

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**ANALOGHI PEPTIDICI DELLE CATELICIDINE
PMAP-36 E BMAP-27: RELAZIONE
STRUTTURA-ATTIVITÀ E STUDI DI STABILITÀ.**

Relatrice: Prof.ssa Cristina Peggion

Controrelatrice: Prof.ssa Barbara Fresch

Laureando: ANDREA SCHIVO

Anno Accademico 2022 - 2023

Riassunto

Il vasto utilizzo di farmaci antibiotici ha fatto sì che negli ultimi anni lo sviluppo di resistenza agli antibiotici sia diventato uno dei principali problemi per la sanità a livello mondiale. Lo scopo di questa tesi è lo studio di sequenze corte di PMAP-36 e BMAP-27, peptidi naturali che appartengono alla classe delle catelicidine e possiedono attività antibatterica ad ampio spettro. Il meccanismo con cui i peptidi esercitano la loro azione permette un minor sviluppo di resistenza da parte dei batteri e ciò li rende promettenti come nuovi farmaci. La scarsa stabilità in ambiente cellulare è un limite per queste molecole, ma può essere aumentata inserendo nelle sequenze peptidiche amminoacidi non naturali o in configurazione D. In questa ricerca vengono sintetizzati quattro peptidi, analoghi dei peptidi naturali: PMAP(12-24) e BMAP(1-18) contenenti tutti gli amminoacidi L e tutti gli amminoacidi D. Quindi, si confronta la resistenza dei peptidi sopracitati in presenza di enzimi proteolitici. Inoltre, si esegue uno studio della loro conformazione, utilizzando il dicroismo circolare e l'NMR, in modo da correlare la loro struttura tridimensionale all'attività osservata nei confronti dei ceppi più comuni di batteri.

Si valuta, infine, la possibilità di impiegare questi peptidi per la realizzazione di tessuti antimicrobici legandoli al cotone con legami chemoselettivi al fine di sviluppare garze o cerotti per la cura di ferite.

Indice

Abbreviazioni.....	6
1. Introduzione.....	9
1.1 Catelicidine	10
1.1.1 Meccanismo d'azione	12
1.1.2 BMAP-27	13
1.1.3 PMAP-36	14
1.1.4 Peptidi come farmaci: limitazioni.....	15
1.2 La Sintesi Peptidica	18
1.2.1 Resina.....	21
1.2.2 Gruppi protettori temporanei	22
1.2.3 Gruppi protettori delle catene laterali	24
1.2.4 Attivatori di Coupling	26
1.2.5 Kaiser Test	27
1.3 Legami chemoselettivi.....	28
1.4 Tessuti antimicrobici: cotone	30
1.4.1 La cellulosa	30
1.4.2. Ossidazione enzimatica della cellulosa.....	31
2. Scopo della Tesi.....	33
3. Risultati e Discussione	35
3.1 BMAP-27(1-18) e PMAP-36(12-24).....	35
3.2 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi.....	37
3.2.1 all-L-Ac-BMAP(1-18).....	37
3.2.2 all-D-Ac-BMAP(1-18).....	39
3.2.3 all-L-PMAP(12-24)	40
3.2.4 all-D-Ac-PMAP(12-24)	43
3.3 Degradazioni enzimatiche.....	45
3.3.1 Degradazioni con Tripsina	45
3.4 Dicroismo Circolare.....	52
3.5 NMR	56
3.6 Test di Leakage	62

3.6.1 Test di Leakage con liposomi PE/PG.....	64
3.6.2 Test di Leakage con liposomi PC/Ch.....	65
3.7 Analisi biologiche	66
3.8 Legame tra peptide e cotone	68
3.8.1 Calcolo del loading di peptide sul cotone	70
4. Parte Sperimentale.....	73
4.1 Materiali e strumentazione.....	73
4.1.1 Reagenti e solventi.....	73
4.1.2 Strumentazione	74
4.2 Sintesi su fase solida di peptidi.....	76
4.2.1 Sintesi di all-L-Ac-BMAP(1-18).....	79
4.2.2 Sintesi di all D Ac-BMAP(1-18)	80
4.2.3 Sintesi di all L PMAP(12-24)	81
4.2.4 Sintesi di all D Ac-PMAP(12-24).....	83
4.3 Degradazioni enzimatiche.....	84
4.4. Dicroismo Circolare.....	85
4.5 Test di Leakage	86
4.6 Analisi Biologiche.....	88
Determinazione MIC sui campioni di peptide	88
4.7 Funzionalizzazione Cotone.....	89
5. Conclusioni.....	93
6. Bibliografia.....	95
RINGRAZIAMENTI.....	99

Abbreviazioni

AA	Amminoacido
ACN	Acetonitrile
AMPs	Antimicrobial peptides
AMR	Antimicrobial resistance
AOAc (Aox)	Acido aminossiacetico
Arg (R)	Arginina
BMAP-27	Bovine Myeloid Antimicrobial Peptide 27
Boc	Ter-butilossicarbonile
Bzl	Benzile
CD	Dicroismo Circolare
CF	Carbossifluoresceina
Ch	Colesterolo
Cys (C)	Cisteina
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimmide
DIPEA	N-etil-diisopropilammina
DMF	N,N-dimetilformammide
DODT	2,2'-(Etilendiossi)dietantiolo
ESI	Electrospray ionization
EtOH	Etanolo
Fmoc	9-fluorenilmetossicarbonile
Gly (G)	Glicina
HBTU	N, N, N', N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HEPES	Acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil]-etansolfonico
His (H)	Istidina
HOBt	N-idrossibenzotriazolo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ile (I)	Isoleucina
LC	Cromatografia Liquida
Leu (L)	Leucina

Lys (K)	Lisina
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MeOH	Metanolo
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MS	Spettrometria di Massa
NOESY	NOE Spectroscopy
PBS	Soluzione tampone di fosfato di potassio
Pbf	2,2,4,6,7-pentametilididrobenzofurano-5-solfonile
PC	Fosfatilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerolo
PMAP-36	Porcine Myeloid Antimicrobial Peptide 36
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
SDS	Sodio dodecil solfato
Ser (S)	Serina
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
t-Bu	Terz-butile
TCEP	tris(2-carbossietil)fosfina
TFA	Acido trifluoroacetico
TFE	2,2,2 - Trifluoroetanolo
Thr (T)	Treonina
TIS	Triisopropilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TRIS·HCl	Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato
Trp (W)	Triptofano
Val (V)	Valina

1. Introduzione

La capacità dei microrganismi, come i batteri, di resistere all'attività di farmaci antibiotici a cui precedentemente erano sensibili è definita antibiotico resistenza (AMR, *antimicrobial resistance*). Le cause che hanno portato all'AMR sono imputabili al vasto e inappropriato utilizzo di antibiotici in medicina umana e veterinaria, in zootecnia e in agricoltura, che ha aumentato la pressione selettiva facilitando lo sviluppo, la moltiplicazione e la diffusione di microbi resistenti. Al giorno d'oggi l'AMR è uno dei principali problemi della sanità a livello mondiale [1, 2].

Nel 2017 l'Unione Europea ha redatto un piano d'azione per fronteggiare l'AMR ("A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance, AMR"), in cui si incentiva la ricerca e lo sviluppo di soluzioni e strumenti che migliorino la prevenzione e il controllo delle infezioni, oltre che di nuovi medicinali e trattamenti alternativi [3].

PMAP-36 e BMAP-27 sono dei peptidi antimicrobici (AMPs, *antimicrobial peptides*) appartenenti alla classe delle catelicidine e in questa tesi vengono sintetizzate e studiate sequenze accorciate di questi peptidi per valutarne l'attività in previsione di una loro potenziale applicazione nello sviluppo di antibiotici. Gli AMPs sono peptidi naturalmente presenti in moltissimi organismi come: piante, insetti, pesci, uccelli, mammiferi, ecc. Fanno parte del sistema immunitario innato e contribuiscono a costituire la prima linea difensiva dalle infezioni [4]. Questi peptidi possiedono dimensioni relativamente piccole, con una carica netta positiva che consente loro di instaurare interazioni elettrostatiche con le membrane batteriche cariche negativamente, rendendole permeabili. Gli AMPs possiedono attività antimicrobica ad ampio spettro e il loro meccanismo d'azione, diverso da quello degli antibiotici convenzionali, rende difficile ai batteri lo sviluppo di resistenza. Questo rende gli AMPs interessanti per lo sviluppo di potenziali nuovi farmaci [5].

Inoltre, dato il crescente interesse verso la ricerca e lo sviluppo di tessuti antimicrobici, si valuta di legare covalentemente analoghi del peptide PMAP-36 al cotone utilizzando legami chemoselettivi. Il cotone è un tessuto dotato di ottime qualità, quali: forza, biocompatibilità, traspirabilità... Ma la sua idrofilicità trova terreno fertile per la proliferazione dei batteri [6]; questo svantaggio potrebbe essere risolto legando covalentemente dei peptidi antimicrobici.

1.1 Catelicidine

Le catelicidine sono una classe di AMPs molto presente negli animali da fattoria e nell'uomo di cui, assieme alle defensine (altra classe di AMPs) costituiscono una parte fondamentale del sistema immunitario innato non-specifico [7, 8].

Le prime catelicidine isolate in un mammifero, in particolare dai globuli bianchi dei bovini negli anni Ottanta, sono state chiamate bactenecins 5 e 7 (abbreviate in Bac5 e 7). Il termine *bactenecin* deriva delle parole “*bacterium*” (batterio) e “*necare*” che in latino significa uccidere. Negli anni successivi molti peptidi appartenenti a questa classe sono stati identificati in maiali, cavalli, pecore, ... Nell'uomo, ad oggi, è stata isolata una sola catelicidina, chiamata LL-37 perché è costituita da 37 amminoacidi e i primi due sono leucine (Leu, L) [7].

I peptidi appartenenti a questa classe possiedono sequenze relativamente corte, che vanno dai 12 agli 80 amminoacidi (AA) [4, 7], e una carica netta positiva, che varia da +2 a +9 [4, 8], e mostrano attività ad ampio spettro contro batteri GRAM positivi e GRAM negativi, virus e funghi [7, 8].

Gli AMPs cationici possiedono una sequenza amminoacidica ricca in AA basici carichi positivamente (come arginina e lisina) e idrofobici (come triptofano e fenilalanina) [9], che gli consente di formare strutture secondarie elicoidali anfipatiche. Un lato dell'elica, dove si concentrano gli AA basici, sarà idrofilico e carico positivamente, mentre l'altro sarà idrofobico (Figura 1.1).

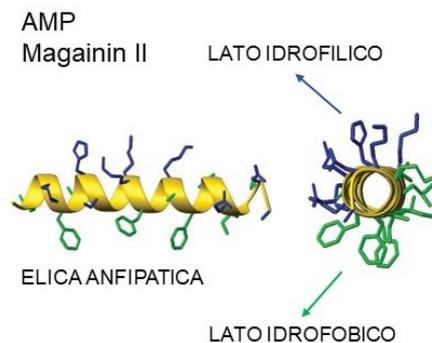


Figura 1.1. Rappresentazione schematica della struttura elicoidale anfipatica degli AMPs [10].

Le membrane batteriche sono formate da fosfolipidi anionici: la superficie esterna dei batteri GRAM- è costituita da lipopolisaccaridi con gruppi fosfato e quella dei

batteri GRAM+ da acidi teicoici e lipoteicoici [11]. La carica positiva degli AMPs cationici permette loro di interagire elettrostaticamente con le membrane batteriche cariche negativamente, quindi di destabilizzarle e permeabilizzarle [5, 7, 9]. Al contrario le membrane delle cellule eucariote sono formate da fosfolipidi zwitterionici (come la fosfatidilcolina) e colesterolo; di conseguenza, i peptidi formano soltanto deboli interazioni idrofobiche con queste membrane [5, 9]. La capacità degli AMPs di interagire diversamente con membrane batteriche ed eucariote (Figura 1.2) spiega la loro attività antibiotica e la bassa citotossicità (tossicità verso cellule eucariote).

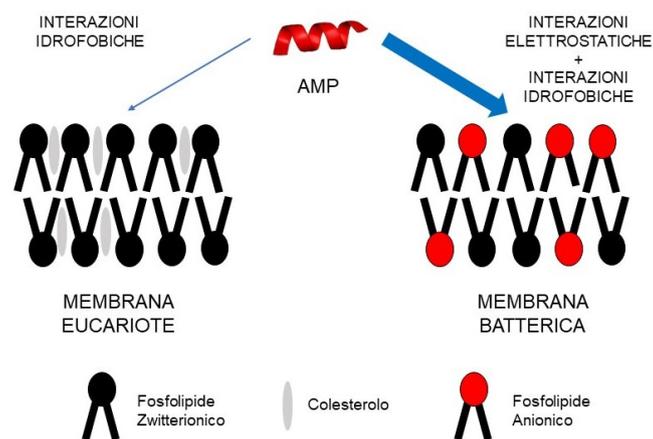


Figura 1.2. Rappresentazione schematica dell'interazione di un AMP con membrane eucariote e batteriche [9].

L'attività antimicrobica ad ampio spettro degli AMPs cationici è legata al meccanismo d'azione basato su interazioni a bassa affinità. Di conseguenza, lo sviluppo di resistenza batterica verso questi peptidi è considerato più difficile in confronto ai farmaci antibiotici convenzionali, il cui meccanismo è basato sull'attacco di *target* specifici [5]. Questa proprietà assieme alla loro bassa tossicità e velocità d'azione [7], li rende dei promettenti nuovi composti utili per combattere le infezioni batteriche [9].

In questa tesi vengono sintetizzati e studiati analoghi di BMAP-27 e PMAP-36, peptidi appartenenti alla classe delle catelicidine, isolati rispettivamente da bovini e suini [7].

1.1.1 Meccanismo d'azione

Comprendere il meccanismo con cui gli AMPs esercitano la loro azione è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi peptidi sintetici ad elevata attività e selettività. È accertato che l'interazione elettrostatica tra peptidi e fosfolipidi sia determinante per l'attività antibiotica [5], ma il meccanismo con cui le membrane vengono permeabilizzate non è del tutto chiaro. Esistono diversi modelli basati su membrane lipidiche artificiali, ma queste sono alquanto diverse dalle membrane delle cellule batteriche [9]. I modelli più accreditati sono: il modello *toroidal-pore*, il modello *barrel-stave* e il modello *carpet* (Figura 1.3).

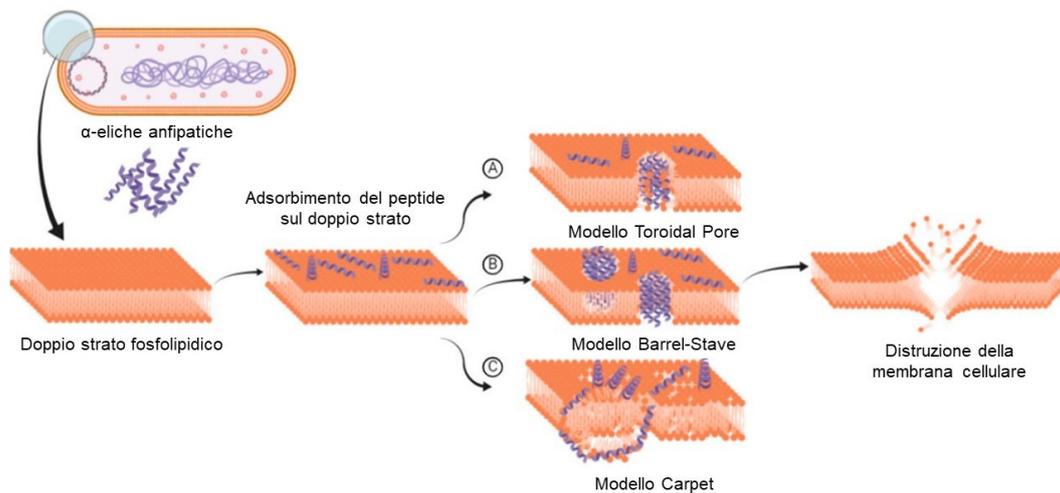


Figura 1.3. Modelli proposti per la distruzione delle membrane cellulari ad opera di AMPs cationici. (A) Modello Toroidal-Pore, (B) Modello Barrel-Stave e (C) modello Carpet [8].

Secondo il modello *barrel-stave*, a bassi rapporti peptide/lipide i peptidi si dispongono parallelamente sul doppio strato lipidico. Ma all'aumentare del rapporto peptide/lipide i peptidi si orientano perpendicolarmente inserendosi nel doppio strato e formando dei pori transmembrana [11] che causano la fuoriuscita del materiale intracellulare e la morte della cellula [9]. In Figura 1.3b si può osservare come i peptidi in conformazione elicoidale formino un fascio con un poro centrale, simile ad una “botte” (*barrel*) con i peptidi come “assi” (*stave*) [11].

Secondo il modello *carpet*, i peptidi si accumulano sulla superficie del doppio strato lipidico fino a ricoprirla come un “tappeto” (*carpet*); oltre una concentrazione critica i peptidi creano dei fori toroidali transitori nella membrana, che permettono ad altre molecole di peptide di raggiungere la membrana e solubilizzarla formando delle micelle (Figura 1.3c) [11]. In questo modello l'azione degli AMPs è simile a

quella di un tensioattivo che modifica la tensione superficiale della membrana cellulare [9, 11].

Infine, secondo il modello *toroidal-pore* la faccia polare delle eliche peptidiche anfipatiche aggrega con la testa polare dei fosfolipidi, inducendo il doppio strato lipidico a piegarsi fino a formare dei pori [11]. Questi pori toroidali (Figura 1.3a) possiedono un diametro di 1-2 nm e causano la morte della cellula [9].

1.1.2 BMAP-27

BMAP-27 (Bovine Myeloid Antimicrobial Peptide 27) è un peptide antimicrobico bovino appartenente alla classe delle catelicidine. È costituito da 27 amminoacidi con sequenza [12]:



Come tutte le catelicidine questo peptide è cationico, con una carica netta di +10 data dall'elevato numero di arginine (Arg, R) e lisine (Lys, K) [13].

Misure di dicroismo circolare hanno dimostrato che in soluzione acquosa BMAP-27 non possiede una struttura tridimensionale ordinata, ma in presenza di liposomi, che mimano le membrane cellulari, assume una conformazione ad α -elica [14]. In particolare, i residui da 1 a 18 formano un'elica anfipatica, con una faccia costituita da AA basici e la faccia opposta da AA idrofobici [13], mentre l'estremità C-terminale del peptide forma un'elica idrofobica (Figura 1.4).

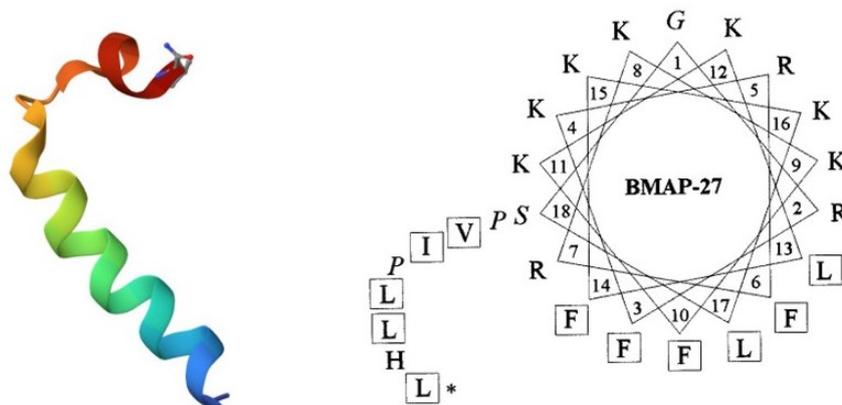


Figura 1.4. A sinistra il diagramma a nastro della struttura a minima energia di BMAP-27 [15], a destra la proiezione dell'elica (i residui basici in grassetto e i residui idrofobici incorniciati) [13].

Analisi biologiche *in vitro* di *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sono state condotte per determinare l'attività antibatterica di BMAP-27 ed è stata osservata un'attività ad ampio spettro verso batteri GRAM+ e GRAM- [8, 13, 14]. Questo peptide, tuttavia, è citotossico verso eritrociti e neutrofilo umani (a concentrazioni molto più elevate rispetto a quelle antibiotiche) [8, 13]; gli effetti di citotossicità sono imputabili all'estremità C-terminale idrofobica che facilita l'interazione con le cellule eucariote. Accorciando la sequenza da 1 a 18, quindi limitando le interazioni idrofobiche tra peptide e membrana eucariote, si è notato che la citotossicità diminuisce [16], mentre l'attività antibatterica viene conservata [8, 14].

1.1.3 PMAP-36

PMAP-36 (Porcine Myeloid Antimicrobial Peptide 36) è un peptide antimicrobico suino appartenente alla classe delle catelicidine. È costituito da 36 amminoacidi con sequenza [17]:



È un peptide cationico e possiede una carica netta di +13; la maggior parte dei residui cationici si concentra nei primi 20 amminoacidi (parte attiva del peptide), che formano una struttura tridimensionale anfipatica ad α -elica (Figura 1.5) [17-19].

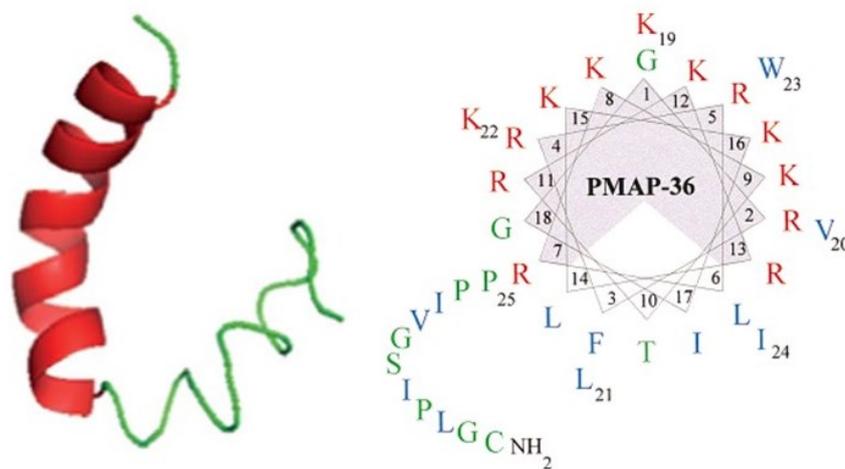


Figura 1.5. A sinistra il diagramma a nastro della struttura a minima energia di PMAP-36 [17], a destra la proiezione dell'elica (i residui basici in rosso, i residui idrofobici blu e i residui idrofilici in verde) [20].

PMAP-36 possiede attività antibiotica ad ampio spettro verso batteri GRAM+, GRAM- e batteri della Candida [17, 19]. Ad alte concentrazioni è leggermente citotossico [17]; tuttavia, è stato osservato che accorciare la sequenza amminoacidica di 11 AA dall'estremità N-terminale ne riduce la citotossicità, ma ne conserva le proprietà battericide [17]. Infine, studi di relazione struttura-attività condotti su analoghi di PMAP-36 hanno dimostrato che il peptide la cui sequenza va dal residuo 12 al 24 mostra le migliori proprietà in termini di alta attività antibiotica e di bassa citotossicità [21].

1.1.4 Peptidi come farmaci: limitazioni

I peptidi antimicrobici, ad oggi, sono oggetto di studio e grande interesse scientifico perché grazie alle loro proprietà possono rappresentare una soluzione al problema dell'antibiotico resistenza. Tuttavia, gli AMPs attualmente in commercio come farmaci non sono molti [22], infatti queste molecole presentano alcuni limiti.

Il principale problema dei peptidi antimicrobici è che nei *test in vitro* presentano un'elevata attività, mentre *in vivo* risultano inattivi o attivi in minima parte. La differenza nei risultati ottenuti da questi *test* è imputabile all'impossibilità di replicare *in vitro* le condizioni fisiologiche. Infatti, nei *test in vivo* l'elevata forza ionica fisiologica influenza l'attività degli AMPs, inoltre il siero degli organismi contiene proteine che si legano ai peptidi e ne impediscono l'interazione con i patogeni, ma soprattutto gli AMPs all'interno dell'organismo sono soggetti ad una rapida degradazione ad opera degli enzimi proteolitici [5, 23]. A questo proposito, la ricerca nel campo degli AMPs punta non solo a individuare nuovi peptidi antimicrobici, ma anche a trovare strategie per rendere tali peptidi delle molecole stabili in ambiente fisiologico.

È possibile apportare delle modifiche strutturali alla catena peptidica per rendere la molecola più stabile all'azione degli enzimi e contestualmente non ridurne l'attività antimicrobica (anzi, se possibile, migliorarla), oltre che non aumentarne la citotossicità. Le modifiche utilizzate con successo sono la ciclizzazione, la modifica dell'estremità N-/C-terminale, la sostituzione di amminoacidi naturali con amminoacidi non proteinogenici e la funzionalizzazione di nanoparticelle [23-25].

Le catene peptidiche lineari sono dotate di alta flessibilità conformazionale che porta ad interazioni non desiderate (*off-target*). La ciclizzazione tramite legami intramolecolari aumenta la rigidità della catena migliorandone la stabilità e la

capacità di legarsi in modo efficiente e selettivo al *target* [26]; di conseguenza l'attività antimicrobica e la selettività dei peptidi ciclici è più elevata [23, 25]. I peptidi ciclici si ottengono attraverso la formazione di ponti disolfuro o di lattami. I ponti disolfuro si creano tramite l'ossidazione dei gruppi tiolo appartenenti alle catene laterali delle cisteine (Cys C) (Figura 1.6a) [23]. I peptidi ciclici con uno o più ponti disolfuro formano strutture secondarie più rigide aumentando, così, la stabilità nei confronti degli enzimi proteolitici. I lattami sono cicli ottenuti tramite la formazione di legami ammidici; i modi con cui questi legami possono formarsi sono: testa-coda, catena laterale-testa (-coda) o catena laterale-catena laterale (Figura 1.6b) [23].

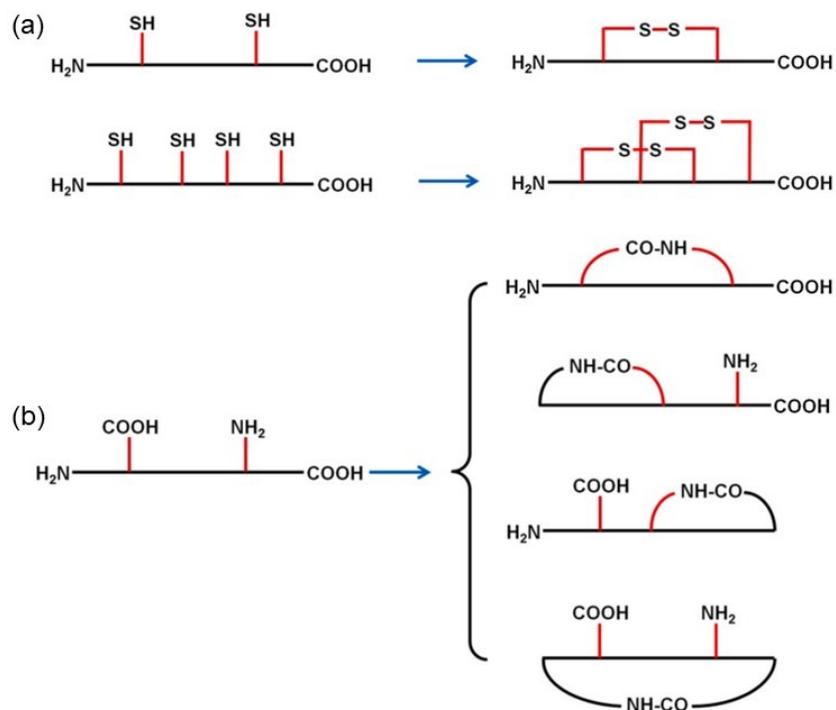


Figura 1.6. Rappresentazione schematica della formazione di peptidi ciclici attraverso la formazione di: (a) ponti disolfuro e (b) legami ammidici [23].

La stabilità degli AMPs può essere, inoltre, migliorata modificando l'estremità N- o C-terminale della catena peptidica; attraverso un'ammidazione (C-terminale), un'acetilazione (N-terminale) o una metilazione (N-terminale) (Figura 1.7); peptidi che presentano queste modifiche sono più resistenti all'azione delle proteasi [24]. Anche i gruppi funzionali delle catene laterali possono essere modificati; ad esempio il gruppo amminico della lisina può essere alchilato aumentando la resistenza del peptide ad enzimi come la Tripsina [23], ma questa modifica

comporterebbe la perdita di una carica positiva, quindi la diminuzione dell'attività antimicrobica.

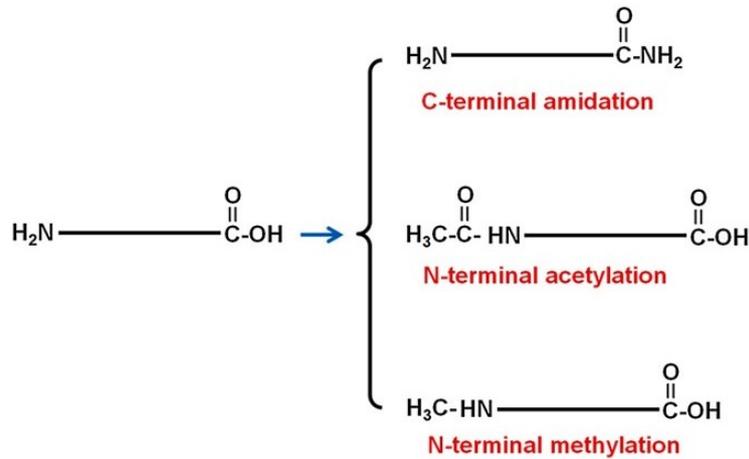


Figura 1.7. Rappresentazione schematica delle modifiche all'estremità N-/C-terminale del peptide [23].

