

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA
INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Nuovi composti peptidici antibatterici e antivirali: sintesi e
studi conformazionali**

Relatore: Prof. Cristina Peggion

Controrelatore: Prof. Marilena Di Valentin

Laureando: Martin Lisa Clelia

ANNO ACCADEMICO 2025/26

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1. Peptidi antimicrobici	5
1.2. AMP antibatterici.....	5
1.2.1. Peptide LL-37	7
1.2.2. Conformazione dei peptidi contenenti Aib	9
1.3. Peptidi antivirali.....	12
1.3.1. West Nile Virus.....	14
2. SCOPO DELLA TESI	17
3. PARTE SPERIMENTALE	20
3.1. Materiali e metodi	20
3.1.1. Reagenti e solventi	20
3.1.2. Strumentazione e metodi.....	20
3.2. Sintesi e caratterizzazione	22
3.2.1. Sintesi degli analoghi di LL-37	25
3.2.2. Sintesi dei peptidi retro-inversi.....	29
3.2.3. Sintesi dei derivati di P29	32
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	35
4.1. Sintesi di peptidi	35
4.1.1. Sintesi su fase solida.....	35
4.1.2. Resina	37
4.1.3. Gruppi protettori	38
4.1.4. Attivazione degli amminoacidi	40
4.1.5. Kaiser test	41
4.1.6. Ossidazione della serina	42
4.1.7. Derivati del P29.....	46
4.2. Indagini conformazionali	51
4.2.1. Dicroismo circolare	51
4.3. Test biologici	56
4.3.1. Disk diffusion test.....	56
4.3.2. Saggio di inibizione dell'attività proteasica di NS2B-NS3	58

5. CONCLUSIONI	61
6. INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI	63
6.1. Spettri degli analoghi di LL-37.....	63
6.2. Spettri dei peptidi retro-inversi	67
6.3. Spettri dei derivati di P29	69
7. BIBLIOGRAFIA.....	73
8. RINGRAZIAMENTI.....	77

ABBREVIAZIONI

AA	Amminoacido/i
Ac	Acetile
Aib (U)	Acido α -amminoisobutirrico
AMP	Peptidi antibatterici
Arg (R)	Arginina
AVP	Peptidi antivirali
BBB	Barriera emato-encefalica
CD	Dicroismo circolare
CH₃CN	Acetonitrile
Cys (C)	Cisteina
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'- Diisopropilcarbodiimmide
DIPEA	N,N-diisopropiletilammina
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DODT	3,6-Diosso-1,8-octanditiolo
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
Glu (E)	Acido glutammico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Istidina
I (Ile)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
NaIO₄	Periodato di sodio
Ossima	Etil(idrossimmino)cianoacetato
Pal	Acido palmitico
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildiidrorobenzofurano-5-sulfonile
Phg	Fenilglicina
SDS	Sodiododecilsolfato
Ser (S)	Serina
SPPS	Sintesi peptidica su fase solida
tBu	Tert-butil

TFA	Acido trifluoroacetico
TFE	2,2,2-Trifluoroetano
TIS	Triisopropilsilano
Trp (W)	Triptofano
Trt	Trityl
WNV	West Nile Virus

ABSTRACT

Il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno di due linee di ricerca differenti, accomunate dalla sintesi di peptidi per il trattamento di infezioni. Tutti i peptidi sono stati ottenuti mediante sintesi peptidica su fase solida (SPPS).

Nell'ambito dei peptidi antimicrobici antibatterici, il lavoro si è focalizzato sulla sintesi e purificazione di diversi analoghi del peptide LL-37, peptide antimicrobico dell'epidermide umana, noto per il suo ruolo nel sistema immunitario e nella difesa dell'ospite nei siti di infiammazione. Il primo obiettivo è stata la sintesi di peptidi corti la cui sequenza corrisponde ad una porzione del peptide LL-37. In alcuni di questi peptidi, l'amminoacido Serina, responsabile dell'interruzione della faccia idrofobica dell' α -elica, è stato sostituito con l'amminoacido C $^{\alpha}$ -tetrasostituito Aib, che stabilizza la struttura α -elica, con lo scopo di aumentare l'ellitticità del peptide. L'estremità N-terminale dei peptidi progettati è stata protetta con il gruppo acetile oppure con l'acido palmitico, per valutare se la catena introdotta potesse avere un ruolo nell'interazione con le membrane batteriche. Gli studi conformazionali mediante dicroismo circolare hanno dimostrato che la sostituzione della Serina con l'Aib induce i peptidi ad assumere una conformazione più ordinata in soluzione. I test biologici (*disk diffusion test*) hanno evidenziato che la presenza dell'acido palmitico e la presenza di Aib influiscono sull'attività antibatterica dei peptidi, aumentandola.

Il secondo studio si è sviluppato nell'ambito dei peptidi antivirali (AVP), sulla sintesi e l'ottimizzazione di potenziali peptidi inibitori del West Nile Virus (WNV). Questo virus, nella maggior parte dei casi, si manifesta in una forma non neuroinvasiva, caratterizzata da sintomi simil-influenzali, ma provoca mortalità fino al 20% dei casi nei soggetti che presentano sintomi neuroinvasivi. Al momento non esistono vaccini o terapie approvate contro questo virus, rendendo fondamentale la ricerca di nuovi composti antivirali. Il genoma virale presenta diversi enzimi e cofattori come possibili siti d'attacco per potenziali inibitori, tra cui la proteasi NS2B-NS3, che è coinvolta nel processamento e nella replicazione della poliproteina virale. La prima classe di composti sintetizzata è quella dei peptidi retro-inversi, caratterizzati dalla presenza di amminoacidi D e dalla sequenza invertita rispetto a quella del peptide riferimento che contiene amminoacidi L. La seconda classe di inibitori del WNV studiata è quella dei derivati del peptide P29, un peptide disegnato per inibire la proteasi NS2B-NS3 del virus Dengue e precedentemente

sintetizzato all'interno del gruppo di ricerca, che ha mostrato una promettente capacità di attraversare la barriera emato-encefalica (BBB) e una significativa attività inibitoria in vitro, ma ha anche presentato citotossicità e assenza di attività antivirale in saggi cellulari, rendendo necessaria l'ottimizzazione. In collaborazione con l'Università di Lisbona sono stati effettuati studi computazionali che hanno permesso di identificare alcuni composti con maggiore attività e minore citotossicità rispetto al peptide P29, valutando principalmente la loro capacità teorica di attraversare la barriera emato-encefalica, con lo scopo di veicolare i peptidi direttamente nel sistema nervoso centrale, sito d'azione del WNV. I peptidi sintetizzati sono stati caratterizzati mediante dicroismo circolare alla ricerca di una conformazione da correlare alla loro attività e modalità d'azione, rivelando tuttavia una struttura prevalentemente disordinata.

Nel complesso, questo lavoro di tesi ha permesso lo studio di modifiche strutturali di analoghi del peptide LL-37, migliorandone l'attività antibatterica, e ha posto le basi per l'ottimizzazione di peptidi inibitori del WNV.

1. INTRODUZIONE

1.1. Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici (AMP) costituiscono un gruppo eterogeneo di piccoli peptidi cationici e anfipatici che presentano differenze a livello di struttura primaria e secondaria, di potenziale antimicrobico e di effetti sulle cellule ospiti. Gli AMP rappresentano una componente fondamentale del sistema immunitario e svolgono un ruolo chiave nella risposta immunitaria iniziale a lesioni e infezioni. Infatti, grazie alle loro proprietà inibitorie e immunomodulatorie, essi forniscono una risposta rapida alle infezioni causate da batteri, virus, funghi o protozoi.¹⁻³

In base alla struttura conformazionale e alla composizione, è possibile suddividere gli AMP in diverse sottofamiglie. Tra le più studiate ci sono le famiglie dei peptidi antimicrobici dei mammiferi: le cathelicidine e le defensine, di cui si riportano le principali differenze:

- **Cathelicidine:** sono peptidi tipicamente lineari che presentano una regione N-terminale chiamata dominio *cathelin*, avente una struttura a α -elica anfipatica, e un dominio antimicrobico altamente variabile al C-terminale. Nell'essere umano è espressa una sola cathelicidina, il peptide antimicrobico cationico umano 18, anche indicato come LL-37.¹⁻³
- **Defensine:** sono peptidi cationici che presentano, nella maggior parte dei casi, sei residui di cisteina che formano tre legami disolfuro intramolecolari, i quali stabilizzano la struttura a β -foglietto. Esse modulano le risposte immunitarie svolgendo così un ruolo centrale nell'immunità innata.¹⁻³

In questo lavoro di tesi verrà approfondita l'attività antibatterica ed antivirale degli AMP.

1.2. AMP antibatterici

Le proprietà antibatteriche degli AMP sono fortemente legate alla presenza di cariche positive, fornite dai residui di lisina, istidina e arginina, che rappresentano una caratteristica fondamentale per l'interazione con le membrane batteriche, pur non essendo l'unico fattore ad assicurarne l'efficacia. La carica positiva facilita le interazioni elettrostatiche con i fosfolipidi caricati negativamente presenti sulla membrana batterica,

provocando la morte della cellula batterica.^{2,4} Nonostante il meccanismo d'azione esatto degli AMP non sia ancora noto, i modelli più accettati sono due:

- **Modello “a doghe di botte”** (Figura 1): gli AMP, in conformazione elicoidale, si legano alla membrana batterica con un orientamento parallelo ad essa, con la superficie anfipatica a contatto con lo strato lipidico. Successivamente, i peptidi si riorientano in posizione perpendicolare al doppio strato, aggregandosi in dimeri o multimeri. In seguito all'aggregazione, i multimeri si inseriscono nella membrana, con la parte idrofobica rivolta verso il doppio strato lipidico e la parte idrofilica rivolta verso l'interno del poro appena formato. Con l'aggiunta di altri monomeri, aumenta la dimensione del poro, causando la fuoriuscita del contenuto cellulare e portando alla morte della cellula.

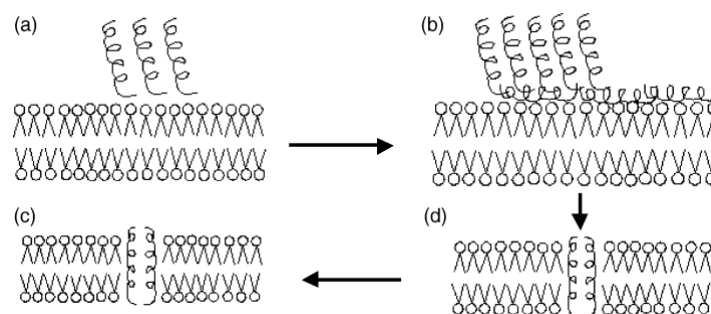


Figura 1 Rappresentazione del modello "a doghe di botte". Si mostrano i vari step a) i monomeri si legano alla membrana batterica, b) aggregazione degli AMP, c) inserzione all'interno della membrana e formazione del poro.⁵

- **Modello “a tappeto”** (Figura 2): gli AMP ricoprono la superficie esterna della membrana interagendo con i gruppi di testa dei fosfolipidi. Successivamente, i monomeri peptidici si allineano alla superficie della membrana, con la superficie idrofilica rivolta verso i gruppi di testa e la superficie idrofobica a contatto con la parte superiore del doppio strato fosfolipidico. Quando la membrana è interamente coperta dagli AMP, questi la disgregano formando delle strutture simili a micelle, causando la morte cellulare.

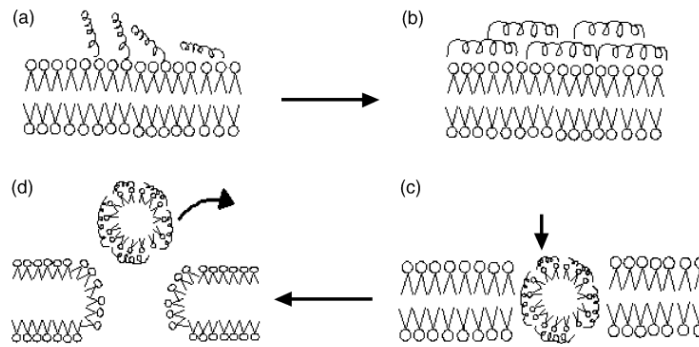


Figura 2 Rappresentazione del modello "a tappeto". Si mostrano i vari step: a) interazione degli AMP con i gruppi di testa dei fosfolipidi, b) allineamento dei monomeri alla superficie della membrana, c) formazione della struttura simil-micellare, d) rottura della membrana e morte della cellula batterica.⁵

Gli AMP sono in grado di attaccare selettivamente le membrane batteriche, lasciando intatte le membrane delle cellule eucariote. Questa selettività può essere spiegata sotto diversi aspetti, come la natura elettrostatica delle interazioni peptide-membrana e la differente composizione delle due membrane. Le membrane batteriche, infatti, presentano una carica netta negativa, che porta ad interazioni elettrostatiche più forti con i peptidi di natura cationica. Le membrane cellulari eucariote invece, essendo costituite prevalentemente da fosfolipidi zwitterionici e quindi con una carica complessiva neutra, instaurano interazioni più deboli. Inoltre, la presenza di colesterolo nelle membrane cellulari umane conferisce maggior stabilità alla membrana, sfavorendo l'inserzione degli AMP.⁵⁻⁷

In particolare, le cathelicidine presentano un'elevata attività antimicrobica contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi.³

1.2.1. Peptide LL-37

La famiglia delle cathelicidine è riconoscibile per la presenza di un dominio "cathelin" altamente conservato. La proteina cathelicidina è espressa come precursore contenente un peptide segnale all'N-terminale, seguito dal dominio "cathelin" e dalla regione antimicrobica al C-terminale. Questo precursore viene successivamente scisso proteoliticamente fino ad ottenere il peptide antimicrobico cathelicidina attivo. Negli esseri umani è stata identificata una sola cathelicidina, chiamata peptide antimicrobico cationico umano 18, indicato come hCAP18. Dopo il rilascio, l'estremità C-terminale di hCAP18, costituita da 37 amminoacidi, viene scissa proteoliticamente, formando il peptide antimicrobico funzionale LL-37.⁸⁻¹⁰

LL-37 svolge un ruolo fondamentale nel sistema immunitario. Oltre a possedere un'elevata attività antimicrobica ad ampio spettro, svolge importanti funzioni immunomodulatorie: è in grado di richiamare cellule immunitarie nei siti di infezione e di stimolare la secrezione di mediatori immunitari. Nei siti di infiammazione sono state infatti rilevate delle elevate concentrazioni di LL-37, che contribuisce alla prima linea di difesa dell'ospite. A seconda del microambiente e dal contesto patologico, LL-37 può esercitare effetti pro-infiammatori o antinfiammatori.^{8,11,12}

Si riporta di seguito la sequenza del peptide LL-37:



Il peptide LL-37 presenta 11 amminoacidi basici e 5 acidi, conferendo al peptide una carica netta di +6 a pH fisiologico. In soluzione acquosa assume una struttura disordinata, mentre subisce una transizione strutturale a α -elica nelle seguenti condizioni: alte concentrazioni, presenza di sali, presenza di detergenti o lipidi. Per spiegare questo effetto si considera un ambiente lipofilo, come quello di membrana. In questa condizione molti amminoacidi possono formare legami idrogeno intramolecolari: i gruppi N-H della catena principale donano un legame idrogeno ai gruppi C=O situati quattro amminoacidi più indietro nella sequenza, stabilizzando la struttura a α -elica.^{8,11} Dalla Figura 3 possiamo osservare la natura anfipatica dell'elica.

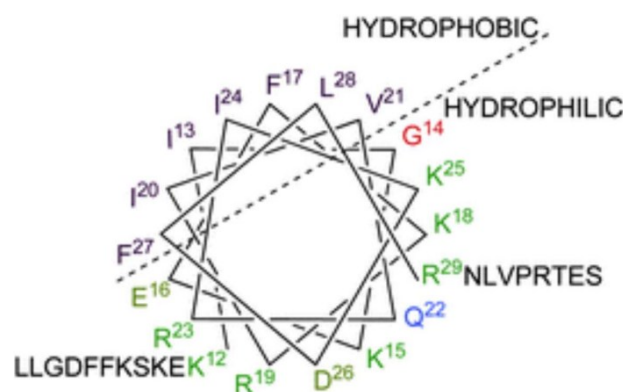


Figura 3 Helical wheel del peptide LL-37. Si osserva la natura anfipatica dell'elica⁸.

È stato osservato che LL-37 risulta citotossico per le cellule eucariotiche, probabilmente a causa di interazioni idrofobiche con la membrana cellulare eucariotica. Tale tossicità si manifesta attraverso diversi effetti: l'induzione di emolisi, tossicità per i leucociti umani e per la linea cellulare di linfociti T, e promozione dell'apoptosi nelle cellule muscolari

lisce vascolari. Gli effetti citotossici vengono inibiti dal legame di LL-37 con le proteine plasmatiche, comportando però anche ad una diminuzione degli effetti antimicrobici del peptide.

Per arginare questi problemi, è stato ridotto il contenuto idrofobico del peptide, rimuovendo i primi quattro amminoacidi N-terminali, generando il frammento 110, riportato di seguito.

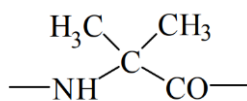


Questo analogo risulta significativamente meno citotossico per le cellule umane rispetto al peptide nativo, conservando la sua azione antimicrobica e l'attività immunomodulatoria. Inoltre, subisce una minore inibizione da parte delle proteine plasmatiche. È stato inoltre scoperto che un peptide identico al Frammento 110 si forma naturalmente sulla pelle, indicando un potenziale ruolo fisiologico nella difesa dell'organismo.¹⁰

Nel presente lavoro di tesi, è stata sintetizzata una serie di peptidi a partire dal frammento 110, sostituendo l'amminoacido serina con l'amminoacido Aib, che è idrofobico e stabilizzante dell' α -elica. L'amminoacido Aib è in grado di condizionare la struttura tridimensionale del peptide che lo contiene. Di seguito si riassumono brevemente le conformazioni note per i peptidi contenenti Aib.

1.2.2. Conformazione dei peptidi contenenti Aib

L'Aib è il più semplice amminoacido C^α -tetrasostituito (Figura 4). Attraverso calcoli di energia conformazionale è stato evidenziato che la presenza dei due gruppi metilici sul C^α causa una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile all'Aib, confinandolo alle sole regioni delle conformazioni elicoidali di tipo α (Figura 5) e 3_{10} (Figura 6). La differenza di energia tra queste due strutture elicoidali è molto piccola.¹³



Aib

Figura 4 Amminoacido C^α -tetrasostituito Aib inserito nella catena di peptidi antimicrobici.

L'Aib è un amminoacido achirale; dunque, un'elica che lo contiene non ha preferenza tra i due sensi di avvolgimento, poiché le forme destrogira e sinistrogira sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. In presenza di altri residui chirali nella struttura, il senso di spiralizzazione dell'elica è definito dalla chiralità di questi: gli L-amminoacidi favoriscono l'elica destrogira, mentre i D-amminoacidi quella sinistrogira.

Qui di seguito vengono riportate le caratteristiche delle strutture a α -elica ed elica 3_{10} , entrambe destrogire, i cui parametri sono raccolti in Tabella 1.

<i>Parametri</i>	<i>Elica 3_{10}</i>	<i>Elica α</i>
ϕ	-57°	-63°
ψ	-30°	-42°
<i>Angolo del legame idrogeno $N-H \cdots O=C$</i>	128°	156°
<i>Rotazione per residuo</i>	111°	99°
<i>Traslazione assiale per residuo</i>	1,94 Å	1,56 Å
<i>Numero di residui per giro</i>	3,24	3,63
<i>Passo dell'elica</i>	6,29 Å	5,67 Å

Tabella 1 Parametri per le eliche destrogire di tipo 3_{10} e α .

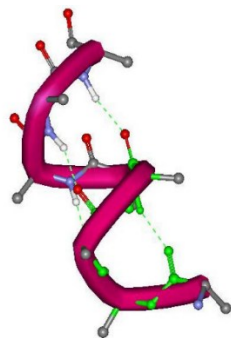


Figura 5 α -elica destrogira.

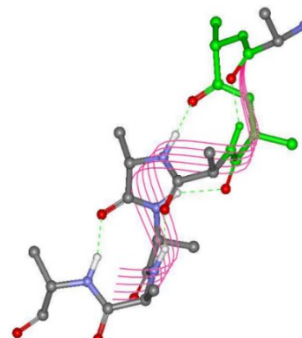


Figura 6 elica 3_{10} destrogira.

In Figura 7 viene rappresentata una catena polipeptidica in conformazione completamente estesa, in cui sono indicati gli angoli torsionali e le notazioni raccomandate per gli atomi.

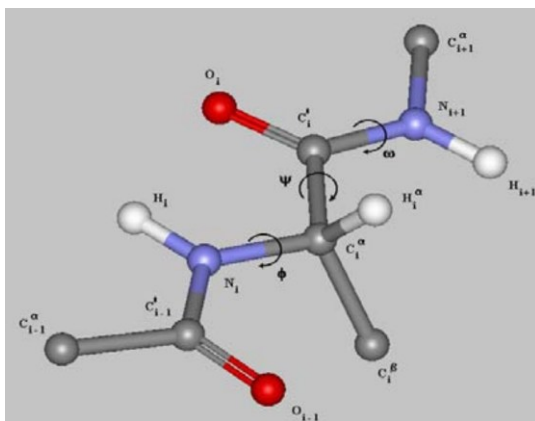


Figura 7 Rappresentazione di due unità peptidiche nella conformazione completamente estesa: $\Phi_i = \Psi_i = \omega_i = 180^\circ$.

L' α -elica è caratterizzata da 3,63 residui per giro e questa conformazione è stabilizzata da legami ad idrogeno intramolecolari che si formano tra un gruppo carbonilico del residuo i ed il protone ammidico del quarto residuo successivo, $i+4$. Il legame ad idrogeno formato chiude un ciclo comprendente 13 atomi.

L'elica 3_{10} presenta invece 3,24 residui per giro, ed è caratterizzata da legami ad idrogeno intramolecolari tra il gruppo carbonilico di un amminoacido i e il protone ammidico del residuo $i+3$. In questo caso, il legame ad idrogeno chiude un ciclo comprendente 10 atomi (Figura 8).

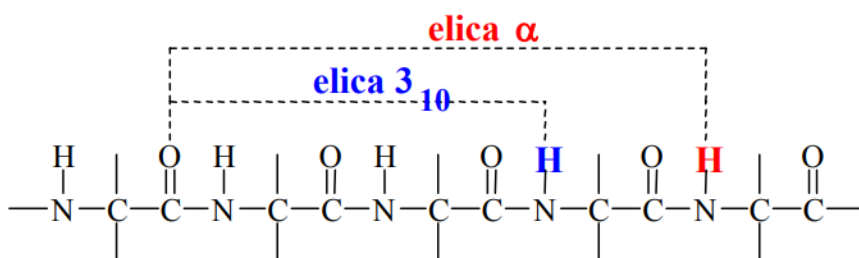


Figura 8 Legami ad idrogeno intramolecolari nell' α -elica e nell'elica 3_{10} .

I peptidi contenenti Aib forniscono cristalli singoli con molta facilità. Da studi conformazionali eseguiti tramite diffrazione a raggi X di diversi omo-oligopeptidi contenenti Aib è risultato che la conformazione adottata allo stato cristallino è solitamente elicoidale di tipo 3_{10} . Inoltre, indagini conformazionali in soluzione mediante assorbimento IR e spettrometria $^1\text{H-NMR}$ hanno dimostrato che tale struttura viene adottata anche in diversi solventi, quali acqua, DMSO e cloroformio.¹⁴⁻¹⁷

Questa preferenza conformazionale negli omo-peptidi è però dipendente dalla lunghezza della catena peptidica. Infatti, studi su sequenze omo-peptidiche hanno dimostrato che catene aventi un numero inferiore a 6 residui di Aib, adottano principalmente una conformazione ad elica 3_{10} . All'aumentare della lunghezza, invece, l'analisi cristallografica di omo-peptidi più lunghi (6-20 residui) ha dimostrato una tendenza preferenziale per l' α -elica, sebbene in alcuni siano state osservate anche eliche 3_{10} o eliche miste $\alpha/3_{10}$.

