



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

SINTESI DI PEPTIDI CONIUGATI AD UNITA' DI FERROCENE CON ATTIVITA'  
ANTITUMORALE

Relatore: Prof. Barbara Biondi

Laureando: Elia Bortot  
2009825

Anno Accademico 2022/2023

# Indice

1. Introduzione.....	1
1.1. Cancro .....	1
1.2. Chemioterapici .....	2
1.3. Organometalli.....	3
1.4. ferrocene .....	3
1.4.1. Ferrocene come medicinale.....	4
1.4.2. Composti del ferrocene .....	4
1.4.3. ROS.....	6
1.4.4. Ferrocene e peptidi.....	7
1.5. Integrine .....	7
1.5.1. Farmaci ed integrine .....	8
1.6. Scopo della tesi.....	9
1.7. Sintesi in fase solida .....	9
1.7.1 Strategie di SPPS .....	11
2. Parte sperimentale.....	13
2.1. Materiali e metodi.....	13
2.1.1. Reagenti e solventi.....	13
2.1.2. Strumenti: .....	13
2.2. Sintesi .....	14
2.2.1. Kaiser test .....	15
3. Caratterizzazione.....	16
4. Discussione .....	18
5. Conclusione.....	18
6. Bibliografia .....	19

# 1. Introduzione

Il cancro è una patologia sempre più diffusa a livello globale e la ricerca farmaceutica è costantemente impegnata nell'individuazione di nuovi e migliori farmaci per combatterlo. I farmaci tuttora utilizzati hanno spesso importanti effetti collaterali dovuti ad una scarsa selettività per le cellule tumorali. Si stanno quindi esplorando nuove molecole e nuove strategie di somministrazione per superare i limiti attuali. In questo elaborato verrà preso in considerazione il ferrocene, per le sue proprietà antitumorali, e la sua coniugazione a peptidi in grado di riconoscere in modo selettivo alcune tipologie di cellule tumorali inducendone l'apoptosi.

## 1.1. Il Cancro

Il cancro è una patologia sempre più comune nel mondo a causa sia dell'allungamento dell'aspettativa di vita che dell'efficacia della medicina nei confronti delle altre patologie, tanto che è la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari, <sup>[1]</sup> con 19.3 milioni di nuovi casi nel 2020, distribuiti come in figura 1. <sup>[2]</sup>

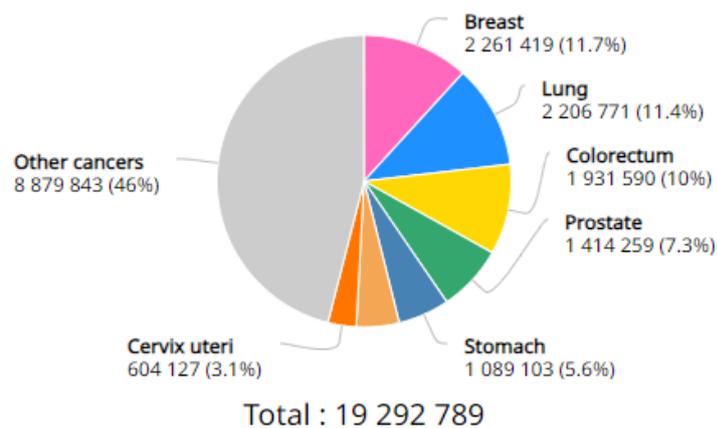


Figura 1 numero di nuovi casi di tumore nel 2020 a livello globale, per tutte le età e sessi [2]

È una patologia molto varia per sintomi e cause ma ha alla base del suo sviluppo dei processi comuni e caratteristici. Si sviluppa in seguito ad una serie di mutazioni genetiche nelle cellule dell'individuo che le fanno diventare cancerose. Le mutazioni avvengono a carico di un insieme di geni che controllano la proliferazione e la morte cellulare e come conseguenza del loro malfunzionamento le cellule mutate si moltiplicano e crescono ad un ritmo molto superiore rispetto alla loro controparte sana.

Non è la mutazione di un singolo gene che genera una cellula tumorale bensì un insieme di mutazioni a diversi geni regolatori della vita cellulare, nello specifico si possono individuare:

- **Oncogeni:** sono geni che nella cellula sana promuovono la crescita e divisione cellulare in modo controllato. Alcune mutazioni a questi geni o la loro sovraespressione portano la cellula ad avere un eccesso di stimoli di crescita causando una moltiplicazione incontrollata.
- **Geni oncosoppressori:** sono i geni che operano come inibitori della crescita cellulare, antagonisti degli oncogeni, il loro ruolo è evitare una eccessiva proliferazione cellulare.

Mutazioni a carico di questi geni possono far perdere il loro ruolo regolatore portando anche in questo caso ad una crescita incontrollata delle cellule mutate.

- Geni regolatori del ciclo cellulare: sono in particolare i geni che regolano l'apoptosi, esistono geni che la promuovono e geni che proteggono la cellula dall'apoptosi. Nella cellula tumorale i primi sono inattivi o sotto-espressi mentre i secondi sono sovra-espressi.
- Geni coinvolti nella segnalazione cellulare: sono geni che regolano i segnali tra la cellula e l'organismo, nella cellula tumorale sono mutati a favorire lo sviluppo e la sopravvivenza cellulare, ad esempio favorendo la formazione di nuovi vasi sanguigni ed eludendo il controllo del sistema immunitario.

Come precedentemente detto è un insieme di mutazioni a trasformare una cellula sana in una tumorale. Questo porta ad avere una forte variabilità nel tipo di mutazioni e nel loro effetto causando quindi una estrema variabilità tra le diverse tipologie di cancro. È possibile però individuare delle specifiche caratteristiche comuni a tutte le cellule tumorali: <sup>[3]</sup>

- Proliferazione incontrollata e indipendente dai segnali di crescita
- Inibizione dell'apoptosi
- Invisibilità al sistema immunitario
- Metabolismo fortemente accelerato e alterato
- Induzione dell'angiogenesi
- Formazione di metastasi

## 1.2. I Chemioterapici

Per combattere i tumori si sono sviluppate nel tempo diverse strategie nel tentativo di affrontare una patologia estremamente sfaccettata. La scelta di una o più terapie dipende da vari fattori, quali il tipo di tumore, la sua posizione, lo stadio della malattia e le condizioni generali del paziente. Tra le terapie più comuni ci sono:

- Chirurgia
- Radioterapia
- Chemioterapia
- Terapia immunologica
- Terapia genica
- Terapia ormonale

La chemioterapia è una classe di trattamenti che utilizza farmaci in grado di distruggere o rallentare la crescita delle cellule tumorali. Questi farmaci agiscono in vari modi, ad esempio, possono interferire in diverse fasi del ciclo cellulare quali la mitosi o la duplicazione del DNA al fine di impedire la divisione e la crescita cellulare. Oppure arrecano danni al DNA impedendo alla cellula di replicarlo correttamente, portando all'apoptosi. Questi trattamenti risultano essere più efficaci nelle cellule tumorali perché queste presentano un peggior sistema di riparazione del DNA.

Questi trattamenti impattano maggiormente sulle cellule a più veloce riproduzione come quelle cancerose. Però colpiscono anche le cellule sane a crescita rapida come quelle dei follicoli piliferi, dell'epitelio intestinale e del midollo osseo, portando a effetti collaterali come la perdita dei capelli e la riduzione dei globuli bianchi e rossi.

Dunque, il principale problema dei farmaci chemioterapici è la loro scarsa selettività verso le cellule cancerose rispetto a quelle sane: svolgono infatti la loro azione citotossica indiscriminatamente verso qualsiasi cellula creando importanti effetti collaterali. Negli ultimi decenni si sono ricercati e trovati farmaci più selettivi verso le cellule cancerose che utilizzano come target particolari proteine o molecole caratteristiche delle neoplasie. [4]

### 1.3. Organometalli

Tra i chemioterapici ha una certa rilevanza la classe degli organometalli, essi sono farmaci con diversa modalità di azione e struttura che hanno in comune la presenza di un centro metallico coniugato o complessato. Sono nati dall'interesse generato dalla scoperta dell'attività antitumorale del cis-platino, composto ancora usato e da cui si sono derivati farmaci di seconda e terza generazione che hanno un minore tossicità e un maggiore effetto. [5]

Svolgono un'azione antitumorale attraverso cinque vie d'azione principali a seconda del composto: [5]

- funzionali, in cui il metallo interagisce con il target tramite un legame diretto;
- strutturali, in cui il metallo fornisce struttura alla molecola ma non ha un'interazione diretta con il target;
- carrier, in cui il metallo trasporta il ligando attivo;
- fotoattivi, nei quali il metallo agisce da foto catalizzatore;
- catalitici, in cui metallo catalizza, ad esempio, la produzione di ROS.

