

Università degli Studi di Padova – Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria chimica e dei materiali

***Relazione per la prova finale
«Sintesi convergente di brevi sequenze
peptidiche e confronto di metodologie in fase
solida e in soluzione»***

Tutor universitario: Prof. Dettin Monica

Laureando: Santarossa Linda

Padova, 18/11/2022

- L'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Padova studia proteine coinvolte nelle **malattie neurodegenerative**, al fine di promuovere lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici;
- in seguito al successo dei peptidi come farmaci, si è rivolto un grande interesse verso la **sintesi peptidica**



- Testare un approccio convergente alla sintesi di un peptide di interesse biologico appartenente alla **proteina EFhd2**;
- Il peptide fa parte di una sequenza di 40 amminoacidi, nota come CC-EF:

INVSSRFEEIKAEQEERKKQAEEMKKQRKA AFKELQSTFK

→Sperimentare la sintesi del frammento centrale **KKQAEEM** mediante approccio convergente

- Lo svolgimento del lavoro prevede due fasi:
 - 1) Sintesi dei tripeptidi **CEE** con residuo Cys N-terminale e **KKQ idrazide** C-terminale mediante SPPS per un test di connessione mediante *chemical ligation nativa*;
 - 2) Sintesi di **KKQ totalmente protetto** da connettere direttamente alla sequenza **EEA** formata tramite SPPS

