



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
Dipartimento di Scienze Chimiche  
Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

Sintesi e caratterizzazione di peptidi membrano-attivi in grado  
di promuovere la fusione tra liposomi modello

**Relatrice:** Prof.ssa Marta De Zotti

**Controrelatore:** Prof. Marco Frasconi

**Laureando:** Giacomo Bettin

ANNO ACCADEMICO: 2022/2023



## SOMMARIO

ABBREVIAZIONI .....	I
RIASSUNTO .....	III
1 INTRODUZIONE.....	1
1.1 Peptidi di fusione .....	1
1.2 Peptaibolici .....	5
1.3 Attività di membrana .....	7
2 SCOPO DELLA TESI.....	10
3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	12
3.1 Sintesi peptidica per via chimica.....	12
3.1.1 Sintesi su fase solida.....	12
3.1.2 Resine .....	14
3.1.3 Gruppi protettori .....	16
3.1.4 Attivatori di <i>coupling</i> .....	18
3.2 Sintesi in soluzione .....	19
3.3 Sintesi di Adenina-CH <sub>2</sub> COOH.....	21
3.4 Ottimizzazione della sintesi di TricKL-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> .....	22
3.5 Sintesi di Ade-TricKL-Thym .....	27
3.6 Sintesi di Cbz-TricKL-Cbz.....	28
3.7 Studio conformazionale mediante dicroismo circolare.....	30
3.8 Leakage liposomiale .....	34
3.9 Dynamic Light Scattering (DLS) .....	39
4 PARTE SPERIMENTALE .....	49
4.1 Materiali e metodi .....	49
4.1.1 Reagenti e solventi.....	49
4.1.2 Strumentazioni e metodi.....	49
4.2 Studio di permeabilità su membrane lipidiche artificiali PC/Ch e PE/PG.....	51
4.2.1 SUV PC/CH.....	52
4.2.2 SUV PE/PG .....	53

4.2.3 Misure di intensità di fluorescenza .....	54
4.3 Dynamic Light Scattering (DLS) .....	54
4.4 Transmission electron microscopy (TEM).....	56
4.5 Sintesi e caratterizzazioni .....	57
4.5.1 Sblocco del peptide dalla resina .....	58
4.5.2 <i>Kaiser test</i> .....	59
4.5.3 Purificazione .....	59
4.5.4 Sintesi in soluzione.....	60
4.5.5 Sintesi Ade-CH <sub>2</sub> COOH.....	60
4.5.6 Sintesi Ade-TrickL-Thym.....	61
4.5.7 Sintesi Cbz-TrickL-Cbz .....	63
5 CONCLUSIONI.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69

## ABBREVIAZIONI

Aib	Acido $\alpha$ -amminoisobutirrico
Boc	ter-butilossicarbonile
Cbz	Benzyloxycarbonyloxy
Cbz-Osu	N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimide
CF	5/6-Carbossifluoresceina
Ch	Colesterolo
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimmide
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	N,N-Dimetilformammide
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimmide
ESI	Electron Spray Ionization
Et	Etile
EtOH	Etanolo
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
HATU	Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium
HEPES	Acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico
HFIP	1,1,1,3,3,3-esafuoro-2-propanolo
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazolo

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Lol	Leucinolo
LUVs	Large Unilamellar Vesicles
MeOH	Metanolo
NMM	N-metilmorfolina
nOct	n-ottanoile
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PG	Phosphatidylglycerol
SUVs	Small Unilamellar Vesicles
TEM	Transmission electron microscopy
TOF	Analizzatore Time Of Flight

## RIASSUNTO

Approfonditi studi sulla fusione virale hanno portato all'identificazione di piccoli segmenti delle proteine di fusione, costituiti da 20-30 residui, con un ruolo preponderante nel processo di fusione delle membrane. In quest'ottica, con il termine peptide di fusione si fa riferimento non solo alla regione corrispondente delle proteine di fusione, ma anche a sequenze peptidiche con capacità fusogeniche, che mimino questi segmenti. Diventa chiaro che indagare in quale modo queste sequenze medino le interazioni tra le membrane sia un aspetto fondamentale per lo sviluppo di nuove strategie preventive e farmacologiche.

In questo lavoro di Tesi è stato studiato il modo in cui le modifiche strutturali di un peptide possano modularne l'attività di membrana.

Il punto di partenza è stata la modifica strutturale del seguente peptide:

Ade-Aib<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Aib<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Aib<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Thym.

Studi precedenti hanno mostrato la capacità della sequenza di promuovere la fusione tra membrane modello cariche negativamente del tipo PE/PG; mentre con membrane zwitterioniche, di dimensioni analoghe, del tipo PC/Ch è stato evidenziato solamente il fenomeno del *leakage*.

Le sequenze modificate e sintetizzate su fase solida sono:

- Ade-Leu<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Leu<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Leu<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Thym

- Cbz- Leu<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Leu<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Leu<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Cbz.

Ottimizzato il processo di sintesi sono state effettuate analisi conformazionali. Gli studi con Dicroismo Circolare hanno permesso di osservare come le sostituzioni effettuate nella sequenza peptidica non abbiano portato a variazioni conformazionali significative in ambiente membranario mimetico.

Infine sono stati svolti studi di interazione con membrane artificiali per il peptide sintetizzato con le nucleobasi. Attraverso studi di DLS e TEM è stato possibile evincere che quest'ultimo sia in grado di promuovere la fusione sia tra le membrane del tipo PE/PG che tra PC/Ch.





# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Peptidi di fusione

Negli ultimi anni lo sviluppo di strategie per comprendere e descrivere il meccanismo delle infezioni ha assunto un ruolo sempre più importante nell'ambito della ricerca. In tempi recenti, la pandemia da COVID-19 ha spinto l'intera comunità scientifica a dedicare una grande quantità di sforzi, lavoro e risorse per studiare i meccanismi dell'infezione e sviluppare nuove strategie per combattere il virus. In particolare, la ricerca improntata sulla proteina Spike virale, che svolge un ruolo importante nell'infettività del SARS-CoV-2, ha evidenziato la presenza di una sequenza peptidica precisa, denominata peptide di fusione, coinvolta nel processo di fusione delle membrane, attività attraverso la quale il virus riesce a penetrare nella cellula ospite e infettare l'organismo (1).

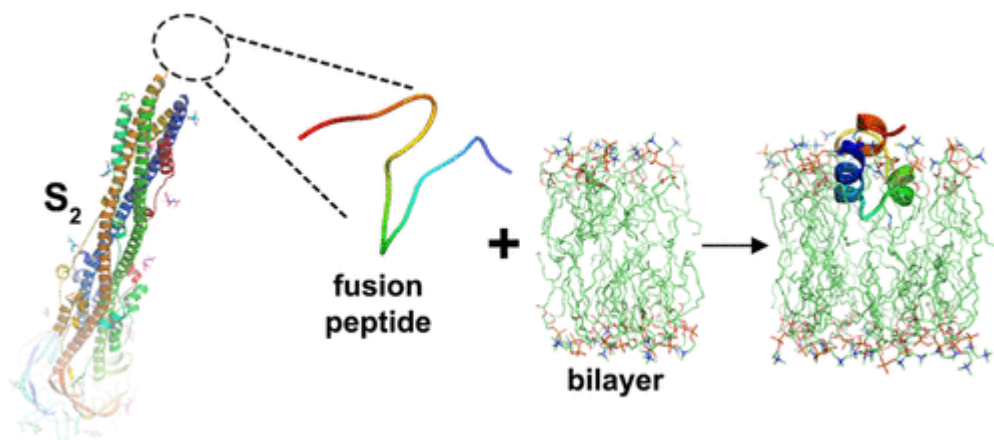


Figura 1.1 Rappresentazione schematica dell'inserimento del peptide di fusione di SARS-CoV-2 nel doppio strato fosfolipidico (2)

Diventa chiaro che indagare in quale modo queste sequenze peptidiche mediano la fusione sia un aspetto fondamentale per lo sviluppo di nuove strategie preventive e farmacologiche.

La fusione di membrana, tuttavia, non è un fenomeno solo legato all'azione dei patogeni, ma avviene continuamente in modo ubiquitario in tutte le cellule eucariotiche, anche se tutt'ora non si conosce ancora dettagliatamente il meccanismo con cui si realizza a livello intracellulare (3).

Come per il SARS-CoV-2, molti virus sfruttano il meccanismo di fusione per penetrare e infettare le cellule; questi virus sono ricoperti dal pericapside, costituito da un doppio strato fosfolipidico alternato da glicoproteine. Non essendo un processo termodinamicamente favorito, sono proprio le proteine presenti sull'involucro esterno dei virus che mediano la fusione, aprendo un poro nella cellula bersaglio.

Le condizioni in cui si verifica questo fenomeno prevedono che i lipidi si fondano in ambiente acquoso e che le membrane coinvolte siano separate e ben definite prima dell'inizio del processo. La fusione inizia quando il contatto tra le membrane porta alla formazione di una giunzione iniziale, che con l'avanzamento del fenomeno si allarga fino a che un'unica membrana arrivi a contenere il materiale che era presente all'interno delle due membrane iniziali (4).

Nel dettaglio si possono descrivere quattro passaggi distinti di questo processo:

- Il contatto tra due membrane;
- fusione dei *bilayers* lipidici in un unico strato continuo;
- fusione transmembrana;
- miscelazione del contenuto delle membrane attraverso la formazione di pori. (5)

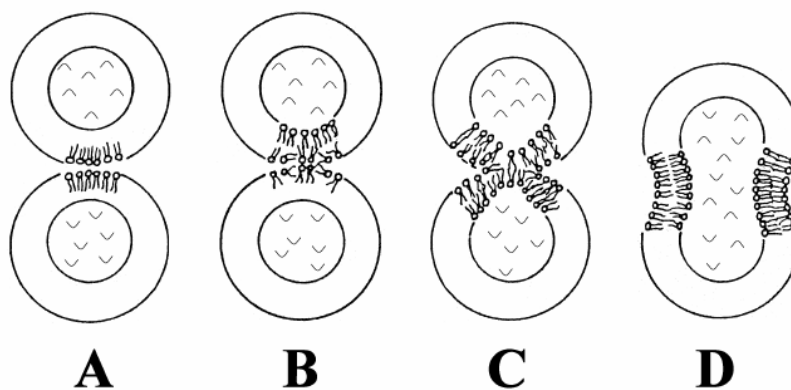


Figura 1.2 A: contatto tra due membrane. B: fusione dei *bilayers* lipidici C: fusione transmembrana.  
(5) D: miscelazione del contenuto delle membrane

Come precedentemente accennato, approfonditi studi sulla fusione virale hanno portato all'identificazione di piccoli segmenti della proteina di fusione, costituiti da 20-30 residui, con un ruolo preponderante nel processo di fusione delle membrane. (6) In quest'ottica, con il termine peptide di fusione si fa riferimento non solo alla regione corrispondente delle proteine di fusione, ma anche a sequenze peptidiche con capacità fusogeniche, che mimino questi segmenti. (7)

In questo lavoro di Tesi, con il termine peptide di fusione si fa quindi riferimento a sequenze peptidiche modello progettate per essere fusogeniche. Infatti, in letteratura sono riportati come peptidi di fusione delle sequenze modello progettate per imitare i segmenti delle proteine virali di fusione in grado di perturbare le membrane. (8)

Studi sistematici hanno evidenziato alcune caratteristiche strutturali che sembrano maggiormente associate al fenomeno della fusione:

- Elevata presenza di residui idrofobici, in particolare Gly e Ala;
- Presenza di una struttura elicoidale in presenza delle membrane;
- Residui aromatici in catena laterale o alle estremità della sequenza (7).

Un'altra caratteristica che accomuna gran parte dei peptidi di fusione è la presenza di una conformazione elicoidale in ambiente di membrana (7). Questo tipo di struttura è ritenuta importante per la promozione della fusione durante la fase di contatto fra le membrane (9) (10).

Considerando le interazioni con i liposomi, si nota come i peptidi di fusione agiscano spesso mediante un meccanismo di *leaky-fusion*, che associa alla fusione una maggiore permeabilità delle membrane, dovuta alla promozione da parte del peptide di un *lipid-mixing* tra i liposomi, che destabilizza il doppio strato fosfolipidico. (11) Questa combinazione di destabilizzazione e fusione delle membrane mediata da peptidi comporta una difficoltà nel dare una definizione specifica di peptide di fusione. (7)

Può accadere, infatti, che insieme al fenomeno di *leakage*, o prima che avvenga, si osservi l'aggregazione dei liposomi e la fusione delle membrane.

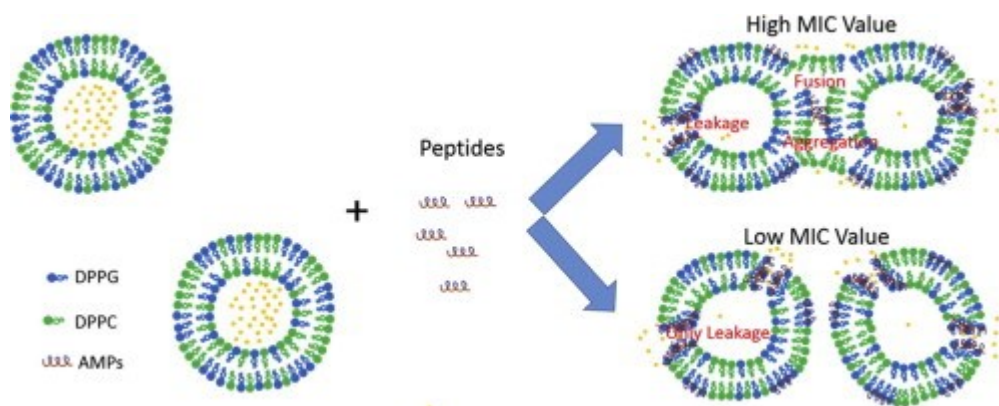


Figura 1.3. Interazione tra membrane modello DPPG/DPPC e peptidi antimicrobici: fusione e leakage. (12)

Come dimostrato da *Sun et al.* (12), l'aggregazione dei liposomi è un prerequisito necessario affinché si osservi la fusione: in questo, la presenza di residui idrofobici nel peptide di fusione risulta fondamentale. Al contrario, il leakage delle membrane è un fenomeno legato solamente all'attività antimicrobica del peptide. I fenomeni di aggregazione e fusione quindi tendono a diminuire le proprietà antimicrobiche dei peptidi, nel caso in cui avvengano insieme al leakage (12).

*Ramamourthy, G et al.* (13) studiando l'attività antimicrobica di una serie di peptidi da loro sintetizzati hanno osservato che uno di questi, denominato KW<sub>5</sub>, è in grado di aggregare e promuovere la fusione tra LUVs del tipo PE/PG e PC/Ch. La struttura del peptide in questione è riportata in figura 1.4. L'elevata presenza di triptofani nella sequenza è importante per l'interazione con le interfacce lipidiche delle membrane (14) (15).

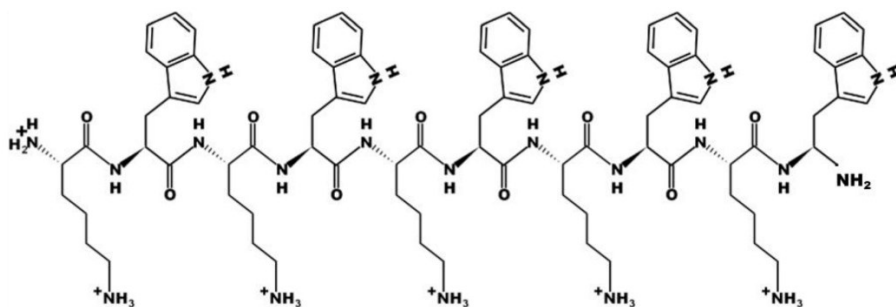


Figura 1.4 Struttura di KW<sub>5</sub>: H-Lys-Trp-Lys-Trp-Lys-Trp-Lys-Trp-Lys-Trp (13)

Sono stati effettuati in seguito degli studi sulle proprietà antifungine dello stesso peptide. La scarsa selettività mostrata per il riconoscimento delle membrane modello si è rivelata utile per l'eradicazione del fungo *C. Albicans*: è stato dimostrato che dopo la traslocazione all'interno della cellula possa legarsi ad RNA e DNA con conseguente eradicazione di *C. Albicans*. (13)

## 1.2 Peptaibolici

Le architetture molecolari progettate in questo lavoro di Tesi prendono spunto da un'importante classe di peptidi antimicrobici naturali, detti peptaibolici, prodotti da funghi del genere *Trichoderma*. (16) (17) I peptidi antimicrobici sono presenti come componente fondamentale del sistema immunitario di molti organismi (18) (19) (20) (21), tra i quali funghi (16), piante (22), procarioti (23) e cellule eucariotiche degli animali (24) (25).

La sequenza dei peptaibolici è caratterizzata dalla presenza dell' $\alpha$ -amminoacido non codificato Aib (acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico) e da un amminoalcol, generalmente leucinolo o fenilalaninolo, all'estremità C-terminale. Sono riportate in figura 1.3 le strutture di Aib e Lol.

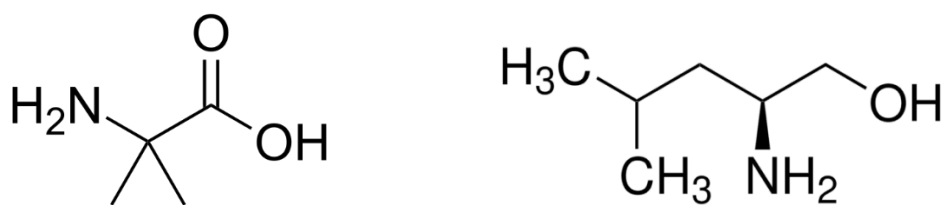


Figura 1.2 A sinistra: struttura dell'amminoacido Aib. A destra: struttura dell'1,2-amminoalcol leucinolo (Lol).

Il numero di residui amminoacidici nei peptaibolici è compreso tra 4 e 21 e il loro peso molecolare spazia da circa 500 Da a circa 2100 Da. (26)

L'attività di questi peptidi antimicrobici è legata ad un'azione membranolitica (27): interagendo con la membrana batterica la rendono permeabile, causando la morte cellulare (28) (29).

Una delle caratteristiche che contraddistingue i peptaibolici è la presenza di

strutture secondarie elicoidali come l' $\alpha$ -elica e l'elica  $3_{10}$ , stabilizzate dall'amminoacido Aib. (30) Quest'ultimo risulta essere un forte induttore di strutture elicoidali perché in grado di restringere lo spazio conformazionale dei legami in cui è coinvolto, grazie all'ingombro dei due gruppi metilici presenti in posizione  $\alpha$ .

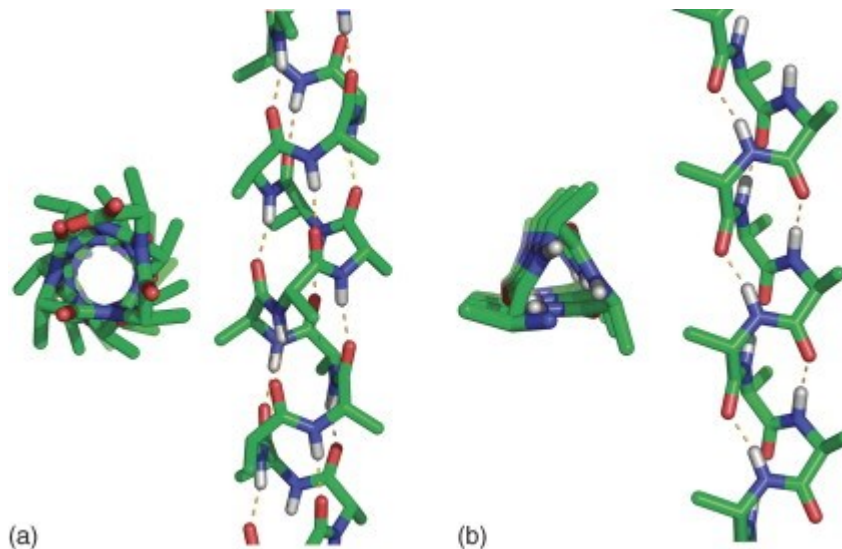


Figura 1.3 Vista perpendicolare e lungo l'asse dell'elica delle strutture a)  $\alpha$ -elica e b) elica  $3_{10}$ .

La conformazione  $\alpha$ -elica è stabilizzata da legami idrogeno tra gruppi NH e CO della catena principale. Il gruppo CO di ciascun amminoacido è unito da un legame idrogeno al gruppo NH dell'amminoacido che si trova quattro residui più avanti nella sequenza lineare. Quindi tutti i gruppi CO ed NH sono uniti da legami idrogeno, ad eccezione di quelli degli amminoacidi terminali della catena. Ciascun residuo è spostato rispetto al precedente di 1.5 Å lungo l'asse dell'elica e forma con esso un angolo di  $100^\circ$ , il che significa che vi sono 3.6 residui di amminoacidi per ogni giro dell'elica. (31) Legami idrogeno intramolecolari stabilizzano anche l'elica  $3_{10}$ : in questo caso vengono coinvolti l'ossigeno e l'idrogeno dei gruppi ammidici coinvolgenti residui distanti 3 amminoacidi. Essendoci 3.2 residui per giro, quest'elica risulta più stretta e allungata rispetto all' $\alpha$ -elica. (32)

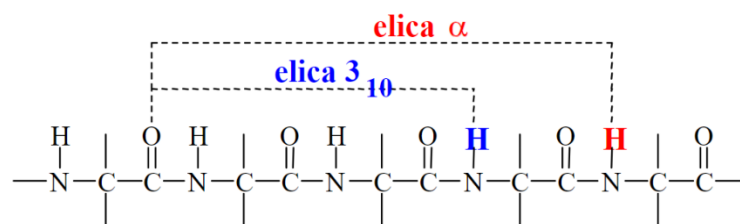


Figura 1.5 Legami idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche ( $3_{10}$  e  $\alpha$ ).

È stato osservato che al crescere della lunghezza del peptide o diminuendo i residui di Aib, si forma preferibilmente l' $\alpha$ -elica; viceversa, numerosi residui di Aib e sequenze corte mostrano più frequentemente l'elica  $3_{10}$ .