### 1.4. Il ferrocene

Il ferrocene (figura 2) è un composto metallorganico costituito da un atomo di ferro (II) legato a due anelli ciclopentadienilici carichi negativamente in una particolare forma a "sandwich". Ogni anello fornisce 6 elettroni  $\pi$  per formare legami con il centro metallico, il ferro (II) essendo in configurazione  $d^6$  ne fornisce 6, il complesso ha quindi 18 elettroni, configurazione più stabile per i complessi. [6]

Si tratta quindi di un complesso neutro particolarmente stabile all'aria, acqua e temperature inferiori a  $400^{\circ}\text{C}$ . Presenta una reattività simile a quella del benzene poiché i due anelli ciclopentadienilici avendo sei elettroni  $\pi$  sono aromatici, è quindi relativamente semplice funzionalizzarlo per variare le sue proprietà e struttura. [7]

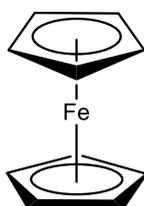


Figura 2 struttura del ferrocene

### 1.4.1. Il ferrocene come medicinale

In seguito alla scoperta dell'effetto antitumorale del cis-platino, si è acceso l'interesse della ricerca verso la possibilità di usare complessi metallici o composti metallorganici come farmaci per diverse patologie, sviluppando il campo della chimica bio-organometallica. La disciplina è molto vasta e svariati composti di diversi metalli sono stati testati, tra questi hanno sviluppato interesse i metalloceni, composti con una struttura analoga al ferrocene ma con catione metallico diverso.<sup>[8]</sup> Sono stati sviluppati dopo la scoperta del ferrocene, nel 1951, che rimane il composto più studiato e rappresentativo del gruppo.

Nel 1984 Köpf-Maier, Köpf e Neuse testarono l'utilizzo del ferrocene come agente antitumorale, sia come composto puro che sotto forma di diversi sali di ferricinio. Osservarono come il ferrocene puro non avesse alcuna azione farmaceutica sulla linea cellulare testata ma alcuni suoi sali, in particolare il tricloroacetato ed il picrato dimostrarono un forte effetto antitumorale, riuscendo anche a guarire completamente le cavie trattate.<sup>[9]</sup>

### 1.4.2. Composti del ferrocene

Successivamente si è studiata l'attività del ferrocene legato a svariate molecole organiche al fine di migliorarne l'azione farmaceutica, l'assorbimento e la stabilità. Infatti, i problemi principali nell'utilizzo del ferrocene come farmaco sono legati alla sua scarsa solubilità in acqua e alla scarsa selettività verso le cellule tumorali. Per superare questi limiti si sono adottate diverse strategie:

- la trasformazione in sale
- la funzionalizzazione con gruppi polari
- la funzionalizzazione con molecole idrofile
- funzionalizzazione con farmaci
- funzionalizzazione con molecole selettive verso le cellule tumorali

La funzionalizzazione con farmaci permette di avere una maggior selettività del ferrocene verso le cellule che esprimono il target del farmaco, può anche migliorare l'efficacia del farmaco in quanto si aggiunge un gruppo lipofilo, il quale rende il composto più efficace nell'oltrepassare le membrane cellulari, permettendogli di raggiungere i bersagli intracellulari con maggiore facilità.<sup>[10]</sup>

Si sono provati diversi composti, tra cui farmaci dall'efficacia già comprovata, ad esempio antitumorali, antimalarici, antibiotici e alchilanti del DNA.

Il ferrocene in questi composti può essere coniugato alla molecola o usato in sostituzione di un gruppo funzionale della molecola.

Esempi della prima possibilità sono i composti con l'artemisinina e con le illudine.

L'artemisinina è un fitocomposto isolato dalla *Artemisia annua* con forti proprietà antimalariche. Si è scoperta anche una sua attività antitumorale dovuta alla presenza di un gruppo endoperossido che può, in presenza di ioni di ferro a livello citoplasmatico, produrre radicali liberi, i quali hanno una forte azione citotossica che porta all'apoptosi. L'effetto antitumorale di questo meccanismo si basa sulla maggiore concentrazione citoplasmatica di ferro libero nelle cellule tumorali rispetto alle cellule sane, differenza dovuta ai cambiamenti metabolici atti a permettere la forte crescita e proliferazione tipica del cancro.

[11] I composti con il ferrocene (figura 3) producono inoltre altri effetti quali la soppressione della proliferazione cellulare e della formazione di metastasi, l'alterazione degli equilibri redox cellulari e dei segnali cellulari.

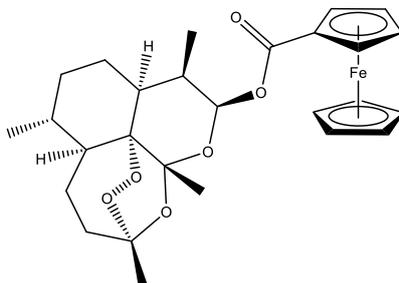


Figura 3 coniugato dell'artemisinina con ferrocene

Le illudine sono una famiglia di molecole sesquiterpeniche di origine fungina, sono tossiche per gli esseri umani ma si sono creati composti semisintetici che hanno dimostrato una apprezzabile attività antitumorale *in vivo* per diverse tipologie di tumori, specialmente ai polmoni, mammella, reni, prostata, ovaie e pancreas. Sono agenti alchilanti ma per svolgere la loro azione devono essere attivati attraverso la riduzione del loro gruppo enonico, solitamente tramite NADPH o glutatione. Non hanno mai avuto un utilizzo clinico a causa della loro forte tossicità; nel tentativo di ridurre questa tossicità sono stati sviluppati degli esteri dell'illudina M con il ferrocene. Questi composti sono stati testati sulle linee cellulari di leucemia HL-60 e melanoma 518A2 e il diestere (figura 4) si è dimostrato assai più selettivo per le cellule tumorali e molto meno citotossico verso le cellule sane rispetto all'illudina non funzionalizzata. [11][12]

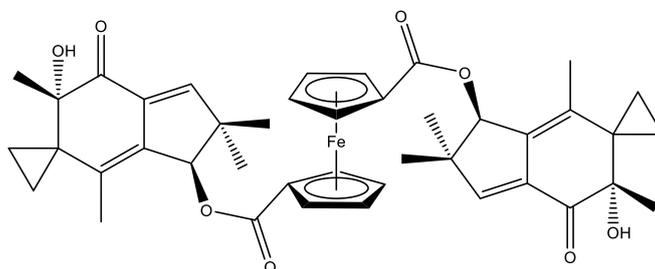


Figura 4 diestere dell'illudina M con ferrocene

Un esempio di composto dove il ferrocene viene usato per sostituire un gruppo funzionale è il ferrocifene (figura 5), un composto derivato dal Tamoxifene, nel quale il ferrocene sostituisce un gruppo fenile. Il tamoxifene è un profarmaco usato nella cura del tumore alla mammella orme-dipendente, la cui proliferazione è stimolata degli estrogeni ed una loro inattivazione conseguentemente rallenta la crescita tumorale. Nell'organismo il tamoxifene viene metabolizzato generando la forma attiva del farmaco, l'idrossitamoxifene, un antagonista dei recettori degli estrogeni nel tumore alla mammella. È quindi solamente attivo verso i tumori che presentano i recettori per gli estrogeni (ER+) e inattivo verso i tumori che ne sono privi (ER-) per i quali è necessario usare chemioterapici tradizionali, con maggiori effetti collaterali rispetto alle cure ormonali.

Il ferrocifene si è dimostrato attivo sia verso i tumori ER+ che i tumori ER-, facendo supporre che il meccanismo d'azione non si basi solamente sull'antagonismo degli estrogeni e che il ferrocene abbia un ruolo importante. È possibile che le proprietà redox del ferrocene

catalizzano l'ossidazione intramolecolare del fenolo a formare specie fortemente citotossiche. [5] [13]

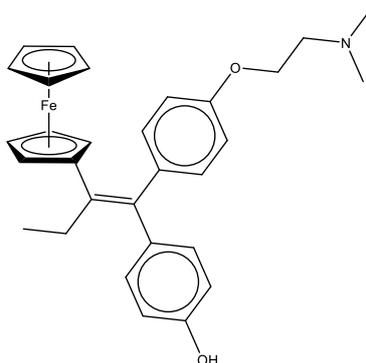


Figura 5 ferrocifene

### 1.4.3. ROS

Il ferrocene esplica la sua funzione antitumorale tramite le sue proprietà redox; infatti, essendo il suo potenziale di ossidazione pari a +0.40 V, all'interno della cellula può facilmente ossidarsi e ridursi visto che il potenziale citoplasmatico è compreso tra +0.40 V e -0.44 V.

