



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

FACOLTA' DI SCIENZE MM. NN. FF

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA  
INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA

**TARGETING RECETTORIALE CON PEPTIDI PER LA  
DIAGNOSI E LA TERAPIA DEL MELANOMA**

RELATORE: PROF. STEFANO MAMMI

CORRELATORE: DOTT. PAOLO RUZZA

CONTRORELATORE: DOTT. LUCA RONCONI

LAUREANDO: MBOTCHACK YANKAM  
BRUNO MARTIAL

ANNO ACCADEMICO 2009-2010



*Ai miei genitori*



# INDICE

	<b>Pg</b>
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	
CODICI DI ABBREVIAZIONE PER AMMINOACIDI	
PROTEOGENICI	
1	INTRODUZIONE 1
1.1	Origine del tumore 2
1.2	Distinzione tra tumori benigni e tumori maligni 3
1.3	Il melanoma 4
1.4	Recettori peptidici 6
1.4.1	Le integrine 7
1.4.2	Struttura delle integrine 8
1.4.3	Peptidi ciclici contenenti la sequenza “RGD”: Ligandi specifici dell'integrina $\alpha V\beta 3$ 10
1.5	Recettori della melanocortina 13
1.6	Multi-targeting tumorale 16
2	SCOPO DELLA TESI 21
3	METODOLOGIE 23
3.1	Sintesi peptidica 23
3.2	Sintesi peptidica su fase solida 24
3.3	Protezione della funzione $\alpha$ -amminica 27
3.4	Protezione dei gruppi funzionali in catena laterale 31

	Rimozione del gruppo ivDde	32
	Rimozione dei gruppi allyl e alloc	33
3.5	Attivazione del gruppo carbossilico con TBTU e coupling	33
3.6	Attivazione del gruppo carbossilico con pentafluorofenolo	35
3.7	Ciclizzazione	36
4	<b>MATERIALI E METODI</b>	37
4.1	Reagenti e solventi	37
4.2	Sintesi su fase solida	37
4.3	Purificazione e caratterizzazione dei peptidi sintetizzati	38
5	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	41
5.1	Sintesi del peptide PEP1	41
5.2	Sintesi del peptide PEP2	43
5.3	Sintesi del peptide PEP3	44
5.4	Sintesi del peptide PEP4	45
5.5	Sintesi del peptide PEP5	48
5.6	Sintesi del peptide PEP6	50
5.7	Sintesi del peptide PEP7	53
5.8	Sintesi di PEP2-2-7	54
5.9	Formazione di complessi metallici con PEP5	55
5.10	Studi di citotossicità e di adesione cellulare della vitronectina in presenza di 7-(4-nitrofenil)carbonato-paclitaxel	56
5.11	Studi di binding su cellule B16 del melanoma murino in presenza di avidina	58
6	<b>CONCLUSIONI</b>	60



## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

<b>AA</b>	<b>Aminoacido</b>
<b>Boc</b>	<b><i>tert</i>-butilossicarbonile</b>
<b>DCM</b>	<b>Diclorometano</b>
<b>DIEA</b>	<b>Diisopropiletilammina</b>
<b>DMF</b>	<b>N,N-dimetilformammide</b>
<b>Eda</b>	<b>Etilendiammina</b>
<b>ESI-MS</b>	<b>ElectroSpray Ionization Mass Spectroscopy</b>
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	<b>Etere etilico</b>
<b>EtOH</b>	<b>Etanolo</b>
<b>Fmoc</b>	<b>9-fluorenilmetossicarbonile</b>
<b>HCl</b>	<b>Acido cloridrico</b>
<b>HOBt</b>	<b>N-idrossibenzotriazolo</b>
<b>ivDde</b>	<b>1-(4,4-dimetil-2,6-diossiccicloesilidene)3-metil- butil</b>
<b>NMP</b>	<b>N-metilpirrolidone</b>
<b>Pbf</b>	<b>2,2,4,5,7-Pentametilbenzofuril-6-solfonile</b>
<b>PET</b>	<b>Tomografia a emissione di positroni</b>
<b>Pfp</b>	<b>Pentafluorofenolo</b>
<b>PhSiH<sub>3</sub></b>	<b>Fenilsilano</b>
<b>Ptx</b>	<b>Paclitaxel</b>
<b>RP-HPLC</b>	<b>Reversed Phase - High Performed Liquid Chromatography</b>
<b>Suc</b>	<b>Anidride succinica</b>



<b>TBTU</b>	<b>2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-tetrafluoroborato</b>
<b>TFA</b>	<b>Acido trifluoroacetico</b>
<b>TIPS</b>	<b>Triisopropilsilano</b>
<b>t<sub>r</sub></b>	<b>Tempo di ritenzione</b>

**CODICI DI ABBREVIAZIONE PER GLI AMMINOACIDI  
PROTEINOGENICI\***

<b>Nome</b>	<b>Codice a tre lettere</b>	<b>Codice ad una lettera</b>
Acido aspartico	Asp	D
Acido glutammico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteina	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Isoleucina	Ile	I
Istidina	His	H
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

\*[IUPAC-IUB Commission, *Eur. J. Biochem.*, 1994, **138**, 9-37]

# 1. INTRODUZIONE

I tumori rappresentano attualmente, dopo gli infarti cardiaci, una delle maggiori cause di mortalità<sup>1</sup>. Per questo motivo, la cura delle neoplasie maligne è diventata oggi una priorità nel settore sanitario ed è oggetto di molti progetti di ricerca. I trattamenti convenzionali con farmaci citotossici non hanno selettività per le cellule tumorali<sup>2</sup>, con conseguenti effetti collaterali. Per superare questo problema, la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di sistemi molecolari in grado di indirizzare il farmaco preferenzialmente verso il bersaglio<sup>3</sup>.

Il *tumore* è una malattia caratterizzata dalla proliferazione anomala delle cellule in un tessuto o organo<sup>4</sup>, con il potere di invasione locale e la capacità di metastatizzare in regioni lontane dalla lesione primitiva. I ricercatori sono oggi di fronte ad una doppia sfida: la diagnosi precoce dei tumori e lo sviluppo di nuove terapie mirate<sup>5</sup>. Nel campo diagnostico, la sfida consiste nello sviluppo di sistemi molecolari capaci di rilevare le fasi iniziali dello sviluppo del tumore, che permetteranno l'identificazione delle lesioni tumorali anche nelle fasi in cui i trattamenti clinici, chirurgici, e chemio terapeutici hanno maggior efficacia. Nel campo terapeutico, la sfida consiste nello sviluppo di farmaci antitumorali mirati in grado di migliorare l'efficacia terapeutica e la tolleranza<sup>6</sup>.

I tumori, nonostante il meccanismo generale<sup>7</sup> di origine sia unico, possono manifestare una gamma molto vasta di evoluzioni e sintomatologie. In tutti però è costante un aumento del numero di cellule cancerose, dovuto alla maggiore velocità di riproduzione cellulare, per cui un maggior numero di cellule tumorali si moltiplica ed un minor numero di esse muore, mentre quelle che sopravvivono continuano a moltiplicarsi. La crescita di un tumore segue una legge geometrica:

la prima fase è lenta a causa del basso numero di cellule in divisione, ma la seconda fase è la fase di crescita più veloce per l'acquisizione del massimo volume del tumore, ed accelera all'aumentare della massa del tumore.

## **1.1 ORIGINE DEL TUMORE**

Il tumore è causato dalla proliferazione incontrollata di cellule in grado di sfuggire alla morte cellulare programmata, che porta alla formazione di una popolazione di cellule anomale che possono distribuirsi in diverse aree del corpo umano. Durante lo sviluppo di un tumore, ci sono tre fasi principali ed indipendenti<sup>8</sup>: l'iniziazione, la promozione e la progressione.

L'iniziazione è la fase in cui la cellula acquisisce una anomalia genetica definitiva. Tra gli agenti di iniziazione ci sono i virus, le sostanze chimiche, e le radiazioni. Una cellula "iniziata" non ha già l'autonomia di crescita, ma trasmette ai suoi discendenti la mutazione genetica irreversibile proveniente dall'iniziazione. I danni creati all'interno di una cellula "iniziata" possono non essere rilevati se altri eventi genetici non si verificano per stimolare la progressione tumorale. In questo stadio le cellule in proliferazione conservano le caratteristiche di specificità dei tessuti dai quali provengono.

La fase successiva è la promozione del tumore. Esso corrisponde alla proliferazione clonale delle cellule "iniziate", che conduce agli ammassi di cellule o di tumori benigni, in seguito alla stimolazione da parte dei promotori. L'ultima fase è la progressione del tumore, e deriva da una o più mutazioni ulteriori che convertono i tumori benigni in tumori maligni. Le cellule tumorali diventano così capaci di invadere i tessuti circostanti e di stabilire metastasi in organi distanti dal

tumore primario. Questa ultima fase di evoluzione è spesso chiamata *fase invasiva*.

Le alterazioni genetiche responsabili dello sviluppo del tumore colpiscono soprattutto i geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nei fenomeni di adesione cellulare, e nel processo di riparazione dei danni del DNA. La cellula tumorale acquisisce allora alcune proprietà che le conferiscono la sua malignità<sup>9</sup>.

## **1.2 DISTINZIONE TRA TUMORI BENIGNI E TUMORI MALIGNI**

I tumori si suddividono in due classi: i tumori *benigni* e i tumori *maligni*.

I tumori benigni derivano dalla moltiplicazione eccessiva di cellule che mantengono in parte le loro funzioni, e la cui evoluzione non dà metastasi. La loro espansione porta ad un tumore limitato rispetto al tessuto sano, a volte con formazione di una capsula che può essere asportata mediante un'operazione chirurgica. Hanno dimensioni variabili, da qualche millimetro a molti centimetri.

Di solito, la loro presenza non provoca la morte del paziente. Però, sono comunque pericolosi. Infatti, possono causare fenomeni di compressione con gravi conseguenze. I tumori benigni crescono lentamente con un ritmo regolato.

Ci sono dei casi in cui possono smettere di crescere ed anche calare in dimensioni.

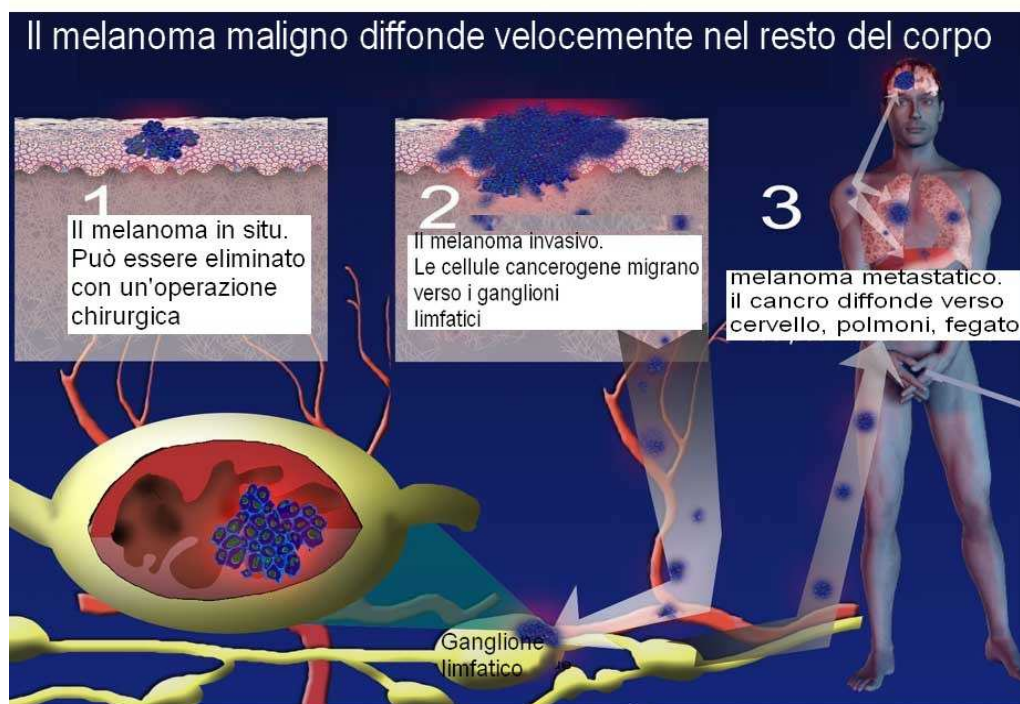
Il blocco della crescita è dovuto a fenomeni come una dipendenza ormonale, o ad una compressione vascolare. Un'altra caratteristica dei tumori benigni è il fatto che molto spesso non presentano recidive dopo eliminazione chirurgica.

I tumori maligni sono causati da una proliferazione cellulare autonoma in grado di dare origine a metastasi. Non hanno un'espansione limitata, invadono gli organi di

origine e a volte anche gli organi vicini. Le dimensioni possono andare da qualche millimetro a molti centimetri. Sono letali soprattutto per invasione diretta dei tessuti d'origine e di quelli circostanti e per formazione di metastasi in regioni distanti dal sito d'origine del tumore. Infatti non sono incapsulati e sono in grado di invadere la matrice extracellulare<sup>10</sup>.

### 1.3 IL MELANOMA

Il melanoma è un tumore maligno sviluppato a partire dai melanociti<sup>11</sup>.



**Figura 1: Il melanoma e la sua diffusione**

I melanociti sono cellule responsabili della colorazione della pelle umana. Sono localizzati nel derma, negli occhi, ed in altre parti dell'organismo. Quando la pelle

viene esposta a radiazioni UV, i cheratinociti producono la cheratina che è responsabile della proliferazione e della funzionalità dei melanociti.

La trasformazione dei melanociti in melanoma avviene in diverse fasi<sup>12</sup>: Le prime fasi, considerate benigne, vanno dalla formazione di un nevo fino allo stadio di crescita radiale. Nei nevi, i melanociti si raggruppano e perdono ogni contatto con i cheratinociti. Ci possono essere gruppi di cellule neoplastiche al di sotto della membrana basale. Le fasi successive portano allo stadio di crescita verticale, fase in cui i melanociti crescono attivamente in modo verticale e si inseriscono profondamente nel derma. Nell'ultima fase, i melanociti invadono completamente il derma, con rischio di metastasi a causa della maggiore circolazione sanguigna presente negli strati più profondi del derma.

Il melanoma, come tutti i tumori<sup>13</sup>, è una malattia a base genetica eterogenea che si sviluppa<sup>14</sup> quando nei melanociti si accumulano alterazioni genetiche a carico di geni coinvolti nella regolazione della crescita cellulare<sup>15</sup>, nella produzione di fattori di crescita autocrini (quelle molecole prodotte dalla cellula che stimolano la crescita e la proliferazione della cellula stessa) e di proteasi coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare, nei meccanismi di adesione cellulare.

Gli studi di citogenetica e di biologia molecolare hanno permesso di identificare una complessa serie di alterazioni cromosomiche, generalmente riarrangiamento o delezione, presenti in cellule di melanoma primitivo e metastatico<sup>16</sup>, particolarmente a carico di diversi cromosomi che codificano per oncogeni e fattori di regolazione del ciclo cellulare<sup>17</sup>.

## 1.4 RECETTORI PEPTIDICI

La comunicazione tra le cellule di un tessuto o di un organismo avviene per lo più attraverso la produzione e liberazione di molecole, capaci di diffondere dal sito di produzione e di legare in modo specifico componenti della cellula ricevente chiamati recettori<sup>18</sup>. Tra le diverse classi di recettori presenti nell'organismo, una classe importante è quella che è costituita dai recettori in grado di legare peptidi<sup>19</sup>. Nell'ultimo decennio, questi recettori sono stati impiegati con successo per il targeting di diverse forme tumorali.

Le basi molecolari che dimostrano tale utilizzo poggiano sull'osservazione *in vitro* della maggiore espressione di alcuni di questi recettori peptidici in specifici tumori, anche se è necessario tener presente l'enorme variabilità *in vivo* che può non riflettere lo stato dei recettori evidenziati in questo studio.

L'impatto clinico dell'indagine recettoriale è sia a livello diagnostico, perché *in vivo* l'analisi scintigrafica con peptidi radiomarcanti permette di localizzare i tumori e le loro metastasi, sia a livello terapeutico, dove la radioterapia principalmente, ma anche la chemioterapia, sono notevolmente potenziate con diminuzione degli effetti indesiderati. È quindi necessario valutare la presenza recettoriale non solo nel tessuto tumorale preso in esame, ma anche nel tessuto sano e in particolare in quello adiacente alla neoplasia.

Oggetto di studio di questo lavoro di tesi sono due tipi di recettori peptidici: le integrine, in particolare l'integrina  $\alpha V\beta 3$ , ed il recettore MC1R della melanocortina.



### 1.4.1 LE INTEGRINE

Le integrine<sup>20</sup> sono una famiglia importante di recettori cellulari responsabili delle interazioni cellule-cellule, e cellule-matrice extracellulare.

Le integrine<sup>21</sup> sono proteine transmembrana presenti su ogni tipo di cellule animali; sembrano essere i principali recettori mediante i quali le cellule aderiscono alla matrice extracellulare e sono in grado di mediare importanti eventi di adesione cellula-cellula<sup>22</sup>. Inoltre è stata dimostrata la loro capacità di trasdurre, selettivamente e in maniera modulabile, segnali all'interno e all'esterno della cellula in un'ampia varietà di tipi cellulari, anche in sinergismo con altri sistemi recettoriali. Le integrine sono quindi versatili molecole che giocano un ruolo chiave in vari processi cellulari<sup>23</sup>, sia durante lo sviluppo sia nell'organismo adulto: adesione e migrazione cellulare, crescita e divisione cellulare, sopravvivenza, apoptosi<sup>24</sup> e differenziazione cellulare, sostegno al sistema immunitario, ecc.

Le integrine<sup>25</sup> si possono suddividere in quattro gruppi:

**$\beta$ 1:** legano le cellule a diversi tipi di molecole della matrice extracellulare;

**$\beta$ 2 e  $\beta$ 7:** si trovano nei leucociti e mediano interazioni tra molecole di adesione intracellulare;

**$\alpha$ V:** sono presenti in varie cellule non tumorali, cellule epiteliali, cellule endoteliali, e anche in differenti forme tumorali<sup>26</sup>;

**$\beta$ 3:** sembrano essere associate a caratteristiche istopatologiche delle cellule e sono coinvolte nel melanoma.

I principali ligandi delle integrine sono i vari tipi di collagene e le glicoproteine della matrice stromale, nonché proteine solubili come il fibrinogeno, e alcune

proteine di membrana. Sono molecole che possiedono una sequenza amminoacidica contenente il sito di riconoscimento per le integrine. Singole integrine<sup>27</sup> possono interagire con diversi ligandi e allo stesso modo un dato ligando può presentare siti di riconoscimento per varie integrine. L'affinità di legame per i propri ligandi è relativamente bassa, ma la loro concentrazione sulla membrana plasmatica è superiore rispetto ad esempio ai recettori di ormoni e di fattori di crescita<sup>28</sup>.