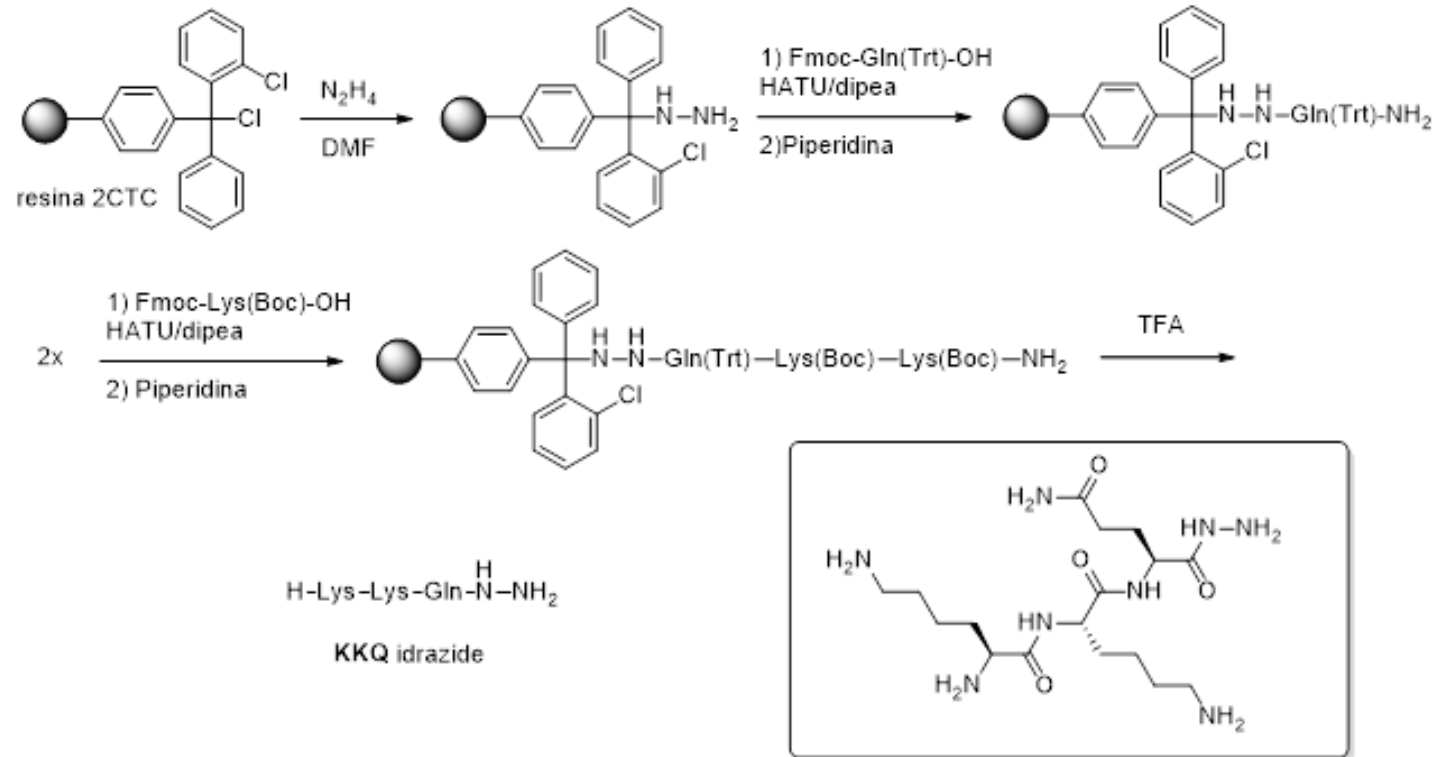
Resina 2-CTC, 5% idrazina

**Aggiunta sequenziale di Gln e
due Lys**

Attivatori: HATU e DIPEA

**Miscela di sblocco: 88% TFA,
5% H₂O, 5% fenolo, 2% TIPS**

Resa complessiva: 62,0%