Il ferrocene può quindi diventare un catalizzatore per la reazione di Haber–Weiss la quale porta alla formazione di specie reattive all'ossigeno (ROS), il cui meccanismo è riportato in figura 6.

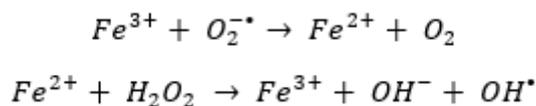


Figura 6 reazione di Haber-Weiss

I ROS sono specie fortemente reattive che possono danneggiare il DNA ed altre componenti cellulari quali proteine e lipidi. L'aumento dei ROS ed il conseguente danno al DNA e alle "macchine cellulari", spesso irreparabile per le cellule tumorali, porta all'apoptosi della cellula che risulta incapace di riprodursi e di sintetizzare gli enzimi necessari alla sua sopravvivenza. [14] [15] [16]

La funzionalizzazione interviene sull'efficacia del ferrocene poiché i diversi sostituenti modulano in modo differente la formazione di ROS. Infatti l'effetto elettrone-attrattore o elettrone-donatore del sostituente va a modificare i potenziali di ossidazione e riduzione del ferrocene variando le energie degli orbitali degli anelli aromatici. [11]

Si è osservato che un sostituente elettrone-donatore (quale una catena carboniosa o un gruppo fenile) impatta positivamente sulla produzione di ROS abbassando il potenziale di ossidazione del ferrocene, rendendo più facile la sua ossidazione e riduzione velocizzando quindi la reazione di Haber–Weiss.

#### 1.4.4. Ferrocene e peptidi

La funzionalizzazione del ferrocene con derivati peptidici ha riscontrato un forte interesse perché permette di aumentare la biodisponibilità del farmaco incrementandone la solubilità in acqua. Inoltre, agendo sulla funzione peptidica per renderla affine a specifici recettori, è possibile ottenere un farmaco selettivo verso le cellule che esprimono tale recettore.

Sono stati testati diversi peptidi e derivati peptidici, osservando che l'efficacia dipende sia dal tipo di peptide che dall'ordine degli amminoacidi. Inoltre, la presenza di uno spaziatore tra la catena amminoacidica e il ferrocene ne aumenta l'efficacia, così come l'introduzione di un gruppo aromatico tra il ferrocene e lo spaziatore. Queste osservazioni sono da attribuire all'effetto elettron-attrattore del legame ammidico che, se legato direttamente al ferrocene, ne alza il potenziale di ossidazione rendendolo meno efficace nella produzione di ROS. Al contrario la presenza della funzione aromatica elettron-donatrice coniugata al ferrocene ne abbassa il potenziale di ossidazione rendendolo più attivo a livello cellulare. Lo spaziatore ha una duplice funzione, distanziando il ferrocene dal peptide diminuisce l'effetto elettron-attrattore di quest'ultimo, inoltre distanziando il ferrocene fortemente ingombrante dal peptide questo può essere meglio riconosciuto dai recettori di membrana, aumentando l'*uptake* cellulare del farmaco. [8] [17] [18]

#### 1.5. Integrine

Le integrine sono una classe di proteine transmembrana, sono eterodimeri formati da due subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Esistono diverse varianti di subunità, 18 per le  $\alpha$  e 8 per le  $\beta$ , che combinandosi formano le 24 integrine conosciute. Entrambe le subunità hanno una piccola porzione contenente l'estremità C-terminale nel citoplasma ed una porzione molto più importante, contenente le estremità N-terminali, all'esterno della cellula. È questa la parte della proteina che funge da recettore.

Le integrine svolgono il ruolo di ancorare la cellula alla matrice extracellulare (ECM) regolando l'adesione cellulare, la migrazione, la proliferazione, la sopravvivenza e l'apoptosi della cellula (figura 7).

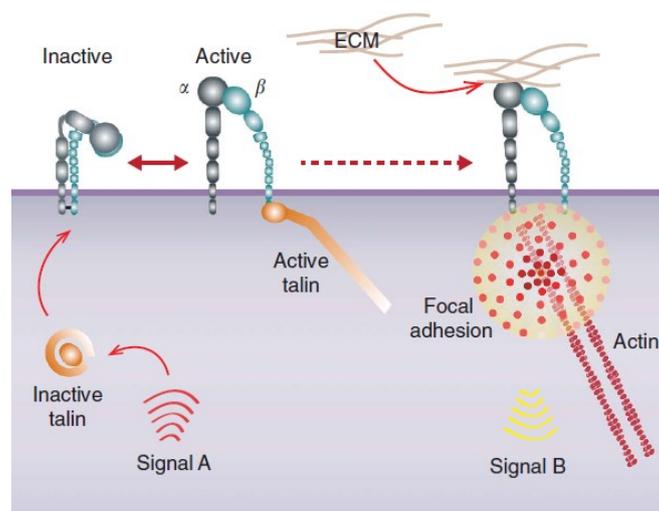


Figura 7 comunicazione bidirezionale mediata dalle integrine [19]

Esse agiscono come ponti molecolari tra la matrice extracellulare e il citoscheletro intracellulare, permettendo una comunicazione da e verso la cellula svolgendo un ruolo critico nella crescita, divisione, migrazione, differenziazione e apoptosi della cellula.

Svolgono un ruolo altrettanto importante per le cellule tumorali in quanto sono coinvolte in una serie di processi di primaria importanza per la sopravvivenza della cellula tumorale:

- Regolando la migrazione cellulare sono responsabili dell'aggressività del tumore, della sua capacità di invadere i tessuti circostanti e di formare metastasi.
- Modulando i segnali con il sistema immunitario influenzano come esso interagisce con le cellule, sono coinvolte quindi nell'evasione immunitaria che permette ai tumori di proliferare indisturbati.
- Sono inoltre parte importante dell'angiogenesi, contribuiscono quindi la formazione di nuovi vasi sanguigni atti a rifornire di nutrienti le cellule tumorali favorendo la loro crescita.

Ciò è possibile perché in una cellula cancerosa le integrine agiscono in maniera diversa rispetto alle cellule sane, in particolare possono venire sovraespresse delle integrine che in una cellula sana non si riscontrano, oppure la modulazione dei segnali di cui sono protagoniste viene alterata.

Un esempio si ritrova nella formazione di metastasi, infatti una importante funzione delle integrine è l'induzione dell'apoptosi nel caso in cui la cellula non sia sufficientemente legata alla ECM, ciò si verifica nel caso la cellula sia in sospensione o nel caso si trovi in un ambiente a lei ostile o estraneo ovvero dove la ECM è incompatibile con le integrine espresse dalla cellula. In tutti questi casi la promozione dell'apoptosi è dovuta alla maggioritaria presenza di integrine non legate rispetto a quelle legate. Nelle cellule sane ciò serve a scongiurare l'accidentale migrazione di cellule in tessuti od organi estranei e quindi a mantenere intatta funzione e forma dei diversi organi

Nel caso di alcune linee di cellule cancerose questo controllo viene meno, ne segue che la cellula cancerosa riesce a sopravvivere in sospensione. Il tumore ha quindi la capacità di invadere e colonizzare vari distretti dell'organismo. <sup>[20]</sup>

### 1.5.1. Farmaci ed integrine

Vista l'importanza delle integrine nello sviluppo tumorale e la loro diversa espressione tra cellule sane e cancerose la ricerca si è focalizzata su molecole in grado di interagire con queste proteine. Si sono seguiti due approcci:

- antagonisti del legame integrina-ECM.
- delivery selettivo di un chemioterapico coniugato con un legante per il recettore extracellulare delle integrine.

Entrambi gli approcci possono sfruttare come ligando il peptide Arg-Gly-Asp (RGD), tipico di molte proteine della ECM come la fibronectina, l'osteopontina, la vitronectina e la laminina. Il peptide viene riconosciuto da otto integrine:  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$ , e  $\alpha11\beta3$ . <sup>[21]</sup>

Alcune linee tumorali sovraesprimono queste specifiche integrine ed è quindi possibile funzionalizzare un farmaco o una struttura per la distribuzione del farmaco (nanostrutture, liposomi) per creare un sistema di *drug delivery* selettivo. [22] [23]

Riuscire a migliorare la selettività di un farmaco è sicuramente uno degli obiettivi fondamentali della ricerca in ambito farmaceutico. La maggiore selettività offre infatti diversi vantaggi: serve infatti somministrare una minore quantità di farmaco per ottenere l'effetto desiderato. Essendo riconosciuto da specifici recettori espressi solo nelle cellule malate, il farmaco colpisce in modo molto limitato le cellule sane riuscendo così a contenere gli effetti collaterali indesiderati.

