



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Medicinali Peptidici: importanza, sviluppi recenti e metodi di stabilizzazione alla proteolisi

Relatore: Prof. Barbara Biondi

**Laureando: Emanuele Poletto
1187305**

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

1. Introduzione	3
2. Modifiche terminali	6
2.1. Modifiche C-terminali.....	6
2.2. Modifiche N-terminali.....	8
3. Modifiche al <i>backbone</i>	9
3.1. Alchilazioni	9
3.2. Sostituzioni.....	9
3.2.1. <i>Amminoacidi D e non-naturali</i>	10
3.2.2. <i>Altre sostituzioni</i>	11
4. Ciclizzazioni	12
4.1. Testa-coda	12
4.2. Backbone-backbone.....	12
4.3. Ponti disolfuro	13
4.4. Ponti tioetere	14
5. Considerazioni	15
Bibliografia:	17

1. Introduzione

I medicinali a base peptidica offrono numerosi vantaggi nel campo della versatilità, specificità e compatibilità con la biologia umana. Queste caratteristiche non sono state tuttavia ancora sufficienti a spingerne un uso ad ampio spettro, a causa delle problematiche legate alla natura stessa dei peptidi: la loro instabilità all'attacco delle proteasi e facilità di denaturazione in condizioni avverse di pH li sottopongono a un forte problema di biodisponibilità orale e intracellulare e ne riducono di molto la durata di circolazione nell'organismo. Le estreme condizioni di acidità e concentrazione enzimatica nell'apparato digerente complicano notevolmente la somministrazione per via orale, e lo stesso plasma umano contiene proteasi in quantità tali da impedire una concentrazione adeguatamente alta e duratura per un farmaco peptidico assunto via iniezione o assorbimento cutaneo.

Ciò generalmente ne abbassa di molto l'efficacia, specialmente a lungo termine, a meno di alti dosaggi che possono essere dannosi per l'organismo e costosi in produzione. La stabilizzazione di queste biomolecole è diventata quindi un importante punto focale per il loro uso commerciale, al fine di permettere lo sviluppo di medicinali notevolmente meno tossici per il paziente e con un'azione specifica e generalmente più potente della controparte tradizionale.

La specificità è infatti uno dei principali vantaggi di questi medicinali, essendo orientati all'interazione con uno specifico recettore con la massima efficacia possibile. Questo ne permette un uso con molti meno effetti collaterali, sia a causa della loro funzione mirata, sia per la loro facile rimozione dal siero umano rispetto ai medicinali tradizionali. Proprio grazie alla loro forte suscettibilità alle proteasi, questi farmaci possono essere progettati con una determinata durata *in vivo*, per evitare effetti prolungati indesiderati o citotossicità nel caso di peptidi antimicrobici.

Il primo uso di medicinali peptidici risale al 1922, con la prima somministrazione di insulina di origine animale ad un paziente umano. Sviluppi successivi degni di nota sono tuttavia avvenuti solo dal 1963, con l'introduzione della sintesi peptidica in fase solida ad opera di B. Merrifield, e dopo il 1980, con le prime ricerche sulla tecnologia a DNA ricombinante per la produzione di sequenze amminoacidiche inedite. Queste innovazioni chiave hanno permesso di produrre peptidi con residui modificati o di sintesi, sostituendo quelli ottenuti da fonti animali con altri progettati per una data funzione, operando opportuni accorgimenti per migliorarne la specificità e la stabilità. [Figura 1]

La coniugazione con macromolecole, lipidi o polimeri ha permesso anche di superare il problema della rimozione per via renale dei farmaci peptidici, ed il continuo studio di peptidi naturali, associandoli al loro DNA o RNA codificante, continua ancora oggi a portare esempi di nuove sequenze e strutture utili e sempre più efficaci.

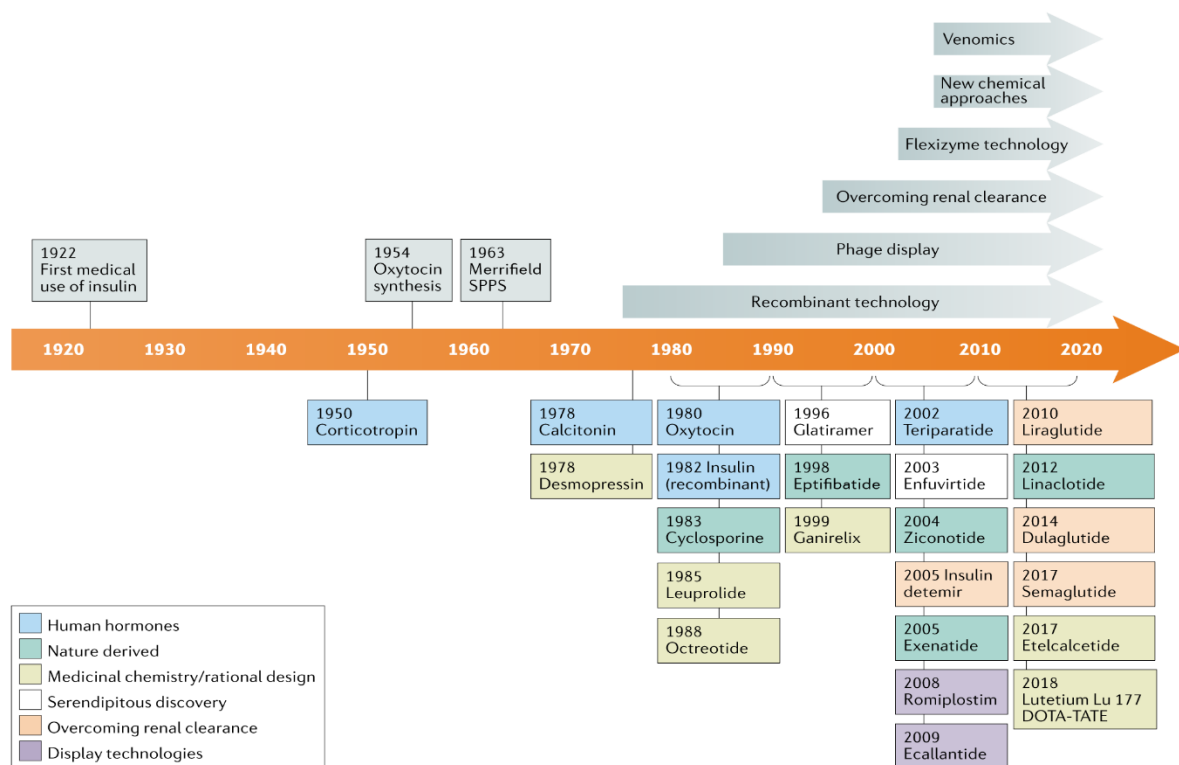
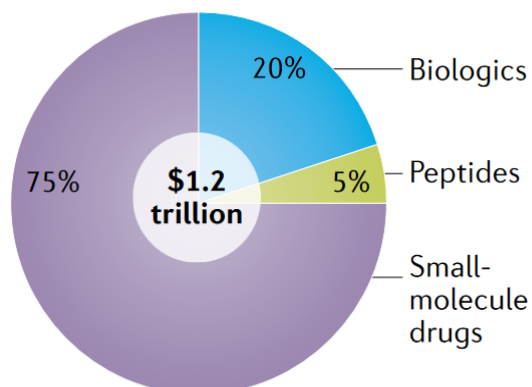


