

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Sintesi e caratterizzazione di coniugati ferrocene-peptide
con potenziale attività antimicrobica**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Controrelatore: Prof. Andrea Biffis

Laureando: Matteo Pesce

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE.....	3
ABBREVIAZIONI.....	5
ABSTRACT	7
1 – INTRODUZIONE	8
1.1. Aspetti generali.....	8
1.1.1. Il problema dell'antibiotico resistenza (AMR).....	10
1.1.2. Cenni storici sugli antimicrobici.....	12
1.1.3. Peptidi terapeutici	14
1.2. Peptidi antimicrobici (AMPs).....	16
1.2.1. Meccanismi d'azione	19
1.2.2. Sintesi industriale dei peptidi	23
1.3. Il ferrocene: caratteristiche principali.....	24
1.3.1. Ferrocene e derivati	25
1.3.2. Ros e ferrocene	26
1.3.3. Coniugati ferrocene - peptide antimicrobici	28
1.4. Scopo della tesi.....	30
2 – PARTE SPERIMENTALE	31
2.1. Materiali e metodi.....	31
2.1.1. Reagenti e solventi	31
2.1.2. Strumentazione e metodi	31
2.2. Sintesi e caratterizzazione	34
2.2.1. Sintesi di Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH- <i>i</i> Pr	34
2.2.2. Sintesi dei coniugati ferrocene-peptide	43
2.3. Test di degradazione enzimatica	50

3 – RISULTATI E DISCUSSIONE	52
3.1. La sintesi peptidica	52
3.1.1. I gruppi protettori	56
3.1.1.1 Protezione del gruppo amminico	56
3.1.1.2. Protezione delle catene laterali	59
3.1.2. Attivazione della funzione carbossilica	60
3.1.3. Kaiser Test	62
3.2. Sintesi e caratterizzazione dei composti	64
3.2.1. Sintesi di Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH- <i>i</i> Pr	64
3.2.2. Sintesi dei coniugati ferrocene-peptide	65
3.3. Studi conformazionali	75
3.3.1. Spettroscopia IR	75
3.3.2. Spettroscopia ¹ H-NMR bidimensionale	80
3.4. Prove di degradazione enzimatica	87
4 – CONCLUSIONI	89
5 – BIBLIOGRAFIA	91

ABBREVIAZIONI

$\cdot\text{NO}$	= Radicale ossido nitrico
$^1\text{O}_2$	= Ossigeno singoletto
6-Ahx	= Acido 6-amminoesanoico
AA	= Generico amminoacido
ACN	= Acetonitrile
AcOEt	= Acetato di etile
Ala	= Alanina
Boc	= Ter-butilossicarbonile
CDCl_3	= Cloroformio deuterato
CF_3COOH	= Acido trifluoroacetico
CH_2Cl_2	= Diclorometano
Cp	= Ciclopentadienile
DCM	= Diclorometano
DIC	= N,N'-diisopropilcarbodiimmide
DIEA	= N,N-diisopropilammina
DMF	= N,N-dimetilformammide
DMSO	= Dimetilsolfossido
DMSO-d_6	= Dimetilsolfossido deuterato
DNA	= Acido desossiribonucleico
EDC·HCl	= N-Etil-N'-(3-dimetilammino) propil-carbodiimmide cloridrata
Et_2O	= Dietiletere
EtOH	= Etanolo
Fc	= Ferrocene
Fc^+	= Ione ferrocenio
Fmoc	= Fluorenilmetilossicarbonile
Gly	= Glicina
H_2O	= Acqua
H_2O_2	= Perossido di idrogeno
H_2SO_4	= Acido solforico
HCl	= Acido cloridrico
HEPES	= Acido 2-[4-(2-idrossietil)piperazin-1-il]etansolfonico

His	= Istidina
HO ₂ [•]	= Radicale idroperossilico
HOBt	= 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HOCl	= Acido ipocloroso
HPLC-MS	= Cromatografia liquida ad alte prestazioni - Spettrometro di massa
Hx	= Esano
KHSO ₄	= Bisolfato di potassio
LPPS	= Sintesi peptidica in fase liquida
MeOH	= Metanolo
Na ₂ SO ₄	= Solfato di sodio
NaCl	= Cloruro di sodio
NaHCO ₃	= Bicarbonato di sodio
NaOH	= Idrossido di sodio
NCAAs	= Amminoacidi non codificati
NH ₂ <i>i</i> Pr	= Isopropilammina
NMR	= Risonanza Magnetica Nucleare
O ₂ ^{•-}	= Radicale superossido
OH [•]	= Radicale idrossido
ONOO ⁻	= Perossinitrito
PhOH	= Fenolo
PM	= Peso molecolare
ROS	= Specie reattive dell'ossigeno
SCE	= Elettrodo a calomelano saturo
SPPS	= Sintesi peptidica su fase solida
TFA	= Acido trifluoroacetico
TIS	= Triisopropilsilano
TLC	= Cromatografia su strato sottile
TOF	= Analizzatore a tempo di volo
Z	= Carbobenzilossi

N.B. Nel testo gli AA chirali si intendono di configurazione L, qualora questa non fosse specificata.

ABSTRACT

L'antibiotico-resistenza (AMR) rappresenta una delle sfide globali del prossimo futuro. Non solo batteri, ma anche funghi, spore, muffe e virus stanno rendendo sempre più inefficaci gli attuali trattamenti farmacologici contro di essi. Tale fenomeno, se non opportunamente contrastato, potrebbe causare non solo problematiche da un punto di vista umanitario e sanitario, ma anche da un punto di vista economico.

Il seguente progetto di tesi ha come scopo principale quello di sintetizzare e caratterizzare peptidi che possiedano attività antimicrobica. La sequenza peptidica comune a tutti i composti sintetizzati è costituita da "His-Ala-D-Ala-His".

A tale scopo, sono stati sintetizzati cinque peptidi differenti attraverso due vie sintetiche differenti quali LPPS e SPPS. Ciascun peptide presenta degli elementi differenti affinché permettano di formulare dei derivati che siano maggiormente resistenti alla degradazione enzimatica e siano maggiormente efficaci contro i patogeni. Questi elementi sono il ferrocene e un aa non codificato (NCAA), che è uno stretto analogo dell'istidina. Inoltre, per i quattro composti con il ferrocene sono impiegati due differenti spaziatori tra quest'ultimo e la sequenza peptidica.

La presenza del ferrocene, noto per le sue proprietà antibatteriche, andrebbe a costituire la componente lipofila necessaria al peptide per interagire con le membrane cellulari, sostituendo la catena di acido laurico presente nel peptide antibatterico di riferimento. In più, permetterebbe di creare nuovi meccanismi di azione antimicrobici, eludendo le attuali difese dei patogeni, favorendo la produzione di ROS e implementando le interazioni elettrostatiche tra coniugato ferrocene-peptide e patogeno.

Pertanto, in questa tesi sono riportate la sintesi di nuovi coniugati ferrocene-peptide, la loro caratterizzazione attraverso HPLC-MS, alcuni studi conformazionali mediante 2D NMR e FT-IR.

Inoltre, si riportano anche i risultati di test condotti per valutare la stabilità alla degradazione enzimatica delle nuove molecole in presenza di siero umano.

In futuro, per i composti più promettenti, verranno effettuati dei test direttamente su diversi patogeni come batteri e funghi.

1. - INTRODUZIONE

1.1. – Aspetti generali

Con il termine “antimicrobico” si identificano tutte le sostanze impiegate per prevenire o trattare un’infezione. All’interno di esse si trovano numerose sottoclassi quali antisettici, antibiotici, antivirali, antimicotici e antiparassitari. ^[1]

Con il termine “antibiotico” si intende invece una sostanza prodotta da un organismo vivente che può inibire la crescita o portare alla morte di un altro organismo, tipicamente un batterio, differenziandosi così dal termine “antimicrobico”.

Dunque, il termine antimicrobico, più generale, racchiude al suo interno pure le molecole sintetiche che possiedono proprietà antibiotiche. In aggiunta, devono essere selettivamente tossiche nei confronti di una o più caratteristiche del microrganismo. Pertanto, una sostanza antimicrobica deve essere in grado di notare differenze a livello strutturale o metabolico tra il patogeno e l’organismo ospite nel quale esso risiede. ^[2]

I batteri sono sempre stati a stretto contatto con la storia dell’evoluzione dell’uomo. L’archeologia forense ha dimostrato che ben prima dell’avvento della scrittura (3200 a.C. ^[3]), l’uomo ha subito gli effetti della presenza dei batteri, sviluppando infezioni anche mortali. Non solo, nel corso della storia epidemie come colera e tubercolosi hanno causato fenomeni di semi-estinzione su alcune aree del mondo. ^[4]

Nonostante ciò, il processo evolutivo dei batteri si differenzia molto rispetto a quello dell’uomo, il che rende più semplice trovare dei target selettivi appartenenti al microorganismo ^[2] rispetto all’organismo nel quale risiedono.

I farmaci che svolgono la loro azione contro i batteri vengono definiti “antibatterici” e possono essere suddivisi in battericidi e batteriostatici. I farmaci battericidi provocano la morte e la distruzione delle cellule batteriche e possono agire sulla parete cellulare, come i β -lattamici, oppure sul DNA dei batteri, come i fluorochinoloni. Gli agenti batteriostatici invece inibiscono la sintesi proteica, impedendo la replicazione del batterio, senza ucciderlo direttamente. Tra questi farmaci si trovano i sulfamidici, le tetracicline e i macrolidi. Spesso la distinzione tra battericida e batteriostatico non è assoluta: possono esserci dei casi in cui un agente è battericida per alcuni microorganismi mentre è batteriostatico per altri. ^[5]

Gli antibatterici possono essere altresì classificati in base al tipo di azione, alla loro origine, alla loro struttura chimica, alla loro modalità d'azione e al loro spettro di attività. [6]

Lo spettro di attività di un antibatterico si basa sul tipo di microorganismo al quale è indirizzato. Questi ultimi vengono suddivisi in Gram-positivi e Gram-negativi. I batteri Gram-positivi sono formati da una membrana citoplasmatica circondata esternamente da una rigida parete cellulare, il peptidoglicano. I batteri Gram-negativi sono formati invece da una sottile parete di peptidoglicano, circondata a sua volta da una seconda membrana lipidica, detta membrana esterna (Figura 1). Lo spazio tra la parete di peptidoglicano e la membrana citoplasmatica prende il nome di periplasma, il quale costituisce un ulteriore strato protettivo. La parete cellulare permette al batterio di mantenere una certa forma, così come la membrana citoplasmatica.

Oltretutto regola il flusso di ioni tra l'interno e l'esterno della cellula. [7]

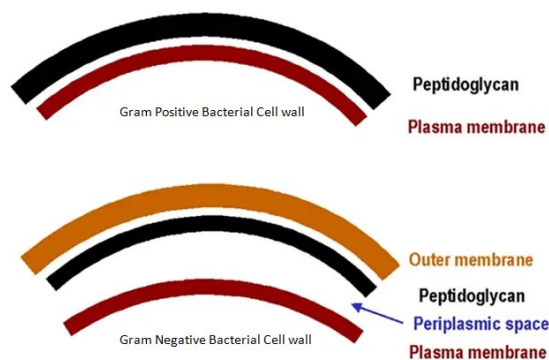


Figura 1 - rappresentazione della distinzione tra batteri Gram-Positivi e Gram-Negativi a livello di parete cellulare.

L'interno della membrana citoplasmatica è simile tra i batteri Gram-positivi e i negativi; tuttavia, sono presenti alcune differenze.

Nei batteri Gram-positivi, la membrana citoplasmatica è circondata da uno spesso strato di peptidoglicano reticolato con acido teicoico carico negativamente, che conferisce rigidità alla cellula. Invece, nei batteri Gram-negativi lo strato di peptidoglicano è più sottile e meno reticolato. Internamente, la membrana citoplasmatica è costituita da fosfolipidi zwitterionici e anionici come fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerolo e cardiolipina, mentre esternamente è presente uno strato di lipopolisaccaridi. All'interno di questo strato sono presenti numerosi gruppi fosfato carichi negativamente, i quali formano dei ponti salini con cationi bivalenti come Ca^{2+} e Mg^{2+} , e vanno a costituire una prima difesa contro l'azione della maggior parte degli antibiotici idrofobici. [8]

Tra le cause principali dell'AMR vi rientra l'uso sconsiderato di antibiotici negli animali da allevamento, rappresentandone la più rilevante.^[13] Tutto ciò viene favorito da una carente legislazione riguardante la loro prescrizione e il loro utilizzo, specie se messa a confronto con le normative, più restrittive, che ne regolano l'uso medico sull'uomo.^[14]

Gli antibiotici, oltre che a prevenire lo sviluppo di malattie nel bestiame, permettono di aumentare il peso degli animali. Anche a causa delle scarse condizioni igienico-sanitarie presenti negli allevamenti, al bestiame viene spesso somministrato un sovradosaggio di antibiotici, il che permette di creare un ambiente favorevole allo sviluppo di fenomeni di resistenza dei batteri nei corpi degli animali.^[15] I ceppi di batteri rafforzati possono poi raggiungere direttamente o indirettamente l'uomo attraverso il cibo animale, l'acqua e il terreno.^[13]

L'utilizzo sregolato degli antibiotici si ripercuote anche a livello ambientale. La presenza degli antibiotici nell'ambiente proviene principalmente da diverse attività antropiche come l'acquacultura e lo smaltimento di rifiuti e reflui. Gli effetti indiretti della presenza degli antibiotici a livello microscopico nell'ambiente sono largamente sconosciuti e si ipotizza che la loro presenza possa alterare l'ecosistema, anche con effetti a lungo termine.^[16]

L'attività biologica degli antibiotici in matrici ambientali differenti dipende dalla loro frazione biodisponibile e dall'interazione con condizioni ambientali come pH, contenuto di carbonio organico, tipo di terreno, contenuto di acqua, tipo di organismo^[17], oltre che al tempo di esposizione e all'effetto combinato di differenti antibiotici.^[16]

La presenza di residui di antibiotici nell'ambiente dipende anche dal profilo farmacocinetico dello stesso e dal modo con cui esso viene somministrato. A livello di salute umana, i residui antibiotici alterano il microbioma e causano disturbi come reazioni allergiche, manifestazione di effetti di tossicità cronica e distruzione delle funzioni digestive. Oltretutto, le infezioni causate da resistenza agli antibiotici hanno un costo elevato per l'economia e il sistema sanitario, aumentando il tempo medio di ospedalizzazione e richiedendo antibiotici di nuova generazione, molto più costosi rispetto ai tradizionali.^[17]

Dunque, per fronteggiare tali problematiche si rende necessario attuare diverse strategie, tra cui l'adozione di piani di azione globali e nazionali, promuovere un uso responsabile degli antibiotici e farmaci già disponibili, attuare piani di sorveglianza su persone, animali e ambiente, adottare una comunicazione trasparente e consapevole con la popolazione da parte delle istituzioni e infine promuovere lo sviluppo di nuove classi di antibiotici e farmaci.^[18]

1.1.2. – Cenni storici sugli antimicrobici

La “golden era” relativa alla scoperta e allo sviluppo degli antibiotici risale al periodo compreso tra il 1950 e il 1970. [19] Tuttavia, l'utilizzo di sostanze antimicrobiche da parte dell'uomo viene rimandato a ben prima del secolo scorso: un trattamento impiegato da antiche civiltà come egizi, greci e romani consisteva nell'applicazione a livello topico di pane ammuffito. L'utilizzo delle muffe per trattare le infezioni venne documentato per la prima volta da John Parkinson nel suo libro “*Theatrum Botanicum*”, pubblicato nel 1640. [20] In altre aree del mondo, sono state rinvenute tracce di tetracicline nelle ossa di resti umani risalenti al 350-550 d.C., probabilmente assunte tramite la dieta. [21] [22] Anche all'interno della medicina tradizionale cinese si trovano rimedi “antibiotici”, in particolare dalla pianta di Artemisia (*Artemisia annua L.*). Il relativo estratto, che prende il nome di artemisina (qinghaosu), è stato usato per più di 1600 anni dagli erboristi cinesi. [23] [24]

In epoca contemporanea, nello specifico all'inizio del '900, il premio Nobel per la medicina del 1908 Paul Ehrlich fu il primo a sostenere l'esistenza di molecole che potessero uccidere selettivamente un microorganismo senza alterare l'ospite. Questo approccio, che prese il nome di “The magic bullet”, permise a Ehrlich di scoprire nel 1910 una classe di nuovi farmaci “chemioterapici” che cambiò radicalmente l'approccio al trattamento della sifilide, causata dal batterio *Treponema pallidum*. Questi farmaci, raffigurati in Figura 3, erano l'arsfenamina (Salvarsan) e la neoarsfenamina (Neosalvarsan) [15], e permisero il progressivo abbandono dei trattamenti a base di sali inorganici di mercurio, poco efficaci e tossici per l'organismo.

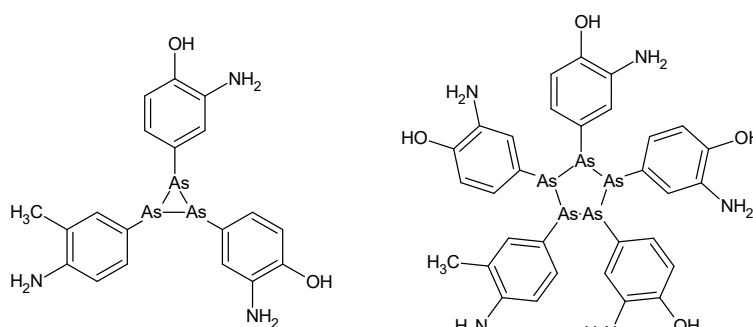


Figura 3 – formule di struttura del Salvarsan. [25]

L'approccio di Ehrlich ispirò vari scienziati, tra cui il Premio Nobel per la medicina 1939 Gerhard Domagk. Egli stava testando dei coloranti per tessuti quando notò che il colorante

raffigurato in Figura 4 era in grado di curare le infezioni da streptococco. Il Prontosil fu così scoperto nel 1932 e venne commercializzato dalla Bayer, iniettabile per via intramuscolare. Ricerche successive dimostrarono che non fu in realtà il Prontosil in sé a dare azione antibatterica, bensì fu il suo prodotto metabolizzato a costituire l'agente attivo sulfamidico. [26]

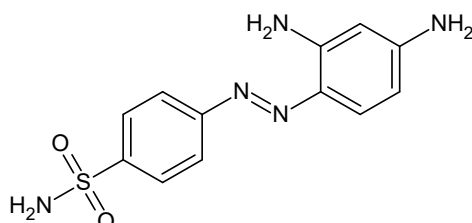


Figura 4 - formula di struttura del Prontosil (nome IUPAC: 4-[(2,4-diamminofenil) diazenil]benzenesulfonammide).

La scarsa solubilità dei sulfamidici in ambiente acquoso rese difficoltosa la loro somministrazione, per cui si rese necessario ottenerli sottoforma di sali. [27]

Ben presto ci fu uno sviluppo di questi farmaci e ne venne chiarito il meccanismo di azione contro i batteri: le sulfonamidi sono una classe di farmaci antagonisti e strutturalmente analoghi all'acido p-amminobenzoico (PABA), un intermedio necessario alla produzione di acido folico, molecola essenziale per la replicazione del DNA delle cellule batteriche. [28] Oltre ai farmaci sintetici, se ne scoprirono altri da derivati "naturali", come microorganismi quali funghi e muffe. Nel 1929 Alexander Fleming pubblicò una scoperta [29] storica: lasciando aperta una piastra di Petri contenente una coltura batterica di ceppi di *Staphylococcus aureus*, questa venne contaminata accidentalmente da delle spore appartenenti a una muffa. Fleming osservò che dove erano presenti le spore, le colonie batteriche morivano. In questo modo scoprì la penicillina, che si dimostrò efficace contro i patogeni Gram-positivi. Tuttavia, non riuscì ad isolare la penicillina dalla muffa. Per la produzione in grandi quantità bisognò attendere fino al 1940, quando Florey ed Ernst Chain riuscirono ad ottimizzare il processo di isolamento della penicillina dal resto della coltura ammuffita. [30]

La struttura chimica della penicillina (Figura 5) venne chiarita qualche anno dopo, nel 1945 da Dorothy Crowfoot Hodgkin [31], vincitrice del Premio Nobel per la Chimica del 1964. La penicillina venne dunque raggruppata all'interno dei farmaci β -lattamici, permettendone così lo sviluppo anche a livello sintetico.

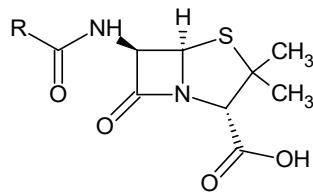


Figura 5 - formula di struttura generale delle penicilline.

I β -lattamici svolgono la loro funzione antibiotica andando ad inibire le trans peptidasi batteriche, enzimi coinvolti nella sintesi del peptidoglicano, componente della parete cellulare dei batteri. Al loro interno, vi è una sottoclasse di enzimi chiamati “ β -lattamasi”, che possiedono la capacità di rendere inefficace l’effetto dei β -lattamici, specifici per ogni differente farmaco, generando così fenomeni di resistenza ai trattamenti farmacologici. [32]

1.1.3. - Peptidi terapeutici

Il primo derivato peptidico conosciuto, la benzoilglicilglicina venne sintetizzato nel 1882 dal chimico Theodor Curtius. Tuttavia, viene considerato il chimico Emil Fisher il primo ad aver affrontato in modo sistematico tale campo della chimica. La prima sintesi peptidica, così come la creazione del termine "peptide", fu riportata da Fischer e Fourneau nel 1901 [33] [34] attraverso la sintesi di un dipeptide libero, la glicilglicina. [35]

La prima metà del XX° secolo ha visto la scoperta di diversi peptidi bioattivi, partendo dallo studio di ormoni presenti naturalmente nell’uomo come l’insulina (Figura 6). Tale molecola è un peptide costituito da 51 aminoacidi ed è stata isolata per la prima volta da Frederick Banting nel 1921. Successivamente venne sviluppata dallo stesso Frederick, assieme a Charles Best, e nel 1923 fu possibile somministrarla ai pazienti affetti dal diabete mellito.

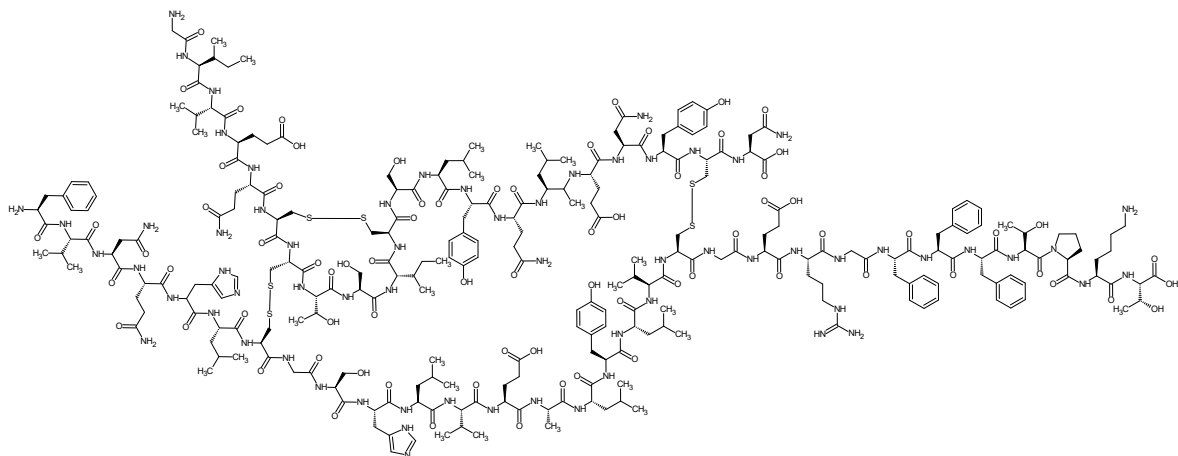


Figura 6 - formula di struttura dell’insulina umana. [36]

Solamente a partire dal 2023, ben oltre 80 farmaci peptidici sono stati approvati nel mondo e più di 200 peptidi sono attualmente in fase di sviluppo clinico, il cui focus è diretto a curare diverse malattie, tra cui malattie infettive, malattie autoimmuni, disturbi metabolici e tumori.

I peptidi terapeutici sono una classe di farmaci composti da una sequenza ordinata di amminoacidi, il cui peso molecolare varia solitamente tra 500 e 5000 Da. ^[37] I peptidi terapeutici possono assolvere diverse funzioni, tra cui ormonale, neuro trasmettitrice e/o antinfettiva. Possiedono elevata affinità e specificità con i recettori della superficie cellulare, simile a quella degli anticorpi. ^[38]

Queste caratteristiche offrono diversi vantaggi rispetto ai farmaci convenzionali. La loro naturale capacità di interagire con ampie superfici proteiche consente di modularne le interazioni proteina-proteina; inoltre, rispetto sempre ai farmaci convenzionali, i peptidi mostrano una maggiore affinità di legame grazie alle loro capacità di riconoscimento molecolare. Dal punto di vista strutturale, le loro dimensioni ridotte ne semplificano la sintesi e ne facilitano la funzionalizzazione, ottimizzandone così le proprietà farmacocinetiche come stabilità e biodisponibilità. In aggiunta, i peptidi mostrano generalmente un'immunogenicità inferiore rispetto agli anticorpi o alle proteine, riducendo al minimo potenziali effetti avversi.

Tuttavia, i peptidi terapeutici possiedono anche degli svantaggi come la maggiore tendenza alla degradazione proteolitica e al breve tempo di emivita nel plasma, richiedendo dosaggi frequenti o differenti sistemi di somministrazione. ^[37]

1.2 - Peptidi antimicrobici (AMPs)

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono tra le più antiche e conosciute molecole che possiedono attività immunitaria innata. Sono abbondanti nelle piante, artropodi, microorganismi e animali. Gli organismi eucarioti e procarioti sintetizzano naturalmente gli AMPs nei ribosomi, trasformandoli in citosol. Possono essere ad ampio spettro o possedere attività specifica contro batteri, virus, funghi e altri parassiti. [39] Anche i mammiferi sono in grado di produrli: nell'uomo gli AMPs più importanti sono le catelicidine e le defensine, prodotte dalle cellule epiteliali e dai neutrofili. [40]

A livello sintetico, la Gramicidina D (Figura 7) è stato il primo AMP approvato nella storia, precisamente nel 1955 dalla Food and Drug Administration. Fu scoperto inizialmente nel 1939 da un batterio del suolo, *Bacillus brevis* [41] ed è costituito da una miscela di Gramicidina A (80%), B (5%), C (15%).

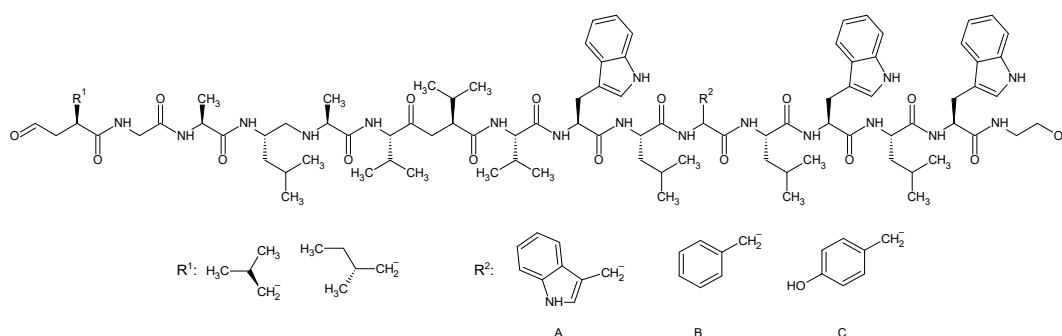


Figura 7 - formule di struttura della Gramicidina D.

È usato per trattare le infezioni superficiali come agli occhi, al naso e alla gola ed esibisce una forte affinità di legame con le membrane cellulari, specie quelle dei batteri Gram-positivi, creando un canale affinché possa permeare e distruggere la membrana. [42]

Gli AMPs possono essere classificati [43][44] secondo diverse caratteristiche:

- origine (insetti, piante, mammiferi, microorganismi).
- attività (antibatterica, antimicotica, antitumorale, antiparassitaria, antivirale, antiinfiammatoria).
- caratteristiche strutturali (α -elica, β -foglietto, estensione lineare (no α e β), e sia α -elica che β -foglietto).
- specie amminoacidiche presenti.

Gli AMPs differiscono tra loro in termini di lunghezza e composizione della sequenza amminoacidica. La maggior parte di essi sono costituiti da un numero di aa compreso tra 5

e 100; inoltre i peptidi antimicrobici possiedono solitamente una carica netta positiva, conferitagli generalmente dalla presenza di aa come lisina, arginina e istidina. [39]

La carica di un AMPs ne influenza l'attività antimicrobica: valori troppo elevati di carica, come +6 e +7, portano a un incremento dell'attività emolitica, e causano la perdita di attività antimicrobica. Questo è dovuto al fatto che, interazioni estremamente forti tra il peptide e i gruppi di testa fosfolipidici della membrana cellulare, ne impedirebbero la traslocazione al suo interno. [45] Il valore della carica è determinato dalla sequenza amminoacidica, la quale conferisce al peptide altre proprietà, quali idrofobicità e anfipaticità.

L'idrofobicità di un peptide antimicrobico, tipicamente pari al 50%, è data dalla presenza all'interno della sequenza amminoacidica di aa come valina, leucina, isoleucina, alanina, metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano. Questa proprietà regola la ripartizione degli AMPs all'interno della membrana cellulare. Generalmente, gli AMPs altamente idrofobici possono essere tossici per le cellule dei mammiferi e quindi risultare poco selettivi nei confronti delle cellule microbiche. L'anfipaticità invece si riferisce alla quantità relativa di residui idrofilici e residui idrofobici presenti all'interno della sequenza amminoacidica. [45] Per i peptidi, ci riferisce a tale proprietà a seguito di un avvolgimento ad elica che permette la formazione di una faccia con residui prevalentemente idrofobici ed un'altra con residui prevalentemente polari.

