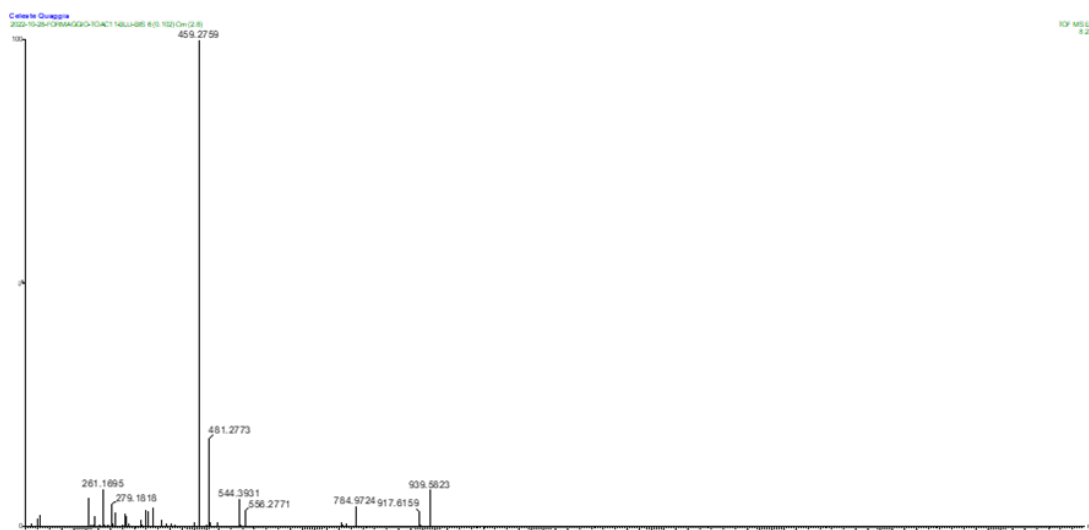


Figura 29: Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 6: trattamento con 10% TFA, 2,5% TIS e 2,5% H₂O, per 16 ore.

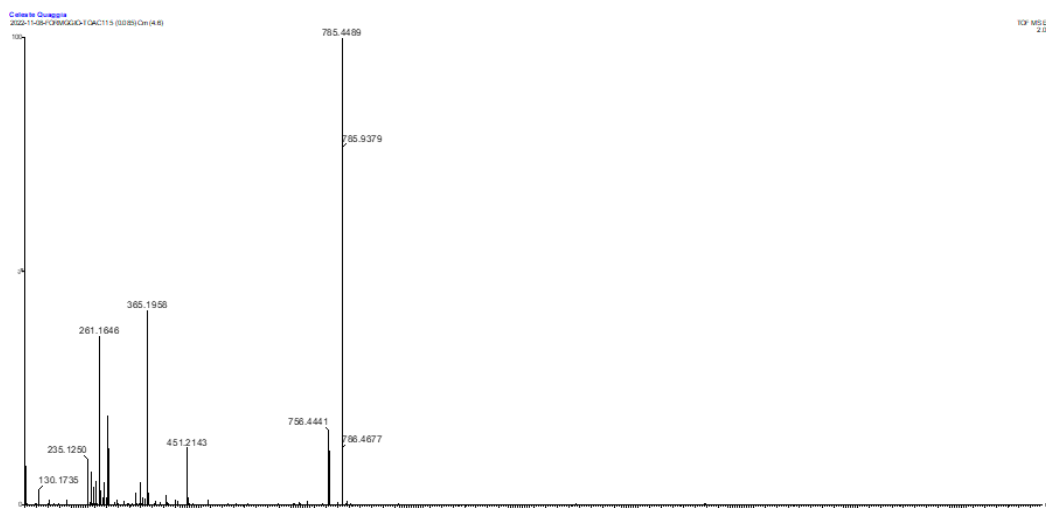


Figura 30: Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 10: trattamento con 5% TFA, 2,5%TIS, per 7 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$; $[M+2H]_{\text{sper}}^{2+} = 785,4489 \text{ m/z}$; $[M-58+2H]^{2+} = 756,4441 \text{ m/z}$.

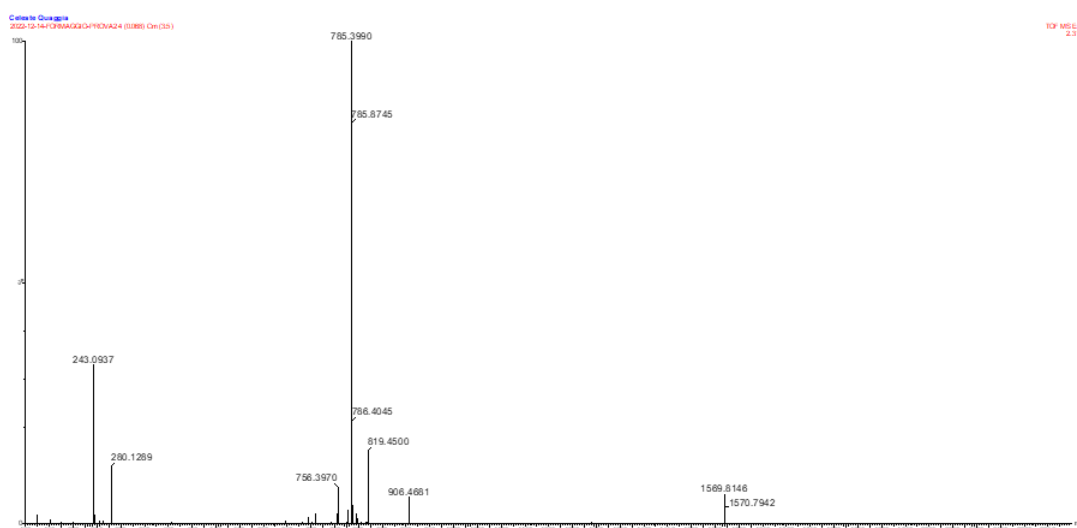


Figura 31: Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione di sblocco H: trattamento con 5% TFA, 2,5%TIS, per 7 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+H]^+ = 1569,8146 \text{ m/z}$ $[M+2H]^{2+} = 785,3990 \text{ m/z}$ $[M-58]^{2+} = 756,3970 \text{ m/z}$.

4.3.3 TOAC¹¹-VX (sintesi 2)

La sintesi di questo peptide è descritta nel Paragrafo 3.2.7. Per la sintesi si è utilizzata la procedura in fase solida (Paragrafo 3.2.1). La resina è la 2-Clorotritile-Fenilalaninolo. La struttura del peptide è riportata in Figura 26.

Poiché, come descritto precedentemente (paragrafi 3.2.6 e 4.3.2), la prima sintesi dell'analogo TOAC¹¹-VX ha evidenziato le difficoltà nel rimuovere il gruppo protettore Trt dalla Gln, si è deciso di risintetizzarlo utilizzando Fmoc-Gln-OH, quindi senza il gruppo protettore Trt in catena laterale. L'utilizzo della Gln senza Trt ha portato ad avere ottimi risultati nella sintesi, senza sottoreazioni e con una drammatica riduzione del tempo necessario per lo sblocco del peptide dalla resina, per il quale è bastato un singolo trattamento con HFIP 30% in DCM, per 1 ora. Inoltre, il peptide ottenuto non ha bisogno del trattamento con NH₄OH acquoso per la rigenerazione del radicale nitrossidico, come nel caso della prima sintesi di TOAC¹¹-VX, perché non avendo visto il TFA presenta il radicale del residuo TOAC integro.

Per questa sintesi, inoltre, si è usata una diversa procedura per l'acetilazione, il cui motivo è spiegato al paragrafo 4.3.4.

La sintesi ha portato ad ottenere il prodotto con una purezza del 94% ed una resa del 7%. La resa bassa è dovuta alla perdita di massa durante il processo di purificazione.

Il peptide ottenuto è stato caratterizzato attraverso analisi di HRMS ESI/TOF (Figura 32) e HPLC (Figura 33). Nello spettro di massa si osservano i picchi relativi allo ione molecolare con $m/z = [M+H]^+$ e il picco dello ione molecolare a doppia carica $[M+2H]^{2+}$.

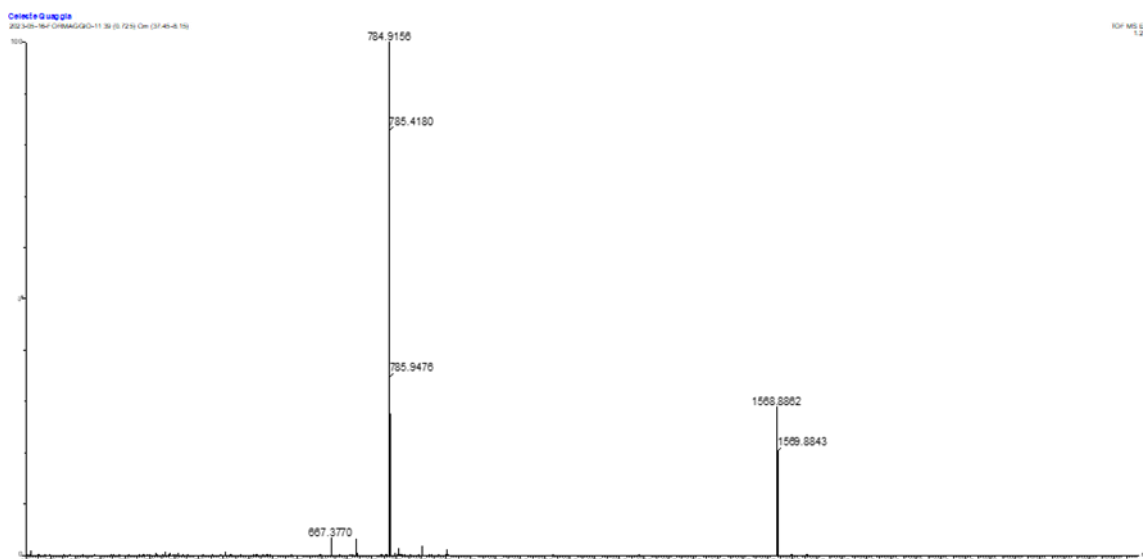


Figura 32: Spettro HRMS ESI-TOF del peptide TOAC¹¹ (sintesi 2)

$[MW_{\text{calc}}: 1567,92] [M+H]^+ = 1568,8882 \text{ m/z} [M+ 2H]^{2+} = 784,9156 \text{ m/z}$

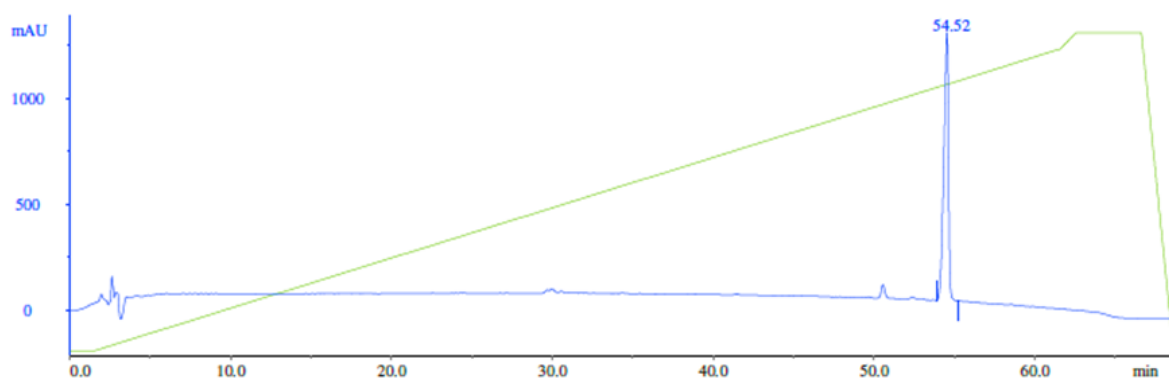


Figura 33 : Cromatogramma HPLC del peptide TOAC¹¹ (sintesi 2) -
 gradiente: da 5 a 95%B in 60 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18-flusso 1mL/min- t_R
 =54,52 min – Purezza: 94%

4.3.4 TOAC^{1,11}-VX

Per ottenere questo peptide sono state svolte tre sintesi, sempre in fase solida (Paragrafo 3.2.1). La resina è la 2-Clorotritile-Fenilalaninolo. La struttura del peptide è riportata in Figura 34.

La procedura sperimentale della prima sintesi si trova al Paragrafo 3.2.8. La seconda sintesi si trova al paragrafo 3.2.9 e infine la terza sintesi si trova la paragrafo 3.2.10.

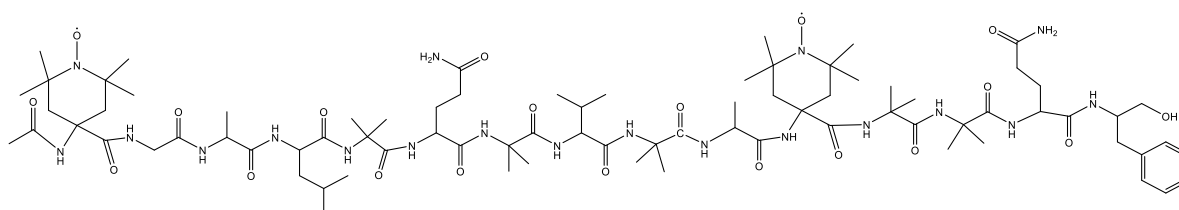


Figura 34: Struttura di TOAC^{1,11}-VX, analogo di pentadecaibina.