Figura 1: Sviluppo di peptidi e farmaci peptidici nell'ultimo secolo, con particolare nota all'introduzione di nuovi metodi e tecnologie. [7]

Il mercato si è espanso molto rapidamente negli ultimi decenni, con 36 farmaci approvati dall'FDA solo negli ultimi 7 anni [Figura 2], toccando 14.1 miliardi di dollari nel 2011 e superando i 70 miliardi di dollari in vendite nel 2019.^{[1][2][3]} Il medicinale principale di questo settore è l'insulina, insieme a suoi analoghi, che coprono oltre metà del mercato dei peptidi ad uso medico. I secondi peptidi più venduti sono agonisti dei recettori di GLP-1, usati per trattare il diabete di tipo 2. Malattie metaboliche, endocrine e carcinogeniche sono il principale focus dei medicinali peptidici attuali, ed il loro trattamento più efficiente e con il minimo numero di dosi possibili è un obiettivo ricercato dalla totalità delle aziende farmaceutiche, sia per minimizzare l'invasività per il paziente che per massimizzare l'efficienza della produzione.

a Global pharmaceutical market (2019)



b Peptide drug approvals

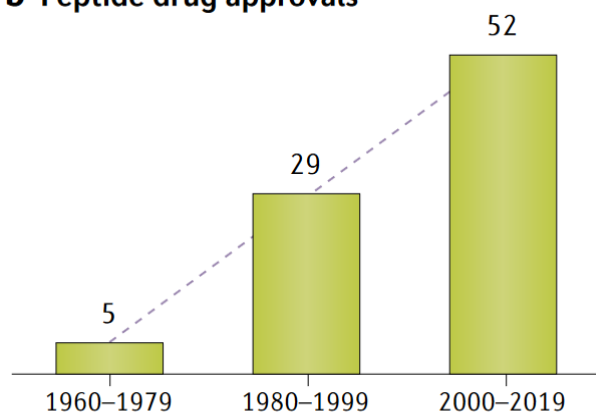


Figura 2: percentuale di medicinali peptidici nel mercato farmaceutico globale (a), e crescita dei farmaci peptidici approvati per ventennio (b). [7]

Numerosi peptidi citotossici e battericidi, orientati alla difesa tumorale e immunitaria, sono inoltre tuttora studiati per le possibili applicazioni chemioterapiche e su batteri immunizzati ad antibiotici convenzionali.^[4] A differenza di questi ultimi, il cui funzionamento si basa sull'interazione con specifici recettori batterici che possono non essere presenti in batteri che hanno sviluppato una resistenza, i peptidi antimicrobici interferiscono direttamente con la struttura della membrana batterica permeandola ed alterandola. Questo potrebbe dare una soluzione al recente problema di immunizzazione dei batteri agli antibiotici tradizionali, fornendo un approccio utile a contrastare l'antibiotico resistenza.

Fra i primi peptidi utilizzati per lo studio di modifiche e stabilizzazioni vanno citati ossitocina, vasopressina, somatostatina e l'ormone di rilascio della gonadotropina (GnRH): questi piccoli peptidi, con breve durata naturale *in vivo*, già negli anni Sessanta sono stati oggetto di modifiche quali sostituzioni con amminoacidi D e non naturali, *capping* e diverse alterazioni ai gruppi terminali, portando a medicinali di migliore efficacia e resistenza.^[1] Questi prodotti sono stati ottenuti inizialmente mediante sintesi in fase solida, legando gli amminoacidi in sequenza ad un substrato polimerico e generando un legame peptidico via carbodiimmide organica o simili reagenti, utilizzando inizialmente solventi come dimetilformammide e diclorometano.^[5]

Questa metodologia di sintesi è stata notevolmente implementata e permette ora di sintetizzare peptidi di media lunghezza in modo automatizzato, anche su larga scala. Tuttavia, la necessità di lavorare in presenza di eccessi di reagenti e la non completa compatibilità dei supporti polimerici verso solventi a scarso impatto ambientale, ha portato la ricerca in questo ambito a indirizzarsi verso approcci sintetici green.^[6]

Grazie alla tecnologia a DNA ricombinante, è stata resa disponibile un'alternativa affidabile per la produzione di grandi molecole: basandosi sull'utilizzo di colonie batteriche per produrre peptidi secondo sequenze genetiche copiate in massa via PCR e importate via plasmidi, è stato possibile ottenere prodotti altamente specifici e potenzialmente copiati dal codice genetico di specie diverse dalle caratteristiche desiderabili.

Questo metodo permette inoltre l'uso di enzimi interni al batterio stesso, facilitando ulteriori modifiche utili con possibili meccanismi stereospecifici, e presenta molte meno complicazioni con peptidi grandi, avendo un meccanismo biologico meno pronò ad errori. Il principale problema dell'approccio biologico risulta tuttavia l'incapacità degli enzimi batterici di produrre peptidi utilizzando amminoacidi non-naturali, il che rende impossibili numerose modifiche di sostituzione necessarie alla stabilizzazione.

2. Modifiche terminali

Le estremità $-NH_2$ e $-COOH$ degli amminoacidi terminali peptidici sono particolarmente sensibili all'attacco enzimatico: esse sono bersaglio degli enzimi aminopeptidasi e carbossipeptidasi, che rimuovono sequenzialmente residui rispettivamente a partire dall'estremità N-terminale o C-terminale.

Le modifiche terminali proteggono le estremità del peptide impedendone il riconoscimento, ed avvengono anche *in vivo* in vari microorganismi, solitamente per via enzimatica. La maggior parte di queste reazioni, agendo su gruppi tipicamente carichi in base al pH, va a rimuovere una carica dal peptide. Questo, pur dandogli una maggior capacità di penetrazione attraverso la membrana cellulare, può alterare l'affinità verso i siti di riconoscimento, dando effetti positivi o negativi in base al *target* che vanno tenuti in considerazione.