Un'altra strategia per aumentare la stabilità degli AMPs è quella di introdurre aminoacidi non proteinogenici, ovvero aminoacidi non presenti nelle proteine degli organismi viventi, che di conseguenza non vengono riconosciuti ed idrolizzati dagli enzimi proteolitici. Gli aminoacidi naturali (ad eccezione della glicina) sono enantiomeri in configurazione L, l'immagine speculare in configurazione D condivide tutte le proprietà chimico-fisiche ad eccezione dell'abilità di ruotare il piano della luce polarizzata, che ruota nel verso opposto (Figura 1.8) [27]. Sostituire un L-AA con il corrispettivo D-AA porta ad un aumento nella resistenza del peptide alla degradazione enzimatica, perché l'enantiomero D non viene riconosciuto dalle proteasi. Tuttavia, introdurre uno o più aminoacidi in configurazione D nella sequenza aminoacidica può portare ad alterazioni nella struttura secondaria del peptide, quindi alla perdita della conformazione ad α -elica e dell'attività antimicrobica [23, 25]. Per risolvere questo problema ci si può limitare alla sostituzione degli aminoacidi terminali della catena peptidica o sintetizzare l'intero peptide con D-AA ottenendo l'immagine speculare. Quest'ultima strategia viene utilizzata in questa tesi. In alternativa è possibile introdurre aminoacidi non proteinogenici variando le catene laterali.

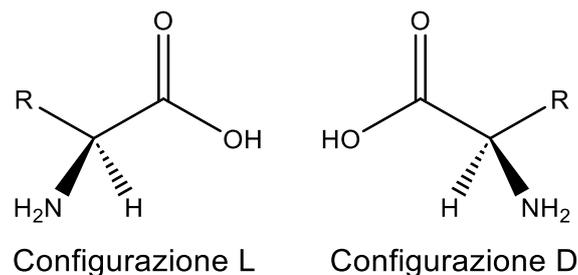


Figura 1.8. Rappresentazione degli amminoacidi in configurazione L e D.

Infine, è possibile ancorare gli AMPs alla superficie di nanoparticelle aumentandone la stabilità e riducendone la tossicità, infatti i nanomateriali sono eccellenti *drug delivery systems* (sistemi per il trasporto di farmaci). Le nanoparticelle di oro sono considerate i nanomateriali ideali, in quanto sono atossiche, inerti e biocompatibili. Inoltre, possono essere facilmente funzionalizzate con legami covalenti tra il gruppo tiolo di una cisteina e un atomo di oro.

1.2 La Sintesi Peptidica

Al giorno d'oggi i peptidi prodotti per via chimica vengono sintetizzati con la tecnica della sintesi peptidica su fase solida (*Solid Phase Peptide Synthesis* SPPS) inventata dal biochimico Robert Bruce Merrifield nel 1963 [28] e che gli valse il Premio Nobel per la Chimica nel 1984. La tecnica SPPS, utilizzata in questa tesi, ha soppiantato, nel tempo, la sintesi peptidica in soluzione, tecnica che presentava numerosi svantaggi. Il principale svantaggio della sintesi peptidica in soluzione era la necessità di uno *step* di purificazione dopo ogni legame tra due amminoacidi (*coupling*), con conseguente perdita di tempo e di prodotto.

La tecnica SPPS si basa sull'utilizzo di un supporto solido insolubile, su cui si lega covalentemente un'estremità della catena peptidica in crescita. In questa tesi la sintesi dei peptidi viene condotta dall'estremità C-terminale alla N-terminale; quindi, si lega l'estremità C-terminale del primo AA al supporto insolubile (resina) e si continua la sintesi legando uno per volta tutti gli AA della sequenza [28, 29]. Prima di legare alla catena ciascun AA, quest'ultimo deve essere attivato trasformando il gruppo ossidrilico della funzionalità carbossilica in un buon gruppo uscente.

Gli amminoacidi utilizzati per la sintesi possiedono i gruppi funzionali protetti da gruppi protettori, in particolare i gruppi funzionali delle catene laterali e l'estremità

N-terminale sono protetti con gruppi detti ortogonali. I gruppi protettori ortogonali presentano condizioni di deprotezione opposte (condizioni acide/condizioni basiche). Il gruppo protettore dell'estremità N-terminale viene detto “gruppo protettore temporaneo”, mentre quelli delle catene laterali vengono detti “gruppi protettori permanenti” [28, 29].

La sintesi si articola in una serie di *step* che vengono ripetuti ciclicamente (Figura 1.9) fino al completamento della sequenza amminoacidica:

- ▶ Deprotezione dell'estremità N-terminale.
- ▶ Lavaggio della resina con solvente.
- ▶ *Coupling* dell'AA attivato alla catena peptidica.
- ▶ Lavaggio della resina con solvente.

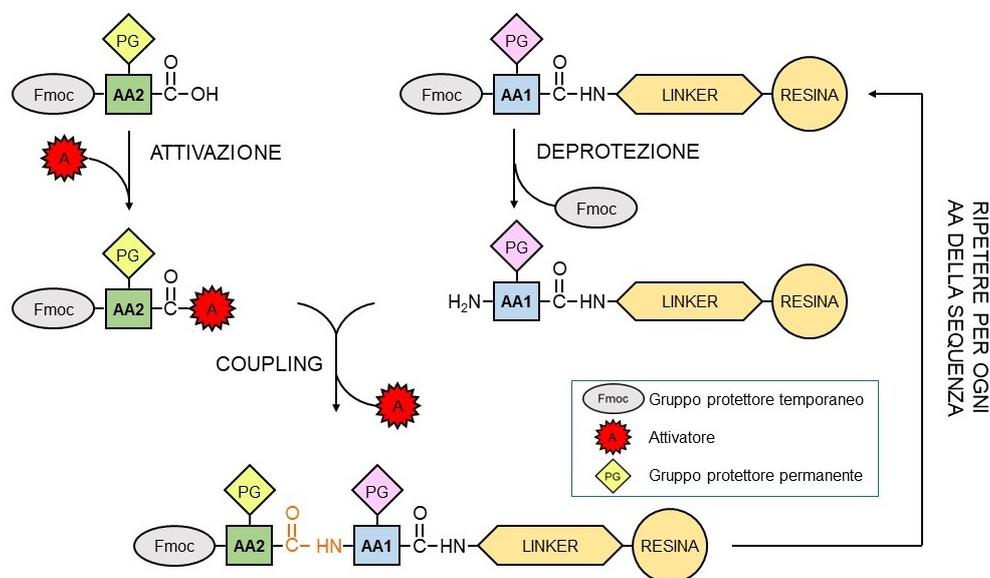


Figura 1.9. Rappresentazione schematica degli *step* che caratterizzano la tecnica SPPS.

Il principale vantaggio della sintesi su fase solida rispetto alla sintesi in soluzione è che la catena peptidica è legata covalentemente ad un supporto insolubile, perciò i reagenti in eccesso e i sottoprodotti solubili possono essere rimossi per semplice filtrazione attraverso una serie di lavaggi con il solvente (Figura 1.10) ed evitando i lunghi passaggi di estrazione e purificazione tipici della tecnica in soluzione. Un ulteriore vantaggio della tecnica di SPPS è che elimina i problemi di solubilità delle lunghe catene peptidiche, dal momento che è possibile utilizzare diversi tipi di solvente come la dimetilformammide che viene usata comunemente.

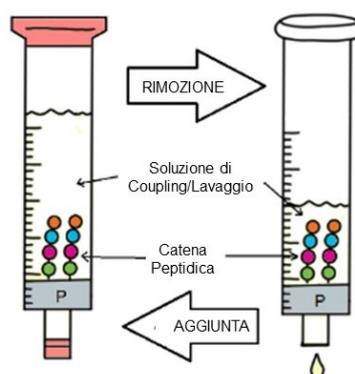


Figura 1.10. Rappresentazione della siringa da SPPS grazie alla quale è possibile aggiungere la soluzione di *coupling* o di lavaggio e poi rimuoverla per semplice filtrazione [30].

Per via della ricorsività degli *step* di sintesi, il processo è facilmente automatizzabile e al giorno d'oggi, in commercio, esistono numerosi sintetizzatori automatici, che caricati con solventi e reagenti svolgono la sintesi in autonomia.

Terminata la sintesi della sequenza amminoacidica è possibile rompere il legame tra la resina e peptide, portando quest'ultimo in soluzione. Questa operazione viene chiamata *sblocco* e le condizioni a cui avviene permettono anche la deprotezione dei gruppi funzionali delle catene laterali dai gruppi protettori permanenti. In un unico passaggio si porta il peptide deprotezionato in soluzione.

I pro della tecnica SPPS sono molti, ma anch'essa presenta degli svantaggi. Il principale problema riguarda il monitoraggio della sintesi. Con la tecnica in soluzione l'andamento della sintesi può essere seguito facilmente con tecniche comuni come le TLC (*Thin Layer Chromatography*) e gli intermedi di reazione possono essere isolati e caratterizzati tramite spettrometria di massa. Con tecnica in fase solida monitorare la sintesi non è semplice; per poter analizzare gli intermedi di reazione è necessario prima *sbloccare* il peptide dal supporto insolubile e quel che si fa è prelevare una piccola quantità di resina ed eseguire lo *sblocco* su di essa, con conseguente perdita di prodotto quindi di resa. Ragionevolmente quest'operazione non può essere svolta dopo ogni *coupling* altrimenti la perdita di prodotto sarebbe ingente e soprattutto verrebbe meno il risparmio di tempo che caratterizza la tecnica SPPS [29]. Per ovviare a questo problema si utilizza un saggio colorimetrico qualitativo chiamato *Kaiser Test* [31], che rivela la presenza di gruppi amminici liberi quindi indica se la reazione è andata a completezza; ovviamente questo saggio può essere eseguito solo se la sintesi è svolta manualmente e non con sintetizzatori automatici. Un ulteriore problema della

sintesi su fase solida riguarda i processi diffusivi; infatti, lavorando con un supporto insolubile la diffusione può limitare il contatto tra i reagenti. Per ovviare a questo problema e per massimizzare la resa della sintesi, nella SPPS si lavora con un largo eccesso di reagenti rispetto ai siti attivi della resina. In Tabella 1.1 si può osservare come la resa di ciascun *coupling* sia un aspetto cruciale e se non è massima l'intera sintesi peptidica ne risente; per questo motivo con la tecnica SPPS è possibile sintetizzare peptidi in resa accettabile con un massimo 40-50 AA [29].

Tabella 1.1. Resa complessiva massima per un peptide di N amminoacidi con una resa di *coupling* di 99% e 95%.

N° coupling	Resa di ciascun coupling	
	99 %	95 %
	Resa complessiva dopo N coupling	
10	90	60
20	81	36
30	74	21
40	67	13
50	61	8

I sottoprodotti che si formano in seguito a reazioni incomplete o collaterali, quindi peptidi senza uno o più amminoacidi nella sequenza, si accumulano nei siti attivi della resina e sono difficili da separare dal prodotto in quanto possiedono proprietà chimico-fisiche simili a quest'ultimo [32].

1.2.1 Resina

La resina, ovvero il supporto insolubile su cui cresce la catena peptidica, è costituito da sfere di polistirene reticolato con l'1% di divinilbenzene [29]. Questo grado di reticolazione permette il corretto, e non eccessivo, rigonfiamento (*swelling*) della resina nei solventi utilizzati e contestualmente garantisce stabilità agli sforzi meccanici dovuti all'agitazione durante le reazioni [33]. Uno *swelling* corretto della resina è fondamentale per consentire ai reagenti di raggiungere i siti attivi del supporto.

Il peptide non è ancorato direttamente alla resina, ma l'estremità C-terminale e il supporto solido sono connessi attraverso un *linker*. Questo spaziatore mantiene

ancorato il peptide alla resina durante tutta la sintesi, proteggendo l'estremità da reazioni collaterali. La concentrazione di *linker* determina il numero di siti attivi della resina su cui accrescere le catene peptidiche, è espressa in mmol/g e viene definita *loading*; mentre il tipo di *linker* determina le condizioni di sblocco del peptide dalla resina e il gruppo funzionale che verrà rilasciato all'estremità C-terminale del peptide.

In Figura 1.11 è riportata la resina utilizzata in questa tesi, ovvero la resina Rink Amide AM. Questa resina è ottenuta legando il *linker* Fmoc-2,4-dimetossi-4'-(carbossimetilossi)-benzidrilammina alla resina amminometilica. Il peptide viene sbloccato dalla resina in condizioni acide, utilizzando acido trifluoroacetico (TFA) al 95%; dopo questa operazione il peptide presenterà un gruppo ammidico all'estremità C-terminale [33, 34].

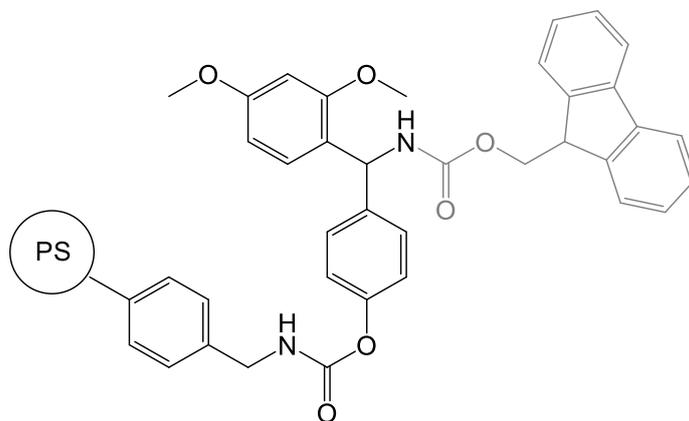


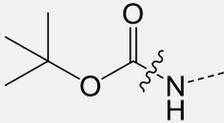
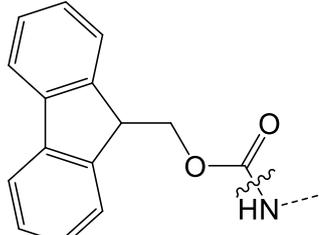
Figura 1.11. Resina Rink Amide AM, in grigio il gruppo protettore temporaneo -Fmoc, che protegge il sito attivo della resina.

1.2.2 Gruppi protettori temporanei

I gruppi protettori temporanei proteggono la funzionalità α -amminica degli AA, vengono rimossi prima di ogni *coupling* e per questo la loro rimozione deve essere rapida, efficiente e priva di reazioni collaterali. Nella tecnica SPPS, a seconda del gruppo protettore temporaneo utilizzato si individuano due strategie di sintesi: la strategia Boc/Bzl e la strategia Fmoc/tBu (Tabella 1.2) [29]. La prima impiega il gruppo protettore Boc (ter-butilossicarbonile) ed è stata impiegata nei primi quindici anni dall'invenzione della SPPS. La seconda impiega il gruppo protettore Fmoc (9-fluorenilmetossicarbonile) ed ha soppiantato la prima, in quanto più

flessibile e pratica [29]. I due gruppi protettori si differenziano per le condizioni di rimozione: acide per Boc e basiche per Fmoc [35].

Tabella 1.2. Gruppi protettori temporanei.

NOME	STRUTTURA
Boc (ter-butilossicarbonile)	
Fmoc (9-fluorenilmetossicarbonile)	

Il gruppo protettore Fmoc viene rimosso in condizioni blandamente basiche e ciò assicura una completa ortogonalità verso i gruppi protettori delle catene laterali, che sono acido-labili. In Figura 1.12 è illustrato il meccanismo di deprotezione dal gruppo Fmoc, consiste in una β -eliminazione ad opera di una base secondaria: la piperidina, da cui si ottiene anidride carbonica e dibenzofulvene, quest'ultimo forma un addotto con la piperidina [36].

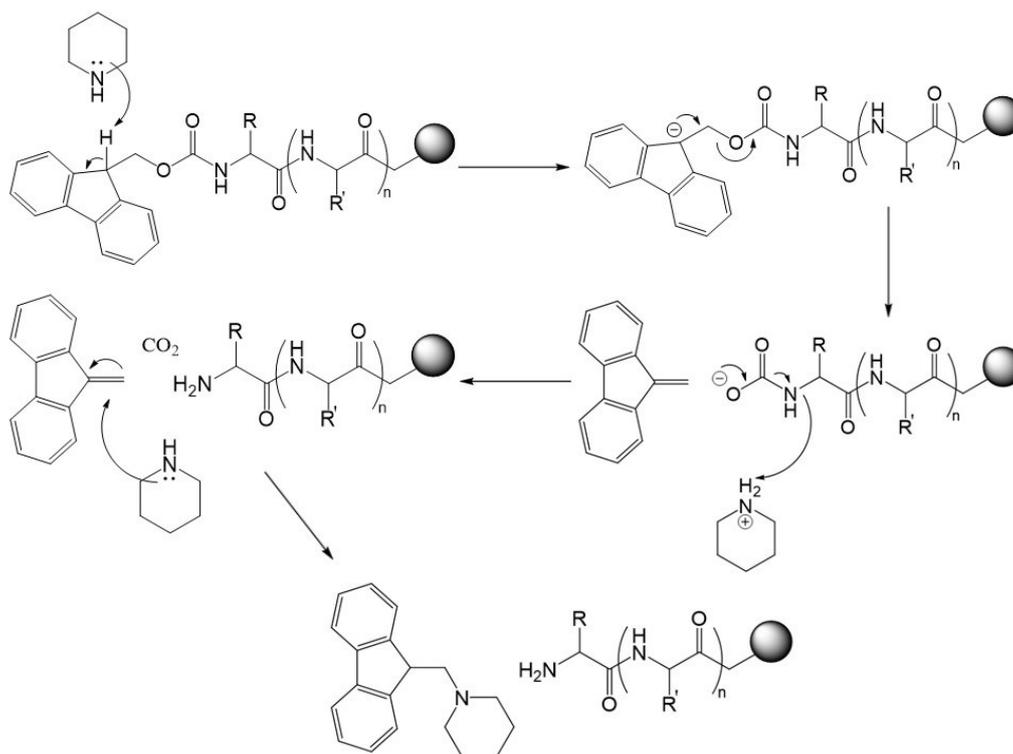
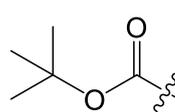
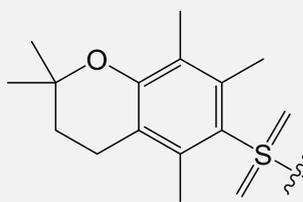
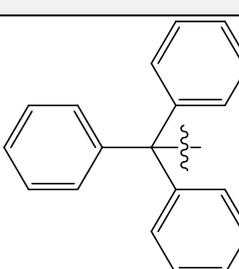


Figura 1.12. Meccanismo di rimozione del gruppo Fmoc.

1.2.3 Gruppi protettori delle catene laterali

Diversi amminoacidi possiedono catene laterali con gruppi funzionali reattivi, che vengono protetti per evitare reazioni secondarie durante il corso della sintesi. Questi gruppi protettori devono essere ortogonali al gruppo protettore temporaneo scelto, utilizzando il gruppo Fmoc devono essere resistenti alle condizioni basiche e rimovibili in condizioni acide [29, 37]. I gruppi protettori delle catene laterali utilizzati in questa tesi sono: terz-butile (t-Bu) per serina (Ser, S), ter-butilossicarbonile (Boc) per Lys, 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano-5-solfonile (Pbf) per Arg e tritile (Trt) per Cys, in Tabella 1.3 vengono riportate struttura e condizioni di deprotezione.

Tabella 1.3. Struttura e condizioni di rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali.

AA	Gruppo Protettore	Struttura	Condizioni di rimozione
Ser	t-Bu		90% TFA-DCM
Lys	Boc		25-50% TFA-DCM
			95% TFA e <i>scavengers</i>
Arg	Pbf		90% TFA e <i>scavengers</i> (TIS e H ₂ O)
Cys	Trt		1% TFA-DCM e <i>scavengers</i> (TIS)

Tutti i gruppi protettori utilizzati vengono rimossi alle condizioni di *sblocco* del peptide dalla resina Rink Amide AM, in modo da eseguire entrambe le operazioni in un unico passaggio. La rimozione dei gruppi protettori, tuttavia, necessita di *scavengers*, ovvero molecole come il triisopropilsilano (TIS) (Figura 1.13) capaci di neutralizzare i carbocationi che si liberano in soluzione durante la deprotezione [37].

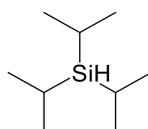


Figura 1.13. Struttura del TIS.

1.2.4 Attivatori di Coupling

A temperatura ambiente mescolare un acido carbossilico e un'ammina porta alla formazione di un sale carbossilato di ammonio; per avere la formazione di un legame ammidico è necessario raggiungere temperature oltre i 200°C alle quali, tuttavia, avviene una rapida degradazione dei peptidi [38]. Di conseguenza, diventa necessario attivare l'estremità C-terminale degli amminoacidi al fine di condurre la sintesi a temperatura ambiente. Utilizzando gli *attivatori di coupling*, il gruppo -OH dell'acido carbossilico dell'amminoacido viene trasformato in un buon gruppo uscente, ovvero un estere con una specie elettrone-attrattrice in grado di aumentare la suscettibilità all'attacco nucleofilo del carbonio carbossilico [39]. Negli anni sono stati sviluppati molti *attivatori di coupling*, i più utilizzati sono le carbodiimmidi, sali di uronio e i sali di fosfonio. In questa tesi vengono utilizzate le coppie Oxyma/N,N'-diisopropilcarbodiimmide (DIC) e N-idrossibenzotriazolo (HOBt)/N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU), le cui strutture sono riportate in Figura 1.14.

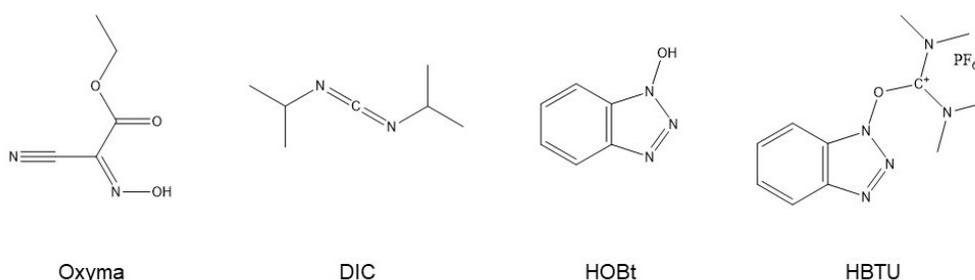


Figura 1.14. Struttura degli attivatori di coupling.

ATTIVATORI DI COUPLING HBTU/HOBt [40]

In Figura 1.15 è illustrato il meccanismo con cui i sali di uronio HBTU e HOBt trasformano l'acido carbossilico di un amminoacido in un estere attivo. La reazione necessita di una base terziaria come la N-etil-diisopropilammina (DIPEA) che deprotona l'acido carbossilico e HOBt, quindi l'amminoacido reagisce con HBTU formando la tetrametilurea e successivamente con OBt^- formando l'estere attivato. Inoltre, va sottolineato che gli *attivatori di coupling* si mescolano con l'amminoacido (pre-attivazione) prima dell'aggiunta della base per scongiurare la formazione della base di Schiff.

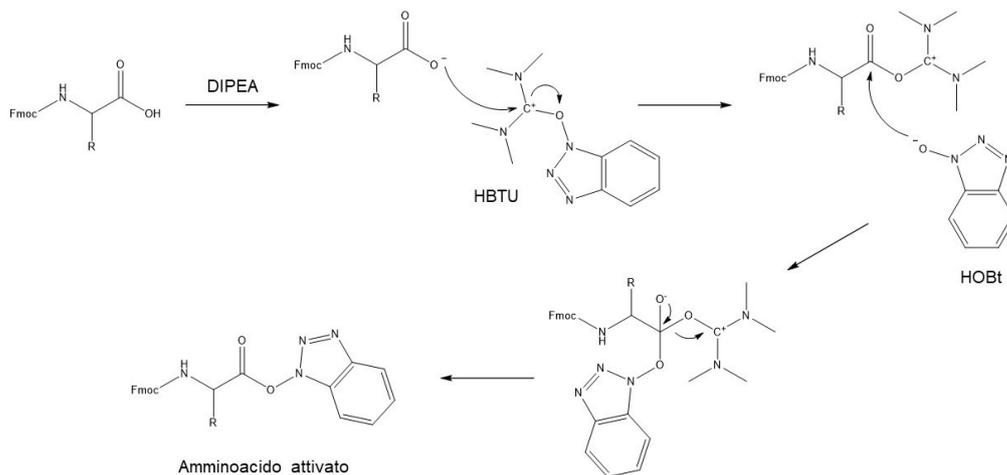


Figura 1.15. Meccanismo di attivazione dell'amminoacido con HBTU e HOBT.

ATTIVATORI DI COUPLING OSSIMA/DIC[39]

In Figura 1.16 è illustrato il meccanismo con cui DIC e ossima attivano l'acido carbossilico di un amminoacido. Il vantaggio di utilizzare questa coppia di *attivatori di coupling* è che ossima previene la racemizzazione degli amminoacidi.

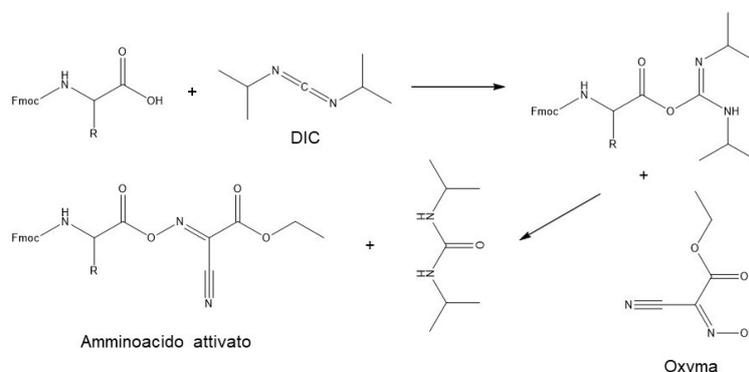


Figura 1.16. Meccanismo di attivazione dell'amminoacido con DIC e Ossima.

1.2.5 Kaiser Test

Il *Kaiser Test* è un saggio colorimetrico qualitativo che permette di individuare la presenza di ammine libere [31]. Nella sintesi peptidica in fase solida viene utilizzato al termine di un *coupling*, dopo lo *step* di lavaggio, su pochi granelli di resina. Se il test risulta positivo la resina si colora di blu e significa che sono presenti ammine libere, di conseguenza sarà necessario ripetere il *coupling* (*doppio coupling*). Se il test risulta negativo la resina non cambia colore ed è possibile proseguire con la sintesi. Uno dei reagenti di questo test è la ninidrina, che reagisce con le ammine a

formare un composto chiamato viola di Ruhemann di colorazione blu (Figura 1.17) [41].

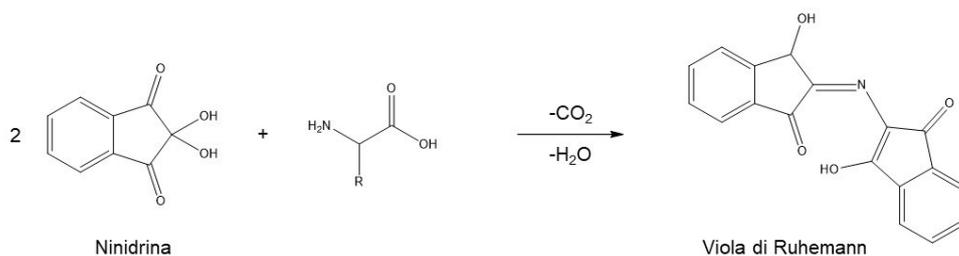


Figura 1.17. Reazione tra Ninidrina e un amminoacido a formare il viola di Ruhemann.

1.3 Legami chemoselettivi

La sintesi peptidica, in fase solida e in soluzione, è limitata dal poter ottenere con buona resa catene con un massimo di 40-50 AA (vedi Paragrafo 1.2), questo rende impossibile la sintesi di proteine o enzimi. Per risolvere questo problema, nel 1992 il chimico Stephen Kent introdusse il concetto di “*chemical ligation*”, ovvero la condensazione chemoselettiva tra due peptidi deprotetti (Figura 1.18) [42].

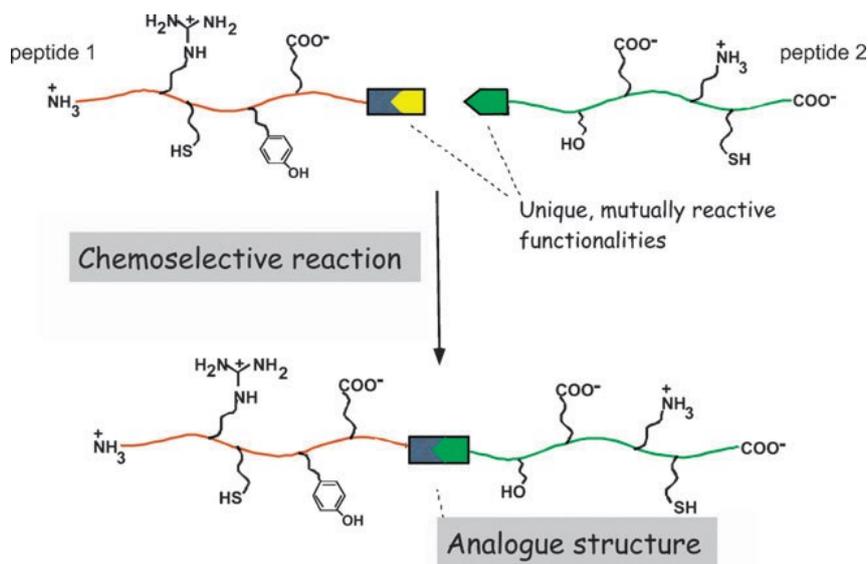


Figura 1.18. Principio della “*chemical ligation*”: due peptidi deprotetti vengono legati covalentemente dalla condensazione chemoselettiva di due gruppi funzionali [42].

La *chemical ligation* è una strategia di sintesi convergente, che attraverso la formazione di un legame covalente tra due catene peptidiche deprotette porta ad un

prodotto di dimensioni maggiori. La reazione di condensazione chemoselettiva avviene tra due gruppi funzionali posizionati ciascuno su un peptide; i due gruppi funzionali vengono scelti in modo tale da reagire velocemente ed esclusivamente tra di loro e non con altre funzionalità presenti sulle due molecole [42]. Il chimico statunitense sintetizzò l'enzima HIV-1 proteasi, utilizzando una sostituzione nucleofila a pH leggermente acido in soluzione acquosa tra un peptide-tiocarbossilato e un secondo peptide-bromoacetilato che ha portato alla formazione di un tioestere (Figura 1.19a) [43]. Questa strategia di sintesi si affianca, quindi, alla SPPS e consente di superarne il limite sopraccitato. Altre reazioni basate sulla stessa strategia sono rappresentate in Figura 1.19b-e e portano alla formazione di ossazolidine [44], tiazolidine [45], ossime [46], e idrazoni [47].