Per le tre sintesi, sono state seguite tre procedure diverse per il *coupling* del residuo TOAC¹, mentre per l'acetilazione si è usata la stessa procedura per la prima e la seconda sintesi e una procedura diversa per la terza sintesi.

Per la prima e la seconda sintesi si sono utilizzate procedure differenti per il *coupling* del TOAC¹. Infatti, forti della procedura ottimizzata per l'analogo TOAC¹-VX, che aveva dato resa quantitativa per questo passaggio, durante la prima sintesi abbiamo evitato il controllo del peptide in crescita, arrivando alla fine della sequenza e all'acetilazione. Tramite uno sblocco in piccolo e successiva analisi MS alla fine della prima sintesi, tuttavia, si è rilevata la totale assenza del prodotto. Pensando che lo step critico fosse il *coupling* di TOAC¹, la

procedura è quindi stata modificata nella seconda sintesi per il *coupling* di TOAC¹ utilizzando gli attivatori DIC e Oxyma-Pure. Lo sblocco in piccolo e successiva analisi di massa ha rilevato che effettivamente l'attacco di TOAC¹ non era quantitativo, tuttavia, la protezione Fmoc era parzialmente saltata e quindi si è deciso di procedere con l'acetilazione, ancora utilizzando la procedura standard. Attraverso lo sblocco in piccolo e successiva analisi MS (Figura 35) dopo trattamento con anidride acetica e DIPEA, non si rileva più la presenza del prodotto. Si è quindi ipotizzato che il problema principale derivasse dall'acetilazione.

Per la terza sintesi si utilizza la Gln senza gruppo protettore, per il motivo descritto al paragrafo 4.3.3. Si utilizza una nuova procedura per il *coupling* di TOAC¹, consistente in tre reazioni da 24 ore (triplo *coupling*) con 3, 0,3 e 0,6 eq. di Fmoc-TOAC-F, rispettivamente, sempre ottenuto *in situ* con TFFH come attivatore. Con questa terza procedura si è ottenuta una resa pressoché quantitativa.

Si utilizza quindi una reazione di *coupling* con acido acetico, al posto di una miscela di anidride acetica, per l'acetilazione. Con questa nuova procedura, dopo lo sblocco in piccolo e successiva analisi HRMS (Figura 37), si ottiene il prodotto desiderato con una purezza al 75%. La resa non è stata calcolata a causa della perdita accidentale del prodotto prima della purificazione. La purezza bassa è dovuta alla poca quantità di prodotto disponibile per la purificazione, che ha aumentato la perdita di peptide legata alla procedura.

Il peptide ottenuto è stato caratterizzato attraverso analisi di HRMS ESI/TOF (Figura 38) e LC-MS (Figura 39). Nello spettro di massa si osservano i picchi relativi allo ione molecolare con $m/z = [M+H]^+$ e il picco dello ione molecolare a doppia carica $[M+2H]^{2+}$.

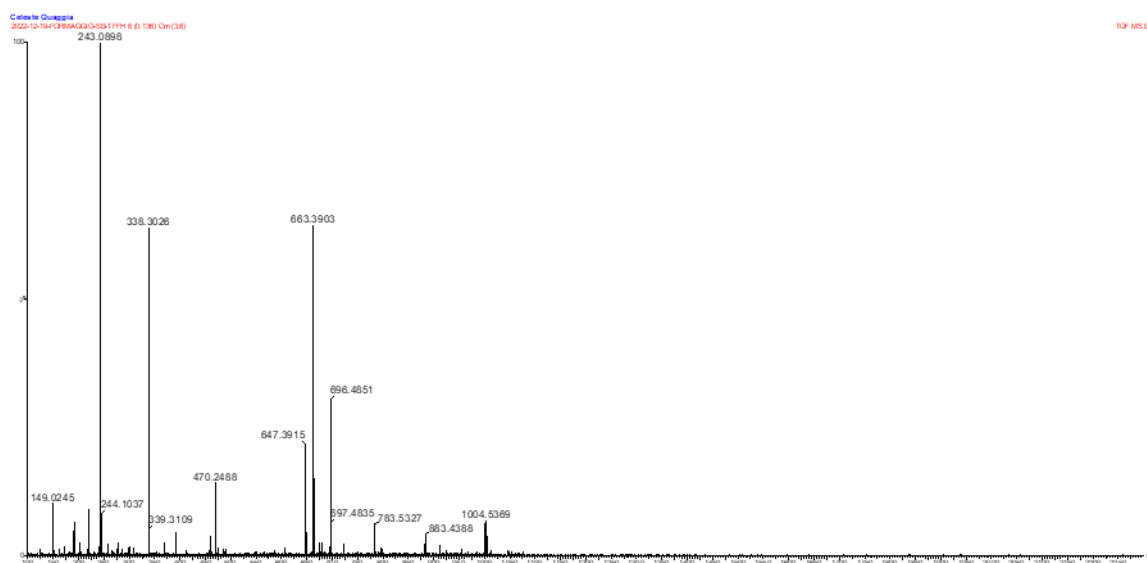


Figura 35: Spettro di HRMS ESI/TOF dello sblocco HFIP 30% in DCM, della prima sintesi TOAC^{1,11}-VX [MW_{calc}:1680,00] (paragrafo 3.2.9).

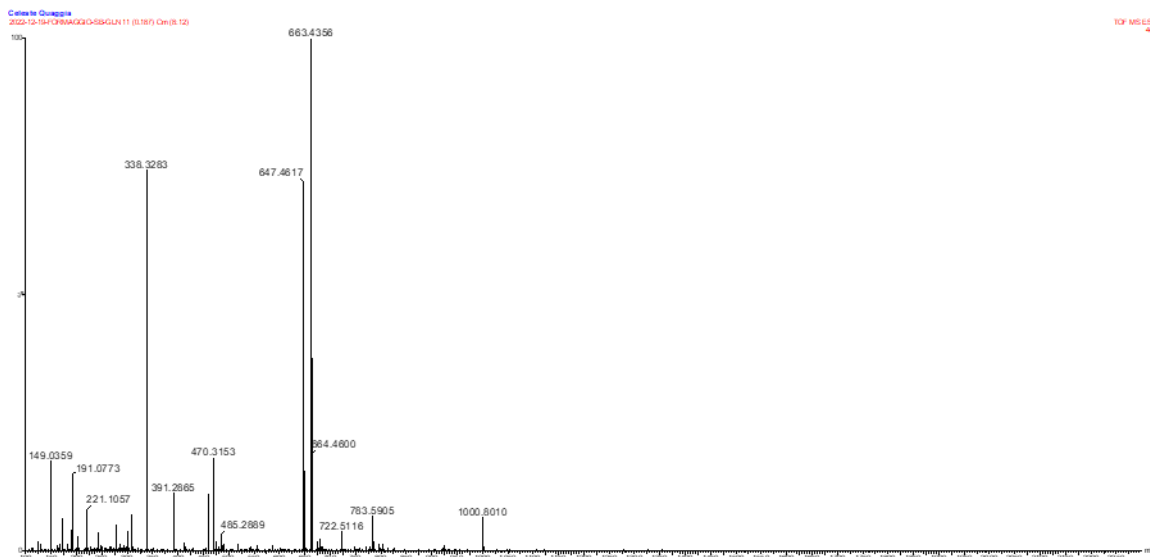


Figura 36: Spettro di HRMS ESI/TOF sblocco HFIP 30% in DCM della seconda sintesi TOAC^{1,11}-VX [MW_{calc} :1680,00]. (paragrafo 3.2.10)

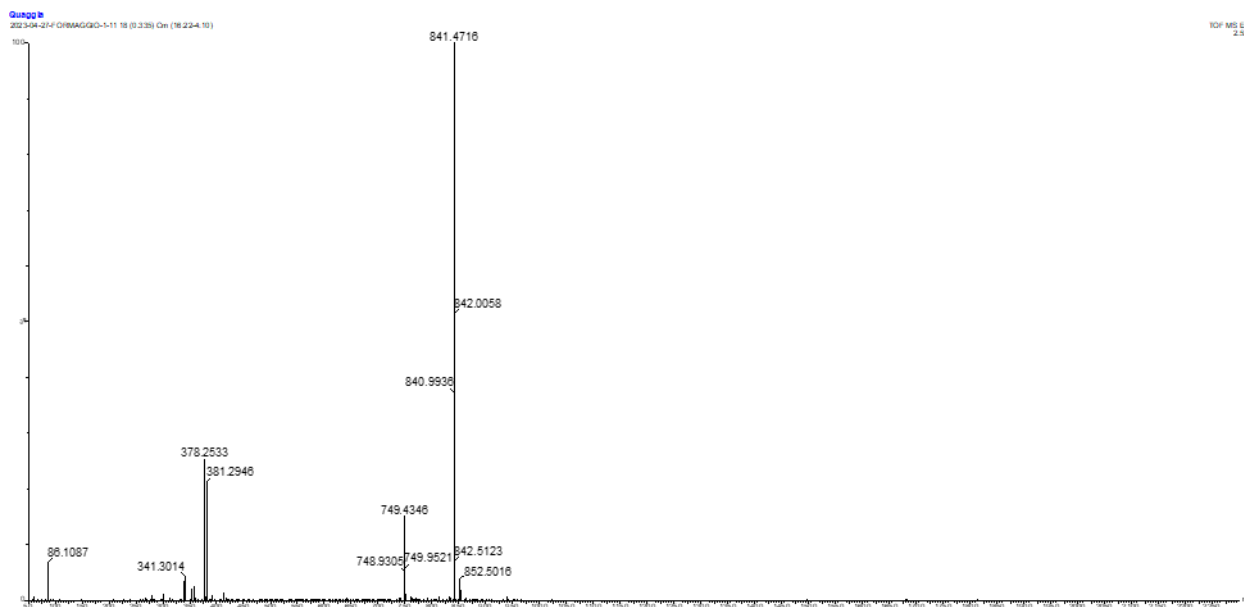


Figura 37 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco in piccolo del peptide TOAC^{1,11}-VX (terza sintesi) [MW_{calc} :1680,00] [$M+2H$]²⁺= 840,9938 m/z

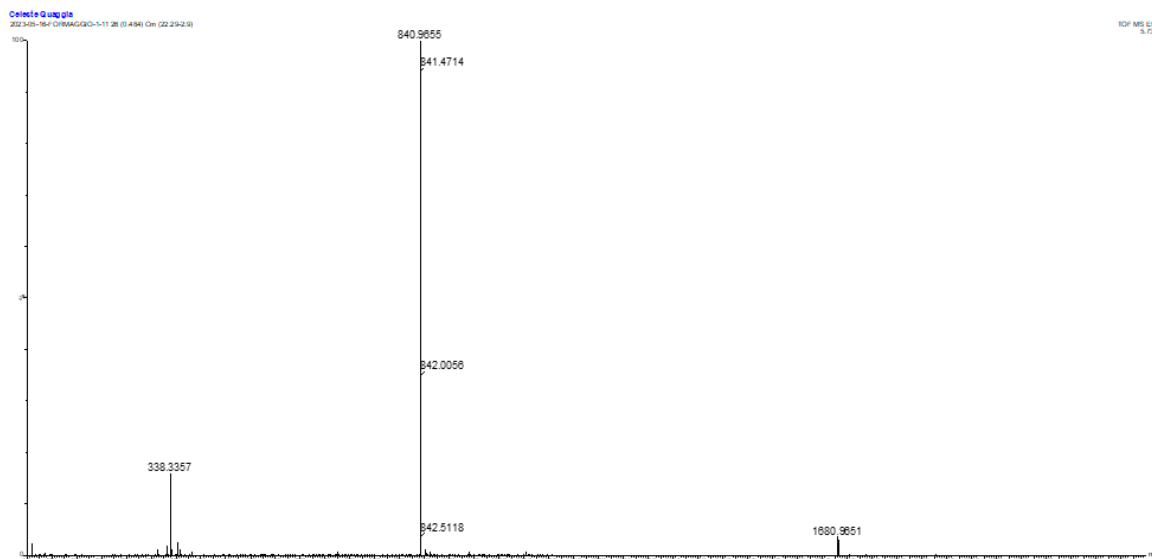


Figura 38: Spettro di HRMS ESI-TOF del peptide TOAC^{1,11}-VX
 $[MW_{\text{calc}}: 1680,00]$ $[M+H]^+ = 1680,9651 \text{ m/z}$ $[M+2H]^{2+} = 840,9655 \text{ m/z}$

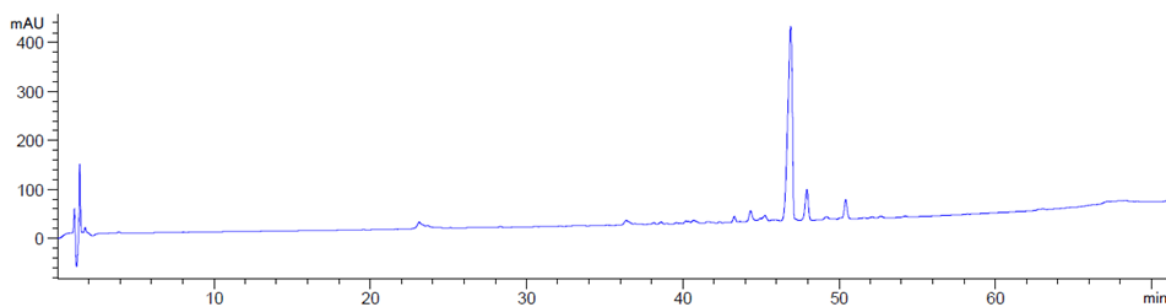


Figura 39: Cromatogramma LC-MS del peptide TOAC^{1,11}-VX - gradiente: da 5 a 95% B in 60 minuti, colonna Agilent Zorbax RX-C18- flusso 1mL/min - $t_R = 47,42 \text{ min}$ - Purezza 75%.