Per i peptidi misti contenenti Aib in sequenza con altri amminoacidi, invece, la transizione da elica 3_{10} a α -elica è influenzata da diversi fattori quali la lunghezza di catena, il contenuto di Aib, la polarità del solvente, le interazioni intramolecolari, l'efficienza di impaccamento nei cristalli e la sequenza amminoacidica. Inoltre, nei peptidi misti, la sequenza amminoacidica e la posizione dei residui di Aib all'interno della catena possono avere degli effetti non sempre prevedibili nella conformazione finale; tuttavia, un'elevata percentuale di residui di Aib all'interno dei peptidi favorisce la conformazione ad elica 3_{10} .^{15,16}

1.3. Peptidi antivirali

Le infezioni virali sono storicamente tra le principali cause di malattia nell'uomo. Inoltre, la comparsa di pandemie in rapida successione, i lunghi tempi necessari per lo sviluppo di vaccini e l'aumento della resistenza ai farmaci antivirali, hanno evidenziato la necessità di ricercare nuovi composti antivirali. Tra questi, i peptidi, essendo piccole molecole biologiche, stanno emergendo come una fonte promettente per lo sviluppo di nuovi antivirali efficaci e clinicamente utilizzabili. Infatti, alcuni AMP presentano attività contro un'ampia gamma di virus, venendo chiamati peptidi antivirali (AVP).^{18,19}

Per esempio, le defensine e la cathelicidina LL-37 hanno mostrato proprietà antivirali nei confronti di diversi virus, tra i quali il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), il virus dell'influenza A (IAV), il virus respiratorio sinciziale (RSV) e altri.¹

Pur condividendo con gli AMP le tipiche caratteristiche strutturali, come la presenza di una carica netta positiva e l'anfipaticità, gli AVP presentano tratti distintivi che ne determinano la funzione. I meccanismi di azione degli AVP, infatti, sono molteplici e dipendono dalla struttura del virus target, come per esempio la presenza o meno di un involucro, e dal suo ciclo di replicazione. Quest'ultimo può essere influenzato dagli AVP

in diversi modi, tra cui la perturbazione della membrana dei virus con involucro, l'inibizione della penetrazione cellulare, la limitazione della trascrizione e della traduzione virale, e/o l'impedimento della gemmazione delle particelle virali mature.¹⁹ A questi si aggiunge un'altra importante strategia, ossia l'inibizione degli enzimi coinvolti nella trascrizione e nella replicazione virale, come la proteasi.²⁰

La maggior parte degli AVP è composta da meno di 100 residui, con una lunghezza media di 31 amminoacidi e le proprietà chimico-fisiche sono dettate dalla specifica sequenza amminoacidica, che ne definisce quindi la forma tridimensionale, i partner di legame e il meccanismo d'azione.¹⁹

Un'ampia varietà di AVP è stata isolata da fonti naturali, come dalle piante (ad esempio i ciclotidi), dagli artropodi (come la melittina), dagli anfibi (le dermaseptine) e dai mammiferi (defensine e cathelicidine). Oltre agli AVP di origine naturale, la scoperta e la progettazione di nuovi antivirali è possibile mediante strumenti bioinformatici. A tal fine, per la progettazione di efficienti inibitori è necessaria una profonda conoscenza del genoma virale target e del suo ciclo di replicazione. Per la progettazione razionale di nuovi peptidi antivirali vengono principalmente utilizzati tre metodi:

- la **progettazione basata su modelli**, il cui scopo è quello di migliorare la selettività e/o l'attività di peptidi (anche inattivi) già noti, attraverso modifiche mirate della sequenza peptidica, come l'aggiunta, la rimozione o lo spostamento dei residui nella catena;
- la **progettazione chimico-fisica**, che prevede la generazione di analoghi di un peptide noto con caratteristiche chimico-fisiche differenti;
- la **progettazione de novo**, nella quale la sequenza peptidica viene determinata "da zero", modellando il peptide costruendo la sequenza un amminoacido alla volta.^{18,19}

Nonostante i vantaggi offerti da questi composti, è necessario considerare alcuni aspetti critici. Infatti, la sintesi di peptidi presenta costi elevati, poiché le tecniche in fase solida necessitano dell'uso di resine, reagenti di *coupling* e amminoacidi protetti. Inoltre, le procedure di sintesi e purificazione possono risultare complesse a seconda della sequenza amminoacidica. Un ulteriore svantaggio è l'elevata suscettibilità alla degradazione enzimatica di questi composti da parte di proteasi e peptidasi, che provoca uno scarso

assorbimento per via orale e impedisce ai peptidi il raggiungimento dei target all'interno dell'organismo.¹⁸

Per ovviare quest'ultima problematica, sono state proposte diverse strategie, tra cui la ciclizzazione e la modifica dello scheletro peptidico. Questi approcci però influenzano profondamente la conformazione peptidica, potenzialmente condizionandone l'attività.

Un'altra strategia promettente è l'utilizzo dei peptidi retro-inversi, che incorporano amminoacidi D disposti in sequenza invertita rispetto a quella del peptide riferimento che contiene amminoacidi L. Questa strategia sfrutta il fatto che, negli analoghi retro-inversi, le catene laterali sono sovrapponibili a quelle del peptide di partenza, mentre i legami amminici e i gruppi terminali N- e C- risultano invertiti. Ciò consente il mantenimento dell'attività biologica ma con una stabilità maggiore nei confronti della degradazione enzimatica.²¹

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati degli inibitori del West Nile Virus, utilizzando la strategia dei peptidi retro-inversi e la sintesi *de novo*.

1.3.1. West Nile Virus

Il virus del Nilo occidentale (West Nile Virus, WNV) è un *Flavivirus* appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, in particolare appartenente al genere *Orthoflavivirus*.^{22,23}

La trasmissione avviene attraverso la puntura di zanzare infette e il virus ha causato numerose epidemie sia nelle popolazioni umane che animali in Africa, Europa, Asia e nelle Americhe. In particolare, negli ultimi anni si è registrato un aumento dei casi di infezione da WNV in Europa, colpendo in particolare le regioni mediterranee e centrali. Nello specifico l'Italia è risultata il paese più colpito nel 2023, con 366 casi confermati su un totale di 700 registrati a livello europeo.²²

Il WNV si mantiene in un ciclo di trasmissione primario zanzara-uccello-zanzara, in cui gli uccelli fungono da serbatoi sani del virus, mentre le zanzare, in particolare quelle del genere *Culex*, ne sono i vettori. In questo ciclo, l'uomo, i cavalli ed altri mammiferi rappresentano gli ospiti finali o incidentali in seguito alle punture di zanzare infette, definiti in questo modo in quanto non hanno un ruolo significativo nell'amplificazione del virus.²²⁻²⁴

Circa l'80% degli infetti risulta asintomatico. Tra i soggetti sintomatici, invece, la maggior parte manifesta una forma non neuroinvasiva dell'infezione, caratterizzata da sintomi simil-influenzali, mentre nei casi più rari (inferiori all'1%) si presenta una forma neuroinvasiva, che può portare a gravi complicanze con un tasso di mortalità fino al 20%. Per contrastare l'infezione da WNV, non esistono vaccini approvati o trattamenti antivirali specifici per l'uomo; dunque, l'attuale farmacoterapia si basa solamente sul trattamento dei sintomi. Si eseguono inoltre campagne di prevenzione basate sulla riduzione del numero di zanzare infettate dal virus.^{22,23,25}

I flavivirus, come il WNV, condividono una struttura comune del virione, che ha forma sferica, con un diametro di circa 50 nm, ed è dotato di involucro. Il genoma del WNV (Figura 9) è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento positivo di 11 kb, che codifica:

- tre proteine strutturali: capside (C), membrana (prM) e involucro (E);
- sette proteine non strutturali: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5.

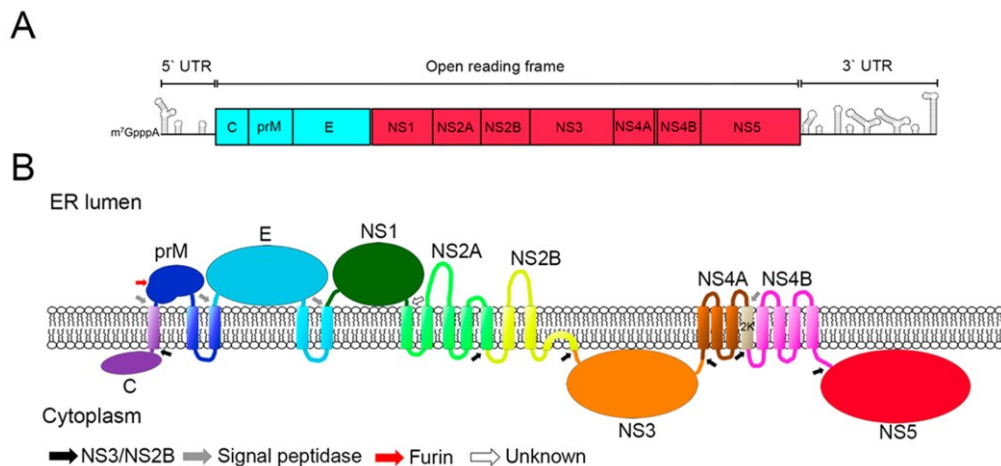


Figura 9 Genoma e poliproteina dei flavivirus.²⁶

La maggior parte delle proteine non strutturali del WNV sono multifunzionali, essendo direttamente o indirettamente coinvolte nella sintesi dell'RNA virale. Le piccole proteine idrofobiche non strutturali NS2A, NS2B, NS4A e NS4B non contengono motivi conservati caratteristici di enzimi noti e hanno il compito principale di facilitare l'assemblaggio dei complessi di replicazione virale e/o la loro localizzazione sulle membrane citoplasmatiche. NS1 è una glicoproteina con 2 siti di glicosilazione legati

all'azoto conservati e 12 cisteine conservate essenziali per la vitalità del virus. NS5 è la più grande e la più altamente conservata tra le proteine dei flavivirus ed è localizzata all'estremità C-terminale della poliproteina virale.

La proteina NS3 è un enzima multifunzionale composto da un dominio elicastico al C-terminale e da un dominio proteasico (NS3^{pro}) all'N-terminale, coinvolto nella replicazione virale. Il sito catalitico della proteasi è formato dalla triade catalitica costituita dai residui His51, Asp75 e Ser135. Per svolgere l'attività catalitica, NS3 forma un complesso con NS2B, che funge da cofattore. L'associazione alla membrana del complesso NS2B-NS3 è necessaria per un efficiente processamento della poliproteina virale. In assenza di altre proteine virali, NS3 è in grado di formare un complesso con NS5, il quale facilita il coordinamento dell'attività elicastica, polimerasica e di capping.²⁴⁻

27

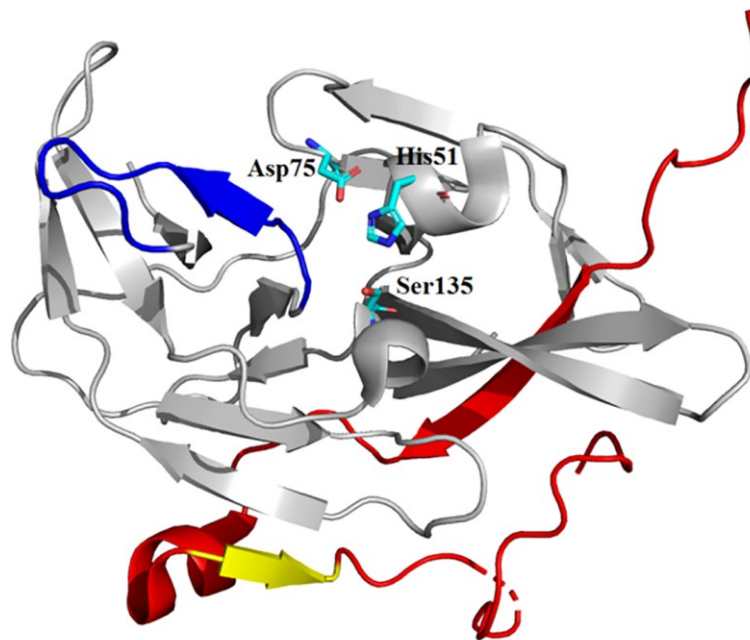


Figura 10 NS2B-NS3^{pro} del DENV in conformazione aperta, con evidenziata la triade catalitica (His51, Asp75 e Ser135). La struttura di NS3^{pro} è rappresentata in grigio, il cofattore NS2B in rosso, il S1-β-hairpin in giallo e il S1-loop in blu.²⁵

Queste caratteristiche rendono il complesso NS2B-NS3 un target ideale per lo sviluppo di nuovi composti antivirali, in quanto la sua inibizione causerebbe la morte del virus.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno di due linee di ricerca differenti, che hanno come filo conduttore la sintesi di peptidi per combattere infezioni.

Nell'ambito degli AMP antibatterici, il lavoro di tesi si è focalizzato sulla sintesi e purificazione di diversi analoghi del peptide LL-37, peptide antimicrobico dell'epidermide umana.

La sintesi ha previsto in primo luogo la modifica del tratto N-terminale della sequenza peptidica del frammento 110, derivante dal peptide LL-37. La modifica degli analoghi ha riguardato la sostituzione della Serina in posizione 9 (S⁹) di LL-37 con l'amminoacido Aib. Il residuo S⁹, infatti, è responsabile dell'interruzione della faccia idrofobica dell' α -elica, mentre l'Aib possiede una natura idrofobica e la tendenza a stabilizzare la struttura elicoidale. L'obiettivo di questa sostituzione è dunque quello di aumentare l'ellitticità del peptide per incrementarne l'attività antimicrobica.

Successivamente l'N-terminale degli analoghi è stato protetto con diversi gruppi acilici, il gruppo acetile e l'acido palmitico, al fine di valutare se la catena introdotta possa avere un ruolo significativo nell'interazione con le membrane batteriche.

Data la sequenza del peptide LL-37, ci si concentra sul frammento evidenziato in grassetto:

LLGDF**FRKSKEKIG**KEFKRIVQRIKDFLRNLVPR**TES**

Gli analoghi derivati sono:

Ac-RKSKEKIG-NH ₂	(1)
Pal-RKSKEKIG-NH ₂	(2)
Ac-RKUKEKIG-NH ₂	(3)
Pal-RKUKEKIG-NH ₂	(4)

Per questo lavoro sono state svolte le seguenti operazioni:

- 1) Sintesi dei peptidi;
- 2) Purificazione dei peptidi (Cromatografia a media pressione e HPLC preparativa);
- 3) Caratterizzazione dei composti (spettro di massa, HPLC);

- 4) Studi conformazionali (dicroismo circolare);
- 5) Test di attività antibatterica (*disk diffusion test*).

Nell'ambito dei peptidi antivirali (AVP), il lavoro di tesi si è concentrato sulla sintesi e l'ottimizzazione di potenziali peptidi inibitori del West Nile Virus, per il quale non sono ancora disponibili vaccini efficaci o terapie antivirali approvate. In particolare, sono state studiate due classi differenti di inibitori per il complesso enzimatico NS2B-NS3, componente fondamentale del ciclo di replicazione virale, in quanto coinvolto nella replicazione del genoma e nel processamento della poliproteina virale.

La prima classe di composti sintetizzata è quella dei peptidi retro-inversi. Per la sintesi di questi composti è stato preso come riferimento il seguente peptide L, citato in letteratura²⁸:

Fenilacetil-KKR-Ald

con Ald- si indica la presenza di una funzionalità aldeidica all'estremità N-terminale. Gli amminoacidi nelle sequenze indicati con lettere maiuscole presentano la configurazione L, mentre quelli indicati con le lettere minuscole rappresentano degli amminoacidi con configurazione D. Per la fenilglicina si utilizza il codice a tre cifre segnando tra parentesi la configurazione (D).

Si riportano di seguito i peptidi retro-inversi sintetizzati:



La seconda classe di AVP è stata sviluppata partendo dal peptide P29, un inibitore per la proteasi NS2B-NS3 del virus Dengue noto in letteratura, identificato tramite studi computazionali e precedentemente sintetizzato all'interno del gruppo di ricerca.

Si riporta di seguito la struttura del peptide P29:



I peptidi selezionati e sintetizzati sono riportati di seguito:



RRKKHLCW	(9)
RKKKHLCW	(10)

Per questo lavoro sono state svolte le seguenti operazioni:

- 1) Sintesi dei peptidi;
- 2) Purificazione dei peptidi (Cromatografia a media pressione e HPLC preparativa);
- 3) Caratterizzazione dei composti (spettro di massa, HPLC);
- 4) Test d'inibizione dell'attività proteasica NS2B-NS3 per i peptidi retro-inversi;
- 5) Studi conformazionali dei derivati di P29 (dicroismo circolare).

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. Materiali e metodi

3.1.1. Reagenti e solventi

Sigma Aldrich: acido trifluoroacetico; sodio dodecil solfato; dimetilformammide; diclorometano; etere dietilico; etanolo, kit di soluzioni per il Kaiser test, acido palmitico; anidride acetica.

VWR chemicals: metanolo; acetonitrile; acetone

Iris biotech GMDH: ossima; piperidina; DIC; Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Leu-OH; Fmoc-L-Trp-OH; Fmoc-Aib-OH; Fmoc-L-Cys(Trt)-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-L-Gly-OH; Fmoc-L-Glu(tBu)-OH; Fmoc-L-Ile-OH; Fmoc-L-Ser(tBu)-OH; Fmoc-D-Lys(Boc)-OH; Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-D-Lys(Boc)-OH.

3.1.2. Strumentazione e metodi

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) per la purificazione dei peptidi

I gradienti utilizzati per la purificazione dei peptidi sintetizzati sono stati scelti caso per caso in base alla natura dei peptidi, come l'idrofilicità e l'idrofobicità, al fine di avere un'ottimale separazione dei picchi cromatografici. La separazione dei peptidi è stata ottenuta utilizzando un gradiente lineare con un sistema di solventi binario.

- *HPLC preparativa.* Agilent 1260 infinity 2 con rivelatore UV a 216 nm, colonna C18 (LUNA 10 μ m C18(2) 100Å, LC Column 250x21.2 mm AXIA Packed), loop da 2 mL e flusso 12 mL/min. Eluenti utilizzati:
A (eluente acquoso): H₂O + 0,1% TFA
B (eluente organico): CH₃CN + 0,1% TFA
- *HPLC a media pressione.* Isolera Prime Biotage con rivelatore UV a 216 nm e 280 nm. Colonna SNAP Ultra C18 12 g (HP-Sphere, dimensioni delle particelle 25 μ m) operante a un flusso di 12 mL/min. Eluenti utilizzati:
A (eluente acquoso): H₂O + 0,05% TFA

B (eluente organico): CH₃CN/H₂O [9:1 (v/v)] + 0,05% TFA

HPLC–MS. Agilent Technologies Infinity II 1260 accoppiato ad uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo con ionizzazione elettrospray (ESI). Colonna a fase inversa Phenomenex Kinetex C18 con una portata di 1,0 mL/min. Eluenti utilizzati:

A (eluente acquoso): H₂O + 0,1% TFA

B (eluente organico): CH₃CN + 0,1% TFA

HPLC per l'analisi dei peptidi. HITACHI chromaster con rivelatore UV a 214 nm e 280 nm, colonna C18 (LUNA 5 µm C18(2) 250x4,60 mm) e loop da 100 µL. Eluenti utilizzati:

A (eluente acquoso): H₂O: CH₃CN (9:1) + 0,05% TFA

B (eluente organico): CH₃CN: H₂O (9:1) + 0,05% TFA

Sintetizzatore automatico. Biotage Initiator + Alstra. Lo strumento è dotato di 32 posizioni per Falcon (ciascuna Falcon può contenere un reagente sciolto in DMF) e tre bottiglie per gli eluenti (DMF e piperidina al 20% in DMF).

Dicroismo circolare. Jasco J-1500 CD Spectrometer. Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando celle in quarzo con cammino ottico di 0,02 cm.

I valori sono espressi in ellitticità molare (gradi x cm² x dmol⁻¹):

$$[\Theta]_T = (PM \cdot \Theta) / (l \cdot c) = 3298 \cdot \Delta\epsilon = 3298 \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R)$$

Dove:

- Θ = ellitticità osservata;
- PM = peso molecolare totale del peptide;
- l = lunghezza del cammino ottico in cm;
- c = concentrazione in g/l;
- $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ = differenza tra i coefficienti di estinzione della luce polarizzata levogira e destrogira.

L'elaborazione degli spettri è stata eseguita con il programma JASCO (*Spectra Manager*).

3.2. Sintesi e caratterizzazione

Sintesi e caratterizzazione dei peptidi riportati in Tabella 2.

Analoghi del peptide LL-37	Ac-RKSKEKIG-NH ₂	(1)
	Pal-RKSKEKIG-NH ₂	(2)
	Ac-RKUKEKIG-NH ₂	(3)
	Pal-RKUKEKIG-NH ₂	(4)
Peptidi retro-inversi	Ald-rkk-NH ₂	(5)
	Ald-rkk-(D)Phg-NH ₂	(6)
Derivati di P29	RKKRHLCW-NH ₂	(7)
	RKRKHLCW-NH ₂	(8)
	RRKKHLCW-NH ₂	(9)
	RKKKHLCW-NH ₂	(10)

Tabella 2 Si riportano tutti i peptidi sintetizzati, divisi per tipologia.

La resina utilizzata per la sintesi dei peptidi è la Rink Amide, con loading (numero di siti attivi per grammo di resina) di 0,5 mmol/g.

I peptidi **1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10** sono stati sintetizzati mediante sintetizzatore automatico, mentre i peptidi **5 e 6** tramite sintesi manuale.

La sintesi peptidica ha seguito il seguente schema generale:

- 1) Rigonfiamento della resina
- 2) Sblocco del gruppo protettore
- 3) Lavaggio
- 4) Reazione di accoppiamento (*coupling*)
- 5) Lavaggio
- 6) Sblocco del gruppo protettore
- 7) Distacco dalla resina (*cleavage*).

I punti 1 e 2 sono stati eseguiti all'inizio delle sintesi, mentre il punto 6 è stato svolto dopo l'aggiunta dell'ultimo amminoacido della sequenza peptidica.

Per ciascun peptide, la prima operazione svolta è stata il rigonfiamento della resina: in entrambe le metodologie sintetiche (automatica e manuale), la resina è stata posta in una siringa dotata di setto poroso, seguita dall'aggiunta di dimetilformammide (DMF). La

sospensione è stata lasciata agitare per tempi diversi a seconda del metodo: 30 minuti nella sintesi manuale e circa 20 minuti a 70°C nella sintesi automatica. Successivamente, la DMF è stata rimossa.

Per lo sblocco del gruppo protettore Fmoc è stata utilizzata una soluzione di piperidina al 20% in DMF. La deprotezione è stata condotta eseguendo due lavaggi successivi con la soluzione basica: il primo della durata di 5 minuti e il secondo di 15 minuti, entrambi eseguiti sotto agitazione. Al termine di questi due passaggi, sono stati effettuati ripetuti lavaggi con DMF.

Tutti i lavaggi sono stati eseguiti con DMF lasciata sotto flusso d'azoto per almeno 30 minuti prima di ogni utilizzo, in modo da rimuovere le ammine libere che potrebbero formarsi al suo interno e che causerebbero la rimozione precoce del gruppo protettore Fmoc.

Per ciascun *coupling*, la resina è stata trattata con una soluzione contenente l'amminoacido e gli attivatori per 60 minuti, sotto agitazione. Nella sintesi con il sintetizzatore automatico sono stati impiegati 10 minuti a 75° per ciascun *coupling*. In tutte le sintesi è stata utilizzata la coppia di attivatori DIC/ossima. La soluzione è stata preparata utilizzando 3 equivalenti di amminoacido e 3 equivalenti di attivatore, sciolti nella minima quantità di DMF. Prima dell'aggiunta della soluzione alla resina, sono stati attesi 2 minuti per la pre-attivazione dell'amminoacido. Trascorso il tempo di reazione, la soluzione è stata filtrata e la resina è stata lavata con DMF. Al termine dell'ultimo *coupling*, la resina è stata lavata con diclorometano (DCM).

Per gli amminoacidi Aib, arginina, istidina e leucina è stato necessario effettuare un doppio *coupling*. Dopo un'ora di agitazione con la soluzione di amminoacido, quest'ultima è stata rimossa e la resina è stata posta a contatto con una soluzione fresca di amminoacido ed attivatori per un'altra ora. Al termine del secondo *coupling* è stato eseguito lo sblocco del gruppo protettore.

Dopo i passaggi di *coupling* critici, è stato eseguito il Kaiser test. Per eseguire questo saggio sono state utilizzate 3 soluzioni reagenti: una soluzione 1 mmol L⁻¹ di cianuro di potassio in piridina, una soluzione di fenolo all'80% in peso in etanolo e una soluzione di ninidrina al 5% in peso in etanolo. Il test è stato eseguito su pochi milligrammi di resina, aggiungendo 20 µL di ciascuna soluzione e scaldando con una pistola termica per qualche

minuto. La comparsa di colorazione indica che la reazione non è andata a completezza ed è quindi necessario ripeterla.