### 1.4.2 STRUTTURA DELLE INTEGRINE

Le integrine sono un gruppo di recettori contenenti due catene distinte, denominate subunità  $\alpha$  e  $\beta$ .

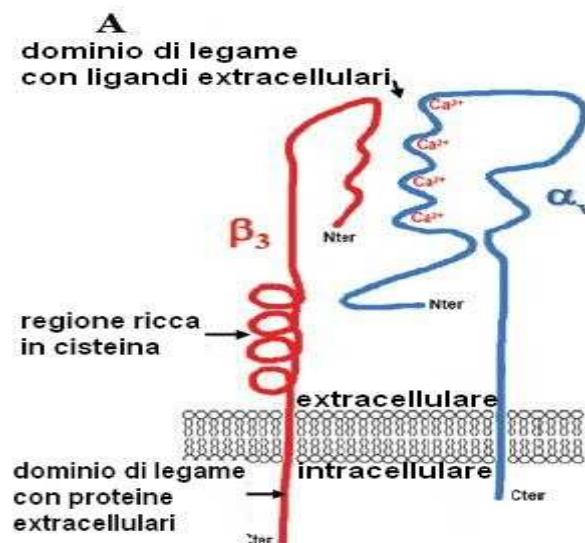
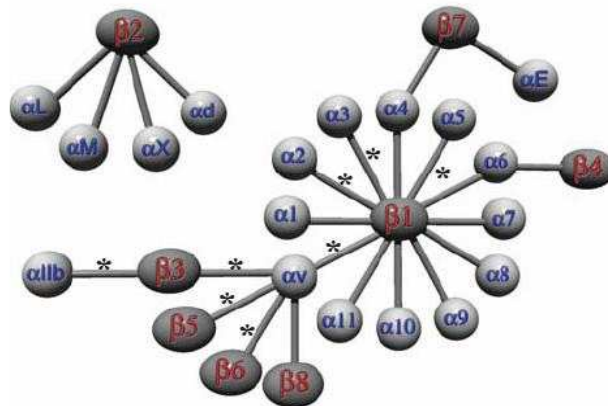


Figura 2:Struttura delle integrine

Le integrine possiedono un esteso dominio extracellulare, una corta elica transmembrana e 2 code di lunghezza variabile, una per ciascuna subunità, dal lato carbossi-terminale citoplasmatico.

Finora sono state individuate circa 18 subunità  $\alpha$  ed 8 subunità  $\beta$  che formano non più di 24 distinti eterodimeri, secondo lo schema descritto in figura 3.



**Figura 3: I 18 membri della subunità  $\alpha$  e 8 della subunità  $\beta$  delle integrine**

Le integrine si legano ai ligandi extracellulari mediante i domini N-terminali delle loro subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Queste interazioni integrine-ligandi sono regolate essenzialmente da alcuni fattori come la presenza sul ligando di sequenze riconosciute da un certo tipo di integrina, la formazione di complessi con i cationi bivalenti ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), la transizione verso una conformazione attiva dell'integrina. Ciascuna cellula può comunque variare le sue proprietà adesive attraverso l'espressione selettiva di differenti integrine, modulando l'affinità delle integrine per il ligando, ed anche la specificità, attraverso il processo di attivazione e di deattivazione dell'integrina stessa. La transizione dallo stato di riposo allo stato attivo avviene dopo una modificazione della conformazione nel dominio extracellulare del recettore. Nello stato inattivo, le integrine sono caratterizzate da una bassa affinità per il ligando. Nello stato attivo, il recettore, dalla forma ripiegata con la testa rivolta verso la membrana ed inaccessibile al

ligando, prende una forma lineare ed estesa che permette di aumentare notevolmente l'affinità per il ligando.

### 1.4.3 PEPTIDI CICLICI CONTENENTI LA SEQUENZA “RGD”: LIGANDI SPECIFICI DELL’INTEGRINA $\alpha V\beta 3$

Le differenti integrine sono presenti in tutto l’organismo nei vari tessuti ma, in alcuni casi specifici, si è dimostrato che un particolare tipo di integrina è sovra-espresso sulla superficie di particolari cellule. Sono un esempio di questo fenomeno le integrine di tipo  $\alpha V\beta 3$  che sono sovra-esprese in diverse cellule tumorali<sup>29</sup> tra cui il melanoma maligno. Il legame che si stabilisce tra la sequenza RGD<sup>30</sup> e l’integrina  $\alpha V\beta 3$  è stato studiato per la prima volta usando il pentapeptide ciclico<sup>31</sup> [c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-[NMe]-Val)], chiamato Cilengitide.

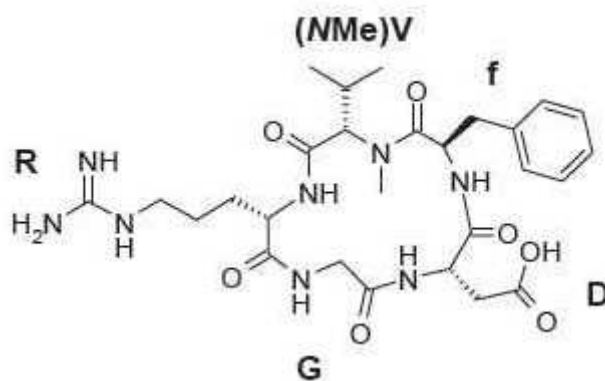
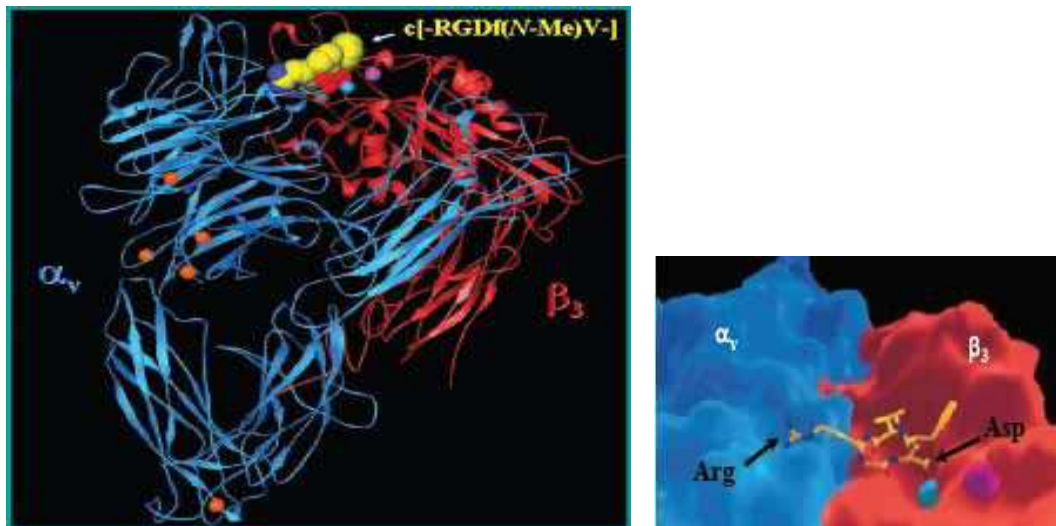


Figura 4: struttura della Cilengitide

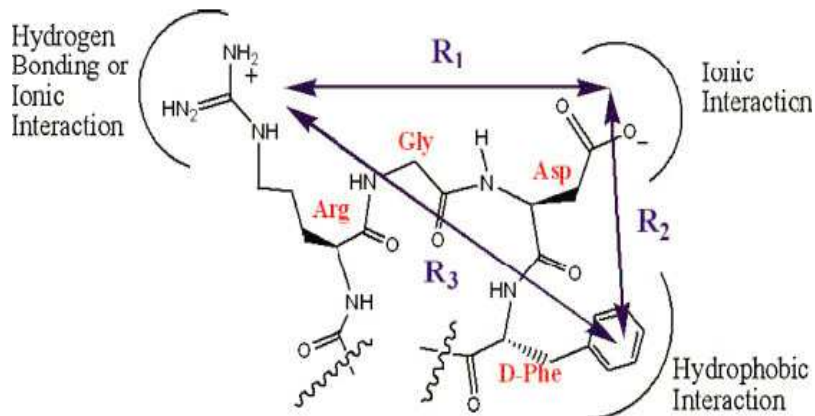
Il peptide si inserisce in una fessura tra le due subunità  $\alpha V$  e  $\beta 3$  e stabilisce dei legami con le due subunità. Il residuo Arg è orientato verso la catena  $\alpha V$  e stabilisce dei ponti salini con due residui Asp dell’integrina. Il residuo Asp del ligando si orienta verso la catena  $\beta 3$  ed è coinvolto nelle interazioni polari come ad esempio la coordinazione di un catione bivalente e la formazione di legami

idrogeno con l'integrina. Il residuo Gly, all'interfaccia tra le due subunità, forma essenzialmente legami idrofobici con la subunità  $\beta_3$ . Gli altri due residui della struttura del ligando, D-Phe e [NMe]-Val, non instaurano nessun contatto con il recettore.



**Figura 5: Rappresentazione della struttura del dominio extracellulare dell'integrina  $\alpha_V\beta_3$  associata al ligando c[-RGDf(N-Me)V-] in presenza di  $M^{2+}$ .**

Il modello generale di riconoscimento del peptide RGD da parte delle integrine è stato proposto da Marinelli. Secondo Marinelli, l'integrina riconosce il motivo RGD attraverso una triplice relazione<sup>32</sup> che coinvolge il gruppo guanidinico del residuo di Arg, l'acido carbossilico del residuo di Asp e l'anello benzenico del residuo di Phe: secondo tale schema le distanze R1, R2, R3, tra i tre siti di legame determinano la selettività del peptide RGD verso una particolare integrina<sup>33</sup> così come la restrizione imposta dalla ciclizzazione della sequenza RGD.



**Figura 6: Meccanismo di binding per RGD proposto da Marinelli**

La subunità  $\alpha V$  è presente anche nelle cellule sane e nel melanoma primario, mentre l'espressione della subunità  $\beta 3$  è ristretta esclusivamente alla forma invasiva e metastatica del melanoma. Questo suggerisce che la subunità  $\alpha V$  possa associarsi ad altre subunità  $\beta$  nei nevi e nei melanociti normali, mentre è solo l'associazione con la subunità  $\beta 3$  che permette alle cellule di muoversi più liberamente nella matrice extracellulare durante l'invasione tumorale<sup>34</sup> e di legarsi più facilmente alle cellule endoteliali dei vasi sanguigni durante il processo metastatico. Inoltre l' $\alpha V\beta 3$  è sovra-espressa nelle cellule endoteliali durante l'angiogenesi, processo essenziale per la proliferazione e la metastasi tumorale, senza il quale le cellule cancerose andrebbero incontro ad apoptosi per mancanza di ossigeno e nutrienti. Si può quindi dedurre che il complesso  $\alpha V\beta 3$  è, oltre che un marker della trasformazione maligna dei melanociti, soprattutto un potenziale target<sup>35</sup> nella terapia antineoplastica.

## 1.5 RECETTORI DELLA MELANOCORTINA

La melanocortina è implicata nella regolazione di diverse funzioni fisiologiche tra cui obesità, infiammazione, funzione sessuale, pigmentazione della pelle e sintesi steroidea.

Il sistema metabolico di tale ormone coinvolto nel controllo dell'omeostasi energetica, consiste di agonisti, antagonisti, recettori e proteine ausiliarie endogene che ne regolano le funzioni fisiologiche. Gli agonisti del recettore della melanocortina,  $\alpha, \beta, \gamma$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha, \beta, \gamma$ -MSH) e adrenocorticotropina (ACTH) sono derivati dal gene per la trascrizione della pro-opiomelanocortina. La sequenza  $\alpha$ -MSH è costituita dai residui amminoacidici 1-13 della molecola di ACTH formata da trentanove amminoacidi mentre il  $\beta$ -MSH è costituito dai 17 residui amminoacidici dell'estremità C-terminale della  $\gamma$ -LPH, e contiene una sequenza di 7 amminoacidi identica ai residui amminoacidici 4-10 dell' $\alpha$ -MSH e dell'ACTH.

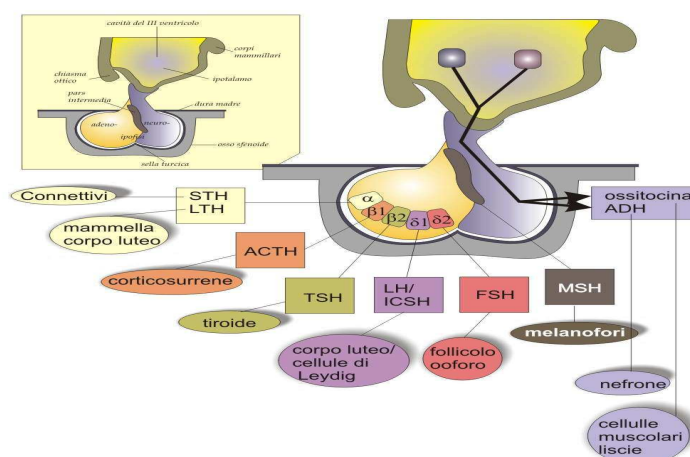


Figura 7: Sito di produzione degli ormoni corticotropi

$\alpha$ -MSH:	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val
$\beta$ -MSH (human):	Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
$\beta$ -MSH (porcine):	Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
$\gamma$ -MSH:	Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly

**Tabella 3: Struttura primaria di  $\alpha,\beta,\gamma$ -melanocyte stimulating hormone**

Ci sono 5 sottotipi di recettori delle melanocortine (MC1R-MC5R): l'MC1R è espresso nei melanociti ed interviene nella pigmentazione della pelle e dei capelli; l'MC2R interagisce con l'ACTH a livello surrenale. L'MC3R e l'MC4R sono espressi nel cervello. Quest'ultimo gioca un ruolo importante nel meccanismo dell'obesità. I suoi agonisti abbassano l'appetito mentre i suoi antagonisti lo fanno aumentare. Il recettore MC5R modula l'aggressività, interagendo sulle funzioni sessuali.

Il recettore MC1R è il principale regolatore positivo della melanogenesi e con i regolatori negativi (le proteine agouti) controlla l'intensità della melanogenesi ed il tipo di melanina sintetizzata. Non stupisce dunque che variazioni significative nel colore della pelle umana siano correlate a mutazioni del gene MC1R. Il gene umano MC1R è altamente polimorfico ed alcune varianti alleliche del gene sono associate al fenotipo capelli rossi, al melanoma e ad altre neoplasie cutanee.



Il recettore MC1R mostra un'estesa espressione cutanea e influenza allo stesso modo del sistema immunitario il comportamento di melanociti e cheratinociti. Il recettore MC1R mutato svolge una diversa attività che rappresenta uno dei fattori eziologici che aumentano l'incidenza del melanoma e di altri tipi di tumore cutaneo.

Per identificare il ruolo fisiopatologico dei recettori della melanocortina MCR nei differenti tessuti, sono stati impiegati peptidi nativi e sintetici usati come agonisti o inibitori. Radioconiugati di peptidi ciclici analoghi  $\alpha$ -MSH sono stati studiati come agenti selettivi per la diagnosi precoce del melanoma attraverso la tecnica PET (positron-emission tomography) imaging e come potenziali agenti terapeutici.

Gli agonisti del recettore MC1R che nella loro struttura contengono la sequenza -***His-D-Phe-Arg-Trp***- sono internalizzati nelle cellule del melanoma dopo legame al recettore.

Tra gli anni '70 e '80 varie ricerche focalizzate sullo sviluppo di analoghi di  $\alpha$ -MSH lineari marcati con il trizio ( $^3\text{H}$ ) hanno dimostrato scarsa specificità d'azione rendendo il targeting tumorale in vivo totalmente inefficiente. Attualmente l'analogo lineare più studiato è marcato con iodio ( $^{125}\text{I}$ ) e rappresenta un ottimo standard per l'elevata affinità di legame al recettore anche in concentrazioni nanomolari.

I radiopeptidi ciclici analoghi all' $\alpha$ -MSH rappresentano un'altra classe di peptidi con un'elevata selettività verso le cellule del melanoma: la ciclizzazione migliora la stabilità e l'affinità di legame *in vivo*, aumenta la potenza agonista e antagonista, impedisce la degradazione proteolitica. I peptidi ciclici sono dotati di

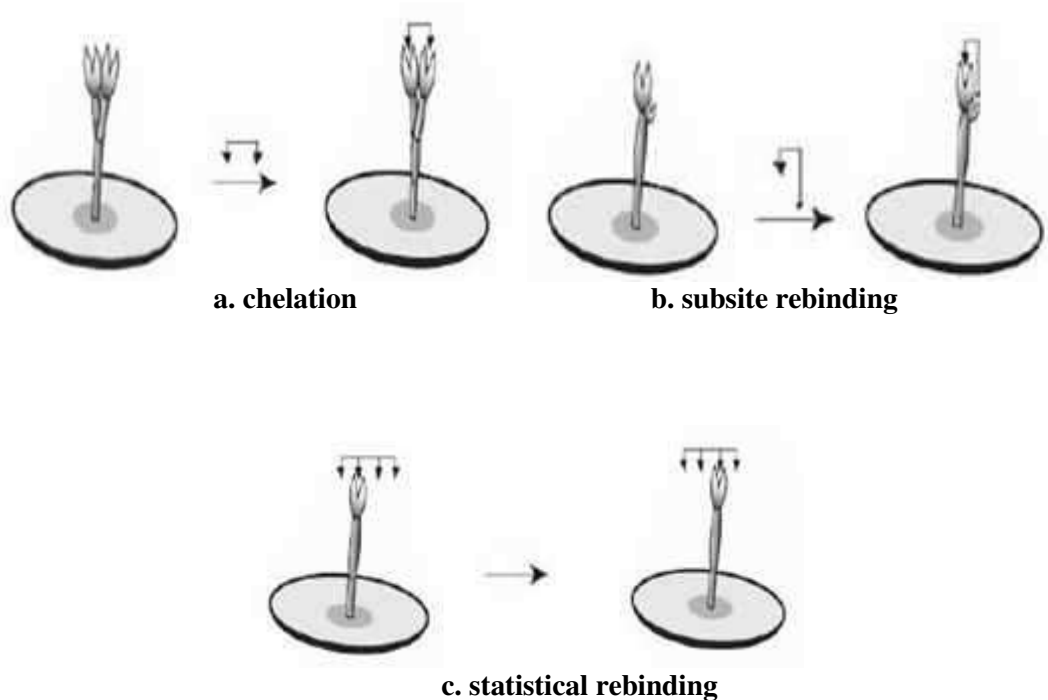
una minore libertà conformazionale rispetto ai peptidi lineari a causa della stabilizzazione della struttura secondaria che rende più facile l'accesso al sito di legame del recettore e ne migliora l'affinità. Essi incorporano metalli radioattivi e non radioattivi nella loro struttura mantenendo elevata affinità per i recettori MC1R.

## **1.6 MULTI-TARGETING TUMORALE**

In questi ultimi anni c'è la necessità di approcci innovativi per lo sviluppo di sistemi sicuri ed efficaci per il multi-targeting<sup>36</sup>. La strategia si basa sull'idea di sviluppare composti che colpiscano molteplici recettori contemporaneamente<sup>37</sup>. Questi composti multifunzionali sono progettati al fine di sfruttare interazioni tra vari target terapeutici e, per questa ragione, per essere più efficaci dal punto di vista terapeutico e più resistenti ai meccanismi compensativi.