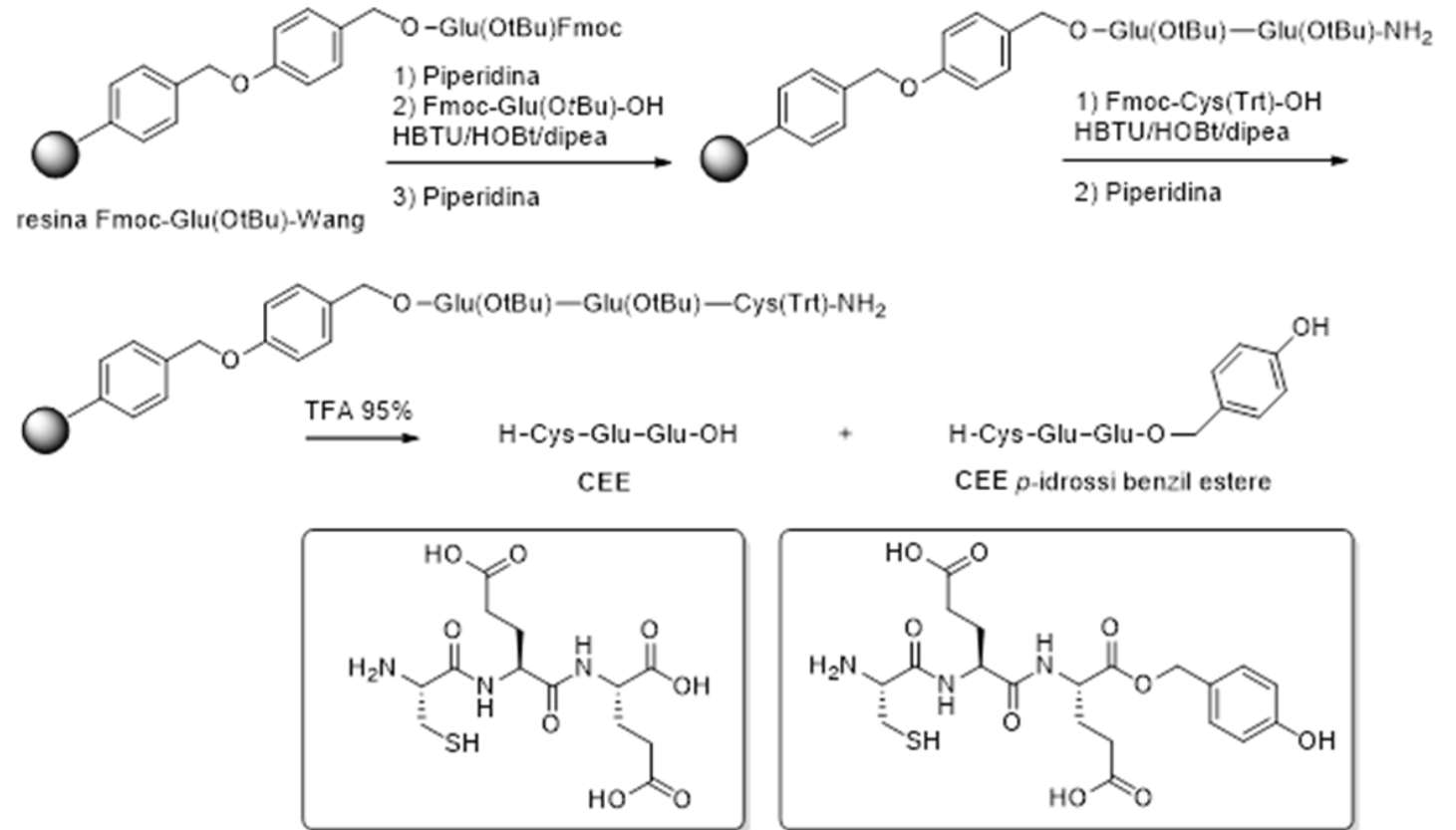
Resina Wang prefunzionalizzata con Glu

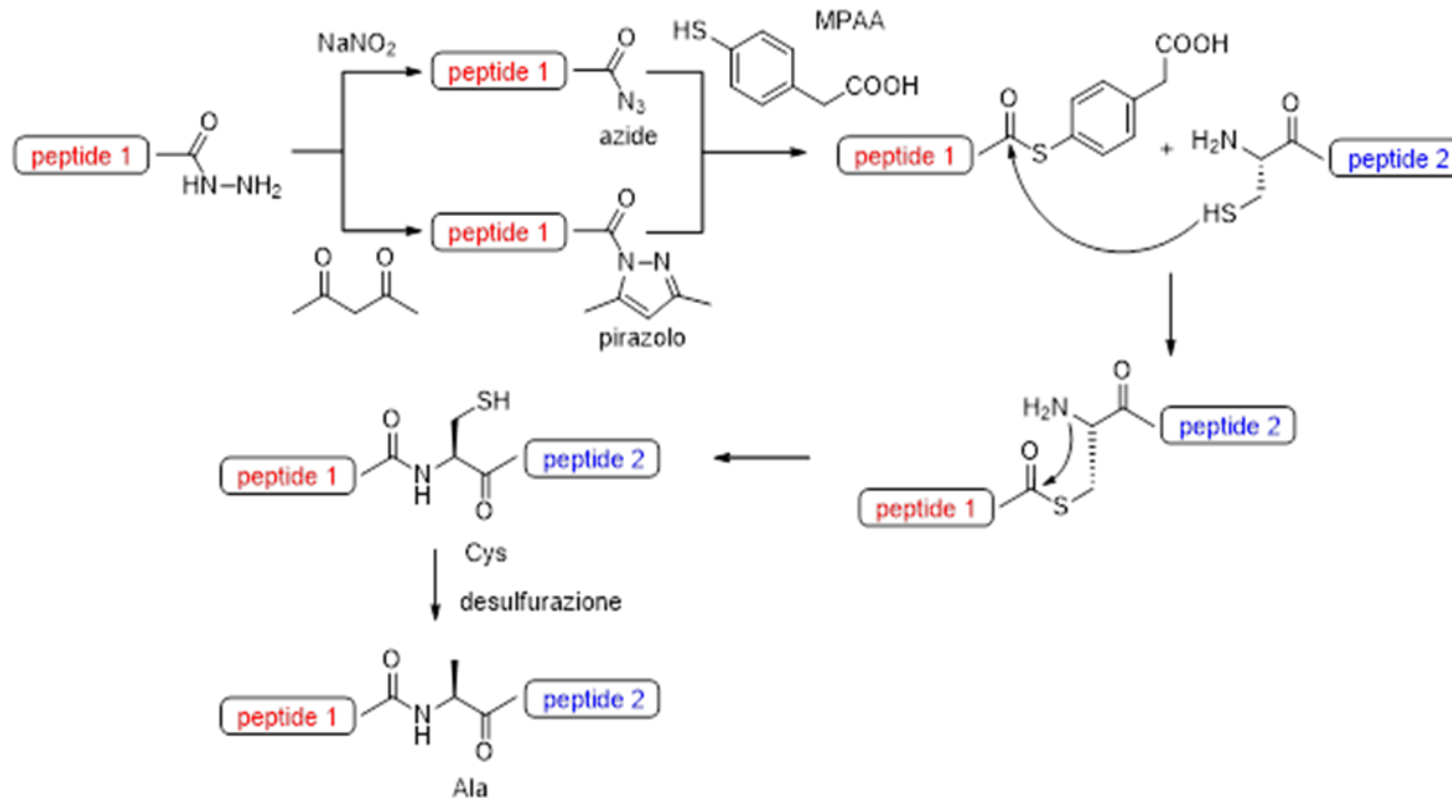
Aggiunta sequenziale di Glu e Cys

Attivatori: HBTU, HOBt, DIPEA

Miscela di sblocco: 95% TFA, 3% H₂O, 2% TIPS

Resa complessiva: 67,5%