Allo stesso tempo, le modifiche terminali sono necessarie per peptidi ottenuti dallo studio di sequenze derivate da proteine più complesse: rimuovendo la carica delle estremità, queste alterazioni rendono il peptide più simile alla sua controparte proteica in modo da ritenerne l'attività.

2.1. Modifiche C-terminali

Le modifiche più comuni all'estremità carbossilica sono le amidazioni, effettuate con gruppi diversi in base alla funzione. Buona parte degli ormoni peptidici naturali sono amidati,^[7] cosa che rende questa modifica necessaria per un corretto funzionamento di numerosi analoghi di sintesi. La più comune amidazione è la trasformazione in ammido semplice dell'acido terminale. Oltre al metodo chimico in fase solida o liquida (via carbodiimmide DCC), questo può avvenire anche per reazione enzimatica, con glicinazione e successiva rimozione di gliossilato da parte dell'enzima α -AE (o PAM, *peptidylglycine α -amidating enzyme*) [Figura 3]. L'approccio biologico, (oltre ad essere più efficiente e *green*) è specificamente utile per peptidi sintetizzati via batteri, che possono essere già dotati dell'enzima necessario.^{[7][8]}

Questa modifica terminale ha generalmente un effetto positivo sulla resistenza e funzionalità del peptide prodotto, specialmente se in natura è già amidato, ma esiste la possibilità di una riduzione dell'efficacia a causa di un cambiamento della polarità del peptide o di difficoltà nel riconoscimento sul sito di interazione.

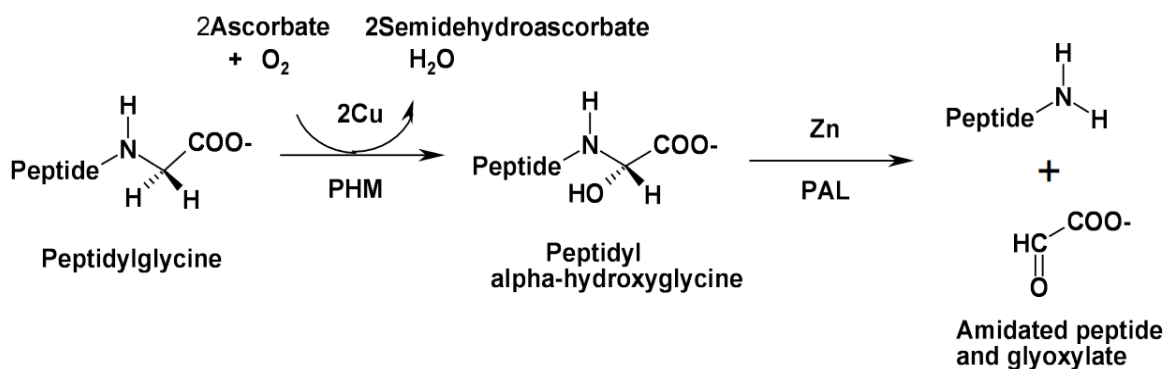


Figura 3: Meccanismo di amidazione enzimatica di un carbonio terminale con perdita di gliossilato. [7]

Diversi tipi di ammidazione possono tuttavia aggirare il problema, utilizzando ammine primarie e secondarie con specifiche catene di migliore affinità, o macromolecole come glicole polietilenico (PEG) legato via $-NH_2$ o per esterificazione.^{[3][9]} Questo polimero, oltre a proteggere dalla peptidasi generando un ingombro sterico, aumenta l'idrosolubilità del peptide e ne riduce la rimozione per via renale.

Altre possibili modifiche meno comuni sono esterificazione (solitamente con alcoli a catena corta come metanolo o etanolo) e aldeidificazione [Figura 4].

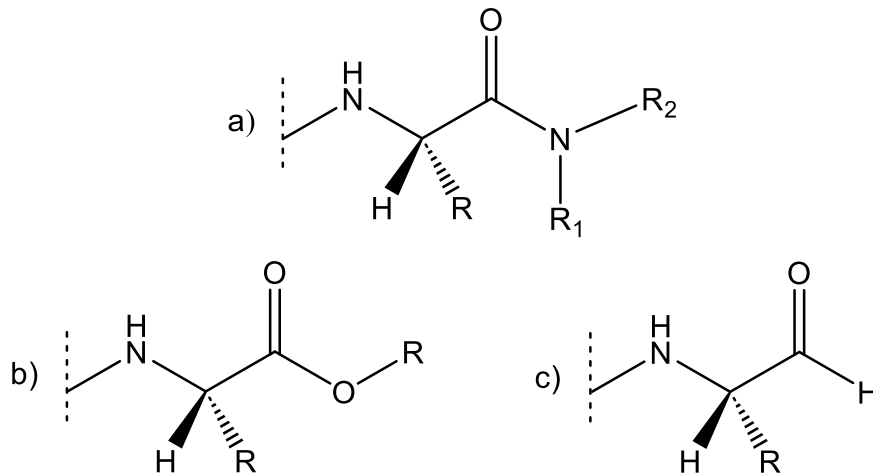


Figura 4: esempi di modifiche all'estremità C-terminale. a) ammidazione con possibile ammina primaria o secondaria; b) esterificazione; c) aldeidificazione.

2.2. Modifiche N-terminali

L'estremità amminica presenta una maggiore varietà di modifiche, come l'acilazione e la metilazione/alchilazione. L'acetilazione, via condensazione peptidica fra $-NH_2$ terminale e acido acetico, è una delle più comuni, e viene ottenuta chimicamente facendo reagire con anidride acetica durante la sintesi su fase solida mentre gli altri gruppi amminici sono ancora protetti. Altri possibili reagenti sono esteri o cloruri dell'acido acetico.^{[11][12][13]} Un approccio biologico è possibile, mediante l'uso dell'enzima acetiltransferasi, ma le applicazioni non sono ancora state approfondite.^[14]

Esistono inoltre opzioni di acilazione della catena laterale in cui glutammato o glutammina, sotto riscaldamento o in ambiente fortemente acido o basico, ciclizzano con l'estremità amminica per dare piroglutammato [Figura 5c]. Questo può essere sfruttato anche aggiungendo un residuo Glu o Gln all'estremità N-terminale, ove possibile, per proteggere il gruppo amminico terminale senza alterare catene laterali potenzialmente necessarie all'attività del peptide.^[10] Acilazioni con acidi grassi o altri gruppi specifici vengono utilizzati per alterare la polarità o l'ingombro sterico, oppure per legare un tracciante al peptide.

