

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

XXI CICLO (2005-2008)

**SVILUPPO DI NUOVI PRINCIPI ATTIVI PER
IL RICONOSCIMENTO MOLECOLARE DI
PROTEINE IMPLICATE
NELL'ANGIOGENESI PATOLOGICA**

Tutore

PROF. C. PEDONE

CO-TUTORE

DR. L.D. D'ANDREA

Relatore

PROF. L. MAZZARELLA

Coordinatore

PROF. A. VITAGLIANO

Candidata

SARA AURIEMMA

INDICE

ABBREVIAZIONI

1	INTRODUZIONE	1
1.1	MECCANISMO DELL' ANGIOGENESI	1
1.2	VEGF	7
1.2.1	VEGF E LE PROTEINE DELLA FAMIGLIA DEL VEGF	7
1.2.2	VEGF E LA SUA STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA	10
1.2.3	VEGF ED I SUOI INIBITORI	13
1.3	OBIETTIVI	15
1.4	RISULTATI E DISCUSSIONI	16
1.4.1	PROGETTAZIONE DELLE SEQUENZE PEPTIDICHE	16
1.4.2	SINTESI DEI PEPTIDI PROGETTATI	23
1.4.3	STUDIO CONFORMAZIONALE MEDIANTE DICROISMO CIRCOLARE DEI PEPTIDI PROGETTATI	26
1.4.4	STUDIO CONFORMAZIONALE MEDIANTE NMR DEI PEPTIDI PROGETTATI	29
1.4.5	STUDI BIOLOGICI DEI PEPTIDI PROGETTATI	35
1.5	CONCLUSIONI	42
1.6	PARTE SPERIMENTALE	44
1.6.1	COSTRUZIONE DEL MODELLO	44
1.6.2	STRATEGIE DI SINTESI E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE	45
1.6.3	DICROISMO CIRCOLARE APPARECCHIATURE E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE.	47
1.6.4	NMR: CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE	48
1.6.5	TEST BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI	49
2	NUOVI POTENTI PEPTIDI CICLICI CON ATTIVITA' ANTITUMORALE	52
2.1	GLI AGENTI INTERCALANTI	52
2.2	GLI AGENTI INTERCALANTI DI ORIGINE NATURALE	54
2.3	LA TIOCORALLINA	55
2.3.1	ATTIVITA' ANTITUMORALE DELLA TIOCORALLINA	56
2.3.2	LA TIOCORALLINA COME FARMACO	58
2.4	LA METILAZIONE DEGLI AMMINOACIDI: IMPORTANZA DELLE CISTEINE METILATE	62

2.5	OBIETTIVI	63
2.6	RISULTATI E DISCUSSIONE	65
2.6.1	SINTESI DELLE CISTEINE METILATE	65
2.6.2	PROGETTAZIONE DELL'ANALOGO DELLA AZATIO- CORALLINA N-METILATA.	70
2.6.3	SCELTA DEL SUPPORTO SOLIDO	73
2.6.4	COUPLING DEL PRIMO AMMINOACIDO	74
2.6.5	COUPLING DEL SECONDO AMMINOACIDO: FORMA- ZIONE DEL DIPEPTIDE	75
2.6.6	COUPLING DELL'ETEROCICLO AL DIPEPTIDE	77
2.6.7	REAZIONE DI METILAZIONE	80
2.6.8	COUPLING DEL TERZO AMMINOACIDO: FORMAZIONE DEL TRIPEPTIDE	84
2.6.9	COUPLING DEL QUARTO AMMINOACIDO: FORMAZIONE DEL TETRAPEPTIDE	87
2.6.10	FORMAZIONE DEL PONTE DISOLFURO E DISTACCO DALLA RESINA	89
2.6.11	CICLIZZAZIONE IN SOLUZIONE	95
2.6.12	SAGGI BIOLOGICI	99
2.7	CONCLUSIONI	100
2.8	PARTE SPERIMENTALE	102
2.8.1	MATERIALI	102
2.8.2	STRATEGIE DI SINTESI: CONDIZIONI SPERIMENTALI	103
2.8.3	UV ED NMR: CONDIZIONI SPERIMENTALI	105
2.8.4	PREPARAZIONE DELLE CISTEINE N -METILATE	106
2.8.5	PREPARAZIONE DELL'ANALOGO DELL'AZA- TIOCORALLINA N-METILATA.	109
2.8.6	SAGGI BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI	115
3	BIBLIOGRAFIA	116
4	SUMMARY	123

ABBREVIAZIONI

2-NBSCl	2-Nitrobenzensolfonilcloruro
2-QXA	Acido 2-chinossalin carbossilico
AcmOH	Acetoamidometanolo
ACN	Acetonitrile
Alloc	Allilossicarbonile
Ang-1 e 2	Angiostatina-1 e 2
BBP-LED	<i>Longitudinal Eddy Current Delay</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
Boc	Butossicarbonile
BSA	Albumina da siero bovino
CD	Dicroismo Circolare
cDNA	DNA (Acido deossiribonucleico) complementare
CTC	Resina clorotritile cloruro
Cys	Cisteina
Dap	Diamminopropionico
DBU	1,8-diazabicycloundecene
DCM	Diclorometano
DIAD	Diisopropilazadicarbossilato
DIPEA/DIEA	Diisopropiletilenammina
DMF	N, N-Dimetilformammide
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
DPFGSE	<i>Double Pulsed Field Gradient Spin Echo</i>
DTNB	5,5'-Ditiobis-(2 acido nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitolo
EC	Cellule Endoteliali
ECM	Matrice Extracellulare
EDT	Etanditiolo
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization - Mass Spectrometry</i>
EtOAc	Acetato d'etile
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FAK kinase	<i>Focal Adhesion kinase</i>
FBS	<i>Precolostral Bovine Serum</i>
FITC	Fluoresceina Isotiocianato
Flt-1	<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
Gly	Glicina
HAOt	1-idrossi-7-azabenzotriazolo(3-idrossi-3H-1,2,3-triazolo-[4,5 b]piridina
HATU	2-(1H-9-Azobenzotriazolo-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HBTU	2-(1H-Benzotriazolo-1-ile)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HEPES	N-(2-idrossietil) piperazina-N'-(Acido 2-etanolsulfonico)
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HOBt	N-Idrossibenzotriazolo
HPLC	<i>High performance liquid chromatography.</i>

HUVEC	Cellule Endoteliali Umane da Vena Ombelicale
INF- α	<i>interferon-α</i>
KDR	<i>Kinase domain receptor</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight</i>
MAP kinase	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Me	Metile
MeOH	Metanolo
MMP	Metallo proteinasi
MSNT	1-(mesitilene-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazolo
Mtt	Metiltritile
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NRP-1	<i>Neurophilin 1</i>
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil diidrobenzofuran-5 sulfonyl
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PhSiH ₃	Fenilsilano
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
<i>p</i> -Nz	<i>p</i> -nitrobenzilossicarbonil
PPh ₃	Trifenilfosfina
PyBop	Esaffluorofosfato di (benzotriazolil)-N-Ossitripirrolidiniofosfonio
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
St-Bu	tio-tButile
TBME	Terbutossimetilere
TBTU	2-(1H-Benzotriazolo-1-ile)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato
<i>t</i> Bu	t-Butile
TFA	Acido trifluoroacetico
TFMSA	Acido trifluorometansolfonico
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor β</i>
THF	Tetraidrofurano
TIE-2	<i>tyrosine-kinase with immonoglobulin-like loop</i>
TIS	triisopropilsilano
Trt	Tritile
TSP-1	<i>Thrombospondin-1</i>
UV-Vis	Spettroscopia UltraVioletta-Visibile
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Le abbreviazioni usate per la progettazione dei peptide seguono le regole IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature in *J.Biol. Chem.* **1982**, 247, 977-983.

1.INTRODUZIONE

1.1 MECCANISMO DELL'ANGIOGENESI

Il normale funzionamento dei tessuti dipende da un adeguato supporto di ossigeno che è trasportato ai diversi organi grazie alla rete di vasi sanguigni.

Il processo fisiologico che consente la formazione di nuovi vasi sanguigni e che si realizza attraverso un *input* iniziale di una cascata di eventi sequenziali è chiamato angiogenesi.

La crescita di nuovi vasi sanguigni si articola in due fasi: la vasculogenesi e l'angiogenesi propriamente detta. Durante la vasculogenesi i nuovi vasi sanguigni si formano nel corso dello sviluppo embrionale attraverso la differenziazione *in situ* di cellule precursori (angioblasti) che danno origine alle cellule endoteliali (EC) che a loro volta si assemblano in una nuova rete vascolare¹. Storicamente il termine angiogenesi fu usato per descrivere la crescita di nuovi vasi sanguigni da quelli già preesistenti; attualmente il termine angiogenesi viene generalmente riutilizzato per denotare il processo di crescita e rimodellamento di una rete primitiva in una rete più complessa. Questo comporta l'allargamento di venule che si diffondono o sono divise da colonne di cellule perendoteliali o da ponti di cellule transendoteliali, che a loro volta si dividono in capillari individuali. Una volta che le cellule (arteriogenesi) sono state reclutate, esse 'muscolarizzano' la nascente vascolatura per diffusione o per migrazione lungo i preesistenti vasi sanguigni, usando questi come linee guida (Fig.1).

Mentre negli organismi adulti il sistema vascolare è normalmente in uno stato quiescente, con solo lo 0.01% di EC che vanno incontro a mitosi, negli adulti la produzione di nuovi vasi si verifica unicamente durante alcuni processi fisiologici, come la cicatrizzazione delle ferite, l'ovulazione, la gravidanza e il ciclo mestruale².

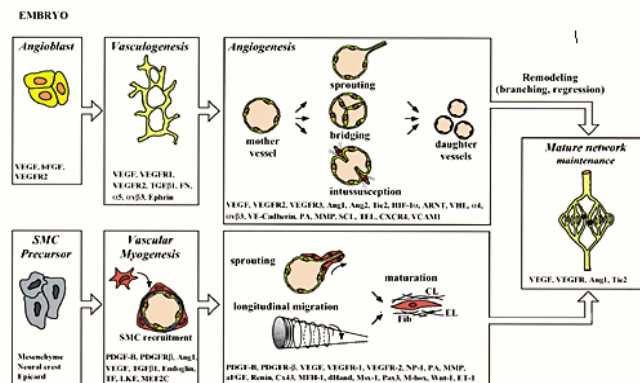


Fig. 1 Schema illustrativo del meccanismo dell'angiogenesi e dell'arteriogenesi. I precursori endoteliali (angioblasti) si assemblano in una rete primitiva (vasculogenesi) che poi si espande e si rimodella (angiogenesi) Rif.1.

Per quanto le cellule endoteliali siano in grado di iniziare il processo angiogenico, esse non possono completarlo da sole e dunque sono necessarie le cellule periendotheliali per la maturazione della rete vascolare. Durante la miogenesi vascolare le cellule murali stabilizzano il nascente vaso sanguigno inibendo la proliferazione e la migrazione endoteliale e stimolando la produzione della matrice extracellulare (Fig.1). Esse quindi provvedono al controllo emostatico e proteggono i nuovi vasi sanguigni dalla regressione e dalla rottura. Durante la successiva fase di arteriogenesi, i vasi sanguigni sono coperti da un rivestimento muscolare in grado di conferire loro proprietà viscoelastiche e vasomotrici necessarie per consentire i bisogni di cambiamento nella perfusione tissutale. L'arteriogenesi avviene anche durante l'allargamento patologico di vasi collaterali preesistenti.

Il processo angiogenico è altamente e finemente controllato, ed è governato dal bilanciamento di fattori pro- ed anti-angiogenici che sono in grado di attivare la proliferazione e la migrazione delle EC, come ad esempio i fattori di crescita (VEGF, PlGF, bFGF, etc.) e le molecole di adesione cellulare (integrine, selectine, caderine, etc.) o di sopprimerla come le molecole della matrice extracellulare derivanti da plasminogeno e collagene (angiostatina, endostatina, etc.) (vedi Tab.1).

TABELLA 1. Attivatori ed inibitori dell'angiogenesi			
Attivatori	Funzione	Inibitori	Funzione
VEGF e omologhi	Stimola l' angio/vasculogenesi, la permeabilità, adesione delle cellule leucocitarie	VEGFR-1, solubile VEGFR-1; solubile NRP-1	Blocco di VEGF, VEGF-B, PlGF
VEGFR, NRP-1	Integra i segnali di angiogenesi e sopravvivenza.	Ang2*	Antagonizza Ang1
Ang1 and Tie2°	Stabilizza i vasi sanguigni, inibisce la permeabilità	TSP-1,-2	Inibisce la migrazione endoteliale, la crescita, l'adesione e la sopravvivenza.
PDGF-BB e recettori	Richiama cellule muscolari lisce.	Angiostatina e related plasminogen kringles	Sopprime l'angiogenesi tumorale
TGF-β1*, endoglina, recettori TGF-β.	Stimola la produzione della matrice extracellulare	Endostatina	Inibisce la migrazione e la sopravvivenza endoteliale.
FGF, HGF, MCP-1	Stimola angiogenesi, arteriogenesi.	Vasostatina, careticulina	Inibisce la migrazione endoteliale.
Integrine α _v β ₃ , α _v β ₅ , α ₅ β ₁	Recettori per le macromolecole delle matrici e proteinasi .	Fattore di aggregazione 4	Inibisce il legame di bFGF and VEGF.
VE-caderina; PECAM (CD31)	Molecole di giunzione endoteliale	TIMPs; inibitori di MMP.	Sopprime l'angiogenesi patologica
Efrine	Regola la specificazione delle arterie, vene.	Meth-1; Meth-2	Inibitori contenenti MMP, TSP e domini delle disintegrine.
Attivatori del plesminogeno, MMPs	Rimodella la matrice, rilascia ed attiva i fattori di crescita.	INF-α, -β, -γ; IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Inibisce la migrazione endoteliale, sottoregola il bFGF.
PAI-1	Stabilizza il nascente vaso sanguigno.	Protrombina, kringle-2; frammento dell' antitrombina III	Sopprime la crescita endoteliale .
NOS; COX-2	Stimola l'angiogenesi e la vasodilatazione	Prolattina (M _r 16K)	Inibisce bFGF/VEGF
AC 133	Regola la differenziazione angioblastica .	VEGI	Modula la crescita cellulare.
Chemochine*	Ruolo pleiotropico nell'angiogenesi.	Frammento di SPARC	Inibisce il legame endoteliale e l'attività del VEGF.
Id1/Id3	Determina la plasticità endoteliale.	Frammento dell'osteopontina.	Interferisce con il segnale dell'integrina.
		Maspina	Inibitori delle proteasi
		Canstatina proteina relazionata alla proliferino.	Meccanismo sconosciuto

*Effetto opposto in alcuni contesti.
° Anche presente in cellule non endoteliali..

In risposta ad appropriati stimoli si può verificare, tuttavia, quello che viene definito “*angiogenic switch*”, condizione nella quale il bilancio di suddetti fattori viene meno e l'angiogenesi, non più soggetta a regolazione fine, diventa patologica. Tale condizione è stata riscontrata in numerose e differenti patologie quali artrite reumatoide, cecità, psoriasi, obesità, malattie infiammatorie croniche del polmone, aterosclerosi, alcune

malattie infettive ed in particolare nella crescita tumorale e nella progressione metastatica³ (Fig.2).

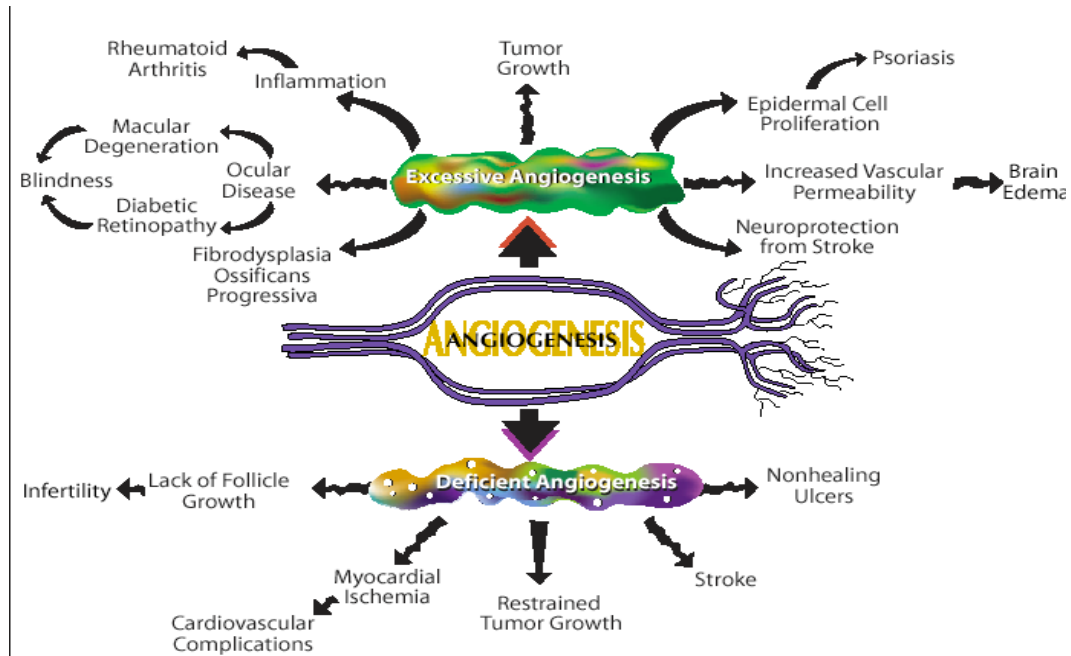


Fig. 2 Schema illustrativo delle possibili situazioni possibili in caso di angiogenesi patologica o eccessiva.

A causare lo *switch angiogenico* ci sono diversi fattori tra cui stress metabolico (bassa pressione di ossigeno, basso pH, ipoglicemia), meccanico, (pressione generata dalla proliferazione cellulare) risposta immuno/infiammatoria (ad esempio cellule immuno/infiammatorie che hanno invaso i tessuti), e mutazioni geniche (ad esempio, attivazione di oncogeni o delezione di geni soppressori tumorali che controllano la produzione dei regolatori di angiogenesi).^{4,5}

La crescita del tessuto neoplastico, così come tutti i tessuti normali richiede un adeguato supporto di ossigeno, metaboliti ed un sistema di eliminazione dei prodotti di scarto⁶. Queste richieste in ogni caso variano in base ai diversi tipi di tumore e cambiano in funzione della progressione tumorale⁷. Inoltre lo *switch angiogenico* può avvenire a differenti stadi del processo tumorale in funzione del tipo di tumore e dell'ambiente. È stato inoltre dimostrato che le lesioni dormienti e le lesioni premaligne inducono precocemente i fenomeni di angiogenesi che consentono loro di progredire^{8,9}.

Durante la normale angiogenesi, i nuovi vasi sanguigni rapidamente maturano e diventano stabili, in opposizione ai vasi sanguigni tumorali, che hanno perso l'appropriato

bilanciamento tra il controllo positivo e negativo dei fattori di crescita, presentano un'architettura completamente differente: essi sono infatti dilatati, tortuosi e presentano una forma irregolare. Non sono organizzati in venule definitive, arteriole e capillari come le loro normali controparti, ma piuttosto condividono caratteristiche caotiche.

La rete vascolare che si forma nei tumori è spesso debole e presenta emorragie, in parte dovuto alla sovrapproduzione del VEGF. Le cellule perivascolari che sono generalmente in stretto contatto con l'endotelio, spesso diventano più difficilmente associate o meno abbondanti^{10,11}. E' stato anche riportato che i vasi sanguigni tumorali hanno cellule cancerogene integrate nella parete vascolare^{12,13} e che alcuni tumori dipendono essenzialmente dalla vasculogenesi, attraverso il reclutamento di cellule endoteliali premature dal midollo osseo.

Il processo angiogenico è dunque molto complesso e dipende dall'interazione tra differenti tipi di sistemi molecolari. Basandosi sul successo di esperimenti preclinici, diversi agenti anti-angiogenici soli⁸ o in combinazione con le terapie convenzionali sono ora in fase di studio clinico. Questi agenti anti-angiogenici presentano diversi meccanismi di azione: (1) interferiscono con i ligandi angiogenici, con i loro recettori o con i segnali a valle; (2) sovraregolano o trasportano inibitori endogeni; (3) bersagliano direttamente la vascolatura tumorale.

Le terapie anti-angiogeniche sono considerate la quarta modalità per il trattamento delle patologie tumorali con il vantaggio che il bersaglio è rappresentato dalle cellule endoteliali microvascolari attivate presenti in un tumore quiescente piuttosto che il tumore stesso. Ad esempio farmaci come l'endostatina¹⁴ e la caplostatina^{15,16} agiscono direttamente sulle cellule endoteliali impedendo che queste rispondano alle proteine angiogeniche.

Le terapie anti-angiogeniche possono anche inibire la proliferazione e la motilità delle cellule endoteliali indirettamente o mediante la soppressione della produzione tumorale di proteine angiogeniche, come succede con il farmaco erlotinib¹⁷, oppure neutralizzando una di queste proteine come accade con il farmaco bevacizumab¹⁸.

Se la chemioterapia agisce più efficacemente su tumori che crescono rapidamente piuttosto che su quelli che agiscono lentamente, con la terapia anti-angiogenica si verifica il contrario. Inoltre con le terapie anti-angiogeniche è possibile eliminare o quantomeno ridurre gli effetti collaterali (i più comuni tra questi sono perdita di capelli, diarrea, vomito e debolezza) che invece sarebbero presenti con un trattamento chemioterapeutico.

Un esempio di terapia che vede la combinazione di tecniche tradizionali con un farmaco antiangiogenico è quella che viene definita come la chemioterapia antiangiogenica¹⁹ o chemioterapia metronomica.^{20,21} Essa prevede un protocollo con somministrazione più frequenti e bassi dosaggi, senza lunghe interruzioni nella terapia e con poca o scarsa tossicità. Un esempio di farmaco utilizzato in questa terapia è il bevacizumab¹⁸.

Lo sviluppo di nuove molecole capaci di modulare l'angiogenesi è attualmente uno dei campi di maggiore interesse medico/farmacologico.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di tesi avente come obiettivo la progettazione, lo sviluppo e la caratterizzazione di nuove molecole di natura peptidica e peptidomimetica in grado di modulare, positivamente o negativamente, l'attività di sistemi molecolari coinvolti nella cascata angiogenica.

A tale scopo è stato scelto di sviluppare molecole capaci di modulare l'attività del attore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) in quanto tale proteina è il maggiore regolatore dell'angiogenesi.

1.2 VEGF

Per oltre una decade il ruolo del VEGF (anche chiamato VPF o fattore di permeabilità vascolare) nella regolazione dell'angiogenesi è stato oggetto di intensa investigazione.

In seguito alla sua identificazione ed al suo isolamento dalle cellule follicolari pituitarie di bovino è stato riconosciuto come il maggiore fattore di crescita che è specifico per le cellule endoteliali ed è importante nella loro fisiologia.^{23,24}

1.2.1 VEGF E LE PROTEINE DELLA FAMIGLIA DEL VEGF

Strutturalmente, il VEGF appartiene alla famiglia del VEGF/PDGF (platelet derived growth factor). Esistono diversi analoghi strutturali del VEGF (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF) e 5 diverse specie molecolari derivanti da uno *splicing* alternativo dell' mRNA del gene codificante il VEGF, rispettivamente di 121, 145, 165, 189 e 206 amminoacidi.^{25,26}

Il VEGF₁₆₅ è l'isoforma predominante ed è secreta come un omodimero di 46 kDa che ha un carattere basico ed una moderata affinità per l'eparina, grazie alla presenza di 15 amminoacidi basici entro i 44 residui decifrati dall'esone 7.^{23,24,27}

In contrasto VEGF₁₂₁ che manca dei residui codificati dagli esoni 6 e 7, non lega l'eparina ed è rilasciato liberamente dalla cellula. VEGF₁₈₉, che contiene una sequenza addizionale codificata dall'esone 6, lega fortemente l'eparina ed è completamente sequestrato nella matrice extracellulare (ECM) ed in minore proporzione dalla superficie cellulare.

L'isoforma che lega la matrice extracellulare può essere rilasciata lentamente per esposizione all'eparina o all'eparinase o più rapidamente sottoforma di frammenti bioattivi mediante rottura per mezzo della plasmina o dell'urochinasi terminale.²⁸

Anche l'isoforma VEGF₂₀₆ è altamente basica e capace di legare l'eparina con alta affinità²⁹ ed è completamente sequestrata dalla matrice extracellulare.

VEGF è prodotto nelle cellule endoteliali, nei macrofagi, nelle celle T-attivate e in una varietà di altri tipi di cellule.³⁰⁻³²

La funzione biologica del VEGF è mediata dall'interazione con due recettori appartenenti alla famiglia delle tirosin chinasi, il *Kinase domain receptor* (KDR) e *Fms-like tyrosine kinase* (Flt-1)³³ (Fig. 3).

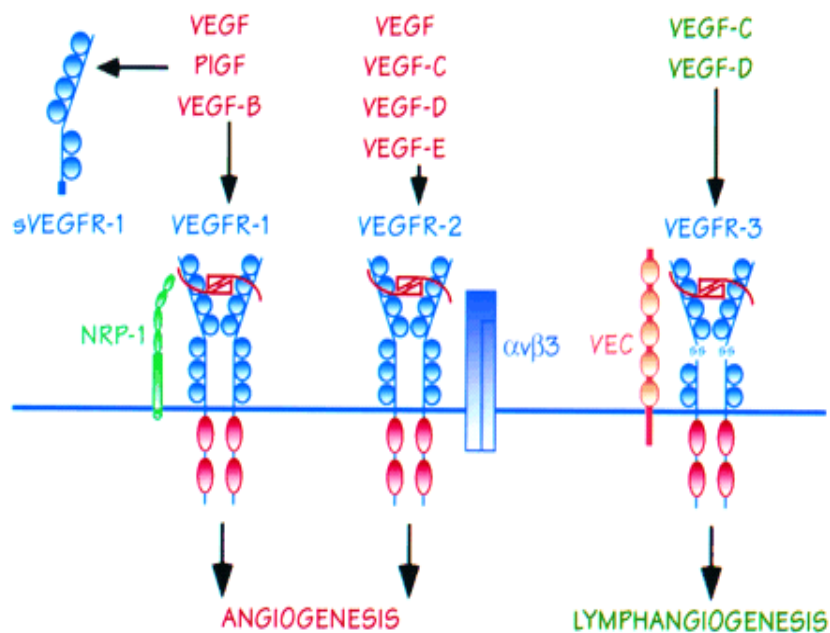


Fig.3. Rappresentazione delle interazioni del VEGF e dei suoi analoghi con alcuni recettori espressi dalle EC.³⁴

Tali recettori sono localizzati sulla superficie di diversi tipi di EC³⁵ e sono entrambi costituiti da sette domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare, da una singola regione transmembrana e da un dominio chinasi intracellulare.

Il VEGF interagisce con i recettori KDR e Flt-1 inducendone la dimerizzazione come diretta conseguenza della simmetria stessa della molecola del VEGF, la quale presenta siti identici di legame localizzati ai poli del dimero.

L'attivazione dei recettori comporta la fosforilazione della loro porzione citoplasmatica in corrispondenza di residui di Tyr necessari a controllare l'attività chinasi dei recettori stessi e a creare siti di *docking* per specifiche molecole citoplasmatiche che fungono da substrati per le chinasi, come ad esempio le MAPK. La cascata di segnali intracellulari che viene in questo modo generata si traduce in un segnale di proliferazione delle EC, la cui conoscenza dettagliata è tuttavia ancora incompleta e oggetto di intense ricerche. Molti studi indicano per Flt-1 e KDR differenti proprietà e modi di trasdurre il segnale ed è stato dimostrato che il VEGF presenta un'affinità per Flt-1 dieci volte superiore rispetto a KDR, anche se l'interazione con quest'ultimo genera un segnale a valle più forte.³⁶⁻³⁸

Diversi meccanismi sembrano partecipare alla regolazione dell'espressione genica del VEGF, come la concentrazione di ossigeno,³⁹ la presenza di citochine⁴⁰ e la

differenziazione cellulare⁴¹. Tra questi la pressione di ossigeno gioca di sicuro un ruolo principale, come dimostrato da studi sia *in vitro* che *in vivo*. L'espressione dell'mRNA codificante per il VEGF è, infatti, indotta in maniera rapida e reversibile dall'esposizione a bassa pressione di ossigeno in diversi tipi di cellule sia sane che tumorali.³⁸ In qualunque modo sia stato indotto, è stato dimostrato che con l'aumento del livello di concentrazione del VEGF si verifica in combinazione anche una sovraespressione dei recettori Flt-1 e KDR delle EC.⁴²

1.2.2 VEGF E LA SUA STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA

In letteratura sono riportate diverse strutture del VEGF sia allo stato libero^{43,44} sia complessato con un anticorpo⁴⁵, con un inibitore peptidico⁴⁶ e con il dominio 2 del recettore Flt-1⁴⁷.

La struttura cristallografica del frammento 8-109 del VEGF, che lega i recettori con affinità paragonabile al *wild-type*, dimostra che il VEGF è un omodimero antiparallelo legato covalentemente da due ponti disolfuro. Esso è caratterizzato da un motivo *cystine knot* che consiste di un anello di otto residui formato da due ponti disolfuro (Cys⁵⁷-Cys¹⁰² e Cys⁶¹-Cys¹⁰⁴) tra due β -strands adiacenti e di un terzo ponte disolfuro (Cys²⁶-Cys⁶⁸) penetrante questo anello (Fig. 4).⁴⁴

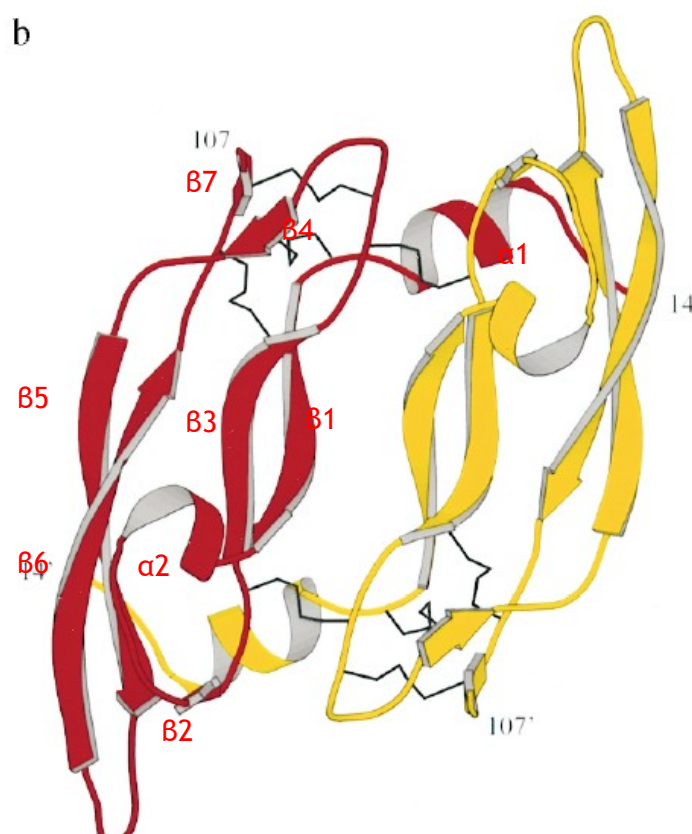


Fig. 4. Struttura ribbon del VEGF. Sono evidenziati i due monomeri⁴⁴

Nella struttura del VEGF sono presenti un totale di 7 segmenti β -strands ($\beta 1$ - $\beta 7$) e due segmenti ad α -elica ($\alpha 1$ e $\alpha 2$). Il core idrofobico situato al centro di ogni monomero è

costituito dai quattro *stranded β -sheets* antiparalleli e si presenta irregolare a causa della mancanza del caratteristico *pattern* di legami idrogeno al centro degli *sheets*. Una seconda regione idrofobica è situata all'interfaccia tra i due monomeri e comprende i residui nel *loop* che unisce $\beta 1$ a $\beta 3$ e il segmento che unisce $\beta 5$ a $\beta 6$ di un monomero, e l' α -elica N-terminale dell'altro monomero.

Ogni monomero del VEGF contiene tre *loop* esposti al solvente che connettono gli *strand* $\beta 1$ a $\beta 3$, $\beta 3$ a $\beta 4$, e $\beta 5$ a $\beta 6$. Il segmento che connette $\beta 1$ a $\beta 3$ (residui 35-50) contiene un singolo *turn* di un α -elica ($\alpha 2$) seguito da residui in una conformazione irregolare e un piccolo β -*strand*. Questo β -*strand* insieme agli *strand* $\beta 5$ e $\beta 6$, forma un piccolo foglietto β alla fine del monomero dalla parte opposta rispetto al *cystine knot*, ed è stato dimostrato far parte del sito di *binding* al recettore.⁴³

Studi di delezione hanno permesso di identificare il secondo dominio extracellulare di Flt-1 (Flt-1_{D2}) come il maggior responsabile del riconoscimento specifico del VEGF.⁴⁸ Flt-1_{D2}, infatti, lega il VEGF con un'affinità solo 60 volte inferiore rispetto alla proteina *wild-type*, mentre la sua delezione abolisce completamente il legame con il VEGF.

Flt-1_{D2} è un membro della famiglia delle immunoglobuline e consiste di un *sandwich* di due foglietti β , formati rispettivamente da 3 e 5 *strand*. Gli *strand* del primo foglietto sono piuttosto corti e consistono di 3 o 4 residui, mentre gli *strand* del secondo foglietto β sono più grandi e formati da 9 e 11 residui.⁴⁷

L'inusuale caratteristica di Flt-1_{D2} rispetto ad un dominio immunoglobulinico standard è la formazione di un *bulge* all'N-terminale nella regione 137-143. Poiché molti dei residui in contatto con il VEGF si trovano in questa regione, si ipotizza che la presenza del *bulge* potesse essere una conseguenza della formazione del complesso. La risoluzione della struttura di Flt-1_{D2} non complessato mediante NMR ha invece dimostrato essere una caratteristica intrinseca del recettore.

Per quanto riguarda la struttura del VEGF₈₋₁₀₉ nel complesso con Flt-1_{D2}, i dati conformazionali indicano che essa resta sostanzialmente identica alla struttura del VEGF₈₋₁₀₉ non complessato.

L'analisi dell'interfaccia VEGF-Flt-1_{D2} rivela che il recettore è in contatto con entrambe le subunità del ligando. La superficie di contatto è divisa in circa 65% e 35% tra le due subunità del VEGF. Il segmento del VEGF₈₋₁₀₉ in contatto con Flt-1_{D2} include i residui dell'elica N-terminale (17-25), il *loop* che connette $\beta 3$ e $\beta 4$ (61-66) e lo *strand* $\beta 7$ (103-106) di un monomero, così come i residui dello *strand* $\beta 2$ (46-48) e degli *strand* $\beta 5$ e $\beta 6$

(79-91) dell'altro monomero. Se si esclude l'interazione fra Arg²²⁴ di Flt-1_{D2} e Asp⁶³ del VEGF, tutti i contatti sono di tipo idrofobico (Fig. 5).

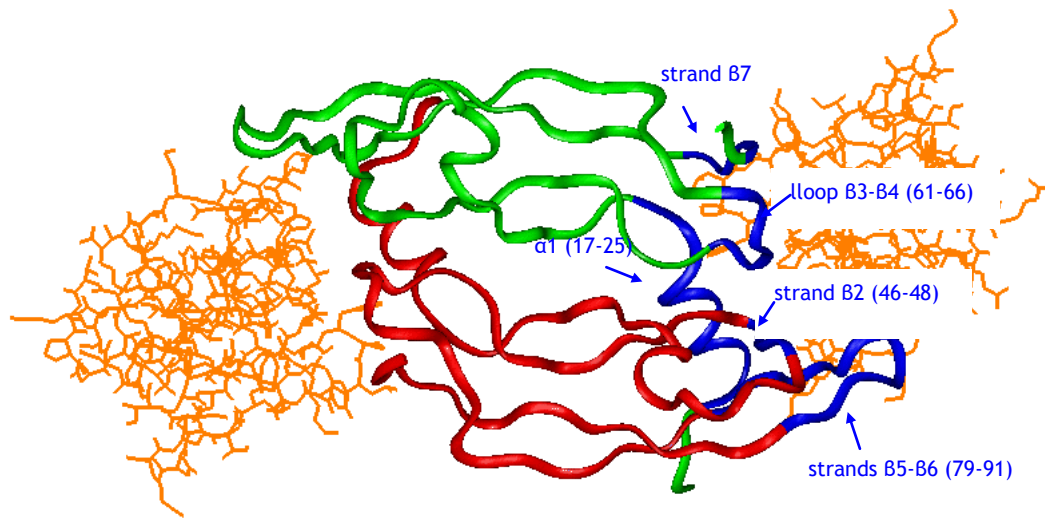


Fig. 5. Dominio 2 di Flt-1 complessato con VEGF₈₋₁₀₉.

Il confronto dei dati strutturali con i risultati degli studi di mutagenesi, che hanno permesso di identificare i residui coinvolti nel *binding* al recettore KDR,⁴³ mette chiaramente in evidenza che i siti di *binding* presenti sui due recettori devono essere molto simili in quanto ben 5 dei 7 residui fondamentali per il legame al KDR fanno parte anche della regione di *binding* a Flt-1_{D2}.

1.2.3 VEGF ED I SUOI INIBITORI

Sono attualmente noti numerosi inibitori dell'attività biologica del VEGF che possono avere come bersaglio sia il VEGF stesso che i suoi recettori. Tali inibitori appartengono a differenti classi di biomolecole, come anticorpi, peptidi e piccole molecole organiche.

Tra gli anticorpi sviluppati alcuni sono in fase avanzata di sperimentazione, come un anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF⁴⁹ e un anticorpo anti-KDR.⁵⁰ Del primo è stata risolta la struttura tridimensionale del complesso fra il frammento Fab e il VEGF che ha messo in evidenza come la struttura del VEGF nel complesso non presenti sostanziali variazioni conformazionali rispetto a quella libera. In tal caso però, a differenza della regione di *binding* del VEGF al recettore Flt-1_{D2}, quella responsabile dell'interazione con il frammento Fab coinvolge un solo monomero del VEGF. In letteratura è, inoltre, riportato un anticorpo contro il complesso VEGF-KDR che è in grado di riconoscere il VEGF complessato e, quindi, si presenta come ottimo candidato per l'utilizzo nel *targeting* del tessuto vascolare tumorale⁴⁸.

Oltre gli anticorpi, altra classe di inibitori è rappresentata dai peptidi in grado di interagire con il VEGF e da quelli capaci di competere con esso nell'interazione con i suoi recettori. Tra questi sono note tre classi di peptidi ottenute dallo *screening*, mediante *phage display*, di librerie di piccoli peptidi eterodetici.⁵¹ I migliori composti presentano una costante di *binding* per i recettori del VEGF dell'ordine micromolare e per uno di questi è stata anche risolta la struttura in complesso con il recettore.^{52,53} In un altro studio è riportata l'inibizione dell'angiogenesi, mediata dal VEGF, e del *binding* a KDR da parte di alcuni piccoli peptidi isolati mediante *phage display libraries*. Dallo *screening*, effettuato contro KDR o contro un anticorpo anti-VEGF è risultato particolarmente attivo il peptide di sequenza ATWLPPR anche se con una costante di *binding* per KDR circa 80 μM .⁵⁴

Sempre mediante *phage display libraries*, sono stati identificati due nuovi peptidi, K237-(HTMYHHYQHHL)⁵⁵ e F56 (WHSDMEWWYLLG).⁵⁶ Il peptide K237 è in grado di legare il recettore KRD con alta affinità e specificità interferendo con l'interazione VEGF-KDR. Test di proliferazione indicano che la proliferazione cellulare è ridotta del 90% quando il peptide K237 è presente in concentrazione 300 μM . Il peptide F56, invece, blocca l'interazione del VEGF con Flt-1 inibendo la formazione di nuovi vasi sanguigni già ad una concentrazione di 0.1 $\mu\text{l/ml}$.

Sono note anche diverse molecole di natura organica capaci di inibire entrambi i

recettori.⁵⁷Tra questi il composto ZD4190, una 4-anilinochinazolina sostituita (Fig. 6), è un potente inibitore dell'attività di KDR ed Flt-1.⁵⁸ Test di *binding* indicano che esso è in grado di inibire la proliferazione delle EC indotta dal VEGF con valori di IC₅₀ rispettivamente di 29nM per KDR e 708nM per Flt-1. Il composto PTK787/ZK 222584⁵⁹(1-[4-cloroanilino]-4-[4-piridilmetil] ftalazinsuccinato) (Fig.7) inibisce la fosforilazione di KDR e Flt-1 con valori di IC₅₀ nel range nanomolare (rispettivamente 37 nM e 77 nM).