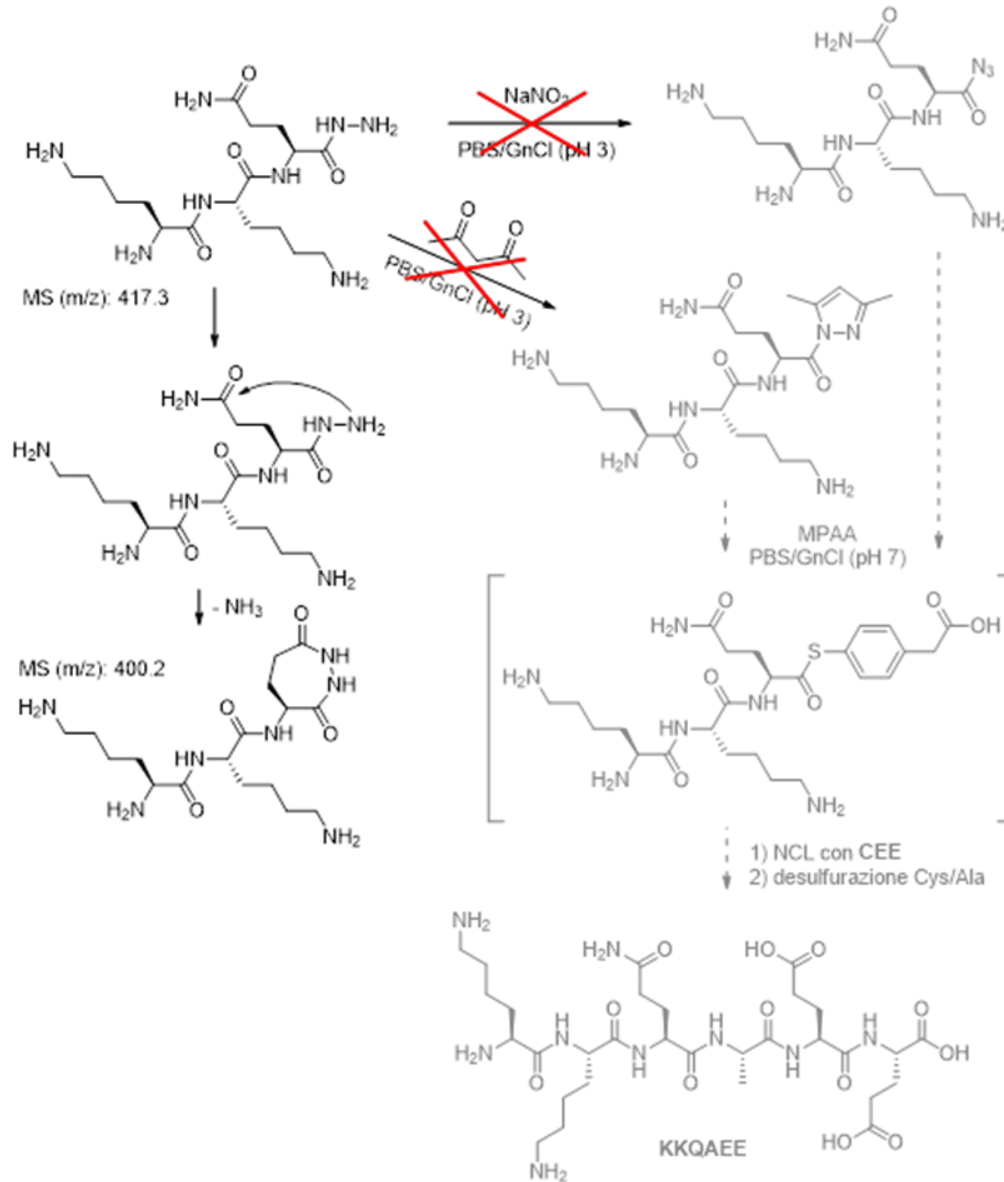




Meccanismo generale della NCL

Un peptide idrazide può essere convertito in un tioestere con MPA tramite reazione con sodio nitrito (intermedio azide) o con acetilacetone (intermedio pirazolo).