La N-metilazione (o alchilazione) è meno utilizzata in modo specifico per l'estremità N-terminale, ma la sua applicazione è importante per le modifiche al backbone. Effettuabile sia per via chimica durante sintesi in fase solida che potenzialmente per via enzimatica con metiltransferasi, questa modifica può essere singola, doppia o tripla. In quest'ultimo caso, si ottiene un gruppo $-NR_3^+$ permanentemente carico che si può usare per alterare la carica del peptide.^{[4][15][16][17]}

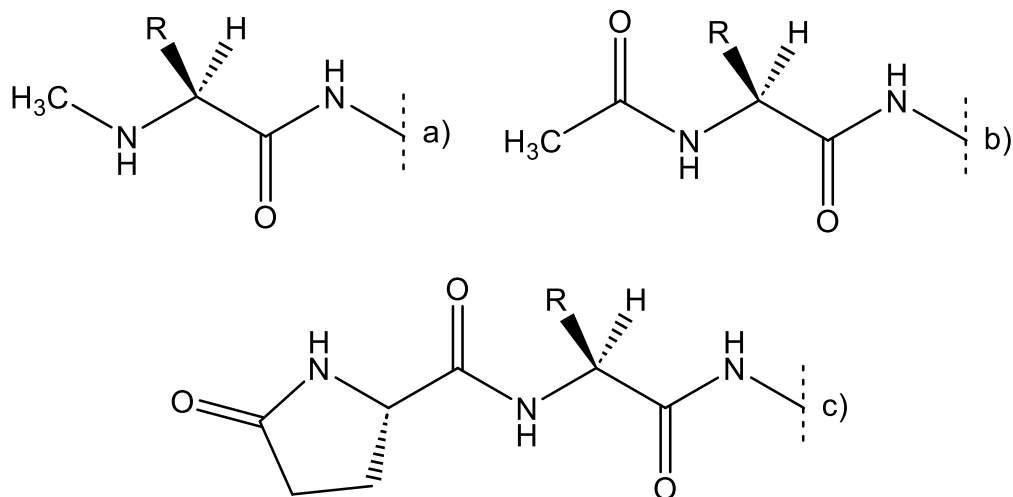


Figura 5: esempi di modifiche all'estremità N-terminale. a) metilazione; b) acetilazione; c) cicloacilazione.

3. Modifiche al *backbone*

Al fine di proteggere dall'azione delle endopeptidasi, che rompono i legami ammidici interni, possono essere applicate diverse modifiche alla sequenza di aminoacidi, alle loro catene laterali o ai loro gruppi funzionali. Residui non funzionali possono essere sostituiti con altri meno facilmente attaccabili o non naturali, e catene laterali o gruppi sensibili (come l'azoto nel legame ammidico) possono essere protetti con gruppi che li rendono meno facilmente riconoscibili alle peptidasi.

3.1. Alchilazioni

Come per l'estremità N-terminale, anche i gruppi amminici delle catene laterali e gli atomi di azoto interni possono essere alchilati, solitamente con un gruppo metile [Figura 3]. Questo, oltre a ridurre la polarità del peptide aumentandone la capacità di penetrazione della membrana plasmatica, impedisce alle endopeptidasi di riconoscere il legame peptidico e scinderlo. Dato il maggiore ingombro sterico, questa modifica favorisce anche legami peptidici *cis* facilitando la ciclizzazione del peptide.^{[17][18]} Il metodo prevalente è quello chimico durante la sintesi in fase solida, in cui la funzione amminica protetta da o-nitrobenzensolfonamide (o-NBS) viene deprotonata da una base organica e poi metilata con dimetilsolfonato o p-nitrobenzensolfonilcloruro (p-NBS).^[19] Questo processo è complicato dalla presenza di un maggior ingombro sterico per la condensazione peptidica, ed oltre ad avere una resa non ottimale comporta uno spreco di reagenti anche a causa dei passaggi aggiuntivi. L'alternativa biologica comporta l'uso di aminoacidi pre-metilati ancora legati al tRNA e, pur avendo ancora rese inferiori al metodo chimico, ha meno problemi di reattività e potrebbe dimostrarsi più valida se adeguatamente approfondita.^[18]

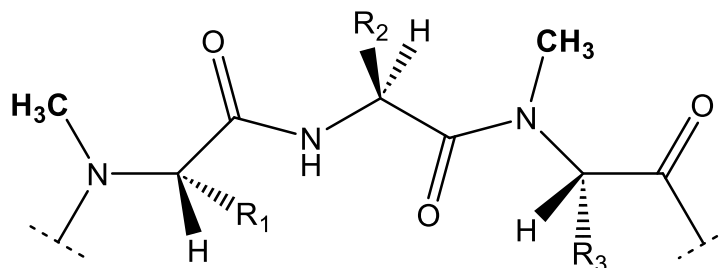


Figura 5: segmento di peptide parzialmente N-metilato (in grassetto), deformato a causa dell'ingombro sterico.

3.2. Sostituzioni

Una modifica chiave nell'alterazione del *backbone* peptidico è la sostituzione di residui nella sequenza: l'inserimento durante la sintesi del peptide di aminoacidi D o con catene laterali modificate ne impedisce il riconoscimento da parte delle peptidasi.^[4]

Un metodo comune per sapere quali aminoacidi possano essere sostituiti e quali siano essenziali per il funzionamento del peptide è la mappatura via *alanine scan*, in cui si sostituiscono in sequenza i diversi residui con alanina. Questo metodo può essere applicato preliminarmente per via computazionale, procedendo successivamente alla sintesi e alla valutazione *in vitro* degli effetti sull'attività biologica. Solitamente, pochi aminoacidi interagiscono realmente con i siti di riconoscimento, mentre gli altri hanno funzioni strutturali o steriche o sono completamente sostituibili.

I residui poi selezionati sono generalmente quelli bersaglio delle peptidasi più comuni, ad esempio lisina e arginina per l'enzima tripsina o serina per l'enzima elastasi, e portano a una resistenza molto maggiore verso la specifica peptidasi considerata. La presenza di numerose peptidasi diverse nel siero umano rende necessaria una valutazione di tutti i possibili amminoacidi attaccabili, la cui protezione generalmente richiede una combinazione di diverse tecniche di sostituzione e modifica.

3.2.1. Amminoacidi D e non-naturali

Data la capacità delle proteasi di riconoscere solo amminoacidi naturali L, l'incorporazione di alcuni amminoacidi D può ridurre notevolmente il tasso di proteolisi dell'intero peptide a causa dell'effetto complessivo di modifica conformazionale. La quantità di sostituzioni va comunque moderata, per evitare un'eccessiva deformazione con possibile perdita della struttura secondaria e della funzione del peptide.^[20] Per peptidi lineari, questo si traduce nella necessità di avere almeno due amminoacidi D nella sequenza, per evitare una singola distorsione che stravolgerebbe completamente la naturale conformazione del peptide.