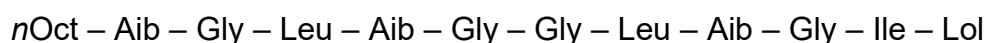
Nome	Sequenza
Alameticina	Ac- <b>Aib</b> -Pro- <b>Aib</b> -Ala- <b>Aib</b> -Ala-Gln- <b>Aib</b> -Val- <b>Aib</b> -Gly-Leu- <b>Aib</b> -Pro-Val- <b>Aib</b> - <b>Aib</b> -Glu-Gln-Fol
Tricovirina	Ac- <b>Aib</b> -Asn-Leu- <b>Aib</b> -Pro-Ser-Val- <b>Aib</b> -Pro- <b>Aib</b> -Leu- <b>Aib</b> -Pro-Lol
Cervinina	Ac-Leu- <b>Aib</b> -Pro- <b>Aib</b> -Leu- <b>Aib</b> -Pro-Ala- <b>Aib</b> -Pro-Val-Lol
Tricogina GA IV	FA- <b>Aib</b> -Gly-Leu- <b>Aib</b> -Gly-Gly-Leu- <b>Aib</b> -Gly-Ile-Lol
Triconingina KB I	FA- <b>Aib</b> -Gly-Val- <b>Aib</b> -Gly-Gly-Val- <b>Aib</b> -Gly-Ile-Lol
Tricodecenina	FA-Gly-Gly-Leu- <b>Aib</b> -Gly-Ile-Lol
Peptaibolina	Ac-Leu- <b>Aib</b> -Leu- <b>Aib</b> -Fol

Tabella 1.1 Nome e sequenza di alcuni peptaibolici. FA (fatty acid): gruppo acilico con un numero di atomi di carbonio compresi tra 8-15.

### 1.3 Attività di membrana

Di particolare rilevanza per questo lavoro di Tesi risulta l'attività sulle membrane biologiche della tricogina GA IV.

Isolato dal fungo *Trichoderma Longibrachiatum*, questo peptaibolico possiede la seguente struttura primaria:



Nonostante sia un peptide più corto rispetto ad altri peptaibolici, manifesta caratteristiche antibatteriche paragonabili a sequenze più lunghe (33).

I suoi possibili meccanismi di azione sulle membrane biologiche è riportato in figura 1.3.1.

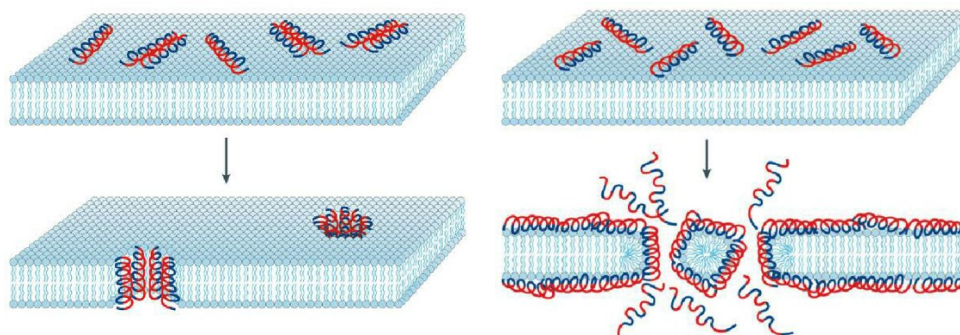


Figura 1.64 A sinistra: meccanismo di interazione di tricogina GA IV con modello a “doghe di botte”.  
A destra: meccanismo di interazione di tricogina GA IV con modello a “tappeto”. (34)

Il modello cosiddetto a “doghe di botte” prevede la penetrazione del peptide all’interno del doppio strato fosfolipidico grazie all’associazione di due molecole di tricogina: si ipotizza che l’interazione non covalente porti alla formazione di dimeri in grado di attraversare le membrane. Più unità di questi dimeri porterebbero alla formazione di un poro; così assemblati, si formerebbe un canale cavo nella membrana, simile alla vicina disposizione delle doghe di una botte (35).

Diversamente, con il modello “a tappeto” si ipotizza una disposizione parallela del peptide rispetto al doppio strato fosfolipidico; accumulandosi, il peptide porterebbe ad una modifica strutturale dell’impaccamento dei fosfolipidi causandone il disfacimento.

Con analoghi peptidici della tricogina sono stati svolti diversi studi sulla permeabilità di membrane modello, mediante esperimenti di *leakage*. (36) (37) (38) Grazie a questi studi, è stato possibile identificare alcune variazioni strutturali, come la sostituzione di residui di glicina con residui di lisina, in grado di modularne l’attività membranolitica. In particolare, l’analogo della tricogina con Lys al posto di Gly:



dove Ade e Thym sono derivati delle nucleobasi adenina e timina recanti un gruppo carbossilico, ha mostrato una certa capacità di promuovere la fusione tra membrane modello cariche negativamente del tipo PE/PG; mentre con membrane zwitterioniche, di dimensioni analoghe, del tipo



PC/Ch è stato evidenziato solamente il fenomeno del *leakage*. Questi studi sono alla base del presente lavoro di Tesi.

## 2 SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di Tesi mira ad identificare le caratteristiche di peptidi membrano-attivi, che li rendano in grado di promuovere la fusione tra membrane fosfolipidiche modello. L'attività di fusione di questi ultimi sarà verificata mediante *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Transmission Electron Microscopy* (TEM).

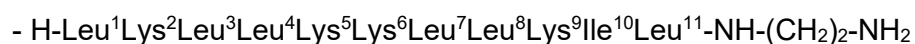
Il punto di partenza sarà la modifica strutturale del peptide: Ade-Aib<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Aib<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Aib<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Thym.

Studi precedenti a questo lavoro di Tesi hanno mostrato la capacità di questo peptide di promuovere la fusione tra membrane modello cariche negativamente del tipo PE/PG; mentre con membrane zwitterioniche, di dimensioni analoghe, del tipo PC/Ch è stato evidenziato solamente il fenomeno del *leakage*.

Si ipotizza che la presenza di sistemi aromatici eterociclici, come le basi azotate, stabilizzino l'interazione tra le membrane sfavorendo il fenomeno del *leakage*. Ritenendo la presenza delle basi fondamentale per osservare il fenomeno della fusione, si è scelto in un primo momento di mantenerle alle estremità del peptide. Si proverà ad eliminare totalmente dalla sequenza peptidica l'amminoacido strutturante Aib, sostituendolo con l'amminoacido Leu. In sede di progettazione dell'architettura molecolare, questa decisione è stata presa con un duplice obiettivo: provare ad aumentare l'idrofobicità del peptide per incrementarne l'attività di fusione e, al contempo, osservarne il comportamento strutturale in ambiente di membrana.

In seguito, si proverà a sintetizzare un analogo della sequenza appena descritta, sostituendo le basi azotate con il gruppo Cbz.

Le sequenze che saranno sintetizzate in questo lavoro sono:



- Ade-Leu<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Leu<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Leu<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Thym  
Ade-TrickL-Thym;
- Cbz- Leu<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Leu<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Leu<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Cbz  
Cbz-TrickL-Cbz.

Ci si pone, come obiettivo, lo sviluppo di una strategia sintetica efficace che porti all'ottenimento delle sequenze con un buon grado di purezza, limitando la comparsa di sequenze incomplete o delete.

Si testerà infine la capacità dei peptidi di modulare l'attività di membrana con le SUVs PE/PG e PC/Ch, con l'obiettivo di osservarne la fusione.

Non avendo a disposizione dei peptidi modello per verificare la fusione delle membrane PC/Ch, sarà utilizzato il TAT come standard di paragone.

Il peptide TAT è una sequenza derivata dal transattivatore trascrizionale del virus dell'immunodeficienza umana, ed è definito come *cell-penetrating peptide*. (39) (40) Questa categoria di peptidi è caratterizzata da sequenze corte in grado di penetrare la barriera lipidica delle cellule, fondendone le membrane.

La capacità di modificare la permeabilità di membrana sarà svolta mediante esperimenti di *leakage*, misurando le quantità di carbossifluoresceina rilasciata dalle membrane.

## **3 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **3.1 Sintesi peptidica per via chimica**

Nel corso degli anni, i progressi della sintesi organica hanno reso disponibili sistemi reattivi completamente nuovi, in relazione alle conoscenze della chimica classica. Tutto ciò ha reso più accessibile il concepimento di nuove strategie per la realizzazione di architetture molecolari complesse quali, ad esempio, quelle che caratterizzano le molecole d'interesse biologico. Nella fattispecie, la sintesi chimica svolge un ruolo essenziale nello studio dei peptidi biologicamente attivi e nuove strategie di sintesi sono continuamente elaborate al fine di realizzare un gran numero di molecole. Per la sintesi peptidica svolta in questo lavoro sono state utilizzate rispettivamente due strategie: la sintesi su fase solida per ottenere la sequenza amminoacidica e la sintesi in soluzione per la modificazione delle funzioni N-terminali.

#### **3.1.1 Sintesi su fase solida**

Introdotta da Bruce Merrifield nel 1963 (41), la sintesi peptidica su fase solida aveva lo scopo di risolvere una serie di problemi riscontrabili nella sintesi peptidica in soluzione, tra i quali, la difficoltà di purificazione degli intermedi peptidici e in particolare la lentezza del processo di sintesi. La strategia utilizzata consiste nel legare l'amminoacido C-terminale di un peptide target ad un polimero insolubile e nell'allungare il peptide passo-passo in direzione C→N terminale, aggiungendo ad ogni stadio un residuo amminoacidico opportunamente protetto al gruppo  $\alpha$ -amminico ed eventualmente in catena laterale, nonché attivato sul gruppo  $\alpha$ -carbossilico. (41) Conclusa la sintesi, il peptide viene rimosso dalla resina: la condizione di rilascio deve essere ortogonale a quelle utilizzate per la rimozione temporanea dei gruppi protettori degli amminoacidi entranti.

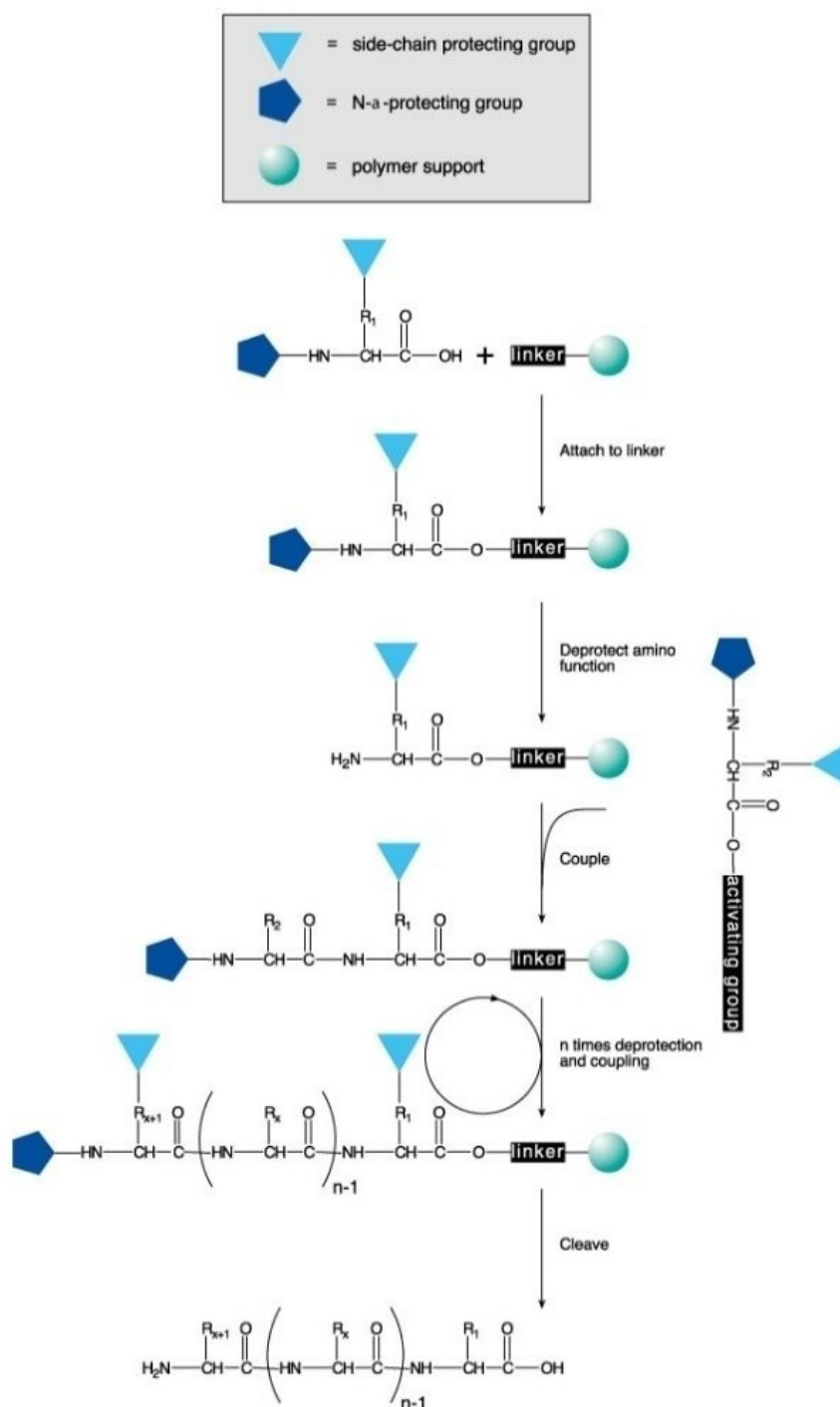


Figura 3.1. Schema generale della sintesi peptidica in fase solida (42)

Il principale vantaggio dell'uso di un polimero supportante la catena peptidica risiede nel fatto che, a differenza di ciò che accade per la sintesi in soluzione, tutti i processi intermedi di purificazione vengono sostituiti da una serie di lavaggi e filtrazioni del peptide legato alla resina, che

permettono di eliminare i reagenti in eccesso ed evitare qualsiasi perdita di materiale. L'interezza della sintesi viene svolta all'interno di un reattore che permette lo svolgimento di tutti i passaggi sopraelencati senza alcun trasferimento del materiale peptidico. (43)

### 3.1.2 Resine

Le resine sono supporti polimerici inerti caratterizzati da granuli, spesso costituiti da polistirene reticolato con 1-2% di divinilbenzene (figura 3.2). (41)

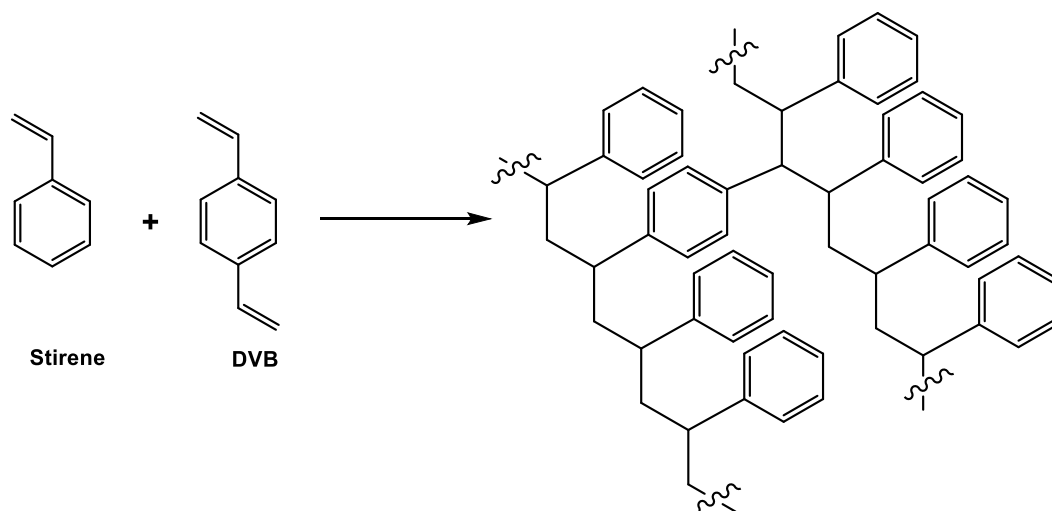


Figura 3.2 Struttura delle resine del tipo stirene/divinilbenzene (DVB)

La reticolazione assume un ruolo fondamentale per migliorare la resistenza meccanica del supporto senza comprometterne le capacità di rigonfiamento.

La crescita della catena peptidica, infatti, non avviene direttamente sulla superficie dei granuli, bensì a livello di siti attivi ad essi legati. Un preventivo rigonfiamento della resina è dunque necessario, per favorire la penetrazione dei reagenti per diffusione, migliorando così l'efficienza della sintesi. (43)

Il primo amminoacido ancorato e, di conseguenza, la catena peptidica sono infatti legati alla resina covalentemente tramite un *linker* che garantisce

anche la protezione della funzione carbossilica C-terminale per tutta la durata della sintesi. Le caratteristiche specifiche del *linker* determinano le condizioni di rilascio del peptide dalla resina: è necessario che siano ortogonali a quelle di deprotezione temporanea che intercorrono tra i vari *coupling* degli amminoacidi.

In questo lavoro è stata utilizzata una resina con *linker* tritile, detta *super acido labile* perché per rimuovere il peptide dal supporto è sufficiente utilizzare una miscela di sblocco composta da 30% HFIP (figura 3.3) in DCM che permette di mantenere intatti i gruppi protettori acido-labili presenti sulle catene laterali. Nel dettaglio si fa riferimento al gruppo protettore *tert*-butilossicarbonile (Boc) presente sulle lisine (si veda paragrafo 3.1.3)

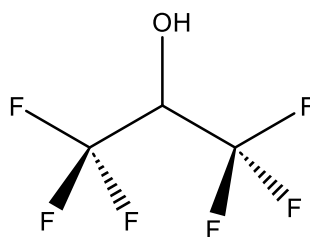


Figura 3.3 Struttura dell'1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo (HFIP)

La resina scelta per le sintesi svolte in questo lavoro è la resina 1,2-diaminoetantritile (figura 3.4) che rilascia il peptide con una funzionalizzazione amminica necessaria per le successive reazioni.

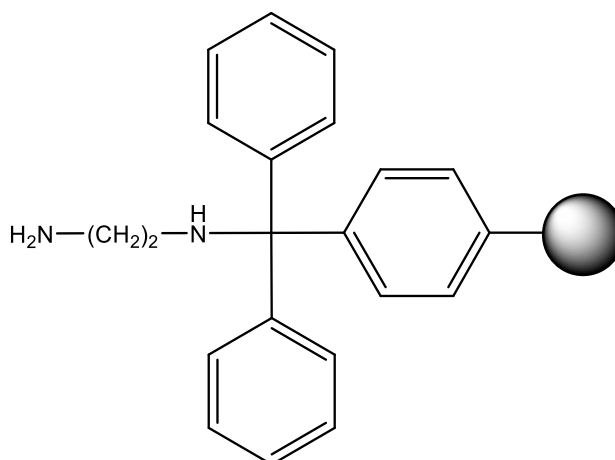


Figura 3.4 Resina 1,2-diaminoetantritile.

### 3.1.3 Gruppi protettori

Gli amminoacidi utilizzati in questa sintesi sono protetti in corrispondenza della funzione  $\alpha$ -amminica per garantire che solamente il gruppo amminico presente nella catena in crescita legata alla resina possa reagire con la funzione carbossilica entrante. Tra le caratteristiche del gruppo protettore devono esserci l'inerzia di reattività nelle condizioni di *coupling* e la facilità di rimozione in condizioni di ortogonalità rispetto a quelle di distacco del peptide dalla resina.

Gli amminoacidi utilizzati in questo lavoro sono protetti con il gruppo uretanico Fmoc (9-Fluorenilmetossicarbonile, figura 3.5) (44), tra i più utilizzati nella sintesi peptidica in fase solida. Facilmente rimosso in ambiente basico, risulta anche funzionale per mantenere integro il centro chirale vicino.

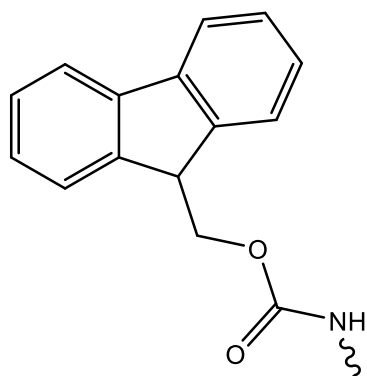


Figura 3.5 Gruppo protettore Fmoc

La rimozione avviene in presenza di ammine secondarie e in fase solida si utilizza piperidina al 20% in DMF. Il meccanismo è riportato in figura 3.6. Sia la  $\text{CO}_2$  che il dibenzofulvene (DBF) sono facilmente eliminabili: la prima per la sua volatilità, mentre il secondo, solubile in DMF, può essere rimosso per filtrazione e lavaggi (45).



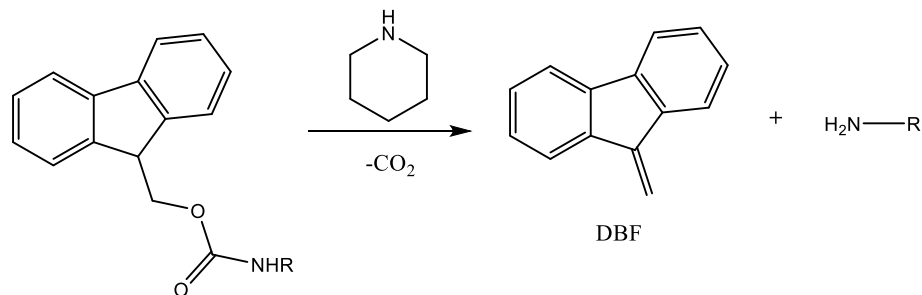


Figura 3.6 Rimozione del gruppo Fmoc con piperidina e formazione di DBF e CO<sub>2</sub>

Per quanto riguarda gli amminoacidi aventi una funzione amminica in catena laterale, come la lisina, è necessaria la presenza di un gruppo protettore per evitare reazioni collaterali tra l'ammina presente in catena laterale e l'amminoacido entrante. Tra le caratteristiche deve esserci l'ortogonalità al gruppo Fmoc, quindi la stabilità in ambiente basico. (46) In questo lavoro sono stati utilizzati amminoacidi protetti in catena laterale con il gruppo Boc (*t*-butilossicarbonile, figura 3.7).

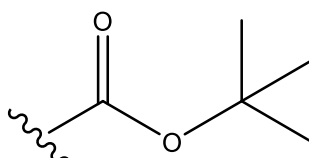


Figura 3.7 Struttura del gruppo protettore Boc

Questo gruppo protettore può essere rimosso in condizioni acide (figura 3.7) con acido trifluoroacetico, oppure, come nelle sintesi descritte nel Paragrafo 4.5.6, con HCl 3M in metanolo (47).

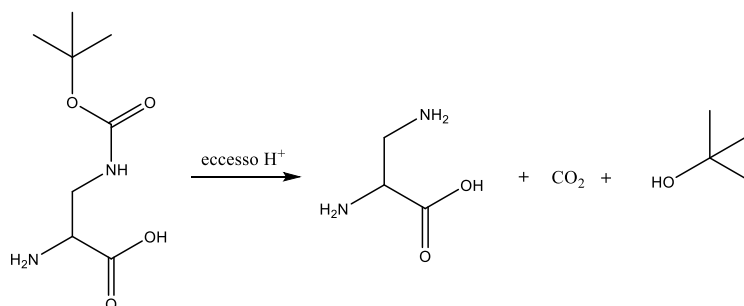


Figura 3.7 Rimozione del gruppo BOC in condizioni acide

### 3.1.4 Attivatori di *coupling*

La formazione del legame peptidico deve essere coadiuvata dall'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido entrante, inserendo un buon gruppo uscente elettroneattrattore. (48) In questo lavoro di Tesi sono state utilizzate diverse combinazioni di attivatori, a seconda delle caratteristiche specifiche della reazione di accoppiamento presa in considerazione, basandosi su metodologie consolidate dettate dal protocollo laboratoriale. Tra i vari metodi sviluppati nel corso degli anni (49), uno dei più comuni fa riferimento all'utilizzo di 1-idrossibenzotriazolo (HOBt), o di suoi derivati, accoppiato con carbodiimmidi (figura 3.8).