La successiva reazione con un peptide avente una cisteina N-terminale e il successivo riarrangiamento $\text{S} \rightarrow \text{N}$ porta alla formazione di un legame ammidico nativo e al nuovo peptide.



Dall'analisi delle miscele di reazione tramite **HPLC-MS** si è osservato che ci sono tracce del prodotto desiderato ma risulta sovrastato da sottoprodotti e reagenti non reagiti.

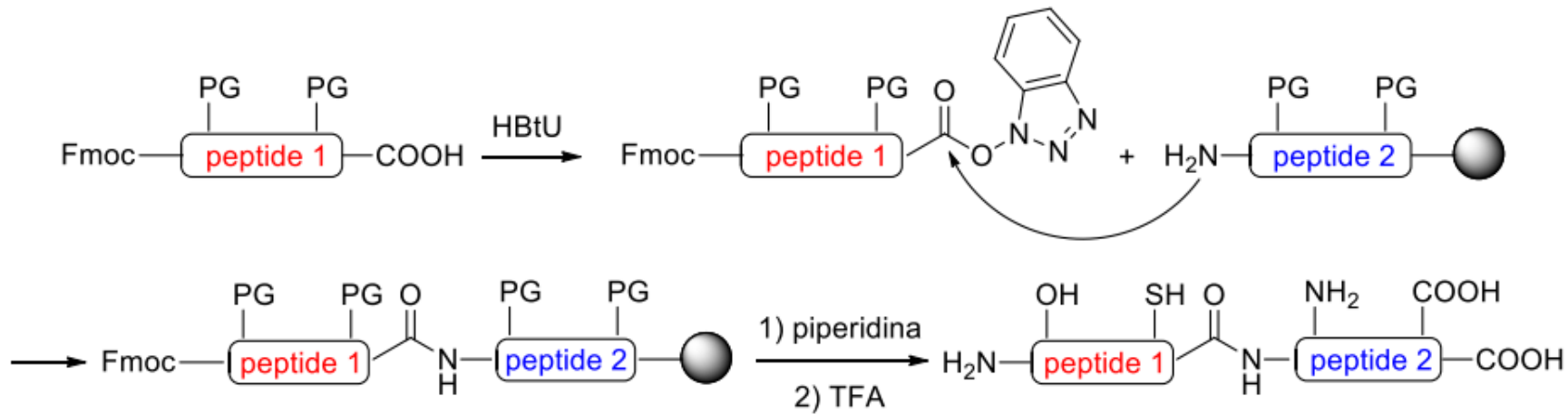
MOTIVO: instabilità del KKQ idrazide in soluzione acquosa

Consiste nella preparazione di peptidi mediante assemblaggio di catene peptidiche protette più corte preparate in fase solida