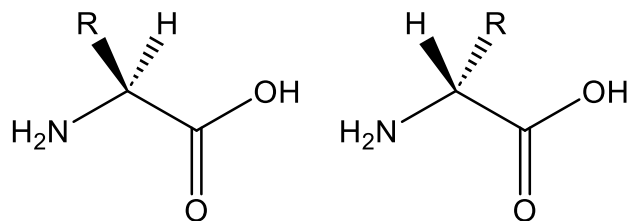


Figura 6: amminoacido L e amminoacido D.

Un approccio poco invasivo prevede la sostituzione dei soli amminoacidi terminali, mantenendo quasi inalterata la forma del peptide: inserendo un numero limitato di amminoacidi D alle estremità, senza interferire con la sequenza di riconoscimento, la resistenza di un peptide privo di altri residui facilmente attaccabili (ad esempio treonina e prolina) può essere notevolmente aumentata senza impattare il riconoscimento della sua sequenza attiva. Nel lavoro di Tugyi et al.^[20], inserendo un massimo di tre amminoacidi D all'estremità C-terminale e due all'estremità N-terminale, in un peptide privo di lisina e arginina, è stato possibile ottenere un'alta stabilità in siero umano con una diminuzione minima dell'attività. La concentrazione non si è ridotta di più del 10% anche dopo 96 ore di incubazione in siero, e l'attività antigenica è stata considerata analoga a quella del peptide originale. La sostituzione di ulteriori residui all'estremità N-terminale ha tuttavia portato a una notevole riduzione dell'attività a causa della vicinanza con la sequenza attiva del peptide, alterata nella sua struttura dai residui D inseriti. Questa opzione va quindi considerata con cautela, evitando di alterare i residui prossimi a quelli funzionali trovati via mappatura, ma offre una protezione sia dalle esopeptidasi che parzialmente dalle endopeptidasi.

In base alla sequenza del peptide possono essere necessarie più o meno sostituzioni, spingendo a possibili diversi approcci per evitare la sopracitata perdita strutturale. A meno di recettori stereospecifici, sono possibili anche sostituzioni totali degli amminoacidi da L a D, che preservano la struttura secondaria del peptide spesso conservandone le proprietà. I peptidi risultanti hanno un'altissima stabilità *in vitro* e *in vivo*, ma questa immunità alla maggior parte delle proteasi ha come effetto collaterale una più marcata citotossicità nel caso di peptidi antimicrobici (AMP),^{[21][22]} come nel lavoro sperimentale di Molhoek et al.^[22]

In questo studio, un peptide antimicrobico elicoidale ha subito una sostituzione completa dei suoi amminoacidi da L a D, producendo un analogo dalle stesse caratteristiche battericide e conformazionali ma enantiomericamente specchiato. La sua altissima stabilità di 24 ore, in contrasto con le 2 ore del peptide di partenza, ha tuttavia portato a una citotossicità del 35% contro gli eritrociti assente nella sua controparte naturale, dovuto all'impossibilità di rimozione dall'organismo.

L-amminoacidi non-naturali possono svolgere una funzione analoga senza modificare la struttura del peptide, se progettati con una catena laterale simile a quella del residuo sostituito [Figura 7]: Lys può essere sostituita da acido 4-amminobutanoico se in posizione terminale, Dab (acido L-2,4-diamminobutanoico) o Dap (acido L-2,3-diamminopropanoico), e Hor (L-omoarginina) può sostituire Arg, entrambi amminoacidi fortemente soggetti all'attacco della tripsina. Phe può essere sostituita da Thi (L-tienilalanina), un amminoacido eterociclico tiofenico.^[21]

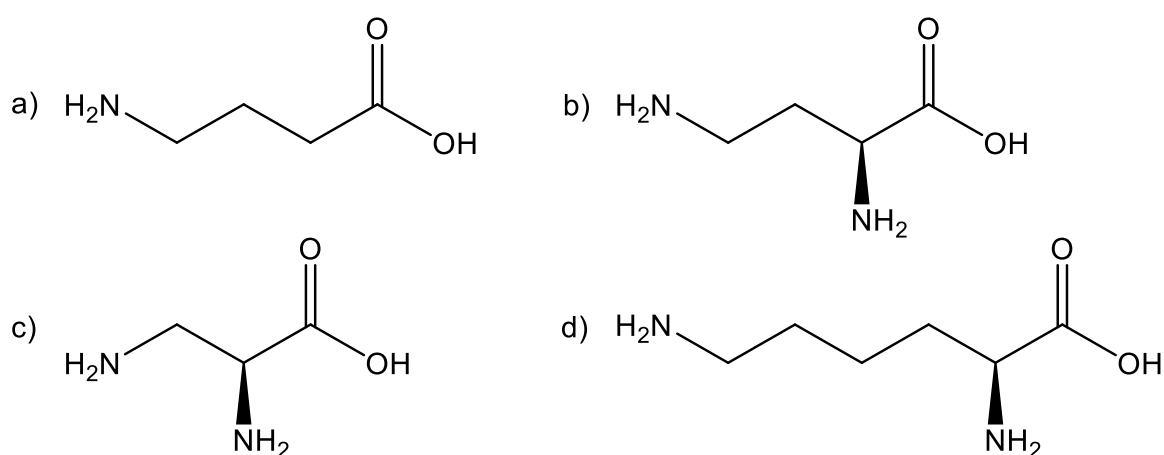


Figura 7: amminoacidi non-naturali acido 4-amminobutanoico (a), Dab (b) e Dap (c), comparati alla lisina (d)

3.2.2. Altre sostituzioni

La sostituzione con amminoacidi naturali non originariamente presenti nel peptide ma meno facilmente attaccati permette un diverso tipo di stabilizzazione, limitando l'uso di residui modificati. Selezionando amminoacidi con catene laterali stericamente e funzionalmente simili agli originali, è possibile impedire l'attacco di specifiche peptidasi senza intaccare la carica o la struttura del peptide. Nel lavoro sperimentale di Molhoek et al.^[22], è stato possibile aumentare l'efficacia *in vivo* di un peptide battericida di 2.5 volte rispetto alla controparte naturale utilizzando triptofano al posto di fenilalanina. In virtù della sua diversa catena laterale aromatica, l'amminoacido subisce infatti un più lento attacco proteolitico, aumentando considerevolmente la durata nel siero umano.