L'attacco del gruppo acetile nei peptidi **1** e **3** è stato effettuato tramite *capping* con anidride acetica. Per questa procedura è stata preparata una soluzione da 10 mL composta da 475 µL di anidride acetica e 225 µL di DIPEA, portata a volume con DMF. La catena, con l'N-terminale deprotetto, è stata messa in contatto con circa 2 mL della soluzione e mantenuta sotto agitazione per 45 minuti. Trascorso questo tempo, la soluzione è stata rimossa e sostituita con un'aliquota fresca, ripetendo il trattamento per ulteriori 45 minuti.

Per i peptidi **2** e **4**, l'attacco dell'acido palmitico all'estremità N-terminale è avvenuto mediante doppio *coupling*, utilizzando il sintetizzatore automatico. La reazione è stata condotta impiegando 4 equivalenti di acido palmitico rispetto alle moli di resina utilizzata.

Al termine della sintesi peptidica, una piccola quantità di resina con il peptide è stata prelevata per effettuare uno "sblocco in piccolo". La resina è stata posta in una siringa da 1 mL dotata di setto poroso e trattata con la soluzione di sblocco per 1,5 ore, sotto agitazione.

La composizione della miscela di sblocco varia a seconda del peptide:

- Per i peptidi **1, 2, 3, 4, 5, 6** la miscela di sblocco è composta da 95% di TFA, 2,5% di H₂O e 2,5% di TIS.
- Per i peptidi **7, 8, 9, 10**, contenenti cisteine, la miscela di sblocco è composta da 94% di TFA, 2,5% di H₂O, 2,5% di TIS e 1% DODT.

Trascorsa il tempo di reazione di 1,5 ore, la soluzione contenente il peptide è stata filtrata attraverso il setto poroso e raccolta in una provetta Falcon. Il TFA è stato poi rimosso per evaporazione sotto flusso di azoto, successivamente il peptide è stato precipitato in etere dietilico freddo. Il volume di etere utilizzato è stato circa 10 volte il volume della soluzione di sblocco dopo rimozione del TFA. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e il peptide precipitato è stato sciolto in un solvente appropriato per essere analizzato tramite spettrometria di massa.

L'analisi mediante spettrometria di massa consente di verificare se la massa dello ione molecolare corrisponde a quella attesa per il peptide. Se i due coincidono, si è proceduto con lo sblocco totale del peptide dalla resina rimanente.

La procedura per lo sblocco totale è analoga a quella dello sblocco in piccolo, con alcune differenze. Il contatto tra resina e miscela di sblocco è stato mantenuto per 3 ore, sotto agitazione.

Dopo la precipitazione in etere freddo del peptide e successiva centrifugazione, il peptide è stato lavato altre 4 volte con etere etilico. Dopo ogni centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e sostituito con nuovo etere freddo, per ottenere una maggiore purezza del peptide.

Dopo lo sblocco dei peptidi **5** e **6**, è stata eseguita l'ossidazione con NaIO₄ della serina per ottenere la funzionalità aldeidica all'N-terminale. Inizialmente la reazione è stata condotta per 3 ore utilizzando una soluzione di 3 equivalenti di NaIO₄ rispetto alle moli di peptide, in acqua ultrapura (MilliQ). Dopo ottimizzazione, l'ossidazione è stata condotta per 2 ore utilizzando un rapporto stechiometrico di 1:1 moli di peptide: moli di NaIO₄.

I peptidi grezzi sono stati purificati tramite cromatografia a media pressione o HPLC preparativa.

Le frazioni contenenti il peptide purificato sono state poi riunite in un pallone, e il solvente è stato rimosso. Il residuo è stato poi sciolto in una soluzione di HCl 10⁻² M e liofilizzato. Quest'ultima operazione è stata eseguita in generale per un totale di 3 volte.

3.2.1. Sintesi degli analoghi di LL-37

Il peptide precursore dei peptidi **1**, **2**, **3**, e **4**, ossia senza catena acilica all'N-terminale, è stato sintetizzato mediante sintetizzatore automatico, utilizzando soluzioni 0,3 M di ciascun reagente. Siccome ogni reagente ha una Falcon corrispondente, le pesate iniziali sono state effettuate considerando l'intera sintesi e il numero di cicli di *coupling* previsti per quel reagente.

➤ Sintesi dei peptidi 1, 2

Per la sintesi sono stati utilizzati 250 mg di resina. Si riporta di seguito la sequenza peptidica:



In tabella 3 sono riportate le quantità dei reagenti utilizzate.

	MW (g/mol)	Massa pesata ± 0,0001 (g)	Concentrazione (mol/L)	Volume ± 1 (μL)	Volume di DMF ± 0,001 (mL)
Lys (K)	468,5	0,5410	0,3	/	3,409
Gly (G)	297,3	0,1200	0,3	/	1,255
Arg (R)	648,8	0,2630	0,3	/	1,132
Glu (E)	425,5	0,1720	0,3	/	1,211
Ile (I)	353,4	0,1430	0,3	/	1,236
Ser (S)	383,4	0,1550	0,3	/	1,225
DIC	126,2	/	0,3	469	9,631
Ossima	142,1	0,4310	0,3	/	10,100

Tabella 3 Reagenti utilizzati per la sintesi automatica del peptide RKSKEKIG.

Al termine della sintesi è stato effettuato uno sblocco in piccolo. La resina è stata poi divisa in due parti uguali per le reazioni di *capping* all’N-terminale: su una metà della resina è stato aggiunto l’acido palmitico, sull’altra metà il gruppo acetile. In Figura 11 sono rappresentati i due peptidi risultanti.

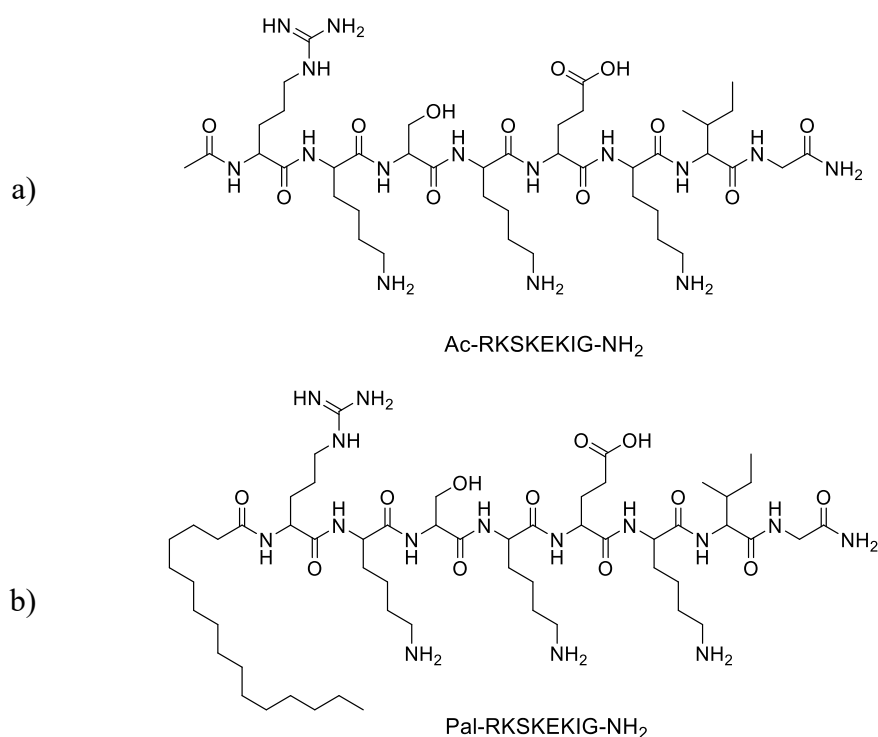


Figura 11 Struttura dei peptidi 1 e 2.

Si riportano in Tabella 4 le quantità utilizzate per l'aggiunta di acido palmitico all'N-terminale di RKSKEKIG-NH₂.

	MW (g/mol)	Massa pesata ± 0,0001 (g)	Concentrazione (mol/L)	Volume ± 1 (μL)	Volume di DMF ± 0,001(mL)
Pal	256,4	0,1040	0,3	/	1,270
Ossima	142,1	0,2660	/	/	6,250
DIC	126,2	/	/	290	5,960

Tabella 4 Reagenti utilizzati per l'aggiunta di acido palmitico all'N-terminale di RKSKEKIG.

Infine, i peptidi sono stati purificati e caratterizzati.

- **Ac-RKSKEKIG (1)**

Purificazione: 10-50% B in 40 minuti

Purezza: 97%

Resa: 19%

HPLC (5-95% B in 30 minuti): t_R=7,0 min

Spettrometria di massa: [M+H]⁺= 986,5 g/mol; [M+2H]²⁺= 493,9 g/mol

- **Pal-RKSKEKIG (2)**

Purificazione: 20-60% B in 40 minuti

Purezza: 99%

Resa: 12%

HPLC (5-95% B in 30 minuti): t_R=17,3 min

Spettrometria di massa: [M+H]⁺= 1182,7 g/mol; [M+2H]²⁺= 592,0 g/mol

➤ **Sintesi dei peptidi 3, 4**

Il peptide di partenza è stato sintetizzato mediante sintetizzatore automatico, partendo da 250 mg di resina. Si riporta di seguito la sequenza peptidica:

RKUKEKIG-NH₂

In tabella 5 sono riportate le quantità di reagenti utilizzate.

	MW (g/mol)	Massa pesata ± 0,0001 (g)	Concentrazione (mol/L)	Volume ± 1 (μL)	Volume di DMF ± 0,001(mL)
Lys (K)	468,5	0,5410	0,3	/	3,409
Gly (G)	297,3	0,1200	0,3	/	1,255
Arg (R)	648,8	0,2630	0,3	/	1,132
Glu (E)	425,5	0,1720	0,3	/	1,211
Ile (I)	353,4	0,1430	0,3	/	1,236
Aib (U)	325,4	0,2540	0,3	/	2,399
DIC	126,2	/	0,3	527	10,823
Ossima	142,1	0,4840	0,3	/	11,350

Tabella 5 Reagenti utilizzati per la sintesi automatica del peptide RKUKEKIG.

Terminata la sintesi di RKUKEKIG è stato svolto uno sblocco in piccolo. Successivamente la resina è stata divisa in due parti uguali per eseguire il *capping* sull’N-terminale: su una metà è stato attaccato l’acido palmitico, sull’altra il gruppo acetile (Figura 12).

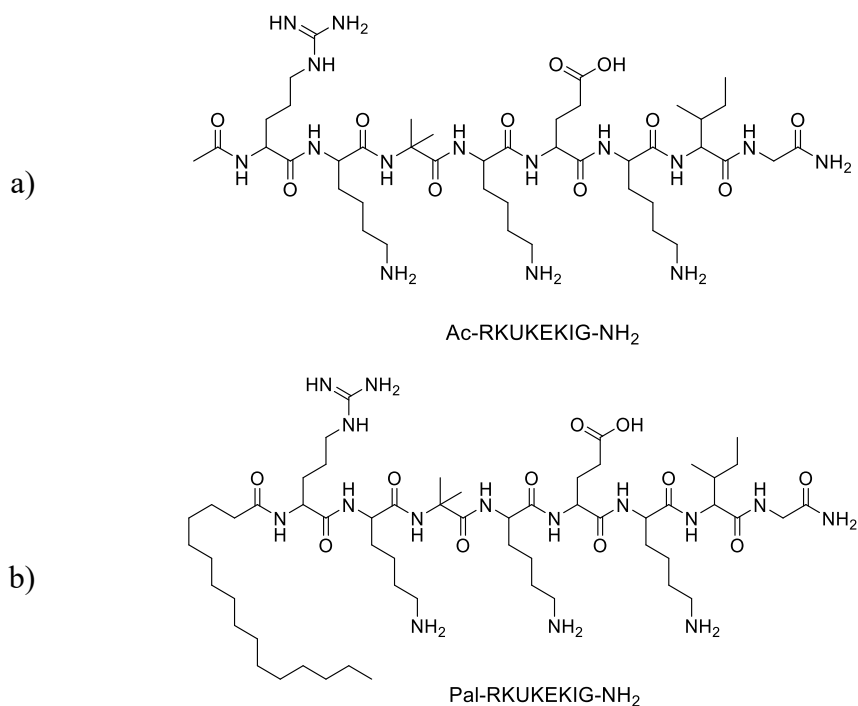


Figura 12 Struttura dei peptidi 3 e 4.

Le quantità di reagenti utilizzati per l'aggiunzione di acido palmitico a RKUKEKIG sono riportate in Tabella 6.

	MW (g/mol)	Massa pesata ± 0,0001 (g)	Concentrazione (mol/L)	Volume ± 1 (μL)	Volume di DMF ± 0,001 (mL)
Pal	256,42	0,1040	0,3	/	1,270
Ossima	142,1	0,2660	/	/	6,250
DIC	126,2	/	/	290	5,960

Tabella 6 Reagenti utilizzati per l'aggiunta di acido palmitico all'N-terminale di RKUKEKIG.

Successivamente i peptidi sono stati purificati e caratterizzati.

- **Ac-RKUKEKIG (3)**

Purificazione: 10-50% B in 40 minuti

Purezza: 98%

Resa: 29%

HPLC (5-95% B in 30 minuti): $t_R=8,1$ min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+= 984,5$ g/mol; $[M+2H]^{2+}= 492,9$ g/mol

- **Pal-RKUKEKIG (4)**

Purificazione: 30-75% B in 45 minuti

Purezza: 96 %

Resa: 30%

HPLC (5-95% B in 30 minuti): $t_R=17,8$ min

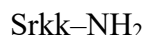
Spettrometria di massa: $[M+H]^+= 1180,7$ g/mol; $[M+2H]^{2+}= 591,0$ g/mol

3.2.2. Sintesi dei peptidi retro-inversi

La sintesi dei peptidi retro-inversi è avvenuta mediante sintesi manuale.

- **Sintesi del peptide 5**

La sintesi è stata condotta partendo da 313,7 mg di resina. Si riporta la sequenza peptidica di seguito:



Nella sintesi manuale, gli amminoacidi e gli attivatori sono stati aggiunti in successione per ogni reazione di *coupling*. In Tabella 7 sono riportate le quantità di reagente utilizzate in ciascuna reazione di *coupling*.

Coupling AA	Massa pesata AA ± 0,1(mg)	Massa pesata ossima ± 0,1 (mg)
(D)Lys (k)	213,7	66,6
(D)Lys (k)	219,7	66,8
(D)Arg (r)	292,2	68,7
Ser (S)	174,0	64,2

Tabella 7 Reagenti utilizzati per ogni ciclo di coupling nella sintesi del peptide 5.

Per ciascuna reazione di *coupling* sono stati utilizzati 450 µL di DIC.

Dopo lo sblocco dalla resina, il peptide grezzo è stato sottoposto ad ossidazione con NaIO₄ per la conversione della serina in aldeide (Figura 13).

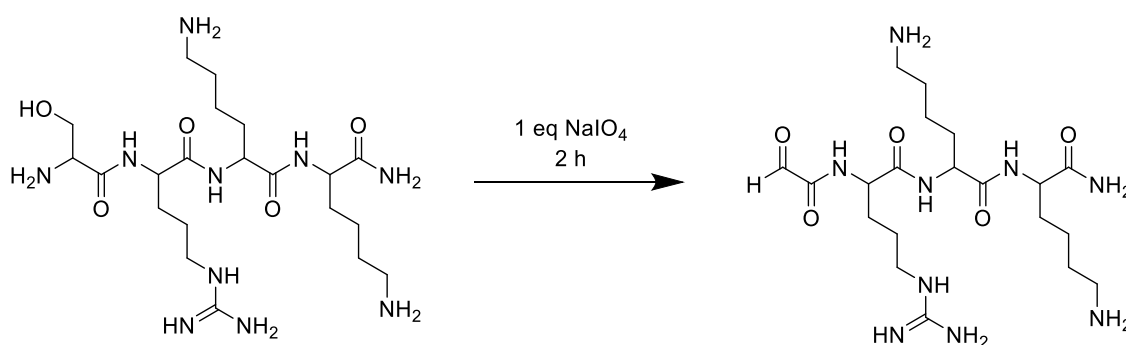


Figura 13 Reazione di ossidazione della serina nel peptide 5 per l'introduzione della funzionalità aldeidica. Solvente H₂O.

L'ossidazione non è stata eseguita direttamente su tutta la quantità di peptide, ma su piccole porzioni alla volta. Nelle prime reazioni è stato utilizzato un rapporto stechiometrico di 1:3 (moli di peptide: moli di NaIO₄) con tempo di reazione 3 ore, mantenendo sotto agitazione. Successivamente le condizioni di reazione sono state ottimizzate, riducendo il rapporto stechiometrico a 1:1 (moli di peptide: moli di NaIO₄) e il tempo di reazione a 2 ore, sotto agitazione.

Si riportano in Tabella 8 le quantità di reagenti utilizzate e le condizioni di reazione utilizzate per ciascuna ossidazione.

Reazione	Condizioni	m peptide ± 0,1 (mg)	m NaIO ₄ ± 0,1 (mg)	V MilliQ ± 0,1 (mL)
A	1:3 in 3 ore	30,8	38,3	3,0
B	1:3 in 3 ore	48,4	61,3	5,0
C	1:1 in 2 ore	16,3	6,8	1,6

Tabella 8 Ossidazione del peptide **5** in tre diverse condizioni, A, B e C.

Il peptide è stato poi purificato e caratterizzato. La purificazione è stata fatta mediante HPLC preparativa, utilizzando il gradiente 0-2% B in 30 minuti.

Purezza: 99%

Resa: 34%

HPLC (0-2% B in 30 minuti): $t_R=1,2$ min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+=486,3$ g/mol; $[M+H]^+_{diolo}=504,3$ g/mol

➤ Sintesi del peptide **6**

La procedura per l'ottenimento del peptide **6** è analoga a quella del peptide **5**, partendo da 308,7 mg di resina. Si riporta di seguito la sequenza peptidica:



In Tabella 9 si riportano le quantità di reagenti utilizzati:

Coupling AA	Massa pesata AA ± 0,1(mg)	Massa pesata ossima ± 0,1(mg)
(D)Phg	167,7	64,4
(D)Lys (k)	210,7	64,0
(D)Lys (k)	214,7	64,1
(D)Arg (r)	292,6	64,9
Ser (S)	172,5	64,7

Tabella 9 Reagenti utilizzati per ogni ciclo di coupling nella sintesi del peptide **6**.

Per ciascuna reazione di *coupling* sono stati utilizzati 450 µL di DIC.

Si riporta in Figura 14 la reazione di ossidazione della serina:

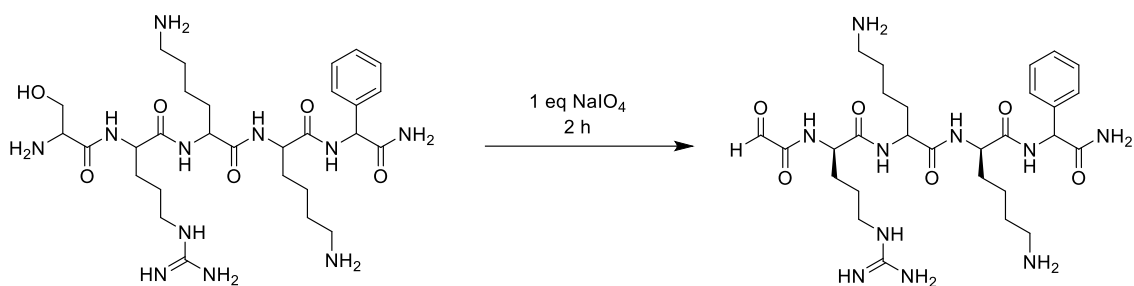


Figura 14 Reazione di ossidazione della serina nel peptide **6** per l'introduzione della funzionalità aldeidica. Solvente H_2O .

L'ossidazione è stata eseguita lavorando sempre con rapporto stechiometrico 1:1 (moli di peptide: moli di $NaIO_4$) e tempo di reazione è stato pari a 2 ore, sotto agitazione.

Si riportano in Tabella 10 le quantità di reagenti e le condizioni di reazione utilizzate per ciascuna ossidazione.

m peptide ± 0,1 (mg)	m $NaIO_4$ ± 0,1 (mg)	V MilliQ ± 0,1 (mL)
26,5	8,9	2,5
121,5	40,2	6,0

Tabella 10 Ossidazione del peptide **6**.

Il peptide è stato successivamente purificato e caratterizzato. La purificazione è stata effettuata mediante HPLC preparativa, utilizzando il gradiente 0-10% B in 30 minuti.

Purezza: 97%

Resa: 22%

HPLC (0-2% B in 30 minuti): t_R =25,3 min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+ = 619,3$ g/mol; $[M+H]^+_{diolo} = 637,3$ g/mol

3.2.3. Sintesi dei derivati di P29

I peptidi **7**, **8**, **9**, **10** sono stati sintetizzati tramite sintetizzatore automatico, partendo ogni volta da 250 mg di resina.

- **Sintesi dei peptidi 7, 8, 9**

Si riportano di seguito le sequenze dei tre peptidi:

RKKRHLCW-NH₂ (7)

RKRKHLCW-NH₂ (8)

RRKKHLCW-NH₂ (9)

Come si osserva dalle sequenze, i tre peptidi condividono gli stessi amminoacidi, anche se disposti in ordine diverso all'interno della sequenza. Le quantità di reagenti utilizzate, dunque, sono le stesse per ciascuna sintesi. In Tabella 11 sono riportate le quantità utilizzate per la sintesi di un singolo peptide, rappresentativo per tutti e tre.

	MW (g/mol)	Massa pesata ± 0,0001 (g)	Concentrazione (mol/L)	Volume ± 1 (μL)	Volume di DMF ± 0,001 (mL)
Cys (C)	585,7	0,2370	0,3	/	1,154
His (H)	619,7	0,4830	0,3	/	2,200
Arg (R)	648,8	0,9930	0,3	/	4,278
Leu (L)	353,4	0,2760	0,3	/	2,380
Trp (W)	526,6	0,2130	0,3	/	1,175
Lys (K)	468,5	0,1900	0,3	/	1,195
DIC	126,2	/	0,3	871	17,879
Ossima	142,1	0,7990	0,3	/	18,750

Tabella 11 Reagenti utilizzati per la sintesi automatica del peptide RRKKHLCW.

I peptidi sono stati purificati mediante HPLC preparativa (gradiente 0-40% B in 40 minuti) e, successivamente, caratterizzati.

- **RKKRHLCW (7)**

Purezza: 80%

Resa: 6,2%

HPLC (5-95% B in 30 minuti): $t_R=10,4$ min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+=1125,6$ g/mol; $[M+2H]^{2+}=563,3$ g/mol

- **RKRKHLCW (8)**

Purezza: 94%

Resa: 9,7%

HPLC (5-95% B in 30 minuti): $t_R=10,4$ min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+ = 1125,6$ g/mol; $[M+2H]^{2+} = 563,3$ g/mol

- **RRKKHLCW (9)**

Purezza: 99%

Resa: 7,2%

HPLC (0-40% B in 20 minuti): $t_R = 15,0$ min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+ = 1125,6$ g/mol; $[M+2H]^{2+} = 563,3$ g/mol

➤ **Sintesi del peptide 10**

Si riporta la sequenza peptidica:



In Tabella 12 sono elencate le quantità di reagenti utilizzate.

	MW (g/mol)	Massa pesata ± 0,0001 (g)	Concentrazione (mol/L)	Volume ± 1 (μL)	Volume di DMF ± 0,001 (mL)
Cys (C)	585,7	0,2370	0,3	/	1,154
His (H)	619,7	0,4830	0,3	/	2,200
Arg (R)	648,8	0,5060	0,3	/	2,181
Leu (L)	353,4	0,2760	0,3	/	2,380
Trp (W)	526,6	0,2130	0,3	/	1,175
Lys (K)	468,5	0,5410	0,3	/	3,409
DIC	126,2	/	0,3	871	17,879
Ossima	142,1	0,7990	0,3	/	18,750

Tabella 12 Reagenti utilizzati per la sintesi automatica del peptide RKKKHLCW.

Il peptide è stato poi purificato mediante HPLC preparativa (gradiente 0-40% B in 40 minuti) e caratterizzato.

