

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA SINTESI PEPTIDICA

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureando: Manuel Cremonese 2000346

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

Abstract	1
1. Introduzione	2
2. Sintesi tradizionale	3
2.1. Sintesi in fase liquida (LPPS)	3
2.2. Sintesi in fase solida (SPPS)	4
2.2.1. Metodologie	5
2.2.1.1. Metodologia Boc	5
2.2.1.2. Metodologia Fmoc	5
2.2.2. Supporto solido	5
2.2.3. Solventi	6
3. Metodologie innovative per la sintesi peptidica	7
3.1. Solventi	7
3.1.1. Classificazione	8
3.1.2. Solvente ideale	9
3.1.3. Solventi binari	10
3.1.4. Riciclo solventi	11
3.2. Sintesi in fase liquida con peptidi ancorati	12
3.2.1. Molecular Hiving™ Technology	13
3.2.2. Ajiphase®	14
3.3. Sintesi con micro-reattori	15
3.3.1. Sintesi via acil azide	16
3.3.2. Sintesi automatizzata flow di peptidi (AFPS)	17
3.3.3. Sintesi mesoflow di peptidi in fase solida	19
3.3.4. Deep Learning	19
4. Parte sperimentale	21
5. Conclusione	23
Bibliografia	24

Abstract

La sintesi peptidica è una delle tecnologie più promettenti per lo sviluppo di nuovi farmaci ad uso terapeutico. Questa tesi vuole affrontare il mondo della sintesi peptidica ripercorrendone la storia ed esplorandone le innovazioni che negli ultimi anni ne hanno riscritto le regole. A partire dalle tecniche più tradizionali, come la sintesi in fase liquida e solida, le metodologie si sono evolute e perfezionate abbracciando le più moderne tecnologie. Dal mondo dei micro-reattori fino alle sintesi industriali, questa tesi esamina l'impatto ambientale che la sintesi peptidica ha e come può essere ridotto. Scopriremo che queste innovazioni non solo sono ottime alternative per le tecniche tradizionali, ma offrono vantaggi sia sintetici che ambientale, spingendo i confini della sintesi peptidica verso un futuro più efficiente e verde.

1. Introduzione

La sintesi peptidica rappresenta un campo di fondamentale importanza nel panorama scientifico odierno. I peptidi, catene di amminoacidi, si trovano alla base di innumerevoli processi biologici, mostrando elevata attività biologica e specificità. Grazie alle loro proprietà i peptidi dimostrano enormi potenzialità in ambito terapeutico, dal trattamento del diabete fino all'impiego come farmaci antitumorali, rappresentando la frontiera nel campo della ricerca farmaceutica e della medicina moderna.

La biosintesi peptidica avviene nei ribosomi presenti nelle cellule viventi. Con l'introduzione della sintesi in laboratorio si sono aperte non solo vie di sviluppo per nuove molecole terapeutiche, ma anche la possibilità di comprendere i processi biologici ad esse legati. Tuttavia, la produzione di queste preziose molecole presenta numerose sfide. La loro sintesi richiede processi meticolosi e complessi, nei quali le condizioni di reazione devono essere accuratamente controllate per ottenere il prodotto desiderato ad alta purezza e resa, garantendone così l'efficacia e la sicurezza per l'uso terapeutico.

Quando venne introdotta per la prima volta da Fischer e Fourneau nel 1901¹, la sintesi peptidica veniva eseguita in fase liquida, un approccio che presenta diverse limitazioni, tra cui la necessità di purificare ad ogni passaggio e la difficoltà nella produzione di peptidi più lunghi dato l'accumulo di impurezze. La vera rivoluzione avvenne nel 1963 quando Merrifield introdusse la sintesi peptidica in fase solida², rendendo possibile la produzione su larga scala e con maggiore efficienza.

Nei decenni successivi, le tecniche sono state continuamente ottimizzate e automatizzate, ampliando l'utilizzo dei peptidi all'ambito commerciale e di ricerca. Nonostante i progressi compiuti, la sintesi peptidica ancora oggi affronta diverse sfide significative e appunto per questo recentemente sono state introdotte nuove metodologie innovative orientate verso una maggiore efficienza e sostenibilità.

2. Sintesi tradizionale

La sintesi peptidica ha una storia lunga ed articolata nella quale le metodologie tradizionali rappresentano ancora oggi un punto di partenza per lo sviluppo delle tecnologie più moderne.

Le metodologie tradizionali si articolano principalmente in due categorie: sintesi in fase liquida (LPPS) e sintesi in fase solida (SPPS). Entrambe le metodologie si basano sull'attacco in sequenza degli amminoacidi utilizzando una serie di passaggi di deprotezione, attivazione e formazione del legame (coupling). Sebbene il principio fondamentale sia il medesimo, le due tecniche differiscono nelle strategie e condizioni nelle quali avvengono.

2.1. Sintesi in fase liquida (LPPS)

Una delle prime tecniche ad essere state sviluppate è la sintesi peptidica in fase liquida (LPPS, Liquid Phase Peptide Synthesis). Questa metodologia consiste in reazioni di condensazione tra il gruppo carbossilico di un amminoacido con il gruppo amminico di un altro, formando così la sequenza desiderata (Figura 1).

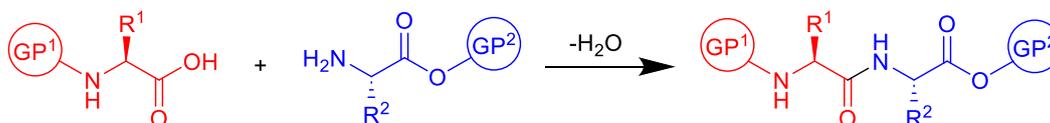


Figura 1: Reazione di condensazione (GP = gruppo protettore)

Per garantire la realizzazione del peptide specifico sono necessarie una serie di accortezze, come l'uso di gruppi protettori (GP) per prevenire l'attacco su gruppi funzionali indesiderati e una sintesi C → N per evitare problemi di racemizzazione.

La LPPS si articola in due strategie di sintesi:

- Sintesi sequenziale: gli amminoacidi vengono fatti reagire uno alla volta. L'uso di singoli amminoacidi consente di usare eccessi di reagenti per spingere quanto più possibile le reazioni. Nonostante la sua semplicità, questa strategia può portare alla formazione di prodotti secondari indesiderati e necessita che ogni deprotezione avvenga quantitativamente per evitare errori nella sequenza.
- Sintesi convergente: vengono unite diverse sequenze peptidiche più brevi. Questa strategia può essere più efficiente rispetto alla sintesi sequenziale e permette la realizzazione di sequenze più lunghe con maggiore resa e minore probabilità di errori. Tuttavia, la reazione

tra frammenti è più lenta rispetto alla condensazione di singoli amminoacidi e l'uso di eccessi non è solitamente conveniente.

Nonostante si siano cercati metodi per rendere la sintesi peptidica in fase liquida più efficiente, essa presenta diversi problemi di carattere chimico ed economico che ne limitano l'applicabilità. Infatti, nella sintesi di peptidi più lunghi c'è un accumulo di errori nella sequenza che ne compromette il risultato. Inoltre, la necessità di purificare ad ogni passaggio comporta una perdita di prodotto, un aumento dei tempi e dei costi.

La sintesi in fase liquida resta comunque un'opzione valida per i peptidi più piccoli data la flessibilità nella scelta delle condizioni di reazione e gli amminoacidi con la quale può essere utilizzata.

2.2. Sintesi in fase solida (SPPS)

La sintesi peptidica in fase solida (SPPS, Solid Phase Peptide Synthesis) (Figura 2), introdotta nel 1963 da Robert Bruce Merrifield², è stata la rivoluzione nelle tecnologie di sintesi peptidica permettendo la produzione di catene prima impensabili. E tra l'altro, lo stesso principio è stato esteso successivamente alla sintesi di altre macromolecole (ad esempio, polinucleotidi e polisaccaridi).

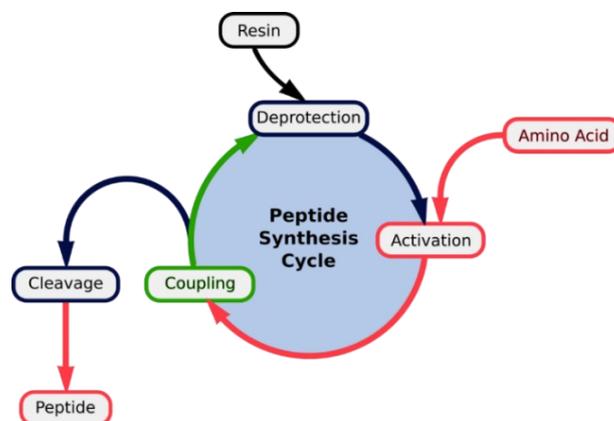


Figura 2: Procedura SPPS

L'idea su cui si basa la SPPS è l'ancoraggio del peptide ad un supporto solido, insolubile, durante la sintesi. Le reazioni e passaggi che coinvolgono questa tecnica sono i medesimi della sintesi in fase liquida, ma l'utilizzo di un peptide ancorato ad una fase solida permette di semplificare le fasi di separazione e purificazione tra un attacco e il successivo. Inoltre, si riducono notevolmente i tempi di produzione, aumentano le rese e nasce la possibilità di automatizzare il processo, estensibile pure alla produzione su larga scala.

2.2.1. Metodologie

La sintesi in fase solida viene eseguita principalmente con due metodologie:

2.2.1.1. Metodologia Boc

Questo metodo prevede la protezione del gruppo α -amminico degli amminoacidi tramite *terz*butil-ossi-carbonile (Boc)³ (Figura 3), ovvero un protettore di tipo uretanico che ha il vantaggio di prevenire la racemizzazione del Boc-AA. La deprotezione dell'amminoacido viene eseguita con acido trifluoroacetico, TFA, e il distacco dalla resina con acidi forti come HF o l'acido trifluorometansolfonico (TMSO)⁴, con il rischio quindi di degradare parzialmente il peptide. Per tale ragione la strategia Boc è stata quasi completamente soppiantata dalla metodologia Fmoc.