Gli aa piccoli come la glicina incrementano l'attività antimicrobica. I peptidi costituiti da essa, oltre a possedere proprietà antimicotiche e antitumorali, possiedono elevata selettività e attività antimicrobica, specie per i batteri Gram-negativi. In aggiunta, gli AMPs ricchi in glicina che possiedono una carica netta pari a +1 o +2 e che richiedono un cofattore (es. Zn^{2+}) esibiscono un'elevata attività biocida, migliorando la risposta immunitaria. [39]

La presenza di aa carichi positivamente, come l'istidina, influenza l'attività del peptide. Recentemente [46] è stato evidenziato che impiegando l'istidina all'interno della sequenza amminoacidica non si osservano effetti antimicrobici a pH neutro. L'aggiunta di un cofattore come lo Zn^{2+} permette di ripristinare l'attività antimicrobica, poiché è in grado di impartire una carica netta positiva all'istidina. È stato altresì notato che protonando l'istidina a pH acidi, migliorano le proprietà antimicrobiche della molecola, specie in sequenze amminoacidiche realizzate artificialmente. [46] Non da meno, i peptidi ricchi in istidina possiedono una buona capacità di permeazione della membrana. [43]

Ciononostante, gli AMPs possiedono dei punti critici da tenere presenti nella loro progettazione, tra cui il poter causare rottura delle membrane cellulari degli organismi eucarioti, portare allo sviluppo di effetti avversi emolitici, avere costi di produzione elevati

con annesse difficoltà sintetiche, possedere stabilità limitata a ristretti range di pH ed essere facilmente idrolizzabili dalle proteasi. ^[43]

Oltretutto, gli AMPs possono perdere la loro attività in ambiente fisiologico e salino, causata dalla perdita di interazioni elettrostatiche con le membrane cellulari. Con il siero possono instaurare legami con proteine, come l'albumina, ed essere maggiormente suscettibili a degradazione proteolitica. Altri aspetti problematici riguardano l'instabilità in vivo e la tossicità. ^[40] Mentre il profilo di sicurezza e di effetti collaterali degli antibiotici tradizionali è ben noto, non sono presenti abbastanza dati clinici relativi all'impiego di AMPs, il che ne limita l'utilizzo o l'approvazione ^[47] e di conseguenza il loro sviluppo.

Nonostante alcune restrizioni, esistono diverse strategie per migliorare l'azione degli AMPs. Tra queste, figura l'impiego di metodi di screening per identificare nuovi potenziali ed efficaci AMPs. ^[48] Non solo, anche l'implementazione di metodi di sintesi automatizzati rappresentano una soluzione ottimale al fine di ridurre i costi. Altre strategie possono essere quelle di legare i peptidi ad altre molecole come nanoparticelle, dendrimeri o enzimi per renderli più attivi e stabili, riducendone le dosi da somministrare ^[48], acetilare l'azoto terminale oppure ottenere dei peptidi ciclici. ^[45]

Una soluzione potrebbe essere quella di impiegare i D-aa all'interno della sequenza peptidica, specie se di aa non naturali. Questo perché, cambiando la stereochimica del peptide, l'aa non codificato (NCAA) non viene riconosciuto dagli enzimi, essendo questi ultimi stereospecifici. ^[45]

Incorporare D-aa può migliorare l'attività biologica, aumentando la flessibilità strutturale e conformazionale stabilizzando certe conformazioni molecolari rispetto agli analoghi L-aa. ^[49] Tuttavia, impiegare D-aa comporta un aumento dei costi di produzione dei peptidi. ^[45]

In sintesi, un AMPs ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: esibire elevata attività antimicrobica, possedere bassa tossicità verso le membrane delle cellule sane dei mammiferi, avere elevata stabilità alla proteasi, avere bassa capacità di legarsi al siero, essere poco costoso a livello produttivo ed essere facilmente accessibile. ^[43]

Un recente studio ^[50] ha individuato un peptide che possiede notevole attività antimicrobica (Figura 8) da una library di sequenze differenti. Tra queste, spicca la presenza di un aa non codificato (NCAA) che aumenta la resistenza alla proteolisi del peptide.

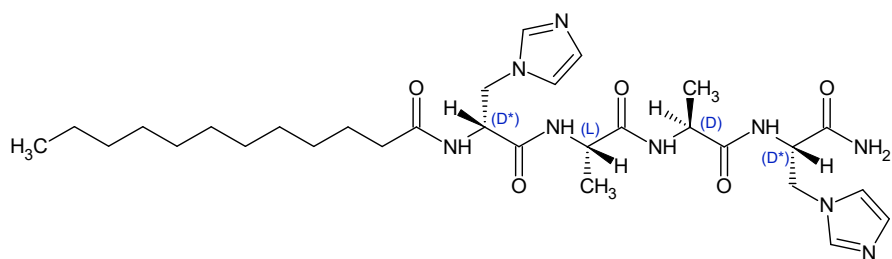


Figura 8 – formula di struttura del peptide antimicrobico “Lauril-D-His*-L-Ala-D-Ala-D-His*-NH₂”.

In questo NCAA, l’anello imidazolico è legato in β rispetto al carbonile attraverso un atomo di azoto e non di carbonio, come invece lo è nell’istidina naturale. Non da ultimo, il peptide si è dimostrato efficace sia contro i batteri Gram-positivi sia contro i batteri Gram-negativi, oltre che al *Saccharomyces Cerevisiae*. Da notare anche la presenza di una catena di acido grasso, l’acido laurico, all’estremità N-terminale. Tale strategia aiuta spesso a migliorare il potere antimicrobico di un AMPs. L’incorporazione di una coda lipidica migliora l’idrofobicità e promuove le interazioni con le membrane cellulari. Non solo, modifica anche la permeabilità, che è correlata alla lunghezza della catena acilica, influenzandone così la specificità e la selettività.^[40]

Tuttavia, più la catena acilica cresce in lunghezza maggiore sarà la tendenza ad autoassemblarsi in soluzione acquosa, portando a una perdita delle interazioni con le membrane batteriche. Risulta dunque essenziale scegliere opportunamente la lunghezza della catena di acido grasso affinché ci sia un bilanciamento tra idrofilicità e idrofobicità, al fine di migliorare la selettività e ridurre la tossicità, mantenendo comunque le proprietà antibatteriche.^[40]

1.2.1. – Meccanismi di azione

Nonostante siano conosciuti più di 2000 AMPs naturali o sintetici, spesso è difficile correlare la loro struttura e sequenza all’attività antimicrobica poiché si instaurano numerose e complesse interazioni tra il peptide e la membrana batterica.^{[8][51]}

Oltretutto, possono cambiare conformazione durante l’adsorbimento sulla membrana batterica, dando origine a differenti meccanismi di azione e complicando ulteriormente l’analisi struttura-attività.^[8]

I peptidi antimicrobici impiegano differenti meccanismi d’azione rispetto agli antibiotici tradizionali. Mentre questi ultimi svolgono la loro azione interrompendo la replicazione del DNA, interferendo con la sintesi proteica o causando rottura dell’involucro cellulare, gli

AMPs possiedono altri meccanismi di azione, che tra l'altro sono meno suscettibili a indurre fenomeni di resistenza. ^[40] In aggiunta, considerando le variazioni strutturali dei microorganismi, lo stesso peptide antimicrobico può possedere differenti meccanismi d'azione, anche contro la stessa specie di patogeno. ^[52]

Generalmente gli AMPs, nel caso dei batteri Gram-positivi, necessitano di diffondersi prima attraverso la matrice di peptidoglicano e poi attraverso la membrana citoplasmatica. Nei batteri Gram-negativi invece, occorre perturbare o distruggere sia la membrana esterna, sia quella citoplasmatica. L'incapacità da parte di AMPs di attuare questi meccanismi comporta a una perdita di attività antimicrobica. ^[8]

I principali metodi di rottura delle cellule batteriche si basano sull'apertura di canali ionici transmembrana, ma evidenze suggeriscono che i peptidi antimicrobici possiedano anche dei target intracellulari. ^[52]

- Meccanismo di azione sulla membrana cellulare.

Il primo stadio riguarda l'assorbimento degli AMPs sopra la superficie della membrana esterna cellulare, processo mediato da interazioni elettrostatiche tra il catione del peptide antimicrobico e i lipopolisaccaridi anionici. ^[8]

Solitamente, le cellule batteriche mantengono un significativo gradiente elettrochimico che, accoppiato a forti interazioni elettrostatiche estese lungo tutta la cellula, favoriscono l'aggregazione e l'accumulo di AMPs sulla membrana. ^[52]

Dunque, il peptide interagisce con la membrana della cellula batterica e interferisce con la costruzione dello strato interno o esterno della membrana batterica, causando perdita dell'integrità di membrana e morte cellulare. In genere, l'interazione dura una decina di nanosecondi e la perdita della *driving force* elettrostatica può comportare una perdita della attività antimicrobica. ^[53]

Una volta assorbiti, gli AMPs instaurano legami a idrogeno con i gruppi fosfato, rompendo di fatto i ponti salini tra i gruppi fosfato e i cationi bivalenti presenti nella membrana esterna. Oltre a ciò, le porzioni idrofobiche del peptide possono interagire con le code lipidiche dei lipopolisaccaridi, portando a un'ulteriore destabilizzazione della membrana esterna. ^[8]

Diversi fattori possono impedire l'accumulo di AMPs sulla membrana come la loro concentrazione, la tendenza ad autoaggregarsi, la composizione e dimensione delle membrane fosfolipidiche, oltre che il potenziale della membrana cellulare batterica. Quest'ultimo permette la migrazione dei peptidi cationici attraverso le regioni non polari della membrana, riducendo la barriera energetica richiesta per poter formare i pori. ^[45]

Una volta legati alle membrane cellulari, gli AMPs vanno in contro a cambiamenti conformazionali. Uno studio ^[49] ha dimostrato che i peptidi antimicrobici con conformazione α -elica possiedono conformazione random coil in ambiente acquoso. Una volta che il peptide interagisce con il doppio strato fosfolipidico, viene ripristinata la sua conformazione ad α -elica anfipatica. Al contrario, i peptidi antimicrobici che possiedono una struttura secondaria a β -foglietto, tendono ad essere maggiormente stabili quando vengono solubilizzati, mantenendo così la loro struttura. ^[45]

Dopo che l'AMP ha permeato o distrutto la membrana, esso diffonde internamente attraverso lo strato periplasmatico, assorbendosi sulla superficie della membrana citoplasmatica. Una volta raggiunta una concentrazione critica superficiale, il peptide induce significative perturbazioni e cambiamenti all'interno della membrana citoplasmatica, portando a una perdita del potenziale di transmembrana e alla fine alla morte della cellula batterica. ^[8]

- Meccanismo di azione attraverso la permeazione della membrana.

Nella permeazione della membrana vi sono quattro modelli: “Barrel-stave model”, “Toroidal-pore model”, “Carpet model” e infine “Aggregate model” illustrati in Figura 9.

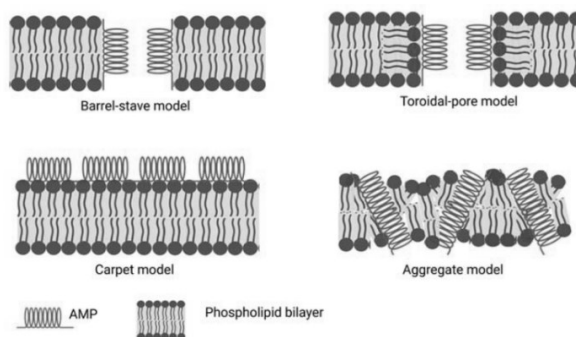


Figura 9 - rappresentazione dei quattro meccanismi di permeazione di membrana da parte degli AMPs.^[41]

La formazione dei pori impiega da alcuni microsecondi a secondi e comporta la perdita del potenziale di membrana ed un rilascio rapido di componenti intracellulari, portando alla morte della cellula. In base alla geometria e dimensioni dei pori, la loro interazione con gli AMPs può essere descritta dai modelli “Barrel-stave” o “Toroidal-pore”. ^[8]

Il modello “Barrel-stave” coinvolge un numero limitato di AMPs. Questo meccanismo si aziona quando i peptidi antimicrobici cationici riescono ad interagire attraverso forze elettrostatiche con la membrana tali da formare gradualmente dei pori o incavi. Queste aperture svolgono la funzione di canale ionico, permettendo così all'acqua di entrare

all'interno della cellula e causando il passaggio di materiale citoplasmatico cellulare verso l'esterno. In alcuni casi, la perdita di energia dovuta alla disgregazione della membrana porta a morte cellulare. [52]

Il modello "Toroidal-pore" si basa sul fatto che il peptide antimicrobico, che si trova all'esterno della membrana cellulare, adotta una conformazione a α -elica, dopo aver interagito con le componenti cariche e idrofobiche della membrana cellulare batterica. Lo spostamento delle teste polari dei residui idrofobici del peptide legato alla membrana cellulare dei batteri porta alla formazione di una struttura idrofobica, causando una rottura che porta a stiramenti e piegamenti da parte della membrana cellulare, compromettendone l'integrità strutturale. Quando il rapporto tra AMPs e lipidi raggiunge una soglia critica, inizia l'orientamento in verticale del peptide all'interno della membrana cellulare, seguito da un autoassemblaggio a formare degli anelli che porta alla formazione di un complesso supramolecolare lipide-peptide. Tuttavia, quando la concentrazione di AMPs è troppo elevata, la stabilità dei pori diminuisce a causa delle repulsioni elettrostatiche causate dalle catene laterali cariche positivamente. [52]

Il modello "Carpet" prevede che gli AMPs carichi positivamente si riarrangino e si dispongano in direzione parallela alla superficie della membrana cellulare. Una volta raggiunta una soglia critica di energia, la membrana cellulare si deteriora, portando prima a una flessione e poi a una rottura della stessa. In questo modello, le porzioni idrofobiche dei peptidi cationici non contribuiscono alla formazione di incavi sulla membrana cellulare. [52]

Infine, il modello "Aggregate" suggerisce che, dopo l'inserzione all'interno della membrana cellulare degli AMPs, questi ultimi formano assieme ai lipidi di membrana dei complessi micellari creando velocemente dei pori all'interno della membrana cellulare, permettendo così agli AMPs di entrare nella cellula. [52]

- Meccanismo di azione intracellulare [45]

Alcuni AMPs si accumulano all'interno delle cellule tissutali, interrompendone le normali funzioni di cellule segnalatrici e portando alla morte di batteri e funghi.

Gli AMPs possono legarsi agli acidi nucleici e alle proteine, impedendone la replicazione, trascrizione, traduzione, compromettendo gli organelli cellulari o interferendo con gli enzimi, al fine di interrompere il ciclo cellulare e il loro metabolismo.

Il modo in cui gli AMPs si legano agli acidi nucleici e alle proteine è differente: dipende dallo specifico target a cui mirano e si basa su differenti elementi quali caratteristiche strutturali, interazioni elettrostatiche, idrofobicità. Oltretutto, i peptidi possono legarsi a

target proteici come recettori di membrana cellulare, causando danni strutturali e funzionali, comportando la non sopravvivenza del patogeno.^[52] In aggiunta, possono anche stimolare le cellule immunitarie al fine di uccidere il patogeno e/o controllare l'infiammazione.

1.2.2. - Sintesi industriale dei peptidi

I metodi principali di sintesi di peptidi sono la sintesi peptidica su fase solida (SPPS) e la biosintesi. La sintesi chimica è vantaggiosa per ottenere peptidi corti (max. 50 aa), per poter ricorrere all'utilizzo di aa non naturali, per introdurre funzionalizzazioni, per impiegare tempi brevi di reazione e consentire un'elevata riproducibilità. La sintesi biologica invece presenta il vantaggio di poter sviluppare peptidi più lunghi e rendere il processo più economico e scalabile a discapito però di una minore riproducibilità.^[37]

Rispetto anche ad altre tecniche di ingegneria quali tecnologie ricombinanti, i peptidi ottenuti attraverso la SPPS risultano essere più puri e le eventuali impurezze, dovute a reazioni collaterali o incomplete, vengono identificate facilmente attraverso HPLC-MS ed NMR, per poi essere rimosse mediante tecniche cromatografiche.^[40]

A livello industriale, la sintesi peptidica su fase solida avviene normalmente su reattori batch. I reattori sono spesso rivestiti per consentire riscaldamento e raffreddamento e possono arrivare a capacità volumetriche pari a 1000 litri. Sono dotati di un filtro nella parte inferiore e la miscelazione viene eseguita mediante agitazione meccanica. La resina su cui avviene la crescita del peptide rimane all'interno del reattore. Tra le fasi di formazione del legame ammidico e di rimozione dei gruppi protettori il solvente viene filtrato attraverso il filtro inferiore e la resina viene lavata con solvente fresco per rimuovere i reagenti in eccesso e i sottoprodotti. La differenza principale, nonché limite, rispetto la scala di laboratorio è il maggiore tempo richiesto per le singole operazioni. Ulteriori aspetti da considerare riguardano la filtrazione, il pompaggio di solventi e reagenti all'interno del reattore, nonché la stabilità degli stessi in soluzione per periodi di tempi prolungati.^[54]

Attualmente il costo per grammo di peptide è variabile e dipende da diversi parametri.^[47]

Si stima essere attorno ai 50-400\$ per grammo di aa prodotto attraverso la SPPS. La vendita annuale di peptidi, tra cui AMPs, è quotata attorno ai 25 miliardi di \$.^[55]

1.3. – Il ferrocene: caratteristiche principali

I metalloceni sono composti di coordinazione organometallici dove un atomo di un metallo di transizione come ferro, rutenio o titanio è legato a due ligandi, i ciclopentadieni [η^5 -(C₅H₅)], che giacciono su due piani paralleli. La distanza interanello è di 3,3 Å. ^[56]

Una caratteristica dei metalloceni è la loro chiralità planare, che si genera solo quando su uno dei ciclopentadieni (Cp) contiene almeno due sostituenti diversi, rendendo le due facce dell'anello non equivalenti. ^[57] Tra i metalloceni spicca il ferrocene (Figura 10), scoperto per la prima volta nel 1951 da Kealy, Pauson e Miller. ^[58]

In realtà, Pauson e Kealy stavano provando a sintetizzare il fulvalene (C₁₀H₈) facendo reagire il bromuro di ciclopentadiene e il cloruro ferroso (FeCl₂). Ciò che ottennero fu invece un solido arancione. Un anno dopo Wilkinson e Woodward determinarono la sua struttura chimica: due anelli ciclopentadienici anionici donano 6 elettroni π al catione Fe²⁺ inserito tra di loro. ^[59]

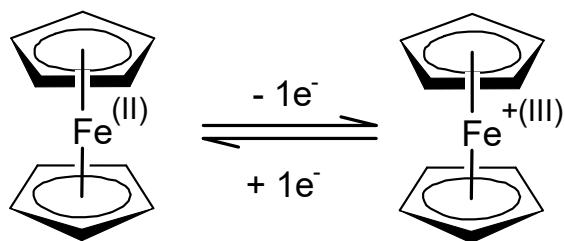


Figura 10 - struttura molecolare del ferrocene (sx) e dello ione ferrocenio (dx).

Per via della sua elevata stabilità e reattività simile al benzene, la chimica del ferrocene si è sviluppata rapidamente negli anni successivi. I ciclopentadieni legati al ferrocene possiedono una parziale carica negativa. Pertanto, essi sono elettrondonatori e subiscono reazioni di sostituzione elettrofila: è possibile sostituire i legami C-H con legami C-X, dove X rappresenta un donatore o un accettore, consentendo il trasferimento delle proprietà geometriche ed elettroniche, tra cui chiralità e comportamento redox, dal ferrocene a composti polifunzionali derivati da esso. ^[60]

Grazie alle sue eccellenti proprietà redox, viene impiegato in diversi ambiti della chimica, tra cui la catalisi omogenea, al fine di ottenere reazioni asimmetriche e stereoselettive. Il suo utilizzo si estende pure in ambito elettrochimico, nella produzione dei polimeri, nonché nella chimica bioorganometallica. ^[58]

Le caratteristiche salienti del ferrocene sono di essere stabile all'aria fino a $T = 400\text{ }^{\circ}\text{C}$, di avere un punto di fusione pari a $172,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, di possedere un atomo di ferro centrale con una struttura elettronica stabile corrispondente al gas nobile appartenente allo stesso periodo (Krypton), di essere un eccellente elettrofilo e di possedere un potenziale di ossidazione reversibile pari a $+0,4\text{ V}$ rispetto SCE (elettrodo a calomelano saturo), anche se il valore esatto dipende dal solvente nel quale esso si trova. In genere, è solubile nella maggior parte dei solventi organici. La reversibilità elettrochimica dipende dal fatto che il trasferimento elettronico di un elettrone verso l'anodo dal ferrocene e poi dall'anodo al catione ferrocenio è relativamente veloce rispetto la scala di potenziale di scansione della voltammetria ciclica. Questo è dovuto al fatto che la struttura del ferrocene e del ferrocenio sono molto simili per cui durante il trasferimento elettronico non si rompono legami. ^[61]

1.3.1. – Ferrocene e derivati

Tra gli interessi principali della chimica sintetica moderna vi è quello di inserire dei frammenti “funzionalizzanti” su una molecola target. Il ferrocene, o i suoi derivati, presenti all'interno della struttura chimica di un composto attivo o di un farmaco, permettono di aumentarne l'attività biologica. ^[62]

I derivati del ferrocene e ferrocenilici sono conosciuti da tempo per le loro proprietà antitumorali e antimicrobiche e la loro stabilità in termini ossidoriduttivi in ambiente biologico, elemento essenziale nello sviluppo di farmaci ferrocenil derivati. ^[63] Oltretutto, il ferrocene possiede bassa tossicità, il che lo rende ideale come bioisostero di gruppi arilici ed eteroarilici. ^[57]

I primi studi sugli effetti antimicrobici del ferrocene sono stati effettuati derivatizzando penicilline, cefalosporine e β -lattamici ^[4] oltre che aminoacidi, peptidi, zuccheri. ^[59]

Nel 1957 è stata ottenuta la ferrocenilalanina, il primo esempio di amminoacido funzionalizzato da un'unità di ferrocene. Ciò ha rappresentato un punto di inizio nello studio e sviluppo dei coniugati ferrocene-peptide, anche al fine di comprendere l'influenza che il ferrocene può avere nella struttura secondaria, nonché nella capacità di costruire delle strutture molecolari ordinate. ^[56]

Più recentemente invece, sono stati sintetizzati dei derivati del fluconazolo funzionalizzati con un'unità di ferrocene, al fine di incrementarne l'attività biologica. Il fluconazolo è un antimicotico che agisce sulla biosintesi degli steroli micotici. ^[64] In particolare, il derivato raffigurato a destra in Figura 11 ha esibito potere antimicotico 400 volte maggiore rispetto

al fluconazolo [65]. Su test *in vivo* ha mostrato risultati promettenti non solo in termini di inibizione della crescita delle cellule di *Candida*, ma anche in termini di maggiore immunopatologia. [66]

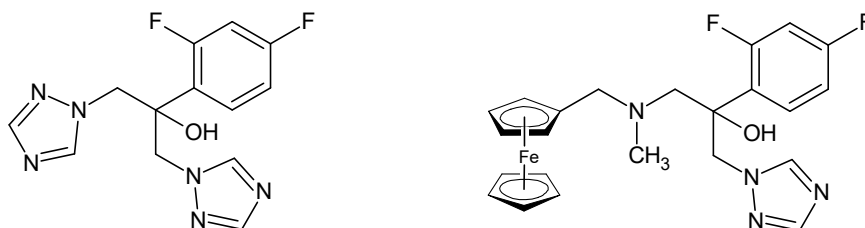


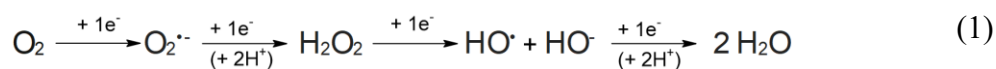
Figura 11 - formula di struttura del fluconazolo (sx.) e derivato funzionalizzato con ferrocene (dx.).

I farmaci che all'interno della loro struttura molecolare includono il ferrocene si caratterizzano per essere stabili e non tossici. [57] Tuttavia, il meccanismo di azione del ferrocene non è stato ancora chiarito del tutto. Si pensa possa interagire con la parete cellulare o che possa inibire l'azione enzimatica, oppure che possa agire direttamente sul DNA, generando radicali ossigeno attraverso un meccanismo di reazioni di Fenton [63] portando così a morte cellulare. [57]

1.3.2. - ROS e ferrocene

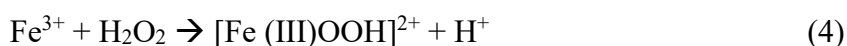
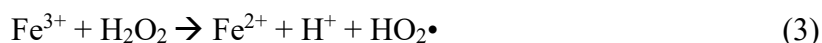
Tutti gli organismi viventi producono ROS come risultato del loro metabolismo cellulare. La loro quantità viene regolata da sistemi antiossidanti costituiti da specie come enzimi o proteine. Tra i ROS più importanti vi rientrano le specie $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , $\cdot NO$ e radicali lipidici. Essi vengono considerati radicali liberi in quanto possiedono elettroni spaiati. Altri ROS che possiedono ugualmente proprietà ossidanti ma che non sono radicali liberi sono H_2O_2 , $ONOO^-$ e $HOCl$ [67] e 1O_2 . [68]

Ognuno di essi svolge un ruolo specifico e la loro azione è influenzata da fattori quali l'ambiente cellulare, il tempo di esposizione e concentrazione. Le tre specie primarie come $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^{\cdot} sono prodotte a partire da O_2 attraverso una serie di reazioni di riduzione come illustrato nell'Equazione 1:

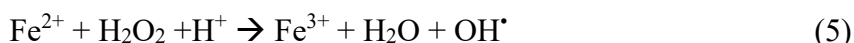


I radicali HO• sono tra i ROS più potenti e reattivi ($E^\circ_{(\text{OH}\cdot/\text{H}_2\text{O})} = 2,81 \text{ V vs NHE}^{[68]}$) e possiedono una forte affinità per siti elettronricchi come gruppi aromatici o molecole contenenti zolfo, come proteine e DNA. La produzione di HO•, oltre ad essere dovuta alla parziale riduzione di H₂O₂, viene prodotta attraverso la reazione di Haber-Weiss e la reazione di Fenton.^[67]

In particolare^[68], la reazione di Fenton è stata scoperta da Fenton nel 19° secolo^[69] e coinvolge la reazione tra i sali di ferro (Fe²⁺), in acqua presente come [Fe(H₂O)₆]²⁺, sali di ferro (Fe³⁺) e H₂O₂:



Il pH gioca un ruolo essenziale in quanto potrebbe causare reazioni di idrolisi di Fe²⁺ formando specie Fe(OH)_n (n= 1-4). Le cellule dei mammiferi possiedono valori di pH intracellulari che variano da 4.7 nei lisosomi ad 8 nei mitocondri. Le cellule tumorali, ad esempio, sono più acide di quelle sane. L'efficienza ottimale per la reazione di Fenton è ottimale nel range di pH compreso tra 2 e 4 e in ambiente acido, l'Equazione 2 diventa:



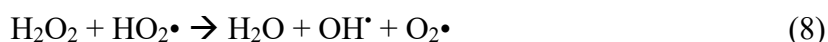
Anche l'anione radicale superossido O₂^{•-} e la sua forma protonata HO₂• si formano a seconda del pH. In presenza di un eccesso di H₂O₂, il radicale OH• viene ossidato, portando alla formazione della forma protonata dell'anione radicale superossido O₂^{•-} ovvero il radicale HO₂• (pKa = 4.8):



Le proprietà basiche e nucleofile di O₂^{•-} dipendono soprattutto dal solvente, se acquoso o no. L'HO₂• è altamente instabile in acqua e dismuta in H₂O₂ e O₂• (Equazione 7). In un mezzo idrofobico, le reazioni basiche e nucleofile sono favorite e la dismutazione avviene mediante l'effetto di un catalizzatore enzimatico come superossido dismutasi.



Anche il radicale $\text{HO}_2\bullet$ reagisce con H_2O_2 per produrre $\text{OH}\bullet$, ma questa reazione è troppo lenta per contribuire in modo significativo alla produzione del radicale $\text{OH}\bullet$ [68]:



Un aspetto importante che contraddistingue il ciclo di reazioni di Fenton del ferrocene e dei suoi derivati è che il Fe(II) è saturo da un punto di vista coordinativo dato che FeCp_2 è un complesso stabile di 18 e^- . Dunque, i radicali $\text{OH}\bullet$ e $\text{HO}_2\bullet$ non possono legarsi al centro del Fe. Questo in contrasto con la forma idratata del Fe^{2+} dove i ligandi H_2O possono essere sostituiti da anioni idrossile, radicali o essere deprotonati facilmente.

I fattori principali che influenzano e distinguono l'ossidazione tra $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ e FeCp_2 sono la solubilità, la coordinazione e il potenziale redox $E^\circ_{\text{Fe(III)/Fe(II)}}$. I sali di $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ sono per lo più solubili in acqua, mentre il ferrocene è solubile in solventi organici non polari e insolubile in acqua. Un altro aspetto riguarda i sostituenti dell'anello che influenzano il potenziale redox del gruppo ferrocenile. In particolare, quando vi sono legati uno o due gruppi carbonilici sugli anelli ciclopentadienici, aumenta il potenziale di ossidazione diventa rispettivamente più elevato di 0,3 V o 0,6 V, rispetto a quello del ferrocene. [68]

1.3.3. - Coniugati ferrocene-peptide antimicrobici

Lo sviluppo di nuovi farmaci si può basare anche sul miglioramento di alcuni già presenti, come ad esempio gli AMPs. Attraverso la strategia della coniugazione è possibile ottenere nuove specie dall'unione di sequenze di AMPs già presenti, combinandole con altre molecole antimicrobiche, al fine di incrementarne l'attività antibatterica. Il ferrocene è un metallocene che esibisce attività antimalarica, antitumorale e antibatterica. [70]

In letteratura sono presenti confronti tra farmaci e i loro analoghi ai quali è legato il ferrocene. Quest'ultimo sembra conferire non solo una maggiore capacità di permeazione della membrana cellulare essendo apolare, ma potrebbe anche inibire la disponibilità dei siti di legame dei metalli in enzimi cruciali, grazie alla delocalizzazione degli elettroni π . Nel caso dei peptidi, si ritiene che sia l'idrofobicità del ferrocene il fattore principale responsabile dell'incremento dell'attività biologica. [68]

Alcuni AMPs richiedono la presenza di uno ione metallico per svolgere la loro funzione. Inserendo frazioni organometalliche, come il ferrocene, migliorano attività e selettività. Questo permetterebbe di poter sviluppare nuovi meccanismi di azione, in quanto la componente metallorganica sarebbe sconosciuta ai batteri. [71]

A tale scopo, risulta importante stabilire come la bioconiugazione possa potenziare l'azione dei farmaci contro differenti patogeni, e possa ridurre la tossicità per l'organismo. Secondo recenti studi, funzionalizzando il ferrocene con il peptide RP1, si genera il catione ferrocenio, che agisce sulla membrana plasmatica del microorganismo, andandola a destabilizzare. Questo effetto comporta la formazione di radicali ossigeno (ROS) che causano stress ossidativo a differenti componenti cellulari. [72]

Come descritto precedentemente (p.17) l'idrofobicità del peptide è un fattore cruciale nell'instaurare le interazioni idrofobiche con l'interno del doppio strato fosfolipidico. Queste interazioni causano la rottura della membrana, la fuoriuscita di liquido citoplasmatico e, potenzialmente, la morte cellulare. A tale scopo, il ferrocene è noto per essere un componente altamente lipofilo, il che rende i suoi bioconiugati maggiormente efficaci nel permeare il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare. [73]

La forma lipofila neutra consente il trasferimento del derivato attraverso le membrane biologiche, mentre la forma ossidata cationica fornisce solubilità in mezzi idrofili. [63]

Diverse tipologie di coniugati ferrocene-peptide sono stati sintetizzati e sviluppati per diverse applicazioni in ambito medico come farmaci anticancro, antimicrobici, in ambito analitico (nanobiosensoristica) e forense. In ambito biologico, è stato osservato che un complesso ferrocene-peptide deve possedere all'interno della sua struttura tre porzioni ben definite (Figura 12), al fine di aumentarne l'attività biologica [74]:

- un elemento/nucleo elettroattivo,
- un linker, che agisca da cromoforo e abbassi il potenziale di ossidazione del ferrocene,
- una catena amminoacidica, che può interagire con altre molecole attraverso legami a idrogeno o altre forme di interazione secondarie intermolecolari.