Purezza: 99%

Resa: 18%

HPLC (0-40% B in 20 minuti): $t_R = 14,8$ min

Spettrometria di massa: $[M+H]^+ = 1097,6$ g/mol; $[M+2H]^{2+} = 549,3$ g/mol

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Sintesi di peptidi

4.1.1. Sintesi su fase solida

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS) è una metodologia in cui la catena peptidica viene fatta crescere su un supporto solido e poroso, generalmente una resina. Rispetto alla sintesi in soluzione, questa tecnica offre diversi vantaggi:

- separazione del peptide dai reagenti e dai solventi tramite lavaggi e filtrazioni;
- adattabilità delle operazioni all'automazione;
- possibilità di lavorare con quantità di reagenti in eccesso e di portare a completezza le reazioni;
- minori perdite fisiche di prodotto, in quanto il peptide rimane legato alla resina durante la sintesi.

Dal momento che molti amminoacidi presentano gruppi reattivi nelle catene laterali, è necessario mascherarli temporaneamente con gruppi protettori, che rimangono legati durante tutta la sintesi della catena e vengono rimossi soltanto al termine della sintesi.

Esistono due principali strategie di sintesi in fase solida, che si distinguono per il tipo di gruppo protettore utilizzato all'N-terminale:

- il metodo Boc, in cui il gruppo protettore viene rimosso in ambiente acido;
- il metodo Fmoc, che viene rimosso in ambiente basico.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il metodo Fmoc, basato su una strategia ortogonale in cui il gruppo temporaneo Fmoc viene rimosso in ambiente basico, mentre la rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali e la rimozione del peptide dalla resina avvengono in condizioni acide.

La sintesi procede dal C-terminale all'N-terminale della sequenza peptidica.

Il primo amminoacido viene legato alla resina tramite un *linker*, che reagisce con l'acido carbossilico del residuo. Successivamente, il gruppo protettore Fmoc sull'N-terminale viene rimosso, lasciando libero il gruppo amminico per il legame con l'amminoacido successivo. Questa strategia garantisce una crescita controllata della catena. L'acido carbossilico è infatti bloccato dal legame con la resina, mentre l'N-terminale è libero per poter reagire con l'amminoacido in ingresso, il quale possiede, a sua volta, il gruppo

amminico protetto e il gruppo carbossilico libero e attivato. Avviene in questo modo la formazione del legame ammidico tra i residui.

La soluzione di *coupling* contiene un eccesso di reagenti (3 equivalenti) rispetto ai siti attivi presenti sulla resina, in modo da favorire il completamento delle reazioni di *coupling* e da massimizzare l'occupazione dei siti di ancoraggio disponibili.

Dopo la reazione di *coupling*, i reagenti in eccesso vengono rimossi tramite lavaggi con DMF, seguiti dalla rimozione del gruppo Fmoc. Si procede quindi con cicli ripetuti di *coupling* e deprotezione, fino all'ottenimento della sequenza desiderata, come mostrato in Figura 15.

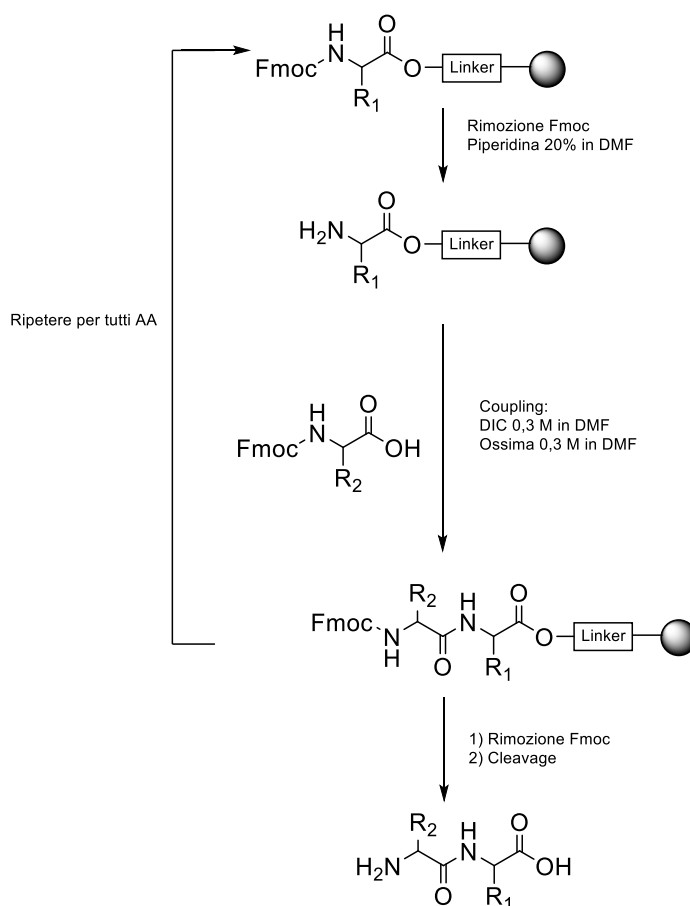


Figura 15 Schema generale della sintesi peptidica su fase solida.

Per la rimozione del gruppo Fmoc viene utilizzata una soluzione di piperidina al 20% in DMF, in quanto questo gruppo è labile in condizioni basiche. Data la sensibilità all'ambiente basico, è necessario degasare la DMF sotto flusso d'azoto per eliminare le ammine libere in essa contenute, in quanto potrebbero causare una rimozione precoce del gruppo Fmoc e una conseguente perdita di controllo sulla crescita della catena.

In combinazione con il gruppo Fmoc, per la protezione delle catene laterali vengono utilizzati gruppi derivati dal *terz*-butile (tBu), i quali sono acido-labili. Questa caratteristica permette di mantenerli intatti durante tutta la sintesi e di rimuoverli nella fase di sblocco, tramite trattamento con TFA.

Dopo la sintesi si procede con la rimozione del peptide dalla resina. La miscela di sblocco è composta da 95% v/v di TFA, 2,5% v/v di H₂O e 2,5% v/v di TIS. L'ambiente acido fornito dal TFA permette contemporaneamente lo sblocco del peptide dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali. Il TIS e l'acqua vengono utilizzati come *scavenger*, ossia sostanze nucleofile che reagiscono con le specie cationiche altamente reattive formate durante la procedura di sblocco, impedendo la loro reazione con gli amminoacidi elettrone-ricchi presenti nella sequenza.²⁹

4.1.2. Resina

La sintesi peptidica su fase solida viene condotta su una resina in polistirene reticolato con l'1% di divinilbenzene, che la rende insolubile nei solventi organici. Siccome la cinetica della reazione di *coupling* è governata dalla diffusione delle specie attive all'interno della resina rigonfiata, la velocità di reazione è direttamente influenzata dal grado di reticolazione della resina. Un elevato numero di reticolazioni riduce il rigonfiamento della resina, limitando la diffusione delle specie reattive all'interno del polimero e rallentando la velocità di *coupling*. Un minor grado di reticolazione, invece, favorisce il rigonfiamento della resina ma compromette la sua stabilità meccanica allo stato rigonfiato.

Le resine utilizzate sono funzionalizzate con dei *linker*, la cui funzione è quella di legare reversibilmente gli amminoacidi della catena peptidica al supporto bloccando il gruppo carbossilico del C-terminale durante l'espansione della catena. Inoltre, la scelta del linker determina la funzionalità del C-terminale nel prodotto finale. In seguito al trattamento con TFA, il peptide rilasciato presenta una funzionalità carbossilica oppure ammidica, a seconda del linker utilizzato. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la resina Fmoc-Rink Amide (Figura 16), che permette la sintesi di peptidi aventi la funzionalità ammidica al C-terminale.²⁹

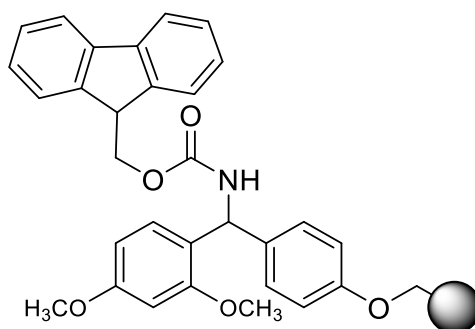


Figura 16 Resina Fmoc-Rink Amide.

4.1.3. Gruppi protettori

Per la sintesi dei peptidi è stato impiegato il gruppo protettore Fmoc (Figura 17) per la protezione temporanea dell'N-terminale, secondo la strategia ortogonale Fmoc/tBu.

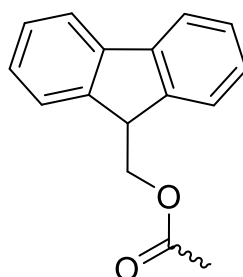


Figura 17 Struttura del gruppo protettore Fmoc.

La rimozione del gruppo Fmoc dall'estremità N-terminale del peptide avviene per trattamento con un'ammina secondaria, come la piperidina, che viene utilizzata come soluzione al 20% in DMF, tramite un meccanismo in due step. Il meccanismo di deprotezione inizia con la rimozione del protone acido dell'anello fluorene del gruppo Fmoc, con conseguente generazione di un carbanione stabilizzato per risonanza. Questo subisce poi una rapida β -eliminazione, che porta alla formazione di anidride carbonica e di dibenzofulvene (DBF), altamente reattivo. Quest'ultimo viene intrappolato da una molecola di piperidina, formando un addotto stabile.³⁰ Il meccanismo di reazione è riportato in Figura 18.

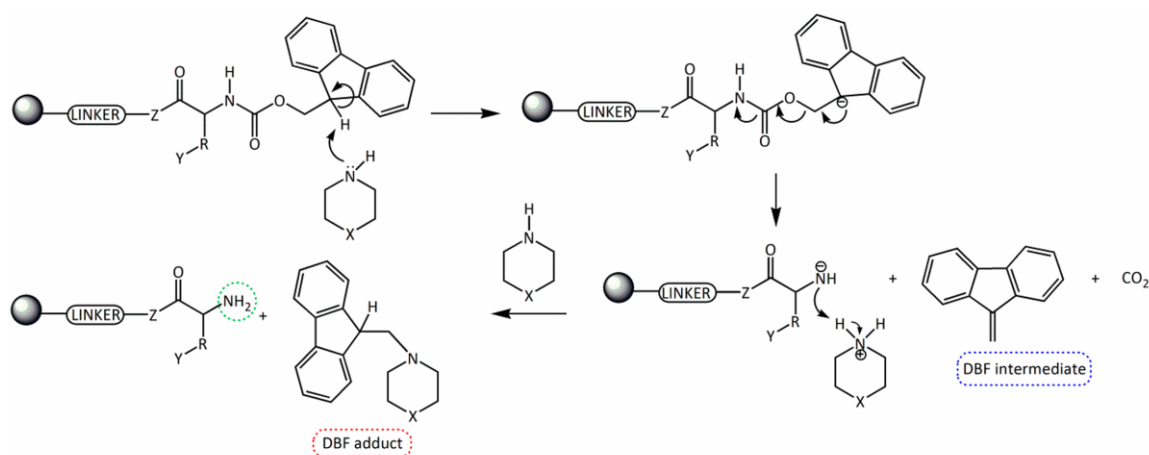


Figura 18 Meccanismo della rimozione del gruppo Fmoc in presenza di ammine secondarie.³⁰

I gruppi protettori delle catene laterali degli amminoacidi rimangono legati ai residui durante tutto il processo sintetico, venendo rimossi solamente durante il processo di *cleavage* in ambiente acido, tipicamente utilizzando il TFA.

Nel metodo Fmoc/tBu possono essere utilizzati diversi gruppi protettori, come il *terz*-butile (tBu), il Boc, il Trt, e il Pbf, scelti in base alla funzionalità della catena laterale da proteggere. Tutti questi gruppi sono accomunati dalle condizioni e dal meccanismo di rimozione in ambiente acido, riportato in Figura 19.

La rimozione procede attraverso un meccanismo SN1, in cui la coppia elettronica presente sull'amminoacido protetto, più basica, accetta il protone acido del TFA. Questo porta all'eliminazione del gruppo protettore sotto forma di un carbocatione estremamente reattivo, il quale reagisce con gli *scavenger* presenti nel mezzo di reazione.³¹

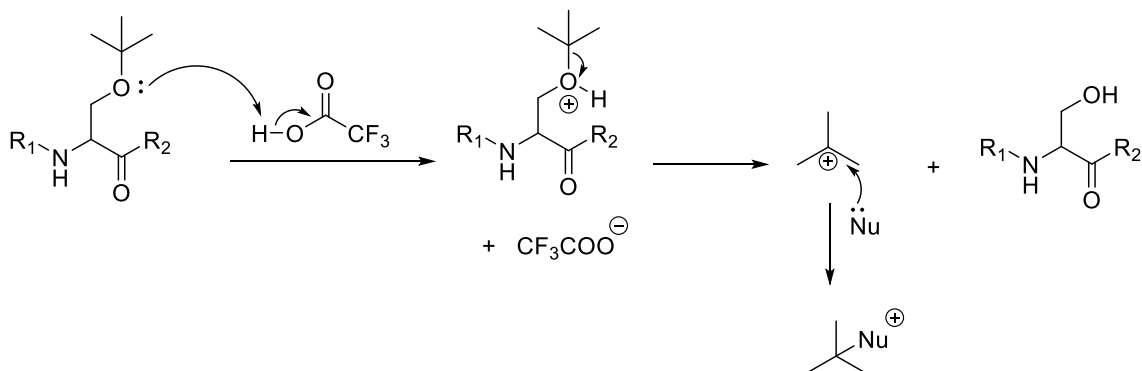


Figura 19 Meccanismo di rimozione del gruppo protettore tBu da un residuo di serina in presenza di TFA.

4.1.4. Attivazione degli amminoacidi

La formazione del legame peptidico, anche se porta alla formazione di un prodotto estremamente stabile, non è cineticamente favorita a causa dell'elevata differenza di energia libera tra i reagenti e lo stato attivato. Per questo motivo è necessario ricorrere all'utilizzo di attivatori, come la coppia formata da diisopropilcarbodiimide (DIC) e ossima, le cui strutture sono riportate rispettivamente in Figura 20 e in Figura 21.

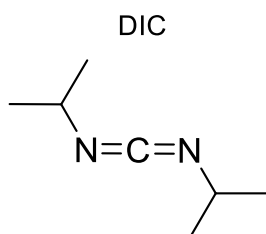


Figura 20 Struttura dell'attivatore DIC.

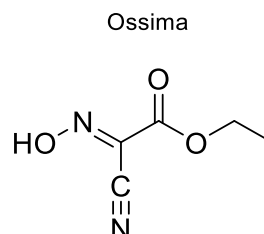


Figura 21 Struttura dell'attivatore ossima.

Lo scopo del processo di attivazione è modificare la densità elettronica attorno al gruppo carbonilico dell'amminoacido in ingresso, rendendolo più elettrofilo e favorendo così la reazione con il gruppo amminico N-terminale del residuo attaccato alla resina. La scelta della DIC come attivatore nella sintesi in fase solida è data dall'elevata solubilità, in DMF e DCM, della diisopropilurea che si forma durante la reazione, rendendo semplice la sua rimozione. L'ossima, essendo un nucleofilo, ha lo scopo di reagire con l'intermedio instabile (derivato dell'O-acilisourea) che si genera durante il processo, impedendo così reazioni secondarie e, soprattutto, la racemizzazione.

Il meccanismo ha inizio con l'attacco nucleofilo del gruppo carbossilico dell'amminoacido in ingresso sul carbonio elettrofilo della DIC, con conseguente formazione di un derivato dell'O-acilisourea. Quest'ultimo subisce un attacco nucleofilo da parte dell'ossima, che porta alla formazione di un estere attivo, il quale reagisce con il gruppo amminico del residuo attaccato alla resina. Il meccanismo completo è mostrato in Figura 22.³¹

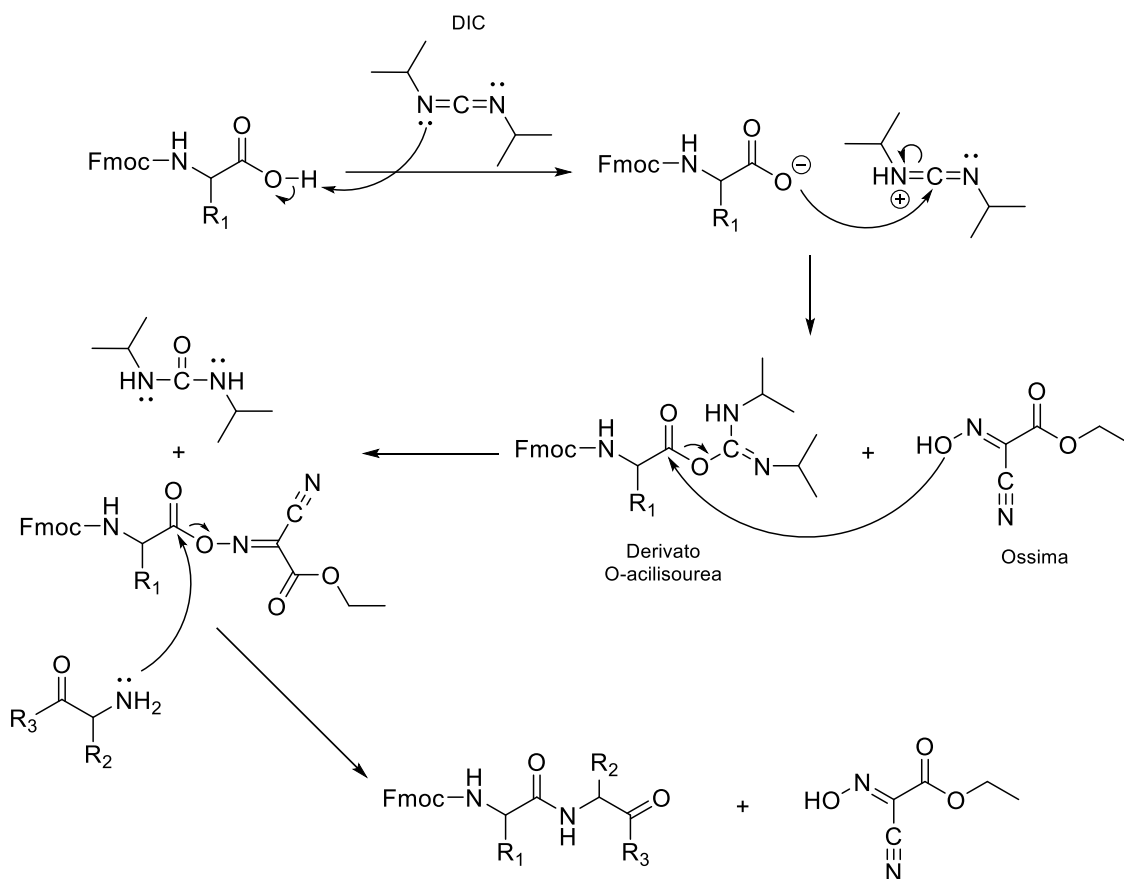


Figura 22 Meccanismo della reazione di attivazione con la coppia di attivatori DIC/ossima. Sono indicate con R₁, R₂, R₃ catene laterali generiche.

4.1.5. Kaiser test

Il Kaiser test è un saggio colorimetrico utilizzato per monitorare l'esito delle reazioni di *coupling* e di deprotezione nella sintesi peptidica in fase solida, identificando la presenza di gruppi amminici liberi sulla resina. Questo saggio si basa infatti sulla reazione della ninidrina con i gruppi amminici, formando un complesso blu scuro con le ammine primarie e un complesso color bruno con le ammine secondarie.

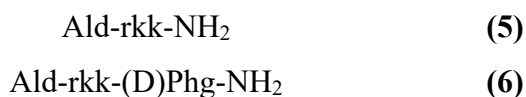
Nel monitoraggio dei passaggi di *coupling* critici, la comparsa di colorazione indica quindi la presenza di gruppi amminici liberi e, di conseguenza, che la reazione non è andata a completezza ed è quindi necessario ripeterla. Per eseguire il test sono necessarie tre soluzioni reagenti: una soluzione di cianuro di potassio in piridina, una soluzione di fenolo in etanolo e una soluzione di ninidrina in etanolo. Le tre soluzioni già pronte sono disponibili anche in un kit commerciale. Il test viene eseguito su pochi milligrammi di

resina, aggiungendo 20 μL di ciascuna soluzione e scaldando con una pistola termica per qualche minuto.

Questo saggio, oltre ad essere pratico e veloce, presenta anche dei lati negativi. Infatti, in presenza di sequenze lunghe e tendenti all'aggregazione, il test può occasionalmente fornire dei falsi negativi. Inoltre, un riscaldamento prolungato può causare la degradazione del campione o la rimozione del gruppo Fmoc per reazione con la piridina.^{29,31}

4.1.6. Ossidazione della serina

Il meccanismo d'inibizione dei peptidi retro-inversi sintetizzati (peptidi **5** e **6**) si basa sull'interazione covalente con la Ser135 del sito attivo della proteasi NS2B-NS3. Si riportano le strutture dei peptidi retro-inversi:



Nello specifico, il legame tra l'enzima e il peptide inibitore avviene attraverso la formazione di un intermedio emiacetalico, formato in seguito dell'attacco nucleofilo dell'ossigeno ossidrilico della catena laterale della Ser135 sul carbonio elettrofilo del gruppo aldeidico (presente all'estremità N-terminale).³²

La formazione della funzionalità aldeidica nei peptidi **5** e **6** avviene tramite ossidazione della serina terminale con NaIO₄. Il periodato di sodio è in grado di provocare selettivamente la scissione ossidativa dei residui di ammino-alcoli (serina o metionina) situati all'estremità N-terminale di un peptide, portando alla formazione di una gliossilammide (o α -osso-aldeide). Questa reazione avviene con un meccanismo analogo a quello della reazione di Malaprade, in cui avviene la scissione ossidativa di dioli vicinali.³³⁻³⁵ Lo ione periodato si coordina simultaneamente al gruppo amminico (in posizione α) e al gruppo idrossilico (in posizione β) della serina, formando un intermedio ciclico a 5 membri. In seguito alla scissione ossidativa del legame tra il C $^\alpha$ e il C $^\beta$ del residuo, il C $^\beta$ viene liberato come formaldeide e il periodato viene ridotto a iodato. Successivamente il residuo N-terminale viene convertito a gruppo gliossilammidico.³⁶ Si riporta lo schema generale della reazione in Figura 23:

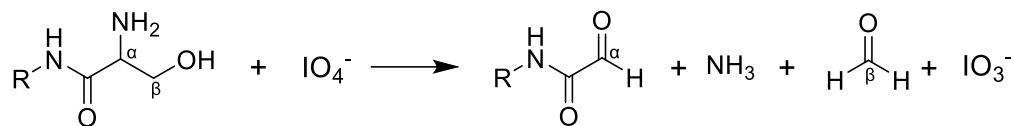


Figura 23 Schema di reazione generale dell'ossidazione della serina con NaIO_4 .

Il prodotto ottenuto si presenta come una miscela all'equilibrio dell'aldeide e della sua forma idrata.³³ In Figura 24 e in Figura 25 si rappresentano rispettivamente i peptidi **5** e **6** all'equilibrio con i relativi dioli.

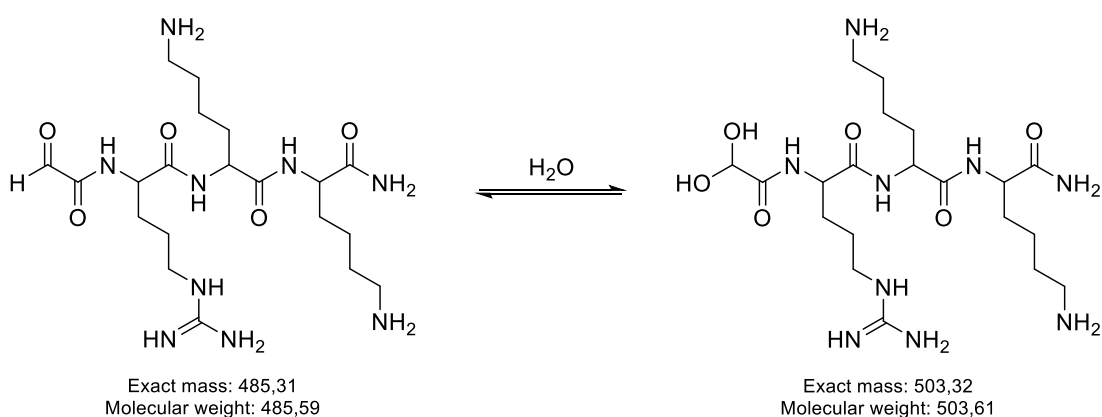


Figura 24 Reazione di equilibrio del peptide **5** con il rispettivo diolo.