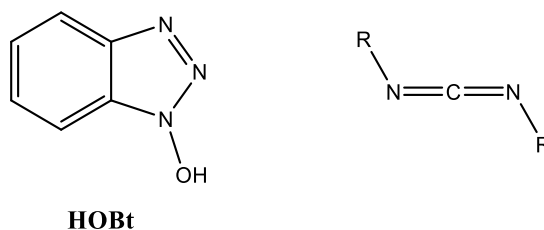


Figura 3.8 Struttura dell'attivatore HOBt e di una generica carbodiimmide

HOBt e derivati hanno il compito di reagire con l'O-acilisourea, specie molto reattiva, generata dalla reazione tra la carbodiimmide e l'amminoacido protetto, a formare un estere attivo, limitando sotto-reazioni indesiderate.

Nello specifico, per quanto riguarda i *coupling* degli amminoacidi su fase solida è stata utilizzata la carbodiimmide DIC, mentre al posto di HOBt è stato preferito il reattivo di *coupling* Oxyma -Pure.

Come riportato da El-Faham e Albericio, Oxyma-Pure (49) mostra un'ottima capacità a sopprimere le reazioni di racemizzazione sul carbonio in  $\alpha$ , paragonabili ad attivatori quali HOAt e superiori a HOBt, e un minore rischio di esplosività rispetto ai derivati benzotriazolici.

Nonostante questa serie di vantaggi, la funzionalizzazione in N-terminale con Adenina-CH<sub>2</sub>COOH è stata svolta con gli attivatori HOAt e HATU in presenza della base N,N-diisopropiletilammina (DIPEA), seguendo un protocollo già consolidato in precedenza. Si riporta la reazione di

formazione dell'estere attivo seguita dalla reazione di *coupling* in figura 3.9.

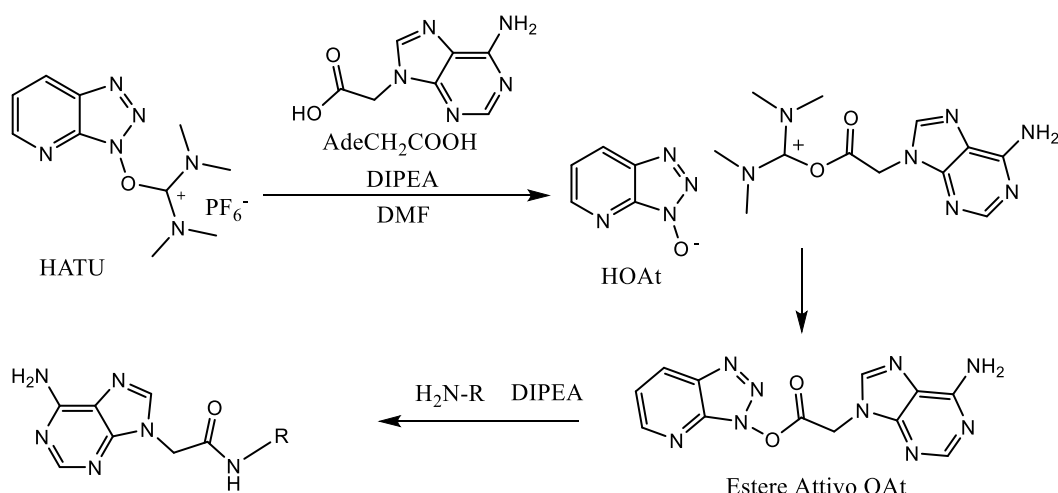


Figura 3.95 Reazione di formazione dell'estere attivo OAt di Adenina-CH<sub>2</sub>COOH e *coupling* in presenza della base DIPEA.

### 3.2 Sintesi in soluzione

La sintesi in soluzione viene svolta per funzionalizzare la catena peptidica all'estremità C-terminale, una volta rimossa dalla resina, secondo l'opportuna architettura molecolare scelta in fase di progettazione. Le reazioni svolte in soluzione in questo lavoro di Tesi, sono, rispettivamente, il *coupling* con la Timina-CH<sub>2</sub>COOH per la sequenza *Ade-LeuLysLeuLeuLysLysLeuLeuLysIleLeuEtNH<sub>2</sub>* e con Cbz-OSu per la sequenza *H-LeuLysLeuLeuLysLysLeuLeuLysIleLeuEtNH<sub>2</sub>*.

Per quanto riguarda il *coupling* delle basi azotate in soluzione, è stato consolidato un protocollo laboratoriale che prevede l'utilizzo degli attivatori EDC-HCl e HOBT. Molto utilizzata nella sintesi peptidica in soluzione grazie alle buone caratteristiche di reattività, l'EDC-HCl (1-Etil-3-[3-dimetilamminopropil]carbodiimide cloridrata) risulta essere solubile in acqua acida e può essere facilmente rimossa conclusa la reazione (49). La formazione dell'estere attivo della Timina, riportato in figura 3.10, coinvolge in un primo momento la Timina-CH<sub>2</sub>COOH e l'EDC con la formazione dell'O-acilisourea, specie molto reattiva che formerà successivamente

l'estere attivo reagendo con HOBT.

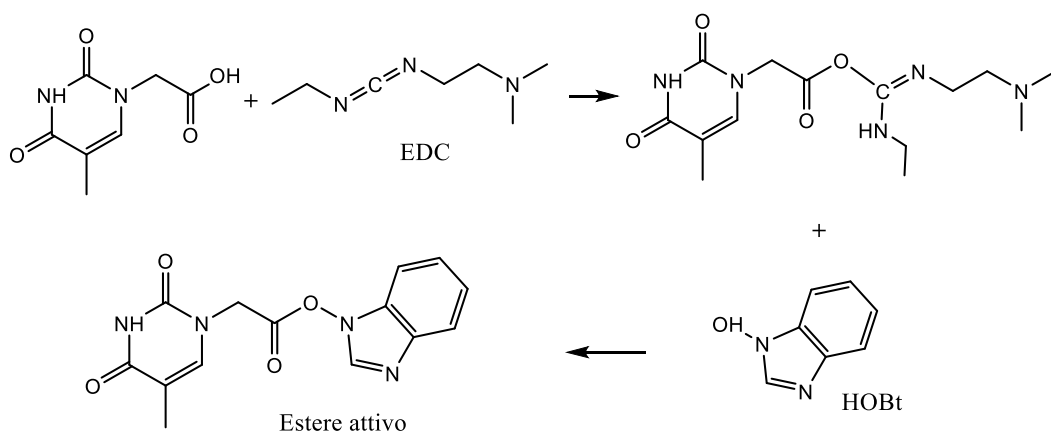


Figura 3.10 Reazione di formazione dell'estere attivo di Timina-CH<sub>2</sub>COOH

Formato l'estere attivo, avviene la reazione di *coupling* con il peptide: essa viene svolta in ambiente basico, pH=8-9, affinché l'ammina deprotonata possa svolgere l'attacco nucleofilo. La base utilizzata è NMM (N-metilmorfolina). In Figura 3.11 è riportata la reazione.

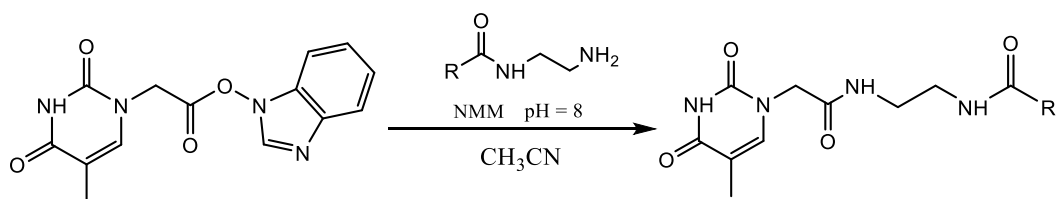


Figura 3.11 Reazione tra l'estere attivo della timina e il peptide, in presenza di NMM per la formazione del Peptide derivatizzato. Il solvente utilizzato è acetonitrile.

Per quanto riguarda la reazione di accoppiamento riguardante Cbz-OSu, essendo la molecola già attivata, è solo necessario mantenere un pH basico affinché la reazione proceda. La reazione è stata svolta in acetonitrile e ed è stata utilizzata come base la trietilammina (TEA).

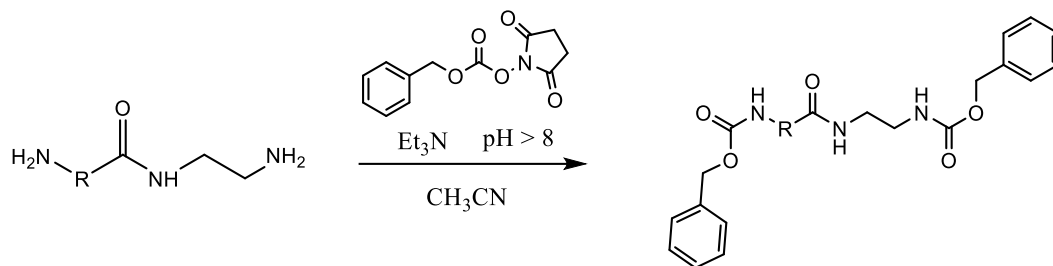


Figura 3.12 Reazione di *coupling* tra il peptide sbloccato dalla resina e il Cbz-OSu Base: Et<sub>3</sub>N (TEA). Solvente: acetonitrile. Sono presenti due funzioni amminiche da modificare: N-terminale della sequenza e il residuo amminico derivante dal rilascio del peptide dalla resina. Con R si indica tutta la catena peptidica intermedia.

### 3.3 Sintesi di Adenina-CH<sub>2</sub>COOH

Avendo a disposizione in reagentario Adenina-CH<sub>2</sub>COOEt si effettua una reazione di saponificazione per ottenere Adenina-CH<sub>2</sub>COOH. La reazione è riportata in Figura 3.13.

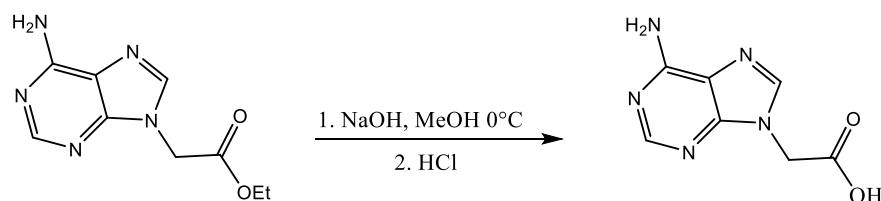


Figura 3.13 Reazione di saponificazione di AdeCH<sub>2</sub>COOEt

Il prodotto è stato caratterizzato con spettrometria di massa ESI/TOF: nello spettro di massa (figura 3.14) si osserva il segnale che fa riferimento al picco dello ione molecolare a carica singola [M+H]<sup>+</sup>.

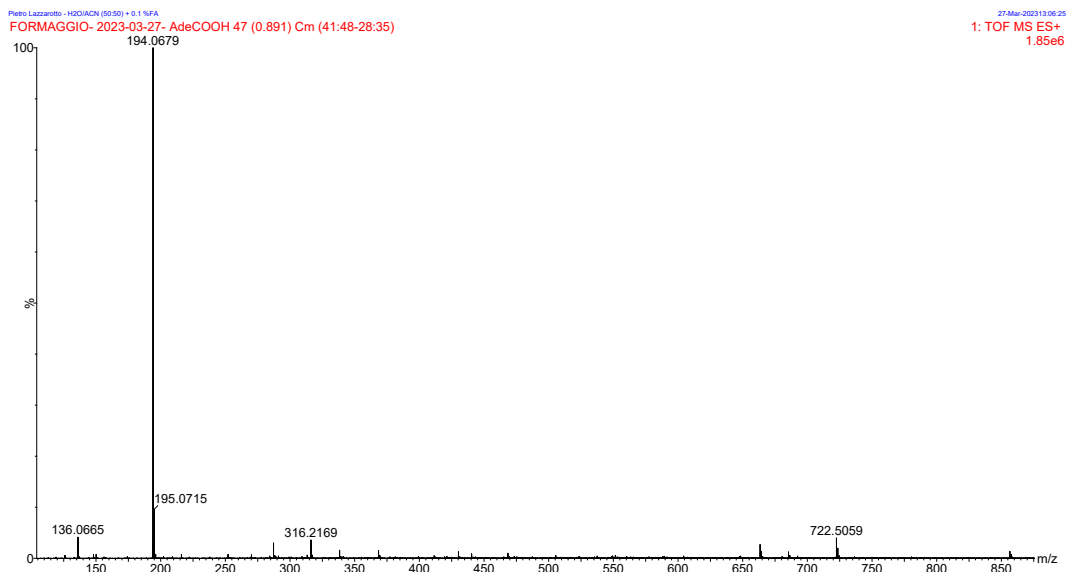


Figura 3.14 Spetto di massa ESI-TOF di Ade(CH<sub>2</sub>)COOH [M+H]<sup>+</sup> calcolato= 194.066

### 3.4 Ottimizzazione della sintesi di TricKL-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

Trattandosi di una sequenza sintetizzata per la prima volta in questo lavoro, sono stati svolti diversi tentativi per poter ottenere il miglior risultato in termini di ottimizzazione della sintesi, eliminando per quanto possibile i sottoprodotti di reazione, perlopiù costituiti da sequenze peptidiche tronche. In quest'ottica sono stati svolti doppi e tripli *coupling* in corrispondenza delle posizioni problematiche della sequenza amminoacidica, la cui individuazione è stata possibile dall'analisi degli spettri di massa, durante e in conclusione della prima sintesi. Si ipotizza che l'elevata idrofobicità degli amminoacidi coinvolti nella sequenza (50), caratteristica già nota in fase di progettazione, sia stata una delle possibili cause delle criticità osservate. Il processo di ottimizzazione della sintesi è riportato dettagliatamente nel Paragrafo 4.5.6.

Vengono riportati due spettri di massa ad alta risoluzione del peptide H<sub>2</sub>N-TricKL-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, la cui struttura è riportata in figura 3.15

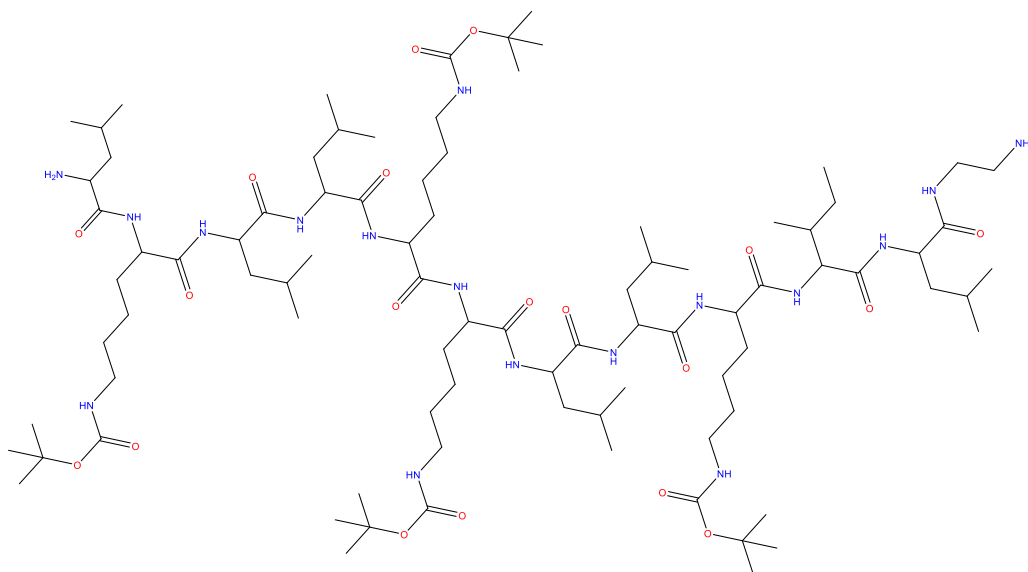


Figura 3.15 Struttura della sequenza:

**H-Leu-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**

Non essendo stato ancora svolto lo step di deprotezione delle funzioni amminiche in catena laterale delle lisine, si può notare negli spettri di massa come le condizioni acide dell'analisi generino ioni molecolari corrispondenti al peptide senza uno o più gruppi Boc.

I segnali osservati hanno permesso di riconoscere tre sequenze peptidiche troncate:

- **H-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>** [M+H]<sup>+</sup>= 1652.17 e [M+2H]<sup>++</sup>= 826.588 (figura 3.16)
- **H-Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>** [M+H]<sup>+</sup>= 1424.02 )figura (3.17)
- **H-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>** [M+H]<sup>+</sup>= 1310.929 (figura 3.18)

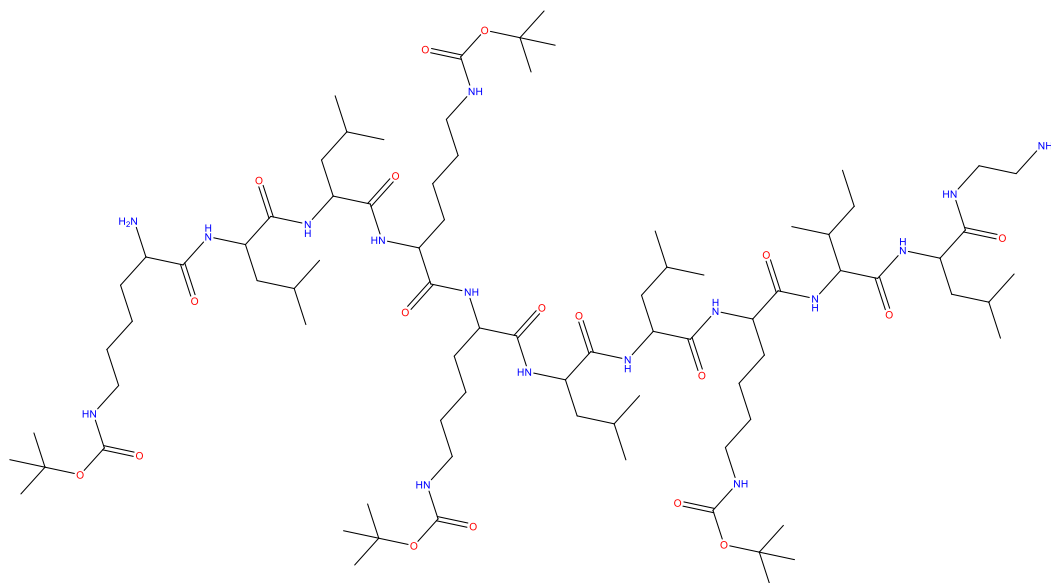


Figura 3.16 Struttura della sequenza troncata:

**H-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**

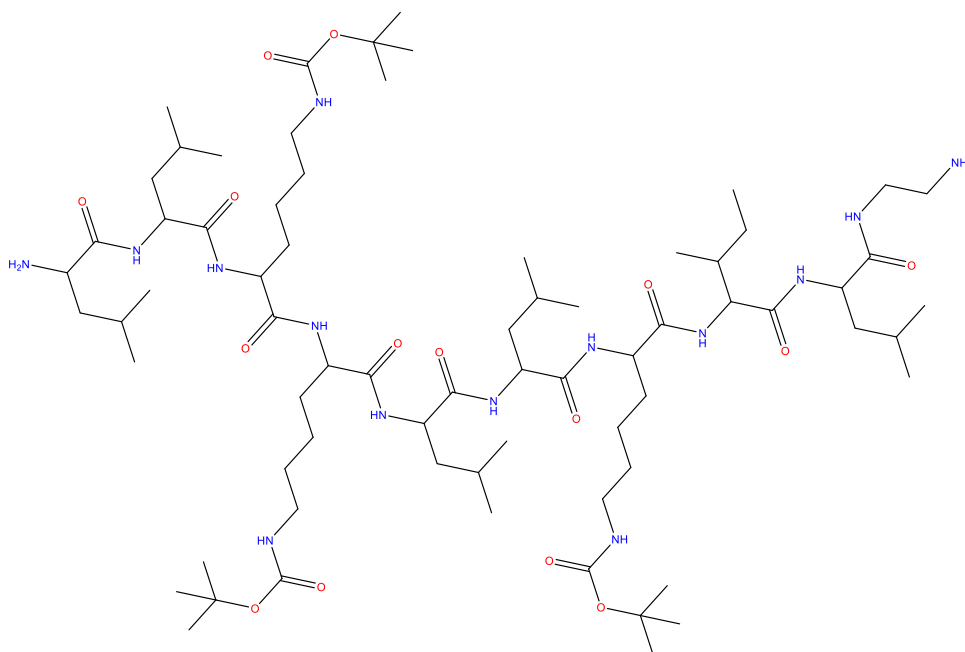


Figura 3.17 Struttura della sequenza troncata:

**H-Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**



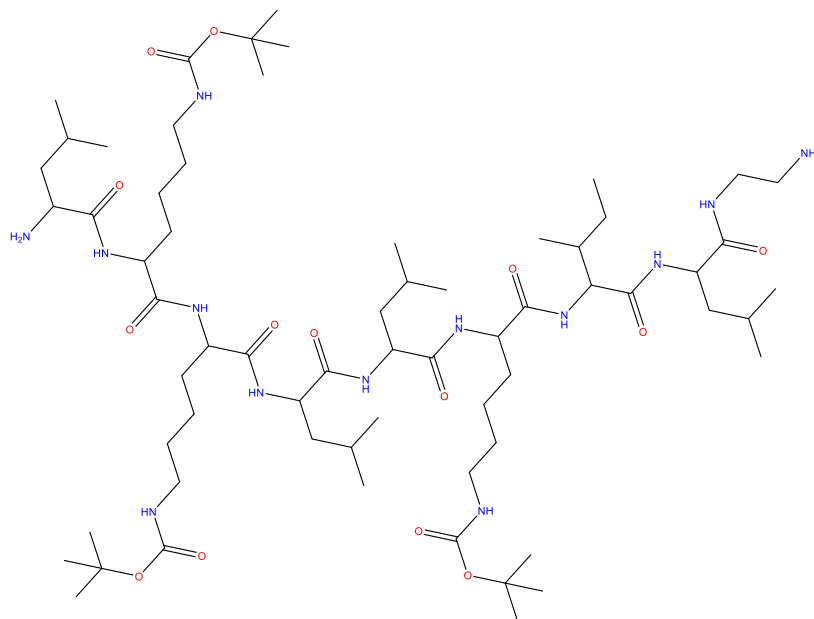
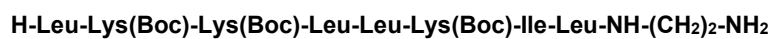


Figura 3.18 Struttura della sequenza troncata:



Lo spettro di massa del prodotto grezzo ottenuto dalla prima sintesi della sequenza peptidica è riportato in Figura 3.19. Lo spettro di massa ottenuto invece al termine della sintesi della stessa sequenza mediante la procedura ottimizzata è riportato in figura 3.20.