## 1.6. Scopo della tesi

Questo elaborato si inserisce in un progetto di ricerca denominato "*Synthesis and biomedical applications of tumor targeting peptidomimetics and conjugates*".

Uno degli obiettivi di questo progetto prevede la sintesi e la caratterizzazione di diversi derivati del ferrocene coniugati al peptide RGD per valutarne poi l'eventuale capacità ad agire come agenti antitumorali. Ho contribuito a questo progetto sintetizzando uno dei composti previsti, la cui struttura è descritta in figura 8.

Il derivato del ferrocene utilizzato è l'acido 4-ferrocenilbenzoico, mentre come spaziatore tra il peptide e il ferrocene è stato usato l'acido 6-amminoesanoico, un  $\epsilon$ -amminoacido. Per la sintesi di questo composto ci si è avvalsi delle tecniche di sintesi peptidica in fase solida (SPPS).

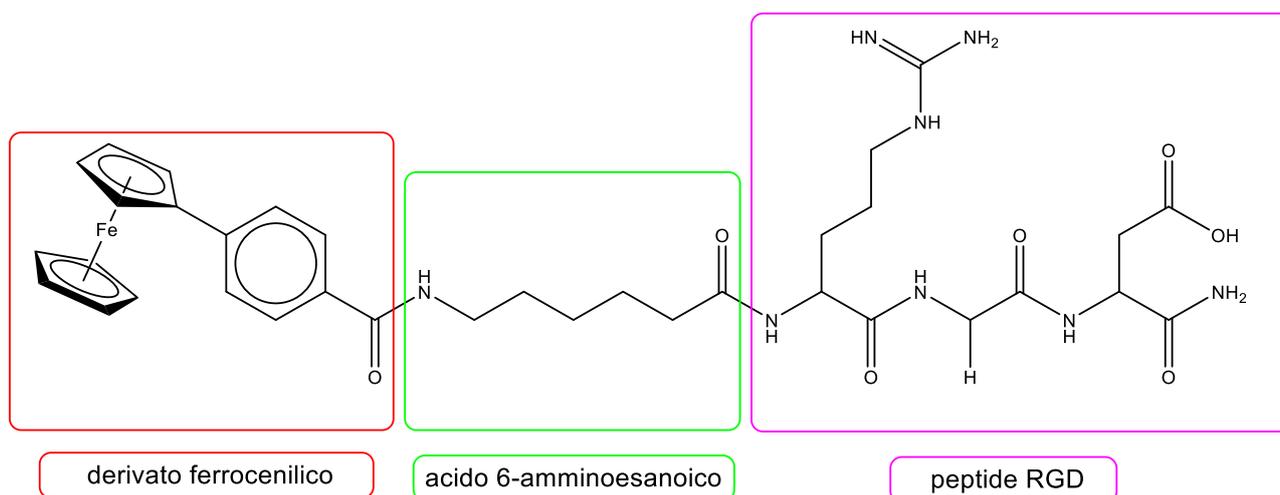


Figura 8 composto sintetizzato

## 1.7. Sintesi in fase solida

La sintesi peptidica in fase solida è una metodologia di laboratorio sfruttata per sintetizzare peptidi. Fu introdotta da Robert Bruce Merrifield nel 1963 e successivamente migliorata e ottimizzata. La tecnica prevede che il peptide abbia l'estremità C-terminale legata ad un

polimero insolubile e venga accresciuto per successive coniugazioni all'estremità N-terminale.

Ciò ha dei notevoli vantaggi rispetto alla precedente metodologia in soluzione: <sup>[24][25]</sup>

- la separazione e purificazione del prodotto desiderato è assai facilitata. Il composto di interesse è covalentemente legato al supporto insolubile mentre i reagenti in eccesso e i sottoprodotti sono in soluzione e possono essere allontanati filtrando e lavando la resina.
- La reazione può avvenire in un singolo contenitore poiché il peptide è bloccato sul supporto insolubile, conseguentemente le perdite di prodotto per trasferimento sono pressoché nulle.
- Si può lavorare in un forte eccesso di reagenti, riuscendo ad ottenere rese molto elevate.
- Si evitano i problemi di solubilità che tendono a manifestarsi quando un peptide supera i 3-4 amminoacidi.
- La procedura sintetica può essere automatizzata. Il polimero utilizzato varia a seconda delle necessità ma il più utilizzato è una resina di polistirene cross-linkato con divinilbenzene. Essa viene funzionalizzata con opportuni *linkers* ai quali si lega covalentemente il peptide per tutta la durata della sintesi, la rottura del legame peptide-linker è l'ultimo passaggio sintetico che libera il prodotto dalla resina. La scelta del *linker* più adatto dipende dalla procedura sperimentale (Fmoc o Boc) e dal gruppo funzionale che si vuole ottenere all'estremità C-terminale (ammide, acido carbossilico, ...).

Il peptide viene sintetizzato aggiungendo un aminoacido per volta all'estremità N-terminale seguendo sempre gli stessi passaggi, riportati in figura 9:

1. Deprotezione del gruppo protettore all'estremità N-terminale della catena peptidica legata al supporto solido
2. Lavaggio per togliere i sottoprodotti e i reagenti in eccesso
3. *Coupling* dell'amminoacido desiderato con adeguati attivanti
4. Lavaggio per togliere i sottoprodotti e i reagenti in eccesso

Il primo passaggio è necessario perché ogni nuovo aminoacido aggiunto è protetto all'estremità N-terminale al fine che solo la funzione carbossilica possa reagire. In questo modo l'unica funzione  $\alpha$ -amminica con cui può reagire l'amminoacido aggiunto è quella della catena peptidica che si sta sintetizzando e non avvengono reazioni di *coupling* parassita dell'amminoacido con sé stesso o successive addizioni alla catena peptidica. Il gruppo protettore viene definito temporaneo.

Per evitare che i gruppi funzionali presenti sulle catene laterali degli amminoacidi siano coinvolti in reazioni secondarie (tra le quali il *coupling* con il nuovo aminoacido o intracatena) devono essere protetti. I gruppi protettori utilizzati solitamente vengono rimossi insieme al *cleavage* del legame catena-resina e devono pertanto essere inerti alle condizioni delle reazioni di *coupling* e deprotezione dell'estremità N-terminale, per questo vengono detti permanenti.

Per far avvenire la reazione è necessario attivare i gruppi funzionali, in caso contrario l'unica reazione che può avvenire è quella acido-base tra la funzione carbossilica e amminica dato che la formazione del legame peptidico è sfavorita termodinamicamente.

Per favorire la reazione e rendere la resa quanto più vicina al 100% si è soliti lavorare in un eccesso di reagenti, al termine della reazione i reagenti in eccesso e i sottoprodotti vengono allontanati dalla resina tramite lavaggio con solvente.

I successivi amminoacidi vengono aggiunti ripetendo iterativamente il ciclo fino ad ottenere il peptide desiderato