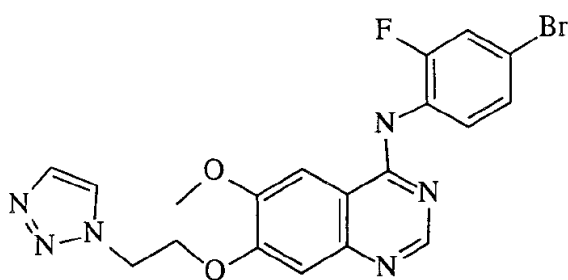


Fig. 6 Struttura chimica del composto ZD4190⁵⁸

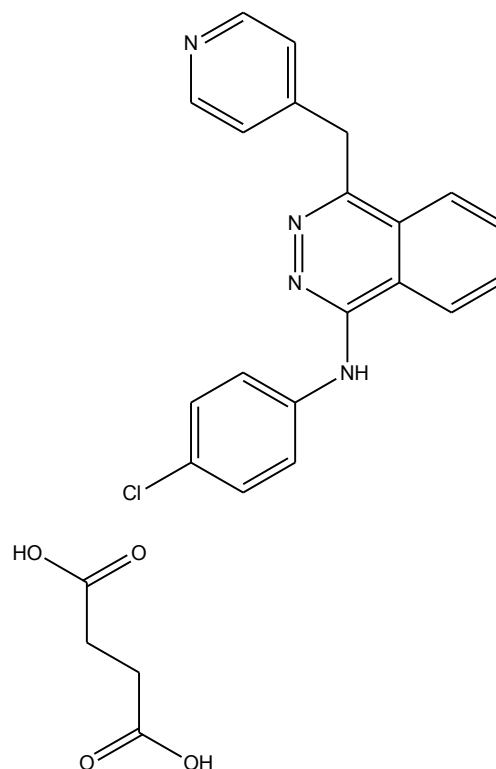


Fig. 7 Struttura chimica del composto PTK787/ZK 222584⁵⁹

1.3 OBIETTIVI

Una lunga lista di patologie legate all'eccessiva angiogenesi sono uno dei motivi fondamentali per cui oggi investigare nell'ambito di tale campo può rappresentare una sfida interessante. I tumori rappresentano attualmente, dopo gli infarti cardiaci, la seconda causa di mortalità nei paesi industrializzati e un milione di nuovi casi si verificano ogni anno. I metodi di terapia dei tumori solidi nell'adulto vanno dalla chirurgia e radioterapia per il trattamento dei tumori primari localizzati, alla chemioterapia, immunoterapia e ormonoterapia per il trattamento delle forme metastatiche. In particolare, la chemioterapia, che prevede l'utilizzo di farmaci citotossici, ha rappresentato per molti anni la principale metodologia terapeutica nelle neoplasie in fase avanzata; tuttavia, è stato dimostrato che l'efficacia della chemioterapia è solo parziale e transitoria a causa, principalmente, della instabilità delle cellule tumorali, della loro eterogeneità, del loro elevato indice mutazionale e della resistenza farmacologica acquisita. Ciò ha portato negli ultimi dieci anni alla ricerca e allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche antitumorali, legate alla definizione di nuove forme di immunoterapia, alla neutralizzazione di specifici fattori di crescita tumorale, alla terapia genica e all'inibizione dell'angiogenesi.

La soppressione infatti, anche di una sola delle fasi dell'angiogenesi inibisce la formazione dei nuovi vasi influenzando sullo sviluppo tumorale e la generazione di metastasi.

In tale contesto l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato lo sviluppo di nuove molecole di natura peptidica e peptidomimetica in grado di modulare l'angiogenesi VEGF-dipendente.

Come prima fase ci si è proposti lo studio delle interazioni del VEGF stesso con i suoi recettori. A questa è seguita la fase di progettazione di peptidi con i requisiti strutturali adatti all'interazione con i recettori. Tali molecole sono state progettate in modo da mimare strutturalmente e funzionalmente la regione di *binding* 17-25 del VEGF, la cui caratteristica conformazione elicoidale è stata stabilizzata introducendo appropriati *tool* molecolari. Le fasi successive hanno riguardato la sintesi e la purificazione dei peptidi disegnati, e la caratterizzazione strutturale in soluzione mediante Dicroismo Circolare e NMR. L'ultima fase del presente lavoro di tesi in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Salerno ha riguardato l'analisi dell'attività biologica dei peptidi sintetizzati.

1.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

1.4.1 PROGETTAZIONE DELLE SEQUENZE PEPTIDICHE

Il primo passo verso la progettazione di nuove molecole in grado di interferire con l'azione svolta da recettori bersaglio è lo studio delle interazioni tra il recettore in esame e i suoi ligandi naturali che costituisce la base del loro riconoscimento molecolare.

A tale scopo si è intrapreso lo studio delle interazioni del VEGF con i suoi recettori attraverso l'analisi del sistema VEGF/Flt-1.

La risoluzione della struttura tridimensionale del complesso VEGF/Flt-1_{D2} e studi di mutagenesi hanno permesso di individuare i residui importanti per il legame di VEGF ai recettori KDR e Flt-1.^{43,44,47} Questi studi hanno dimostrato che la regione di *binding* al recettore è situata all'estremità dell'unità dimerica (polo) e consiste di residui forniti da entrambe le subunità. In particolare, è possibile individuare su VEGF tre regioni che contengono i determinanti strutturali necessari per l'interazione con il recettore: l'elica $\alpha 1$ (residui 17-25), il *loop* $\beta 3$ - $\beta 4$ (61-66) e lo *strand* $\beta 7$ (103-106) del monomero 1, e il β -*hairpin* (79-91) del monomero 2.

Nel presente lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata su una di queste regioni, la sequenza elicoidale (17-25) rappresentata in Fig. 8, il cui modello è stato la base per la progettazione di antagonisti del VEGF di natura peptidica.

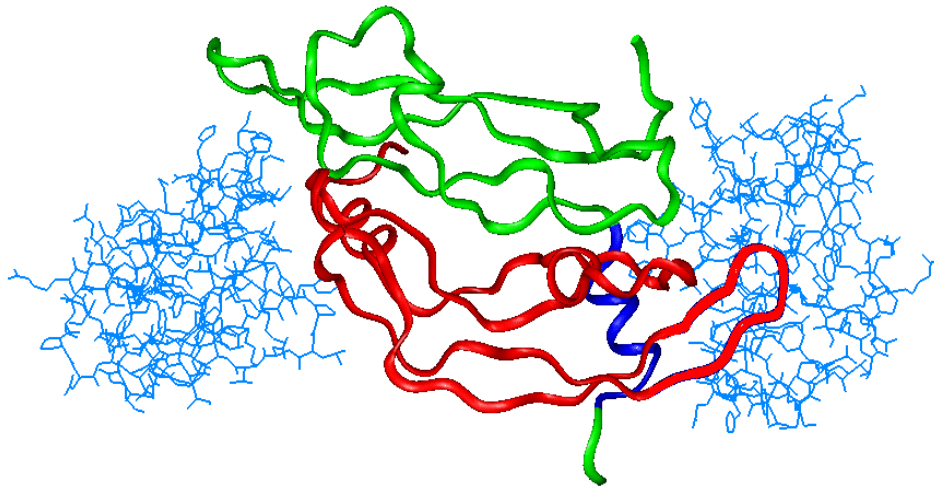


Fig. 8. Rappresentazione *ribbon* del complesso VEGF₈₋₁₀₉/Flt-1_{D2}. In blu è evidenziata una delle regioni di binding al recettore: l'elica b (17-25).

L'analisi del sistema ha indicato i residui Phe¹⁷, Met¹⁸, Tyr²¹, Gln²² e Tyr²⁵ come i diretti responsabili dell'interazione con Flt-1_{D2}. Questi 5 residui occupano una faccia dell'elica e sono situati ad una distanza minore di 4.5 Å dal recettore con il quale stabiliscono interazioni di tipo idrofobico (Fig. 9).

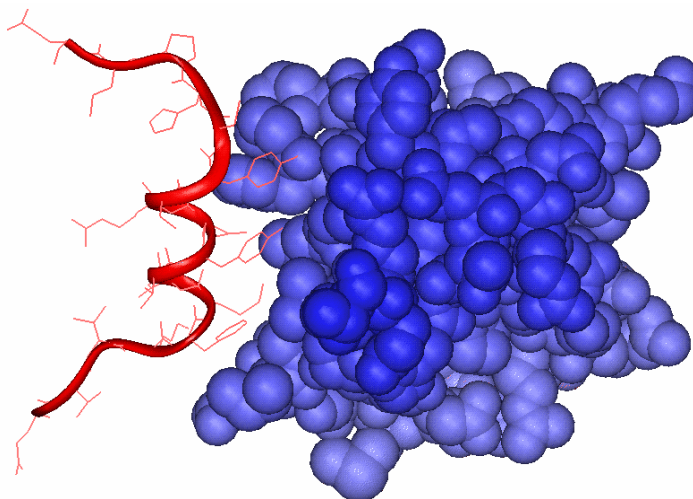


Fig. 9. Dettaglio dell'interazione fra la regione elicoidale 17-25 del VEGF (rosso) ed il dominio 2 del recettore Flt-1 (blu).

Studi di mutagenesi indicano che quando il residuo di Phe¹⁷ è sostituito con uno di Ala l'affinità del VEGF per il recettore KDR è ridotta di 90 volte, mentre le mutazioni degli altri amminoacidi influenzano solo lievemente il legame al recettore.⁴⁴

Per quanto riguarda i residui che si trovano sul lato opposto dell'elica, questi protendono verso l'interno della proteina e nel peptide isolato risulterebbero esposti al solvente.

La strategia di progettazione adottata ha previsto la conservazione dei residui fondamentali per l'interazione e l'inserimento di opportuni amminoacidi allo scopo di stabilizzare la conformazione elicoidale.

I requisiti alla base della stabilità di un' α -elica sono ampiamente descritti in letteratura,^{60,61} la loro conoscenza permette di progettare sequenze peptidiche capaci di adottare e/o stabilizzare questa conformazione. Tali requisiti sono di seguito riassunti in maniera schematica:

- intrinseca preferenza conformazionale dei residui amminoacidici;
- formazione di legami a idrogeno tra catene laterali e catena principale;
- interazioni catena laterale-catena laterale;
- legami a idrogeno, interazioni aromatiche e elettrostatiche tra residui separati da un *turn* di elica;
- interazioni elettrostatiche tra residui parzialmente carichi e le estremità N- e C terminale.

Inoltre, per stabilizzare ulteriormente un' α -elica, le estremità N- e C-terminali possono essere rispettivamente acetilate e ammidate in modo da eliminare le cariche su di esse presenti la cui interazione con il dipolo dell'elica costituirebbe un fattore destabilizzante. Inoltre, l'inserimento di sequenze amminoacidiche capaci di formare legami ad idrogeno con i gruppi amminici o carbonilici presenti alle due estremità (*N-capping* e *C-capping*) stabilizza ulteriormente la conformazione elicoidale.

Sulla base di queste conoscenze le sequenze dei peptidi progettati sono riportate in Fig. 10, insieme alla sequenza del frammento naturale 15-28 del VEGF (denominata VEGF15).

		15		20		25									
VEGF15	Ac-K	V	K	F	M	D	V	Y	Q	R	S	Y	C	H	P-NH ₂
FMK	Ac-K	L	T	F	M	E	L	Y	Q	L	K	Y	K	G	I-NH ₂
MA	Ac-K	L	T	W	M	E	L	Y	Q	L	A	Y	K	G	I-NH ₂
KA	Ac-K	L	T	W	K	E	L	Y	Q	L	A	Y	K	G	I-NH ₂
MK	Ac-K	L	T	W	M	E	L	Y	Q	L	K	Y	K	G	I-NH ₂
QA	Ac-K	L	T	W	Q	E	L	Y	Q	L	A	Y	K	G	I-NH ₂
KK	Ac-K	L	T	W	K	E	L	Y	Q	L	K	Y	K	G	I-NH ₂

Fig. 10. Sequenze aminoacidiche (codice monoletterale) dei peptidi progettati. In rosso sono evidenziati i 5 residui ritenuti responsabili dell'interazione con Flt-1; in blu i residui mutati.

Come si può osservare dalle sequenze, i principali accorgimenti per stabilizzare il motivo elicoidale sono stati: l'inserimento dei motivi N- e C-capping alle due estremità, l'impiego di residui con propensione per la conformazione elicoidale, l'acetilazione e l'ammidazione rispettivamente delle estremità N- e C-terminali.

L'N-capping è stato modellato sul motivo *capping box*.⁶² Esso permette di formare legami ad idrogeno con due dei quattro protoni ammidici iniziali del *backbone* dell'elica. In particolare, la catena laterale del residuo Ncap (Fig. 11) forma un legame ad idrogeno con l'NH ammidico del *backbone* del residuo N3 e, reciprocamente, la catena laterale di N3 forma un legame ad idrogeno con il *backbone* del residuo Ncap.

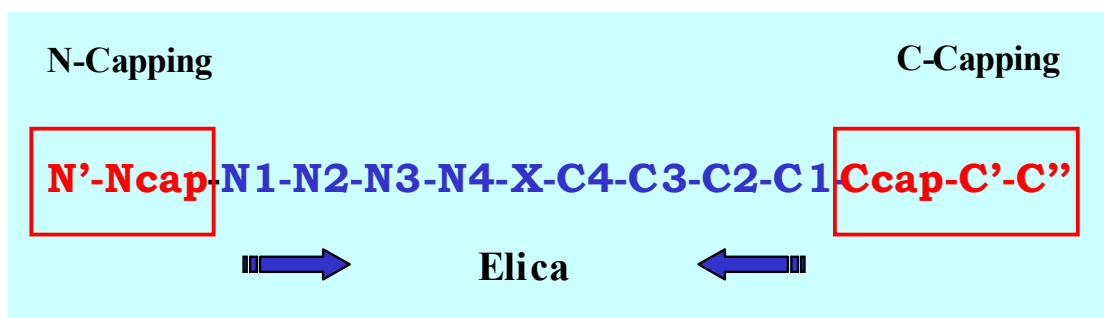


Fig. 11. Schema e nomenclatura delle posizioni di una α -elica e delle regioni di *capping*.

In posizione N' e Ncap sono stati inseriti, rispettivamente, un residuo di Leu e Thr perché presentano un'elevata propensione per queste posizioni.⁶² Le posizioni N1 e N2 sono state lasciate inalterate in quanto corrispondono ai residui che interagiscono con il recettore. E'

stata, inoltre, effettuata la sostituzione Asp→Glu (N3) perché quest'ultimo ha maggiore propensione ad assumere una conformazione elicoidale.⁶² Infine, nella posizione N4 è stato inserito un residuo di Leu sia perché stabilizza il capping mediante interazione idrofobiche con N', sia per la elevata propensione per una conformazione elicoidale.

Per quanto riguarda la regione C-terminale questa è stata stabilizzata introducendo una sequenza che potenzialmente può assumere una conformazione tipo motivo di Schellman.⁶³ Essa prevede un doppio *pattern* di legame ad idrogeno tra NH al C'' e il CO del residuo C3 e tra NH del C' e il CO del C2. Inoltre, è presente un'associazione idrofobica tra il C3 e il C''. I vincoli conformazionali dovuti a queste interazioni impongono al residuo C' una conformazione tipica di un residuo con configurazione D. Per questa ragione un residuo di Gly è stato inserito in C', mentre per la posizione C'' e Ccap sono stati scelti residui con elevata propensione a stabilizzare l'elica, rispettivamente Ile e Lys.

In posizione C3 è stato inserito un residuo di Leu per favorire le interazioni idrofobiche tipiche di questo motivo *C-capping*. In posizione C2 è stato inserito un residuo di Ala (elevata propensione per l'elica) o Lys (aumenta la solubilità del peptide conservando la propensione per la conformazione elicoidale) così da ottenere due serie di mutanti. La posizione C1 è occupata dal residuo di Tyr della regione di *binding* del VEGF.

All'N-terminale è stata, inoltre, aggiunta una Lys per permetterne la funzionalizzazione con fluoresceina, e le estremità amminica e carbossilica dei peptidi sono state rispettivamente acetilata e amidata.

In Fig. 12 sono riportate le rappresentazioni delle "eliche *wheel*" di VEGF 17-25 e di uno dei peptidi progettati, MA, che permettono di evidenziare la disposizione amminoacidica lungo l'elica.

La sostituzione della Phe¹⁷ con Trp è stata effettuata perché studi di modelling hanno indicato che la cavità sul recettore che ospita la Phe¹⁷ potrebbe alloggiare residui con maggiore ingombro sterico. L'introduzione di un residuo di Trp dovrebbe permettere di rafforzare le interazioni con il recettore aumentando la superficie di contatto. Inoltre, il triptofano può fungere da *probe* sia per la determinazione della concentrazione sia per eventuali studi di *binding* mediante spettrofluorimetria.

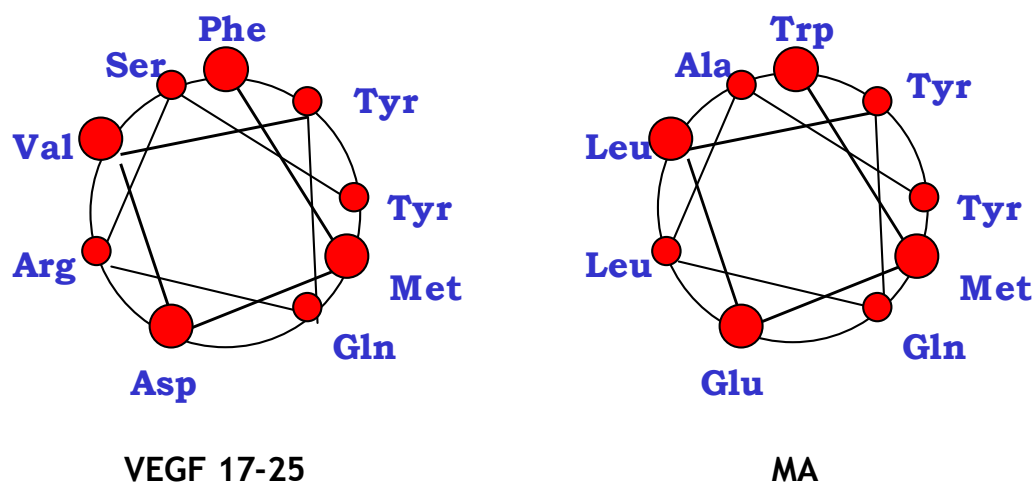


Fig. 12. Rappresentazione mediante elica *wheel* della disposizione amminoacidica della sequenza naturale VEGF (17-25) e del peptide progettato MA.

Infine, poiché la tasca che ospita la Met¹⁸ presenta sul fondo due residui che potenzialmente possono formare legami idrogeno (Asp²¹⁹ e Thr²⁰⁶), sono state inserite le due mutazioni Met¹⁸→Lys e Met¹⁸→Gln.

Dopo aver modellato la sequenza è stata eseguita una minimizzazione energetica per raffinare a livello conformazionale il modello, eliminando le conformazioni ad alta energia. Successivamente è stata eseguita una simulazione di dinamica molecolare in solvente in presenza del recettore. La sequenza è stata posizionata correttamente nel sito del recettore sovrapponendo gli atomi del *backbone* delle due eliche dal residuo 17 al 25.

L'analisi ha indicato che la struttura elicoidale disegnata risulta conformazionalmente stabile e che è in grado di conservare i contatti con il recettore in maniera analoga al composto naturale (Fig. 13).

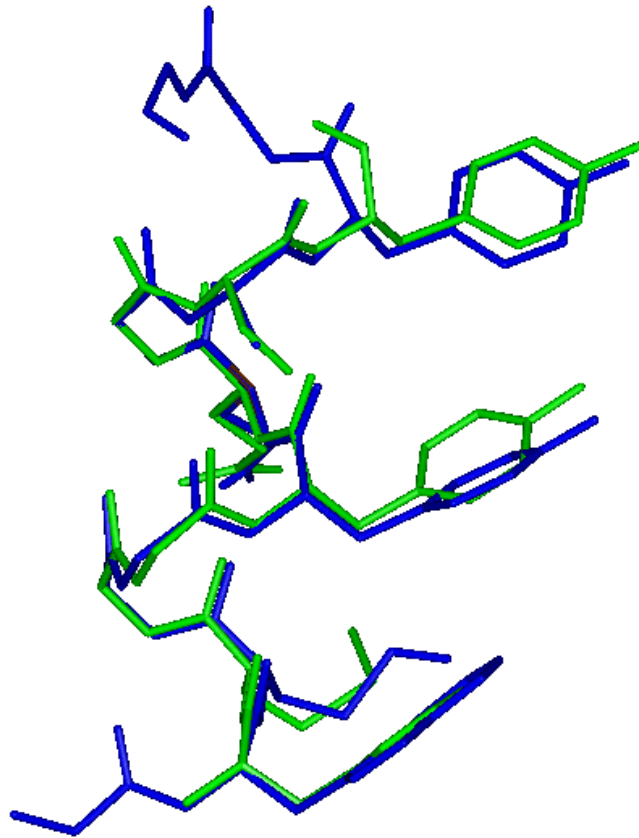


Fig. 13. Sovrapposizione fra la struttura della regione 17-25 del VEGF (verde) nel complesso con il recettore e l'analogo tratto del modello molecolare del peptide MA (blu). Per chiarezza sono mostrate solo le catene laterali degli amminoacidi coinvolti nell'interazione con il recettore.

1.4.2 SINTESI DEI PEPTIDI PROGETTATI

Tutti i peptidi sono stati sintetizzati in fase solida con chimica Fmoc utilizzando il sintetizzatore automatico di peptidi ADVANCED CHEMTECH 348 Ω e la resina *Rink-Amide MBHA*. In Fig. 14 è rappresentata la struttura del *linker* della resina.

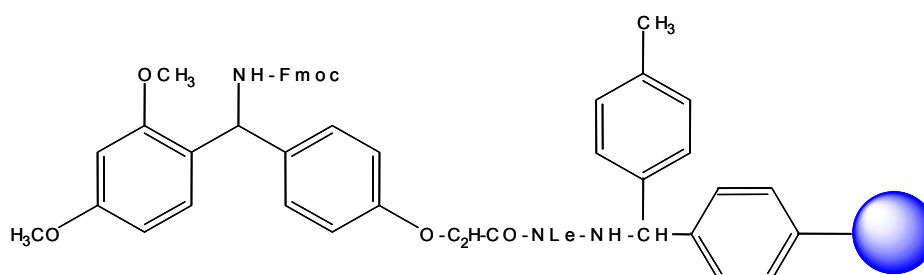


Fig. 14. Resina *Rink-Amide MBHA*.

Le sintesi sono state condotte su scala 0.03 mmol e sono stati impiegati tutti amminoacidi con gruppi protettori standard. Tutti gli amminoacidi della sequenza sono stati inseriti mediante attivazione *in situ* con HOBt/TBTU o HOBt/PyBop.(Fig. 15)

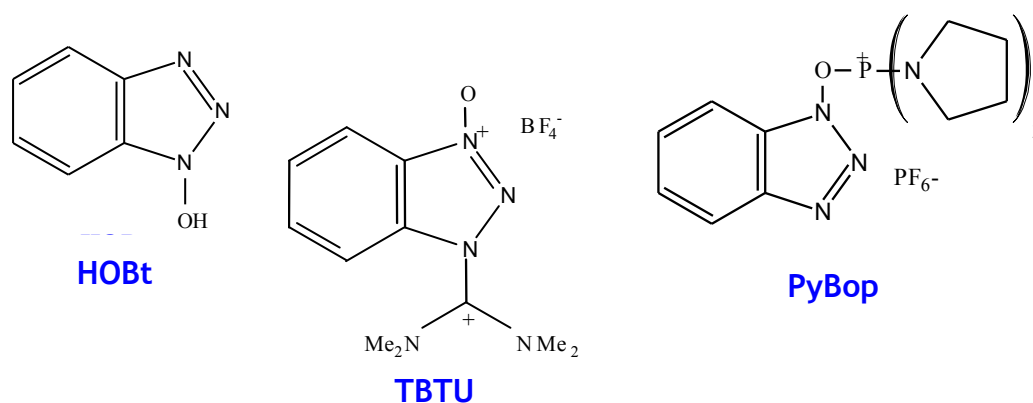


Fig 15: reattivi utilizzati nella sintesi peptidica

Nella miscela di reazione è stata aggiunta la base DIPEA in modo da stabilizzare l'estremità carbossilica dell'amminoacido nella sua forma deprotonata e, quindi, favorirne l'attacco nucleofilo sull'agente attivante.

Le reazioni di accoppiamento sono state effettuate utilizzando un eccesso di amminoacido (4 equivalenti rispetto alla scala di sintesi) e la strategia del doppio accoppiamento, che

consiste nel ripetere due volte la fase di accoppiamento dell'amminoacido prima di procedere alle fasi successive. La deprotezione delle estremità amminiche di ogni amminoacido dal gruppo Fmoc è stata realizzata impiegando piperidina/DMF; mentre per la reazione di acetilazione è stata utilizzata una soluzione di anidride acetica/Piridina/DMF. I peptidi, infine, sono stati distaccati dalla resina mediante trattamento con TFA e precipitati in etere etilico a freddo. La successiva fase di purificazione è stata eseguita mediante RP-HPLC mentre la purezza e l'identità dei peptidi sintetizzati sono state confermate mediante RP-HPLC analitico e spettroscopia di massa MALDI-TOF. I peptidi sono stati ottenuti tutti in buone rese e con elevato grado di purezza, come si può osservare dalla Tab. 2 in cui sono riportati i dati riassuntivi riguardanti le sintesi del VEGF 15 e dei sei peptidi progettati.

PEPTIDE	PM_{teor}	PM_{sper}	t_R	RESE
VEGF 15	1942	1943	14.2 min	52 %
FMK	1916	1917	16.13 min	51 %
MA	1898	1899	18.3 min	53 %
KA	1895	1896	16.4 min	54 %
MK	1955	1956	15.6 min	53 %
QA	1896	1897	15.4 min	48 %
KK	1952	1953	14.3 min	53 %

Tab. 2. Parametri e Rese di purificazione dei peptidi sintetizzati

In figura 16 A e B sono riportati, come esempio, rispettivamente il cromatogramma e lo spettro MALDI-TOF del peptide MA

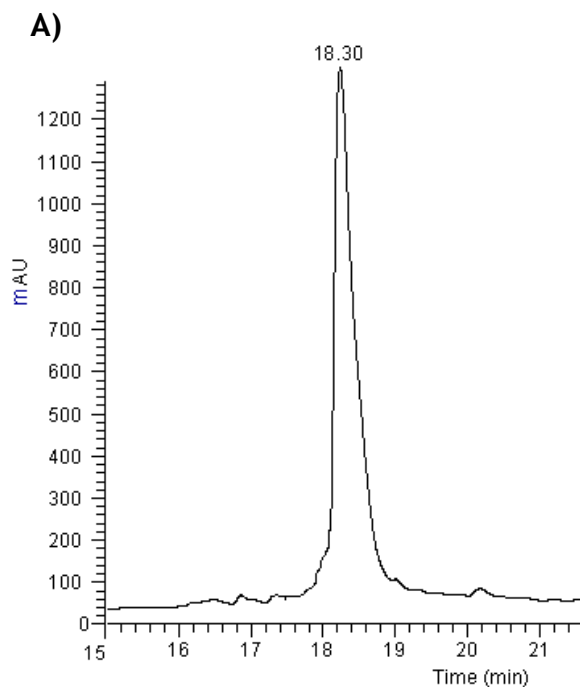


Fig. 16 A) Profilo cromatografico RP-HPLC del peptide MA puro: $t_r = 18.30$ min.

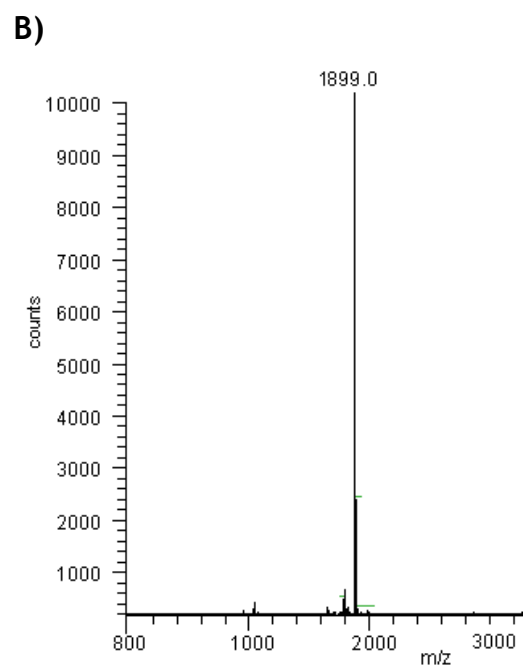


Fig. 16 B) Spettro di massa MALDI-TOF di MA puro: picco molecolare $[M+H]^+$ a m/z 1899 ($PM_{teor} = 1898$ Da).

1.4.3 STUDIO CONFORMAZIONALE MEDIANTE DICROISMO CIRCOLARE DEI PEPTIDI PROGETTATI

Al fine di studiare le proprietà conformazionali dei peptidi sintetizzati sono state effettuate misure di dicroismo circolare nel lontano-UV in tampone fosfato 5 mM a pH=7.

Sono state impiegate soluzioni di peptidi 50 μ M controllandone la concentrazione mediante lettura UV-Vis a 280 nm.

I parametri CD relativi ai peptidi in tampone fosfato sono riportati in Tab. 3.

PEPTIDE	λ_{\max}	$[\theta]_{\min} \cdot 10^{-3} (\lambda_{\min})$	$[\theta]_{207} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{222} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{222}/[\theta]_{\min}$	λ_0
FMK	190.2	-14.2(203.8)	-12.9	-7.2	0.5	194.8
MA	190.4	-9.7 (204.9)	-9.4	-6.9	0.7	196.8
KA	190.8	-11.2 (203.0)	-9.8	-5.7	0.5	194.4
MK	191.0	-11.0 (206.6)	-11.0	-7.3	0.7	197.2
QA	190.4	-5.1 (204.8)	-5.0	-3.5	0.7	196.6
KK	191.2	-11.0 (204.2)	-10.1	-6.1	0.6	195.2

Tab. 3. Parametri CD relativi ai peptidi in tampone fosfato 5mM (pH=7)

In Fig. 17 sono riportati gli spettri CD dei peptidi esaminati.

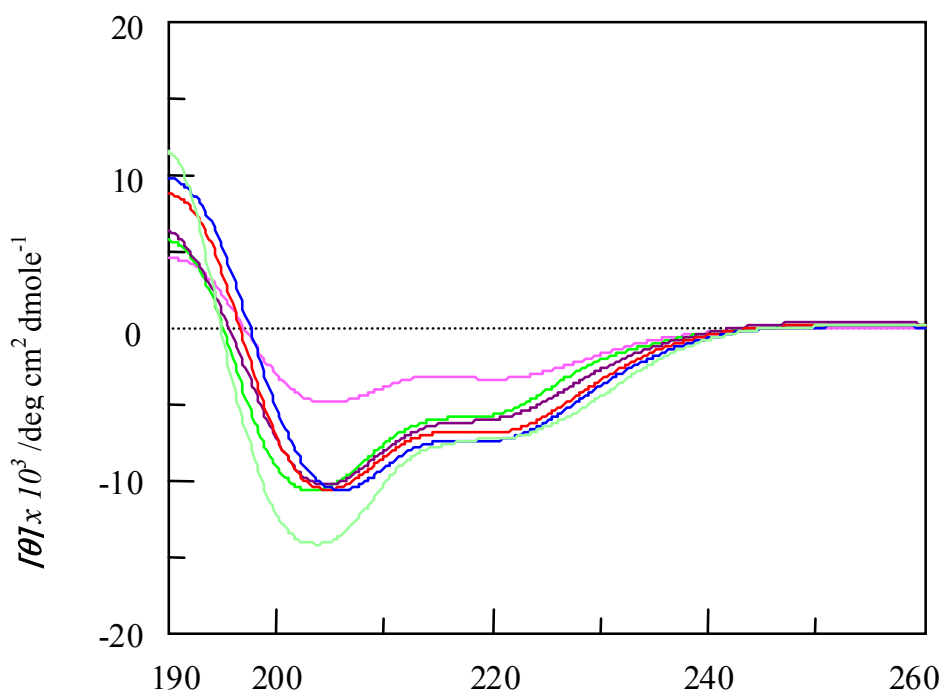


Fig. 17. Spettri CD nel lontano-UV in tampone fosfato 5 mM a pH=7: — FMK; — KA; — KK; — MA; — MK; — QA.

Dall'analisi degli spettri e dei valori riportati in Tab. 3 si evince che tutti i peptidi tendono ad assumere prevalentemente una conformazione elicoidale. In particolare, i peptidi MA ed MK presentano il contenuto elicoidale maggiore, mentre il peptide FMK presenta il contenuto minore. E' interessante, inoltre, notare come anche i peptidi con la Lys in posizione 18 (KA e KK) abbiano minore propensione per la struttura elicoidale, probabilmente a causa della destabilizzazione indotta dalla carica positiva presente nella regione N-terminale che può interagire sfavorevolmente con il dipolo dell'elica.

In fig. 18 e' riportata la sovrapposizione degli spettri del VEGF 15 e il MA.

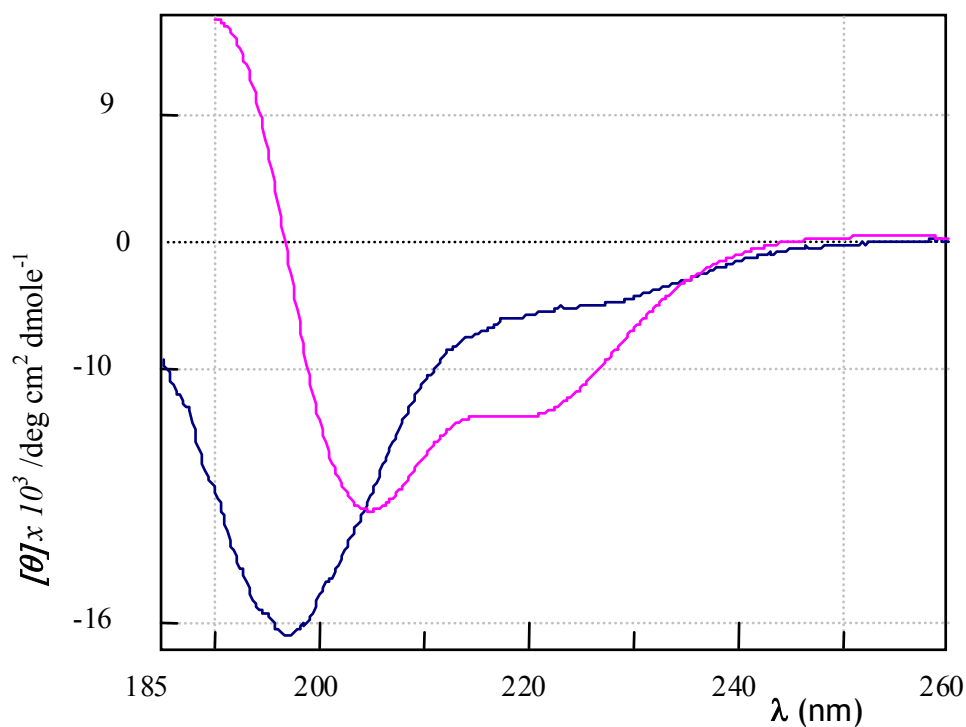


Fig. 18. Sovrapposizione degli spettri CD del peptide MA (—) e del VEGF 15 (—) in tampone fosfato 5 mM a pH=7.

E' evidente dall'analisi degli spettri che il VEGF 15, cioè la sequenza naturale, non presenta struttura secondaria definita contrariamente al peptide MA.

I dati ottenuti da questi esperimenti risultano estremamente interessanti in quanto è noto, da dati di letteratura, che piccole sequenze naturali difficilmente presentano in soluzione una conformazione ben definita. Non a caso il peptide VEGF 15, tratto dalla sequenza naturale del VEGF, non sembra presentare preferenze conformazionali. Al contrario i peptidi progettati, ed in particolare il peptide MA, sono un chiaro esempio di come l'introduzione di opportune modifiche nella sequenza amminoacidica, cioè la progettazione razionale, abbia permesso di ottenere uno *scaffold* stabile impiegando solo amminoacidi naturali.

1.4.4 STUDI CONFORMAZIONALI VIA NMR DEI PEPTIDI PROGETTATI

Al fine di determinare la struttura dei peptidi MA ed MK sono stati effettuati esperimenti NMR. Questi peptidi sono stati rispettivamente sciolti in 90% H₂O and 10% D₂O (v/v) per avere una concentrazione finale di 1.0×10^{-3} M. Esperimenti bidimensionali, in particolare modo spettri DQF-COSY⁶⁴, TOCSY⁶⁵ e NOESY⁶⁶ sono stati registrati a 298 K su uno strumento Varian Inova 600.

Dall'analisi degli spettri TOCSY, NOESY e DQF-COSY è stato possibile dare un'assegnazione completa dei chemical shift di questi protoni seguendo procedure standard⁶⁷. L'analisi dei chemical shift dei protoni H α , registrati usando l'indice dei Chemical Shift Index ha evidenziato la presenza di una struttura elicoidale comprendente la regione 3-13 del peptide MA e 3-12 del peptide MK (Fig.19).

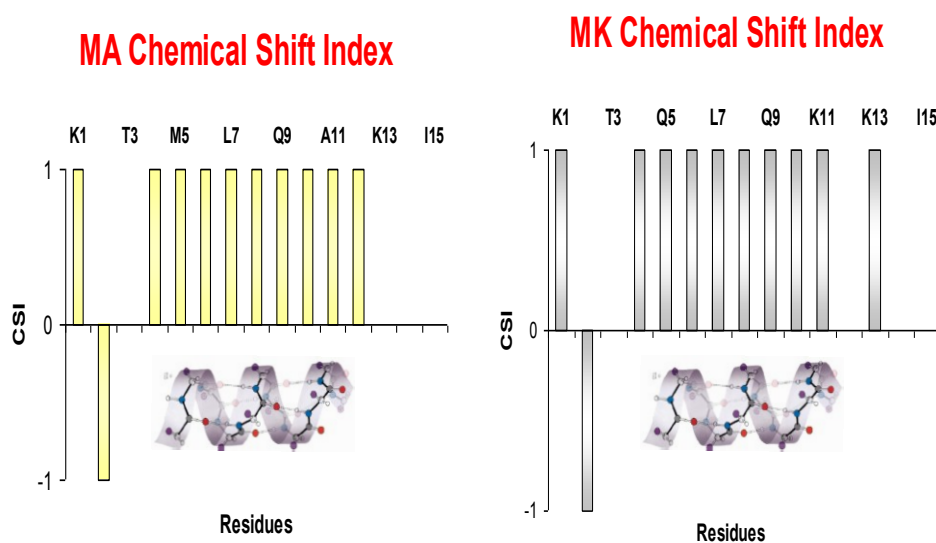


Fig. 19. Chemical shift Index rispettivamente del peptide MA e del peptide MK. Sono indicate le risultanti regioni dell' α -elica.

Tale dato è stato confermato dall'analisi dello spettro 2D-Noesy, nel quale si evidenziano segnali NOE HN–HN ($i, i + 1$), H_{α} –HN ($i, i + 3$) and H_{α} – H_{β} ($i, i + 3$), segnali tipici della presenza di struttura elicoidale (Fig.20).

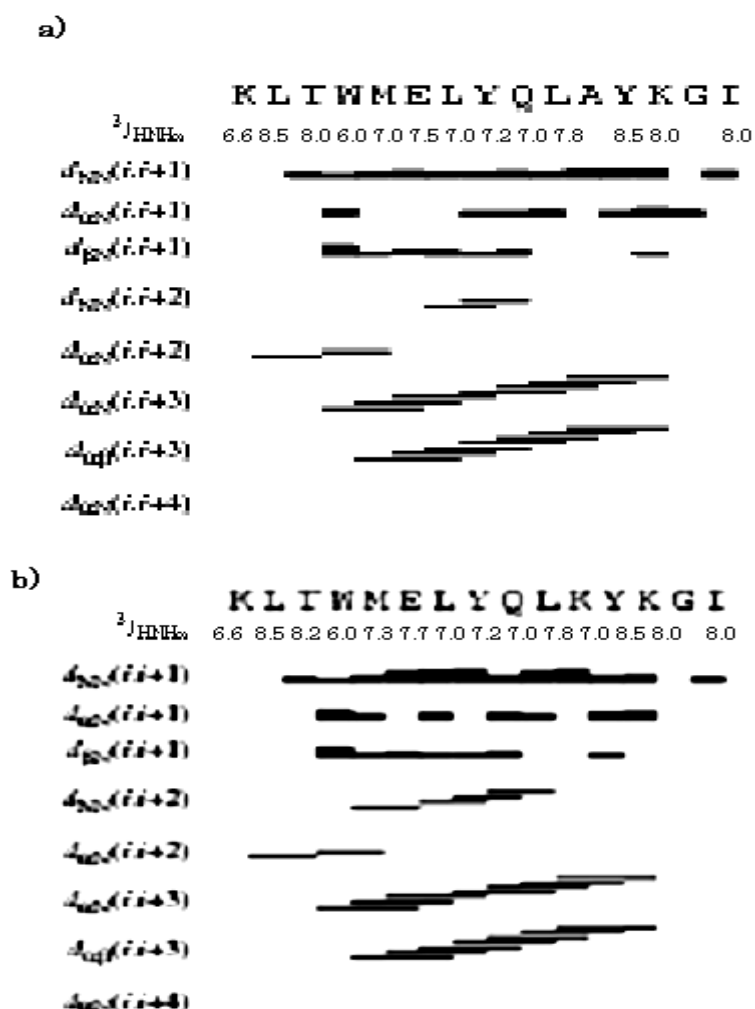


Fig. 20. Diagramma dei residui NOE di piccolo e medio range che sono rilevanti per definire la preferenza della struttura secondaria dei peptidi MA (a) ed MK (b).