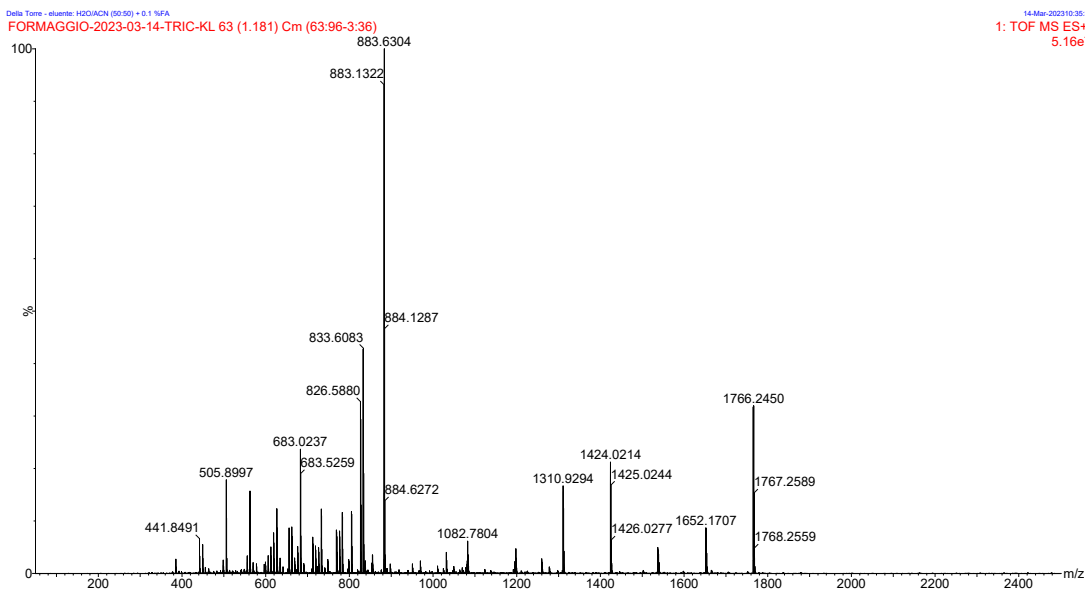


Figura 3.197 Spettro di massa ESI-TOF del peptide  $\text{NH}_2\text{-TrickL-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  in MeOH:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1766.24$  m/z,  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 883.63$  m/z,  $[(\text{M-Boc})+2\text{H}]^{++} = 833.61$  m/z,  $[(\text{M-4Boc})+2\text{H}]^{++} = 683.52$  m/z;

**Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**  
 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1652.17$  e  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 826.588$ ; **Leu-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**  
 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1424.02$ ; **Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**  
 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1310.929$ .

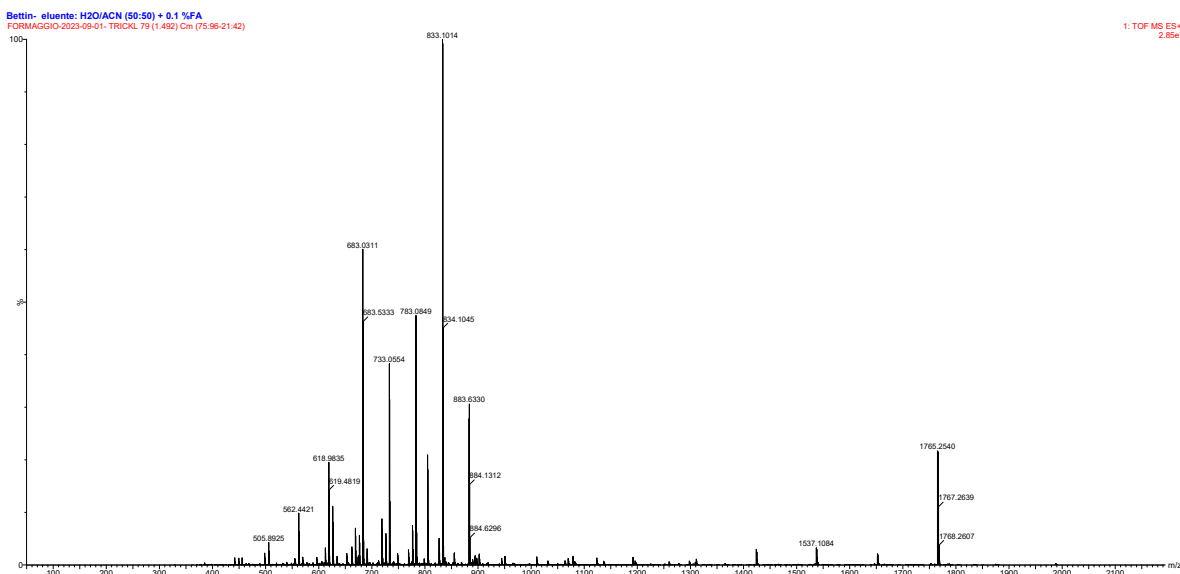


Figura 3.20 Spettro di massa ESI-TOF del peptide  $\text{NH}_2\text{-TrickL-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  in MeOH:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1766.25$  m/z,  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 883.63$  m/z,  $[(\text{M-Boc})+2\text{H}]^{++} = 833.10$  m/z,  $[(\text{M-2Boc})+2\text{H}]^{++} = 783.08$  m/z,  $[(\text{M-3Boc})+2\text{H}]^{++} = 733.06$  m/z,  $[(\text{M-4Boc})+2\text{H}]^{++} = 683.53$  m/z

### 3.5 Sintesi di Ade-TrickL-Thym

La sintesi di questo peptide è stata realizzata su fase solida manuale (non automatizzata). La resina utilizzata è la 1,2-diamminoetantrilica. La struttura del peptide è riportata in Figura 3.21.

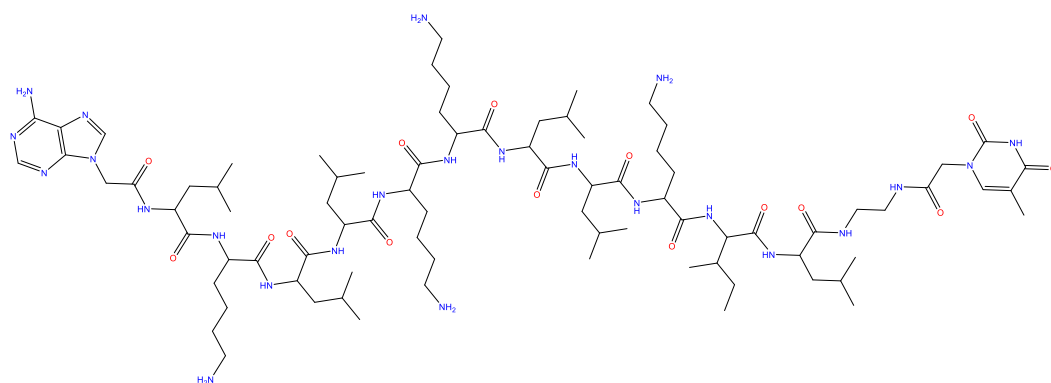


Figura 3.21 Struttura di Ade-LeuLysLeuLeuLysLysLeuLeuLysIleLeu-NH-Et-NH-Thym (Ade-TrickL-Thym)

Il peptide sintetizzato è stato caratterizzato, dopo purificazione, attraverso HPLC (figura 3.21) e spettrometria di massa ESI/TOF ad alta risoluzione (figura 3.22).

Si sono ottenuti 16mg di peptide al 93.3% con una resa del 13%.

Nello spettro di massa si osservano i segnali relativi al picco dello ione molecolare a carica singola  $[M+H]^+$ , a carica doppia  $[M+2H]^{++}$ , a carica tripla  $[M+3H]^{+++}$  e a carica quadrupla  $[M+4H]^{++++}$ , dovuti alla presenza delle lisine deprotette in catena.

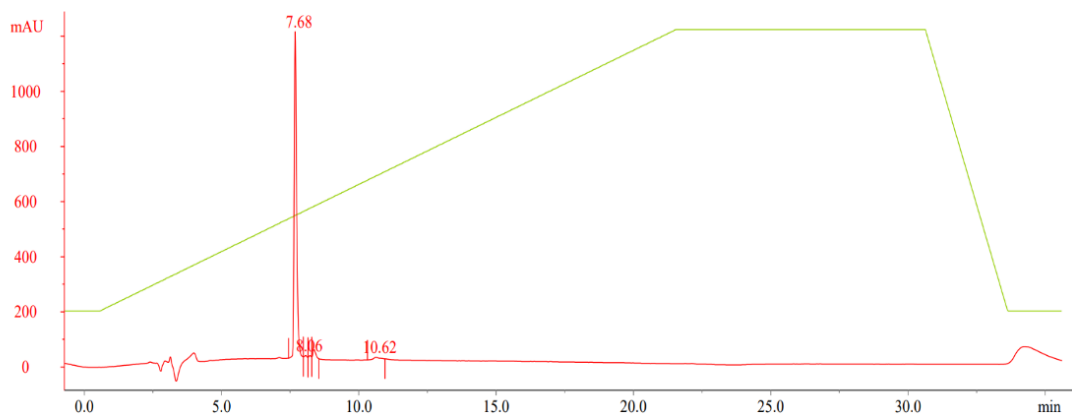


Figura 3.218 Cromatogramma del peptide Ade-TrickL-Thym in MeOH (gradiente: da 20 a 100% B in 20 minuti, seguito da altri 10 minuti a 100%B; flusso 1mL/min; colonna Agilent Zorbax RX-C18) tr = 7.68 min. Purezza 93.3%.

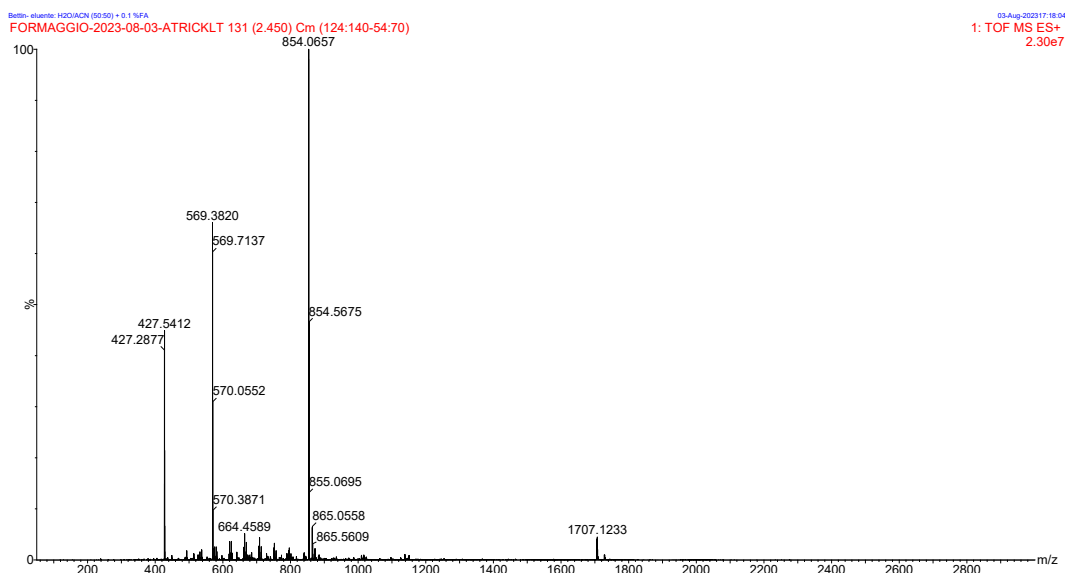


Figura 3.22 Spetto di massa ESI-TOF del peptide Ade-TrickL-Thym in MeOH:  $[M+H]^+ = 1707.12$  m/z,  $[M+2H]^{++} = 854.06$  m/z,  $[M+3H]^{+++} = 569.38$  m/z,  $[M+4H]^{++++} = 427.54$  m/z

### 3.6 Sintesi di Cbz-TrickL-Cbz

La sintesi di questo peptide, descritta nel Paragrafo 4.5.7, è stata realizzata utilizzando la sintesi in fase solida manuale. La resina utilizzata è la 1,2-diamminoetan-tritilica. La struttura del peptide è riportata in Figura 3.23.

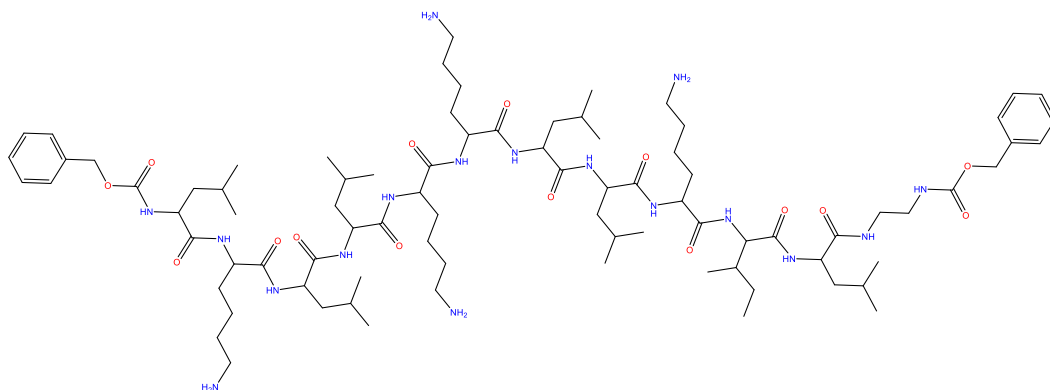


Figura 3.239 Struttura di Cbz-LeuLysLeuLeuLysLysLeuLeuLysIleLeu-NH-Et-NH-Cbz

Il peptide sintetizzato è stato caratterizzato, dopo purificazione, attraverso HPLC (figura 3.24) e spettrometria di massa ESI/TOF (figura 3.25). Come si può osservare dal cromatogramma, si presenta un'impurezza con un tempo di ritenzione molto simile a quello del prodotto desiderato, causando un abbassamento del grado di purezza. Nonostante due purificazioni distinte, non si è riusciti a separare il prodotto dall'impurezza, impedendo una caratterizzazione approfondita di quest'ultima.

Si sono ottenuti 185 mg di peptide al 85% con una resa del 47%.

Nello spettro di massa si osservano i segnali relativi al picco dello ione molecolare a carica singola  $[M+H]^+$ , a carica doppia  $[M+2H]^{++}$  e a carica tripla  $[M+3H]^{+++}$ , dovuti alla presenza delle lisine in catena.

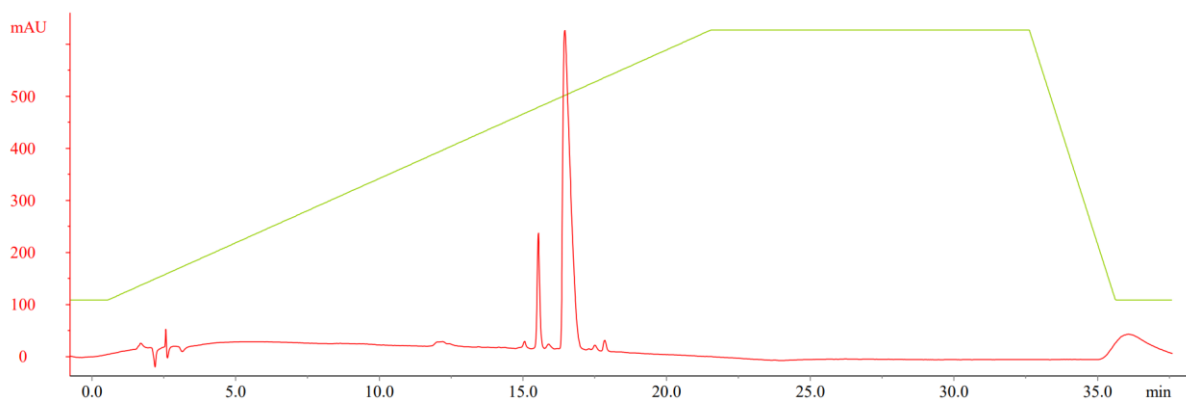


Figura 3.2410 Cromatogramma del peptide Cbz-TrickL-Cbz in MeOH (gradiente: da 20 a 100% B in 20 minuti, con 10 minuti a 100%B; flusso 1mL/min; colonna Agilent Zorbax RX-C18) tr = 16.45 min. Purezza 85%.

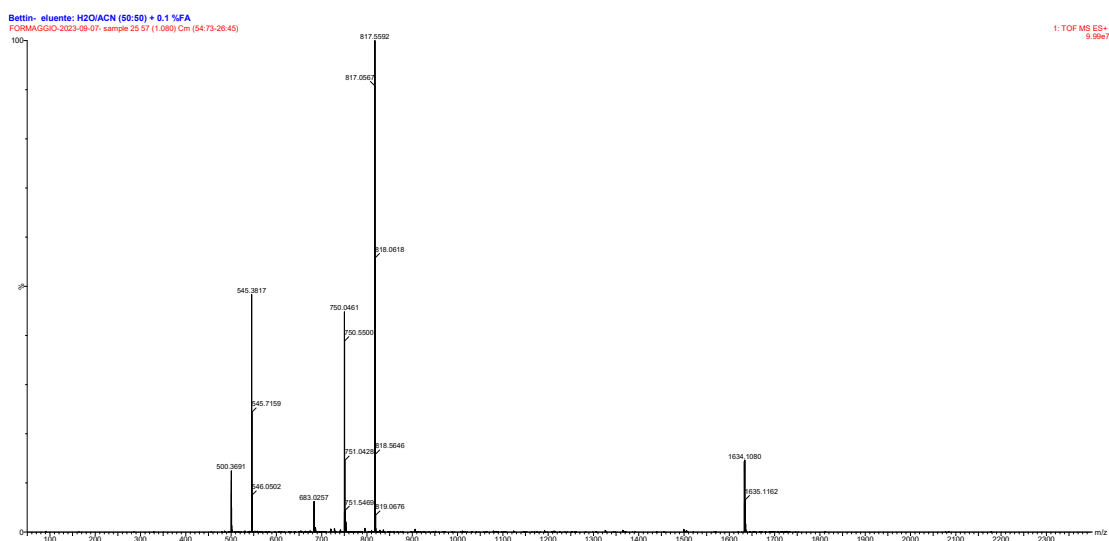


Figura 3.2511 Spettro di massa ESI-TOF del peptide Cbz-TricKL-Cbz in MeOH:  $[M+H]^+ = 1634.11$  m/z,  $[M+2H]^{++} = 817.56$  m/z,  $[(M+3H)]^{+++} = 545.38$  m/z,  $[(M-Z)+2H]^{++} = 750.05$  m/z. (51)

L'inserimento del gruppo Cbz alle estremità della sequenza peptidica, insieme all'ottimizzazione del processo di sintesi su fase solida, ha permesso di ridurre notevolmente la durata dell'intero processo, arrivando quasi a triplicare la resa finale del peptide con un buon grado di purezza. Le caratteristiche conformazionali, analizzate nel paragrafo successivo, indicano comportamenti simili tra i peptidi sintetizzati. Si può ipotizzare che Cbz-TricKL-Cbz possa avere un comportamento simile a Ade-TricKL-Thym riguardo la capacità di modificare la permeabilità di membrane artificiali (i risultati degli esperimenti di *leakage* sono riportati nel paragrafo 3.8).

### 3.7 Studio conformazionale mediante dicroismo circolare

Le preferenze conformazionali dei peptidi sintetizzati sono state analizzate mediante dicroismo circolare (CD) in diversi ambienti: acqua, metanolo e in una soluzione acquosa di sodio dodecilsolfato (SDS, figura 3.26) 100mM. Quest'ultimo ambiente è membrano-mimetico, poiché a queste concentrazioni l'SDS in acqua forma delle micelle.

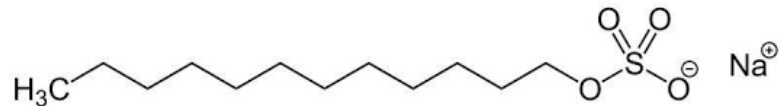
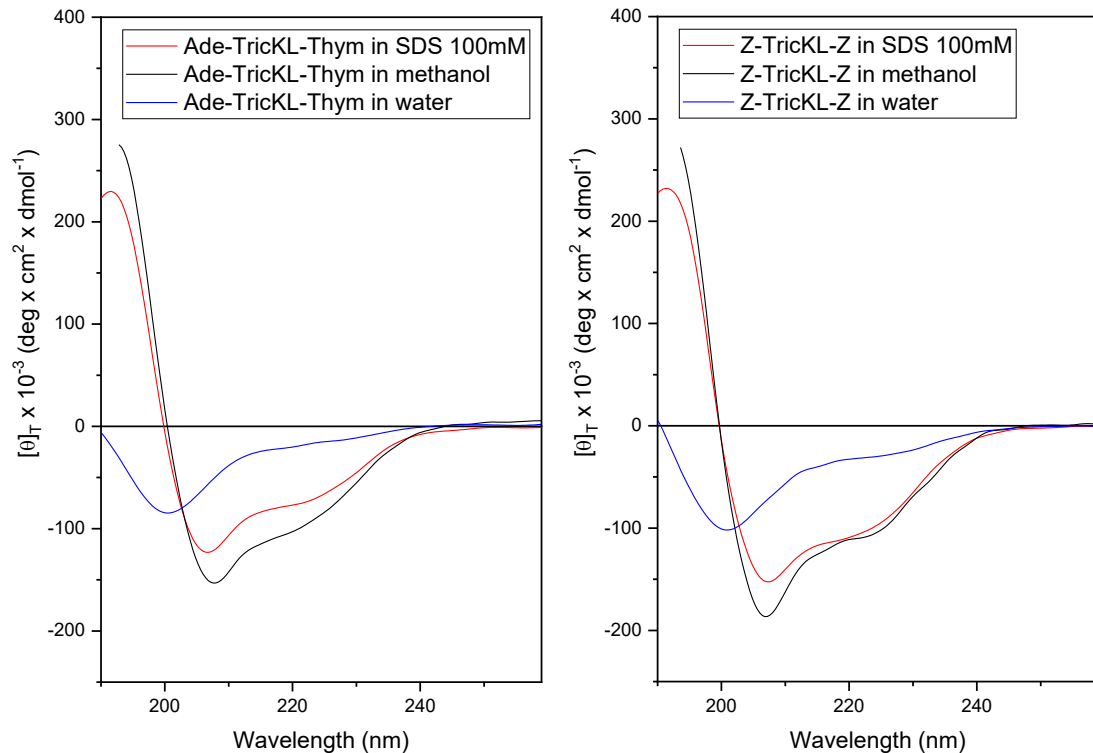


Figura 3.26 12 Struttura del sodio dodecilsolfato (SDS)

Il dicroismo circolare di un peptide nella zona del lontano UV, cioè a lunghezze d'onda comprese tra 180 e 280 nm, è dominato dagli assorbimenti del cromoforo peptidico e di eventuali gruppi aromatici presenti nelle catene laterali. Il cromoforo peptidico e i gruppi aromatici sono otticamente inattivi, poiché non chirali, ma diventano attivi quando hanno vicino dei centri chirali, come il carbonio in  $\alpha$  degli amminoacidi chirali, o sono compresi in una struttura secondaria intrinsecamente chirale, come un'elica destrogira o sinistrogira. Il cromoforo peptidico mostra bande di intensità, segno e posizione differenti a seconda della struttura secondaria adottata dal peptide. Le bande dicroiche per una struttura elicoidale sono centrate a circa 195, 208 e 222 nm e si riferiscono alle transizioni elettroniche  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ . Una banda a 195 nm di segno positivo, accompagnata da due massimi negativi centrati a 208 e 222 nm, è indicativa di una struttura elicoidale destrogira.