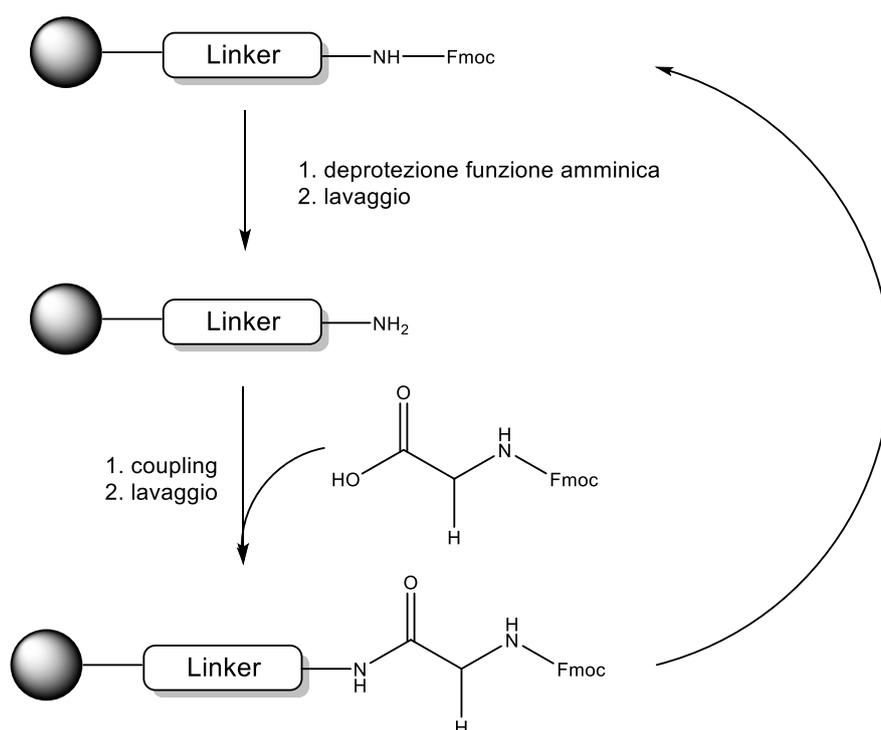


Figura 9 schema dei passaggi della sintesi in fase solida

### 1.7.1 Strategie di SPPS

In questo lavoro di tesi per sintetizzare il composto si è usata la strategia Fmoc che usa come gruppo protettore temporaneo il gruppo 9-fluorenilmetilossicarbonilico. Esso viene rimosso in condizioni basiche (figura 10) mentre i gruppi protettori permanenti e il legame peptide/resina vengono rimossi in condizioni acide tramite l'utilizzo di acido trifluoroacetico (TFA). Si sfrutta quindi l'ortogonalità dei gruppi protettori, rendendo la metodologia molto versatile ed efficiente, priva del rischio di accidentali deprotezioni in itinere.

Il *cleavage* tramite l'utilizzo di TFA è vantaggioso per la sua sicurezza e semplicità inoltre è un ottimo solvente per i peptidi ed è abbastanza volatile da poter essere rimosso per evaporazione in condizioni non drastiche. Tuttavia, in presenza di gruppi protettori permanenti basati sul tert-butanolo si vengono a creare dei carbocationi estremamente reattivi che tendono ad attaccare le funzioni nucleofile contenute in amminoacidi quali triptofano, cisteina, metionina, serina. Per evitare queste reazioni vengono miscelati al TFA degli *scavengers*, specie chimiche che reagiscono con i carbocationi neutralizzandoli. Se

ne usa solitamente più di uno e la composizione della miscela utilizzata varia a seconda delle caratteristiche del peptide che si sta sintetizzando. [26] Per questa sintesi si è utilizzata una miscela TFA : TIS : H<sub>2</sub>O (95 : 2.5 : 2.5) dove il TIS (triisopropilsilano) e l'acqua agiscono da *scavengers*.

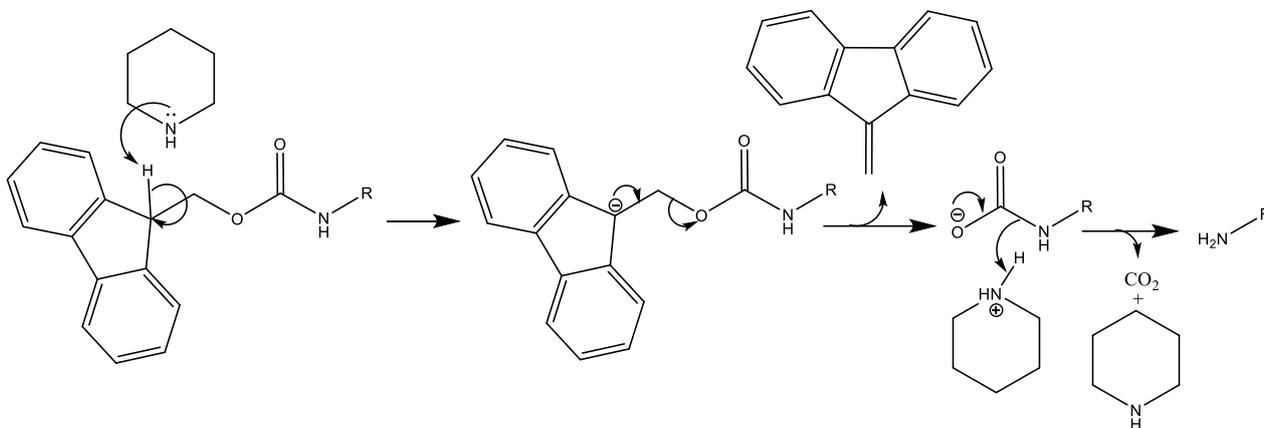


Figura 10 meccanismo di deprotezione del gruppo Fmoc

Affinché si formi il legame peptidico è necessario l'utilizzo di reagenti attivanti del gruppo carbossilico, i quali solitamente reagiscono per formare dei migliori gruppi uscenti spostando la reazione verso la formazione dei prodotti.

La loro scelta è indipendente dalla strategia utilizzata ma bensì è subordinata a diversi fattori quali:

- la scelta del solvente che influenza la solubilità dei reagenti, il rigonfiamento della resina e di conseguenza l'accessibilità dei siti reattivi.
- l'ingombro sterico sia del reagente attivato che dei gruppi protettori permanenti, i quali possono rendere difficoltoso il *coupling*.
- La reattività del complesso attivato

Per questa sintesi si è usata come attivante la N,N'-Diisopropilcarbodiimide (DIC), appartenente alle carbodiimmidi. Questa è stata sviluppata successivamente alla DCC (N,N'-dicicloesilcarbodiimide), per anni la principale carbodiimide utilizzata, rispetto alla quale ha il vantaggio di produrre un gruppo uscente solubile, rendendone più facile l'eliminazione quando si lavora in fase solida. [27]

Le carbodiimmidi non vengono però quasi mai utilizzate come unico reagente perché hanno un alto tasso di racemizzazione. Per evitare ciò si usano in miscela con delle idrossilamine al fine di formare un intermedio meno reattivo. In questo lavoro si è utilizzato etil (2Z)-2-ciano-2-idrossiiminoacetato (noto come Oxyma Pure) che da un attacco nucleofilo all'aminoacido attivato come acil isourea, trasformandolo in un estere attivato che andrà a reagire con la catena peptidica tramite il meccanismo descritto in figura 11. [28]

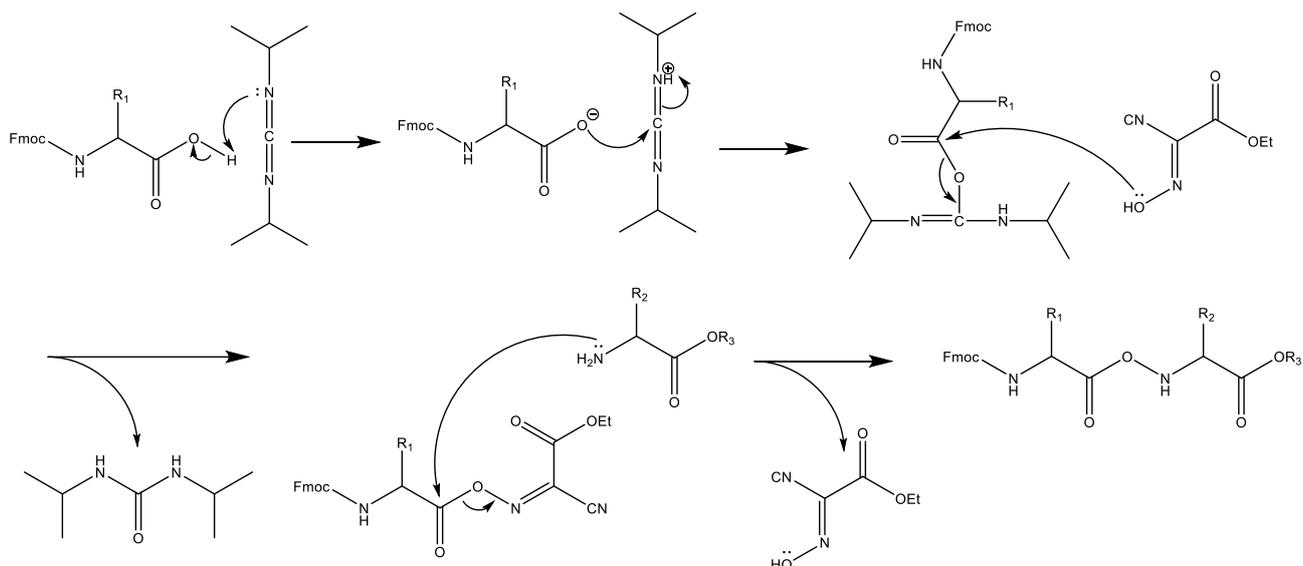


Figura 11 meccanismo di attivazione e coupling tramite DIC e Oxyma

## 2. Parte sperimentale

### 2.1. Materiali e metodi

#### 2.1.1. Reagenti e solventi

reagente	Ditta produttrice
OxymaPure, Fmoc-6-Ahx-OH	Iris Biotech
TFA, DMF, DCM, etere dietilico, N,N'-Diisopropilcarbodiimide (DIC), Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, triisopropilsilano (TIS), piperidina	Sigma-Aldrich
Fmoc rink amide	Iris-Biotech
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Orpegen
metanolo	Carlo Erba
acido 4-ferrocenilbenzoico	Prodotto in laboratorio