4.4 Loading della resina H-L-Phol-2Cl-Tritile (Iris Biotech)

Dalla procedura descritta al paragrafo 3.4, si può calcolare il *loading* (numero di mmoli di siti attivi per grammo di resina) effettivo rispetto a quello dichiarato dal produttore, che è di 0,4 mmol/g.

Partendo dalla Legge di Lambert-Beer $A = \epsilon bC$, il calcolo del *loading* della resina si svolge avendo i seguenti dati:

$$\text{Abs} = 0,776 \quad (\lambda = 289,8 \text{ nm}) \quad \epsilon = 5253 \text{ L n}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad V_{\text{soluzione}} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ L} \quad b(\text{cammino ottico}) = 1 \text{ cm}$$

$$m = 11,24 \cdot 10^{-3} \text{ g (grammi di resina pesati)}$$

Calcolo la concentrazione : $C = \frac{Abs}{b \cdot \epsilon} = 1,477 * 10^{-4} M$

Numero di moli : $n = C * V_{sol} = 4,44 * 10^{-7} mol$

Loading effettivo: $loading = \frac{n(mmol)}{m(g)} = 0,039 \frac{mmol}{g}$

Si è dimostrato che la resina utilizzata ha un *loading* di 10 volte inferiore rispetto al valore riportato sulla confezione d'acquisto.

La medesima procedura è stata svolta per il calcolo del *loading* di un lotto della stessa resina fornita da un altro produttore. In questo secondo caso, il valore è risultato in linea con quanto dichiarato. Per le sintesi successive al calcolo del *loading* è stata usata la seconda resina.

4.5 Dicroismo Circolare

Attraverso misure di dicroismo circolare (CD) in diversi solventi è stato possibile ottenere informazioni riguardo la conformazione assunta in soluzione dai peptidi sintetizzati.

Le misure si effettuano a 25°C e gli spettri si acquisiscono nell'intervallo di lunghezze d'onda da 190 a 290 nm. Questa zona spettrale risulta essere di interesse in quanto a quelle lunghezze d'onda sono presenti le bande relative alle transizioni del cromoforo peptidico $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Queste transizioni, otticamente inattive, sono rese otticamente attive dalla presenza di centri chirali vicini al cromoforo (legame peptidico), come ad esempio i carboni in α di residui chirali, e/o dall'appartenenza a strutture secondarie rigide intrinsecamente chirali, come nel caso dell' α -elica o dell'elica 3_{10} .

Le α -eliche destrorse presentano nello spettro di dicroismo circolare un massimo positivo a circa 195 nm e due massimi negativi di pari intensità a 208 nm (transizione $\pi \rightarrow \pi^*$) e a 222 nm (transizione $n \rightarrow \pi^*$). Anche la struttura a elica 3_{10} destrorsa presenta uno spettro simile, ma, a differenza da quanto si osserva per l' α -elica, la transizione $n \rightarrow \pi^*$ ha intensità minore rispetto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ed entrambi i massimi negativi si spostano a lunghezze d'onda leggermente inferiori.⁴³⁻⁴⁴

Dalla forma e dall'intensità delle bande dicroiche è possibile quindi ricavare l'eventuale presenza di strutture secondarie elicoidali nei peptidi in analisi nelle diverse condizioni di misura. Infatti, valutando il parametro R , che indica il rapporto tra le ellitticità molari ai due

massimi negativi (per l' α elica 222 nm e a 208 nm), è possibile quantificare il contributo dei due tipi di elica nella struttura del peptide $R = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{208}}$.

Quando R è inferiore a 0.4, prevale l'elica 3_{10} , mentre quando R è vicino o uguale a 1 prevale l' α -elica,⁴⁴ valori intermedi indicano la compresenza di queste strutture elicoidali, mentre R maggiore di 1 indica la presenza di aggregati di eliche.

In particolare, per la pentadecaibina ed i suoi analoghi vengono acquisiti gli spettri di dicroismo circolare in celle di quarzo da 0.1 cm a una concentrazione di 10^{-4} M in due diversi solventi: CH₃OH e in una soluzione acquosa di sodio dodecilsolfato (SDS) 100 mM. (paragrafo 3.1.2.2)

L'SDS (Figura 38) è un tensioattivo che a concentrazioni superiori alla concentrazione micellare critica (circa 8 mM) tende a formare micelle, imitando un ambiente di membrana.⁴⁶

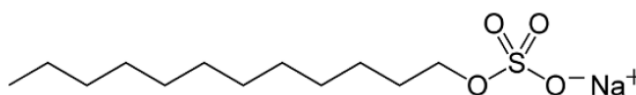
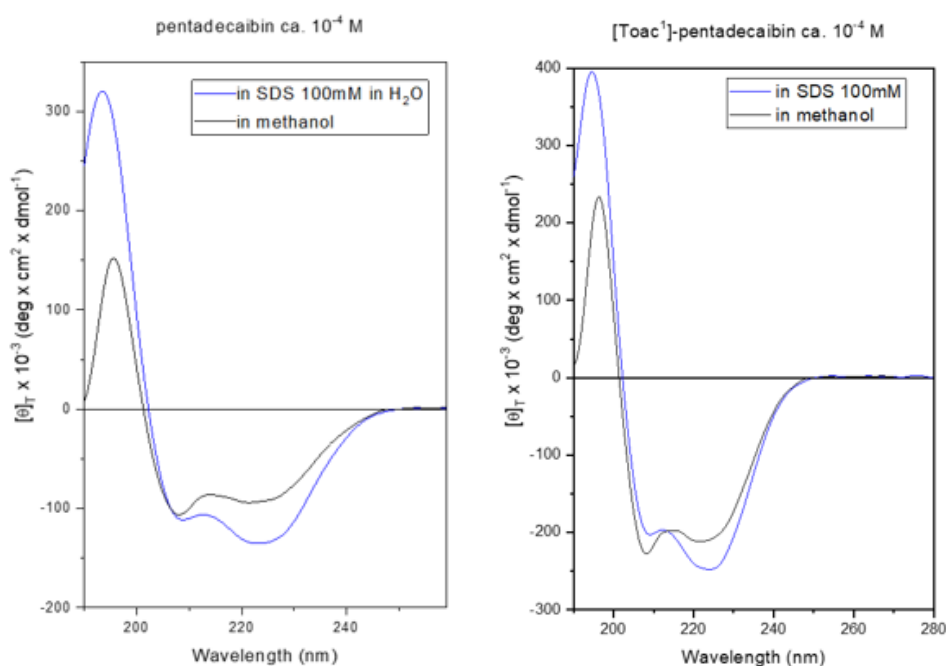


Figura 38: Struttura del sodio dodecilsolfato (SDS).

Nella Figura 39 sono riportati gli spettri CD della pentadecaibina e dei suoi analoghi nei due diversi solventi.



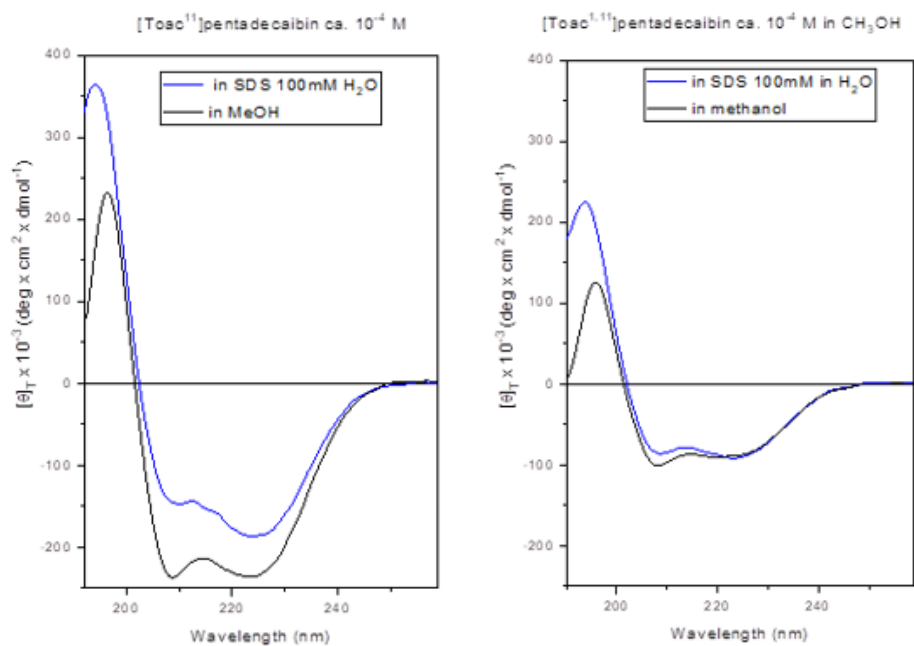


Figura 39: In alto a sinistra: spettri CD del peptide pentadecaibina. In alto a destra: spettri CD del peptide analogo TOAC¹-VX. In basso a sinistra: spettri CD del peptide analogo TOAC¹¹-VX. In basso a destra: spettri CD del peptide analogo TOAC^{1,11}-VX. Tutti i peptidi sono sciolti nei solventi SDS 100mM o CH₃OH alla concentrazione 10⁻⁴ M.

Dall'analisi dei profili dicroici ottenuti per il peptide pentadecaibina (Figura 39) si osserva differenza tra le intensità relative dei due massimi negativi (208nm e 222nm) al variare del solvente impiegato. La presenza di una struttura prevalentemente α -elicoidale destregira sia in CH₃OH che in SDS è dimostrata dalla posizione e dal segno delle bande. Il rapporto tra le ellitticità molari in CH₃OH $R = [\theta]_{222}/[\theta]_{208} \approx 0.9$ è tipico dell' α -elica. Passando in ambiente membrano-mimetico (SDS), il rapporto $R = [\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ diventa superiore a 1, indice della presenza di aggregazione tra eliche.

Per quanto riguarda i profili dicroici degli analoghi del peptide pentadecaibina, TOAC¹-VX, TOAC¹¹-VX e TOAC^{1,11}-VX, sia in metanolo che in SDS essi presentano tre massimi, due negativi centrati a circa 208nm e 222nm e uno positivo centrato a circa 195nm. Anche in questi casi, quindi, le posizioni delle bande dicroiche sono diagnostiche della presenza di una struttura elicoidale destregira, a prevalente carattere di α -elica. Anche per gli analoghi contenenti TOAC, si osserva un rapporto R tra le ellitticità molari in CH₃OH $[\theta]_{222}/[\theta]_{208} \approx 0.9$. Passando in ambiente membrano-mimetico (SDS), il rapporto $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ diventa superiore a 1, indice anche in questo caso della presenza di aggregazione.

In conclusione, i peptidi analoghi sintetizzati assumono strutture α -elicoidali destregire stabili, simili a quella di pentadecaibina. Questo comportamento è dovuto principalmente

alla nota comune capacità di indurre strutture elicoidali dei due residui C^α-tetrasostituiti, per cui la sostituzione del residuo di Aib con TOAC non altera la conformazione peptidica nativa.

Lo spettro CD dei peptidi dipende dal solvente in cui sono disciolti. In particolare, in CH₃OH le sequenze mostrano il tipico profilo di un α-elica destrorsa, mentre in presenza di micelle di SDS le α-eliche si aggregano, come d'altronde previsto dalla nota capacità di interagire con le membrane dei peptidi appartenenti alla famiglia dei peptaibolici.

4.6 Spettroscopia EPR

La caratterizzazione all'EPR è stata condotta dal prof. Antonio Barbon (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova). Sono state eseguite tre analisi preliminari sui tre peptidi, due contenenti un solo TOAC e uno contenente due TOAC: TOAC¹, TOAC¹¹ e TOAC^{1,11}. I due motivi principali per cui si sono fatte le analisi sono: confermare la presenza del radicale libero per il gruppo TOAC per i peptidi monosostituiti/bi-marcato e vedere per il peptide bi-marcato se è possibile ottenere informazioni sulla interazione tra i radicali. In questo ultimo caso, i due peptidi singolarmente marcati servono come composto di riferimento.

Analizzando gli spettri cw-EPR ottenuti, possiamo dire come effettivamente si notino differenze tra i peptidi mono-marcati e il peptide bi-marcato (Figura 40). Per entrambi i peptidi mono-marcati TOAC¹ e TOAC¹¹, vediamo 3 picchi; questi sono dovuti all'interazione iperfine dell'elettrone spaiato con il nucleo di ¹⁴N. Sono tre per il fatto che ¹⁴N presenta un numero quantico di spin I pari a 1 e m_I = -1, 0 e +1: di conseguenza, l'interazione iperfine deve dare tre segnali.⁴⁷ I picchi sono raccolti come derivata del segnale EPR per questioni strumentali.