Modifiche conformazionali desiderabili possono essere introdotte anche mediante sostituzione con prolina o amminoacidi ingombrati, per esempio per facilitare la ciclizzazione. Lo stesso può essere svolto per modificare la carica del peptide, scegliendo residui anionici, neutri o cationici per facilitare l'interazione con determinati siti o membrane.^[23]

La sostituzione con amminoacidi con catene laterali carbossiliche, idrossiliche, amminiche o tioliche può permettere l'introduzione di un nuovo sito di ciclizzazione^[10], utile ad evitare l'uso delle estremità N- o C- terminali o di catene laterali necessarie alla funzione del peptide.

4. Ciclizzazioni

La ciclizzazione, cambiando la forma del peptide, ne impedisce il riconoscimento da parte delle peptidasi. Essa richiede una deformazione preventiva del peptide, effettuata mediante sostituzioni con amminoacidi D, stericamente ingombrati (ad es. metilati), o rigidi come la prolina. Tipicamente avviene legando insieme gruppi amminici, gruppi idrossilici o gruppi tiolici, sia di *backbone*, terminali o di catene laterali. In base alla forma del peptide e alla distanza fra le funzioni da ciclizzare, può anche essere utilizzato un *linker* che colleghi le due parti.^[24]

4.1. Testa-coda

Mediante la formazione di un legame peptidico fra l'estremità C-terminale e N-terminale del peptide, è possibile proteggere le funzioni carbossilica e amminica terminali dalle esopeptidasi, il tutto modificando la struttura tridimensionale del peptide. Questo protegge anche il "corpo" del peptide, rendendolo a sua volta meno facilmente riconoscibile dagli enzimi proteolitici.^[24] Generalmente, questa ciclizzazione richiede l'introduzione di un amminoacido D nella sequenza peptidica, in modo da permettere al *backbone* la conformazione adatta a legare insieme le sue estremità.^[25]

Nel lavoro di Veber et al.^[26], un esapeptide analogo all'ormone somatostatina è stato stabilizzato via ciclizzazione testa-coda, introducendo un D-triptofano e una prolina nella sequenza per irrigidire la struttura nella forma ciclica desiderata. I risultati hanno mostrato una stabilità e potenza di varie volte superiori all'originale, comparabili a un altro peptide analogo ma biciclico e molto più complesso. La rigidità del ciclo ha sicuramente contribuito alla sua alta stabilità proteolitica, così come l'uso di un D-amminoacido e la protezione di entrambi i gruppi terminali insieme alla ciclizzazione.

4.2. Backbone-backbone

Ciclizzazioni nel *backbone* possono avvenire fra catene laterali, atomi di azoto già coinvolti in legami peptidici o un'estremità carbossilica o amminica del peptide. Ponti lattamici possono essere formati ad esempio fra Asp, Glu o l'estremità C-terminale e Lys, azoto di *backbone* o l'estremità N-terminale [Figura 8]. L'uso di *linker* bifunzionali, come una catena alifatica con due estremità amminiche o carbossiliche, può permettere anche la ciclizzazione fra due gruppi uguali.

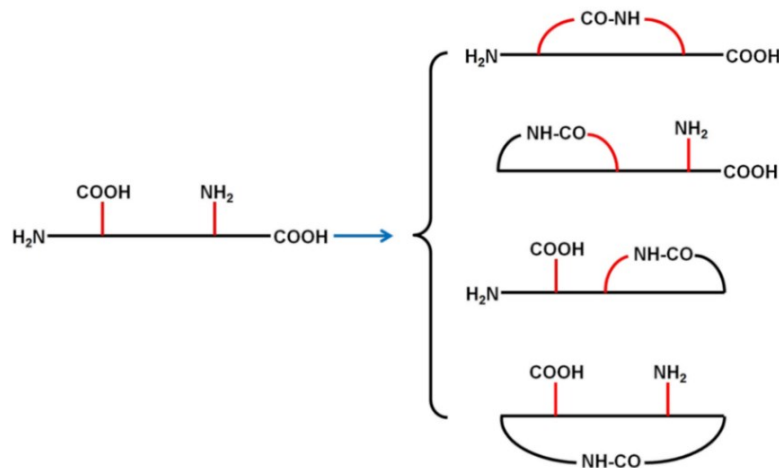


Figura 8: rappresentazione schematica di ciclizzazioni di backbone e testa-coda. [4]

4.3. Ponti disolfuro

I ponti disolfuro sono una delle modifiche più comuni in peptidi modificati. Possono essere creati fra due residui di cisteina, molto spesso in più copie nella molecola peptidica [Figura 9]. Questi ponti portano il peptide, soprattutto se originariamente lineare, a sviluppare una struttura secondaria più elaborata e rigida con conseguente maggiore stabilità.

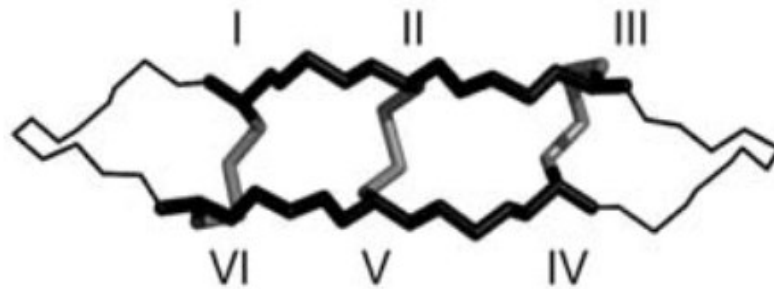


Figura 9: molecola ciclicizzata con tre diversi ponti disolfuro, schematizzati fra i residui numerati. [24]

Un esempio estremamente importante di peptide stabilizzato in questo metodo è l'insulina: già naturalmente, essa presenta tre ponti disolfuro, due dei quali uniscono le due catene peptidiche che la compongono. La difficoltà nella produzione di un peptide così complesso via sintesi in fase solida, specialmente ai suoi albori, fu rimediata dalla tecnologia a DNA ricombinante. L'uso di enzimi già presenti in natura adatti alla formazione di specifici ponti disolfuro fra catene diverse rese possibile una sintesi affidabile e precisa, lasciando inoltre spazio ad alterazioni del codice genetico di partenza via *splicing* per introdurre residui diversi nella sequenza.^[27] [figura 10] Sono state inoltre possibili diverse modifiche, ad esempio legami con altre molecole come acidi grassi o polimeri per ridurre la *clearance* renale e modificarne l'affinità.

