



a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

Dipartimento di Chimica
Università di Milano
silvia.cauteruccio@unimi.it
monica.civera@unimi.it

Peptidi: alcune applicazioni nel campo del drug discovery e recenti metodologie sintetiche

L'uso di peptidi a scopo terapeutico inizia nel 1922 con l'insulina, un ormone estratto dal pancreas di animali. Ci vorranno quarant'anni perché la sintesi di altri due ormoni, ossitocina e vasopressina, venga pubblicata dal gruppo di du Vigneaud [V. du Vigneaud *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 3115, *J. Biol. Chem.*, 1953, **205**, 949] e solo a partire dal 1963, grazie all'invenzione della sintesi in fase solida di peptidi del premio Nobel Merrifield [R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149], l'industria farmaceutica inizia ad investire in questo campo. Attualmente, ci sono circa 80 farmaci peptidici sul mercato globale e la ricerca di nuove terapie peptidiche continua a un ritmo costante, con più di 150 peptidi in fase di sviluppo clinico e altri 400-600 peptidi in studi preclinici [M. Muttenthaler *et al.*, *Nat Rev Drug Discov.*, 2021, **20**, 309].

L'utilizzo dei peptidi come farmaci è stato limitato non solo da costi e difficoltà sintetiche ma anche dalla scarsa stabilità metabolica. Sebbene molto selettivi e potenti, i peptidi sono rapidamente eli-

minati. Per migliorare le loro proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche, si possono modificare con vari approcci di chimica farmaceutica (Fig. 1). Ad esempio, l'uso di amminoacidi non naturali, l'acetilazione dell'estremità *N*-terminale, la *N*-metilazione o la ciclizzazione o la sostituzione di residui con opportuni *scaffold*. La strategia degli *stapled peptide* [L.D. Walensky *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 6275] utilizza la formazione di legami covalenti tra le catene laterali degli amminoacidi per stabilizzare la sequenza peptidica di riconoscimento. Di solito applicata per stabilizzare α -eliche, questa tecnica permette di aumentare la permeabilità cellulare e diminuire la degradazione proteolitica del peptide. Due *stapled peptides*, entrambi sviluppati da Aileron Therapeutics, sono entrati in studi clinici: ALRN-6924, per riattivare p53 nei tumori inibendo i suoi principali regolatori negativi, MDM2 e MDMX, è attualmente in studi clinici di fase II; ALRN-5281, per attivare il recettore GHRH sulla superficie cellulare e aumentare il rilascio dell'ormone della crescita nelle persone con rari disturbi endocrini, ha completato la fase I. Anche la coniugazione con proteine più grandi o catene di PEG

aumenta la stabilità metabolica dei peptidi.

La principale via di somministrazione dei peptidi è per iniezione, un fattore limitante per il loro impiego come farmaci. Come strategie non-invasive si stanno considerando diversi approcci, come un rilascio transdermico mediante l'uso di *skin-penetrating peptides* o *microneedle technologies*. Nel campo della somministrazione orale, frenata dalla digestione enzimatica dei peptidi nel tratto gastrointestinale e dalla loro limitata permeazio-

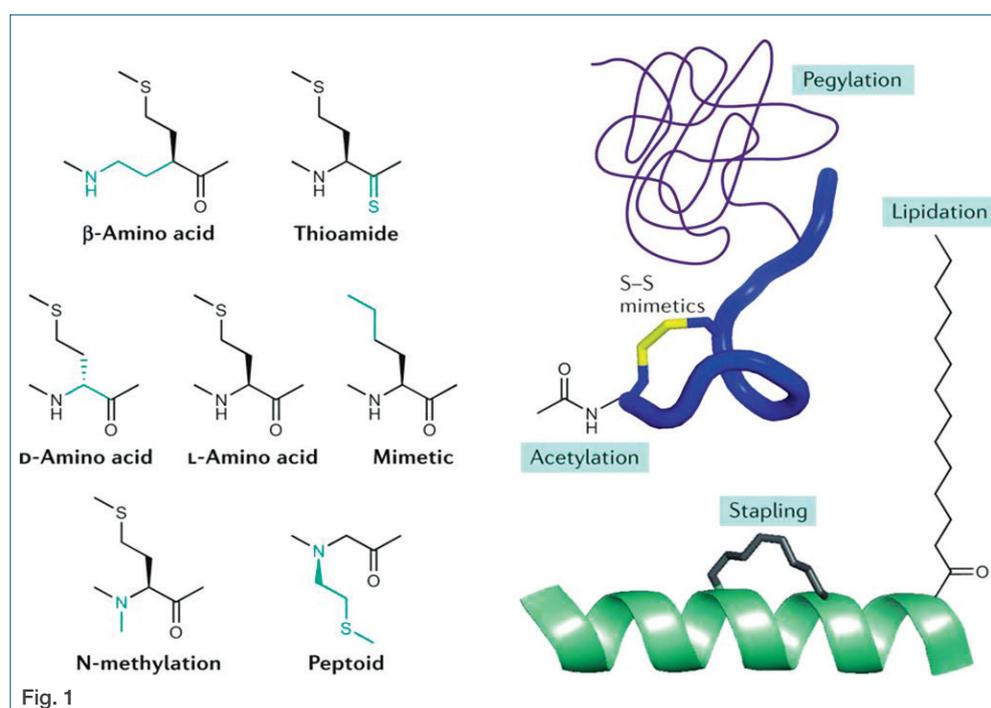
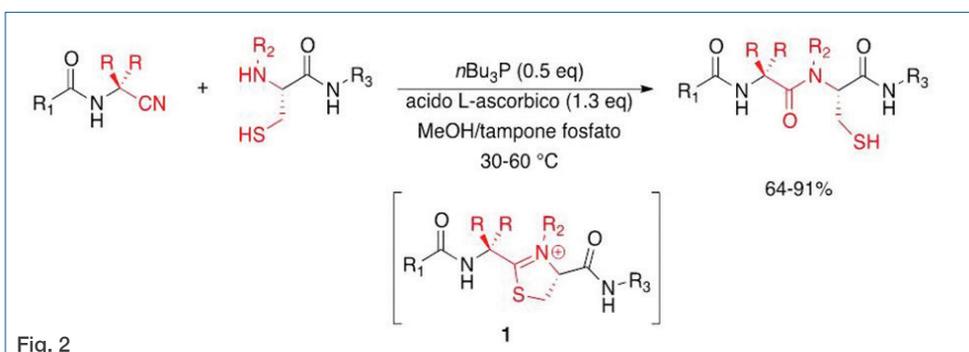