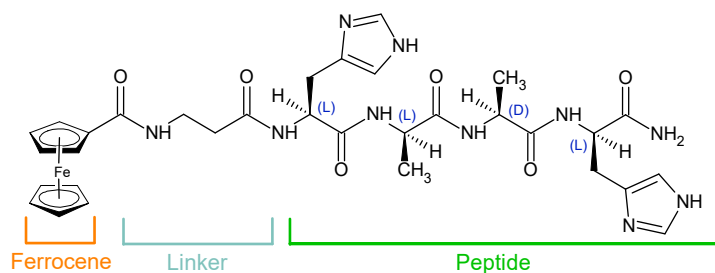


Figura 12 - formula di struttura di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

1.4. - Scopo della tesi

Gli obiettivi che il seguente progetto di tesi si pone sono molteplici.

Il primo è quello di svolgere la sintesi in soluzione (LPPS) e in fase solida (SPPS) di differenti peptidi, composti dalla medesima sequenza di aa “L-His-L-Ala-D-Ala-L-His”. Questa sequenza viene adattata in base alla tipologia di sintesi impiegata.

Su fase solida si prevede la formazione di un legame ammidico tra l'acido ferrocencarbossilico e il peptide, al fine di formare dei coniugati ferrocene-peptide. Come dimostrato in recenti studi su farmaci o biomolecole si prevede che i peptidi coniugati al ferrocene possiedano attività antimicrobica elevata rispetto agli analoghi non funzionalizzati. Il ferrocene viene legato al peptide attraverso uno spaziatore, di differente lunghezza, come la β -alanina oppure l'acido 6-amminoesanoico. La funzione principale dello spaziatore è quella di preservare il potere antimicrobico del peptide e impedire che il ferrocene possa interferire negativamente su di esso.

In fase liquida invece ci si propone di sintetizzare un peptide di riferimento per gli studi biologici che abbia l'acido laurico al posto del ferrocene.

Il secondo obiettivo è quello di confrontare sotto diversi aspetti i peptidi ottenuti e comprendere:

- a parità di sequenza peptidica, l'influenza del ferrocene rispetto all'analogo derivato dell'acido laurico.
- a parità di sequenza peptidica, l'effetto di spaziatori di differente lunghezza tra il ferrocene e il peptide.
- gli effetti prodotti dall'impiego di aa non codificati (NCAAs) all'interno della sequenza peptidica, in sostituzione degli analoghi naturali.

Un'ulteriore obiettivo è quello di mettere a punto un protocollo sintetico su fase solida che consenta di legare il ferrocene direttamente al peptide, preservandone lo stato di ossidazione e verificandone la fattibilità.

Questi confronti tra i vari coniugati ferrocene-peptide e lauril-peptide verranno effettuati attraverso misure di caratterizzazione quali HPLC-MS, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ mono e bidimensionale, al fine di determinarne la struttura e la conformazione.

In ultimo, verrà valutata la stabilità alla degradazione enzimatica su campioni di siero umano.

2 - PARTE SPERIMENTALE

2.1. - Materiali e metodi

2.1.1. - Reagenti e solventi

Alfa Aesar: acido ferrocencarbossilico.

CBL: Fmoc-Rink Amide MBHA resina

Eurisotop: cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato.

Iris Biotech: Fmoc- β -Ala-OH Fmoc-L-Ala-OH Fmoc-L-His(Trt)-OH Fmoc-D-Ala-OH Fmoc-6-Ahx-OH, N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato (EDC · HCl), oxyma pure. Z-Gly-OH

Macherey-Nagel: silica gel 60 M.

Sigma-Aldrich: acetato di etile, acido laurico, acido trifluoroacetico, bicarbonato di sodio, bisolfato di potassio, diclorometano (DCM), diclorometano anidro, dimetilsolfossido, esano, etere dietilico, fenolo, HEPES, idrossibenzotriazolo idrato (HOBt · H₂O), N,N'-Diisopropilcarbodiimmide (DIC), N,N-diisopropilammina (DIEA), N,N'-dimetilformamide (DMF), piperidina, siero umano, solfato di sodio anidro, triisopropilsilano (TIS), palladio (Pd/C 10%), dietilammina (DEA).

VWR Chemicals: acetone nitrile, etanolo, idrossido di sodio, metanolo.

2.1.2. - Strumentazione e metodi

- Cromatografia su strato sottile (TLC).

L'andamento delle reazioni viene monitorato mediante cromatografia su strato sottile (TLC), usando lastre di gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck).

I composti ottenuti, contenenti gruppi cromofori quali gruppi aromatici, vengono osservati attraverso la lampada UV "Desaga HP-UVIS", alla lunghezza d'onda di 254 nm.

Al fine di determinare i fattori di ritenzione, si impiegano i seguenti eluenti:

R_{f1}: DCM:EtOH (9:1)

R_{f2}: DCM:EtOH (9.5:0.5)

R_{f3}: DCM:MeOH (9:1)

- Cromatografia flash.

Al fine di purificare i composti ottenuti in soluzione, si impiega il sistema “Biotage™ Isolera One” a fase diretta. La fase stazionaria è costituita da colonne di silice SNAP Cartridge KP-SIL (50 o 100 g.). La composizione della fase mobile viene scelta al fine di rendere ottimale il processo di purificazione ($0.3 \leq R_f \leq 0.4$).

Prima di procedere alla purificazione, il prodotto è stato fatto adsorbire su gel di silice e poi caricato in colonna.

Per la purificazione del peptide finale si impiega il sistema “Biotage™ Isolera One” a fase inversa. La fase stazionaria è costituita da una colonna “SFAR BIO C18 D Duo 300 Å” e la fase mobile è costituita dai seguenti eluenti:

A: H₂O_{Milli-Q} + 0.05% TFA

B: ACN 90% + H₂O_{Milli-Q} 10% + TFA 0.05%

Il gradiente scelto è 30-70% di B con flusso di 12 mL/min.

- HPLC-MS (High Pressure/Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry).

Per le analisi di massa si impiega uno spettrometro di massa con rilevatore a tempo di volo (TOF) e sorgente ESI della Mariner, Perseptive Biosystems. La colonna usata è la “Phenomenex Kinetex 3.5 μm XB-C18, 100 Å, 100x4.6 mm”. ($\lambda = 214$ nm e 280 nm)

Gli eluenti impiegati sono:

A: H₂O_{Milli-Q} + 0.1% TFA

B: ACN + 0.1% TFA

Il gradiente scelto è 5-50% B in 20 minuti, flusso di 1 mL/min e con volume di iniezione del campione variabile (20-25-50 μL).

- Spettrometria NMR

Gli spettri degli intermedi di sintesi del peptide ottenuto in soluzione vengono registrati con lo spettrometro “Bruker modello Advance III HD” operante a 400.130 MHz, T= 25°C in CDCl₃. Gli spettri ¹H-NMR mono e bidimensionali dei coniugati Fc-peptide e del peptide finale ottenuto in soluzione vengono registrati a 600.130 MHz, T= 25°C in DMSO-d₆.

Gli spostamenti chimici (δ) vengono espressi in parti per milione (ppm), rispetto al segnale del tetrametilsilano (TIS).

Le molteplicità dei picchi sono espresse come s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), q (quartetto), qt (quintetto), dd (doppietto di doppietti), m (multipletto).

- HPLC analitico

Le analisi HPLC sono effettuate dal cromatografo “Hitachi Chromaster” con rilevatore UV ($\lambda_1 = 214 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 280 \text{ nm}$). La tipologia di colonna è a fase inversa “Phenomenex Luna, C18, 100 Å, 5 μm , 100 x 4.60”.

Gli eluenti impiegati sono:

A: $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$ 90% + ACN 10% + TFA 0.05%

B: ACN 90% + $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$ 10% + TFA 0.05%

Le condizioni di eluizione sono: gradiente 0-50% B in 30 minuti, flusso 1 mL/min.

Per i test di degradazione enzimatica sono stati utilizzati differenti gradienti:

5-45% di B in 20 min per il peptide di riferimento “YSFF”;

30-70% di B in 30 min per il peptide finale ottenuto in soluzione;

0-50% di B in 30 min per i coniugati Fc-peptide.

- HPLC preparativo

I coniugati ferrocene-peptide sono stati purificati attraverso HPLC preparativo a fase inversa, sistema ÄKTA pure™, impiegando la colonna “Daisogel SP-120 C18 300 Å 10 μm ” ($\lambda = 216 \text{ nm}$ e 280 nm)

Gli eluenti impiegati sono:

A: $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$ + TFA 0.05%

B: ACN 90% + $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$ 10% + TFA 0.05%

Le condizioni di eluizione sono le seguenti: gradiente 15-45% di B in 40 minuti, flusso 12 mL/min.

- Spettroscopia IR

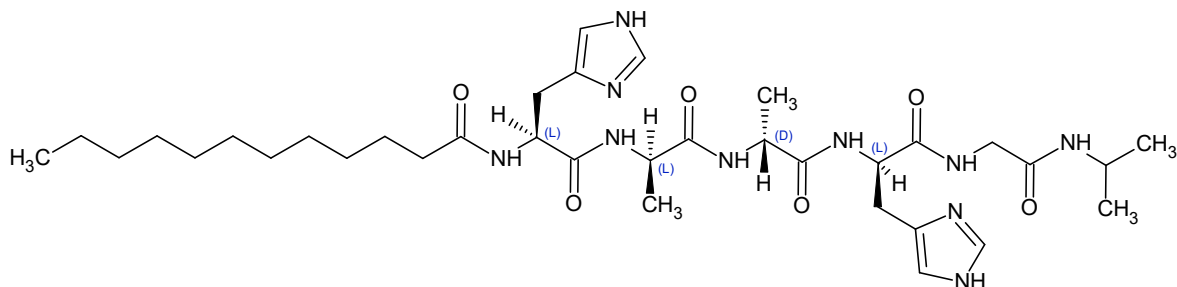
Gli spettri IR sono effettuati per il peptide ottenuto in soluzione e per i relativi intermedi di sintesi. Lo spettrometro IR è “Nicolet Nexus 670” con accumulo di 25 scansioni e risoluzione pari a 2 cm^{-1} . Le concentrazioni delle soluzioni sono:

- serie “S” 0.1mM in CDCl_3 cella 1 cm;

- serie “D” 1 mM in CDCl_3 cella 1 mm.

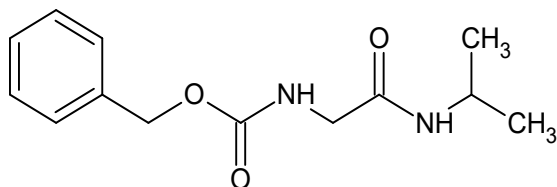
2.2 – Sintesi e caratterizzazione

2.2.1. - Sintesi di Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr



La sintesi del peptide sopra illustrato viene eseguita in soluzione. L'ultimo *coupling* prevede la formazione di un legame ammidico tra il gruppo amminico della "L-His" terminale con il gruppo carbossilico dell'acido laurico e successiva rimozione del gruppo "Trt" dalla catena laterale delle due L-His (p- 41-42).

2.2.1.1. - Z-Gly-NH-*i*Pr



Si pesano 3.001 g di Z-Gly-OH (0.014 mol) e si sciolgono in 25 mL di DCM anidro all'interno di un pallone da 250 mL munito di tappo con tubo riempito di CaCl₂, in costante agitazione, sotto cappa aspirante e a temperatura e pressione ambiente. Poi, si aggiungono nel seguente ordine: HOBT (2.220 g, 0.014 mol), EDC.HCl (3.303 g, 0.017 mol), NH₂*i*Pr (6.2 mL, 0.072 mol) goccia a goccia. Si lascia sotto agitazione per 24 ore.

Successivamente si trasferisce il pallone contenente la soluzione al rotavapor, eliminando parzialmente il DCM. Si aggiungono 150 mL di AcOEt e si trasferisce in un imbuto separatore. Poi, si eseguono tre lavaggi da 30 mL ciascuno nel seguente ordine: NaHCO₃ 5%, H₂O distillata (1), KHSO₄ 10%, H₂O distillata (2); raccogliendo la fase acquosa in delle beute. La fase organica viene recuperata su una beuta a parte e anidrificata con Na₂SO₄ per

un quarto d'ora. Il tutto viene poi filtrato mediante gooch, recuperato in un pallone tarato e fatto evaporare il solvente all'evaporatore rotante.

Si osserva la formazione di un solido bianco (2.548 g, 0.010 mol).

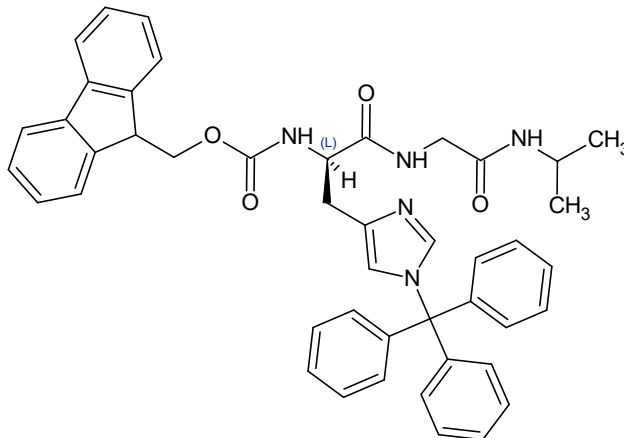
R_{f1} = 0.67

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{teorico} = 250.3
 [M-*i*Pr]⁺_{sperimentale} = 207.2

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) = 7.35 (m, 4H, CH Z), 5.66 (s, 1H, NH Z), 5.34 (s, 1H, NH Gly), 5.14 (s, 2H, CH₂ Z), 4.08 (dd, 1H, CH *i*Pr), 3.82 (d, 2H, CH₂ Gly), 1.15 (d, 6H, CH₃ *i*Pr).

Resa% = 71 %

2.2.1.2. - Fmoc-L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr



Al fine di rimuovere il gruppo protettore “Z” dal peptide “Z-Gly-NH-*i*Pr”, si discioglie il prodotto ottenuto precedentemente in 50 mL di metanolo anidro, facendo gorgogliare Ar all'interno della soluzione e mantenendo il tutto sotto costante agitazione. Si aggiunge poi il catalizzatore Pd/C (circa il 10% rispetto la massa del peptide) e si esegue la reazione di idrogenazione con H₂. Si procede a filtrare su gooch riempito di celite imbibita di metanolo e si raccoglie il prodotto in un pallone da 250 mL. Poi, si fa evaporare il metanolo al

rotavapor e quindi si aggiungono ed evaporano due aliquote da 15 mL di Et₂O per rimuovere completamente il metanolo. Si ottiene un olio giallognolo.

Si discioglie il prodotto ottenuto in 10 mL di DCM anidro e si trasferisce poi in un altro pallone da 250 mL, munito di tubo a CaCl₂, al quale sono stati aggiunti nel seguente ordine: 6.312 g di Fmoc-L-His(Trt)-OH (0.010 mol) disciolti in 25 mL di DCM anidro, HOBT (1.579 g, 0.102 mol), EDC.HCl= 2.147 g (0.011 mol) e infine DIEA (1.8 mL, 0.010 mol). Si lascia sotto agitazione costante, sotto cappa aspirante e a temperatura e pressione ambiente per 24 ore.

Successivamente si trasferisce il pallone contenente la soluzione al rotavapor, eliminando parzialmente il DCM anidro. Si aggiungono 180 mL di AcOEt e si trasferisce in un imbuto separatore. Poi, si eseguono tre lavaggi da 50 mL ciascuno nel seguente ordine: NaHCO₃ 5%, H₂O distillata (1), KHSO₄ 10%, H₂O distillata (2); raccogliendo la fase acquosa in delle beute. Le acque di lavaggio tendono ad essere torbide, specie quelle basiche. Si osserva la formazione di un'emulsione difficile da rompere. La fase organica viene recuperata su una beuta a parte e anidrificata con Na₂SO₄ per mezz'ora. Il tutto viene poi filtrato mediante gooch e recuperato in un pallone tarato da 100 mL e infine fatto evaporare il solvente all'evaporatore rotante.

Infine, si procede con il sistema di purificazione "Biotage[®] Isolera One" a fase diretta per isolare il prodotto puro dal resto delle impurezze.

Si ottiene un solido bianco cristallino (1.717 g, 0.002 mol).

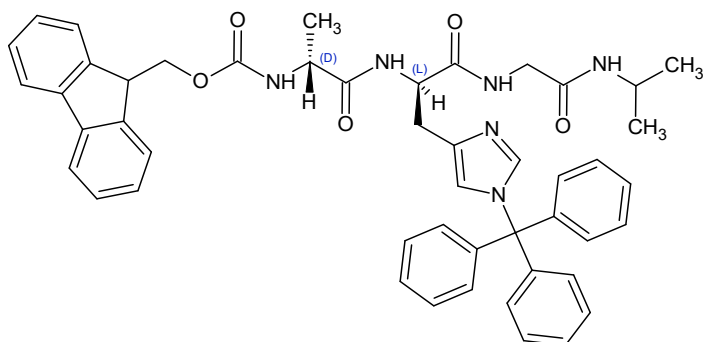
R_f = 0.38

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{teorico} = 717.87
 [M+H-Trt]⁺_{sperimentale} = 476.2

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) = 7.76 (m, 2H, CH Fmoc), 7.58 (m, 2H, CH Fmoc), 7.34 (m, 14H, CH Fmoc, CH Trt, CH Im), 7.10 (m, 6H, CH Trt), 6.86 (t, 1H, NH Gly), 6.78 (d, 1H, NH His), 6.68 (m, 2H, NH iPr, CH Im), 4.37 (m, 3H, CH₂ Fmoc, CH His), 4.22 (m, 1H, CH Fmoc), 4.05 (m, 2H, CH₂ Gly, CH iPr), 3.69 (m, 1H, CH₂ Gly), 3.04 (m, 2H, CH₂ His), 1.07 (dd, 6H, CH₃ iPr).

Resa% = 23 %

2.2.1.3. - Fmoc-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr



Si aggiungono 50 mL di DCM:dietilammina (DEA) 8:2 e dopo un'ora 5 mL di DEA al peptide "Fmoc-L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr" al fine di rimuovere il gruppo protettore "Fmoc". Dopo due ore, si trasferisce la miscela su un gooch contenente gel di silice. Si lava poi con 50 mL di etere dietilico per disciogliere e filtrare via il dibenzofulvene. Successivamente si eluisce con 100 mL di una miscela DCM: MeOH 85:15 per rimuovere il peptide dalla silice. Si fa evaporare il solvente al rotavapor e per due volte aggiungono ed evaporano 10 mL di DCM per rimuovere tutte le tracce di DEA.

Per procedere con il *coupling* successivo, in un pallone da 100 mL munito di tubo a CaCl_2 si aggiungono nel seguente ordine: 0.745 g di Fmoc-D-Ala-OH (0.002 mol) disciolti in 25 mL di DCM anidro, HOBT (0.372 g, 0.002 mol), EDC·HCl (0.505 g, 0.003 mol), il peptide sbloccato in precedenza e infine DIEA (0.42 mL, 0.002 mol). Si lascia sotto agitazione costante, sotto cappa aspirante e a temperatura e pressione ambiente per 24 ore.

Successivamente si trasferisce il pallone contenente la soluzione al rotavapor, eliminando parzialmente il DCM anidro. Si aggiungono 250 mL di AcOEt e si trasferisce in un imbuto separatore. Poi, si eseguono cinque lavaggi da 25 mL ciascuno nel seguente ordine: NaHCO_3 5%, H_2O distillata (2), KHSO_4 10%, H_2O distillata (3); raccogliendo la fase acquosa in delle beute. La fase organica viene recuperata su una beuta a parte e anidrificata con Na_2SO_4 per un quarto d'ora. Il tutto viene poi filtrato mediante gooch e recuperato in un pallone tarato da 100 mL e infine fatto evaporare il solvente all'evaporatore rotante.

Infine, si procede con il sistema di purificazione "Biotage® Isolera One" a fase diretta per isolare il prodotto puro dal resto delle impurezze.

Si ottiene un solido bianco cristallino (1.151 g, 0.001 mol).

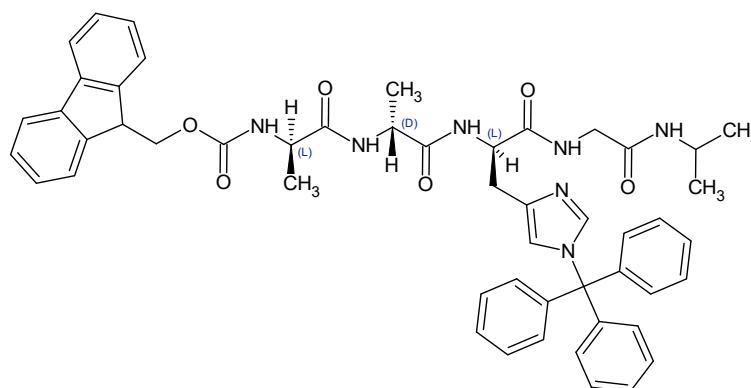
$R_f = 0.31$

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 788.95$
 $[M+H-\text{Trt}]^+_{\text{sperimentale}} = 547.2$
 $[M+\text{Na}-\text{Trt}]^+_{\text{sperimentale}} = 569.2$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) = 8.63 (d, 1H, NH His), 7.74 (m, 2H, CH Fmoc), 7.53 (m, 2H, CH Fmoc), 7.39 (m, 3H, NH Gly, CH Fmoc), 7.29 (m, 10H, CH Im, CH Trt), 7.03 (m, 6H, CH Trt), 6.65 (s, 1H, CH Im), 6.62 (d, 1H, NH iPr), 5.29 (d, 1H, NH Ala), 4.50 (m, 1H, CH His), 4.18 (m, 4H, CH_2 Gly, CH Fmoc, CH_2 Fmoc), 4.02 (m, 2H, CH Ala, CH iPr), 3.38 (m, 1H, CH_2 Gly), 3.18 (m, 1H, CH_2 His), 2.93 (m, 1H, CH_2 His), 1.43 (d, 3H, CH_3 Ala), 1.11 (dd, 6H, CH_3 iPr).

Resa% = 61 %

2.2.1.4. - Fmoc-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-iPr



Si aggiungono 50 mL di DCM:DEA 8:2 e dopo un'ora 5 mL di DEA al peptide "Fmoc-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-iPr" al fine di rimuovere il gruppo protettore "Fmoc". Dopo due ore, si trasferisce la miscela su un gooch contenente gel di silice. Si eluisce con 80 mL di etere dietilico per disciogliere e filtrare via il dibenzofulvene e successivamente si raccoglie su un pallone da 250 mL il prodotto che viene staccato dalla silice eluendo con 100 mL di DCM: MeOH 85:15. Si fa evaporare il solvente al rotavapor e per due volte si aggiungono ed evaporano 10 mL di DCM.

Per procedere con il *coupling* successivo, in un pallone da 100 mL munito di tubo a CaCl_2 si aggiungono nel seguente ordine: 0.455 g di Fmoc-L-Ala-OH (0.001 mol) disciolti in 20 mL di DCM anidro, HOBT (0.226 g, 0.001 mol), EDC.HCl (0.368 g, 0.001 mol + 0.001 mol

aggiunte dopo 20 ore), il peptide sbloccato in precedenza e infine DIEA (0.25 mL, 0.001 mol). Si lascia sotto agitazione costante a temperatura ambiente per 24 ore.

Successivamente si trasferisce il pallone contenente la soluzione al rotavapor, eliminando parzialmente il DCM anidro. Si aggiungono 180 mL di AcOEt e si trasferisce in un imbuto separatore. Poi, si eseguono 5 lavaggi da 20 mL ciascuno nel seguente ordine: NaHCO₃ 5%, H₂O distillata (2), KHSO₄ 10%, H₂O distillata (3); raccogliendo la fase acquosa in delle beute. La fase organica viene recuperata su una beuta a parte e anidrificata con Na₂SO₄ per un quarto d'ora. Il tutto viene poi filtrato mediante gooch e recuperato in un pallone tarato da 100 mL e infine fatto evaporare il solvente all'evaporatore rotante.

Infine, si procede con il sistema di purificazione "Biotage[®] Isolera One" a fase diretta per isolare il prodotto puro dal resto delle impurezze.

Si osserva la formazione di un solido bianco (0.634 g, 0.001 mol).

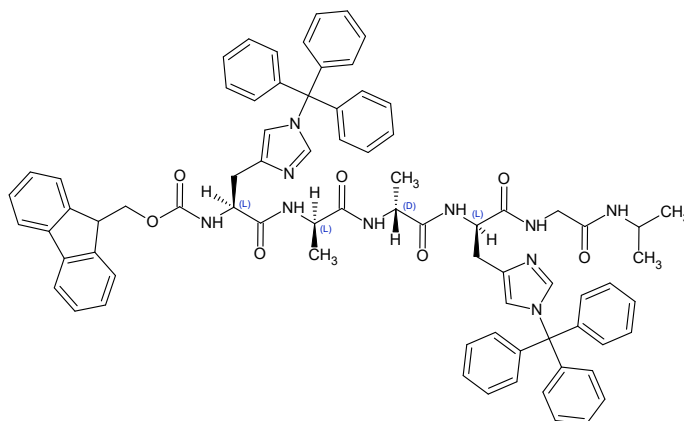
Rf₂ = 0.40

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{teorico} = 860.03
 [M+H-Trt]⁺_{sperimentale} = 618.2
 [M+Na-Trt]⁺_{sperimentale} = 640.3

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) = 8.28 (d, 1H, NH His), 7.76 (m, 2H, CH Fmoc), 7.57 (m, 2H, CH Fmoc), 7.40 (m, 4H, NH Gly, CH Im), 7.32 (m, 10H, CH Fmoc, CH Trt), 7.07 (m, 6H, CH Trt), 6.82 (d, 1H, NH Ala), 6.64 (s, 1H, CH Im), 6.53 (d, 1H, NH iPr), 5.63 (d, 1H, NH Ala), 4.51 (m, 1H, CH His), 4.40 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.19 (m, 3H, CH Ala, CH Fmoc), 4.01 (m, 2H, CH₂ Gly, CH iPr), 3.50 (m, 1H, CH₂ Gly), 3.16 (m, 1H, CH₂ His), 2.93 (m, 1H, CH₂ His), 1.39 (d, 3H, CH₃ Ala), 1.30 (d, 3H, CH₃ Ala), 1.10 (dd, 6H, CH₃ iPr).

Resa_% = 51%

2.2.1.5. – Fmoc-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-iPr



Si aggiungono 50 mL di DCM:DEA 8:2 e dopo un'ora 5 mL di DEA al peptide "Fmoc-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-iPr" al fine di rimuovere il gruppo protettore "Fmoc". Dopo due ore, si trasferisce la miscela su un gooch contenente gel di silice. Si eluisce poi con 80 mL di etere dietilico per disciogliere il dibenzofulvene e filtrarlo via e successivamente si raccoglie su un pallone da 250 mL il prodotto che viene staccato dalla silice eluendo con 100 mL di DCM: MeOH 85:15. Si fa evaporare il solvente all' evaporatore rotante e per due volte si aggiungono ed evaporano 20 mL di DCM.

Per procedere con il *coupling* successivo, in un pallone da 100 mL munito di tubo a CaCl₂ si aggiungono nel seguente ordine: 0.459 g di Fmoc-L-His(Trt)-OH (0.001 mol) disciolti in 15 mL di DCM anidro, HOBT (0.114 g, 0.001 mol), EDC.HCl (0.172 g, 0.0007 mol + 0.0003 mol aggiunte dopo 20 ore), il peptide sbloccato in precedenza e infine DIEA (0.13 mL. 0.001 mol). Si lascia sotto agitazione costante a temperatura ambiente per 24 ore.

Successivamente si trasferisce il pallone contenente la soluzione al rotavapor, eliminando parzialmente il DCM anidro. Si aggiungono 200 mL di AcOEt e lo si trasferisce in un imbuto separatore. Poi, si eseguono sei lavaggi da 15 mL ciascuno nel seguente ordine: NaHCO₃ 5%, H₂O distillata (3), KHSO₄ 10%, H₂O distillata (3); raccogliendo la fase acquosa in delle beute. La fase organica viene recuperata su una beuta a parte e anidrificata con Na₂SO₄ per un quarto d'ora. Il tutto viene poi filtrato mediante gooch e recuperato in un pallone tarato da 250 mL e infine fatto evaporare il solvente all' evaporatore rotante.