Peptide QKK totalmente protetto via SPPS



Peptide EEA via SPPS



**Resina 2-CTC trattata inizialmente
con Gln**

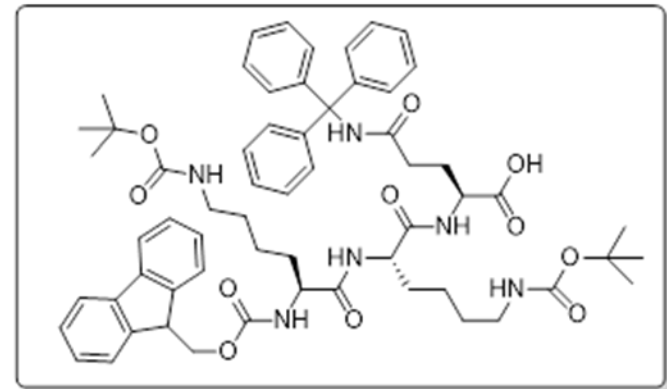
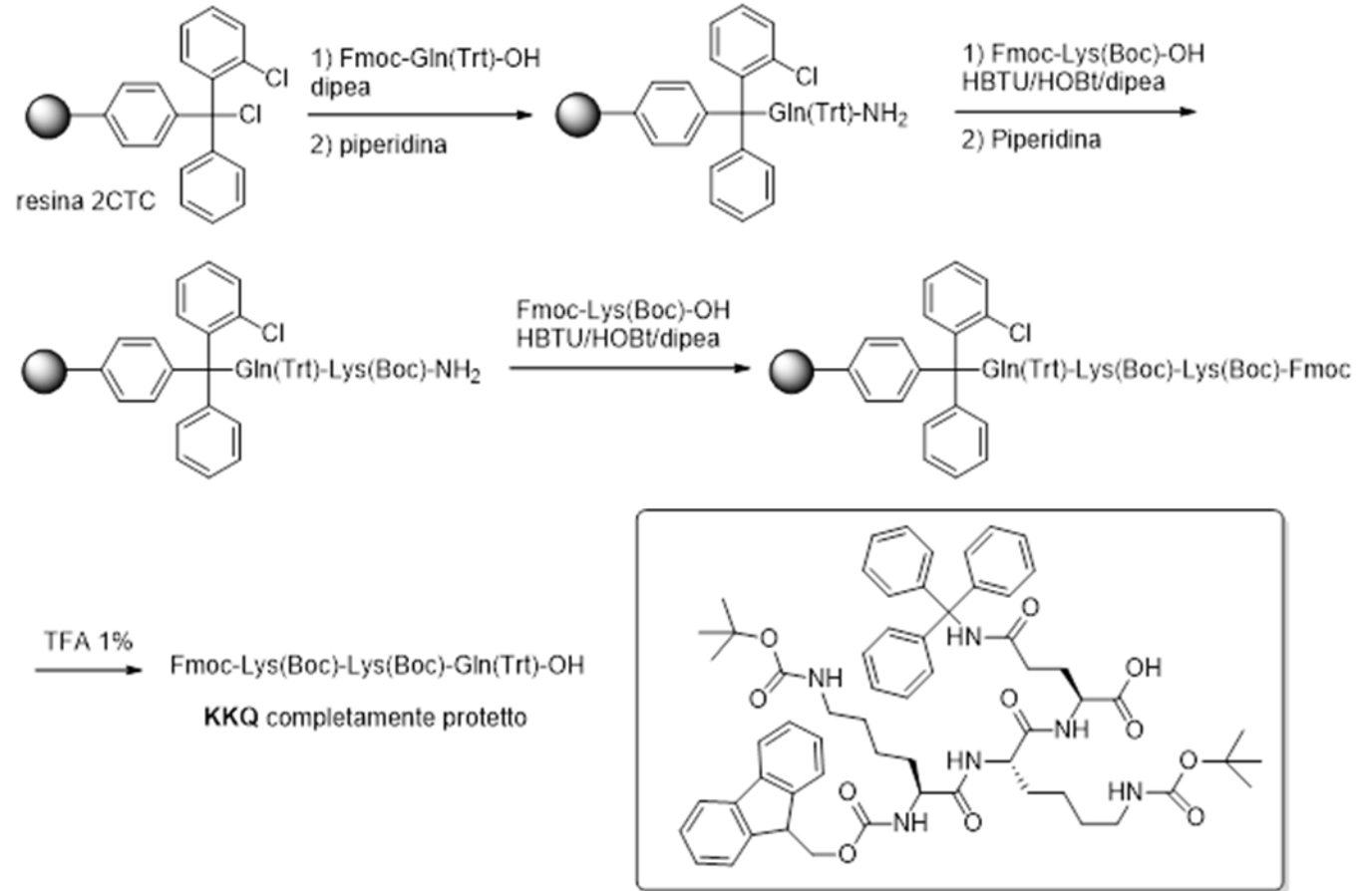
Due *coupling* sequenziali con Lys