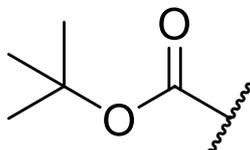


Figura 3: *Terzbutil-ossi-carbonile, Boc*

2.2.1.2. Metodologia Fmoc

Introdotta nel 1970 dalla Carpino⁵, il gruppo protettore 9-fluorenil-metossicarbonile (Fmoc) (Figura 4) viene rimosso in condizioni più blande rispetto al Boc. Si usa generalmente una base, come la piperidina, consentendo quindi di operare il distacco del peptide dalla resina con TFA⁴, acido meno aggressivo di HF o TMSO. Le condizioni di reazione meno forti lo rende un metodo più versatile rispetto alla metodologia Boc.

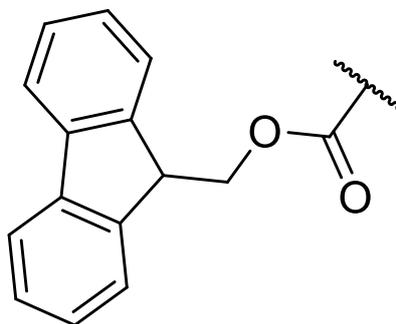


Figura 4: *9-fluorenil-metossicarbonile, Fmoc*

2.2.2. Supporto solido

I supporti solidi che vengono utilizzati sono resine polimeriche in grado di conferire stabilità meccanica e chimica, garantire una buona filtrazione e un buon rigonfiamento in solventi organici

(Figura 5, Figura 6). Un materiale con queste caratteristiche è un copolimero polistirene (PS) e divinilbenzene (DVB)⁶. Il rigonfiamento risulta necessario per permettere ai reagenti di penetrare all'interno e raggiungere i siti funzionalizzati presenti nella resina.

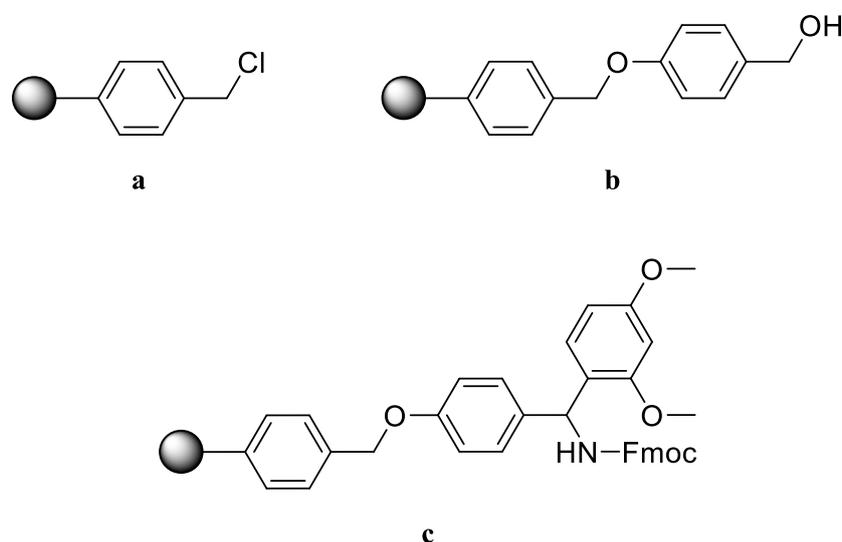


Figura 5: Resina di Merrifield (a), Resina di Wang (b), Resina di Rink (c)

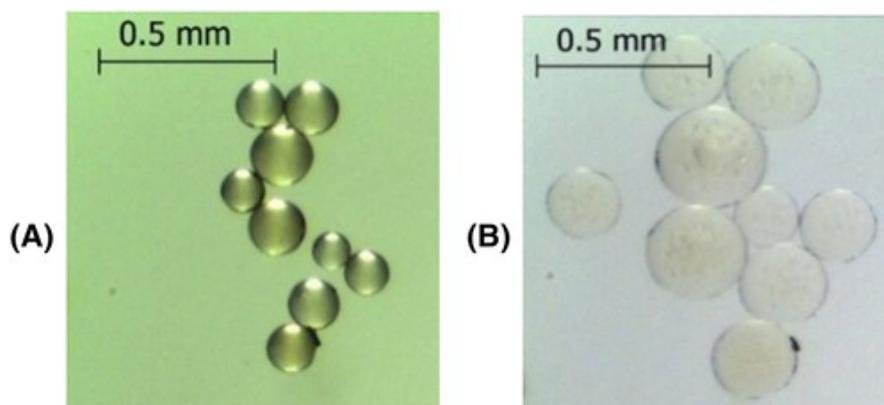


Figura 6: Immagini al microscopio ottico che mostrano (A) la resina WangChemMatrix prima del trattamento con acetonitrile (MeCN) e (B) la stessa resina gonfiata⁷

2.2.3. Solventi

La sintesi in fase solida è stata ottimizzata intorno a solventi quali N,N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM)⁷ (Figura 7). Oggi questi sono i solventi di riferimento per condurre la SPPS in quanto sono in grado di fornire le caratteristiche necessarie a basso costo.

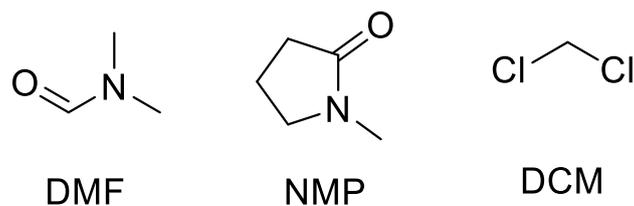


Figura 7: Solventi in uso per la SPPS

Tuttavia, questi solventi sono classificati dalla Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) come sostanze pericolose a causa delle loro proprietà cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR, carcinogenic, mutagenic, toxic for reproduction)⁸ e se ne richiede quindi la sostituzione.

È giusto sottolineare come la SPPS presenti inconvenienti, tra cui l'accesso dei reagenti all'interno del supporto solido, reazioni indesiderate ed incomplete che richiedono un largo eccesso di reagenti, tutti fattori che rendono la sintesi meno efficiente e più costosa. Nonostante ciò, la sintesi su fase solida è la metodologia di sintesi peptica ad oggi più utilizzata grazie alla sua versatilità e capacità di produrre peptidi ad elevata resa e purezza. Attualmente, la ricerca in questo ambito è sull'ottimizzazione dei processi di SPPS e sullo sviluppo di nuove strategie per superare le sue limitazioni.

3. Metodologie innovative per la sintesi peptica

Nel 1990, con l'introduzione del Pollution Prevention Act⁹ la comunità scientifica ha iniziato a porre attenzione sul tema dell'inquinamento e della prevenzione. La chimica ha avuto ed ha ancora un ruolo centrale nella ricerca di metodi innovativi per minimizzare l'impronta ambientale. In questo contesto vennero introdotti i 12 principi della *green chemistry*¹⁰ con l'obiettivo di minimizzare al massimo l'impatto ambientale dei processi chimici, sottolineandone la responsabilità nell'ambito delle produzioni industriali e della ricerca scientifica.

3.1. Solventi

Per la sintesi peptica solventi quali DMF, NMP e DCM rappresentano tra l'80% e il 90% degli scarti totali⁶, e in un'ottica di ridurre l'impatto sull'ambiente e l'uomo⁸, è necessaria la ricerca di alternative più green e meno dannose.

Tabella 1: analisi dell'impatto dei reagenti usati nella SPPS⁶

PMI impact		Main component
Solvents	80–90%	DMF, NMP, DCM
Base	4–5%	Piperidine
Cleavage blend	4–5%	TFA
Activated amino acid	1%	Fmoc chemistry
Coupling blend	1%	OximaPure/DIC
Resin	0.1%	PS, PEG

3.1.1. Classificazione

L' American Chemical Society Green Chemistry Institute Pharmaceutical Roundtable (ACS GCI-PR) e aziende farmaceutiche quali GSK, Sanofi, Pfizer, e AstraZeneca hanno prodotto guide per la selezione di solventi sostitutivi usando indicatori ambientali, di sanità, proprietà chimico-fisiche, sicurezza e legislazione associati ad essi. Nel 2016, Byrne *et al.* confrontarono le diverse guide con il CHEM21 report¹¹ assegnando ad ogni solvente un punteggio che va a quantificarne la pericolosità e classificandoli dunque in sei diversi indici di pericolosità (Figura 8)⁶.