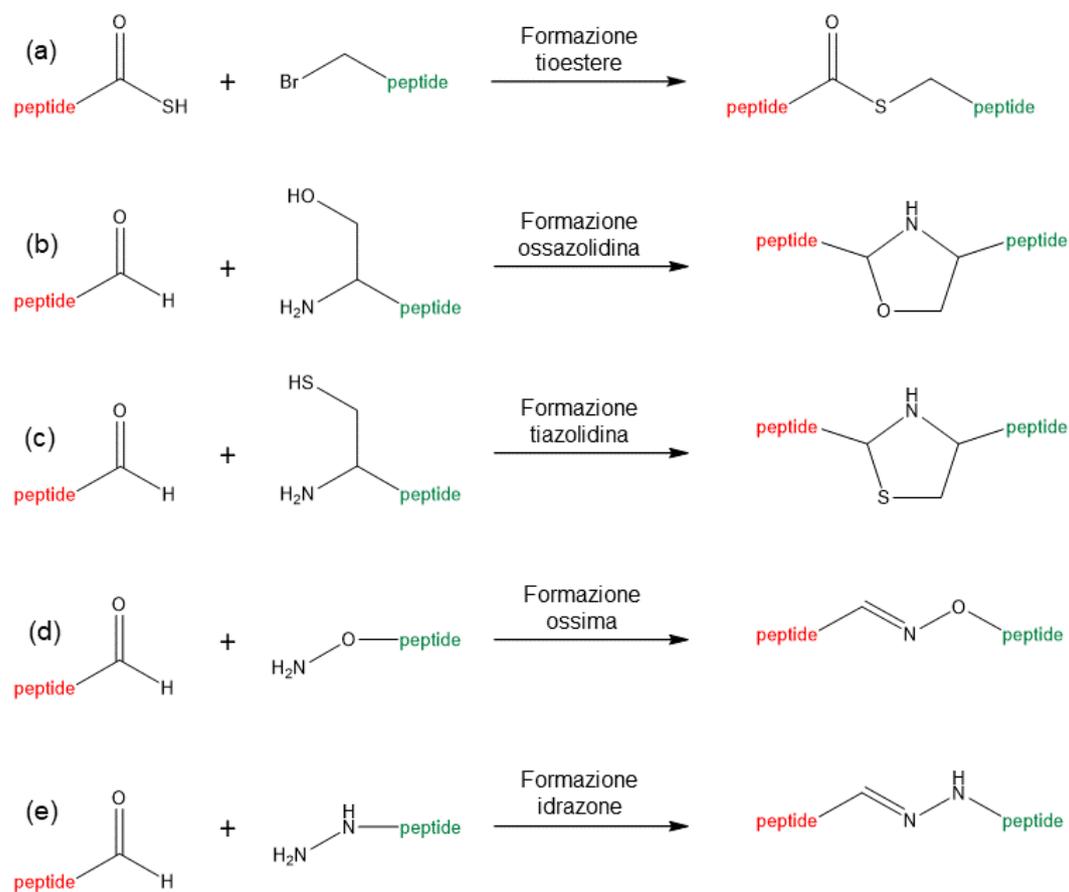


Figura 1.19. Legami chemoselettivi che portano alla formazione di: (a) tioesteri, (b) ossazolidine, (c) tiazolidine, (d) ossime e (e) idrazoni.

1.4 Tessuti antimicrobici: cotone

Il cotone è una fibra naturale a basso costo molto utilizzata per la produzione di tessuti in ambito ospedaliero, quali: garze, bende, camici, ... Il cotone garantisce peculiari proprietà ai tessuti, come la morbidezza, la forza, l'elasticità, la biocompatibilità e la traspirabilità; tuttavia, il cotone è molto affine all'acqua e questo rappresenta uno svantaggio perché facilita la proliferazione di batteri, soprattutto nelle strutture ospedaliere [6, 48]. Da qui nasce il crescente interesse della ricerca verso lo sviluppo di tessuti funzionalizzati con agenti antimicrobici [6]. Attualmente sul mercato sono presenti tessuti antimicrobici costituiti da polimeri sintetici contenenti sali o nanoparticelle di argento, sali d'ammonio quaternario, triclosano, chitosano, coloranti e N-alcoammine [6, 49]. In questa tesi si sperimenta la possibilità di funzionalizzare il cotone con peptidi antimicrobici attraverso la formazione di legami chemoselettivi in modo da combinare le proprietà della fibra di cotone con quelle degli AMPs, ottenendo un tessuto biocompatibile.

Gli analoghi del peptide PMAP-36 sintetizzati e studiati in questo lavoro di tesi vengono legati al cotone attraverso la formazione di tiazolidina e ossima (vedi Paragrafo 1.3). Il legame tiazolidinico si forma tra un'aldeide e un gruppo β -ammino tiolo costituito dalla catena laterale di una cisteina. Il legame ossima si forma tra un gruppo carbossilico e un acido aminossiacetico (Aox). Di conseguenza, per creare questi due legami è necessario legare Cys e Aox all'estremità N-terminale della catena peptidica ed ottenere un gruppo aldeidico sul cotone [50, 51].

1.4.1 La cellulosa

Il cotone è costituito prevalentemente da cellulosa, ovvero un polisaccaride lineare del glucosio caratterizzato da elevato peso molecolare e cristallinità. Il monomero del polimero è il glucosio, mentre il suo dimerò chiamato cellobiosio è l'unità ripetitiva. Infatti, il glucosio è unito da legami β -1,4-glicosidici tra i gruppi -OH del carbonio C1 e il carbonio C4 in posizione equatoriale, questo fa sì che ogni molecola sia ruotata di 180° rispetto all'altra (Figura 1.20). La catena termina da un lato con un'unità di glucosio con un gruppo C4-OH: l'estremità non riducente,

dall'altro con un'unità di glucosio il cui gruppo C1-OH è in equilibrio con la forma aperta: estremità riducente [52].

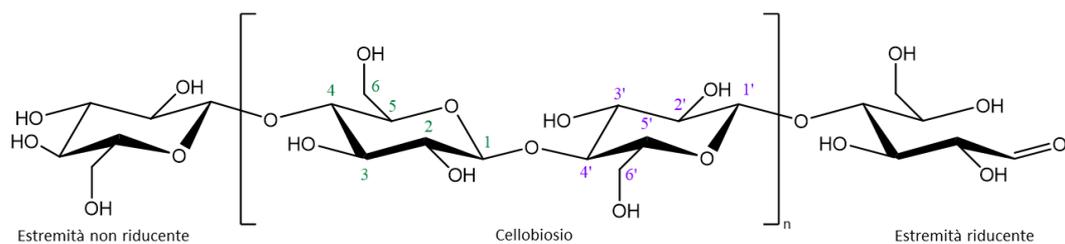


Figura 1.20. Struttura della cellulosa [30].

Le proprietà della cellulosa sono attribuibili al grande numero di gruppi ossidrilici presenti nella catena, che consentono la formazione di legami idrogeno intramolecolari e intermolecolari. I primi donano rigidità e robustezza alla catena, mentre i secondi consentono alle catene di cristallizzare ed organizzarsi in strutture gerarchiche (microfibrille, fibrille e fibre) insolubili nella maggior parte dei solventi [52].

1.4.2. Ossidazione enzimatica della cellulosa

Il metodo comunemente utilizzato per generare gruppi aldeidici nel cotone è l'ossidazione dei gruppi ossidrilici della cellulosa con periodato. Tuttavia, questo composto ossida i gruppi ossidrilici dei carboni C3 e C4 del glucosio, portando alla rottura del legame carbonio-carbonio e conseguente apertura dell'anello piranosico. Di conseguenza, alti gradi di ossidazione causano un'alterazione delle proprietà meccaniche delle fibre. Quindi, è preferibile utilizzare agenti ossidanti meno aggressivi come il 2,2,6,6-tetrametilpiperidina N-ossile (TEMPO) mediato dall'enzima laccasi: sistema TEMPO/laccasi. Il TEMPO è un radicale stabile e solubile in acqua, capace di ossidare selettivamente gli alcoli primari, quindi nella cellulosa il gruppo ossidrilico del carbonio C6 (selettività > 95%). La laccasi, infine, è un enzima capace di riossidare la forma ridotta del TEMPO utilizzando ossigeno atmosferico come ossidante primario e chiudendo il cerchio. La reazione, il cui meccanismo è illustrato in Figura 1.21, può essere svolta in soluzione acquosa, a pH leggermente acidi e a temperatura ambiente, perciò è interessante anche da un punto di vista ecologico [50, 51].

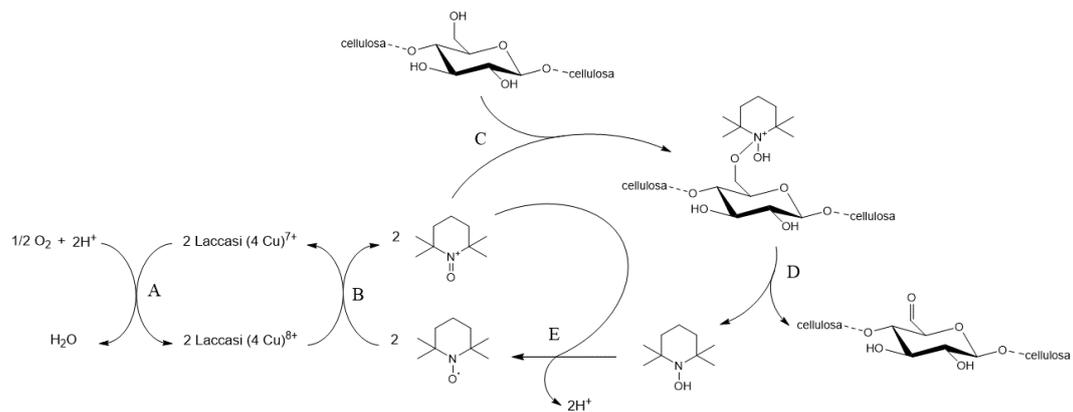


Figura 1.21. Meccanismo dell'ossidazione della cellulosa ad opera del sistema TEMPO/laccasi/O₂. A) reazione di O₂. B) ossidazione di TEMPO ad opera dell'enzima laccasi. C) legame chemoselettivo tra TEMPO e l'alcol primario in C6 della cellulosa. D) ossidazione della cellulosa. E) comproporzionamento di TEMPO [30].

2. Scopo della Tesi

Lo scopo di questa tesi è la sintesi di sequenze corte dei peptidi antimicrobici naturali BMAP-27 e PMAP-36, in modo da studiarne la stabilità in un ambiente proteolitico e relazionare la struttura tridimensionale assunta in soluzione all'attività antimicrobica.

La sintesi viene effettuata in fase solida utilizzando in un caso tutti amminoacidi proteinogenici in configurazione L e nell'altro tutti amminoacidi non proteinogenici in configurazione D. Nello specifico vengono sintetizzate le sequenze di:

- BMAP-27 dal residuo 1 al 18, utilizzando tutti amminoacidi in configurazione L.
- BMAP-27 dal residuo 1 al 18, utilizzando tutti amminoacidi in configurazione D.
- PMAP-36 dal residuo 12 al 24, utilizzando tutti amminoacidi in configurazione L.
- PMAP-36 dal residuo 12 al 24, utilizzando tutti amminoacidi in configurazione D.

Gli analoghi peptidici sintetizzati vengono purificati con cromatografia *flash* e caratterizzati con HPLC-UV e HPLC-MS.

Un limite nell'utilizzo di peptidi antimicrobici naturali come agenti antibiotici è la loro instabilità in ambienti proteolitici fisiologici. In questa tesi, attraverso prove di degradazioni enzimatiche con Tripsina, si confronta la resistenza degli analoghi con amminoacidi L a quella degli analoghi con amminoacidi D.

BMAP-27 e PMAP-36 sono peptidi antimicrobici appartenenti alla classe delle catelicidine. È noto che i peptidi appartenenti a questa classe possiedono una carica netta positiva e in soluzione assumono conformazioni elicoidali anfipatiche. L'attività antibiotica ad ampio spettro delle catelicidine è imputabile, proprio, a questa capacità di formare strutture secondarie elicoidali, consentendo ai peptidi di instaurare interazioni elettrostatiche con le membrane batteriche cariche negativamente.

In questa tesi, utilizzando le tecniche CD e NMR, si studia la conformazione in soluzione degli analoghi sintetizzati per valutare se l'accorciamento della sequenza

e l'utilizzo di amminoacidi in configurazione D permetta ai peptidi di organizzarsi in strutture secondarie elicoidali.

La struttura dei peptidi viene relazionata all'attività antibiotica. La capacità dei peptidi di interagire e distruggere le membrane batteriche viene valutata attraverso un *test* preliminare chiamato *leakage* a cui segue un'analisi biologica di attività antibiotica *in vitro*, condotta dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Scocchi dell'Università di Trieste.

In secondo luogo, si lega il peptide PMAP-36(12-24), con amminoacidi in configurazione L, ad una matrice di cellulosa (cotone) al fine di valutarne l'impiego per lo sviluppo di tessuti antimicrobici biocompatibili. Vengono indagati due tipi di legami tra peptide e cotone: il legame tiazolidinico, tra un'aldeide e una cisteina, e il legame ossima, tra un'aldeide e un acido aminossiacetico. Quindi si legano i residui cisteina e acido aminossiacetico all'estremità N-terminale del peptide e si utilizza cotone ossidato con un ciclo enzimatico TEMPO/laccasi, che quindi presenta un gruppo aldeidico nel carbonio C6. Le reazioni sono interessanti pensando ad applicazioni ecocompatibili, in quanto possono essere condotte in soluzione acquosa a temperatura ambiente e condizioni blandamente acide.

3. Risultati e Discussione

3.1 BMAP-27(1-18) e PMAP-36(12-24)

In questo elaborato di tesi vengono sintetizzati analoghi dei peptidi antimicrobici naturali BMAP-27 e PMAP-36. In particolare, si accorcia la sequenza amminoacidica concentrandosi sulle regioni 1-18 e 12-24 che costituiscono la porzione più attiva rispettivamente di BMAP-27 e di PMAP-36. La scelta di accorciare la sequenza viene dettata dall'interesse di individuare peptidi che mantengano la loro struttura elicoidale e la loro attività, pur riducendo il numero di amminoacidi rendendo così la sintesi stessa più semplice e conveniente.

La sequenza di BMAP-27 viene sintetizzata dall'amminoacido 1 al 18 (Figura 3.1), ovvero la parte del peptide che, da letteratura, assume una conformazione ad elica anfipatica. Si ritiene che escludendo la parte C-terminale apolare e non strutturata la selettività del peptide verso le membrane cellulari procariote aumenti. Il peptide viene ottenuto come ammidato all'estremità C-terminale. Viene riportato in letteratura che l'ammidazione di queste catelicidine non influenza l'attività antimicrobica, e le forme ammidate presentano un'attività del tutto paragonabile a quella delle forme con il C-terminale libero [14]. L'estremità N-terminale viene acetilata.

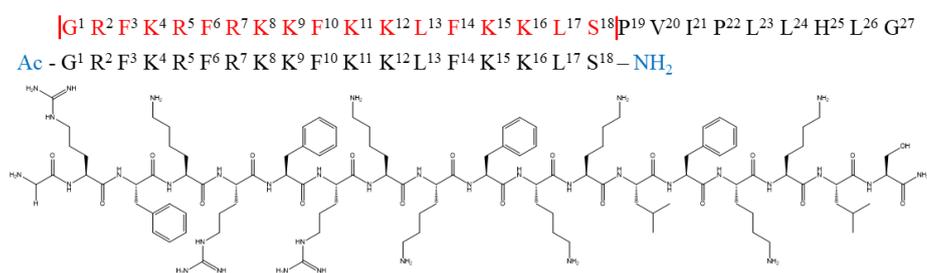


Figura 3.1. Sequenza di BMAP-27 e di BMAP-27(1-18).

La sequenza di PMAP-36 viene sintetizzata dall'amminoacido 12 al 24 (Figura 3.2), ovvero la parte di peptide che da studi di relazione struttura-attività ha mostrato le migliori proprietà in termini di alta attività battericida e bassa citotossicità [21]. Anche in questo caso il peptide viene ottenuto come ammidato all'estremità C-terminale, mentre all'estremità N-terminale si lega in un caso il gruppo acetile, in un altro una cisteina e in un terzo caso un acido aminossiacetico, ottenendo così

tre differenti analoghi. L'analogo acetilato viene utilizzato per studi strutturali e di stabilità, mentre gli altri due vengono utilizzati per la preparazione di tessuti antimicrobici tramite la funzionalizzazione del cotone. In particolare, Cys e Aox fungono da "bracci" utili a formare un legame chemoselettivo e specifico con una matrice di cellulosa (cotone).

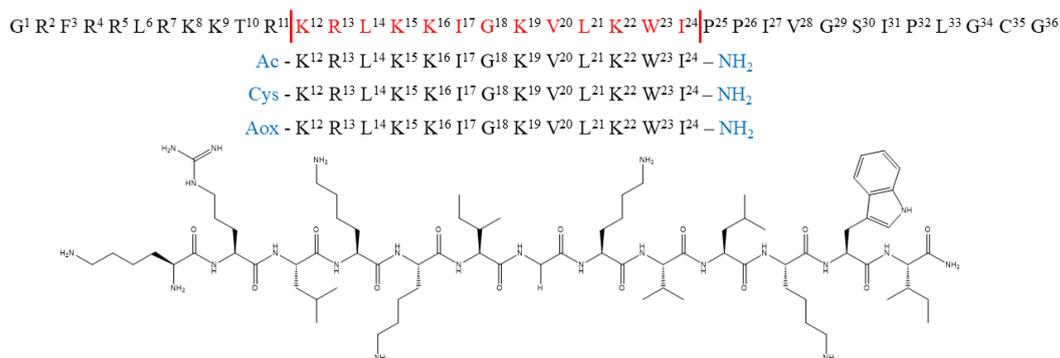


Figura 3.2. Sequenza di PMAP-36 e sequenze accorciate di PMAP-36(12-24) modificate all'estremità N- e C-terminale.

Sia l'Ac-BMAP(1-18) che l'Ac-PMAP(12-24) vengono sintetizzati utilizzando una volta tutti L-AA (aminoacidi proteinogenici) e poi tutti D-AA (aminoacidi non proteinogenici), ottenendo così due serie di peptidi mutuamente enantiomerici. La struttura, l'attività antibiotica e la stabilità delle due coppie di peptidi vengono quindi studiate e discusse. In Tabella 3.1 si riportano nomi, sequenze e dati dei peptidi sintetizzati.

Tabella 3.1. Nome, sequenza, carica e peso molecolare dei peptidi sintetizzati.

NOME	SEQUENZA	CARICA	MW (g/mol)
<i>all-L</i> -Ac-BMAP(1-18)	Ac-GRFKRFRKFKKLFKKLS-NH ₂	+11	2384.0
<i>all-D</i> -Ac-BMAP(1-18)	Ac-grfkrfrkkfkklfkklsl-NH ₂	+11	2384.0
<i>all-L</i> -Ac-PMAP(12-24)	Ac-KRLKKIGKVLKWI- NH ₂	+7	1651.2
<i>all-D</i> -Ac-PMAP(12-24)	Ac-krllkigkvlkwi- NH ₂	+7	1651.2
<i>all-L</i> -Cys-PMAP(12-24)	Cys-KRLKKIGKVLKWI- NH ₂	+7	1713.3
<i>all-L</i> -Aox-PMAP(12-24)	Aox-KRLKKIGKVLKWI- NH ₂	+7	1682.2

3.2 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi

Tutti i peptidi descritti nella precedente sezione vengono sintetizzati con la tecnica SPPS utilizzando la strategia Fmoc/tBu. La sintesi procede dall'estremità C-terminale all'estremità N-terminale, utilizzando la resina Rink Amide AM come supporto solido. La scelta di accrescere la catena nel suddetto verso è dovuta alla minor possibilità di racemizzazione del peptide durante la sintesi [32]. Inoltre, così facendo è possibile aggiungere amminoacidi attivati (in eccesso) alla catena peptidica e non amminoacidi alla catena peptidica attivata, ottenendo *rese di coupling* più elevate.

La sintesi inizia con lo *swelling* della resina, che consiste nel rigonfiamento del supporto con il solvente al fine di rendere i siti attivi più accessibili ai reagenti; poi prosegue con la *deprotezione dal gruppo Fmoc* che protegge i siti attivi della resina e segue con il *coupling* del primo amminoacido. Da questo punto in poi la sintesi continua ripetendo *step* di *deprotezione dal gruppo Fmoc* e di *coupling*. Infine, terminato l'accrescimento della sequenza amminoacidica, se necessario si esegue un'acetilazione a cui segue lo *sblocco*, attraverso il quale si stacca il peptide dalla resina e contestualmente si rimuovono i gruppi protettori alle catene laterali.

Terminata la sintesi, il prodotto viene analizzato tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) e, quando necessario, purificato con cromatografia *flash*. Infine, il peptide viene caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS.

3.2.1 *all-L-Ac-BMAP(1-18)*

Il peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, di cui si riporta la struttura in Figura 3.3, viene sintetizzato manualmente, purificato con cromatografia *flash* automatizzata e caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS. In Figura 3.4 viene riportato il cromatogramma e lo spettro di massa relativo al picco cromatografico, integrando i picchi cromatografici si calcola una purezza del 93.4%.

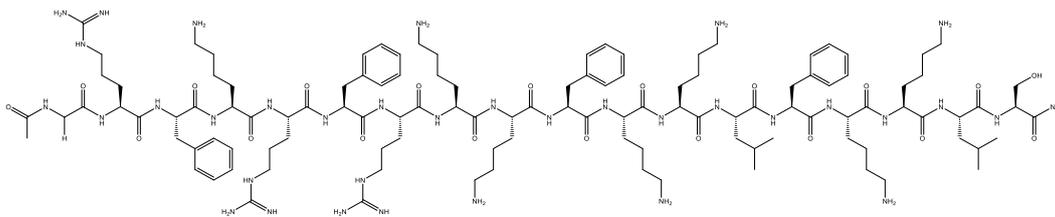


Figura 3.3. Struttura del peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)*.

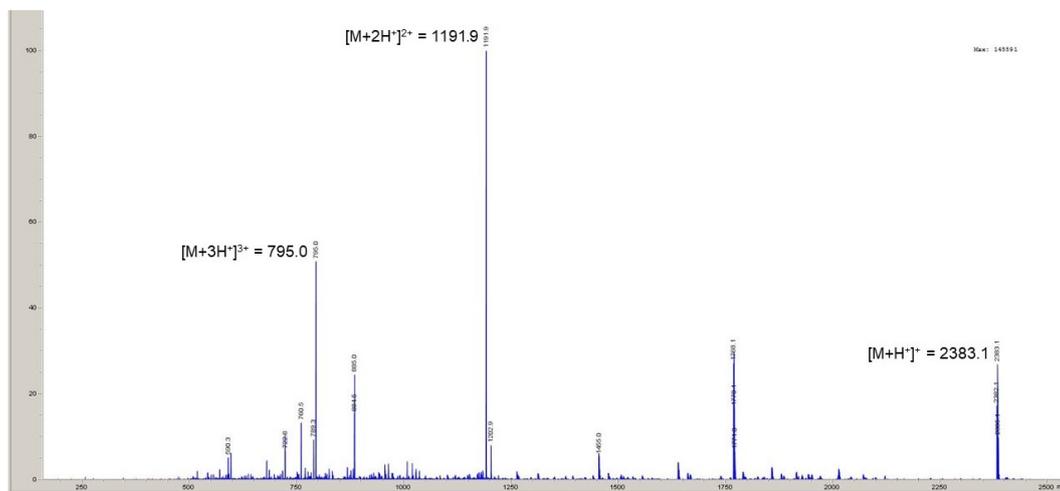
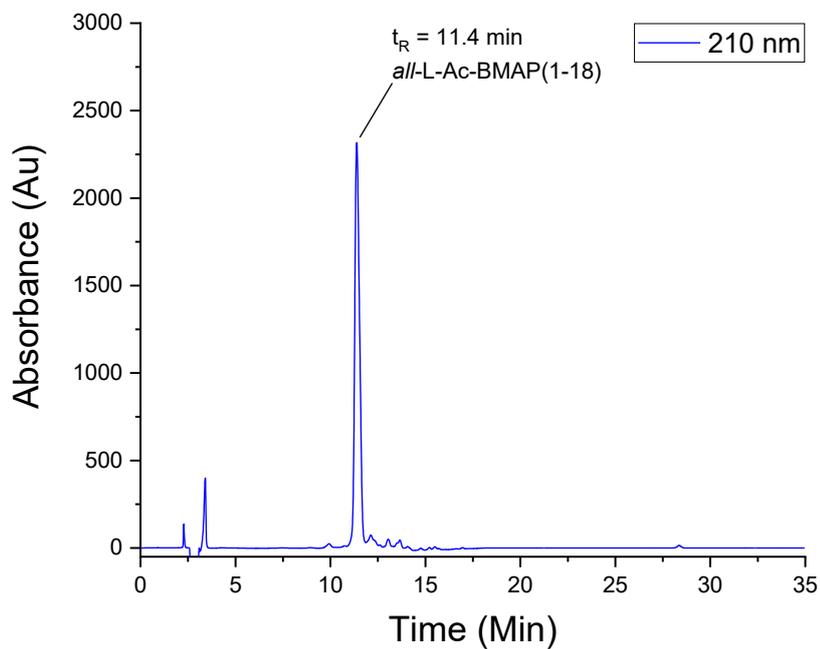


Figura 3.4. In alto il cromatogramma del peptide all L Ac-BMAP(1-18), in basso lo spettro di massa del picco cromatografico.

3.2.2 *all-D-Ac-BMAP(1-18)*

Il peptide *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, di cui si riporta la struttura in Figura 3.5, viene sintetizzato con il sintetizzatore automatico Biotage–Syro Wave, purificato con cromatografia *flash* automatizzata e caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS. In Figura 3.6 viene riportato il cromatogramma e lo spettro di massa relativo al picco cromatografico, integrando i picchi cromatografici si calcola una purezza del 96%.

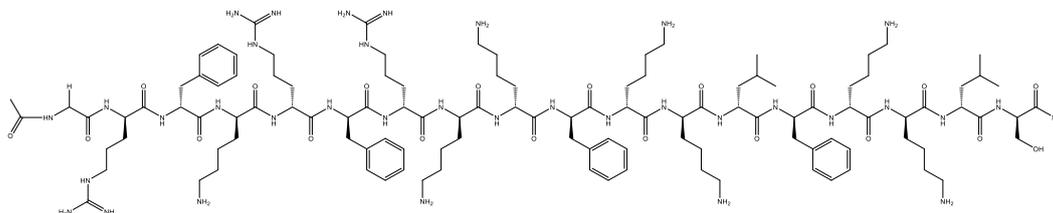
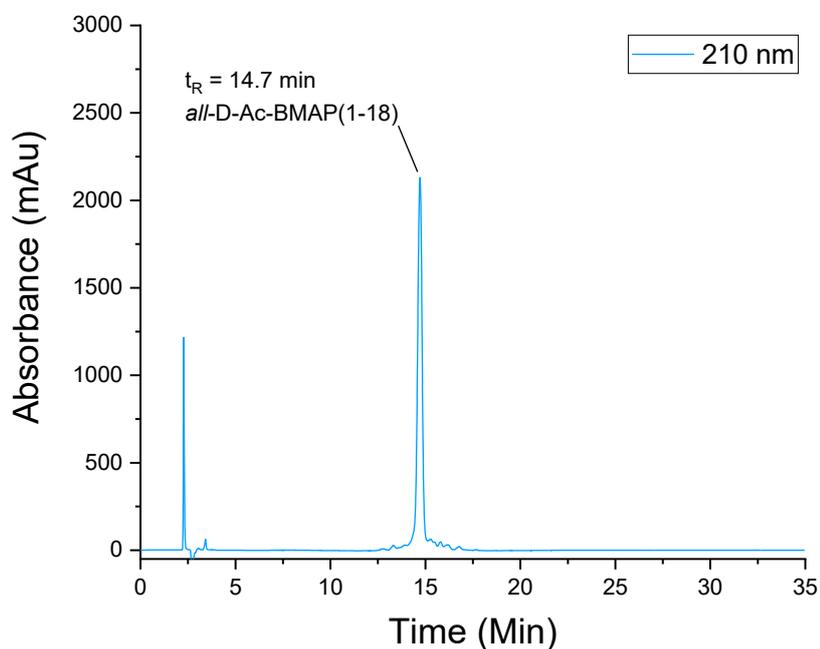


Figura 3.5. Struttura del peptide *all-D-Ac-BMAP(1-18)*.



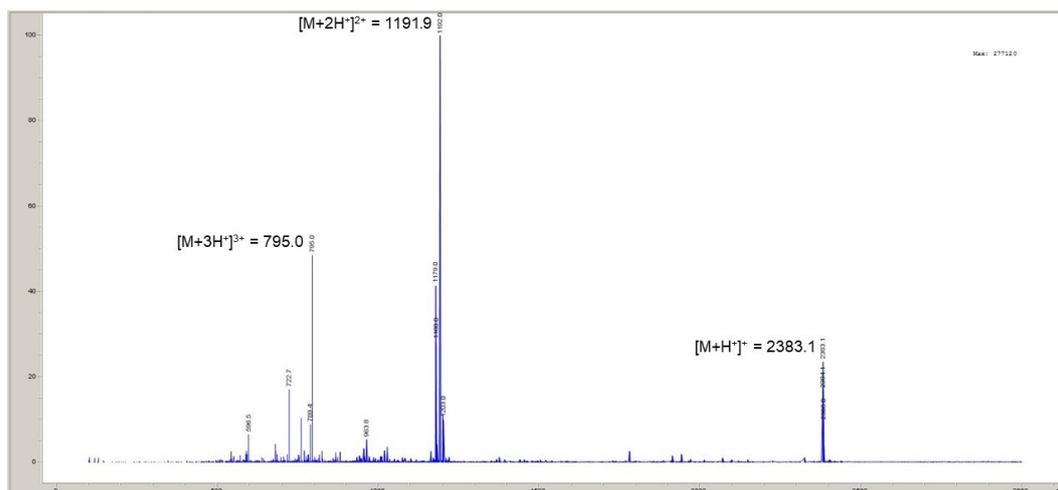


Figura 3.6. In alto il cromatogramma del peptide *all*-D-Ac-BMAP(1-18), in basso lo spettro di massa del picco cromatografico.