13 Figura 3.27. Profili dicroici acquisiti per i peptidi Ade-TrickKL-Thym (sinistra) e Cbz-TrickKL-Cbz (a destra) in tre ambienti: acqua, soluzione di SDS 100mM in acqua e metanolo. Concentrazione peptidica:  $5 \times 10^{-5}$  M.

Il profilo dicroico di Ade-TrickKL-Thym e Cbz-TrickKL-Cbz (figura 3.27) in metanolo e in ambiente membrano-mimetico è quello tipico di una struttura elicoidale destrogira. Le posizioni dei due massimi negativi in questi due ambienti, circa 207-208 e 222 nm, sono quelle tipiche di un'elica  $\alpha$ . Entrambi in acqua invece presentano una curva dicroica tipica di una struttura non completamente ordinata, con un massimo negativo centrato a 200-201 nm. Questa posizione è diagnostica della presenza di una combinazione di strutture elicoidali e strutture disordinate. Un cambiamento nello spettro CD di un peptide al variare delle condizioni sperimentali è indicativo di una struttura tridimensionale flessibile, come ci aspettavamo avendo sostituito i residui di Aib, noti stabilizzatori di strutture elicoidali, con Leu. Tuttavia, anche il peptide analogo contenente i tre residui di Aib va incontro ad un cambiamento conformazionale, adottando in acqua una conformazione



elicoidale più vicina a un'elica di tipo  $3_{10}$ . Questa struttura mista è però caratterizzata da un massimo negativo centrato a 204 nm, mentre un blue-shift della banda verso 200nm è considerato indicativo della presenza in soluzione di una popolazione significativa di strutture disordinate. Le intensità dei massimi negativi sono riportate in Tabella 3.1, in cui sono anche riportati i valori del rapporto  $R = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{208}}$ . Dal valore di questo rapporto è possibile ricavare informazioni sul tipo di struttura elicoidale adottata dal peptide. Un valore di  $R$  uguale a 1 è diagnostico di una struttura  $\alpha$ -elicoidale, mentre se è inferiore a 0.4, l'elica è prevalentemente di tipo  $3_{10}$ . (52) Valori intermedi sono diagnostici di strutture elicoidali miste  $\alpha/3_{10}$ . (53) Per i peptidi analizzati, il valore ha un senso solo in metanolo e in ambiente membrano-mimetico, dove le posizioni dei massimi negativi sono a lunghezze d'onda tipiche delle strutture elicoidali. Come si può vedere dai valori riportati in Tabella 3.1, in questi due solventi i peptidi mantengono una struttura elicoidale mista  $\alpha/3_{10}$ , con una prevalenza di elica  $\alpha$ . Riassumendo, il comportamento dei due peptidi è molto simile a quello del peptide analogo contenente Aib in metanolo ed in ambiente membrano mimetico, mentre la struttura risulta più flessibile e meno definita in acqua.

**Tabella 3.1.** Valori di ellitticità molare totale  $[\theta]_{\text{T}} \times 10^{-3}$  (deg x cm<sup>2</sup> x dmol<sup>-1</sup>) ai massimi negativi e relativo rapporto  $R$  per i peptidi analizzati nei diversi solventi. Concentrazione peptidica:  $5 \times 10^{-5}$  M. Il peptide analogo a quelli sintetizzati in questo lavoro di Tesi, ma contenente Aib invece di Leu, è inserito nella Tabella per confronto.

peptide	$[\theta]_{220}$	$[\theta]_{208}$	$R \ [\theta]_{220}/[\theta]_{208}$
Ade-TrickL-Thym in SDS 100mM	-77	-123	0.63
Ade-TrickL-Thym in MeOH	-103	-153	0.67
Ade-TrickL-Thym in H <sub>2</sub> O	-20	-65 <sup>a</sup>	0.31

Z-TrickKL-Z in SDS 100mM	-104.5	-152.5	0.68
Z-TrickKL-Z in MeOH	-109	-186.5	0.58
Z-TrickKL-Z in H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	-31	-102 <sup>b</sup>	0.30
A-KT-T in SDS 100mM	-117.879	-196.155	0.60
A-KT-T in MeOH	-114.074	-195.754	0.58
A-KT-T in H <sub>2</sub> O	-53.1863	-122.208 (204 nm)	0.43

<sup>a</sup> Il massimo negativo di questo peptide in acqua è centrato a 200 nm. <sup>b</sup> Il massimo negativo di questo peptide in acqua è centrato a 201 nm.

### 3.8 Leakage liposomiale

La tendenza dei fosfolipidi a organizzarsi spontaneamente formando membrane a doppio strato è stata utilizzata per sviluppare un importante modello sperimentale. Le vescicole lipidiche, o liposomi, costituite da compartimenti acquosi delimitati da un doppio strato fosfolipidico, possono essere usate per studiare l'effetto di composti chimici sulla permeabilità delle membrane. (31)

Nel dettaglio, le vescicole unilamellari, cioè formate da un solo doppio strato, possono essere classificate facendo riferimento alle loro dimensioni (figura 3.28):

- *Small Unilamellar Vesicles* (SUV): 20-100 nm
- *Large Unilamellar Vesicles* (LUV): > 100 nm
- *Giant Unilamellar Vesicles* (GUV): > 1000 nm.

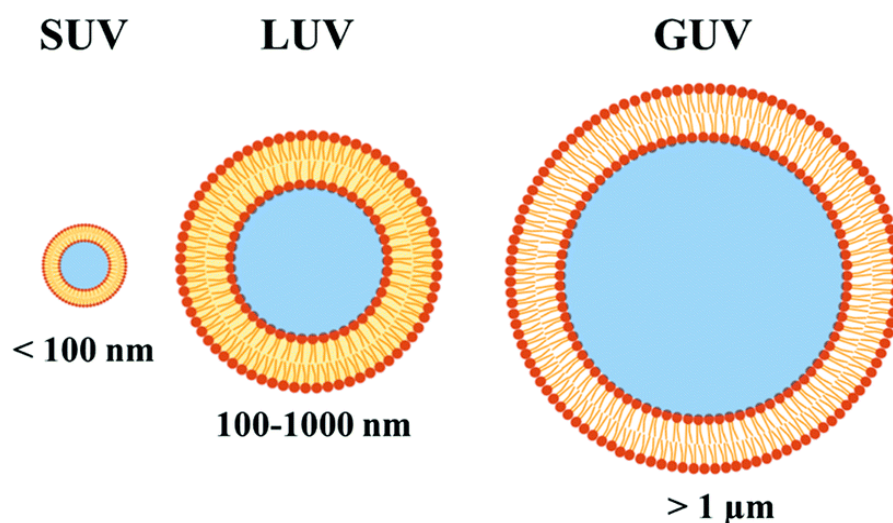


Figura 3.28 14 Unilamellar vesicles: small, large e giant. (54)

L'architettura molecolare dei peptidi sintetizzati in questo lavoro, è stata sviluppata per promuovere l'azione membrano-attiva degli stessi. Per verificarne le capacità vengono effettuati degli esperimenti di *leakage* liposomiale; le prove sono state svolte su due diversi tipi di liposomi: SUV PE/PG 7:3 e SUV PC/Ch 7:3. La metodologia utilizzata per la preparazione dei liposomi consiste nell'ottenimento di un film lipidico che viene successivamente idratato con una soluzione acquosa di carbossifluoresceina, l'incubazione avviene *overnight*. Seguono una serie di operazioni per ottenere le SUVs. La metodologia completa è descritta nella sezione "Studio di permeabilità su membrane lipidiche artificiali PC/Ch e PE/PG" del Capitolo successivo. Si riportano nelle figure 3.29-3.32 le strutture dei lipidi utilizzati.

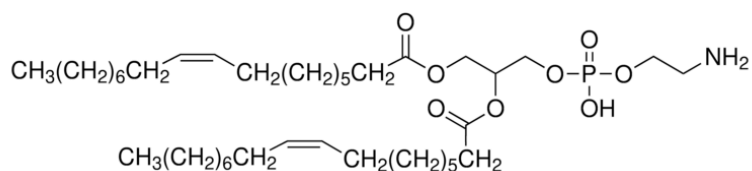


Figura 3.2915 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine: PE

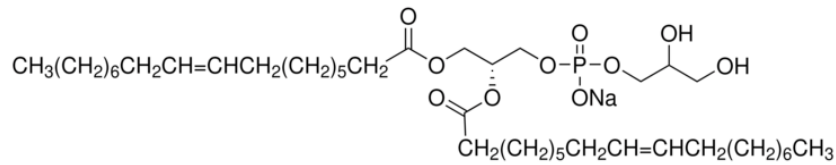


Figura 3.3016 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol): **PG**

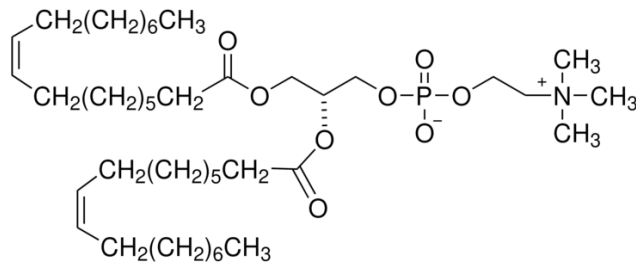


Figura 3.3117 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine: **PC**

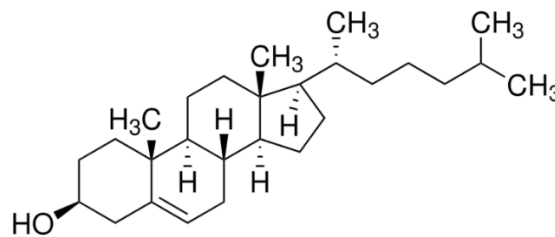


Figura 3.32 18 Colesterolo **Ch**

I liposomi sono stati scelti in base alle peculiarità delle cellule che dovrebbero mimare; nel dettaglio, come modello di membrana di cellule eucariote vengono utilizzate le membrane artificiali PC/Ch, zwitterioniche e ricche di colesterolo, mentre come modello di cellule tumorali, o batteriche, PE/PG, cariche negativamente. Nelle cellule batteriche, infatti, la percentuale di lipidi carichi negativamente come il fosfatidilglicerolo (PG), presenti sul lato della membrana rivolto verso l'ambiente esterno, è maggiore. (55)

Risulta essenziale sottolineare il fatto che si tratti di modelli estremamente semplificati; per questo motivo, i risultati di questi esperimenti necessitano di essere considerati in maniera puramente qualitativa.

Nell'esperimento di *leakage* si valuta la capacità dei vari peptidi di rilasciare

la CF precedentemente inglobata all'interno delle SUVs attraverso misure di fluorescenza. Non si osserva un'emissione di fluorescenza apprezzabile nel caso in cui il peptide non interagisca con le membrane, questo perché l'elevata concentrazione di CF confinata all'interno dei liposomi è responsabile del fenomeno di *self-quenching* (56). Nel caso in cui avvenga il rilascio di CF causato dalla perturbazione delle membrane ad opera del peptide, è invece apprezzabile un aumento dell'intensità di fluorescenza. Il controllo positivo dell'esperimento viene effettuato con la completa distruzione delle membrane con l'uso del tensioattivo Triton X-100 (figura 3.33), osservando in questo modo il valore massimo di intensità di fluorescenza.

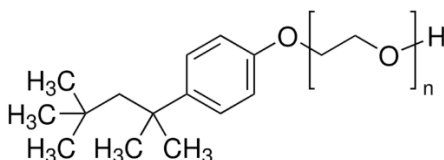


Figura 3.3319 Struttura del tensioattivo Triton X-100 (42)

Le sequenze dei peptidi utilizzati per questo studio sono rispettivamente:

- **nOct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol:**  
Tricogina GA IV (**Tric**);
- **Thym-Aib-Lys-Leu-Aib-Lys-Lys-Leu-Aib-Lys-Ile-Ade**  
Thym-Trick-Ade (**T-Trick-A**);
- **Ade-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ile-Thym**  
Ade-TrickL-Thym (**A-TrickL-T**).

I risultati sono riportati graficamente nella figura 3.34.

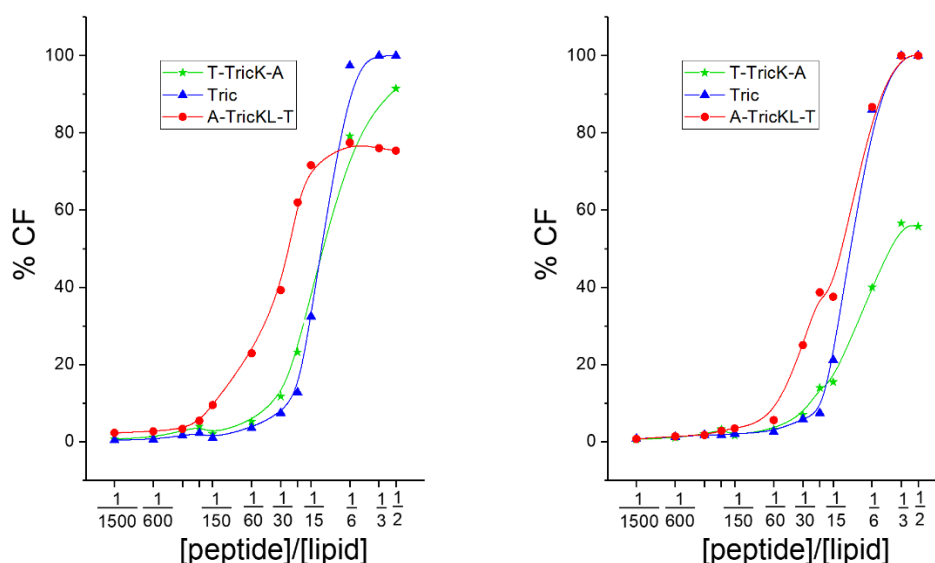


Figura 3.3420 Misura della capacità dei peptidi di modificare la permeabilità di SUVs di composizione PE/PG, a sinistra, e PC/Ch a destra.

Si può osservare dai grafici che i peptidi studiati si mostrano membrano-attivi con entrambe le tipologie di membrane. Rilevante è il fatto che le sequenze funzionalizzate con le basi azotate, presentino un'attività paragonabile alla tricogina GA IV: peptide ampiamente riconosciuto come membrano-attivo. (57) (58)

Ade-TrickL-Thym (A-TrickL-T, curva rossa nei grafici di figura 3.34) mostra attività a concentrazioni minori rispetto alla tricogina GA IV su liposomi di entrambe le composizioni lipidiche. Tuttavia, non arriva a causare il rilascio completo della carbossifluoresceina per le SUV PE/PG. Questo può essere dovuto a un contemporaneo fenomeno di fusione delle membrane. Con le SUVs PC/Ch si osserva una netta differenza tra i due analoghi funzionalizzati con le nucleobasi: in questo caso, è l'analogo contenente Aib a non dare 100% di *leakage*. Si può supporre che la sostituzione dell'amminoacido Aib con Leu riesca a modulare l'efficacia dell'interazione peptide-membrana, rendendola dipendente dalla composizione lipidica dei liposomi.

Infine, dall'andamento sigmoide delle curve si può intuire il meccanismo cooperativo, per cui è necessario raggiungere una certa concentrazione peptidica per apprezzare l'attività di interazione con le membrane da parte

dei peptidi.

### 3.9 Dynamic Light Scattering (DLS)

Durante gli esperimenti sulle membrane modello, dopo l'aggiunta di peptide a diverse concentrazioni si è osservato macroscopicamente un aumento di torbidità della soluzione di liposomi per alcune cuvette. Questa osservazione macroscopica dipende dalla concentrazione di peptide che si aggiunge alla soluzione ed è stato possibile determinare il valore di concentrazione soglia.

Al fine di indagare un'eventuale correlazione tra il fenomeno osservato e modifiche nella dimensione dei liposomi, sono state effettuate delle misurazioni di *Dynamic Light Scattering* sulle soluzioni che si presentavano torbide. Infine, sono state acquisite anche delle immagini al TEM.

Inizialmente, abbiamo osservato un aumento delle dimensioni dei liposomi con SUV PE/PG, cariche negativamente e peptidi analoghi di tricogina GA IV a cui è stato inserito l'amminoacido lisina in posizione 2, 5, 6, 9 e funzionalizzati alle estremità con le basi azotate Timina-CH<sub>2</sub>COOH e Adenina-CH<sub>2</sub>COOH. Le strutture dei due peptidi sono riportate nelle figure 3.35 e 3.36.

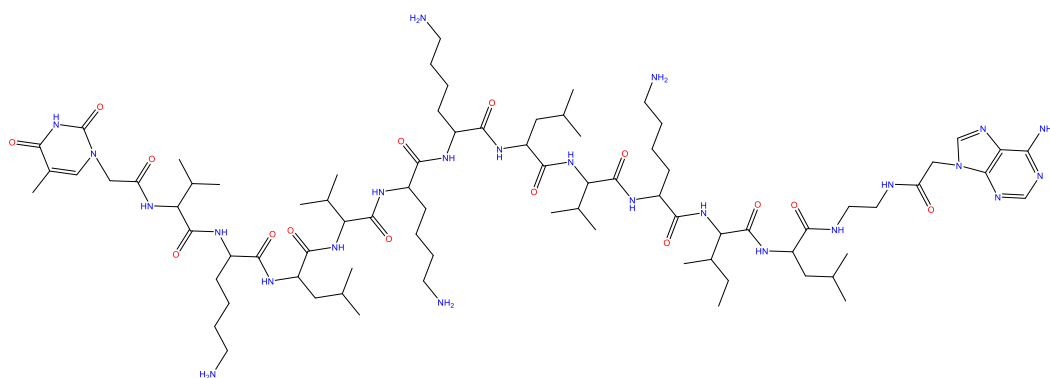


Figura 3.3521 Struttura del peptide Thym-Trick-Ade

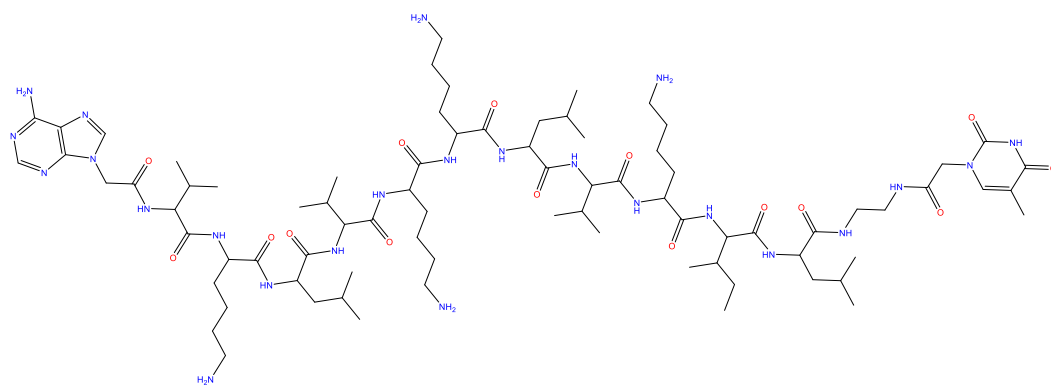


Figura 3.3622 Struttura del peptide Ade-Trick-Thym

Sono riportati in seguito i risultati ottenuti per il peptide Thym-Trick-Ade con SUVs PE/PG. Misurazioni al DLS con le SUVs *pristine* sono riportate in figura 3.37 come riferimento.

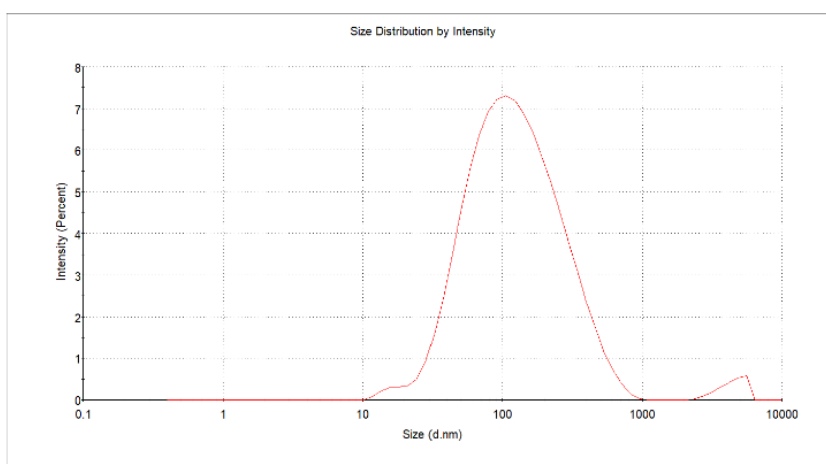


Figura 3.37 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante 23 DLS su una soluzione di liposomi PE/PG non trattati (*pristine*).

Le dimensioni dei liposomi in assenza di peptide si attestano prevalentemente intorno ai 100 nm. La polidispersività del campione potrebbe essere dovuta a una certa aggregazione dei liposomi all'interno della soluzione.