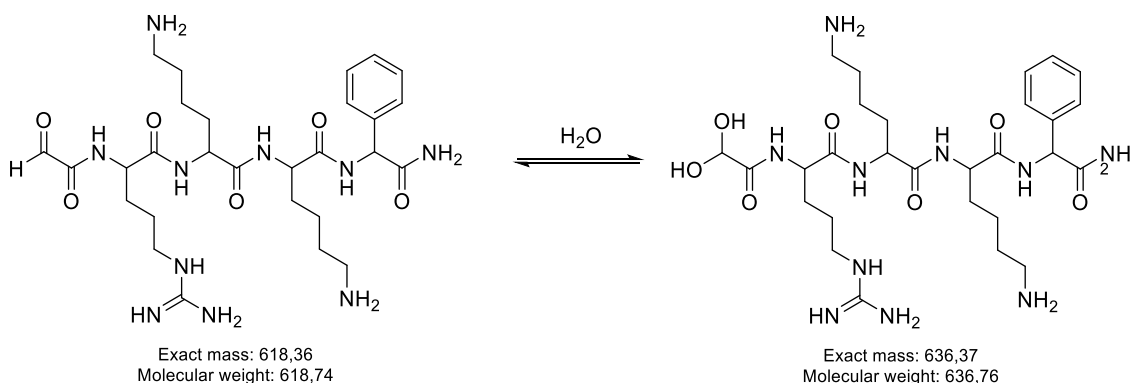


Figura 25 Reazione di equilibrio del peptide **6** con il rispettivo diolo.

Dopo l'ossidazione si è proceduto con la separazione del peptide dai sali. La separazione è risultata difficoltosa a causa della natura estremamente idrofila dei peptidi (costituiti da amminoacidi cationici) e della loro tendenza ad eluire insieme ai sali. Inizialmente, l'ossidazione della serina è stata condotta per 3 ore utilizzando un rapporto stechiometrico 1:3 tra le moli di peptide e le moli di NaIO_4 . In queste condizioni, i sali presenti in largo eccesso, al momento della separazione in HPLC, uscivano dalla colonna presentando un picco molto largo e intenso, rendendo il picco del peptide poco visibile e complicando ulteriormente la purificazione. Per questo motivo le condizioni di reazione sono state

ottimizzate riducendo il tempo di reazione a 2 ore e il rapporto stechiometrico a 1:1, con monitoraggio finale mediante spettrometria di massa, con lo scopo di verificare che tutto il peptide fosse stato ossidato. Queste condizioni hanno permesso di effettuare l'ossidazione in tempi più brevi e con una minor quantità di sale, ma anche di ottenere picchi HPLC più separati, facilitando così la purificazione. Per entrambi i peptidi sono stati utilizzati dei gradienti fortemente polari, nel dettaglio 0-2% B in 30 minuti per il peptide 5 e 0-10% B per il peptide 6. I risultati sperimentali sono riportati in Tabella 13.

Peptide	Sequenza	MW (g/mol)	Resa	Purezza	t_R (min)	$[M+H]^+$ (g/mol)
5	Ald-rkk	485,6	34%	99%	1,2	486,3
6	Ald-rkk-(D)Phg	618,7	22%	97%	25,3	619,3

Tabella 13 Risultati sperimentali della sintesi e purificazione dei peptidi retro-inversi. Gradiente utilizzato 0-2% B in 30 min.

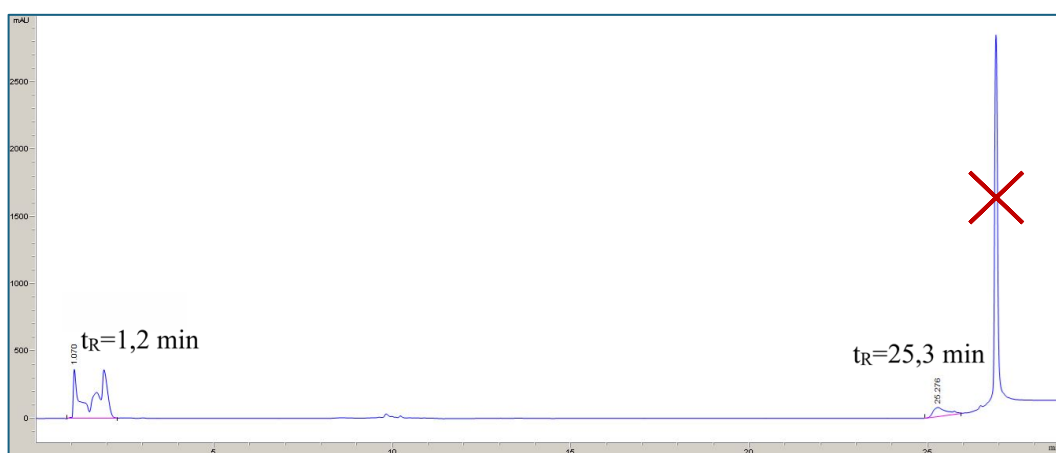


Figura 26 Profilo HPLC del peptide 5. Gradiente 0-3 % B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

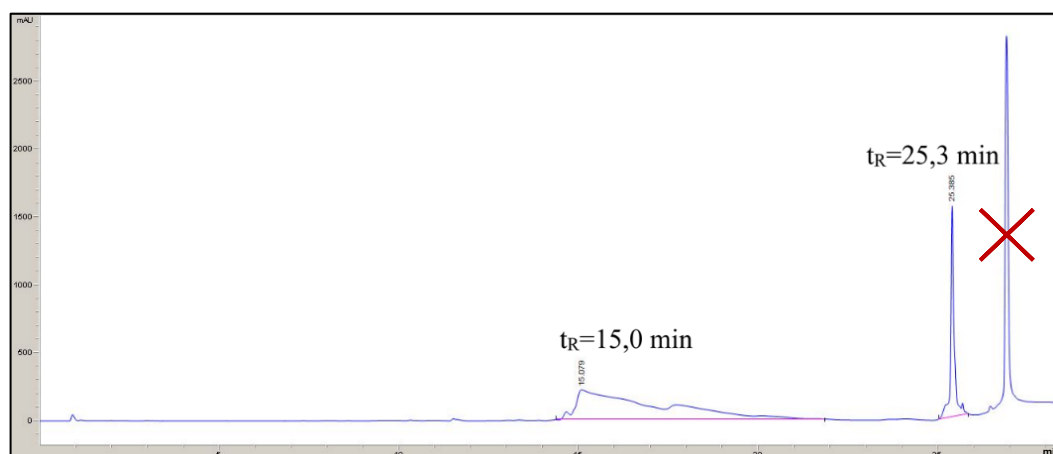
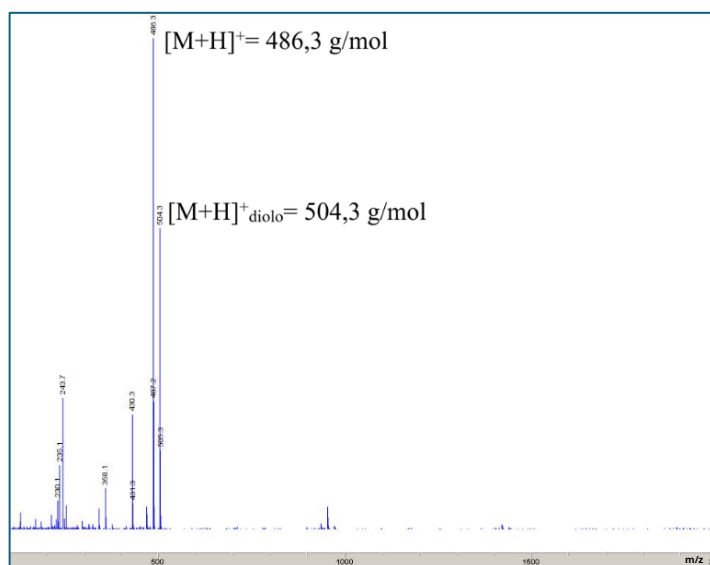


Figura 27 Profilo HPLC del peptide 6. Gradiente 0-3 % B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Si riportano in Figura 26 e 27, rispettivamente, i cromatogrammi dei peptidi **5** e **6**. In entrambi i cromatogrammi il picco a $t_R = 26,8$ min è un'impurezza presente all'interno della colonna. Il peptide **5** eluisce con $t_R = 1,2$ min, mentre il peptide **6** con $t_R = 25,3$ min. Si osserva che ciascun peptide è presente in un secondo picco, il peptide **5** a $t_R = 25,3$ min (Figura 26) e il peptide **6** a $t_R = 15,0$ min (Figura 27). La presenza dei peptidi e dei rispettivi dioli in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla presenza di un equilibrio dinamico tra le due specie.



In Figura 28 e in Figura 29 sono riportati gli spettri di massa del peptide **5** e del peptide **6**, in cui $[M+H]^+_{\text{diolo}} = 504,3 \text{ g/mol}$ e $[M+H]^+_{\text{diolo}} = 637,4 \text{ g/mol}$ corrispondono alle masse dei relativi dioli.

4.1.7. Derivati del P29

Una delle principali problematiche nello sviluppo di farmaci contro il WNV e, più in generale, contro i Flavivirus, è rappresentata dal trasporto del farmaco nel sito di replicazione virale. Di conseguenza, affinché un composto antivirale risulti efficace, deve essere in grado di superare barriere fisiologiche, come la barriera emato-encefalica (BBB), per raggiungere il sito d'azione del virus, che per il WNV risiede nel sistema nervoso centrale. La BBB è una barriera semi-permeabile che regola il movimento delle molecole dal sangue al cervello e svolge un ruolo cruciale nella protezione di quest'ultimo da sostanze potenzialmente pericolose. A causa di questa sua funzione protettiva, la BBB limita fortemente il passaggio della maggior parte delle piccole molecole, rendendo particolarmente difficile lo sviluppo di terapie efficaci contro i flavivirus neurotropi.³⁷

In questo contesto si inserisce la seconda classe di peptidi antivirali derivati da P29. Questa classe è stata sviluppata partendo dal peptide P29, un inibitore per la proteasi NS2B-NS3 del virus Dengue noto in letteratura, identificato tramite studi computazionali³⁸ e precedentemente sintetizzato all'interno del gruppo di ricerca.

Si riporta di seguito la struttura del peptide P29:



Dai risultati sperimentali il P29 ha mostrato una promettente capacità di attraversare la barriera emato-encefalica (BBB) e una significativa attività inibitoria in vitro; tuttavia, la citotossicità osservata e l'assenza di attività antivirale in saggi cellulari ne limitano il potenziale terapeutico, rendendo necessaria un'ulteriore ottimizzazione.³⁹ Per questo motivo sono stati condotti studi computazionali in collaborazione con l'Università di Lisbona, con l'obiettivo di identificare modifiche della sequenza in grado di aumentare l'attività e ridurre la citotossicità del peptide. Nello studio condotto è stato mantenuto invariato il numero di residui e l'estremità -HLCW, mentre sono state modificate la disposizione e il numero di lisine e arginine nelle prime quattro posizioni. L'effetto delle variazioni è stato valutato sulla base del parametro "attraversamento BBB" ottenuto, indice della capacità dei peptidi di attraversare la barriera emato-encefalica.

I risultati dello studio computazionale effettuato dall'Università di Lisbona sono riportati in Tabella 14.

Sequenza	Peso molecolare (g.mol ⁻¹)	Coefficiente di estinzione (M ⁻¹ x cm ⁻¹)	Punto isoelettrico	Carica netta (pH 7,4)	Stabilità (min)	Attraversamento BBB
RRRRHLCW	1181,44	5810	12,97	5,04	5,189	0,9848
KRRRHLCW	1153,43	5810	12,81	5,04	5,189	0,8272
RKRRHLCW	1153,43	5810	12,81	5,04	5,189	0,9875
RRKRHLCW	1153,43	5810	12,81	5,04	5,189	0,9864
RRRKHLCW	1153,43	5810	12,81	5,04	5,189	0,9819
KKRRHLCW	1125,41	5810	12,52	5,04	5,189	0,7435
KRRRHLCW	1125,41	5810	12,52	5,04	5,189	0,7863
KRRKHLCW	1125,41	5810	12,52	5,04	5,189	0,7743
RKKRHLCW	1125,41	5810	12,52	5,04	5,189	0,9844
RKRKHLCW	1125,41	5810	12,52	5,04	5,189	0,9845
RRKKHLCW	1125,41	5810	12,52	5,04	5,189	0,9764
KKKRHLCW	1097,4	5810	11,84	5,04	5,189	0,6842
KKRKHLCW	1097,4	5810	11,84	5,04	5,189	0,6708
KRKKHLCW	1097,4	5810	11,84	5,04	5,189	0,6976
RKKKHLCW	1097,4	5810	11,84	5,04	5,189	0,9687
KKKKHLCW	1069,39	5810	11,07	5,04	5,189	0,5006

Tabella 14 Risultati degli studi computazionali eseguiti all'Università di Lisbona.

Tra le diverse strutture identificate, è stato scelto di sintetizzare e caratterizzare le seguenti sequenze, evidenziate in grigio nella Tabella 14 insieme al peptide P29 di partenza (in cima):

RKKRHLCW (7)

RKRKHLCW (8)

RRKKHLCW (9)

RKKKHLCW (10)

Per la scelta delle sequenze sono stati presi in considerazione diversi parametri, spiegati di seguito. Dal momento che l'enzima NS2B-NS3^{pro} presenta una sequenza di riconoscimento costituita da due residui basici (P1: Arg, P2: Lys),^{28,40} per mantenere l'interazione cationica con la proteasi sono state scelte sequenze contenenti arginina in posizione 1 e lisina in posizione 2. Quest'ultimo requisito non è stato rispettato per il peptide 9, che presenta un'altra arginina in posizione 2, al fine di avere un confronto con gli altri peptidi scelti e per valutare se questa sostituzione influisce sull'attività del peptide.

Inoltre, sono state scelte sequenze con un maggior numero di lisine per due motivi principali:

- Peptidi con una maggiore quantità di lisine presentano generalmente una citotossicità minore rispetto ai peptidi contenenti arginine,^{28,41}
- Il *coupling* dei residui di lisina è più semplice rispetto a quello dell'arginina. Ciò è dovuto al maggiore ingombro sterico della catena laterale dell'arginina rispetto a quella della lisina, effetto che viene amplificato dalla presenza di gruppi protettori ingombranti sulla catena laterale dell'arginina.

I risultati sperimentali della sintesi dei peptidi **7**, **8**, **9** e **10** sono riportati in Tabella 15.

Peptide	Sequenza	MW (g/mol)	Resa	Purezza	t _R (min)	[M+H] ⁺ (g/mol)
7	RKKRHLCW	1125,41	6,2%	80%	10,4	1125,6
8	RKRKHLCW	1125,41	9,7%	94%	10,4	1125,6
9	RRKKHLCW	1125,41	7,2%	99%	15,0	1125,6
10	RKKKHLCW	1097,40	18%	99%	14,8	1097,6

Tabella 15 Risultati sperimentali della sintesi dei peptidi derivati di P29. Per i t_R utilizzando i gradienti: peptide 7 5-95% B in 30 minuti, peptide 8 5-95%B in 30 minuti, peptide 9 0-40%B in 20 minuti, peptide 10 0-40%B in 20 minuti.

Dai risultati sperimentali emerge che il peptide **7**, nonostante sia stato purificato mediante HPLC preparativa, presenta una purezza dell'80%, molto inferiore rispetto agli altri peptidi.

Questo perché, oltre al prodotto desiderato, si è formato un peptide a cui manca una leucina. È probabile che la causa della formazione della sequenza errata sia dovuta all'ingombro sterico della leucina e del triptofano, che dovrebbero legarsi, e alla loro vicinanza al *linker* della resina.

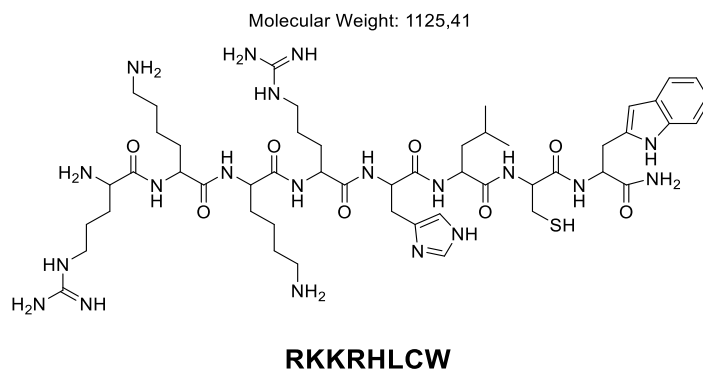


Figura 30 Struttura e peso molecolare del peptide 7 (RKKRHLCW).

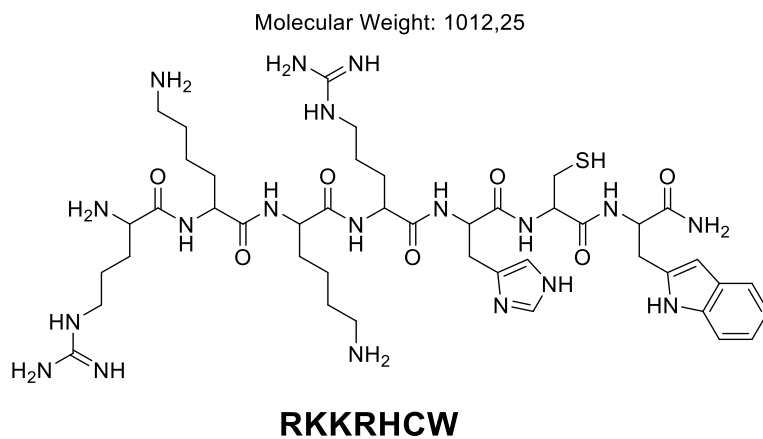


Figura 31 Struttura e peso molecolare del peptide RKKRHWCW

Alla fine della sintesi, dunque, si è ottenuta una miscela composta dal peptide desiderato, RKKRHLCW (Figura 30), e dall'analogo senza leucina, RKKRHWCW (Figura 31), come evidenziato dagli spettri di massa, rispettivamente in Figura 32 e in Figura 33.

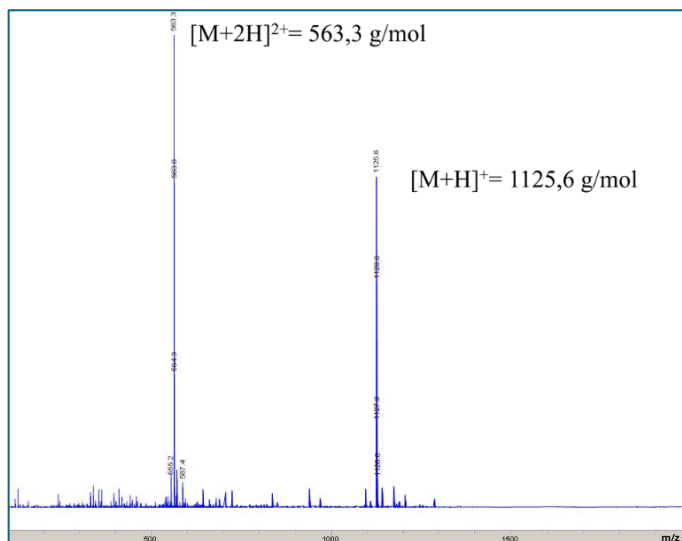


Figura 32 Spettro di massa del peptide 7. $[M+H]^+ = 1125,6$ g/mol; $[M+2H]^{2+} = 563,3$ g/mol.

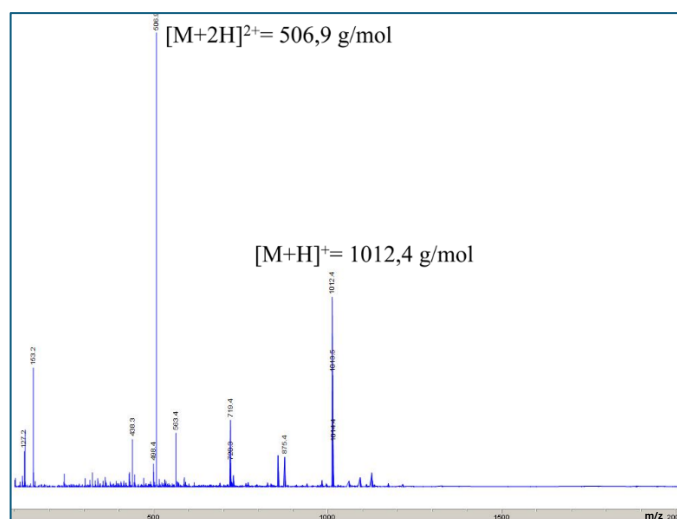


Figura 33 Spettro di massa del peptide RKKRHWC. $[M+H]^+ = 1012,4$ g/mol; $[M+2H]^{2+} = 506,9$ g/mol.

Siccome i due peptidi hanno la lunghezza, la composizione e l'idrofobicità estremamente simili, presentano anche tempi di ritenzione molto vicini. Per questo motivo non è stato possibile separarli maggiormente, come mostrato dal cromatogramma in Figura 34. Il peptide **7** eluisce con $t_R = 10,4$ min, il picco a $t_R = 1,0$ min è il picco d'iniezione, mentre nei picchi minori è presente il peptide RKKRHWC. Il peptide **7** si osserva anche in un secondo picco a $t_R = 9,0$ min. La presenza del peptide **7** in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla formazione di coppie ioniche tra i residui basici (lisina, arginina e istidina) con il TFA presente nella fase mobile, in condizioni di sovraccarico della colonna cromatografica.

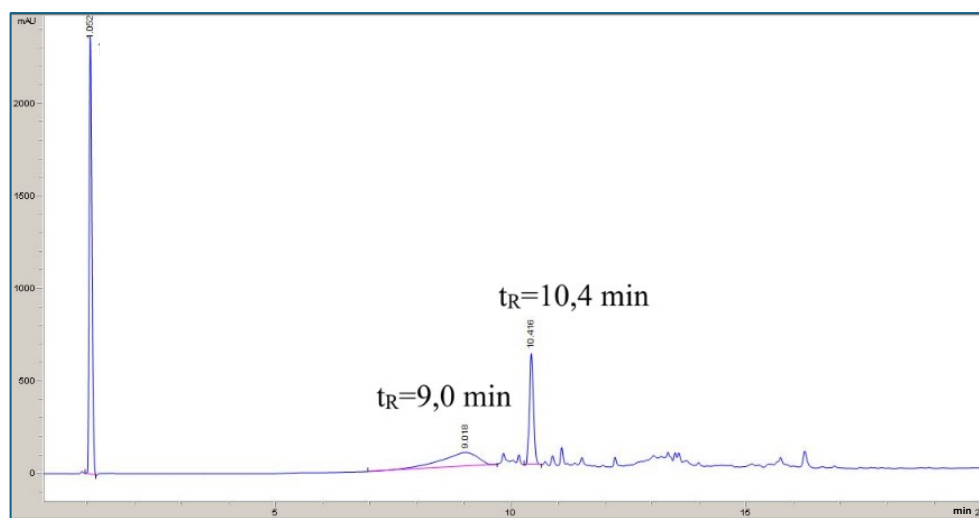


Figura 34 Cromatogramma del peptide **7** con tracce del peptide RKKRHWC. Gradiente 5-95% B in 30 minuti.

4.2. Indagini conformazionali

4.2.1. Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare è una tecnica spettroscopica utilizzata per ricavare informazioni sulla struttura secondaria dei peptidi e delle proteine in soluzione. È stata dunque adoperata questa tecnica per lo studio della struttura secondaria adottata in soluzione dai peptidi **1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10**.

Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente e utilizzando soluzioni a concentrazione 5×10^{-4} M, nei seguenti solventi:

- Per i peptidi **1, 2, 3, 4** sono stati scelti TFE e SDS 10 mM in acqua;
- Per i peptidi **7, 8, 9, 10** sono stati utilizzati TFE e acqua.

L'SDS è stato scelto per mimare l'ambiente di membrana, mentre il TFE induce la conformazione ad elica nei peptidi.

La spettroscopia CD, impiegata nell'analisi conformazionale di proteine e peptidi, si basa sulle transizioni elettroniche dei cromofori ammidici della catena principale.⁴² Sebbene i cromofori ammidici siano planari e intrinsecamente achirali (e quindi otticamente inattivi), essi acquisiscono attività ottica indotta sia dai centri stereogenici dei residui amminoacidici, sia dall'organizzazione spaziale della struttura secondaria.⁴³

La zona spettrale di interesse è compresa tra 190 nm e 260 nm, in cui cadono le transizioni più significative del gruppo ammidico: la transizione della componente parallela di $\pi \rightarrow \pi^*$, che avviene a 190 nm; la transizione $n \rightarrow \pi^*$, a circa 208 nm; e la componente perpendicolare della transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, a 222 nm.⁴³

Dall'analisi della forma delle curve ottenute e dalla posizione delle bande è possibile ricavare informazioni sul tipo di struttura secondaria che il peptide assume in soluzione. Si utilizzano come riferimento gli spettri delle conformazioni "pure" (come l' α -elica, il β -foglietto e l'elica 3_{10}), caratterizzati da profili definiti e bande dicroiche distintive.