3.2.3 *all*-L-PMAP(12-24)

Il peptide *all*-L-PMAP(12-24) viene sintetizzato con il sintetizzatore automatico CS136 di CSBio C. Terminato l'accrescimento della sequenza amminoacidica la resina viene divisa in tre parti. Una parte viene acetilata manualmente, ottenendo il peptide *all*-L-Ac-PMAP(12-24), di cui in Figura 3.7 si riporta la struttura, che viene purificato con cromatografia *flash* automatizzata e caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS. In Figura 3.8 viene riportato il cromatogramma del prodotto e lo spettro di massa relativo al picco cromatografico, integrando i picchi cromatografici si calcola una purezza del 93.6%.

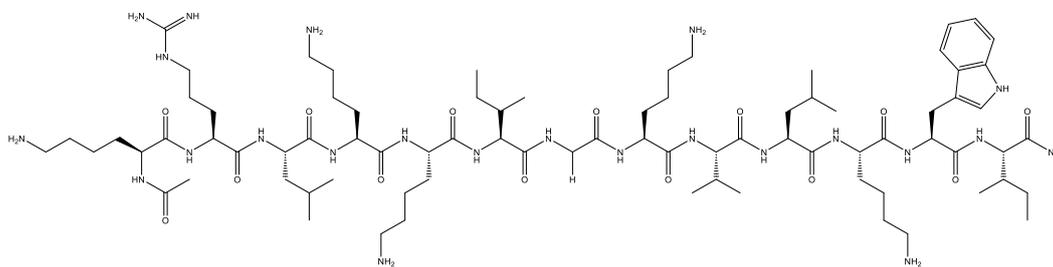


Figura 3.7. Struttura del peptide *all*-L-Ac-PMAP(12-24).

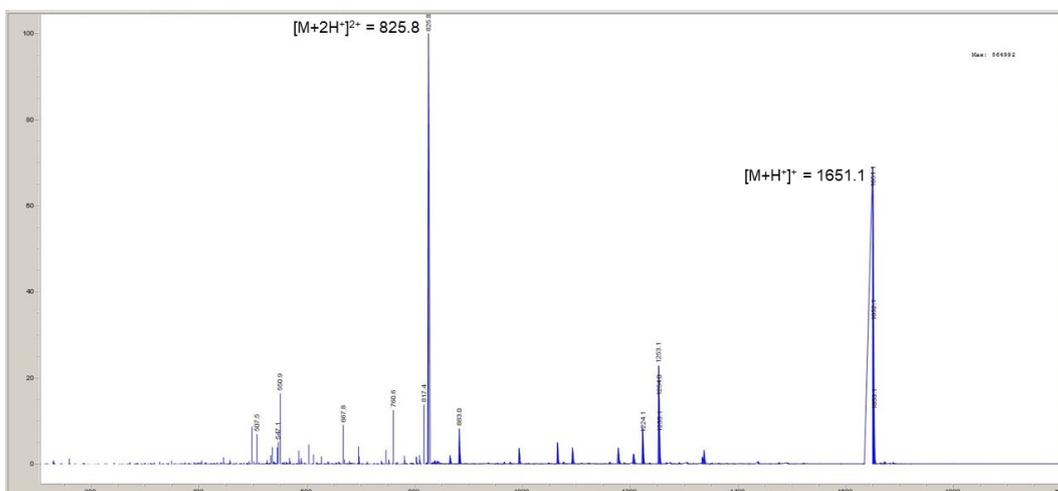
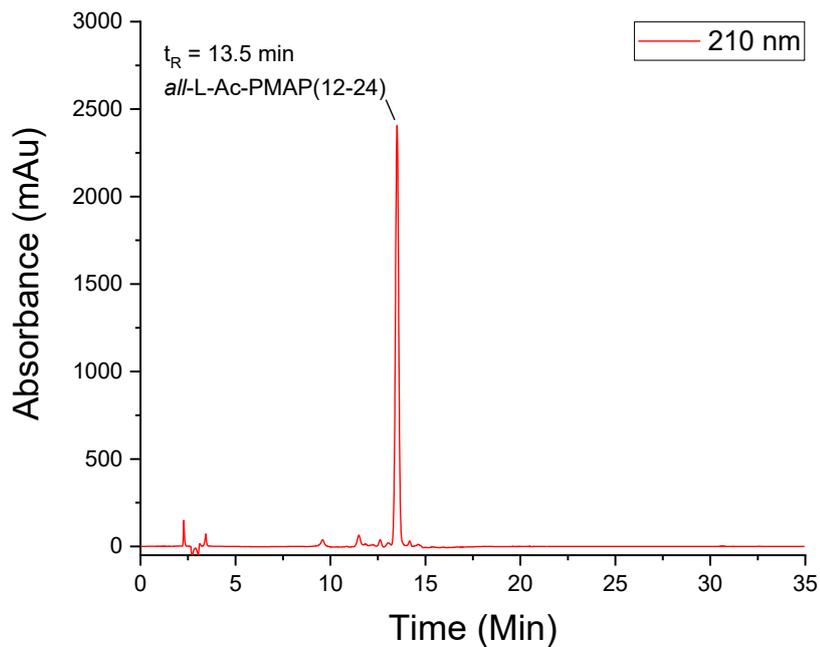


Figura 3.8. In alto il cromatogramma del peptide *all*-L-Ac-PMAP(12-24), in basso lo spettro di massa del picco cromatografico.

Alla seconda parte di resina viene legata manualmente una cisteina, ottenendo il peptide *all*-L-Cys-PMAP(12-24), di cui in Figura 3.9 si riporta la struttura. Lo *sblocco* dalla resina di questo peptide si esegue con una soluzione di TFA, TIS, H₂O e 2,2'-(Etilendiossi)dietantiolo (DODT), quest'ultimo previene la formazione di ponti disolfuro tra i residui di cisteina, quindi la dimerizzazione del peptide. Il prodotto viene purificato con cromatografia *flash* automatizzata e poi caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS, in Figura 3.10 viene riportato il cromatogramma.

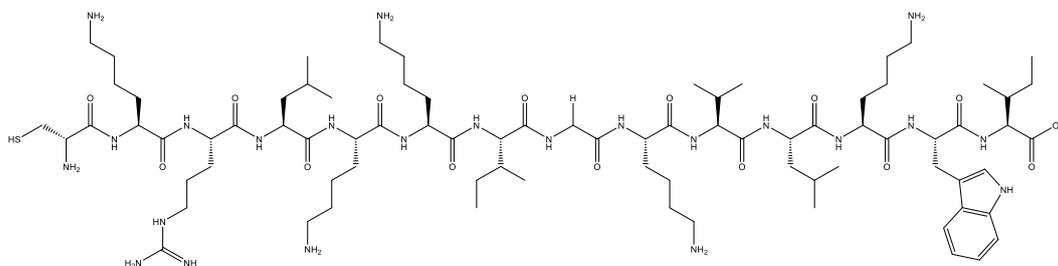


Figura 3.9. Struttura del peptide *all-L-Cys-PMAP(12-24)*.

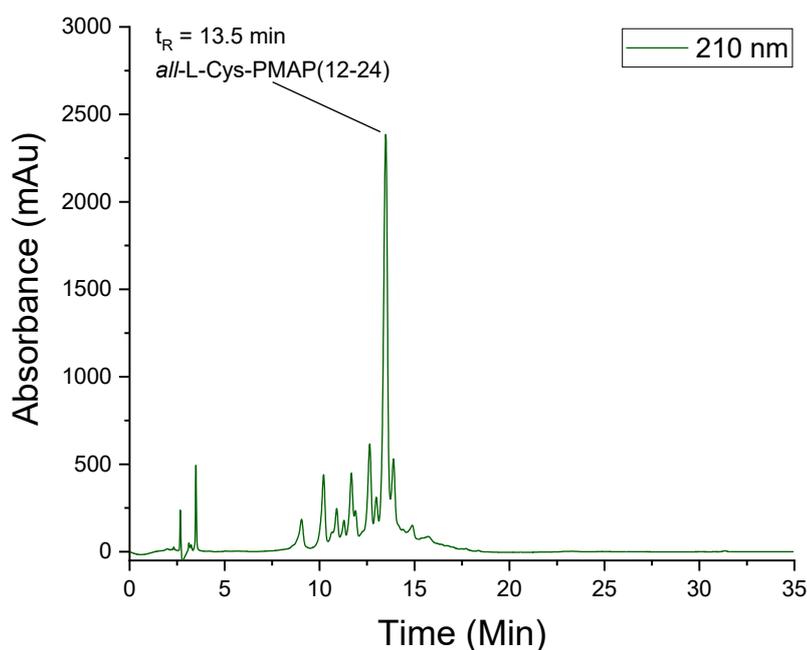


Figura 3.10. Cromatogramma del peptide *all-L-Cys-PMAP(12-24)*.

Infine, all'ultima parte di resina viene legato un acido aminossiacetico, ottenendo il peptide *all-L-Aox-PMAP(12-24)*, di cui in Figura 3.11 si riporta la struttura. Durante la sintesi di questo peptide è necessario prestare attenzione ad evitare contaminazioni con acetone, in quanto il gruppo aminossi forma un addotto stabile con questi composti. Per lo stesso motivo alla soluzione utilizzata per lo *sblocco*, si aggiunge acido aminossi acetico in eccesso che agisce come *scavenger* per possibili tracce di acetone. Il peptide viene purificato con cromatografia *flash* automatizzata e poi caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS, in Figura 3.12 viene riportato il cromatogramma.

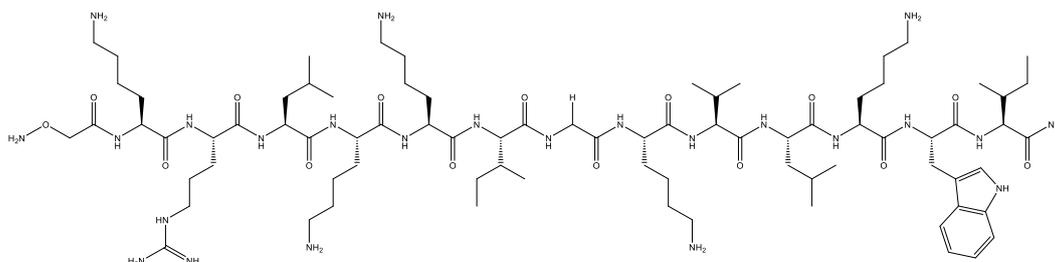


Figura 3.11. Struttura del peptide *all-L-Aox-PMAP(12-24)*.

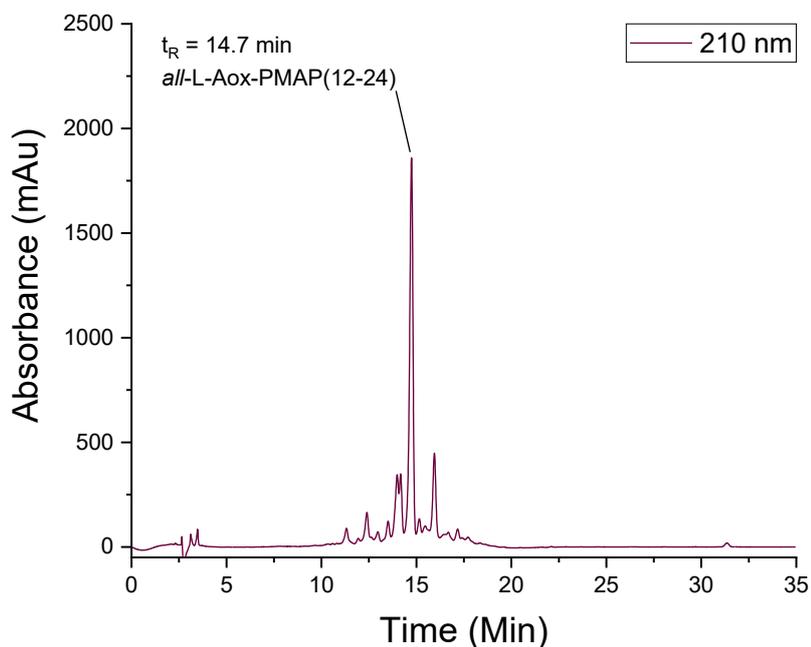


Figura 3.12. Cromatogramma del peptide *all-L-Aox-PMAP(12-24)*.

3.2.4 *all-D-Ac-PMAP(12-24)*

Il peptide *all-D-Ac-PMAP(12-24)*, di cui si riporta la struttura in Figura 3.13, viene sintetizzato con il sintetizzatore automatico Biotage–Syro Wave, purificato con cromatografia *flash* automatizzata e caratterizzato con HPLC-UV e HPLC-MS. In Figura 3.14 viene riportato il cromatogramma e lo spettro di massa relativo al picco cromatografico, integrando i picchi cromatografici si calcola una purezza del 98.6%.

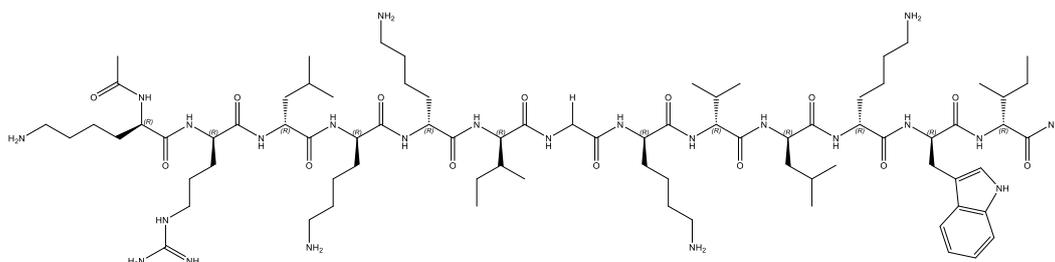


Figura 3.13. Struttura del peptide *all-D-Aox-PMAP(12-24)*.

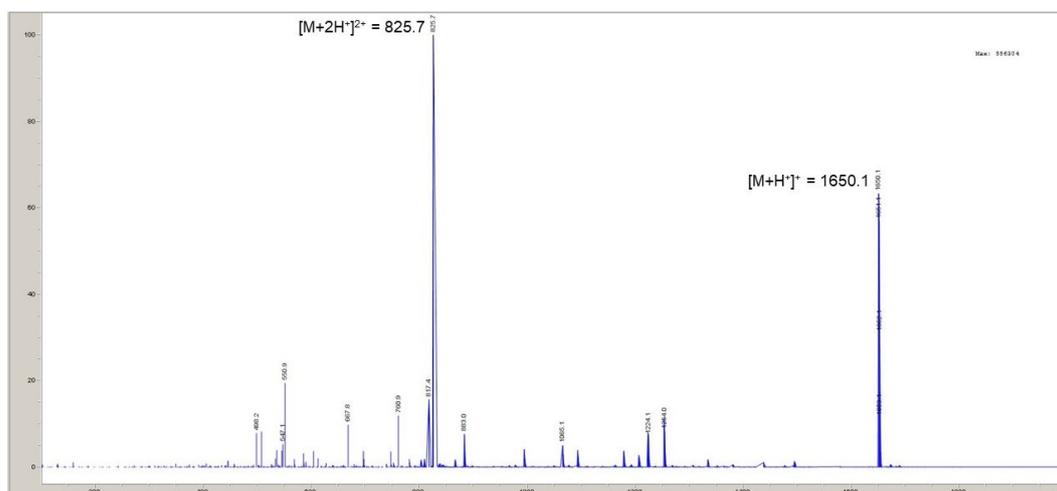
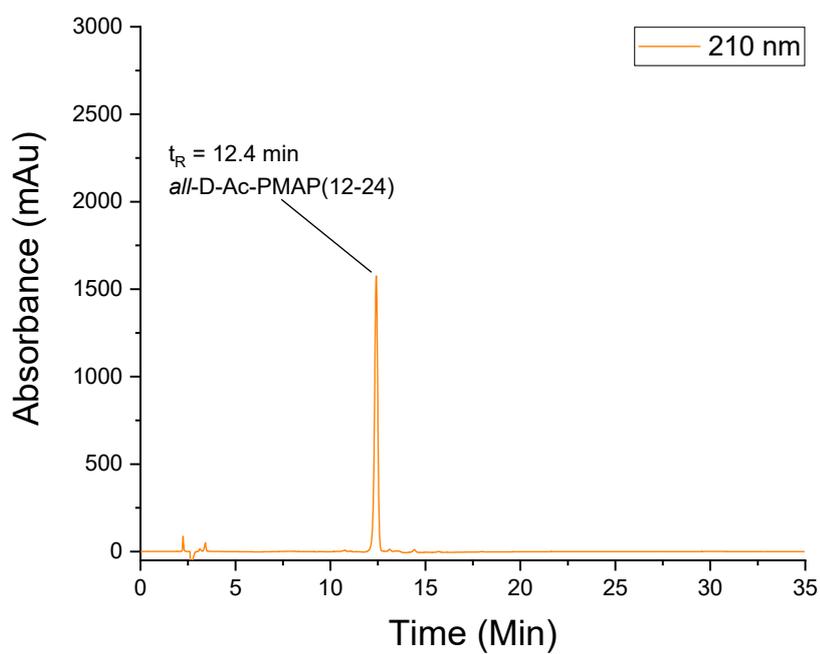


Figura 3.14. In alto il cromatogramma del peptide *all-D-Ac-PMAP(12-24)*, in basso lo spettro di massa del picco cromatografico.

La sintesi del peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)* non ha richiesto l'utilizzo di *doppi coupling*, in quanto la sintesi, svolta manualmente, ha consentito un maggior controllo dei *coupling* tramite *Kaiser Test*. Al contrario per le sintesi dei restanti peptidi, svolte in automatico, si è preferito ricorrere a *doppi coupling* in corrispondenza degli amminoacidi stericamente ingombrati come Arg, triptofano (Trp, W) o fenilalanina (Phe, F). A maggior ragione se questi residui si trovano nella parte finale della sequenza amminoacidica dove l'ingombro sterico con la catena peptidica è maggiore. In questo modo dopo la purificazione si sono ottenuti prodotti con resa compresa tra il 6 e il 7%. La purificazione è stata particolarmente efficace per i peptidi acetilati ottenendo purezze intorno al 95%.

3.3 Degradazioni enzimatiche

Uno dei limiti per l'utilizzo di AMPs come potenziali farmaci è la loro instabilità a contatto con enzimi proteolitici. In questa tesi sono stati sintetizzati i peptidi *Ac-PMAP(12-24)* e *Ac-BMAP(1-18)* con soli L-AA e con soli D-AA, al fine di confrontarne la stabilità attraverso prove biologiche di degradazione enzimatica con *Tripsina*. La *Tripsina* è un enzima proteolitico che catalizza l'idrolisi dei legami peptidici di lisina e arginina [53], due AA basici presenti in grandi quantità negli AMPs [9].

3.3.1 Degradazioni con *Tripsina*

I peptidi analizzati *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* vengono trattati con *Tripsina* in una soluzione tampone a pH 7.8 e termostata a 37°C. La reazione di degradazione viene monitorata nel tempo eseguendo prelievi dalla soluzione dopo 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 minuti, 6 e 24 ore dall'inizio dell'esperimento, che vengono analizzati con HPLC. Si correla l'intensità del picco cromatografico alla quantità di peptide presente in soluzione. Per verificare che la sola soluzione tampone non degradi o alteri i peptidi, si preparano delle soluzioni di riferimento con peptide e tampone di cui si eseguono prelievi dopo 0, 30 minuti e 24 ore.

Degradazione di BMAP(1-18)

I peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)* e *all-D-Ac-BMAP(1-18)* non vengono alterati dalla sola soluzione tampone; in Figura 3.15 si riportano i profili HPLC dei due riferimenti da cui si può osservare che l'intensità dei picchi a tempo di ritenzione 13.6 min, che rappresenta il segnale del peptide Ac-BMAP(1-18), rimane invariata, a meno di errori sperimentali effettuati durante i prelievi.

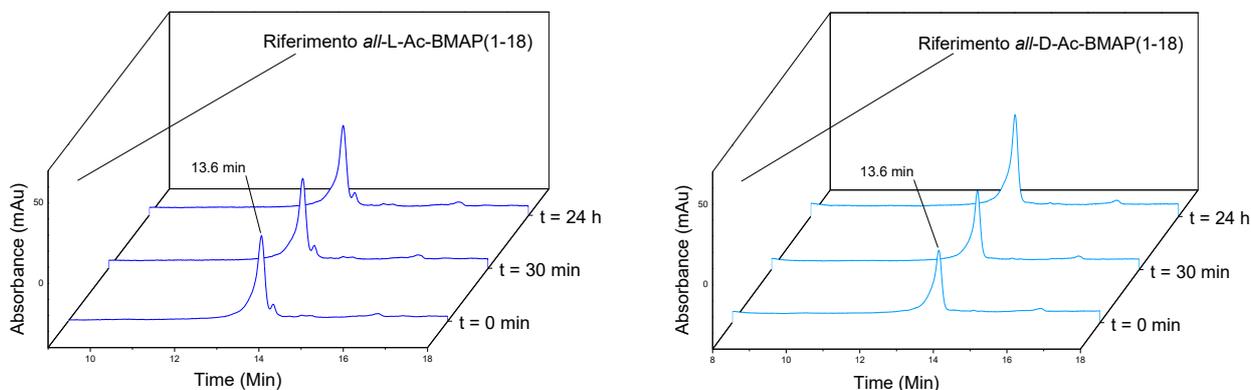


Figura 3.15. A sinistra i profili HPLC dei riferimenti di *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, a destra quelli di *all-D-Ac-BMAP(1-18)*.

Il peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)* viene completamente degradato dall'enzima Tripsina dopo 5 minuti dall'inizio della reazione. Dai profili HPLC, riportati in Figura 3.16 ed utilizzati per monitorare la reazione di degradazione, è possibile osservare che già a $t = 0$ l'intensità del picco a tempo di ritenzione 13.6 min possiede minor intensità rispetto al riferimento e a $t = 5$ min il picco non è più presente. La rapida degradazione del peptide è imputabile all'elevato numero di residui basici nella sequenza amminoacidica; infatti, dieci AA su diciotto sono residui di Lys e Arg.

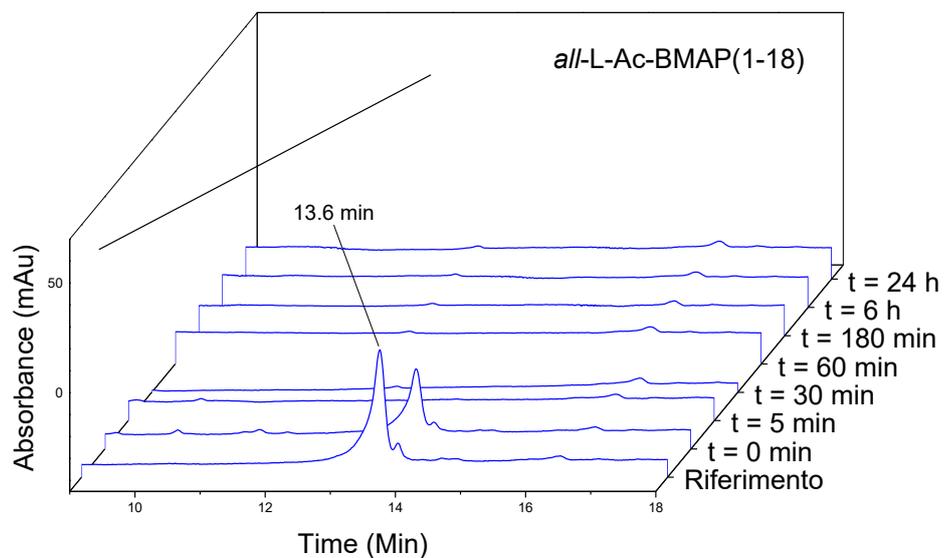


Figura 3.16. Profili HPLC della reazione di degradazione di *all-L-Ac-BMAP(1-18)*.

Il peptide *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, al contrario, non viene degradato dall'enzima durante il corso della reazione. Dai profili HPLC, riportati in Figura 3.17, è possibile osservare che l'intensità del picco a tempo di ritenzione 13.6 min rimane relativamente costante; le piccole variazioni in intensità dei picchi sono imputabili ad errori sperimentali effettuati durante i prelievi. La configurazione D degli AA che costituiscono il campione, impedisce la degradazione del peptide ad opera dell'enzima Tripsina.

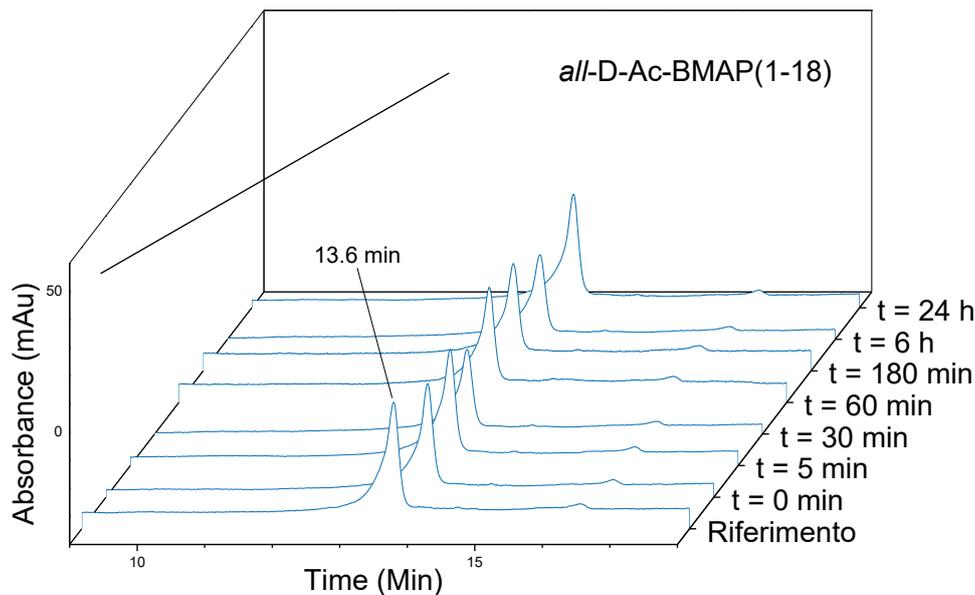


Figura 3.17. Profili HPLC della reazione di degradazione di *all*-D-Ac-BMAP(1-18).

Degradazioni PMAP(12-24)

I peptidi *all*-L-Ac-PMAP(12-24) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24) non vengono alterati dalla sola soluzione tampone; in Figura 3.18 si riportano i profili HPLC dei due riferimenti da cui si può osservare che l'intensità dei picchi a tempo di ritenzione 13.1 min, che rappresenta il segnale del peptide Ac-PMAP(12-24), rimane invariata, a meno di errori sperimentali effettuati durante i prelievi.

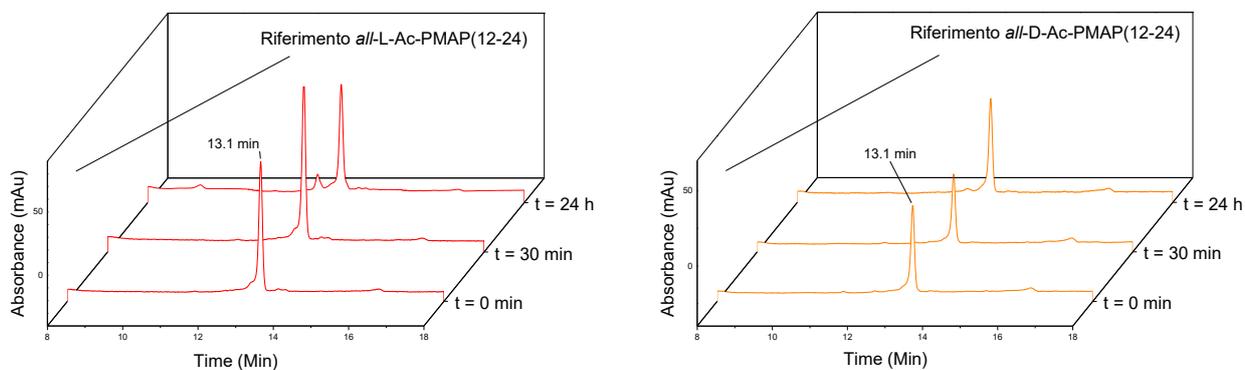


Figura 3.18. A sinistra i profili HPLC dei riferimenti di *all*-L-Ac-PMAP(12-24), a destra quelli di *all*-D-Ac-PMAP(12-24).

Il peptide *all-L-Ac-PMAP(12-24)* viene completamente degradato dall'enzima Tripsina dopo 30 minuti dall'inizio della reazione. In Figura 3.19 si riportano i profili HPLC da cui si può osservare come il picco a tempo di ritenzione 13.1 min tra $t = 0$ e $t = 15$ min diminuisca gradualmente la propria intensità, mentre a $t = 30$ min non è più presente. Al contempo compaiono dei segnali ai tempi di ritenzione 12.5 min e 9.4 min, che corrispondono ai prodotti di degradazione del peptide.

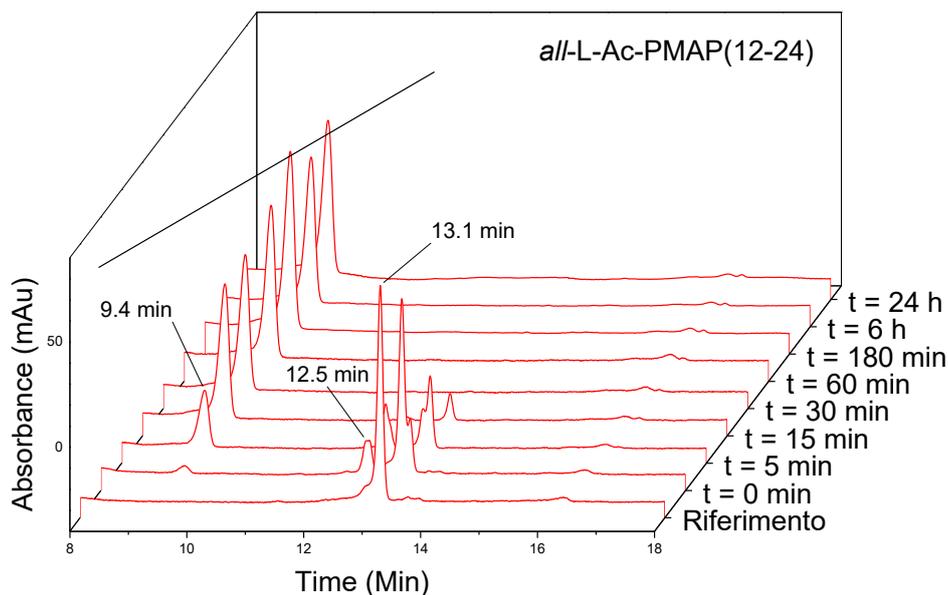


Figura 3.19. Profili HPLC della reazione di degradazione di *all L Ac-PMAP(12-24)*.