Per il peptide MA sono stati assegnati ed integrati 272 picchi di correlazione NOE; L'assegnazione stereospecifica dei protoni metilenici in posizione C^{β} del Trp 4 è stata ottenuta dal file di input del software CYANA. Le 13 costanti di accoppiamento ³J_{HNH α} sono state ricavate dallo spettro DQF-COSY; i coefficienti di temperatura eseguiti sul peptide MA indicano che i protoni ammidici dei residui 3, 6, 11 del backbone potrebbero essere ben coinvolti nella formazione di legami ad idrogeno. Per il peptide MK invece, sono stati assegnati ed integrati 212 picchi di correlazione NOE. L'assegnazione

stereospecifica dei protoni metilenici in posizione C^β della L-10 è stata ottenuta dal file di input del software CYANA. Le 14 costanti di accoppiamento $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ sono state ricavate dallo spettro DQF-COSY; i coefficienti di temperatura eseguiti sul peptide MK sono stati misurati ed i dati indicano che i protoni ammidici dei residui 6, 10, 11 del backbone potrebbero essere ben coinvolti nella formazione di legami ad idrogeno.

Data l'indicazione della struttura ad α -elica di entrambi i peptidi, i NOE osservati sono stati impiegati per ottenere informazioni sulla struttura tridimensionale dei peptidi, mediante l'impiego del software di calcolo strutturale, CYANA. Per il peptide MA il *file* finale di input ha evidenziato un totale di 206 *distance constraints* (61 intraresiduo, 88 *short-* and 57 *medium-range*) and 62 *angle constraints*, risultanti dai NOE intraresiduo e sequenziali e dalle costanti di accoppiamento $^3J_{\text{HNH}\alpha}$, mentre per il peptide MK il *file* finale di input ha rilevato 158 *distance constraints* (61 intraresiduo, 53 *short-* and 43 *medium-range*) and 47 *angle constraints*.

Inizialmente il software CYANA ha generato 100 strutture random. Tra queste sono state scelte le 20 conformazioni con il più basso valore della target function e su queste è stata condotta un'ulteriore minimizzazione energetica. La sovrapposizione del backbone delle 20 strutture risultanti dal calcolo di CYANA sono mostrate in fig. 21, dopo la sovrapposizione degli atomi del backbone. Per il peptide MA i valori di RMSD (Root Mean Square Deviation) del backbone e di tutti gli atomi pesanti della regione 4-12 sono 0.22 Å e 0.99 Å, rispettivamente, mentre per MK i valori di RMSD sono 0.14 Å e 0.78 Å.

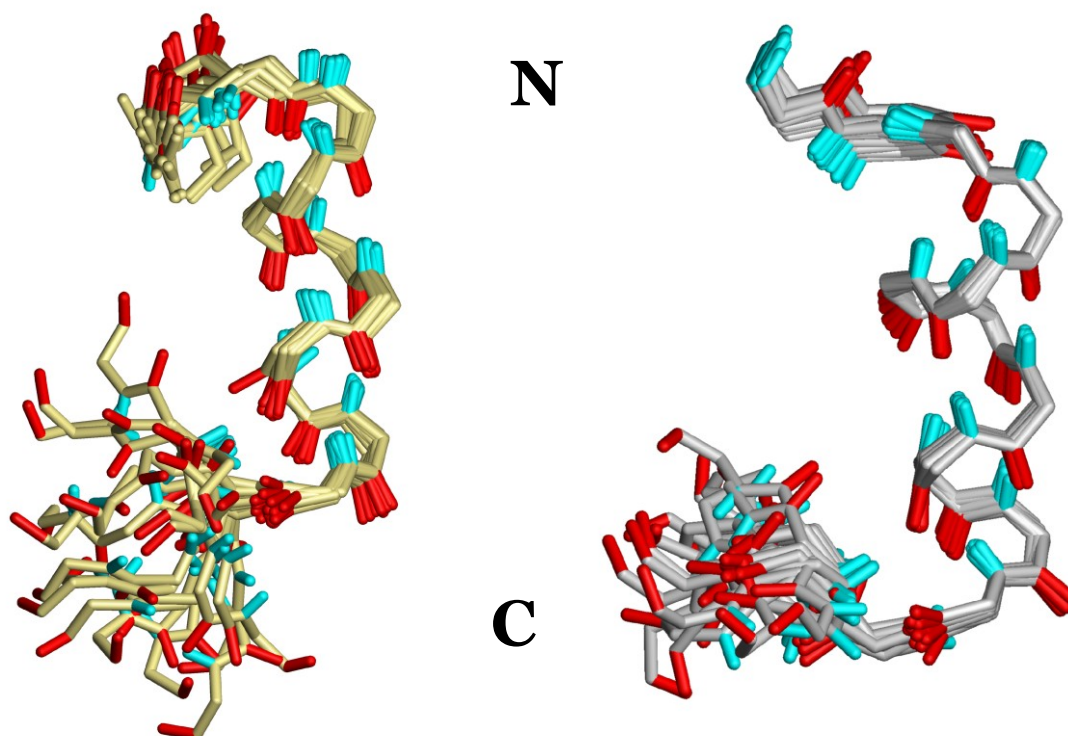


Fig.21 Sovrapposizione del backbone delle 20 migliori strutture risultanti dal calcolo di CYANA

I dati conformazionali ottenuti sui peptidi MA ed MK in soluzione acquosa indicano che essi assumono una ben definita conformazione elicoidale. Le regioni elicoidali di entrambe i peptidi progettati corrispondono all'elica N-terminale (residui 17-25) del VEGF complessato con Flt-1_{D2} (Fig.22).

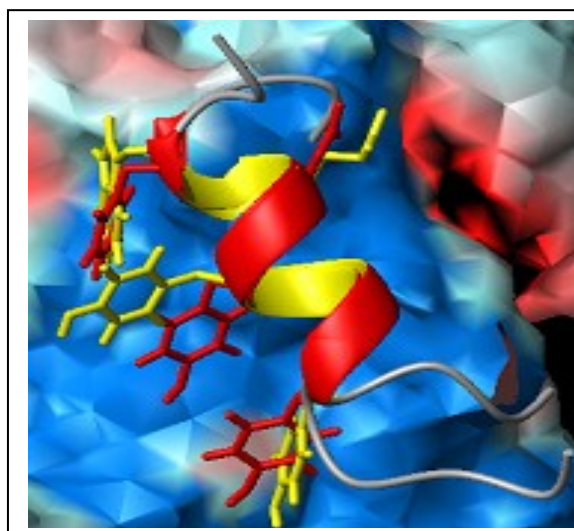
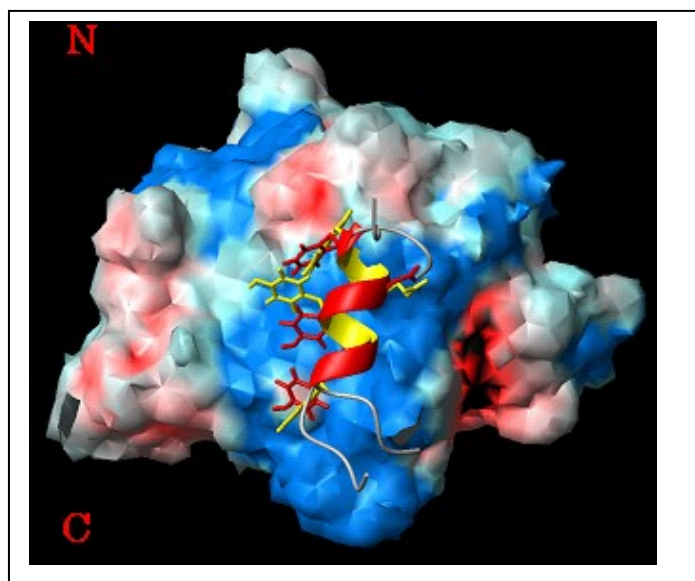


Fig.22 Sovrapposizione dello scheletro della struttura rappresentativa (gialla) e dell'elica rossa legata alla superficie elettrostatica rossa

Un' altra importante informazione che si può ricavare nella determinazione strutturale di macromolecole è la identificazione del loro grado di associazione in soluzione. Questo è particolarmente vero per i peptidi che spesso presentano un piccolo numero di interazioni long-range e l'erronea attribuzione di un contatto intramolecolare può influenzare la struttura finale calcolata. E' stato analizzato lo stato di aggregazione di due peptidi MA ed MK in condizioni identiche a quelle usate nella determinazione strutturale mediante NMR. L' informazione sul grado di oligomerizzazione può essere direttamente ottenuto dalla misura dei coefficienti traslazionali di diffusione mediante PFGNMR.

Altieri⁶⁸ ed altri hanno dimostrato che lo stato di oligomerizzazione dei peptidi progettati potrebbe essere direttamente misurato dal valore dei coefficienti di diffusione paragonando tali valori con quelli dei coefficienti di diffusione di peptidi monomerici riportati in letteratura.

I coefficienti di diffusione misurati negli spettri DOSY sono $1.77 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1.95 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ per MA e MK rispettivamente. Le masse apparenti dei peptidi in acqua sono 4-35% più grandi dei loro valori monomerici teoretici senza correzione per gli effetti della concentrazione del campione.

Mediante l'utilizzo dell'equazione di Einstein Stokes sono stati calcolati i raggi idrodinamici (R_H) dei peptidi ed è stato notato rispettivamente che il raggio idrodinamico dei peptidi MA ed MK è rispettivamente di 13.5 Å e 12.2 Å, in ragionevole accordo con altri peptidi monomerici noti nello stesso solvente⁶⁹. Con lo scopo di esaminare gli effetti della concentrazione del campione sui coefficienti di diffusione molecolare, sono state condotte misure a differenti concentrazioni per il peptide MA. Il leggero aumento del coefficiente di diffusione a basse concentrazioni di peptide in acqua è consistente con l'idea che le più basse concentrazioni di soluto in acqua favorirebbero una grande mobilità traslazionale, ma dovrebbe essere enfatizzato che l'effetto è piccolo. Da questi dati assumiamo che in soluzione acquosa i peptidi sono prevalentemente monomerici.

1.4.5 STUDI BIOLOGICI DEI PEPTIDI PROGETTATI

I peptidi progettati e la sequenza VEGF15 sono stati sottoposti a diversi saggi, condotti in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Salerno, allo scopo di valutarne l'attività biologica.

E' noto che una delle principali funzioni biologiche del VEGF è la capacità di recuperare dall'apoptosi le cellule endoteliali,⁷⁰ pertanto, per analizzare la capacità dei peptidi di antagonizzare tale attività biologica, sono stati impiegati saggi di valutazione dell'apoptosi in cellule endoteliali umane primarie da vena ombelicale (HUVEC). In particolare, è stata misurata, mediante spettrofluorimetria, l'attivazione di caspasi 3, enzima specifico dell'apoptosi.⁷¹ Il test è stato condotto incubando le cellule, depurate di siero, per un tempo variabile da due a sei ore in assenza e in presenza del VEGF (concentrazione 20 ng/ml). L'attività della caspasi è stata, quindi, determinata in estratti citosolici cellulari attraverso l'analisi del rilascio di 7-amino-4-metilcumarina (AMC) dalla N-acetil-DEVD-AMC, uno specifico substrato della caspasi. Il miglior risultato è stato ottenuto dopo quattro ore di incubazione (Fig. 23) e ha fornito, una percentuale di inibizione dell'attività di caspasi 3 (e quindi dell'apoptosi) da parte del VEGF di circa il 40%.

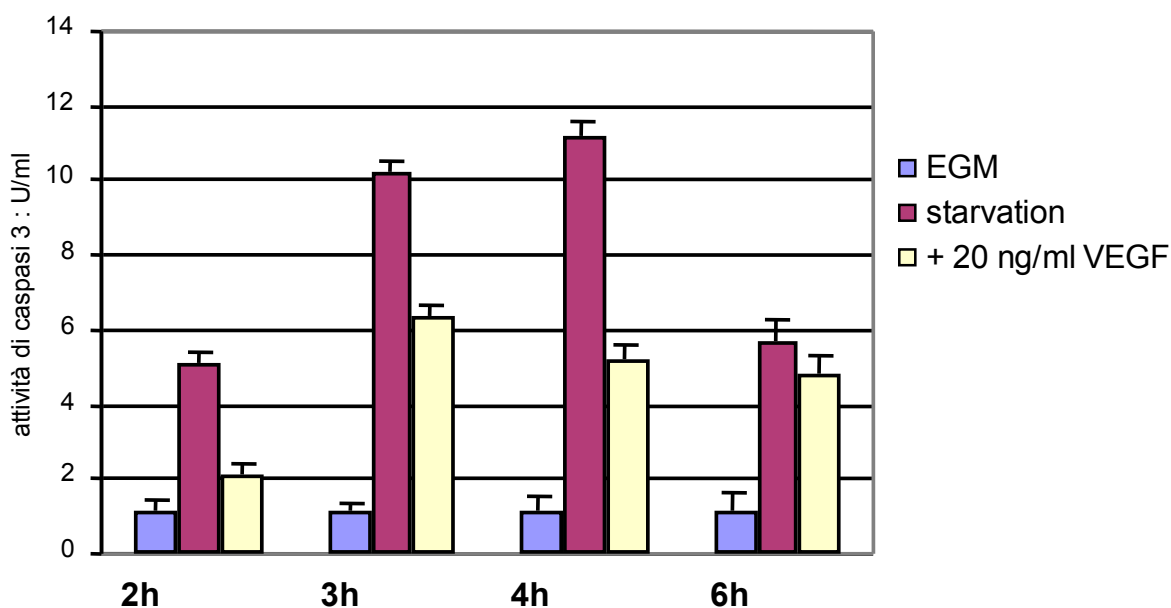


Fig. 23. Rappresentazione ad istogrammi del saggio fluorimetrico dell'attività di caspasi 3.

Di ogni peptide è stata testata la capacità di inibire l'azione di recupero dall'apoptosi che il VEGF esplica sulle HUVEC sottoposte a deprivazione di siero (*starvation*). Sono stati eseguiti 3 esperimenti in duplicato incubando le cellule prima con i peptidi alla concentrazione di 20 ng/ml e, successivamente, in assenza o in presenza del VEGF (20 ng/ml).

I risultati sono stati riportati in grafico (Fig. 24) come percentuale di "Rescue" rispetto al recupero effettuato dal VEGF da solo considerato come il 100%.

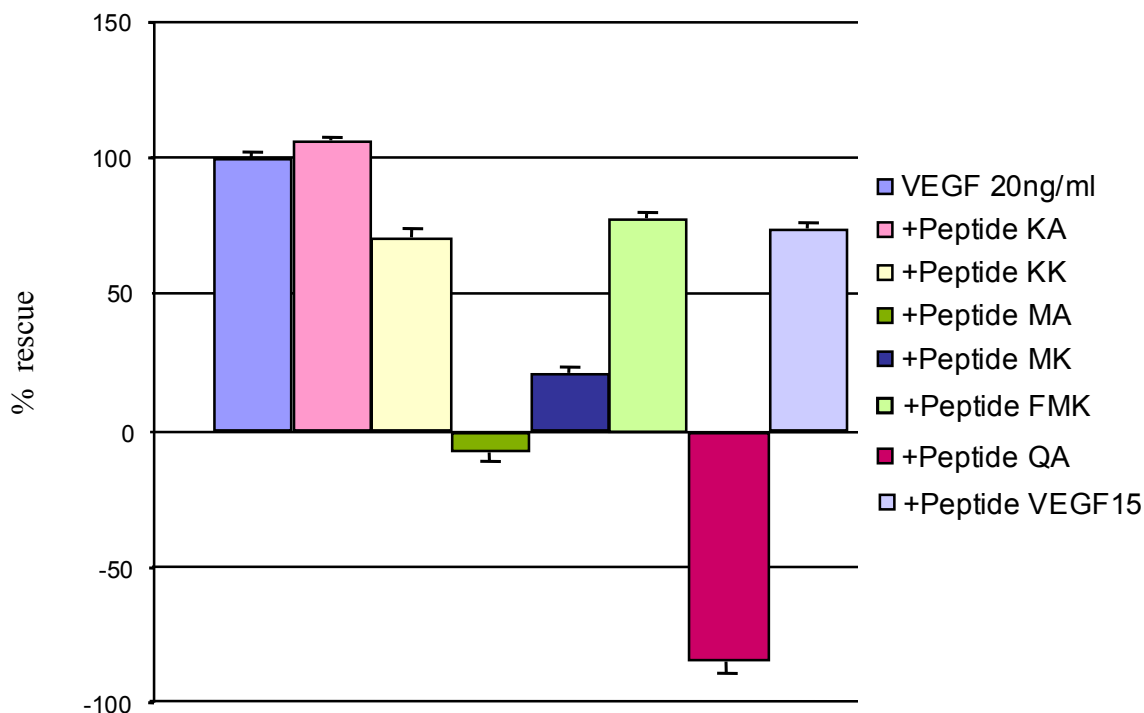


Fig. 24. Rappresentazione ad istogrammi del saggio fluorimetrico dell'attività di caspasi 3.

I dati ottenuti indicano chiaramente che i peptidi MA e MK sono in grado di inibire per più dell' 80% l'attività antiapoptotica del VEGF; il peptide QA risulta tossico, mentre i peptidi KA, KK e VEGF 15 non variano sostanzialmente l'azione di recupero esplicata dal VEGF. Per il peptide MA è stata, inoltre, valutata la dose-dipendenza dell'effetto antagonista (Fig. 25).

Le cellule sono state prima incubate con il peptide MA alle concentrazioni rispettivamente di 1 ng/ml e 20 ng/ml e, successivamente, sono state incubate in assenza e in presenza del VEGF (20 ng/ml).

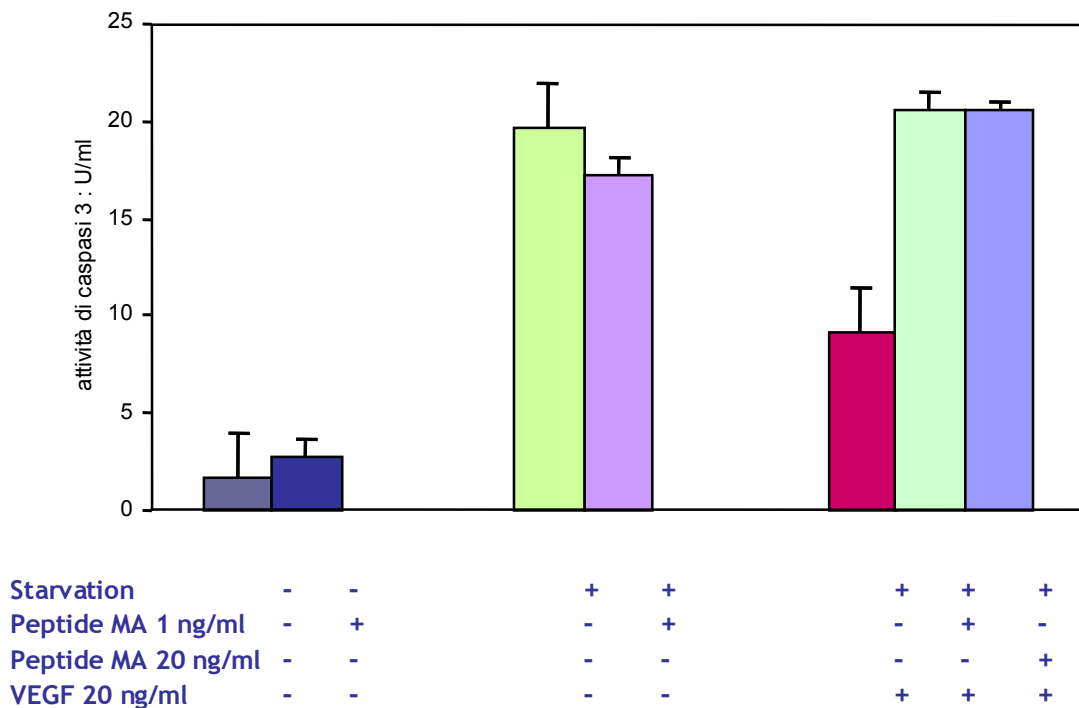


Fig. 25. Rappresentazione dell'effetto antagonista del peptide MA in dipendenza della dose e del tempo.

Dal grafico appare evidente che, nel caso in cui il peptide MA sia aggiunta alle cellule in mezzo completo o deprivato di siero, la variazione dell'attività di caspasi 3 risulta poco significativa, al contrario se MA viene aggiunto successivamente al VEGF, che induce una diminuzione nei livelli di caspasi 3, il peptide è in grado di antagonizzare l'effetto antiapoptotico del VEGF, riportando la concentrazione di caspasi al livello iniziale.

Per valutare se l'effetto antagonista del peptide MA fosse dovuta all'interazione con il recettore o con il VEGF, è stato effettuato un saggio di competizione tra il peptide MA e il VEGF per i recettori su cellule HUVEC ed in seguito monitorato mediante tecnica FACS. Il peptide MA è stato, quindi, fluoresceinato legando la catena laterale del residuo di Lys¹⁴ alla funzione carbossilica di una fluoresceina derivatizzata con uno *spacer* di acido esamminocaproico.

I saggi sono stati realizzati incubando le cellule HUVEC al buio a 4°C per 4 h in presenza del peptide fluoresceinato alla concentrazione di 1 µg/ml ciascuno e del VEGF a concentrazione variabile (da 0.002 a 20 µg/ml). Dopo è stata effettuata la lettura della intensità di fluorescenza relativa alle cellule mediante tecnica FACS (Fig. 26).

Come evidente dal grafico, quando le cellule vengono incubate con il peptide MA fluoresceinato in assenza di VEGF, l'intensità di fluorescenza è molto elevata, segno

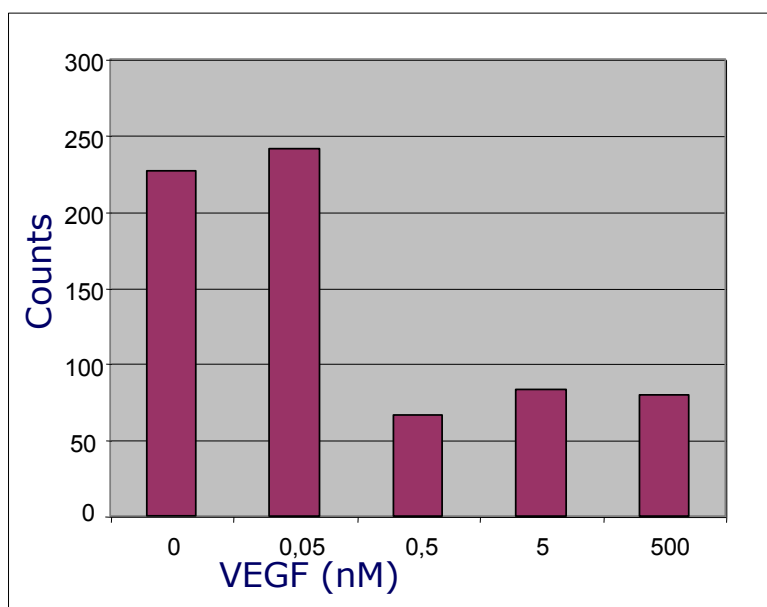


Fig. 26. Saggio di *binding* del peptide MA su cellule HUVEC mediante tecnica FACS

evidente del fatto che il peptide MA lega la superficie delle cellule. All'aumentare della concentrazione di VEGF, il peptide MA viene spiazzato indicando che le due molecole competono per lo stesso sito di legame sulla superficie cellulare.

Per confermare che il peptide MA interagisca con i recettori del VEGF e che tale interazione sia funzionalmente significativa è stata valutata la capacità del peptide di interferire con l'attivazione delle MAP chinasi dipendente dal VEGF. Infatti, il legame del VEGF ai suoi recettori comporta l'attivazione di diversi pathway cellulari tra cui quello che comporta l'attivazione (fosforilazione) delle MAP chinasi ERK1/2⁷². Le cellule HUVEC sono state incubate con VEGF (20 ng/ml) in assenza ed in presenza del peptide MA (100 ng/ml) in duplicato, per 30 min. Poi le cellule sono state lisate ed analizzate mediante Western-Blot utilizzando un anticorpo anti-fosfo ERK.

Dalla figura 27 è evidente che le cellule stimulate con il VEGF mostrano apprezzabili livelli di ERK1/2 fosforilati (forma attivata delle chinasi), questi livelli invece sono ridotti

in cellule incubate con il VEGF ed in presenza del peptide MA, segno evidente del fatto che il peptide MA è in grado di inibire l'attivazione (mediante la loro fosforilazione) delle MAP chinasi per opera del VEGF.

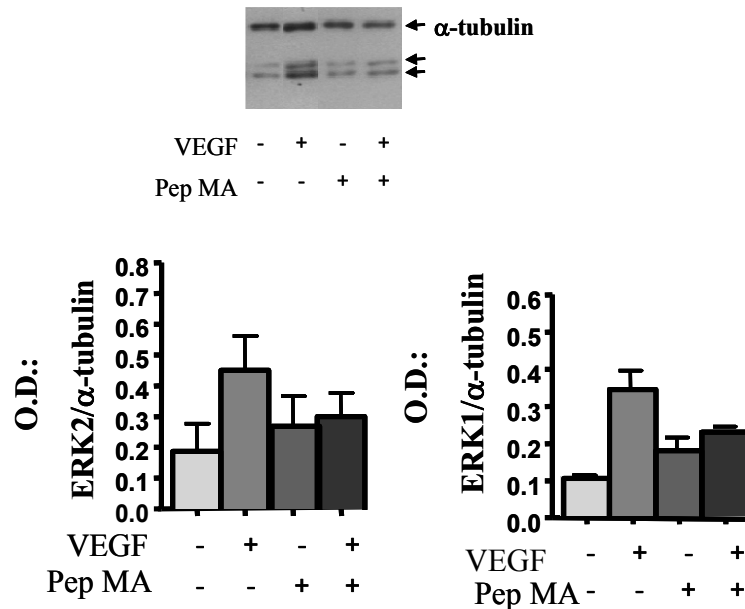


Fig. 27 Saggio biologico di inibizione del peptide MA sull'attivazione delle chinasi ERK indotte dal VEGF

E' stato condotto un ulteriore saggio allo scopo di determinare la capacità del peptide MA di inibire l'attività anti-apoptotica del VEGF sulla base della valutazione della quantità di fosfatidilserina esternalizzata sulla superficie cellulare in seguito all'induzione di apoptosi⁷³.

Il saggio è stato condotto incubando le cellule HUVEC con VEGF alla concentrazione di 20 ng/ml in assenza ed in presenza del peptide MA la cui concentrazione è stata di 100 ng/ml. Le cellule sono state incubate in triplicati per 24 h a 37°C in atmosfera di monossido di carbonio al 5%. La presenza di fosfatidilserina presente sulla superficie cellulare è stata quantificata misurando la concentrazione di Annessina V fluoresceinata legata alla fosfatidilserina mediante citofluorimetria di flusso (Fig. 28)

Come è possibile notare dal grafico le cellule incubate con VEGF presentano una diminuzione della quantità di Annessina V rispetto al controllo, evidenziando l'attività anti-apoptotica del VEGF. Se le cellule vengono incubate con il VEGF ed il peptide MA si osserva un aumento dei valori di Annessina V, segno evidente che il peptide significativamente inibisce l'effetto anti-apoptotico del fattore di crescita.

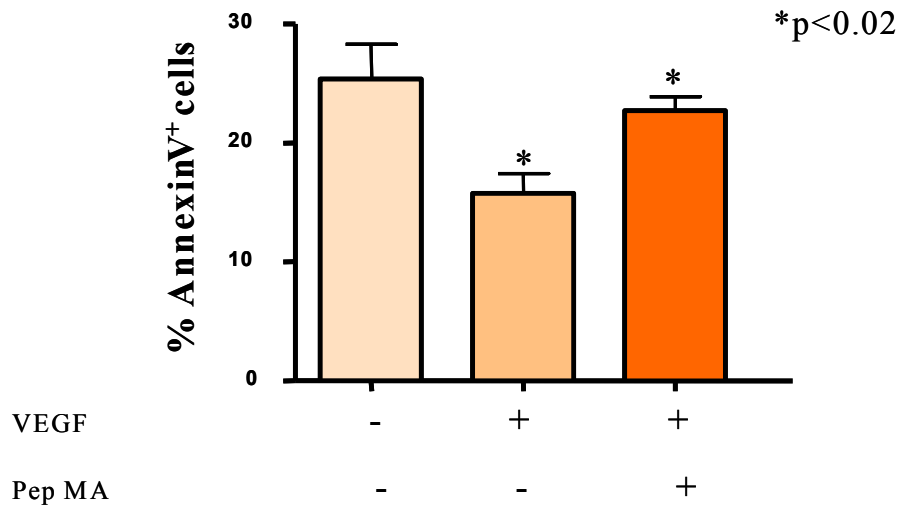


Fig. 28: Saggio biologico per la valutazione dell'effetto del peptide MA sulla comparsa dell'annexina 5 nelle cellule in presenza del VEGF.

I risultati di questi esperimenti biologici indicano che il peptide MA è capace di legare i recettori del VEGF e di antagonizzare le funzione biologiche del VEGF. Il peptide MA è, quindi, un candidato ideale per la futura sperimentazione in vivo per possibili applicazioni terapeutiche come agente anti-angiogenico e diagnostiche per il riconoscimento selettivo dei recettori del VEGF sovraespressi nei fenomeni di angiogenesi patologica.

1.5. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono state effettuate la progettazione, la sintesi e la caratterizzazione di nuove molecole di natura peptidica e peptidomimetica in grado di modulare l'attività di sistemi molecolari coinvolti nella cascata angiogenica. A tale scopo è stato scelto un sistema che è tra quelli più noti e studiati nell'ambito della regolazione del processo di angiogenesi patologica: il fattore di crescita vascolare endoteliale.

In particolare, l'obiettivo è stato quello di individuare nuovi peptidi in grado di interferire con il legame del VEGF ai suoi recettori e bloccare il processo angiogenico. Dopo aver effettuato un accurato studio del sistema VEGF-Flt-1 ed aver individuato tre regioni del VEGF comprendenti i determinanti strutturali per l'interazione con il recettore, è stata scelta la regione elicoidale 17-25.

Individuata la regione di interesse ed analizzate le sue caratteristiche di legame al recettore mediante determinazione dei residui direttamente coinvolti nell'interazione, l'approccio seguito è stato quello di progettare dei peptidi capaci di riprodurre le caratteristiche strutturali della regione elicoidale, introducendo appropriati *tool* molecolari e conservando i residui fondamentali per l'interazione con il recettore. Ciò allo scopo di ottenere composti capaci di legare i recettori e competere con il legame del VEGF, solubili tale da permetterne la caratterizzazione strutturale e funzionale. Sono state in tal modo progettate e sintetizzate, in fase solida mediante chimica Fmoc, sei molecole peptidiche che sono state purificate mediante RP-HPLC.

Sulle molecole così ottenute sono stati condotti studi conformazionali in soluzione mediante dicroismo circolare, per valutare l'attendibilità del modello ottenuto in fase di progettazione. I dati ottenuti dall'esame degli spettri CD in tampone fosfato a pH=7 hanno indicato che tutti i peptidi tendono ad assumere una conformazione elicoidale. Inoltre, misure CD condotte sulla sequenza originale del VEGF (VEGF15) hanno mostrato in maniera evidente che la sequenza naturale non presenta struttura secondaria definita contrariamente ai peptidi progettati, dimostrando che le modifiche introdotte effettuando

una progettazione razionale hanno permesso di ottenere uno *scaffold* stabile e la sostituzione di amminoacidi responsabili del legame al recettore non ne modificano le preferenze conformazionali.

Su due delle sei molecole peptidiche progettate sono stati condotti esperimenti NMR dissolvendoli in una miscela di H₂O/D₂O. Dall'analisi degli spettri TOCSY, NOESY e DQF-COSY è stato possibile dare un'assegnazione completa dei chemical shifts di questi protoni seguendo procedure standard. L'analisi dei chemical shifts ha evidenziato la presenza di una struttura elicoidale comprendente la regione 3-13 del peptide MA e 3-12 del peptide MK. Inoltre il fold caratteristico delle molecole progettate è quello di un α -elica e si può concludere dicendo che le regioni elicoidali di entrambe i peptidi progettati corrispondono all'elica naturale (residui 17-25) del VEGF complessato con Flt-1_{D2}. Sono stati studiati anche gli effetti dell'aggregazione dei due peptidi in acqua e si può concludere dicendo che i peptidi sono essenzialmente monomerici.

Infine, sulle sequenze progettate sono stati condotti saggi biologici che hanno permesso di individuare fra questi, due peptidi che fungono da antagonisti del VEGF. Per uno di questi, il peptide MA, è stata valutata anche la dose-dipendenza dell'effetto antagonista e sono stati condotti saggi di *binding* mediante tecnica FACS in assenza e presenza del VEGF. I risultati ottenuti hanno indicato che il peptide MA è in grado di legarsi in maniera specifica ai recettori del VEGF espressi sulla superficie cellulare competendo con il *binding* del VEGF stesso, come evidenziato dalla diminuzione dell'intensità del segnale di fluorescenza del peptide MA fuoresceinato all'aumentare della concentrazione del VEGF.

Per il peptide MA è stata anche valutata la capacità di bloccare l'attivazione delle MAP chinasi in seguito al legame del VEGF con i propri recettori.

In conclusione, si è riusciti a stabilizzare una sequenza peptidica naturale nella conformazione attesa, utilizzando peptidi di piccole dimensioni (15 residui) che hanno un potenziale impiego per il *targeting* di cellule tumorali ed eventualmente per la terapia. Tra questi peptidi, studi biologici hanno permesso di individuarne uno in grado di fungere da antagonista del VEGF ed è per questo motivo che questo si presenta come un valido candidato per una futura sperimentazione *in vivo* al fine di un suo impiego farmacologico. Infatti, se opportunamente funzionalizzato potrebbe trovare impiego, come sonde per il riconoscimento selettivo dei recettori del VEGF (KDR o Flt-1) overespressi nei fenomeni di angiogenesi patologica.

1.6 PARTE SPERIMENTALE

1.6.1 COSTRUZIONE DEL MODELLO

L'analisi conformazionale è stata eseguita su una *workstation* Silicon Graphics Octene. Il pacchetto integrato INSIGHT/DISCOVER della MSI è stato utilizzato per le minimizzazioni energetiche dei sistemi progettati e per le successive simulazioni di dinamica molecolare. L'algoritmo "*steepest descent*" è stato impiegato nei primi stadi di raffinamento, mentre l'algoritmo "*Quasi-Newton-Raphson*" è stato utilizzato negli stadi finali. Per tutte le simulazioni è stato adoperato il campo di forza CVFF.⁷⁴⁻⁷⁶

Il modello di partenza per la simulazione del complesso recettore/peptide modello, condotte a 300 K in soluzione, è stato costruito utilizzando il programma Insight II. Durante la fase di minimizzazione e di dinamica molecolare il recettore è stato tenuto fisso, tranne per i residui distanti dall'elica del VEGF entro i 4.5 Å. La dinamica molecolare in solvente è stata condotta per 100 ps con *step* di 0.5 fs per la prima fase di equilibratura del sistema, e per ulteriori 100 ps senza *rescaling* della velocità per studiare il comportamento del sistema.

1.6.2 STRATEGIE DI SINTESI E CONDIZIONI SPERIMENTALI

Le sintesi dei peptidi progettati sono state effettuate tutte in fase solida con chimica Fmoc su scala 0.03 mmol, utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi ADVANCED CHEMTECH 348 Ω e, come supporto solido, la resina *Rink-Amide MBHA* (grado di sostituzione 0.59 mmol/g) che rilascia il peptide con l'estremità carbossilica ammidata.

Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Cys(Trt)-OH
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-Gly-OH
Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Leu-OH
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Mtt)-OH	Fmoc-Met-OH
Fmoc-Phe-OH	Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Ser(tBu)-OH
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Fmoc-Trp(Boc)-OH	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-Val-OH		

La fase di deprotezione dell' N-terminale di ogni amminoacido dal gruppo Fmoc è stata effettuata trattando la resina-peptide con una soluzione di piperidina in DMF (30:70 v/v), due volte per un tempo di 10 min.

Nella fase di accoppiamento, per ogni ciclo sono stati impiegati, rispetto alla scala di sintesi, 4 eq di Fmoc-amminoacido, 3.9 eq di TBTU 0.45 M in DMF, 3.9 eq di HOBt 0.45 M in DMF ed 8 eq di DIPEA 2 M in NMP. Ogni ciclo è stato condotto per un tempo di 45 min ed è stato ripetuto 2 volte, nelle stesse condizioni, per ciascun amminoacido.

Dopo ogni ciclo di accoppiamento è stata effettuata una reazione di acetilazione per bloccare i gruppi amminici che non hanno reagito nella precedente fase. La reazione è stata eseguita trattando la resina-peptide con una soluzione di anidride acetica e piridina in DMF (4.7:4:91.3 v/v/v), due volte per 10 min.

Ogni *step* è stato seguito da 5 lavaggi di 1 min con DMF.

Alla fine della sintesi il gruppo Fmoc terminale è stato rimosso dal gruppo amminico, ed è stata eseguita l'acetilazione finale a cui sono seguiti una serie di lavaggi della resina con DMF, DCM, MeOH anidro ed etere etilico.

Nel caso dei peptidi da fluoresceinare, prima del distacco dalla resina, è stata eseguita la deprotezione selettiva della Lys¹⁴ dall'Mtt mediante ripetuti trattamenti della resina-peptide con una soluzione 1% TFA/5% TIS in DCM, fino a completa scomparsa della colorazione gialla indicativa della presenza del gruppo Mtt. E' stata, quindi, effettuata la fluoresceinazione della Lys deprotetta trattando i peptidi con 2 eq di acido Fluorescein-5(6)-carbossiammidocaproico in presenza di 2 eq di HATU e 5 eq di DIPEA in DMF. La reazione è stata lasciata proseguire per l'intera notte.

Il distacco dei peptidi dalla resina è stato effettuato mediante trattamento con una miscela TFA/TIS/H₂O/EDT (94.5:1:2.5:2.5 v/v/v/v) per 3h a temperatura ambiente.

La resina è stata, quindi, separata dalla soluzione per filtrazione e lavata ripetutamente con TFA. Il filtrato e i lavaggi sono stati poi riuniti e concentrati. I peptidi grezzi sono stati precipitati con etere etilico a 0 °C. I precipitati sono stati quindi seccati, disciolti in una miscela di H₂O/CH₃CN e liofilizzati.

I peptidi grezzi sono stati analizzati e purificati mediante RP-HPLC. Tutte le analisi di tipo analitico sono state eseguite su un cromatografo liquido serie Hewlett-Packard Serie 1100 collegato ad un rivelatore UV e ad un autocampionatore. Sono stati utilizzati una colonna Phenomenex Juppiter C₁₈ (4.6 x 250 mm, 5µm, 300 Å) e, come eluenti, H₂O/0.1% TFA (eluente A) e CH₃CN/0,1% TFA (eluente B). L'analisi cromatografica è stata effettuata adoperando un gradiente lineare che va dal 20% al 80% dell'eluente B in 30 min (variazione di 2% di B al min) ad un flusso di 1 ml/min.

Le purificazioni sono state condotte su uno SHIMADZU LC-8A collegato ad un rivelatore UV SPD-10A, usando una colonna Vydac 218TP C₁₈ (15 µm, 22x250 mm) con gli stessi eluenti e gradienti impiegati nella scala analitica e con una velocità di flusso di 20 ml/min

Gli spettri di massa sono stati effettuati su uno spettrometro MALDI-TOF Voyager-DE della Perseptive Biosystem utilizzando come matrice l'acido α-ciano-4-idrossicinnamico e come standard l'insulina bovina.

1.6.3 DICROISMO CIRCOLARE: APPARECCHIATURE E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE

Spettroscopia di Dicroismo Circolare

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata a 20°C con uno spettropolarimetro Jasco-J715. I dati sono stati raccolti utilizzando una velocità di scansione pari a 10 nm/min, una larghezza di banda di 2.0 nm ed una costante di tempo di 16 sec. Le scansioni sono state effettuate da 260 a 190 nm usando celle di quarzo da 0.1 cm. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone fosfato 5 mM a pH=7, utilizzando soluzioni di peptidi con concentrazione 50 µM. Le intensità delle bande CD sono state espresse come ellitticità molare per residuo, calcolata dividendo l'ellitticità molare totale per il numero di residui amminoacidici delle molecole in esame.

Spettroscopia UV-Vis

Gli spettri UV-Vis sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Jasco V-550, adoperando celle di quarzo di cammino ottico di 1 cm (Hellma). Tutti gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 200-400 nm, con una velocità di scansione pari a 100 nm/min e una larghezza di banda di 1 nm.

I reagenti utilizzati per la preparazione dei campioni sono gli stessi utilizzati per l'acquisizione degli spettri mediante dicroismo circolare.

1.6.4 NMR: CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE

I peptidi MA ed MK sono stati sciolti ad un pH di 6.5 e 5.5 rispettivamente in 90% di H₂O and 10% D₂O (v/v) per avere una concentrazione finale della soluzione di circa 1.0×10^{-3} M. Esperimenti bidimensionali, quali il DQF-COSY, TOCSY e NOESY sono stati registrati su uno spettrometro Varian Inova 600 MHz alla temperatura di 298 K.

La soppressione dell'acqua è stata ottenuta tramite le sequenze *Double Pulsed Field Gradient Spin Echo*. Per ogni peptide è stato usato un *mixing time* di 70 ms per il TOCSY e 250 ms per il NOESY. Gli spettri DQF-COSY sono stati acquisiti con 4096 punti di dati nella dimensione diretta e 500 incrementi con 64 scansioni in modo da aumentare la risoluzione e convertire la misura delle costanti di accoppiamento $^3J_{\text{HNH}\alpha}$.

Il processing degli spettri è stato effettuato impiegando il software PROSA⁷⁷, mentre l'analisi e l'assegnazione degli spettri sono state eseguite mediante il software CARA.