Per il peptide contenente due TOAC, cioè TOAC^{1,11}-VX, abbiamo uno spettro sempre a tre picchi e questa osservazione ci permette di affermare che la distanza tra i due radicali è di molto superiore a 13Å, come dimostrato in Figura 40. In caso contrario, infatti, si osserverebbe un quintetto, derivante dalla presenza di interazione di scambio J. In prima approssimazione, quindi, lo spettro è la somma dei due singoli radicali. L'intensità minore rispetto ai mono-marcati (tutti i campioni sono alla stessa concentrazione) indica una bassa purezza del peptide TOAC^{1,11}-VX.

Si è potuto misurare il fattore giromagnetico (g +/- 0.0001) per i tre sistemi: per TOAC¹-VX g=2.0067; Per TOAC¹¹-VX g=2.0063; Per TOAC^{1,11}-VX g=2.0065. La misura di g

del bi-marcato è intermedia a quella dei due mono-marcati, supportando la presenza di due radicali.

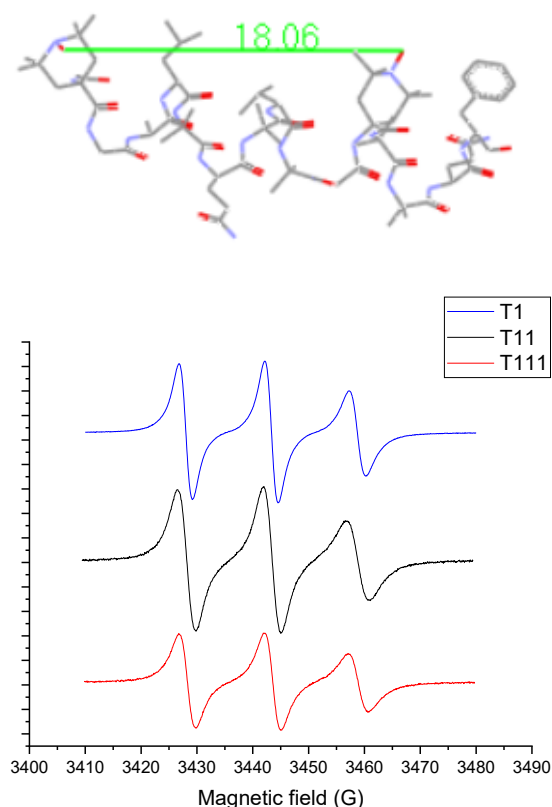


Figura 40 : Sopra: modello della struttura ad α -elica di TOAC^{1,11}-VX costruito con WebLab con indicazione della distanza tra i radicali. Sotto: spettri in EPR dei peptidi: TOAC¹-VX (blu), TOAC¹¹-VX (nero) e TOAC^{1,11}-VX (rosso), in CH₃OH alla concentrazione di 1×10^{-4} M.

Per la misura della distanza fra i due nitrossidi presenti in TOAC^{1,11}-VX, si è tentato di fare una misura di saturazione del segnale in funzione della potenza microonde (in realtà in funzione del campo magnetico della radiazione microonde, che è proporzionale alla radice della potenza). Un esempio dei risultati di questa misura è mostrato per TOAC¹¹-VX in Figura 41. Non avendo ottenuto nessun segno di saturazione, la misura non ha permesso di stimare una distanza. Per ottenere informazioni sulla distanza tra gli spin, in futuro si dovrà quindi tentare con esperimenti Double Electron Electron Resonance (DEER) sul peptide TOAC^{1,11}-VX.

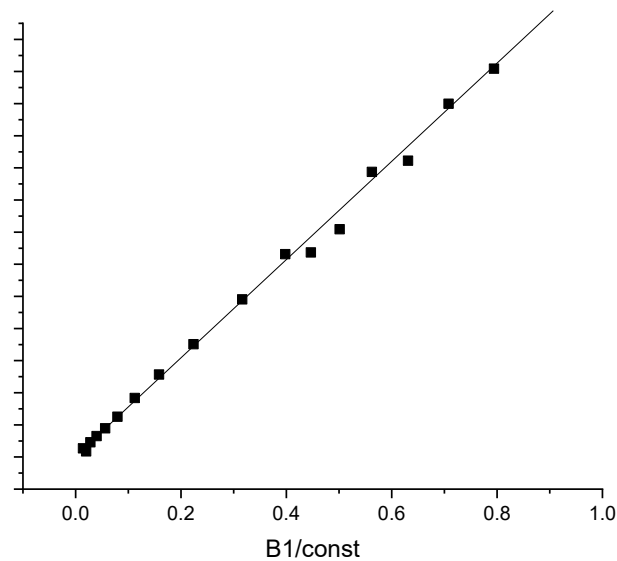


Figura 41: Profilo di saturazione per TOAC¹¹-VX in funzione della radice della potenza (proporzionale a B_1 , campo magnetico della radiazione microonde. La finestra corrisponde ad intervalli fra 30 e 0.2 mW circa).

4.7 Leakage

Il test di *leakage* permette di verificare la capacità dei peptidi di modificare la permeabilità della membrana di liposomi modello, in modo da avere un'indicazione sull'efficacia dell'interazione peptide-membrana, spesso cruciale nel meccanismo di azione biologica dei peptaibolici. I peptaibolici a media lunghezza, in particolare, hanno la potenzialità di modificare il loro meccanismo di interazione con le membrane a seconda dello spessore e della composizione lipidica delle membrane stesse.

Le membrane cellulari sono formate principalmente da fosfolipidi,⁴⁸ molecole costituite da una testa polare, che presenta un gruppo fosfato, e da una coda apolare, costituita da due catene di acidi grassi. La struttura anfifilica di queste molecole fa sì che in soluzione acquosa esse tendano ad aggregare formando strutture a doppio strato, nelle quali i fosfolipidi espongono la porzione polare verso l'acqua e la parte apolare verso l'interno (Figura 42).

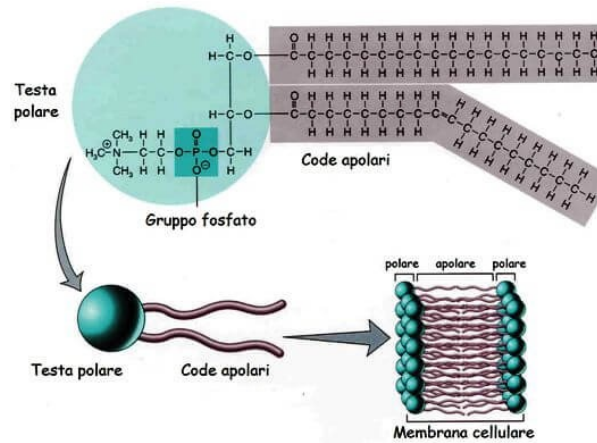


Figura 42: Struttura fosfolipide di membrana.

Nelle cellule eucariotiche sane, il lato della membrana esposto verso l'ambiente extracellulare presenta principalmente fosfolipidi zwitterionici, come fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) (Figura 43).⁴⁹

Invece, nelle cellule tumorali, la percentuale di fosfolipidi carichi negativamente, come ad esempio fosfatidilglicerolo (PG), presente sul lato della membrana rivolto verso l'ambiente esterno è maggiore⁵⁰ (Figura 43).

Un ulteriore aspetto che differenzia le membrane delle cellule sane da quelle delle cellule tumorali è legato al contenuto di colesterolo. Questa molecola risulta molto più presente nel doppio strato fosfolipidico delle cellule sane. Infatti, un basso contenuto di colesterolo nelle cellule di tipo metastatico le rende più flessibili e quindi in grado di attraversare agevolmente i vasi sanguigni.⁵¹

La modulazione della quantità di colesterolo in membrane modello in passato si è mostrata influenzare l'interazione dei peptaibolici con i doppi strati fosfolipidici. In particolare, si è visto sperimentalmente che una maggiore quantità di colesterolo riduce la capacità di modificare la permeabilità delle membrane da parte dei peptaibolici (dati non pubblicati). Quindi, il contenuto inferiore di colesterolo potrebbe contribuire ad aumentare la selettività dei peptaibolici verso le cellule tumorali.

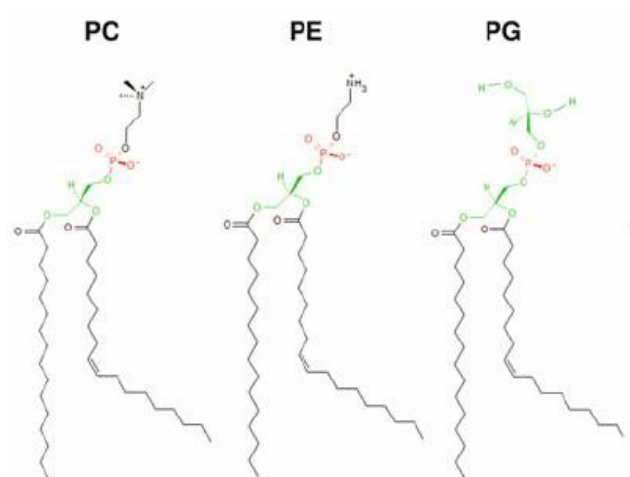


Figura 43: Strutture di: PC 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PE 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine e PG 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)].

In questo lavoro di Tesi, si è eseguita una serie di test su liposomi modello (*small unilamellar vesicles*, SUV) di due diverse composizioni, per i peptidi sintetizzati, allo scopo di valutarne le proprietà di modulazione della permeabilità delle membrane stesse.⁵² La procedura sperimentale è descritta nel Paragrafo 3.5.

Utilizzando misure di fluorescenza, è stata valutata la capacità dei vari peptidi di indurre il rilascio della CF precedentemente inglobata all'interno di SUV del tipo PC/Ch e del tipo PE/PG.

Si è scelto di utilizzare questi due tipi di liposomi in modo da mimare le caratteristiche che distinguono le cellule eucariotiche sane da quelle tumorali. In particolare, i liposomi PC/Ch sono zwitterionici e contengono colesterolo, mimando le cellule sane, mentre in quelle di tipo PE/PG si è creata una carica negativa netta sulla superficie grazie alla presenza del lipide PG, come nelle cellule tumorali. Essendo comunque test su liposomi modello, i risultati di questi esperimenti sono da considerarsi del tutto qualitativi. Si tratta infatti di modelli semplificati.

Se il peptide non interagisce con le membrane, la CF non viene rilasciata e quindi non si osserva emissione di fluorescenza dovuta al venir meno del fenomeno di auto-quenching, a sua volta dovuto all'elevata concentrazione di CF all'interno dei liposomi. Quando invece il peptide perturba la membrana artificiale, esso provoca la fuoriuscita della CF e quindi porta ad un aumento d'intensità di fluorescenza. Il valore massimo di intensità di fluorescenza, corrispondente alla completa distruzione delle vescicole da parte del tensioattivo Triton X-100, è utilizzato come riferimento (Figura 44).

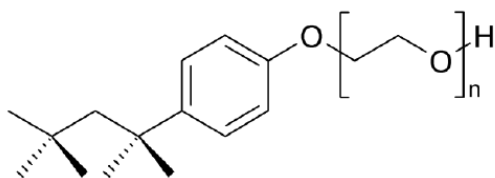


Figura 44: struttura del Triton X-100

In Figura 45 sono riportati i risultati delle prove fatte. Il peptaibolico tricogina GA IV (Tric GA IV) è stato utilizzato come controllo positivo ed i grafici sono mostrati in scala logaritmica per evidenziare l'andamento a sigmoide delle curve.

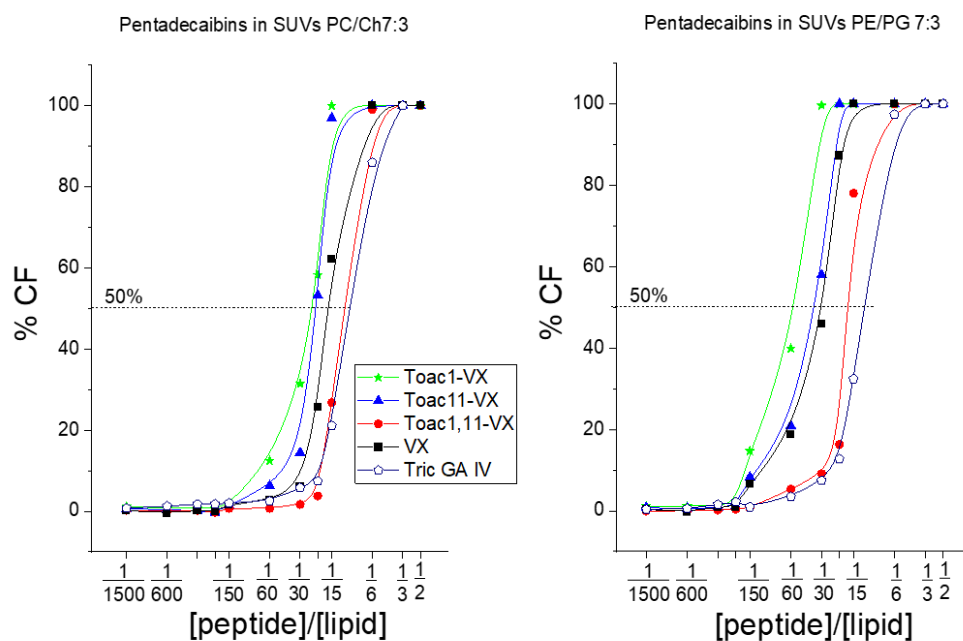


Figura 45: Misura della capacità dei peptidi di modificare la permeabilità di liposomi modello (*small unilamellar vesicles*) di composizione: a sinistra PC/Ch 7:3 e a destra PE/Pg 7:3.