Dalla Figura 3.20 in cui sono riportati i profili cromatografici della reazione di degradazione di *all-L-Ac-PMAP(12-24)* a $t = 0, 5, 15$ e 30 min, è possibile osservare come il segnale a tempo di ritenzione 12.5 min inizialmente aumenti di intensità per poi calare a $t = 15$ min, in favore del segnale a tempo di ritenzione 9.4 min, che a $t = 30$ min raggiunge intensità massima. Questi picchi cromatografici corrispondono a prodotti di degradazione con dimensioni più piccole rispetto al peptide, che di conseguenza vengono trattenuti meno dalla colonna cromatografica ed escono a tempi di ritenzione inferiori. Anche in questo caso, l'instabilità del peptide in presenza dell'enzima Tripsina è dovuta all'elevato numero di residui basici nella sequenza amminoacidica; infatti, sei AA su tredici sono residui di Lys e Arg.

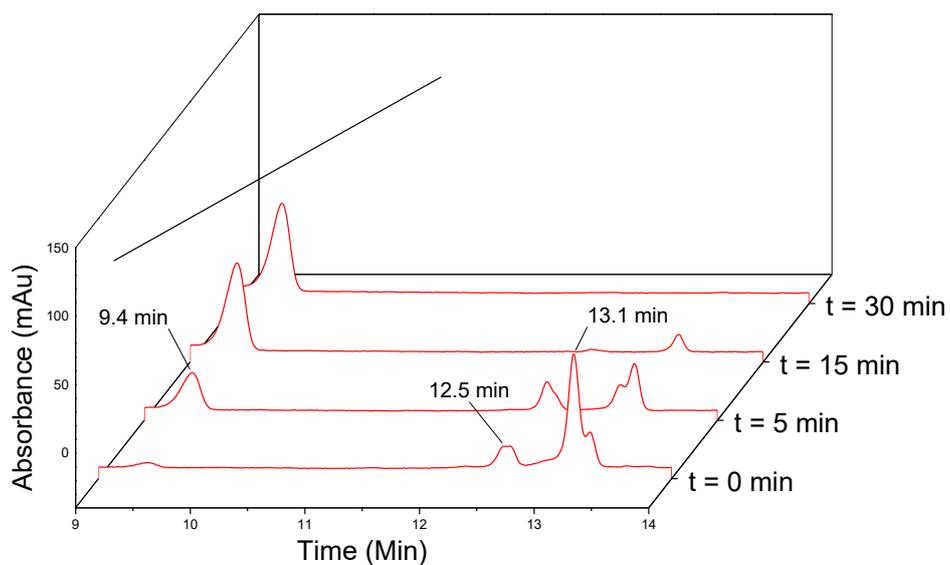


Figura 3.20. Profili HPLC a $t = 0, 5, 15$ e 30 min della reazione di degradazione di *all*-L-Ac-PMAP(12-24).

In Figura 3.21 sono riportati i profili cromatografici della reazione di degradazione del peptide *all*-D-Ac-PMAP(12-24). Dalla figura è possibile notare come anche in questo caso il peptide contenente AA in configurazione D non venga degradato dall'enzima Tripsina; infatti, l'intensità del picco a tempo di ritenzione 13.1 min rimane relativamente costante, a meno di errori sperimentali, durante il corso della reazione.

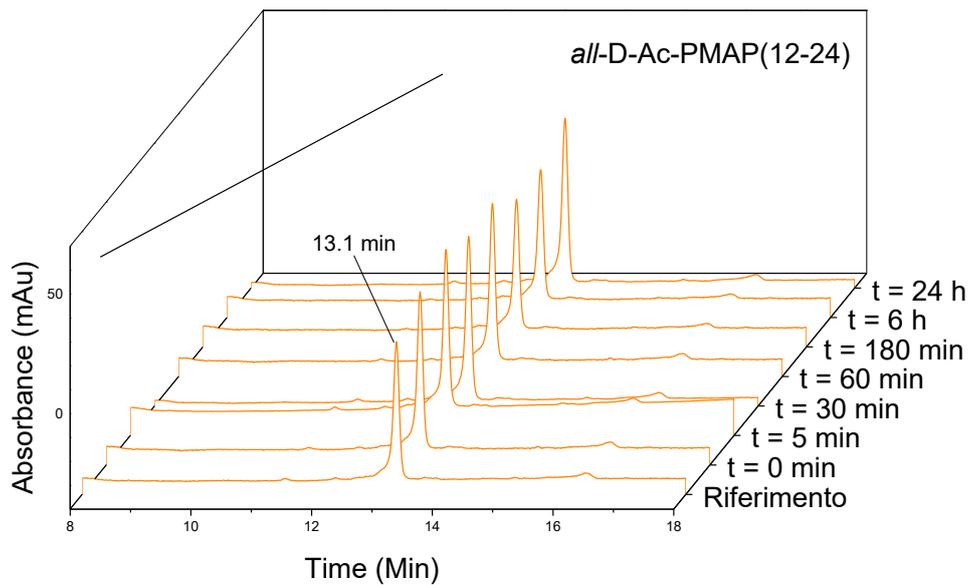


Figura 3.21. Profili HPLC della reazione di degradazione di *all-D-Ac-PMAP(12-24)*.

In Figura 3.22 si riassume graficamente l'effetto che l'enzima proteolitico Tripsina provoca nei peptidi L e nei loro enantiomeri D.

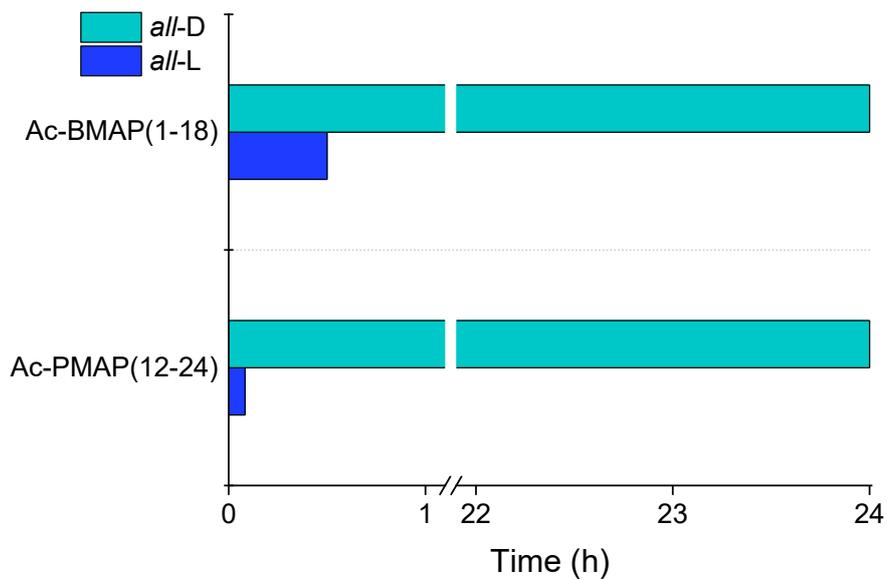


Figura 3.22. Resistenza dei peptidi Ac-BMAP(1-18) e Ac-PMAP(12-24) alla degradazione con Tripsina.

In conclusione, questo esperimento ha dimostrato come la sintesi dei peptidi BMAP(1-18) e PMAP(12-24) con D-AA abbia portato a prodotti stabili nei confronti dell'enzima proteolitico Tripsina. Perciò questa strategia potrebbe essere utilizzata con successo per superare uno dei principali limiti dell'uso di AMPs come potenziali agenti antibiotici per lo sviluppo di nuovi farmaci, ovvero l'instabilità in ambienti proteolitici [23].

Per ottenere un profilo più dettagliato della stabilità dei peptidi, questo studio effettuato con Tripsina andrebbe esteso ad altri enzimi. In particolare, uno studio in siero sarebbe più significativo. Il siero meglio riprodurrebbe le condizioni fisiologiche in cui si troverebbero i peptidi qualora venissero utilizzati come agenti antibiotici.

3.4 Dicroismo Circolare

La struttura secondaria dei peptidi in soluzione viene studiata attraverso misure di dicroismo circolare (CD), in tre diversi solventi: 2,2,2-trifluoroetano (TFE), soluzione tampone di fosfato di potassio (PBS 0.2 mM, pH = 7) e soluzione di sodio dodecil solfato (SDS 100 mM). Il CD è una tecnica spettroscopica, che consente di indagare le transizioni elettroniche $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del legame peptidico (cromoforo) nella regione spettrale 190 – 270 nm. Queste transizioni non sono otticamente attive, ma in presenza di centri chirali vicini al cromoforo (come il C_α degli amminoacidi) e di strutture secondarie asimmetriche assunte dalla molecola (α -elica, β -foglietto, ...) diventano otticamente attive [54]. Le misure vengono condotte su soluzioni $2 \cdot 10^{-4}$ M dei peptidi *all*-L-Ac-BMAP(1-18), *all*-D-Ac-BMAP(1-18), *all*-L-Ac-PMAP(12-24) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24), a 25°C nella regione del vicino UV tra 190 e 270 nm.

In Figura 3.23 si riportano gli spettri dei campioni in TFE, questo solvente possiede la proprietà di indurre la formazione di eliche e stabilizzarle, attraverso il rafforzamento dei legami idrogeno intermolecolari [55]. Gli spettri dei peptidi *all*-L-Ac-BMAP(1-18) e *all*-L-Ac-PMAP(12-24) presentano due massimi negativi a 222 nm e 206-208 nm e un massimo positivo a 192 nm, questi segnali sono caratteristici di una conformazione ad α -elica o elica 3_{10} . Il massimo a 222 nm è dovuto alla transizione $n \rightarrow \pi^*$, mentre quelli a 206-208 e 192 nm alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ [54, 56]. Gli spettri dei peptidi *all*-D-Ac-BMAP(1-18) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24) presentano segnali speculari all'asse delle ascisse rispetto ad *all*-L-

Ac-BMAP(1-18) e *all*-L-Ac-PMAP(12-24); infatti, l'elica che normalmente è destrogira, con D-AA assume la forma levogira, quindi speculare [57].

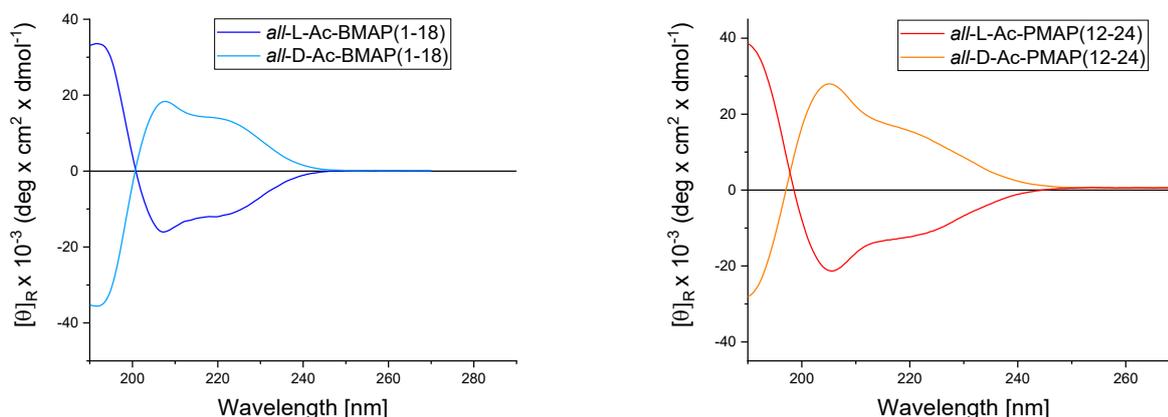


Figura 3.23. A sinistra spettri CD in TFE dei peptidi *all*-L-Ac-BMAP(1-18) (in blu) e *all*-D-Ac-BMAP(1-18) (in azzurro); a destra spettri CD in TFE dei peptidi *all*-L-Ac-PMAP(12-24) (in rosso) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24) (in arancione).

Valutando forma ed intensità delle bande dicroiche attraverso il parametro R (Equazione 3.1) è possibile determinare il tipo di struttura elicoidale assunta dal peptide nel solvente di misura. Il parametro R indica il rapporto tra le ellitticità molarie [9] a 222 nm e 208-206 nm in corrispondenza dei due massimi.

$$R = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{208-206}} \quad (3.1)$$

Quando R assume un valore compreso tra 0.4 e 0.5 prevale la conformazione ad elica 3_{10} e quando R è uguale o vicino ad 1 prevale l' α -elica, mentre valori intermedi indicano la compresenza delle due strutture elicoidali [58, 59].

In Tabella 3.2 vengono riportati i calcoli del parametro R per i diversi peptidi sciolti in TFE. I peptidi BMAP(1-18) presentano valori di R tipici della compresenza delle due strutture elicoidali: α -elica ed elica 3_{10} , mentre i peptidi PMAP(12-24) assumono prevalentemente la conformazione ad elica 3_{10} .

La preferenza a formare eliciche miste $\alpha/3_{10}$ è confermata, oltre che dal rapporto R, anche dalla posizione del massimo negativo che si sposta dal valore ideale di 208 a quello osservato intorno ai 204-206 nm.

Tabella 3.2. Calcoli dei parametri R per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* in TFE.

SOLVENTE:		TFE (Trifluoroetanolo)	
PEPTIDE	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 222 nm deg · cm ² · d mol ⁻¹	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 208 nm deg · cm ² · d mol ⁻¹	R ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)
<i>all-L-Ac-BMAP(1-18)</i>	-11.5	-16.0	0.72
<i>all-D-Ac-BMAP(1-18)</i>	13.9	18.3	0.76
PEPTIDE	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 222 nm deg · cm ² · d mol ⁻¹	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 206 nm deg · cm ² · d mol ⁻¹	R ($[\theta]_{222}/[\theta]_{206}$)
<i>all-L-Ac-PMAP(12-24)</i>	-11.7	-21.3	0.55
<i>all-D-Ac-PMAP(12-24)</i>	14.5	27.9	0.52

In Figura 3.24 si riportano gli spettri dei campioni in PBS, da cui si può notare un intenso massimo negativo vicino ai 200 nm (positivo per i peptidi *all-D*) caratteristico di una struttura secondaria disordinata [54, 56]. Si può concludere che in soluzione acquosa i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* assumano una conformazione *random coil*.

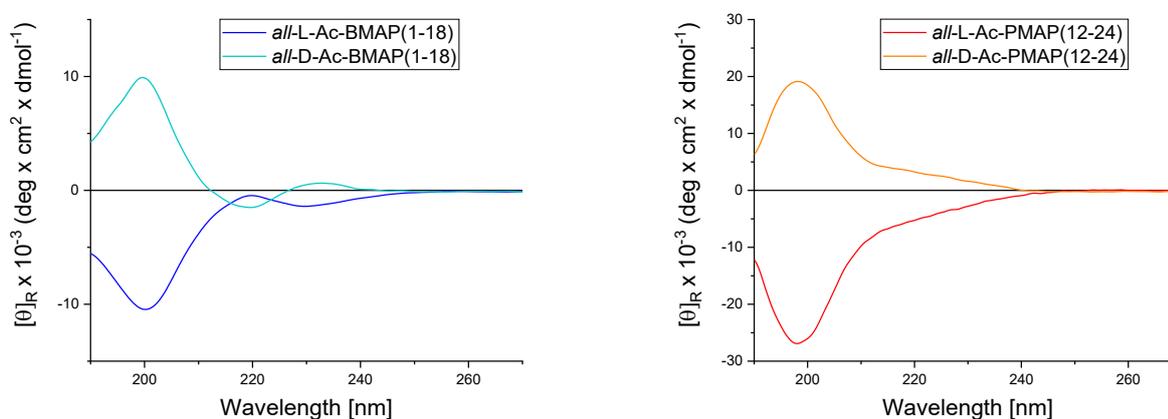


Figura 3.24. A sinistra spettri CD in PBS dei peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)* (in blu) e *all-D-Ac-BMAP(1-18)* (in azzurro); a destra spettri CD in PBS dei peptidi *all-L-Ac-PMAP(12-24)* (in rosso) e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* (in arancione).

In Figura 3.25 si riportano gli spettri dei campioni in soluzione di SDS 100 mM. SDS è un tensioattivo e al di sopra della concentrazione micellare critica (circa 8

mM) forma delle micelle, che mimano le membrane cellulari [60]. Un'analisi del comportamento dei peptidi in questa soluzione fornisce una rappresentazione della conformazione assunta dai peptidi durante l'interazione con le membrane dei batteri. Negli spettri di *all*-L-Ac-BMAP(1-18), *all*-D-Ac-BMAP(1-18), *all*-L-Ac-PMAP(12-24) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24) si possono osservare gli stessi massimi ottenuti per i campioni sciolti in TFE, vale a dire due massimi negativi a 222 e 206-208 nm e un massimo positivo a 190 nm (speculari per i peptidi con D-AA), tipici di una conformazione elicoidale.

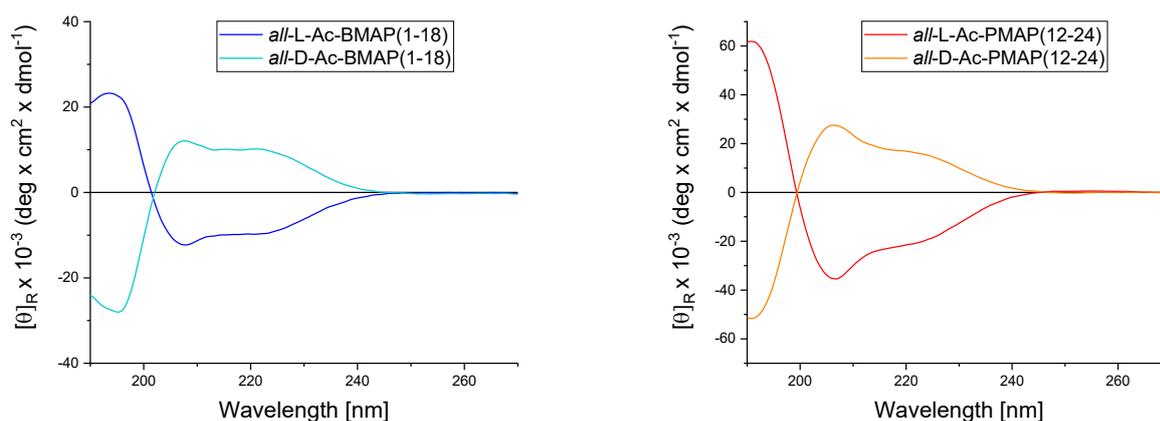


Figura 3.25. A sinistra spettri CD in SDS dei peptidi *all*-L-Ac-BMAP(1-18) (in blu) e *all*-D-Ac-BMAP(1-18) (in azzurro); a destra spettri CD in SDS dei peptidi *all*-L-Ac-PMAP(12-24) (in rosso) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24) (in arancione).

In Tabella 3.3 vengono riportati i calcoli del parametro R per i diversi peptidi sciolti in SDS. Anche in questo solvente i peptidi BMAP(1-18) presentano valori di R tipici della compresenza delle due strutture elicoidali, mentre i peptidi PMAP(12-24) assumono prevalentemente la conformazione ad elica 3_{10} , confermata dallo spostamento del massimo a 206 nm.

Tabella 3.3. Calcoli dei parametri R per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D Ac-PMAP(12-24)* in SDS.

SOLVENTE:	SDS (Sodio dodecil solfato 100 mM)		
PEPTIDE	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 222 nm deg · cm ² · dmol ⁻¹	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 208 nm deg · cm ² · dmol ⁻¹	R ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)
<i>all-L-Ac-BMAP(1-18)</i>	-9.7	-12.3	0.78
<i>all-D-Ac-BMAP(1-18)</i>	10.1	12.1	0.83
PEPTIDE	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 222 nm deg · cm ² · dmol ⁻¹	$[\theta]_R \times 10^{-3}$ a 206 nm deg · cm ² · dmol ⁻¹	R ($[\theta]_{222}/[\theta]_{206}$)
<i>all-L-Ac-PMAP(12-24)</i>	-20.7	-35.4	0.58
<i>all-D-Ac-PMAP(12-24)</i>	16.2	27.5	0.59

Da questo studio strutturale si può concludere che i peptidi con AA di entrambe le configurazioni in ambiente membrano-mimetico assumono una conformazione elicoidale (destrogiro per peptidi all L e levogiro per peptidi all D) essenziale per il meccanismo con cui gli AMPs distruggono le membrane batteriche [9].

3.5 NMR

Le tecniche di spettrometria NMR consentono di ricavare utili informazioni sia per quanto riguarda la caratterizzazione di peptidi, per quello che concerne la conformazione assunta da un peptide in soluzione.

In questo lavoro di tesi sono state condotte misure NMR sui peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)* e *all-D-BMAP(1-18)*. Il peptide *all-L-Ac-PMAP(12-24)* era invece già stato caratterizzato in precedenza nel gruppo di ricerca dove si è svolta la tesi. Il peptide *all-D-PMAP(12-24)* rimane da caratterizzare. Gli spettri sono stati acquisiti utilizzando come solvente trifluoroetanolo, TFE-d₂: in questo modo si garantisce lo scambio protonico tra il gruppo -OH del TFE e i gruppi ammidici dei peptidi, evitando così la perdita dei segnali degli HN. Gli spettri sono stati ottenuti sciogliendo circa 1 mg di peptide in 0,5 mL di TFE-d₂ e acquisiti a 600 MHz alla temperatura di 308 K.

Per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)* e *all-D-Ac-BMAP(1-18)* sono stati condotti esperimenti mono- e bidimensionali per assegnare con precisione tutti gli

spostamenti chimici dei protoni e per determinare le preferenze conformazionali dei peptidi stessi. La zona degli spostamenti chimici degli NH per i due peptidi è riportata in Figura 3.26.

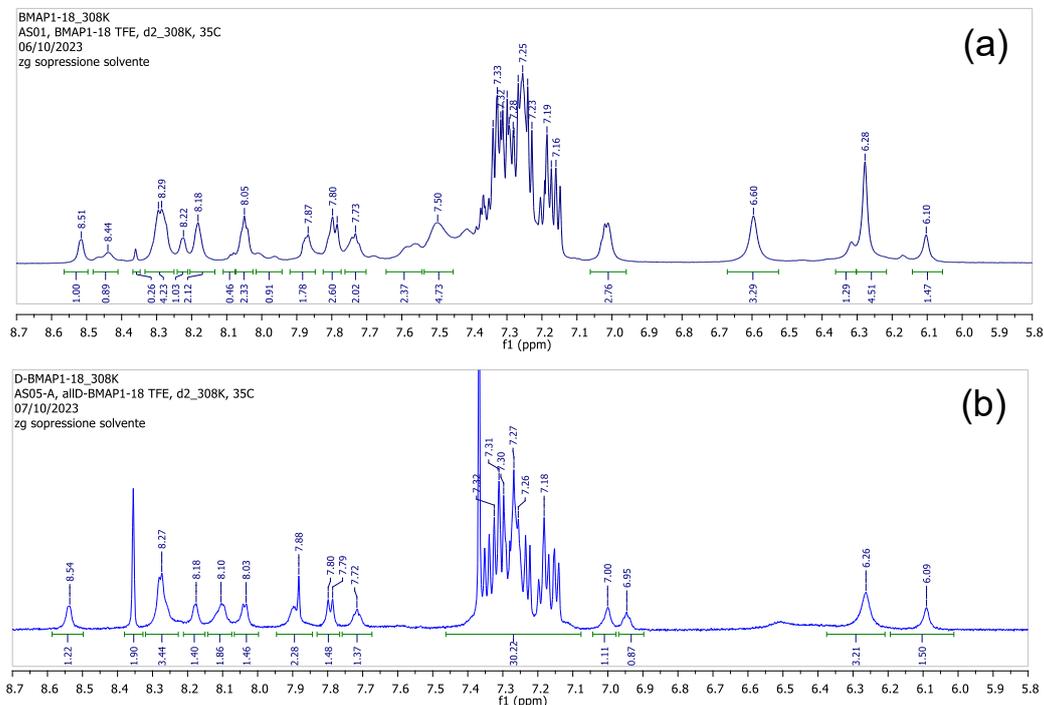


Figura 3.26. Zona NH degli spettri NMR monodimensionali dei peptidi: (a) *all*-L-Ac-BMAP(1-18) e (b) *all*-L-Ac-BMAP(1-18) (600 MHz, TFE-d₂, 308K).

Per i due peptidi sono stati registrati gli spettri bidimensionali TOCSY (*T*otal *C*orrelation *S*pectroscopy [61]) e NOESY (*N*OE *S*pectroscopy [62]), ma l'analisi completa è stata ottenuta solamente per il peptide *all*-L-Ac-BMAP(1-18). Gli spettri NMR del peptide *all*-D-Ac-BMAP(1-18) presentano molti segnali sovrapposti che ne hanno impedito la completa assegnazione.

Il TOCSY è una tecnica NMR bidimensionale utilizzata per correlare gli spostamenti chimici dei protoni che presentano accoppiamento J tra loro. Questi spettri vengono utilizzati per assegnare tutte le frequenze dei protoni. Attraverso gli spettri NOESY si va a mappare la distanza spaziale tra i protoni presenti. La presenza di un *cross peak* denota un'interazione per effetto nucleare *Overhauser* (o effetto NOE [63]) e quindi una vicinanza spaziale tra due protoni. Per i peptidi, si osserva l'interazione per effetto NOE dei protoni di residui immediatamente adiacenti nella struttura primaria, più precisamente le interazioni $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$. L'effetto NOE tra protoni di residui non vicini sarà presente solo se il peptide assume una struttura secondaria che avvicina residui lontani nella sequenza.

Per il peptide *all*-L-Ac-BMAP(1-18) sono stati identificati i protoni α CH e i protoni NH di tutti gli amminoacidi individuando nello spettro TOCSY i *cross peaks* tra le due tipologie di segnali (Figura 3.27).

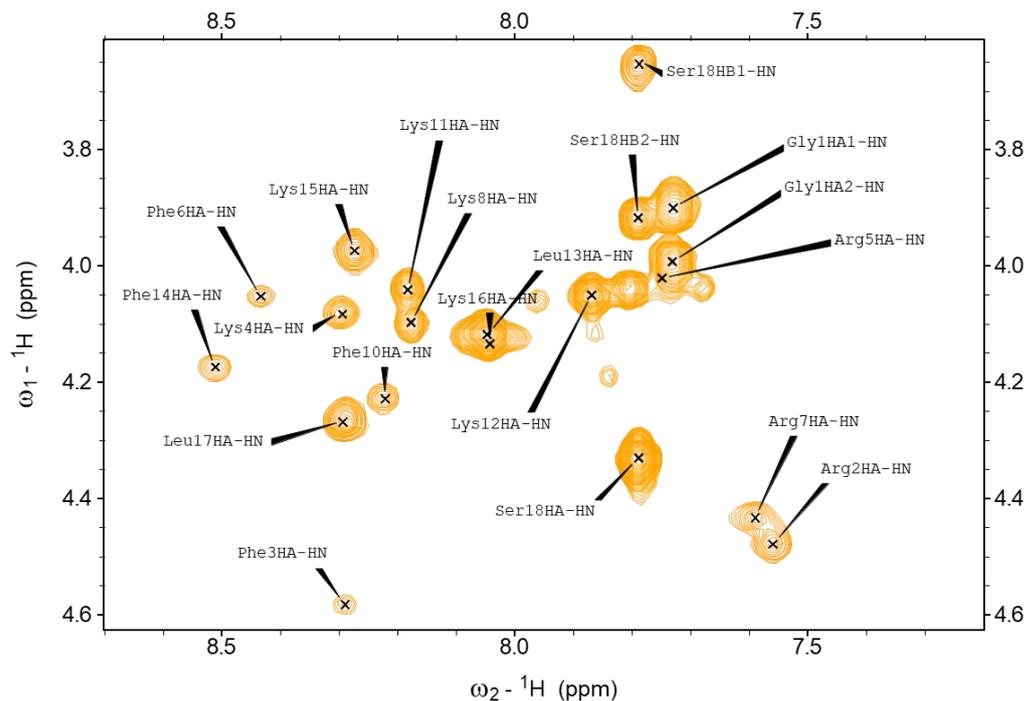


Figura 3.27. Regione dello spettro TOCSY del peptide *all*-L-Ac-BMAP(1-18) in cui è evidenziata l'assegnazione dei *chemical shifts* dei protoni dei carboni α . (600 MHz, TFE-d₂, 308K).

L'assegnazione completa delle risonanze protoniche di *all*-L-Ac-BMAP(1-18) viene riportata in Tabella 3.4.

Tabella 3.4. Tabella dei *chemical shift* del peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)*.

	CH ₃	H α	H β 1	H β 2	H δ	H ϵ	H γ	HN	HNE
Ac0	2.139	-	-	-	-	-	-	-	-
Gly1	-	3902-3996	-	-	-	-	-	7.730	-
Arg2	-	4.476	-	-	-	-	-	7.564	-
Phe3	-	4.584	3.390	3.504	-	-	-	8.290	-
Lys4	-	4.081	-	-	-	-	-	8.294	-
Arg5	-	4.031	1.901	1.945	3.164	-	1.601-1.658	7.747	-
Phe6	-	4.047	3.025	3.118	-	-	-	8.442	-
Arg7	-	4.432	-	-	3.289	-	-	7.589	-
Lys8	-	4.095	-	-	-	-	-	8.178	-
Lys9	-	4.046	-	-	-	-	-	7.803	7.178
Phe10	-	4.227	3.023	3.139	-	-	-	8.223	-
Lys11	-	4.041	-	-	-	-	-	8.183	-
Lys12	-	4.049	1.785	1.946	-	2.070	1.535	7.875	-
Leu13	-	4.118	1.718	2.064	0.9280	-	-	8.050	-
Phe14	-	4.174	2.954	3.076	-	-	-	8.514	-
Lys15	-	3.972	-	-	-	-	-	8.276	7.154
Lys16	-	4.126	-	-	-	-	-	8.044	-
Leu17	-	4.264	1.797	1.836	0.9130	-	1.597	8.295	-
Ser18	-	4.331	3.654	3.918	-	-	-	7.790	-

Per il peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, lo spettro NOESY viene acquisito e analizzato per assegnare ogni NH ad un preciso amminoacido nella sequenza peptidica. In particolare, l'assegnazione sequenziale è possibile osservando la zona di *fingerprint* nella quale cadono le interazioni di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$ (Figura3.28).