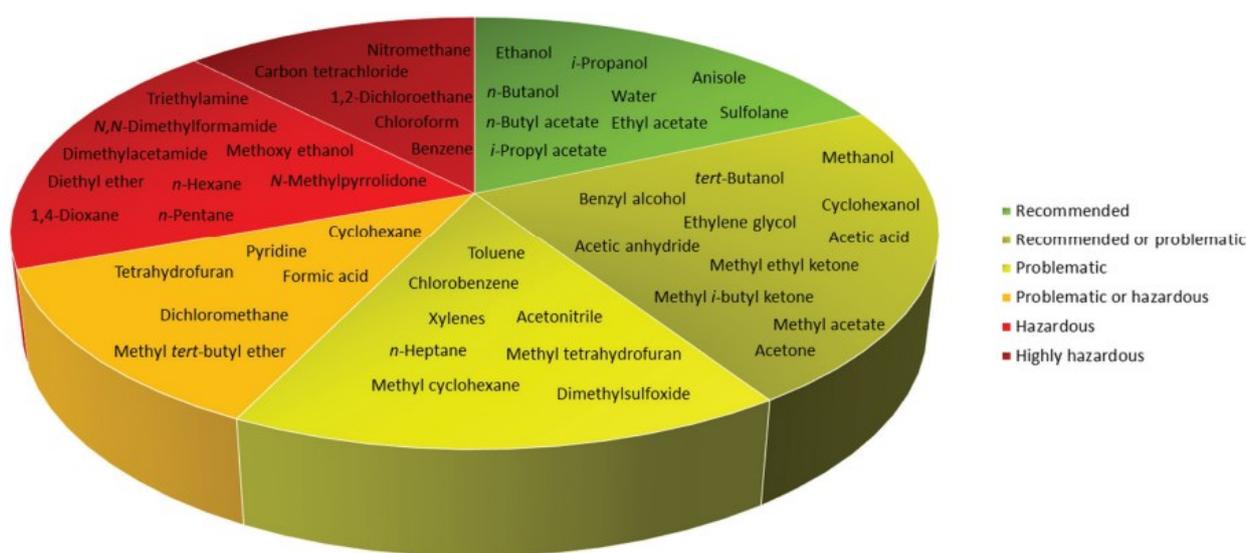


Figura 8: classificazione solventi per confronto con le guide⁶

La scelta del solvente resta comunque limitata dalla reazione specifica che si intende condurre in quanto influenza fattori come velocità di reazione, selettività, controllo della temperatura ed efficienza della purificazione.

3.1.2. Solvente ideale

Come precedentemente esposto, DMF, NMP e DCM necessitano di essere sostituiti da alternative più sostenibili e sicure. Alla ricerca di un solvente surrogato si sono definite una serie di caratteristiche che un solvente utilizzabile in una sintesi peptidica in fase solida dovrebbe avere⁶:

- punto di fusione ≤ 10 °C;
- viscosità < 4 mPa s;
- solubilità dei reagenti e prodotti $\geq 0,25$ M;
- rigonfiamento iniziale della resina 4-7 mL/g;
- tempo di accoppiamento: 60-90 min;
- rimozione del gruppo protettore: 30-40 min;
- accoppiamento del primo amminoacido sulla resina < 120 min;
- stabilità e inezia durante il ciclo SPPS;
- basso livello di racemizzazione e/o reazioni secondarie.

In accordo con lo studio, solventi in grado sostituire DMF e NMP sono nella SPPS sono acetonitrile (ACN) e tetraidrofurano (THF), ma pure loro sono classificati come problematici secondo la guida GSK¹². In sostituzione al THF è stato proposto l'utilizzo di 2-metil tetraidrofurano (2-MeTHF), alternativa più green in quanto può essere ottenuto dalle biomasse¹³ restando però, anche se in misura minore, problematico.

Un altro studio presso Novartis ha ottenuto ottimi risultati valutando per 37 solventi non pericolosi rigonfiamento della resina, solubilità dei reagenti, efficienza dell'accoppiamento e rimozione del gruppo Fmoc¹⁴. Dei solventi esaminati sono stati localizzati come maggiormente compatibili: dimetilsolfossido (DMSO), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2-pirimidinone (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinone (DMI), N-etilpirrolidone (NEP) e N-butilpirrolidone (NBP). Tra questi NBP ha prodotto ottimi risultati in termini di purezza del prodotto, risultando quindi un'ottima alternativa alla DMF.

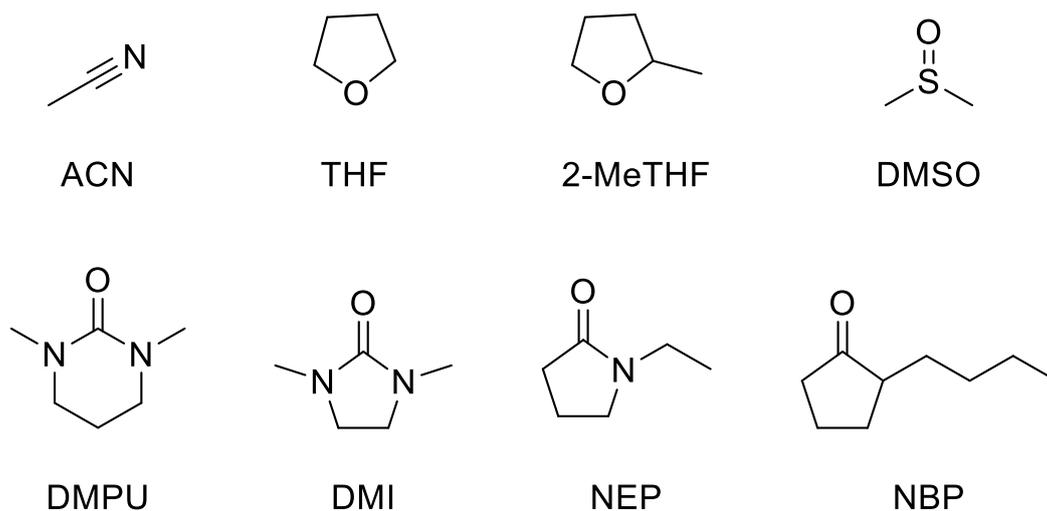


Figura 9: solventi alternativi

3.1.3. Solventi binari

Poiché trovare un solvente che rispetti a pieno le caratteristiche cercate è difficile, negli ultimi anni è stato proposto l'uso di solventi binari. Queste miscele producono risultati migliori rispetto ai singoli solventi in quanto permettono di personalizzarne le proprietà chimico-fisiche e raggiungere le caratteristiche cercate.

Risultati comparabili con solventi tradizionali sono stati ottenuti da una miscela 4:1 di H₂O e metil-5-(dimetilammino)-2-metil-5-oxopentanoato (PolarClean), un solvente biodegradabile, non tossico, non infiammabile e non volatile. Questa miscela ha reso possibile il raggiungimento di una sintesi peptidica in fase solida completamente green e con resa analoga alla DMF.

Una collaborazione NovoNordisk e Bachem, invece, ha identificato come parametri determinanti nella sintesi in fase solida la polarità e viscosità del solvente (Figura 10)¹⁵⁻¹⁷. È stato inoltre proposto che una variazione della concentrazione e composizione nel solvente possa migliorare selettivamente i singoli step della SPPS. Miscele di DMSO con 1,3-diossolano (DOL), 2-MeTHF, o etilacetato (EtOAc) sono risultate le migliori nella deprotezione del gruppo Fmoc (step favorito da una maggiore polarità). Gli accoppiamenti invece sono favoriti da solventi non polari e quindi sono state selezionate miscele NMF/DOL o NBP/DOL. I migliori risultati sono stati ottenuti con 3:7 DMSO/DOL e 3:7 DMSO/2-MeTHF.

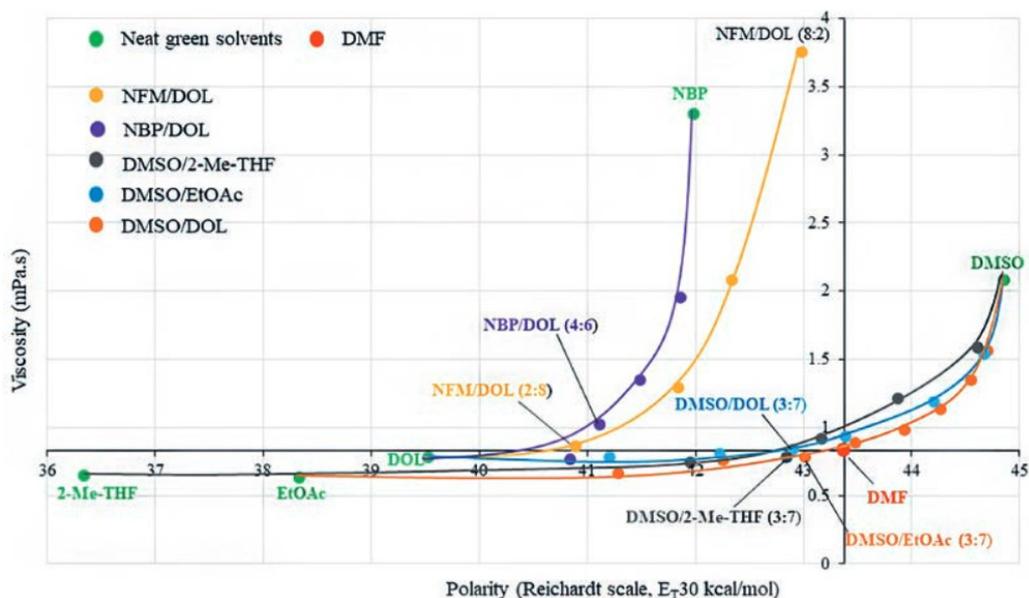


Figura 10: Grafico polarità-viscosità per solventi green attraverso la loro ricomposizione in una miscela binaria¹⁵

3.1.4. Riciclo solventi

Pawlas e Rasmussen¹⁸, con il protocollo ReGreen SPPS, hanno analizzato la possibilità di riciclare solventi e reagenti utilizzati nel processo (9:1 EtOAc/DMSO; OxymaPure®) separandoli dagli scarichi (Figura 11). La separazione è stata eseguita per filtrazione in colonna con resina a scambio ionico. I risultati ottenuti con l'uso di solventi e reagenti separati sono stati comparabili con quelli ottenuti utilizzando prodotti vergini.

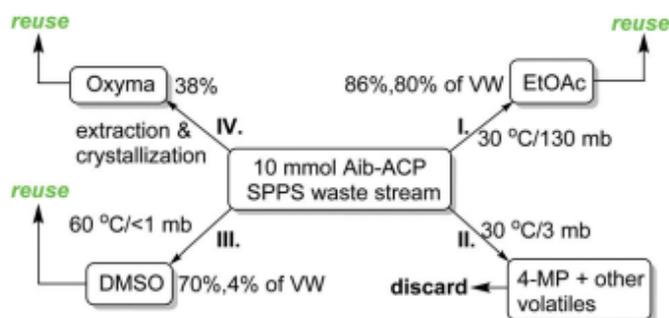


Figura 11: Rappresentazione schematica del riciclo del flusso di rifiuti da SPPS con resina peptidica Aib-ACP¹⁸

Un altro metodo analizzato per il recupero è la distillazione (Figura 12), tecnica che ha prodotto un recupero del 85-95% dei solventi (N-ottilpirrolidone/DMC)⁶.