Dalla Figura 45, si osserva che la pentadecaibina (VX) ed i suoi analoghi sono tutti membrano-attivi, con un rapporto peptide/lipide al 50% di Leakage centrato a circa 1/20 per le SUV zwitterioniche (PC/Ch) e a circa 1/50 per le anioniche (PE/Pg). Questa differenza è dovuta al diametro medio più piccolo per le SUVs di PE/Pg.

L'andamento a sigmoide delle curve dimostra il meccanismo cooperativo, per cui è necessario raggiungere una certa concentrazione soglia affinché i peptidi esibiscano attività di interazione con le membrane. Questo aspetto è tipico dei peptaibolici ed è legato alla

formazione di aggregati elicoidali in presenza di membrane, come evidenziato dagli studi CD in presenza di micelle. Si può quindi confermare la capacità della pentadecaibina e dei suoi analoghi di interagire con le membrane, modificandone la permeabilità, e questa capacità contribuisca alla sua azione citotossica.

4.8 Attività antibatterica ed emolisi

L'attività antibatterica di pentadecaibina è stata valutata rispetto alla concentrazione minima inibente (CMI) ed alla concentrazione minima battericida (CMB) (Tabella 3). Esse sono state determinate, in triplicato, con il metodo della microdiluizione in brodo, in terreno Mueller-Hinton (MHB), come raccomandato dal CLSI (documento M07-A10, 2015), utilizzando un panel di ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi di riferimento, rappresentativi e di elevata rilevanza clinica, poiché comunemente responsabili di infezioni batteriche sia negli animali che nell'uomo.

Bacillus subtilis ATCC 6633 (Bsu) è stato incluso anche come organismo Gram-positivo modello a forma di bastoncino. Il pannello Gram-positivo comprende inoltre: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Efa); *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344 (Spia) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Sau); come Gram-negativi: *Escherichia coli* CCUGT (Eco), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833 (Kpn), *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 (Aba) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Pae).

I dati confermano l'attività antibatterica della pentadecaibina contro tre dei quattro ceppi batterici Gram-positivi testati, assente contro i batteri Gram-negativi.

Il test di emolisi è stato effettuato mediante dispensazione di 2 µl di soluzione peptidica, corrispondente a 50 µg, su piastre di Agar sangue.⁵³

Il Triton X-100 è stato utilizzato come controllo positivo (diametro dell'alone d'inibizione 13 mm), mentre DMSO come controllo negativo. La pentadecaibina si è rivelata debolmente emolitica.

Composto	CMI/CMB (µg/ml)								Test emolisi (diametro mm)
	Bsu	Efa	Spa	Sau	Eco	Kpn	Aba	Pae	
Pentadecaibina	16/32	16/16	16/32	32/64	>128	>128	>128	>128	+ (8)

Tabella 3: Attività antibatterica pentadecaibina.

4.9 Attività antitumorale

La pentadecaibina e gli analoghi TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX sono stati studiati per valutare la loro citotossicità verso cellule tumorali.

Lo studio dell'attività antitumorale di questi peptidi è stato effettuato presso il dipartimento di Biologia - Università di Padova, dal Dott. Luca Menilli.

Sono state utilizzate linee cellulari originate da adenocarcinoma alveolare (A549), cellule sane di fibroblasti polmonari (CCD-34Lu), carcinoma mammario triplo negativo (MDA-MB-231) e carcinoma ovarico (SK-OV-3).

La descrizione della procedura è al paragrafo 3.1.2.7, in cui è riportato come le cellule siano state incubate con concentrazioni crescenti di peptidi per 24 ore prima di valutare la vitalità cellulare con il test MTS al fine di creare curve dose/risposta (Figura 46) e calcolare i valori della concentrazione inibente il 50% della crescita cellulare (IC₅₀) per ciascun peptaibolico. (Tabella 4)

Un valore di IC₅₀ basso indica elevata attività citotossica del peptide.

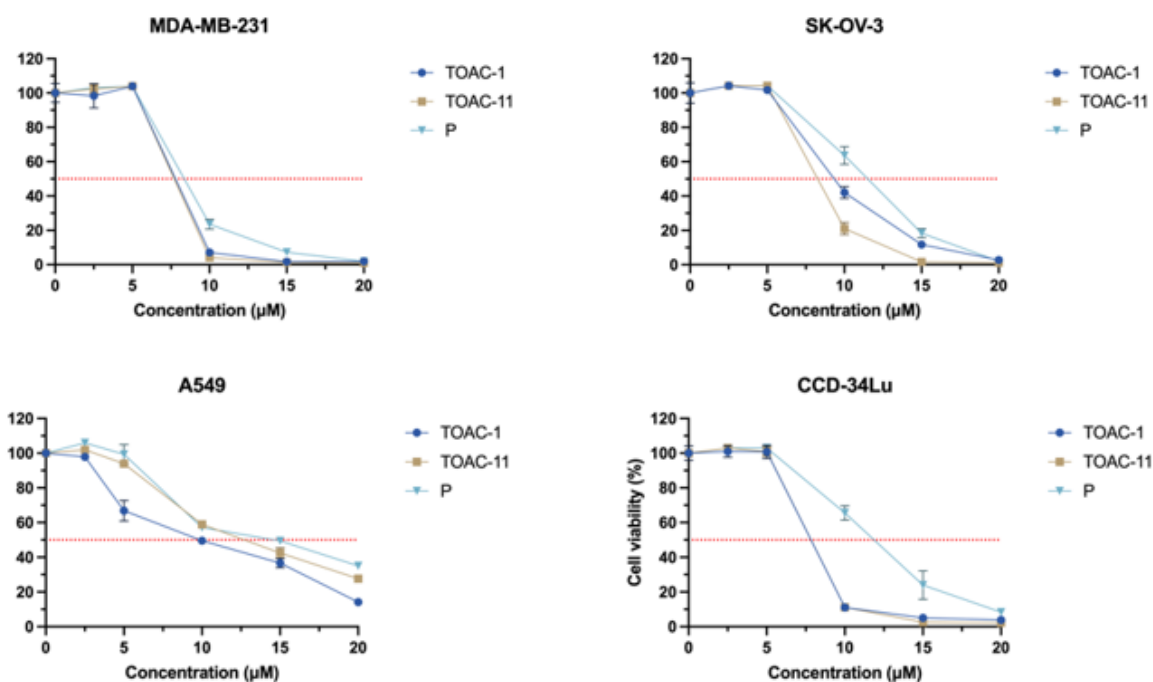


Figura 46: Citotossicità di pentadecaibina (P) e dei suoi analoghi TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX, nei confronti delle cellule di carcinoma mammario triplo negativo (MDA-MB-231), carcinoma ovarico (SK-OV-3) adenocarcinoma alveolare (A549) e cellule sane di fibroblasti polmonari (CCD-34Lu). Le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti

di peptaibol per 24 ore e la vitalità è stata misurata con il test MTS al termine del tempo di incubazione.

IC₅₀ (μM)			
Cellule testate	Pentadecaibina (P)	TOAC¹-VX	TOAC¹¹-VX
MDA-MB-231	8,76	8,91	8,85
SK-OV-3	11,17	9,54	9,13
A549	14,08	9,30	12,78
CCD-34Lu	11,62	8,28	8,53

Tabella 4: Valori di IC₅₀ (μM) per ciascun peptide.

Come si osserva dalla Figura 46 e dalla Tabella 4, la pentadecaibina (P) e gli analoghi TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX, hanno influenzato in modo significativo la vitalità della linea cellulare carcinoma mammario triplo negativo (MDA-MB-231) e carcinoma ovarico (SK-OV-3) riducendo la vitalità cellulare in modo dipendente dalla concentrazione. In particolare, TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX sembrano in generale più citotossiche del peptide nativo, forse grazie all'ingombro sterico del TOAC.

Per quanto riguarda la selettività, essa è stata testata *in vitro* utilizzando le cellule di adenocarcinoma alveolare (A549) e le corrispondenti cellule sane di fibroblasti polmonari (CCD-34Lu). I peptidi sembrano influenzare maggiormente la vitalità delle sane rispetto alle cellule di carcinoma.

5 CONCLUSIONI

Questo lavoro di Tesi si è focalizzato sulla pentadecaibina, un peptaibolico di media lunghezza, promettente per la sua potenziale selettività di interazione con membrane fosfolipidiche di diversa composizione e possibile candidato come agente antimicrobico e antitumorale.

Allo scopo di studiarne le caratteristiche e potenzialità, in questo lavoro si è ottimizzato la strategia di sintesi e si è prodotto sia la pentadecaibina che tre suoi analoghi contenenti il TOAC, il quale sostituisce Aib¹, Aib¹¹ o Aib^{1,11}, mediante sintesi manuale in fase solida.

La principale sfida era trovare un'efficace procedura di sintesi senza avere reazioni di accoppiamento non quantitative o produzione di sequenze delete, soprattutto a livello dei tre Aib in serie presenti nella sequenza.

Il lavoro ha permesso di stabilire che l'utilizzo dell'attivatore TFFH per l'inserimento degli Aib in serie e del TOAC (negli analoghi), permette la sintesi ottimale della sequenza, risultando decisamente migliore rispetto agli attivatori DIC e Oxyma-Pure.

Un altro aspetto riguardante la sintesi è l'acetilazione N-terminale. Per avere completa derivatizzazione senza perdita di prodotto è necessario procedere con una reazione con acido acetico, DIC e Oxyma-Pure, rispetto all'utilizzo di una miscela contenente Ac₂O e DIPEA.

Nel caso di sintesi con la glutammina protetta con il gruppo tritile, è stato possibile identificare la procedura di sblocco che permette di ottenere il peptide grezzo con il più alto grado di purezza. Il metodo prevede un'ora di trattamento della resina con HFIP 30% in DCM e successiva reazione del peptide protetto così ottenuto con una soluzione 5% di TFA e 2,5% TIS in DCM per un tempo di 7 ore, per la rimozione dei gruppi tritili. Questo metodo richiede la successiva rigenerazione del radicale sui residui di TOAC, protonati dall'acido trifluoroacetico, mediante trattamento con una soluzione acquosa di NH₄OH al 33%.

La sintesi con l'amminoacido glutammina libero senza la presenza del gruppo protettore tritile (Trt), permette di ottenere il peptide senza sottoreazioni e con una purezza del grezzo elevata, in modo molto più agevole. Il peptide desiderato è ottenuto semplicemente tramite una reazione con HFIP 30% in DCM per un tempo di un'ora.

Le indagini conformazionali in soluzione, eseguite tramite Dicroismo Circolare, dimostrano che la struttura elicoidale di pentadecaibina viene mantenuta negli analoghi prodotti contenenti TOAC. In particolare, le sequenze assumono strutture elicoidali di tipo α

destrogire sia in CH₃OH che in SDS. In quest'ultimo ambiente membrano-mimetico, le α -eliche si aggregano, evidenziando un'efficace interazione con le membrane per questo peptaibolico di media lunghezza.

Si può quindi concludere che le modifiche alla struttura primaria apportate non comportino variazioni conformazionali significative. Questo conferma la validità di procedere con lo studio del meccanismo di interazione di pentadecaibina con le membrane mediante Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) sugli analoghi contenenti TOAC, che seguirà a questo lavoro di Tesi.

Gli studi spettroscopici, tramite EPR, svolti sui peptidi mono-marcato e sul bi-marcato, hanno confermato la presenza del radicale libero del residuo TOAC in tutti gli analoghi.

Studi di interazione con le membrane modello (*Leakage*) sui peptidi sintetizzati hanno evidenziato la capacità di questi analoghi di modulare la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici e di essere membrano-attivi.

Il test biologico sull'attività antibatterica della pentadecaibina sintetizzata, svolto presso l'Università di Siena, ha evidenziato come essa sia attiva contro *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Bsu), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Efa) e *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344 (Spia), batteri Gram-positivi, mentre sia inattiva contro i batteri Gram-negativi.

Infine, i test preliminari sull'attività antitumorale della pentadecaibina e degli analoghi TOAC¹-VX e TOAC¹¹-VX, hanno mostrato una buona citotossicità nei confronti del carcinoma mammario triplo negativo (MDA-MB-231) e del carcinoma ovarico (SK-OV-3). Una prova di selettività *in vitro* su cellule polmonari ha mostrato una capacità dei peptidi di influenzare maggiormente la vitalità delle cellule sane rispetto alle corrispondenti cellule di carcinoma.

6 APPENDICE

Sono allegati gli spettri HRMS ESI-TOF dell'ottimizzazione dello sblocco e rimozione dei Trt del TOAC¹¹-VX (sintesi 1) descritti al paragrafo 4.3.2.