La dipendenza dalla temperatura dei chemical shifts dei protoni ammidici scambiabili è stata misurata mediante spettri 2D TOCSY e mediante spettri monodimensionali NMR registrati a cinque temperature diverse 298, 301, 304, 307, and 310 K. Gli spettri sono stati calibrati sul segnale dell' HDO prendendo in considerazione lo shift della temperatura di riferimento dati dall'equazione $\delta_{\text{1H(T)}} = 5.060 - 0.0122T + (2.11 \times 10^{-5})T^2$ dove T è espressa in °C.

Gli esperimenti DOSY⁷⁸ (*Diffusion Ordered SpectroscopY*) sono stati eseguiti utilizzando una sequenza di eco stimolato (*stimulated-echo*) che incorpora impulsi a gradiente bipolare e un ritardo per le correnti parassite (*longitudinal eddy current delay*) (BBP-LED). La forza del gradiente è stata aumentata in maniera logaritmica in 15 *step*, con un tempo di diffusione di 100 ms e *longitudinal eddy current delay* a 5 ms.

Il coefficiente di diffusione del peptide MA e del peptide MK sono stati ottenuti eseguendo un *fitting* delle intensità dei picchi maggiormente risolti, mediante l'equazione $I = I_0 \exp[-\gamma^2 g^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3)]$, dove γ è il rapporto giromagnetico, e g, δ , Δ sono l'ampiezza, la durata e la separazione di un'unica coppia di impulsi di gradiente, rispettivamente.

1.6.5 TEST BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI

SAGGIO FLUORIMETRICO DELL'ATTIVITA' DI CASPASI 3

L'analisi è stata condotta come riportato di seguito:

- ↳ le cellule HUVEC sono state piastrate in duplicato alla densità di 1.0×10^5 cellule/cm² con EGM-2 (FBS 2%, Idrocortisone, hFGF-B, VEGF, acido ascorbico, hEGF, GA-1000, eparina) in multiwell da sei e incubate a 37°C, 5% CO₂
- ↳ dopo 24 ore le cellule sono state lavate con HBSS e incubate per 30 min con EBM-2 (eparina 0.1%, BSA 0.1%) contenente i peptidi alla concentrazione di 20 ng/ml
- ↳ dopo 30 min le cellule sono state incubate per 4 ore in presenza di VEGF alla concentrazione di 20 ng/ml

L'attività della caspasi 3 è stata determinata per via fluorimetrica in estratti citosolici di cellule Jurkat attraverso l'analisi del rilascio di 7-amino-4-metilcumarina (AMC) dalla N-acetil-DEVD-AMC, substrato specifico della caspasi:

- ↳ 3×10^6 cellule sono state lisate in *caspase 3 reaction buffer* 1X (10mmol/l Tris pH= 7.5, 130 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 10 mmol/l NaPi and 10 mmol/l NaPPi)

- ↪ 100 µg/ml di proteina sono stati incubati con il substrato 3 µM (BD) in un buffer contenente 20 mmol/l HEPES (pH 7.5), 10% glicerolo e 2 mmol/l ditiotreitolo (DTT) a 37°C per 3h
- ↪ il rilascio di AMC è stato monitorato attraverso analisi spettrofluorimetrica con un raggio d'eccitazione di 380 nm ed una lunghezza d'onda della radiazione di emissione di 430-460 nm
- ↪ a partire dai risultati ottenuti è stata calcolata la percentuale di "rescue".

SAGGI DI *BINDING* MEDIANTE TECNICA FACS

Determinazione della immunofluorescenza di superficie:

- ↪ 2×10^6 cellule sono state raccolte, centrifugate a 600 g per 5 min e lavate 2 volte in PBS 1X
- ↪ il lisato ottenuto è stato risospeso in 200 µmol di PBS 1X (Cambrex Bio Science, Belgium), a cui è stato aggiunto l'anticorpo primario ad una concentrazione di 1 µg/ml, e incubato a 4°C per 1h
- ↪ dopo 2 lavaggi in PBS 1X, le cellule sono state incubate a 4°C per 1h con l'anticorpo secondario policlonale (*goat anti-mouse IgG*) coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC) (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) ed analizzate mediante citofluorimetria a flusso (FACSCalibur, BD)
- ↪ i dati sono stati elaborati mediante il programma CellQuest program (BD Biosciences).

Determinazione della fluorescenza accoppiata alle molecole testate:

- ↪ le cellule HUVEC sono state tripsinizzate e risospese alla densità di 3×10^5 cellule/cm² in EBM-2 contenente 0.1% di eparina e 0.1% di BSA

- ↳ il lisato cellulare è stato incubato in ghiaccio per 5 min rispettivamente con il peptide MA *scramble* fluoresceinato (1 µg/ml), con il peptide MA fluoresceinato (1 µg/ml) e con la miscela peptide MA (1 µg/ml) e concentrazioni variabili di *human recombinant* VEGF (da 20 a 0.002 µg/ml), infine analizzato in citofluorimetria a flusso (FACSCalibur, BD)

- ↳ i dati sono stati elaborati mediante il programma CellQuest program (BD Biosciences).

SAGGI DI INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE CHINASI ERK1/2.

Fluorescenza: Le cellule sono state incubate con quantità saturanti di reagenti coniugati alla fluoresceina isocianato e con gli altri reagenti indicati 5 min a 4 °C al buio. Dopo lavaggi con PBS le cellule son state risospese in PBS ed analizzate con citofluorimetria di flusso FACS Scan (Becton Dickinson).

Western blotting: I lisati proteici delle cellule sono stati posti in un buffer (2% di sodio dodici solfato; 10% di glicerolo; 2 % di mercaptoetanolo e 60 mM tris HCl pH 6.8 in acqua dmineralizzata su ghiaccio)

I lisati sono stati fatti correre su 12% gel SDS page e trasferiti elettroforeticamente alla nitrocellulosa. Le macchie di nitrocellulosa sono state bloccate con il 5% di BSA in un buffer di *Tris Buffer Saline Tween-20* (TBST) [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 500 mM NaCl, e 0.01% Tween 20] ed incubati con anticorpo primario in TBST -5% durante tutta la notte a 4°C. L'immunoreattività è stata seguita dalla incubazione sequenziale con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi da rafano ed i reagenti di chemiluminescenza aumentati seguendo i protocolli standard (Amersham Bioscience,UK).

Analisi statistica : l'analisi statistica e' stata condotta usando la versione GraphPad prism 4.00 per Windows, Graphpad Software, San Diego, CA.

2. NUOVI POTENTI PEPTIDI CICLICI CON ATTIVITA' ANTITUMORALE

2.1 GLI AGENTI INTERCALANTI

In natura esistono una larga classe di molecole aromatiche policicliche capaci di intercalarsi negli spazi tra due coppie adiacenti di basi. L'azione dell'intercalazione induce cambiamenti strutturali locali sul DNA in special modo per ciò che riguarda il disavvolgimento della doppia elica e l'allungamento del filamento di DNA. Queste modifiche strutturali possono comportare un ritardo o un'inibizione delle fasi di trascrizione e replicazione della macromolecola di DNA, agendo in questa maniera come inibitori di specifici enzimi come la topo isomerasi II, la topo isomerasi I e le replicasi

Tra i più noti agenti intercalanti vanno ricordati ad esempio la 9-amminoacridina ed i suoi derivati che si legano reversibilmente al DNA mediante l'istaurazione di legami deboli come forze di Van der Waals, interazioni idrofobiche e legami ad idrogeno^{79,80}. Da studi condotti in esperimenti su batteri e batteriofagi è stata individuata l'attività principale di questi agenti intercalanti ed è stato notato che la loro attività mutagenica si esplica in particolar modo sulle sequenze di DNA ripetute. In ogni modo, nelle cellule dei mammiferi, essi sono dei deboli clastogeni⁸¹ e non sembrano mostrare un'alto numero di attività mutagenica. Quando i gruppi dell'acridina agiscono per legare altre molecole al DNA, si nota una più ampia attività mutagenica, (relativa alla sostituzione delle paia di basi e relative alla mutagenesi del frameshift nei batteri e nelle cellule dei mammiferi) Anche gli effetti clastogenici (danni cromosomici) sono maggiori.

Altri agenti intercalanti noti sono quelli appartenenti alla famiglia dei monosaccaridi antracicline⁸² e agliconi. Tra questi vanno menzionati la doxorubicina e la daunorubicina

che presentano una certa cardiotoxicità, dovuta probabilmente allo stress ossidativo sul muscolo cardiaco non protetto.

Ferguson⁸³ ed altri hanno esteso il loro studio per valutare l'azione mutagenica esercitata da diacridine e dichinoline, mettendo in evidenza che per quanto queste sostanze siano bisintercalanti e dunque aumentano notevolmente l'attività di *binding* delle molecole di DNA, non sono in grado di indurre attività mutagenica in specifiche linee cellulari.

In ogni modo rispetto agli agenti monointercalanti, i farmaci antitumorali che sono composti di due monomeri planari intercalanti dovrebbero presentare una più alta affinità per il DNA e prolungare il tempo di residenza del farmaco nel DNA rispetto al singolo monomero grazie al favorevole contributo entropico che ne deriva dopo il legame del primo agente intercalante.

Agenti chimici bisintercalanti sono ad esempio la bis (benzoisochinoline) LU 79553⁸⁴ e la DMP 840⁸⁵; bis(benzofuroisochinoline) come la BisBFI⁸⁶ e MCI335⁸⁷. In particolare la LU 79553 ha mostrato una potente attività antitumorale ed è stata testata in fase clinica per il trattamento di tumori solidi, mentre ad esempio la DMP 840 ha mostrato alti livelli di attività antitumorale e si trova adesso in fase clinica di studio 3.

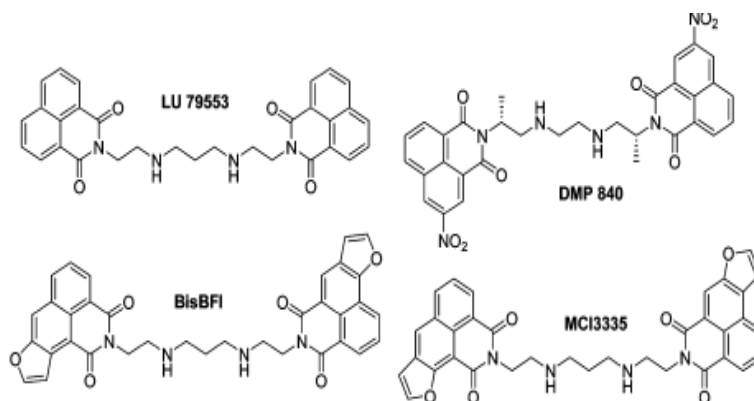


Fig.1 : Struttura chimica della LU 79553, DMP 840; BisBFI; MCI3335, serie di agenti bis intercalanti.

2.2 AGENTI INTERCALANTI DI ORIGINE NATURALE

Accanto agli agenti intercalanti sopracitati, esistono altri agenti di origine naturale, quali la Triostina A⁸⁸, l'echinomomicina⁸⁹, la Tiocorallina⁹⁰ che sono octadepsipeptidi simmetrici biciclici di origine marina, ma appartenenti ad una differente classe di actinomiceti (Fig 2).

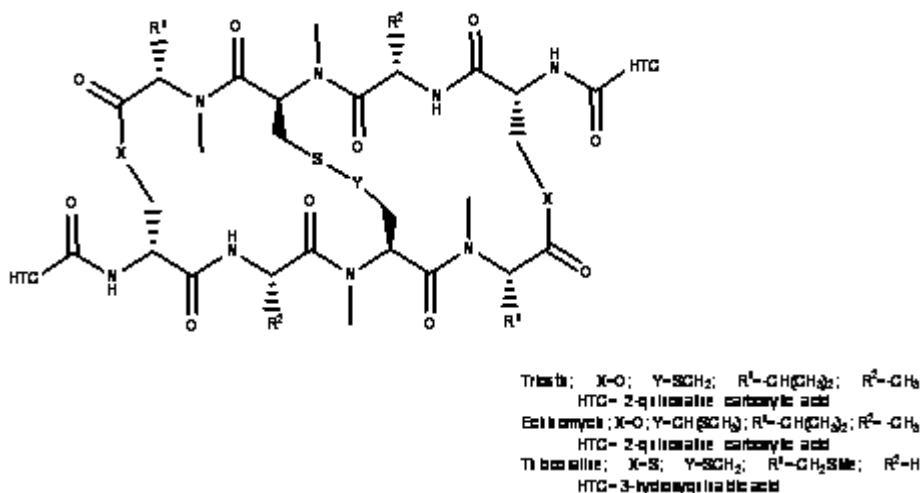


Fig 2 : Struttura generale dei depsipeptidi con proprieta' antitumorali.

Questo gruppo di peptidi sono caratterizzati dall'avere

- strutture cicliche,
- simmetria C₂,
- legami esterei o tioesterei alla parte terminale della catena peptidica
- ponti disolfuro o analoghi nel centro della catena peptidica,
- presenza di differenti aminoacidi N-metilati
- amminoacidi non naturali della serie sterica D.

Le presenza dei due anelli aromatici eterociclici situati sulla funzione terminale amminica, conferisce a questa famiglia di peptidi la capacita' di legarsi al solco minore del DNA⁹¹ mediante bisintercalazione, alterando cosi' il ciclo vitale della cellula

2.3 LA TIOCORALLINA

La tiocorallina è un potente tiodepsipeptide isolato dal micelio di un actinomicete marino, *Micronospora* sp L-13-ACM2-092^{90,92} che ha mostrato di avere una potente attività antitumorale nel saggio citotossico su cellule leucemiche di topo e di inibire l'allungamento del DNA ad opera della polimerasi α nelle cellule neoplastiche di colon umano ad una concentrazione che blocca la progressione del ciclo cellulare e la clonogenicità⁹³. (Fig.3).

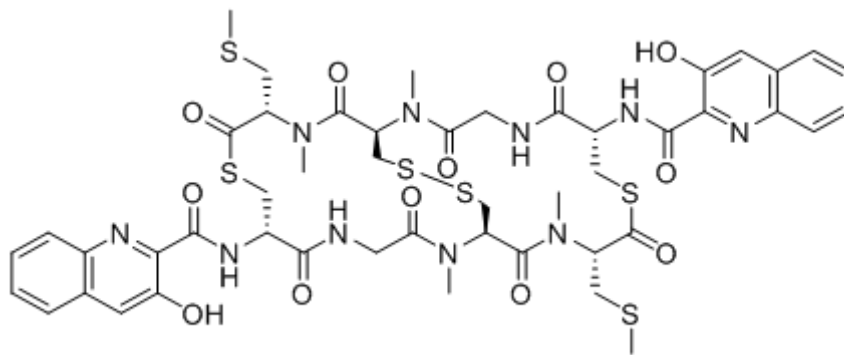


Fig. 3 Struttura della Tiocorallina

In particolare la tiocorallina è un depsipeptide biciclico caratterizzato da:

- * 2 catene tetrapeptidiche simmetriche e antiparallele unite attraverso due funzioni tioesteree.
- * Un ponte disolfuro che conferisce rigidità alla struttura.
- * Due unità di acido 3-idrossichinaldico (3HQA), situate agli estremi N-terminali delle due catene.

Le catene tetrapeptidiche contengono diversi residui non proteinogenici, N-Me amminoacidi e a configurazione D, ed in massima parte cisteine.

Ogni catena è costituita da:

- Una cisteina a configurazione D che è un punto di ramificazione del peptide: il gruppo α -amminico è impegnato in un legame ammidico con l'acido 3-idrossi chinaldico, la funzione tiolica è coinvolta nel legame tioestereo.
- Una cisteina modificata per due gruppi metilici, uno nel gruppo amminico e l'altro in quello tiolico.

- Una cisteina metilata nella funzione amminica anch'essa punto di ramificazione, il cui gruppo tiolico forma un ponte disolfuro con la stessa cisteina situata nella catena opposta.
- Una glicina.

2.3.1 ATTIVITA' ANTITUMORALE DELLA TIOCORALLINA

La tiocorallina è un potente antitumorale e inibisce il 50% della crescita cellulare a una concentrazione di $IC_{50} = 2.4 \pm 1.7$ nM.⁹⁴

cell line	cytotoxic activity (nM)		cell line	cytotoxic activity (nM)	
DU-145	GI ₅₀	1.9	K-562	GI ₅₀	1.3
	TGI	6.4		TGI	4.6
	LC ₅₀	1481.3		LC ₅₀	9.2
LN-CaP	GI ₅₀	3.0	PANC-1	GI ₅₀	2.5
	TGI	5.0		TGI	82.5
	LC ₅₀	14.2		LC ₅₀	378.0
IGROV	GI ₅₀	1.9	HT-29	GI ₅₀	3.9
	TGI	11.1		TGI	73.6
	LC ₅₀	1257.1		LC ₅₀	6293.3
SK-BR-3	GI ₅₀	2.2	LoVo	GI ₅₀	7.2
	TGI	8.9		TGI	263.1
	LC ₅₀	30.8		LC ₅₀	283.5
SK-MEL-28	GI ₅₀	3.0	LoVo-Dox	GI ₅₀	212.3
	TGI	14.0		TGI	2380.0
	LC ₅₀	50.3		LC ₅₀	nd
A-549	GI ₅₀	4.8	HeLa	GI ₅₀	1.3
	TGI	19.3		TGI	4.7
	LC ₅₀	95.6		LC ₅₀	22.6

Fig 4 Attività citotossica della tiocorallina

Studi realizzati su una serie di 12 differenti linee cellulari tumorali umane, hanno dimostrato che la tiocorallina possiede una elevata attività antiproliferativa *in vitro*, in particolare contro tumori della prostata (DU-145 e LN-CaP), delle ovaie (IGROV), della mammella (SK-BR3), pancreas (PANC-1), colon (HT-29, LoVo e LoVo-Dox), cervice (HeLa), leucemia (K-562) e melanoma (SK-MEL-28).

L'attività biologica della tiocorallina si deve alla formazione di un complesso ternario DNA-tiocorallina-polimerasi α , durante la tappa di replicazione del DNA, che impedisce l'allungamento della catena.⁹³

Nel 2007 è stata pubblicata la struttura cristallina del complesso tra la tiocorallina e un frammento di DNA a doppia elica.⁹⁴

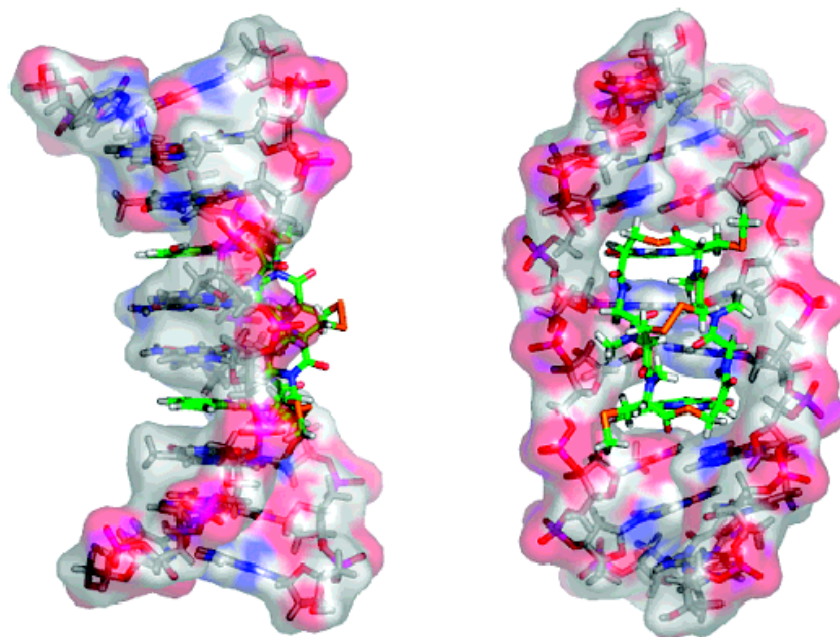


Fig.5 Struttura cristallina del complesso tiocorallina DNA

La struttura peptidica complessa e la presenza dei due eterocicli forniscono alla tiocorallina la possibilità d'unione al polimero polinucleotidico: la geometria della molecola, con le unità eterocicliche che giacciono parallele tra loro e sono proiettate in un piano perpendicolare a quello dello scheletro peptidico, ne favorisce l'inserimento tra le basi azotate mediante interazione di π -stacking. La distanza tra le due unità eterocicliche, determinata principalmente dal numero di α -amminoacidi che compongono il ciclo e costante in tutti i membri della famiglia, è tale da accogliere due coppie di basi (GC-CG). Inoltre la presenza di amminoacidi N-metilati introduce una forte tensione sterica allo scheletro ciclico e, allo stesso tempo, inibisce la formazione di legami idrogeno intramolecolari permettendo la formazione di due ponti a idrogeno tra l'idrogeno ammidico delle due glicine e l'N3 delle due guanine interne allo spazio delimitato dai due eterocicli.

Data la sua capacità antitumorale, essa può essere considerata un eventuale target da sintetizzare, tuttavia presenta una scarsa solubilità e una bassa stabilità nel plasma umano, il che preclude il suo utilizzo come agente terapeutico.

Per migliorare la sua farmacocinetica è necessario l'apporto di modifiche nella struttura della molecola, allo scopo di aumentare solubilità e stabilità, mantenendo l'attività biologica.

2.3.2 LA TIOCORALLINA COME FARMACO

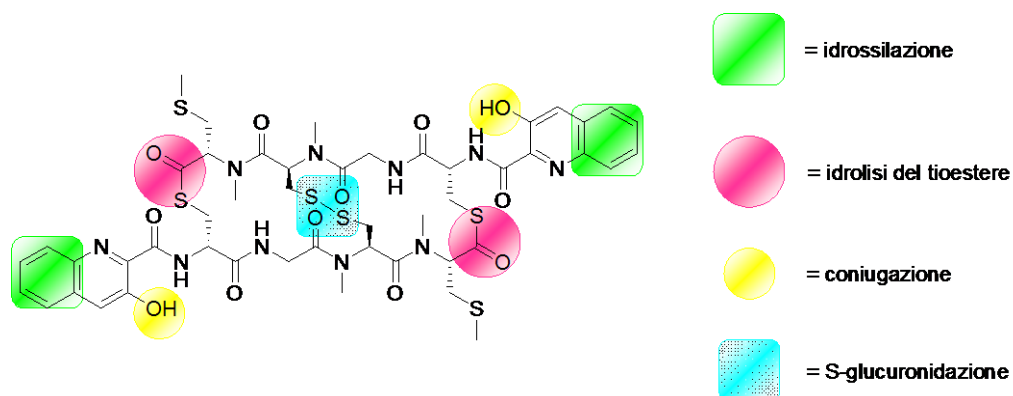


Fig. 6 :Siti di biodegradazione della tiocorallina

La tiocorallina presenta una scarsa solubilità e una bassa stabilità nel plasma umano, il che preclude il suo utilizzo come agente terapeutico. Brandon e suoi collaboratori⁹⁵ realizzarono studi di farmacocinetica, metabolismo e tossicologia sulla tiocorallina per conoscerne il potenziale farmacologico, determinando che questo depsipeptide ciclico presenta una vita media, nel plasma umano, relativamente corta (4,3 ore) e presenta diversi siti suscettibili a degradazione per via enzimatica, per idrolisi, per ossidazione e per coniugazione. Il punto meno stabile risulta il legame tioestereo che è facilmente idrolizzabile nel plasma umano.

Per migliorare la sua farmacocinetica è dunque necessario l'apporto di modifiche nella struttura della molecola, allo scopo di aumentare solubilità e stabilità, mantenendo l'attività biologica.

Nella progettazione di analoghi della tiocorallina sviluppata presso i laboratori in Spagna, si è pensato a una sostituzione di tipo conservativo: lo scheletro strutturale della molecola si mantiene invariato mentre viene apportata una modifica alla funzione tioesterea, cui si deve l'eccessiva suscettibilità a degradazione. L'idea è di sostituire un'ammide negli analoghi azatiocorallina e azatiocorallina N-metilata⁹⁶.

Il nuovo legame ammidico, più resistente di quello tioestereo, conferirebbe anche una maggiore solubilità alle nuove molecole.

La stabilità della funzione ammidica è un buon punto di partenza per la sintesi di una nuova classe di derivati della tiocorallina con potenziale attività antitumorale, perché permette di impiegare una strategia sintetica più semplice, rispetto a quella che richiederebbe il peptide originale.

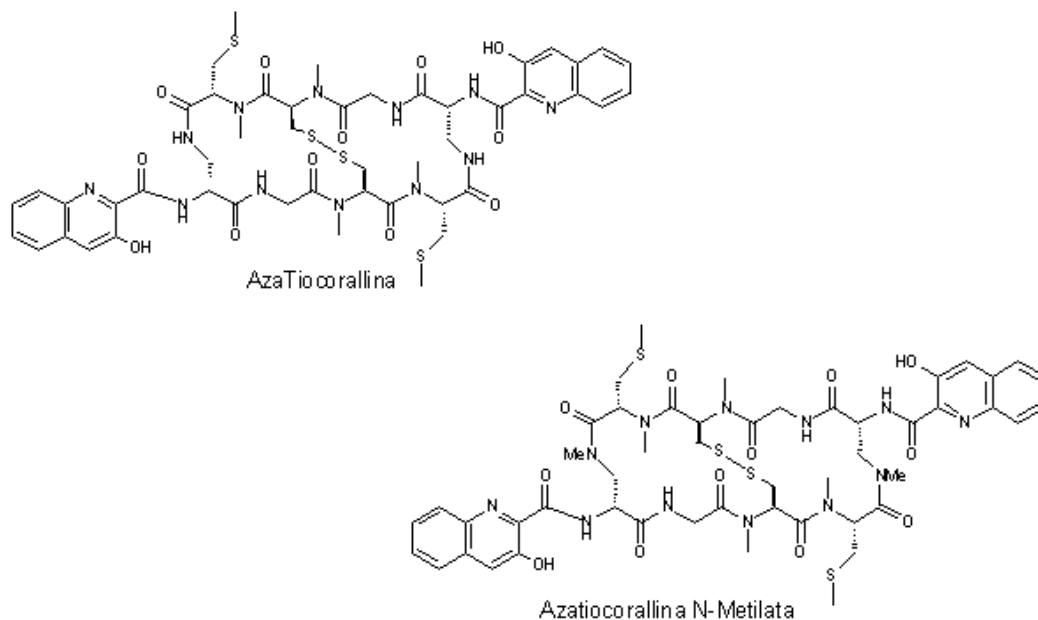


Fig. 7 Struttura degli analoghi della tiocorallina:rispettivamente l' azatiocorallina e l'azatiocorallina N-Metilata

In generale però la sintesi di questi depsipeptidi si è presentata difficile per diversi fattori. L'elevato numero di amminoacidi non proteinogenici richiede un lavoro di sintesi precedente dei building blocks convenientemente protetti nelle funzioni amminiche e nelle catene laterali, così come la presenza di unità di acido 3-idrossichinaldico. La rigidità della struttura biciclica richiede cautela nella scelta della strategia sintetica (se si sbaglia il punto di ciclizzazione la reazione non avviene) ed infine la presenza di numerosi N-Me amminoacidi, oltretutto consecutivi, tra cui vi è la presenza di NMe-Cys(Me) impone lo studio di condizioni differenti da quelle comunemente utilizzate nella sintesi peptidica.

La NMe-Cys(Me) in ambiente basico, è soggetta a β -eliminazione per dare la deidroalanina (Dha). Questo richiede dunque un delicato equilibrio nelle condizioni da utilizzare durante i coupling poichè mentre la NMe-Cys(Me) richiederebbe condizioni neutre per evitare la reazione secondaria di eliminazione a deidroalanina, il coupling di N-Me amminoacidi deve essere attuato in condizioni più drastiche, attraverso l'impiego di basi forti.⁹⁷

Gli N-Me amminoacidi possono essere facilmente coinvolti in reazioni secondarie: quali la reazione di racemizzazione e la reazione di formazione di dichetopiperazine (DKP)⁹⁸.

La reazione di racemizzazione può aver luogo nel corso dell'attivazione di N-Me amminoacidi protetti nella funzione amminica, durante la quale è possibile la formazione di 5-oxo- Δ^2 -ossazoloni, caratterizzati da una struttura pseudoaromatica⁹⁹, che possono cedere un protone dando origine a racemizzazione (Fig 8)

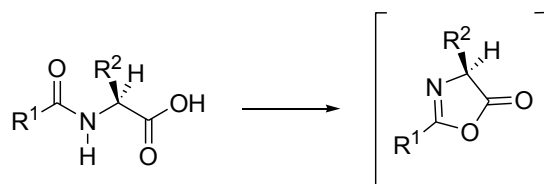


Fig 8 Formazione del 5-oxo- Δ^2 -ossazolone

La protezione dell'amminoacido in forma di carbammato riduce il rischio di racemizzazione mentre il gruppo N-acil lo aumenta.

Il gruppo Fmoc è preferibile al Boc perché il Boc-ossazolone può decomporre a N-carbossianidride e polimerizzare. (Fig. 9)

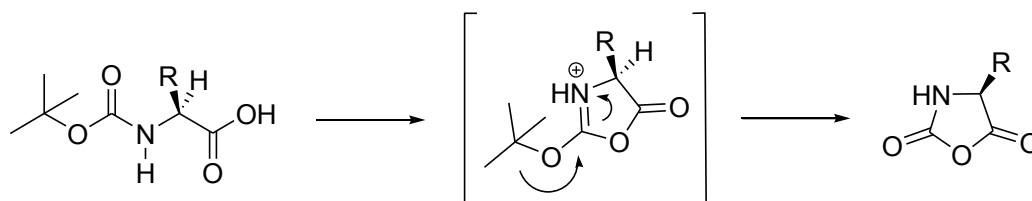


Fig. 9: Meccanismo di decomposizione del Boc-ossazolone a carbossianidride

Nella sintesi peptidica la formazione di dichetopiperazine¹⁰⁰ è una reazione molto frequente, soprattutto se si utilizza la chimica Fmoc e in particolare nella sintesi di peptidi con una funzione esterea in C-terminale, durante il passo di deprotezione a livello del secondo amminoacido. Quando sono presenti N-Me amminoacidi tale reazione è ancor più favorita dalla miglior nucleofilia dell'ammina secondaria, che prevale sull'ingombro sterico del gruppo Me. (Fig.10).

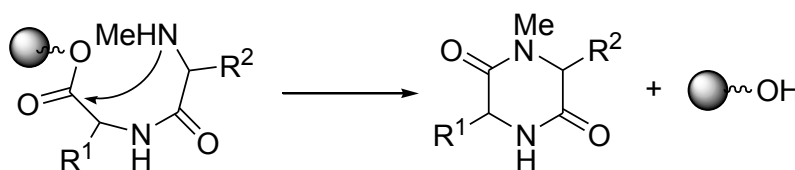


Fig.10: . Meccanismo di formazione di dichetopiperazine (DKP)

E' cruciale anche la scelta della resina da utilizzare e questo viene svolto sulla base non solo del costo della stessa, ma anche sulla possibilità di ridurre il rischio di formazione di dichetopiperazine (DKP). Ulteriori difficoltà risiedono nella presenza del ponte disolfuro che impone la scelta di gruppi protettori specifici e la scelta di una strategia sintetica ben precisa.

Generalmente la strategia di sintesi per un peptide ciclico si avvale di un sistema misto, fase solida e soluzione, e prevede l'incorporazione del primo aminoacido al supporto solido, l'elongazione graduale della catena per condensazione di un aminoacido per volta, la scissione del peptide lineare dalla resina e, infine, la reazione di ciclizzazione in soluzione. L'alternativa consiste invece nell'utilizzo di una strategia convergente.

Degli analoghi sintetizzati sono stati effettuati test biologici, e questi hanno mostrato possedere una certa attività antitumorale.

2.4 LA METILAZIONE DEGLI AMMINOACIDI: IMPORTANZA DELLE CISTEINE METILATE.

Gli amminoacidi N-metilati sono stati ritrovati in molti peptidi lineari e ciclici che presentano interessanti attività biologiche. Il sistema ecomarino è il punto di partenza per la ricerca di esempi di peptidi contenenti amminoacidi N-metilati: la keramamide e la jaspamide, l'alipeptina e non ultima la Tiocorallina con la sua classe di depsipeptidi ciclici¹⁰¹⁻¹⁰⁴ ne sono una chiara prova.

I peptidi che contengono amminoacidi N-metilati mostrano una serie di vantaggi maggiori rispetto a quelli che ne sono privi: una più alta stabilità metabolica, una maggiore idrofobicità e una struttura conformazionale più rigida, sono alcune delle peculiarità che si possono visibilmente ottenere. Nella sintesi di peptidi più volte si è ricorsi alla metilazione poichè in questo modo si può garantire una diminuzione della flessibilità della catena peptidica in crescita sulla fase solida e si possono sopprimere i legami ad idrogeno intermolecolari che sono causa di aggregazione del peptide^{105,106}. Un interessante esempio è rappresentato dalla cilingitide, un peptide ciclico basato sulla sequenza RGD con una valina N-metilata, di cui si sta valutando l'efficacia in studi clinici per il trattamento di un ricorrente glioma, un tumore altamente vascolarizzato del cervello^{107,108}.

Poichè gli amminoacidi mostrano un' estrema importanza nel campo della farmacologia, sono stati compiuti molti sforzi per cercare di migliorare i metodi sintetici previsti per la preparazione di amminoacidi N-metilati e che, ottimizzati, possono essere in qualche modo impiegati nella chimica dei peptidi. La cisteina è uno degli amminoacidi trifunzionali che desta maggiore interesse, poichè esso offre la possibilità di formare ponti disolfuro e legami tioesterei.

Inoltre tale amminoacido è un residuo chiave perchè mantiene le proteine nel loro stato foldato, che spesso è anche lo stato attivo¹⁰⁹. I ponti disolfuro forniscono la giusta rigidità conformazionale che permette alle proteine di assumere il corretto fold e nelle proteine con molte cisteine il *pathway* per il folding può essere determinato seguendo l'ordine in cui i ponti disolfuro si formano¹¹⁰.

Analoghi proteici che non sono foldati, sono generalmente inattivi, ma in alcuni casi essi possono essere causa di diverse malattie come il morbo di Alzheimer, Huntington e Parkinson¹¹¹. Nei piccoli peptidi che non tendono a foldare naturalmente la costrizione imposta dalla formazione del ponte disolfuro può migliorare sia l'attività biologica sia la resistenza alla proteolisi^{112,113}.

2.5 OBIETTIVI

In base agli studi effettuati sugli analoghi azatiocorallina ed al suo derivato N-metilato e al riscontro della loro attività biologica, è stato progettato lo schema strutturale di un nuovo analogo della tiocorallina, con l'obiettivo di migliorare la farmacocinetica e potenziare l'attività antitumorale.

In particolare si è deciso di porre l'attenzione su un nuovo analogo della Azatiocorallina N-Metilata, in cui la variante rispetto a quella riportata in figura 7 è consistita nell'inserimento dell'acido 2-chinossalin carbossilico (2-QXA) in luogo dell'acido 3-idrossichinaldico (3-HQA)

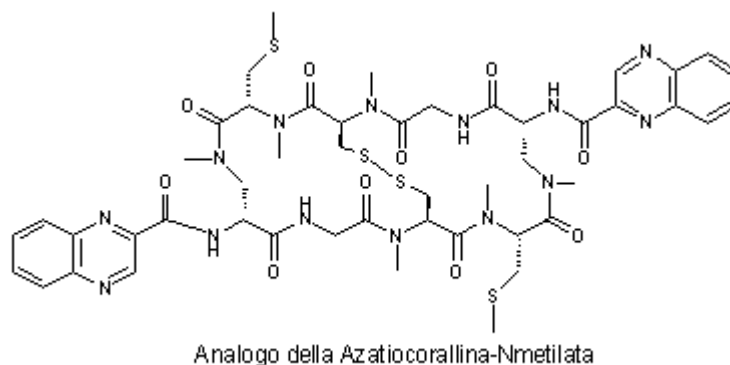


Fig.11 Nuovo analogo della Azatiocorallina N-Metilata in cui il nuovo etero ciclo è l'acido 2-chinossalin carbossilico

Il nuovo analogo sarà caratterizzato dallo stesso sistema biciclico della tiocorallina, in cui i due residui di D-Dap(Me) sostituiscono le due unità di D-Cys ed in cui l'eterociclo inserito sarà l'acido 2-chinoassallincarbossilico al posto dell'acido 3-idrossichinaldico.

Rispetto alla Azatiocorallina-NMetilata, invece la variante sarà costituita dalla presenza di un eterociclo differente.

L'introduzione di due ulteriori residui amminoacidici NMe può essere motivata da diversi fattori:

1. Come amminoacidi non proteinogenici e NMe, sono meno suscettibili ad attacco enzimatico;
2. La presenza dei due nuovi sostituenti metilici limita maggiormente la possibilità di formare legami idrogeno intramolecolari, favorendo la formazione di ponti idrogeno con le basi azotate del DNA e quindi migliorando la forza dell'interazione.

3. Al pari delle ammidi secondarie, esteri e tioesteri prediligono la conformazione *trans*, tuttavia la barriera energetica dell'interconversione conformazionale (isomeria cis/trans) è sensibilmente più alta per le ammidi secondarie. Nelle ammidi terziarie il rapporto tra gli isomeri è dettato dall'ingombro dei due sostituenti e generalmente l'isomero cis è più rappresentato. L'isomeria cis/trans potrebbe essere importante per la sua attività biologica (interazione con altre macromolecole biologiche, trasporto attraverso i compartimenti cellulari, etc).

L'obiettivo è quindi quello di pianificare e ottimizzare una strategia sintetica in fase solida ed in soluzione su larga scala per l'ottenimento del nuovo composto azatiocorallina N-metilata, un analogo della tiocorallina come potenziale farmaco antitumorale.

La strategia sintetica progettata, in cui si è cercato di ridurre il numero di passaggi sintetici in soluzione, è stata condotta secondo i seguenti criteri:

- ❖ sfruttare la naturale simmetria del peptide;
- ❖ evitare la formazione di dichetopiperazine interne e la racemizzazione al C-terminale
- ❖ migliorare il coupling tra amminoacidi consecutivi N-metilati evitando la loro possibile demetilazione
- ❖ migliorare il coupling con l'eterociclo preso in considerazione.
- ❖ ridurre la flessibilità della catena peptidica in crescita sulla fase solida mediante l'inserimento di un ponte disolfuro intermolecolare,
- ❖ migliorare la reazione di macrolattonziazione in soluzione.

2.6 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.6.1 SINTESI DELLE CISTEINE METILATE

La N-metil cisteina è stata trovata nei peptidi della tiocorallina ed analoghi e gioca un ruolo rilevante nella ramificazione⁹⁰. Poichè le cisteine N-metilate non sono commercialmente disponibili e poichè i metodi riportati per la loro metilazione utilizzano solo condizioni drastiche¹¹⁴ e non adeguate per la sintesi su larga scala è importante poter sviluppare un metodo versatile che ne consenta la sintesi, con pochi ed efficienti passaggi nei quali si possano evitare gli step di purificazione e che consentano di ottenere prodotti differentemente protetti sia alla funzione amminica che quella tiolica con buone rese. I building blocks così ottenuti serviranno per la sintesi dell'analogo dell' Azatiocorallina N-metilata, compatibilmente alle esigenze sintetiche.

La maggior parte delle procedure descritte per la formazione di NMe amminoacidi viene condotta in soluzione e solo una minima parte in fase solida. Una nuova metodica¹¹⁵ in questo caso è stata seguita per conseguire la sintesi dei due amminoacidi che saranno utilizzati nella sintesi dell'analogo dell'Azatiocorallina N-Metilata e che sono stati rispettivamente l'AllocNMeCys(Me)OH e la BocNMeCys(Acm)OH. Tale metodica prevede l'uso di metilioduro come agente di metilazione, NaH come base e THF come solvente.

Il primo residuo amminoacidico N-metilato da dover sintetizzare è stato l'AllocNMeCys(Me)OH ma per fare questo è stato necessario scegliere un opportuno precursore che soddisfacesse alcuni criteri.

Il precursore eletto è stato l' Alloc-Cys(Trt)-OH:

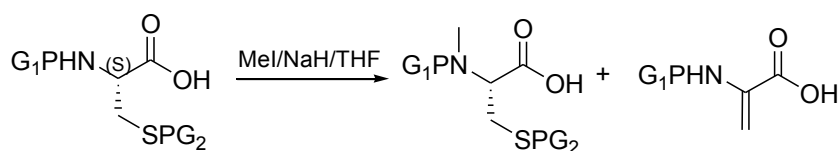
Per quel che riguarda la protezione α -ammino è stato scelto l'Alloc perchè:

- È compatibile con le condizioni basiche utilizzate nella N-metilazione
- Può essere convertito facilmente in altri gruppi protettori sia in soluzione sia in fase solida

Per la protezione della catena laterale, il gruppo funzionale è eletto è stato il Trt perché soddisfa i seguenti requisiti:

1. essere stabile alle condizioni di metilazione.
2. essere facilmente rimossa in soluzione
3. permettere l'interconversione ad altri gruppi protettori in catene laterale per ottenere un metodo robusto in modo da ricavare derivati della N- metilcisteina
4. essere ortogonale al gruppo protettore in posizione α dell'amminoacido.

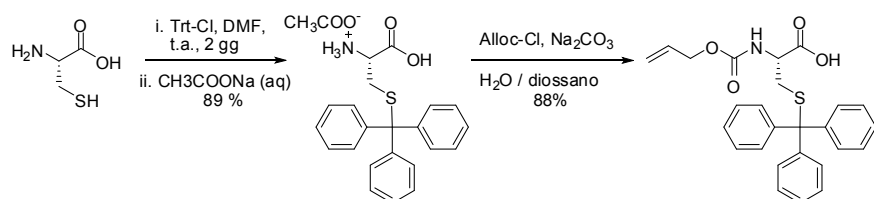
La funzione Trt inoltre evita la reazione di β -eliminazione che subirebbero le cisteine nelle condizioni basiche per portare alla formazione di deidroalanine (Dha) per il suo elevato ingombro sterico.