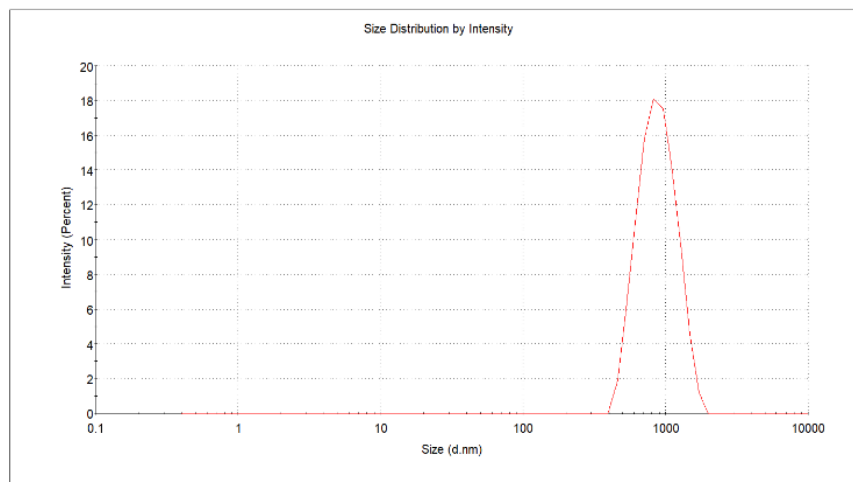


Figura 3.38 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante 24 25 DLS: Thym-Trick-Ade in liposomi PE/PG a rapporto peptide/lipide 1:6.

L'aggiunta di peptide Thym-Trick-Ade (rapporto peptide/lipide = ) induce una variazione dimensionale dei liposomi (figura 3.38). Il campione analizzato si presenta polidisperso, con una distribuzione di diametro centrata a 1000 nm.

Per indagare se l'aumento delle dimensioni medie sia correlato alla fusione dei liposomi o, alla formazione di aggregati degli stessi, diversi campioni sono stati osservati anche al TEM. Come descritto nel Capitolo 1, i peptidi possono presentare attività di *leakage*, aggregazione e fusione, talvolta contemporaneamente (59): in quest'ottica, il TEM può fornire un'indicazione specifica sull'eventuale formazione di aggregati e sulla dimensione dei liposomi.

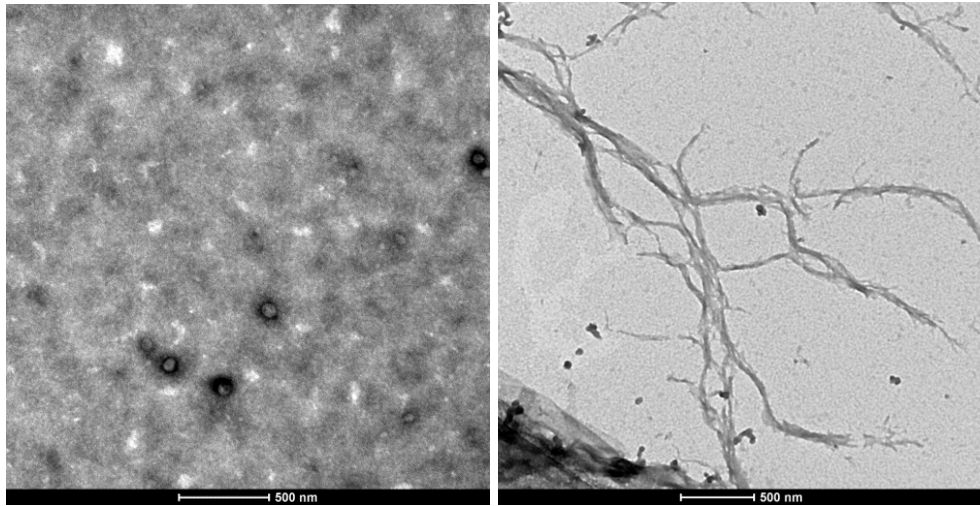


Figura 3.39 A sinistra: SUVs PE/PG *pristine*. A destra: immagini al TEM del peptide Thym-Trick-Ade.

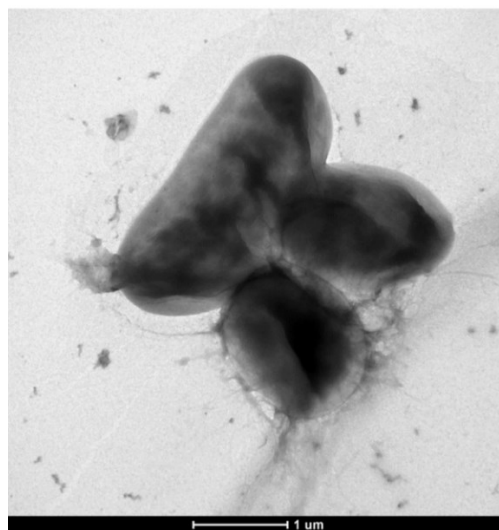
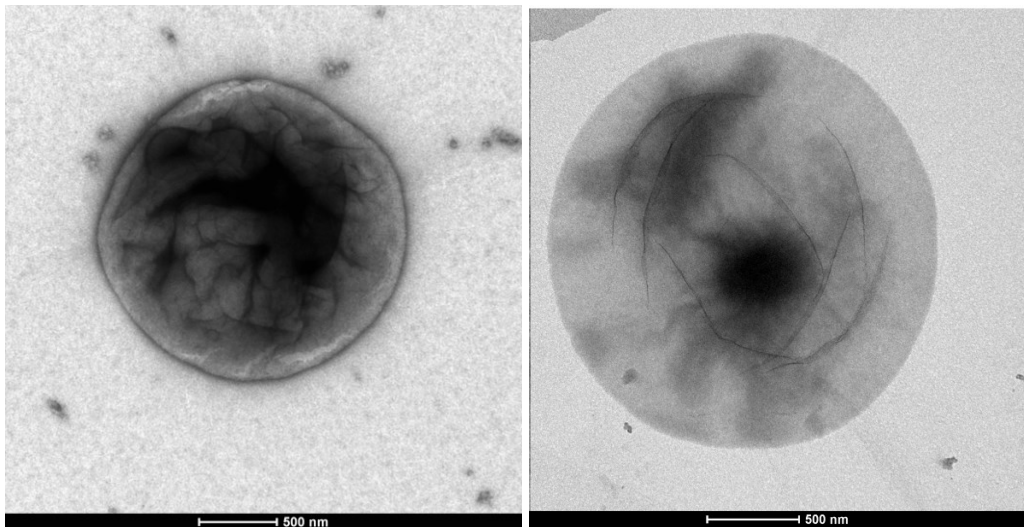


Figura 3.40 26 Immagini TEM della soluzione del peptide Thym-Trick-Ade in liposomi (rapporto peptide/lipide 1:2).

Si può apprezzare, paragonando le SUVs prima (figura 3.39) e dopo l'aggiunta del peptide Thym-TrickK-Ade fino a un rapporto peptide/lipide 1/2 (figura 3.40), un aumento delle dimensioni delle stesse: presentandosi intatte, è plausibile supporre che le membrane si siano fuse.

Sono state quindi analizzate le sequenze sintetizzate in questo lavoro di Tesi, progettate per cercare di ottenere la fusione su membrane zwitterioniche PC/Ch, non osservata in precedenza. Non avendo dei peptidi da noi sintetizzati come riferimento, si sceglie quindi di utilizzare il TAT (figura 3.41) come sequenza modello per verificare solamente la fusione delle SUVs PC/Ch .

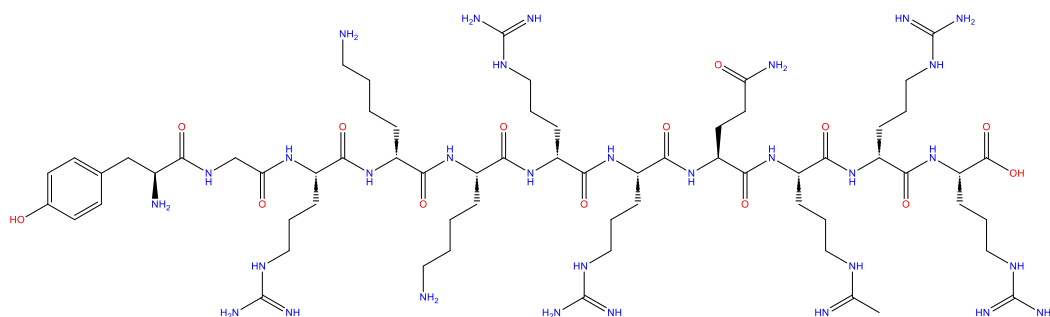


Figura 3.41 27 Struttura del peptide TAT:

**H-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-OH**

Il peptide TAT è una sequenza derivata dal transattivatore trascrizionale del virus dell'immunodeficienza umana, ed è definito come *cell-penetrating peptide*. Questa categoria di peptidi è caratterizzata da sequenze corte in grado di penetrare la barriera lipidica delle cellule, fondendone le membrane. (40) (39)

Inizialmente, sono state verificate le capacità del peptide nuovo Ade-TrickL-Thym di fondere le membrane modello PE/PG. Analogamente a quanto sopra esposto, sono state svolte anche le misurazioni al DLS delle corrispondenti SUVs *pristine*.

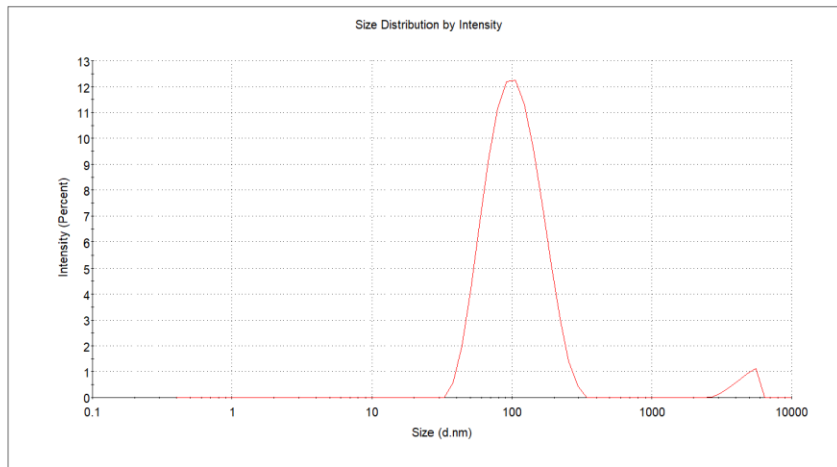


Figura 3.42 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante 2829 DLS: su una soluzione di liposomi PE/PG non trattati (*pristine*).

Come nelle analisi precedenti, le dimensioni dei liposomi in assenza di peptide si attestano prevalentemente intorno ai 100 nm. La polidispersività del campione potrebbe essere dovuta ad aggregazione dei liposomi all'interno della soluzione.

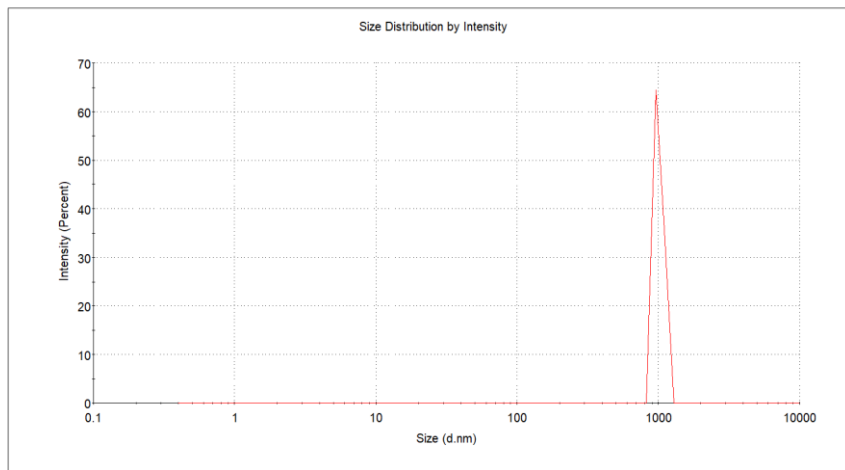


Figura 3.43 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante 3031 DLS: Ade-TrickL-Thym in liposomi PE/PG a rapporto peptide/lipide 1:3. .

Rispetto al caso del peptide Thym-Trick-Ade precedentemente descritto, la

distribuzione si presenta più stretta, con una polidispersione inferiore: le vescicole hanno dimensioni più omogenee, sempre però centrate a 1000 nm.

Sono stati portati al TEM diversi campioni per verificare la fusione delle membrane (Figura 3.44).

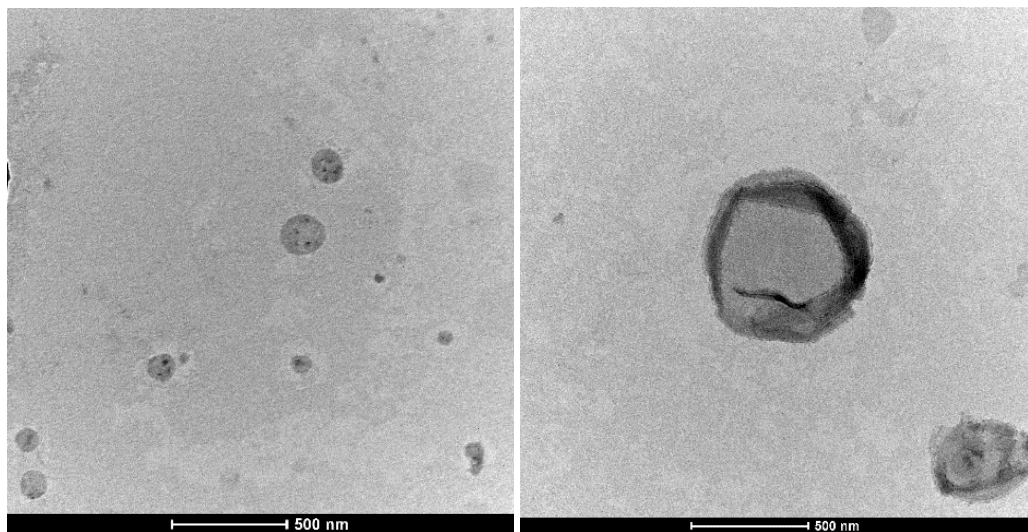


Figura 3.44 A sinistra: SUVs PE/PG *pristine*. A destra: soluzione peptide A-TrickL-T/lipidi 1:15

Si osserva un aumento delle dimensioni delle vescicole dopo l'aggiunta di peptide. Anche in questo caso le strutture sono ben riconoscibili, confermando l'ipotesi della fusione delle membrane.

La capacità di fondere le SUVs PE/PG è stata quindi confermata anche per il peptide A-TrickL-T, contenente l'amminoacido Leu al posto di Aib nella sequenza.

Per monitorare il comportamento di questo peptide con le membrane zwitterioniche PC/Ch è stato seguito lo stesso procedimento.

Anche in questo caso, sono state effettuate misurazioni al DLS con le SUVs *pristine*, come riferimento (figura 3.45).

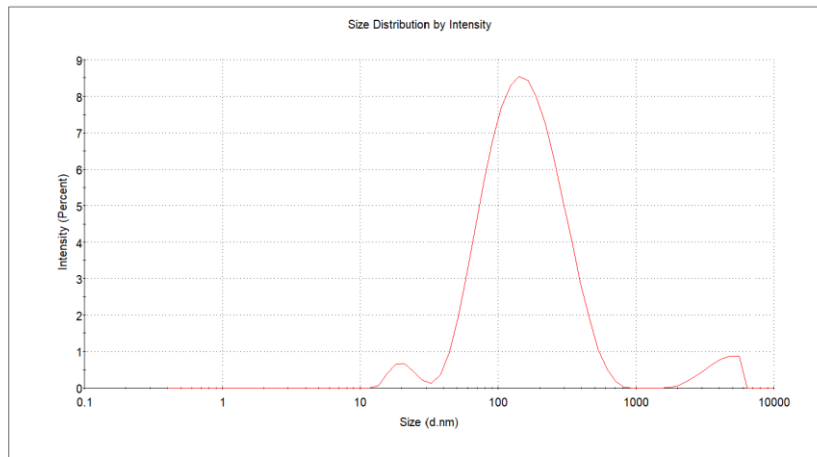


Figura 3.45 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante DLS: su una soluzione di liposomi PC/Ch non trattati (*pristine*).

Le dimensioni dei liposomi in assenza di peptide è maggiore rispetto alle SUVs PE/PG. La polidispersività del campione potrebbe essere dovuta ad aggregazione dei liposomi all'interno della soluzione.

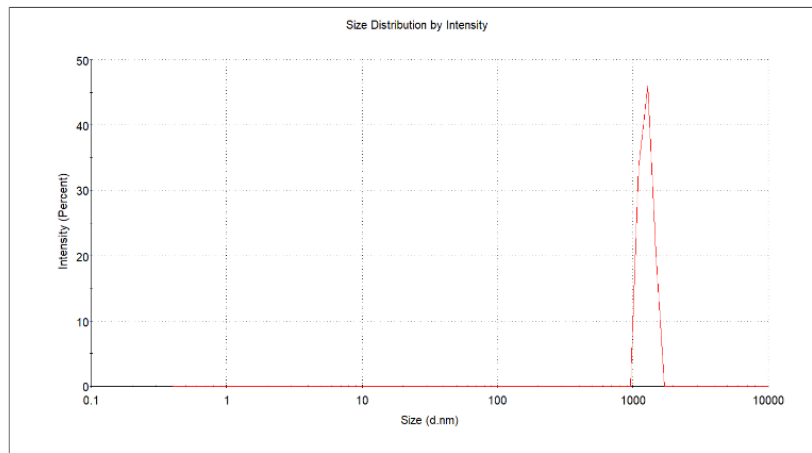


Figura 3.46 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante DLS: TAT in liposomi PC/Ch a rapporto peptide/lipide 1:30.

L'aggiunta del TAT aumenta le dimensioni dei liposomi (figura 3.46), perché ne causa la fusione (40).

Avendo effettuato, a questo punto, delle misurazioni con un peptide standard per la fusione, si svolgono misurazioni al DLS per il peptide Ade-TrickL-Thym con le SUVs PC/Ch (figura 3.47).

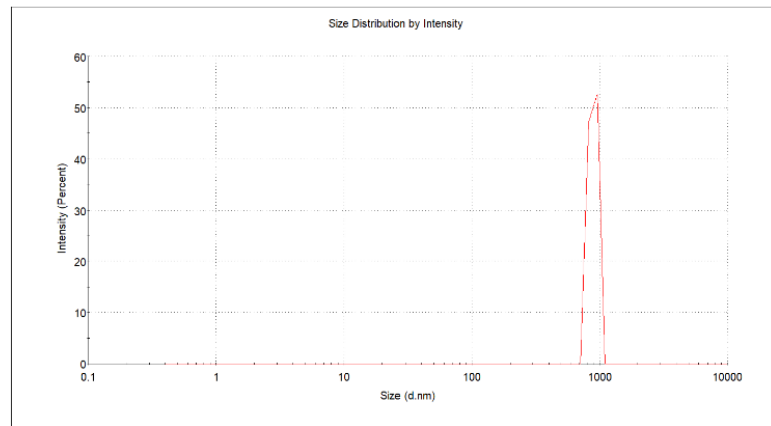
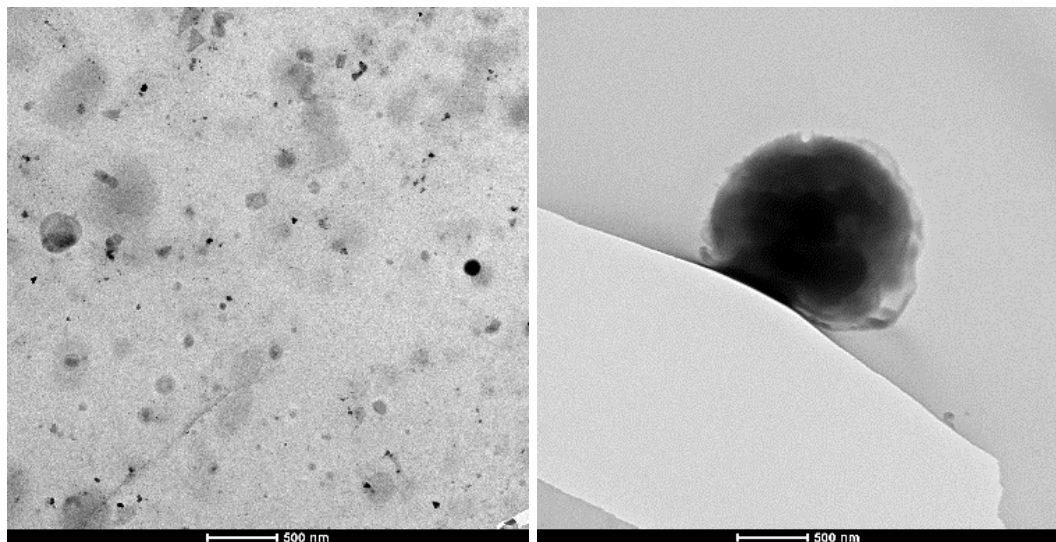


Figura 3.47 Distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi mediante DLS Ade-TrickKL-Thym in liposomi PE/PG a rapporto peptide/lipide 1:3. .

La distribuzione mostra un profilo analogo all'aggiunta del TAT ai liposomi. La polidispersione risulta molto ridotta se paragonata alle SUVs *pristine*. Infine, sono stati portati al TEM i diversi campioni, per visualizzare l'eventuale fusione delle membrane.



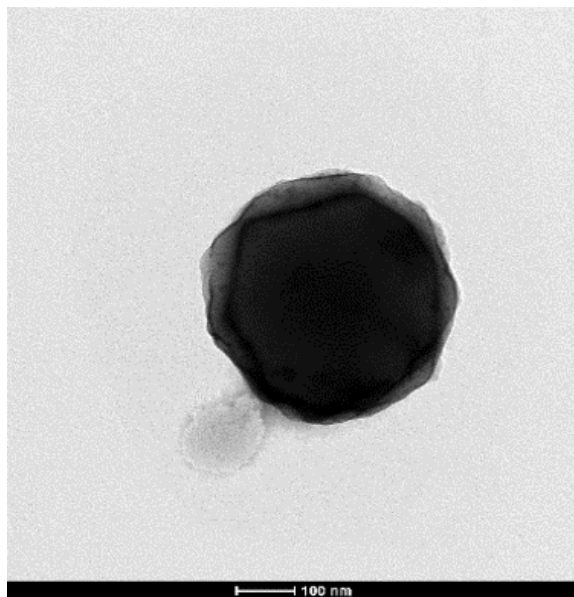


Figura 3.48 Immagini TEM della soluzione del peptide Ade-TricKL-Thym in liposomi PC/Ch (rapporto peptide/lipide 1:6 ).

Paragonando le immagini al TEM delle SUVs prima e dopo l'aggiunta di peptide (figura 3.48), si può apprezzare un aumento delle dimensioni delle stesse. Anche in questo caso la forma dei liposomi è mantenuta e ben riconoscibile, confermando l'ipotesi della fusione delle membrane.

La sostituzione nella sequenza di Aib con Leu ha permesso al peptide di riuscire a fondere membrane zwitterioniche.