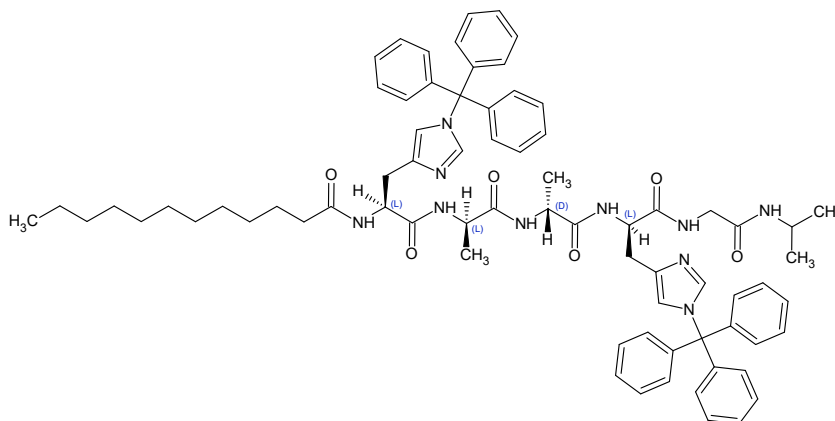
Si osserva la formazione di un solido bianco (0.672 g, 0.001 mol).

$$Rf_1 = 0.62$$

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 1239.5$
 $[M+H]^+_{\text{sperimentale}} = 1240.4$

Resa% = 74 %

2.2.1.6. - Lauril-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-iPr



Si aggiungono 50 mL di DCM:DEA 8:2 e dopo un'ora 1.5 mL di DEA al peptide "Fmoc-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-iPr" al fine di rimuovere il gruppo protettore "Fmoc". Dopo due ore, si trasferisce la miscela su un gooch contenente gel di silice. Si eluisce con 80 mL di etere dietilico per disciogliere e filtrare via il dibenzofulvene e successivamente si raccoglie su un pallone da 250 mL il prodotto che viene rimosso dalla silice eluendo con 100 mL di DCM: MeOH 85:15. Si fa evaporare il solvente all' evaporatore rotante e per due volte si aggiungono ed evaporano 10 mL di DCM.

Per procedere con il *coupling* successivo, in un pallone da 100 mL munito di tubo a CaCl₂ si aggiungono nel seguente ordine: 0.109 g di acido laurico (0.001 mol) disciolti in 15 mL di DCM anidro, HOBT (0.086 g, 0.001 mol), EDC·HCl (0.115 g, 0.001 mol), il peptide sbloccato in precedenza e infine DIEA (0.1 mL, 0.001 mol). Si lascia sotto agitazione costante a temperatura ambiente per 24 ore.

Successivamente si trasferisce il pallone contenente la soluzione al rotavapor, eliminando parzialmente il DCM anidro. Si aggiungono 150 mL di AcOEt e si trasferisce in un imbuto separatore. Poi, si eseguono 4 lavaggi da 25 mL ciascuno nel seguente ordine: NaHCO₃ 5%, H₂O distillata (2), KHSO₄ 10%, H₂O distillata (2); raccogliendo la fase acquosa in delle beute. La fase organica viene recuperata su una beuta a parte e anidrificata con Na₂SO₄ per

un quarto d'ora. Il tutto viene poi filtrato mediante gooch e recuperato in un pallone tarato da 100 mL e infine fatto evaporare il solvente all'evaporatore rotante.

Si osserva la formazione di un solido bianco (0.437 g, 0.001 mol).

$Rf_3 = 0.52$

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 1199.5$
 $[M]^+_{\text{sperimentale}} = 1199.5$
 $[M+H]^+_{\text{sperimentale}} = 1200.6$

Resa% = 67 %

Al fine di rimuovere il gruppo protettore "Trt" legato ai N^τ dell'anello imidazolico delle istidine si introducono 15 mL di una miscela DCM:TFA 7:3 all'interno del pallone, contenente il prodotto, munito di tubo a CaCl₂ e lasciando sotto costante agitazione per 90 minuti. Successivamente si fa evaporare il solvente all'evaporatore rotante e per due volte si aggiungono ed evaporano 10 mL di Et₂O. Poi, si lascia precipitare il prodotto aggiungendo 50 mL di Et₂O freddo, lasciando in frigorifero per una notte. Si prosegue a centrifugare (5 minuti, 5000 rpm) e dunque a rimuovere il surnatante, lasciando poi il prodotto in essiccatore. Infine, si procede con il sistema di purificazione "Biotage[®] Isolera One" a fase inversa per isolare il prodotto puro dal resto delle impurezze.

Si osserva la formazione di un solido bianco (0.066 g, 0.0001 mol).

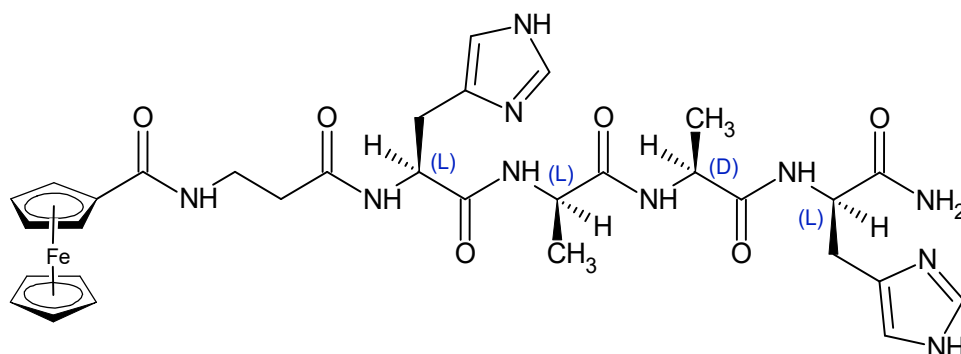
MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 714.9$
 $[M+H]^+_{\text{sperimentale}} = 715.4$

¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) = 8.65 (d, 1H, CH Im o NH His), 8.32 (d, 1H, NH Ala), 8.21 (m, 2H, NH Gly, NH His), 8.09 (m, 2H, NH Ala, NH His), 7.77 (d, 1H, NH iPr), 7.23 (d, 2H, CH Im), 4.54 (m, 3H, CH His), 4.24 (m, 3H, CH Ala), 3.84 (m, 3H, CH iPr), 3.68 (m, 3H, CH₂ Gly), 2.99 (m, 9H, CH₂ His), 2.07 (m, 2H, CH₂ Lau), 1.61 (m, 3H, CH₃ Ala), 1.21 (m, 18H, (CH₂)₉ Lau), 1.14 (m, 3H, CH₃ Ala), 1.05 (m, 6H, CH₃ iPr), 0.85 (m, 3H, CH₃ Lau).

Resa% = 25 %

2.2.2. - Sintesi dei coniugati ferrocene-peptide

2.2.2. - Sintesi di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂



Le sintesi del coniugato ferrocene-peptide sopra riportato e dei successivi vengono eseguite su fase solida (SPPS), svolte a temperatura e pressione ambiente.

A partire dalla resina “Fmoc-Rink Amide” con loading pari a 0.5 mmol/g, si introducono 300 mg (0.15 mmol) all’interno di una siringa per SPPS e si disciolgono in 3 mL di DMF degasata. Si lascia in agitazione per un’ora al fine di rigonfiare la resina.

La procedura che segue viene applicata ad ogni ciclo comprendente le fasi di deprotezione, lavaggio, *coupling* e lavaggio successivo. Le condizioni impiegate vengono riportate nella Tabella 1.

Operazione	Volume (mL)	Tempo (min)
Deprotezione	3 mL di sz. 20% v/v di piperidina in DMF	5' + 12'
	<i>Filtrazione</i>	
Lavaggio	3 mL di DMF	2' x4
	<i>Filtrazione</i>	
Coupling	3 mL di DMF con AA + Oxyma pure + DIC	50'
	<i>Filtrazione</i>	
Lavaggio	3 mL di DMF	2' x2
	<i>Filtrazione</i>	

Tabella 1 - descrizione modalità esecuzione SPPS impiegate.

La fase di deprotezione prevede la rimozione del gruppo protettore “Fmoc” dalla funzione amminica.

Le fasi di lavaggio vengono eseguite dopo le fasi di deprotezione e di *coupling*: nel primo caso per rimuovere qualsiasi residuo di piperidina rimasto nella siringa e nel secondo caso invece per rimuovere reagenti e sottoprodotti che non si sono legati alla resina.

La fase di *coupling* prevede l’introduzione di 3 equivalenti di aa, l’agente attivante Oxyma Pure e l’agente attivante DIC disciolti in 3 mL di DMF degasata.

Dopo ogni fase viene allontanata la fase liquida mediante filtrazione.

Per ottenere il peptide “Fmoc-β-Ala-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-NH₂ si impiegano le seguenti quantità di aa e agenti attivanti (Tabella 2):

AA	moli (mmol)	AA (g)	Oxyma Pure (g)	DIC (μL)
Fmoc-L-His(Trt)-OH		0.279		
Fmoc-D-Ala-OH		0.141		
Fmoc-L-Ala-OH	0.45	0.141	0.064	69.7
Fmoc-L-His(Trt)-OH		0.279		
Fmoc-β-Ala-OH		0.141		

Tabella 2 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fmoc-β-Ala-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-NH₂.

Prima di legare l’acido ferrocencarbossilico al peptide ottenuto, si esegue uno sblocco in piccolo della resina.

Si preleva una piccola quantità di resina-peptide e la si inserisce su una siringa più piccola per SPPS. Successivamente la si lava con DCM per tre volte, facendola poi seccare flussando N₂. Poi si introduce 1 mL di una miscela di cleavage costituita da TFA:TIS:H₂O (9:0.5:0.5) e si lascia in agitazione per 90 minuti. Si recupera poi la soluzione contenente il peptide distaccato dalla resina all’interno di una falcon e si fa evaporare il solvente flussando N₂. Si aggiungono poi 10 mL di Et₂O freddo e si fa precipitare il prodotto, lasciando in un bagno a ghiaccio per almeno mezz’ora. Poi, si passa il tutto in centrifuga (5 minuti, 5000 rpm), dunque si rimuove il surnatante, lasciando seccare il peptide contenuto nella falcon.

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 726.6950$
 $[M+H]^+_{\text{sperimentale}} = 727.3$

Al fine di legare il ferrocene al peptide si esegue la stessa procedura di deprotezione, *coupling* e lavaggio impiegata per i precedenti aa.

In questo caso, si utilizzano 2 eq. di acido ferrocencarbossilico e di agenti attivanti Oxyma Pure e DIC, disciolti in 3 mL di DMF degasata. Il *coupling* richiede 90 minuti.

moli (mmol)	Fc-COOH (g)	Oxyma Pure (g)	DIC (μ L)
0.30	0.069	0.043	46.5

Tabella 3 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fc- β -Ala-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-NH₂.

Poi, si esegue lo sblocco in piccolo analogamente a quanto descritto a p.44. In questo caso la miscela di cleavage è costituita da TFA:PhOH:TIS:H₂O (9.0:0.5:0.25:0.25).

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+$ teorico = 716.58
 $[M+H]^+$ sperimentale = 717.2
 $[M+Na]^+$ sperimentale = 739.2

Si eseguono sei lavaggi con DCM per 2 minuti, flussando N₂ e lasciando poi la siringa contenente la resina e il coniugato ferrocene-peptide in essiccatore.

Il *cleavage* di "Fc- β -Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂" dalla resina richiede 2.5 mL di miscela TFA:PhOH:TIS:H₂O (9.0:0.5:0.25:0.25), mantenendo in agitazione per 90 minuti.

Successivamente si fa precipitare il prodotto con Et₂O freddo per poi liofilizzarlo.

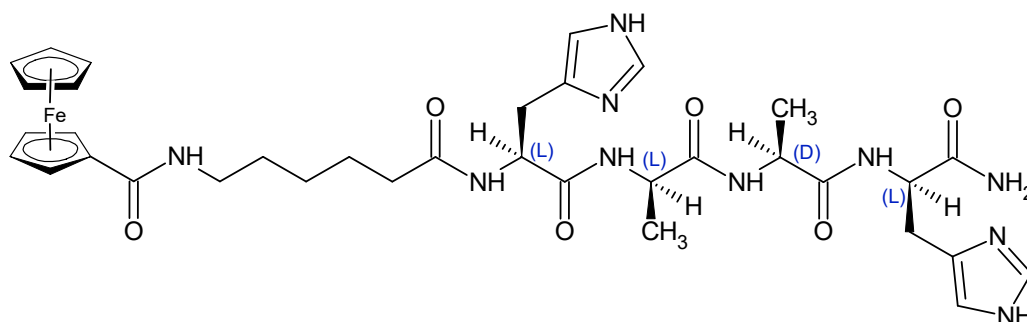
Infine, si purifica il prodotto grezzo attraverso HPLC preparativo e si liofilizza la frazione desiderata.

Si osserva la formazione di un solido marrone, indice della presenza di ferrocene (2.15 mg, 0.003 mol).

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+$ teorico = 716.58
 $[M+H]^+$ sperimentale = 717.2

Resa% = 2%

2.2.3. - Sintesi di Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂



A partire dalla resina “Fmoc-Rink Amide” con loading pari a 0.5 mmol/g, si introducono 300 mg (0.15 mmol) all’interno di una siringa per SPPS, disciolti in 3 mL di DMF degasata. La procedura dettagliata riguardante ogni deprotezione, lavaggio, *coupling* e lavaggio finale per ogni aa è analoga a quanto descritto a p. 43-44.

La fase di *coupling* prevede l’impiego di 3 equivalenti rispettivamente di aa, Oxyma Pure e DIC, disciolti in 3 mL di DMF degasata. Si lascia in agitazione per 50 minuti.

Per ottenere il peptide “Fmoc-6-Ahx-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-NH₂ si impiegano le seguenti quantità di aa e agenti attivanti (Tabella 4):

AA	moli (mmol)	AA (g)	Oxyma Pure (g)	DIC (μL)
Fmoc-L-His(Trt)-OH		0.279		
Fmoc-D-Ala-OH		0.141		
Fmoc-L-Ala-OH	0.45	0.141	0.064	69.7
Fmoc-L-His(Trt)-OH		0.279		
Fmoc-6-Ahx-OH		0.160		

Tabella 4 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fmoc-6-Ahx-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-NH₂.

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 768.8760$
 $[M+H]^+_{\text{sperimentale}} = 769.3$

Al fine di legare il ferrocene al peptide si impiegano rispettivamente 2 equivalenti di acido ferrocencarbossilico, Oxyma Pure e DIC, disciolti in 3 mL di DMF degasata. Il *coupling* richiede 90 minuti.

moli (mmol)	Fc-COOH (g)	Oxyrna Pure (g)	DIC (μL)
0.30	0.069	0.043	46.5

Tabella 5 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fc-6-Ahx-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-NH₂.

Il *cleavage* del coniugato ferrocene-peptide dalla resina richiede 5 mL (2 x 2.5 mL) di miscela TFA:PhOH:TIS:H₂O (9.0:0.5:0.25:0.25), mantenendo in agitazione per 45 minuti prima e per altri 45 minuti poi. Successivamente si fa precipitare il prodotto con Et₂O freddo per poi liofilizzarlo.

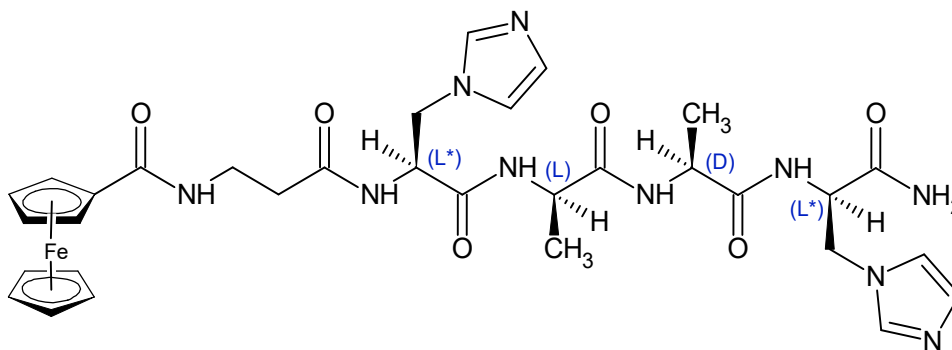
Infine, si purifica il prodotto grezzo attraverso HPLC preparativo e si liofilizza la frazione desiderata.

Si osserva la formazione di un solido arancione (1.60 mg, 0.002 mol).

MS (ESI/TOF) m/z: $[\text{M}]^+$ teorico = 768.8760
 $[\text{M}+\text{H}]^+$ sperimentale = 769.3

Resa% = 1.4%

2.2.4. - Sintesi di Fc- β -Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.



Per ottenere i peptidi “Fc- β -Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂” e “Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂” viene sintetizzata prima la sequenza peptidica comune “Fmoc-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂” per poi dividerla in due aliquote uguali.

A partire dalla resina “Fmoc-Rink Amide” con loading pari a 0.5 mmol/g, si introducono 500 mg (0.75 mmol) all’interno di una siringa per SPPS, disciolti in 5 mL di DMF degasata. La procedura dettagliata riguardante ogni deprotezione, lavaggio, *coupling* e lavaggio finale per ogni aa è analoga a quanto descritto a p. 43-44.

La fase di *coupling* prevede l'impiego di 3 equivalenti rispettivamente di aa, Oxyma Pure e DIC, disciolti in 3 mL di DMF degasata. Si lascia in agitazione per 50 minuti, ad eccezione di "Fmoc-L-His*-OH" che richiede un tempo di *coupling* pari a 80 minuti a causa della bassa solubilità dell'aa in DMF.

Per ottenere il peptide "Fmoc-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂" si impiegano le seguenti quantità di aa e agenti attivanti (Tabella 6):

AA	moli (mmol)	AA (g)	Oxyma Pure (g)	DIC (μL)
Fmoc-L-His*-OH		0.283		
Fmoc-D-Ala-OH	0.75	0.233	0.107	116.1
Fmoc-L-Ala-OH		0.233		
Fmoc-L-His*-OH		0.283		

Tabella 6 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fmoc-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+$ teorico = 655.7160
 $[M+H]^+$ sperimentale = 656.3

I successivi *coupling* con "Fmoc-β-Ala-OH" e "Fc-COOH" impiegano rispettivamente 3 e 2 equivalenti di reagente, Oxyma Pure e DIC, disciolti in 3 mL di DMF degasata. Il *coupling* richiede 50 minuti per lo spaziatore e 90 minuti per il ferrocene.

reagente	moli (mmol)	massa (g)	Oxyma Pure (g)	DIC (μL)
Fmoc-β-Ala-OH	0.125	0.117	0.053	58.1
Fc-COOH		0.057	0.035	38.7

Tabella 7 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fc-β-Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+$ teorico = 716.5810
 $[M+H]^+$ sperimentale = 717.2

Il *cleavage* del coniugato ferrocene-peptide dalla resina richiede 5 mL (2 x 2.5 mL) di miscela TFA:PhOH:TIS:H₂O (9.0:0.5:0.25:0.25), mantenendo in agitazione per 45 minuti prima e per altri 45 minuti poi. Successivamente si fa precipitare il prodotto con Et₂O freddo per poi liofilizzarlo.

Infine, si purifica il prodotto grezzo attraverso HPLC preparativo e si liofilizza la frazione desiderata.

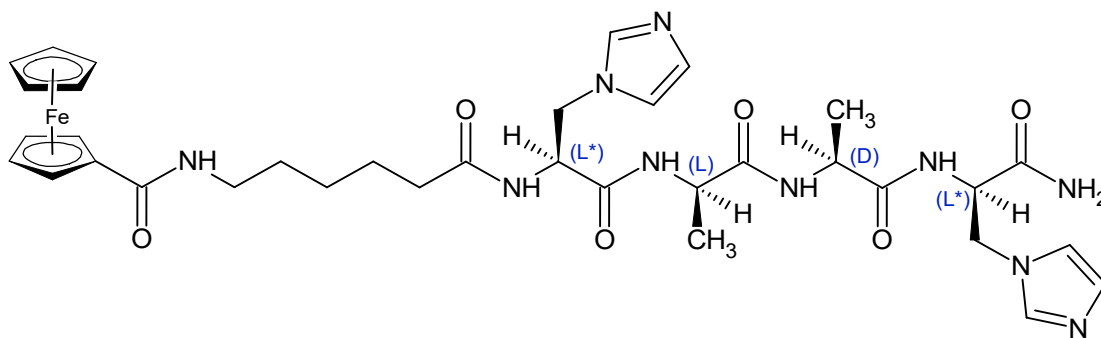
Si osserva la formazione di un solido arancione (0.001 g, 0.001 mol).

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+$ teorico = 716.58
 $[M+H]^+$ sperimentale = 717.2

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) = fare riferimento a Tabella 14 p. 85

Resa% = 1%

2.2.5. - Sintesi di Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.



Per la sintesi del peptide “Fmoc-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂” fare riferimento a p.47-48.

I successivi *coupling* con “Fmoc-6-Ahx-OH” e “Fc-COOH” impiegano rispettivamente 3 e 2 equivalenti di reagente, Oxyma Pure e DIC, disciolti in 3 mL di DMF degasata. Il *coupling* richiede 50 minuti per lo spaziatore e 90 minuti per il ferrocene.

reagente	moli (mmol)	massa (g)	Oxyma Pure (g)	DIC (μL)
Fmoc-6-Ahx-OH	0.125	0.132	0.053	58.1
Fc-COOH		0.057	0.035	38.7

Tabella 8 - quantità di reagenti necessarie per ottenere Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+$ teorico = 758.66
 $[M+H]^+$ sperimentale = 759.2

Il *cleavage* del coniugato ferrocene-peptide dalla resina richiede 5 mL (2 x 2.5 mL) di miscela TFA:PhOH:TIS:H₂O (9.0:0.5:0.25:0.25), mantenendo in agitazione per 45 minuti prima e per altri 45 minuti poi. Successivamente si fa precipitare il prodotto con Et₂O freddo per poi liofilizzarlo.

Infine, si purifica il prodotto grezzo attraverso HPLC preparativo e si liofilizza la frazione desiderata.

Si osserva la formazione di un solido arancione (0.001 g, 0.001 mol).

MS (ESI/TOF) m/z: $[M]^+_{\text{teorico}} = 758.66$
 $[M+H]^+_{\text{sperimentale}} = 759.2$

¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) = fare riferimento a Tabella 15 p. 86

Resa% = 1%

2.3. - Test di degradazione enzimatica

I test di degradazione enzimatica in presenza di siero umano sono stati effettuati su un peptide standard di riferimento “YSFF”, sul peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” e infine sui coniugati ferrocene-peptide “Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂”, Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂” e “Fc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂”.

Per i test si preparano prima le seguenti soluzioni:

A) soluzione tampone di HEPES 25 mM a pH 7.24;

B) soluzione del peptide a concentrazione 1 mg/mL in DMSO;

Poi, si preparano le seguenti soluzioni all'interno delle eppendorf:

1) soluzione di riferimento del peptide: 40 μL di B + 1.25 mL di A;

2) soluzione di reazione del peptide: 40 μL di B + 250 μL di siero umano + 1 mL di A;

L'analisi delle soluzioni di riferimento, in assenza del siero, è finalizzata a verificare che il peptide non venga degradato dalla soluzione tampone.

Le eppendorf vengono successivamente immerse in un bagno termostato alla temperatura di 37°C. Il campionamento viene eseguito ad intervalli temporali prestabiliti (t= 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 360 min) prelevando 100 μL di ciascuna delle soluzioni 1 e 2, trasferendoli in due differenti eppendorf contenenti 200 μL di etanolo. Allo scopo di favorire la precipitazione delle proteine, si pongono le eppendorf all'interno di un bagno a ghiaccio.

Infine, si pongono le eppendorf in centrifuga (5 minuti, 13000 rpm), dunque prelevato il surnatante e infine analizzato all'HPLC.

3 - RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. - La sintesi peptidica

I peptidi sono piccole catene poliammidiche costituite da amminoacidi. [75]

Il passaggio fondamentale nella formazione di un peptide consiste nella formazione di un legame ammidico tra due amminoacidi. La formazione di tale legame deve essere selettiva e coinvolgere due gruppi funzionali: un gruppo carbossilico e un gruppo amminico. [76]

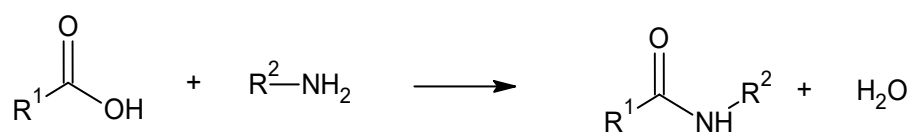


Figura 13 - schema generico di formazione del legame peptidico.

Per assicurare la formazione di un legame specifico tra un dato gruppo carbossilico e un dato gruppo amminico, i gruppi protettori giocano un ruolo fondamentale poiché possono essere introdotti e rimossi selettivamente. Di fatto, il ciclo sintetico prevede prima la deprotezione della funzione amminica, poi l'attivazione della funzione carbossilica e infine la formazione del legame. [76]

L'allungamento della catena peptidica è stato sviluppato in direzione C→N.

Questo approccio permette di minimizzare i fenomeni di racemizzazione, impiegando degli opportuni gruppi protettori legati all'α-N. In contrasto, la natura sintetizza i peptidi in direzione N→C all'interno dei ribosomi, i quali garantiscono che la formazione del legame ammidico avvenga senza possibili racemizzazioni. [75]

Solitamente, ma non solo, è la dimensione del peptide a determinare l'approccio sintetico ottimale. I peptidi corti sono generalmente prodotti attraverso una strategia lineare che prevede l'aggiunta graduale di ciascun amminoacido nella sequenza peptidica fino ad ottenere la molecola desiderata.

I peptidi più lunghi invece vengono sintetizzati attraverso una strategia convergente che prevede prima la sintesi di piccoli segmenti o frammenti, i quali vengono poi assemblati, secondo l'ordine stabilito, per ottenere la molecola finale desiderata. [77]

In questo progetto di tesi sono state impiegate due diverse metodologie sintetiche relative alle differenti sequenze peptidiche: sintesi in soluzione (LPPS) e sintesi su fase solida (SPPS). In entrambi i casi, l'approccio sintetico scelto è stato di tipo lineare.

Storicamente, le prime sintesi di peptidi venivano eseguite in soluzione e richiedevano un'attenta manipolazione dei gruppi protettivi, oltre a richiedere differenti fasi di analisi e isolamento. L'uso di questa metodologia può essere problematico per la sintesi di peptidi più lunghi o complessi, ma rimane invece valido per peptidi più corti. ^[78]

Di fatto, questa tecnica viene impiegata soprattutto per la sintesi di piccoli peptidi composti solo da pochi residui amminoacidici. Il suo vantaggio principale è che i prodotti intermedi possono essere isolati e purificati dopo ogni fase della sintesi. ^[79]

La sintesi su fase solida (SPPS) venne descritta per la prima volta da Merrifield nel 1963. ^[80] Questa metodologia sintetica ha comportato un miglioramento nella sintesi dei peptidi. Si basa su step sintetici come *coupling* e deprotezione degli amminoacidi all'interno di un singolo reattore. ^[40]

L'impiego di un supporto solido comporta una serie di vantaggi, rispetto alla sintesi in soluzione ^[81]:

- si può indirizzare la reazione a completezza mediante l'uso di un largo eccesso di reagenti (aa e agenti attivanti);
- i reagenti in eccesso e i sottoprodotti vengono allontanati dal peptide, ancorato alla resina, attraverso filtrazione e lavaggi;
- vengono minimizzate le perdite di prodotto in quanto le reazioni avvengono all'interno dello stesso contenitore.

L'aa che di volta in volta viene aggiunto possiede la funzione amminica protetta da un opportuno gruppo protettore, mentre il primo amminoacido della sequenza viene ancorato alla resina attraverso il suo gruppo carbossilico. La funzione amminica di tale amminoacido è quindi disponibile per formare il legame ammidico con l'amminoacido successivo, N-protetto. Nelle SPPS riportate in questa tesi è stata utilizzata come supporto solido la resina "Fmoc-Rink Amide" (Figura 14).

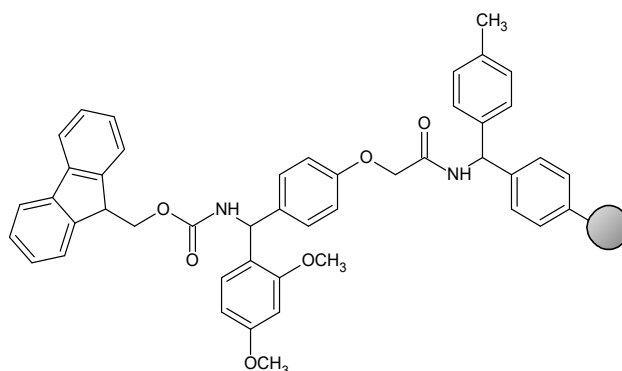


Figura 14 - struttura chimica della resina "Fmoc-Rink Amide MBHA 100-200 mesh". Il cerchio grigio indica il polimero polistirenico.

La resina è costituita da un copolimero di stirene e 1% di divinilbenzene, al quale è legato un opportuno linker.

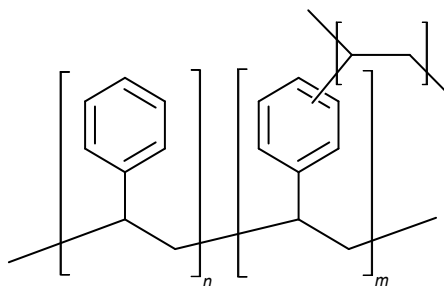


Figura 15 - unità costitutiva del copolimero stirene reticolato con divinilbenzene.

Le sfere di resina (diametro medio di $\sim 50 \mu\text{m}$) costituiscono una rete polimerica interpenetrante, reticolata in modo casuale. A seconda del solvente utilizzato, la resina aumenta il suo volume da tre a cinque volte rispetto a quando è secca.

La solvatazione delle catene polimeriche all'interno delle sfere di resina porta al rigonfiamento della stessa, fino alla riduzione di entropia delle catene di polimeri di resina a causa dei legami reticolati covalenti che bilanciano l'energia libera di solvatazione delle catene polimeriche e prevengono successivi aumenti di volume. [82]

In modo più significativo, il legame covalente all'interno delle sfere di resina polimeriche rigonfiate di solvente comporta una maggiore solvatazione delle catene peptidiche protette legate alla resina, rispetto ai peptidi protetti in soluzione, nello stesso solvente, ma non ancorati alla resina.