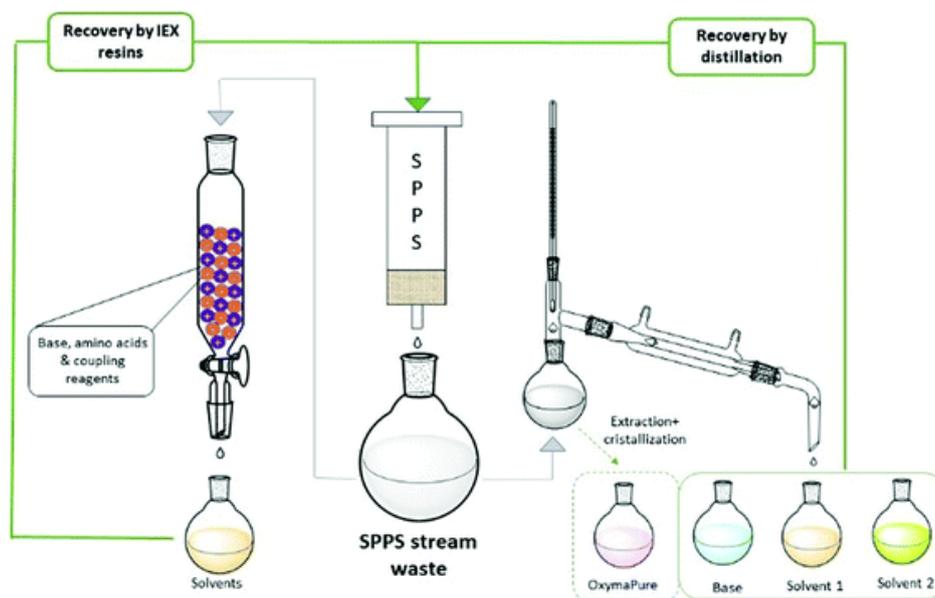


Figura 12: Rappresentazione schematica del recupero di solventi e reagenti dai flussi di scarico SPPS con colonna a scambio ionico (sinistra) o distillazione (destra)⁶

La sostituzione di solventi tradizionali nella SPPS come la DMF è quindi possibile. È giusto denotare, tuttavia, che l'uso di solventi binari complica la filiera di approvvigionamento, come anche quella dello smaltimento. Inoltre, i solventi nella sintesi peptidica rappresentano un grande costo dato il quantitativo massiccio che ne viene utilizzato e proprio per il basso costo la DMF è stata fino ad oggi la scelta favorita.

3.2. Sintesi in fase liquida con peptidi ancorati

La sostituzione dei solventi non è l'unico tema che sta interessando la comunità scientifica. L'uso di peptidi ancorati ad un *tag*, infatti, è stato oggetto di studi degli ultimi anni. Questa interessante tecnologia rende possibile combinare i vantaggi della sintesi in fase solida (velocità e purificazione) con quelli della sintesi in fase liquida (minor consumo di solventi e reagenti, monitoraggio in tempo reale). Con questa tecnologia la sintesi avviene in fase liquida rimuovendo, quindi, le problematiche legate all'uso di una resina quali rigonfiamento, diffusione del solvente, ecc....

Il peptide viene legato ad un tag organico (Figura 13) che lo rende solubile in solventi organici e insolubile in solventi inorganici. Le ricerche su queste nuove tecnologie sono legate ad aziende come Jitsubo, Ajinomoto Bio Pharma Services, Eli Lilly, Exactmer e GAPPeptides, che hanno brevettato le tecnologie.

3.2.1. Molecular Hiving™ Technology

Molecular Hiving™ Technology (MHV) è una tecnologia proprietaria di Jitsubo, sviluppata da Kazuhiro Chiba, che consiste nell'uso di TAG (Figura 13) per ancorare la catena peptidica in crescita¹⁹.

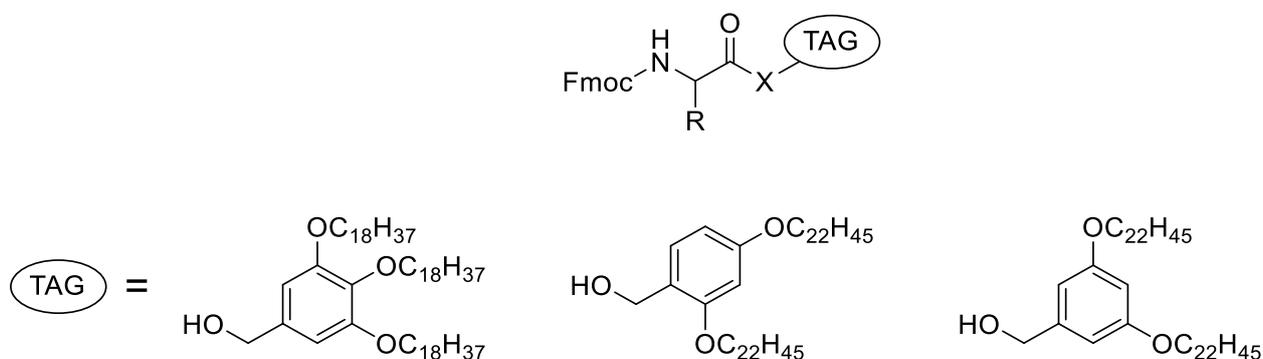


Figura 13: Tag Molecular Hiving™ Technology

Una collaborazione tra Jitsubo e Bachem ha reso possibile l'industrializzazione della tecnologia eliminando le precipitazioni intermedie tramite lavaggi con soluzioni acquose per togliere reagenti in eccesso e prodotti secondari (Figura 14). Nei webinar tenuti da Bachem (Figura 14) è stata enunciata una riduzione dei solventi del ~60% rispetto alla tradizionale sintesi in fase solida²⁰.

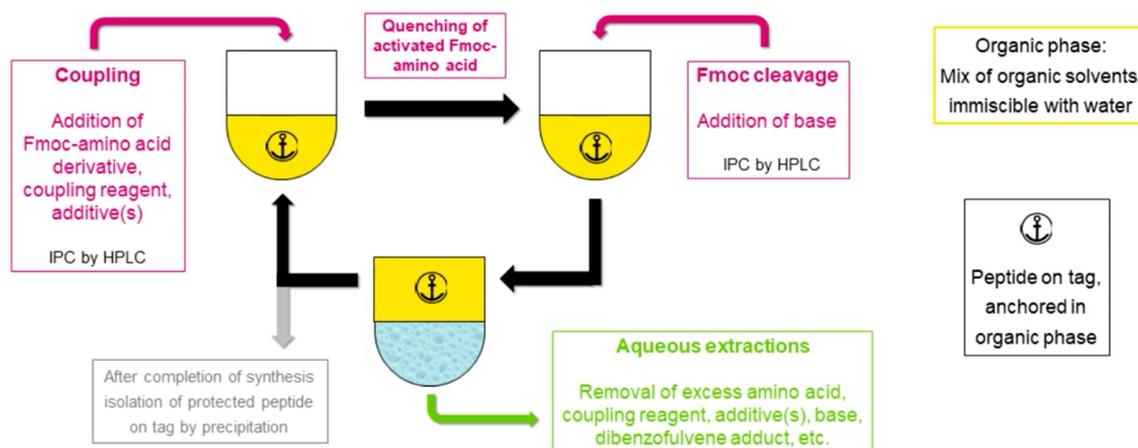


Figura 14: Procedura Molecular Hiving™ Technology¹⁵



Figura 15: Sintesi con metodologia Molecular Hiving™ Technology

La Molecular Hiving™ Technology ha numerosi vantaggi. In primis non sono richiesti amminoacidi con protezioni speciali, sono utilizzabili gli stessi Fmoc-AA della SPPS. Inoltre, la deprotezione dal TAG avviene come per la SPPS con TFA, con il vantaggio che in queste condizioni il TAG polimerizza rendendo più facile la separazione dal peptide per filtrazione (Figura 16). Il TAG inoltre viene sintetizzato da reagenti poco costosi²¹. Un altro punto particolarmente interessante è che non sono richiesti reagenti come DMF o NMP rendendo il processo CMR-free.

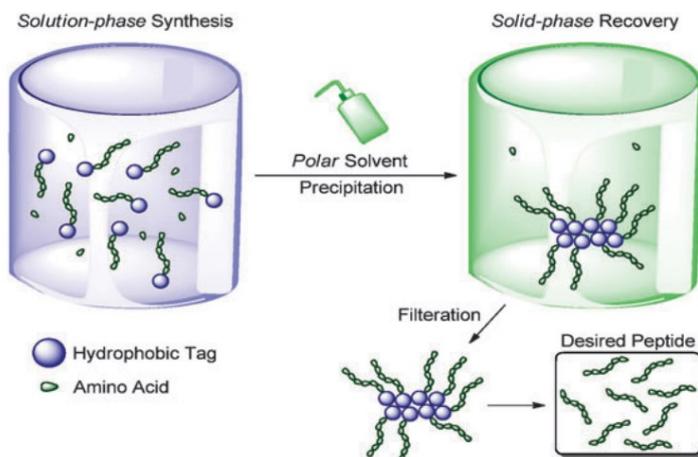


Figura 16: Purificazione da sintesi con TAG²²

3.2.2. Ajiphase®

La tecnologia Ajiphase® è stata sviluppata dalla Ajinomoto nel 2005⁶. Come per la Molecular Hiving™ Technology, le reazioni avvengono in fase liquida con il peptide ancorato ad un TAG (Figura 17) che ne promuove la solubilità in solventi organici. La prima generazione di TAG consisteva in gruppi trifenilici o linker per la resina Rink Amide (Figura 5c) funzionalizzati con catene

lineari (Figura 18a). Un importante avanzamento della tecnologia avvenne con il passaggio a catene ramificate che ne ha incrementato la solubilità in solventi organici^{23,24} (Figura 18b).