PG₁ ; PG₂=Gruppo protettore

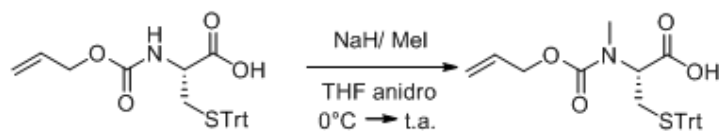
Schema 1: Reazione di eliminazione che si avrebbe in presenza di un gruppo protettore meno ingombrato del tritile.

La Alloc-Cys(Trt)-OH può essere preparata su larga scala mediante una reazione molto semplice a partire dalla cisteina cloridrato¹¹⁶ con una sintesi in soluzione che impiega due passaggi senza tappe di purificazione né degli intermedi né del prodotto finale (resa 63%).



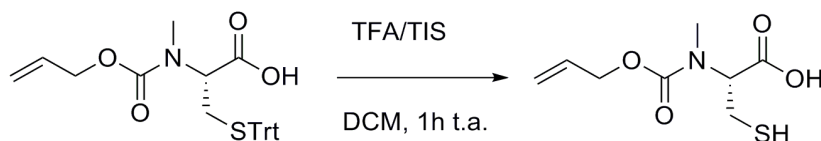
Schema 2: Illustrazione della reazione per la sintesi dell'Alloc-Cys(Trt)OH

La Alloc-Cys(Trt)-OH è stata sottoposta alle condizioni di N-metilazione in presenza di NaH (2.4 eq.) e MeI (3 eq.) in THF per 10 h a temperatura ambiente (Schema 3). La conversione è totale con resa dell'80 %



Schema 3: Reazione di metilazione dell' Alloc-Cys(Trt)OH

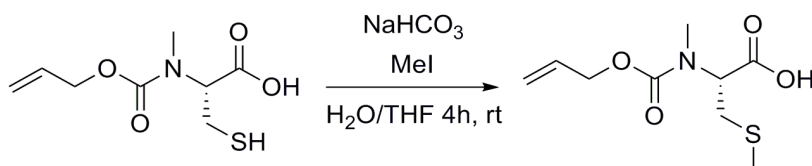
Per realizzare la rimozione del gruppo Trt e ottenere la funzione tiolica libera, la Alloc-NMeCys(Trt)-OH è stata trattata con TFA in presenza di triisopropilsilano in CH_2Cl_2 per 1 ora a temperatura ambiente. La AllocNMe-Cys-OH è stata ottenuta con resa quantitativa. È stato necessario l'uso di un forte scavenger come il TIS perché in presenza di scavenger più blandi la conversione che si osserva è minore, a causa della rialchilazione del gruppo Trt. (Schema 4):



Schema 4: passaggio sintetico per l' eliminazione del gruppo Trt

L'introduzione del gruppo protettore Me è stata realizzata senza la necessità di tappe di purificazione del derivato con la funzione tiolica libera, perché il trifenilmetano e l'eccesso di TIS non interferiscono nella seguente reazione di protezione.

La Alloc-NMeCys(Me)-OH è stato ottenuto con una resa del 78 % in condizioni blande in ambiente acquoso a pH neutro, con un leggero eccesso di MeI e senza passaggi di purificazione (Schema 5)

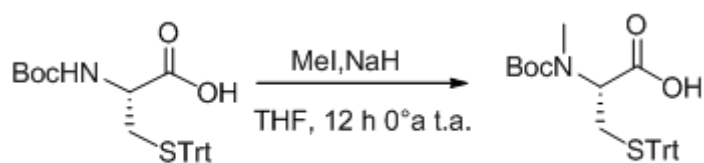


Schema 5 passaggio sintetico per l' ottenimento del prodotto AllocNMeCys(Me)OH.

Il secondo residuo di cisteina sintetizzato è stato il BocNMeCys(Acm)OH.

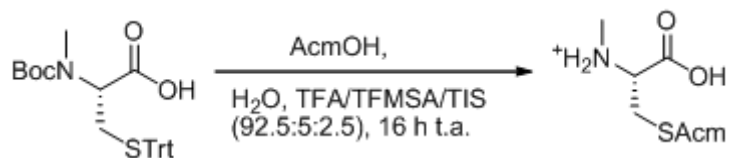
La sintesi di questo prodotto è stata condotta secondo una procedura molto conveniente che ha previsto l'utilizzo della Boc-Cys(Trt)-OH commercialmente disponibile. Il gruppo Boc può essere facilmente rimosso in condizioni acide, mentre il gruppo Trt evita la reazione di β -eliminazione della cisteina, come già accennato.

In particolare la Boc-Cys(trt)-OH è stata metilata alla funzione amminica con metilioduro (3 eq.) e NaH (2 eq) in THF per 12 ore da 0° a temperatura ambiente per ottenere la Boc-NMe-Cys(Trt)OH con una resa del 96% (Schema 6).



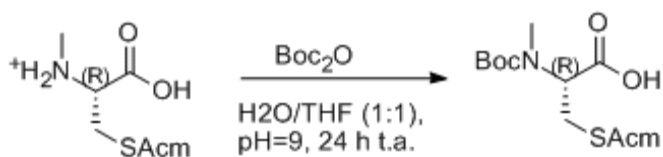
Schema 6 passaggio sintetico per l'ottenimento della cisteina metilata.

Successivamente l'amminoacido protetto è stato trattato con Acetoamidometanolo (3 eq.) in ambiente acido ed acqua [(TFA-TFMSA-TIS (92.5:5:2.5))] per 16 h a temperatura ambiente e simultaneamente sono stati rimossi sia il gruppo Boc che Trt. (Schema 7).



Schema 7 passaggio sintetico per la sintesi dell'intermedio NMeCvs(Acm)OH

L'intermedio ottenuto H-NMe-Cys(Acm)OH è stato trattato con Boc_2O (2 eq) in $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ mantenendo il pH intorno a 9 e lasciando proseguire la reazione per 24 h a temperatura ambiente. In seguito a successiva lavorazione in ambiente acido, ovvero mantenendo il pH intorno a 4 (Schema 8), condizione necessaria per allontanare l'anidride non reagita, si è ottenuto il prodotto finale con una resa del 90 % e che sarà impiegato per la sintesi successiva del depsipeptide.

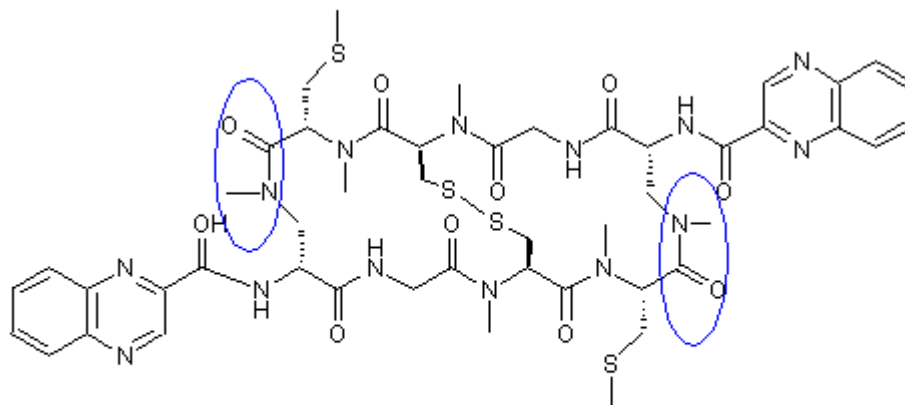


Schema 8 passaggi sintetico per la sintesi del prodotto Boc-NMe-Cys(Acm)OH.

Il gruppo Acm (acetoamidometanolo) è ortogonale al gruppo Boc e si allontana facilmente in seguito ad una reazione redox che è fatta avvenire su resina durante la sintesi dell'analogo della Azatiocorallina N metilata.

I passaggi sintetici illustrati sono stati condotti evitando qualsiasi step di purificazione e comunque si sono ottenute alte rese, segno evidente che la strategia può funzionare per la sintesi di N-metil cisteine su larga scala.

2.6.2 PROGETTAZIONE DELL' ANALOGO DELL'AZATICORAL LINA N-METILATA



Analogo della Azatiocorallina-N-Metilata in cui al posto dell'acido 3-idrossichinaldico è stata aggiunto l'acido 2- chinossallinicarbossilico (2QXA).

L'analogo della azatiocorallina N-metilata è un ottapeptide biciclico caratterizzato dalla presenza di due unità di acido 2-chinossallin carbossilico e un gran numero di amminoacidi NMe, 6 sugli 8 totali. .

La maggior parte degli amminoacidi impiegati non è commercialmente disponibile ed essi richiedono, perciò, un discreto tempo di preparazione.

Il peptide presenta una elevata rigidità, conferita sia dalla sua struttura biciclica, sia dai numerosi N-Me amminoacidi, che presentano tra l'altro una configurazione ben precisa, che va essenzialmente conservata.

Il rischio delle reazioni secondarie di racemizzazione e formazione di dichetopiperazine è aumentato dalla lunga sequenza di residui N-Me uno dei quali è la NMe-Cys(Me) che, nelle condizioni drastiche richieste per i coupling può dare β -eliminazione.

Gli amminoacidi utilizzati quali AllocNMeCys(Me)OH e BocNMeCys(Acm)OH possono essere facilmente metilati mediante le normali tecniche in soluzione¹¹⁵.

Il problema ancora più grosso è relativo alla presenza dei due residui di acido D-Dap(Me) da dover inserire, poiché la presenza della doppia funzione amminica impedisce l'utilizzo della reazione di metilazione selettiva in posizione β con le classiche tecniche in soluzione. La preparazione del D-Dap(Me) ha richiesto infatti condizioni particolari ed è stata conseguita attraverso il protocollo di Mitsunobu¹¹⁷ applicato alla fase solida.

Questa reazione impone drastiche condizioni ed è per questo che con l'intento di ovviare alla formazione di possibili sottoprodotti, il residuo D-Dap dovrà essere uno dei primi a dover essere accorpato alla catena peptidica.

L'eterociclo da introdurre anche influenza la scelta della strategia sintetica: esso potrebbe essere introdotto alla fine della sintesi in soluzione oppure accoppiato direttamente alla funzione amminica in catena laterale del D-Dap in seguito alla sua metilazione.

Nella progettazione della strategia sintetica si deve tener in conto del ponte disolfuro presente nel depsipeptide e che sarà conseguibile sulla base del gruppo protettore scelto per il gruppo tiolico della cisteina.

Non ultima e non meno importante è la reazione di macrolattoneizzazione che avviene in soluzione e alla quale deve essere dato il giusto peso.

La strategia sintetica, sviluppata sfruttando la normale simmetria della molecola, può essere così schematizzata (*Fig. 12*)

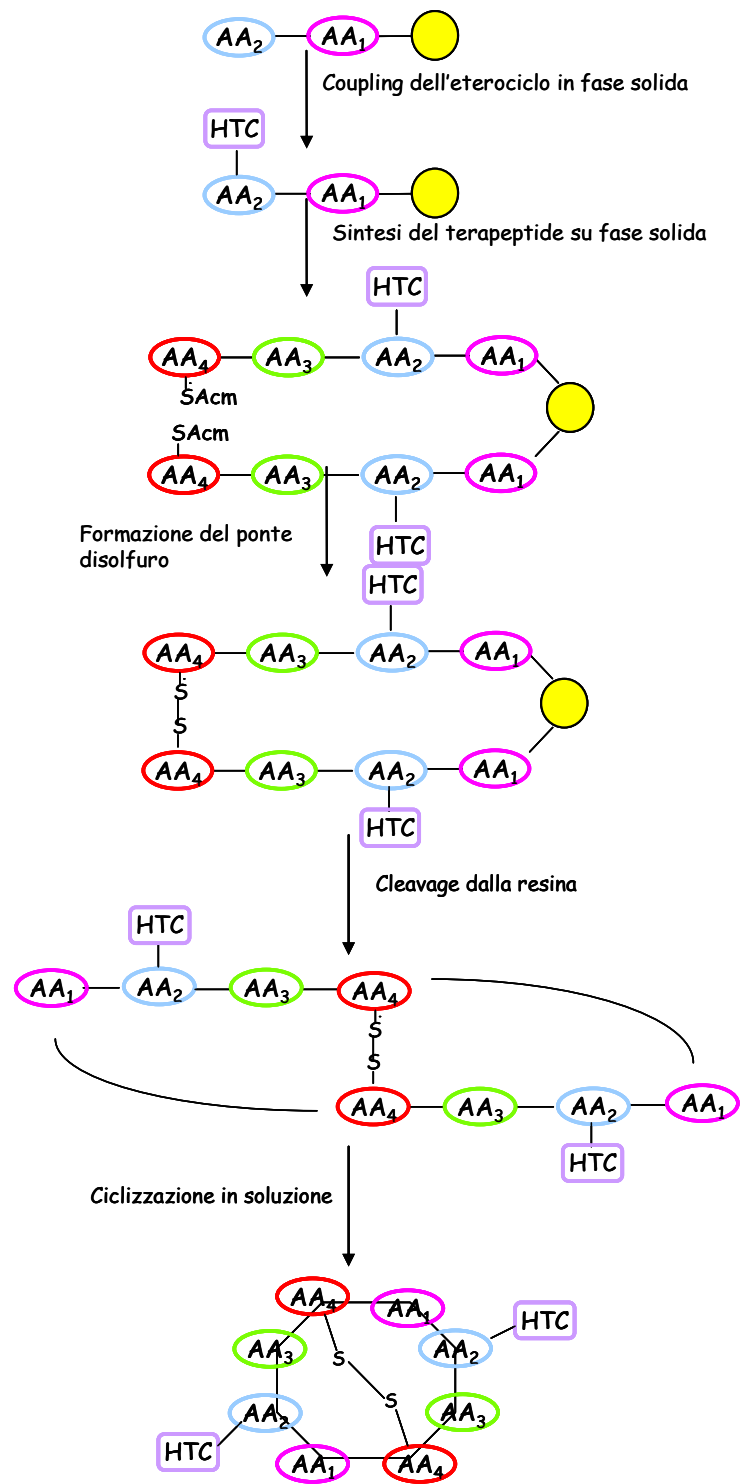


Fig. 12: Schema della strategia sintetica per l'analogo della Azatiocorallina N-metilata

2.6.3 SCELTA DEL SUPPORTO SOLIDO

Il supporto solido utilizzato è stato la resina 2-clorotritil cloruro (CTC)¹¹⁸ (Fig. 13) che permette di legare con resa quantitativa il primo amminoacido di una catena, evita la formazione di dichetopiperazine e permette di condurre il coupling in condizioni blande. Il distacco della molecola si ottiene utilizzando condizioni acide blande (TFA 0.1%-1%) e, per questo, tale strategia è compatibile con la chimica Fmoc e con l'utilizzo di gruppi protettori che si eliminano con concentrazioni di acidi più alte.

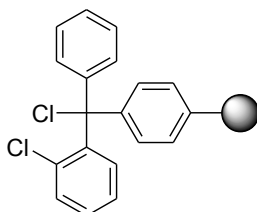


Fig. 13. Resina CTC

Il peptide che crescerà sul supporto insolubile si trova protetto permanentemente come estere. La formazione di DKP per attacco intramolecolare del gruppo amminico del secondo amminoacido al legame estereo è sfavorita a causa dell'ingombro sterico del gruppo 2Cl-Trt. Uno svantaggio nell'impiego della resina CTC è il suo elevato costo.

2.6.4 COUPLING DEL PRIMO AMMINOACIDO

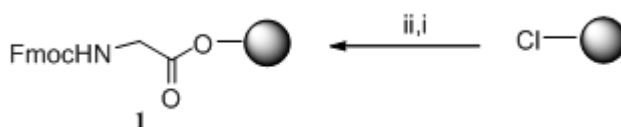
Nella strategia sintetica del nuovo analogo si deve considerare l'amminoacido da dover accoppiare per primo sulla resina CTC.

La scelta del primo amminoacido da dover accoppiare su resina è la chiave dell'intera sintesi perché determina il sito in cui avviene la ciclizzazione del peptide, la fase più delicata a causa dell'elevata rigidità della struttura. E' per questo che è necessario valutare il punto dove la ciclizzazione venga favorita, sia per maggiore reattività, sia per minore ingombro sterico, sia per minore possibilità di formazione di prodotti secondari.

Come primo amminoacido è stato scelto la glicina perché è il residuo amminoacidico più flessibile e meno impedito stericamente e che dunque favorisce la chiusura della catena per formazione del legame peptidico con Cys(Acm).

La glicina protetta alla funzione amminica con il gruppo Fmoc, è stata ancorata su resina in presenza della base DIEA per 50' (*Schema 9*, prodotto **1**). Il gruppo Fmoc è usato come gruppo protettore temporaneo per la funzione α -amminica degli amminoacidi che vengono incorporati nella catena peptidica ed è utile per riuscire a risalire al grado di funzionalizzazione della resina in seguito al coupling del primo amminoacido.

La reazione di coupling del primo amminoacido è stata spenta mediante l'uso di metanolo.



Schema 9: i) FmocGlyOH, DIEA, DCM, 50'; ii) MeOH, 10'

2.6.5 COUPLING DEL SECONDO AMMINOACIDO: FORMAZIONE DEL DIPEPTIDE

L'analogo da sintetizzare prevede la sostituzione dei due residui di D-Cys, con due residui di D-Dap (acido (*R*)-2,3-diamminopropionico). In questo caso è stato scelto l'amminoacido Fmoc-D-Dap(Alloc)OH (*Fig. 14*)

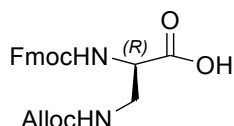


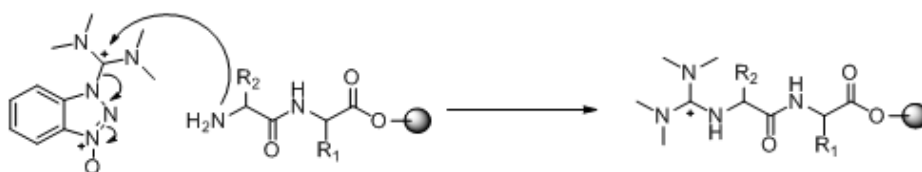
Fig. 14: Amminoacido Fmoc-D-Dap(Alloc)OH

Mentre il gruppo amminico in posizione α e protetto con il gruppo Fmoc è impiegato nella formazione del legame ammidico con l'eterociclo, il gruppo amminico in posizione β , protetto con il gruppo Alloc è quello scelto per consentire l'allungamento del peptide.

L'Alloc è stato scelto come gruppo protettore perchè ortogonale al gruppo Fmoc e perchè richiede, per la sua rimozione, condizioni neutre.

L'HATU è stato scelto come agente attivante per accoppiamenti che sono inferiori a 35 minuti poichè esso si decompone in tempi relativamente brevi. Infatti la presenza di un ulteriore azoto nell'anello guanidinico, lo rende più reattivo.

Tuttavia l'uso dell'HATU è associato ad una reazione secondaria, la guanidilazione dell'ammina libera in crescita sul peptide (*Schema 10*)



Schema 10: Reazione secondaria di guanidilazione impiegando HATU come agente di coupling

Per evitare tale tipo di reazione è necessaria una preattivazione dell'amminoacido con agente accoppiante e base per 5 minuti, mentre il tempo richiesto da ogni accoppiamento è minore di 35 minuti perchè l'HATU si decompone in tempi relativamente brevi.

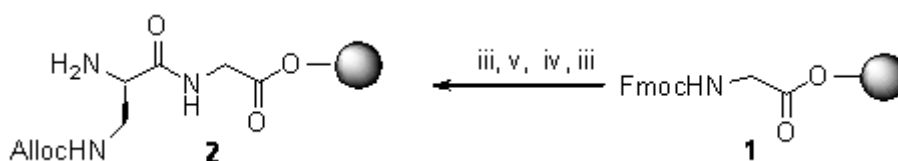
Prima di procedere con il coupling del secondo amminoacido, il gruppo protettore Fmoc presente sulla funzione amminica della glicina è stato rimosso in seguito al trattamento con

una soluzione di piperidina al 20% in DMF. Questo ha permesso di quantificare il grado di funzionalizzazione della resina mediante la misura dell'assorbanza del filtrato a $\lambda = 290$: da 1 si è passati a 0.9 g/mmol.

Il coupling del FmocD-DapAllocOH con la glicina ancorata su resina (**1**) è stato effettuato mediante l'uso degli agenti attivanti HATU/HOAt/DIEA in DCM/DMF in 35' (*Schema 11*)

La completezza della reazione è stata seguita mediante test di Kaiser che si effettua nella sintesi peptidica per valutare l'andamento dell'accoppiamento tra l'ammina primaria dell'amminoacido ancorato su resina ed il gruppo carbossilico del secondo amminoacido che viene introdotto.

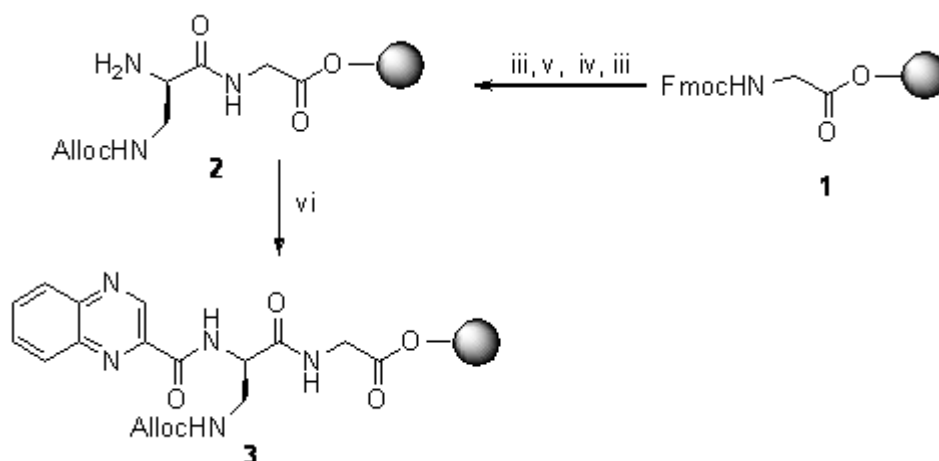
Per bloccare gli eventuali gruppi amminici liberi non reagiti in seguito alla rimozione del gruppo Fmoc legato alla glicina è seguita la reazione di acetilazione in DMF/DIEA per 30' e successivamente il gruppo protettore Fmoc della funzione amminica in α del D-Dap è stato rimosso mediante trattamento con una soluzione di piperidina al 20% in DMF.



Schema 11: iii) Piperidina-DMF (1:5); iv) FmocDDap(Alloc)OH, HATU/HAOt/DIEA, DMF, 35'; v) Ac₂O, DIEA, DMF, 30';

2.6.6 COUPLING DELL' ETEROCICLO AL DIPEPTIDE

La funzione amminica libera in posizione α del D-Dap, protetto alla funzione amminica in posizione β con il gruppo Alloc, è stata impiegata nel coupling con la funzione carbossilica dell'acido 2-chinossalin-carbossilico (2QXA) in seguito all'uso di agenti accoppianti PyBOP/HAOt in DMF/DIEA per 1 h e 30' (*Schema 12*, prodotto **3**). Il PyBOP, sale di solfonio, è un reattivo usato nella sintesi peptidica nel caso di accoppiamenti lunghi e difficili. L' andamento della reazione è stato seguito mediante Test di Kaiser dopo 2 h, tuttavia sono state aggiunte altre quantità dimezzate dei reattivi sopra specificati per assicurarsi che la reazione fosse completa.



Schema 12: iii) Piperidina-DMF (1:5); iv) FmocDDap(Alloc)OH, HATU/HAOt/DIEA, DMF, 35'; v) Ac₂O, DIEA, DMF, 30'; vi) acido 2-chinossallin carbossilico, PyBOP/HOAt/DIEA, DMF, 1h e 30'

In Fig. 15 è riportato l' HPLC del dipeptide con l'eterociclo legato alla funzione amminica in α del D-Dap (*Schema 12*, prodotto **3**), ottenuto con una purezza del 100%

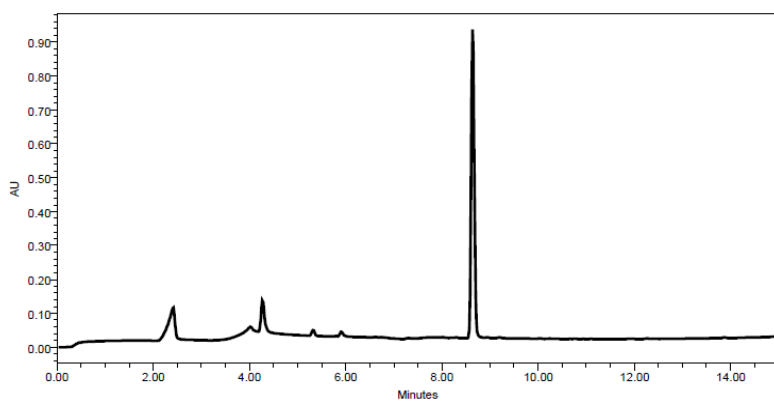
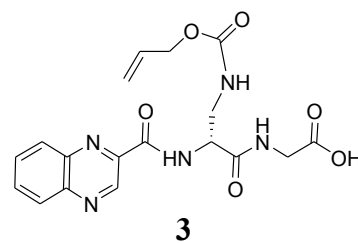


Fig.15 Analisi HPLC del prodotto 3



In fig. 16 invece, è riportata l'analisi HPLC-MS.

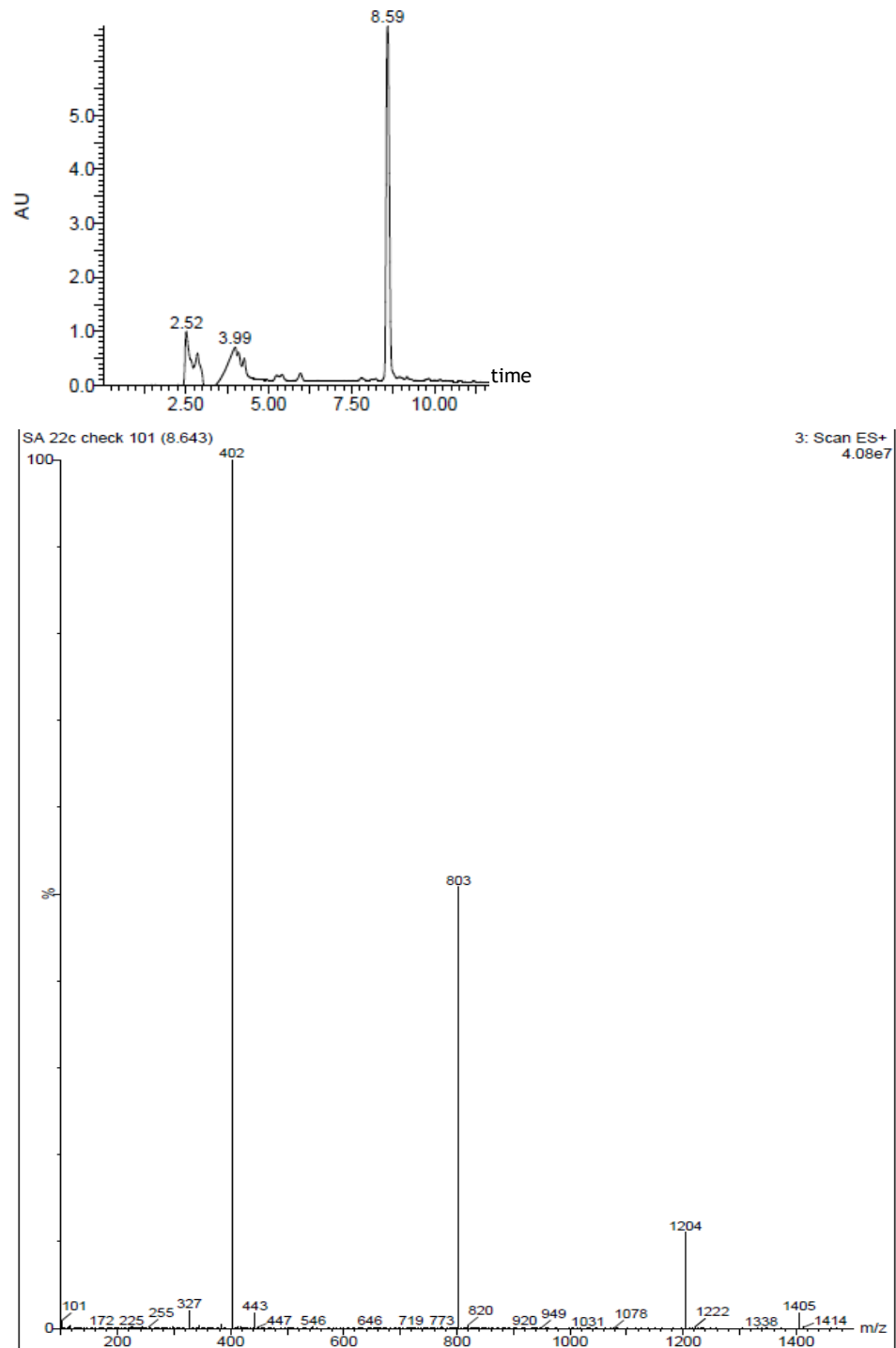
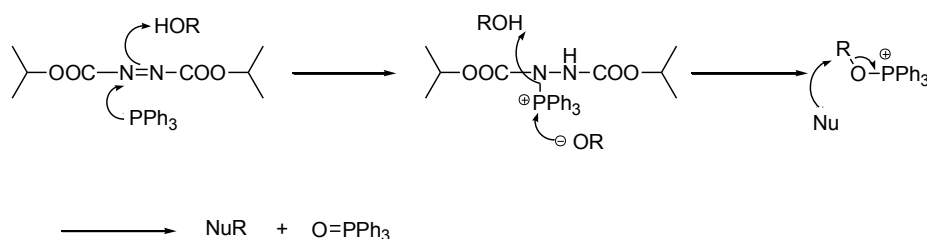


Fig.16 Analisi HPLC-MS, gradiente da 0:100 a 100:0 (ACN:H₂O) in 15 min

2.6.7 REAZIONE DI METILAZIONE

Nell'analogo da dover sintetizzare, la funzione amminica in β del D-Dap è quella da dover metilare, tuttavia non è possibile realizzare la N-metilazione selettiva in posizione β con le classiche tecniche in soluzione. La metilazione dell'amminoacido ha richiesto condizioni particolari ed è stata conseguita mediante protocollo di Mitsunobu¹¹⁷ applicato alla fase solida.

La Mitsunobu è una reazione di grande interesse perchè porta alla formazione di un nuovo legame C-C. Essa avviene, mediante l'uso di PPh_3 e DIAD, tra un alcol e un nucleofilo il cui acido coniugato abbia un $\text{pK}_a < 15$: un acido carbossilico, un acido idrazoico, un imide, un fenolo o una solfonammide. (Schema 13)

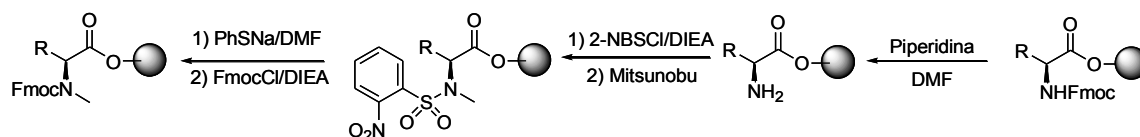


Schema 13 Meccanismo della reazione di Mitsunobu.

Il meccanismo prevede l'attacco nucleofilo della trifetilfosfina sul diisopropilazodicarbossilato e un successivo attacco dell'alcolato per formare la specie elettrofila, sulla quale avviene l'addizione del nucleofilo Nu.

L'alchilazione di ammine primarie porta alla formazione indesiderata di ammine terziarie o sali d'ammonio quaternari: Fukuyama e suoi collaboratori¹¹⁹ hanno conseguito il derivato monoalchilato applicando il protocollo di alchilazione di Mitsunobu a solfonammidi e trifluoroacetammidi. Sfruttando la reazione di Fukuyama per la preparazione di ammine secondarie a partire da ammine primarie, Yang e Chiu¹²⁰ hanno esteso il metodo alla sintesi in fase solida di Fmoc N-metil amminoacidi.

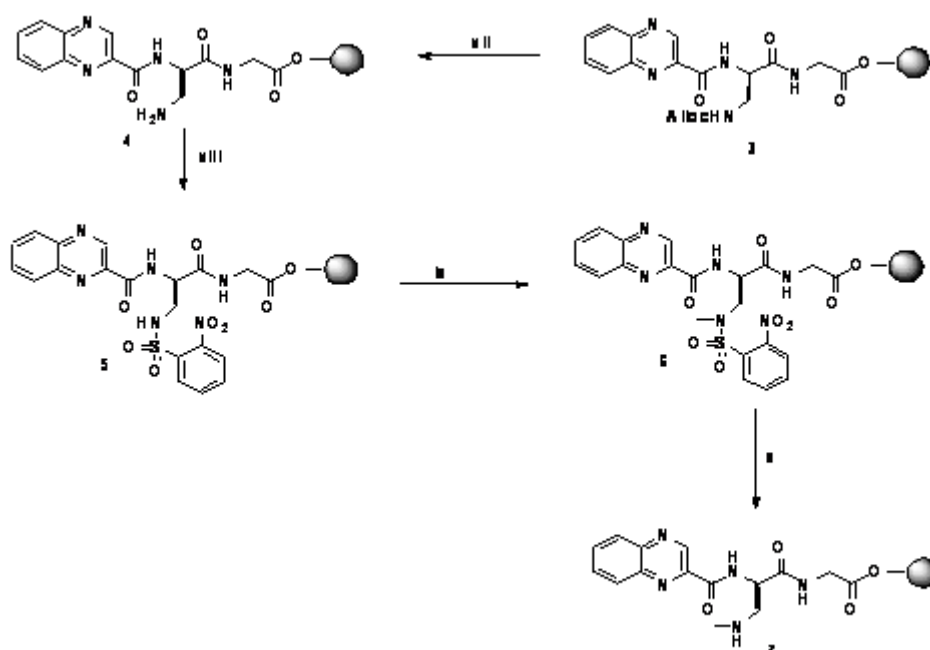
La procedura prevede l'ancoraggio dell'amminoacido Fmoc protetto al supporto solido (resina 2-Cl-tritile), deprotezione del gruppo Fmoc, trasformazione in 2-nitrobenzensolfonil derivato, reazione di Mitsunobu, rimozione del gruppo 2-NBS ed introduzione della protezione Fmoc. (Schema 14)



Schema 14 Sintesi di Fmoc N-Metil aminoacidi con il metodo di Fukuyama

Nel caso in questione, prima di effettuare la reazione di metilazione in β al D-Dap, è stata allontanato il gruppo pretettore Alloc mediante 3 trattamenti di 15' l'uno con $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ e PhSiH_3 in DCM. (Schema 15, prodotto **4**). La funzione amminica libera è stata trasformata nella corrispettiva solfonammide (Schema 15, prodotto **5**) mediante l'uso del 2-nitrobenzensolfonil cloruro (2-NBSCl) in DCM per 1h e 30' a temperatura ambiente. Il prodotto **5** è stato ottenuto con una resa del 100%. Successivamente è stata effettuata la reazione di Mitsunobu avvenuta mediante l'uso di trifenilfosfina, metanolo, diisopropilazadicarbossilato (DIAD) in THF per 1h a temperatura ambiente per dare il prodotto **6**. La reazione di Mitsunobu è stata ripetuta una seconda volta con gli stessi reattivi e dall'analisi mediante HPLC è stato possibile notare che il prodotto **6** è stato ottenuto con una resa dell'80%. La resina è stata dunque sottoposta a 2 trattamenti di 15 minuti con mercaptoetanolo e DBU in DMF per allontanare il gruppo 2-nitrobenzensolfonil (Schema 15, prodotto **7**).

Lo schema 15 riassume tutti i passaggi sintetici sopra citati



Schema 15 vii) $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$, PhSiH_3 , DCM, 3x15'; viii) 2-NBSCl, DIEA, DCM, 1h e 30' t.a.; ix) PPh_3 , MeOH, DIAD, THF, 1h a t.a.; x) DBU, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, DMF, 2x15'

Trasformando la funzione amminica in posizione β in una solfonammide, la reazione di N-metilazione avviene in maniera chemoselettiva.

In fig. 17 è riportato l'HPLC relativo al prodotto 7 ottenuto con una resa dell'80%.

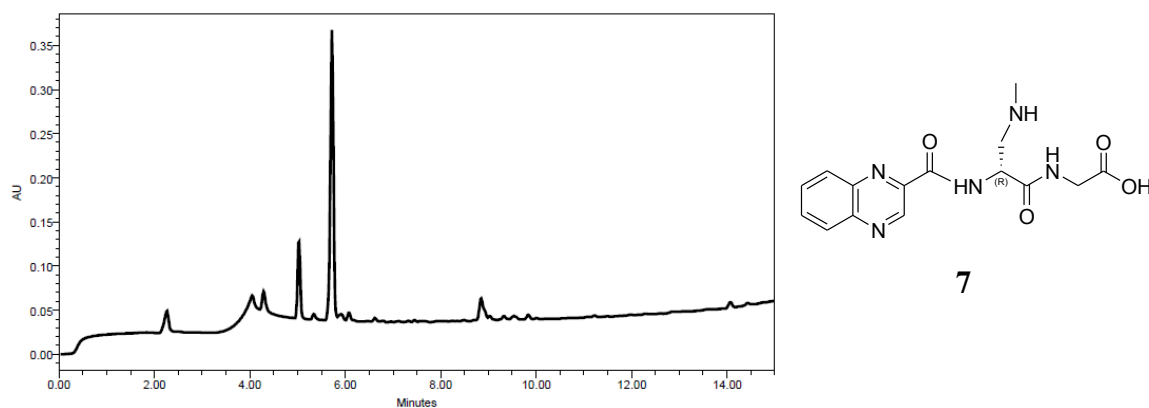


Fig 17 Analisi HPLC del prodotto 7

In fig. 18, è invece riportata l'analisi LC-MS relativa al prodotto 7

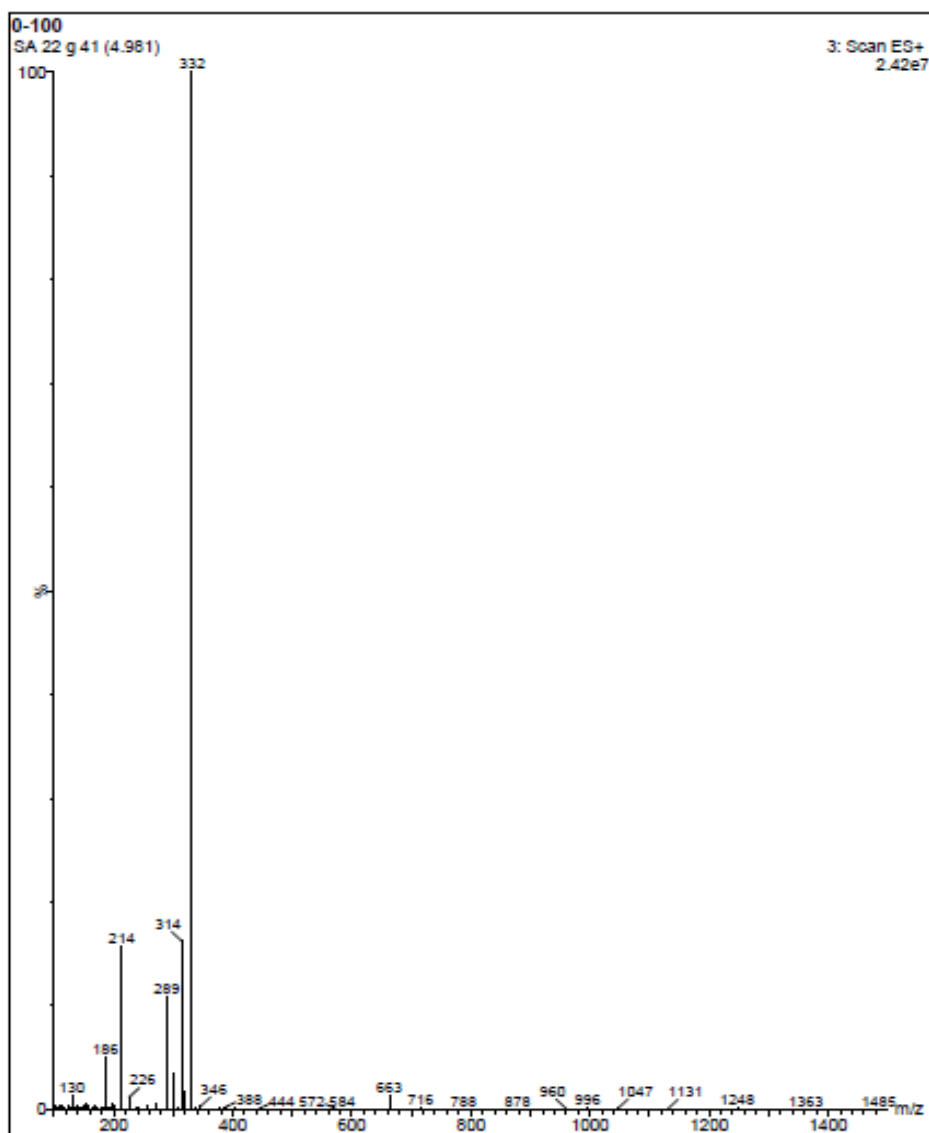
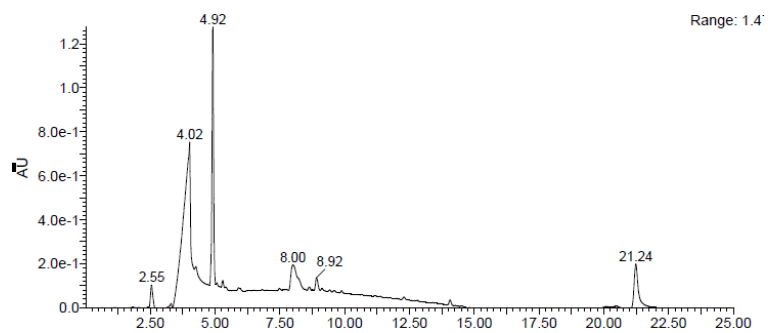


Fig.18 Analisi HPLC-MS, gradiente da 0:100 a 100:0 (ACN:H₂O) in 15 min

2.6.8 COUPLING DEL TERZO AMMINOACIDO: FORMAZIONE DEL TRIPEPTIDE

Il gruppo amminico in posizione β dell'amminoacido D-Dap è utilizzato come punto di ramificazione del peptide; ma essendo metilato, il coupling con il terzo amminoacido è risultato più difficile perchè un' ammina secondaria è meno reattiva rispetto a quella primaria per motivi di ingombro sterico

La bassa reattività degli N-Me amminoacidi coinvolti nella sintesi ha necessitato l'utilizzo di agenti accoppianti energici e che permettano coupling in tempi brevi, per evitare l'eccessiva esposizione del peptide alla DIEA e quindi rischio di racemizzazione.