Lo spettro del β -foglietto è caratterizzato da un massimo negativo a circa 217 nm e da un massimo positivo a 198 nm.

La struttura a α -elica presenta due bande negative di intensità circa uguale, una a 222 nm e l'altra a 208 nm, e una banda positiva molto intensa a 190 nm.

L'elica 3_{10} ha un profilo simile a quello dell' α -elica, mostrando una banda positiva poco intensa a 195 nm e bande negative spostate a lunghezze d'onda leggermente inferiori, con la banda a circa 222 nm di intensità molto minore rispetto alla banda a 208 nm.⁴⁴

Data questa caratteristica, per distinguere le due strutture ad elica è possibile usare il rapporto $R = [\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$, dove $[\Theta]_{222}$ è l'ellitticità molare della banda a 222 nm e $[\Theta]_{208}$ è l'ellitticità molare della banda a 208 nm. I valori di R non sono assoluti e vengono influenzati dall'ambiente, tuttavia si considera generalmente $R=1$ nella struttura ad α -elica, e circa $R = 0,4$ per l'elica 3_{10} .⁴²

➤ Peptidi 1 e 3

Si considerano gli spettri dicroici dei peptidi **1** (Ac-RKSKEKIG) e **3** (Ac-RKUKEKIG), che presentano entrambi il gruppo acetile all'N-terminale, ma differiscono per la sostituzione dell'amminoacido serina in posizione 3 con l'amminoacido Aib, noto per la sua capacità di stabilizzare strutture elicoidali. Gli spettri sono stati registrati in TFE (Figura 35), che favorisce conformazioni elicoidali, e SDS 10 mM (Figura 36), utilizzato come mimetico dell'ambiente di membrana.

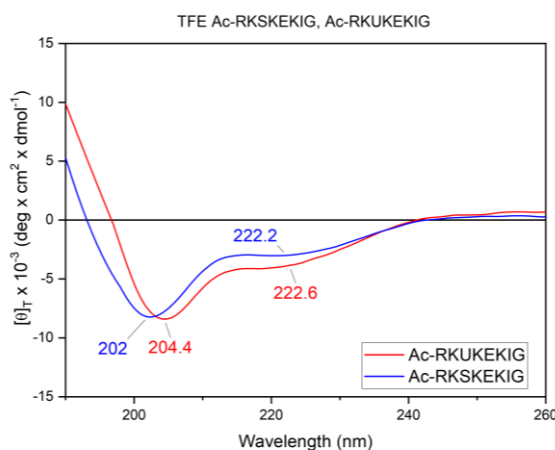


Figura 35 Spettri CD dei peptidi **1** (Ac-RKSKEKIG) e **3** (Ac-RKUKEKIG) in TFE. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

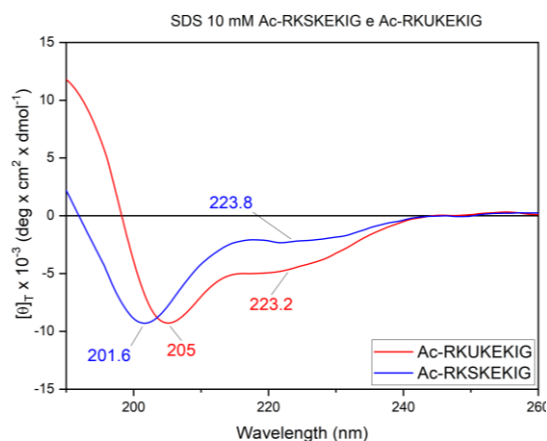


Figura 36 Spettri CD dei peptidi **1** (Ac-RKSKEKIG) e **3** (Ac-RKUKEKIG) in SDS 10 mM. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

Solvente	Peptide	$\theta_T \times 10^{-3}$	$\theta_T \times 10^{-3}$	R
		(deg x cm ² x dmol ⁻¹)	(deg x cm ² x dmol ⁻¹)	
TFE	1	-8,2 (202 nm)	-3,0 (222,2 nm)	0,36
	3	-8,4 (204,4 nm)	-3,8 (222,6 nm)	0,46
SDS	1	-9,3 (201,6 nm)	-2,2 (223,8 nm)	0,24
	3	-9,3 (205 nm)	-4,6 (223,2 nm)	0,49

Tabella 16 Valori delle ellitticità molari (deg × cm² × dmol⁻¹) e rapporto $R = [\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ per i peptidi **1** e **3**, alle lunghezze d'onda corrispondenti ai due massimi negativi delle curve dicroiche in TFE e SDS 10 mM, concentrazione peptidica di 5x10⁻⁴ M.

Il peptide **1** presenta in entrambi i solventi un massimo poco intenso a 190 nm e due massimi negativi di diversa intensità. Nonostante questo profilo suggerisce una tendenza verso una struttura elicoidale, la posizione della prima banda negativa ricade a circa 200 nm, un valore più vicino al valore tipico di un random coil (198 nm) rispetto all' α -elica. Si conclude quindi che in soluzione il peptide assume una conformazione disordinata ma con una tendenza all'elica 3₁₀.

Per il peptide **3**, gli spettri CD mostrano che in entrambi i solventi il profilo presenta un massimo intenso a 190 nm e due massimi negativi di diversa intensità, il primo più intenso a circa 205 nm e il secondo a circa 223 nm, caratteristici dell'elica 3₁₀. Inoltre, i valori di R, riportati in Tabella 16, sono compresi tra 0,4 e 0,6, coerenti con una conformazione elicoidale mista con contributo maggioritario dell'elica 3₁₀. A conferma di ciò, la posizione del primo massimo negativo a circa 205 nm è compatibile con l'elica 3₁₀, in cui i minimi sono spostati a lunghezze d'onda inferiori rispetto all' α -elica.

Da questi risultati si conclude quindi che la sostituzione dell'amminoacido Serina con l'amminoacido Aib ha indotto un maggior ordine nella struttura secondaria del peptide in soluzione, anche nell'ambiente membranimitico SDS.

➤ Peptidi **2** e **4**

Si considerano gli spettri del peptide **2** (Pal-RKSKEKIG) e del peptide **4** (Pal-RKUKEKIG), i quali hanno entrambi l'acido palmitico all'N-terminale e si differenziano solo per l'amminoacido in posizione 3: serina nel peptide **2** e Aib nel peptide **4**.

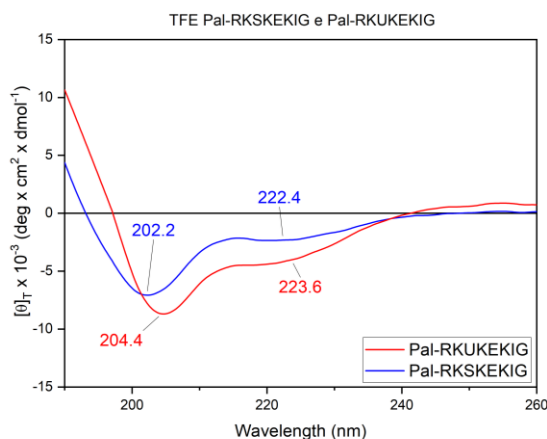


Figura 37 Spettri CD dei peptidi **2** (Pal-RKSKEKIG) e **4** (Pal-RKUKEKIG) in TFE. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

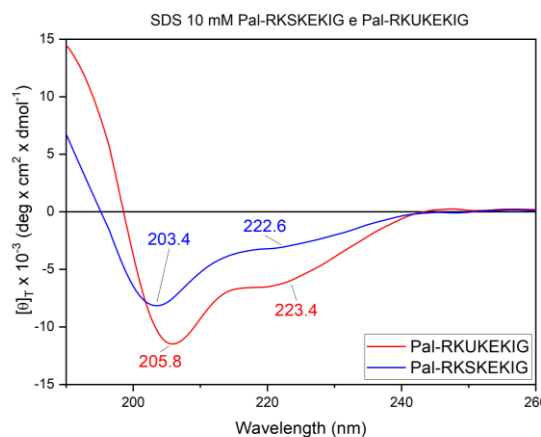


Figura 38 Spettri CD dei peptidi **2** (Pal-RKSKEKIG) e **4** (Pal-RKUKEKIG) in SDS 10 mM. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

Solvente	Peptide	$\theta_T \times 10^{-3}$	$\theta_T \times 10^{-3}$	R
		(deg x cm ² x dmol ⁻¹)	(deg x cm ² x dmol ⁻¹)	
TFE	2	-7,1 (202,2 nm)	-2,3 (222,4 nm)	0,33
	4	-8,7 (204,4 nm)	-4,0 (223,6 nm)	0,46
SDS	2	-8,1 (203,3 nm)	-3,0 (222,6 nm)	0,37
	4	-11,5 (205,8 nm)	-6,0 (223,4 nm)	0,52

Tabella 17 Valori delle ellitticità molari (deg x cm² x dmol⁻¹) e rapporto $R = [\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ per i peptidi **2** e **4**, alle lunghezze d'onda corrispondenti ai due massimi negativi delle curve dicroiche in TFE e SDS 10 mM, concentrazione peptidica di 5×10^{-4} M.

I profili delle curve ottenute sono analoghi a quelli dei corrispondenti peptidi con il gruppo acetile all’N-terminale. Il peptide **2** mostra in entrambi i solventi un massimo poco intenso a 190 nm, una banda negativa a circa 202 nm e una seconda banda negativa poco pronunciata a circa 222 nm. La posizione della banda, prossima al valore tipico del random coil, indica che il peptide assume una conformazione mista che comprende contributi di strutture disordinate e di eliche presumibilmente di tipo 3_{10} .

Il peptide **4**, invece, presenta un profilo compatibile con una conformazione elicoidale mista con prevalente contributo dell’elica 3_{10} , presentando un massimo molto intenso a 190 nm e due minimi di diversa intensità a circa 205 nm e 222 nm, tipici della struttura ad elica 3_{10} . L’analisi è coerente con i valori di R calcolati (Tabella 17), entrambi compresi tra 0,4 e 0,6. Le diverse conformazioni assunte dai peptidi **2** e **4** in TFE (Figura 37) e in

SDS 10 mM (Figura 38) sono confermate sia dalla posizione del primo massimo negativo, più vicino al valore del random coil nel peptide **2** e coerente con l'elica 3_{10} nel peptide **4**, sia dalla diversa intensità delle bande. Infatti, il peptide **4** presenta delle bande di intensità maggiore rispetto al peptide **2**, indice di un maggiore contributo elicoidale nella struttura. Si può dunque concludere che, anche in questo caso, la sostituzione della serina con l'amminoacido Aib ha promosso un maggiore ordine strutturale del peptide in soluzione.

➤ Peptide 7, 8, 9, 10

Si considerano gli spettri dicroici dei peptidi **7** (RKKRHLCW, Figura 39), **8** (RKRKHLWC, Figura 40), **9** (RRKKHLWC, Figura 41) e **10** (RKKKHLWC, Figura 42), registrati in acqua e TFE.

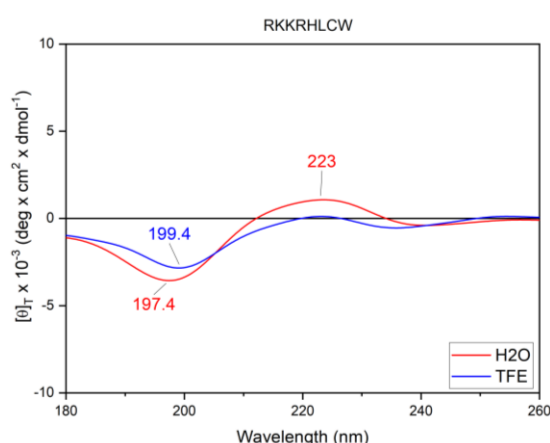


Figura 39 Spettri CD del peptide **7** (RKKRHLCW) in TFE e acqua. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

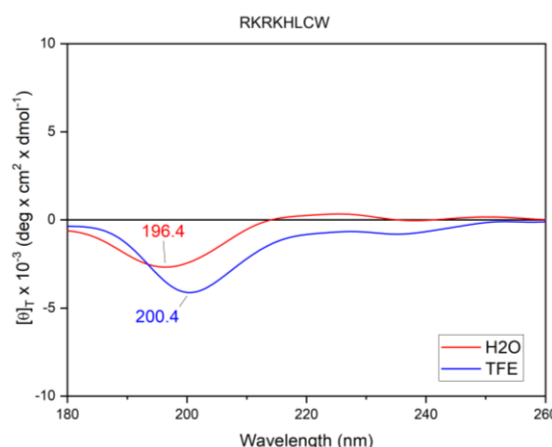


Figura 40 Spettri CD del peptide **8** (RKRKHLWC) in TFE e acqua. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

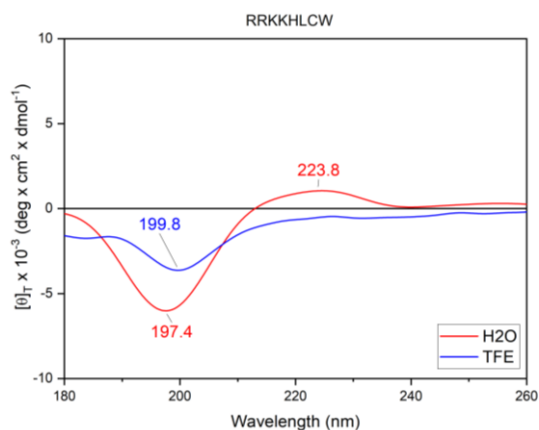


Figura 41 Spettri CD del peptide **9** (RRKKHLWC) in TFE e acqua. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

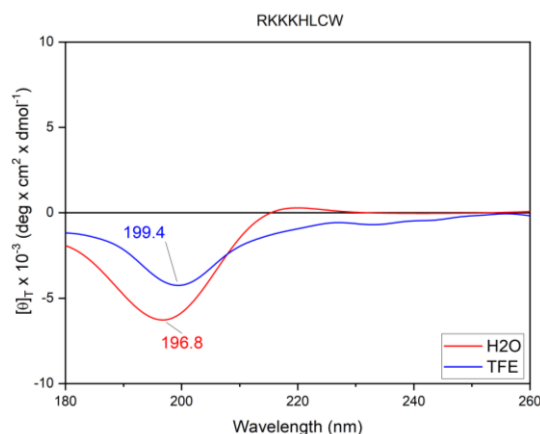


Figura 42 Spettri CD del peptide **10** (RKKKHLWC) in TFE e acqua. Concentrazione peptidica 5×10^{-4} M, cammino ottico 0,02 cm.

In acqua, tutti i peptidi presentano un massimo negativo a circa 198 nm, di diversa intensità, e una debole banda positiva a circa 220 nm. Questi due segnali sono riconducibili a un profilo random coil, dunque a una conformazione prevalentemente disordinata. Inoltre, negli spettri del peptide **7** e del peptide **9**, nel medesimo solvente, è presente un massimo poco intenso a 223 nm. Questo segnale può essere attribuito alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'anello indolico del residuo di triptofano.

La variazione dell'intensità della banda e l'assenza di questa negli altri spettri possono essere giustificate dal diverso intorno chimico, come la variazione della sequenza, che influenza la libertà conformazionale dell'anello indolico.⁴⁵

Gli spettri registrati in TFE, oltre al massimo negativo a 198 nm, presentano una risalita verso valori positivi di ellitticità molare, senza però superare lo zero. Questo comportamento potrebbe essere attribuito al TFE, che, pur essendo un solvente strutturante, modifica la struttura disordinata, ma non riesce a indurre strutture note prevalenti in soluzione. Si conclude quindi che tutti i derivati di P29 assumono una struttura disordinata in tutti i solventi considerati.

4.3. Test biologici

4.3.1. Disk diffusion test

L'attività antibatterica dei peptidi **1**, **2**, **3** e **4** è stata valutata mediante il metodo di diffusione su disco di Kirby-Bauer (*disk diffusion test*).

Il metodo si basa sul contatto tra una quantità standardizzata di microrganismo e una concentrazione nota del composto antimicrobico. Dopo l'incubazione in condizioni controllate, l'attività inibitoria viene valutata misurando il diametro dell'alone di inibizione, ossia l'area priva di crescita microbica che si forma attorno al campione.

I peptidi, precedentemente sciolti in DMSO, sono stati adsorbiti su dischi di carta del diametro di 6 mm, ciascuno caricato con 100 µg di campione. L'inoculo batterico di 0,5 McFarland (corrispondente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL) è stato seminato su terreno di coltura Mueller-Hinton a pH 7,2–7,4 con incubazione a 37°C per 20 ore. Al termine, l'attività del peptide è stata determinata misurando i diametri (in millimetri) degli aloni di inibizione attorno ai dischi di carta.

Il test è stato eseguito su diversi ceppi batterici Gram-positivi (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19-15, *Bacillus subtilis* ATCC –33, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Vancomycin-resistant enterococci* ATCC 51299 e un clinico isolato *Streptococcus pyogenes*) e Gram-negativi (*Salmonella enterica* ATCC 1307-, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19-0-, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048).

I diametri dell'alone di inibizione misurati in mm sono riportati in Tabella 18; i batteri Gram-positivi sono evidenziati in azzurro, mentre i Gram-negativi sono evidenziati in arancione.

Ceppi batterici	Peptide 1 ±1 (mm)	Peptide 2 ±1 (mm)	Peptide 3 ±1 (mm)	Peptide 4 ±1 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	7	-	8
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19-15	-	11	-	8
<i>Streptococcus pyogenes</i> Clinical isolate	-	10	-	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	8	-	8
<i>Vancomycin-resistant enterococci</i> ATCC 51299	-	8	9	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 1307	-	-	-	8
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	-	-	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	7	-	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	7	-	7
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19-0-	-	9	-	7
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC --33	-	-	-	7

Tabella 18 Attività antimicrobica dei peptidi 1, 2, 3, 4 rispetto a ceppi batterici Gram-positivi (evidenziati in azzurro) e Gram-negativi (evidenziati in arancione) dopo 20 ore di incubazione a 37°C. I diametri degli aloni di inibizione sono stati misurati in mm.

Questo test è stato utilizzato per valutare l'attività antibatterica e studiare l'effetto delle modifiche strutturali (l'utilizzo di due diverse catene aciliche all'N-terminale e la sostituzione della serina in posizione 3 con l'Aib) sulla capacità inibitoria dei peptidi sintetizzati.

Dai risultati sperimentali emerge che i peptidi 1 (Ac-RKSKEKIG) e 3 (Ac-RKUKEKIG), aventi entrambi il gruppo acetile all'N-terminale, mostrano una capacità inibitoria pressoché nulla. In particolare, il peptide 1 è risultato completamente inattivo su tutti i

ceppi testati, mentre il peptide **3** ha mostrato un'attività inibitoria limitata al solo ceppo *Vancomycin-resistant enterococci* ATCC 51299.

Il peptide **2** (Pal-RKSKEKIG) presenta una discreta attività inibitoria, risultando più attivo nei confronti dei batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi.

Il peptide **4** (Pal-RKUKEKIG) è risultato il più attivo tra tutti i peptidi testati in termini di spettro d'azione, inibendo la crescita nella maggior parte dei ceppi batterici considerati. Si osserva però che i diametri degli aloni di inibizione osservati per il peptide **4** sono tendenzialmente inferiori o uguali rispetto a quelli misurati per gli altri peptidi attivi sullo stesso ceppo. Dunque, il peptide **4** presenta uno spettro d'azione più ampio ma una capacità inibitoria generalmente minore o uguale.

Si conclude quindi che gli analoghi aventi l'acido palmitico all'N-terminale sono significativamente più attivi rispetto agli analoghi con l'acetile. Si può ipotizzare che la presenza dell'acido palmitico aumenti notevolmente il carattere idrofobico del peptide, rafforzando in genere le interazioni con la membrana batterica. L'acido palmitico, infatti, è in grado di formare delle interazioni con le code apolari dei fosfolipidi di membrana, fungendo da "ancora" e favorendo l'inserzione del peptide nel doppio strato lipidico. Questo effetto non si osserva invece in presenza del gruppo acetile, la cui catena risulta troppo corta per formare interazioni di questo tipo.⁴⁶

Inoltre, la sostituzione dell'amminoacido serina in posizione 3 con l'Aib, ha causato una riduzione dell'attività inibitoria dei peptidi per alcuni batteri ma ha aumentato lo spettro d'azione verso un maggior numero di ceppi batterici. Questo dato può essere attribuito all'aumento dell'ordine conformazionale dei peptidi aventi Aib nella sequenza, come confermato dagli studi di dicroismo circolare, che porta a maggiori interazioni con la membrana batterica.

4.3.2. Saggio di inibizione dell'attività proteasica di NS2B-NS3

L'attività inibitoria del peptide **5** (Ald-rkk) e del peptide **6** (Ald-rkk-(D)Phg) nei confronti della proteasi NS2B-NS3 è stata valutata mediante un saggio fluorimetrico condotto in piastra.

Per il saggio è stato utilizzato un enzima chimerico, in cui la porzione di NS2B è stata fusa al dominio proteasico di NS3 mediante un linker contenente residui di glicina. Come

substrato è stato utilizzato il tripeptide Gly-Lys-Arg, sequenza riconosciuta dalla proteasi, coniugato alla 7-aminocumarin-4-metil-3-acetato (ACMA, un derivato della cumarina), avente la funzione di fluoroforo.

La scissione proteolitica del substrato fluorogenico provoca il rilascio del fluoroforo, con conseguente generazione del segnale di fluorescenza direttamente proporzionale all'attività enzimatica. Il saggio è stato eseguito in piastre nere da 96 pozzetti (OptiPlates™, PerkinElmer), utilizzando come tampone di reazione Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM e Brij 35 0,008% a pH 8,0. Le concentrazioni finali utilizzate nel saggio sono state pari a 0,5 µM per l'enzima e 1 µM per il substrato e la temperatura di lavoro è stata mantenuta a 37°C. Prima della misurazione dell'attività enzimatica, i peptidi testati sono stati preincubati con l'enzima per 30 minuti a temperatura ambiente.

Le letture fluorimetriche sono state effettuate con un lettore multimodale di piastre (VICTOR® Nivo™ Multimode Plate Reader, PerkinElmer), utilizzando un filtro di eccitazione a 355 nm e un filtro di emissione a 480 nm, con larghezza di banda del filtro rispettivamente di 40 e 30 nm. La fluorescenza è stata misurata ogni 5 minuti, per una durata complessiva di 30 minuti. Prima di ciascuna lettura, la piastra è stata sottoposta ad agitazione orbitale per 5 secondi, per garantire l'omogeneizzazione del contenuto dei pozzetti. Il segnale di fondo è stato determinato misurando la fluorescenza del substrato fluorogenico in assenza dell'enzima, mentre come riferimento per la massima attività enzimatica è stata utilizzata la condizione contenente l'enzima e il substrato in assenza del peptide inibitore.

I dati ottenuti sono stati elaborati confrontando i segnali registrati in presenza dei peptidi con il segnale di massima attività enzimatica, il quale corrisponde al 100% dell'attività enzimatica. Tale confronto ha permesso di determinare la riduzione dell'attività proteasica associata alla presenza degli inibitori.

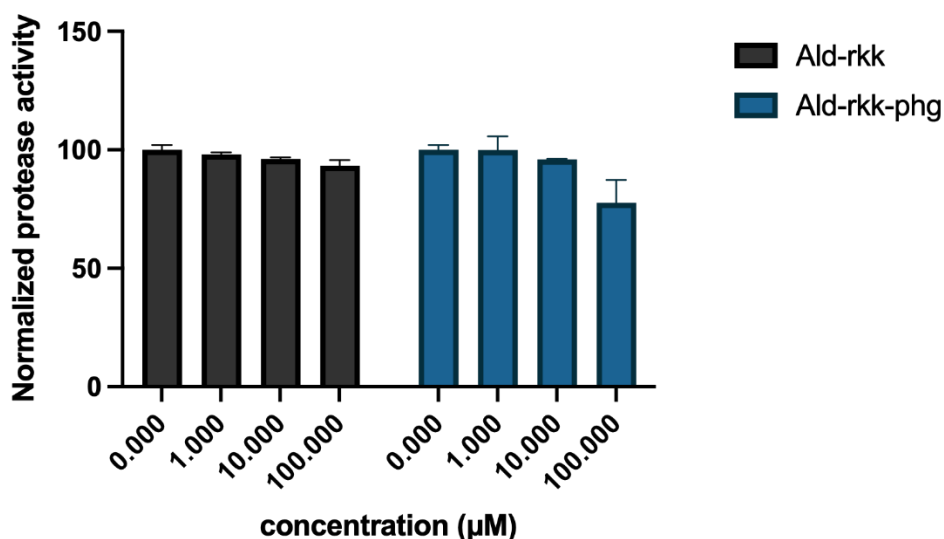


Figura 43 Risultati del test d'inibizione dell'attività enzimatica di NS2B-NS3. In blu sono rappresentati i risultati relativi al peptide 6 (Ald-rkk-(D)Phg) e in nero sono riportati i risultati riferiti al peptide 5 (Ald-rkk). I test sono stati condotti su diverse concentrazioni peptidiche (1, 10, 100 μM) a 37°C, dopo 30 minuti di pre-incubazione del peptide con l'enzima.