tabella 1 reagenti e fornitori

#### 2.1.2. Strumenti:

##### HPLC

Il prodotto è stato analizzato e purificato tramite HPLC. Le analisi cromatografiche sono state condotte utilizzando il cromatografo VWR HITACHI Chromaster dotato dei moduli VWR HITACHI UV Detector 5410, alle lunghezze d'onda 280 e 214 nm, Auto-sampler 5260 e Pump 5410. È stata utilizzata la colonna Phenomenex C18 100 Å, 5μ, 250 x 4,60 mm, con flusso 1 mL/min. Gli eluenti usati sono:

A: H<sub>2</sub>O Milli-Q : ACN (9 : 1) + TFA (0,05%)

B: H<sub>2</sub>O Milli-Q : ACN (1 : 9) + TFA (0,05%)

## HPLC-MS

Per tracciare il composto d'interesse all'interno delle analisi cromatografiche si è utilizzata l'analisi di massa con uno spettrometro di massa a tempo di volo (TOF, time of flight) con ionizzatore ESI (Electrospray ionization) della Agilent. La colonna usata è la Phenomenex Kinetex 3.5  $\mu$ m XB-C18, 100 Å, 100x4.6 mm, flusso 1 mL/min.

Gli eluenti impiegati sono:

A: H<sub>2</sub>O Milli-Q + TFA (0.1%)

B: ACN + TFA (0.1%)

## Spettroscopia NMR

Si è caratterizzato il composto tramite <sup>1</sup>H-NMR. Si è usato lo spettrometro Bruker modello Advance III HD operante a 400.13 MHz. Gli spostamenti chimici ( $\delta$ ) sono espressi in parti per milione (ppm) rispetto al segnale del solvente.

## 2.2. Sintesi

Reagenti per <i>coupling</i>	quantità	millimoli	equivalenti
Resina Fmoc-Rink Amide	0.256 g	0.164	1
Piperidina al 20% in DMF	~4 ml		
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.135 g	0.327	2
Fmoc-Gly-OH	0.097 g	0.33	2
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.212 g	0.327	2
Fmoc-6-Ahx-OH	0.174 g	0.491	3
OxymaPure	0.050 g	0.352	2
DIC	0.05 mL	0.327	2
Acido 4-ferrocenilbenzoico	0.100 g	0.327	2
Reagenti per <i>cleavage</i>			
Miscela TFA : TIS : H <sub>2</sub> O (95 : 2.5 : 2.5)	5 ml		

tabella 2 quantità reagenti

Per ottenere un peptide con un'amide all'estremità C-terminale si è utilizzata la resina Fmoc-Rink Amide (100-200 mesh). Per rendere i suoi siti attivi disponibili alle reazioni è necessario rigonfiare la resina nel solvente di reazione (nel nostro caso la DMF), così che diventi quasi un gel dove possono permeare i reagenti. Concluso questo passaggio è necessario deproteggere dal gruppo Fmoc i siti attivi con una soluzione di piperidina al 20% in DMF. Per migliorare la resa della reazione questa viene effettuata in due step, uno da 5 minuti ed un secondo da 20 minuti, allontanando la soluzione del primo step e lavando la resina prima di aggiungere la piperidina per il secondo step. Così facendo si eliminano i prodotti di reazione del primo step e si lavora sempre in eccesso di reagenti, in modo da spostare la reazione verso i prodotti tramite il principio di Le Chatelier. In seguito ad un ciclo di lavaggio si può aggiungere la soluzione di *coupling* preparata miscelando Fmoc-Asp(OtBu)-OH, OxymaPure e DIC in circa 5 ml di DMF. La reazione viene condotta per circa un'ora. Finita la reazione si è testata la sua completezza tramite un saggio colorimetrico detto "Kaiser Test", se questo da esito negativo si può continuare con la procedura rimuovendo il gruppo protettore come precedentemente descritto.

Si segue la medesima procedura sintetica per unire i restanti amminoacidi, in ordine glicina, arginina e acido 6-amminoesanoico. Per eseguire il *coupling* dell'acido 6-amminoesanoico si usano 3 equivalenti di ciascun reagente perché l'amminoacido precedete, l'arginina, presenta una catena laterale molto ingombra che interferisce con la reazione. Per legare con l'acido 4-ferrocenilbenzoico si è seguita la stessa procedura di un amminoacido aumentando il tempo di reazione a due ore.

Si può quindi distaccare il peptide dalla resina e togliere i gruppi protettori permanenti trattando la resina con 5 ml di una miscela di TFA, TIS e acqua per tre ore. Al termine della reazione il prodotto è in soluzione, per isolarlo si recupera la soluzione e i successivi lavaggi della resina e si evaporano, poi si dissolve il prodotto ottenuto in una minima quantità di metanolo e si precipita con etere dietilico. Si effettua questo passaggio perché dopo l'evaporazione del solvente il prodotto si presenta come un liquido oleoso, contenente tracce di solvente e altri prodotti di reazione. È necessario quindi allontanare queste impurezze dal prodotto e per farlo si sfrutta la loro diversa solubilità in etere dietilico.

Il prodotto grezzo ottenuto è comunque contaminato da sottoprodotti quali catene peptidiche sbagliate o rovinata, derivate da reazioni secondarie durante i *coupling*. Per purificarlo si è disciolto in metanolo e si è proceduto alla purificazione tramite HPLC preparativa. Le frazioni di simile purezza sono state raccolte e liofilizzate. Il composto sintetizzato verrà poi utilizzato in test biologici, è necessario quindi scambiare il suo controanione, il trifluoroacetato, con uno che non crei interferenze durante i saggi biologici. Per fare ciò si è sciolto il prodotto in una soluzione 0.1 M di HCl e si è nuovamente liofilizzato.

Si sono ottenuti 6.41 mg di prodotto puro, con una resa del 5%.

### 2.2.1. Kaiser test

Durante la sintesi in fase solida si possono eseguire dei controlli in itinere per verificare la completezza della reazione di *coupling* tramite il saggio colorimetrico chiamato "Kaiser test". Esso determina la presenza di funzioni amminiche libere e quindi di catene amminoacidiche la cui estremità N-terminale non ha reagito. Il test sfrutta la reazione tra ammine primarie o secondarie e la ninidrina per formare un composto blu detto blu di Ruhemann descritta in figura 12. <sup>[29]</sup> <sup>[30]</sup>