L'incremento dell'effetto di solvatazione delle catene peptidiche legate alla resina è dovuto alla natura differente della resina rispetto alle catene peptidiche protette, che sfavorisce la formazione di uno stato aggregato e quindi non solvatato. In aggiunta, i legami reticolati di polimero della resina prevengono la separazione di fase delle catene peptidiche protette dalle

catene di polimeri all'interno delle sfere di resina. L'insieme di questi due fattori favorisce di molto la solvatazione delle catene peptidiche legate alla resina, andando a costituire uno dei vantaggi nella scelta di ricorrere alla SPPS. [82]

In generale, il supporto solido, o resina, deve rispettare diversi criteri: la distribuzione delle dimensioni delle particelle deve essere omogenea, deve possedere ottime proprietà meccaniche, deve essere facilmente filtrabile, deve essere chimicamente inerte e stabile nelle condizioni sintetiche. Deve essere altresì accessibile ai solventi, consentendo la penetrazione dei reagenti all'interno della sua microstruttura e permettendo così l'allungamento della catena peptidica. In più, non deve interagire fisicamente con la catena peptidica in fase di sintesi e deve essere in grado di essere funzionalizzata da un opportuno gruppo protettore di partenza. [79]

Il residuo C-terminale della sequenza peptidica è dunque legato covalentemente a una resina insolubile. Il peptide risultante è costituito da una serie di aa aggiunti di volta in volta attraverso una serie ripetitiva di reazioni chimiche seguendo lo schema in Figura 16:

Dopo il coupling con l'aa successivo, l'eccesso di reagente viene rimosso per filtrazione attraverso dei lavaggi. Il gruppo N-terminale viene poi deprotezionato al fine di ancorare l'aa successivo opportunamente attivato nella sua funzione carbossilica e con l'N-protetto. Il ciclo di reazioni viene ripetuto fino ad ottenere la sequenza peptidica desiderata.

Lo step finale prevede lo sblocco del peptide dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali. [81]

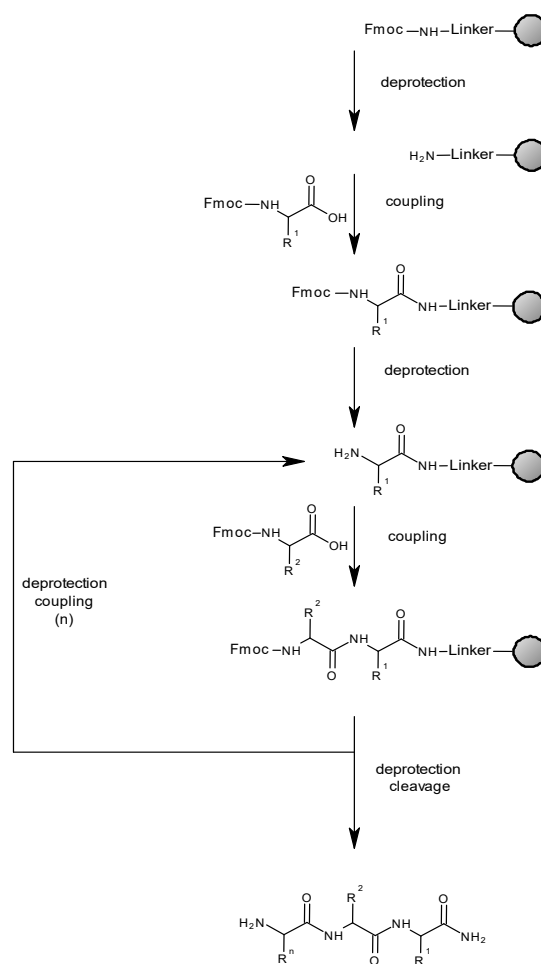


Figura 16 - schema di sintesi generico SPPS.

3.1.1. I gruppi protettori

La scelta dei gruppi protettori è essenziale per poter garantire la formazione della corretta sequenza peptidica. Solitamente il gruppo protettore di α -NH₂ è un derivato uretanico che viene rimosso in condizioni tali da preservare l'integrità del peptide. Inoltre, il gruppo uretanico riduce l'epimerizzazione, dovuta in larga parte alla formazione del 5(4H)-ossazolone (Figura 17).^[81]

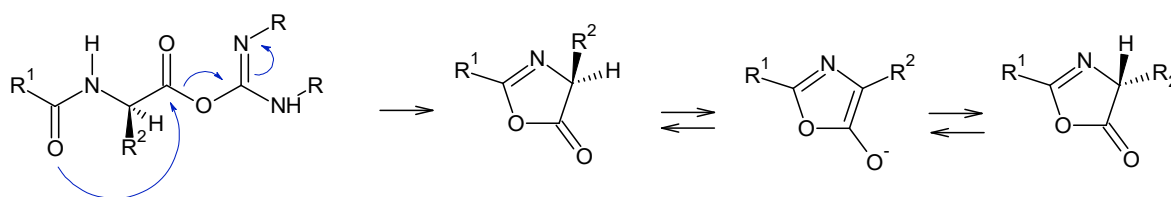


Figura 17 - meccanismo di formazione di 5(4H)-ossazolone a seguito di attivazione del gruppo carbossilico con carbodiimmide. La facile rimozione dell' α -CH, favorita dall'intermedio anionico stabilizzato per risonanza, porta a perdita di purezza ottica.

La racemizzazione di un singolo amminoacido può avvenire anche in presenza di basi molto forti per strappo diretto dell' α -CH, soprattutto nel caso di amminoacidi con catene laterali contenenti gruppi elettronattrattori. La perdita di purezza ottica di anche uno solo degli amminoacidi della sequenza peptidica può influire sulla conformazione di tutta la molecola ed eventualmente modificarne l'attività biologica. In più, i prodotti epimerizzati sono difficili da separare perché possiedono caratteristiche fisiche simili al peptide oggetto della sintesi.^[49]

3.1.1.1. - Protezione del gruppo amminico

I gruppi protettori della funzione amminica degli aa utilizzati in questa tesi sono il gruppo "Z" e il gruppo "Fmoc".

In LPPS il gruppo protettore "Z" è stato impiegato unicamente nell'aa di partenza, ovvero Z-Gly-OH. La scelta di questo gruppo protettore, rispetto ad altri come "Boc" o "Fmoc", risiede nel fatto che esso viene rimosso completamente attraverso una reazione di idrogenazione catalitica, permettendo un recupero quantitativo del prodotto sbloccato, oltre che richiedere blande condizioni di reazione.

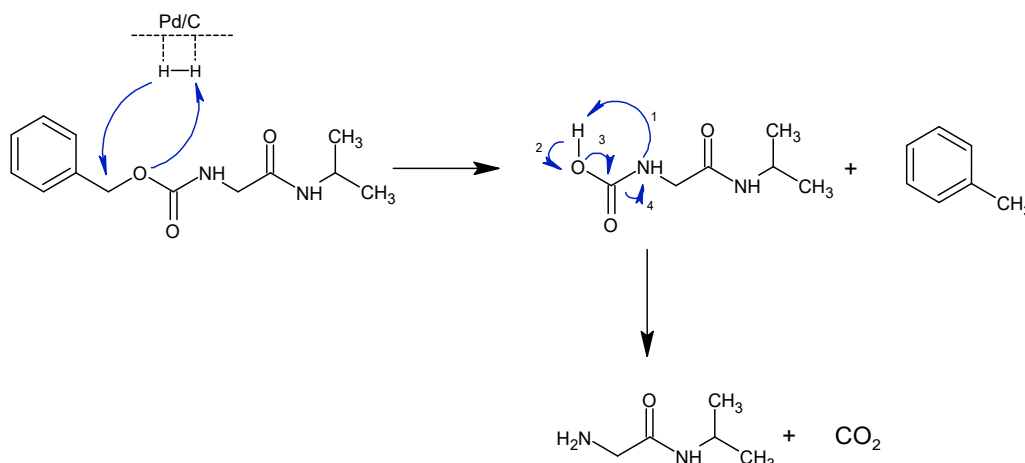


Figura 18 - meccanismo di rimozione del gruppo protettore “Z” da “Z-Gly-NH-*i*Pr” mediante reazione di idrogenazione catalitica.

Il meccanismo di rimozione del gruppo protettore “Z” illustrato in Figura 18 prevede la reazione di idrogenazione catalitica catalizzata da Pd/C con conseguente scissione del legame C-O benzilico, a dare il corrispondente acido carbammico e toluene. Quest’ultimo viene allontanato facilmente attraverso evaporazione con evaporatore rotante. Segue poi la decarbossilazione dell’acido carbammico in CO₂ e relativo carbammato, contenente un’ammina primaria pronta a legarsi al successivo aminoacido.

Il gruppo protettore “Fmoc” (fluorenilmetilossicarbonile) è stato impiegato sia in LPPS sia soprattutto in SPPS.

Attualmente, il gruppo protettore “Fmoc” è il più utilizzato per la sintesi dei peptidi mediante SPPS. Da un punto di vista della chimica verde l’utilizzo del gruppo “Fmoc” non è molto indicato, specie per quanto riguarda l’economia atomica. Il peso molecolare del gruppo Fmoc (224.3 g/mol) è circa il doppio rispetto alla massa media dei residui di aminoacidi impiegati nella sintesi peptidica. Questo significa che solo un terzo della massa di un generico “Fmoc-aa” contribuisce alla sequenza finale peptidica desiderata. Questo fatto ha un peso ancora maggiore se si considera che solitamente nella SPPS viene impiegato un eccesso di “Fmoc-aa” (3 o 5 equivalenti) per assicurarsi rese quantitative ad ogni passaggio e riuscire quindi ad ottenere quindi il peptide target.^[82] Anche rese del 90%, che in LPPS sarebbero ottime, non sono compatibili con la SPPS. Infatti, dovendo effettuare numerosi passaggi senza purificazioni intermedie, difficilmente si otterrebbe il peptide desiderato, soprattutto con peptidi lunghi.

Per la SPPS di questo lavoro di tesi sono stati generalmente impiegati 3 equivalenti di “Fmoc-aa” mentre per la sintesi in soluzione invece è stato impiegato 1 equivalente.

Lo “Fmoc” può essere rimosso attraverso l’utilizzo di una base. Solitamente si impiega un’ammina secondaria. La sua deprotezione avviene più velocemente in solventi polari come DMF piuttosto che in solventi apolari come DCM. Oltretutto, è stabile in condizioni acide. Pertanto, è possibile utilizzare nelle catene laterali degli amminoacidi dei gruppi protettori rimuovibili con acido, comunemente detti ortogonali. Lo stesso vale per l’ancoraggio del primo aa alla resina. Tale ortogonalità consente quindi di rimuovere selettivamente Fmoc, mantenendo integri altri gruppi protettori e senza staccare dalla resina il peptide in crescita.

[83]

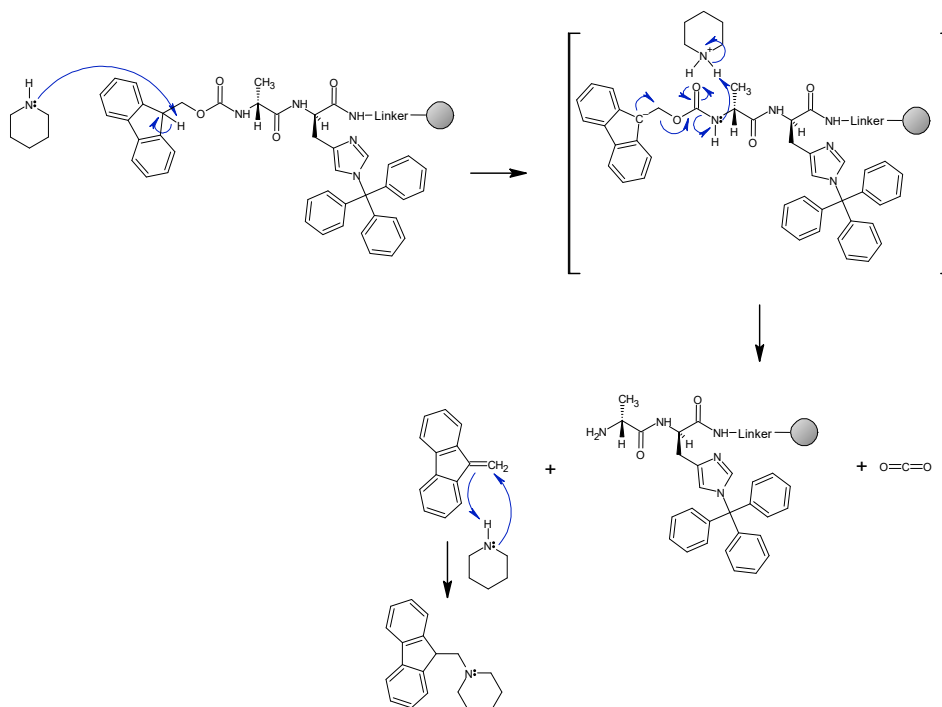


Figura 19 - meccanismo di rimozione del gruppo protettore “Fmoc” con piperidina dal peptide “Fmoc-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-Resina”

La rimozione dello Fmoc dal peptide ad opera di un’ammina, in questo caso della piperidina, porta alla formazione del dibenzofulvene attraverso una reazione di β -eliminazione; inoltre, l’ammina in eccesso può sequestrare il dibenzofulvene e formare un addotto stabile come illustrato nel meccanismo in Figura 19.

3.1.1.2. - Protezione dei gruppi laterali

Nel progetto di questa tesi, l'unico aa impiegato contenente un gruppo protettore in catena laterale è l'istidina, con il gruppo tritile (Trt) a protezione di N^τ (Figura 20).

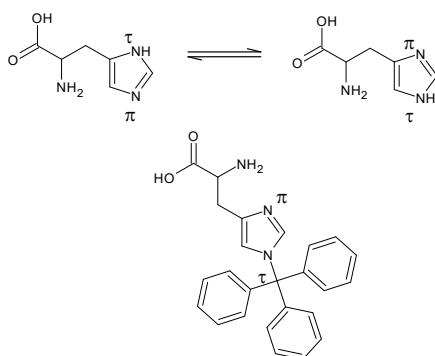


Figura 20 - struttura chimica dell'istidina e dell'istidina legata al gruppo protettore "Trt".

La basicità e la nucleofilicità di N^τ causa fenomeni di racemizzazione se non opportunamente protetta. A tal proposito, sono possibili due differenti strategie: proteggere direttamente N^τ con un gruppo protettore oppure proteggere N^τ con un gruppo protettore ingombrato stericamente o elettronattrattore, tale per cui possa ridurre la basicità di N^τ. Nonostante ciò, N^τ può ancora dare racemizzazione; tuttavia, l'ingombro sterico del "Trt" impedisce di causare reazioni secondarie. [84]

La rimozione del "Trt" si svolge in ambiente acido, il che lo rende compatibile con gli aa la cui funzione amminica è protetta con "Fmoc", quest'ultimo stabile in condizioni acide come sopra ricordato.

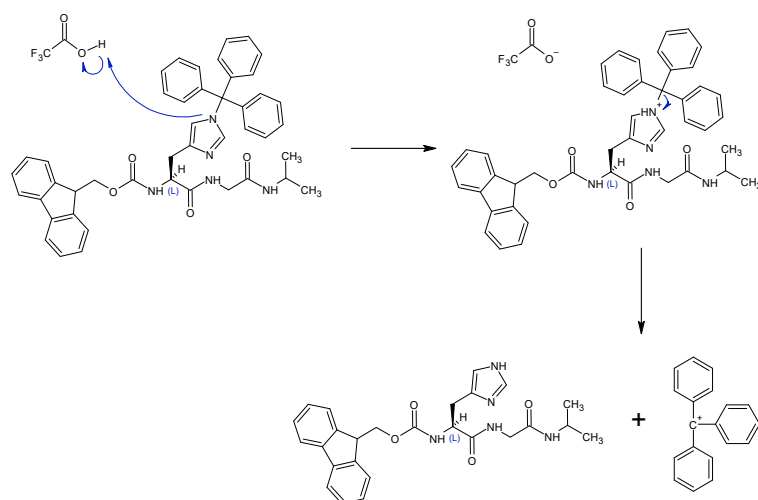


Figura 21 - meccanismo di rimozione del gruppo protettore "Trt" per mezzo del TFA.

Il meccanismo di rimozione del Trt prevede la protonazione N^{π} , la quale causa rottura del legame con il Trt favorita dalla formazione di un carbocatione trifenilmetile terziario, molto stabile per risonanza.

La deprotezione viene effettuata con acidi relativamente forti che possono portare a reazioni secondarie indesiderate di alchilazione o acilazione in alcuni aminoacidi, favorite dai gruppi protettore che si staccano.^[79] Infatti, la scissione dei gruppi protettori dalle catene laterali può liberare specie reattive, in grado di modificare alcuni residui amminoacidici. Tale evento può essere ridotto utilizzando molecole dette *scavenger*, come ad esempio il fenolo, in grado di catturare i carbocationi che spesso si liberano nei trattamenti con acido.^[34]

In SPPS la rimozione del “Trt” è avvenuta tramite impiego di una miscela costituita da TFA:PhOH:TIS:H₂O in rapporto 9.0:0.5:0.25:0.25. In questo caso, il TFA non solo permette la rimozione del gruppo protettore dall’istidina, ma consente pure il distacco del peptide dalla resina.

In LPPS la rimozione del “Trt” è avvenuta impiegando una miscela DCM:TFA in rapporto 7:3 .

Il fatto che il gruppo “Trt” sia labile in condizioni acide, spiega perché in alcuni casi i picchi in HPLC-MS mostrano le masse del peptide private del “Trt”, come per il peptide “Fmoc-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr.” (p. 39).

3.1.2. - Attivazione della funzione carbossilica

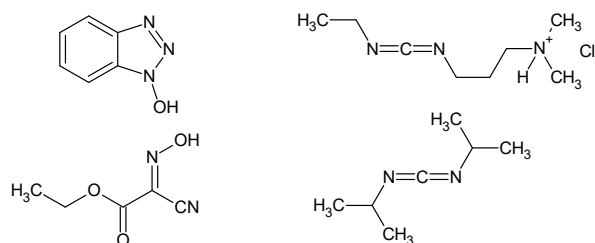


Figura 22 - agenti attivanti impiegati durante le sintesi. In alto HOBT (sx.) e EDC·HCl (dx.) per LPPS, in basso Oxyma Pure (sx.) e DIC (dx.) per SPPS.

Gli agenti attivanti come EDC·HCl e DIC sono comunemente usati per preparare ammidi, esteri e anidridi dal corrispondente acido carbossilico. Le carbodimmidi vengono impiegate nella sintesi peptidica perché non richiedono di trasformare preliminarmente il gruppo carbossilico in un derivato reattivo, come ad esempio in un cloruro acilico. Inoltre, attivano il gruppo carbossilico in maniera efficace, ma non eccessivamente, come potrebbero esserlo

bromuri o cloruri acilici. Le iperattivazioni vanno evitate poiché favoriscono pure reazioni secondarie indesiderate. [76]

La DIC è impiegata nella sintesi su fase solida, e il corrispondente sottoprodotto urea è solubile in solventi come DCM, rimanendo di fatto in soluzione.

L'EDC forma invece un sottoprodotto urea solubile in acqua, facilmente removibile attraverso estrazione acquosa. [76]

La carbodiimmide reagisce con l'acido carbossilico per formare la O-acilisourea, la quale reagisce direttamente con l'ammina per formare la corrispondente ammido e il sottoprodotto urea. La driving force della reazione è la formazione del sottoprodotto urea. Tuttavia, attraverso un attacco nucleofilo intramolecolare si può formare N-acilurea, che non è più in grado di acilare l'ammina e di conseguenza si perde il reagente.:

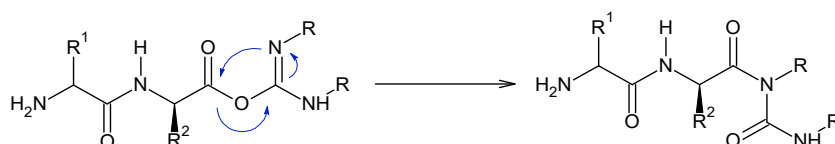


Figura 23 - meccanismo conversione N-acilisourea da O-acilisourea.

Per minimizzare la quantità di N-acilurea, si aggiunge un nucleofilo, come HOBt, che reagisce velocemente con l'O-acilisourea impedendo in questo modo la formazione di N-acilurea. [85]

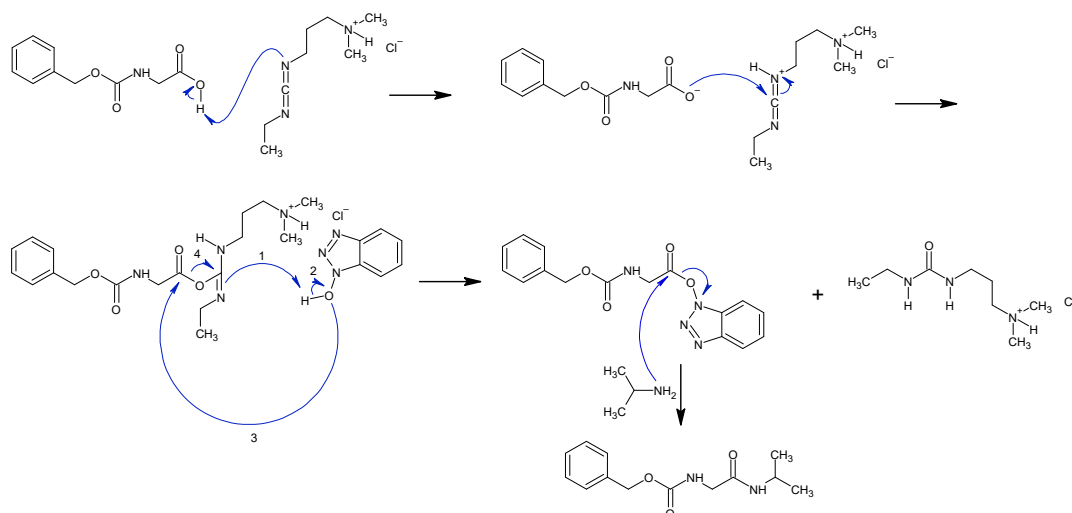


Figura 24 - meccanismo di reazione di *coupling* tra Z-Gly-OH e NH₂-iPr impiegando gli agenti attivanti HOBt ed EDC-HCl.

L'HOBt oltretutto agisce da soppressore di racemizzazione quando combinato con le carbodiimmidi, perché ostacola anche la formazione di 5(4H)-ossazolone, che come visto sopra è il principale responsabile delle racemizzazioni che si osservano nella sintesi peptidica. [76]

3.1.3. - Kaiser Test

Durante la sintesi peptidica su fase solida, al fine di verificare che il *coupling* sia avvenuto correttamente e non siano presenti gruppi amminici liberi, è stato effettuato il Kaiser Test. [86]

Si preleva qualche mg di resina e la si lava con DCM. Si trasferisce poi il contenuto in una provetta di vetro, all'interno della quale si introducono 20 μ L per ciascuna delle seguenti soluzioni: fenolo 80% in etanolo, KCN in H₂O/piridina e ninidrina 6% in etanolo. Si lascia la provetta immersa in un bagno a sabbia termostata alla temperatura di 110 °C per qualche minuto.

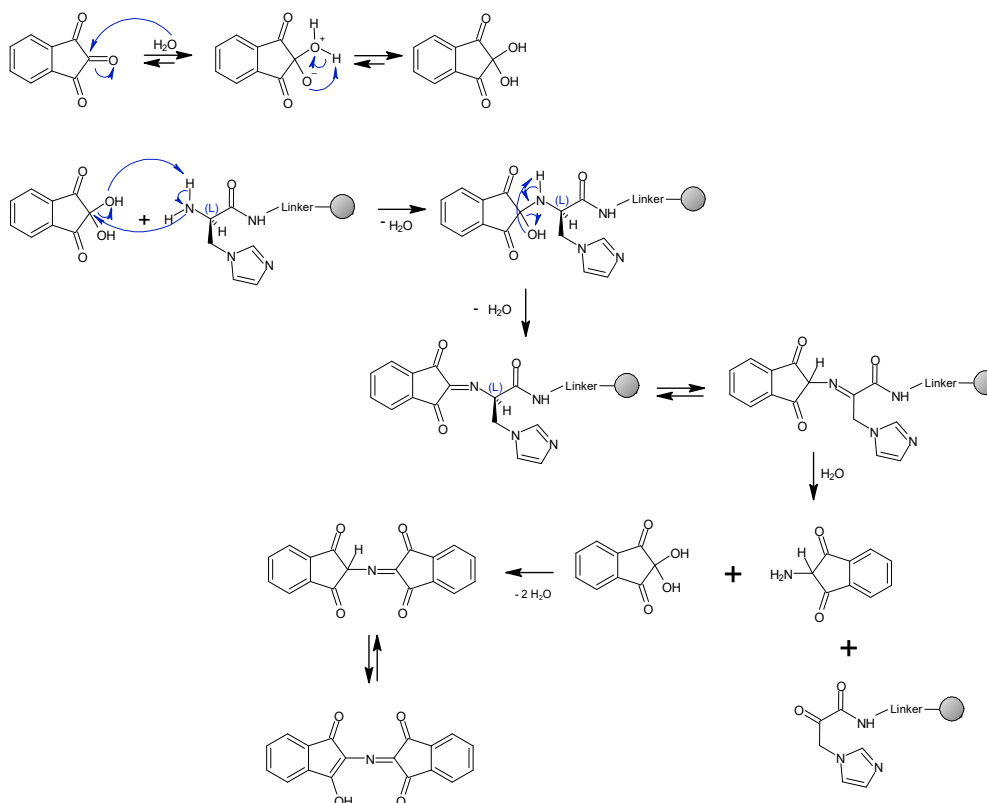


Figura 25 - meccanismo coinvolto durante il saggio colorimetrico "Kaiser Test".

Se si dovesse osservare la formazione di colore blu (Ruhemanns Blu) a livello delle sferette di resina-peptide allora bisognerebbe ripetere il *coupling* precedente, poiché significherebbe che è presente ancora dell'aa deprotetto, dunque con funzione amminica primaria libera. Tale fatto porterebbe alla formazione di sottoprodotti indesiderati, diminuendo la quantità del successivo amminoacido disponibile per la sequenza peptidica corretta.

3.2. - Sintesi e caratterizzazione dei composti

3.2.1 - Sintesi di Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr

La principale problematica riscontrata durante la sintesi del peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” è stata la bassa quantità di prodotto finale puro ottenuta.

Si è partiti da un aa protetto dal gruppo “Z”. Il suo meccanismo di rimozione (p. 56-57) prevede la formazione di molecole facilmente eliminabili per evaporazione (toluene e CO₂), rendendo così l’aa completamente disponibile per il *coupling* successivo.

Il legame tra “Fmoc-L-His(Trt)-OH” e “NH₂-Gly-NH*i*Pr” comporta la formazione di “Fmoc-L-His(Trt)-NH-Gly-NH*i*Pr”. La presenza di due grossi gruppi idrofobici, Fmoc e Trt, ha comportato dei problemi in fase di *work-up*, poiché si è formata un’emulsione tra la fase organica (AcOEt) e la fase acquosa, soprattutto quella basica, portando a recuperare poco prodotto. Infatti, in presenza di base Fmoc-L-His(Trt)-OH non reagito avrà il gruppo carbossilico deprotonato. Tuttavia, tale carica negativa non è sufficiente a trascinare in acqua Fmoc e Trt, troppo idrofobici.

Oltretutto, durante ogni *coupling* si è resa necessaria una purificazione del prodotto attraverso una cromatografia su gel di silice, contribuendo ad aumentare il tempo necessario ad ottenere i peptidi intermedi e finali, oltre che a perdere delle aliquote di prodotto.

I peptidi “Fmoc-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH*i*Pr” e “Lauril- L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH*i*Pr” sono stati isolati mediante le usuali estrazioni in imbuto separatore, ma non sono stati purificati ulteriormente poiché si è deciso di purificare solamente il peptide finale, quello cioè ottenuto dopo rimozione dei due Trt, essendo poca la quantità di pentapeptide ottenuta.

Di seguito si riporta il cromatogramma HPLC per il peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr”.

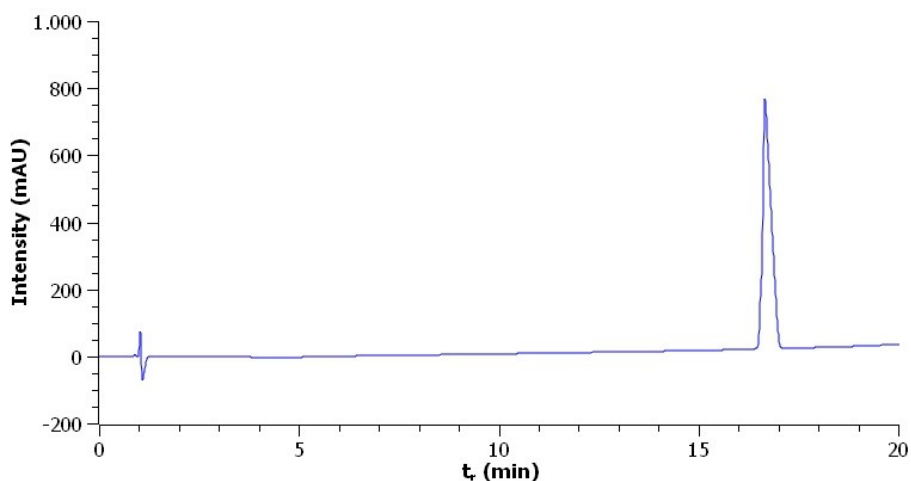


Figura 26 - spettro HPLC del peptide Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr (gradiente 5-50% di B, $\lambda = 214$ nm).

La purezza del peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” è stata calcolata integrando l’area del picco cromatografico corrispondente al prodotto desiderato ($t_R = 16.67$ min.) ed è risultata essere pari al 98%.

3.2.2. - Sintesi dei coniugati ferrocene-peptide

La sintesi dei coniugati ferrocene-peptide è stata svolta completamente su fase solida e successivamente sono stati purificati attraverso HPLC preparativo.