Queste interazioni si riferiscono a protoni di amminoacidi vicini nella sequenza, e si osservano quasi tutte: $\alpha\text{CH-Gly}^1 \rightarrow \text{NH-Arg}^2$, $\alpha\text{CH-Arg}^2 \rightarrow \text{NH-Phe}^3$, $\alpha\text{CH-Phe}^6 \rightarrow \text{NH-Arg}^7$, $\alpha\text{CH-Arg}^7 \rightarrow \text{NH-Lys}^8$, $\alpha\text{CH-Lys}^8 \rightarrow \text{NH-Lys}^9$, $\alpha\text{CH-Phe}^{10} \rightarrow \text{NH-Lys}^{11}$, $\alpha\text{CH-Lys}^{12} \rightarrow \text{NH-Leu}^{13}$, $\alpha\text{CH-Phe}^{14} \rightarrow \text{NH-Lys}^{15}$, $\alpha\text{CH-Leu}^{17} \rightarrow \text{NH-Ser}^{18}$.

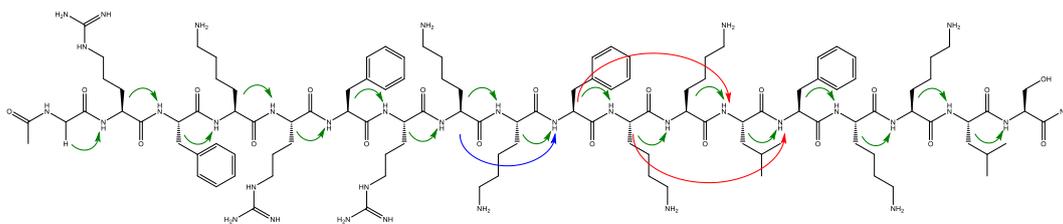


Figura 3.28. Struttura del peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)*. Le interazioni osservate nello spettro NOESY tra protoni attigui, di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$ sono indicate nella struttura con frecce verdi; quelle a lunga distanza, di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+2)$ con frecce blu e di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+3)$ con frecce rosse.

Dallo studio NMR si può identificare una conformazione ordinata per il peptide quando esso si trova in soluzione di trifluoroetanolo. Le interazioni a lunga distanza di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+2)$ e $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+3)$ infatti sono indicative di strutture elicoidali. Nel caso del peptide in esame si osservano i *cross peaks* relativi alle interazioni a lunga distanza tra $\alpha\text{CH Lys}^8 \rightarrow \text{NH-Phe}^{10}$, $\alpha\text{CH Phe}^{10} \rightarrow \text{NH-Leu}^{13}$, $\alpha\text{CH Lys}^{11} \rightarrow \text{NH-Phe}^{14}$ (Figura 3.29). Le interazioni di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+2)$ generalmente sono indicative di eliche di tipo 3_{10} , mentre quelli di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+3)$ sono compatibili con eliche miste e α -eliche. Tali dati sono in buon accordo con quanto si osserva nello studio di dicroismo circolare per lo stesso peptide in soluzione di trifluoroetanolo, ovvero la tendenza del peptide ad assumere conformazioni elicoidali di tipo misto $\alpha/3_{10}$.

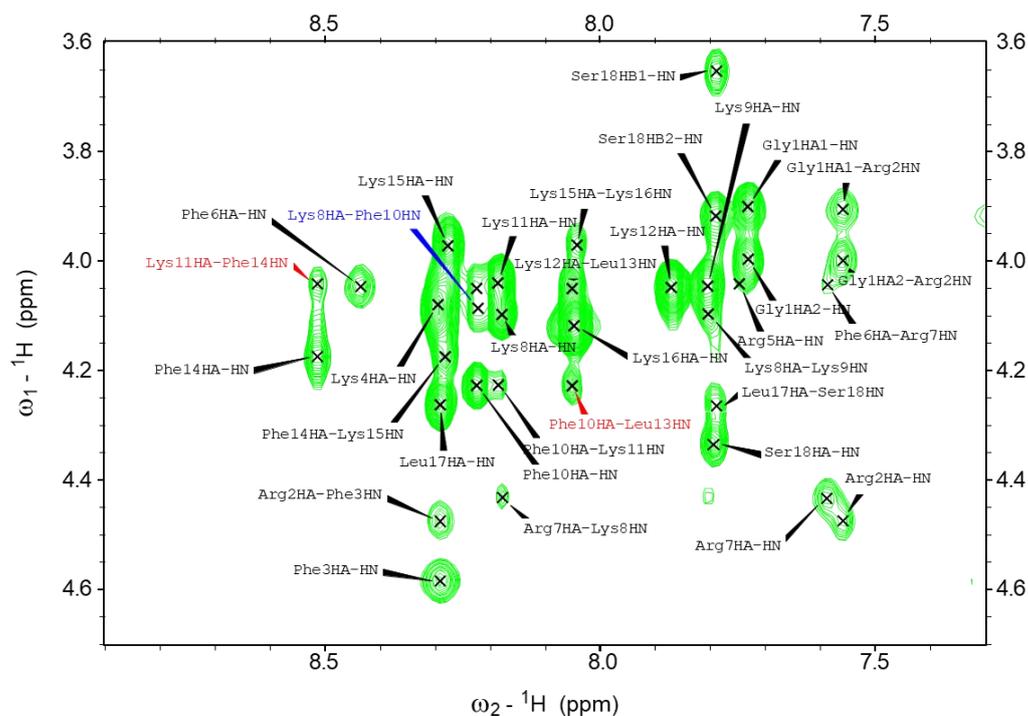


Figura 3.29. Regione di *fingerprint* dello spettro NOESY del peptide *all*-L-Ac-BMAP(1-18) (600 MHz, TFE- d_2 , 308K). In rosso le interazioni di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+3)$ e in blu quelle di tipo $\alpha\text{CH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+2)$.

A confermare la tendenza del peptide ad assumere una struttura elicoidale ben definita si aggiunge il fatto che tutti i *cross-peaks* sequenziali di tipo $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$ nella regione spettrale dei protoni ammidici sono visibili (Figura 3.30).

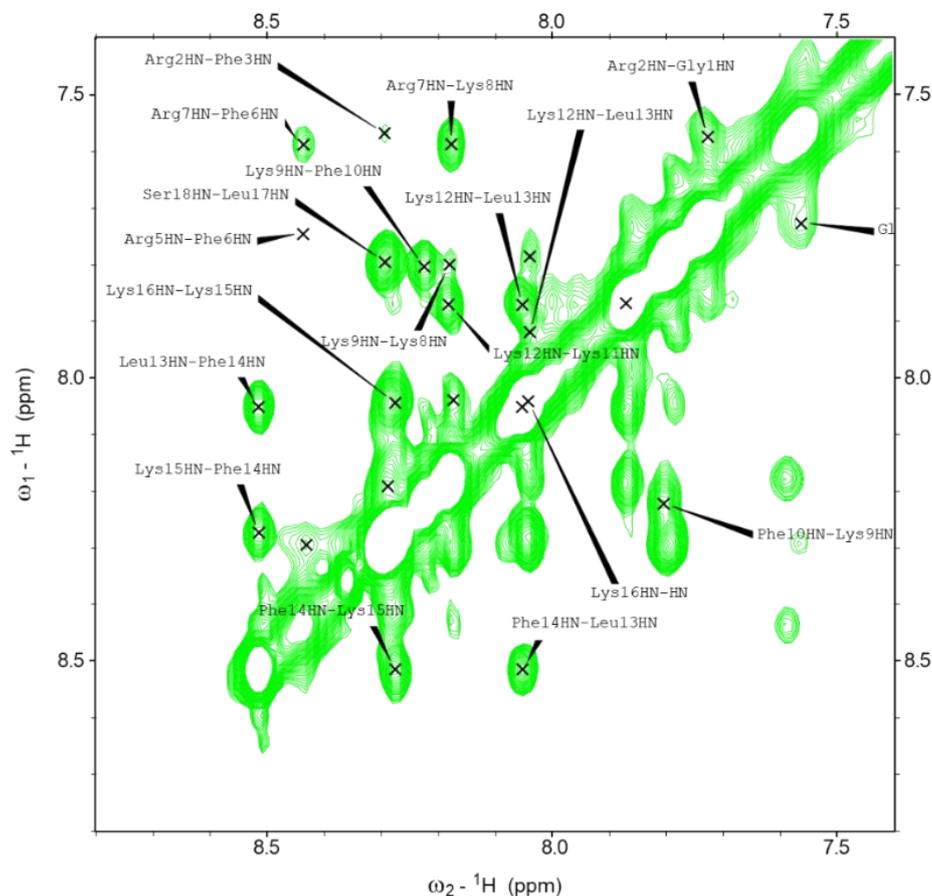


Figura 3.30. Regione dello spettro NOESY del peptide *all-L-Ac-BMAP(1-18)* (600 MHz, TFE- d_2 , 308K), zona delle interazioni di tipo $\text{NH}(i) \rightarrow \text{NH}(i+1)$.

Nel complesso i dati NMR evidenziano e confermano quanto già emerso dall'analisi degli spettri di dicroismo circolare per lo stesso peptide in soluzione di trifluoroetanolo.

3.6 Test di Leakage

Allo scopo di verificare se i peptidi sintetizzati (*all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)*) interagiscono ed alterano la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici delle membrane procariote ed eucariote, si esegue un test preliminare, chiamato *leakage*, con liposomi contenenti un fluoroforo. I liposomi sono vescicole costituite da un doppio strato di fosfolipidi e colesterolo; per questo test si utilizzano due tipi di liposomi con composizione del doppio strato lipidico differente e al loro interno viene confinata una soluzione di carbossifluoresceina (CF). Vengono sintetizzati liposomi costituiti da

fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerolo (PE/PG) e fosfatidilcolina/colesterolo (PC/Ch); i primi simulano le membrane dei batteri GRAM- e i secondi le membrane delle cellule eucariote. Quando CF è confinata all'interno delle vescicole l'intensità di fluorescenza è modesta a causa del fenomeno dell'*auto-quenching*, ma l'interazione tra i peptidi e le membrane fosfolipidiche causa la fuoriuscita (*leakage*) del fluoroforo in soluzione, quindi l'aumento dell'intensità di fluorescenza.

Le misure vengono condotte utilizzando rapporti peptide/lipide R^{-1} (Equazione 3.2) crescenti, aggiungendo diverse aliquote di peptide ad una soluzione di liposomi a concentrazione costante, pari a 0.06 mM. In Figura 3.31 viene rappresentato lo schema dell'esperimento.

$$R^{-1} = \frac{[peptide]}{[lipide]} \quad (3.2)$$

Dove $[peptide]$ e $[lipide]$ rappresentano rispettivamente le concentrazioni di peptide e liposomi nei campioni.

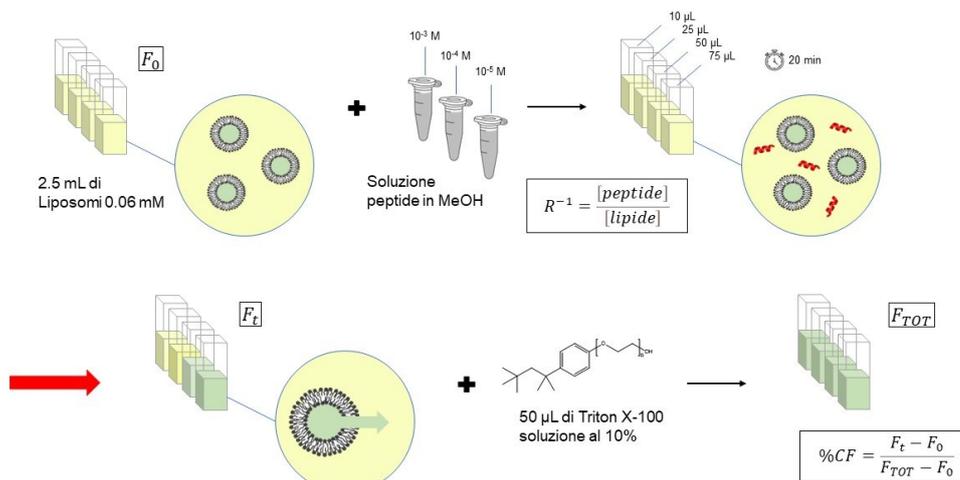


Figura 3.31. Test di Leakage rappresentazione schematica.

Dopo aver misurato l'intensità di fluorescenza F_0 della soluzione di liposomi al tempo zero in assenza di peptide, si aggiungono quantità crescenti di peptide. Si attende un tempo t di 20 minuti durante il quale avviene l'interazione tra peptide e membrane lipidiche con la fuoriuscita di CF, quindi si misura l'intensità di

fluorescenza F_t . Per determinare la quantità totale di CF contenuta nei liposomi, si aggiunge ai campioni una soluzione di Triton X-100: un tensioattivo che distrugge le vescicole portando in soluzione tutto il fluoroforo; si determina l'intensità di fluorescenza F_{TOT} . È possibile determinare la percentuale di carbossifluoresceina fuoriuscita $\%CF$ in soluzione per azione del peptide, utilizzando l'Equazione 3.3.

$$\%CF = \frac{F_t - F_0}{F_{TOT} - F_0} \cdot 100 \quad (3.3)$$

L'attività dei peptidi *all*-L-Ac-BMAP(1-18), *all*-D-Ac-BMAP(1-18), *all*-L-Ac-PMAP(12-24) e *all*-D-Ac-PMAP(12-24) viene confrontata con quella della Tricogina GA IV: un peptide noto per la sua attività membranolitica.

3.6.1 Test di Leakage con liposomi PE/PG

Il Test di Leakage con liposomi PE/PG simula l'interazione tra peptide e membrana dei batteri GRAM-. I risultati di $\%CF$ contro R^{-1} vengono riportati nel grafico di Figura 3.32, da cui si nota un andamento sigmoideale caratteristico di un'azione cooperativa delle molecole di peptide. A bassi R^{-1} si osservano valori modesti di $\%CF$, ma al superamento di una concentrazione critica di peptide, oltre la quale le molecole riescono ad aggregare e permeabilizzare i liposomi, si ha un brusco aumento di $\%CF$ fino al raggiungimento di un *plateau*.

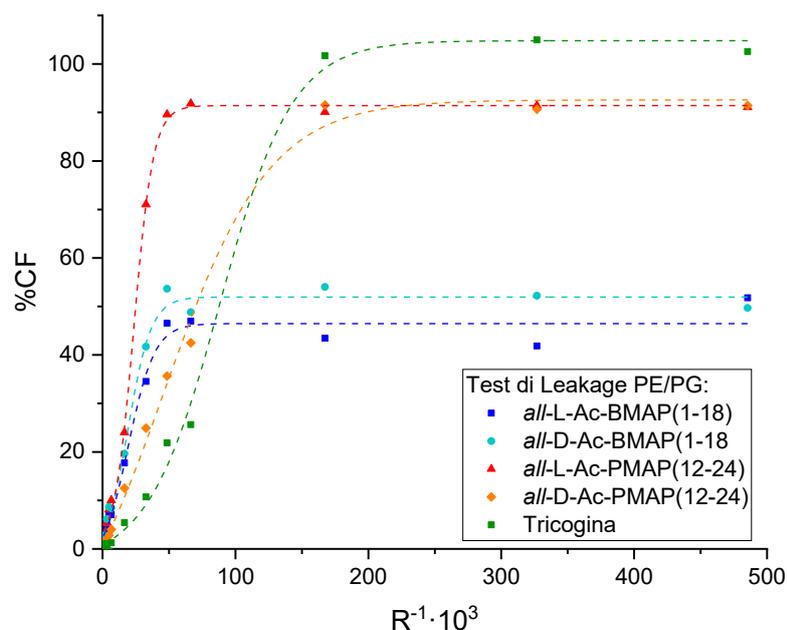


Figura 3.32. Grafico relativo al Test di Leakage con liposomi PE/PG per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)* (in blu), *all-D-Ac-BMAP(1-18)* (in azzurro), *all-L-Ac-PMAP(12-24)* (in rosso), *all-D-Ac-PMAP(12-24)* (in arancione) e Tricogina (in verde).

Dal grafico in Figura 3.32 si può, inoltre, osservare come i valori di %CF dei peptidi PMAP(12-24) nel *plateau* della curva siano paragonabili a quelli della Tricogina, confermando l'elevata attività di queste molecole nei confronti di batteri GRAM- [19]. L'attività dei peptidi BMAP(1-18), al contrario, sembra essere più bassa verso questo tipo di batteri.

Il dato più significativo ottenuto da questo saggio qualitativo è che peptidi con L-AA o D-AA interagiscono e permeabilizzano in egual modo le membrane dei liposomi. Perciò, si può concludere che l'interazione elettrostatica tra fosfolipidi, che costituiscono la membrana, e peptidi dipenda dalla conformazione assunta da quest'ultimi in soluzione e non dal senso di rotazione dell'elica o dalla geometria dei singoli AA.

3.6.2 Test di Leakage con liposomi PC/Ch

Il Test di Leakage con liposomi PC/Ch simula l'interazione tra peptide e membrana delle cellule eucariote. I risultati di %CF contro R^{-1} dei campioni vengono riportati

nel grafico di Figura 3.33, da cui si osserva lo stesso andamento sigmoidale ottenuto per il Test di Leakage con liposomi PE/PG caratteristico di un'azione cooperativa. Inoltre, i valori di %CF in funzione di R^{-1} sono simili al *test* precedente; di conseguenza, i peptidi non mostrano selettività verso liposomi che simulano membrane batteriche rispetto a quelli che simulano membrane eucariote.

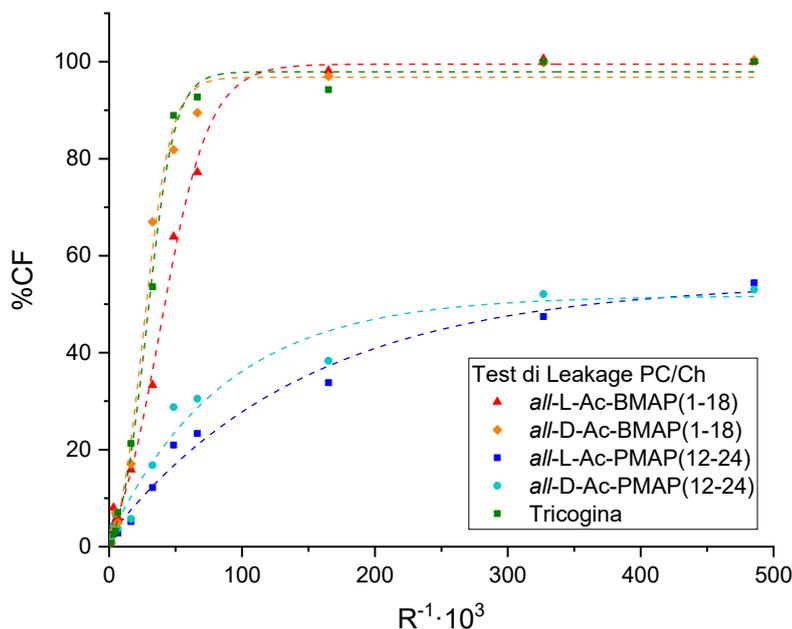


Figura 3.33. Grafico relativo al Test di Leakage con liposomi PC/Ch per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)* (in blu), *all-D-Ac-BMAP(1-18)* (in azzurro), *all-L-Ac-PMAP(12-24)* (in rosso), *all-D-Ac-PMAP(12-24)* (in arancione) e Tricogina (in verde).

In conclusione, questi *test* dimostrano la capacità dei peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* di interagire con membrane cellulari, ma quest'ultime sono alquanto diverse dai modelli utilizzati ed uno studio più approfondito di attività deve essere effettuato con analisi biologiche *in vitro*.

3.7 Analisi biologiche

L'attività antibiotica *in vitro* dei peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* è stata determinata tramite analisi biologiche di concentrazione minima inibente (MIC) e

concentrazione minima battericida (MBC) [64] dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Scocchi dell'Università di Trieste. I ceppi batterici utilizzati per questi test: *Escherichia coli* (GRAM-), *Staphylococcus aureus* (GRAM+), *Acinetobacter baumannii* (GRAM-), *Klebsiella pneumoniae* (GRAM-), *Pseudomonas aeruginosa* (GRAM-) e *Staphylococcus epidermidis* (GRAM+), vengono scelti in quanto, solitamente, infettano le ferite chirurgiche [65, 66].

La MIC è la minima concentrazione di peptide capace di inibire la crescita dei batteri, quindi più basso è il valore, più attivo è l'antibiotico. I risultati ottenuti per i peptidi testati vengono riportati in Tabella 3.5, da cui si osserva che i peptidi PMAP(12-24) sono più attivi rispetto ai BMAP(1-18) verso i batteri GRAM-, in accordo con il *test di leakage*; mentre per i batteri GRAM+ sono i peptidi BMAP(1-18) a mostrare l'attività maggiore. Si noti, poi, che la MIC misurata per peptidi con D-AA è sempre uguale o minore ai corrispettivi peptidi con L-AA, a dimostrazione che l'ipotesi formulata in seguito ai *test di leakage* è corretta, ovvero che l'attività degli AMPs cationici non dipenda dal senso di rotazione dell'elica o dalla configurazione degli amminoacidi, ma solo dalla capacità di formare delle strutture secondarie anfipatiche a contatto con le membrane cellulari. Inoltre la migliore attività che in alcuni casi i peptidi con D-AA mostrano rispetto ai corrispettivi con L-AA può essere dovuta alla capacità di queste molecole di resistere agli enzimi proteolitici che potrebbero essere presenti nell'ambiente di crescita dei batteri [67].

Tabella 3.5. Valori di MIC per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* verso batteri GRAM- e GRAM+.

Peptide	MIC (μ M)					
	E.coli	S.aureus	A.baumannii	K.pneumoniae	P.aeruginosa	S.epidermidis
	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 19606	ATCC 700603	ATCC 27853	ATCC 12228
<i>all-L-Ac-PMAP(12-24)</i>	4	>64	2	4	8	4
<i>all-D-Ac-PMAP(12-24)</i>	2	16	2	4	4	4
<i>all-L-Ac-BMAP(1-18)</i>	8	16	8	16	16	2
<i>all-D-Ac-BMAP(1-18)</i>	4	8	8	8	8	1

La MBC è la minima concentrazione di peptide necessaria a provocare la morte del 99.9% dei batteri. I risultati ottenuti per i peptidi testati vengono riportati in Tabella 3.6. La MBC dei peptidi PMAP(12-24) coincide con la MIC (ad eccezione di *S. aureus*), quindi queste molecole oltre all'effetto inibente presentano un effetto

batterricida. Al contrario, la MBC dei peptidi BMAP(1-18) è più elevata della MIC (ad eccezione dei batteri GRAM+), perciò si può concludere che queste molecole possiedono un modesto effetto inibente verso i batteri GRAM- e un marcato effetto battericida verso il ceppo *S.epidermidis*.

Tabella 3.6 Valori di MBC per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* verso batteri GRAM- e GRAM+.

Peptide	MBC (μ M)					
	E.coli	S.aureus	A.baumannii	K.pneumoniae	P.aeruginosa	S.epidermidis
	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 19606	ATCC 700603	ATCC 27853	ATCC 12228
<i>all-L-Ac-PMAP(12-24)</i>	4	nd	2	4	8	4
<i>all-D-Ac-PMAP(12-24)</i>	2	32	2	4	4	4
<i>all-L-Ac-BMAP(1-18)</i>	16	16	16	16	32	2
<i>all-D-Ac-BMAP(1-18)</i>	8	8	8	16	16	1

In conclusione, le analisi biologiche di MIC e MBC condotte per i peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* hanno dimostrato una buona attività di queste molecole nei confronti dei più comuni ceppi batterici.

3.8 Legame tra peptide e cotone

Il cotone viene funzionalizzato con i peptidi antimicrobici *all-L-Cys-PMAP(12-24)* e *all-Aox-PMAP(12-24)* utilizzando rispettivamente un legame tiazolidinico e un legame ossima, i cui meccanismi di formazione prendono spunto dalla “*chemical ligation*” (vedi Paragrafo 1.3). Come descritto nel Paragrafo 1.4.2 “Ossidazione enzimatica della cellulosa” le catene di cellulosa che costituiscono il cotone possono essere ossidate con il sistema TEMPO/laccasi/O₂, in modo da ottenere un gruppo aldeidico in posizione C6 [50]. L’aldeide viene fatta reagire con il gruppo β -ammino tiolo della Cys introdotta all’estremità N-terminale di *all-L-Cys-PMAP(12-24)* e con il gruppo aminossi dell’Aox introdotto all’estremità N-terminale di *all-L-Aox-PMAP(12-24)*. Entrambe le reazioni avvengono in fase eterogenea immergendo un dischetto di cotone ossidato in una soluzione acquosa del peptide a pH 5 e temperatura ambiente (Figura 3.34). Alla soluzione di *all-L-Cys-PMAP(12-24)* è necessario aggiungere 1 equivalente di tris(2-

carbossietil)fosfina (TCEP). TCEP è un'agente riducente che evita la dimerizzazione del peptide tramite la formazione di ponti disolfuro, che impedirebbero a quest'ultimo di legarsi al cotone [51].

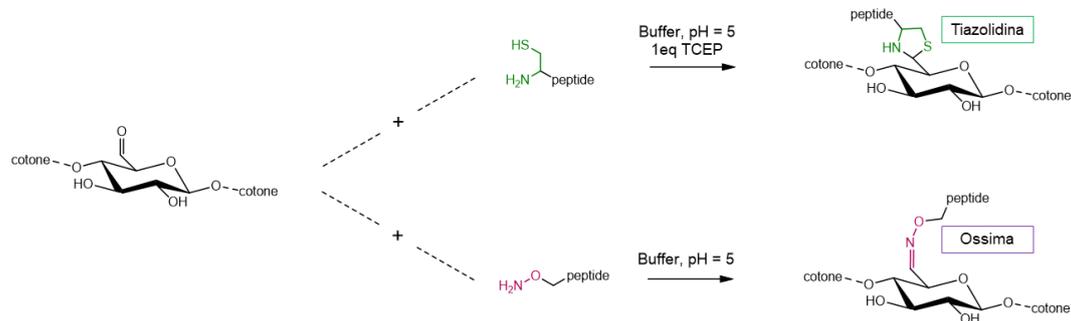


Figura 3.34. Formazione del legame tiazolidinico e ossima tra cotone e peptidi [30].

Le reazioni avvengono in fase eterogenea: il peptide legandosi al cotone passa dalla soluzione alla superficie del cotone a cui si lega, perciò la sua concentrazione nella soluzione cala durante il decorso della reazione. La presenza di un residuo di triptofano nella sequenza di PMAP(12-24) permette di monitorare l'andamento della reazione tramite UV-Vis. Per farlo si analizza la soluzione tramite spettroscopia UV seguendo l'intensità del picco di assorbimento di Trp a 280 nm. Per verificare l'effettiva presenza di peptide legato covalentemente al di cotone si effettua un *Kaiser Test* su alcune fibre (vedi Paragrafo 1.2.5). I gruppi amminici liberi dei residui di Lys e Arg reagiscono con i reagenti del test colorando di blu il cotone. In Figura 3.35 si riporta uno schema dell'esperimento.

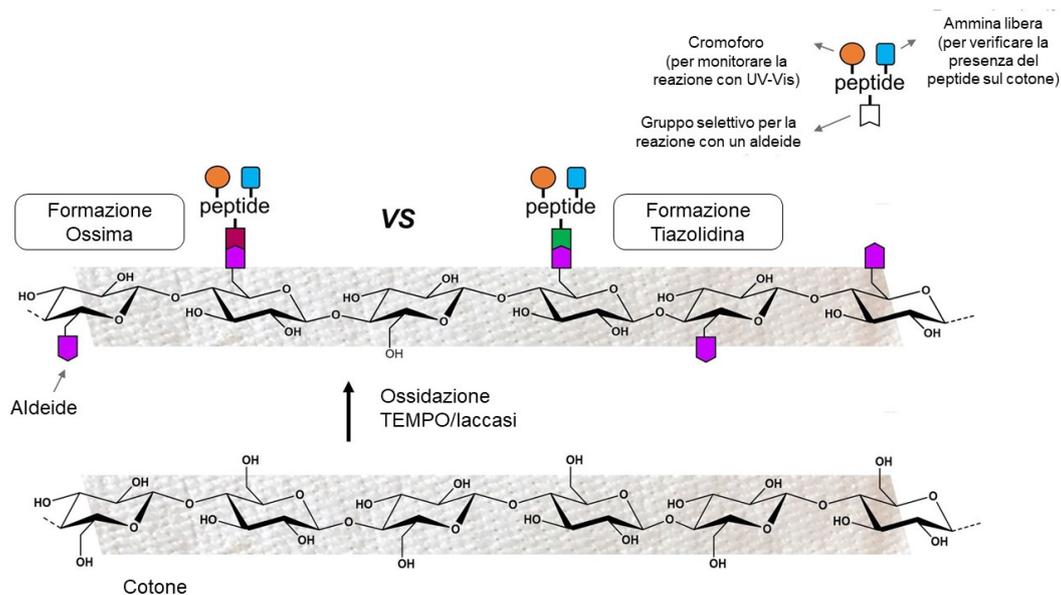


Figura 3.35. Schema dell'esperimento di funzionalizzazione del cotone [51].

3.8.1 Calcolo del loading di peptide sul cotone

Preparate le due soluzioni dei peptidi si esegue una misura di assorbanza tra 240 e 350 nm ($t = 0$ h). Quindi si aggiunge un dischetto di cotone ossidato a ciascuna soluzione e si agita blandamente per due giorni. Le reazioni vengono monitorate dopo 2, 4, 6, 24 e 48 h eseguendo misure di assorbanza nel medesimo *range* spettrale. Dall'assorbanza del picco a 280 nm si risale alla concentrazione, utilizzando la legge di Lambert-Beer (Equazione 3.4).

$$C = Abs / \varepsilon \cdot l \quad (3.4)$$

Dove C rappresenta la concentrazione della soluzione, Abs l'assorbanza a 280 nm, ε il coefficiente di estinzione molare di Trp pari a $\varepsilon = 5690 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e l il cammino ottico pari a 0.1 cm.