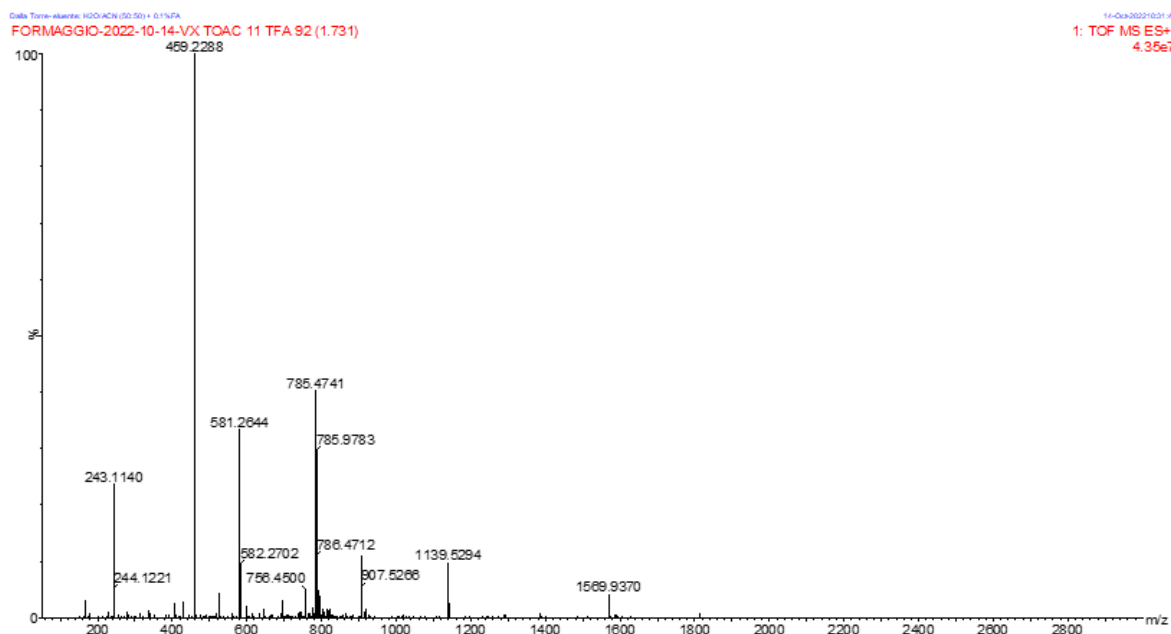


Figura A1 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 1 con 20% TFA, 2,5% H₂O, per 2 ore e 30 minuti. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+H]^+=1569,9370$ m/z $[M+2H]^{2+}=785,4741$ m/z $[M-58]^{2+}=756,3970$ m/z $[M+\text{Trt}]^{2+}=907,5296$

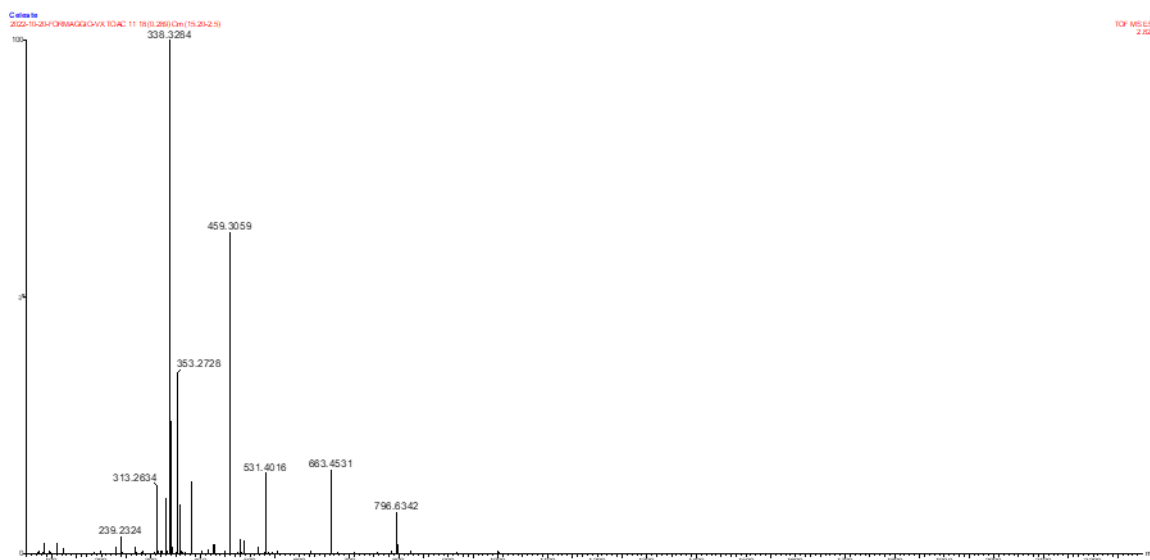


Figura A2 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 3 con 10% TFA, per 24 ore.

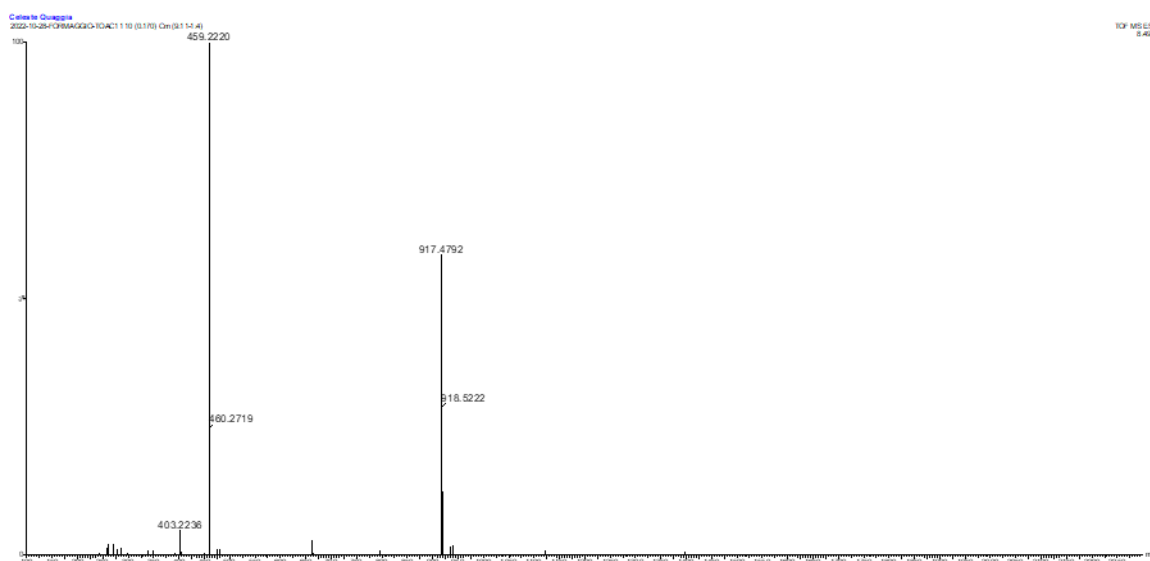


Figura A3 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 5 con 10% TFA, 2,5%TIS, 5% H_2O per 24 ore.

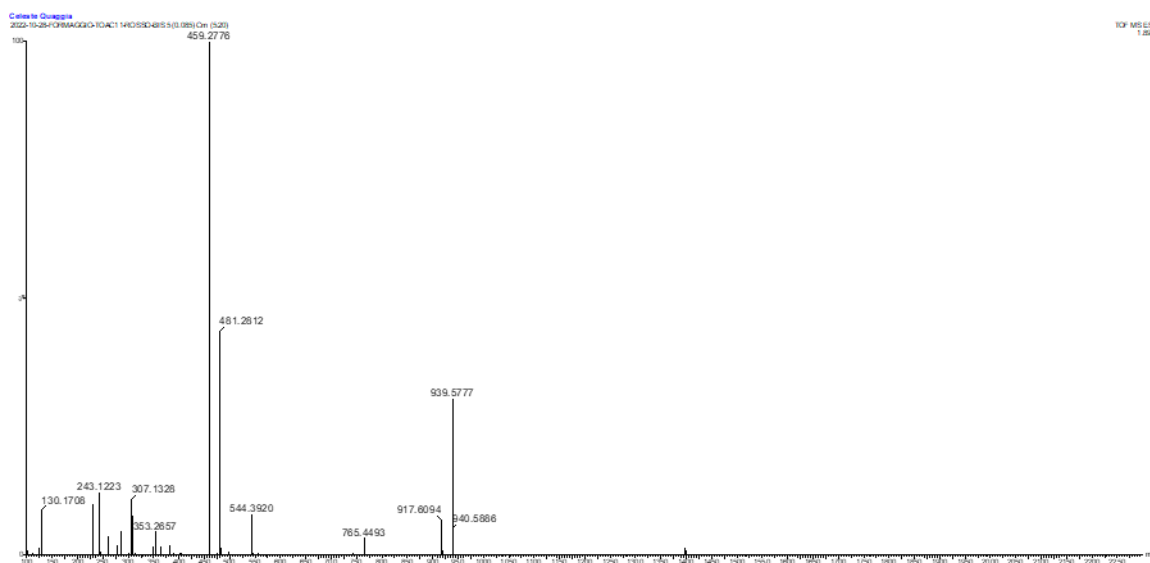


Figura A4 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 7 con 5% TFA, 2,5%TIS, 2,5% H_2O per 24 ore.

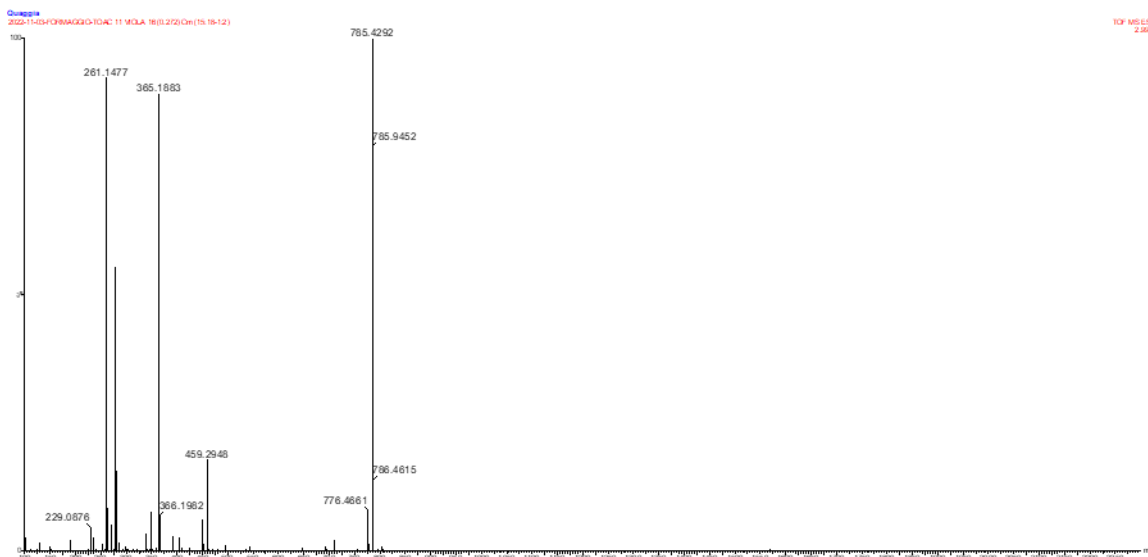


Figura A5 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 8 con 10% TFA, 2,5%TIS,
 per 14 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+2H]^{2+} = 785,4292 \text{ m/z}$ $[M-18]^{2+} = 776,4661 \text{ m/z}$

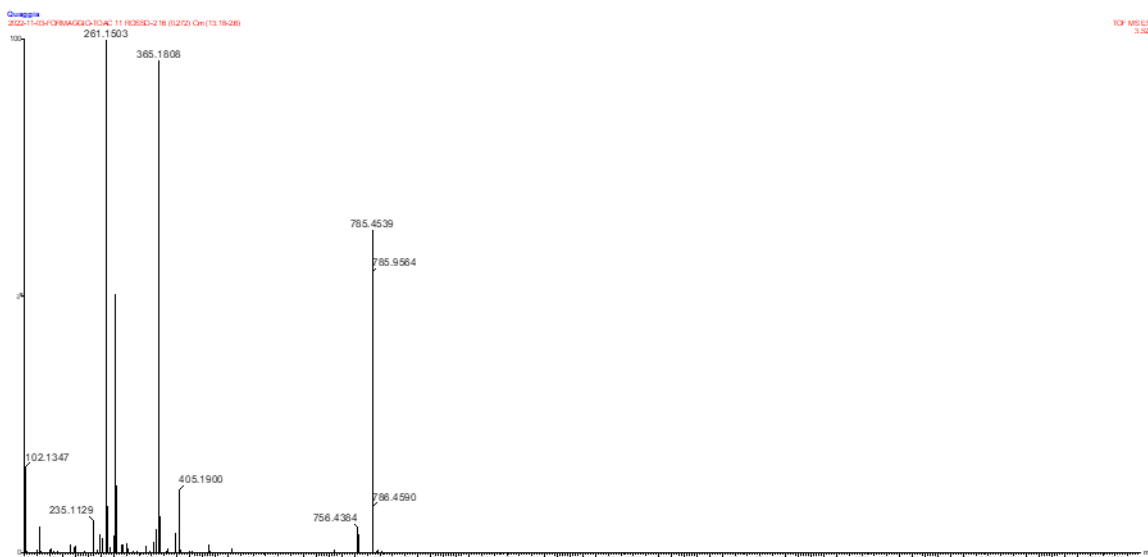


Figura A6 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 9 con 5% TFA, 2,5%TIS,
 per 9 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+2H]^{2+} = 785,4539 \text{ m/z}$ $[M-58]^{2+} = 756,4384 \text{ m/z}$