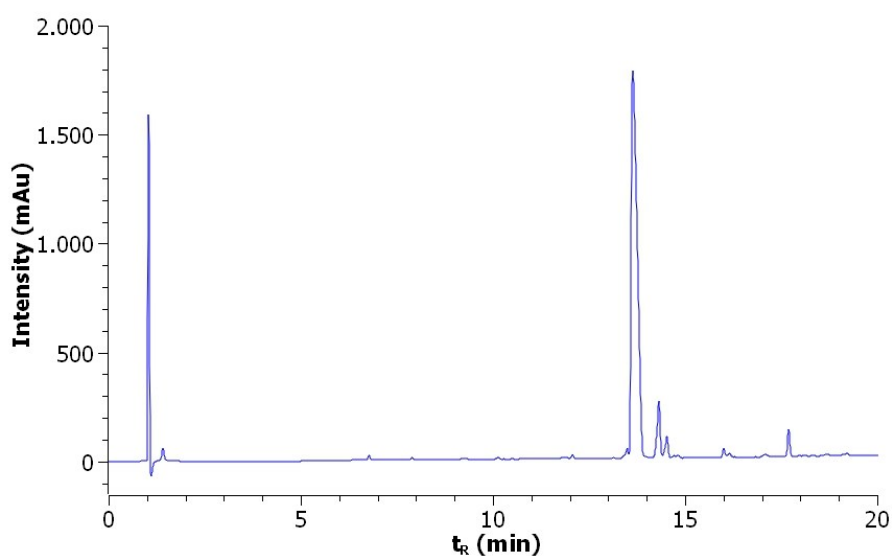


Figura 27 - spettro HPLC di Fmoc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ (gr. 5-50% di B, $\lambda = 214$ nm)

Il picco a 13.65 minuti produce come frammento principale $[M+H]^+$ a 727.3, corrispondente alla massa dello Fmoc-peptide, evidenziando la corretta sintesi del peptide su fase solida.

Nonostante ciò, è stato osservato dal cromatogramma HPLC relativo allo sblocco del coniugato “Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂” dalla resina che sono presenti diversi segnali interessanti.

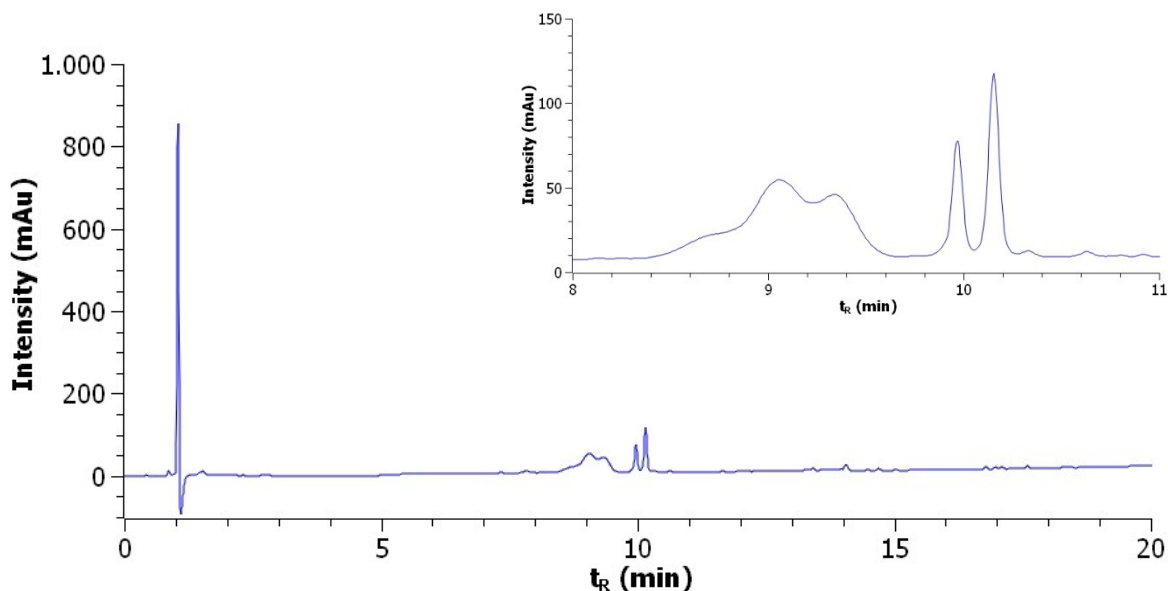


Figura 28 - spettro HPLC di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ (gradiente 5-50% di B, λ= 214 nm).

coniugato	t _R (min)
no Ala	8.99, 9.99
β-Ala	9.39, 10.14

Tabella 9 - tempi ritenzione specie di interesse relative allo spettro in Figura 28.

Dall’analisi ESI, risultano quattro picchi caratteristici. A t_R = 9.39 e 10.14 min il segnale del coniugato Fc-peptide corretto, mentre a t_R = 8.99 e 9.99 min è presente il coniugato Fc-peptide privato di un’alanina.

Inizialmente si è pensato che lo sdoppiamento dei picchi fosse dovuto al fatto che una parte dei prodotti con il ferrocene si fosse ossidata, i quali vengono eluiti prima.

A seguito di purificazione tramite HPLC preparativo, sono state recuperate le frazioni corrispondenti al prodotto con la maggiore purezza.

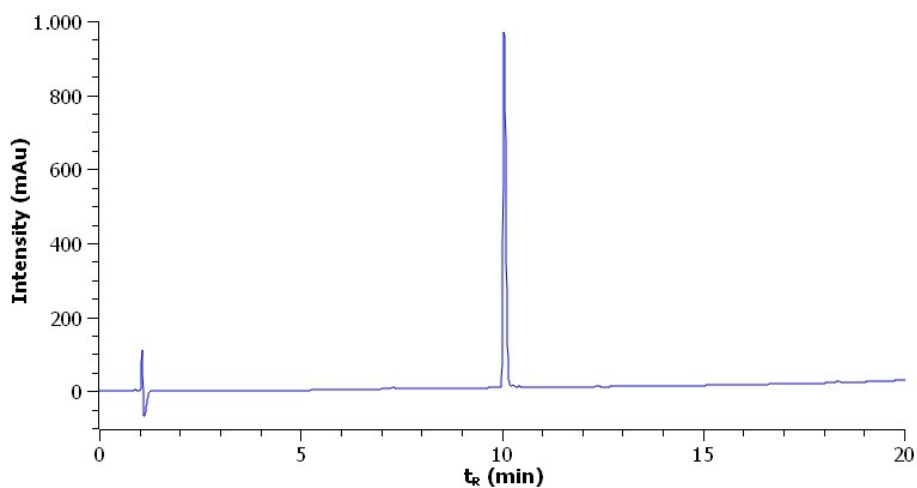


Figura 29 - spettro HPLC di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ purificato (gradiente 5-50% di B, λ= 214 nm).



Figura 30 - spettro ESI di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

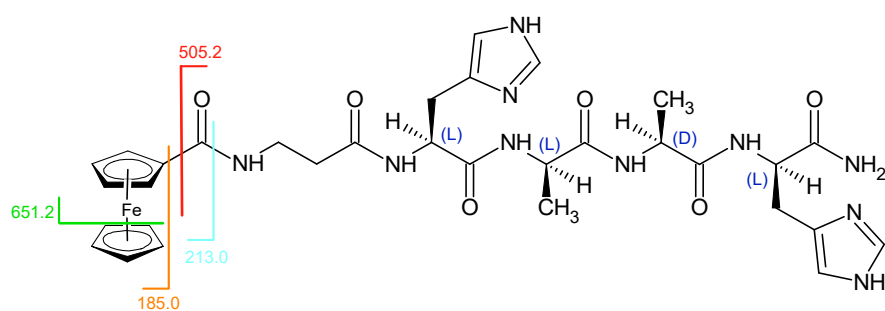


Figura 31 - frammentazioni di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

I frammenti a 717.2 e 718.2 corrispondono rispettivamente ai segnali $[M+H]^+$ e $[M+2H]^+$. Il segnale a 651.2 corrisponde al frammento della molecola privata di un ciclopentadienile del ferrocene mentre il segnale a 505.2 corrisponde al frammento della molecola privata del ferrocene.

Infine, i segnali a 185.0 e 213.0 corrispondono rispettivamente ai segnali $[\text{Fc-H}]^+$ e $[\text{FcC=O-H}]^+$.

Per il coniugato “Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂” sono state ottenute due frazioni, impiegando la stessa aliquota di miscela di sblocco contenente fenolo (2 x 2.5 mL) e recuperando una frazione dopo 45 minuti di trattamento con acido e una dopo 90 minuti. Ciò è stato pensato perché, come evidenziato dallo spettro HPLC di Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ (Figura 28) il segnale della massa corretta del prodotto era presente a t_R differenti. Il ferrocene ossidato, essendo più polare rispetto al ferrocene, a causa della presenza di una carica positiva sul Fe³⁺, viene trattenuto meno dalla colonna e dunque il ferrocene e i suoi derivati ossidati hanno tempi di ritenzione inferiore rispetto agli analoghi non ossidati.

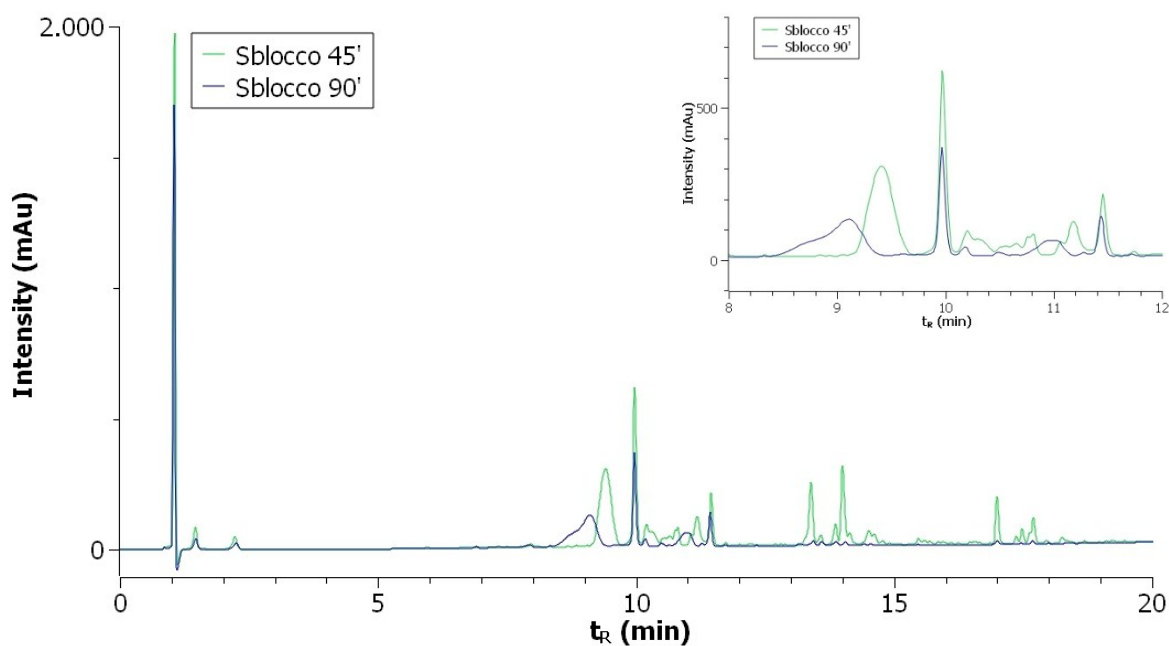


Figura 32 - confronto tra spettri HPLC di Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ con tempo di sblocco dalla resina di 45 e 90 minuti (gradiente 5-50% di B, λ= 214 nm).

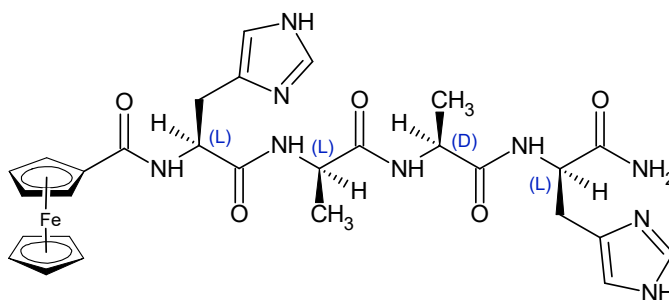
Come è stato evidenziato dagli spettri HPLC dei coniugati Fc-peptide, il tempo di sblocco è ininfluente in quanto produce lo stesso tracciato cromatografico.

Oltretutto, i segnali legati ai prodotti “ossidati” non sono dovuti al fatto che i prodotti lo erano realmente, bensì era dovuta alla presenza del TFA all’interno degli eluenti che ha ossidato i prodotti in colonna.

Dalle analisi HPLC-MS sono stati evidenziati dei segnali riconducibili al prodotto desiderato ma privato dello spaziatore.

coniugato	t _R 45'	t _R 90'
no spacer	9.34, 9.94	9.11, 9.94
6-Ahx	11.20, 11.47	11.07, 11.47

Tabella 10 - tempi ritenzione specie di interesse relative allo spettro in Figura 32.



Il coniugato “Fc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂” è stato anch'esso recuperato dopo purificazione tramite HPLC preparativo ed è stato altresì sottoposto a test di natura enzimatica, permettendo in questo modo di valutare l'influenza che esercita la presenza/assenza dello spaziatore tra peptide e ferrocene.

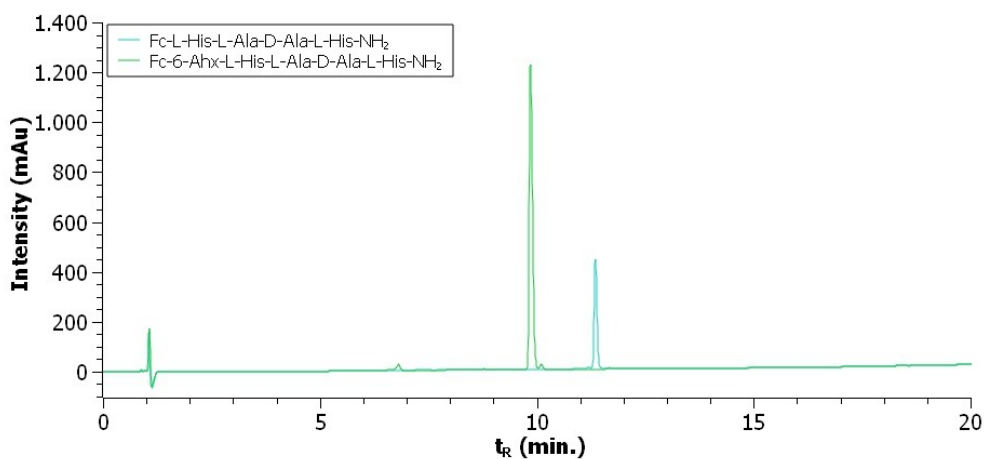


Figura 33 - spettri HPLC di Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ e Fc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂ purificati (gradiente 5-50% di B, λ = 214 nm).

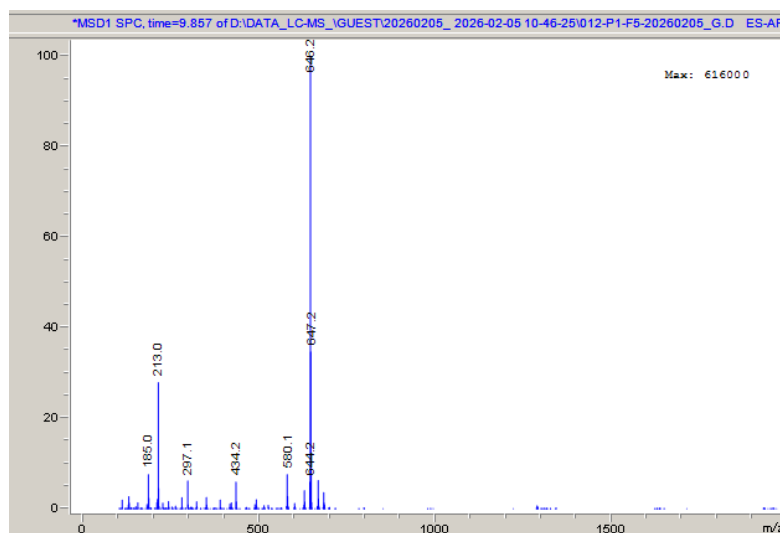


Figura 34 - spettro ESI di Fc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

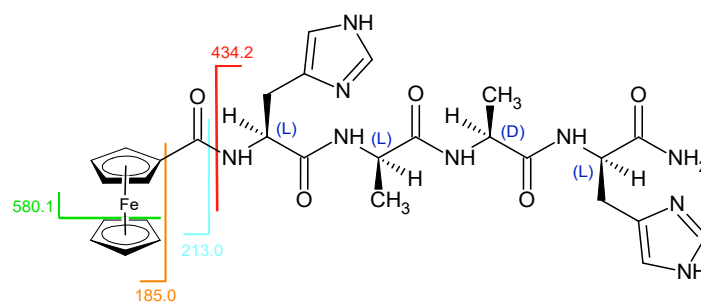


Figura 35 - frammentazioni di Fc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

I frammenti a 646.2 e 647.2 corrispondono rispettivamente ai segnali $[M+H]^+$ e $[M+2H]^+$. Il segnale a 580.1 corrisponde al frammento della molecola privata di un ciclopentadienile del ferrocene mentre il segnale a 434.2 corrisponde al frammento della molecola privata del ferrocene e del carbonile. Infine, i segnali a 185.0 e 213.0 corrispondono rispettivamente ai segnali $[Fc-H]^+$ e $[FcC=O-H]^+$.

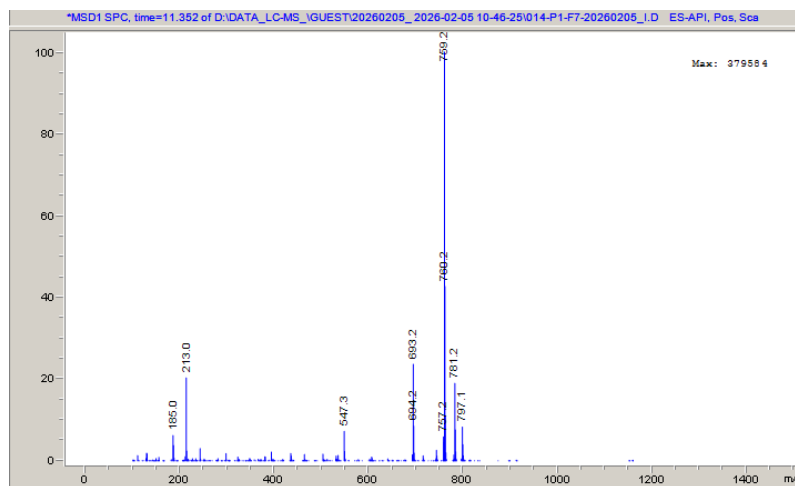


Figura 36 - spettro ESI di Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

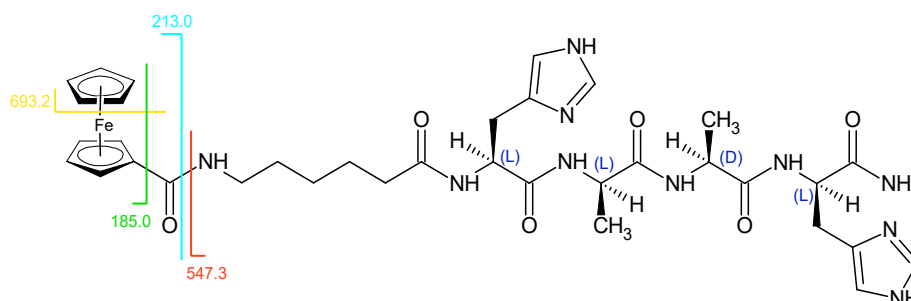


Figura 37 - frammentazioni di Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂.

I frammenti a 759.2 e 760.2 corrispondono rispettivamente ai segnali $[M+H]^+$ e $[M+2H]^+$, mentre a 781.2 e 797.1 sono rispettivamente i segnali degli addotti $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$.

Il segnale a 693.2 corrisponde al frammento della molecola privata di un ciclopentadienile del ferrocene mentre il segnale a 547.3 corrisponde al frammento della molecola privata del ferrocene. Infine, i segnali a 185.0 e 213.0 corrispondono rispettivamente ai segnali $[Fc-H]^+$ e $[FcC=O-H]^+$.

La sintesi dei due coniugati con l'istidina non codificata, essendo un reagente disponibile in poca quantità, era stata pensata per la sintesi su fase solida automatizzata, ricorrendo al sintetizzatore.

I vantaggi di impiegare un sintetizzatore per la sintesi peptidica sono di migliorare la riproducibilità e l'affidabilità della sintesi. Non solo, se si utilizza un sintetizzatore che impiega il riscaldamento a microonde, consente di migliorare la reazione di acilazione degli aa, permettendo di ottenere rese più elevate, nonché peptidi più puri. [88]

Ciò nonostante, l'istidina non canonica non si è solubilizzata bene in DMF; dunque, sarebbe stata difficoltosa la sintesi al sintetizzatore poiché si sarebbe sporcato il puntale del prelievo, portando alla formazione di prodotti indesiderati.

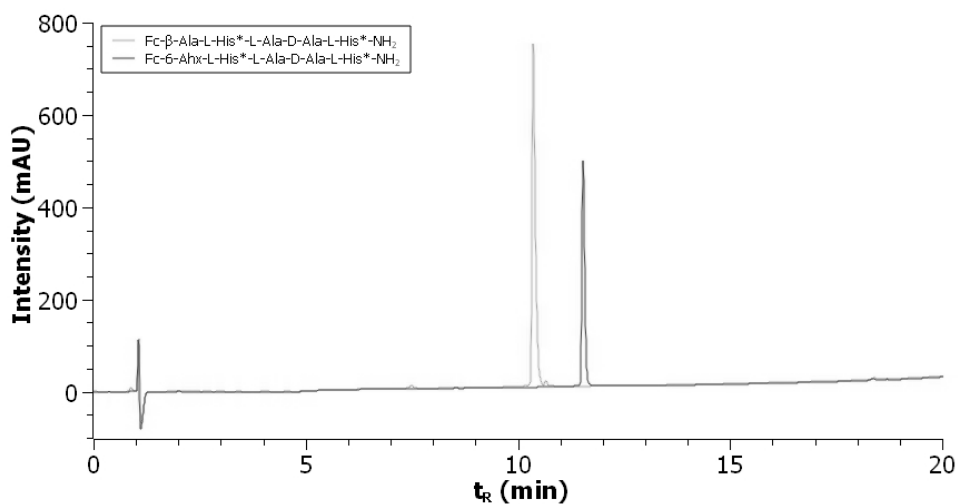


Figura 38 - spettri HPLC di Fc-β-Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂ e Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂ purificati (gradiente 5-50% di B, λ= 214 nm).

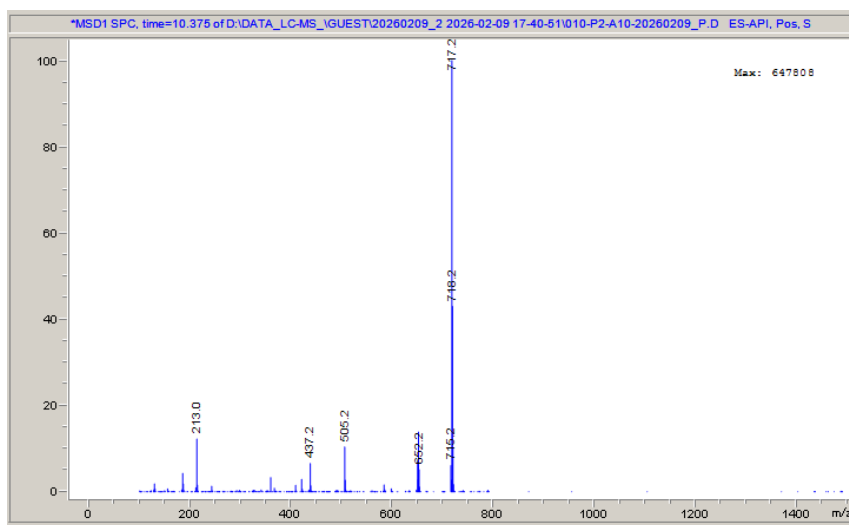


Figura 39 - spettro ESI di Fc-β-Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂ purificato.

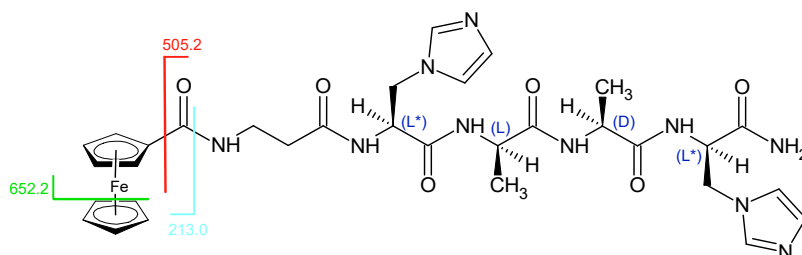


Figura 40 - frammentazioni di Fc-β-Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.

I frammenti a 717.2 e 718.2 corrispondono rispettivamente ai segnali $[M+H]^+$ e $[M+2H]^+$.
 Il segnale a 652.2 corrisponde al frammento della molecola privata di un ciclopentadienile del ferrocene mentre il segnale a 505.2 corrisponde al frammento della molecola privata del ferrocene.

Infine, il segnale a 213.0 corrisponde al frammento $[FcC=O-H]^+$.

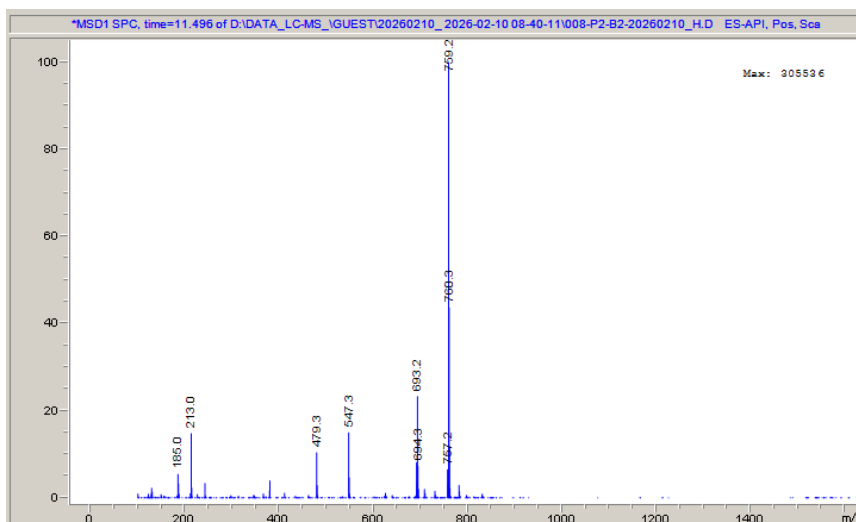


Figura 41 - spettro ESI di Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.

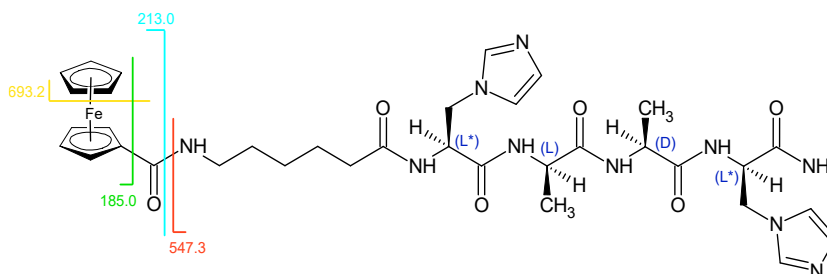


Figura 42 - frammentazioni di Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂.

I frammenti a 759.2 e 760.3 corrispondono rispettivamente ai segnali $[M+H]^+$ e $[M+2H]^+$.
 Il segnale a 693.2 corrisponde al frammento della molecola privata di un ciclopentadienile del ferrocene mentre il segnale a 547.3 corrisponde al frammento della molecola privata del ferrocene e del carbonile.

Infine, i segnali a 185.0 e 213.0 corrispondono rispettivamente ai segnali $[Fc-H]^+$ e $[FcC=O-H]^+$.

Dopo essere stati purificati tramite HPLC preparativo, le purezze dei coniugati ferrocene-peptide sono state calcolate integrando l'area dei picchi corrispondenti ai cromatogrammi dei relativi prodotti.

coniugato Fc-peptide	purezza (%)
Fc- β -Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH ₂	96%
Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH ₂	93%
Fc- L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH ₂	95%
Fc- β -Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH ₂	95%
Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH ₂	92%

Tabella 11 - purezze dei coniugati ferrocene-peptide ottenuti.

3.3. - Studi conformazionali

3.3.1. Spettroscopia IR

La spettroscopia IR (infrarossa) è una tecnica che si basa sulle vibrazioni degli atomi di una molecola indotte da un'opportuna radiazione elettromagnetica. Le energie dei picchi registrate negli spettri IR corrispondono alle frequenze vibrazionali di opportuni legami presenti in una molecola e fanno riferimento alla frazione di energia assorbita dal campione rispetto l'energia della radiazione incidente. ^[87]

La presenza di legami idrogeno ha un effetto importante nella spettroscopia infrarossa, in quanto influenza la rigidità del legame, alterando così la frequenza di vibrazione. I fattori che contribuiscono a tale contributo sono solvente, concentrazione e temperatura. Minore è la concentrazione, minore è la probabilità che due molecole entrino in collisione; conseguentemente il grado di legame idrogeno *intermolecolare* diminuisce al diminuire della concentrazione. ^[87] Tuttavia, eventuali legami a idrogeno *intramolecolari* non risentono della concentrazione.

Le frequenze vibrazionali dei legami ammidici sono influenzate dalle diverse strutture secondarie assunte dalla molecola di appartenenza. Queste differenze sono dovute al contributo dei legami a idrogeno e possono essere intra o intermolecolari. I modi vibrazionali di un legame peptidico coinvolgono i gruppi C=O, C-N e N-H. ^[89]

Le misure IR sono state effettuate nel range del MIR (4000-400 cm^{-1}) ^[87] focalizzandosi su due regioni in particolare: ^{[90][91]}

3600-3200 cm^{-1} : stretching legami N-H di gruppi peptidici, ammidici e uretanici.

1800-1600 cm^{-1} : stretching C=O di gruppi peptidici, ammidici e uretanici.