Confrontando la concentrazione iniziale e finale di peptide in soluzione si determina la quantità di peptide che, sottratta dalla soluzione, si è legata al cotone. Utilizzando questo valore è possibile determinare il *loading*, ovvero le mmoli di peptide per grammo di cotone ($mmol/g$), (Equazione 3.5), che quantifica la funzionalizzazione del cotone.

$$Loading \text{ cotone} = \frac{n_{iniziale} - n_{finale}}{m_{cotone}} \quad (3.5)$$

Dove $n_{iniziale}$ e n_{finale} ($mmol$) rappresentano rispettivamente le moli iniziali e finali di peptide presenti nella soluzione e m_{cotone} (g) rappresenta il peso del dischetto di cotone.

In Figura 3.36 si riporta l'andamento della reazione di *all*-L-Cys-PMAP(12-24). Da una concentrazione iniziale di 1.028 mM, si raggiunge un valore finale di 0.889 mM, quindi si determina un *loading* di 0.056 mmol/g. In Figura 3.37 si riporta il risultato del *Kaiser Test* su un pezzetto di cotone funzionalizzato e di cotone ossidato usato come confronto. Il risultato del saggio per il cotone funzionalizzato

è positivo, il tessuto diventa blu confermando la presenza di peptide legato alla superficie, mentre il risultato del confronto è negativo, il tessuto non cambia colore.

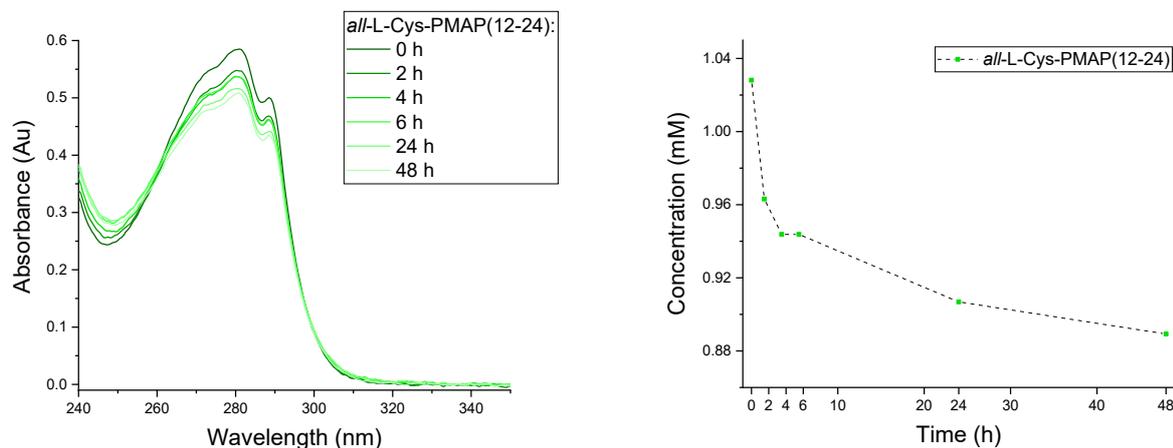


Figura 3.36. Reazione di *all*-L Cys-PMAP(12-24), a destra le misure di assorbanza, a sinistra l'andamento della concentrazione nel tempo.

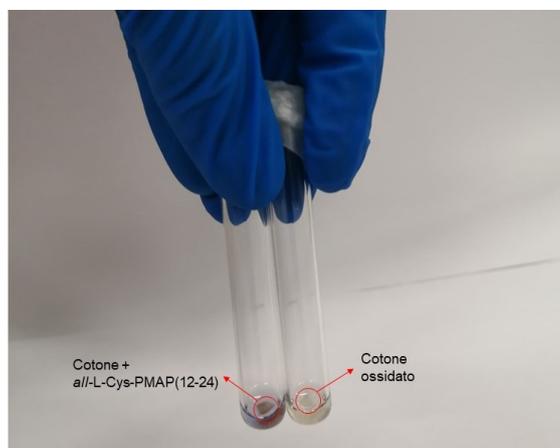


Figura 3.37. Risultato del *Kaiser Test* di *all*-L-Cys-PMAP(12-24) legato al cotone.

In Figura 3.38 Si riporta l'andamento della reazione di *all*-L-Aox-PMAP(12-24). Da una concentrazione iniziale di 0.844 mM, si raggiunge un valore finale di 0.800 mM, quindi si determina un *loading* di 0.017 mmol/g. In Figura 3.39 Si riporta il risultato del *Kaiser Test* su un pezzetto di cotone funzionalizzato e di cotone ossidato. Il risultato del saggio per il cotone funzionalizzato e il confronto è il medesimo dell'esperienza precedente, la presenza di peptide legato alla superficie è confermata.

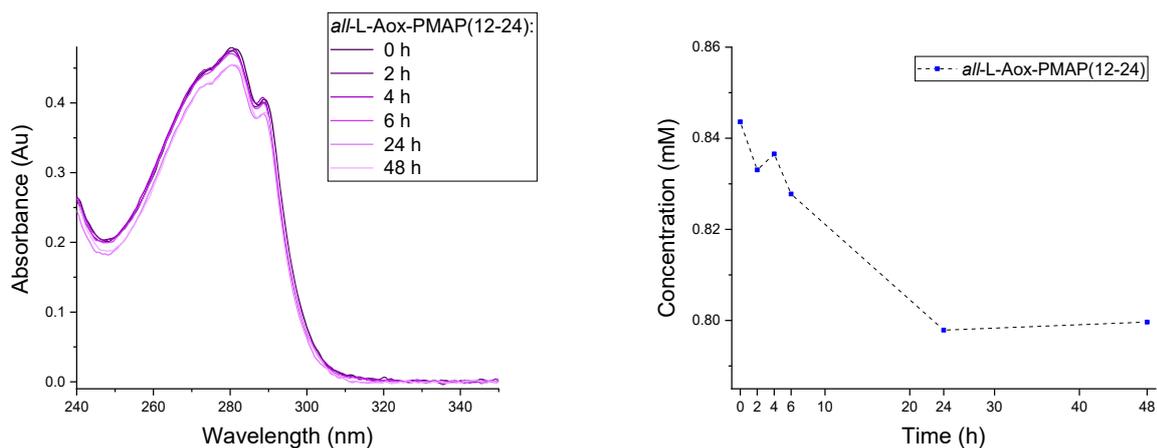


Figura 3.38. Reazione di *all*-L-Aox-PMAP(12-24), a destra le misure di assorbanza, a sinistra l'andamento della concentrazione nel tempo.



Figura 3.39. Risultato del *Kaiser Test* di *all*-L-Aox-PMAP(12-24) legato al cotone.

Dal confronto dei due *loading*, 0.056 mmol/g per *all*-L-Cys-PMAP(12-24) e 0.017 mmol/g per *all*-L-Aox-PMAP(12-24), e dagli andamenti delle reazioni si nota come formazione del legame tiazolidinico risulti più efficace rispetto al legame ossima. In particolare, dalla Figura 3.36 si osserva un brusco calo della concentrazione di *all*-L-Cys-PMAP(12-24) dopo 2 h dall'inizio della reazione ed un'ulteriore diminuzione tra le 24 e 48 h; al contrario, dalla Figura 3.38 si nota come nelle prime ore la reazione tra *all*-L-Aox-PMAP(12-24) e cotone sia più lenta e dopo 24 h raggiunga l'equilibrio.

Ad ogni modo entrambi i legami hanno permesso di funzionalizzare con successo il cotone al peptide PMAP(12-24). I campioni di cotone vengono, quindi, inviati all'Università di Trieste per un'analisi biologica di attività antimicrobica, così da confrontarne i risultati con gli analoghi peptidici non funzionalizzati. I *test* sono tutt'ora in corso.

4. Parte Sperimentale

4.1 Materiali e strumentazione

4.1.1 Reagenti e solventi

Sigma-Aldrich	N,N-dimetilformammide (DMF); Diclorometano (DCM); Acido trifluoro acetico (TFA) per sintesi; Acido trifluoro acetico (TFA) per HPLC; Triisopropilsilano (TIS); N-etil-diisopropilammina (DIPEA); Kaiser Test Kit; Anidride acetica; Boc-L-Cys(Trt); O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride; Acetone; Dietilere; Etanolo assoluto; Trifluoroetanolo (TFE); Trifluoroetanolo D2 per NMR; Sodio dodecil solfato (SDS); Acido acetico; tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP); Dimetilsolfossido (DMSO); Tripsina da pancreas bovino; Tri(idrossimetil)amminometano cloridrato (TRIS·HCl); Acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil]-etansolfonico (HEPES); Carbossifluoresceina (CF); Colesterolo (Ch).
Honeywell	Piperidina.
Iris Biotech GmbH	Resina Fmoc-Rink Amide AM 100-200 mesh; Ossima; N,N'-diisopropilcarbodiimmide (DIC); N, N, N', N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium Hexafluorophosphate(HOBt); N-idrossibenzotriazolo (HBTU); Fmoc-L-Ile-OH; Fmoc-D-Ile-OH; Fmoc-L-Lys(Boc)-OH; Fmoc-D-Lys(Boc)-OH; Fmoc-L-Leu-OH; Fmoc-D-Leu-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-L-Trp(Boc)-OH; Fmoc-D-Trp(Boc)-OH; Fmoc-L-Val-OH; Fmoc-D-Val-OH; Fmoc-L-Ser(tBu)-OH; Fmoc-D-

	Ser(tBu)-OH; Fmoc-L-Phe-OH; Fmoc-D-Phe-OH; Boc-AOAc-OH.
Novabiochem	Resina Fmoc-Rink Amide AM 200-400 mesh.
Fluorochem	2,2'-(Etilendiossi)dietantiolo (DODT).
Carlo Erba	Acetonitrile (ACN) per HPLC; Metanolo per HPLC.
Piave Maitex SRL	Cotone organico $g/m^2 = 120$.
Riedel-den Haen	Acetato di sodio.
Avanti Polar Lipids	Fosfatilcolina (PC); Fosfatidiletanolamina (PE); Fosfatidilglicerolo (PG).
Euriso-Top	Trifluoroetanolo deuterato (TFE-d ₂)

4.1.2 Strumentazione

Sintetizzatore Automatico

Alcuni peptidi sono stati sintetizzati utilizzando i sintetizzatori automatici CS136 di CSBio Co e Biotage–Syro Wave, il primo permette di lavorare con grandi quantità di resina, mentre il secondo con quantità modeste.

Centrifuga

Per la sintesi peptidica è stata utilizzata la centrifuga NEYA 10 di REMI ELEKTROTECHNIK LTD, centrifugando a 5500 rpm per 10 min.

Nei test di degradazione enzimatica è stata utilizzata la centrifuga per eppendorf Biofuge 13 di Heraeus Instruments, centrifugando a 13000 rpm per 5 min.

High Performance liquid chromatography (HPLC)

Lo strumento usato per l'analisi dei peptidi e delle degradazioni enzimatiche è il cromatografo VWR HITACHI Cromaster equipaggiato con i moduli VWR HITACHI UV Detector 5410 settato alle lunghezze d'onda 280 e 210 nm, Auto-sampler 5260 e Pump 5410, con la colonna a fase inversa Phenomenex C18 100 Å, 5 μ , 250 x 4.60 mm, flusso 1 mL/min.

Gli eluenti utilizzati sono:

- ▶ Eluente A: 90% acqua ultrapura/10% ACN + 0.05% TFA.
- ▶ Eluente B: 90% ACN / 10% acqua ultrapura + 0.05% TFA.

Cromatografia Liquida – Spettrometria di Massa (LC-MS)

I peptidi vengono caratterizzati con HPLC-MS. Lo strumento utilizzato è un HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II equipaggiato con colonna KINETEX XB C18, 100Å, 3,5 µm, 100 x 4,60 mm. Il cromatografo è collegato ad uno spettrometro di massa del tipo Agilent Technologies 6130 Quadrupole, con sorgente ESI.

Gli eluenti utilizzati sono:

- ▶ Eluente A: 100% acqua ultrapura + 0.1% TFA.
- ▶ Eluente B: 100% ACN + 0.1%TFA.

Cromatografia Flash

I peptidi sono stati purificati utilizzando il cromatografo a media pressione Biotage Isolera Prime, dotato di rivelatore UV settato alle lunghezze d'onda 216 e 280 nm. La soluzione di peptide viene adsorbita in una pre-colonna (*cartridge*), caricata nella colonna cromatografica C₁₈ SNAP 12 g con volume massimo di 15 mL. Si utilizza un flusso di 12 mL/min e uno specifico gradiente di eluizione, che separa il campione in frazioni, le quali vengono automaticamente raccolte in provette.

Gli eluenti utilizzati sono:

- ▶ Eluente A: 100% acqua ultrapura + 0.05% TFA.
- ▶ Eluente B: 90% ACN/ 10% acqua ultrapura + 0.05%TFA.
- ▶ Eluente B: 100% MeOH + 0.05% TFA.*

*usato solo per il peptide all-L-Aox-PMAP(12-24).

Spettrofotometro UV-Vis

Si utilizza lo spettrofotometro Shimadzu UV-250 1PC per monitorare la reazione di funzionalizzazione del cotone, si usa una cella in quarzo con cammino ottico 0.1 cm e intervallo spettrale 240-350 nm.

Fluorimetro

Il *test di leakage* viene eseguito utilizzando il fluorimetro PERKIN ELMER Luminescence Spectrometer LS50B in modalità *Single Read* ed *Integration Time* 1.0 s. Si regola la lunghezza d'onda di eccitazione a 488 nm, mentre quella di

emissione a 520 nm, le *slit* di eccitazione ed emissione a 7.5 nm per il test con PC/Ch e rispettivamente a 5.0 e 7.5 nm per il test PE/PG.

Dicroismo Circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con il micrografo Jasco J-1500 utilizzando celle di quarzo (Hellam) con cammino ottico di 0,2 cm. Gli spettri sono stati acquisiti con un numero di accumuli pari a 6 e velocità di scansione pari a 50 nm/min, tra 270 e 190 nm.

NMR

Gli spettri H^1 -NMR sono stati acquisiti con uno strumento Bruker AVANCE NEO-600MHz. I peptidi analizzati sono stati sciolti in trifluoroetanolo deuterato ($TFE d_2$). Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione (ppm) rispetto al segnale di riferimento del tetrametilsilano (TMS).

4.2 Sintesi su fase solida di peptidi

La procedura di sintesi peptidica su fase solida (SPPS) si basa su alcuni passaggi ripetuti in maniera sistematica. Di seguito vengono riportati tutti i passaggi sintetici:

- *Swelling*: consiste nel rigonfiamento della resina con DMF. La resina viene inserita in una siringa da SPPS e viene immersa nel solvente sotto agitazione per almeno 30 min.
- *Deprotezione dal gruppo Fmoc*: consiste nella rimozione del gruppo protettore temporaneo dalla resina o dall'ultimo AA attaccato. Il gruppo Fmoc viene rimosso in ambiente basico, eseguendo due lavaggi della resina con una soluzione di piperidina al 20% v/v in DMF, rispettivamente per 5 e 20 min sotto agitazione. Seguono 5 lavaggi con DMF per rimuovere tutte le tracce di piperidina.
- *AA Coupling*: consiste nel legame tra il primo AA e la resina o tra un AA e il precedente. Tutti i peptidi vengono sintetizzati con la strategia Fmoc/tBu, utilizzando 3 equivalenti in eccesso di AA e attivatori rispetto ai siti attivi della resina. L'AA, protetto nell'estremità N-terminale con il gruppo Fmoc, viene sciolto in DMF con gli attivatori Ossima e DIC e dopo aver atteso 5 min per l'attivazione si aggiunge alla resina. Dopo aver lasciato la resina sotto agitazione per 1 ora, si eseguono 5 lavaggi con DMF degasata per rimuovere i reagenti in eccesso.

- *Kaiser test*: è un saggio colorimetrico per verificare se la reazione di *coupling* è quantitativa. Prima della deprotezione dal gruppo Fmoc, si preleva una punta di spatola di resina, che si lava con DCM e si pone in una provetta di vetro. Si aggiungono 20 μL di ciascuno dei tre reagenti del Kaiser Test Kit (cianuro di potassio in piridina, fenolo all'80% in etanolo e ninidrina al 6% in etanolo) e si scalda a 120°C per 5 min. Si osserva il colore dei granelli di resina: se non cambiano colore il test è negativo e si può proseguire con la sintesi, se diventano blu il test è positivo e significa che sono presenti dei gruppi $-\text{NH}_2$ liberi, in questo caso è necessario eseguire un ulteriore *coupling* dell'ultimo AA attaccato (senza deproteggere dal gruppo Fmoc).
- *Sblocco in piccolo*: consiste nello staccare la catena peptidica in crescita da una piccola quantità di resina, permette di verificare l'andamento della sintesi. Si preleva una piccola quantità di resina (circa 5 mg) e la si lava con DCM in modo da rimuovere completamente la DMF; quindi, si aggiunge una soluzione di TFA/H₂O/TIS in rapporto 95/2.5/2.5 e si pone sotto agitazione per 2 ore. L'ambiente acido consentirà la deprotezione dai gruppi protettori delle catene laterali del peptide e lo sblocco di quest'ultimo della resina. Trascorso il tempo necessario, si filtra la resina e si raccoglie la soluzione, a cui viene aggiunto dietiletere freddo per favorire la precipitazione del peptide. Si centrifuga e si rimuove il dietiletere; quindi, si ripone il peptide in essiccatore prima di eseguire un'analisi HPLC-MS, sciogliendo il campione in opportuno solvente.
- *Acetilazione*: Consiste nell'acetilazione con anidride acetica dell'estremità N-terminale del peptide. Questo *step* si esegue per i peptidi che non vengono utilizzati per funzionalizzare il cotone. Si preparano 10 mL di una soluzione composta da 470 μL di anidride acetica e 220 μL di DIPEA portati a volume con DMF, si aggiunge la soluzione alla resina e pone sotto agitazione per 45 min, ripedendo l'operazione due volte.
- *Sblocco in grande*: Consiste nello staccare il peptide dalla resina e nella deprotezione da tutti i gruppi laterali, alla fine della sintesi. La procedura e la soluzione di sblocco da usare sono le stesse dello sblocco in piccolo, ma questa volta si utilizza tutta la resina, quindi si pone sotto agitazione per 3 ore. Se nella sequenza peptidica è presente un residuo di Cys, si utilizza una soluzione di sblocco con una composizione diversa: TFA/DODT/H₂O/TIS in rapporto 94/2.5/2.5/1. Dopo aver rimosso il dietiletere, si eseguono 2 lavaggi con questo solvente in modo da portare in soluzione tutti i gruppi

protettori rimossi dalla catena peptidica. Si procede lasciando il prodotto in essiccatore per 24 ore ed eseguendo un'analisi HPLC-MS.

La sintesi manuale della sequenza peptidica viene eseguita alternando gli *step* di *deprotezione dal gruppo Fmoc*, *coupling* e *Kaiser Test*.

Alcuni peptidi sono stati sintetizzati con sintetizzatori automatici. Questi strumenti, una volta programmati, riescono a svolgere la sintesi in autonomia; infatti, sono in grado di prelevare volumi prestabiliti di reagenti e solventi, riempire, agitare e svuotare un reattore in cui si inserisce la resina. Durante la sintesi con CS136 di CSBio Co, ogni equivalente di AA è stato sciolto in 3 mL di DMF e come attivatori si usano due soluzioni 0.5 M di Ossima e DIC. Durante la sintesi con Biotage–Syro Wave come attivatori si usano HBTU e HOBT, inoltre si aggiungono 6 equivalenti di DIPEA ad ogni *coupling*.

4.2.1 Sintesi di all-L-Ac-BMAP(1-18)



Si utilizzano 250.7 mg di resina Fmoc-Rink Amide AM con un *loading* teorico di 0.64 mmol/g. La sintesi viene svolta manualmente, in Tabella 4.1 si riportano le quantità di reagenti utilizzate.

Tabella 4.1. Quantità di amminoacidi e attivatori utilizzati per la sintesi di all-L Ac-BMAP(1-18).

Residuo		Descrizione	MW (g/mol)	Equivalenti (eq)	AA	OSSIMA	DIC
					Massa Pesata (mg)	Massa Pesata (mg)	Volume (μL)
18	S	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	383.4	3	186.6	70.0	75.5
17	L	Fmoc-L-Leu-OH	353.4	3	172.2	63.6	75.5
16	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	229.9	63.3	75.5
15	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	229.2	63.1	75.5
14	F	Fmoc-L-Phe-OH	387.4	3	189.3	63.8	75.5
13	L	Fmoc-L-Leu-OH	353.4	3	172.8	63.6	75.5
12	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	228.3	63.5	75.5
11	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	228.2	65.9	75.5
10	F	Fmoc-L-Phe-OH	387.4	3	188.9	64.0	75.5
9	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	228.8	63.2	75.5
8	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	228.2	64.1	75.5
7	R	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648.8	3	315.8	63.8	75.5
6	F	Fmoc-L-Phe-OH	387.4	3	189.5	63.1	75.5
5	R	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648.8	3	316.0	64.0	75.5
4	K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	3	228.4	63.8	75.5
3	F	Fmoc-L-Phe-OH	387.4	3	188.9	63.9	75.5
2	R	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648.8	3	316.6	63.4	75.5
1	G	Fmoc-Gly-OH	297.3	3	145.2	64.2	75.5

Il peptide viene purificato con cromatografia *flash*, sciogliendo il campione in 1 mL di H₂O ultrapura ed utilizzando un gradiente 10-45% di B in 45 min. Le frazioni contenente il prodotto puro vengono riunite e liofilizzate.

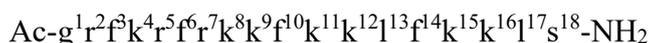
HPLC:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 μL con gradiente 15-45% di B in 30 min. $t_R = 11.39$ min; purezza 93.4%.

HPLC-MS:

Concentrazione 0.5 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 60 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 22.8$ min; $[M+H]^+ = 2383.1$; $[M+2H]^{2+} = 1192.1$; $[M+3H]^{3+} = 795.1$.

4.2.2 Sintesi di all D Ac-BMAP(1-18)



Si utilizzano 250.1 mg di resina Fmoc-Rink Amide AM con un *loading* teorico di 0.64 mmol/g. La sintesi viene svolta con sintetizzatore automatico Biotage–Syrro Wave, in corrispondenza di l¹⁷, f¹⁴, l¹³, r⁷, f⁶, r⁵, k⁴, f³, e r² si esegue un doppio *coupling*. In Tabella 4.2 si riportano le quantità di reagenti utilizzate, per ogni *coupling* si utilizzano 167 µL di DIPEA.

Tabella 4.2. Quantità di amminoacidi e attivatori utilizzati per la sintesi di all D Ac-BMAP(1-18).

	Residuo					
	Descrizione	MW (g/mol)	n° Coupling	Equivalenti (eq)	Massa Pesata (mg)	Volume DMF (mL)
s	Fmoc-D-Ser(tBu)-OH	383.4	1	1.5	280.0	1.5
l	Fmoc-D-Leu-OH	353.4	4	4.5	775.2	4.5
k	Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	468.5	8	8.5	1939.7	8.5
f	Fmoc-D-Phe-OH	387.4	7	7.5	1418.7	7.5
r	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	648.8	6	6.5	2059.7	6.5
g	Fmoc-Gly-OH	297.3	1	1.5	218.6	1.5
Attivatore HBTU		379.3	27	82.5	5090.4	27.5
Attivatore HOBT·H ₂ O		153.1			2049.7	

Il peptide viene purificato con cromatografia *flash*, dividendolo in quattro parti ciascuna sciolta in 500 µL di H₂O ultrapura ed utilizzando un gradiente 0-15% di B in 10 min, 15% di B per 5 min, 15-30% di B in 15 min e 30 % di B per 5 min. Le frazioni contenente il prodotto puro vengono riunite e liofilizzate.

HPLC:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 14.71$ min; purezza 96%.

HPLC-MS:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. t_R = 23.0 min; [M+H⁺]⁺ = 2383.1; [M+2H⁺]²⁺ = 1192.0; [M+3H⁺]³⁺ = 795.0.

4.2.3 Sintesi di all L PMAP(12-24)



Si utilizzano 1.5002 g di resina Fmoc-Rink Amide AM con un *loading* teorico di 0.64 mmol/g. La sintesi viene svolta con sintetizzatore automatico CS136 di CSBio Co, in corrispondenza di R¹³, L¹⁴, V²⁰, L²¹, W²³ e I²⁴ si esegue un doppio *coupling*. In Tabella 4.3 si riportano le quantità di reagenti utilizzate.

Tabella 4.3. Quantità di amminoacidi e attivatori utilizzati per la sintesi di all-L-PMAP(12-24).

	Residuo					
	Descrizione	MW (g/mol)	n° Coupling	Equivalenti (eq)	Massa Pesata (g)	Volume DMF (mL)
I	Fmoc-L-Ile-OH	353.4	3	10.5	3.6178	31.5
K	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.5	5	16.5	7.5386	49.5
L	Fmoc-L-Leu-OH	353.4	4	13.5	4.6509	40.5
G	Fmoc-Gly-OH	297.3	1	4.5	1.3065	13.5
R	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648.8	2	7.5	4.7454	22.5
W	Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526.6	2	7.5	3.8506	22.5
V	Fmoc-L-Val-OH	339.4	2	7.5	2.4815	22.5
Attivatore	MW (g/mol)	Conc. (M)	Volume (mL)	Massa Pesata (g)	Volume Prelevato (mL)	
Ossima	142.1	0.5	250	17.7641	/	
DIC	126.2	0.5	250	/	19.35	

Al termine della sintesi due parti di resina vengono utilizzate per la sintesi di all-L-Cys-PMAP(12-24) e all-L-Aox-PMAP(12-24) (utilizzati per la funzionalizzazione del cotone) e una piccola parte viene acetilata.



Il peptide viene purificato con Cromatografia Flash, sciogliendo il campione in 1 mL di soluzione H₂O/DMF con composizione 50/50 ed utilizzando un gradiente

10-40% di B in 60 min. Le frazioni contenente il prodotto puro vengono riunite e liofilizzate.

HPLC:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 14.71$ min; purezza 93.6%.

HPLC-MS:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 20.9$ min; $[M+H]^+ = 1651.0$; $[M+2H]^{2+} = 825.8$.



Il *coupling* con Cys viene svolto manualmente utilizzando Boc-L-Cys(Trt)-OH su circa un quarto della resina. Si utilizza un AA con gruppo protettore Boc rimovibile in ambiente acido, questo permette di saltare lo *step* di deprotezione in ambiente basico. Il *coupling* viene svolto con 4 equivalenti di AA per un tempo di 1 ora e 30 minuti affinché la reazione sia quantitativa; il gruppo protettore della catena laterale è labile e si vuole evitare la formazione di ponti disolfuro durante doppi *coupling*. In Tabella 4.4 si riportano le quantità di reagenti utilizzate.

Tabella 4.4. Quantità di amminoacido e attivatori utilizzati per la sintesi di *all*-L-Cys-PMAP(12-24).

Residuo				AA	OSSIMA	DIC
	Descrizione	MW (g/mol)	Equivalenti (eq)	Massa Pesata (mg)	Massa Pesata (mg)	Volume (µL)
C	Boc-L-Cys(Trt)-OH	463.59	4	464.5	144.4	155

Il peptide viene purificato con cromatografia *flash*, dividendolo in due parti e sciogliendo il campione in 1 mL di soluzione AcOH/MeOH con composizione 50/50 ed utilizzando un gradiente 20-35% di B in 30 min. Le frazioni contenente il prodotto puro vengono riunite e liofilizzate.

HPLC:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 60 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 13.5$ min.

HPLC-MS:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 50 µL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 22.9$ min; $[M+H]^+ = 1711.2$; $[M+2H]^{2+} = 856.6$.



Il *coupling* con Aox viene svolto manualmente utilizzando Boc-AOAc-OH su circa un quarto della resina. Durante tutte le operazioni che coinvolgono questo peptide si evita ogni traccia di acetone, in quanto reagisce con Aox formando un addotto stabile. Inoltre, durante lo sblocco in grande si aggiungono alla soluzione di sblocco 139.0 mg di acido aminossiacetico libero (corrispondenti a 5 equivalenti) che agiscono come *scavenger* per acetone. In Tabella 4.5 si riportano le quantità di reagenti utilizzate.

Tabella 4.5. Quantità di amminoacido e attivatori utilizzati per la sintesi di *all-L-Aox-PMAP(12-24)*.

Residuo				AA	OSSIMA	DIC
	Descrizione	MW (g/mol)	Equivalenti (eq)	Massa Pesata (mg)	Massa Pesata (mg)	Volume (μL)
Aox	Boc-Aox-OH	191.19	3	143.2	106.7	116

Il peptide viene purificato con cromatografia flash, dividendolo in due parti sciogliendo il campione in 2 mL di soluzione H₂O/DMF con composizione 50/50 ed utilizzando un gradiente 25-45% di B in 50 min. Le frazioni contenente il prodotto puro vengono riunite e liofilizzate.

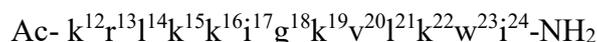
HPLC:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 40 μL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 14.7$ min.

HPLC-MS:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 50 μL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 22.8$ min; $[M+H]^+ = 1683.0$; $[M+2H]^{2+} = 842.0$.

4.2.4 Sintesi di *all D Ac-PMAP(12-24)*



Si utilizzano 249.9 mg di resina Fmoc-Rink Amide AM con un *loading* teorico di 0.64 mmol/g. La sintesi viene svolta con sintetizzatore automatico Biotage–Syro Wave, in corrispondenza di r¹³, l¹⁴, v²⁰, i²¹, w²³ e i²⁴ si esegue un doppio *coupling*.

In Tabella 4.6 si riportano le quantità di reagenti utilizzate, per ogni *coupling* si utilizzano 167 μL di DIPEA.

Tabella 4.6. Quantità di amminoacidi e attivatori utilizzati per la sintesi di *all-D-Ac-PMAP(12-24)*.

	Residuo					
	Descrizione	MW (g/mol)	n° Coupling	Equivalenti (eq)	Massa Pesata (mg)	Volume DMF (mL)
i	Fmoc-D-Ile-OH	353.4	3	10.5	603.8	3.5
k	Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	468.5	5	16.5	1256.2	5.5
l	Fmoc-D-Leu-OH	353.4	4	13.5	774.3	4.5
g	Fmoc-Gly-OH	297.3	1	4.5	217.0	1.5
r	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	648.8	2	7.5	789.8	2.5
w	Fmoc-D-Trp(Boc)-OH	526.6	2	7.5	641.1	2.5
v	Fmoc-D-Val-OH	339.4	2	7.5	414.8	2.5
Attivatore HBTU		379.3	19	58.5	3602.8	19.5
Attivatore HOBT·H ₂ O		153.1			1452.2	

Il peptide viene purificato con cromatografia *flash*, dividendolo in due parti e sciogliendo il campione in 1 mL di soluzione H₂O/DMF con composizione 50/50 ed utilizzando un gradiente 10-40% di B in 50 min. Le frazioni contenente il prodotto puro vengono riunite e liofilizzate.