Quindi il residuo di cisteina AllocNMeCys(Me)OH, preparato attraverso la reazione di N-metilazione in soluzione, è stato ancorato su resina mediante l'uso degli agenti attivanti HATU/HOAt/DIEA in DCM/DMF per 35' (*Schema 16*, prodotto **8**)

L'Alloc è stato utilizzato come gruppo protettore perchè più idoneo per le cisteine e perchè facilmente rimovibile in condizioni blande.



Schema 16 xi) AllocNMeCys(Acm)OH HATU/HAOt/DIEA, DMF, 35'.

La reazione di coupling è stata seguita con il test di Le Clercq¹²¹, adatto sia per ammine primarie che secondarie.

In fig. 19 è riportato l'HPLC relativo al prodotto **8**, distaccato dalla resina. Il tripeptide protetto è stato ottenuto con una resa del 92%.

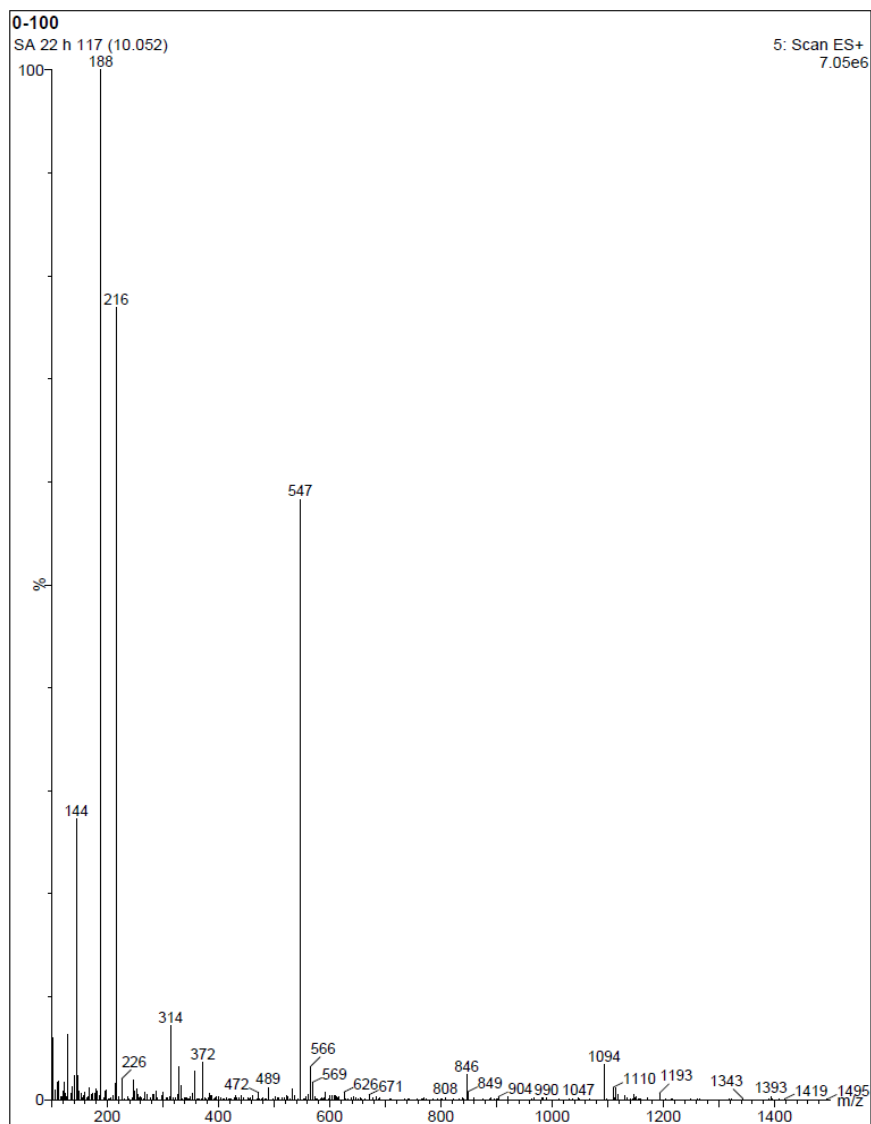
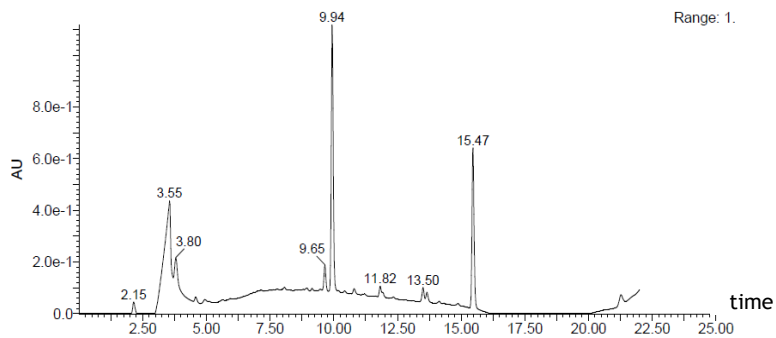


Fig.20 Analisi HPLC-MS, gradiente da 0:100 a 100:0 (ACN:H₂O)

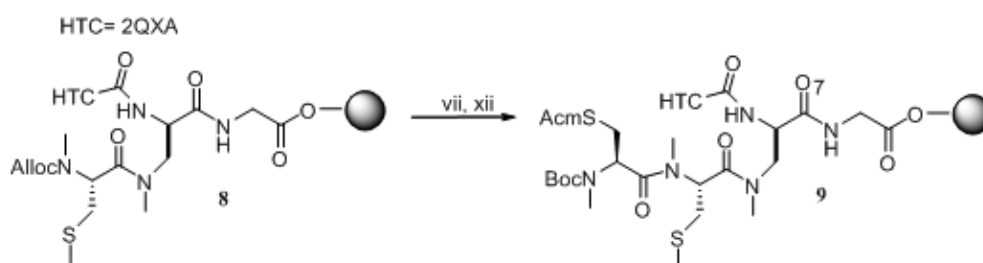
2.6.9 COUPLING DEL QUARTO AMMINOACIDO: FORMAZIONE DEL TETRAPEPTIDE

Il quarto amminoacido ancorato sulla resina è stato il BocNMeCys(Acm)OH, metilato come il terzo amminoacido seguendo la procedura di N- metilazione in soluzione.

La funzione amminica di questo amminoacido è quella che consentirà la chiusura del ciclo per reazione con il gruppo carbossilico della glicina.

Per questo amminoacido il gruppo protettore Boc è stato utilizzato in quanto esso richiede condizioni blandamente acide per poter essere rimosso, mentre il gruppo Acm (acetoamidometanolo) è stato eletto come protezione della funzione tiolica perché permetterà di realizzare il ponte disolfuro in fase solida: la deprotezione e la formazione del legame S-S avvengono in tal modo in un solo passaggio, in condizioni blande compatibili con il peptide ed il supporto solido impiegato.

Il tripeptide (*Schema 17*, prodotto **8**) protetto alla funzione amminica con il gruppo Alloc è stato trattato con Pd(Ph₃)₄ e PhSiH₃ in DCM mediante tre trattamenti da 15' e successivamente la BocNMeCys(Acm)OH è stata ancorata su resina mediante l'uso degli agenti attivanti HATU/HOAt/DIEA in DCM/DMF per 35' (*Schema 17*, prodotto **9**).



Schema 17: vii) Pd(Ph₃)₄, PhSiH₃, DCM, 3x15'; xii) BocNMeCys(Acm)OH HATU/HOAt/DIEA, DMF, 35'

Trattandosi di un coupling difficile poiché interessava una funzione amminica secondaria, scarsamente reattiva, è stato deciso di ripetere la reazione di coupling, utilizzando come agenti attivanti PyAOP/HOAt/DIEA in DMF e lasciando proseguire la reazione per 1 h e 30'.

La completezza della reazione è stata seguita con il test di Le Clercq¹²¹, adatto sia per ammine primarie che secondarie.

In fig. 21 è riportata l'analisi HPLC del prodotto **9**.

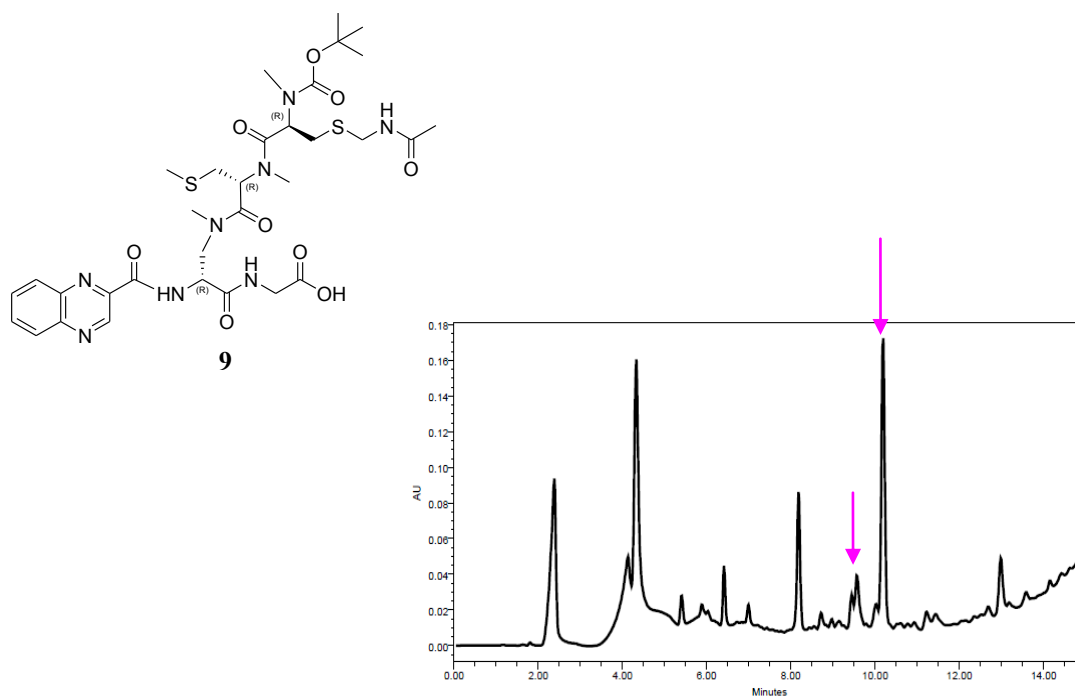


Fig. 21: Analisi HPLC del prodotto **9**

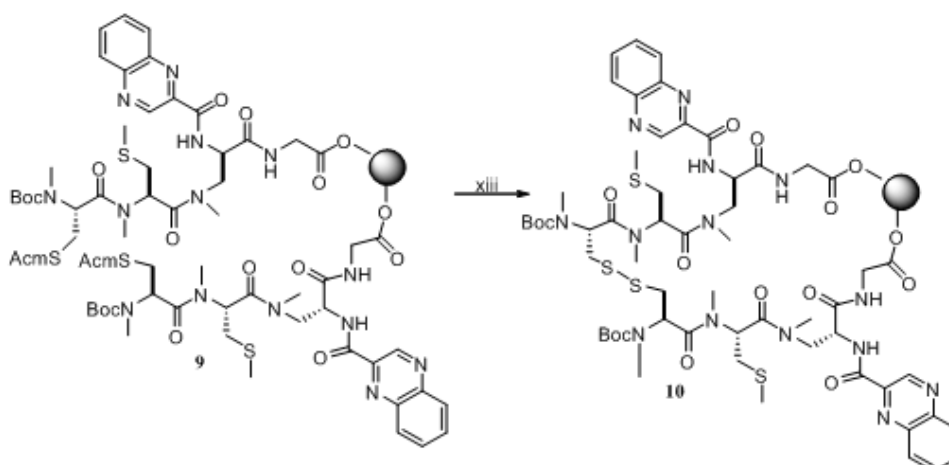
Nel cromatogramma HPLC è possibile notare la presenza di due conformeri (indicati dalle frecce) a causa della rigidità della molecola conferita dai tre residui N-metilati in sequenza. La resa relativa ai due conformeri è del 65%.

2.6.10 FORMAZIONE DEL PONTE DISOLFURO E DISTACCO DALLA RESINA

Generalmente la formazione del ponte disolfuro si realizza in soluzione ad alta diluizione (1 mM) per favorire il corretto ripiegamento della molecola e la reazione intramolecolare rispetto alla intermolecolare. In base al gruppo protettore impiegato nella funzione tiolica, in letteratura sono descritti diversi metodi di formazione del legame S-S. Nel caso del gruppo AcM la reazione richiede la presenza di iodio, che porta all'eliminazione del gruppo protettore e la formazione del ponte in un unico passaggio, in condizioni che non interferiscono con la stabilità del peptide.

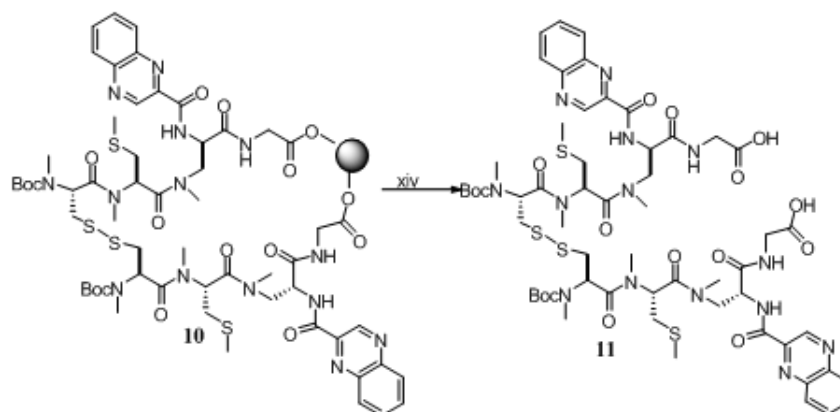
In questo caso la formazione del ponte disolfuro si è realizzata in fase solida perchè la realizzazione del nuovo legame è avvenuta in tempi notevolmente brevi e perchè lo iodio è stato facilmente eliminato mediante lavaggi della resina con opportuni solventi.

Il peptide ancorato su resina (*Schema 18*, prodotto **9**) è stato sottoposto a due trattamenti di 10 minuti con una soluzione di iodio (2.5 eq. per gruppo AcM) in DMF (0.05 M) e a lavaggi ripetuti di DMF e CH₂Cl₂ per eliminare l'eccesso di reagente (*Schema 18*, prodotto **10**).



Schema 18: xiii) I₂, DMF, 2x10'

Successivamente il peptide è stato rimosso dalla resina con brevi trattamenti di TFA all'1% in DCM (*Schema 19*, prodotto **11**) e la soluzione filtrata è stata raccolta in acqua per



Schema 19: xiv) TFA 1% in DCM

evitare l'eliminazione del gruppo Boc. Il prodotto è stato dunque liofilizzato e si sono effettuate l'analisi sia HPLC che LC-MS.

In fig. 22 è riportata l'analisi HPLC del prodotto **11**.

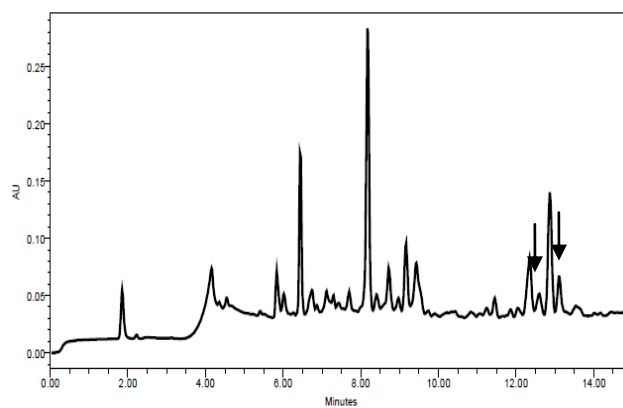
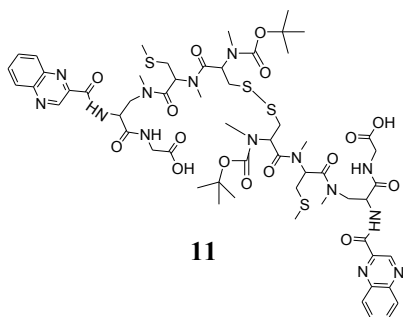


Fig. 22: Analisi HPLC del prodotto **11**

Nel cromatogramma è possibile notare la presenza dei due conformeri (indicati dalle frecce) per i quali la resa totale è stata del 40%. Il picco più intenso è invece relativo al prodotto **11** senza un gruppo Boc per il quale è stata calcolata una resa del 40%.

In fig. 23 è invece riportata l'analisi all'LC-MS del prodotto **11**.

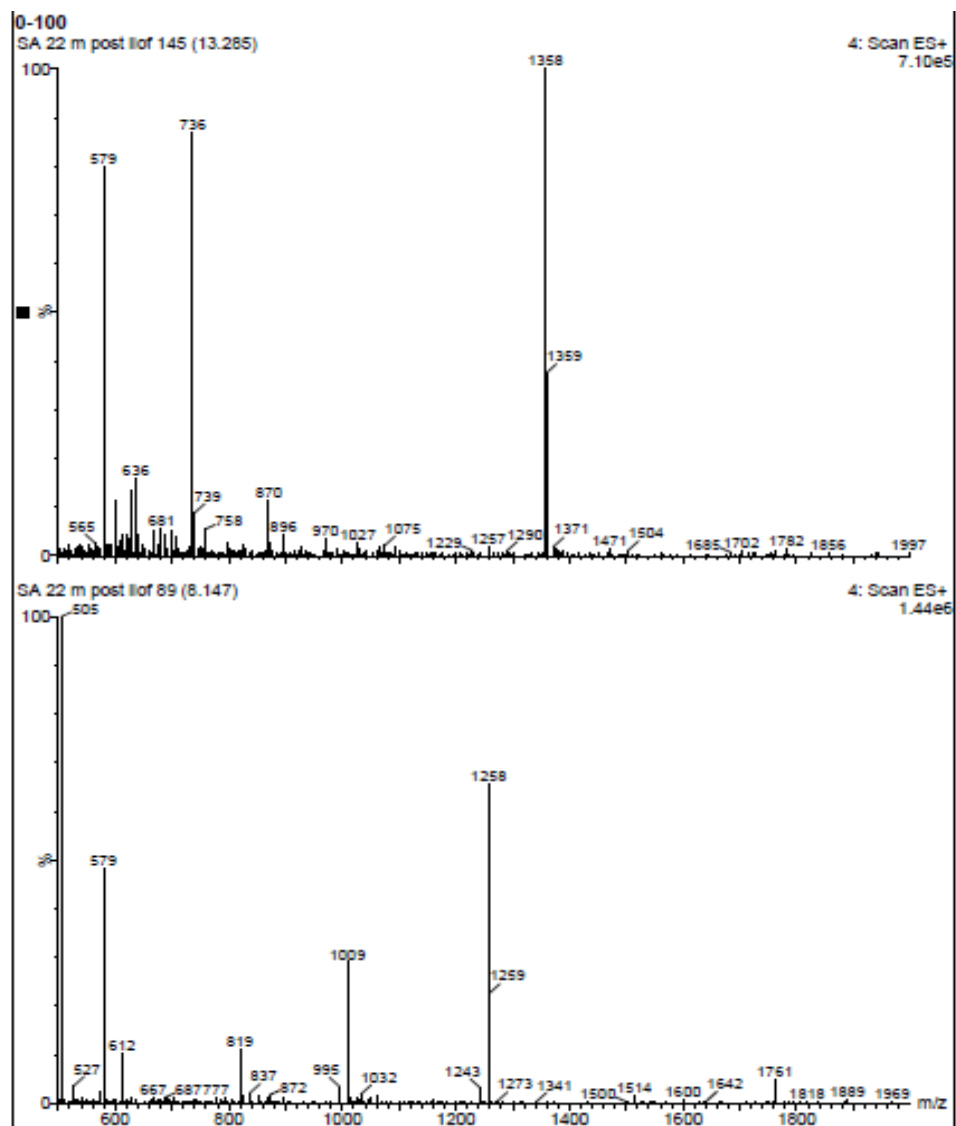
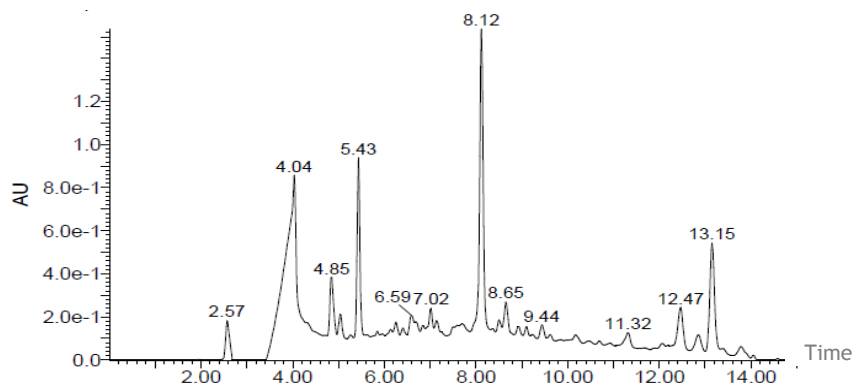
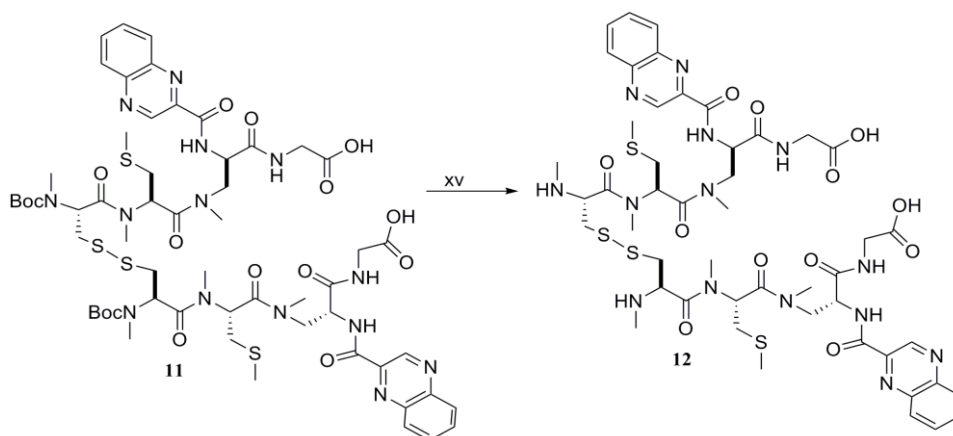


Fig. 23: Analisi HPLC-MS, gradiente da 0:100 a 100:0 (ACN:H₂O) in 15'

Dall' analisi dello spettro si possono evidenziare due picchi molecolari. Quello a $m/z=1358$, è relativo al prodotto **11**, quello con un valore di $m/z=1258$ è relativo al prodotto **11** deprivato di un Boc.

A tal punto il prodotto **11** è stato trattato con una soluzione di TFA/H₂O (35/5 v/v) in DCM per 45' per allontanare i due gruppi protettori Boc legati alla funzione amminica della cisteina, funzione che serve per la ciclizzazione finale del peptide (*Schema 20*, prodotto **12**)



Schema 20: xv) TFA:H₂O (35: 5) in DCM per 45'.

La Fig. 24 mostra l'analisi HPLC relativa al prodotto **12**

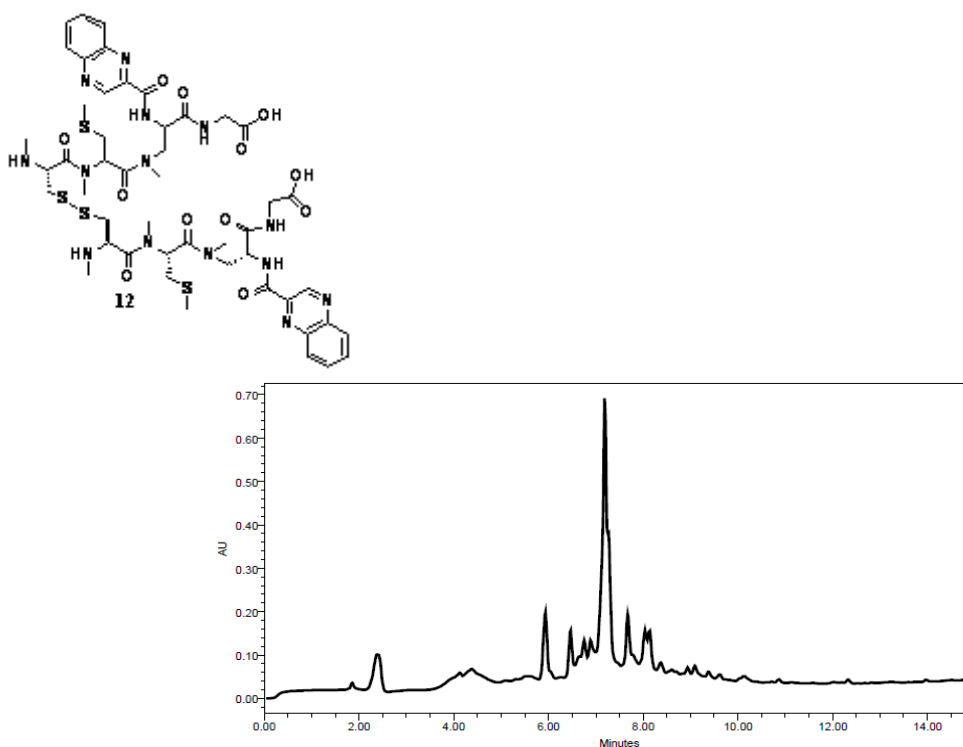


Fig. 24: Analisi HPLC del prodotto **12**

Dall' analisi HPLC, è possibile evidenziare la presenza di un *range* specifico nel quale ritrovare tre conformeri relativi al prodotto 12.

In Fig. 25 e' invece riportata l'analisi LC-MS relativa al prodotto 12

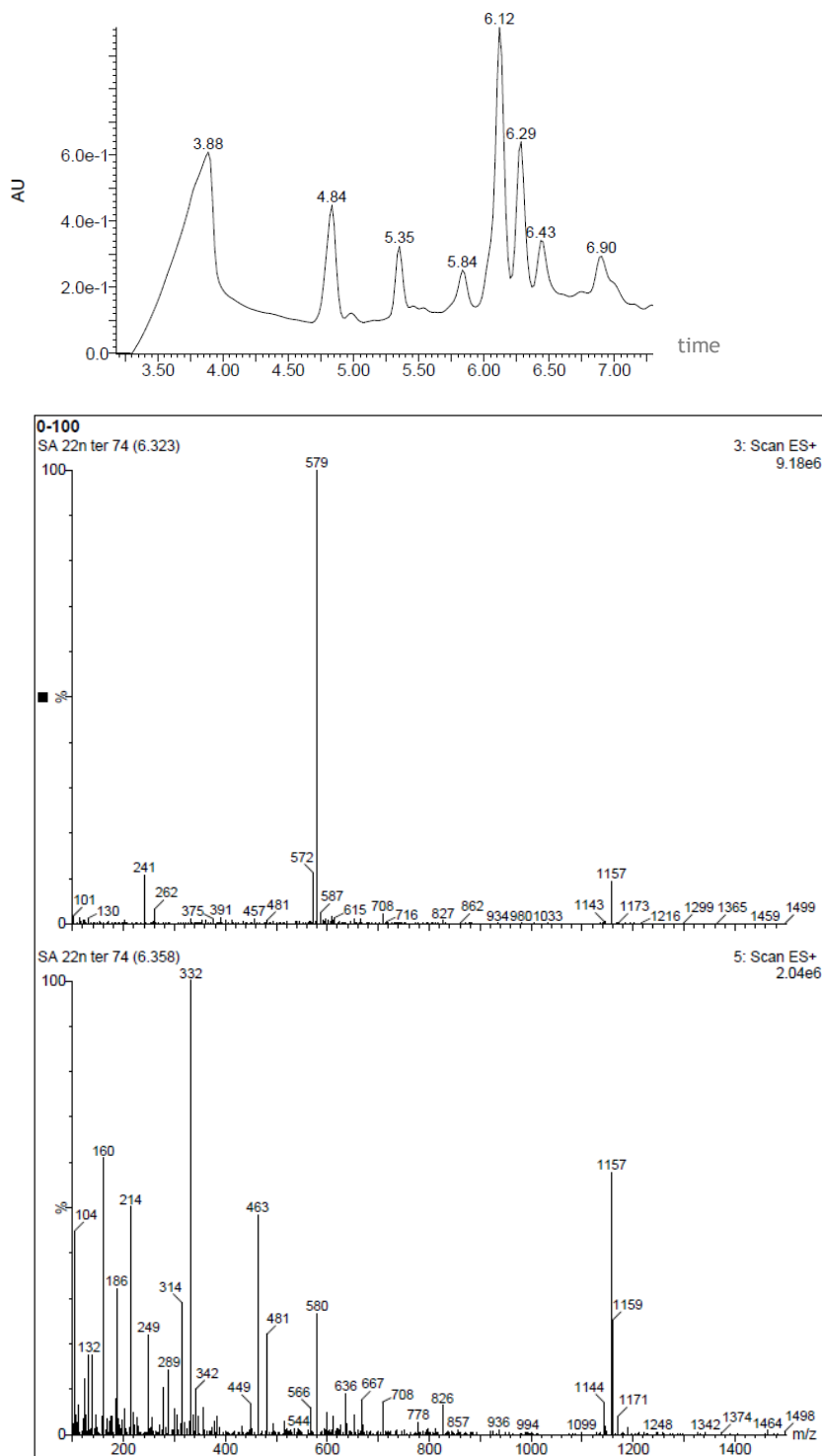


Fig. 25: Analisi HPLC-MS, gradiente da 0:100 a 100:0 (ACN:H₂O) in 15'

2.6.11 CICLIZZAZIONE IN SOLUZIONE

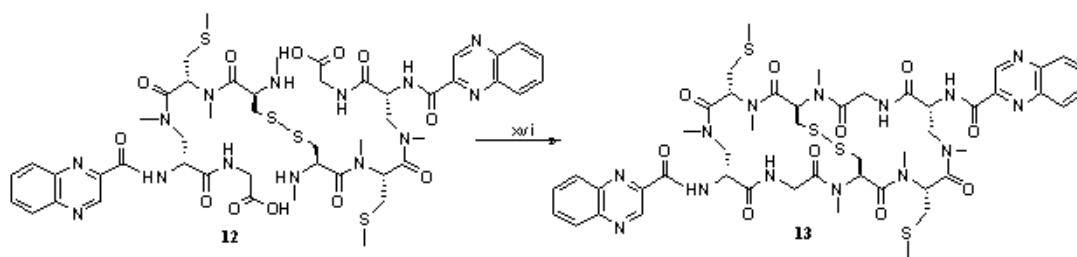
La ciclizzazione è la tappa più delicata nella sintesi di depsipeptidi ciclici. Non esiste un agente accoppiante universale per le reazioni di chiusura d'anello e spesso è necessario realizzare uno screening di diversi agenti di coupling. La reazione deve essere condotta in condizioni altamente diluite (1 mM) per favorire l'attacco intramolecolare a dispetto di quello intermolecolare.

In questo caso al momento della ciclizzazione la molecola si presenta più rigida perchè il legame S-S determina una costrizione nella struttura, che provoca un avvicinamento dei due estremi della catena, e, pertanto, la chiusura dell' anello è favorita.

I gruppi coinvolti nella reazione di doppia ciclizzazione sono stati la funzione amminica secondaria dei due residui di cisteina e la funzione carbossilica dei due residui di glicina.

Nella reazione di doppia ciclizzazione in soluzione è necessario l'uso di un agente accoppiante più efficace di una carbodiimmide: la scelta è stata rivolta al PyBOP.

Quindi il prodotto **12** è stato trattato con PyBOP/HOAt in presenza di DIEA (pH=8-9) nella minima quantità di DMF ed in presenza di DCM fino ad ottenere una concentrazione del prodotto disciolto di 1. mM e la reazione e' stata agitata per 24 h a temperatura ambiente in seguito all' aggiunta di altra quantità di agente accoppiante.



Il grezzo di reazione contenente il prodotto **13** (il prodotto finale), recuperato in seguito a lavaggi acidi (NH₄Cl aq.) e neutri con Brine è stato liofilizzato.

In fig. 26 è riportata l'analisi HPLC del grezzo contenente il bicyclo (prodotto 13)

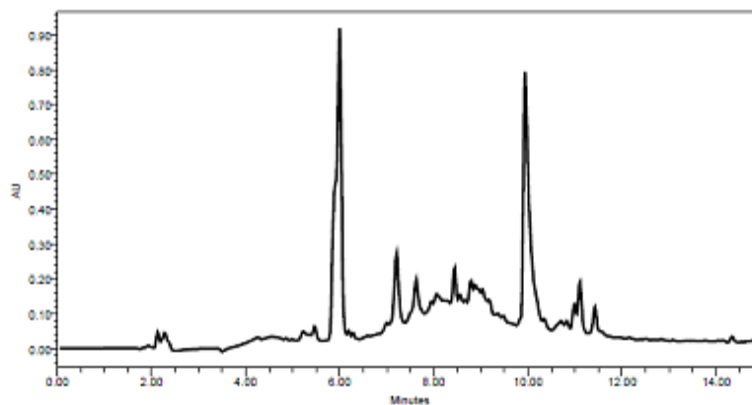
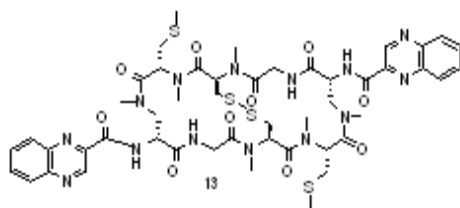


Fig 26: Analisi HPLC del grezzo contenente il prodotto 13

Come si può vedere dal cromatogramma, la zona in cui cercare il prodotto di nostro interesse è quella intorno agli 11 minuti. Non è stato possibile quantificare la resa della reazione poiché si tratta di un grezzo molto complicato.

In fig. 27, invece è riportata l'analisi HPLC_MS del grezzo di reazione. In particolare dalla massa, per quanto il grezzo sia complicato, è stato possibile individuare la massa di nostro interesse.

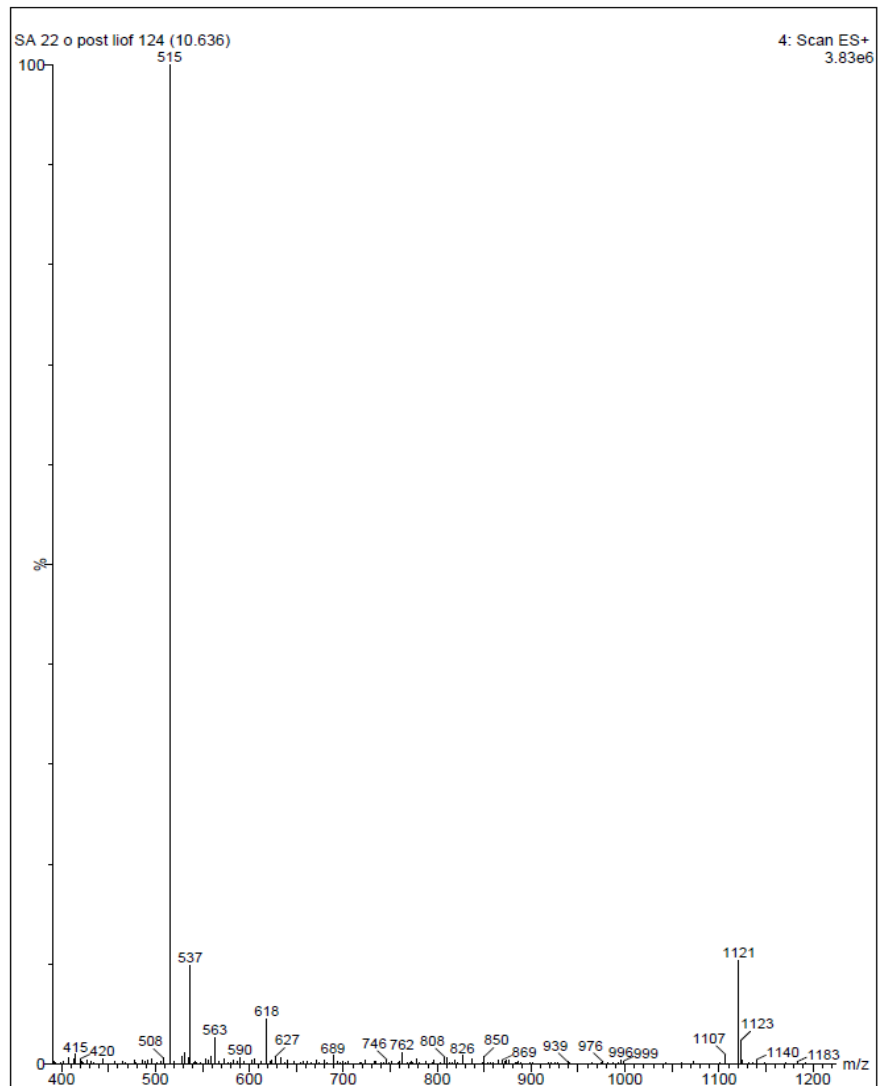
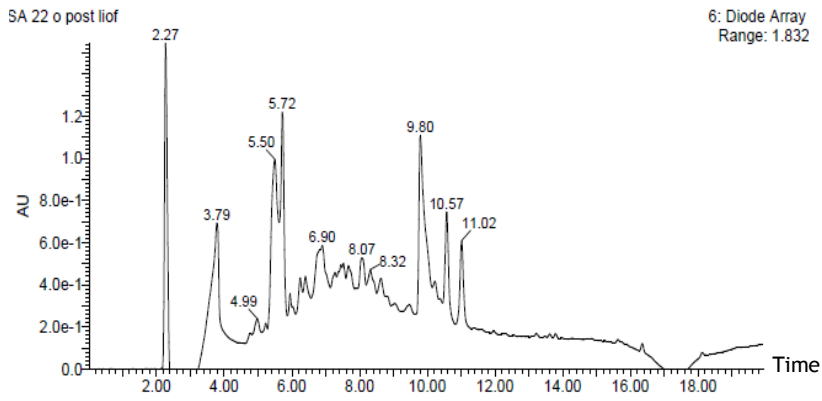


Fig. 27: Analisi HPLC-MS, gradiente da 0:100 a 100:0 (ACN:H₂O) in 15'

Il crudo della reazione è stato purificato su scala analitica e sono stati recuperati 3 stereoisomeri recanti lo stesso valore di massa/ carica atteso.

In fig. 28 è riportata l'analisi LC-MS relativa allo stereoisomero più abbondante recuperato, ottenuto con una resa del 0.7%.