I risultati del test d'inibizione della proteasi NS2B-NS3 sono riportati in Figura 43, con le bande nere che rappresentano l'inibizione provocata dal peptide 5 e quelle in blu che rappresentano l'inibizione provocata dal peptide 6.

Il peptide 5 non ha provocato variazioni significative dell'attività proteasica fino alla concentrazione peptidica di 10 μM, mostrando una minima diminuzione dell'attività a 100 μM, la massima concentrazione testata.

Il peptide 6 inizia a mostrare una debole capacità inibitoria a 10 μM. Alla massima concentrazione peptidica analizzata (100 μM), l'attività enzimatica si riduce a circa il 75-80%, equivalente ad un'inibizione di circa il 20-25 % della proteasi NS2B-NS3 da parte del peptide.

Dunque, il peptide 6, avente una struttura simile al peptide di riferimento riportato in letteratura (Fenilacetil-KKR-Ald), presenta un'attività inibitoria superiore rispetto al peptide 5, che differisce per l'assenza dell'amminoacido fenilglicina. La presenza del gruppo idrofobico ingombrato determina quindi una migliore interazione con la proteasi enzimatica,⁴⁷ con conseguente aumento dell'attività inibitoria, in accordo con i risultati sperimentali. Tuttavia, pur essendo il più attivo tra i due peptidi testati, la diminuzione del segnale rimane contenuta anche ad alte concentrazioni, indicando una capacità d'inibizione ridotta.

5. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono state seguite due linee di ricerca differenti, la prima riguardante la sintesi e caratterizzazione di peptidi antibatterici (analoghi della cathelicidina LL-37), la seconda di peptidi antivirali (peptidi retro-inversi e derivati di P29). Tutti i peptidi sono stati sintetizzati con successo tramite la strategia di sintesi peptidica su fase solida.

Gli analoghi della cathelicidina LL-37 presentano una sequenza più corta rispetto al peptide originario, caratterizzati dalla sostituzione dell'amminoacido Serina con l'Aib e dalla presenza di diversi gruppi acilici all'N-terminale. L'indagine conformazionale effettuata tramite dicroismo circolare dei peptidi **1**, **2**, **3** e **4** ha evidenziato che gli analoghi contenenti il residuo Aib nella catena (peptidi **2** e **4**) presentano delle strutture secondarie più ordinate rispetto a quelli con la serina (peptidi **1** e **3**), assumendo conformazioni ad elica. Le proprietà antibatteriche dei peptidi sono state testate su ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi mediante il *disk diffusion test*. I risultati sperimentali hanno dimostrato che la presenza dell'acido palmitico all'N-terminale comporta un aumento dell'attività antibatterica rispetto al gruppo acetile. Inoltre, la presenza di Aib ha ampliato lo spettro d'azione dei peptidi verso un maggior numero di ceppi batterici, anche se ha dimostrato una tendenza a ridurre l'attività antibatterica rispetto ad altri peptidi risultati attivi sullo stesso ceppo.

Le due classi di peptidi antivirali sintetizzate sono state studiate per inibire il complesso enzimatico NS2B-NS3 del West Nile Virus, coinvolto nella replicazione del genoma e nel processamento della poliproteina virale.

La prima classe è costituita dai peptidi retro-inversi, formata dai peptidi **5** (Ald-rkk) e **6** (Ald-rkk-(D)Phg). La funzionalità aldeidica ha la funzione di legarsi covalentemente al residuo catalitico Ser135 della proteasi NS2B-NS3 ed è stata ottenuta tramite ossidazione del peptide con NaIO₄. Il saggio di inibizione dell'attività proteasica di NS2B-NS3 ha mostrato un'attività inibitoria maggiore per il peptide **6** rispetto al peptide **5**, suggerendo che la presenza di un gruppo idrofobico all'estremità favorisca l'inibizione. Complessivamente, però, è stata osservata una scarsa capacità inibitoria.

La seconda classe di peptidi antivirali è stata sintetizzata partendo dal peptide P29, un inibitore della proteasi NS2B-NS3 del virus Dengue riportato in letteratura e già

sintetizzato all'interno del gruppo di ricerca. In collaborazione con l'Università di Lisbona, l'obiettivo è stato di identificare dei composti aventi un'attività maggiore e una citotossicità inferiore rispetto al peptide P29, mantenendo la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica al fine di raggiungere il sistema nervoso centrale, sito d'azione del WNV. Tra i peptidi identificati sono stati scelti e sintetizzati i peptidi **7** (RKKRHLCW), **8** (RKRKHLCW), **9** (RRKKHLCW) e **10** (RKKKHLCW). Gli studi conformazionali eseguiti tramite dicroismo circolare hanno dimostrato che tutti i peptidi di questa classe assumono una conformazione disordinata in soluzione.

Si prospetta che, in futuro, lo studio e ulteriori modifiche della cathelicidina LL-37 potranno contribuire allo sviluppo di nuovi farmaci contro disturbi dermatologici, malattie autoimmuni e cancro.⁴⁸

La mancanza di vaccini o terapie antivirali approvate per il WNV rende fondamentale la ricerca di nuovi composti in grado di inibire questo virus. A tal proposito, lo studio condotto in questo lavoro di tesi pone le basi per l'ottimizzazione degli inibitori peptidici retro-inversi e per ulteriori approfondimenti sulla famiglia dei peptidi P29, di cui sarà necessario studiare l'attività, la citotossicità e la capacità di attraversare la membrana emato-encefalica.

6. INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI

6.1. Spettri degli analoghi di LL-37

➤ Peptide 1 (Ac-RKSKEKIG)

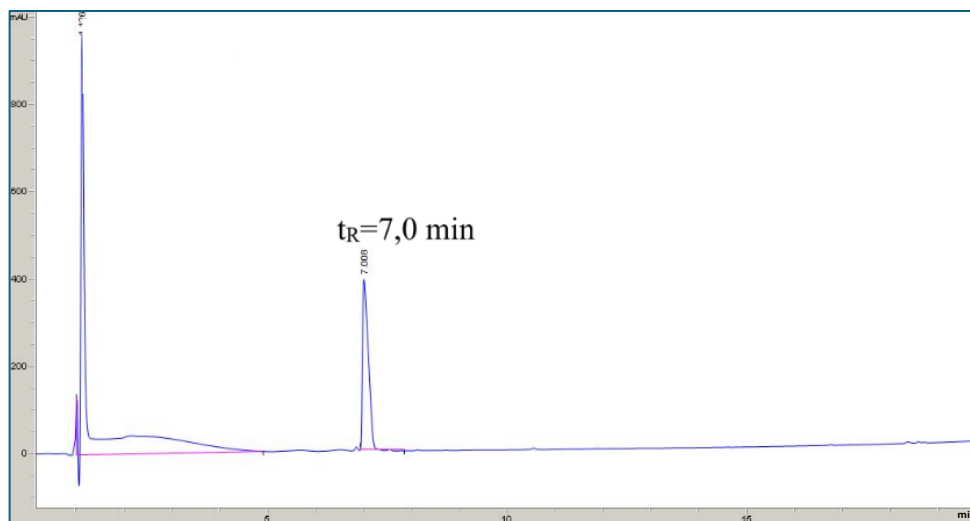


Figura 44 Profilo HPLC del peptide 1. Gradiente 5-95% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 44, il picco a $t_R = 1,0$ min è il picco di iniezione, mentre il peptide 1 eluisce con $t_R = 7,0$ min.

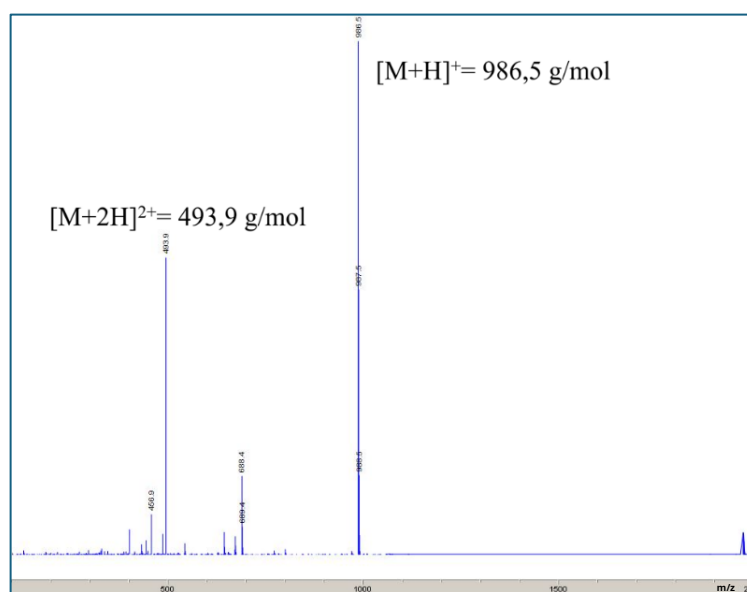


Figura 45 Spettro di massa del peptide 1.

➤ **Peptide 2 (Palm-RKSKEKIG)**

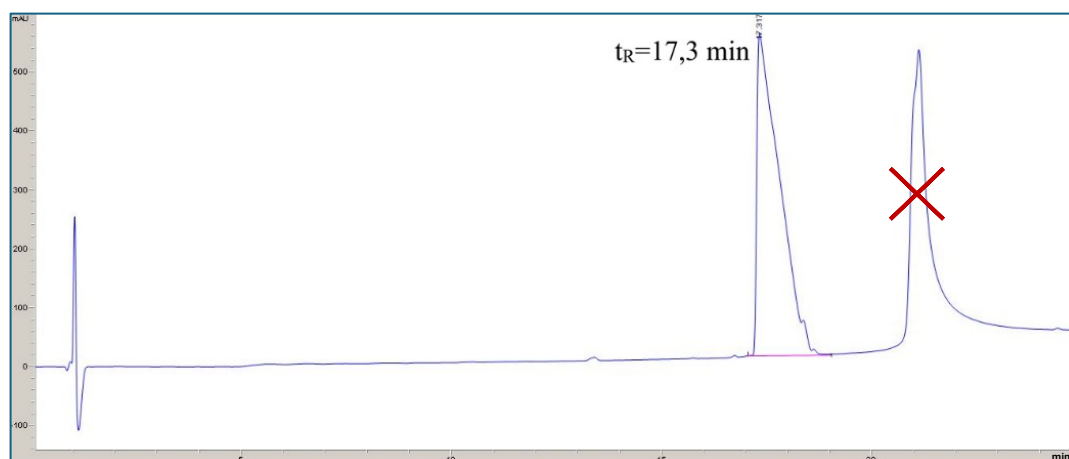


Figura 46 Profilo HPLC del peptide 2. Gradiente 5-95% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220 \text{ nm}$.

Nel cromatogramma in Figura 46 il picco a $t_R = 1,0 \text{ min}$ è il picco d'iniezione, il picco a $t_R = 21,0 \text{ min}$ corrisponde ad un'impurezza presente in colonna. Il peptide 2 eluisce con $t_R = 17,3 \text{ min}$.

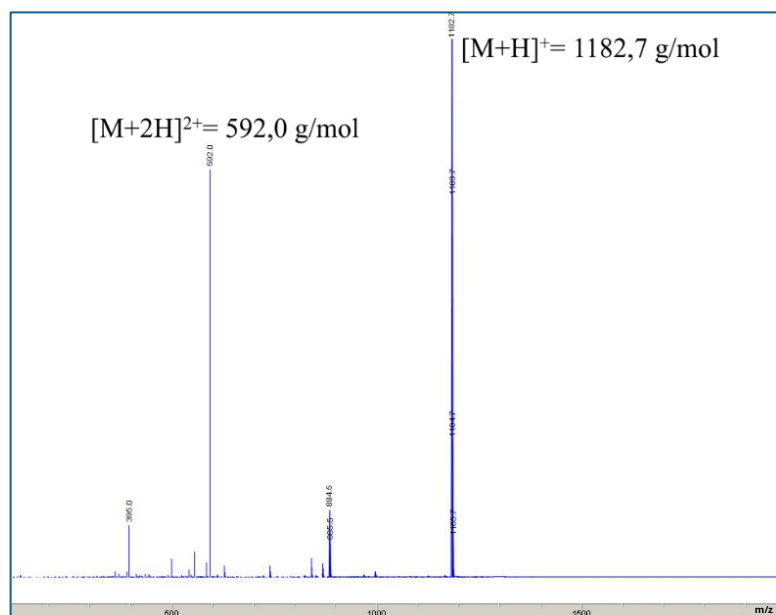


Figura 47 Spettro di massa del peptide2.

➤ **Peptide 3 (Ac-RKUKEKIG)**

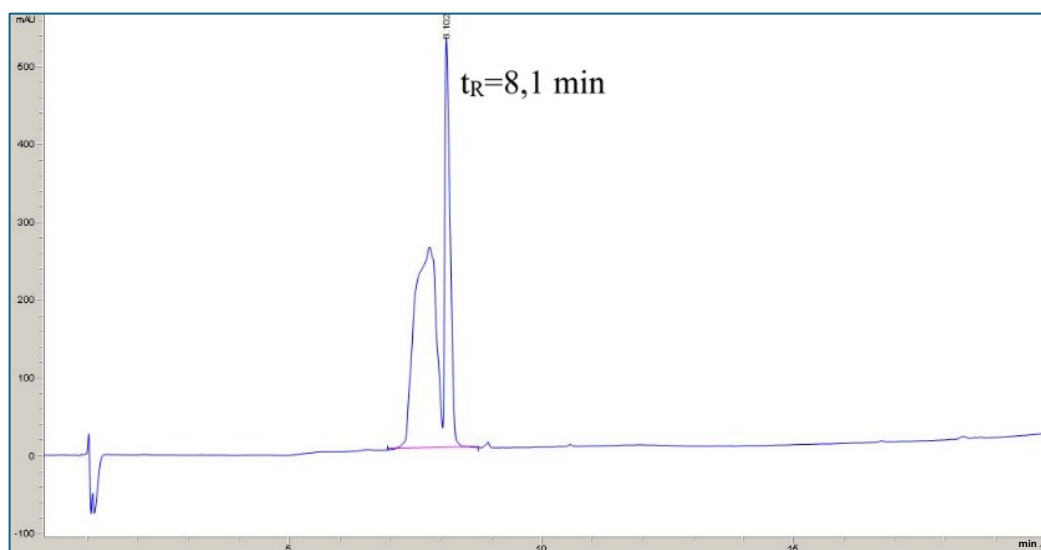


Figura 48 Profilo HPLC del peptide 3. Gradiente 5-95% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220 \text{ nm}$.

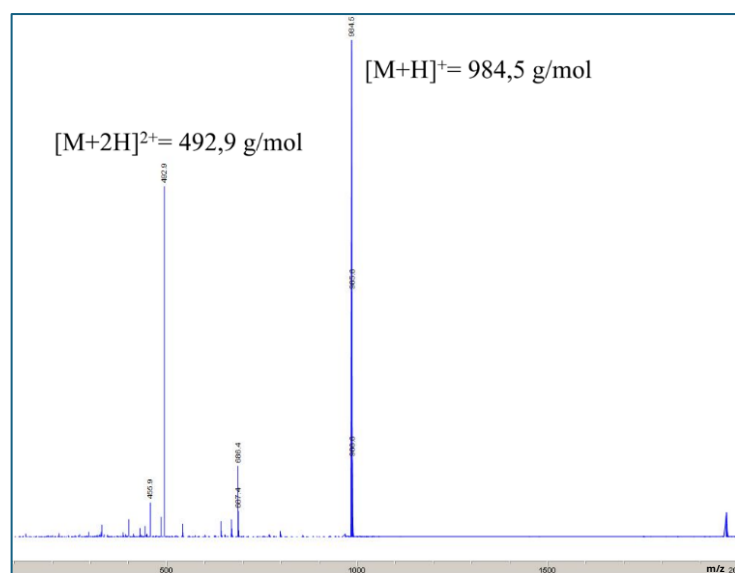


Figura 49 Spettro di massa del peptide 3.

➤ **Peptide 4 (Pal-RKUKEKIG)**

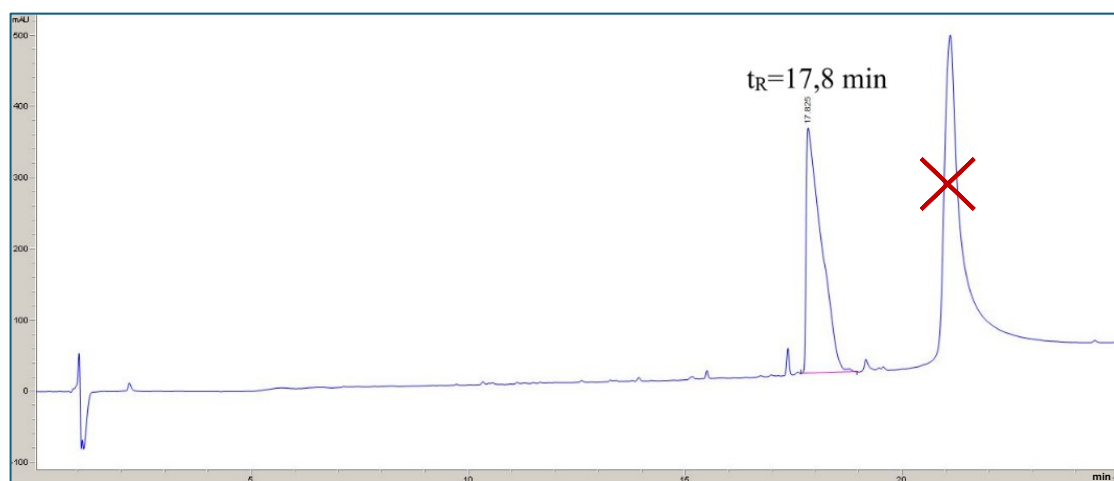


Figura 50 Profilo HPLC del peptide 4. Gradiente 5-95% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 50 il picco a $t_R = 21,0$ min corrisponde ad un'impurezza presente in colonna. Il peptide 4 eluisce con $t_R = 17,8$ min.

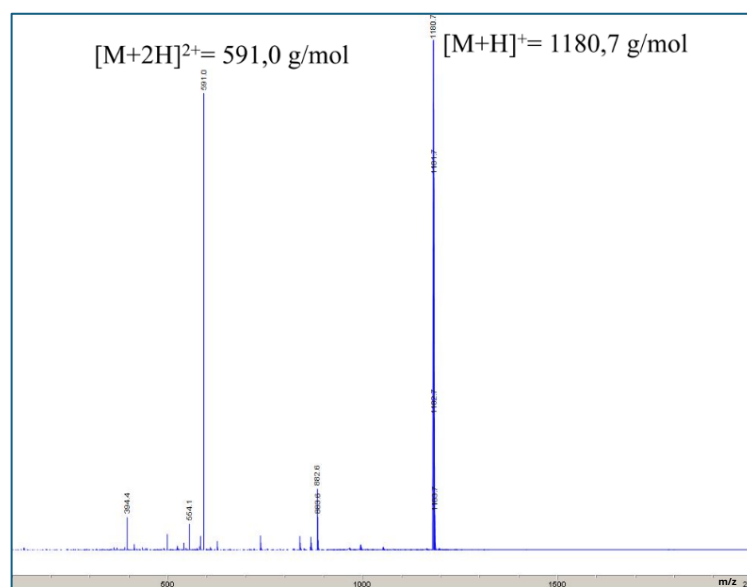


Figura 51 Spettro di massa del peptide 4.

6.2. Spettri dei peptidi retro-inversi

➤ Peptide 5 (Ald-rkk)



Figura 52 Profilo HPLC del peptide 5. Gradiente 0-3% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 52, il picco a $t_R = 26,8$ min corrisponde ad un'impurezza presente in colonna. Il peptide 5 eluisce con $t_R = 1,2$ min, ma il peptide si osserva anche in un secondo picco a $t_R = 25,3$ min. La presenza del peptide e del suo diolo in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla presenza di un equilibrio dinamico tra le due specie.

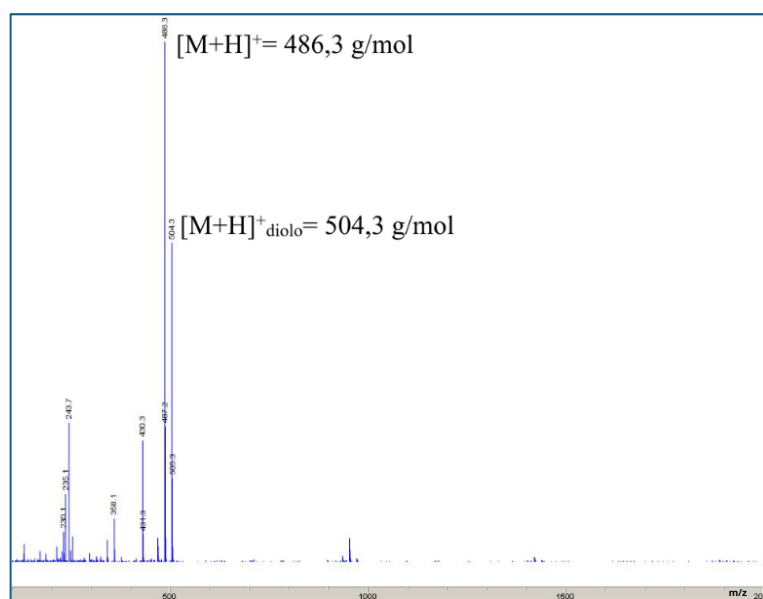


Figura 53 Spettro di massa del peptide 5.

➤ **Peptide 6 (Ald-rkk-(D)Phg)**

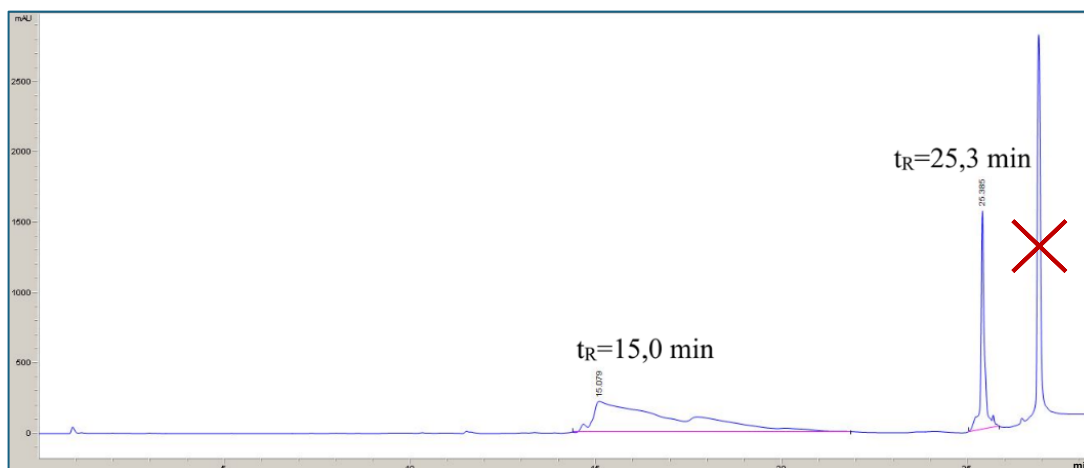
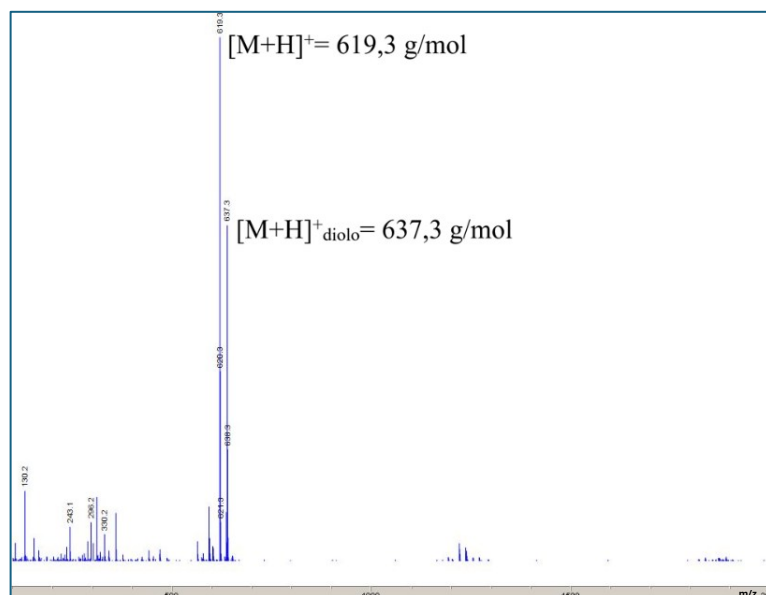


Figura 54 Profilo HPLC del peptide 6. Gradiente 0-3% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 54, il picco a $t_R = 26,8$ min corrisponde ad un'impurezza presente in colonna. Il peptide 6 eluisce con $t_R = 25,3$ min, ma il peptide si osserva anche in un secondo picco a $t_R = 15,0$ min. La presenza del peptide e del suo diolo in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla presenza di un equilibrio dinamico tra le due specie.