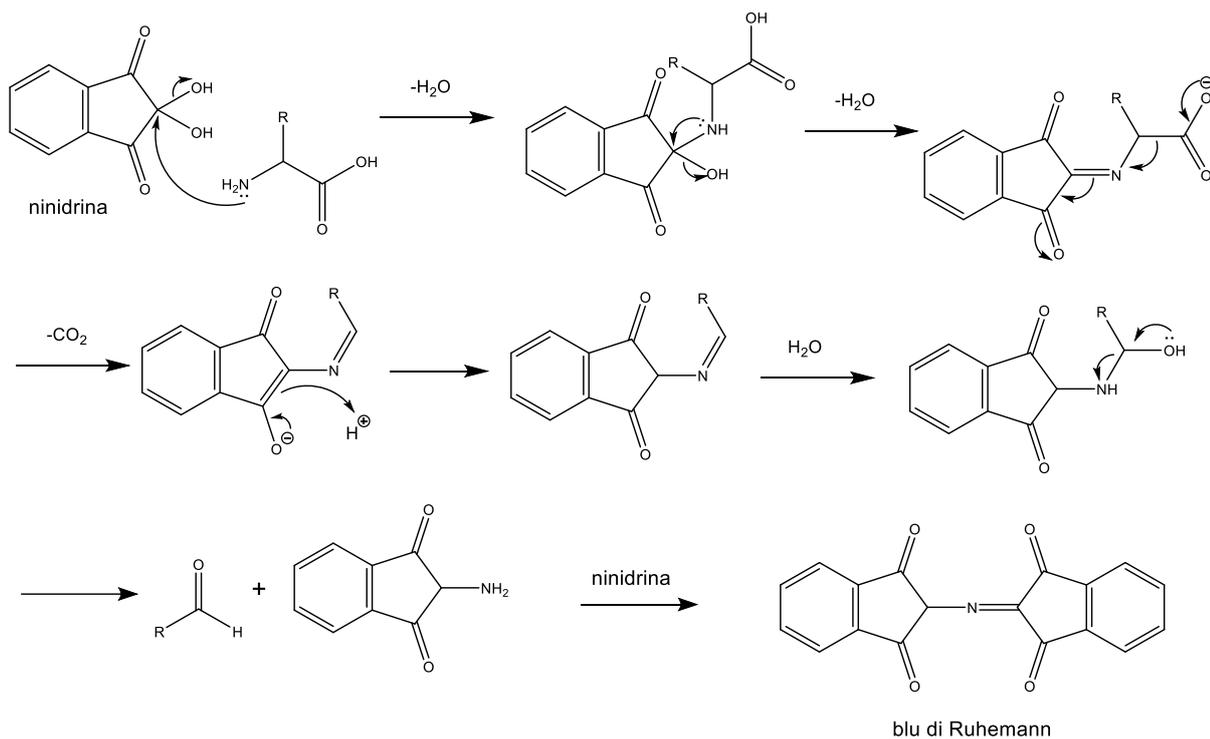


Figura 12 meccanismo di reazione tra ninidrina e amminoacido

### 3. Caratterizzazione

Il prodotto è stato caratterizzato tramite spettro NMR e HPLC-MS.

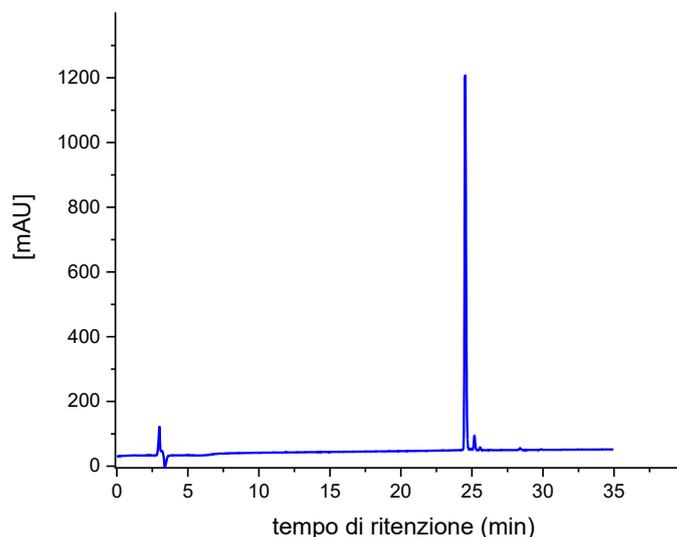


Figura 13 cromatogramma del prodotto purificato

Nello spettro di massa (figura 14) acquisito il picco base è a  $[M+H]^+_{\text{sp}}=747.3$ , che paragonato a  $[M+H]^+_{\text{teo}}=747.65$  calcolato teoricamente, indica che il prodotto ottenuto è quello voluto.

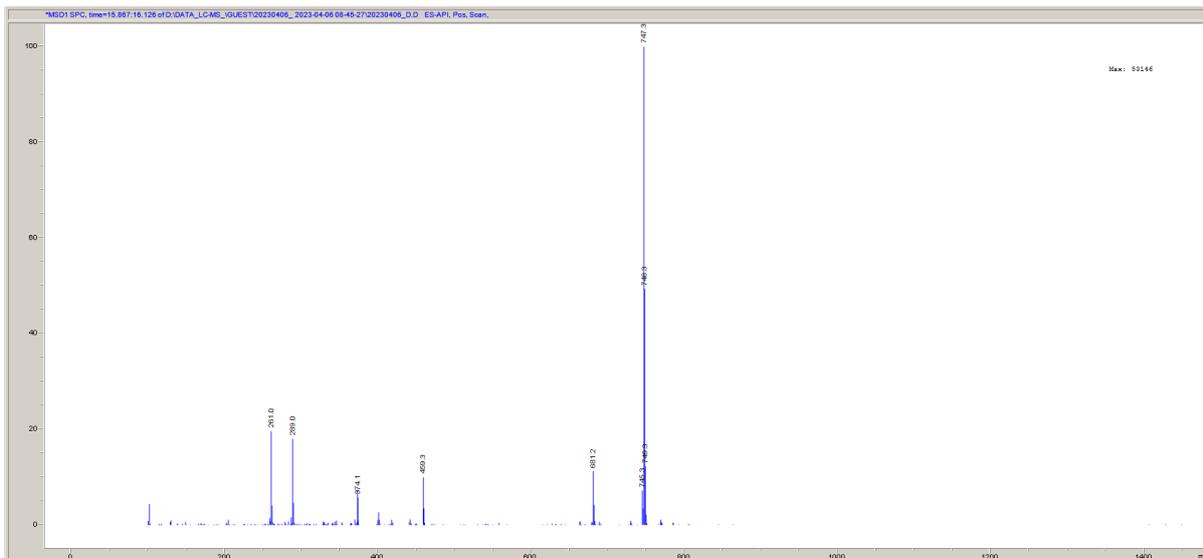


Figura 14 spettro di massa del prodotto purificato

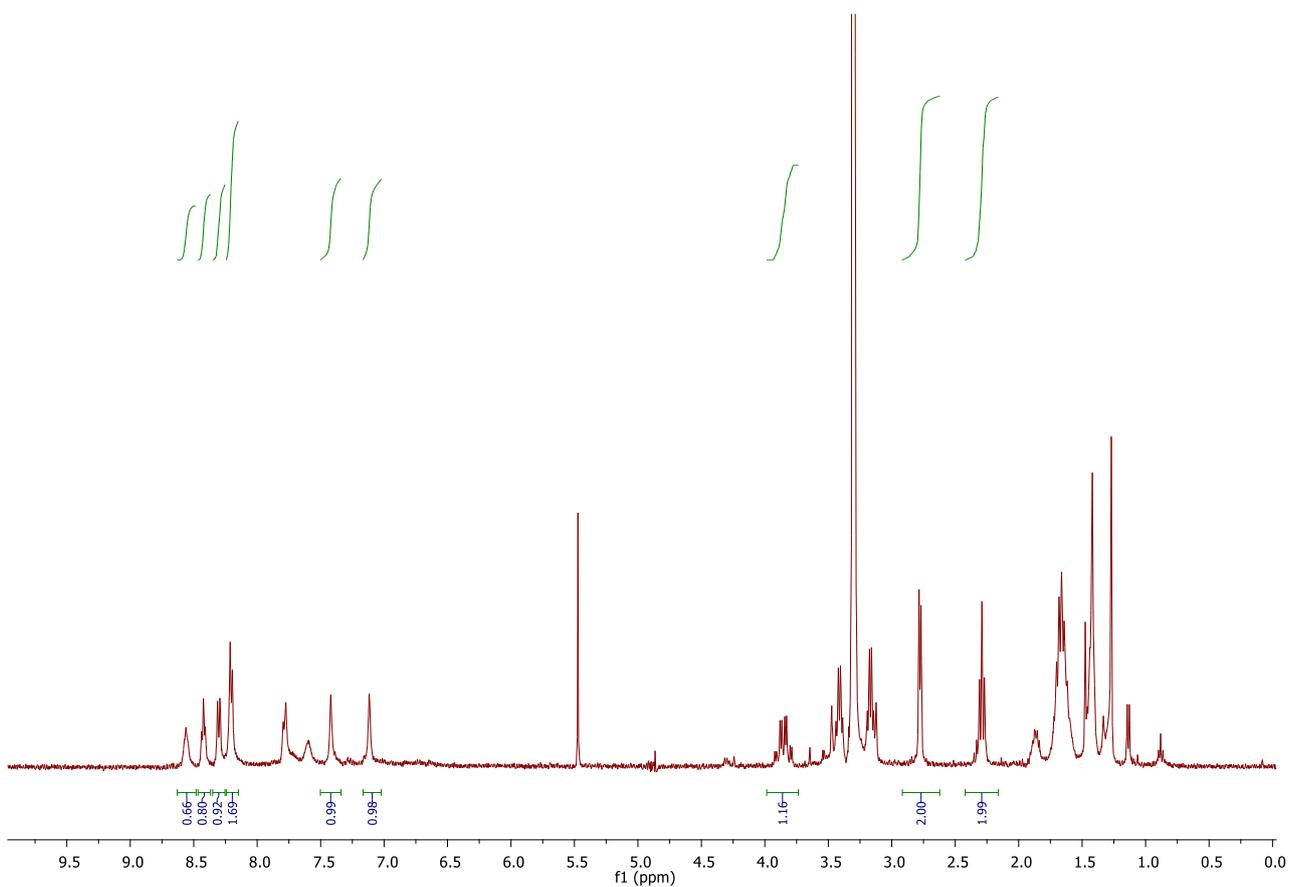


Figura 15 Spettro <sup>1</sup>H-NMR di 4-ferrocenilbenzoil-6-Ahx-RGD-NH<sub>2</sub> in MeOH, d<sub>3</sub> (1.2 mM) a 400 MHz

Nello spettro NMR (figura 15) si individuano alcuni picchi caratteristici del composto di interesse, che possiamo attribuire basandoci sulla letteratura. <sup>[31]</sup>

A circa 2.30 e 2.75 si osservano dei picchi con integrale pari a due assegnabili rispettivamente ai protoni alifatici dell'acido 6-amminoesanico e ai protoni della catena laterale dell'acido aspartico.