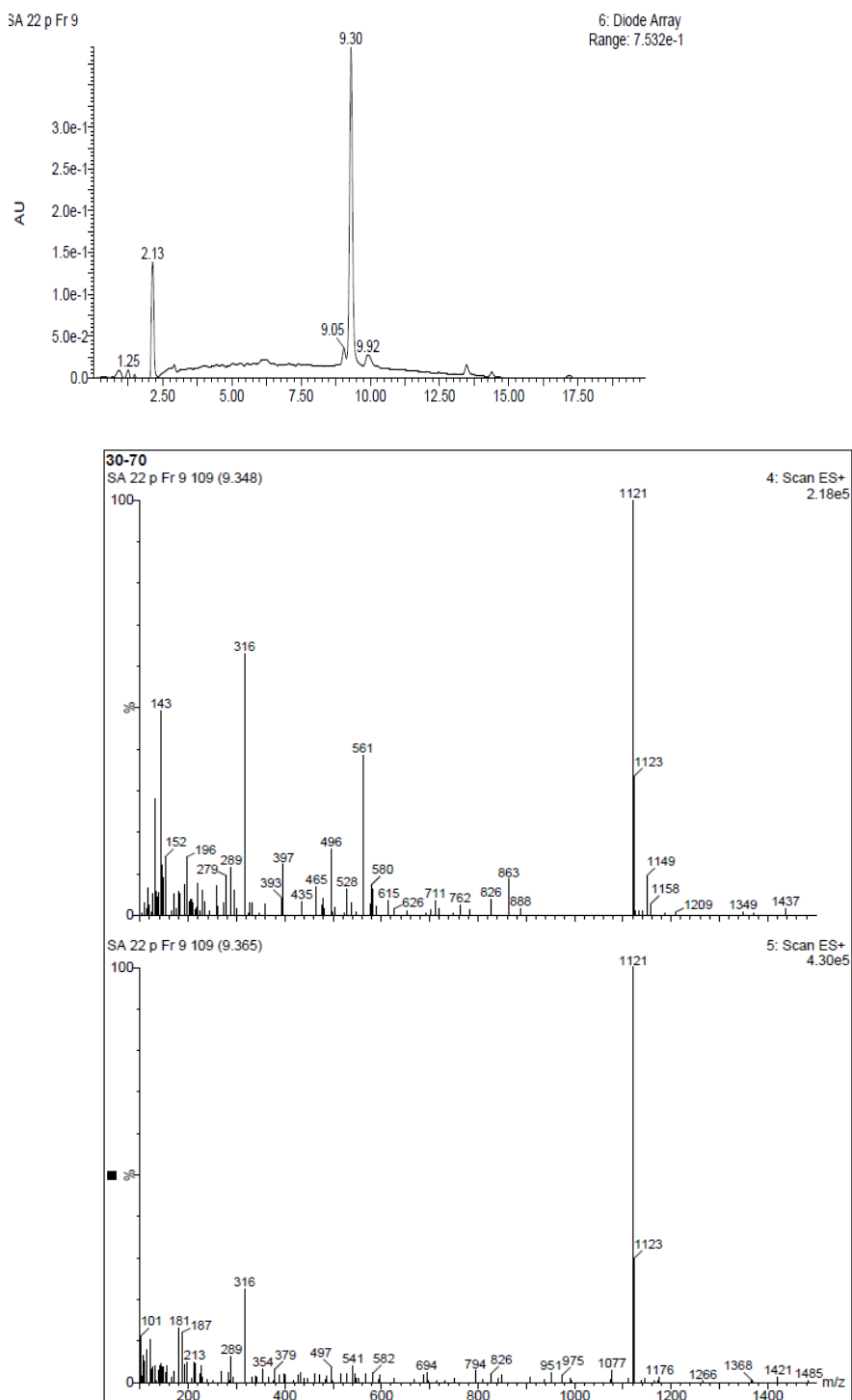


Fig. 28: Analisi HPLC-MS, gradiente da 30:70 a 70:30 (ACN:H₂O) in 15'

2.6.12 SAGGI BIOLOGICI DELL'ANALOGO DELLA AZATIOCORALLINA N-METILATA

E' stata sviluppata una strategia di sintesi che, sebbene non ancora ottimizzata, ha permesso di ottenere un analogo della azatiocorallina N-Metilata con un buon grado di purezza e in una quantità sufficiente per poter effettuare studi di attività antitumorale. Essi sono stati realizzati dall'impresa Pharma Mar, S.A. La tabella 4 qui riportata mostra i risultati dei saggi biologici ottenuti per il nuovo analogo:

Risultati di attività in vitro (Molare)				
Studio		MAMMELLA	POLMONE	COLON
		<i>MDA-MB-231</i>	<i>A549</i>	<i>HT29</i>
Tiocorallina A	GI50	< 2.25E-9	6.22E-9	4.06E-9
	TGI	1.12E-8	2.68E-8	2.25E-8
	LC50	3.20E-8	1.64E-7	>8.64E-6
Analogo dell'Azatiocorallina N-Metilata	GI50	4.73E-8	7.13 E-8	3.75E-7
	TGI	1.43E-6	>8.92E-6	>8.92E-6
	LC50	<8.92E-8	>8.92E-6	>8.92E-6

Tab. 1: Risultati biologici relativi all' attività dell' analogo della tiocorallina

L'attività in vitro del nuovo depsipeptide è stata valutata in tre linee cellulari tumorali diverse (mammella, polmone e colon) ed ha presentato valori di concentrazione inibitoria vicini a quelli del peptide originale, dell'ordine di 10^{-8} M.

In tab. 1 sono riportati solo i risultati relativi all' analogo più abbondante. Gli altri due stereoisomeri per quanto purificati, non hanno mostrato nessuna attività biologica.

2.7 CONCLUSIONI

E' stata messa a punto una strategia sintetica per la sintesi di un analogo dell'Azatiocorallina N-metilata, che presenta in totale ben sei residui amminoacidici metilati alla funzione amminica.

La strategia sintetica sviluppata è consistita nel cercare di limitare i passaggi sintetici in soluzione aumentando quindi quelli su fase solida.

Sfruttando la naturale simmetria della molecola, dopo aver opportunamente scelto il supporto solido, sono stati ancorati su resina i primi due amminoacidi (Gly e D-Dap) con la classica metodica Fmoc/t-Bu e successivamente l'eterociclo. Il secondo amminoacido inserito è stato metilato alla funzione amminica in β secondo la procedura di Mitsunobu su fase solida, ed il prodotto relativo è stato ottenuto con una resa molto elevata. I residui di NMe cisteina, preparati in soluzione e protetti alla funzione amminica e carbossilica con gruppi protettori ortogonali e compatibili con la strategia su fase solida, sono stati accorpati alla resina mediante l'uso di HATU ed HAOt che permettono di risolvere il problema della scarsa reattività insita negli amminoacidi N-metilati.

Mediante due trattamenti con una soluzione di I_2 in DMF, sono stati contemporaneamente rimossi la funzione Acm dal residuo di cisteina (il quarto residuo introdotto) e si è provveduto alla formazione di un ponte disolfuro intermolecolare, allontanando facilmente lo iodio presente in eccesso mediante semplici lavaggi con solvente. La formazione del ponte disolfuro su fase solida garantisce una maggiore rigidità strutturale al peptide, necessaria per la reazione di ciclizzazione finale in soluzione avvenuta mediante l'utilizzo del PyBOP come agente accoppiante in quanto più efficace rispetto ad una carbodiimmide.

Dalla purificazione del grezzo di reazione è stato possibile isolare tre stereoisomeri, ma tra questi solo quello avente una purezza maggiore, ha mostrato un'attività biologica dell'ordine di 10^{-8} M paragonabile a quella del peptide di origine naturale.

Alla luce dei risultati biologici, è possibile pensare di progettare una libreria di analoghi sfruttando, una volta ottimizzato, lo schema sintetico descritto, allo scopo di ottenere una

famiglia di analoghi della Tiocorallina con differenti N-Me aminoacidi ed eterocicli intercalatori con migliore bioattività.

2.8 PARTE SPERIMENTALE

2.8.1 MATERIALI

Gli amminoacidi protetti ed il PyBOP sono stati acquistati dall' Applied Biosystems (Framingham, MA), Bachem (Bubendorf, Switzerland), Albatross (Montreal, Canada), e NovaBiochem (Läufelfingen, Switzerland). La resina 2-Clorotrietile è stata acquistata dall' Iris Biotech. La DIEA, la piperidina, il TFA, l'allilcloroformiato, lo iodometano, sono stati acquistati dalla Aldrich (Milwaukee, WI) mentre l' HOAt dalla Luxembourg Industries (Tel Aviv, Israel).

La DMF, il DCM, l' Acetonitrile (per HPLC), il metanolo (per HPLC), il diossano, l'etere etilico, il TBME (t-butossi metil etere) e EtOAc (acetato d'etile) sono stati acquistati dalla SDS (Peypin, France). L'acido trifluorometansolfonico (TFMSA) è stato acquistato dalla Fluka (Buchs, Switzerland).

Tutti i reagenti commerciali ed i solventi sono stati acquistati al più alto grado di purezza disponibile ed utilizzati senza ulteriore purificazione ad eccezione della DMF e del diclorometano, che è stato fatto gorgogliare con azoto per rimuovere i contaminanti e conservato su setacci molecolari attivati del diametro di 4 Å (Merck, Darmstadt, Germany). Il THF è stato distillato su sodio/benzofenone.

I simboli degli amminoacidi denotano una configurazione L, a meno che non specificato diversamente. Tutti i rapporti tra i solventi sono espressi come v/v, a meno che non diversamente specificato.

2.8.2 STRATEGIE DI SINTESI: CONDIZIONI SPERIMENTALI

Le reazioni in soluzione sono state effettuate in palloni. I solventi organici estratti sono stati seccati su MgSO₄ anidro, ed evaporati sottovuoto a temperature al di sotto dei 40 °C.

Le sintesi in fase solida sono state effettuate in siringhe di polipropilene (10 mL) riempite con un disco poroso di polietilene. I solventi ed i reagenti solubili sono stati rimossi per filtrazione. La rimozione del gruppo Fmoc è stata condotta con Piperidina-DMF (1:4, v/v) (1 x 1 min, 2 x 5 min). I lavaggi tra gli step di deprotezione, coupling e deprotezione finale sono stati condotti con DMF (5 x 1 min) e DCM (5 x 1 min) usando 5 ml di solvente per grammo di resina per ogni lavaggio. La sintesi peptidica ed i lavaggi sono state effettuate a 25 °C.

Gli amminoacidi sono stati analizzati mediante RP-HPLC, ESI-MS.

I peptidi grezzi sono stati analizzati e purificati mediante RP-HPLC, ESI-MS, MALDI-TOF

Tutte le analisi di tipo analitico sono state eseguite su un cromatografo liquido della WATERS munito di un modulo di separazione (Waters 2695), un iniettore automatico, un rivelatore UV (Waters 996), e un sistema di controllo (Millenium³² login). La lettura UV è stata effettuata a 220 nm e a 254 nm. Sono stati utilizzati una colonna analitica Waters Symmetry C₁₈ a fase inversa (5.0 µm x 4.6 mm x 150 mm) e come eluenti, H₂O/0.045% TFA (eluente A) e ACN /0.036 % TFA (eluente B). L'analisi cromatografica, sia per gli amminoacidi che per i campioni dei peptidi è stata effettuata adoperando un gradiente lineare che va dal 0% al 100% dell'eluente B in 15 min ad un flusso di 1 ml/min.

Le purificazioni sono state condotte su un HPLC analitico WATERS munito di un modulo di separazione (Waters 2695), un iniettore automatico, un rivelatore UV a doppia assorbanza (Waters 996), e un sistema di controllo (Millenium³² login). La lettura UV è stata effettuata a 220 nm e a 254 nm. Sono stati utilizzati una colonna analitica Waters Symmetry C₁₈ a fase inversa (5.0 µm x 4.6 mm x 150 mm) e come eluenti, H₂O/0.045% TFA (eluente A) e ACN /0.036 % TFA (eluente B). La purificazione cromatografica è stata effettuata adoperando un gradiente lineare che va dal 25% al 75% dell'eluente B in 30 min ad un flusso di 1 ml/min.

Le analisi all'Es(+)-MS relative ai campioni degli amminoacidi e relative ai campioni dei peptidi sono state condotte su uno spettrometro Waters Micromass a tempo di volo ed in un Agilent Ion TRAP 1100 Series LC/MSD .

Gli spettri di massa relative ai campioni di peptidi sono stati condotti su uno spettrometro MALDI-TOF della Applied Biosystems Voyager DE RP, usando una matrice l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico.

2.8.3 UV ED NMR: CONDIZIONI SPERIMENTALI

UV

Le letture UV sono state effettuate usando uno spettrofotometro Nicolet 510 FT-IR, adoperando celle di quarzo di cammino ottico di 1 cm (Hellman). Lo spettro è stato registrato per avere una quantificazione del grado di funzionalizzazione della resina in seguito al distacco del gruppo protettore Fmoc dalla resina e per questo la lettura è stata condotta a $\lambda=290$ nm.

Si è risalito al grado di funzionalizzazione della resina mediante l'uso della formula $Z = A X / \epsilon Y l$ dove Z è la funzionalizzazione della resina (mmol g^{-1}), A l'assorbanza, X volume di solvente (mL), ϵ il coefficiente di assorbività molare ($= 5800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Y il peso della resina (g), l la lunghezza della cuvetta (cm).

NMR

Gli spettri ^1NMR e $^{13}\text{C NMR}$ sono stati registrati su uno strumento Varian Mercury 400 usando come solvente il CDCl_3 . I chemical shift (δ) sono espressi in parti per milione, considerando come standard interno il trimetilsilil cloruro. Le costanti di accoppiamento sono espresse in Hertz.

2.8.4 PREPARAZIONE DELLE CISTEINE N-METILATE

Alloc-Cys(Trt)-OH. La $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{H-Cys(Trt)-OH}^{\text{i}}$ (4.69 g, 11.1 mmol) è stata disciolta in diossano (55 mL) e Na_2CO_3 aq.(2%, 55 ml) e la soluzione portata a una temperatura di 4 °C. L'Alloc-Cl (1.5 eq, 1.78 mL, 16.65 mmol) è stato disciolto in diossano (5 mL) e aggiunto lentamente alla soluzione amminoacidica. La miscela è stata messa in agitazione per 1 ora a 4 °C e poi per 2 ore a 25 °C, mantenendo il pH a 9-10. Il diossano è stato evaporato e la fase acquosa sottoposta a lavaggi con TBME (3 × 50 ml), quindi acidificata con HCl (1 N) fino a pH 6-7 e il prodotto estratto con EtOAc (3 × 50 ml). Il solvente è stato evaporato per fornire 4.35 g di prodotto solido bianco (resa 88% ; purezza 85%). HPLC analitico (gradiente lineare da 0 a 100% ACN; 15 min, flusso 1 mL/min): $t_{\text{R}} = 13.9$ min. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.36 (m, 6H, CH_{Ar} Trt), 7.21 (m, 6 H, CH_{Ar} Trt), 7.14 (m, 3H, CH_{Ar} Trt), 5.79 (m, 1 H, CH Alloc), 5.27 (d, 1H, NH), 5.18(m, 2 H, CHH' Alloc), 4.41 (m, 2H, CH_2 Alloc), 3.94 (m, 1H, CH^{α}), 2.59 (m, 2H, CH_2^{β}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 174.5 (CO Cys); 155.6 (CO Alloc); 144.1 (C_{Ar} Trt); 132.5 (CH Alloc); 129.4 (CH_{Ar} Trt), 128.0 (CH_{Ar} Trt), 126.8 (CH_{Ar} Trt); 117.9 (CHH' Alloc); 67.0 (CH_2 Alloc); 66.0 (C Trt); 52.7 (CH^{α}); 33.6 (CH_2^{β}). HPLC-ESMS: m/z calcolato per $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$, 447.2; 445.5 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Alloc-NMe-Cys(Trt)-OH. In un pallone è stato sospeso NaH (60% in olio minerale) (617 mg, 15.43 mmol) in THF anidro (20 ml) sotto azoto e la sospensione è stata raffreddata a 4 °C. L'Alloc-Cys(Trt)-OH (2.87 g, 6.43 mmol) è stata disciolta in THF (4 mL) e la soluzione aggiunta lentamente alla sospensione di NaH. Il MeI (1.33 mL, 21.21 mmol) è stato introdotto goccia a goccia e la reazione è stata lasciata in agitazione per 2 ore a 4 °C e 10 ore a temperatura ambiente. MeOH e H_2O sono stati aggiunti e il THF evaporato. La soluzione acquosa è stata lavata con TBME (3 × 20 ml), acidificata con HCl (1 N) fino a pH 6-7 e il prodotto estratto con EtOAc (3 × 30 ml). Il solvente è stato seccato su Na_2SO_4 e evaporato e il prodotto ridisciolti in ACN e H_2O e infine liofilizzato per dare 2.34 g di solido bianco. (79% resa; 97% purezza). HPLC analitico (gradiente lineare da 0 a 100% ACN; 15 min, flusso 1 mL/min): $t_{\text{R}} = 14.5$ min. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): conformero maggioritario δ 7.42 (m, 6H, CH_{Ar} Trt), 7.28 (m, 6H, CH_{Ar} Trt), 7.20 (m, 3H, CH_{Ar} Trt), 5.85 (m, 1H, CH Alloc), 5.21 (m, 2H, CHH' Alloc), 4.54 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2 Alloc), 3.92 (m, 1H, CH^{α}), 2.72 (m, 2H, CH_2^{β}), 2.68 (s, 3H, NCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3):

major conformer δ 174.7 (CO Cys); 156.6 (CO Alloc); 144.4 (C_{Ar} Trt); 132.5 (CH Alloc); 129.5 (CH Trt), 127.9 (CH Trt), 126.8 (CH Trt); 117.4 (CHH' Alloc); 67.0 (C Trt); 66.4 (CH₂ Alloc); 60.4 (CH₂ ^{β}); 60.0 (CH ^{α}), 32.9 (NCH₃). HPLC-ESMS: m/z calcolato per C₂₇H₂₇NO₄S, 461.2; 459.4 [M - H]⁻.

Alloc-NMe-Cys(Me)-OH. Una soluzione di TFA and TIS in CH₂Cl₂ (4:1:35, 2 mL) è stata aggiunta lentamente ad un pallone contenente Alloc-NMe-Cys(Trt)-OH (0.22 mmol, 100 mg). La soluzione è stata lasciata in agitazione per un'ora a temperatura ambiente e il solvente evaporato e coevaporato con toluene. Il prodotto è stato disciolto in H₂O-THF (1:1, 2.8 mL) e la soluzione raffreddata a 4 °C. Mantenendo il pH a 7, il MeI (0.31 mmol, 20 μ L) è stato aggiunto goccia a goccia. La miscela è stata agitata per 4 ore a temperatura ambiente e il THF evaporato. La fase acquosa è stata basificata a pH 9, sottoposta a lavaggi con TBME (3 \times 5 mL), quindi acidificata fino a pH 3.5 ed estratta con EtOAc (3 \times 7 mL). La fase organica è stata seccata su MgSO₄ ed evaporata per ottenere 40.0 mg di olio incolore (78 % resa, 80% purezza). HPLC analitico (gradiente lineare da 0 a 100% ACN; 15 min; flusso 1 mL/min): t_R = 9.2 min. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) conformero maggioritario: δ 5.93 (m, 1H, CH Alloc), 5.35 (dd, 1H, CHH' Alloc), 5.22 (dd, 1H, CHH' Alloc), 4.88 (m, 1H, CH ^{α}), 4.65 (d, 2H, CH₂ Alloc), 3.12 (dd, 1H, CH ^{β}), 2.95 (s, 3H, NCH₃), 2.92 (dd, 1H, CH ^{β'}), 2.15 (s, 3H, SCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): conformero maggioritario δ 174.8 (CO), 157.2 (CO Alloc), 136.8 (CH Alloc), 117.9 (CHH' Alloc), 67.1 (CH₂ Alloc), 58.8 (CH ^{α}), 33.1 (CH₂ ^{β}), 32.0 (NCH₃), 17.9 (SCH₃). ESMS: m/z calcolato per C₉H₁₅NO₄S, 233.07; 234.3 [M + H]⁺.

Boc-NMe-Cys(Trt)-OH.

La Boc-Cys(Trt)-OH (5.0 g, 10.8 mmol) è stata disciolta THF anidro (10 mL). La soluzione è stata gocciolata su una sospensione di NaH in olio minerale al 60 % (0.84 g, 25.9 mmol) in THF anidro (35 mL) raffreddata a 4°C. Il MeI (2.2 mL, 35.6 mmol) è stato poi introdotto goccia a goccia e la reazione lasciata in agitazione 12 ore (da 0 °C a 25 °C). MeOH e H₂O sono stati aggiunti alla miscela di reazione e il solvente evaporato. La fase acquosa è stata sottoposta a lavaggi con TBME (3 \times 100 mL), acidificata fino a pH 4.5 ed estratta con EtOAc (4 \times 100 mL), seccata su MgSO₄ ed evaporata per fornire 4.8 g di solido bianco (96% resa; 97% purezza). HPLC analitico (gradiente lineare da 0 a 100% ACN; 15 min; flusso 1 mL/min): t_R = 15.1 min. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) miscela di due rotameri δ 7.42 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.29 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.21 (m, 3H, CH_{Ar}), 3.82 & 3.68

(dd, 1H, CH^α), 2.84-2.72 (m, 2H, CH₂^β), 2.69 & 2.67 (s, 3H, NCH₃), 1.45 & 1.38 (s, 9H, CH₃ Boc). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) miscela di due rotameri δ 175.7 & 174.9 (CO Cys), 156.4 & 154.9 (CO Boc), 144.7 (3C_{Ar}), 129.8 (6CH_{Ar}), 128.2 (6CH_{Ar}), 127.0 (3CH_{Ar}), 81.3 & 81.1 (C Boc), 67.2 (C Trt), 60.6 & 59.8 (CH^α), 34.3 & 33.8 (NCH₃), 31.7 & 31.1 (CH₂^β), 28.5 (3CH₃ Boc). HPLC-ESMS: *m/z* calcolato per C₂₈H₃₁NO₃S, 477.20; 477.12 [M - H]⁻.

Boc-NMe-Cys(Acm)-OH.

La Boc-NMe-Cys(Trt)-OH (2.8 g, 5.36 mmol) è stata sospesa in H₂O (8.4 mL) ed è stato aggiunto l'acetamidometanolo (0.62 g, 6.96 mmol), seguito dall'aggiunzione di una soluzione di TFA-TFMSA-TIS (92.5:5:2.5; 50 mL) goccia a goccia. La miscela è stata lasciata in agitazione per 16 ore a temperatura. Il solvente è stato rimosso e si sono realizzate coevaporazioni con TBME (3 × 50 mL). L' H-NMe-Cys(Acm)-OH è stata ridisciolta in H₂O (25 mL) e THF (50 mL) e il pH mantenuto a 8-9 per addizione di NaOH al 50%. La (Boc)₂O (2.3 g, 10.72 mmol, 2 eq.) è stata addizionata e la miscela è stata mantenuta in agitazione per 24 ore a 25°C, ad un valore di pH di 8-9. Il THF è stato evaporato e la fase acquosa sottoposta a lavaggi con TBME (3 × 100 mL), acidificata fino a pH 4.0 per addizione di HCl (1 N) ed estratta con EtOAc (4 × 100 mL). La fase organica è stata seccata su MgSO₄ ed evaporata per fornire 1.35 g di un solido bianco (90% resa, 93% purezza). HPLC analitico (gradiente lineare da 0 a 100% ACN; 15 min, flusso 1 mL/min): *t_R* = 7.9 min. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.72 (br s, 1H, NH), 4.92 (m, 1H, CHH' Acm), 4.56 (m, 1H, CH^α), 4.21 (m, 1H, CHH' Acm), 3.21 (m, 1H, CH^β), 2.89 & 2.82 (m, 4H, CH^{β'} & NCH₃), 2.05 (m, 3H, CH₃ Acm), 1.50 (s, 9H, CH₃ Boc). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.6 (CO Cys), 159.1 (CO Acm), 153.5 (CO Acm) , 80.9 (C Boc), 59.3 (CH^α), 40.6 (CH₂ Acm), 32.3 (NCH₃), 31.4 (CH₂^β), 28.3 (CH₃ Boc), 22.9 (CH₃ Acm). HPLC-ESMS: *m/z* calcolato per C₁₂H₂₂N₂O₅S, 306.12; 306.67 [M + H]⁺.

2.8.5 PREPARAZIONE DELL'ANALOGO DELLA AZA-TIOCORALLINA-N METILATA

2-QXA-D-Dap(Alloc)-Gly-O-CTC-PS

La resina CTC (200 mg, 1.6 mmol/g) è stata posta in una siringa di polipropilene da 10 ml dotata di 2 filtri di polipropilene. La resina è stata lavata con DMF (5 × 1 min) e DCM (3 × 1 min). Il DCM utilizzato per i passaggi di sintesi in fase solida è stato sempre passato su allumina. E' stata introdotta una soluzione di FmocGlyOH (60 mg, 0.2 mmol) e DIEA (234 µL, 1.32 mmol, 6.6 eq.) in DCM (2 mL). Dopo 10 minuti è stata aggiunta una maggiore quantità di DIEA (117 µL, 0.66 mmol, 3.3 eq) e la miscela è stata agitata per 50' a temperatura ambiente. La reazione è stata spenta mediante l'introduzione di MeOH (200 µL) e la miscela è stata agitata ulteriormente per 10' a temperatura ambiente. Il solvente è stato filtrato e la resina sulla quale è ancorato il peptide è stata lavata con DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min), piperidina/DMF (1:5; 2 × 1 min, 2 × 5 min). La funzionalizzazione della resina è stata calcolata in base alla misura di assorbanza a 290 nm e ha fornito un valore di 0.98 mmol/g.

$Z = A X / \epsilon Y l$ dove Z è la funzionalizzazione della resina (mmol g⁻¹), A l'assorbanza, X volume di solvente (mL), ϵ il coefficiente di assorbività molare (= 5800 L mol⁻¹ cm⁻¹), Y il peso della resina (g), l la lunghezza della cuvetta (cm).

L'allungamento della catena peptidica è proseguito aggiungendo alla siringa l'amminoacido Fmoc-D-Dap(Alloc)-OH (201 mg, 0.49 mmol, 2.5 eq) con HATU (186 mg, 0.49 mmol, 2.5 eq), HOAt (66.6 mg, 0.49 mmol, 2.5 eq) usati come agenti attivanti e DIEA (166 µL, 0.98 mmol, 6 eq) in DMF (2 mL). La miscela è stata lasciata in agitazione per 35' a temperatura ambiente. La soluzione è stata filtrata ed in seguito a lavaggi della resina con DMF (3 × 0.5 min), DCM (3 × 0.5 min), DMF (3 × 0.5 min), DCM (3 × 0.5 min) è stata aggiunta una soluzione di Ac₂O (184 µL, 1.96 mmol, 10 eq) e DIEA (340 µL, 1.96 mmol, 10 eq) in DMF (2 ml). La miscela è stata agitata per 30' a temperatura ambiente e poi la resina, sulla quale è ancorato il peptide in crescita, è stata lavata con DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min), piperidina/DMF (1:5; 2 × 1 min, 2 × 5 min) ed ancora con DMF (5 × 0.5 min) e DCM (3 × 0.5 min).

E' stata poi introdotto l'acido 2-chinossalin carbossilico (70 mg, 0.392 mmol, 2 eq) usando come agenti di coupling PyBOP (408 mg, 0.784 mmol, 4 eq), HOAt (106.6 mg, 0.784

mmol, 4 eq) e DIEA (276 μ L, 1.55 mmol, 8 eq) in DMF (2 mL). La miscela è stata lasciata in agitazione per 90' a temperatura ambiente. Dopo circa due ore di agitazione, il test di Kaiser è risultato negativo e per questo sono stati introdotti altro PyBOP (204 mg, 0.392 mmol, 2 eq), HOAt (53 mg, 0.392 mmol, 2 eq) e DIEA (138 μ L, 1.55 mmol, 4 eq) in DMF (2 mL). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per altre 2 ore. Dopo filtrazione e lavaggi della resina con DMF (5 \times 0.5 min) e DCM (3 \times 0.5 min), un' aliquota di resina è stata trattata con una soluzione di TFA al 2% in DCM per effettuare un' analisi HPLC e HPLC-ESMS.

Condizioni HPLC: t_R = 8.64 min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 100%.

Condizioni HPLC-ES: t_R = 8.59 min da 0:100 to 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min. m/z calcolato per C₁₈H₁₉N₅O₆: 401.13; trovato [M + H]⁺ 401.89.

{[Boc-NMeCys(Acm)-NMeCys(Me)] 2-QXA -D-Dap(NMe)-Gly-O-CTC-PS}

Prima di proseguire con l'allungamento della catena peptidica, il gruppo Alloc è stato rimosso mediante tre trattamenti da 15' l'uno con una soluzione di Pd(PPh₃)₄ (23 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq.) e PhSiH₃ (241 μ L, 1.96 mmol, 10 eq.) in DCM e la resina è stata sottoposta a lavaggi con DCM (3 \times 1 min), DMF (3 \times 1 min), DCM(3 \times 1 min), DMF (3 \times 1 min).

E' stata poi aggiunta una soluzione di 2-NBS-Cl (174 mg, 0.78 mmol, 4 eq.) e DIEA (348 μ L, 1.96 mmol, 10 eq) in DCM (2 ml) e la miscela è stata lasciata in agitazione per 90'.

In seguito alla filtrazione della soluzione e lavaggi della resina con DCM (3 \times 0.5 min), un' aliquota di resina è stata trattata con una soluzione di TFA al 2% in DCM per effettuare un' analisi HPLC e HPLC-ESMS.

Condizioni HPLC: t_R = 9.55 min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 100%

Condizioni HPLC-ES: t_R = 9.59 min da 0:100 to 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min. m/z calcolato per C₂₀H₁₈N₆O₈S: 502.09; trovato [M + H]⁺ 502.74.

La resina è stata sottoposta dunque a lavaggi con DMF (3 \times 0.5 min), DCM (3 \times 0.5 min) e THF dry (3 \times 0.5 min) ed una soluzione di PPh₃ (257 mg, 0.98 mmol, 5 eq) e MeOH (80 μ L, 1.96 mmol, 10 eq) in THF dry e una soluzione di DIAD (110 μ L, 5 mmol, 5 eq) in THF dry sono state unite ed aggiunte alla resina. La soluzione è stata agitata per 1h a temperatura ambiente ed in seguito alla filtrazione del solvente e lavaggi con THF dry (3 \times 0.5 min) DCM (3 \times 0.5 min) e THF dry (3 \times 0.5 min), la resina è stata sottoposta nuovamente alla reazione di metilazione nelle stesse condizioni sopra riportate. In seguito alla rimozione del solvente per filtrazione e a lavaggi con THF dry (3 \times 0.5 min) DCM (3

× 0.5 min) e THF dry (3 × 0.5 min), un' aliquota di resina è stata trattata con una soluzione di TFA al 2% in DCM per effettuare un' analisi HPLC e HPLC-ESMS.

Condizioni HPLC: $t_R = 9.91$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 78%.

Condizioni HPLC-ES: $t_R = 9.94$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per C₂₁H₂₀N₆O₈S: 516.11; trovato [M + H]⁺ 516.92

La resina è stata quindi sottoposta a 2 trattamenti di 15 minuti con DBU (147 μL, 0.98 mmol, 5 eq.) e mercaptoetanolo (144 μL, 1.96 mmol, 10 eq) in DMF (2 mL) e a lavaggi con DMF (3 × 1 min), DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min). un' aliquota di resina è stata trattata con una soluzione di TFA al 2% in DCM per effettuare un' analisi HPLC e HPLC-ESMS.

Condizioni HPLC: $t_R = 5.72$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 80%.

Condizioni HPLC-ES: $t_R = 4.98$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per C₁₅H₁₇N₅O₄: 331.13; trovato [M + H]⁺ 331.89.

L'allungamento della catena peptidica è proseguito aggiungendo alla siringa l'amminoacido AllocNMeCys(Me)OH (184 mg, 0.78 mmol, 4 eq) con HATU (298 mg, 0.784 mmol, 4 eq), HOAt (106.6 mg, 0.784 mmol, 4 eq) usati come agenti attivanti e DIEA (570 μL, 3.2 mmol, 8 eq) in DMF (2 mL). La miscela è stata lasciata in agitazione per 35' a temperatura ambiente sotto controllo con il test di De Clercq⁶. In seguito alla rimozione del solvente per filtrazione e a lavaggi con DMF (3 × 0.5 min), DCM (3 × 0.5 min) e DMF (3 × 0.5 min), un' aliquota di resina è stata trattata con una soluzione di TFA al 2% in DCM per effettuare un' analisi HPLC e HPLC-ESMS.

Condizioni HPLC: $t_R = 9.79$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 92%.

Condizioni HPLC-ES: $t_R = 9.94$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per C₂₄H₃₀N₆O₇S: 546.19; trovato [M + H]⁺ 547.02.

Il cleavage del gruppo Alloc è stato conseguito attraverso 3 trattamenti di 15 minuti con Pd(PPh₃)₄ (23 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq) e PhSiH₃ (241 μL, 1.96 mmol, 10 eq.) in DCM, seguiti da lavaggi con DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min), DCM(3 × 1 min), DMF (3 × 1 min).

Alla siringa contenente la resina è stata poi aggiunto una soluzione di BocNMeCys(Acm)OH (180 mg, 0.58 mmol, 3 eq), HATU (223 mg, 0.588 mmol, 3 eq), HOAt (80 mg, 0.588 mmol, 3 eq) e DIEA (210 μL, 1.18 mmol, 6 eq) in DMF (2 ml) e la miscela è stata lasciata in agitazione per 35 min a temperatura ambiente sotto controllo con il test di De Clercq. La reazione di coupling è stata effettuata una seconda volta utilizzando

sempre l'amminoacido citato (240 mg, 0.784 mmol, 4 eq) e come agenti di coupling PyAOP (408 mg, 0.784 mmol, 4 eq), HOAt (107 mg, 0.784 mmol, 4 eq) e DIEA (280 μ L, 1.57 mmol, 8 eq) in DMF (2 ml). La siringa è stata lasciata in agitazione per 90' a temperatura ambiente, ed in seguito sono stati aggiunti ulteriormente PyAOP, HOAt e DIEA nelle stesse condizioni sopra descritte e la miscela lasciata in agitazione per altre 2 h a temperatura ambiente. La soluzione è stata filtrata e la resina lavata con DCM (3 x 1 min), DMF (3 x 1 min), DCM(3 x 1 min), DMF (3 x 1 min).

Un' aliquota di resina è stata trattata con una soluzione di TFA al 2% in DCM per effettuare un' analisi HPLC e HPLC-ESMS.

Condizioni HPLC: miscela di due conformeri $t_R = 9.57$ (minore) min and 10.2 min (maggiore) da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 65%.

Condizioni HPLC-ES: miscela di due conformeri 9.59 (minore) and 10.3 min (maggiore) da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per C₃₂H₄₆N₈O₉S₂: 750.28; found [M + H]⁺ 751.75 [M – Boc + H]⁺ =651.57
{[2-QXA -D-Dap(NMe&)-Gly-O-CTC-PS] [NMeCys(&¹)-NMeCys(Me)&]}₂

La formazione del ponte disolfuro intermolecolare (dimero) è stata conseguita trattando la resina con una una soluzione di iodio (247 mg, 0.98 mmol, 5 eq., 2.5 eq x Acm) in DMF (0.01 M) e la miscela è stata messa in agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Si è ripetuta la procedura e, dopo filtrazione, la resina è stata lavata con DMF (3 x 1 min), DCM (3 x 1 min), DMF (3 x 1 min), DCM (3 x 1 min). L'analisi HPLC-MS di una piccola aliquota di peptide distaccato dalla resina ha dimostrato che la reazione è andata a completezza.

{[2-QXA -D-Dap(NMe&)-Gly-OH] [NMeCys(&¹)-NMeCys(Me)&]}₂

Il peptide è stato distaccato dalla resina mediante l'uso di una soluzione di TFA/DCM (2:98, 5 x 1 min) ed il filtrato è stato raccolto in presenza di H₂O, evaporato sotto azoto e liofilizzato.

Condizioni HPLC: miscela di due conformeri $t_R = 12.3$ min (minore) e 12.8 min (maggiore) da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 40% (riferita al dimero protetto alla funzione amminica della Cys con i due gruppi Boc).

$t_R = 8.17$ min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 40% (dimero senza un gruppo Boc).

Condizioni HPLC-ES: miscela di due conformeri 12.5 (minore) e 13.1 min (maggiore) da 0: 100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min. (dimero con i due gruppi Boc)

m/z calcolato per $C_{58}H_{80}N_{14}O_{16}S_4$: 1356.48; trovato $[M + H]^+$ 1357.53.

$t_R = 8.12$ min. da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; dimero protetto con un solo gruppo Boc.

m/z calcolato per $C_{53}H_{72}N_{14}O_{14}S_4$: 1256.42; trovato $[M + H]^+$ 1257.53.

In seguito alla liofilizzazione il dimero protetto alla funzione amminica della cisteina con i due gruppi Boc è stato trattato con una soluzione di TFA/DCM/H₂O = 35:5:60 per 45 minuti, il crudo liofilizzato ed analizzato all' HPLC ed all' HPLC-MS.

Condizioni HPLC: miscela di tre conformeri $t_R =$ intervallo tra 7.19 a 7.27 min da 0:100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min; purezza 40%

Condizioni HPLC-ES: miscela di tre conformeri $t_R = 6.12$; 6.29 e 6.43 min. da 0: 100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per $C_{48}H_{64}N_{14}O_{12}S_4$: 1156.37; trovato $[M + H]^+$ 1157.20, 1157.33, 1157.07
 $[M + 2H]^{2+}$ 580.04, 580.04, 579.

{[2-QXA- D-Dap(Me&¹)-Gly-NMeCys(&²)-NMe-Cys(Me)&³][2-QXA-D-Dap(Me&³)-Gly-NMeCys(&²)-NMe-Cys(Me)&¹}

Il dimero liofilizzato (28 mg, 0.024 mmol, 1 eq, 0.2 mM) è stato sciolto in DMF/DCM (1:9) ed aggiunto ad una soluzione di HOAt (26 mg, 0.2 mmol, 8 eq.) in DMF/DCM (1:9;50 mL, 1mM). Dopo aver controllato che il pH fosse neutro, sono state aggiunte la DIEA fino a pH 8 ed il PyBOP (99 mg, 0.2 mmol, 8 eq.). la reazione è stata agitata per 4 h a temperatura ambiente. Dopo è stato aggiunto altro PyBOP (50 mg, 0.1 mmol, 4 eq) in DMF e la reazione è stata lasciata in agitazione per altre 20 h.

Quando l'analisi per HPLC-MS ha dimostrato la scomparsa del prodotto di partenza, il solvente è stato evaporato ed il bicyclo grezzo è stato ridisciolti in DCM. Gli estratti organici sono stati trattati con lavaggi con NH₄Cl sat. (2 x 50 mL) e Brine (2 x 50 mL), seccati su MgSO₄ ed evaporati.

Condizioni HPLC-ES: $t_R = 10.6$ min. da 0: 100 a 100:0 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per $C_{48}H_{60}N_{14}O_{10}S_4$: 1120.35; trovato $[M + H]^+$ 1121.20.

Il grezzo di reazione ottenuto è stato purificato mediante HPLC analitico

Condizioni di purificazione: gradiente da 25:75 a 55:45 (ACN/ H₂O) in 30 min; velocità di flusso: 1ml/min.

Sono stati raccolti tre differenti picchi molecolari, identificati nuovamente mediante l'analisi all' HPLC ed all' LC- HPLC-MS

Condizioni HPLC: t_{R4} = 7.91-8.04 min; t_{R5} = 8.89 min.; t_{R9} = 9.75 min. da 30:70 a 70:30 (ACN/H₂O) in 15 min. In particolare tra i tre stereoisomeri quello con t_{R9} = 9.75 min. ha mostrato una purezza del 93%, gli altri hanno mostrato una purezza di poco superiore all'82%.

Condizioni HPLC-ES. t_{R4} = 7.42-7.57 min; t_{R5} = 8.89 min, t_{R9} = 9.30 min (maggiore) da 30:70 a 70:30 (ACN/H₂O) in 15 min.

m/z calcolato per C₄₈H₆₀N₁₄O₁₀S₄: 1120.35;

1) per lo stereoisomero con t_{R4} = 7.42-7.57 min , trovato [M + H]⁺ 1121.20; [M+ Na⁺] 1143.90;

2) per lo stereoisomero con t_{R5} = 8.89 min trovato [M + H⁺] 1121.13; [M+ Na⁺] 1143.21; [M+ K⁺] 1161.21

3) per lo stereoisomero con t_{R9} = 9.30 min trovato [M + H⁺] 1121.40; [M + 2H⁺]²⁺ 561.65; [M+ Na⁺] 1149.27; [M+ K⁺] 1158.09;

Condizioni MALDI-TOF: m/z calcolato per C₄₈H₆₀N₁₄O₁₀S₄: 1120.35;

1) per lo stereoisomero con t_{R4} = 7.42-7.57 min trovato [M + H⁺] 1122.13; [M+ Na⁺] 1143.16; [M+ K⁺] 1159.11;

2) per lo stereoisomero con t_{R5} = 8.89 min trovati [M + H⁺] 1122.13; [M+ Na⁺] 1143.21; [M+ K⁺] 1161.21;

3) per lo stereoisomero con t_{R9} = 9.30 min trovato [M + H⁺] 1122.26; [M+ Na⁺] 1143.23; [M+ K⁺] 1159.21;

Sono stati recuperati rispettivamente per

1) per lo stereoisomero con con t_{R4} = 7.42-7.57 min, 370 µg.(resa calcolata rispetto al numero di moli della resina secondo quantificazione Fmoc a livello del primo amminoacido: 0.2%)

2) per lo stereoisomero con t_{R5} = 8.89 min, 1.18 mg (resa calcolata rispetto al numero di moli della resina secondo quantificazione Fmoc a livello del primo amminoacido: 0.5%)

3) per lo stereoisomero con t_{R9} = 9.30 min, 1.534 mg (resa calcolata rispetto al numero di moli della resina secondo quantificazione Fmoc a livello del primo amminoacido: 0.7%)

2.8.6 SAGGI BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI

L'attività antiproliferativa della tiocorallina e dell'analogo è stata misurata mediante il test della sulforodamina B. La sulforodamina B è un colorante che si unisce specificamente alle proteine. Si utilizza per quantificare il contenuto totale di proteine in un campione ottenendo così una stima del numero di cellule con cui questo correla. La quantificazione del contenuto di sulforodamina B si effettua attraverso una lettura spettrofotometrica a 565 nm. Il saggio si realizza in placche da 96 pozzetti tipo ELISA, nei quali sono dispensate soluzioni contenenti un numero definito di cellule tumorali (2000-10000 cellule/pozzetto dipendendo dal tipo cellulare). Le cellule sono lasciate aderire alla placca durante 12 ore, in presenza di terreno DMEM addizionato con 10% siero fetale bovino e al 5% di pressione di CO₂ a 37 °C. Successivamente si aspira il medio e lo si sostituisce con medio fresco (nel controllo negativo) o medio contenente il peptide da testare in differenti concentrazioni (da 10⁻⁴ molare a 10⁻¹¹ molare). Si lascia così incubare la placca a 37 °C per 24 o 48 ore. I peptidi sono dissolti ad alta concentrazione inizialmente in una soluzione contenente DMSO/MeOH/H₂O che viene poi diluita serialmente all'interno dei pozzetti.