HPLC:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 μL con gradiente 10-40% di B in 30 min. $t_R = 12.4$ min; purezza 98.6%.

HPLC-MS:

Concentrazione 1 mg/mL in H₂O ultrapura, iniezione 30 μL con gradiente % di B in 30 min. $t_R = 21.0$ min; $[M+H^+]^+ = 1650.1$; $[M+2H^+]^{2+} = 825.7$.

4.3 Degradazioni enzimatiche

Per studiare la stabilità dei peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)* si eseguono prove biologiche di degradazione enzimatica con Tripsina. Lo schema dell'esperimento è rappresentato in Figura 4.1.

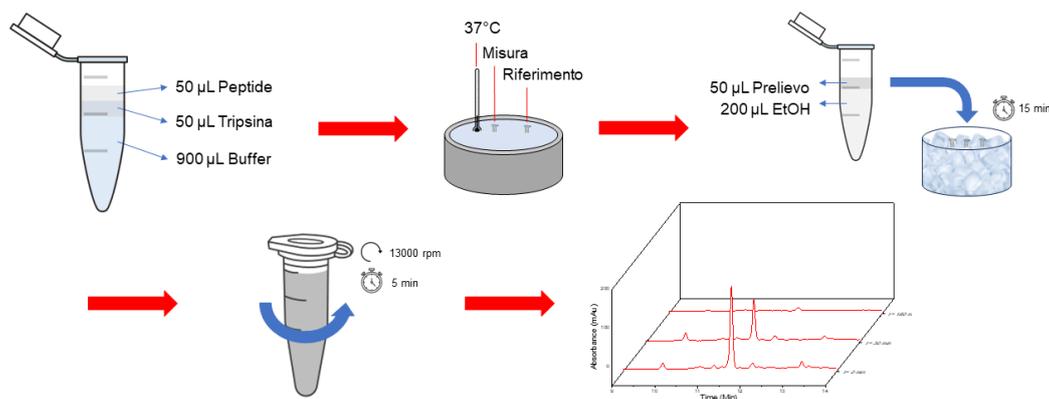


Figura 4.1. Schema dell'esperimento di degradazione enzimatica con Tripsina.

Si preparano soluzioni 5 mg/mL in DMSO dei quattro peptidi e 1 mg/mL in acqua ultrapura dell'enzima, quest'ultima viene diluita con un tampone di TRIS·HCl (10 mM, pH 7.8), ottenendo una concentrazione di 0.05 mg/mL. Si preparano le *soluzioni di misura* inserendo, in una eppendorf, 900 µL di soluzione tampone, 50 µL di soluzione di peptide e 50 µL di soluzione di enzima, che viene inserita in un bagno termostato a 37°C. Si esegue un prelievo a 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 minuti, 6 e 24 ore di 50 µL di soluzione che vengono trasferiti in una eppendorf contenente 200 µL di alcol etilico (EtOH) per bloccare la reazione di degradazione del peptide. Si preparano le *soluzioni di riferimento*, inserendo in una eppendorf 950 µL di soluzione tampone e 50 µL di soluzione di peptide, che viene inserita anch'essa nel bagno termostato. Si esegue un prelievo a 0, 30 minuti e 24 ore di 50 µL di soluzione e anch'essi vengono trasferiti in alcol EtOH. Le eppendorf con i prelievi vengono immerse in un bagno di ghiaccio per almeno 15 minuti, l'abbassamento della temperatura causa la precipitazione delle proteine dell'enzima. Si centrifuga e si preleva il surnatante per un'analisi HPLC con gradiente 5-65% di B ed iniezione di 98 µL.

4.4. Dicroismo Circolare

Le misure di Dicroismo Circolare vengono effettuate su campioni con concentrazione $2 \cdot 10^{-4}$ M. Si preparano soluzioni 10^{-3} M in metanolo (MeOH) dei peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)*. Si prelevano 100 µL di queste soluzioni e si mettono in una eppendorf, si ripete 3 volte per ciascun peptide. Si fa evaporare il solvente dalle eppendorf e si scioglie il peptide rimasto in 500 µL di opportuno solvente: TFE,

PBS e SDS. La soluzione di SDS 100 mM viene preparata pesando 0.7209 g di SDS (MW = 288.38 g/mol) e sciogliendoli in 25 mL di H₂O distillata. Gli spettri dei campioni vengono sottratti con il bianco del solvente, normalizzati per la concentrazione e il numero di residui, quindi elaborati con una funzione di *smoothing*, utilizzando il *software* Spectral Manager 2 di JASCO Corporation.

4.5 Test di Leakage

Il *test di leakage* usato per lo studio di interazione tra peptidi e membrane fosfolipidiche utilizza liposomi monolayer di fosfatilcolina/colesterolo e fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerolo, contenenti carbossifluoresceina (CF). La procedura per preparare i due tipi di liposomi è identica ed è schematizzata in Figura 4.2.

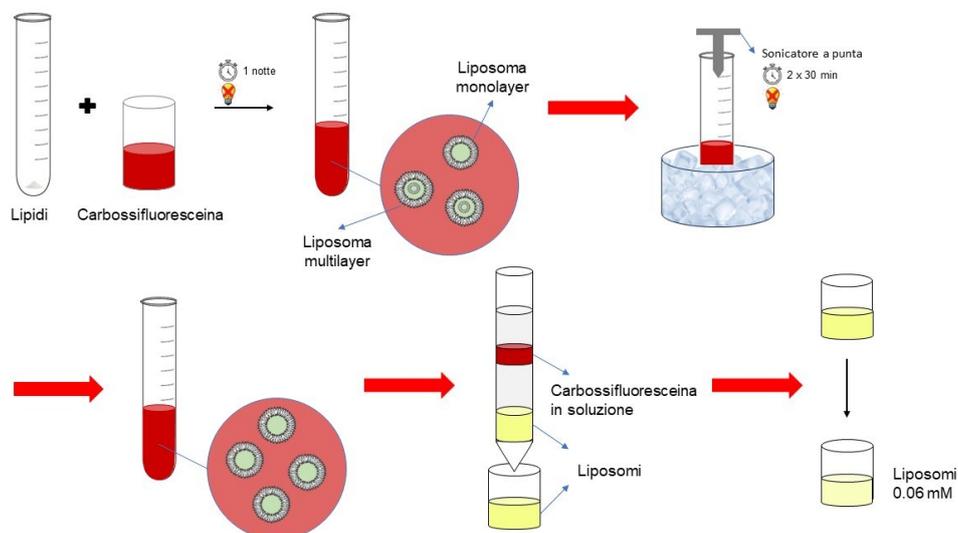


Figura 4.2. Rappresentazione schematica della procedura di preparazione dei liposomi.

Si preparano le seguenti soluzioni:

- *Soluzione di lipidi:* in una provetta si pesano 9.8 mg di PE (MW = 797.04 g/mol n = 0.012 mmol) e 22.1 mg di PG (MW = 768.00 g/mol, n = 0.028 mmol) in rapporto 7:3; in una seconda provetta si pesano 25.1 mg di PC (MW = 768.93 g/mol, n = 0.032 mmol) e 5.4 mg di Ch (MW = 386.7 g/mol, n = 0.014 mmol) con lo stesso rapporto dei precedenti. Ad entrambe le provette si aggiungono 3 mL di DCM e si sciolgono i lipidi.

- *Soluzione NaOH 1M*: si pesano 4 g di NaOH e si sciolgono con 100 mL di H₂O distillata,
- *Soluzione HEPES 30 mM*: si pesano 0.3570 g di HEPES, si sciolgono in H₂O distillata e si aggiusta il pH portandolo a 7.4, aggiungendo goccia a goccia la *soluzione NaOH 1M*; quindi, si porta a volume in un matraccio da 50 mL
- *Soluzione NaCl 100 mM tamponata con HEPES 5mM*: si pesano 1.1920 g di HEPES e 5.8627 g di NaCl, si sciolgono in acqua distillata e si aggiusta il pH portandolo a 7.4 con la *soluzione NaOH 1M*; quindi, si porta a volume in un matraccio da 1 L.
- *Soluzione CF*: si pesano 90.6 mg di carbossifluoresceina (CF) e si sciolgono in 1 mL di H₂O distillata; si aggiunge 1 mL di soluzione NaOH 1 M e 1 mL di soluzione di HEPES 30 mM ed infine altri 3 mL di acqua distillata si ottiene una soluzione 40 mM che viene utilizzata per i liposomi PE/PG. Per i liposomi PC/Ch, si prepara una soluzione 50,2 mM, pesando 113.4 mg di CF e procedendo in maniera analoga alla soluzione precedente. Le *vial* contenenti le due soluzioni vengono avvolte con carta d'alluminio in modo da evitare il contatto con la luce.
- *Soluzione Triton 10%*: si preparano 100 mL di soluzione al 10% diluendo di 10 volte la soluzione commerciale di Triton X-100.

Si procede evaporando DCM con flusso di N₂, dalle provette contenenti i lipidi; quindi, si lascia in essiccatore per 2 ore. Trascorso il tempo necessario, si aggiungono 5 mL di *soluzione CF* alle rispettive provette, si copre con carta d'alluminio e si lascia ad incubare per una notte, durante la quale avverrà la formazione dei liposomi. Il giorno seguente, si immergono le provette in un bagno di ghiaccio e si sonica per 1 ora, al fine di distruggere i liposomi *multilayer*, ottenendo esclusivamente quelli *monolayer*. Per separare i liposomi da CF in eccesso rimasta in soluzione, si utilizza una colonna cromatografica ad esclusione dimensionale, con Sephadex come fase solida e la *soluzione NaCl 100 mM tamponata con HEPES 5mM* come fase mobile. Le soluzioni contenenti i liposomi escono in testa alla colonna e assumono una colorazione giallo pallido (non fluorescente), queste vengono trasferite in due matracci da 100 mL e vengono portate a volume con la *soluzione NaCl 100 mM tamponata con HEPES 5mM*. A questo punto la soluzione con PE/PG viene diluita prelevando 37.5 mL e portandoli a volume in un matraccio da 250 mL; mentre la soluzione con PC/Ch viene diluita in maniera analoga, ma prelevando 32.5 mL. Si ottengono due soluzioni di liposomi

0.06 mM, che vengono conservate in bagno di ghiaccio e coperte con carta d'alluminio.

Il Test di Leakage utilizza soluzioni 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M in MeOH dei peptidi *all-L-Ac-BMAP(1-18)*, *all-D-Ac-BMAP(1-18)*, *all-L-Ac-PMAP(12-24)* e *all-D-Ac-PMAP(12-24)*; quindi, si pesano i peptidi in modo da ottenere circa 1 mL di soluzione 10^{-3} M e si preparano per diluizione le altre due soluzioni (prelevando 100 μ L e aggiungendo 900 μ L di MeOH). Inoltre, si preparano tre soluzioni in MeOH, a concentrazioni identiche alle precedenti, del peptide Tricogina GA IV utilizzato come riferimento.

Si procede con le misure, la cui procedura è identica per i liposomi PE/PG e PC/Ch. Per ciascuna misura si preparano dodici cuvette monouso in polistirene (cammino ottico 1 cm) in cui si inseriscono 2.5 mL di soluzione 0.6 mM di liposoma. Si determina la fluorescenza di ciascuna cuvetta F_0 , quindi si aggiungono 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L e 75 μ L delle tre soluzioni (quattro aliquote differenti per ogni concentrazione per un totale di dodici), si mescola e si attendono 20 minuti, al termine dei quali si misura la fluorescenza F_t . Infine, si aggiungono 50 μ L di soluzione Triton 10%, si agita e si misura la fluorescenza F_{TOT} .

4.6 Analisi Biologiche

I test biologici per determinare l'attività antimicrobica dei campioni sono stati svolti dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Scocchi del Dipartimento di Life Sciences dell'Università di Trieste.

Determinazione MIC sui campioni di peptide

Per la valutazione dell'attività antimicrobica è stato eseguito il "Broth Microdilution Susceptibility Test" secondo le linee guida suggerite dal Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). I ceppi batterici utilizzati sono *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Diluizioni seriali 1:1 di ciascuna molecola sono state preparate con Mueller-Hinton brodo (MH, Difco) in

micropiastre a 96 pozzetti, in un volume finale di 50 μL . Ad ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 50 μL di sospensione batterica in fase esponenziale di crescita, alla concentrazione di 5×10^5 cellule/mL. Le micropiastre così allestite sono state incubate in termostato a 37°C per consentire la crescita batterica, rilevabile visivamente come torbidità del terreno o come presenza di un fondello nel pozzetto. Il valore di MIC, corrispondente all'ultimo pozzetto limpido, indica la concentrazione più bassa di molecola in grado di inibire la crescita dei microrganismi.

4.7 Funzionalizzazione Cotone

Per funzionalizzare il cotone, si preparano due soluzioni dei peptidi *all*-L-Cys-PMAP(12-24) e *all*-L-Aox-PMAP(12-24) in tampone NaOAc/AcOH (50 mM, pH=4.5); alla soluzione del primo peptide si aggiunge 1 equivalente di TCEP: un agente riducente che evita la formazione di ponti disolfuro. Si esegue una misura di assorbanza a 280 nm (picco di assorbimento Trp $\epsilon = 5690 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) per determinare la concentrazione iniziale delle due soluzioni. In Tabella 4.7. si riportano i dati relativi alle due soluzioni.

Tabella 4.7. Dati relativi alla preparazione delle soluzioni dei peptidi *all*-L-Cys-PMAP(12-24) e *all*-L-Aox-PMAP(12-24).

	Soluzione Cys-PMAP(12-24)		Soluzione Aox-PMAP(12-24)
	Cys-PMAP(12-24)	TCEP	Aox-PMAP(12-24)
Massa Pesata (mg)	28.0	5.4	25.2
MW (g/mol)	1713.3	286.6	1682.19
Moli (mol)	0.016	0.019	0.015
Volume (mL)	10.0		10.0
Conc. Teorica (mM)	1.634		4.498
Assorbanza (Au)	0.585		0.480
Conc. Calcolata (mM)	1.028		0.844

Si aggiungono alle due soluzioni un dischetto di cotone ossidato ciascuna (ossidazione con un ciclo catalitico TEMPO/Laccasi) e si monitora l'andamento

della reazione determinando l'assorbanza, quindi la concentrazione della soluzione. Infine, si determina il *Loading cotone (mmol/g)* utilizzando l'Equazione 3.5. In Tabella 4.8. si riporta l'andamento della reazione.

Tabella 4.8. Andamento della reazione di funzionalizzazione del cotone.

R1 Cys-PMAP(12-24)			R1 Aox-PMAP(12-24)		
t (h)	Abs (Au)	Conc. (mM)	t (h)	Abs (Au)	Conc. (mM)
0	0.585	1.028	0	0.480	0.844
1.5	0.548	0.963	1.5	0.474	0.833
3.5	0.537	0.944	3.5	0.476	0.837
5.5	0.537	0.944	5.5	0.471	0.828
24	0.516	0.907	24	0.454	0.798
48	0.506	0.889	48	0.455	0.800
m cotone (mg)	Loading cotone (mmol/g)		m cotone (mg)	Loading cotone (mmol/g)	
24.6	0.056		25.5	0.017	

Al termine della reazione si lavano i dischetti di cotone con H₂O e MeOH, quindi si mettono in essiccatore. Si esegue un *Kaiser Test* per verificare l'effettiva presenza del peptide legato al tessuto. Si taglia un pezzetto di cotone dai due dischetti e si inserisce in una provetta, si aggiungono 40 µL di ciascuno dei tre reagenti del Kaiser Test Kit, si scalda la provetta a 120°C per 5 min e si osserva il colore assunto dal pezzetto di cotone. Se il pezzetto si colora di blu il test è positivo e significa che sono presenti dei gruppi -NH₂ liberi, che confermano la presenza del peptide legato al cotone.

Le soluzioni dei due peptidi vengono filtrate e riutilizzate altre due volte. In Tabella 4.9. si riporta l'andamento delle reazioni.

Tabella 4.9. Andamento della reazione di funzionalizzazione del cotone.

R2 Cys-PMAP(12-24)			R2 Aox-PMAP(12-24)		
t (h)	Abs (Au)	Conc. (mM)	t (h)	Abs (Au)	Conc. (mM)
0	0.433	0.761	0	0.418	0.735
2	0.427	0.750	2	0.412	0.724
4	0.426	0.749	4	0.409	0.719
6	0.412	0.724	6	0.413	0.726
24	0.409	0.719	24	0.400	0.703
m cotone (mg)	Loading cotone (mmol/g)		m cotone (mg)	Loading cotone (mmol/g)	
31.9	0.015		24.9	0.014	
R3 Cys-PMAP(12-24)			R3 Aox-PMAP(12-24)		
t (h)	Abs (Au)	Conc. (mM)	t (h)	Abs (Au)	Conc. (mM)
0	0.377	0.663	0	0.403	0.708
2	0.376	0.661	2	0.393	0.691
4	0.380	0.668	4	0.382	0.671
6	0.373	0.656	6	0.396	0.696
24	0.363	0.638	24	0.393	0.691
48	0.364	0.640	48	0.380	0.668
120	0.359	0.631	120	0.377	0.663
m cotone (mg)	Loading cotone (mmol/g)		m cotone (mg)	Loading cotone (mmol/g)	
14.7	0.022		16.0	0.029	

5. Conclusioni

In questo elaborato di tesi sono stati studiati analoghi dei peptidi antimicrobici BMAP-27(1-18) e PMAP-36(12-24) con tutti L-AA e tutti D-AA. La scelta di accorciare la sequenza originale viene dettata dall'interesse di individuare peptidi che mantengano la loro struttura elicoidale e la loro attività, pur riducendo il numero di amminoacidi rendendo, così, la sintesi stessa più semplice e conveniente. Inoltre, l'impiego di amminoacidi in configurazione D viene utilizzato per migliorare la stabilità dei peptidi ad ambienti proteolitici.

Inoltre, si lega al peptide *all*-L-PMAP(12-24) un residuo di cisteina e un residuo di acido aminossiacetico ottenendo due analoghi impiegati per la funzionalizzazione del cotone attraverso la formazione di tiazolidina e ossima.

La sintesi di tutti i peptidi viene svolta con la tecnica SPPS utilizzando la strategia Fmoc/t-Bu. I prodotti finali presentano una purezza intorno al 95%.

Uno studio di degradazioni enzimatiche con Tripsina, enzima specifico per residui di Lys e Arg, ha permesso di confrontare la stabilità degli analoghi peptidici in un ambiente proteolitico. È emerso che i peptidi con tutti amminoacidi L degradano in tempi inferiori alla mezz'ora, dato il grande numero di residui di Lys e Arg nelle loro sequenze; mentre i peptidi con tutti amminoacidi D non degradano affatto. Si conclude che l'utilizzo di amminoacidi non proteinogenici in configurazione D rappresenti una buona strategia per il superamento del principale limite degli AMPs, ovvero la loro instabilità in ambienti proteolitici fisiologici. Tuttavia, per ottenere un profilo più dettagliato della stabilità dei peptidi, lo studio andrebbe condotto in siero, che meglio riproduce le condizioni fisiologiche degli organismi viventi.

La struttura dei peptidi, in soluzione, viene determinata con le tecniche CD e NMR. Tutti gli analoghi in PBS assumono una conformazione *random coil*, mentre sono elicoidali in TFE e SDS. In particolare, gli spettri CD hanno permesso di osservare che peptidi con D-AA formano un'elica levogira, con senso di rotazione opposto ai rispettivi enantiomeri.

La struttura dei peptidi viene messa in relazione alla loro capacità di interagire con le membrane lipidiche. La capacità di permeare le membrane viene valutata attraverso un *test di leakage*, dal quale emerge che il senso di rotazione dell'elica non influisce sull'attività dei peptidi. Le analisi biologiche condotte *in vitro* di MIC

e MBC vanno in accordo con i risultati del *test di leakage*. Si osserva alta attività verso i ceppi batterici *E. coli* (GRAM-), *A. baumannii* (GRAM-), *K. pneumoniae* (GRAM-), *P. aeruginosa* (GRAM-) e *S. epidermidis* (GRAM+) per i peptidi PMAP(12-24) e verso il ceppo batterico *S. epidermidis* (GRAM+) per i peptidi BMAP(1-18).

Dagli esperimenti di funzionalizzazione del cotone con PMAP(12-24) si conclude che entrambi i tipi di legame utilizzati, tiazolidina e ossima, possono essere impiegati con successo per legare il peptide alla matrice di cellulosa ossidata. Resta da valutare l'attività dei tessuti funzionalizzati, così ottenuti, rispetto ai ceppi batterici sopracitati.

In conclusione, lo scopo della tesi è stato raggiunto. L'accorciamento delle sequenze peptidiche e l'utilizzo di amminoacidi in conformazione D hanno permesso di ottenere analoghi più stabili e con alta attività antibiotica. Nel futuro potrebbe essere interessante funzionalizzare il cotone, anche, con peptidi *all-D-AA* per combinare le proprietà di questi analoghi peptidici con le particolari caratteristiche del cotone.

6. Bibliografia

- [1] G. Fadda, A. Grossi, P. D. A. Fortunato, <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/resistenza>, Last access: 27/10/2023
- [2] C. L. Ventola, *Pharmacy and therapeutics* **2015**, *40*, 277.
- [3] https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_en#ref-2017-eu-one-health-action-plan-against-amr, Last access: 27/10/2023
- [4] H. Jenssen, P. Hamill, R. E. W. Hancock, *Clinical Microbiology Reviews* **2006**, *19*, 491.
- [5] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2016**, *6*.
- [6] A. Granados, R. Pleixats, A. Vallribera, *Molecules* **2021**, *26*, 3008.
- [7] E. M. Kościuczuk, P. Lisowski, J. Jarczak, N. Strzałkowska, A. Józwik, J. Horbańczuk, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski, E. Bagnicka, *Molecular Biology Reports* **2012**, *39*, 10957.
- [8] R. Kumar, S. A. Ali, S. K. Singh, V. Bhushan, M. Mathur, S. Jamwal, A. K. Mohanty, J. K. Kaushik, S. Kumar, *Veterinary Sciences* **2020**, *7*, 206.
- [9] J. Lei, L. Sun, S. Huang, C. Zhu, P. Li, J. He, V. Mackey, D. H. Coy, Q. He, *American journal of translational research* **2019**, *11*, 3919.
- [10] A. Som, S. Vemparala, I. Ivanov, G. N. Tew, *Peptide Science* **2008**, *90*, 83.
- [11] K. A. Brogden, *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3*, 238.
- [12] University of Nebraska Medical Center, <https://aps.unmc.edu/database/peptide>, Last access: 10/11/2023
- [13] B. Skerlavaj, R. Gennaro, L. Bagella, L. Merluzzi, A. Risso, M. Zanetti, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 28375.
- [14] S. Yang, C. W. Lee, H. J. Kim, H.-H. Jung, J. I. Kim, S. Y. Shin, S.-H. Shin, *Peptides* **2019**, *118*, 170106.
- [15] S. Yang, Jung, H., Kim, J., <https://doi.org/10.2210/pdb2KET/pdb>, Last access: 10/11/2023
- [16] M. Mardirossian, A. Pompilio, V. Crocetta, S. De Nicola, F. Guida, M. Degasperi, R. Gennaro, G. Di Bonaventura, M. Scocchi, *Amino Acids* **2016**, *48*, 2253.
- [17] M. R. Scheenstra, M. van den Belt, J. L. M. Tjeerdsma-van Bokhoven, V. A. F. Schneider, S. R. Ordonez, A. van Dijk, E. J. A. Veldhuizen, H. P. Haagsman, *Scientific Reports* **2019**, *9*, 4780.
- [18] M. Scocchi, I. Zelezetsky, M. Benincasa, R. Gennaro, A. Mazzoli, A. Tossi, *The FEBS Journal* **2005**, *272*, 4398.
- [19] Y. Lv, J. Wang, H. Gao, Z. Wang, N. Dong, Q. Ma, A. Shan, *PLOS ONE* **2014**, *9*, e86364.
- [20] R. Gennaro, M. Zanetti, *Peptide Science* **2000**, *55*, 31.
- [21] B. Biondi, L. De Pascale, M. Mardirossian, A. Di Stasi, M. Favaro, M. Scocchi, C. Peggion, *Scientific Reports* **2023**.
- [22] K. Browne, S. Chakraborty, R. Chen, M. D. Willcox, D. S. Black, W. R. Walsh, N. Kumar, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 7047.
- [23] Y. Han, M. Zhang, R. Lai, Z. Zhang, *Peptides* **2021**, *146*, 170666.

- [24] P. Slominsky, M. Shadrina, *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* **2018**, *33*, 8.
- [25] J. Fetse, S. Kandel, U.-F. Mamani, K. Cheng, *Trends in Pharmacological Sciences* **2023**.
- [26] A. G. Jamieson, N. Boutard, D. Sabatino, W. D. Lubell, *Chemical Biology & Drug Design* **2013**, *81*, 148.
- [27] Z. Feng, B. Xu, *Biomolecular Concepts* **2016**, *7*, 179.
- [28] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.
- [29] W. Chan, P. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, OUP Oxford, **1999**, p.
- [30] F. Albini, *Study of the Cellulose-peptide Conjugation for the Development of Antimicrobial Cotton Textiles*, Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, **2022**.
- [31] E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. Cook, *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595.
- [32] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 5012.
- [33] Bachem, *TIPS AND TRICKS FOR SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS FROM THE EXPERTS AT BACHEM* **2014**.
- [34] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 4645.
- [35] L. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*, 5748.
- [36] J. E. Sheppeck II, H. Kar, H. Hong, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 5329.
- [37] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 2455.
- [38] B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 2761.
- [39] E. Valeur, M. Bradley, *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 606.
- [40] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2279.
- [41] M. Friedman, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 385.
- [42] S. B. Kent, *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 338.
- [43] M. Schnölzer, S. B. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221.
- [44] J. P. TAM, C. RAO, C. F. LIU, J. SHAO, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1995**, *45*, 209.
- [45] C.-F. Liu, J. P. Tam, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 4149.
- [46] K. Rose, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 30.
- [47] T. P. King, S. W. Zhao, T. Lam, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5774.
- [48] S. Goyal, S. C. Khot, V. Ramachandran, K. P. Shah, D. M. Musher, *American Journal of Infection Control* **2019**, *47*, 994.
- [49] A. Orlandin, F. Formaggio, A. Toffoletti, C. Peggion, *Journal of Peptide Science* **2014**, *20*, 547.
- [50] S. Scapin, F. Formaggio, A. Glisenti, B. Biondi, M. Scocchi, M. Benincasa, C. Peggion, *Macromolecular Bioscience* **2020**, *20*, 2000199.
- [51] F. Albini, B. Biondi, L. Lastella, C. Peggion, *Cellulose* **2023**, *1*.
- [52] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, A. Bohn, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 3358.

- [53] W. Rick in *Trypsin*, Elsevier, **1974**, p. 1013.
- [54] R. W. Woody in *Circular Dichroism of Peptides*, Elsevier, **1985**, p. 15.
- [55] P. Luo, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413.
- [56] K. Bakshi, M. R. Liyanage, D. B. Volkin, C. R. Middaugh, *Therapeutic Peptides: Methods and Protocols* **2014**, 247.
- [57] D. Wade, A. Boman, B. Wåhlin, C. Drain, D. Andreu, H. G. Boman, R. Merrifield, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*, 4761.
- [58] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 2744.
- [59] N. H. Andersen, Z. Liu, K. S. Prickett, *FEBS letters* **1996**, *399*, 47.
- [60] S. Mammi, E. Peggion, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5265.
- [61] C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 7870.
- [62] A. Bax, D. G. Davis, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1985**, *63*, 207.
- [63] K. Wüthrich, *Europhysics News* **1986**, *17*, 11.
- [64] J. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, T. Villa, *Biochemical Pharmacology* **2017**, *133*, 117.
- [65] A. Giacometti, O. Cirioni, A. Schimizzi, M. Del Prete, F. Barchiesi, M. M. D'Errico, E. Petrelli, G. Scalise, *Journal of Clinical Microbiology* **2000**, *38*, 918.
- [66] G. Ayliffe, *Reviews of Infectious Diseases* **1991**, *13*, S800.
- [67] M. H. Cardoso, E. S. Cândido, K. G. Oshiro, S. B. Rezende, O. L. Franco in *Peptides containing d-amino acids and retro-inverso peptides: general applications and special focus on antimicrobial peptides*, Elsevier, **2018**, p. 131.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questa tesi ci tengo a ringraziare la Prof.ssa Cristina Peggion, la mia relatrice, che mi ha permesso di svolgere il mio lavoro di ricerca nel suo laboratorio e mi ha guidato con tranquillità ed esperienza in questi mesi.

Ringrazio, poi, la mia controrelatrice Prof.ssa Barbara Fresch per la disponibilità, nonostante i problemi burocratici della segreteria.

Ringrazio il gruppo di ricerca del Prof. Marco Scocchi dell'Università di Trieste per le analisi biologiche.

Inoltre, devo ringraziare anche la Prof.ssa Barbara Biondi e tutti i dottorandi e gli assegnisti del gruppo di ricerca Formaggio, che hanno sempre avuto buoni consigli da darmi nei momenti di necessità; menzione speciale per Francesca e Luana. Francesca mi ha insegnato tutto sulla sintesi dei peptidi, la funzionalizzazione del cotone e la creazione di illustrazioni per tesi e presentazioni. Luana c'è sempre stata nel momento del bisogno, che fosse per indicarmi la posizione di un solvente o per fare e rifare le degradazioni enzimatiche.

Un ringraziamento speciale ai miei amici: a Bolo e Balda su cui ho sempre potuto contare negli ultimi dieci anni, a Bea, Giulia e Perry che hanno reso unico questo percorso universitario e a Nello miglior compagno di laboratorio.

Ringrazio infinitamente la mia fidanzata Gioia, che mi ha sempre supportato e sopportato; se ho raggiunto questo obiettivo è anche merito suo.

Ed infine ringrazio mio fratello Marco e i miei genitori Carla e Gianni, che mi sono sempre stati vicini, hanno sostenuto e appoggiato le mie decisioni, ma soprattutto mi hanno finanziato gli studi!