A circa 7.1 e 7.4 si osservano due picchi con integrale pari a uno, assegnabili ai protoni dell'ammide terminale dell'acido aspartico.

Nella regione compresa tra 8.2 e 8.7 ppm si osservano quattro picchi attribuibili ai protoni ammidici. Due tripletti con integrale pari a uno, appartenenti ai protoni ammidici dell'acido 6-amminoesanico e della glicina, un doppietto con integrale pari a uno e un doppietto con integrale pari a due, attribuibili ai protoni ammidici dell'acido aspartico e dell'arginina; il secondo protone del doppietto con integrale pari a due potrebbe appartenere al protone amminico della catena laterale dell'arginina ma per una corretta assegnazione sono necessari ulteriori esperimenti NMR.

## 4. Discussione

La sintesi in fase solida richiede di lavorare in forte eccesso di reagente per avere rese elevate, attraverso semplici test colorimetrici è possibile controllare la completezza della reazione (Kaiser test). Durante la sintesi del peptide è stato necessario ripetere il *coupling* della glicina e dell'acido 6-amminoesanico probabilmente dovuto all'ingombro sterico delle catene laterali dell'amminoacido cui si legavano che interferiscono con la reazione. Questo effetto è particolarmente marcato per la catena laterale dell'arginina; infatti, sebbene siano stati utilizzati tre equivalenti di reagenti, è stato necessario ripetere il *coupling*.

Gli spettri di massa e NMR permettono una prima identificazione del composto ottenuto. La massa molecolare determinata sperimentalmente corrisponde al valore calcolato teoricamente. Nello spettro NMR si osservano segnali in linea con quanto previsto per il composto sintetizzato; tuttavia, non è possibile assegnare in modo univoco tutti i protoni della molecola con un semplice spettro monodimensionale.

## 5. Conclusione

In questo elaborato si è presentata una panoramica della letteratura relativa all'utilizzo di derivati del ferrocene in ambito medico, in particolare come antitumorali, in virtù della loro capacità di generare cataliticamente ROS all'interno della cellula. Si è trattata poi la possibilità di coniugare il ferrocene ad un peptide riconosciuto da alcune proteine di membrana sovraesprese in linee tumorali, nel tentativo di individuare un potenziale farmaco selettivo per queste ultime.

Si è inoltre eseguita la sintesi e caratterizzazione di uno di questi composti, il 4-ferrocenilbenzoil-6-Ahx-RGD-NH<sub>2</sub>, tramite le tecniche di sintesi peptidica in fase solida. Questo, insieme ad altri composti analoghi, verrà valutato nella sua efficacia come antitumorale grazie a test *in vitro* della sua citotossicità che saranno effettuati nei mesi a venire.

## 6. Bibliografia

- [1] Jemal A.; Bray F.; Center M.M.; Ferlay J.; Ward E.; Forman D.; *Global cancer statistics*. **2011**, *61*(2), pp 69-90.
- [2] <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>; Accesso in rete 06/03/2023.
- [3] Kumar, V.; Abbas, A. K.; Aster, J. C. *Robbins basic pathology*; Elsevier: Philadelphia, Pennsylvania, **2018**; pp 189-226.
- [4] Corrie P.G.; *Medicine*. **2008**, *36*(1), pp 24–28.
- [5] Gianferrara, T.; Bratsos, I.; Alessio, E.; *Dalton Trans.* **2009**, pp 7588-7598.
- [6] Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *Inorganic Chemistry*, 3rd ed, Pearson Education Limited, Edinburgh Gate, Harlow, **2008**; pp 648.
- [7] Werner, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 6052–6058.
- [8] Soler, M.; Feliu, L.; Planas, M.; Ribas, X.; Costas, M.; *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 12970.
- [9] Chaudhary, A.; Poonia, K.; *Inorg. Chem. Commun.*, **2021**, *134*, 109044.
- [10] Ludwig, B. S.; Correia, J. D.G.; Kühn, F. E.; *Coord. Chem. Rev.*, **2019**, *396*, 22-48
- [11] Biersack, B., Schobert, R.; “Current State of Metal-Based Drugs for the Efficient Therapy of Lung Cancers and Lung Metastases” in *Lung Cancer and Personalized Medicine*; Ahmad, A.; Gadgeel, S. (Eds); Springer, Cham: **2015**, pp 211–224.
- [12] Knauer, S.; Biersack, B.; Zoldakova, M.; Effenberger, K.; Milius, W.; Schobert, R.; *Anticancer Drugs*, **2009**, *20*(8), 676-681.
- [13] Nguyen, A.; Vessières, A.; Hillard, E. A.; Top, S.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; *Chimia*, **2007**, *61*, 716.
- [14] Lu, X.; Wang, X.; Li, A.; Zhou, T.; Zhang, L.; Qu, J.; Mao, Z.; Gu, X.; Zhang, X.; Jing, S; *Dyes and Pigments*, **2022**, *205*, 110586.
- [15] Kehrer, J. P.; *Toxicology*, **2000**, *149*(1), 43-50.
- [16] Harry, A. G.; Butler, W. E.; Manton, J. C.; Pryce, M. T.; O'Donovan, N.; Crown, J.; Rai, D. K.; Kenny, P.T.M.; *J. Organomet. Chem.*, **2014**, *757*, 28-35.
- [17] Zhou, B.; Li, J.; Feng, B.; Ouyang, Y.; Liu, Y.; Zhou, F.; *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *116*, 19–25.
- [18] Meier-Menches, S. M.; Casini, A.; *Bioconjug. Chem.*, **2020**, *31* (5), 1279-1288.
- [19] Hamidi, H.; Pietila, M.; Ivaska, J.; *Brit. J. Cancer*, **2016**, *115*, 1017–1023.
- [20] Valdembri, D.; Serini, G.; *Fac. Rev.*, **2021**, *10*:45
- [21] Desgrosellier, J. S.; Cheresch D. A.; *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, *10*(1), 9–22.
- [22] Liu, X.; Liu, J.; Xu, Q.; Tao, W.; Xie, X.; Meng, C.; Zhou, Q.; Zhang, Y.; Ling, Y.; *J. Colloid Interface Sci.*, **2023**, *648*, 994-1005.

- [23] Ludwig, B. S.; Tomassi, S.; Di Maro, S.; Di Leva, F. S.; Benge, A.; Reichart, F.; Nieberler, M.; Kühn, F. E.; Kessler, H.; Marinelli, L.; Reuning, U.; Kossatz, S.; *Biomater.*, **2021**, *271*, 120754.
- [24] Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149–2154.
- [25] Marquardt, M.; Eifler-Lima, V. L.; *Quim. Nova*, **2001**, *24*, 846–855.
- [26] Behrendt, R.; White, P.; Offer, J.; *J. Pept. Sci.*, **2016**, *22*, 4–27.
- [27] Wongpanich, J.; *Conjugated Polymer Nanoparticles for Applications in Bioimaging*, **2020**, Student thesis: PhD.
- [28] Pires, D. A. T.; Bemquerer, M. P.; do Nascimento, C. J.; *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2014**, *20*, 53–69.
- [29] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I.; *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595–598.
- [30] McCaldin, D. J.; *Chem. Rev.*, **1959**, *1*, 39–51.
- [31] Wuthrich K.; *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons Inc, **1986**, pp 16.