## 4 PARTE SPERIMENTALE

### 4.1 Materiali e metodi

#### 4.1.1 Reagenti e solventi

<b>Avanti polar lipids</b>	PE; PG; PC
<b>Carbosynth</b>	HATU
<b>Carlo Erba</b>	Acetonitrile per HPLC; MeOH per HPLC; TEA
<b>Fluka</b>	NaCl
<b>Honeywell</b>	DCM; Dietil etere; DMF; Piperidina
<b>Iris Biotech</b>	DIC; DIPEA; Fmoc-lys(Boc)-OH; Fmoc-AA-OH; Oxyma-Pure; Z-OSu; 1,2-diaminoethane trityl
<b>Merk</b>	KHSO <sub>3</sub> ; NAHCO <sub>3</sub>
<b>Sigma</b>	Acetone; CF; CH; EDC; Etile adenina-9- acetato; HCl; HCl 3M in MeOH; HOAt; HOBt; Kit Kaiser Test; MeOH; NaOH; SDS; TFA per HPLC; HFIP; Thymine-1-acetic acid; Triton

#### 4.1.2 Strumentazioni e metodi

##### HPLC – High Performance Liquid Chromatography

Per questo lavoro di Tesi è stato utilizzato un cromatografo *Pharmacia Biotech* con detector in grado di rilevare a tre lunghezze d'onda: 208, 215 e 260nm. Si è usata la seguente colonna a fase inversa: Agilent Zorbax RX-C<sub>18</sub> 5µm con flusso di 1mL/min.

Per quanto riguarda gli eluenti sono stati utilizzati:

- Eluente A → 9/1 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.05% TFA
- Eluente B → 1/9 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.05% TFA.

Prima della preparazione degli eluenti, per evitare l'insorgenza di bolle d'aria durante la corsa cromatografica, si effettua un'operazione di degasaggio dell'H<sub>2</sub>O MilliQ.

## Reverse Phase Chromatography

Tutti i peptidi sintetizzati sono stati purificati utilizzando cromatografia a fase inversa a bassa pressione. Lo strumento è un cromatografo *Isolera Prima Biotage* con rivelatore a due lunghezze d'onda comprese tra 400 e 200nm. Sono state utilizzate due colonne per le purificazioni: C<sub>18</sub> SNAP 12g con un volume di colonna di 15mL e C<sub>18</sub> SNAP 30g con volume di 33mL. Le colonne differiscono per la quantità di campione grezzo caricabile. I flussi operativi rispecchiano la dimensione delle colonne e sono rispettivamente di 12 mL/min e di 25 mL/min. Il caricamento si effettua su cartuccia; il volume di solvente utilizzato in questa fase deve rispettare le specifiche indicazioni di caricamento indicate dal produttore.

Sono stati utilizzati i seguenti eluenti per la purificazione di Ade-TrickL-Thym:

- Eluente A → H<sub>2</sub>O MilliQ con 0.1% HCl
- Eluente B → 1/9 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.1% HCl.

Per la purificazione di Z-TrickL-Z:

- Eluente A → 1/9 v/v acetonitrile / H<sub>2</sub>O MilliQ con 0.1% HCl
- Eluente B → 1/9 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.1% HCl.

## Spettrometria di massa

Sono stati utilizzati due spettrometri a iniezione diretta:

- *Micromass Q-Tof micro*: analizzatore a tempo di volo con sorgente ESI a ionizzazione positiva.
- *Xevo G2-XS QTof*: analizzatore a tempo di volo usato nella configurazione *ToF MS ESI+*.

## Dicroismo Circolare (CD)

Lo strumento utilizzato per l'acquisizione è lo spettrometro Jasco J-1500. Il caricamento del campione viene eseguito in una cella di quarzo con cammino ottico di 0.1 cm (Hellam). Gli spettri sono stati acquisiti con un numero di accumuli pari a 32, tra 290 e 190 nm; la concentrazione dei campioni è di 10<sup>-4</sup> M.

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

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

$\Theta$  = ellitticità osservata;

$PM$  = peso molecolare totale del peptide;

$l$  = lunghezza del cammino ottico in cm;

$c$  = concentrazione in g/L;

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

I solventi utilizzati sono MeOH, H<sub>2</sub>O e sodiododecilsolfato (SDS).

Le operazioni svolte per migliorare la qualità dello spettro, eliminando il rumore di fondo sottraendo lo spettro del bianco, è stata svolta grazie all'utilizzo del programma JASCO Spectra Manager.

### Liofilizzatore

Per il processo di liofilizzazione viene utilizzato un liofilizzatore *Edwards Modulyo*. Caratterizzato da otto porte alle quali vengono agganciati i palloni, preventivamente congelati a -78°C con ghiaccio secco e acetone.

Successivamente, aprendo le valvole collegate ai rispettivi palloni, si portano a vuoto. L'operazione di liofilizzazione è stata svolta generalmente overnight.

## **4.2 Studio di permeabilità su membrane lipidiche artificiali PC/Ch e PE/PG**

La preparazione dei liposomi viene svolta incubando i fosfolipidi di cui sono composti e la carbossifluoresceina al buio per 12 ore (*overnight*). Si ottengono vescicole multilamellari che sono sottoposte a cicli di sonicazione. Per separare i liposomi dalla carbossifluoresceina in eccesso,

si prepara una colonna per effettuare una cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC).

#### **4.2.1 SUV PC/CH**

Sono stati pesati e trasferiti in un provettone a fondo sferico, 25 mg di PC (MW = 768.93 g/mol) che corrispondono a 32.5  $\mu$ mol. Sono stati aggiunti 5.39 mg di CH (MW = 386.70 g/mol) che corrispondono a 13.9  $\mu$ mol. Si scioglie in DCM, ottenendo così una soluzione 7:3 PC/CH. Successivamente, fatto evaporare il solvente sotto flusso di azoto, si ripone il provettone in essiccatore per un'ora e mezza.

Viene preparata una soluzione di CF 50.2 mM sciogliendo 113.4 mg di CF in 4 mL di H<sub>2</sub>O, 1 mL di NaOH e 1 mL di soluzione di HEPES 30 mM a pH = 7.40.

Segue, a questo punto, la procedura di idratazione del film fosfolipidico formatosi sul fondo del provettone con i 6 mL della soluzione di CF: è necessario mescolare vigorosamente per staccare i fosfolipidi dal fondo, eventualmente con l'ausilio di una spatola. Il rapporto CF/lipidi totali ottenuto è di 6/1.

Si lascia ad incubare al buio e a temperatura ambiente per tutta la notte, ottenendo in questo modo i liposomi multilamellari.

La mattina seguente, per ottenere liposomi monolamellari (SUV) si effettuano due cicli di sonicazione, al buio in bagno di ghiaccio, della durata di 30 minuti ciascuno.

Per eliminare la CF non inglobata nelle SUV si utilizza la tecnica della cromatografia a esclusione dimensionale (SEC). Si utilizza una colonna Sephadex G-75 (5.6g). Come eluente è stata usata una soluzione precedentemente degasata di NaCl 100 mM tamponata con HEPES 5 mM a un pH = 7.40.

Supponendo di aver raccolto la totalità dei lipidi, si porta a 100 mL con l'eluente, la miscela di SUV ottenendo in questo modo la soluzione madre 0.464 mM.

Per effettuare le misure si prepara una soluzione con una concentrazione

0.06 mM: sono stati prelevati dalla soluzione madre 32.3 mL e portati a volume in 250 mL con HEPES 5mM.

#### **4.2.2 SUV PE/PG**

Sono stati pesati e trasferiti in un provettone a fondo sferico, 21.49 mg di PC (MW = 768.0 g/mol) che corrispondono a 27.98  $\mu$ mol. Sono stati aggiunti 9.56 mg di CH (MW = 797.04 g/mol) che corrispondono a 9.56  $\mu$ mol. Si scioglie in DCM, ottenendo così una soluzione 7:3 PC/CH. Successivamente, fatto evaporare il solvente sotto flusso di azoto, si ripone il provettone in essiccatore per un'ora e mezza.

Viene preparata una soluzione di CF 50.2 mM sciogliendo 113.4 mg di CF in 4 mL di H<sub>2</sub>O, 1 mL di NaOH e 1mL di soluzione di HEPES 30 mM a pH = 7.40.

Segue, a questo punto, la procedura di idratazione del film fosfolipidico formatosi sul fondo del provettone con i 6 mL della soluzione di CF: è necessario mescolare vigorosamente per staccare i fosfolipidi dal fondo, eventualmente con l'ausilio di una spatola. Il rapporto CF/lipidi totali ottenuto è di 6/1.

Si lascia ad incubare al buio e a temperatura ambiente per tutta la notte, ottenendo in questo modo i liposomi multilamellari.

La mattina seguente, per ottenere liposomi monolamellari (SUV) si effettuano due cicli di sonicazione, al buio in bagno di ghiaccio, della durata di 30 minuti ciascuno.

Per eliminare la CF non inglobata nelle SUV si utilizza la tecnica della cromatografia a esclusione dimensionale (SEC). Si utilizza una colonna Sephadex G-75 (5.6g). Come eluente è stata usata una soluzione precedentemente degasata di NaCl 100 mM tamponata con HEPES 5 mM a un pH = 7.40.

Supponendo di aver raccolto la totalità dei lipidi, si porta a 100 mL con l'eluente, la miscela di SUV ottenendo in questo modo la soluzione madre 0.40 mM.

Per effettuare le misure si prepara una soluzione con una concentrazione

0.06 mM: sono stati prelevati dalla soluzione madre 37.5 mL e portati a volume in 250 mL con HEPES 5mM.

### 4.2.3 Misure di intensità di fluorescenza

Vengono svolti esperimenti di intensità di fluorescenza per verificare il rilascio di CF dalle SUV. Si utilizzano cuvette di polistirene con cammino ottico di 1 cm, contenenti 2.5 mL di sospensione lipidica. Lo strumento utilizzato per queste rilevazioni è uno spettrofluorimetro *Perkin-Elmer LS50B*: le misure vengono effettuate a temperatura ambiente eccitando a 488 nm e leggendo l'emissione di fluorescenza a 520 nm.

Si inseriscono diverse aliquote di peptide, sciolto in MeOH, per ottenere diversi valori di rapporto peptide/lipide ( $R^{-1}$ ). Si effettua un controllo positivo per ogni cuvetta, determinando l'intensità totale di fluorescenza, distruggendo le vescicole con 50  $\mu$ L di una soluzione di Triton X-100 al 10% in acqua, preparata diluendo dieci volte la soluzione commerciale.

Si utilizza la seguente relazione per determinare la percentuale di CF rilasciata dalle vescicole ai diversi valori di  $R^{-1}$ :

$$\%CF = \frac{F_{20'} - F_0}{F_T - F_0} \times 100$$

$F_0$  = intensità di fluorescenza delle SUVs in assenza di peptide;

$F_{20'}$  = intensità di fluorescenza delle SUVs con peptide dopo 20 minuti;

$F_T$  = intensità totale di fluorescenza delle SUVs con Triton X.

### 4.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

Le misure di *Dynamic Light Scattering*, necessarie ad indagare la fusione delle membrane modello, sono state svolte con lo strumento *Malvern ZS nano DLS* dotato di laser a diodi da 4.5 mW come sorgente di luce operante a 670 nm. Questo strumento permette di determinare le dimensioni di particelle disciolte e sospese in un intervallo di dimensioni compreso tra 2 e 1000 nm, mantenendo costante la temperatura dello scomparto campioni. I fotoni vengono rilevati con un angolo di 173°, condizione utilizzata in letteratura per indagare il diametro dei liposomi. (60) La temperatura

impostata è di 25°C. Non sono stati effettuati trattamenti al campione: è stata prelevata direttamente la cuvetta da analizzare proveniente dagli esperimenti di *leakage*.

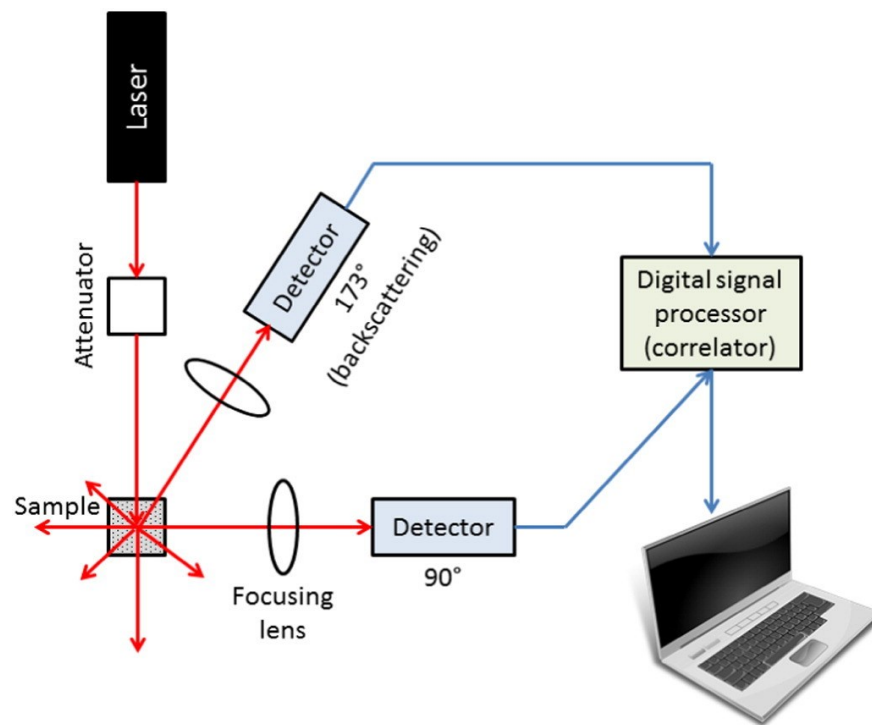


Figura 432.1 Schema generale dello strumento Malvern ZS nano DLS (61)

Questa tecnica permette di relazionare il moto browniano con la dimensione delle particelle illuminate da un laser, analizzando l'intensità delle fluttuazioni della luce diffusa emessa dalle stesse. Si utilizza poi l'equazione di Stokes-Einstein, per correlare il coefficiente di diffusione traslazionale in diametro idrodinamico ( $d_H$ ) di una sfera:

$$d_H = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D}$$

$d_H$  = diametro idrodinamico;

$k$  = costante di Boltzmann;

$T$  = temperatura assoluta;

$\eta$  = viscosità;

$D$  = coefficiente di diffusione.

Il risultato di questa analisi viene riportato in grafici aventi l'intensità della luce diffusa sull'asse delle ordinate e una distribuzione dimensionale sulle ascisse. (60)

Sebbene la distribuzione dimensionale generata dal DLS sia una distribuzione d'intensità, questa può essere convertita, usando la teoria di Mie, in una distribuzione di volume che a sua volta può essere ulteriormente trasformata in una distribuzione numerica. (60)

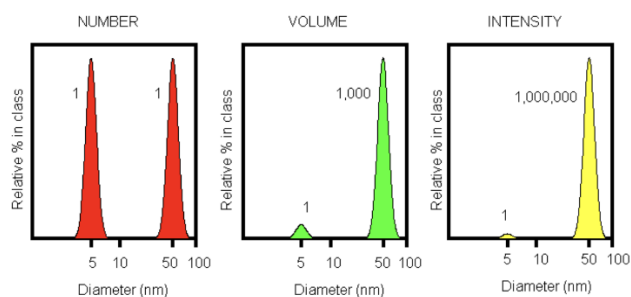


Figura 4.2 Da sinistra si può osservare una distribuzione numerica, di volume e di intensità di una miscela bimodale composta in egual misura da reticoli di 5 e 50 nm.

Tuttavia, la distribuzione di intensità è il metodo più utilizzato per determinare la dimensione di nanoparticelle che possono aggregare in piccole quantità (60), per questo utilizzata in questo lavoro.

#### 4.4 Transmission electron microscopy (TEM)

Sono state acquisite delle immagini al TEM delle sospensioni lipidiche addizionate con i peptidi, scegliendo le concentrazioni alle quali è stato osservato un intorbidimento del contenuto delle cuvette durante gli esperimenti di *leakage*.

Le misure sono state svolte presso il servizio di microscopia del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova. Lo strumento utilizzato è il microscopio elettronico a trasmissione *Tecna G2 (FEI)* con telecamera *OSIS Veleta 4Kpixel*.

Per la visualizzazione dei campioni è stata eseguita una tecnica di



colorazione al negativo, detta *negative staining*, utilizzando un sale acetato di uranile all'1% il quale viene fatto reagire sul campione posto su una griglia di carbone, con supporto in rame, per 10 minuti a temperatura ambiente. Questo risulta essere il passaggio fondamentale per l'osservazione al microscopio, perché l'acetato di uranile funge da contrasto con il bianco del campione. (62)

#### 4.5 Sintesi e caratterizzazioni

La sintesi in fase solida di un peptide è caratterizzata da una serie di passaggi ripetuti in maniera sistematica:

1. Si pesa la quantità di resina scelta all'interno di una siringa di reazione delle dimensioni adeguate alla quantità di resina utilizzata: per evitare l'impaccamento dei reagenti, sono stati utilizzati reattori da 15 mL. Le siringhe sono caratterizzate da un setto poroso in grado di trattenere i granelli di resina sui quali viene fatta crescere la sequenza peptidica, facendo passare tutte le sostanze liquide che non hanno reagito con la resina stessa.
2. Segue un processo di rigonfiamento della resina con DMF: la siringa viene riempita con circa 10 mL di solvente, necessari a ricoprire la resina. Si agita per 30-40 minuti e si svuota il reattore dalla DMF filtrando attraverso il setto poroso. Per garantire un adeguato rigonfiamento dei granelli, quindi l'esposizione dei siti attivi, si ripete questa operazione per due cicli.
3. Arrivati a questo punto, si svolgono le reazioni di *coupling*. Si pesano 3 equivalenti, rispetto alle mmol/g di resina, di amminoacido Fmoc-protetto, si sciolgono in una boccetta con la minima quantità necessaria di DMF degasata. Si aggiungono nella medesima gli attivatori con le stesse modalità: 3 equivalenti di Oxyma-Pure e 3 equivalenti di DIC. Seguono spesso agitazione con vortex e sonicazione, fino alla scomparsa totale dei solidi in boccetta. La soluzione viene trasferita nel reattore e si lascia reagire per 55 minuti. Nel caso del *coupling* della Adenina-COOH vengono utilizzati

- 3 equivalenti di Ade-COOH, 3 equivalenti di HATU, 3 equivalenti di HOAt e 4 equivalenti di DIPEA: ogni *coupling* svolto dura 120 minuti.
4. Si rimuovono per filtrazione le specie non reagite effettuando 5 lavaggi con DMF. Nel caso in cui si scelga di ripetere il *coupling* non si deve effettuare la rimozione del gruppo protettore Fmoc, ripartendo dal punto 3.
  5. Si effettua la rimozione del gruppo protettore Fmoc dall'aminoacido legato alla resina, inserendo nel reattore una soluzione di piperidina al 20% in DMF: la reazione si svolge in due cicli, il primo da 5 minuti, seguito da filtrazione, e il secondo da 10 minuti.
  6. Seguono 7 lavaggi con DMF per la rimozione totale di piperidina dal reattore: la presenza di quest'ultima nella reazione successiva potrebbe portare alla rimozione accidentale del gruppo protettore dell'amminoacido entrante.
  7. Si riprende con le reazioni di *coupling* come descritto nel punto 3, fino alla conclusione della sequenza peptidica.

#### **4.5.1 Sblocco del peptide dalla resina**

Durante la sintesi è possibile monitorare la presenza di ammine libere, verificando la sequenza del peptide, prelevando pochi granelli di resina. Si rimuove la DMF residua nella resina con DCM, seccando in questo modo i granelli. Si può eseguire a questo punto un *Kaiser Test*, descritto nel dettaglio nel paragrafo 4, oppure staccare il peptide dalla resina, con un'opportuna miscela di sblocco, e analizzarlo con tecniche di HPLC e spettrometria di massa.

In questo lavoro di Tesi, la miscela di sblocco utilizzata è composta da un acido debole HFIP in una soluzione di DCM 3:7: l'utilizzo di un acido debole è fondamentale per evitare la rimozione dei gruppi Boc presenti in catena laterale delle Lys.

Si inserisce nella siringa la quantità di soluzione necessaria a ricoprire la resina e si lascia sotto agitazione per circa un'ora. Alla fine dello sblocco si filtra il liquido in boccetta e si porta a secco sotto flusso di azoto.

Per lo quanto riguarda lo sblocco del peptide dall'intera resina, ne vengono svolti tre: i primi due hanno la durata di 60 min, mentre il terzo viene svolto *overnight*.

#### **4.5.2 Kaiser test**

Prelevando pochi granelli di resina è possibile monitorare in qualsiasi momento della sintesi la presenza, o meno, di ammine libere: in questo modo si determina la possibilità di sviluppare una strategia di correzione a sintesi in corso, ripetendo il *coupling* dell'amminoacido entrante.

Dal punto di vista operativo, si prelevano alcuni granelli di resina dai quali si rimuove la DMF con DCM. Seccata la resina, si inserisce in una provetta e si aggiungono nell'ordine:

- 20 µL di cianuro di potassio in piperidina;
- 20 µL di fenolo 80% in EtOH;
- 20 µL di ninidrina 6% in EtOH.

Con la pistola termica si scalda la provetta fino al raggiungimento della temperatura di 100°C circa. Si attendono 2-3 minuti per verificare il colore della resina: il test risulta positivo nel caso in cui la resina si colora di blu-viola e negativo se rimangono gialli-arancio.

#### **4.5.3 Purificazione**

Nel protocollo laboratoriale seguito per la sintesi del peptide Ade-TricKL-Thym, sono state svolte delle precipitazioni in etere etilico. Il peptide essendo insolubile in etere precipita. In seguito all'aggiunta di etere, si ripone in frigo a 4°C *overnight*. Seguono il giorno successivo centrifugazioni e recupero del surnatante, aggiungendo per tre volte etere fresco. Concluso il ciclo di precipitazioni e centrifugazioni, viene fatto evaporare l'etere sotto flusso di azoto e riposto il precipitato in essiccatore.

Recuperando e analizzando il surnatante, dopo averlo portato a secco, si è osservata la presenza di peptide. Si è supposto che le caratteristiche molto idrofobiche della sequenza abbiano influenzato la ripartizione del peptide, sia nella fase solida (precipitato) che in etere (surnatante). Per questo

motivo le precipitazioni in etere non sono state più svolte nelle successive sintesi.