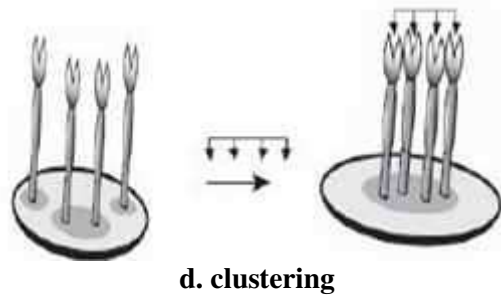
Alcuni sistemi biologici instaurano interazioni multiple, come ad esempio durante l'adesione sui siti di infiammazione nella coagulazione. Queste interazioni multiple sono responsabili di tutte quelle risposte biologiche specifiche, diverse dalle risposte indotte da un contatto unico. Nel caso del targeting di un recettore, i sistemi di presentazione multivalente dei ligandi permettono di aumentare l'efficienza del targeting. Inoltre, è stata osservata una modulazione della risposta fisiologica indotta per il recettore in funzione della multivalenza del ligando (intensità e natura della risposta). Ad esempio, una presentazione multivalente di ligandi può indurre un fenomeno di endocitosi del complesso ligando/recettore non osservato nel caso del ligando monovalente<sup>38</sup>. Esistono molti meccanismi

possibili che possono darci un'idea dell'effetto della multivalenza in un fenomeno di targeting ligando-recettore<sup>39</sup>:



L'effetto "*chelation*" e l'effetto "*subsite binding*" risultano dai contatti multipli tra il ligando multivalente e un recettore che ha molti siti di legame. L'effetto "*statistical rebinding*" corrisponde alla facilità che ha un ligando multivalente a legarsi di nuovo sullo stesso recettore grazie alla concentrazione locale elevata in ligandi a prossimità del recettore. Questi 3 tipi di associazione ligando-recettore permettono una diminuzione della dissociazione del sistema ligando-recettore e aumentano l'affinità apparente del ligando multivalente per il suo recettore. In modo indiretto, l'aumento dell'affinità del ligando per il suo recettore può essere all'origine di una endocitosi del complesso recettore-ligando.

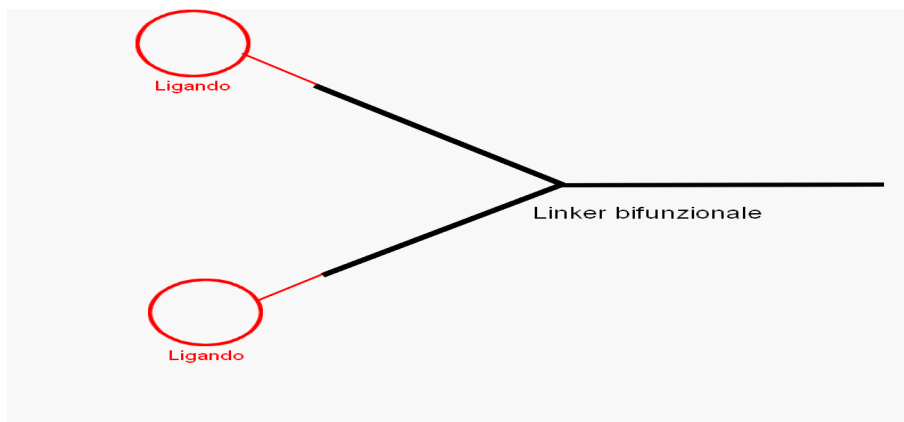
L'effetto "clustering" corrisponde a una modifica della vicinanza e dell'orientazione di molti recettori provocata dal loro legame al ligando multivalente.



Anche questo fenomeno può provocare l'endocitosi del sistema recettore-ligando.

La multivalenza nel targeting tumorale può essere:

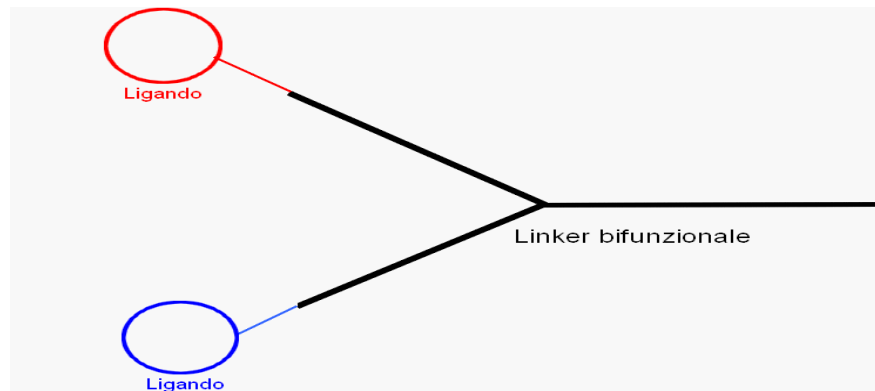
A. Omo-multivalente:



**Figura 8: Sistema per il targeting omo-bivalente**

In questo caso due o molte coppie di ligandi uguali vengono coniugati al supporto.

B. Etero-multivalente:



**Figura 9: sistema per il targeting etero-bivalente**

In questo caso due o molte coppie di ligandi diversi vengono coniugate al supporto.



## 2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la sintesi di peptidi in grado di legare recettori espressi o over-espressi sulle cellule del melanoma maligno, a cui associare un radionuclide o un farmaco per realizzare il direccionamento sito-specifico.

Al fine di aumentare la selettività del targeting nei confronti delle cellule tumorali, si svilupperanno dei sistemi di multi-targeting contenenti sequenze peptidiche in grado di interagire con i recettori dell'integrina  $\alpha V\beta 3$  e MC1R, entrambi over-espressi nel melanoma maligno.

Sarà quindi importante lo studio delle proprietà strutturali del linker a cui legare i diversi peptidi in grado di riconoscere i due recettori selezionati. Ad esempio, un linker rigido può facilmente direccionare i ligandi verso i rispettivi recettori con una piccola spesa entropica. Però, un'elevata rigidità impedisce gli spostamenti del ligando verso il recettore diminuendo l'efficienza del binding tra recettore e ligando.

Gli isotopi radioattivi dei metalli di transizione offrono molte opportunità nello sviluppo dei radiopeptidi, e tra di essi il  $^{99m}\text{Tc}$  gioca un ruolo importante in ambito diagnostico, mentre la sua sostituzione con il  $^{188}\text{Re}$  permette di ottenere dei radiopeptidi da utilizzare in ambito terapeutico.

Sempre in ambito terapeutico, l'utilizzo di peptidi in grado di legarsi ai recettori permette il direccionamento dei classici farmaci antitumorali o di molecole molto citotossiche quali le tossine di origine vegetale o batterica (ricina A, botulino),

riducendo notevolmente gli effetti secondari (farmaci antitumorali) o annullando la tossicità intrinseca delle molecole (tossine).

Nome	Sequenza
PEP1	c[D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(Wang-R)]
PEP2	c[D-Phe-Lys(Suc-Pfp)-Arg-Gly-Asp]
PEP3	Pfp-Suc-Ahx-βAla-Nle-Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-NH <sub>2</sub>
PEP4	H-Cys-Ahx-βAla-c[Lys-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Glu]-Arg-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
PEP5	H-Cys-Ahx-βAla-Nle-Asp-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH <sub>2</sub>
PEP6	c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)   Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-CO-OPtx
PEP7	Fmoc-Gly-Gly-(Pro-Gly) <sub>3</sub> \ Dap-Ahx-Gly-Cys(Trt)-Wang Resin / Boc-Gly-Gly-(Pro-Gly) <sub>3</sub>
PEP2-2-7	PEP2-Gly-Gly-(Pro-Gly) <sub>3</sub> \ Dap-Ahx-Gly-Cys(Trt)-Wang Resin / PEP2-Gly-Gly-(Pro-Gly) <sub>3</sub>

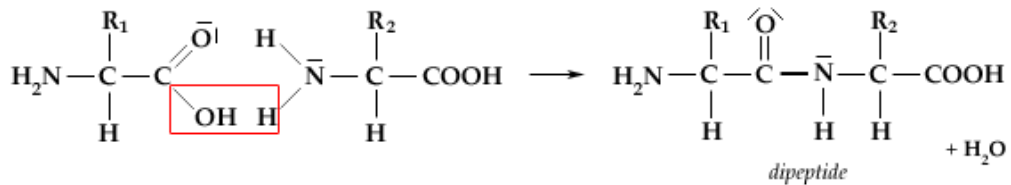
**Tabella 4 : Sequenze peptidiche**



### 3. METODOLOGIE

#### 3.1 SINTESI PEPTIDICA

I Peptidi sono costituiti da amminoacidi condensati fra loro attraverso un legame peptidico<sup>40</sup>, o legame ammidico, che si instaura tra il gruppo  $\alpha$ -carbossilico di un residuo ed il gruppo  $\alpha$ -amminico del successivo. Si forma così un legame singolo che però presenta parziali caratteristiche di doppio legame.



**Figura 10: Formazione di un dipeptide**

La sintesi di peptidi è un'operazione complessa anche se consiste nel realizzare sempre un solo tipo di legame, quello ammidico, tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e quello amminico del successivo. Il problema fondamentale risulta essere la necessità di proteggere i gruppi funzionali<sup>1z</sup> che, nel corso della reazione, non devono reagire, lasciando invece liberi quelli coinvolti nella formazione del legame peptidico. La scelta dei gruppi protettori deve essere fatta in considerazione della possibilità di rimuoverli, al termine della sintesi, senza compromettere la stabilità del legame peptidico appena formato.

### 3.2 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA

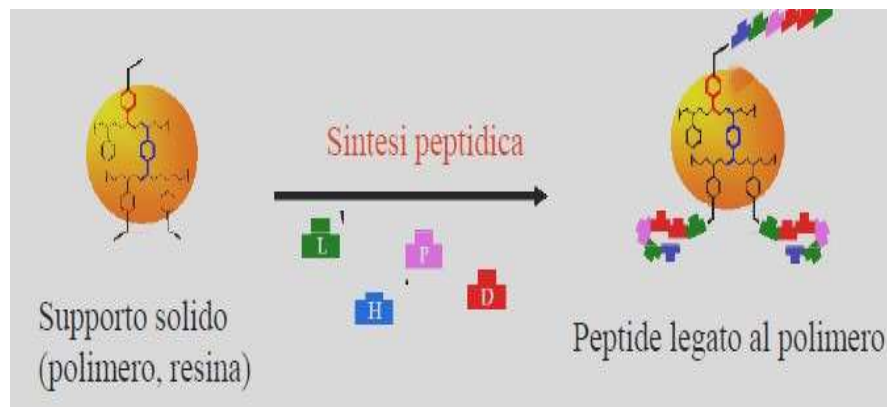
La sintesi peptidica condotta in soluzione richiede molto lavoro visto che ad ogni coupling deve seguire la purificazione del prodotto di reazione e poi l'isolamento del prodotto prima di proseguire con la reazione successiva. Un grande miglioramento di questa tecnica di sintesi è stato raggiunto con la sintesi peptidica su un supporto solido.

L'estrema efficienza della biosintesi delle proteine, che avviene al ritmo di 20 amminoacidi al secondo, è stata uno stimolo forte per esplorare nuove strade nel campo della sintesi di peptidi.

Infatti, durante la biosintesi le proteine non si trovano in soluzione, ma sono ancorate con legame estereo ad una molecola di RNA transfer il quale, a sua volta, è legato al complesso ribosoma-RNA messaggero. Questo costituisce una sorta di supporto solido dal quale le proteine si staccano solo quando sono state completate<sup>41</sup>.

Nel 1963 Merrifield ha messo a punto una tecnica di sintesi di peptidi in fase solida che richiama in parte la biosintesi delle proteine. Questo nuovo tipo di sintesi peptidica è un ottimo metodo per preparare peptidi e piccole proteine in breve tempo, evitando i lunghi processi di estrazione, filtrazione e cristallizzazione necessari nella sintesi in soluzione. Questo tipo di sintesi prevede la crescita di catene peptidiche ancorate ad un supporto polimerico insolubile in presenza di un linker adeguato che permette l'attacco e il distacco del peptide e di una strategia di protezione/deprotezione di tipo ortogonale per i singoli monomeri.

L'idea chiave della sintesi in fase solida consiste nel far crescere una catena peptidica legata covalentemente, con l'amminoacido C-terminale, ad un polimero insolubile. In questo modo i reagenti in eccesso e i sottoprodotti della sintesi possono essere rimossi per semplice filtrazione e lavaggio del polimero al quale è legato il peptide.



**Figura 11: Sintesi peptidica in fase solida: L, H, P, D sono amminoacidi**

Questa tecnica ha reso la sintesi di peptidi molto più veloce: gli amminoacidi vengono introdotti al ritmo di uno ogni ora, cioè il tempo strettamente necessario per eseguire le reazioni. Così, i lunghi tempi di purificazione, tipici della sintesi tradizionale, sono stati trasformati in semplici filtrazioni e lavaggi del peptide legato al supporto insolubile. Inoltre, data la semplicità delle operazioni richieste, l'intero processo può essere automatizzato. Un sintetizzatore automatico di peptidi in fase solida può introdurre fino a dodici amminoacidi al giorno.

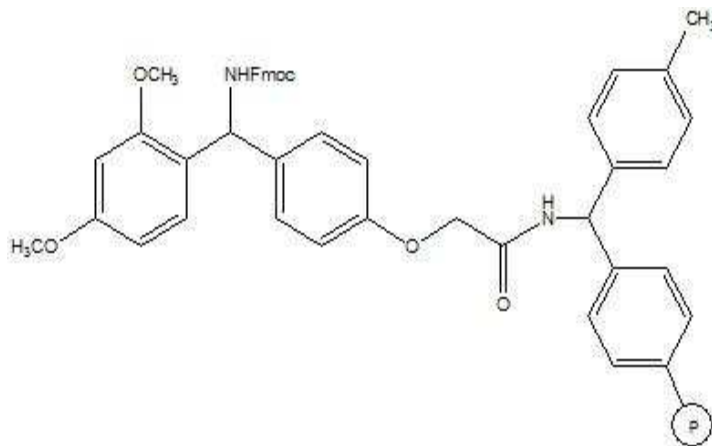


**Figura 12: Strumento per la sintesi peptidica automatica**

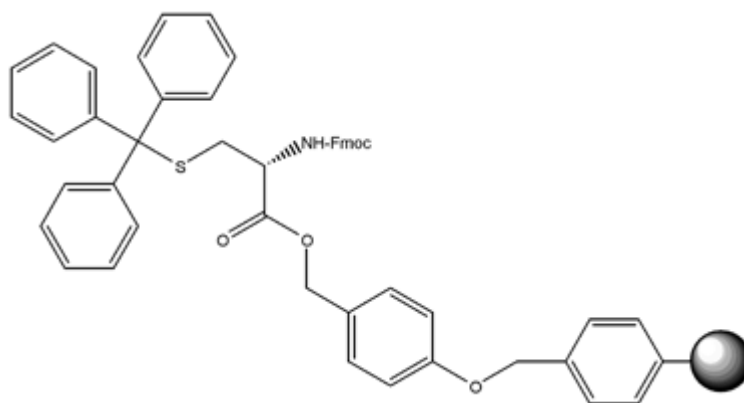
Date queste premesse la sintesi in fase solida dovrebbe essere in grado di sintetizzare persino proteine, cioè sequenze peptidiche con più di 100 amminoacidi. In realtà, con questa tecnica, si possono preparare facilmente solo peptidi fino a 30 amminoacidi. Un fattore che limita l'efficienza della sintesi in fase solida è la mancanza di purificazioni intermedie nella sintesi in fase solida. Infatti, Se la reazione di aggancio di un certo amminoacido non va a completezza, si ottengono, accanto a catene peptidiche che sono cresciute correttamente, anche un certo numero di catene che non hanno incorporato l'amminoacido in questione. Dato che i peptidi sono legati in modo covalente al supporto polimerico (resina), non è possibile eliminare i peptidi errati, anzi ad ogni nuovo ciclo della sintesi il loro numero è destinato ad aumentare<sup>42</sup>. Alla fine, accanto al peptide corretto, si ottengono molti altri peptidi simili tra loro, che possono differire anche per un solo amminoacido e che rendono le operazioni di purificazione finali piuttosto difficili. Per questo motivo è necessario che la resa della reazione con cui viene introdotto ogni amminoacido sia il più possibile vicina al 100%.

In questo lavoro di tesi per la sintesi dei peptidi sono state utilizzate una resina Wang-R e una resina Rink ammidica, caratterizzate dalle proprietà di rilasciare il

peptide privo di gruppi protettori in catena laterale dopo lo sblocco con TFA al 95%.



**Figura 13: Rink Amide MBHA**



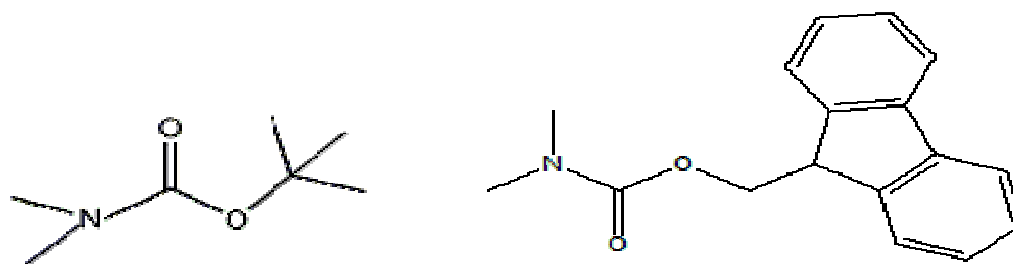
**Figura 14: Resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang**

### 3.3 PROTEZIONE DELLA FUNZIONE $\alpha$ -AMMINICA

Il carattere nucleofilo del gruppo  $\alpha$ -amminico non coinvolto nella reazione di condensazione deve essere soppresso al fine di evitare reazioni secondarie. Ciò è possibile attraverso una riduzione della sua densità elettronica per opera di opportuni sostituenti, oppure mediante l'impiego di sistemi altamente ingombranti

che ne riducono la reattività per effetto sterico. Il gruppo protettore deve essere introdotto selettivamente, essere di facile introduzione e rimozione; infine deve risultare ortogonale rispetto ad ogni altro gruppo protettore eventualmente presente.

La strategia di sintesi peptidica utilizzata in questo lavoro di tesi prevede l'impiego del gruppo Fmoc-(9-fluorenilmetossicarbonile)<sup>43</sup> e del gruppo Boc-(tert-butossicarbonile) come gruppi protettori  $\alpha$ -amminici.