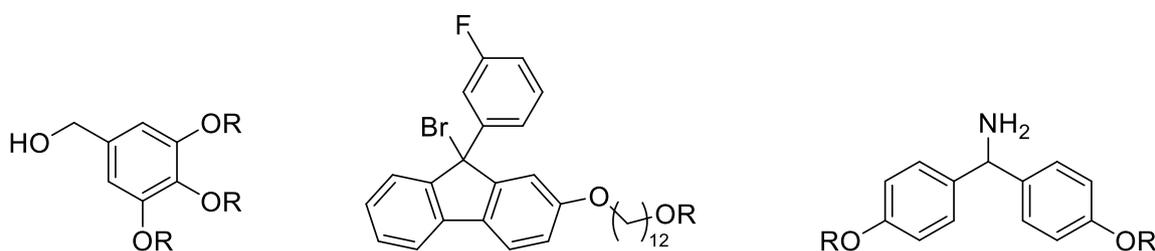


Figura 17: TAG Ajiphase®

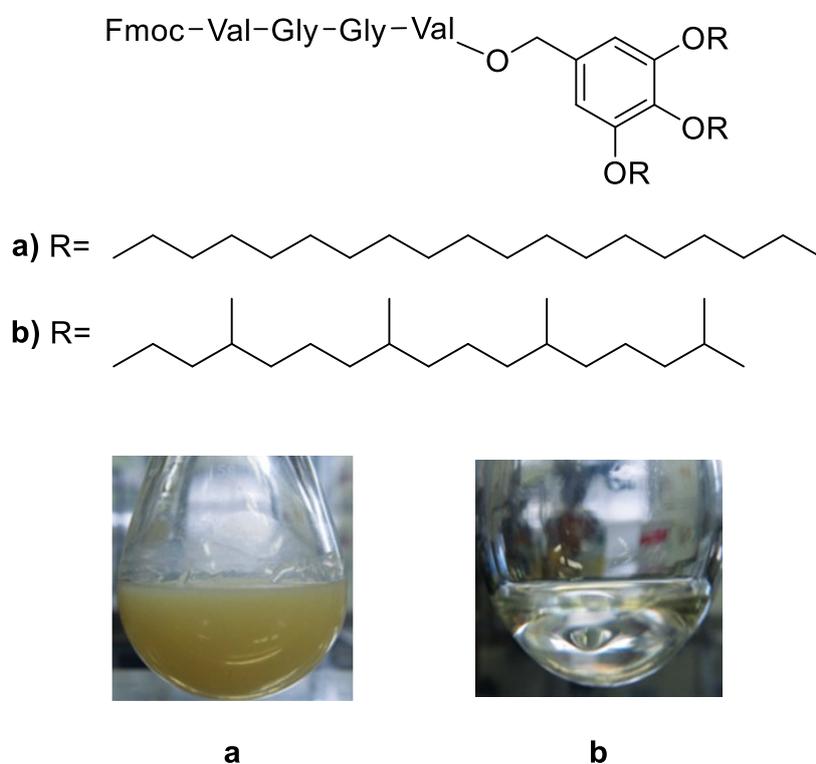


Figura 18: Miscela di reazione con TAG a catene lineari (a) e ramificate (b), entrambe in cloroformio

Come per la Molecular Hiving Technology è possibile eseguire una sintesi one-pot purché i reagenti siano allontanabili per rimozione della fase acquosa²³.

3.3. Sintesi con micro-reattori

Dagli anni 90' la sintesi in micro-reattori ha raccolto l'attenzione della comunità scientifica dati i vantaggi rispetto la convenzione sintesi batch. Per *microflow* si intende reazioni che avvengono in spazi ≤ 1 mm.

La tecnologia microflow presenta numerosi e significativi vantaggi. Le ridotte dimensioni dello spazio di reazione permettono una miscelazione in tempi estremamente brevi, inferiori al secondo, permettendo un controllo accurato della temperatura grazie all'elevato rapporto superficie/volume. In accordo con la legge di Lambert-Beer, la penetrazione della luce è nettamente maggiore rispetto alle sintesi batch privilegiandone l'applicazione per reazioni fotochimiche. Inoltre, i ridotti quantitativi di reagenti utilizzati contribuiscono a minimizzare i rischi associati alla manipolazione di composti tossici e/o esplosivi. Un ulteriore punto di forza è la sua facile scalabilità e possibilità di automatizzare le sintesi²⁵. Un campo di avanguardia per questa tecnologia è la combinazione tra sintesi microflow automatizzate, metodi di monitoraggio in tempo reale e algoritmi di *machine learning* per avere un'ottimizzazione delle condizioni di reazione²⁶.

3.3.1. Sintesi via acil azide

La sintesi via acil azide rappresenta una metodologia alternativa nella preparazione di peptidi. Questa metodologia è particolarmente interessante poiché permette di abbassare il rischio di epimerizzazione. Le acil azidi sono composti particolarmente instabili e potenzialmente esplosivi, caratteristiche che ne riducono l'applicabilità²⁷; tuttavia, le tecniche flow permettono l'uso di composti tossici ed esplosivi con maggior semplicità data l'esigua quantità che viene utilizzata, adattandosi dunque a questa tecnica.

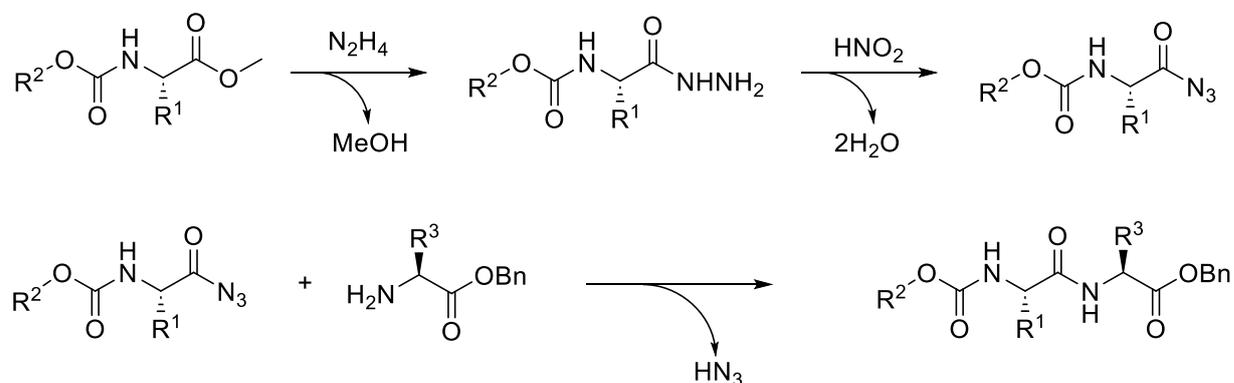


Figura 19: Sintesi via acil azide

La sintesi (Figura 19) inizia con la preparazione di un estere dell'amminoacido che viene in seguito fatto reagire con idrazina (NH_2NH_2) per formare l'idrazide. L'idrazide quindi formata è convertita ad acil azide con acido nitroso (HNO_2). L'ammina libera presente in un altro amminoacido reagisce quindi con l'acil azide formando il legame peptidico e con uscita di acido idrazoico (HN_3)²⁷.

Una reazione secondaria che può avvenire in seguito alla formazione dell'acil azide è il riarrangiamento di Curtius con formazione di un isocianato (Figura 20).

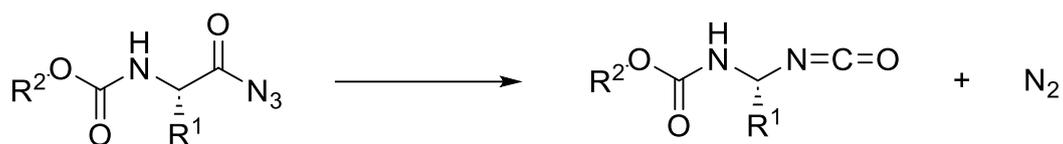


Figura 20: Riarrangiamento di Curtius

Come precedentemente esposto, l'uso della tecnologia microflow permette di risolvere le problematiche legate all'uso di acil azidi poiché i composti instabili e pericolosi vengono generati *in situ* e subito consumati. La sintesi con acil azidi inoltre non ha il rischio di passare per l'intermedio ossazolone che è la prima causa di racemizzazione; infatti, le cinque sintesi di dipeptidi prese in esame hanno riportato una racemizzazione $< 1\%$ ²⁷.

La scelta del solvente è particolarmente importante nell'evitare la formazione di composti solidi che ostruirebbero i condotti del reattore. Solventi come THF e MeOH hanno prodotto una piena conversione ma con scarsa selettività. Una soluzione migliore è l'uso di solventi bifasici. Per lo studio sono stati presi in esame MeTHF, Et₂O e EtOAc come fase organica e H₂O come fase acquosa. L'uso di questi solventi ha portato alla conversione completa del peptide con, tuttavia, una bassa formazione di precipitato stimata come accettabile²⁷.