Fig. 1



ne dell'epitelio intestinale, alcuni successi sono stati ottenuti utilizzando degli agenti, come dei derivati degli acidi grassi, che aumentano la permeabilità. ORMD-0801, un candidato per la somministrazione orale dell'insulina, contiene un potenziatore della permeazione, un inibitore della tripsina e un chelante ed è attualmente in fase clinica II.

La necessità di ottenere peptidi con un buon profilo farmacologico ha portato allo sviluppo di diverse metodologie sintetiche sempre più efficienti e versatili finalizzate alla preparazione di peptidi modificati con amminoacidi stericamente ingombrati, i quali risultano particolarmente stabili chimicamente. L'introduzione di α -amminoacidi α,α -disostituiti e *N*-alchil α -amminoacidi nella catena principale, o *backbone* peptidico, permette di ottenere peptidi più resistenti a processi di degradazione enzimatica nonché caratterizzati da una maggiore permeabilità cellulare. Da un punto di vista sintetico, la formazione del legame ammidico tra queste due tipologie di amminoacidi risulta particolarmente difficoltosa a causa del significativo ingombro sterico e, a questo riguardo, il gruppo di Hayashi [Y. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, **144**, 10145] ha messo a punto una strategia efficiente per la sintesi di diversi peptidi (tetra, penta e decapeptidi) che prevede la formazione di legami ammidici utilizzando un frammento peptidico contenente un gruppo terminale α -ammido nitrile α,α -disostituito e un secondo frammento contenente una *N*-alchil cisteina terminale (Fig. 2). La reazione è condotta in presenza di $n\text{Bu}_3\text{P}$ e acido ascorbico per garantire un ambiente riducente in grado di preservare i gruppi tiolici del residuo cisteinico, ma non prevede l'impiego di agenti attivanti. La sostituzione del residuo *N*-alchil cisteinico con diversi *N*-alchil amminoacidi (serina o acido aspartico) non porta alla formazione del legame peptidico, ma al solo recupero dei reagenti di partenza. Questo risultato



sembra dimostrare come il gruppo -SH della cisteina sia essenziale per questa reazione, e supporta il meccanismo proposto dagli autori che prevede la formazione di un intermedio tiazolidinico, lo ione *N*-alchiltiazolio **1** (Fig. 2), dal quale per idrolisi è possibile ottenere il legame ammidico desiderato. Un altro aspetto molto importante nell'ambito della sintesi peptidica riguarda la possibilità di rendere tale metodologia sempre più sostenibile e vicina ai principi della *green chemistry*. Il gruppo di Albericio ha sviluppato una procedura di sintesi peptidica su fase solida che permette di condurre contemporaneamente i passaggi di deprotezione, ovvero di rimozione del gruppo protettivo Fmoc, e di condensazione per la formazione del legame ammidico (*coupling*), riducendo così il numero dei lavaggi necessari dopo i singoli passaggi, i quali sono così ridotti da una tipica sequenza *coupling*-lavaggio-deprotezione-lavaggio ad una sequenza più corta *coupling*-deprotezione-lavaggio [F. Albericio, *Green Chem.*, 2022, DOI: 10.1039/d2gc00963c].

Questa strategia sembra avere dei requisiti di sostenibilità molto promettenti, in quanto permette un risparmio di solvente intorno al 75%. Inoltre, per la sintesi del peptide Leu-encefalina sono stati valutati i parametri di intensità di massa (*Process Mass Intensity*, PMI) e il fattore *E* (*Environmental Factor*, *E-factor*), confrontando i valori ottenuti con questa nuova strategia con il protocollo di sintesi classica. La strategia "*In situ Fmoc removal*" ha fornito dei valori di PMI e *E-factor* quattro volte più bassi rispetto alla procedura classica, senza compromettere purezza e resa finale del peptide.