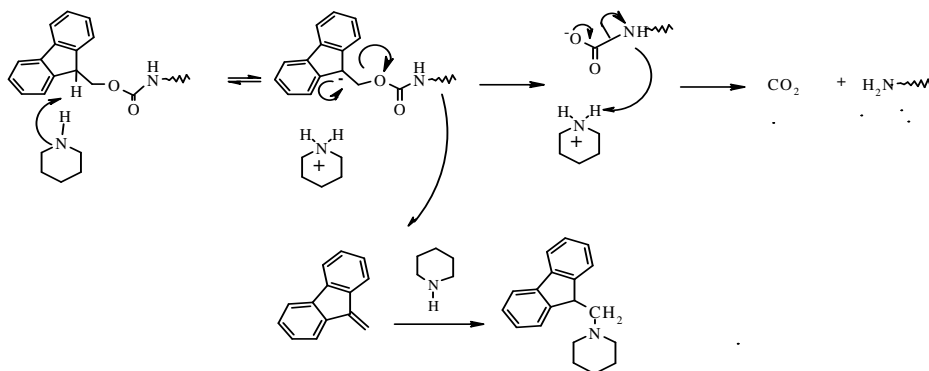
**Figura 15: Strutture di Boc-NMe<sub>2</sub> e Fmoc-NMe<sub>2</sub>**

Lo Fmoc forma con il gruppo amminico un derivato di tipo uretanico. Oltre alla facilità e alla selettività di introduzione e rimozione, una protezione di tipo uretanico previene la racemizzazione all'atomo di carbonio in  $\alpha$ .

Tale protezione è perfettamente ortogonale al legame peptide-resina: offre una buona resistenza agli acidi mentre è facilmente rimovibile in ambiente basico. Il gruppo protettore Fmoc è infatti rimosso per esempio in presenza di ammine secondarie quali piperidina o piperazina. Questo gruppo protettore, inoltre, non è inerte all'idrogenolisi catalitica a pressione ambiente ed è labile in presenza di ioni F<sup>-</sup>.

La reazione di sblocco è veloce e conduce al componente amminico in forma non protonata pronto per il successivo stadio di acilazione; i prodotti secondari sono tutti solubili in DMF, e quindi facilmente eliminabili attraverso i lavaggi.

La rimozione dello Fmoc avviene mediante un meccanismo di eliminazione E1<sub>cb</sub>.



**Figura 16: Meccanismo di rimozione del gruppo Fmoc**

Inizialmente, per azione della base, si forma l'anione ciclopentadienilico che risulta essere stabilizzato per risonanza. La reazione prosegue con la formazione di dibenzofulvene; quest'ultimo risulta essere reattivo e forma un addotto con un'ulteriore molecola di piperidina. Tale meccanismo di eliminazione è favorito in presenza di un solvente polare come DMF, che stabilizza maggiormente l'intermedio ionico.

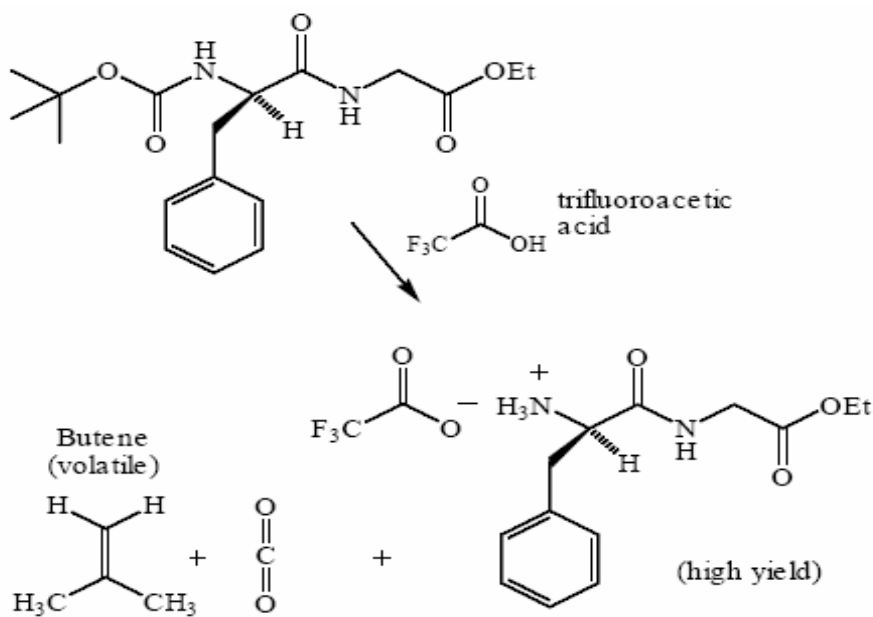
Con il gruppo Fmoc si utilizzano gruppi protettori per le catene laterali stabili in ambiente basico e rimovibili in ambiente acido (come il tert-butilossicarbonile, gli esteri ed eteri tert-butilici) o rimovibili mediante trattamento con metalli (come il gruppo allil-ossicarbonile e gli esteri allilici), assicurando così la completa ortogonalità della protezione.

La rimozione del gruppo Fmoc è una reazione veloce.

Basi	Tempo
Piperidina al 20%	6 s
Piperazina al 5%	20 s
Morfolina al 50%	1 min
Dicicloesilammina al 50%	35 min
p-dimetilamminopiridina al 10%	85 min
Etil-di-isopropilammina al 50%	10.1 h

**Tabella 6: Tempi per la rimozione del gruppo Fmoc**

Il gruppo Boc- viene rimosso in ambiente acido (ad esempio TFA, HCl in diossano) secondo lo schema riportato di seguito:



**Figura 17: Schema di rimozione del gruppo Boc**

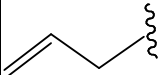
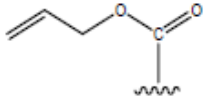
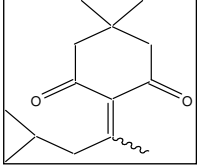


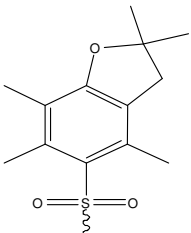
### 3.4 PROTEZIONE DEI GRUPPI FUNZIONALI IN CATENA LATERALE

Oltre al gruppo amminico bisogna proteggere le catene laterali dei vari residui.

Per fare in modo che le protezioni siano efficaci devono essere rimosibili ortogonalmente rispetto ai protettori della funzione  $\alpha$ -amminica.

In Tabella 3 sono raggruppati i gruppi protettori utilizzati per la sintesi peptidica in questo lavoro di tesi:

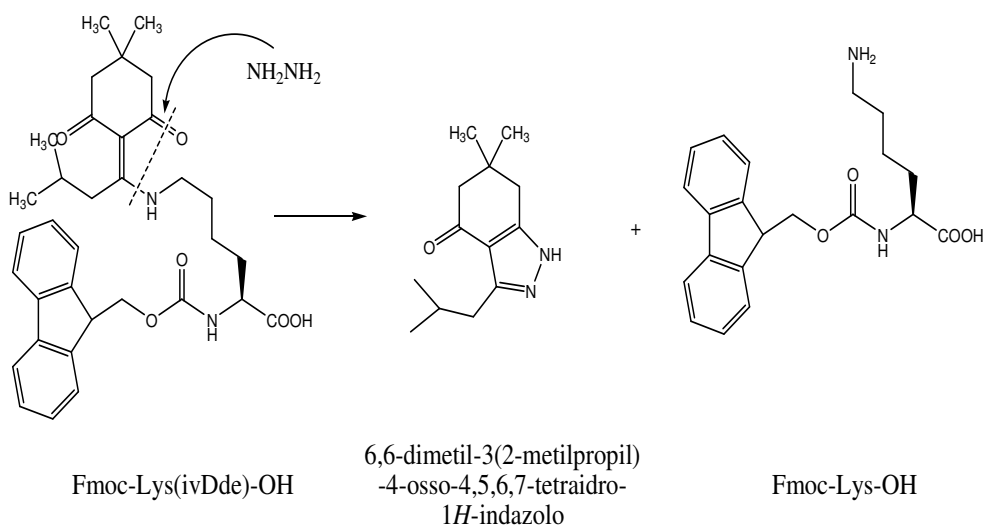
Struttura	Gruppo protettore	Abbreviazione	Funzione	Rimozione
 All-	Allyl	All	Protezione del gruppo OH in catena laterale	Con PhSiH <sub>3</sub> Catalizzata da Palladio
	Allilossicarbonile	Alloc	Protezione funzione amminica in catena laterale	Riduzione catalizzata da Palladio
	1-(4,4-dimetil-2,6 diossiccicloesilidene)3-metil-butil	ivDde	Protezione funzione amminica in catena laterale	Idrazina al 2% in DMF

	2,2,2,4,5,7- pentametilbenzofu ril-6-solfonide	Pbf	Protezione funzione guanidinica	TFA al 95%
---	--	-----	---------------------------------------	------------

**Tabella 7: Gruppi protettori dei gruppi funzionali delle catene laterali.**

### RIMOZIONE DEL GRUPPO ivDde:

In questo lavoro di tesi la protezione della funzione amminica del residuo di lisina di alcuni peptidi è stata realizzata utilizzando il gruppo ivDde (1-(4,4-dimetil-2,6 diossicicloesilidene)3-metil-butil)<sup>44</sup> stabile alle condizioni di rimozione del gruppo Fmoc ma che può essere rimosso facilmente per trattamento con una soluzione al 2% di idrazina in DMF rendendo quindi possibile la rimozione della protezione in  $\epsilon$  del residuo di lisina senza alterare le protezioni acido labili presenti nelle catene laterali dei singoli residui presenti nel peptide, e rendendo possibile il legame di specifici gruppi funzionali al gruppo amminico libero.



**Figura 18: Rimozione del gruppo ivDde**

### RIMOZIONE DEI GRUPPI Allyl E Alloc:

La protezione semi-permanente del gruppo -COOH in catena laterale al residuo di Glu (peptide) e al -COOH del residuo di Asp (peptide) mediante il gruppo protettore Allyl è stata ampiamente usata nella sintesi di peptidi ciclici e ramificati nonché nella chimica dei glicopeptidi.

Le condizioni di rimozione variano a seconda del tipo di gruppo allyl da rimuovere, ma comunque avviene mediante riduzione catalizzata da Palladio Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Pd(O) in presenza di un nucleofilo come il fenilsilano (PhSiH<sub>3</sub>) ed in atmosfera inerte di argon.

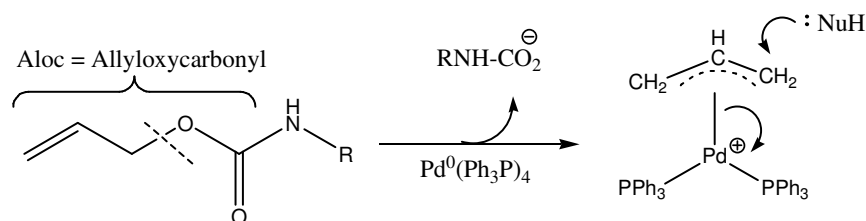


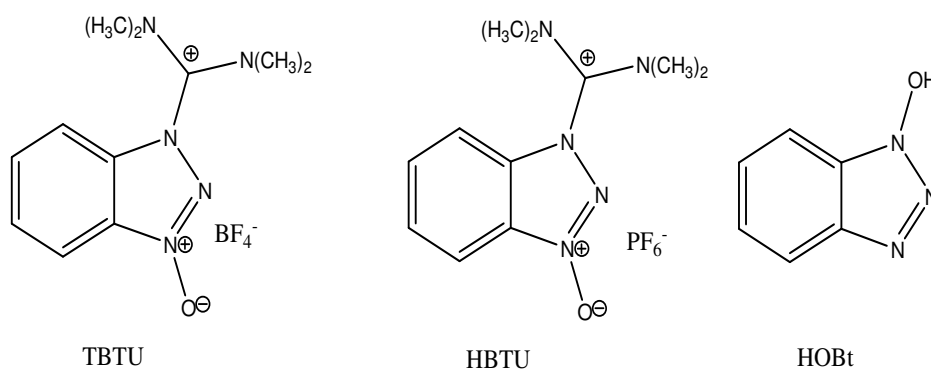
Figura 19: Rimozione del gruppo protettore Alloc

### 3.5 ATTIVAZIONE DEL GRUPPO CARBOSSILICO CON TBTU E COUPLING

Nel processo di condensazione risulta fondamentale la reattività del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -protetto come pure l'accessibilità e la reattività della funzione amminica libera.

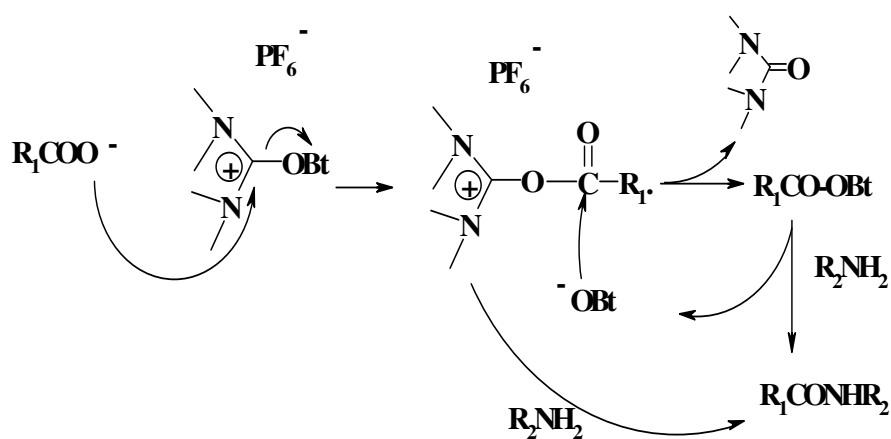
L'ottenimento di rese elevate, essenziale nella sintesi su fase solida, è condizionato dall'aver a disposizione un metodo di attivazione efficace anche nei solventi polari normalmente utilizzati.

Il protocollo di attivazione usato per la sintesi di peptidi in fase solida prevede l'uso di un agente attivante<sup>45</sup> (Figura 20), generalmente un sale di uronio (HBTU o TBTU) in presenza di N-idrossibenzotriazolo (HOBT) e di una base quale la diisopropiletilammina (DIEA).



**Figura 20: Strutture di TBTU, HBTU e HOBT**

Il meccanismo di attivazione è di seguito riportato (**Figura 21**).

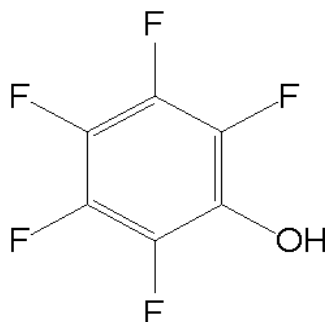


**Figura 21: Meccanismo di attivazione e coupling**

Questo metodo è efficace ed in grado di dare rese di condensazione quantitative anche per reazioni che coinvolgono amminoacidi con catene laterali piuttosto ingombrate come Val, Ile, Leu ed Arg, con sottoprodotti innocui.

### 3.6 ATTIVAZIONE DEL GRUPPO CARBOSSILICO CON PENTAFLUOROFENOLO

Gli esteri attivi sono una classe di esteri particolarmente reattivi perchè contengono alcoli che sono ottimi gruppi uscenti.



**Figura 23: Pentafluorofenolo**

Questo è dovuto al fatto che l'alcol ha caratteristiche acide e quindi il suo alcossido è stabile.

La presenza di atomi elettrone-attrattori come il fluoro sull'anello migliora l'effetto di dispersione della carica aumentando l'acidità del composto, e quindi aumentano la sua reattività del suo estere.

Il protocollo di attivazione della funzione carbossilica con pentafluorofenolo utilizzato in questo lavoro di tesi prevede l'uso di un agente attivante (diisopropylcarbodiimide), in presenza di pentafluorofenolo in DMF/DCM.

### **3.7 CICLIZZAZIONE**

La reazione di ciclizzazione di un peptide può avvenire o per formazione di ponti disolfuro fra residui di cisteina oppure tramite condensazione delle funzioni amminica e carbossilica N- e C- terminale, secondo un meccanismo testa-coda, o di eventuali funzioni presenti nelle catene laterali di specifici residui. In qualsiasi caso affinché la ciclizzazione proceda senza reazioni secondarie la miscela di reazione deve essere diluita (1 mM), così l'eventuale reazione secondaria di polimerizzazione risulta fortemente sfavorita. Inoltre gli eventuali gruppi funzionali presenti in catena laterale devono essere adeguatamente protetti al fine di non avere reazioni indesiderate.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 REAGENTI E SOLVENTI

**CARLO ERBA** (Milano, Italia)

EtOH, Et<sub>2</sub>O, DCM, etere di petrolio, acetonitrile per HPLC

**ALDRICH-SIGMA-FLUKA** (Milano, Italia)

DMF, TFA, Anisolo, Triisopropilsilano, Anidride succinica, Pentafluorofenolo, Diisopropilcarbodiimide

**J. T. Baker** (Deventer, Olanda)

Piridina

**IRIS** (Marktredwitz, Germania)

Boc-Gly-OH, DIEA, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp-(OAll)-OH, Fmoc-Cys-OH, Fmoc-(Fmoc)Dap-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, HOBt, Fmoc-Asp-(OtBu)-OH, Fmoc-ε-Ahx-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Trp-OH, piperidina, PyBop, resina Rink Amide MBHA, TBTU.

L'acqua usata nelle procedure cromatografiche è purificata per passaggio attraverso sistema MilliQ Millipore (BILLERICA, MA); i solventi normalmente usati sono di grado RP ed usati senza ulteriore purificazione. I solventi anidri e per sintesi peptidica sono forniti dalla ditta IRIS.

## 4.2 SINTESI SU FASE SOLIDA

La sintesi peptidica su fase solida è stata effettuata manualmente usando il seguente protocollo:

1. Rigonfiamento della resina con DMF
2. Deprotezione del gruppo protettore Fmoc dell'ultimo residuo condensato alla resina con piperidina al 20% in DMF
3. Lavaggio della resina con DMF
4. Attivazione della funzione  $\alpha$ -carbossilica del residuo da condensare con TBTU/HOBt/DIEA in DMF
5. Coupling del residuo attivato
6. Eliminazione dei reagenti in eccesso e lavaggio della resina con DMF.

La sintesi inizia con il rigonfiamento della resina (protocollo1). I protocolli 2, 3, 4, 5, e 6 sono ripetuti ciclicamente fino alla condensazione dell'ultimo amminoacido.

La reazione di attivazione (4) è condotta utilizzando 3 equivalenti di Fmoc-AA-OH, 3 equivalenti di TBTU in presenza di 3 equivalenti di HOBt e 6 equivalenti di DIEA.

La sintesi termina con il lavaggio della resina con DCM. La resina è quindi essiccata sottovuoto.

Il distacco del peptide dalla resina con contemporanea rimozione dei gruppi protettori presenti in catena laterale è ottenuto per trattamento con una miscela di TFA/Anisolo/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2:2:1. La resina è allontanata mediante filtrazione ed il peptide precipitato per aggiunta di etere etilico.