In questo tipo di saggio l'attività antiproliferativa è valutata mediante tre differenti parametri: IC₅₀ (la concentrazione che inibisce la crescita delle cellule del 50 %), TGI (la concentrazione alla quale si ottiene l'inibizione totale della crescita cellulare) e LC₅₀ (la concentrazione alla quale si ottiene il 50% della morte cellulare).

Per l'ottenimento di questi tre parametri è necessaria una lettura dell'assorbanza a 565 nm al tempo zero, ossia la lettura dello stesso campione, o di uno equivalente, immediatamente dopo l'aggiunta delle soluzioni contenenti le molecole da testare. La IC₅₀ definita come la concentrazione alla quale si ottiene un valore di assorbanza pari a $[(A_t - A_0) \times 0.5]$, con A_t = assorbanza al tempo t e A_0 = assorbanza al tempo 0. Analogamente la TGI è la concentrazione alla quale si ottiene un'assorbanza pari a $[(A_t - A_0) = 0]$ e la LC₅₀ la concentrazione alla quale $A_t = A_0 \times 0.5$.

3. BIBLIOGRAFIA

- 1) Carmeliet, P. *Nat. Med.*, **2000**, 6, 389-395.
- 2) S.M. Hyder, G.M. Stancel, *Mol. Endocrinol.* **1999**, 13, 806-811
- 3) J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, 1, 27-31.
- 4) R.S. Kerbel, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 505-515.
- 5) P. Carmeliet, *Nature* **1999**, 401, 657-658.
- 6) Papetti, M. *Am.J. Physiol. Cell. Physiol.* **2002**, 282, C497-C970.
- 7) Hlatky, L. et al. *J. Natl Cancer Inst.* **2002**, 94, 883-893.
- 8) J. Folkman, *Cancer Medicine* **2000**, 2546.
- 9) Hanahan, D. et al *Cell* **1996**, 86, 353.
- 10) Benjamin, L.E. et al *J. Clin. invest* **1999**, 103, 159-165.
- 11) Morikawa, S. et al. *Am. J. Pathol* **2002**, 160, 985-1000.
- 12) Folberg, R. et al. *Am. J. Pathol.* **2000**, 156, 361-381.
- 13) McDonald, D. M. et al. *Am. J. Pathol* **2000**, 156, 383-388.
- 14) Abdollahi, A. et al. *Mol. Cell.* **2004**, 13, 649-663.
- 15) Satchi-Fainaro, R. e al. *Cancer Cell.* **2005**, 7, 251-261.
- 16) Satchi-Fainaro, R. e al. *Nature Med.* **2004**, 10, 255-261.
- 17) Pore, N. et al. *Cancer Res.* **2006**, 15, 3197-3204.
- 18) Sweeney, C.J. et al. *Cancer Res.* **2001**, 61, 3369-3372.

- 19) Browder, T et al. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1878-1886.
- 20) Hanahan, D., Bergers, G. et al. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1045-1047.
- 21) Klement, G. et al. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, R15-R24.
- 22) Folkman, J. *Nature Review, Drug discovery*, **2007**, *6*, 273-286.
- 23) Leung, D.W., Cachianes, G., et al. *Science* **1989**, *246*, 1306-1309.
- 24) Keck, P.J., Hauser, S.D., et al. *Science* **1989**, *246*, 1309-1312.
- 25) K.A. Houck, N. Ferrara, J. Winer, et al. *Mol. Endocrinol.* **1991**, *5(12)*, 1806-1814
- 26) E. Tischer, R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, C.J. Fiddes, J.A. Abraham, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (18), 11947-11954.
- 27) Ferrara, N. e Henzel, W.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851-858.
- 28) Plouet, J., Moro, F., Bertagnolli, S. et al **1997** *J.Biol.Chem* *272*, 13390-13396.
- 29) Hauk, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M. et al. *J.Biol.Chem* **1992**, *267*, 26031-26037
- 30) Ferrara, N. e Davis-Smyth, T *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4-25
- 31) Melter, M., Reinders, M.E., Sho, M. et al. *Blood.* **2000**, *96*, 3801-3808.
- 32) Freeman, M.R., Schneck, F.X., Gagnon., M.L. et al. . *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4140-4145.
- 33) N. Ferrara, *Curr. Opin. Biotech.* **2000**, *11*, 617-624
- 34) T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, K. Alitalo, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 203-212.
- 35) N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669-676
- 36) C. deVries, J.A. Escobedo, H. Ueno, K.A. Houck, N. Ferrara, L.T. Williams, *Science* **1992**, *255*, 989-991.
- 37) B.I. Terman, M.D. Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, P. Bohlen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *34*, 1578-1586.

- 38) B. Li, G. Fuh, G. Meng, X. Xin, M.E. Gerritsen, B. Cunningham, A.M. de Vos, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29823-29828.
- 39) D.T. Shima, A.P. Adamis, N. Ferrara, K.T. Yeo, T.K. Yeo, M. Allende, J. Folkman, P.A. D'Amore, *Mol. Med.* **1995**, *2*, 64-71.
- 40) S. Frank, G. Haubner, G. Breier, M.T. Longaker, D.G. Greenhalgh, S. Werner, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12607-12613.
- 41) K.P. Claffey, W.O. Wilkinson, B.M. Spiegelman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16317-16322.
- 42) N. Ferrara, K. Altalo, *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1359-1364.
- 43) Y.A. Muller, H.W. Christinger, B.A. Keyt, A.M. de Vos, *Structure* **1997**, *5*, 1325-1338.
- 44) Y.A. Muller, B.Li, H.W. Christinger, J.A. Wells, B.C. Cunningham, A.M. de Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* **1997**, *94*, 7192-7197.
- 45) Y.A. Muller, Y. Chen, H.W. Christinger, B. Li, B.C. Cunningham, H.B. Lowman, A.M. de Vos, *Structure* **1998**, *6*, 1153-1167.
- 46) N. Ferrara, T. Davis-Smyth, *Endocrine Rev.* **1997**, *18*, 4-25.
- 47) C. Wiesman, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, A.J. Wells, A.M. de Vos, *Cell* **1997**, *91*, 695-704.
- 48) S.P. Cooke, G.M. Boxer, L. Lawrence, R.B. Pedley, D.I. Spencer, R.H.J. Begent, K.A. Chester, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3653-3659.
- 49) G. Presta, H. Chen, S.J. O' Connor, V. Chisllhom, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, N. Ferrara, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4593-4599.
- 50) M. Prewett, J. Huber, Y. Li, A. Santiago, W. O' Connor, K. King, J. Overholser, A. Hooper, B. Pytowski, L. Witte, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5209-5218.
- 51) W.J. Fairbrother, H.W. Christinger, A.G. Cochran, G. Fuh, C.J. Keenan, C. Quan,

- S.K. Shriver, J.Y.K. Tom, J.A. Welles, B.C. Cunningham, *Biochemistry* **1998**, *37*, 17754-17764.
- 52) C. Wiesman, H.W. Christinger, A.G. Cochran, B.C. Cunningham, W.J. Fairbrother, C.J. Keenan, G. Meng, A.M. de Vos, *Biochemistry* **1998**, *37*, 17765-17772.
- 53) T. Asai, M. Nagatsuka, K. Kuromi, S. Yamakawa, K. Kurohane, K. Ogino, M. Tanaka, T. Taki, N. Oku, *FEBS Lett.* **2002**, *510*, 206-210.
- 54) R. Binétruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouet, C. Derbin, G. Perret, J.C. Mazié, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1525-1533.
- 55) L. Hetian, A. Ping, S. Shumei, L. Xiaoying, H. Luowen, W. Jian, M. Lin, L. Meisheng, Y. Junshan, S. Chengchao, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43137-43142.
- 56) A. Ping, L. Hetian, J. Zhang, S. Song, H. Luowen, J. Genglin, L. Xiaoying, W. Jian, M. Lin, L. Meisheng, S. Chengchao, *Int. J. Cancer* **2004**, *111*, 165-173.
- 57) L.M. Strawn, G. McMahon, H. App, R. Schreck, W.R. Kuchler, M.P. Longhi, T.H. Hui, C. Tang, A. Levitzki, A. Gazit, I. Chen, G. Keri, L. Orfi, W. Risau, I. Flamme, A. Ullrich, K.P. Hirth, L.K. Shawver, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3540-3545.
- 58) S.R. Wedge, D.J. Ogilvie, M. Dukes, J. Kendrew, J.O. Curwen, L.F. Hennequin, A.P. Thomas, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 970-975.
- 59) J.M. Wood, G. Bold, E. Buchdunger, R. Cozens, S. Ferrari, J. Frei, F. Hofman, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2178-2189.
- 60) W.F. De Grado, C.M. Summa, V. Pavone, F. Nastri, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 779-819.
- 61) R. Parthasarathy, S. Chaturvedi, K. Go, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **1996**, *64*, 1-54.
- 62) R. Aurora, T.P. Creamer, R. Scrinivasan, G.D. Rose, *Prot. Sci.* **1998**, *7*, 21-38.
- 63) C. Schellman, *Protein Folding*, Elsevier New York, 53-61.

- 64) Rance M, Sorensen OW, Bodenhausen G, Wagner G, Ernst RR, Wüthrich K *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**; *117*, 479–485.
- 65) Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K., and Ernst, R. R. *J. Am. Chem. Soc* **1988**. *110*, 7870.
- 66) Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. *Biochem Biophys Res Commun* **1980**, 95:1-6
- 67) Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acid* Wiley New York
- 68) Altieri, A.S., Hilton, D.P., Byrd, R.A *J. Am. Chem. Soc.* **1995**; *117*, 7566-7567
- 69) Yao S., Howlett G.J., Norton R.S. *J. Biomol. NMR.* **2000** *16*, 109-119.
- 70) D.A. Greenberg, K. Jin, *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 1-3.
- 71) J.M. Adams, *Genes. Dev.* **2003**, *20*, 2481-95.
- 72) Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, Bussolino F, Oliviero S. *Blood.* **2005**, *106*, 3423-31.
- 73) Steensma D P, Timm M, Witzig TE. *Methods Mol Med.* **2003**; *85*, 323-32.
- 74) A.T. Hagler, S. Lifson, P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5122-5130.
- 75) A.T. Hagler, P. Dauber, S. Lifson, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5131-5141.
- 76) A.T. Hagler, P.S. Stern, R. Sharon, J.M. Becker, F. Naider, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6842-6852.
- 77) Güntert P, Dötsch V, Wider G, Wüthrich K *J. Biomol. NMR* **1992**; *2*, 619–629.
- 78) Morris, K.F. and Johnson, J.C.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**; *114*, 3139-3141.
- 79) Denny, W.A, Turner, P.M. Atwell, G.J. et al. *Mutat Res.* **1990**, *232*, 233-241.
- 80) Ferguson, L.R., Denny, W.A. *Mutat Res.* **1991**, *258*, 123-160.
- 81) Wilson, W.R. Harris, N.M. Ferguson, L.R. . *Mutat Res.* **1984**, *44*, 4420-4431.
- 82) Ferguson, L.R, Denny, W.A *Mutat Res.* **2007**, *623*, 14-23.
- 83) Ferguson, L.R, Turner, P.M, Denny, W.A *Mutat Res.* **1990**, *232*, 337-343.

- 84) Bosquet, P.F.; Brana, M.F.; Conlon, D.; Fitzgerald, K.M. et al. *Cancer res.* **1995**, *55*, 1176-1180.
- 85) O'Reilly, S.; Baker, S.D.; Sartorius, S., Rowinsky, E.K., Finizio, M. et al. *Ann.Oncol.* **1997**, *9*, 101-104.
- 86) Brana, M.F., Cacho, M., Garcia, M.A.; de Pascual-Teresa, B.; et al. *J.Med.Chem* **2004**, *47*, 1391-1399.
- 87) Bailly, C.; Carrasco, C.; Joubert, A.; Bal, C.; et al. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4136-4150.
- 88) Otsuka, H.; Shoji, J. *Tetrahedron* **1967**, 1535.
- 89) Dell, A.; Williams, D.H.; Morris, H.R.; Smith, G. A.; Feeney, J.; Roberts, C.G. K. *JACS* **1975**, *97*, 2497.
- 90) (a) Romero, F.; Espliego, F.; Perez Baz, J.; Garcia de Quesada, T.; Gravalos, D. et al. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 734-737 b) Pèrez Baz, J.; Canedo, L.M.; Fernández-Puentes *J. Antibiot* **1997**, *50*, 738-741.
- 91) Waring, M.G.; Wakelin, M.P. *Nature* **1974**, *252*, 653-657.
- 92) Lombo, F.; Velasco, A.; Castro, A., et al. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 366-376.
- 93) Erba, E., Bergamaschi D., Ronzoni, S., *British J Cancer.* **1999**, *80*, 971-980.
- 94) Negri, A.; Marco, E.; García-Hernández, V.; Domingo, A.; Llamas-Saiz, A. L.; Porto Sandà, S. et al.; *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 3322-3333
- 95) Brandon, E. F. A.; Sparidans, R. W.; Meijerman, I.; Manzanares, I.; Beijnem J. H. M. *Investigational New Drugs*, **2004**, *22*, 241-251.
- 96) Bayo'-Puxan, N., Fernandez, A; Tulla-Puhe, J. Riego E. et al. *Chem Eur J.* **2006**, *12*, 9001-9009.
- 97) Tulla-Puche, J.; Bayò-Puxan, N.; Moreno, J. A.; Francesch, A. M.; Cuevas, C; Alvarez, M.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5322-5323.
- 98) Teixidò, M.; Albericio, F.; Giralt, E. *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 153-166.
- 99) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *CRC Press Inc*, Boca Raton, Florida, USA, **1997**, ISBN; 0-8493-9142-3
- 100) Isidro-Ilobet, A; Gulasch-Camell, J.; Álvarez M.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, *14*, 3031-3039.
- 101) Davidson, B.S. *Chem Rev* **1993**, *93*, 1771-1791.
- 102) Fusetani, N., Matsunaga, S., *Chem Rev* **1993**, *93*, 1793-1806.
- 103) Wipf, P., *Chem Rev* **1995**, *95*, 2115-2134.

- 104) Hamada, Y.; Shioiri, T.; *Chem Rev* **2005**, *105*, 4441-4482.
- 105) Cruz, M.; Tusell, J.M.; Grillo-Bosh, D.; Albericio, F.; et al., *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 324-328.
- 106) Hughes, E.; Burque, R.M.; Doig, A. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25109-25115.
- 107) Dechansreiter, M.A.; Planker, E.; Mathae, B.; Lohof, E. et al. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- 108) Nabors, L.B.; Mikkelsen, T.; Rosenfeld, S.S.; Hochberg, F.; Akella, N.S.; et al *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1651-1657.
- 109) Hogg, P.J.: *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 210-214.
- 110) Creighton, T.E. *In frontiers in Molecular Biology: mechanism in protein folding* 2nd ed.; Pain, R.H. Ed.; Oxford university Press: Oxford.UK **2000**, *32*, 250-278.
- 111) Dobson, C.M. *Nature* **2003**, *426*, 884-890.
- 112) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.
- 113) Rizo, J.; Gierasch, L.M. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387-418.
- 114) Blondeau, P.; Berse, C.; Gravel, *Can. J. Chem.*, 1967, *45*, 49-52
- 115) Marcucci, E.; Bayò-Puxan, N.; Tulla-Puche, J., Spengler, Jan, and Albericio, F.; *J.Comb.Chem.* **2008**, *10*, 69-78.
- 116) Rudolph, J.; Theis, H.; Hanke, R.; Endermann, R.; Johannsen, L.; Geschke, F.-U. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 619-626
- 117) Mitsunobu, O. *Synthesis*, **1981**, 1-28
- 118) Chiva C.; Vilaseca, E; Giralt, E; Albericio, F. *J. Pept. Sci.*, **1999**, *5*, 131-140.
- 119) Fukuyama, T.; Jow, C.K.; Cheung, M.; *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7307-7310.
- 120) Miller, S.C.; Scalan, T.S.; *J.Am.Chem.Soc.*, **1997**, *119*, 2301-2302.
- 121) Maddler, A.; Farcy, N.; Hosten, N.G.C; De Clercq, P.J.; Barry, J, Davis, A.P. **1999** *Eur. J. Org. Chem*, 2787-2791.

4 SUMMARY

DEVELOPMENT OF NEW ACTIVE PRINCIPLES FOR THE MOLECULAR RECOGNITION OF PROTEINS INVOLVED IN THE PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS

Angiogenesis, the process leading to the formation of new blood vessels from existing vessels by sprouting, bridging and intussusception¹, is regulated by a consistent number of pro- (such as VEGF, PlGF, bFGF, PDGF, HGF, MMPs, integrins, etc.) and anti- angiogenic factors (such as Angiostatin, RTK-inhibitors, Endostatin, RGD peptides, etc.). The vasculature is quiescent in the normal adult mammal, except for highly orderly processes in the female reproductive cycles² (ovulation, menstruation, implantation, pregnancy). In response to appropriate stimuli^{3,4}, the balance between pro- and anti- angiogenic molecules falters (*angiogenic-switch*⁵) and angiogenesis becomes pathological causing the development of a long list of disorders such as psoriasis, arthritis, blindness, obesity, asthma, atherosclerosis and cancer⁶.

In the last years many new anti-angiogenic factors⁷ have been approved for clinical trials, as well as a lot of new anti-angiogenic therapies in combination with the traditional therapies such as chemotherapy able to destroy the tumoral vessel growth by targeting the endothelial cells, have been developed giving promising results and showing that ‘therapeutic angiogenesis’ can provide a treatment for all the different diseases related to the dysregulated growth of blood vessels.

For these reasons the aim of this project has been the design, synthesis and characterization of new peptidic or peptidomimetic molecules able to modulate, positively or negatively, the activity of molecular systems involved in the angiogenic cascade.

In particular the attention has been focused on VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) because this protein is among the primary factors modulating the behaviour of ECs in the angiogenesis.^{8,9}

VEGF is a homodimeric protein belonging to the cystine knot growth factors family. It is encoded by a single gene that is expressed in four different isoforms (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₅) due to different splicing events. VEGF₁₆₅, the most abundant isoform, is a 45KD glycoprotein and it binds to heparin with high affinity. The biological function of VEGF is mediated through binding to two tyrosine kinases receptors, the kinase domain receptor (KDR, Flk-1 or VEGFR-2) and the Fms-like tyrosine kinase (Flt-1 or VEGFR-1)¹⁰ both localized on the cell surface of various EC types.⁹ VEGF induces receptors dimerization which stimulates EC mitogenesis.

Increased expression of KDR and Flt-1 receptor occurs in response to several stimulations and results in priming of EC toward cell proliferation, migration and angiogenesis.¹¹

Several VEGF structures have been reported. In particular crystal structure of VEGF in complex with domain 2 of the extracellular region of Flt-1 receptor (Flt-1_{D2}), the major responsible for the specific recognition, indicates that VEGF is an antiparallel homodimer, covalently linked through two disulfide bridges.¹² The analysis of structural and mutagenesis data allowed to identify residues involved in the binding to the receptors. These are distributed over a discontinuous surface which includes residues from the N-terminal helix (17-25), the loop connecting strand β 3 to β 4 (61-66) and strand β 7 (103-106) of one monomer, as well as residues from strand β 2 (46-48) and from strand β 5 and β 6 together with the connecting turn (79-91) of the other monomer. Among these regions the attention has been focused on the α -helical region (17-25) and its interaction with VEGF receptor has been studied with the aim to develop a new class of small peptidic and/or peptidomimetic molecules able to recognize VEGF receptors modulating angiogenic response.

The followed approach has consisted in designing peptides able to reproduce the structural characteristics of α -helical region preserving the residues essential for receptor binding.

On the basis of the requisites that confer stability to an α -helix, the main changes have been: insertion of N- and C-capping motifs at the ends, use of residues with strong propensity for helical conformation, elimination of unfavourable interaction of helix dipole with the charges present at the two ends by acetylating of N-terminal aminic groups and by amidation of C-terminal carboxylic group.

Six peptidic sequences thus have been designed and synthesized including the natural fragment from VEGF protein (residues 15-28) named VEGF15. All sequences are following reported (residues responsible for receptor interaction are in red, mutated residues in bleu):

		15			20			25					
VEGF15	Ac-K	V	K	F	M	D	V	Y	Q	R	S	Y	C H P-NH ₂
FMK	Ac-K	L	T	F	M	E	L	Y	Q	L	K	Y	K G I-NH ₂
MA	Ac-K	L	T	W	M	E	L	Y	Q	L	A	Y	K G I-NH ₂
KA	Ac-K	L	T	W	K	E	L	Y	Q	L	A	Y	K G I-NH ₂
MK	Ac-K	L	T	W	M	E	L	Y	Q	L	K	Y	K G I-NH ₂
QA	Ac-K	L	T	W	Q	E	L	Y	Q	L	A	Y	K G I-NH ₂
KK	Ac-K	L	T	W	K	E	L	Y	Q	L	K	Y	K G I-NH ₂

All peptides were synthesized by Fmoc strategy on an ADVANCED CHEMTECH 348 Ω automated peptide synthesizer using a Rink-Amide MBHA resin that leaves C-terminal end in the amidic form. Each synthetic cycle was performed as described:

- ❖ Fmoc deprotection of amino acid N-terminal with 30% piperidine in DMF

- ❖ Double coupling under a fourfold excess of amino acid using 0.45M TBTU (4 eq)/0.45M HOBt (4 eq)/2M DIPEA (8 eq) in DMF
- ❖ Capping with a solution of acetic anhydride/HOBt/DIEA/DMF (4.7:4:91.3 v/v/v)

At the end of the synthesis all peptides were cleaved from the resin and deprotected using a mixture of TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:1 v/v/v/v). The resins were then filtered and peptides were precipitated using ethyl ether and purified by preparative RP-HPLC. Peptides purity was confirmed by analytical RP-HPLC and their identity by mass spectrometry MALDI-TOF, giving all products in good yield.

In order to study the conformational properties in aqueous medium of all peptides, CD were performed. Results obtained indicated that all six peptides assume an α -helical conformation, but the major percentage of helical structure was found for MA and MK. The same result about the natural folding of MA and MK peptides was obtained by ¹H NMR spectra carried out in H₂O/D₂O solution. Furthermore the self-association of MA and MK in aqueous medium was investigated by ¹H-NMR spectra analysis and it was possible to conclude that both peptides were prevalently monomeric.

Since it is known from literature data¹³ that one of the main biological functions of VEGF is apoptosis inhibition in the EC, in order to test the ability of designed peptides to antagonize this biological activity, apoptosis assays in HUVEC cells were performed. In particular, fluorimetric analysis of caspase 3 activity, enzyme specific of apoptotic process, was carried out.¹⁴ The assays indicated, in good agreement with literature data,¹⁵ that VEGF was able to inhibit about 40% caspase 3 activity. Subsequently, each peptide has been tested for its capacity to inhibit the function of rescue from apoptosis that VEGF effects on HUVEC cells in starvation. Obtained results indicated that two of the six designed peptides, MA and MK, were able to inhibit more than 80% VEGF activity. Furthermore for MA peptide the dose- time- dependence of antagonist effect and binding assay by FACS technique were performed. Binding tests indicated that MA was able to bind VEGF receptors expressed on cell surface in a specific way competing with VEGF binding. For the peptide MA was also investigated its capacity to block ERK kinase activation¹⁶ induced by the binding of VEGF with its own receptors. Obtained results indicated that MA is able to inhibit the phosphorylation of ERK kinase, showing that this peptide still act as an antagonist of VEGF and so it can be considered a valid candidate for a future *in vivo* experimentation

In conclusion it has been possible to stabilize a natural peptidic sequence in the attended conformation using small peptides (15 amino acids) that have a potential application in tumor cells targeting and therapy. These peptides, working as antagonists of natural protein, may be used opportunely functionalized as biospecific probe for the selective recognition of VEGF receptors overexpressed in pathological angiogenesis.

NEW POTENT CICLIC PEPTIDES WITH ANTITUMORAL ACTIVITY.

Triostin¹⁷, Echinomycin¹⁸, Thiocoraline¹⁹ belong to a family of potent antitumoral bicyclic peptide antibiotics, all of marine origin but proceeding from distinct actinomycetes. These octapeptides (Fig. 1) share a common general structure characterized by a) bicyclic structures, b) C₂ symmetry, c) DNA intercalation chromophore moieties; d) Ester or thioester linkages at the terminal part of the peptide chains, e) disulfide or analogous bridges in the middle of the peptide chain, f) the presence of several N-methyl amino acids, g) non natural amino acids of D configuration, h) two key heterocyclic units which act as bisintercalators to DNA²⁰

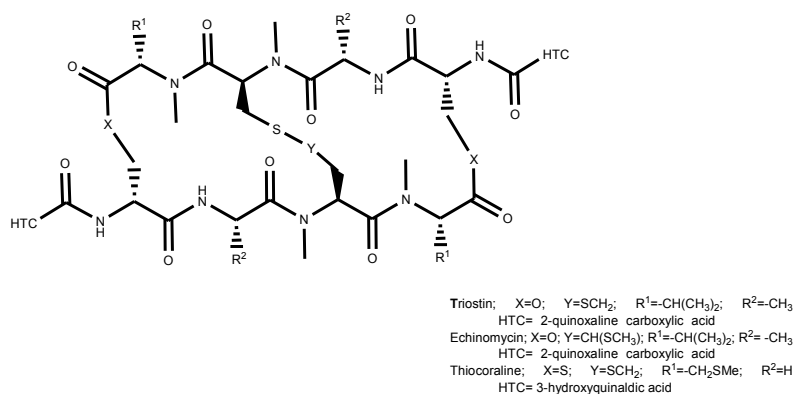


Fig.1: general structure of the family of the cited octapeptides

Among these octadepsipeptides, Thiocoraline is an antitumor cyclic thiopeptide isolated from the mycelium of the marine actinomycete *Micromonospora* sp. that has been shown to exhibit exceptionally potent activity in the L1210 mouse leukemia cytotoxic assay (IC₅₀= 200 pM)²¹ and to inhibit the elongation activity of DNA polymerase α in both LoVo and SW 620 human colon cancer cells²². Thiocoraline causes an arrest in the G1 phase of the cell cycle and a decrease in the progression into the G2 phase.

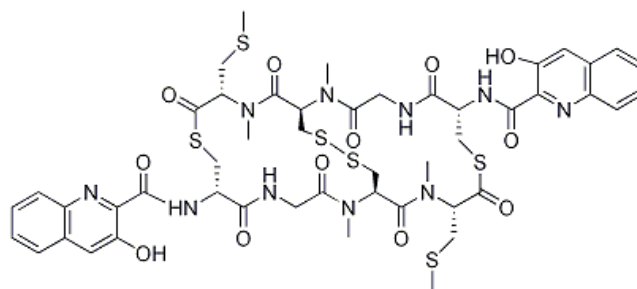


Fig.2 chemical structure of the thiocoraline

In thiocoraline the N-terminal function is capped with the 3-hydroxyquinaldic acid which acts as an intercalating chromophore group, while the two peptide chains are bridged by thioester and disulfide linkages from Cys residues these being the components that afford the disulfide N-methylated bridge and D configuration, as well as the two Cys(Me) residues. Even though this peptide exhibits a strong biological activity, it shows low solubility and resistance to enzyme degradation and so it cannot be used as a drug. In order to improve its pharmacokinetics it has been focused the attention on a new analogue in which the thioester bridge has been replaced by an amide one²³ and in which the two units of 3-hydroxyquinaldic acid have been replaced by two units of 2-quinoxalinecarboxylic acid (2QXA).

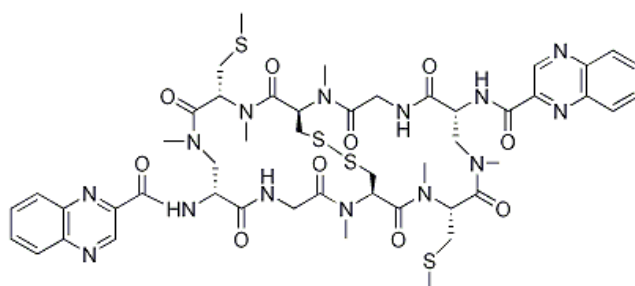
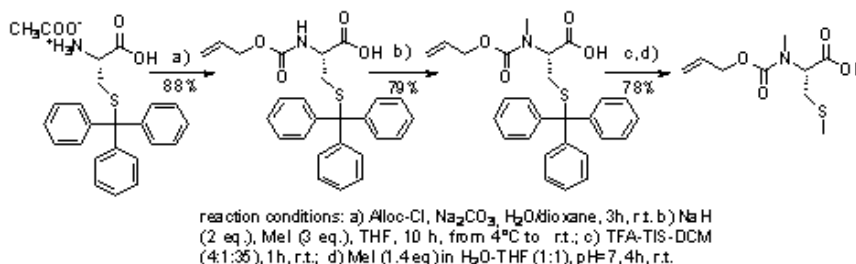


Fig.3 Chemical structure of N-methyl Azathiocoraline analogue

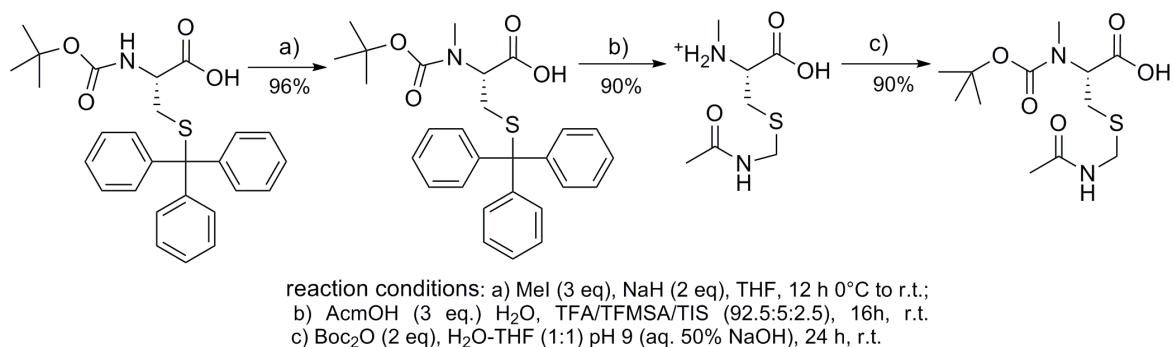
The synthesis of this kind of analogue represents a challenge because in addition to being cyclic it contains six residues of consecutive *N*-methyl aminoacids which can undergo internal diketopiperazine (DKP) formation and *N*Me-Cys(Me) easily undergoes an elimination side chain reaction to produce didehydroalanine. So it has been developed a new synthetic strategy on solid-phase and in solution for a large-scale synthesis of the new *N*-methyl Azathiocoraline analogue, trying to avoid all that kind of reactions (epimerization, racemization, DKP's formation) which are usually predominant in the peptidic synthesis on solid phase.

At first, for the synthesis of this molecular target, two *N*-methylated cysteines²⁴ which were the last residues to be attached onto the resin, were synthesized. The reactions of protection of both the amino and carboxylic moieties of the two cysteines as well as the *N*-methylation reaction of the α -amino function of these two aminoacids were performed in solution. Scheme 1 summarizes the synthetic steps for the obtention of Alloc/*N*MeCys(Me)OH.



Scheme 1

Scheme 2 summarizes the synthetic steps for the obtention of BocNMeCys(Acm)OH



Scheme 2

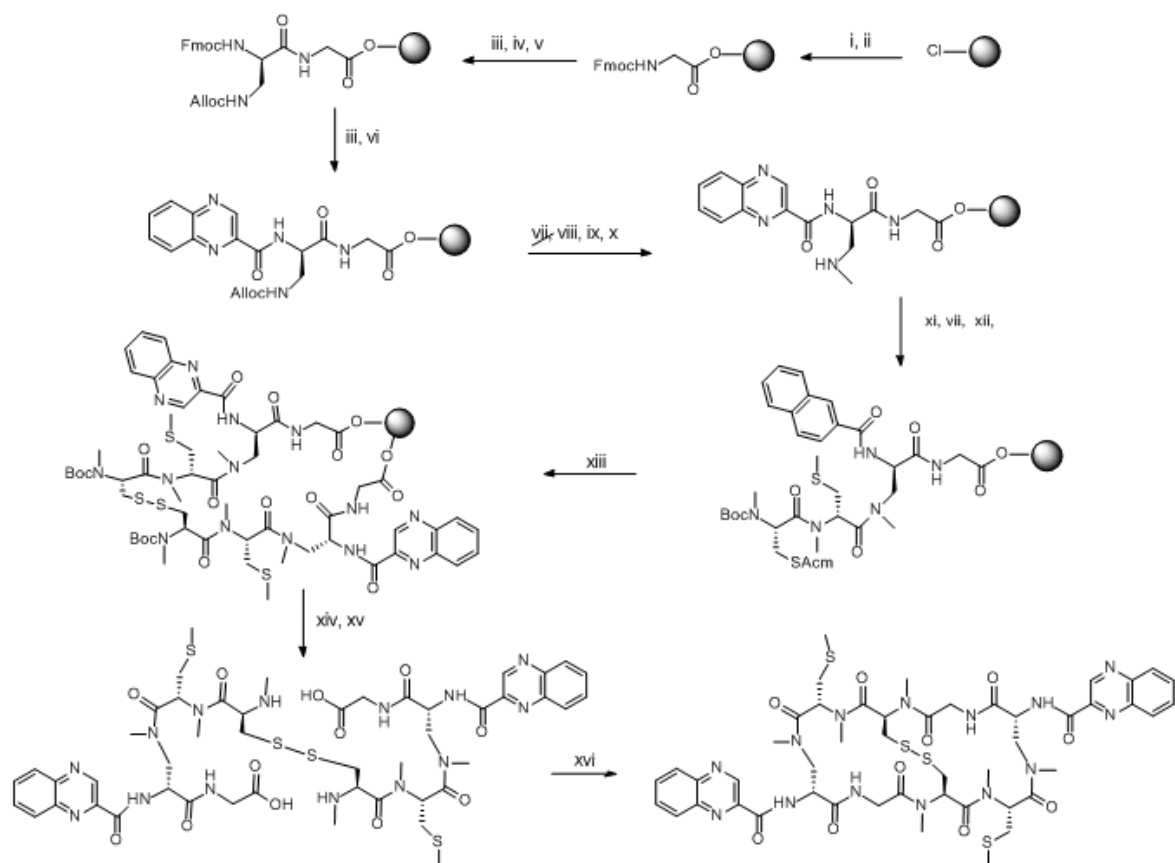
Products purity have been confirmed by analytical RP-HPLC and identified by HPLC-MS and NMR. After having synthesized the two aminoacids in solutions, the synthesis of our target has been started.

Taking advantage of the symmetry of the peptide, a Fmoc/*t*Bu strategy for the synthesis of analogue, was followed as synthetic approach, with the use of a CTC resin, which minimizes the diketopiperazine (DKP) formation and allows cleavage of protected peptide under very mild acid conditions. The first aminoacid, FmocGlyOH was anchored onto the resin by simply using DIEA while the coupling reagents HATU/HOAt made FmocD-Dap(Alloc)OH coupling possible. After removal of the Fmoc protecting group with the use of piperidine/DMF (1:5) solution, the two units of 2-quinolinecarboxylic acid were attached onto the resin by using PyBOP/HAOt in DMF. Before of the methylation on the solid support with Mitsunobu reaction, the β -amino function of D-Dap was transformed in the 2-nitro benzenesulfonyl derivative and after removal of the 2-nitrobenzenesulfonyl protecting group with a solution of DBU and 2-Mercaptoethanol in DMF, the coupling with the third aminoacid AllocNMeCys(Me)OH was performed by using the strong coupling reagent HATU which assure complete acylation of the N-methylamino acids. HATU was used another time to allow the coupling of the last aminoacid BocNMeCys(Acm)OH. The acetamidomethyl group was chosen to facilitate the direct formation of a key intermolecular disulfide bridge under solid phase conditions with I₂ in DMF for 10 min. This on-resin oxidation greatly facilitated the removal of the excess of reagent and soluble side-chain products by simply filtration and extensive washings with DMF and DCM. The dimerized peptide was cleaved from the resin, the two BOC protecting groups were removed with a solution of TFA/H₂O/DCM and the double cyclization in solution of the final dimer was performed by using PyBOP/HOAt in DMF. All the intermediates purity was confirmed by analytical RP-HPLC and their identity by HPLC-ESI, giving all good yields.

The final crude was purified by analytical RP-HPLC to afford three different stereoisomers. One of these, obtained with an overall yield of 0.7 %, was identified by HPLC-ESI and MALDI-TOF and some biological assays were performed to evaluate its biological activity.

The *in vivo* activity of the final compound was evaluated in three different tumoral cells lines (breast, lung and colon) showing an inhibitory effect of 10^{-9} M, a value comparable with the inhibitory activity of the natural product.

The synthetic strategy for the obtention of the N-methyl Azathiocoraline analogue is summarized in Scheme 3:



(i) Fmoc-GlyOH, DIEA, DCM:DMF (9:1), 50'; (ii) MeOH, 10'; (iii) piperidine-DMF (1:5); (iv) Fmoc-D-Dap(Alloc)-OH, HATU, HOAt, DIEA, DMF, 35'; (v) Ac₂O, DIEA, DMF, 30'; (vi) 2-quinoxaline carboxylic acid, PyBOP, HOAt, DIEA, DMF, 1h e 30'; (vii) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM, 3x15'; (viii) 2-NBsCl, DIEA, DCM, 1h e 30'; (ix) PPh₃, MeOH, DIAD, THF, 1h (x) DBU, Mercaptoetanol, DMF, 2x15' (xi) AllocNMeCys(Me)OH, HATU, HOAt, DIEA, DMF, 35'; (xii) BocNMeCys(Acm)OH, HATU, HOAt, DIEA, DMF, 35'; (xiii) I₂ in DMF, 2x10'; (xiv) TFA 1% in DCM; (xv) TFA-H₂O-DCM (35/5/70), 45'; (xvi) PyBOP, HOAt, DIEA, DMF, 24 h.

Scheme 3

Even though the synthetic strategy have to be still improved, it could be considered a rapid and efficient way to develop new bioactive high non-proteinogenic complex depsipeptides with therapeutic properties.

References

- ¹ Risau, W. *Nature* **1997**, *386*, 671-674.
- ² S.M. Hyder, G.M. Stancel, *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 806-811.
- ³ R.S. Kerbel, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 505-515.
- ⁴ P. Carmeliet, *Nature* **1999**, *401*, 657-658.
- ⁵ Hanahan, D et al. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- ⁶ J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- ⁷ Ferrara, N.; Kerbel, R.S. *Nature*, **2005**, *438*, 967-974.
- ⁸ Ferrara, N *Curr Opin Biotechnol* **2000**, *11*, 617-624.
- ⁹ Ferrara, N., Gerber, H.P; LeCouter, J. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669-676.
- ¹⁰ Ferrara, N.; Davis-Smyth, T *Endocr. Rev.*, **1997**, *18*, 4-25.
- ¹¹ Abedi, H.; Zachary, I; *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 15442-15451.
- ¹² Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H.W.; Eigenbrot, C.; Wells, J.A.; deVos, A.M.; *Cell* **1997**, *91*, 695-704.
- ¹³ Greenberg, D.A.; Jin, K., *Trends Mol Med.*, **2004**, *10*, 1-3.
- ¹⁴ Adams, J.M. *Genes Dev.*, **2003**, *20*, 2481-2495.
- ¹⁵ Yilmaz, A.; Kliche, S.; Mayr-Beyrle, U.; Fellbrich, G.; Waltenberger, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *306*, 730-736.
- ¹⁶ Salameh A., Galvagni F., Bardelli M., Bussolino F., Oliviero S. *Blood*, **2005**, *106*, 3423-31.
- ¹⁷ Otsuka, H.; Shoji, J. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1535-1542.
- ¹⁸ Dell, A.; Williams, D.H.; Morris, H.R.; Smith, G.A., Feeney, J. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2497-2502.
- ¹⁹ Romero, F.; Espliego, F.; Perez Baz, J.; Garcia de Quesada, T.; Gravalos, D. et al. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 734-737.
- ²⁰ Waring, M.G.; Wakelin, M.P.; *Nature* **1974**, *252*, 653-657.
- ²¹ Boger, D.L.; Ichikawa, S.; Tse, W.C.; Hedrick, M.P., Jin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 561-568.
- ²² Erba, E.; Bergamaschi, D.; Ronzoni, S.; Taverna, S.; Bonfanti, M.; Catapano, C.V.; *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 971-980.
- ²³ Bayò-Puxan, N.; Fernández, A.; Tulla-Puche, J.; Riego E.; Cuevas, C.; Alvarez, M. and Albericio, F. *Chem.Eur. J.* **2006**, *12*, 9001-9009.
- ²⁴ Marcucci, E.; Bayò-Puxan, N.; Tulla-Puche, J.; Spengler, J. and Albericio, F. *J. Comb. Chem.* **2008**, *123*, 561-568.