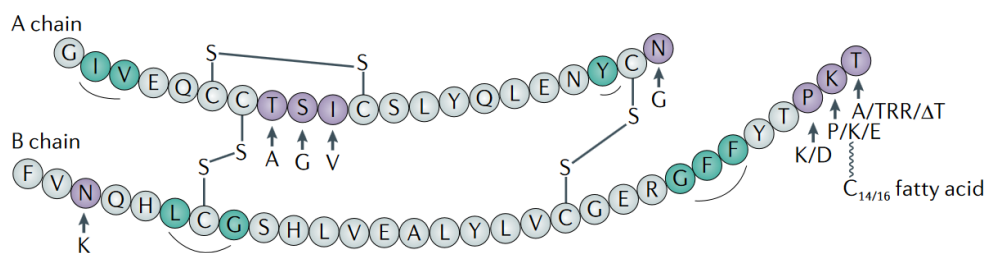


Figura 10: struttura dell'insulina. In verde e sottolineati, i siti necessari al riconoscimento sul suo recettore. In viola, gli amminoacidi tipicamente sostituiti o modificati nella produzione di farmaci più stabili o efficaci. [1]

4.4. Ponti tioetere

I ponti tioetere vengono generalmente introdotti mediante la reazione fra una catena laterale con funzione tiolica e una catena laterale con funzione idrossilica, ottenendo l'amminoacido ciclizzante lantionina (Lan) [Figura 11]. Anche se relativamente più rari, la loro stabilità è considerevolmente maggiore di quella dei ponti disolfuro.

Nel lavoro di Rink et al.^[10], un peptide derivato dall'ormone di rilascio dell'ormone luteninizzante (LHRH) è stato ciclizzato via ponte tioetere, previa sostituzione del quarto e settimo residuo con serina e D-cisteina rispettivamente, in modo da rendere possibile la ciclizzazione.

L'approccio è stato sia chimico, con reazione in ambiente basico, che biologico, utilizzando enzimi batterici preesistenti in *Lactococcus lactis* [Figura 11].

La ciclizzazione, insieme alle modifiche terminali di amidazione e acilazione e all'introduzione di una D-cisteina, ha portato a una stabilità fino a 20 volte maggiore del peptide originale in base alle condizioni di test (provenienza del siero umano e pH).

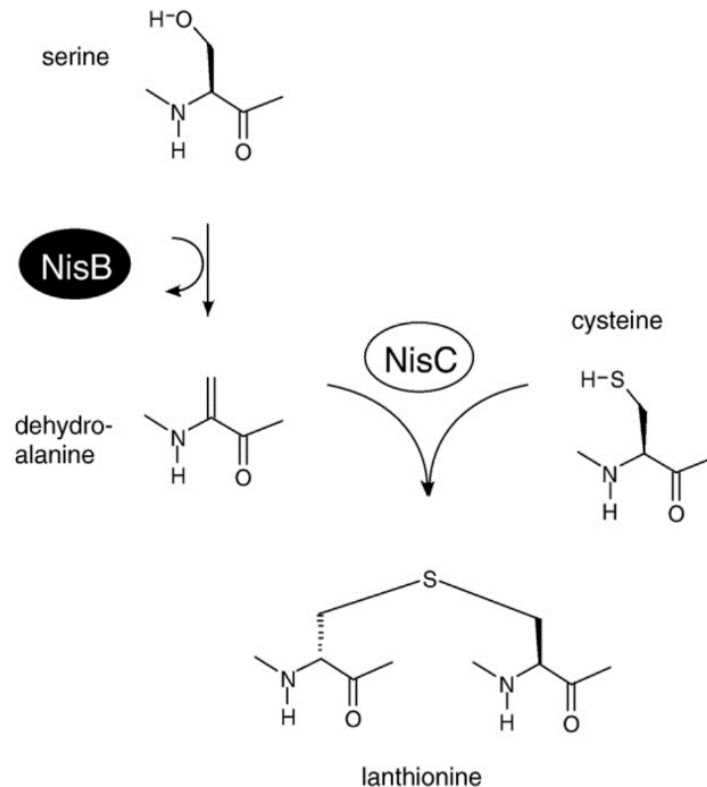


Figura 11: reazione enzimatica di formazione dell'amminoacido lantionina, con conseguente ponte tioetere. [10]

5. Considerazioni

I medicinali peptidici rappresentano ormai un importante settore del mercato farmaceutico, con una sempre crescente attenzione da parte di aziende ed enti regolatori, ma presentano tanti vantaggi e opportunità quanti ostacoli da superare [Figura 12].

Punti di forza:	Svantaggi:
<ul style="list-style-type: none">- Specificità- Modularità- Alta efficacia- Alta tolleranza	<ul style="list-style-type: none">- Instabilità <i>in vivo</i>- Metodi invasivi di assunzione- Degradazione
Opportunità:	Pericoli:
<ul style="list-style-type: none">- Nuove sequenze utili da peptidi esistenti o simulati- Multifunzionalità- Peptidi antimicrobici	<ul style="list-style-type: none">- Sviluppo di nuove resistenze- Risposta immunitaria ed effetti collaterali

Figura 12: analisi SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats) dei farmaci peptidici.

La loro specificità, utile sia ad evitare effetti collaterali sia in quanto correlata alla loro potenza, ne è sicuramente il miglior punto di forza, ma lo sono anche la loro ridotta risposta immunitaria, dovuta alla natura stessa di peptidi prodotti con amminoacidi presenti nel corpo umano, e la loro modularità, che rende possibile una progettazione del farmaco in tutte le sue caratteristiche. La possibilità di costruire un peptide con un *target* ben definito, una specifica affinità per determinati ambienti o recettori e una potenza e durata appropriati all'uso, li rendono ampiamente più versatili del farmaco tradizionale. La loro sintesi è inoltre standardizzabile, soprattutto nel caso del metodo in fase solida ormai completamente automatizzato, e nel caso di peptidi più complessi è possibile ricorrere alla sintesi biologica.

La loro instabilità, principale ostacolo al loro utilizzo ad ampio spettro, può essere contrastata con l'uso combinato dei metodi di stabilizzazione finora sviluppati, di cui buona parte è descritta in questo elaborato. Essa può inoltre diventarne un punto di forza se adeguatamente sfruttata: peptidi con durata e metabolismo programmati possono offrire un'efficacia mirata nel tempo, senza effetti collaterali e tossicità dovuti alla permanenza o al deposito nell'organismo.

Il problema resta comunque importante, soprattutto considerando l'effetto ancora limitato che i metodi di stabilizzazione possono avere sui peptidi: l'assunzione orale, ideale per un farmaco di uso comune, è ancora molto lontana per numerosi peptidi ad uso farmaceutico, così come altri metodi di somministrazione poco invasivi. La loro conservazione è altrettanto complessa, data la tendenza all'idrolisi, all'ossidazione e all'aggregazione anche fuori dall'organismo, che ne rende lo stoccaggio meno agevole che per medicinali tradizionali.