### **4.3 PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI PEPTIDI SINTETIZZATI**

La purificazione dei prodotti è stata ottenuta mediante RP-HPLC preparativa, utilizzando uno strumento Shimadzu (Kyoto, Japan) costituito da due pompe LC-8A, controller SCL-8A e rivelatore spettrofotometrico SPD-6A. Gli eluenti (H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN) sono deaerati con degasatore ERMA modello ERC-3562. La caratterizzazione tramite HPLC analitico è effettuata utilizzando un apparecchio Shimadzu costituito da pompe LC-10AD, controller SCL-10A, rivelatore SPD-10A e degasatore Gastorr 154. I dati sono acquisiti tramite il software Starlet ChromStar (Bruker, Bremen, Germany).

L'eluizione è stata condotta utilizzando una miscela CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O in percentuali variabili in presenza di 0.05% TFA come additivo.

Gli spettri ESI-MS sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro di massa Applied Biosystems Mariner Spec. La taratura è effettuata usando uno standard esterno costituito da una soluzione 1 pmol/μl dei seguenti tre peptidi: angiotensina I, bradichinina e neurotensina, in 1:1 v/v H<sub>2</sub>O/acetonitrile in presenza di 1% di AcOH. I campioni sono stati preparati sciogliendo quantità ponderate di peptide in soluzioni appropriate.



## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1 SINTESI DI PEP1: c[D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(Wang-R)]

Il peptide PEP1 è sintetizzato a partire da 0.1 mmol di Fmoc-Asp(Wang Resina)-OAll (loading: 0.43 mmol/g, 233 mg) secondo la procedura di sintesi su fase solida descritta nel capitolo precedente, utilizzando il gruppo protettore Fmoc come protezione della funzione  $\alpha$ -amminica e come reattivo di coupling il TBTU. La ciclizzazione di questo peptide avviene dopo la rimozione del gruppo protettore alla funzione  $\alpha$ -carbossilica del residuo di Asp(-OAll) utilizzando 2.4 eq di Phenylsilane ( $\text{PhSiH}_3$ ) e 0.25 eq di Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in atmosfera inerte di argon secondo quanto descritto nelle metodologie, e successiva rimozione del gruppo Fmoc.

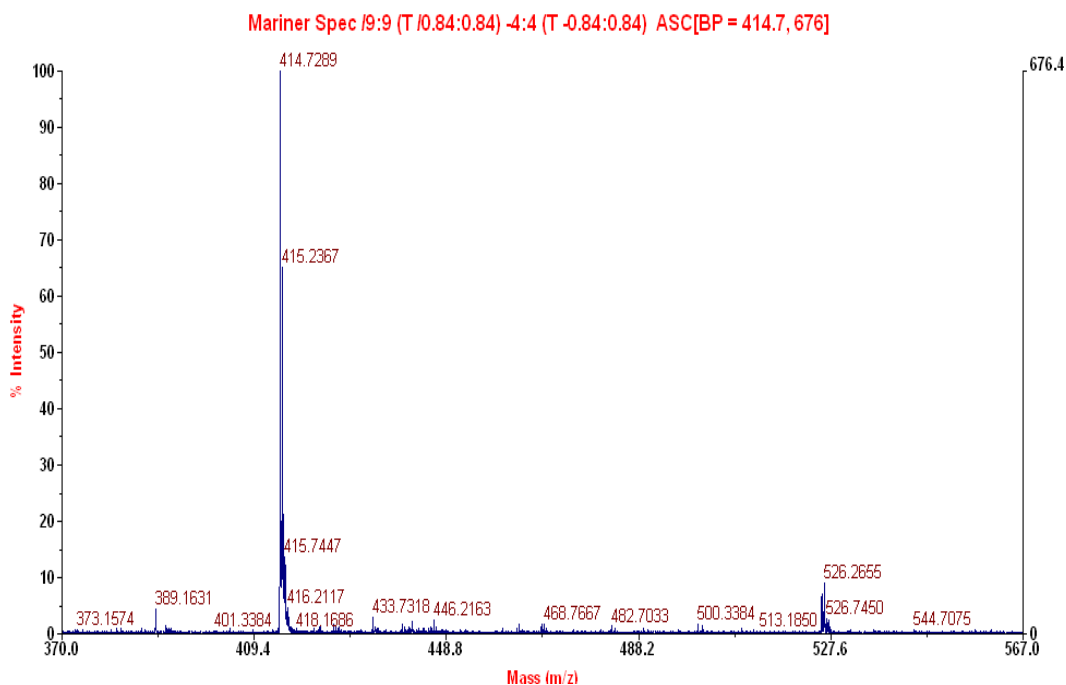
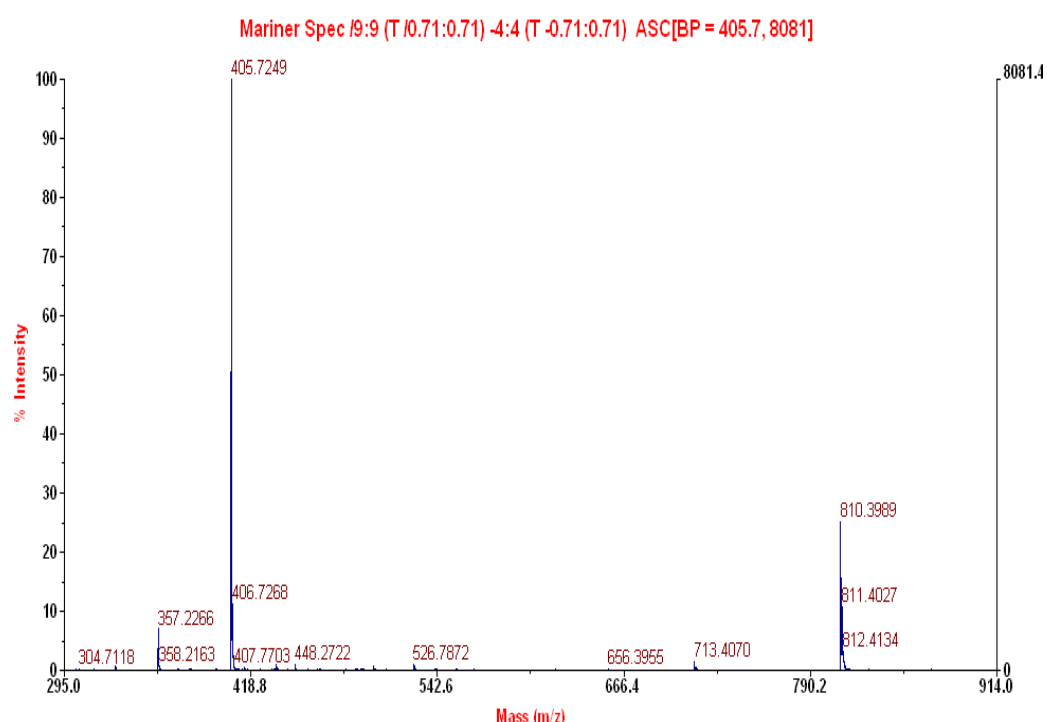


Figura 24: Spettro ESI-MS del peptide lineare Fmoc-D-Phe-Lys(IVDde)-Arg(Pbf)-Gly-Asp-OH. MM calcolata per  $\text{C}_{55}\text{H}_{71}\text{N}_9\text{O}_{12}$  = 1049.52 Da. MM determinata da  $[\text{M}+2\text{H}]^{+2} = 526.26$  m/z. MM determinata da  $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$  senza Fmoc = 414.7 Da.

La reazione di ciclizzazione è stata condotta sul peptide lineare ancorato alla resina e protetto alle funzioni presenti in catena laterale in DMF, in presenza di 4 eq di PyBop (0.4 mmol), 4 eq di HOBt (0.4 mmol), e di 8 eq di DIEA (114  $\mu$ L). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 3h, i reattivi in eccesso sono stati eliminati per filtrazione e quindi sono stati aggiunti altri 4 eq di PyBop, 4 eq di HOBt, e 8 eq di DIEA. La reazione è stata lasciata sotto agitazione per una notte, i reattivi in eccesso sono stati eliminati per filtrazione, la resina è stata lavata con DMF e DCM, e asciugata sotto vuoto.



**Figura 25: Spettro ESI-MS del peptide ciclico c[D-Phe-Lys(IVDde)-Arg(Pbf)-Gly-Asp].** MM calcolata per  $C_{40}H_{59}N_9O_9$  = 809.44 Da. MM determinata da  $[M+H]^+$  = 810.4 m/z, da  $[M+2H]^{+2}$  = 405.72 m/z.

Il peptide ciclico c[D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(Wang-R)] è stato ottenuto per trattamento con 5 mL di una soluzione al 2% di idrazina anidra in DMF sotto agitazione in 30 min per rimuovere selettivamente la protezione della funzione amminica in catena laterale del residuo di lisina.

## 5.2 SINTESI DI PEP2: c[D-Phe-Lys(Suc-Pfp)-Arg-Gly-Asp]

Il peptide PEP2 è stato sintetizzato a partire da 0.1 mmol di PEP1 e 2 eq (0.2 mmol) di anidride succinica, dopo 3 h di reazione. I reagenti in eccesso sono stati eliminati per filtrazione, e sono stati aggiunti 1 eq (0.1 mmol) di pentafluorofenolo, 1 eq (0.1 mmol) di di-isopropylcarbodiimide in DMF/DCM 1:1. La reazione è stata lasciata decorrere a temperatura ambiente per 4 h, e si è proceduto a un secondo coupling dopo aver eliminato i reagenti in eccesso per filtrazione.

La resina e le protezioni ai gruppi funzionali presenti in catena laterale sono state rimosse per trattamento con una soluzione di TFA al 95%, in presenza di TIPS 2%, anisolo 2%, H<sub>2</sub>O 1%, a temperatura ambiente per 45 min, la resina è stata quindi separata per filtrazione e il prodotto grezzo è stato precipitato per aggiunta di Et<sub>2</sub>O, ottenendo 73.86 mg di peptide (resa 85%).

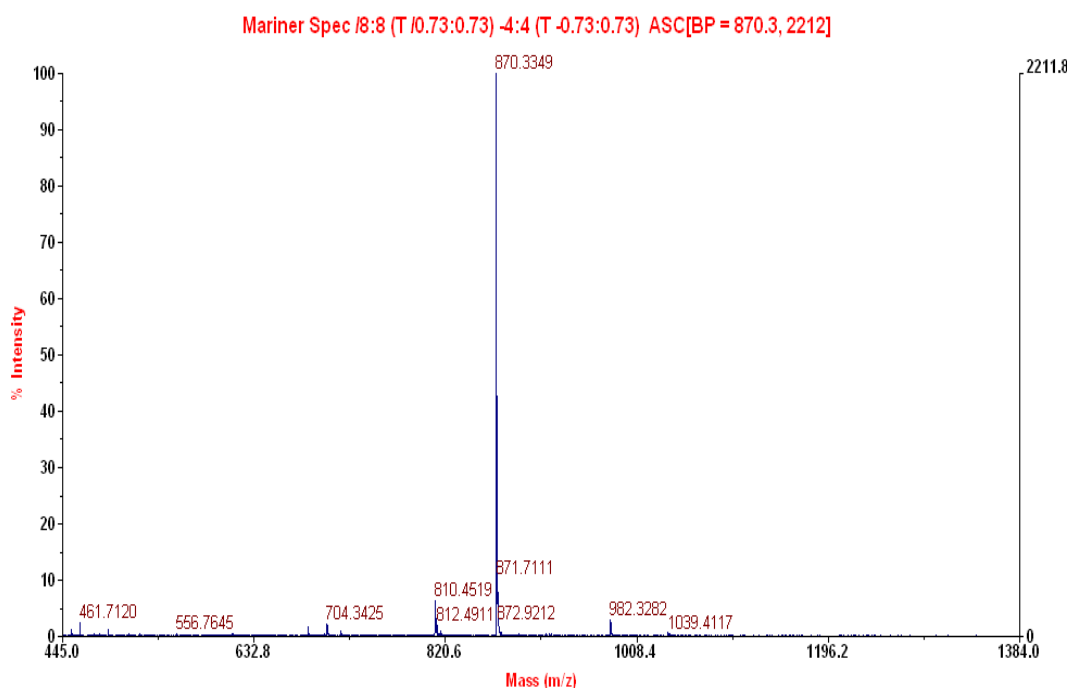
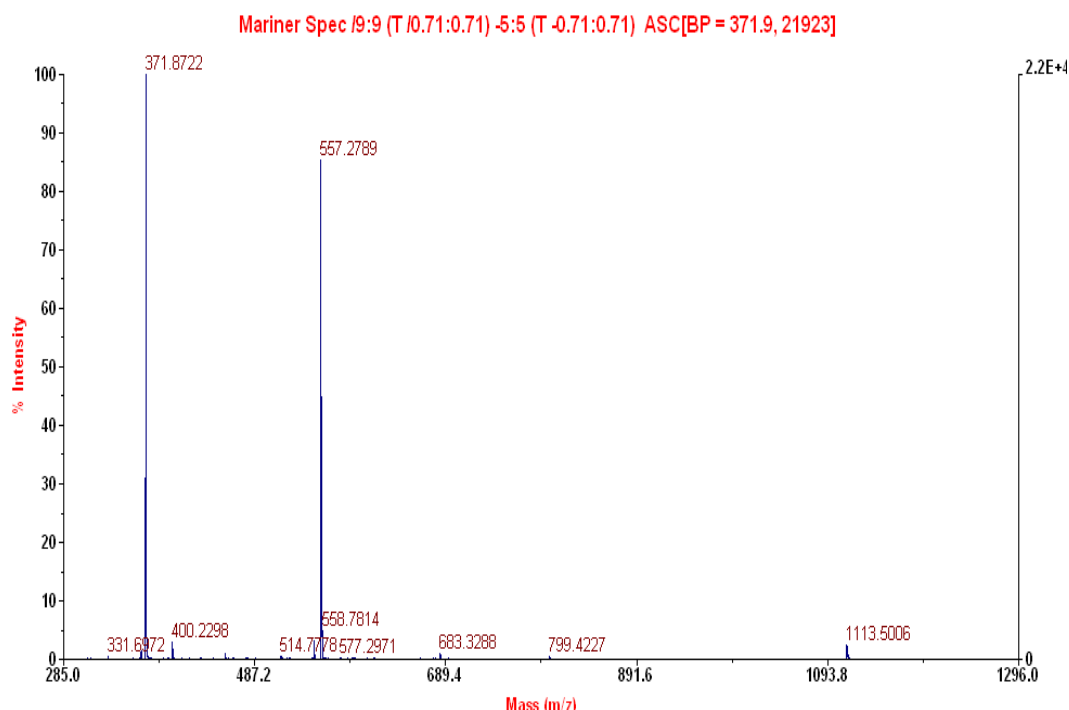


Figura 26: Spettro ESI-MS di PEP2. MM calcolata per C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>F<sub>5</sub> = 869 Da, MM determinata da [M+H]<sup>+</sup> = 870.33 Da

### 5.3 SINTESI DI PEP3: Pfp-Suc-Ahx-βAla-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>

Il peptide H-Ahx-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Resina è stato sintetizzato a partire da 0.6 mmol di Resina Rink Ammide MBHA (loading: 0.65 mmol/g, 92.3 mg) mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico di marca *Advanced ChemTech 348Ω* secondo la procedura di sintesi descritta nel capitolo precedente, utilizzando il gruppo protettore Fmoc come protezione della funzione α-amminica e il TBTU quale reattivo di coupling.

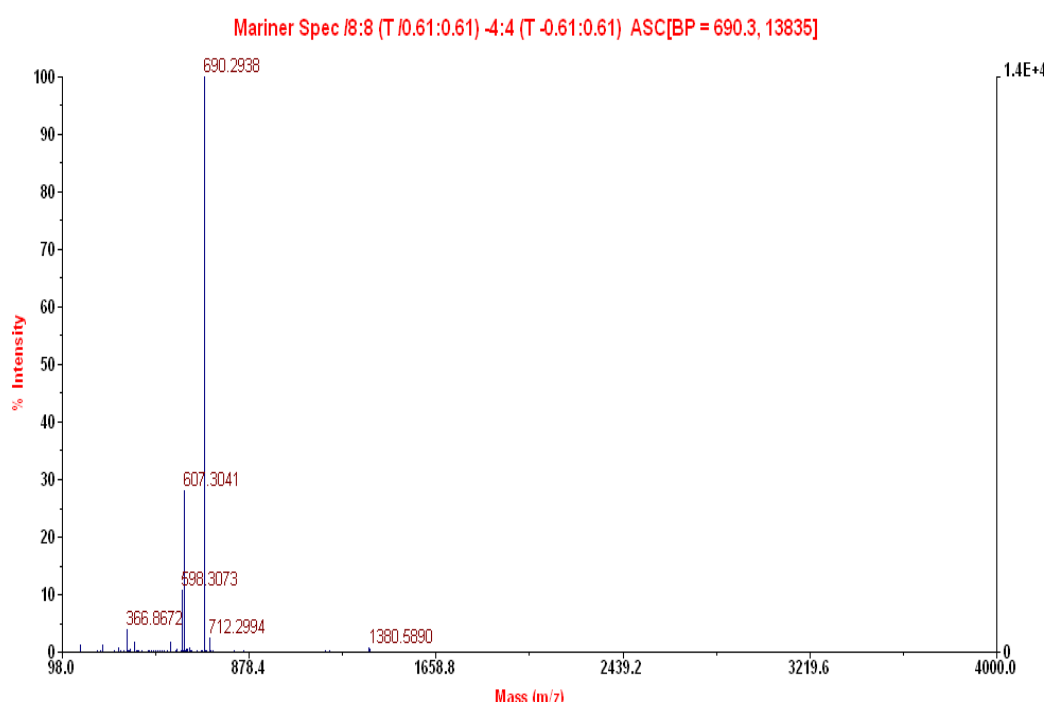


**Figura 27: Spettro ESI-MS del peptide H-Ahx-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>. MM calcolata per C<sub>53</sub>H<sub>76</sub>N<sub>16</sub>O<sub>11</sub> = 1112.59 Da, MM determinata da [M+2H]<sup>2+</sup> = 557.28 m/z, da [M+3H]<sup>3+</sup> = 371.87 m/z.**

Dopo rimozione del gruppo Fmoc al residuo di Ahx, il peptide legato alla resina è stato trattato con 2 eq (0.12 mmol) di anidride succinica. Dopo 3 h di reazione, i reagenti in eccesso sono stati eliminati per filtrazione, e sono stati aggiunti 1 eq (0.06 mmol) di pentafluorofenolo e 2 eq (19 µL) di di-isopropylcarbodiimide in DMF/DCM 1:1 v/v. La reazione è stata lasciata decorrere a temperatura ambiente

per 4 h, e si è proceduto ad un secondo coupling dopo aver eliminato i reagenti in eccesso per filtrazione.

La resina e le protezioni ai gruppi funzionali presenti in catena laterale sono state rimosse per trattamento con una soluzione di TFA al 95%, in presenza di TIPS 2%, anisolo 2%, H<sub>2</sub>O 1% per 45 min a temperatura ambiente. La resina è stata separata per filtrazione e il prodotto grezzo è stato precipitato per aggiunta di Et<sub>2</sub>O, ottenendo 75.82 mg di peptide (resa 91.7%).