Le ammidi secondarie mostrano una banda di stretching N-H a 3300–3250 cm^{-1} , mentre lo stretching del C=O (banda Amide I) si osserva a 1680–1640 cm^{-1} . La banda Amide II per le ammidi secondarie è costituita all'accoppiamento del bending di N-H e dello stretching del C-N a 1560–1530 cm^{-1} . ^[87]

Sono state effettuate misure IR per il peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” e relativi intermedi di sintesi. Di seguito si riporta la relativa numerazione:

- 1) Z-Gly-NH-*i*Pr
- 2) Fmoc-L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr
- 3) Fmoc-D-Ala- L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr
- 4) Fmoc-L-Ala-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr
- 5) Fmoc-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala- L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr
- 6) Lauril-L-His(Trt)-L-Ala-D-Ala- L-His(Trt)-Gly-NH-*i*Pr
- 7) Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala- L-His-Gly-NH-*i*Pr

Come solvente si è scelto il cloroformio perché non essendo un forte donatore o accettore di legami a idrogeno consente di studiare la conformazione peptidica determinata dalle interazioni tra ammidi. Per i campioni con la sigla “D” si fa riferimento a una concentrazione pari a 1 mM in cella con cammino ottico da 1 mm, mentre con la sigla “S” si fa riferimento a una concentrazione di 0.1 mM in cella con cammino ottico da 1 cm. Le intensità delle misure alle due concentrazioni sono così facilmente confrontabili poiché alla diluizione di dieci volte corrisponde un aumento del cammino ottico di dieci volte.

In Tabella 12 sono riassunti i dati più significativi per la serie D (concentrazione 1 mM in CDCl₃). I relativi spettri sono riportati nelle Figure 43 e 44.

Peptide	3600-3200 cm ⁻¹	1800-1600 cm ⁻¹
1	3429	1719, 1677, 1602
2	3429, 3361	1719, 1668, 1601
3	3445, 3352	1710, 1675, 1602
4	3429, 3339	1666, 1602
5	3419, 3336	1721, 1676, 1602
6	3412, 3331	1663, 1602
7	3288	1668, 1628, 1602

Tabella 12 - valori frequenze vibrazionali di assorbimento IR dei peptidi 1-7 serie “D” in CDCl₃.

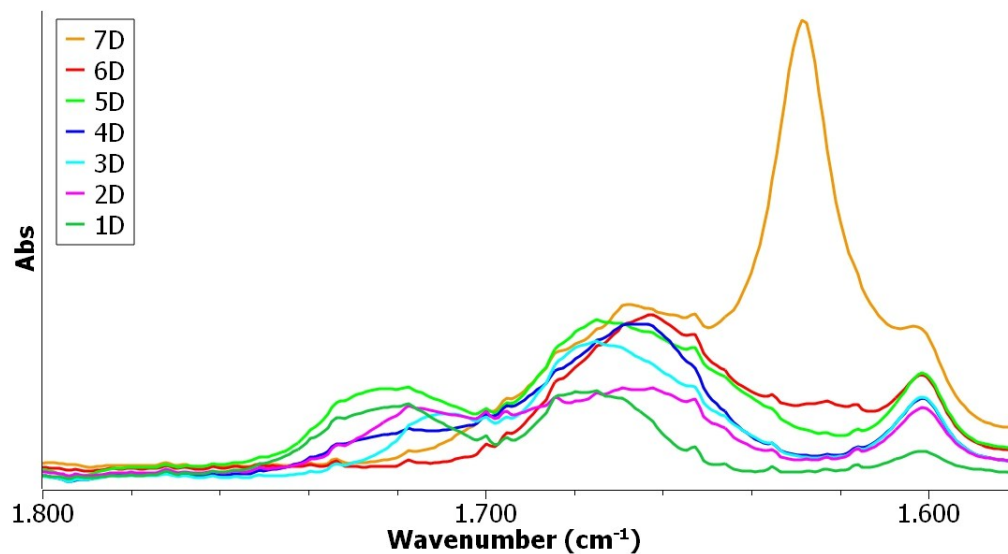


Figura 43 - spettri di assorbimento IR (1800-1580 cm^{-1}) dei peptidi 1-7 serie "D" in CDCl_3 .

Analizzando gli spettri di assorbimento IR alla concentrazione 1 mM, si nota nella zona Amide I (stretching C=O) per il peptide 7 una banda di assorbimento molto intensa a circa 1630 cm^{-1} . Questo assorbimento intenso e a frequenze molto più basse rispetto agli altri peptidi indica che il peptide instaura legami forti intermolecolari e quindi tende ad autoaggregarsi. La soluzione era infatti opalescente, proprio perché l'aggregazione fa diminuire la solubilità del peptide.

I peptidi più corti hanno la corrispondente banda di assorbimento tra 1650 e 1670 cm^{-1} , zona dove assorbono i carbonili non impegnati in legame a idrogeno o coinvolti in legami a idrogeno deboli. L'assorbimento del C=O uretanico è centrato a circa 1720 cm^{-1} . È dovuto alla presenza dello Fmoc o dello Z nel derivato 1. Non compare pertanto nei peptidi 6 e 7 che hanno solo ammidi.

Di seguito si riportano gli spettri IR nella regione “Amide A” alla concentrazione 1 mM.

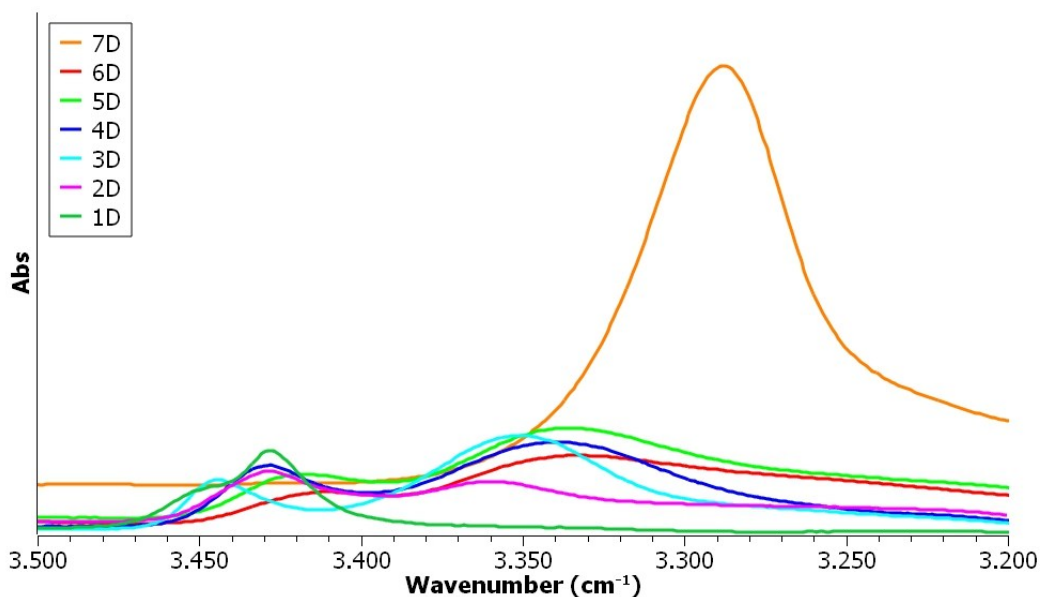


Figura 44 - spettri di assorbimento IR (3500-3200 cm^{-1}) dei peptidi 1-7 serie “D” in CDCl_3 .

Analizzando la zona Amide A (Figura 44) si nota come il derivato 1 assorba solo sopra 3400 cm^{-1} . In questa regione assorbono gli N-H ammidici o uretanici liberi, non impegnati in legami a idrogeno. In presenza invece di legami a idrogeno l'assorbimento scende al di sotto di 3400 cm^{-1} . Notiamo infatti che nello spettro del dipeptide 2, in aggiunta alla banda a circa 3430 cm^{-1} ne compare una a circa 3360 cm^{-1} . Tale evento indica proprio la formazione di un β -turn stabilizzato da un legame a idrogeno intramolecolare tra il C=O uretanico di Fmoc e il protone ammidico di NH-*i*Pr. È poi interessante notare che al crescere della catena peptidica cresce pure l'intensità della banda relativa agli N-H impegnati in legami a idrogeno. Non solo, tale banda si sposta via via a frequenze più basse, passando da circa 3360 cm^{-1} per il peptide 2 a circa 3335 cm^{-1} per il peptide 6. La crescita d'intensità e lo spostamento del massimo a frequenze più basse sono chiare indicazioni che in soluzione di CDCl_3 il peptide ha tendenza a strutturarsi in elica (3_{10} - oppure α -), stabilizzata da un numero di legami a idrogeno che cresce con l'allungarsi della catena. Il peptide 7, invece, non presenta bande di assorbimento di N-H liberi, ma solo una banda molto intensa di NH fortemente legati (massimo a circa 3288 cm^{-1}). Tale comportamento conferma quanto già osservato nella regione dello stretching del carbonile e cioè la presenza di forti legami idrogeno tipici di quelli intermolecolari che si instaurano nelle strutture a foglietto β . La variazione improvvisa di comportamento, da elica a foglietto β , è probabilmente imputabile alla rimozione degli ingombranti gruppi Trt e la concomitante esposizione degli anelli

imidazolici dei due residui di istidina. Questi possono pertanto favorire l'aggregazione promuovendo la formazione di reticoli di legami a idrogeno intermolecolari, grazie anche al guadagno termodinamico che si ha rispetto ai più deboli legami a idrogeno delle strutture elicoidali.

Diluendo le soluzioni di 10 volte (Figura 45) la situazione non cambia: il peptide 7 rimane fortemente aggregato, (Figura 46) mentre i suoi precursori con i residui di His protetti confermano la tendenza a dare strutture elicoidali stabilizzate da legami a idrogeno intramolecolari.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}
1	3429
2	3429, 3362
3	3445, 3351
4	3429, 3340
5	3420, 3336
6	3417, 3335
7	3288

Tabella 13 - valori frequenze vibrazionali di assorbimento IR dei peptidi 1-7 serie "S" in CDCl_3 .

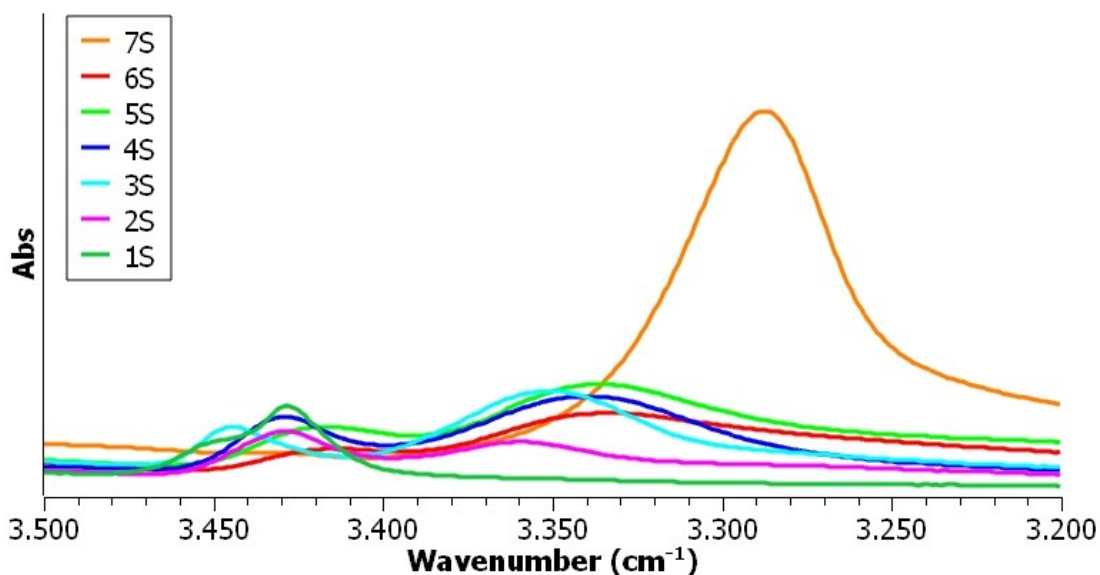


Figura 45 - spettri di assorbimento IR (3500-3200 cm^{-1}) dei peptidi 1-7 serie "S" in CDCl_3 .

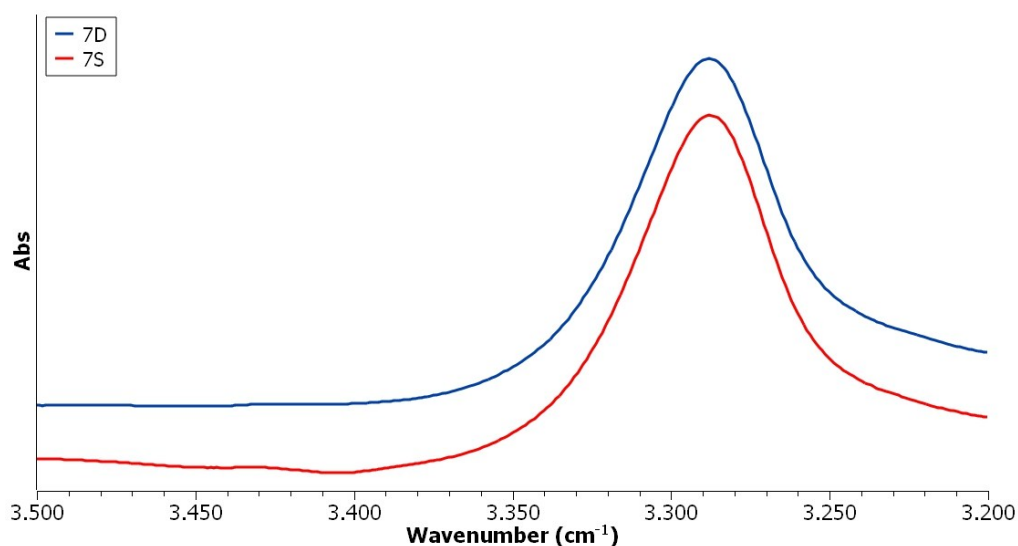


Figura 46 - spettri di assorbimento IR (3500-3200 cm^{-1}) del peptide 7 serie "S" e "D" in CDCl_3 .

3.3.2. Spettroscopia ^1H NMR bidimensionale

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), in combinazione con la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), rappresentano un insieme di metodi fondamentali per determinare la struttura di una molecola. ^[92]

La spettroscopia NMR si basa sulle proprietà magnetiche dei nuclei atomici. Quando interagiscono con un intenso campo magnetico, tipicamente nel campo delle frequenze radio (1-10000 MHz), essi risuonano a una frequenza caratteristica, chiamata frequenza risonante. Le variazioni del valore di questa frequenza forniscono delle informazioni sulla struttura molecolare all'interno della quale l'atomo risiede. ^[93]

La spettroscopia NMR monodimensionale è una rappresentazione bidimensionale in cui sull'asse delle ascisse viene riportato il chemical shift mentre sull'asse delle ordinate l'intensità.

Un esperimento di spettroscopia NMR bidimensionale invece produce uno spettro, costituito da due assi che rappresentano le frequenze e da un terzo asse che rappresenta l'intensità. Gli spettri NMR bidimensionali sono generati utilizzando tecniche nel dominio del tempo in cui il sistema di spin è sottoposto a impulsi e intervalli di tempo. ^[94]

Il vantaggio degli esperimenti NMR bidimensionali è che permettono di risolvere i picchi che si sovrappongono (overlap) nello spettro NMR monodimensionale, fornendo informazioni strutturali e quantitative. ^[95] Sono stati sviluppati diversi esperimenti NMR bidimensionali per la determinazione della struttura chimica di una molecola: ^[92] ^[96]

COSY (COrrrelation SpectroscopY)

Lo spettro COSY rivela accoppiamenti di spin tra idrogeni vicinali e geminali separati da tre legami ($^3J_{HH}$). Ciò consente di identificare gli atomi di carbonio vicini collegati da un legame chimico.

TOCSY (Total Correlation SpectroscopY)

Lo spettro TOCSY contiene in aggiunta le correlazioni con altri protoni nello stesso sistema di spin. Questo spettro risulta particolarmente utile per composti che contengono differenti sistemi di spin, come i residui amminoacidici di un peptide.

NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)

Lo spettro NOESY fornisce informazioni sulla stereochimica e sulle relazioni tra sistemi di spin separati, rivelando gli accoppiamenti tra protoni separati nello spazio da una distanza inferiore a 5 Å. L'effetto NOE (Nuclear Overhauser Effect) tra due protoni dipende dalla loro distanza e dalla mobilità della molecola, nonché dalla sua conformazione.

Di fatto, grazie al ripiegamento proteico, due protoni possono essere vicini nello spazio senza appartenere a un residuo adiacente. [97]

Lo spettro NOESY fornisce un forte supporto per gli elementi della struttura secondaria nel peptide. La regione NH/NH NOESY è particolarmente informativa.

In una struttura secondaria a α -elica regolare la distanza tra i protoni $C_\alpha H_i$ e $N_\alpha H_{i+1}$ è di 3,5 Å, mentre la distanza $N_\alpha H_i - N_\alpha H_{i+1}$ è 2,8 Å. Nella conformazione β -foglietto invece la distanza $C_\alpha H_i - NH_{i+1}$ è di 2,2 Å e la distanza $NH_i - NH_{i+1}$ è pari a 4,3 Å mentre sono difficilmente osservabili le correlazioni $N_\alpha H_i - N_\alpha H_{i+1}$ nelle regioni random coil.

Un altro criterio spesso utilizzato per confermare la struttura secondaria è la costante di accoppiamento dei tre legami $^3J_{HN-C\alpha H}$. I valori per una struttura ad α -elica regolare, un'elica 3_{10} , β -foglietto antiparallelo e β -foglietto parallelo i valori sono rispettivamente 3,9, 4,2, 8,9 e 9,7. [98]

Sono stati eseguiti esperimenti 2D NMR su alcuni peptidi, selezionati in quanto rappresentativi. In particolare, si sono registrati gli spettri TOCSY (Figura 47) e NOESY (Figura 48) di Fmoc-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH i Pr in soluzione di CDCl₃, lo stesso solvente dell'analisi IR. Combinando i due spettri è stato possibile assegnare tutte le risonanze. Ma la conclusione più interessante è arrivata dallo spettro NOESY (Figura 48). In questo sono infatti chiaramente osservabili due *cross-peak* di tipo $N_\alpha H_i - N_\alpha H_{i+1}$, che indicano la presenza

di un'incipiente struttura eliocoidale. Tale dato conferma pertanto quanto già dedotto dall'analisi mediante IR nello stesso solvente.

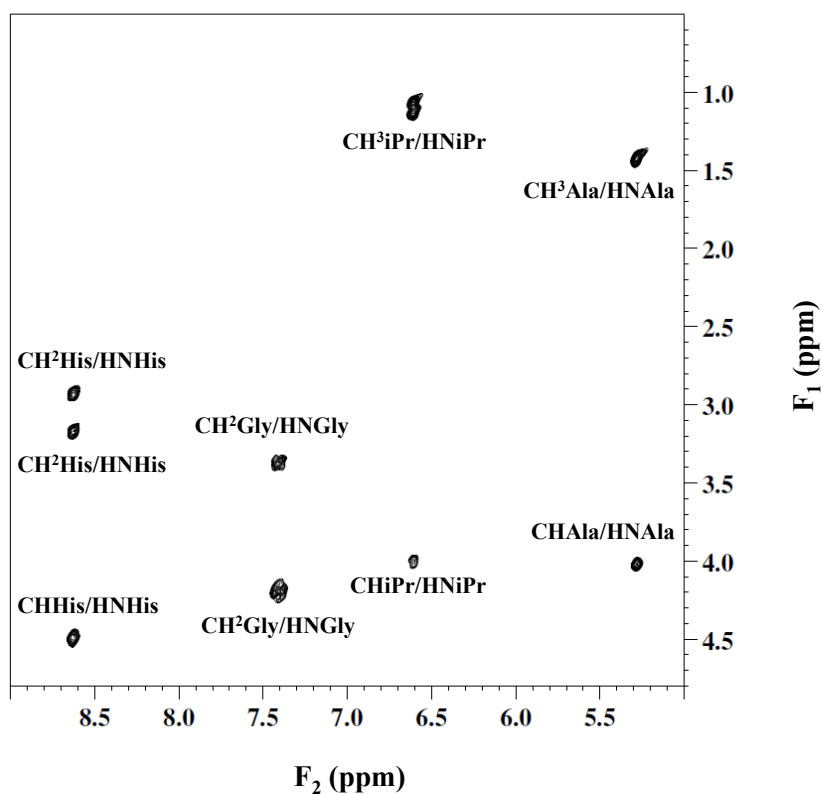


Figura 47 - sezione dello spettro TOCSY di Fmoc-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH*i*Pr (c=1mM in CDCl₃, T=25°C, 600 MHz).

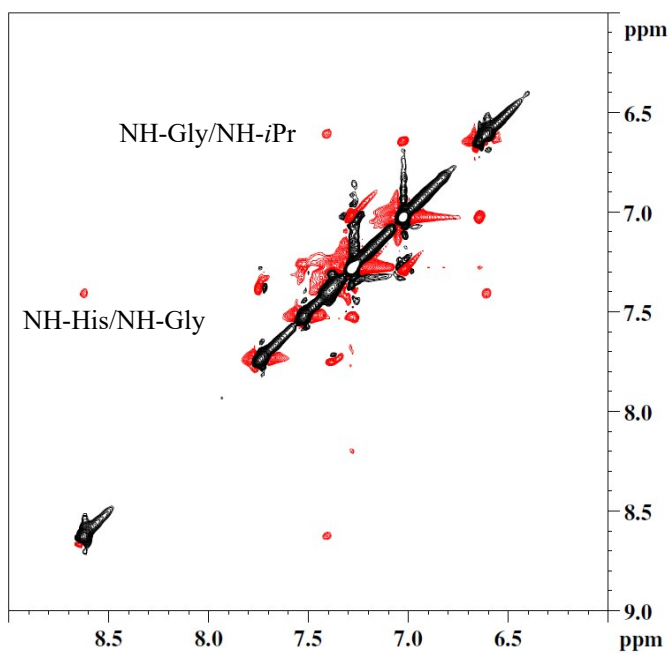


Figura 48 - sezione dello spettro NOESY di Fmoc-D-Ala-L-His(Trt)-Gly-NH*i*Pr (c=1mM in CDCl₃, T=25°C, 600 MHz).

Per il peptide 7, Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr non è stato possibile registrare spettri 2d NMR di qualità accettabile in CDCl₃, il solvente dell'analisi IR. D'altra parte, anche lo studio IR ha presentato difficoltà per questo peptide a motivo dell'aggregazione, come sopra discusso. Si è pertanto ricorsi al DMSO deuterato come solvente. In tali condizioni la soluzione del peptide è limpida, ma chiaramente scompaiono le aggregazioni. Infatti, il DMSO è un forte accettore di legami idrogeno e pertanto solvata tutte le ammidi impedendo i legami a idrogeno. Lo spettro TOCSY (Figura 49) ha comunque consentito di confermare la struttura del peptide e di assegnare tutte le risonanze. Dal punto di vista conformazionale, lo spettro NOESY ha permesso solamente di concludere che in DMSO il peptide 7 non adotta la struttura a foglietto β , osservata in CDCl₃, ma neppure una struttura elicoidale, essendo assenti le tipiche interazioni di tipo $N_{\alpha}H_i-N_{\alpha}H_{i+1}$.

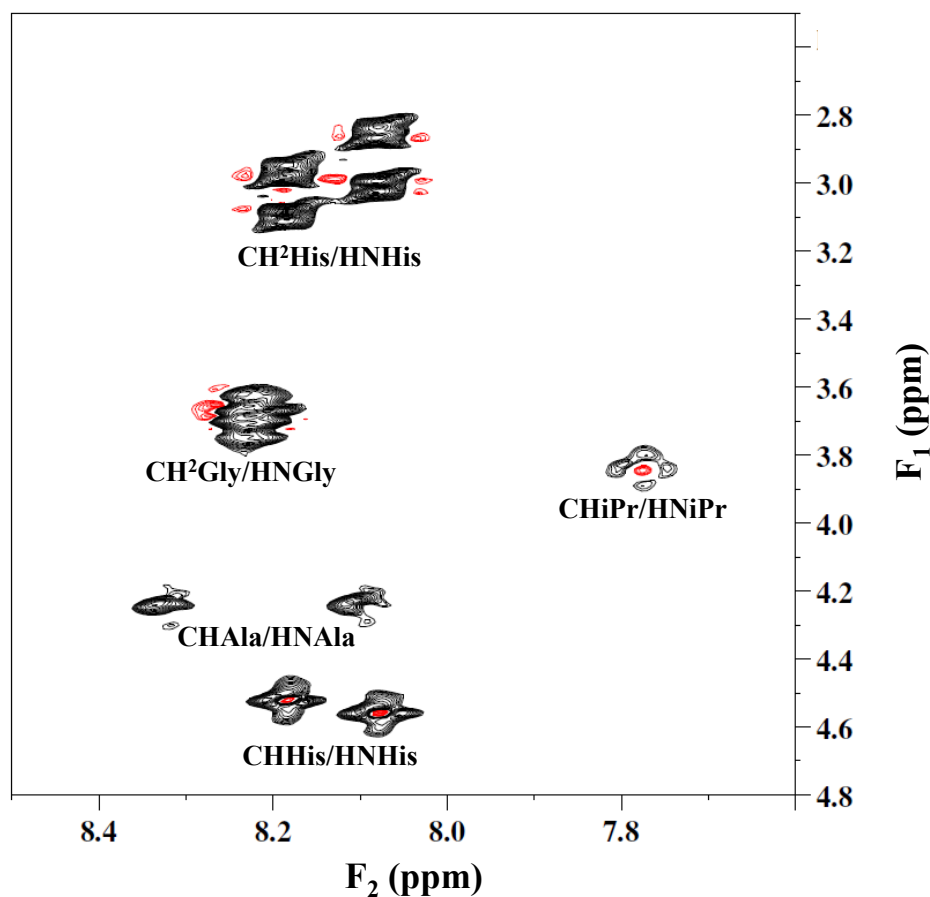


Figura 49 - sezione dello spettro TOCSY di Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr ($c=1\text{mM}$ in DMSO- d_6 , $T=25^\circ\text{C}$, 600 MHz).

Un'analisi accurata mediante spettroscopia NMR è stata condotta anche su due coniugati contenenti il ferrocene e l'istidina modificata e precisamente su "Fc-β-Ala-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂" e "Fc-6-Ahx-L-His*-L-Ala-D-Ala-L-His*-NH₂". Anche per questi pentapeptidi si è utilizzato il DMSO come solvente per problemi di solubilità.

Utilizzando i dati raccolti tramite esperimenti TOCSY e NOESY sono state assegnate tutte le risonanze protoniche per i composti Fc-βAla-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂ e Fc-6-Ahx-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂ (Tabelle 14 e 15). Le Figure 51 e 53 riportano sezioni significative degli spettri NOESY dei due peptidi. Nonostante siano presenti molti *cross-peak*, risultati utile per assegnare le risonanze, non è stato possibile individuare correlazioni tipiche di strutture secondarie note. D'altra parte, come osservato per Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr, anche questi due peptidi sono corti e si trovano in presenza di un forte accettore di legami ad idrogeno, il DMSO. Pertanto, le strutture elicoidali sono sfavorite come pure le strutture a foglietto β. Questi tre peptidi saranno quindi piuttosto flessibili. Non sempre questo è uno svantaggio. A volte, infatti, i meccanismi di azione biologica richiedono che un peptide sia in grado di adattarsi a un recettore o comunque di assumere conformazioni indotte dall'ambiente in cui viene a trovarsi.

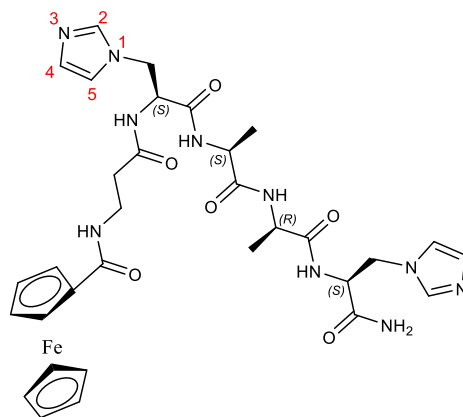


Figura 50 - formula di struttura del coniugato Fc-βAla-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂ e relativa numerazione degli atomi dell'anello imidazolico.

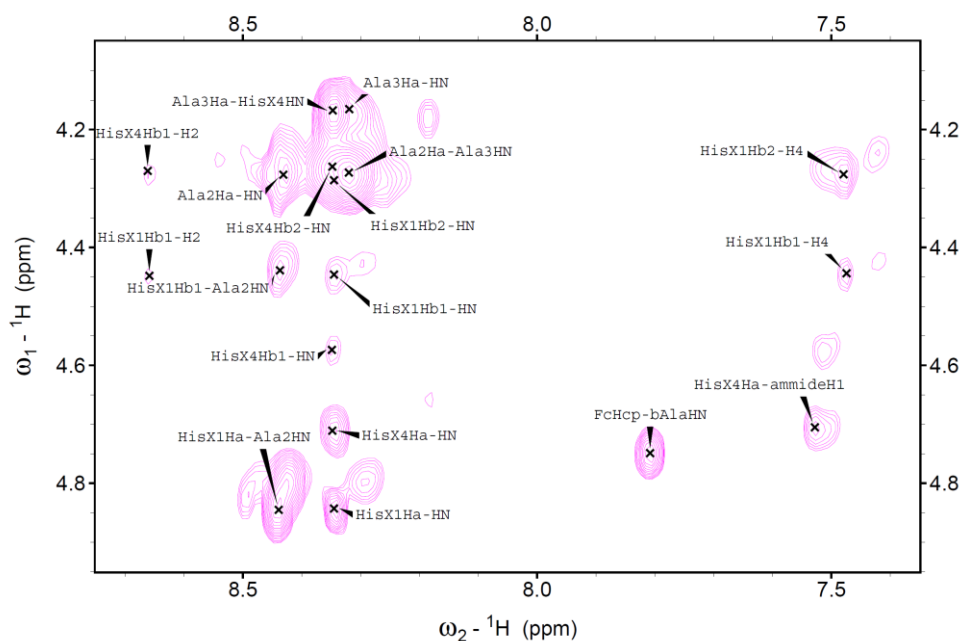


Figura 51 - sezione dello spettro NOESY di Fc-βAla-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂ (c=1mM in DMSO-d₆; T=25°C, 600 MHz).

	HN	αCH	βCH	altri
Fc				4.79; 4.34; 4.17
βAla	7.81	3.33	2.41	
His* ¹	8.34	4.84	4.44, 4.28	8.66(2), 7.48(4,5)
Ala	8.44	4.27	1.24	
D-Ala	8.32	4.17	1.11	
His* ⁴	8.35	4.71	4.42, 4.26	8.66 (2), 7.42(4,5)
-NH ₂				8.35, 7.52

Tabella 14 - valori dei *chemical shifts* dei protoni di Fc-βAla-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂.