6.3. Spettri dei derivati di P29

➤ Peptide 7 (RKKRHLCW)

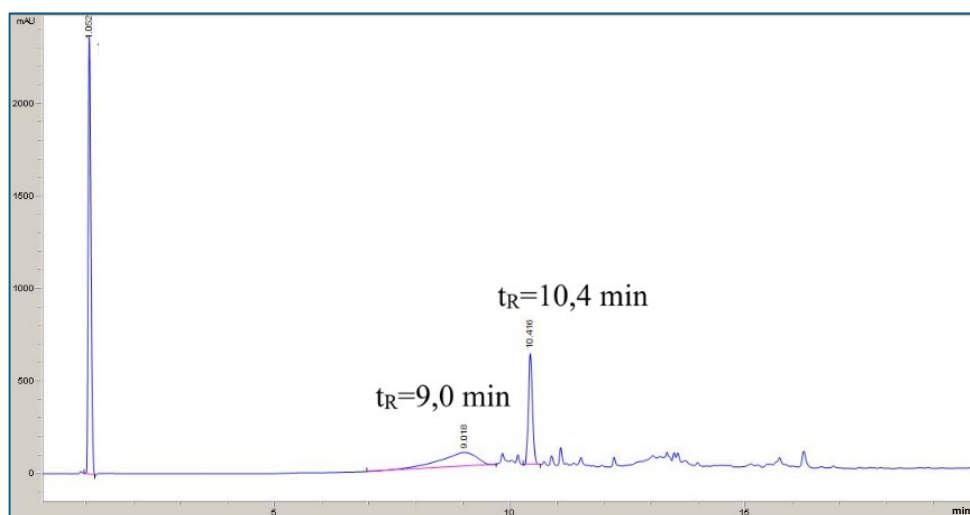


Figura 56 Profilo HPLC del peptide 7. Gradiente 5-95% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 56 il picco a $t_R = 1,0$ min è il picco di iniezione, il peptide 7 eluisce con $t_R = 10,4$ min. Il peptide 7 si osserva anche in un secondo picco a $t_R = 9,0$ min. La presenza del peptide in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla formazione di coppie ioniche tra i residui basici (lisina, arginina e istidina) con il TFA presente nella fase mobile, in condizioni di sovraccarico della colonna cromatografica.

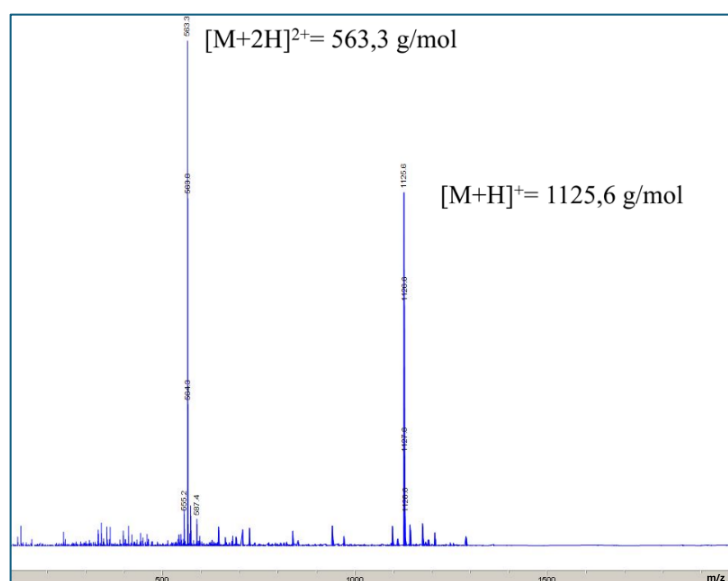


Figura 57 Spettro di massa del peptide 7.

➤ **Peptide 8 (RK RKHLCW)**

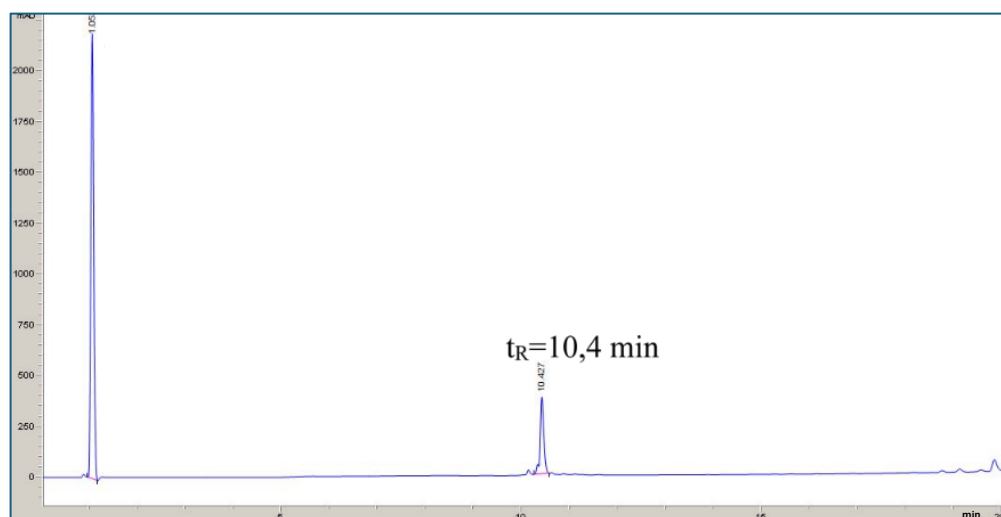


Figura 58 Profilo HPLC del peptide 8. Gradiente 5-95% B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 58, il picco a $t_R = 1,0$ min è il picco d'iniezione, il peptide **8** eluisce con $t_R = 10,4$ min.

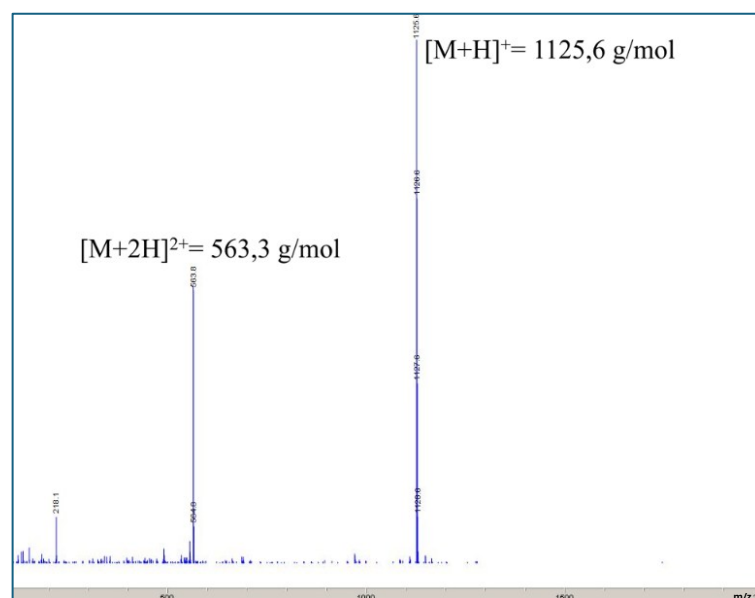


Figura 59 Spettro di massa del peptide 8.

➤ **Peptide 9 (RRKKHLCW)**

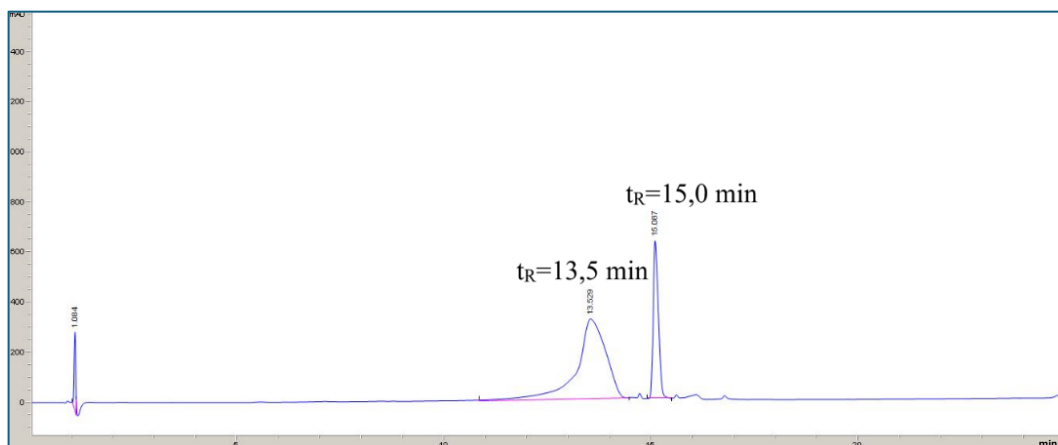


Figura 60 Profilo HPLC del peptide 9. Gradiente 0-40% B in 20 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 60, il picco a $t_R = 1,0$ min è il picco d'iniezione, il peptide **9** eluisce con $t_R = 15,0$ min. Il peptide **9** si osserva anche in un secondo picco a $t_R = 13,5$ min. La presenza del peptide in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla formazione di coppie ioniche tra i residui basici (lisina, arginina e istidina) con il TFA presente nella fase mobile, in condizioni di sovraccarico della colonna cromatografica.

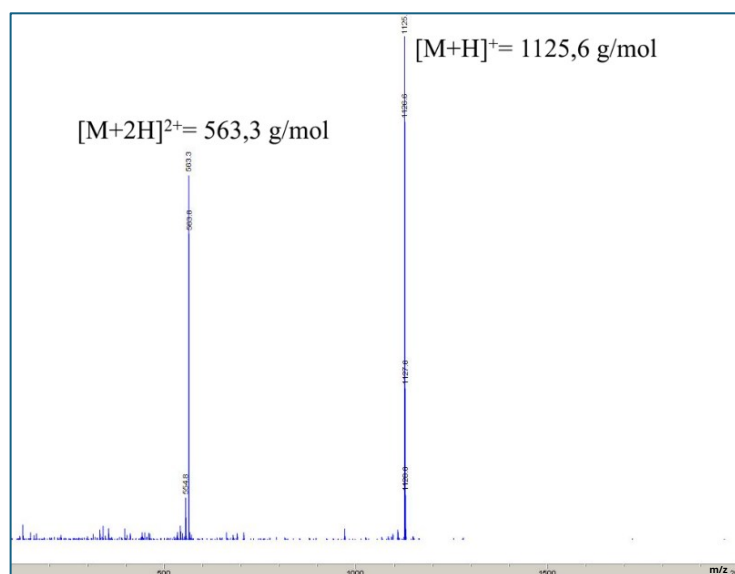


Figura 61 Spettro di massa del peptide 9.

➤ Peptide 10

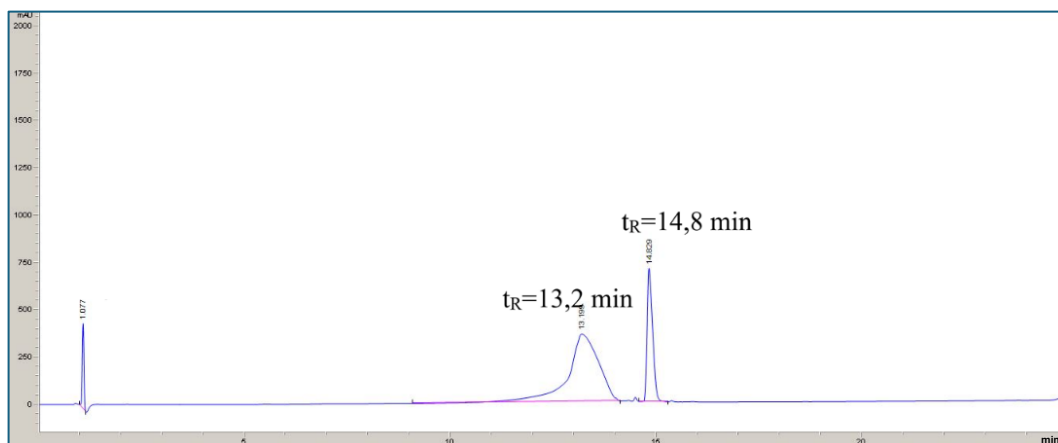


Figura 62 Profilo HPLC del peptide **10**. Gradiente 0-40 % B in 30 min, $\lambda_{abs} = 220$ nm.

Nel cromatogramma in Figura 62, il picco a $t_R = 1,0$ min è il picco d'iniezione, il peptide **10** eluisce con $t_R = 14,8$ min. Il peptide **10** si osserva anche in un secondo picco a $t_R = 13,2$ min. La presenza del peptide in due picchi cromatografici distinti può essere attribuita alla formazione di coppie ioniche tra i residui basici (lisina, arginina e istidina) con il TFA presente nella fase mobile, in condizioni di sovraccarico della colonna cromatografica.

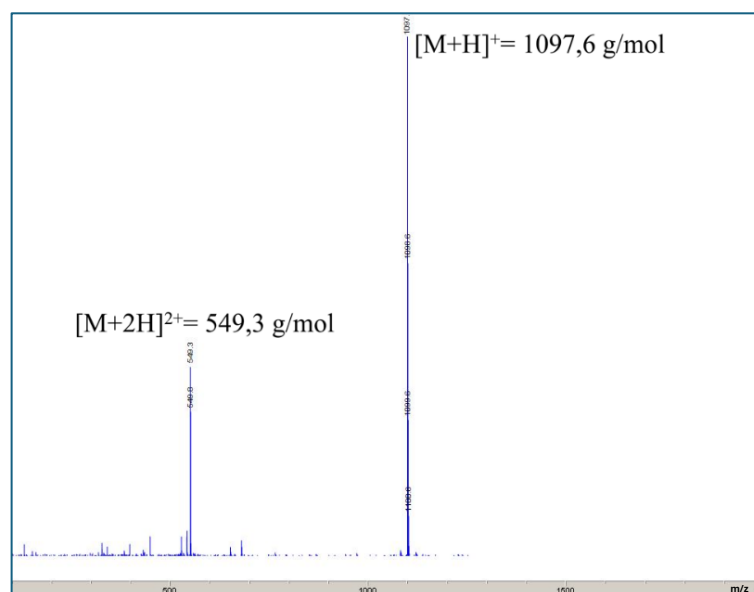


Figura 63 Spettro di massa del peptide **10**.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed, A., Siman-Tov, G., Hall, G., Bhalla, N. & Narayanan, A. Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. *Viruses* **11**, 704 (2019).
2. Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Terán, L. M. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology* **135**, 1–11 (2010).
3. Auvynet, C. & Rosenstein, Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *The FEBS Journal* **276**, 6497–6508 (2009).
4. Liao, Z. *et al.* Fatty acid chain modification enhances the serum stability of antimicrobial peptide B1 and activities against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Bioorganic Chemistry* **154**, 108015 (2025).
5. Reddy, K. V. R., Yedery, R. D. & Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**, 536–547 (2004).
6. Pálffy, R. *et al.* On the Physiology and Pathophysiology of Antimicrobial Peptides. *Mol Med* **15**, 51–59 (2009).
7. Powers, J.-P. S. & Hancock, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681–1691 (2003).
8. Duplantier, A. J. & Van Hoek, M. L. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 as a Potential Treatment for Polymicrobial Infected Wounds. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
9. Lim, R., Barker, G. & Lappas, M. Human cathelicidin antimicrobial protein 18 (hCAP18/LL-37) is increased in foetal membranes and myometrium after spontaneous labour and delivery. *Journal of Reproductive Immunology* **107**, 31–42 (2015).
10. Ciornei, C. D., Sigurdardóttir, T., Schmidtchen, A. & Bodelsson, M. Antimicrobial and Chemoattractant Activity, Lipopolysaccharide Neutralization, Cytotoxicity, and Inhibition by Serum of Analogs of Human Cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2845–2850 (2005).
11. Bhattacharjya, S., Zhang, Z. & Ramamoorthy, A. LL-37: Structures, Antimicrobial Activity, and Influence on Amyloid-Related Diseases. *Biomolecules* **14**, 320 (2024).
12. Pazgier, M. *et al.* Structural and Functional Analysis of the Pro-Domain of Human Cathelicidin, LL-37. *Biochemistry* **52**, 1547–1558 (2013).

13. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. & Peggion, C. Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C^α-tetrasubstitution). *Biopolymers* **60**, 396–419 (2001).
14. Hanson, P., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M. & Toniolo, C. ESR Characterization of Hexameric, Helical Peptides Using Double TOAC Spin Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7618–7625 (1996).
15. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. & Peggion, C. Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C^α-tetrasubstitution). *Biopolymers* **60**, 396–419 (2001).
16. Karle, I. L. & Balaram, P. Structural characteristics of .alpha.-helical peptide molecules containing Aib residues. *Biochemistry* **29**, 6747–6756 (1990).
17. Inai, Y., Ousaka, N. & Okabe, T. Mechanism for the Noncovalent Chiral Domino Effect: New Paradigm for the Chiral Role of the N-Terminal Segment in a 3₁₀-Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8151–8162 (2003).
18. Vilas Boas, L. C. P., Campos, M. L., Berlanda, R. L. A., De Carvalho Neves, N. & Franco, O. L. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3525–3542 (2019).
19. Lee, Y.-C. J., Shirkey, J. D., Park, J., Bisht, K. & Cowan, A. J. An Overview of Antiviral Peptides and Rational Biodesign Considerations. *BioDesign Research* **2022**, 9898241 (2022).
20. Neghabi Hajigha, M. *et al.* Antiviral and antibacterial peptides: Mechanisms of action. *Heliyon* **10**, e40121 (2024).
21. Doti, N., Mardirossian, M., Sandomenico, A., Ruvo, M. & Caporale, A. Recent Applications of Retro-Inverso Peptides. *IJMS* **22**, 8677 (2021).
22. Bruno, L. *et al.* West Nile Virus (WNV): One-Health and Eco-Health Global Risks. *Veterinary Sciences* **12**, 288 (2025).
23. Petersen, L. R., Brault, A. C. & Nasci, R. S. West Nile Virus: Review of the Literature. *JAMA* **310**, 308 (2013).
24. Brinton, M. A. The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 371–402 (2002).
25. Da Silva-Júnior, E. F. & De Araújo-Júnior, J. X. Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **27**, 3963–3978 (2019).

26. Barrows, N. J. *et al.* Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem. Rev.* **118**, 4448–4482 (2018).
27. Schüller, A. *et al.* Tripeptide inhibitors of dengue and West Nile virus NS2B–NS3 protease. *Antiviral Research* **92**, 96–101 (2011).
28. Stoermer, M. J. *et al.* Potent Cationic Inhibitors of West Nile Virus NS2B/NS3 Protease With Serum Stability, Cell Permeability and Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **51**, 5714–5721 (2008).
29. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. (Oxford University Press, New York, 2000).
30. Luna, O. *et al.* Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules* **21**, 1542 (2016).
31. Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P. & Do Nascimento, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int J Pept Res Ther* **20**, 53–69 (2014).
32. Robin, G. *et al.* Structure of West Nile Virus NS3 Protease: Ligand Stabilization of the Catalytic Conformation. *Journal of Molecular Biology* **385**, 1568–1577 (2009).
33. Spears, R. J. & Fascione, M. A. Site-selective incorporation and ligation of protein aldehydes. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 7622–7638 (2016).
34. Fan, Y., Yang, D., Hu, X. & Bi, X. Protein N-Terminal Modification: Recent Advances in Chemical and Enzymatic Strategies. *Chemistry A European J* **31**, e01565 (2025).
35. Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.* **3**, 138–146 (1992).
36. Kołodziejczyk, A., Błaziak, M., Podgórnjak, K., Jezierska, A. & Błaziak, K. The Malaprade reaction mechanism for ethylene glycol oxidation by periodic acid based on density functional theory (DFT). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **25**, 21448–21455 (2023).
37. Wu, D. *et al.* The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 217 (2023).
38. Prusis, P. *et al.* Design and evaluation of substrate-based octapeptide and non substrate-based tetrapeptide inhibitors of dengue virus NS2B–NS3 proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **434**, 767–772 (2013).

39. Volpin, D. STRATEGIES TO TARGET VIRAL NON-STRUCTURAL PROTEINS Peptide-based methodologies against West Nile and related emerging viruses. (Università degli studi di Padova).
40. Chappell, K. J. *et al.* Site-directed Mutagenesis and Kinetic Studies of the West Nile Virus NS3 Protease Identify Key Enzyme-Substrate Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2896–2903 (2005).
41. Liu, X., Cao, R., Wang, S., Jia, J. & Fei, H. Amphipathicity Determines Different Cytotoxic Mechanisms of Lysine- or Arginine-Rich Cationic Hydrophobic Peptides in Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **59**, 5238–5247 (2016).
42. Toniolo, C., Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M. & Kamphuis, J. Circular Dichroism Spectrum of a Peptide 3_{10} -Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2744–2745 (1996).
43. Keiderling, T. A. Structure of Condensed Phase Peptides: Insights from Vibrational Circular Dichroism and Raman Optical Activity Techniques. *Chem. Rev.* **120**, 3381–3419 (2020).
44. Manning, M. C. & Woody, R. W. Theoretical CD studies of polypeptide helices: Examination of important electronic and geometric factors. *Biopolymers* **31**, 569–586 (1991).
45. Auer, H. E. Far-ultraviolet absorption and circular dichroism spectra of L-tryptophan and some derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 3003–3011 (1973).
46. Helmy, N. M., Davani-Davari, D. & Parang, K. Fatty Acid-Conjugated Antimicrobial Peptides: Advances in Design, Activity, and Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* **69**, 1942–1962 (2026).
47. Stoermer, M. J. *et al.* Potent Cationic Inhibitors of West Nile Virus NS2B/NS3 Protease With Serum Stability, Cell Permeability and Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **51**, 5714–5721 (2008).
48. Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W. & Schoofs, L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular Immunology* **280**, 22–35 (2012).

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio in primo luogo la Prof.ssa Cristina Peggion e la Dott.ssa Claudia Storti, per avermi guidata e aiutata con competenza e disponibilità lungo tutto il percorso di questa tesi.

Ringrazio dal profondo del cuore i miei genitori, Marina e Manuel, e mio fratello Christian, per avermi sempre sostenuta e per aver creduto in me, anche quando io stessa ero la prima a non farlo.

Ringrazio tutti i miei zii - Michela, Furio, Luca e Camillo - per avermi sempre regalato un sorriso (e per non avermi diseredata dopo tutti i bei voti presi).

Ringrazio i miei cani Tay e, soprattutto, Snoopy, per essere stati i migliori compagni di studio, sempre ligi al dovere.

Ringrazio Giorgio, il mio ragazzo, per essere stato innanzitutto il mio miglior amico, per avermi sempre aiutata, supportata (e sopportata), portandomi il sorriso anche nei momenti più difficili e, non da meno, una brioche.

Ringrazio Aurora per essere stata la miglior coinquilina del mondo e aver reso il nostro appartamento una vera Casa.

Ringrazio Davide per avermi accompagnata in questi mesi di laboratorio, e per aver sopportato la mia follia.

Ringrazio tutti i miei amici di Padova - Michele, Giorgia, Andrea, Daniele e tutti gli altri - per aver alleggerito ogni mia giornata in Università e aver reso questi anni indimenticabili.

Infine, ringrazio tutti i miei amici, per essermi stati accanto in tutti questi anni e per avermi resa la persona che sono oggi.