**Figura 28: Spettro ESI-MS del peptide PEP3. MM calcolata per C<sub>63</sub>H<sub>79</sub>F<sub>5</sub>N<sub>16</sub>O<sub>14</sub> = 1378.6 Da, MM determinata da [M+2H]<sup>2+</sup> = 690.29 m/z.**

## 5.4 SINTESI DEL PEPTIDE PEP4:

### **H-Cys-Ahx-βAla-c[Lys-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Glu]-Arg-Pro-Val-NH<sub>2</sub>**

Il peptide PEP4 è stato sintetizzato a partire da 0.06 mmoli di resina Rink Ammide MBHA (*loading* 0.73 mmol/g, 87.84 mg) seguendo le procedure di sintesi in fase solida descritte in precedenza.

La contemporanea rimozione dei gruppi protettori –Alloc e –Allyl alla funzione amminica e carbossilica dei residui Lys<sup>4</sup> e Glu<sup>10</sup> è stata condotta sul peptide ancorato alla resina e sospeso in DCM in atmosfera di argon, in presenza di 1.50 mmol (0.18 mL) di PhSiH<sub>3</sub> e di Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (17.03 µg). La reazione è stata lasciata decorrere sotto agitazione per 45 minuti. Dopo l'eliminazione dell'eccesso dei reagenti per filtrazione, la resina è stata lavata con DCM e la procedura sopra descritta è quindi stata ripetuta.

La reazione di ciclizzazione tra le catene laterali dei residui di Lys<sup>4</sup> e Glu<sup>10</sup> sul peptide ancorato alla resina è stata condotta in presenza di 193.5 mg di PyBop, 50.25 mg di HOBt, e 0.13 mL di DIEA. La reazione è stata lasciata decorrere per 1h sotto agitazione a temperatura ambiente. I reattivi in eccesso sono stati eliminati per filtrazione, la resina è stata lavata con NMP e DCM, e asciugata sotto vuoto.

0.03 mmol (95.81 mg) di peptide ciclico legato alla resina sono stati trattati con la miscela di sblocco composta da TFA al 95%, TIS 2%, anisolo 2% ed H<sub>2</sub>O 1% per 45 minuti a temperatura ambiente. Dopo filtrazione della resina, il peptide grezzo è stato precipitato per aggiunta di Et<sub>2</sub>O, ottenendo 17.89 mg di prodotti grezzo, con una resa del 36.12%.

La purificazione del peptide è stata condotta tramite HPLC preparativa usando una colonna Vydac C18 218TP1022, 10µ, 300Å 250x22.0 mm.

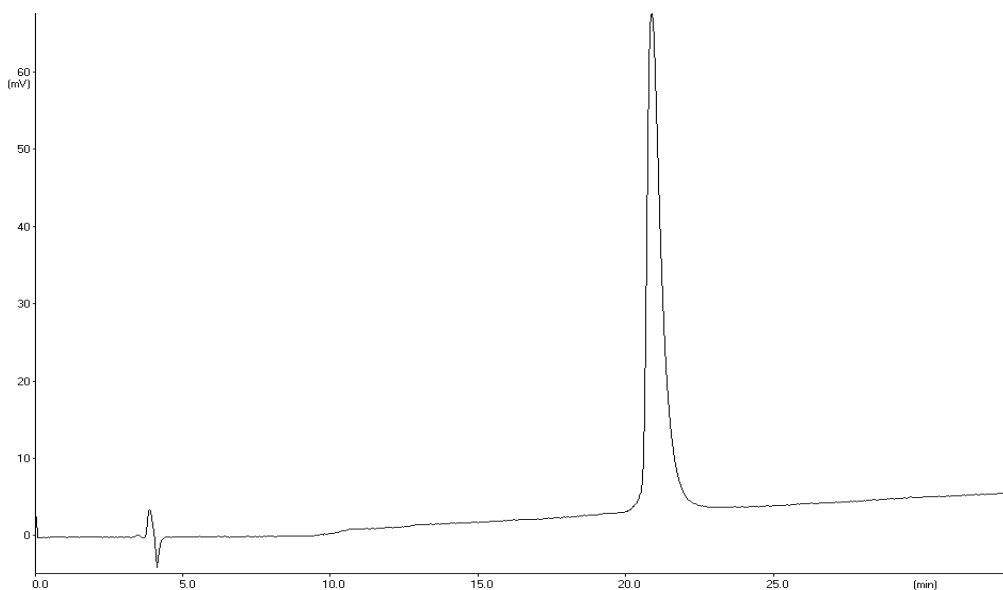
Gli eluenti usati sono:

A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O

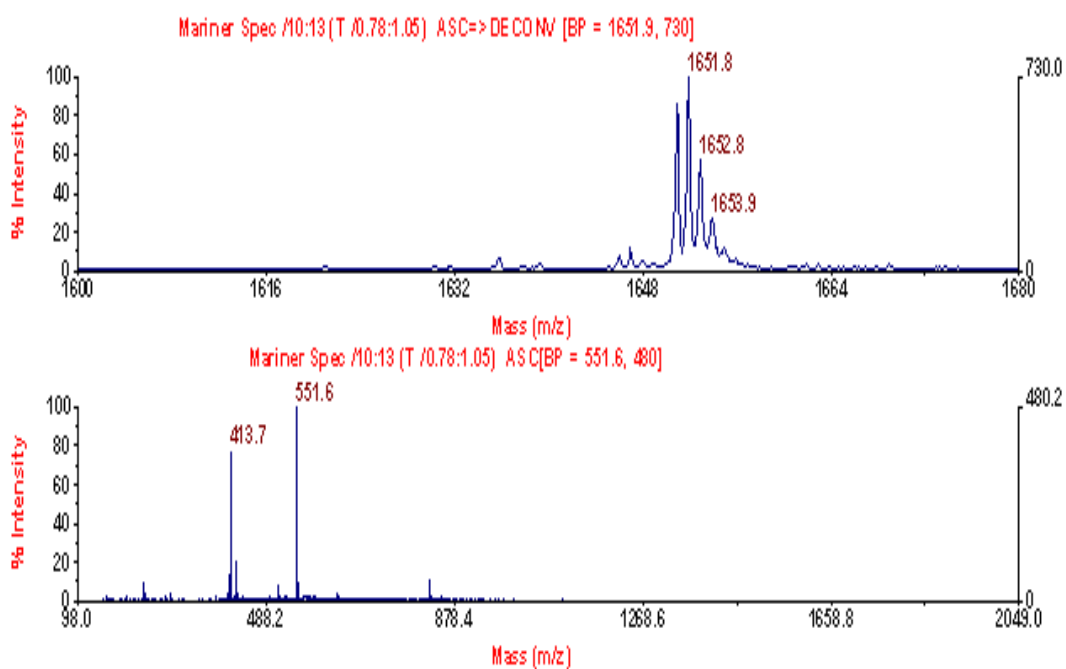
B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v)

Flusso 12 mL/min, λ 216 nm. Eluizione isocratica per 3 minuti al 17% di B, poi gradiente lineare dal 17% di B al 30% di B in 26 minuti.





**Figura 29: Cromatogramma analitico del peptide ciclico PEP4** Colonna Vydac C18, 10 $\mu$ , 250x4.6 mm. Eluenti: A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O, B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1). Flusso 1 mL/min.  $\lambda_{\text{detector}} = 216$  nm. Gradiente: 3 min al 17% di B, 26 min dal 17% al 30%, 2 min al 90%, 1 min dal 90% al 17%. Tempo di ritenzione 21 min.



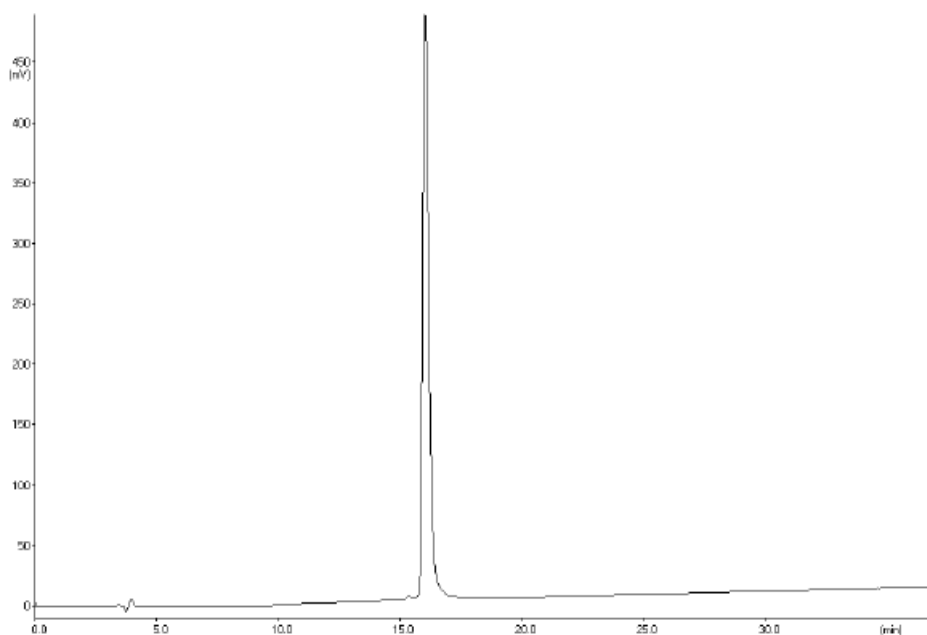
**Figura 30: Spettro ESI-MS del peptide PEP4.** MM calcolata per C<sub>76</sub>H<sub>115</sub>N<sub>24</sub>O<sub>17</sub>S<sub>1</sub> = 1650.98 Da. MM determinata da [M+H]<sup>+</sup> = 1651.9 m/z, da [M+2H]<sup>2+</sup> = 551.6 m/z, MM da spettro deconvoluto = 1651.8 Da.

Sono stati ottenuti 7.47 mg di peptide puro con una resa del 41.75% .

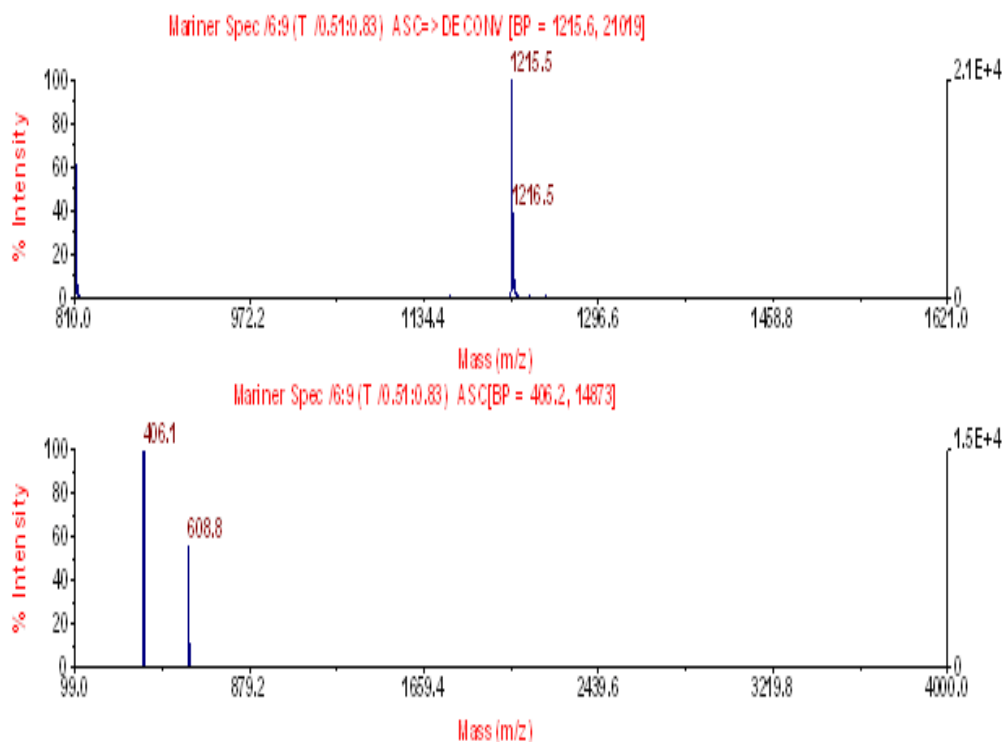
## 5.5 SINTESI DEL PEPTIDE PEP5:

### H-Cys-Ahx-βAla-Nle-Asp-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>

Il peptide lineare PEP5 è stato sintetizzato a partire da 0.12 mmol di Rink Ammide MBHA-resina (*loading* 0.73 mmol/g, 136.98 mg) secondo le consuete procedure di sintesi in fase solida. La rimozione del peptide dalla resina è stata eseguita con una miscela di TFA al 95%, TIPS al 2%, anisolo al 2%, H<sub>2</sub>O all'1%, che contemporaneamente rimuove le protezioni ai gruppi funzionali in catena laterale. Si ottengono 112.63 mg di peptide (MW: 1214.59) con una resa del 77.27%.



**Figura 31: Cromatogramma analitico del peptide PEP5. Colonna Vydac C18, 10 $\mu$ , 250x4.6 mm. Eluenti: A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O, B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1). Flusso 1 mL/min.  $\lambda_{\text{detector}} = 216$  nm. Gradiente: 3 min al 20% di B, 30 min dal 20% al 50%, 1 min al 90%, 1 min dal 90% al 20%. Tempo di ritenzione 16 min.**



**Figura 32: Spettro ESI-MS del peptide PEP5. MM calcolata per  $C_{56}H_{80}N_{17}O_{12}S$ : 1214.5 Da. MM determinato da  $[M+H]^{1+} = 1215.5$  m/z,  $[M+2H]^{2+} = 608.8$  m/z,  $[M+3H]^{3+} = 406.1$  m/z; MM da spettro deconvoluto = 1215.5 Da.**

25.02 mg del peptide grezzo PEP5 sono stati purificati tramite HPLC preparativa usando una colonna Vydac

C18 218TP1022, 10 $\mu$ , 300Å 250x22.0 mm.

Gli eluenti usati sono:

A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O

B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v)

Flusso 12 mL/min,  $\lambda$  216 nm. Eluizione isocratica per 3 minuti al 20% di B, poi gradiente lineare dal 20% di B al 50% di B in 30 minuti.

Sono stati ottenuti 19.57 mg di peptide puro con una resa del 78.28% che sono stati consegnati alla Dr.ssa C. Bolzati (ICIS-CNR) presso il gruppo di lavoro del prof. Bandoli (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche) per la marcatura con <sup>99m</sup>Tc e/o <sup>188</sup>Re.

## 5.6 SINTESI DEL PEPTIDE PEP6:

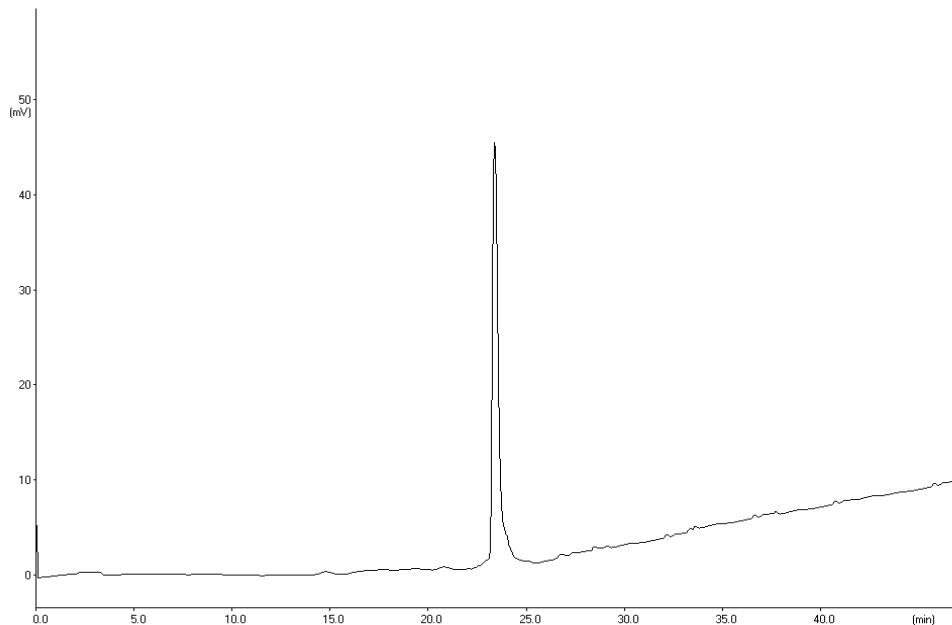
**c(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys)**

**/**  
**Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-CO-OPtx**

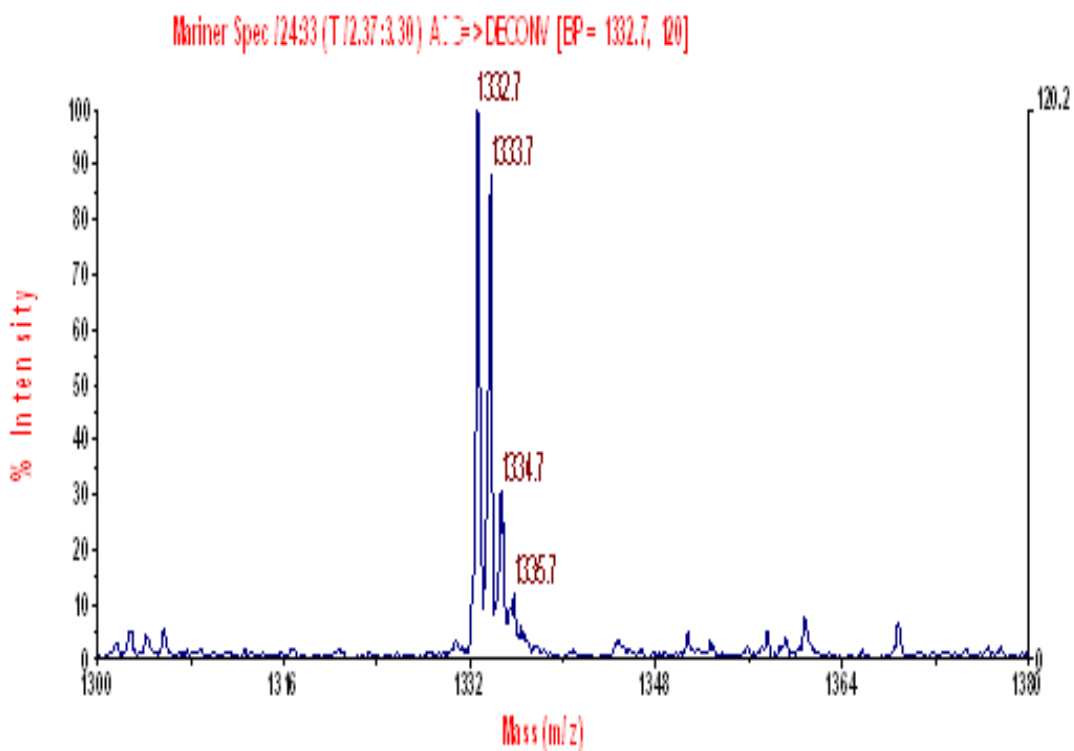
Il peptide PEP6 è stato ottenuto per condensazione di 0.06 mmol (54.68 mg) di peptide c[Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys] con 1 eq del peptide Pfp-Suc-Gly-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Phe-Ala-Eda-Trt-Resina che proviene dalla reazione del peptide H-Gly-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Phe-Ala-Eda-Trt-Resina con anidride succinica e successiva attivazione del gruppo carbossilico con pentafluorofenolo e diisopropilcarbodiimide. La reazione di condensazione è stata lasciata decorrere per 3h a temperatura ambiente nel reattore per la sintesi su fase solida. La miscela di reazione è stata quindi allontanata per filtrazione, e la resina lavata con DMF e DCM.