Attivatori: HOBt, HBTU, DIPEA

**Gruppi protettori mantenuti sulle
catene laterali**

Soluzione di sblocco: 1% TFA in DCM

Resa complessiva: 72%



Resina Wang funzionalizzata con Glu

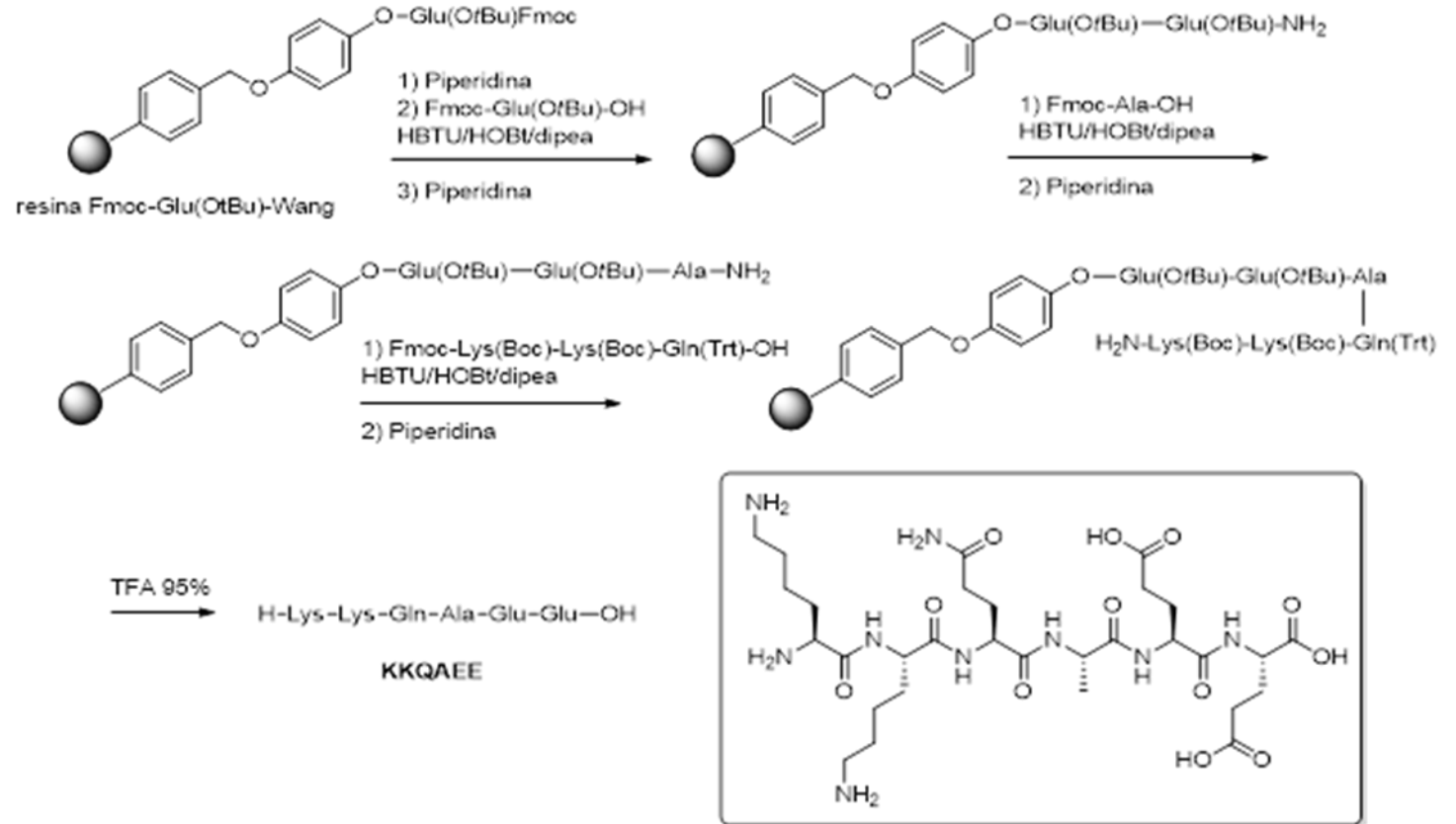
Accoppiamento degli amminoacidi protetti Glu e Ala

Attivatori: HOBt, HBTU, DIPEA

Aggiunta KKQ completamente protetto

Miscela di sblocco: 95% TFA, 3% H₂O, 2% TIPS

Resa complessiva: 95%



- **La sintesi peptidica su fase solida** risulta essere un metodo valido e veloce per preparare brevi sequenze peptidiche come il CEE e KKQ idrazide;
- per realizzare peptidi lunghi è consigliato l'uso di approcci convergenti, dalla **Native chemical ligation** alla **SPPS mista**:
 - le prove di **Native chemical ligation** hanno avuto **esito negativo**;
 - la **SPPS convergente** ha permesso di ottenere il KKQAEE in **ottima resa**;