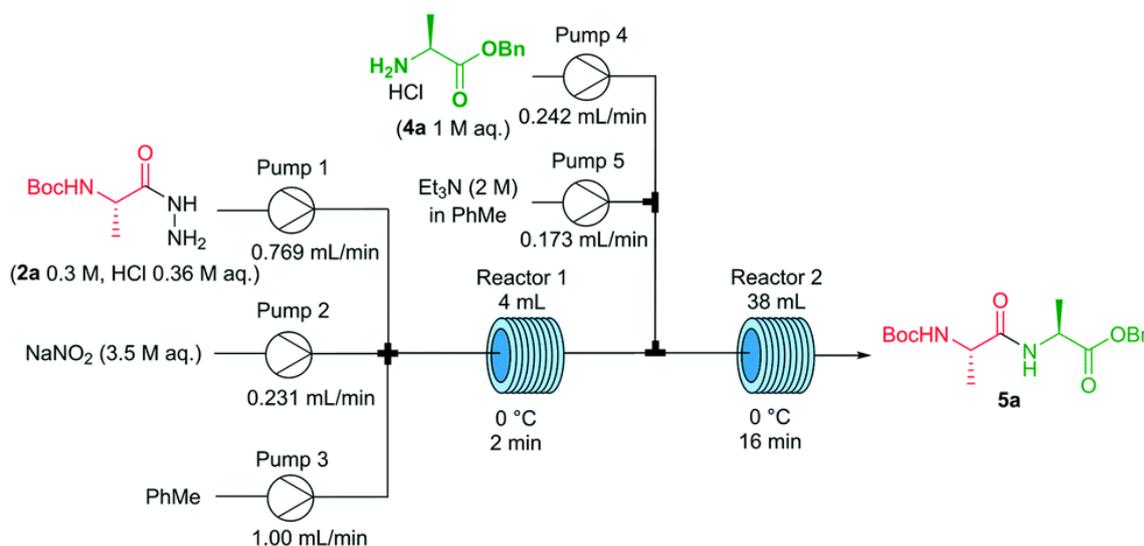


Figura 21: Setup micro-reattore

3.3.2. Sintesi automatizzata flow di peptidi (AFPS)

Mediante l'utilizzo della tecnologia microflow è stato prodotto un protocollo automatico ottimizzato (Figura 22) che permette la sintesi di peptidi in tempi relativamente brevi e con rese maggiori rispetto alla tradizionale SPPS²⁸.

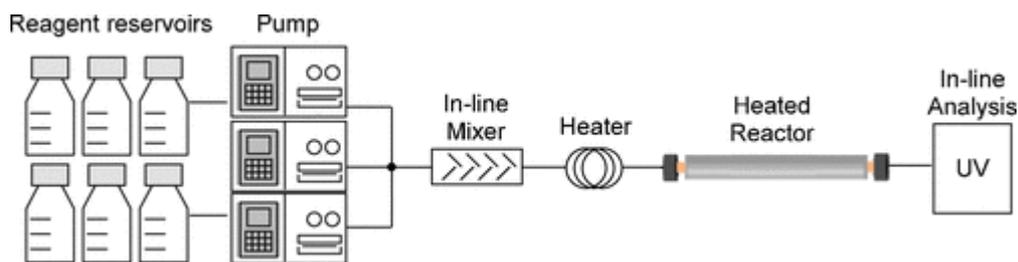


Figura 22: Sintetizzatore per la sintesi automatizzata fast-flow di peptidi (AFPS)²⁵

La tecnologia protocollo AFPS²⁹ è stata applicata per la sintesi della proinsulina (86 aminoacidi) e la proteasi del virus dell'immunodeficienza umana-1 (HIV-1) (99 aminoacidi). In parallelo è stata eseguita la sintesi degli stessi peptidi SPPS con metodologia Boc²⁸.

La sintesi AFPS ha richiesto un decimo del tempo rispetto alla SPPS e una successiva analisi con cromatografia liquida accoppiata a spettroscopia di massa (LC-MS) ha evidenziato come l'utilizzo della tecnica microflow abbia prodotto una maggiore selettività verso il prodotto desiderato (Figura 23).

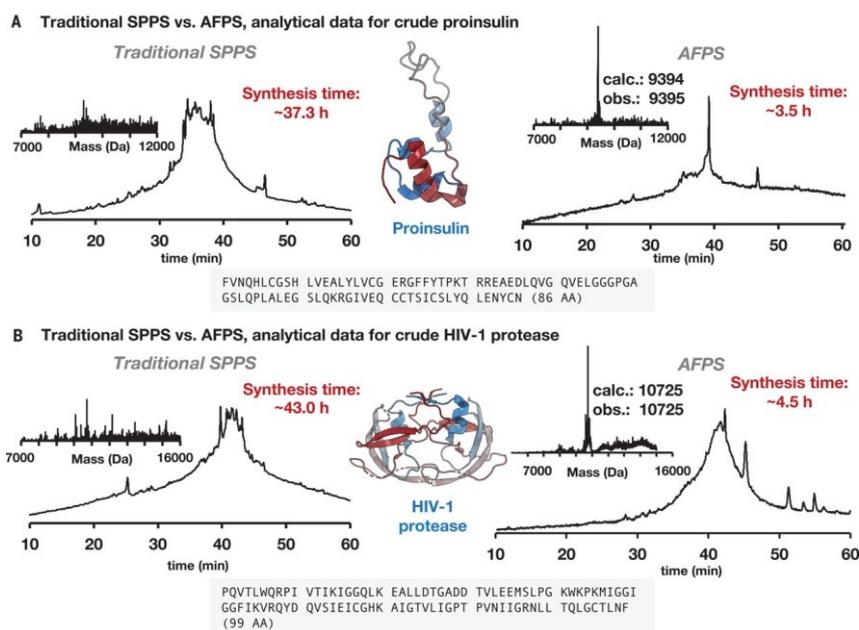


Figura 23: SPPS vs. AFPS nella sintesi di Proinsulina e HIV-1.²⁵

Con il fine di verificar la generale applicabilità del protocollo AFPS, sono state condotte sintesi di proteine storicamente importanti (Figura 24) così da poter confrontare i risultati con quelli presenti in letteratura. Per ogni sintesi la proteina desiderata è stata il prodotto principale, confermando come questa metodologia sia una valida opzione per la sintesi di peptidi lunghi e riduca pure tempistiche e sforzi richiesti all'operatore²⁸.

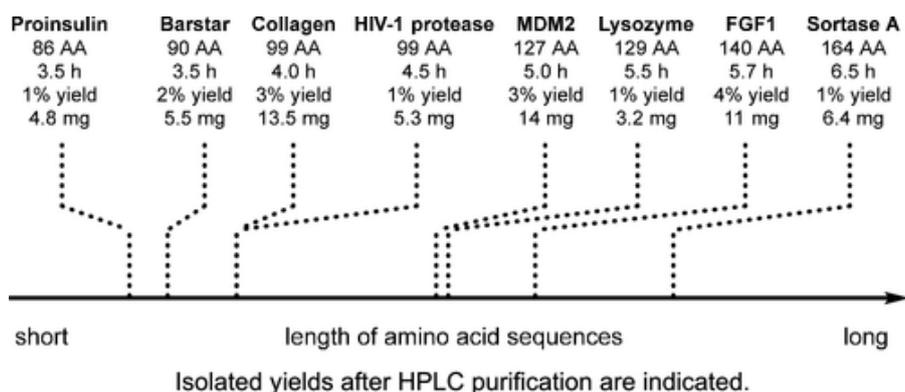


Figura 24: Peptidi/proteine sintetizzati tramite l'approccio AFPS^{25,28}

3.3.3. Sintesi mesoflow di peptidi in fase solida

Per avere i vantaggi delle tecniche microflow non è sempre necessario utilizzare spazi così ridotti e apparecchiature dedicate. Un sistema di sintesi con reattore di sezione poco maggiore al millimetro è stato sviluppato usando un HPLC commerciale³⁰. Nello studio in analisi, gli amminoacidi sono stati immobilizzati su una resina TentaGel con Rink Amide inserita all'interno di una colonna cromatografica PEEK (Polyether ether ketone) (Figura 25). In parallelo è stata eseguita una sintesi con microonde (MW) per la catena B dell'insulina (30 AA). L'uso della colonna cromatografica ha ridotto significativamente l'uso di solventi (solo un quinto del solvente utilizzato in una sintesi via microonde) e al contempo ha incrementato resa e purezza del prodotto. Tra le due sintesi, tuttavia, sono state usate tempistiche e temperature diverse.

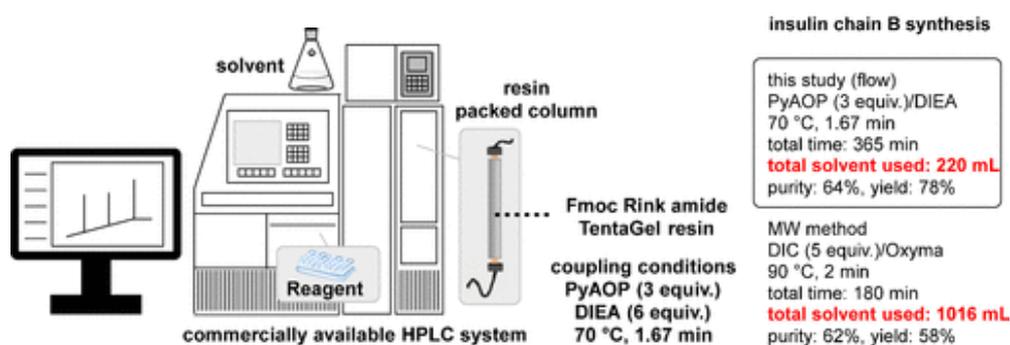


Figura 25: sintetizzatore mesoflow con HPLC commerciale^{25,30}

3.3.4. Deep Learning

Per Deep Learning si intende un modello di intelligenza artificiale che tramite reti neurali artificiali è in grado di analizzare una serie di dati. Nello specifico, le reti neurali sono algoritmi composti da “neuroni” pesati e divisi in una serie di *layer* comunicanti tra loro (Figura 26). I *layer* ai due estremi sono chiamati di *input* e *output*, nell'*input layer* vengono inseriti i dati in analisi e

dall'*output layer* esce il risultato. Questo processo richiede tuttavia una prima fase di addestramento nel quale si sottopone la rete neurale ad un *training set*, composto da coppie di *input/output* note, così da pesare ogni neurone adeguatamente. Conclusa la fase di addestramento la rete neurale è utilizzabile.