La resina e le protezioni ai gruppi funzionali della catena laterale sono state rimosse per trattamento con una soluzione di TFA al 95%, in presenza di TIPS 2%, anisolo 2%, e H<sub>2</sub>O 1% a temperatura ambiente per 45 min. La resina è stata separata per filtrazione e il prodotto grezzo è stato precipitato per aggiunta di Et<sub>2</sub>O, ottenendo 68.45mg di peptide (resa 85.54%).

C<sub>59</sub>H<sub>93</sub>N<sub>22</sub>O<sub>14</sub>, MW = 1333.72



**Figura 33: Cromatogramma analitico del peptide c(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys)-Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H.** colonna Vydac C18, 10 $\mu$ , 250 x 4.6 mm. Eluenti; A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O, B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1). Flusso 1 mL/min.  $\lambda_{\text{detector}} = 216$  nm. Gradiente: 5 min al 5% di B, dal 5% al 45% di B in 40 min, dal 45% al 90% in 1 min, 1 min al 90%, dal 90% al 5% in 1 min.

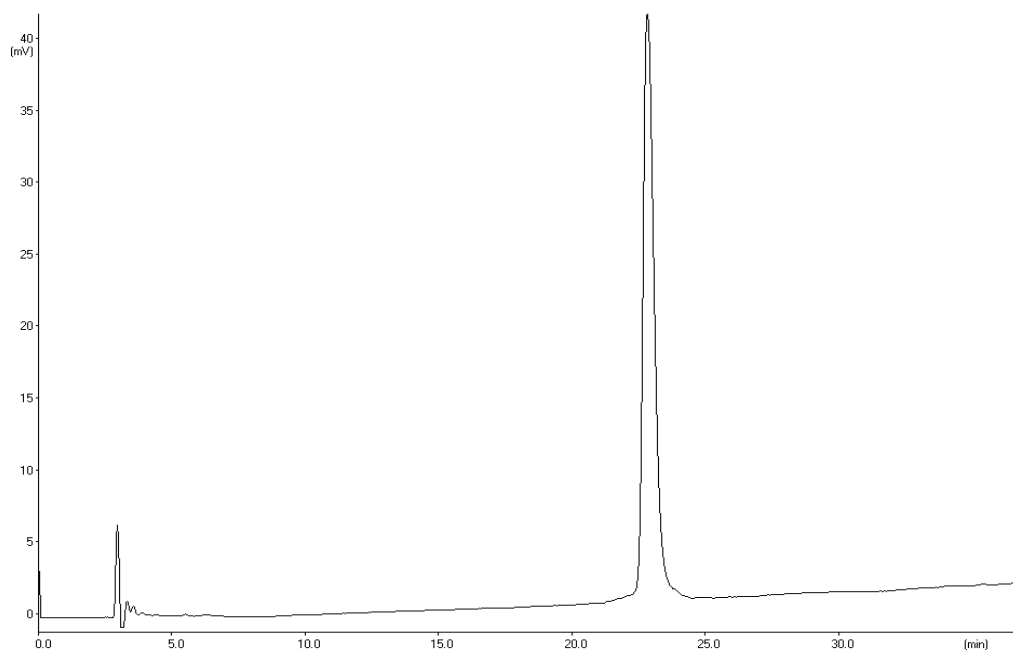


**Figura 34: Spettro ESI-MS del peptide c(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys)-Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H.**  
 MM calcolata per C<sub>59</sub>H<sub>93</sub>N<sub>22</sub>O<sub>14</sub> = 1333.7 Da. MM determinata = 1332.7 Da.

Per l'ottenimento del profarmaco contenente il paclitaxel, 10.78 mg dell'isomero 7-(4-nitrofenil)carbonato-paclitaxel (0.01 mmoli) forniti dalla Dr.ssa Marchiani, sono stati disciolti in DMF in presenza di 1 eq del peptide [c(RGDfK)]-Suc-GRRFA-Eda-H (0.01 mmoli, 14.11 mg) e 3 eq di TEA (0.03 mmoli, 5  $\mu$ L). La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione e la reazione è stata lasciata decorrere per 24h a temperatura ambiente. La soluzione è stata concentrata a secco e il prodotto grezzo è stato purificato tramite RP-HPLC preparativa utilizzando una colonna Vydac C18, 10 $\mu$ , 250x22 mm.

Gli eluenti utilizzati sono: (A) 0.05% di TFA in H<sub>2</sub>O, (B) 0.05% di TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v), flusso 12 mL/min,  $\lambda$  216 nm. Eluizione isocratica per 5 min al 5% di B, poi gradiente lineare dal 5% di B al 95% di B in 95 minuti, ottenendo 15.86 mg di prodotto puro (resa 71.72%).

C<sub>107</sub>H<sub>141</sub>N<sub>23</sub>O<sub>29</sub>, MM = 2212.03 Da.



**Figura 35: Cromatogramma analitico del peptide [c(RGDfK)]-Suc-GRRFA-Eda-CO-O-paclitaxel. colonna Vydac C18, 10 $\mu$ , 250x4.6 mm. Eluenti; A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O, B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1). Flusso 1 mL/min.  $\lambda_{\text{detector}} = 216$  nm. Gradiente: 3 min al 35% di B, dal 35% al 50% di B in 30 min, dal 50% al 90% in 1 min, 1 min al 90%, dal 90% al 35% in 1 min. Tempo di ritenzione 23 min.**

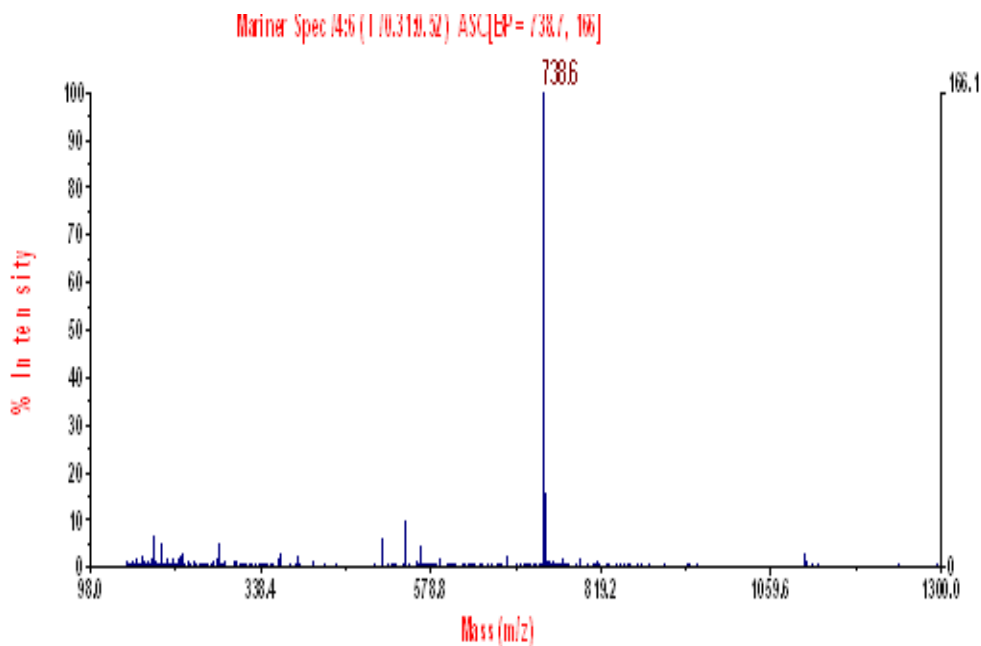


Figura 36: Spettro ESI-MS del peptide [c(RGDfK)]-Suc-GRRFA-Eda-CO-O-paclitaxel. MM calcolata per  $C_{107}H_{141}N_{23}O_{29} = 2212.03$  Da. MM determinata da  $[M+3H]^{3+} = 738.6$  m/z.

## 5.7 SINTESI DEL PEPTIDE PEP7:

**Fmoc-Gly-Gly-(Pro-Gly)<sub>3</sub>**

\  
/  
/

**Dap-Ahx-Gly-Cys(Trt)-Wang Resin**

**Boc-Gly-Gly-(Pro-Gly)<sub>3</sub>**

Il peptide PEP7 è stato sintetizzato manualmente a partire da 0.05 mmol di Fmoc-Cys-Resina (loading 0.55 mmol/g, 91 mg) secondo la procedura di sintesi su fase solida descritta nel capitolo precedente, utilizzando il gruppo protettore Fmoc come protezione della funzione  $\alpha$ -amminica e il TBTU quale reattivo di coupling.

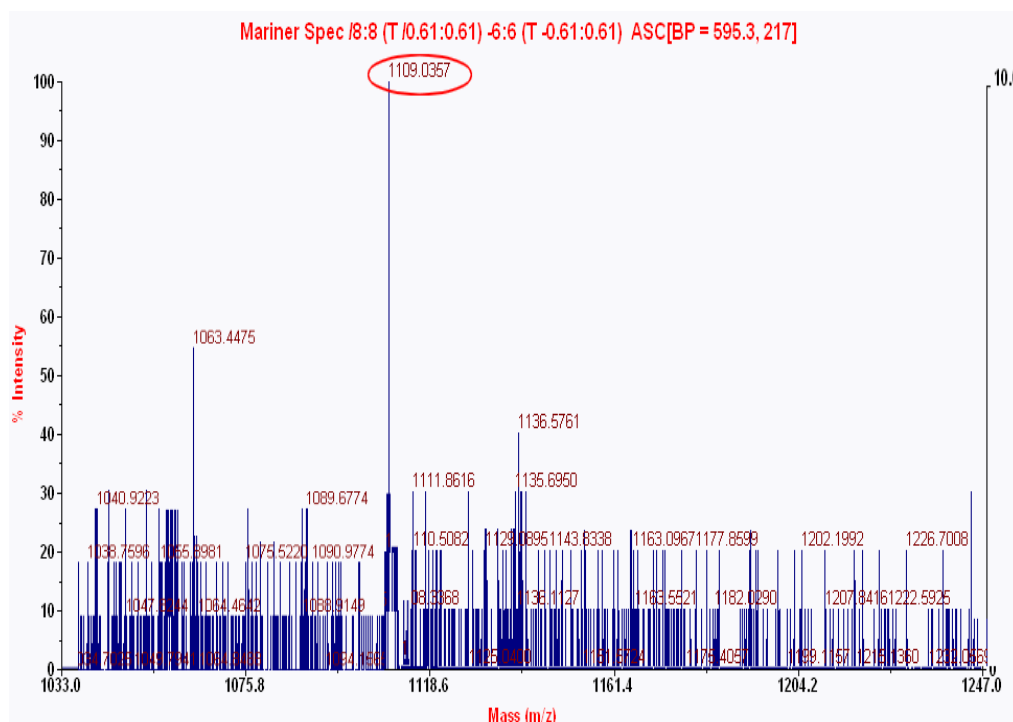
## 5.8 SINTESI DI PEP2-2-7

**PEP2-Gly-Gly-(Pro-Gly)<sub>3</sub>**

**Dap-Ahx-Gly-Cys(Trt)-Wang Resin**

**PEP2-Gly-Gly-(Pro-Gly)<sub>3</sub>**

Il peptide PEP2-7 è stato ottenuto per condensazione di 0.015 mmol di PEP2 con 1 eq (0.015 mmol) di PEP7 dopo rimozione del gruppo protettore Fmoc della glicina in posizione N-terminale, in presenza di 1 eq (0.015 mmol) di HOBt, 1 eq (2.5  $\mu$ L) di DIEA. La reazione di condensazione è stata lasciata decorrere sotto agitazione per un week-end a temperatura ambiente.



**Figura 37: Spettro ESI-MS di PEP2-7. MM calcolata = 2213.1 Da, MM determinata da  $[M+2H]^{2+} = 1109$  m/z.**

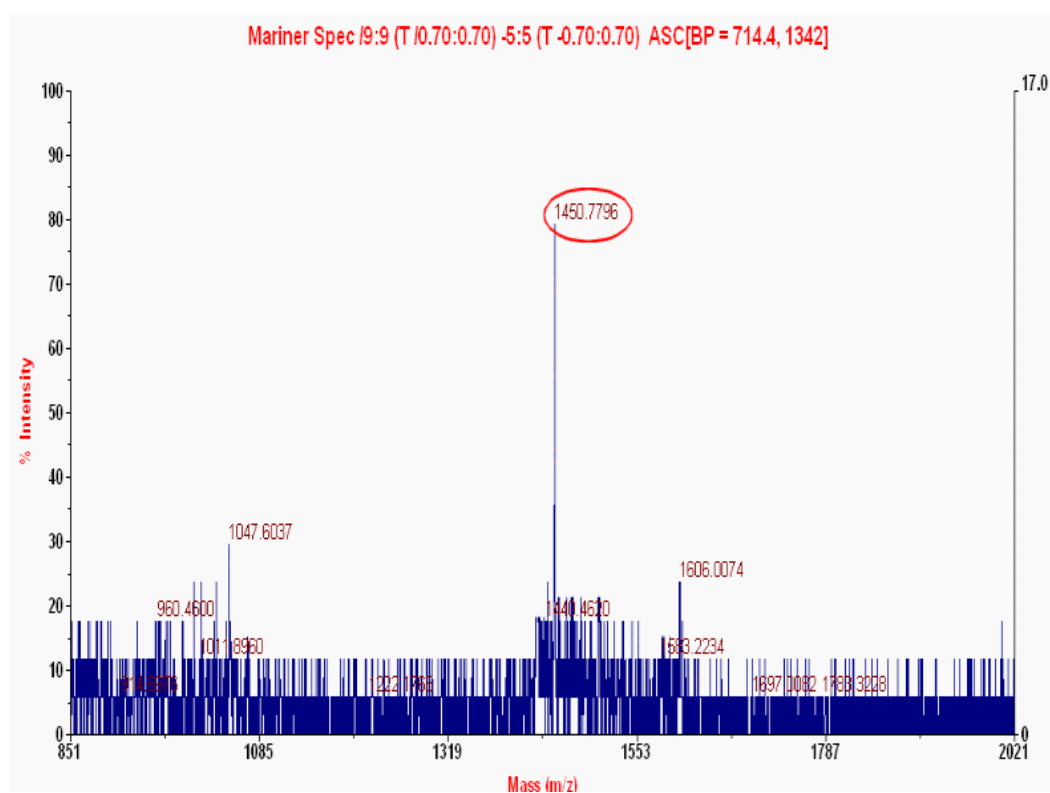
La resina, il gruppo protettore Boc della glicina in posizione N-terminale, e le protezioni ai gruppi funzionali presenti in catena laterale sono state rimosse per trattamento con una soluzione di TFA al 95%, in presenza di TIPS 2%, anisolo



2%, H<sub>2</sub>O 1%. Questa reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 45 min, la resina è stata separata per filtrazione e il prodotto grezzo è stato precipitato per aggiunta di Et<sub>2</sub>O.

Il peptide PEP2-2-7 è stato ottenuto per condensazione di 0.015 mmol di PEP2 con 1 eq (0.015 mmol) di PEP2-7, in presenza di 1 eq (0.015 mmoli) di HOBt, e 1 eq (2.5 µL) in DIEA. La reazione di condensazione è stata lasciata decorrere sotto agitazione per un week-end a temperatura ambiente.

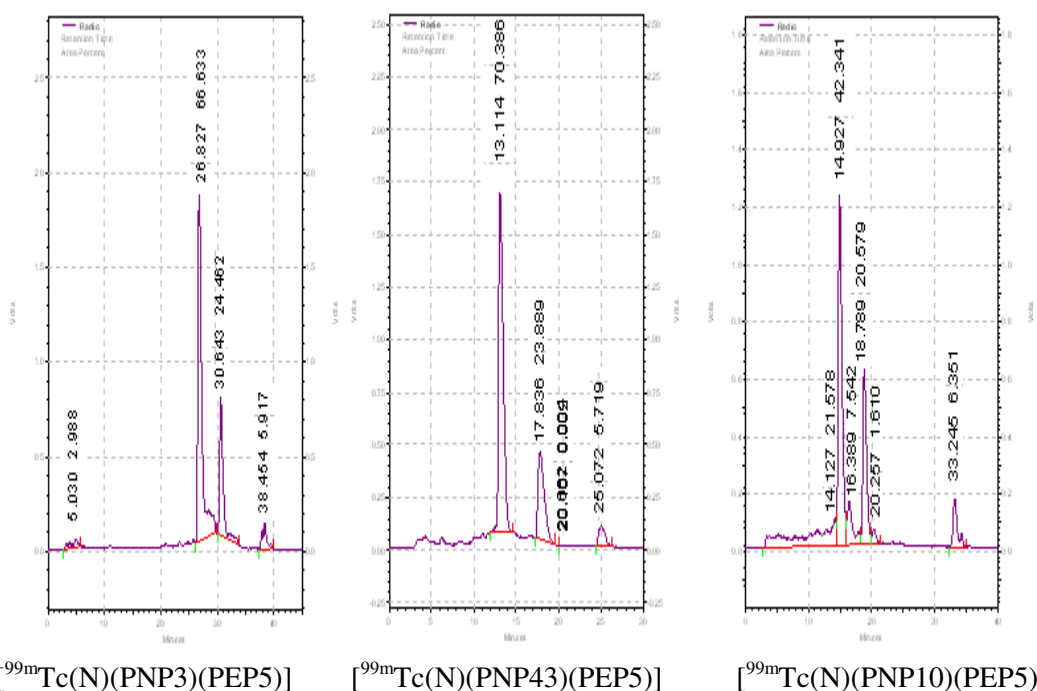
Il prodotto è stato liofilizzato, pesato, ottenendo 5 mg (resa 11.5%).



**Figura 38:** Spettro ESI-MS del peptide PEP2-2-7. MM calcolata = 2899 Da, MM determinata da  $[M+2H]^{2+} = 1450.5$  m/z.

## 5.9 FORMAZIONE DI COMPLESSI METALLICI CON PEP5

Il peptide PEP5 è stato utilizzato dal Gruppo del Prof. Bandoli (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche) per la formazione di complessi con  $^{99m}\text{Tc}$  con diversi ligandi.