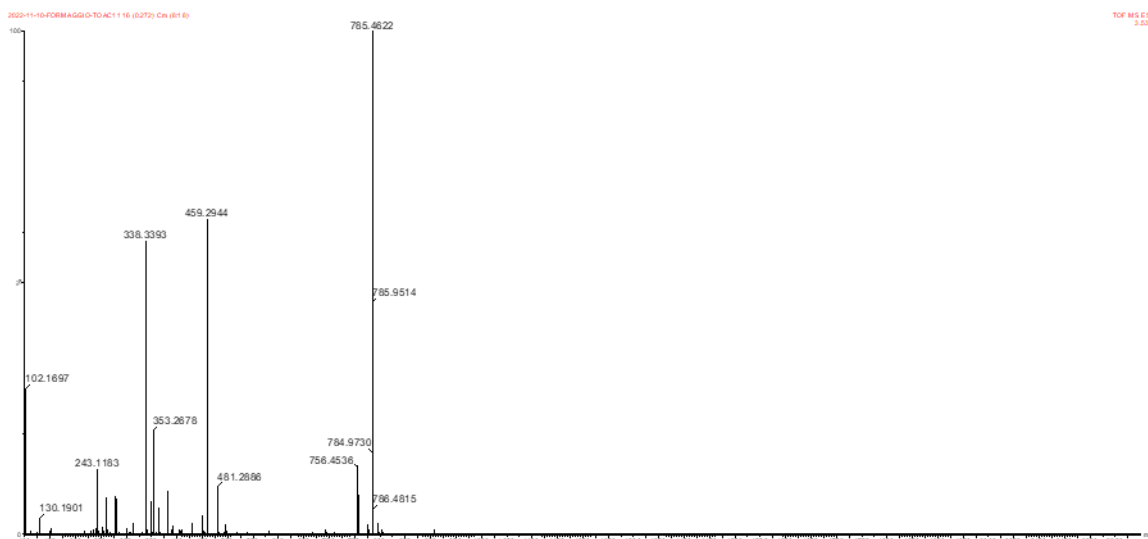


Figura A7 : Spettro di HRMS ESI-TOF dello sblocco 11 con 5% TFA, 2,5%TIS,1% H₂O per 7 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+2H]^{2+} = 785,4489 \text{ m/z}$ $[M-58]^{2+} = 756,4536\text{m/z}$

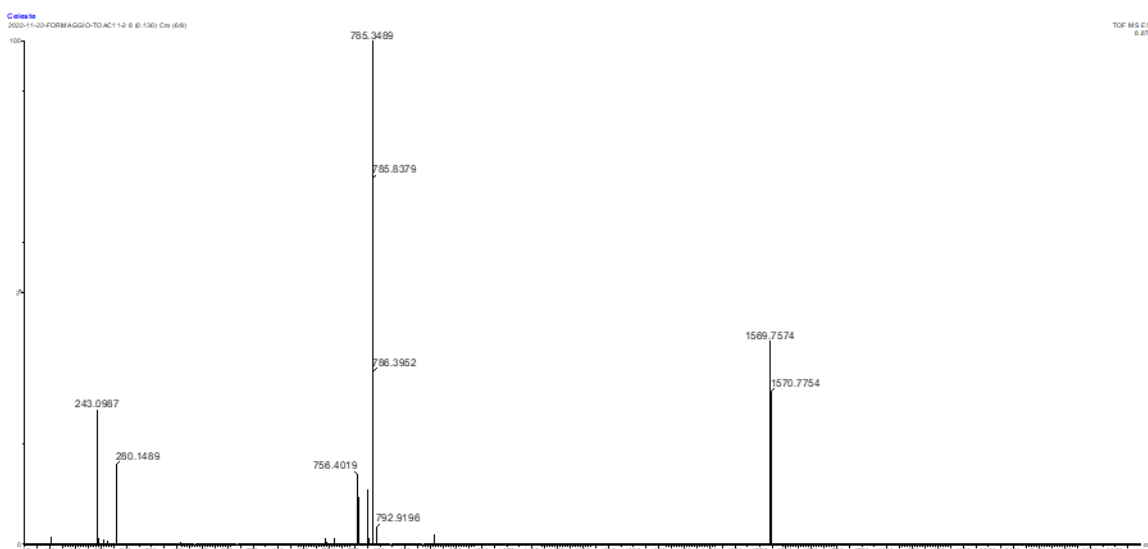


Figura A8 : Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione B con 5% TFA, 2,5%TIS, per 7 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+H]^+ = 1569,7574 \text{ m/z}$ $[M+2H]^{2+} = 785,3489 \text{ m/z}$ $[M-58]^{2+} = 756,4019\text{m/z}$

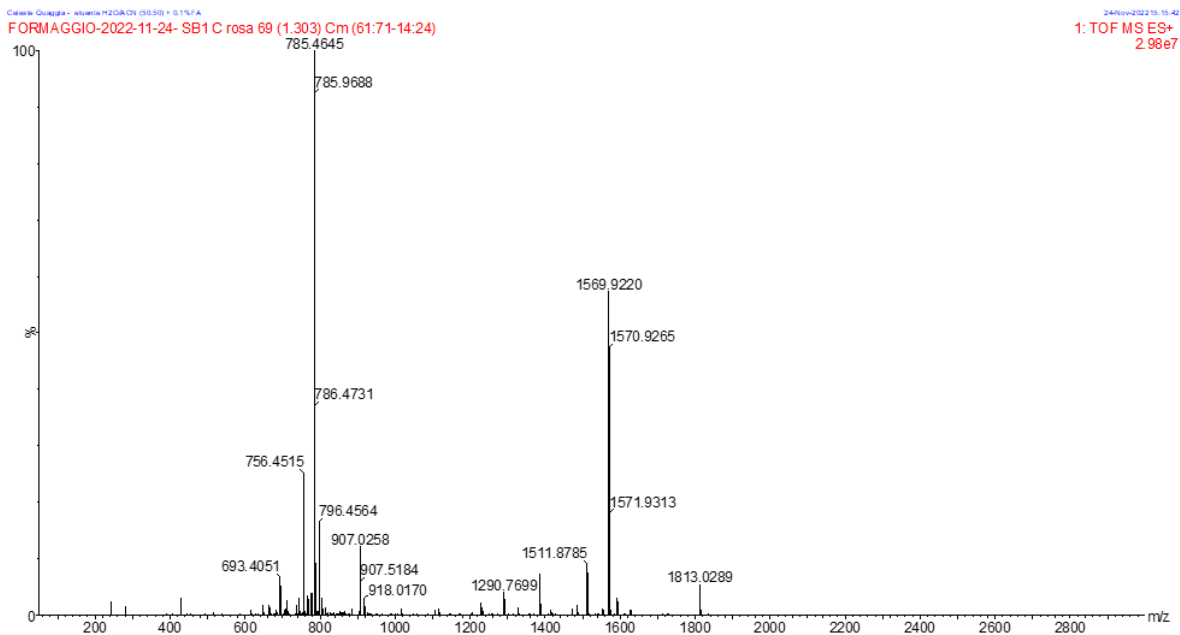


Figura A9 : Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione C con 5% TFA, 2,5% TIS, per 5 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+H]^+=1569,9220$ m/z $[M+2H]^{2+}= 785,4645$ m/z $[M-58]^{2+}= 756,3970$ m/z $[M+Trt]^{2+}=907,5296$

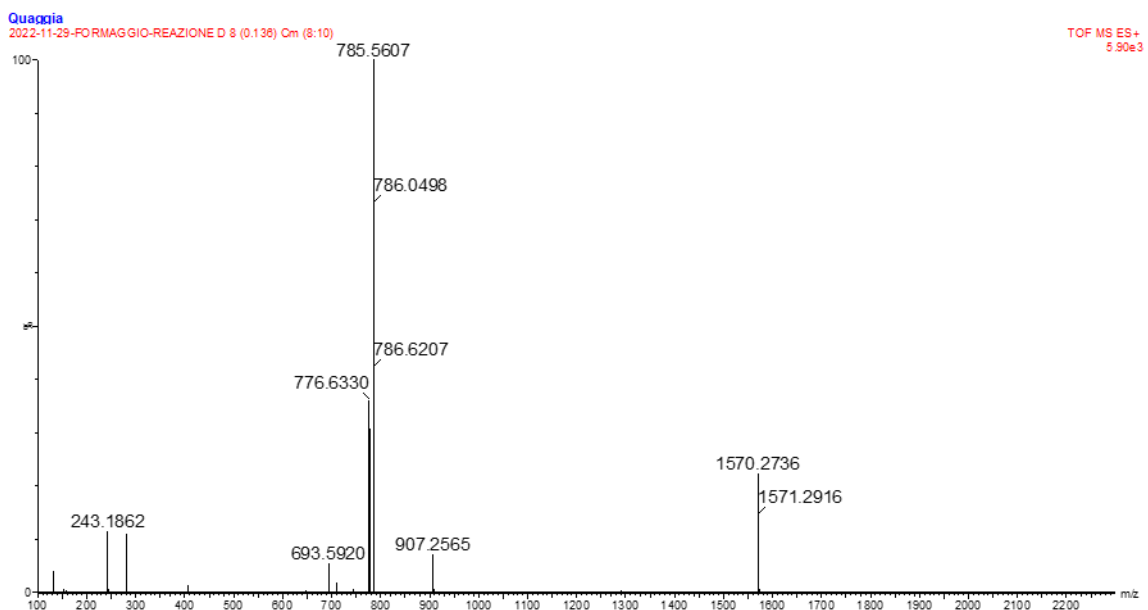


Figura A10 : Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione D con 5% TFA, 2,5% TIS, per 6 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+2H]^+=1570,2736$ m/z $[M+2H]^{2+}= 785,5607$ m/z $[M-18]^{2+}= 776,6330$ m/z $[M+Trt]^{2+}=907,2565$

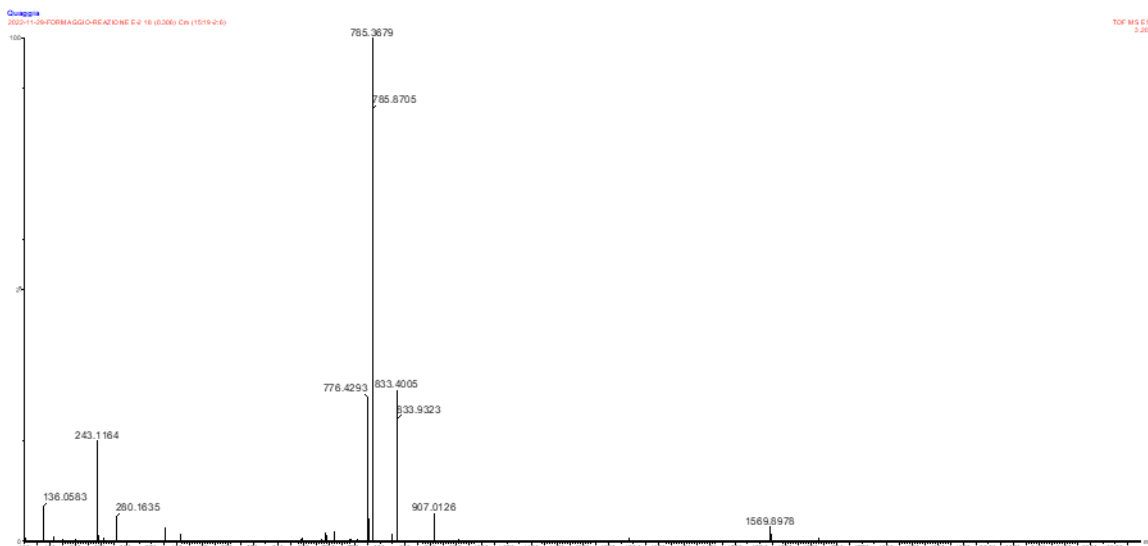


Figura A11 : Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione E con 5% TFA, 2,5% TIS, 1% H_2O per 7 ore. $[MW_{calc}:1568,92]$ $[M+2H]^+=1569,6976$ m/z $[M+2H]^{2+}=785,3679$ m/z $[M-18]^{2+}=776,4293$ m/z $[M+Trt]^{2+}=907,0126$

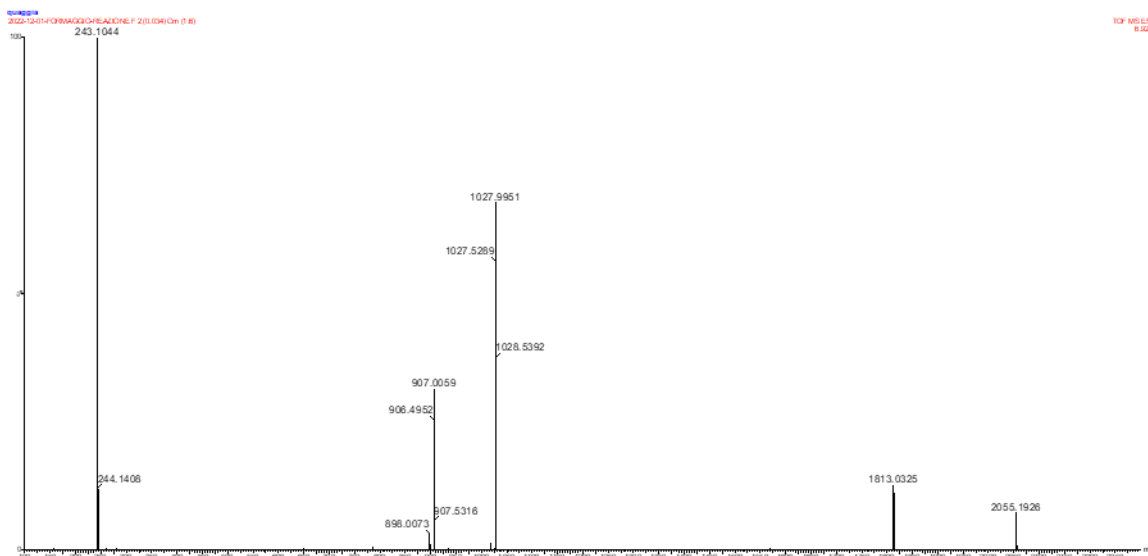


Figura A12 : Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione F con 5% TFA, 2,5% TIS, 2,5% H_2O per 7 ore. $[MW_{calc}:1568,92]$ $[M+Trt]^{2+}=906,4952$