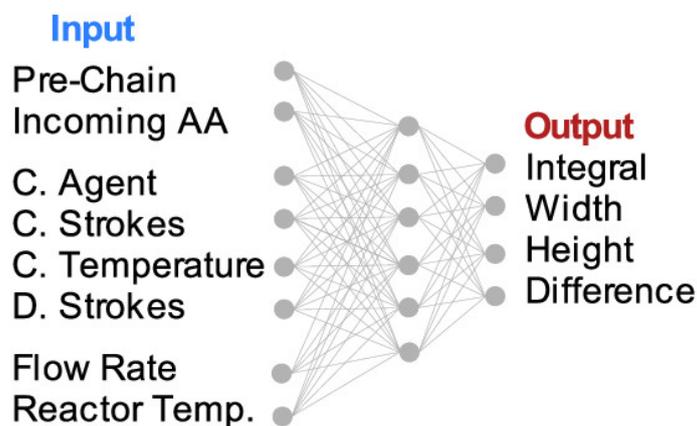


Figura 26: Rete neurale²⁶

L'accesso ad un set di dati di alta qualità, standardizzati e utilizzabili da questi sistemi modelli sono ad oggi l'ostacolo più rilevante. Per risolvere il problema Mohepatra *et al*²⁶ hanno utilizzato un sintetizzatore fast-flow automatico di peptidi (Automated fast-flowpeptide synthesizer, AFPS) (Figura 22), ottenendo un dataset di 35427 reazioni utilizzate poi per istruire la rete neurale.

Tra gli input sono state inserite le condizioni di reazione, la sequenza precedente all'attacco (*prechain*) e l'amminoacido che si vuole introdurre in sequenza. La *prechain* è rappresentata con una matrice Figura 27 composta dalle extended-connectivity fingerprints (ECFP)^{26,31} dei singoli monomeri in sequenza. Le ECFP sono rappresentazioni delle molecole al cui interno è codificata la struttura e gruppi funzionali.

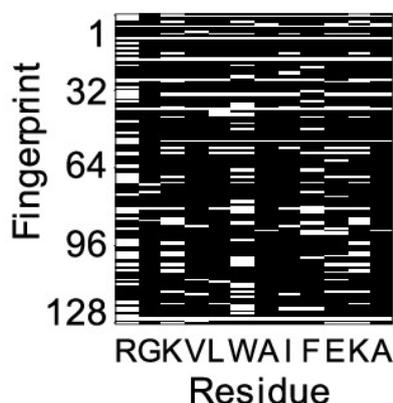


Figura 27: Matrice ECFP con gruppi amminici liberi²⁶

Come output, invece, sono stati utilizzati integrale, altezza e larghezza del picco UV-Vis associato alla deprotezione del gruppo Fmoc. Infatti, con la strumentazione in uso la deprotezione è quantitativa e il dibenzofulvene prodotto ha un assorbimento a 310 nm misurabile con un rivelatore UV-vis²⁶ (Figura 22).

La rete neurale istruita è stata quindi in grado di stimare le forme dei picchi di deprotezione e dunque prevedere gli andamenti di reazione per sintesi peptidiche anche al di fuori del *training set*, trovando oltretutto le condizioni ottimali per ogni singolo step²⁶.

Il design utilizzato nello studio in aggiunta è relativamente semplice e automatizzato, permettendo quindi ad altri ricercatori di implementarlo ed espandere il dataset con ulteriori reazioni così da coprire il più ampio intervallo possibile.

4. Parte sperimentale

Per comprendere al meglio le problematiche legate alla sintesi peptidica, è stata svolta un'attività di laboratorio presso il Dipartimento di Science Chimiche dell'Università di Padova.

Nel corso dell'attività sperimentale è stata effettuata una sintesi peptidica in fase solida (SPPS) con l'obiettivo di sintetizzare un peptide di 4 amminoacidi con sequenza Leu-Leu-Val-Phe (Figura 28).

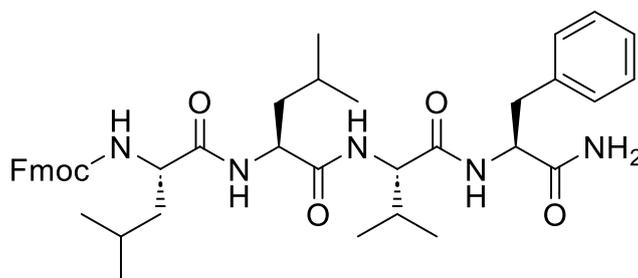


Figura 28: *Fmoc-Leu-Leu-Val-Phe-NH₂*

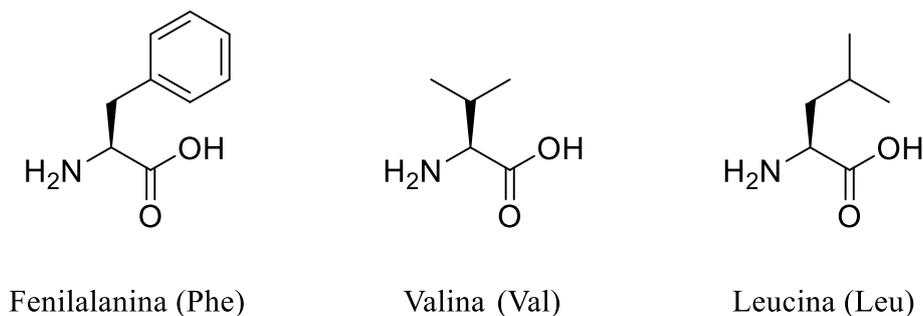


Figura 29: *Aminoacidi*

La sintesi è stata eseguita seguendo la metodologia Fmoc, per supporto solido è stata utilizzata una resina Rink Amide e come solvente dimetilformammide (DMF). Inizialmente, il gruppo Fmoc presente nella resina (Figura 5c) è stato rimosso trattando con una miscela di piperidina 20% in DMF. Successivamente, è stata aggiunta la miscela di coupling composta da 3 equivalenti del primo amminoacido protetto con gruppo Fmoc, insieme a OxymaPure® e DIC (diisopropilcarbodiimide) (Figura 30). Questa procedura è stata ripetuta per ciascun amminoacido della sequenza.

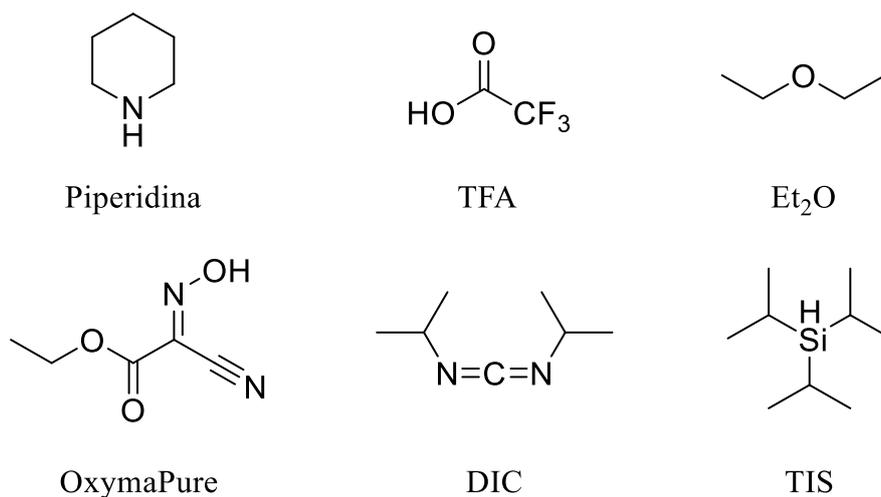


Figura 30: Reagenti

Dopo ogni coupling, è stato eseguito il Kaiser test per confermare il completo attacco dell'amminoacido. Esso, infatti, consiste in una reazione tra la ninidrina e un'ammina libera producendo come derivato il Ruhemann's purple di colorazione blu/viola intensa³². Pertanto, la resina si colora di blu se il coupling non è stato completo.

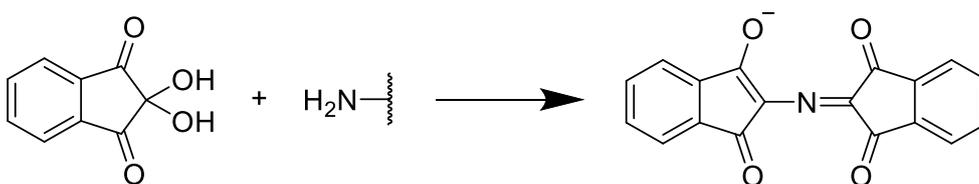


Figura 31: Kaiser test con ninidrina

Al termine della sintesi, il peptide ancorato alla resina è stato rilasciato per trattamento con una miscela di acido trifluoroacetico (TFA), H₂O e triisopropilsilano (TIS) in rapporto 95:2,5:2,5. Il peptide presente in soluzione è stato fatto precipitare tramite etere dietilico (Et₂O) (Figura 30) e isolato tramite centrifuga. Infine, il peptide sintetizzato (Figura 28) è stato caratterizzato utilizzando una cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa (LC-MS) per confermare la sua composizione e purezza.

5. Conclusione

La sintesi peptidica è un'attività che sta sempre più occupando il settore chimico farmaceutico. Come abbiamo avuto modo di verificare, le tecnologie di sintesi oggi maggiormente impiegate presentano problematiche di carattere ambientale e sanitario. Appunto per questo risulta necessario trovare nuove metodologie che possano risolverne le complicazioni. La transizione dalle tecniche tradizionali a quelle innovative, come la sintesi in fase liquida con peptidi ancorati e le tecniche microflow, rappresenta un'importante sviluppo, offrendo maggiore efficienza, sostenibilità e accuratezza. Anche l'uso di solventi alternativi alla DMF, NMP e DCM risulta sempre più necessario sul piano legale e ambientale.