#### 4.5.4 Sintesi in soluzione

In seguito alla sintesi in fase solida sono state svolte le funzionalizzazioni della catena peptidica in soluzione. Nel dettaglio, il *coupling* della base azotata Timina-COOH, per il peptide Ade-TrickL-Thym, e quello del carbobenzilossi per Z-TrickL-Z. Trasferito il peptide in un pallone con ancoretta, si scioglie con acetonitrile, circa 50-75 mL. In una boccetta di vetro, si sciolgono con acetonitrile 2 equivalenti di timina-CH<sub>2</sub>COOH, 2 equivalenti di HOBt e 2 equivalenti di EDC. La reazione viene svolta a pH = 8, si aggiunge goccia a goccia NMM alla miscela di reazione. Si tappa il pallone con tappo a cloruro di calcio e si monitora la scomparsa del reagente in HPLC e con spettrometria di massa. Per quanto riguarda il *coupling* del carbobenzilossi vengono aggiunti in tre aliquote 4 equivalenti di Z-OSu, già attivato, sciolti in acetonitrile, perché i siti da funzionalizzare sono il doppio. La base utilizzata in questo caso è la trietilammina. La reazione viene monitorata osservando la scomparsa di reagente in HPLC e con spettrometria di massa.

#### 4.5.5 Sintesi Ade-CH<sub>2</sub>COOH

In un pallone da 250 mL si inseriscono 2.301 g di AdeCH<sub>2</sub>COOEt e un'ancoretta magnetica. Si aggiungono 60 mL di MeOH e si lascia in agitazione in bagno a ghiaccio per 10 minuti. Vengono introdotti in pallone 60 mL di NaOH 2N, raggiungendo pH = 14.

Si mantiene la reazione in bagno a ghiaccio e sotto agitazione per 30 minuti. A questo punto, è stato aggiunto HCl 37% fino ad arrivare a pH = 1. Dopo l'introduzione dell'acido si forma un precipitato; segue una filtrazione su Gooch lavando il precipitato con poche aliquote H<sub>2</sub>O acidificata a pH = 3 fredda. Si lascia il filtro con il solido raccolto per due giorni in essiccatore. Sono stati pesati 1.9885 g di solido secco, con una resa del 98%.

#### 4.5.6 Sintesi Ade-TricKL-Thym

Sequenza del peptide sintetizzato:

Ade-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ile-Leu-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Thym

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 4.1, mentre il *coupling* della Timina-CH<sub>2</sub>COOH è stato svolto in soluzione come descritto nel paragrafo 4.2.

Sono stati pesati 510g della resina 1,2-diamminoetan-tritile, con loading, ovvero il numero di mmoli di siti attivi per grammo di resina, di 0.81 mmol/g. 1 equivalente corrisponde a 0.413 mmol. Si utilizzano 3 equivalenti di reagenti: amminoacidi N-protetti e attivatori. Per il *coupling* in fase solida di Ade-CH<sub>2</sub>COOH viene splittata la resina a metà, quindi cambiano le mmol degli amminoacidi, gli equivalenti mantengono la stessa proporzione rispetto alla resina. Infine, il rapporto Ade-CH<sub>2</sub>COOH e DIPEA è 3 equivalenti a 4.

Reagente	MW (g/mol)	mmol	Eq.	Peso (mg)	Densità (g/mL)	Volume ( $\mu$ L)
Fmoc-Leu-OH	353.41	1.24	3	437.9	/	/
Fmoc-Ile-OH	353.41	1.24	3	437.9	/	/
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.53	1.24	3	580.5	/	/
Ade-CH <sub>2</sub> COOH	193.00	0.62	3	119.56	/	/
Oxyma-Pure	142.11	1.24	3	176.07	/	/
DIC	126.20	1.24	3	/	0.815	168.75
HATU	380.23	0.62	3	234.18	/	/
HOAt	136.02	0.62	3	83.83	/	/
DIPEA	129.25	0.83	4	/	0.742	144

Sono stati eseguiti, in seguito a *Kaiser test* positivi:

- doppio *coupling* con Leu 7;
- doppio *coupling* con Leu 3.

Alle operazioni di sblocco del peptide, descritte nei paragrafi precedenti, segue il *coupling* della timina-CH<sub>2</sub>COOH in soluzione.

Nel processo di ottimizzazione della sintesi, si è osservato che effettuare una purificazione con cromatografia a fase inversa del peptide Ade-TricLNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> sbloccato, causa una grande perdita di peptide: l'elevata idrofobicità dello stesso, determinata dalla presenza dei gruppi protettori Boc e dalla base azotata, rende molto complesse le operazioni di caricamento della cartuccia precolonna e l'eluizione del peptide, che rimane talvolta ritenuto all'interno della colonna.

Si utilizzano quindi 2 equivalenti di timina-CH<sub>2</sub>COOH, 2 equivalenti di HOBt, 2 equivalenti di EDC e NMM goccia a goccia per raggiungere pH = 8. Unendo i tre sblocchi si hanno 320mg di peptide grezzo Ade-TricLNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> con una purezza del 50% da HPLC.

Reagente	MW (g/mol)	mmol	Eq.	Peso (mg)	Densità (g/mL)	Volume ( $\mu$ L)
Timina-CH <sub>2</sub> COOH	184.15	0.329	2	60.76	/	/
HOBt	153.41	0.329	2	50.62	/	/
EDC	191.7	0.329	2	63.26	/	/
NMM	101.15	0.329	2	/	0.92	40

Si è scelto di aggiungere un ulteriore equivalente perché sia nei cromatogrammi che negli spettri di massa si continuava ad osservare la presenza di reagente.

Avendo lavorato con eccesso di reagenti, prima di effettuare la reazione di deprotezione dei Boc, si è scelto di eseguire una serie di lavaggi per rimuovere dalla fase organica, per quanto possibile, le specie non reagite solubili in acqua. Nelle sintesi successive è stato deciso di evitare il *work up*: il peptide infatti, formando una sorta di emulsione tra la fase organica e quella acquosa, si ripartiva in entrambe; inoltre, da successive analisi, è stata osservata la presenza dello stesso sulle pareti dell'imbuto separatore. Per rimuovere i gruppi protettori Boc dalle catene laterali delle Lys, viene sciolto il peptide con 10 mL di HCl 3M in MeOH in un pallone da 100 mL con un'ancoretta al suo interno. Monitorando il picco del reagente con HPLC si rendono necessarie 3 cicli di deprotezione da 90 minuti ciascuno. Rimossi i Boc si effettuano 8 lavaggi con MeOH fresco portando a secco tra i vari lavaggi.

L'elevata quantità di impurezze rende necessario la purificazione del peptide con cromatografia a fase inversa. Gli eluenti usati sono:

- Eluente A → H<sub>2</sub>O MilliQ con 0.1% HCl
- Eluente B → 1/9 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.1% HCl.

Le frazioni con purezza inferiore al 90% vengono raccolte insieme in un pallone e, portato a secco l'acetonitrile, liofilizzate. Le frazioni contenenti il peptide con purezza superiore, vengono unite, portate a secco, liofilizzate e infine pesate.

Si sono ottenuti 16mg di peptide al 93.3% con una resa del 13%.

HPLC: gradiente da 20 a 100% B con 10 minuti a 100%; flusso 1mL/min; colonna Agilent Zorbax RX-C18) tr = 7.68 min.

HRMS: ESI [M+H]<sup>+</sup> = 1707.12 m/z, [M+2H]<sup>++</sup> = 854.06 m/z, [M+3H]<sup>+++</sup> = 569.38 m/z, [M+4H]<sup>++++</sup> = 427.54 m/z.

#### 4.5.7 Sintesi Cbz-TricKL-Cbz

Sequenza del peptide sintetizzato:

Cbz–Leu–Lys–Leu–Leu–Lys–Lys–Leu–Leu–Lys–Ile–Leu–NH–(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>–Cbz

Il peptide è stato sintetizzato attraverso la procedura di sintesi in fase solida descritta nel paragrafo 4.1, mentre il *coupling* per funzionalizzare le estremità della sequenza è stato svolto in soluzione come descritto nel paragrafo 4.2.

Sono stati pesati 510g della resina 1,2-diamminoetan-tritile, con loading, ovvero il numero di mmoli di siti attivi per grammo di resina, di 0.81 mmol/g. 1 equivalente corrisponde a 0.413 mmol. Si utilizzano 3 equivalenti di reagenti: amminoacidi N-protetti e attivatori.

Reagente	MW (g/mol)	mmol	Eq.	Peso (mg)	Densità (g/mL)	Volume ( $\mu$ L)
Fmoc-Leu-OH	353.41	1.24	3	437.9	/	/
Fmoc-Ile-OH	353.41	1.24	3	437.9	/	/
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.53	1.24	3	580.5	/	/
Oxyma-Pure	142.11	1.24	3	176.07	/	/
DIC	126.20	1.24	3	/	0.815	168.75

Essendo stata ottimizzata la sintesi della sequenza, sono stati eseguiti doppi e tripli *coupling*:

- doppio *coupling* con Leu 7;
- doppio *coupling* con Lys 5;
- triplo *coupling* con Leu 3;
- doppio *coupling* con Lys 2;
- doppio *coupling* con Leu 1.

Alle operazioni di sblocco del peptide, descritte nei paragrafi precedenti, segue il *coupling* del carbobenzilossi in soluzione. Come descritto nel



paragrafo 4. si evitano purificazioni intermedie.

Si utilizzano quindi 4 equivalenti di Cbz-OSu, trimetilammina (TEA) goccia a goccia per raggiungere pH = 8.

Reagente	MW (g/mol)	mmol	Eq.	Peso (mg)	Densità (g/mL)	Volume ( $\mu$ L)
Cbz-Osu	249.2	1.652	4	411.68	/	/
NMM	101.19	1.652	4	/	0.726	230

Non si effettua il *work-up* della reazione come descritto nel paragrafo precedente.

Per rimuovere i gruppi protettori Boc dalle catene laterali delle Lys, viene sciolto il peptide con 10 mL di HCl 3M in MeOH in un pallone da 100 mL con un'ancoretta al suo interno. Monitorando il picco del reagente con HPLC si rendono necessarie 3 cicli di deprotezione da 90 minuti ciascuno. Rimossi i Boc si effettuano 8 lavaggi con MeOH fresco portando a secco tra i vari lavaggi.

Nonostante l'ottimizzazione del processo di sintesi, osservando i cromatogrammi delle analisi effettuate con la tecnica HPLC, si osservano una serie di sottoprodotti che eluiscono che devono essere rimossi. Risulta necessario effettuare la purificazione del peptide con cromatografia a fase inversa. Gli eluenti usati sono:

- Eluente A  $\rightarrow$  9/1 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.1% HCl
- Eluente B  $\rightarrow$  1/9 v/v H<sub>2</sub>O MilliQ / acetonitrile con 0.1% HCl.

Si sono ottenuti 185mg di peptide al 85% con una resa del 47%.

HPLC: Z-TrickL-Z in MeOH gradiente: da 20 a 100% B con 10 minuti a 100%; flusso 1mL/min; colonna Agilent Zorbax RX-C18, tr = 16.45 min. Purezza 85%.

HRMS: ESI  $[M+H]^+$  = 1766.25 m/z,  $[M+2H]^{++}$  = 883.63 m/z,  $[(M-Boc)+2H]^{++}$  = 833.10 m/z,  $[(M-2Boc)+2H]^{++}$  = 783.08 m/z,  $[(M-3Boc)+2H]^{++}$  = 733.06 m/z,  $[(M-4Boc)+2H]^{++}$  = 683.53 m/z.



## 5 CONCLUSIONI

In questo lavoro di Tesi sono state sintetizzate due sequenze peptidiche:

- Ade-Leu<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Leu<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Leu<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Thym  
(Ade-TricKL-Thym);
- Cbz- Leu<sup>1</sup>Lys<sup>2</sup>Leu<sup>3</sup>Leu<sup>4</sup>Lys<sup>5</sup>Lys<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Leu<sup>8</sup>Lys<sup>9</sup>Ile<sup>10</sup>Leu<sup>11</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Cbz  
(Cbz-TricKL-Cbz).

Gran parte del lavoro svolto è stato incentrato sull'ottimizzazione del processo di sintesi, con lo scopo di risolvere le criticità che si sono sviluppate durante i primi tentativi. Non è stato possibile evitare totalmente la comparsa di sottoprodotti, in particolare per le reazioni di *coupling* con le basi azotate.

L'utilizzo di residui di lisina, Boc-protetti, e l'aumento di residui idrofobici, avendo sostituito l'amminoacido Aib con Leu, ha incrementato ulteriormente le problematiche legate alla solubilità; per questo motivo è risultato molto complesso effettuare purificazioni intermedie, trovandosi spesso a lavorare in soluzione con miscele ricche di impurezze.

Gli studi conformazionali hanno portato alla conclusione che il comportamento dei due peptidi è molto simile a quello del peptide analogo contenente Aib in metanolo ed in ambiente membrano mimetico, mentre la struttura risulta più flessibile e meno definita in acqua. Le modifiche strutturali, quindi, non hanno comportato variazioni conformazionali significative.

Gli studi sulla permeabilità di membrana sono stati svolti per peptidi precedentemente prodotti e per il peptide Ade-TricKL-Thym sintetizzato in questo lavoro di Tesi.

La modifica strutturale ha permesso di osservare la fusione sia con SUVs PE/PG cariche negativamente, come per l'analogo con Aib, che con le membrane modello zwitterioniche PC/Ch. È stato confermato il fatto che la presenza di residui idrofobici nella sequenza del peptide favorisca il fenomeno della fusione e permetta di modulare la permeabilità delle

membrane modello.

Concludendo, si è vista la possibilità di modulare la fusione di membrana attraverso l'inserzione di residui più idrofobici; è importante sottolineare che il peptide si struttura in ambiente membrano-mimetico, confermando l'importanza di questo fatto per l'interazione con le membrane stesse.

Per quanto riguarda Cbz-TricKL-Cbz, non si sono osservate differenze sostanziali di comportamento in ambiente membrano-mimetico; tuttavia, si svolgeranno in futuro studi di permeabilità di membrana per osservarne il comportamento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Strikingly Different Roles of SARS-CoV-2 Fusion Peptides Uncovered by Neutron Scattering. 2022, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **144**, pp. 2968-2979.
2. Fusion Peptide of SARS-CoV-2 Spike Rearranges into a Wedge Inserted in Bilayered micelles. Rama K. Koppiseti, Yan G. Fulcher, and Steven R. Van Doren. 2021, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **143**, pp. 13205–13211.
3. Kozlov, Leonid V Chernomordik and Michael M. 2008, *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. **15**, pp. 675-683.
4. R. Blumenthal, M. J. Clague, S. R. Durell, and R. M. Epand. 2003, *Chem. Rev.*, Vol. **103 (1)**, pp. 53-70.
5. Molecular Control of Vesicle Aggregation and Membrane Fusion: Hypothesis on Bile Vesicles. N., Duzgunes. 1990, *Hepatology*, Vol. **12**, pp. 67-74.
6. Tamm, L. K., et al. 2002, *Biopolymers*, Vol. **66 (4)**, pp. 249-260.
7. Fusion Peptides and the mechanism of viral fusion. Epand, R. M. 2003, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. **1614**, pp. 116-121.
8. Identification and Characteristics of Fusion Peptides Derived From Enveloped Viruses. Lozada, C., et al. 2021, *Frontiers in chemistry*, Vol. **9**, pp. 1-18.
9. Siegel, D.P. 1999, *Biophys. J*, Vol. **76**, pp. 291-313.
10. Chernomordik, L. 1996, *Chem. Phys. Lipids*, Vol. **81**, pp. 203-213.
11. Aggregation, Fusion, and Leakage of Liposomes Induced by Peptides. Yuqiong Xia, Jianbo Sun, and Dehai Liang. 2014, *Langmuir*, Vol. **30**, pp. 7334-7342.
12. Jianbo Sun, Yuqiong Xia, Dong Li, Quan Du and Dehai Liang. 2014, *Biochimica et Biophysica Acta BBA- Biomembranes*, Vol. **1838**, pp. 2985-2993.
13. Ramamourthy, G., et al. 2020, *Microorganisms*, Vol. **8 (5)**.
14. de Jesus, A.J. and Allen, T.W. 2013, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.

**1828**, pp. 864-876.

15. Shagaghi, N., et al. 2016, World J. Microbiol. Biotechnol., Vol. **32**, pp. 31-40.

16. M. De Zotti, E. Schievano, S. Mammi, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, S. B. Singh, H. Bruckner and C. Toniolo. 2010, Chemistry & Biodiversity, Vol. **7**, pp. 1612-1624.

17. C. B. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, E. Sándor and I. S. Druzhinina. 2007, Chemistry & Biodiversity, Vol. **4**, pp. 1068-1082.

18. R. E. Hancock, E. F. Haney and E. E. Gill. 2016, Nature reviews. Immunology, Vol. **16**, pp. 321-334.

19. B. M. Peters, M. E. Shirtliff and M. A. Jabra-Rizk. 2010, PLoS Pathog, Vol. **6 (10)**.

20. Gallo, K. Radek and R. 2007, Seminars in Immunopathology, Vol. **29**, pp. 27-43.

21. H. Jenssen, P. Hamill and R. E. Hancock. 2006, Clinical microbiology reviews, Vol. **19**, pp. 491-511.

22. F. García-Olmedo, A. Molina, J. M. Alamillo and P. Rodríguez-Palenzuela. 1998, Biopolymers, Vol. **47**, pp. 479-491.

23. Harman, J. L. Botsford and J. G. 1992, Microbiological Reviews, Vol. **56**, pp. 100-122.

24. Lehrer, R. E. Hancock and R. 1998, Trends in Biotechnology, Vol. **16**, pp. 82-88.

25. Zasloff, M. 2002, Nature, Vol. **415**, pp. 389-395.

26. N. K. N. Neumann, N. Stoppacher, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. 2015, Chemistry & Biodiversity, Vol. **12**, pp. 743-751.

27. Y. Shai, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999, , Vol. **1462**, pp. 55-70.

28. E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo and G. M. Bonora. 1982, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. **79**.

29. Brogden, K. A. 2005, Nature reviews. Microbiology, Vol. **3**, pp. 238-250.

30. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio and C. Peggion. 2001, Peptide

- Science, Vol. **60**, pp. 396-419.
31. J. M. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer. Biochimica. Bologna : Zanichelli, **2008**. pp. 296-299.
32. J. S. Richardson, in Advances in Protein Chemistry, eds. C. B. 1981, Academic Press, Vol. **34**, pp. 167-339.
33. C. Auvin-Guette, S. Rebuffat, Y. Prigent and B. Bodo. 1992, Journal of the America Society, Vol. **114**, pp. 2170-2174.
34. Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. T. Ebenhan, O. Gheysens, H. G. Kruger, J. Zeevaart, M. Sathekge. 2014, BioMed Research International, Vol. **2014**.
35. Brogden, K. A. 2005238-250, Nature reviews. Microbiology, Vol. **3**.
36. Laura, Gabbatore. Sintesi, caratterizzazione e studi di attività antitumorale di analoghi di peptidi naturali. Padova : s.n., **2019**.
37. R. F. Epand, R. M. Epand, V. Monaco, S. Stoia, F. Formaggio, M. Crisma and C. Toniolo. 1999, European journal of Biochemistry, Vol. **266**, pp. 1021-1028.
38. Boxer, Y. H. M. Chan and S. G. 2007, Current opinion in chemical biology, Vol. **11**, pp. 581-587.
39. Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. Torchilin, V. P. 2005, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. **57**, pp. 95-109.
40. Cell-Penetrating Peptide Induces Leaky Fusion of Liposomes Containing Late Endosome-Specific Anionic Lipid. Sung-Tae Yang, Elena Zaitseva, Leonid V. Chernomordik, and Kamran Melikov. 2010, Biophysical Journal, Vol. **99**, pp. 2525-2533.
41. Merrifield, R.B. 1963, Journal of the American Chemistry Society, Vol. **85**, pp. 2149-2153.
42. Sigma-Aldrich. sigmaaldrich.com. [Online]  
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/images/applications/chemistry-and-synthesis/solid-phase-peptide-synthesis/solid-phase-peptide-synthesis.jpg>.
43. Santagada-Caliendo. Peptidi e peptidomimetici. Padova : Piccin, **2003**,

pp. 302-303.

44. Han, L. A. Carpino and G. Y. 1970, Journal of the American Chemical Society, Vol. **92**, pp. 5748-5749.
45. A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. al., James E Sheppeck II et. 2000, Vol. **41**, pp. 5329-5333.
46. A. Isidro-Llobet, M. Àlvarez and F. Albericio. 2009, Chemical Reviews, Vol. **109**, pp. 2455-2504.
47. F. Carpino's protecting groups, beyond the Boc and the Fmoc. El-Faham, A. Albericio. **2020**, Peptide Science.
48. Falque, C. A. G. N. Montalbetti and V. 2005, Tetrahedron, Vol. **61**, pp. 10827-10852.
49. Albericio, A. El-Faham and F. Peptide coupling Reagents, More than a Letter Soup. Chemical Reviews. 2011, Vol. **111**, pp. 6557-6602.
50. Amino acid hydrophobicity and accessible surface area. Moret, M. A. and Zebende, G. F. s.l. : American Physical Society, 2007, Phys. Rev. E, Vol. **75**.
51. Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Carbobenzyloxy-protected Amino Acids and Peptides. B. Danieli, F. M. Rubino and A. Cremonesi. 1989, Organic Mass Spectrometry, Vol. **24**, pp. 225-229.
52. C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma and J. Kamphuis. 1996, Journal of the American Chemical Society, Vol. **118**, pp. 2744-2745.
53. T. S. Sudha, E. K. S Vijayakumar and P. Balaram. 1983, International journal of peptide and protein research, Vol. **22**, pp. 464-468.
54. Liposomes for oral delivery of protein and peptide-based therapeutics: challenges, formulation strategies, and advances. Apratim Jash, Ali Ubeyitogullari and Syed S. H. Rizvi. **24**, 2021, Journal of Materials Chemistry.
55. Yorek, A. A. Spector and M. A. 1985, Journal of lipid research, Vol. **26**, pp. 1015-1035.
56. Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence reuquenching. A. S. Ladokhin, W. C. Wimley, and S. H. White. November 1995, Biophys J., Vol. **69** , pp. 1964-1971.



57. C. Peggion, F. Formaggio, M. Crisma, R. F. Epand, R. M. Epand and C. Toniolo. 2003, *Journal of Peptide Science*, Vol. **9**, pp. 679-689.
58. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, V. Monaco, C. Goulard, S. Rebuffat and B. Bodo. 1996, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. **118**, pp. 4952-4958.
59. Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides. Jianbo Sun, Yuqiong Xia, Dong Li, Quan Du and Dehai Liang. **1838**, 2014, *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 2985-2993.
60. Malvern. Zetasizer Nano User Manual. **2013**. pp. 1-250.
61. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Bhattacharjee, Sourav. 2016, *Journal of Controlled Released*, Vol. **235**, pp. 337-351.
62. Imaging of Liposomes by Transmission Electron. BAXA, U. 2018, *Methods Molecular Biology*, Vol. **1682**, pp. 73-88.
63. Sansom, M. S. 1991, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* , Vol. **55**, pp. 139-235.
64. M. Epand, Y. Shai, J. P. Segrest and G. M. Anantharamaiah. 1995, *Biopolymers*, Vol. **37**, pp. 319-338.