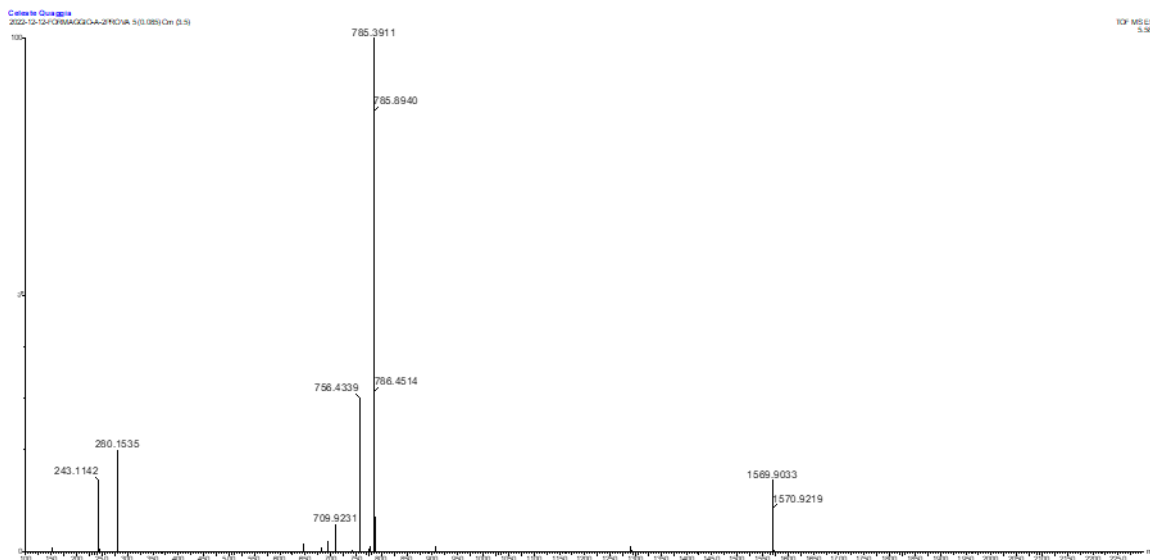


Figura A13 : Spettro di HRMS ESI-TOF della reazione G con 5% TFA, 2,5% TIS, per 7 ore. $[MW_{\text{calc}}:1568,92]$ $[M+2H]^+=1569,6976$ m/z $[M+2H]^{2+}=785,3679$ m/z
 $[M-58]^{2+}=756,4339$ m/z

7 BIBLIOGRAFIA

1. Toniolo C., Crisma M., et al, *Structures of peptides from α -amino acids methylated at the α -carbon* Biopolymers, **33**, 1061-1072,1993.
2. Fosgerau K., Hoffmann T., *Peptide therapeutics: current status and future directions*, Drug Discovery Today, **20**, 122-128, 2015.
3. Di L., *Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties*, The AAPS journal, **17**, 134-143, 2015.
4. Lau J., and Dunn K., *Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends and future directions*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **26**, 2700-2707, 2018.
5. Apostolopoulos V., *A Global Review on short peptides: frontiers and perspectives*, *Molecules*, **26**, 430, 2021.
6. Bahar A. A., Ren D., *Antimicrobial Peptides*, Pharmaceuticals, **6**, 1543-1575, 2013
7. Hancock R. E., Sahl H. G., *Manufacturing of peptides exhibiting biological activity*, Nature biotechnology, **24**, 1551-1557, 2006.
8. Dalla Torre C., Sannio F., et al, *Peptaibol Analogs Show Potent Antibacterial Activity against Multidrug Resistant Opportunistic Pathogens*, nt. J. Mol. Sci., **24**(9), 79-97,2023.
9. Hancock R. E., Haney E. F. and Gill E. E., *The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity*, Nature reviews. Immunology, **16**, 321-334, 2016.
10. Jenssen H., Hamill P. and Hancock R. E., *Peptide Antimicrobial Agents*, Clinical microbiology reviews, **19**, 491-511, 2006.
11. Marik T., Tyagi C., et al. *Structural Diversity and Bioactivities of Peptaibol Compounds From the Longibrachiatum Clade of the Filamentous Fungal Genus Trichoderma*, Front. Microbiol.,**10**, 2019.
12. Hou X., Sun R., et. al., *Peptaibols: Diversity, bioactivity, and biosynthesis*, Engineering Microbiology, **2**, 2022.
13. Zeilinger S., *Secondary metabolism in Trichoderma- Chemistry meet genomics*, Fungal Biology Reviews, **30**, 74-79, 2016.
14. Mueller P. and Rudin D. O., *Action potentials induced in biomolecular lipid membranes*, Nature, **217**, 713-719,1968.
15. Shi M., Wang H. N., et. al., *Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells*, Molecular cancer, **9**, 26, 2010.

16. Venugopal D., Klapper D., et. al. *Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**, 5137-5147, 2010.
17. Neumann N. K. N., Stoppacher N., et. al. *The Peptaibiotics Database – A Comprehensive Online Resource*, *Chemistry & Biodiversity*, **12**, 743-751, 2015.
18. Toniolo C., Crisma M., et al. *Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C^α -tetrasubstitution)*, *Peptide Science*, **60**, 396-419, 2001.
19. Karle I. L. and Balaram P., *Structural characteristics of alpha.-helical peptide molecules containing Aib residues*, *Biochemistry*, **29**, 6747–6756 , 1990.
20. Toniolo C. and Benedetti E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
21. Bohemen A.-I. v., Ruiz N., et al. *Pentadecaibins I–V: 15-Residue Peptaibols Produced by a Marine-Derived Trichoderma sp. of the Harzianum Clade*, *J. Nat. Prod.*, **84**, 1271–1282, 2021.
22. Morbiato L., Haneen D. S. A., Formaggio F., De Zotti M. ; *Total synthesis of the natural, medium-length, peptaibol pentadecaibin and study of the chemical features responsible for its membrane activity*, *Journal of peptide science*, 2023.
23. Hao X., Li S., et al. *Acremopeptaibols A–F, 16-Residue Peptaibols from the Sponge-Derived Acremonium sp. IMB18-086 Cultivated with Heat-Killed Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Natural Products*, **84** (11) , 2990-3000, 2021.
24. Toniolo C, Brückner H. *Peptaibiotics: Fungal Peptides Containing α -Dialkyl α -Amino Acids*. Weinheim, Germany: Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich, Switzerland and Wiley-VCH; 2009
25. Hanson, P., Martinez, G., et al. *Distinguishing Helix Conformations in Alanine-Rich Peptides Using the Unnatural Amino Acid TOAC and Electron Spin Resonance*, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 271,1996.
26. Toniolo, C., Valente, E., et. al. *Synthesis and conformational studies of peptides containing TOAC, a spin-labelled $C\alpha,\alpha$ -disubstituted glycine*, *Journal of peptide science*, **1**, 45, 1995.
27. Hanson, P., Martinez, G., et al. *Electron spin resonance and structural analysis of water soluble, alanine-rich peptides incorporating TOAC*, *Mol. Phys.*, **95**, 957-966, 1998.
28. Hideg, K. e Hankovszky, O.H., in *Spin Labeling: Theory and Applications*, *Biological Magnetic Resonance series*, **8**, 427, 1989.
29. Rozantsev E.G., *Free Nitroxyl Radicals*, Ulrich, H., Ed., Plenum Press, New York, 1970.

30. Shai O., *Mode of action of linear amphipathic-helical antimicrobial peptides*, Biopolymers, 47,45-463, 1998.
31. Merrifield R. B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, Journal of the American Chemical Society, **85**, 2149-2154, 1963.
32. D. M. M. Jaradat, *Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation*, Amino Acids, **50**, 39-68, 2018.
33. Jones J., *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Second edn., OUP Oxford, 1992.
34. K. Barlos, O. Chatzi, et al, *2-Chlorotrityl chloride resin* International journal of peptide and protein research, **37**, 513-520, 1991.
35. Isidro-Llobe A., et al, *Amide acid- protecting groups*, Chem. Rev., **109**, 2455-2504, 2009.
36. Bradley M., et al, *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*, Chemical Society Reviews, **38**, 606-631, 2009.
37. Montalbetti C. A. G. N. and Falque V., *Amide bond formation and peptide coupling*, Tetrahedron, **61**, 10827-10852, 2005.
38. El-Faham A. and Albericio F., *Peptide coupling reagents, more than a letter soup*, Chemical Reviews, 111, 6557-6602, 2011.
39. Carpino L. A. and El-Faham A, *Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis*, J. Am. Chem. Soc. **117**, 5401–5402, 1995.
40. El-Faham A. *New Syntheses Of Bis (Tetramethylene) Fluoroformamidinium Hexafluorophosphate (Btffh) And 1,3-Dimethyl-2-Fluoro-4,5-Dihydro-1h-Imidazolium Hexafluorophosphate (Dfih). Utility In Peptide Coupling Reactions*, The New Journal for Organic Synthesis, **30**, 477-481, 1998.
41. López S. E., Salazar J., *Trifluoroacetic acid: Uses and recent applications in organic synthesis*, Journal of Fluorine Chemistry., **156**, 73-100, 2013.
42. Garcia O, Bofill J. M., et al. *2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-methyl (Pbfm) as an Alternative to the Trityl Group for the Side-Chain Protection of Cysteine and Asparagine/Glutamine*, EurJoc, **2010**, 3631-3640, 2010.
43. Woody R. W. and Tinoco I., *Optical Rotation of Oriented Helices. III. Calculation of the Rotatory Dispersion and Circular Dichroism of the Alpha- and 3¹⁰-Helix*, The Journal of Chemical Physics, **46**, 4927-4945, 1967.

44. Wallimann P., Kennedy R. J. and Kemp D. S., *Large Circular Dichroism Ellipticities for N-Templated Helical Polypeptides Are Inconsistent with Currently Accepted Helicity Algorithms*, *Angewandte Chemie International Edition*, **38**, 1290-1292,1999.
45. C. Toniolo, Polese A., *Circular Dichroism Spectrum of a Peptide 3^{10} -Helix*, *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 2744-2745, 1996.
46. S. Mammi and E. Peggion, *Conformational Studies of Human [15-2-Aminohexanoic acid]little Gastrin in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles by NMR*, *Biochemistry*, **29**, 5265-5269,1990.
47. Wright K., Wakselman M., et al. *Synthesis and Conformational Characterisation of Hexameric β -Peptide Foldamers by Using Double POAC Spin Labelling and cw-EPR*, *Chemistry*, **16**, 11160-11166, 2010.
48. S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science (New York, N.Y.)*, 1972, 175, 720-731.
49. Dobrzyńska I., Szachowicz-Petelska B., et al. *Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells*, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **276**, 113-119, 2005.
50. T. Utsugi, A. J. Schroit, et al, *Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes*, *Cancer research*, **51**, 3062-3066,1991.
51. Zalba S. and ten Hagen T. L. M., *Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy*, *Cancer Treatment Reviews*, **52**, 48-57,2017.
52. Chan Y.-H. M. and Boxer S. G., *Model membrane systems and their applications*, *Current opinion in chemical biology*, **11**, 581-587, 2007.
53. Bechlars, Silke et al. *Cell-free synthesis of functional thermostable direct hemolysins of *Vibrio parahaemolyticus**. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, **76**, 132-42, 2013.

Ringraziamenti

Ringrazio la Professoressa Marta de Zotti per essere stata un vero e proprio mentore. I confronti, le riflessioni, gli scambi di idee che hanno costellato questi mesi di lavoro e ricerca sulla tesi, sono un tesoro che porterò con me.

Ringrazio la Professoressa Elisabetta Collini per la disponibilità e per l'interesse dimostrato per questo lavoro.

Ringrazio tutti i miei colleghi di laboratorio, in particolare, la Dottoressa Chiara Dalla Torre, per avermi pazientemente seguita ed incoraggiata sin dall'inizio.

Ringrazio la mia famiglia, il mio più grande sostegno e la mia guida, perché senza di voi non sarei mai arrivata fino in fondo a questo difficile cammino.

Ringrazio il mio ragazzo, Andrea, per essere stato sempre al mio fianco in ogni momento.

Ringrazio gli amici per avermi regalato momenti di spensieratezza e divertimento.

Infine, grazie Eleonora, perché se ho scelto questo argomento di tesi è stato per te, che mi hai insegnato a lottare e ad essere forte anche davanti alle difficoltà più impensabili.