Questo settore presenta anche diverse opportunità: farmaci polifunzionali, come la somatostatina, possono essere utilizzati per diverse patologie con le dovute modifiche, e innumerevoli sequenze inedite possono essere scoperte sia studiando ormoni umani che veleni animali ^[1], o peptidi batterici ^[10], oppure per simulazione computazionale o usando librerie combinatorie.

I peptidi antimicrobici aprono un'altra importante strada: il loro approccio completamente diverso all'attacco battericida permetterebbe di aggirare il problema ormai sempre più comune e preoccupante dell'immunizzazione batterica agli antibiotici tradizionali, con potenzialmente molti meno rischi di adattamento o di effetti collaterali.

Questa possibilità ha però dei rischi notevoli, in quanto l'immunizzazione di patologie sia batteriche che ad esempio tumorali ai medicinali peptidici le renderebbe estremamente più difficili da curare.

La risposta immunogenica del corpo umano ai farmaci peptidici ed i loro possibili effetti collaterali restano poi delle incognite per ogni medicinale pre-test, e la potenza e selettività di questi ultimi potrebbe renderli molto più dannosi per l'organismo se dovessero avere *target* indesiderati o interazioni non preventivate. L'immunogenicità dei peptidi è tuttavia molto più bassa che nei farmaci tradizionali, e resta un enorme vantaggio nel loro uso.

Il mercato dei medicinali peptidici è inevitabilmente in rapida espansione, e il loro utilizzo si estenderà a sempre più settori farmaceutici nei prossimi anni. Oltre al miglioramento dei pochi farmaci affermati, primo fra tutti l'insulina, sarà soprattutto importante la scoperta e il brevetto di medicinali innovativi e più performanti di quelli correnti. La cura delle patologie con farmaci biologici, modulari e di facile produzione è senza dubbio un obiettivo ambizioso considerando gli ostacoli, ma migliorando le tecniche di sintesi, raccogliendo quante più sequenze utili combinabili in peptidi funzionali, e sviluppando nuove tecnologie di *delivery* si potrebbe arrivare anche a cure personalizzate per l'individuo e a *toolbox* mediche adatte a ogni condizione.

Bibliografia:

- [1] Muttenthaler, M.; King, G. F.; Adams, D. J.; Alewood, P. F. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20* (4), 309–325.
- [2] Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discovery Today* **2015**, *20* (1), 122–128
- [3] Wang, L., Wang, N., Zhang, W. *et al. Sig Transduct Target Ther* **2022**, *7* (48)
- [4] Han, Y.; Zhang, M.; Lai, R.; Zhang, Z. *Peptides* **2021**, *146*, 170666.
- [5] Merrifield, R. B. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (14), 2149–2154
- [6] Guo, R.-C.; Zhang, X.-H.; Ji, L.; Wei, Z.-J.; Duan, Z.-Y.; Qiao, Z.-Y.; Wang, H. *Biomater Sci* **2020**, *8* (22), 6175–6189.
- [7] Kim, K.-H.; Seong, B. L. *Biotechnol Bioprocess Eng* **2001**, *6* (4), 244–251.
- [8] Merkler, D. J. *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, *16* (6), 450–456.
- [9] Brinckerhoff, L. H.; Kalashnikov, V. V.; Thompson, L. W.; Yamshchikov, G. V.; Pierce, R. A.; Galavotti, H. S.; Engelhard, V. H.; Slingluff, C. L. *Int J Cancer* **1999**, *83* (3), 326–334.
- [10] Rink, R.; Arkema-Meter, A.; Baudoin, I.; Post, E.; Kuipers, A.; Nelemans, S. A.; Akanbi, M. H. J.; Moll, G. N. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2010**, *61* (2), 210–218.
- [11] Fu, Y.; Hammer, R. P. *Org Lett* **2002**, *4* (2), 237–240.
- [12] Li, D.; Yang, Y.; Li, R.; Huang, L.; Wang, Z.; Deng, Q.; Dong, S. *J Pept Sci* **2021**, *27* (9).
- [13] Yoshida, T.; Kawamura, S.; Nakata, K. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58* (12), 1181–1184.
- [14] Ree, R.; Varland, S.; Arnesen, T. *Exp Mol Med* **2018**, *50* (7), 1–13.
- [15] Chen, P.; Paschoal Sobreira, T. J.; Hall, M. C.; Hazbun, T. R. *J Proteome Res* **2021**, *20* (9), 4231–4247.
- [16] Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. S. *Org Lett* **2013**, *15* (19), 5012–5015.
- [17] Biron, E.; Chatterjee, J.; Kessler, H. *J Pept Sci.* **2006**, *12* (3), 213–219.
- [18] Chatterjee, J.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52* (1), 254–269.
- [19] Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J Am Chem Soc* **1997**, *119* (9), 2301–2302.

- [20] Tugyi, R.; Uray, K.; Iván, D.; Fellingner, E.; Perkins, A.; Hudecz, F. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**, *102* (2), 413–418.
- [21] Lu, J.; Xu, H.; Xia, J.; Ma, J.; Xu, J.; Li, Y.; Feng, J. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 563030.
- [22] Molhoek, E. M.; Van Dijk, A.; Veldhuizen, E. J. A.; Haagsman, H. P.; Bikker, F. J. *Peptides* **2011**, *32* (5), 875–880.
- [23] De Breij, A.; Riool, M.; Cordfunke, R. A.; Malanovic, N.; De Boer, L.; Koning, R. I.; Ravensbergen, E.; Franken, M.; Van Der Heijde, T.; Boekema, B. K.; Kwakman, P. H. S.; Kamp, N.; El Ghalbzouri, A.; Lohner, K.; Zaat, S. A. J.; Drijfhout, J. W.; Nibbering, P. H. *Sci Transl Med* **2018**, *10* (423).
- [24] Conibear, A. C.; Chaousis, S.; Durek, T.; Johan Rosengren, K.; Craik, D. J.; Schroeder, C. I. *Biopolymers* **2016**, *106* (1), 89–100.
- [25] Ovadia, O.; Greenberg, S.; Laufer, B.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2010**, *5* (7), 655–671.
- [26] Veber, D. F.; Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Paleveda, W. J.; Holly, F. W.; Strachan, R. G.; Nutt, R. F.; Arison, B. H.; Homnick, C.; Randall, W. C.; Glitzer, M. S.; Saperstein, R.; Hirschmann, R. *Nature* **1981**, *292* (5818), 55–58.
- [27] Johnson, I. S. *Science* **1983**, *219*, 632–637.