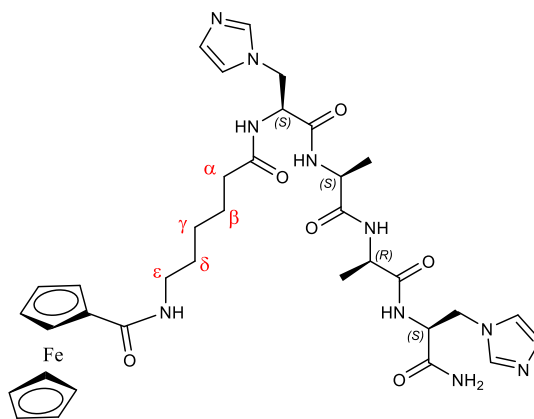


Figura 52 - formula di struttura del coniugato Fc-6-Ahx-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂ e relativa numerazione degli atomi dell'anello imidazolico.

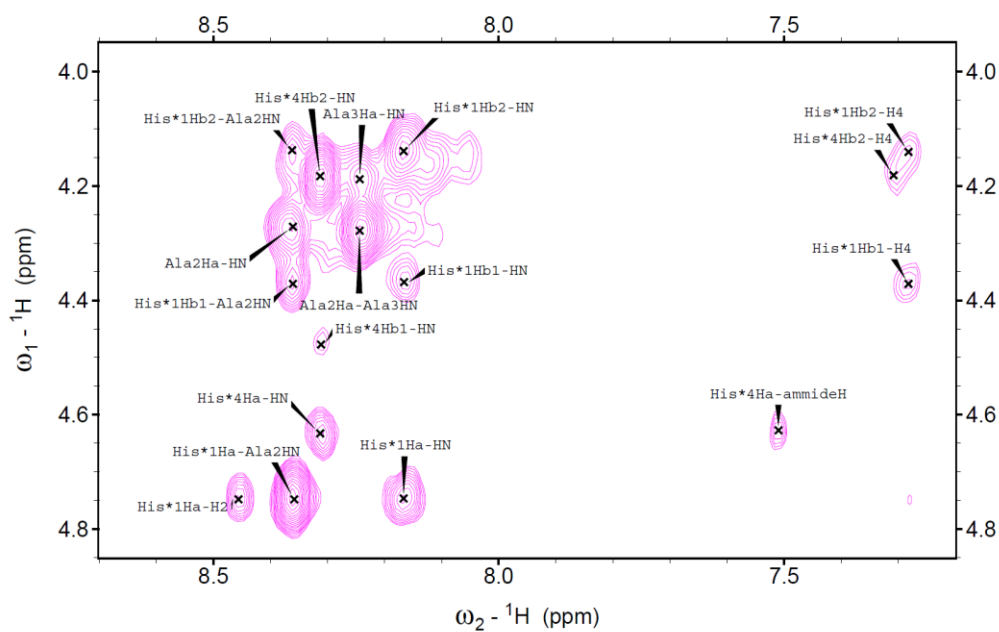


Figura 53 - sezione dello spettro NOESY di Fc-6-Ahx-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂ (c=1mM in DMSO-d₆; T=25°C, 600 MHz).

	HN	^α CH	^β CH	altri
Fc				4.79; 4.34; 4.17
Ahx	7.78	2.11	-	3.13 (ε); 1.45(δ); 1.19 (γ)
His* ¹	8.46	4.75	4.37, 4.14	8.46(2), 7.28(4,5)
Ala	8.36	4.27	1.23	
D-Ala	8.24	4.19	1.09	
His* ⁴	8.31	4.63	4.48, 4.18	8.66 (2), 7.31 (4,5)
-NH ₂				7.51

Tabella 15 - valori dei *chemical shifts* dei protoni di Fc-6-Ahx-His*-Ala-D-Ala-His*-NH₂.

3.4. - Prove di degradazione enzimatica

I test di degradazione enzimatica sono stati condotti su campioni di siero umano e sono stati effettuati su un peptide standard di riferimento “YSFF”, sul peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” e infine sui coniugati ferrocene-peptide “Fc-β-Ala-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂”, “Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂” e “Fc-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂”.

Questi test hanno permesso di valutare la stabilità dei composti in siero umano alla temperatura di 37°C.

In particolare, si è voluto confrontare rispetto al peptide di riferimento “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” diversi contributi:

- l'effetto del ferrocene, in sostituzione della catena idrofobica;
- l'effetto degli spaziatori a parità di sequenza;
- l'effetto dell'assenza di uno spaziatore tra il ferrocene e la sequenza peptidica.

Tutti i composti sono stati analizzati all'HPLC analitico campionando nei seguenti intervalli: 0, 15, 30, 60, 120, 180, 360 minuti.

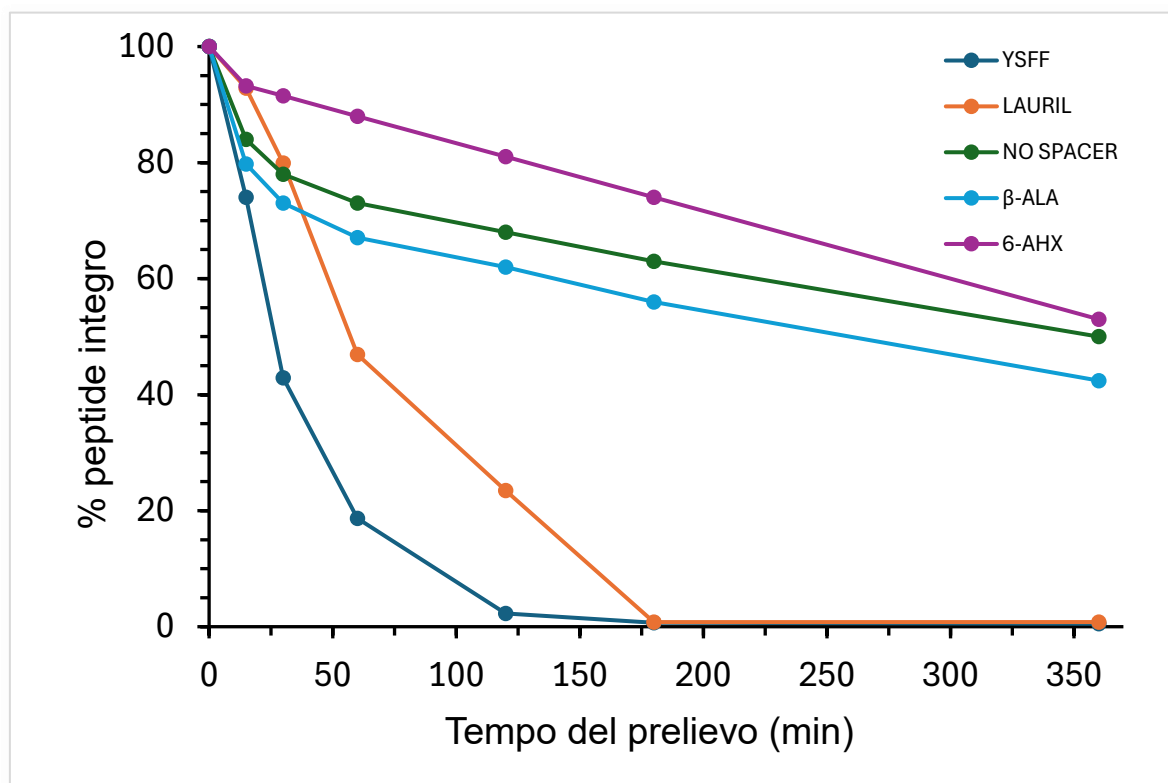


Figura 52 - risultati dei test di degradazione enzimatica dei peptidi sintetizzati.

Dai risultati evidenziabili dalla Figura 52 è possibile osservare che il peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-*i*Pr” si degrada progressivamente con andamento esponenziale, raggiungendo un minimo già dopo 180 minuti.

I coniugati ferrocene-peptide mostrano invece una maggiore stabilità alla degradazione, con una riduzione della percentuale di peptide integro molto meno marcata dopo 180 minuti. Da evidenziare come l’effetto dello spaziatore sia marginale, in quanto la percentuale di peptide presente è pressoché identica nei tre peptidi contenenti ferrocene.

L’effetto dello spaziatore sembra tuttavia avere un certo ruolo nel coniugato “Fc-6-Ahx-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-NH₂”, il più stabile alla degradazione enzimatica su campioni di siero umano.

In conclusione, l’effetto di incorporare il ferrocene, a parità di sequenza peptidica, al posto della catena di acido grasso, sembra conferire una maggiore stabilità ai peptidi nelle condizioni di esecuzione dei test.

4. - CONCLUSIONI

Questo progetto di tesi ha trattato le due metodologie sintetiche principali relative ai peptidi, ovvero LPPS e SPPS.

La sintesi in fase liquida ha permesso la sintesi del peptide “Lauril-L-His-L-Ala-D-Ala-L-His-Gly-NH-iPr”. Su fase solida invece sono stati sintetizzati i coniugati ferrocene-peptide. L’obiettivo principale raggiunto in questa tesi è stato quello di aver verificato la fattibilità del legare il ferrocene a un peptide su fase solida, approccio che in precedenza non era andato a buon fine nel gruppo di ricerca del prof. Formaggio. Infatti, nel trattamento con acido trifluoroacetico, per rimuovere il peptide dalla resina, il ferrocene veniva ossidato.

Nonostante le basse quantità finali di prodotti purificati ottenute, è stato possibile osservare i punti critici relativi a tali sintesi, ottimizzando alcuni parametri fondamentali.

Il primo parametro riguarda la miscela di *cleavage* impiegata per rimuovere il coniugato ferrocene-peptide dalla resina. L’aggiunta di fenolo, triisopropilsilano e acqua alla soluzione di acido trifluoroacetico ha preservato lo stato di ossidazione del ferrocene, come confermato dalle analisi ¹H-NMR, oltre che dal colore arancione e marrone dei coniugati.

Il secondo parametro riguarda la durata di reazione di *cleavage* del coniugato dalla resina. È stato evidenziato, tramite spettri HPLC, che non sussistono differenze riguardante i profili di eluizione tra tempi di reazione pari a 45 o 90 minuti.

La sintesi del peptide in soluzione ha richiesto tempi di sintesi maggiori, per la natura intrinseca della metodologia sintetica adottata. Oltretutto, è stata ottenuta una resa di reazione bassa a causa dell’istidina ingombrata stericamente e dei numerosi passaggi e purificazioni intermedie che la sintesi ha richiesto.

Tutti i composti sintetizzati sono stati altresì caratterizzati attraverso HPLC-MS, consentendo di determinare la massa e la purezza dei prodotti ottenuti. Dopo la fase di purificazione i composti ottenuti presentano una purezza maggiore del 90%.

Dagli spettri IR del peptide in soluzione è possibile osservare come il peptide 7 in CDCl₃ tenda a formare forti legami intermolecolari. Nello stesso solvente i peptidi precursori tendono ad assumere strutture ripiegate di tipo elicoidale, con legami N-H ··· O=C di tipo intramolecolare.

Gli spettri NMR bidimensionali sono stati registrati in DMSO-d₆ a causa della scarsa solubilità dei peptidi deprotetti in CDCl₃. In tale ambiente, in presenza cioè di un forte accettore di legami ad idrogeno, gli N-H ammidici interagiscono con il solvente. Tale evento

sta ad indicare che i peptidi sono piuttosto flessibili, non adottano cioè una struttura secondaria ben definita.

Infine, sono stati effettuati dei test di degradazione enzimatica su alcuni dei prodotti. L'introduzione del ferrocene, in sostituzione dell'acido laurico, su una determinata sequenza peptidica nota per esibire attività antimicrobica, ha comportato una maggiore resistenza alla degradazione enzimatica, mostrando una certa stabilità entro le 6 ore. In particolare, il coniugato contenente l'acido amminoesanoico come spaziatore è risultato il migliore.

In futuro, i coniugati ferrocene-peptide più interessanti verranno sottoposti a test biologici. La prosecuzione di questo progetto prevede anche la sintesi di peptidi corrispondenti contenenti D-aa, oltre che analoghi non codificati. Si ritiene che essi resisteranno ancora meglio alla degradazione enzimatica e che, sperabilmente, avranno anche maggiore attività biologica rispetto agli analoghi naturali e L-aa.

5 – BIBLIOGRAFIA

- [1]: Di Martino P. "Antimicrobial agents and microbial ecology." *AIMS Microbiol.* 8 (2022) p. 1-4
- [2]: Purssell E. "Antimicrobials." in *Understanding pharmacology in nursing practice*, Springer Cham (2020) p. 147-165
- [3]: Schmandt-Besserat D. "The evolution of writing." in *International encyclopedia of social and behavioral sciences*, Elsevier (2014) p. 1-15
- [4]: Sierra M.A., Casarrubios L., de la Torre M.C. "Bio-Organometallic Derivatives of Antibacterial Drugs." *Chem. Eur. J.* 25 (2019) p. 7232-7242
- [5]: Leekha S., Terrell C.L., Edson R.S. "General principles of antimicrobial therapy." *Mayo Clin. Proc.* 86 (2011) p. 156-167
- [6]: Ullah H., Ali S. "Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions." *Antibacterial agents*, IntechOpen (2017)
- [7]: Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. "Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians." *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 33 (2017) p. 300-305
- [8]: Li J., Koh J.J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W. "Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design." *Front. Neurosci.* 11 (2017) p. 1-18
- [9]: Naghavi M., Vollset S.E., Ikuta K.S., Swetschinski L.R., Gray A.P., Wool E. E., Dekker D.M., et. al. "Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050." *Lancet* 404 (2024) p. 1199-1226
- [10]: O'Neill J. "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations." London: Review on Antimicrobial Resistance (2016) p. 1-84
- [11]: Pulingam T., Parumasivam T., Gazzali A.M., Sulaiman A.M., Chee, J.Y., Lakshmanan M., Lakshmanan M., Chin C.F., Sudesh K. "Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome." *Eur. J. Pharm. Sci.* 170 (2022) art. n.106103
- [12]: Talapko J., Meštrović T., Juzbašić M., Tomas M., Erić S., Horvat Aleksijević L., Bekić S., Schwarz D., Matić S., Neuberg M., Škrlec I., "Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications." *Antibiotics* 11 (2022) art. n. 1417

- [13]: Ma F., Xu S., Tang Z., Li Z., Zhang L., "Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans." *Biosaf. Health* 3 (2021) p. 32-38
- [14]: Hunt D., Kates OS. "A Brief History of Antimicrobial Resistance." *AMA J Ethics.* 26 (2024) p. 408-417
- [15]: Kirchhelle C. "Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017)." *Palgrave Commun.* 4 (2018) art. n. 96
- [16]: Ding C., He J., "Effect of antibiotics in the environment on microbial populations." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) p. 925–941
- [17]: Polianciuc S.I., Gurzău A.E., Kiss B., Ștefan M.G., Loghin F. "Antibiotics in the environment: causes and consequences." *Med. Pharm Rep.* 93 (2020) p. 231-240
- [18]: Mudenda S., Chabalenge B., Daka V., Mfuno R.L., Salachi K.I., Mohamed S., Mufwambi W., Kasanga M., Matafwali S.K. "Global Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective" *Pharmacol. Pharm.* 14 (2023) p. 271-328
- [19]: Adedeji, W. A. "The treasure called antibiotics." *Ann. Ib. Postgrad. Med.* 14 (2016) p. 56-57
- [20]: Gould K. "Antibiotics: from prehistory to the present day." *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016) p. 572-575
- [21]: Bassett E.J., Keith M.S., Armelagos G.J., Martin D.L., Villanueva A.R. "Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350)." *Science.* 209 (1980) p. 1532-1534
- [22]: Aminov R.I. "A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future." *Front Microbiol.* 1 (2010) art. n. 134
- [23]: Cui L., Xin-zhuan S. "Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin." *Expert Rev Anti Infect Ther* 7 (2009) p. 999-1013
- [24]: Krungkrai J., Krungkrai S.R. "Antimalarial qinghaosu/artemisinin: The therapy worthy of a Nobel Prize." *Asian Pac J Trop Biomed* 6 (2016) p. 371-375
- [25]: Lloyd N.C., Morgan H.W., Nicholson B.K., Ronimus R.S. "The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century-old debate." *Angew Chem Int Ed Engl* 44 (2005) p. 941-944
- [26]: Watkinson-Deane A. "From dyes to D-Day: the first antibacterial drugs." *Bull R Coll Surg Engl* 106 (2024) art. n. 42

- [27]: Christensen S.B., “Drugs That Changed Society: History and Current Status of the Early Antibiotics: Salvarsan, Sulfonamides, and β -Lactams.” *Molecules* 26 (2021) art. n. 6057
- [28]: Oving A., Bhattacharyya J. “Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions.” *Biophys Rev.* 13 (2021) p. 259-272
- [29]: Fleming A. “On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*.” *Br J Exp Pathol.* 10 (1929) art. n. 226-236
- [30]: Tan S.Y., Tatsumura Y. “Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin.” *Singapore Med J.* 56 (2015) p. 366-367
- [31]: Hodgkin D.C. “The X-ray analysis of the structure of penicillin.” *Adv Sci.* 6 (1949) p. 85-89
- [32]: Oelschlaeger P. “ β -Lactamases: Sequence, Structure, Function, and Inhibition.” *Biomolecules* 11 (2021) art. n. 986
- [33]: Fischer E., Fourneau E. “Ueber einige derivate des Glykocolls. In Untersuchungen über Aminosäuren,” *Polypeptide und Proteine (1899–1906)* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg Springer Berlin (1906) p. 279-289
- [34]: Stawikowski M., Fields G.B. “Introduction to peptide synthesis.” *Curr. Protoc. Protein Sci* 69 (2012) p. 1-17
- [35]: Mitchell A.R. “Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment.” *Peptide Science* 90 (2008) p. 175-184
- [36]: Østergaard M., Mishra N.K., Jensen K.J. “The ABC of insulin: the organic chemistry of a small protein.” *Chem. Eur. J* 26 (2020) p. 8341-8357
- [37]: Zheng B., Wang X., Guo M., Tzeng C.M. “Therapeutic Peptides: Recent Advances in Discovery, Synthesis, and Clinical Translation.” *Int. J. Mol. Sci* 26 (2025) art. n. 5131
- [38]: Wang L., Wang N., Zhang W., Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R. Fu C. “Therapeutic peptides: current applications and future directions.” *Signal Transduct Target Ther* 7 (2022) art. n. 48
- [39]: Dini I, De Biasi MG, Mancusi A. “An Overview of the Potentialities of Antimicrobial Peptides Derived from Natural Sources.” *Antibiotics* 11 (2022) art. n. 1483
- [40]: Cresti L., Cappello G., Pini A. "Antimicrobial peptides towards clinical application—A long history to be concluded." *Int. J. Mol. Sci* 25 (9) (2024) art. n. 4870

- [41]: Mazurkiewicz-Pisarek A., Baran J., Ciach T. "Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use." *Int J Mol Sci.* 24 (2023) art. n. 9031
- [42]: Al Musaimi O. "FDA-Approved Antibacterials and Echinocandins. *Antibiotics.*" 14 (2025) art. n. 166
- [43]: Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol.* 11 (2020) art. n. 582779.
- [44]: Wang G. "Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides." *Methods Mol Biol.* 1268 (2015) art. n. 43-66
- [45]: Kumar P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.K. "Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo." *Biomolecules* 8 (2018) art. n. 4
- [46]: Kacprzyk L., Rydengård V., Mörgelin M., Davoudi M., Pasupuleti M., Malmsten M., Schmidtchen A. "Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions." *Biochim Biophys Acta.* 1768 (2007) p. 2667-2680
- [47]: Zhang Q. "Antimicrobial peptides: from discovery to developmental applications." *Appl Environ Microbiol.* 91 (2025) p. 1-23
- [48]: Chen C. H., Lu T.K. "Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications." *Antibiotics* 9 (2020) art. n. 24
- [49]: Duengo S., Muhajir M.I., Hidayat A.T., Musa W.J., Maharani R. "Epimerisation in peptide synthesis." *Molecules* 28 (2023) art. n. 8017
- [50]: Peggion C., Schivo A., Rotondo M., Oancea S., Popovici L.F., Călin T., Mkrtychyan A., Saghyan A., Hayriyan L., Khachatryan E., Formaggio F., Biondi B. "Synthesis and Biological Activity of Ultrashort Antimicrobial Peptides Bearing a Non-Coded Amino Acid." *J Pept Sci.* 31 (2025) art. n. 70021
- [51]: Lee S.Y., Kim, S., Kim S.S., Cha S.J., Kwon Y.K., Moon B.R., Lee B.J. "Application of decision tree for the classification of antimicrobial peptide." *Genomics Inform.* 2 (2004) p. 121-125
- [52]: Ma X., Wang Q., Ren K., Xu T., Zhang Z., Xu M., Rao Z., Zhang X. "A review of antimicrobial peptides: Structure, mechanism of action, and molecular optimization strategies." *Fermentation* 10 (2024) art. n. 540
- [53]: Talapko J., Meštrović T., Juzbašić M., Tomas M., Erić S., Horvat Aleksijević L., Bekić S., Schwarz D., Matic S., Neuberg M., et al. "Antimicrobial Peptides—Mechanisms

- of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications.” *Antibiotics* 11 (2022) art. n. 1417
- [54]: Martin V., Egelund P.H., Johansson H., Le Quement S.T., Wojcik F., Pedersen D.S. “Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective.” *RSC Adv.* 10 (2020) p. 42457-42492
- [55]: Moretta A., Scieuzo C., Petrone A.M., Salvia R., Manniello M.D., Franco A., Lucchetti D., Vassallo A., Vogel H., Sgambato A., Falabella P. “Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields.” *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11 (2021) art. n. 668632
- [56]: Moriuchi T., Ohmura S.D., Moriuchi-Kawakami T. “Chirality Induction in Bioorganometallic Conjugates.” *Inorganics* 6 (2018) art. n. 111
- [57]: Peluso P., Mamane V. “Ferrocene derivatives with planar chirality and their enantioseparation by liquid-phase techniques.” *Electrophoresis.* 44 (2023) p. 158-189
- [58]: Heinze K., Lang H. “Ferrocene-Beauty and Function” *Organometallics* 32 (2013) p. 5623–5625
- [59]: Čakić Semenčić M., Barišić L. "Ferrocene bioconjugates." *Croat. Chem. Acta* 90 (2017) p. 537-569
- [60]: Lerayer E., Radal L., Nguyen T.A., Dwadnia N., Cattey H., Amardeil R., Pirio N., Roger J., Hierso, J.C. “Highly functionalized ferrocenes.” *Eur. J. Inorg. Chem* 2020 (2020) p. 419-445
- [61]: Astruc D. “Why is Ferrocene so Exceptional?” *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) p. 6-29
- [62]: Larik F.A., Saeed A., Fattah T.A., Muqadar U., Channar P.A. “Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives.” *Appl Organometal Chem.* 31 (2017) art. n. 3664
- [63]: Metzler-Nolte N. "Medicinal applications of metal–peptide bioconjugates." *Chimia* 61 (11) (2007) p. 736-741
- [64]: Biot C., François N., Maciejewski L., Brocard J., Poulain D. “Synthesis and antifungal activity of a ferrocene–fluconazole analogue.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) p. 839-841
- [65]: Rubbiani R., Weil T., Tocci N., Mastrobuoni L., Jeger S., Moretto M., Ng J., Lin Y., Hess J., Ferrari S., Kaech A., Young L., Spencer J., Moore A.L., Cariou K., Renga G., Pariano M., Romani L., Gasser G. “In vivo active organometallic-containing antimycotic agents.” *RSC Chem Biol.* 2 (2021) p. 1263-1273

- [66]: Lin Y., Jung H., Bulman C.A., Ng J., Vinck R., O'Beirne C., Zhong S., Moser M.S., Tricoche N., Peguero R., Li R.W., Urban J.F.Jr, Le Pape P., Pagniez F., Moretto M., Weil T., Lustigman S., Cariou K., Mitreva M., Sakanari J.A., Gasser, G. "Discovery of new broad-spectrum anti-infectives for eukaryotic pathogens using bioorganometallic chemistry." *J Med Chem.* 66 (2023) p. 15867-15882
- [68]: Ornelas C., Astruc D. "Ferrocene-Based Drugs, Delivery Nanomaterials and Fenton Mechanism: State of the Art, Recent Developments and Prospects." *Pharmaceutics* 15 (2023) art. n. 2044
- [67]: de Almeida A.J.P.O., de Oliveira J.C.P.L., da Silva Pontes L.V., de Souza Júnior J.F., Gonçalves T.A.F., Dantas S.H., de Almeida Feitosa M.S., Silva, A.O., de Medeiros I.A. "ROS: basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways." *Oxid Med Cell Longev.* 2022 (2022) art. n. 1225578
- [69]: Fenton, H. J. H. "LXXIII. —Oxidation of tartaric acid in presence of iron." *J. Chem. Soc* 65 (1894) p. 899-910
- [70]: Ardila-Chantré N., Hernández-Cardona A.K., Pineda-Castañeda H.M., Estupiñan-Torres S.M., Leal-Castro A.L., Fierro-Medina R., Rivera-Monroy Z.J., García-Castañeda J.E. "Short peptides conjugated to non-peptidic motifs exhibit antibacterial activity." *RSC Adv.* 10 (2020) p. 29580-29586
- [71]: Albada B., Metzler-Nolte N. "Highly potent antibacterial organometallic peptide conjugates." *Acc. Chem. Res.* 50 (2017) p. 2510-2518
- [72]: Costa N.C., Piccoli J.P., Santos-Filho N.A., Clementino L.C., Fusco-Almeida A.M., De Annunzio S.R., Fontana C.R., Verga J.B.M., Eto S.F., Pizauro-Junior J.M., Graminha M.A.S., Cilli E.M. "Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group." *Plos one* 15 (2020) p. 228740
- [73]: Kovačević M., Čakić Semenčić M., Kodrin I., Roca S., Perica J., Mrvčić J., Brkljačić L., Barišić L. "Biological Evaluation and Conformational Preferences of Ferrocene Dipeptides with Hydrophobic Amino Acids." *Inorganics*, 11 (2023) art. n. 29
- [74]: Lal B., Badshah A., Altaf A.A., Khan N., Ullah S. "Miscellaneous applications of ferrocene-based peptides/amides." *Appl. Organometal. Chem.*, 25 (2011) 843-855
- [75]: Ghosh K., Lubell W.D. "N-to C-Peptide Synthesis, Arguably the Future for Sustainable Production." *J. Pept. Sci.* 31 (2025) art. n 70019
- [76]: Kvsrg P., Bharathi K., Haseena Banu B. "Applications of peptide coupling reagents— an update." *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* 8 (2011) p. 108-119

- [77]: Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Nilsson B., Verlander M. "Large-scale synthesis of peptides." *Peptide Science* 55 (2000) p. 227-250
- [78]: Isidro-Llobet A., Kenworthy M.N., Mukherjee S., Kopach M.E., Wegner K., Gallou F., Smith A.G., Roschangar F. "Sustainability challenges in peptide synthesis and purification: from R&D to production." *J Org Chem* 84 (2019) p. 4615-4628
- [79]: Guzmán F., Barberis S., Illanes A. "Peptide synthesis: chemical or enzymatic." *Electron. J. Biotechnol* 10 (2007) p. 279-314
- [80]: Merrifield R.B. "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide." *J. Am. Chem. Soc* 85 (1963) p. 2149-2154
- [81]: Amblard M., Fehrentz J.A., Martinez, J., Subra, Gilles, "Fundamentals of Modern Peptide Synthesis.", *Methods Mol Biol.* 298 (2005) p. 3-24
- [82]: Kent S.B. "Fundamental aspects of SPPS and green chemical peptide synthesis." *J. Pept. Sci* 31 (2025) art. n. 70013
- [83]: Li W., O'Brien-Simpson NM, Hossain M.A., Wade J.D. "The 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) group in chemical peptide synthesis—its past, present, and future." *Aust. J. Chem.* 73 (2020) p. 271-276
- [84]: Isidro-Llobet A., Alvarez M., Albericio F. "Amino acid-protecting groups." *Chem. Rev.* 109 (2009) p. 2455-2504
- [85]: Montalbetti C.A., Falque, V. "Amide bond formation and peptide coupling." *Tetrahedron* 61 (2005) p. 10827-10852
- [86]: Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides." *Anal. Biochem.* 34 (1970) p. 595-598
- [87]: Stuart B.H. "Infrared spectroscopy: fundamentals and applications." John Wiley & Sons (2004)
- [88]: Wellings D.A., Greenwood J., Zhang T., Li W., Lin F., Wade J.D. "Development of modern continuous flow solid phase peptide synthesis: chemistry, automation and sustainability impact." *Aust. J Chem.* 78 (2025) art. n. 25131
- [89]: Singh B.R. "Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins." (2000) p. 2-37
- [90]: Bellamy L.J.F.C. "The infra-red spectra of complex molecules." Springer Science & Business Media (2013)

- [91]: Formaggio F., Di Valentin M., Longo E. Sintesi e caratterizzazione e studi conformazionali di analoghi dell'antibiotico peptidico tricogina GA IV, contenenti l'amminoacido pCN-(α Me)Phe
- [92]: Elyashberg M. "Identification and structure elucidation by NMR spectroscopy." *TrAC Trends Anal. Chem.* 69 (2015) p. 88-97
- [93]: Jacobsen N.E., "NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology." John Wiley & Sons (2007) 1-38
- [94]: Gomathi L., Subramanian S. "Elucidation of secondary structures of peptides using high resolution NMR." *Curr. Sci.* (1996) p. 553-567
- [95]: Lhoste C., Lorandel B., Praud C., Marchand A., Mishra R., Dey A., Bernard A., Dumez J.N., Giraudeau P. "Ultrafast 2D NMR for the analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.*" (2022) p. 1-46
- [96]: Bross-Walch N., Kühn T., Moskau D., Zerbe O. "Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy." *Chem. Biodiversity* 2 (2005) p. 147-177
- [97]: Marion D. "An introduction to biological NMR spectroscopy." *Mol. Cell. Proteomics* 12 (2013) p. 3006-3025
- [98]: Karlslake C., Piotto M.E., Pak Y.K., Weiner H., Gorenstein D.G. "2D NMR and structural model for a mitochondrial signal peptide bound to a micelle." *Biochem.* 29 (1990) p. 9872-9878