In conclusione, nei prossimi anni la sintesi peptidica avanzerà verso nuovi orizzonti promettenti, ma questo richiede una collaborazione multidisciplinare e un continuo sforzo ed investimento nella ricerca ed innovazione. Le scoperte che avverranno in questo campo avranno il potenziale di rivoluzione non solo la sintesi peptidica, ma anche altre strategie di sintesi che presentano insidie simili.

Bibliografia

- (1) Fischer, E.; Fourneau, E. Ueber Einige Derivate Des Glykocolls. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34* (2), 2868–2877. <https://doi.org/10.1002/cber.190103402249>.
- (2) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (3) Muttenthaler, M.; Albericio, F.; Dawson, P. E. Methods, Setup and Safe Handling for Anhydrous Hydrogen Fluoride Cleavage in Boc Solid-Phase Peptide Synthesis. *Nat Protoc* **2015**, *10* (7), 1067–1083. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.061>.
- (4) Varnava, K. G.; Sarojini, V. Making Solid-Phase Peptide Synthesis Greener: A Review of the Literature. *Chem Asian J* **2019**, *14* (8), 1088–1097. <https://doi.org/10.1002/asia.201801807>.
- (5) Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J Am Chem Soc* **1970**, *92* (19), 5748–5749. <https://doi.org/10.1021/ja00722a043>.
- (6) Ferrazzano, L.; Catani, M.; Cavazzini, A.; Martelli, G.; Corbisiero, D.; Cantelmi, P.; Fantoni, T.; Mattellone, A.; De Luca, C.; Felletti, S.; Cabri, W.; Tolomelli, A. Sustainability in Peptide Chemistry: Current Synthesis and Purification Technologies and Future Challenges. *Green Chemistry* **2022**, *24* (3), 975–1020. <https://doi.org/10.1039/d1gc04387k>.
- (7) Magtaan, J. K.; Devocelle, M.; Kelleher, F. Assessing the Correlation of Microscopy-based and Volumetry-based Measurements for Resin Swelling in a Range of Potential Greener Solvents for SPPS. *Journal of Peptide Science* **2020**, *26* (6). <https://doi.org/10.1002/psc.3250>.
- (8) *European CHemicals Agency ECHA*. <https://echa.europa.eu/it/candidate-list-table> (accessed 2023-08-18).
- (9) *Pollution Prevention Act*; 1990; pp 13101–13109.
- (10) Green Chemistry: Principles, Applications, and Disadvantages. *Chemical Methodologies* **2020**, *4* (4), 408–423. <https://doi.org/10.33945/SAMI/CHEMM.2020.4.4>.
- (11) Byrne, F. P.; Jin, S.; Paggiola, G.; Petchey, T. H. M.; Clark, J. H.; Farmer, T. J.; Hunt, A. J.; Robert McElroy, C.; Sherwood, J. Tools and Techniques for Solvent Selection: Green Solvent

- Selection Guides. *Sustainable Chemical Processes* **2016**, *4* (1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0051-z>.
- (12) Alder, C. M.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Redman, A. M.; Shukla, L.; Shuster, L. E.; Sneddon, H. F. Updating and Further Expanding GSK's Solvent Sustainability Guide. *Green Chemistry* **2016**, *18* (13), 3879–3890. <https://doi.org/10.1039/C6GC00611F>.
- (13) Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Domínguez de María, P.; Alcántara, A. R. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry. *ChemSusChem* **2012**, *5* (8), 1369–1379. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100780>.
- (14) Lopez, J.; Pletscher, S.; Aemissegger, A.; Bucher, C.; Gallou, F. N -Butylpyrrolidinone as Alternative Solvent for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org Process Res Dev* **2018**, *22* (4), 494–503. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00389>.
- (15) Jadhav, S.; Seufert, W.; Lechner, C.; Schönleber, R. Bachem – Insights into Innovative and Sustainable Peptide Chemistry and Technology by the Leading Independent Manufacturer of TIDES. *Chimia (Aarau)* **2021**, *75* (6), 475–479. <https://doi.org/10.2533/chimia.2021.476>.
- (16) Martin, V.; Jadhav, S.; Egelund, P. H. G.; Liffert, R.; Johansson Castro, H.; Krüger, T.; Haselmann, K. F.; Thordal Le Quement, S.; Albericio, F.; Dettner, F.; Lechner, C.; Schönleber, R.; Pedersen, D. S. Harnessing Polarity and Viscosity to Identify Green Binary Solvent Mixtures as Viable Alternatives to DMF in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Green Chemistry* **2021**, *23* (9), 3295–3311. <https://doi.org/10.1039/D1GC00603G>.
- (17) Jadhav, S.; Martin, V.; Egelund, P. H. G.; Johansson Castro, H.; Krüger, T.; Richner, F.; Thordal Le Quement, S.; Albericio, F.; Dettner, F.; Lechner, C.; Schönleber, R.; Pedersen, D. S. Replacing DMF in Solid-Phase Peptide Synthesis: Varying the Composition of Green Binary Solvent Mixtures as a Tool to Mitigate Common Side-Reactions. *Green Chemistry* **2021**, *23* (9), 3312–3321. <https://doi.org/10.1039/D1GC00604E>.
- (18) Pawlas, J.; Rasmussen, J. H. ReGreen SPPS: Enabling Circular Chemistry in Environmentally Sensible Solid-Phase Peptide Synthesis. *Green Chemistry* **2019**, *21* (21), 5990–5998. <https://doi.org/10.1039/C9GC02775K>.
- (19) Okada, Y.; Takasawa, R.; Kubo, D.; Iwanaga, N.; Fujita, S.; Suzuki, K.; Suzuki, H.; Kamiya, H.; Chiba, K. Improved Tag-Assisted Liquid-Phase Peptide Synthesis: Application to the

- Synthesis of the Bradykinin Receptor Antagonist Icatibant Acetate. *Org Process Res Dev* **2019**, *23* (11), 2576–2581. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00397>.
- (20) Bachem. *Cost-efficient and green manufacturing of peptides thanks to Molecular Hiving technology™*. https://youtu.be/8zhv_mnBCxU (accessed 2023-08-14).
- (21) Chiba, K.; Sugihara, M.; Yoshida, K.; Mikami, Y.; Kim, S. Synthesis of Hydrophobic Phase-Tagged Prolyl Peptides Featuring Rapid Reaction/Separation. *Tetrahedron* **2009**, *65* (38), 8014–8020. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.07.045>.
- (22) Tana, G.; Kitada, S.; Fujita, S.; Okada, Y.; Kim, S.; Chiba, K. A Practical Solution-Phase Synthesis of an Antagonistic Peptide of TNF- α Based on Hydrophobic Tag Strategy. *Chemical Communications* **2010**, *46* (43), 8219. <https://doi.org/10.1039/c0cc03090b>.
- (23) Takahashi, D.; Inomata, T.; Fukui, T. AJIPHASE®: A Highly Efficient Synthetic Method for One-Pot Peptide Elongation in the Solution Phase by an Fmoc Strategy. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (27), 7803–7807. <https://doi.org/10.1002/anie.201702931>.
- (24) Takahashi, D.; Yano, T.; Fukui, T. Novel Diphenylmethyl-Derived Amide Protecting Group for Efficient Liquid-Phase Peptide Synthesis: AJIPHASE. *Org Lett* **2012**, *14* (17), 4514–4517. <https://doi.org/10.1021/ol302002g>.
- (25) Masui, H.; Fuse, S. Recent Advances in the Solid-and Solution-Phase Synthesis of Peptides and Proteins Using Microflow Technology. *Org Process Res Dev* **2022**, *26* (6), 1751–1765. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.2c00074>.
- (26) Mohapatra, S.; Hartrampf, N.; Poskus, M.; Loas, A.; Gómez-Bombarelli, R.; Pentelute, B. L. Deep Learning for Prediction and Optimization of Fast-Flow Peptide Synthesis. *ACS Cent Sci* **2020**, *6* (12), 2277–2286. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00979>.
- (27) Mata, A.; Weigl, U.; Flögel, O.; Baur, P.; Hone, C. A.; Kappe, C. O. Acyl Azide Generation and Amide Bond Formation in Continuous-Flow for the Synthesis of Peptides. *React Chem Eng* **2020**, *5* (4), 645–650. <https://doi.org/10.1039/D0RE00034E>.
- (28) Hartrampf, N.; Saebi, A.; Poskus, M.; Gates, Z. P.; Callahan, A. J.; Cowfer, A. E.; Hanna, S.; Antilla, S.; Schissel, C. K.; Quartararo, A. J.; Ye, X.; Mijalis, A. J.; Simon, M. D.; Loas, A.; Liu, S.; Jessen, C.; Nielsen, T. E.; Pentelute, B. L. Synthesis of Proteins by Automated Flow Chemistry.

- (29) Mijalis, A. J.; Thomas, D. A.; Simon, M. D.; Adamo, A.; Beaumont, R.; Jensen, K. F.; Pentelute, B. L. A Fully Automated Flow-Based Approach for Accelerated Peptide Synthesis. *Nat Chem Biol* **2017**, *13* (5), 464–466. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2318>.
- (30) Farkas, V.; Ferentzi, K.; Horváti, K.; Perczel, A. Cost-Effective Flow Peptide Synthesis: Metamorphosis of HPLC. *Org Process Res Dev* **2021**, *25* (2), 182–191. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00178>.
- (31) Rogers, D.; Hahn, M. Extended-Connectivity Fingerprints. *J Chem Inf Model* **2010**, *50* (5), 742–754. <https://doi.org/10.1021/ci100050t>.
- (32) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal Biochem* **1970**, *34* (2), 595–598. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6).