**Figura 39: HPLC analitici di complessi [ $^{99m}\text{Tc}$ (N)(PNP)(PEP5)].** Le condizioni cromatografiche sono uguali per questi tre complessi metallici. Precolonna a fase inversa C18 Beckam (45 x 4.1) e colonna a fase inversa RP18 Symmetry shield (250 x 4.6) diametro 5  $\mu\text{m}$ . Eluenti; A:  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA), B:  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0.1% TFA). Flusso: 1 mL/min.  $\lambda_{\text{detector}} = 215 \text{ nm}$ . Gradiente: 5 min dal 15 al 25% di B, 19 min al 25% di B, 4 min dal 25 al 90%, 1 min al 90%, 5 min dal 90 al 25%. Tempi di ritenzione per l'isomero piú abbondante: per il primo complesso 26 minuti, per il secondo 13 minuti, per il terzo 14 minuti. Sono inoltre riportati nelle figure le percentuali relative dei due isomeri per ciascun composto.

## 5.10 STUDI DI CITOTOSSICITA E DI ADESIONE CELLULARE DELLA VITRONECTINA IN PRESENZA DI 7-(4-NITROFENIL)CARBONATO-PACLITAXEL

Allo IOV (Dr. A. Rosato) sono stati consegnati 5 mg di peptide [c(RGDfK)]-Suc-GRRFA-Eda-CO-O-Ptx per i saggi di citotossicità e per le prove di inibizione dell'adesione della vitronectina su cellule A375 di melanoma. Come atteso, lo studio di citotossicità (figura 29) dimostra che il paclitaxel libero inibisce completamente e dipendentemente dalla concentrazione la vitalità delle cellule A375 *in vitro*.

Al contrario, il paclitaxel coniugato con il peptide c(RGDfK)]-Suc-GRRFA-Eda-H riduce la vitalità cellulare solo alle più alte concentrazioni testate.

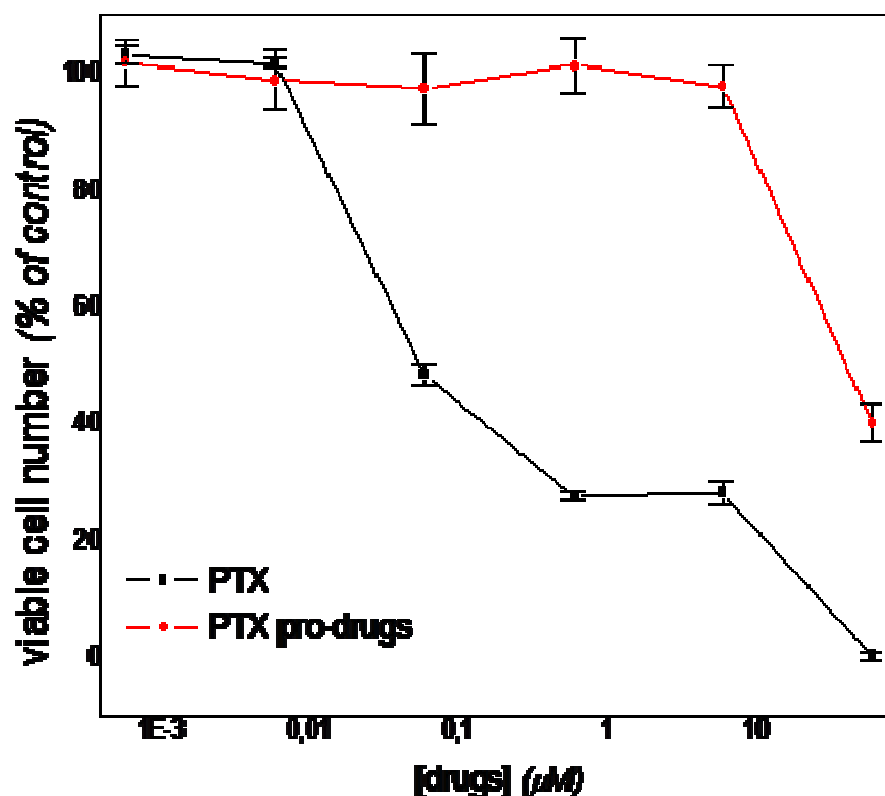
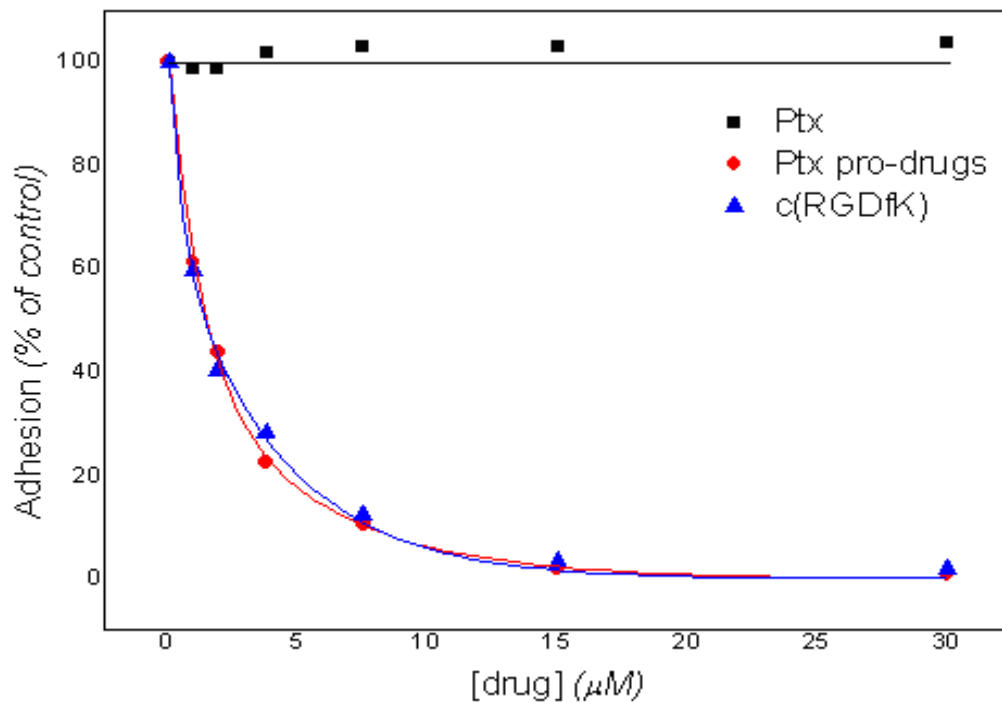


Figura 40: Cellule A375 del melanoma in presenza di concentrazioni crescenti di paclitaxel libero o coniugato. La percentuale di cellule in coltura sopravvissute è calcolata attraverso valori di assorbanza a 540 nm.

Lo studio di adesione evidenzia che il paclitaxel coniugato al peptide c(RGDfK)-Suc-GRRFA-Eda-H è veramente in grado di inibire completamente e dipendentemente dalla concentrazione il legame del ligando naturale vitronectina ai recettori delle integrine  $\alpha V\beta 3$  sovraespressi sulle cellule A375 del melanoma umano.



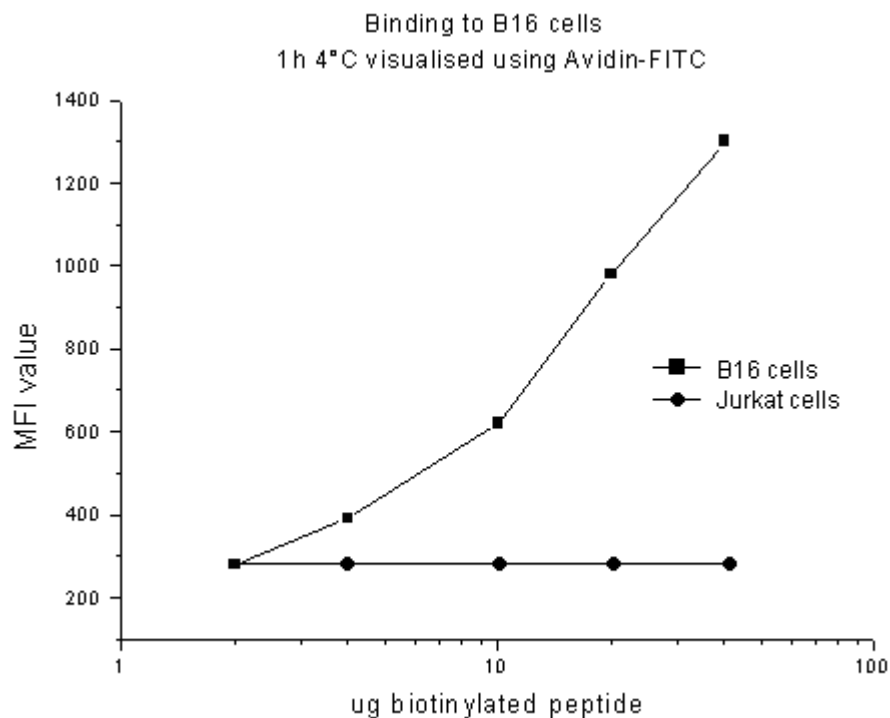
**Figura 41: Prove di adesione cellulare della vitronectina ai recettori delle integrine  $\alpha V\beta 3$  sovraespressi su cellule A375 del melanoma umano.**

La curva concentrazione/risposta del coniugato è sovrapponibile a quella del peptide c(RGDfK) libero. Invece, il paclitaxel non coniugato non ha effetti sull'adesione di vitronectina alle cellule A375.

## 5.11 STUDI DI BINDING DELL'ANOLOGO BIOTINILATO A CELLULE B16 DEL MELANOMA MURINO IN PRESENZA DI AVIDINA

Il peptide riprodotto la sequenza PEP5 e contenente un residuo di Lys(biotina) C-terminale consegnato al Dott. G. Fracasso (Dipartimento Di Patologia UNIVR) è stato utilizzato per realizzare prove di binding ai recettori MC1R sovraespressi su cellule B16 di melanoma murino.

Lo studio dimostra, attraverso l'aumento del segnale di fluorescenza, la specificità di legame del peptide in esame alle cellule B16 rispetto alle cellule Jurkat usate come riferimento.



**Figura 42: Aumento dell'intensità di fluorescenza dovuto all'interazione tra il complesso Avidina-Fluoresceinaisoticianato (FITC) e il peptide in esame. Lo studio è stato condotto su cellule B16 del melanoma murino. Lettura con citometro FacsCANTO.**



## 6. CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stata la sintesi di peptidi in grado di interagire con i recettori sovraespressi sul melanoma quali l'integrina  $\alpha V\beta 3$  e l'MC1R, e lo sviluppo di un complesso peptidico per il multi-targeting in grado di legare selettivamente e con grande efficienza entrambi i recettori. Per la sua realizzazione è stato sintetizzato un peptide ciclico di sequenza c(D-Phe-Lys-Arg-Gly-Asp), in grado di interagire con l'integrina  $\alpha V\beta 3$ , e un peptide lineare di sequenza H-Ahx- $\beta$ Ala-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>, in grado di interagire con il recettore MC1R. Poi è stato sintetizzato un linker in grado di legare all'estremità C-terminale un radioisotopo (ad esempio Re) o un farmaco antitumorale, ed all'estremità N-terminale le due sequenze peptidiche sopra riportate.

Caratteristica di questo linker è la presenza di due catene peptidiche contenenti la sequenza -(Gly-Pro)<sub>3</sub>-. Questa sequenza dà una sufficiente rigidità che permette di posizionare comodamente i due ligandi e nel contempo dà una flessibilità che permette piccoli spostamenti dell'intera struttura per facilitare il binding.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la sequenza ciclica cRGDFK sia in grado di interagire con buona specificità verso le cellule che sovraesprimono i recettori dell'integrina  $\alpha V\beta 3$ , mentre il peptide riprodotto la sequenza PEP5 e contenente un residuo di Lys(biotina) C-terminale è in grado di interagire con buona specificità verso le cellule che sovraesprimono i recettori MC1R.

Inoltre, i risultati ottenuti hanno evidenziato come la procedura utilizzata in questo lavoro di tesi per la sintesi del complesso peptidico contenente il linker coniugato

a due ligandi porti all'ottenimento del prodotto desiderato. Ma, le basse rese e l'impossibilità di ottenere strutture contenenti entrambi i ligandi ci portano a dire che sarà necessario sviluppare ulteriormente le ricerche fatte in questo lavoro di tesi per trovare nuove strategie di sintesi al fine di produrre quantità notevoli di prodotto essenziali per gli studi su modelli tumorali.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P.; Parkin, D. M. GLOBOCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC CancerBase No 5, version 2.0. IARC Press Lyon 2004.
- <sup>2</sup> Sullivan, D. C.; Kelloff, G. Seeing into cells. The promise of *in vivo* molecular imaging in oncology. *EMBO Rep* 2005, 6, 292-296.
- <sup>3</sup> Couvreur, P.; Vauthier, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* 2006, 23, 1417-1450.
- <sup>4</sup> Gibbs, W.W. Alle radici del cancro. *Le scienze* 2003, 420, 35-43.
- <sup>5</sup> Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: entering the mainstream. *Science* 2004, 303, 1818-1822.
- <sup>6</sup> Petrak, K. Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Disc. Tod.* 2005, 10, 1667-1673.
- <sup>7</sup> Bogenrieder, T.; Herlyn, M. Axis of evil: Molecular mechanism of cancer metastasis. *Oncogene* 2003, 22, 6524-6536
- <sup>8</sup> Loeb, L. A.; Loeb, K. R.; Anderson, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 776-781.
- <sup>9</sup> Loeb, L. A.; Springgate, C. F.; Battula, N. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res.* 1974, 34, 2311-2321.
- <sup>10</sup> Celotti, F. *Patologia generale e fisiopatologia*, EdiSES-Napoli, 2002, 33-40.
- <sup>11</sup> Haass, N. K.; Smalley, K. S. M.; Li, L.; Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research* 2005, 18, 150-159.
- <sup>12</sup> Porras, B. H.; Cockerell, C. J. Cutaneous malignant melanoma: Classification and clinical diagnosis. *Semin. Cutaneous Med. Surg.* 1997, 16, 88-96.
- <sup>13</sup> Bergers, G., Benjamin, L. E. "Tumorigenesis and the angiogenic switch". *Nat. Rev. Cancer* (2003), 3, 401- 410.
- <sup>14</sup> Gimbrone, M. A. jr, Cotran, R. S., Leapman, S. B., Folkman, J. "tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornea". *J. Natl. Cancer Inst.* (1974), 452, 413-427.

- <sup>15</sup> Ruoslahti, E. "Specialization of tumour vasculature". *Nat. Rev. Cancer* (2002), 2, 83-90.
- <sup>16</sup> Poste, G., Fidler, I. J. "The pathogenesis of cancer metastasis". *Nature* (1980), 283, 139-146.
- <sup>17</sup> Fidler, I. J., Kripke, M. L. "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor". *Science* (1997), 197, 893-895.
- <sup>18</sup> Cheong, I.; Huang, X.; Thornton, K.; Diaz, L. A., Jr.; Zhou, S. Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. *Cancer Res* 2007, 67, 9605-9608.
- <sup>19</sup> Russ, V.; Wagner, E. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy. *Pharm Res* 2007, 24, 1047-1057.
- <sup>20</sup> Albelda, S. M.; Buck, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 1990, 4, 2868-2880.
- <sup>21</sup> Ni, J.; Powell, R.; Baskakov, I. V.; DeVico, A.; Lewis, G. K.; Wang, L. X. Synthesis, conformation, and immunogenicity of monosaccharide-centered multivalent HIV-1 gp41 peptides containing the sequence of DP178. *Bioorg Med Chem* 2004, 12, 3141-3148.
- <sup>22</sup> van der Flier, A.; Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001, 305, 285-298.
- <sup>23</sup> Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. Recent Carbohydrate-Based Chemoselective Ligation Applications. *Curr Org Synth* 2005, 2, 59-81.
- <sup>24</sup> Carmeliet, P. "Angiogenesis in health and disease". *Nat. Med.* (2003), 9, 653-660.
- <sup>25</sup> Albelda, S. M.; Mette, S. A.; Elder, D. E.; Stewart, R.; Damjanovich, L.; Herlyn, M.; Buck, C. A. Integrin Distribution in Malignant Melanoma: Association of the  $\beta_3$  Subunit with Tumor Progression. *Cancer Res* 1990, 50, 6757-6764.
- <sup>26</sup> Felding-Habermann, B. M.; Mueller, B. M.; Romerdhal, C. A.; Cheresch, D. A. Involvement of integrin  $\alpha_V$  gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Inv.* 1992, 89, 2018-2022.
- <sup>27</sup> Brooks, P.; Clark, R.; Cheresch, D. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994, 264, 569-571.

- <sup>28</sup> Loftus, J. C.; Smith, J. W.; Ginsberg, M. H. Integrin-mediated cell adhesion: The extracellular face. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 25235-25238.
- <sup>29</sup> Brooks, P. C.; Montgomery, A. M.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresh, D.A. Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994, 79, 1157-1164.
- <sup>30</sup> Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry - A European Journal* 2003, 9, 2717-2725.
- <sup>31</sup> Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K.; de Leij, L. F.; Molema, G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J Control Release* 2002, 83, 241-251.
- <sup>32</sup> Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D. New perspective in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987, 238, 491-497.
- <sup>33</sup> F.-Z.; Liu, G.; Gupta, S.; Zhu, Z.; Rusckowski, M.; Hnatowitch, D. In vitro and in vivo evaluation of technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of  $\alpha v \beta 3$  integrin for tumor imaging. *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 561-570.
- <sup>34</sup> Tong, R.; Cheng, J. Anticancer Polymeric Nanomedicines. *Polymer Reviews* 2007, 47, 345 - 381.
- <sup>35</sup> Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. Inhibition of cell adhesion to fibronectin by oligopeptidesubstituted polynorbornenes. *J Am Chem Soc* 2001, 123, 1275-1279.
- <sup>36</sup> Milenic, D. E. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr. Pharm. Des.* 2002, 8, 1749-1764.
- <sup>37</sup> Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc* 2002, 124, 14922-14933.
- <sup>38</sup> Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006, 45, 2348-2368.
- <sup>39</sup> Fichter, K. M.; Zhang, L.; Kiick, K. L.; Reineke, T. M. Peptide-Functionalized Poly(ethylene glycol) Star Polymers: DNA Delivery Vehicles with Multivalent Molecular Architecture. *Bioconjug Chem* 2008, 19, 76-88.

<sup>40</sup>Jones, J. Aminoacid and peptide synthesis. Oxford University Press-Oxford, 1991, 25-41.

<sup>41</sup>Write, P.; Beythien, J. Poster 95, In 4th International Symposium on Solid Phase Chemistry e Combinatorial Chemistry Libraries, Edimburg, September 1995.

<sup>42</sup>Write, P.; Beythien, J. "Poster 95", 4th International Symposium on Solid Phase Chemistry & Combinatorial Chemistry Libraries, Edinburgh, September 1995.

<sup>43</sup>Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. J. Org. Chem.1972, 37, 3404-3409.

<sup>44</sup>Chhabra, S. R.; Hothi, B.; Evans, D. J.; White, P. D.; Bycroft, B. W.; Chan, W. C. An appraisal of new variant of ivDde amine protecting group for solid phase peptide synthesis. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 1603-1606.

<sup>45</sup> Jones, J. Aminoacid and peptide synthesis. Oxford University Press-Oxford, 1991, 25-41.