



a cura di **Silvia Cauteruccio** e **Monica Civera**

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

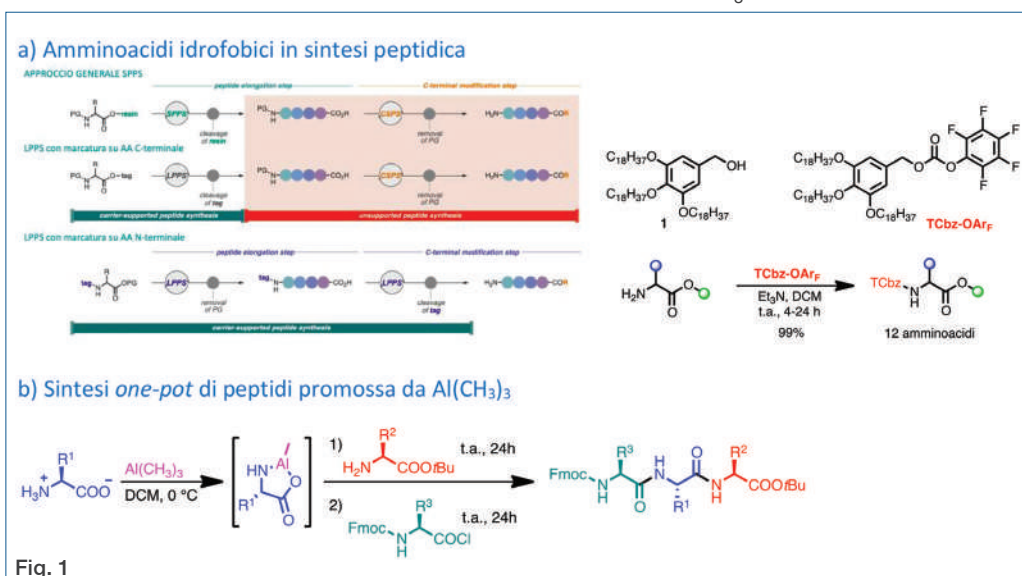
Recenti sviluppi in sintesi peptidica

La preparazione di oligopeptidi opportunamente modificati per scopi terapeutici si basa principalmente sulla sintesi peptidica in soluzione (*Liquid-Phase Peptide Synthesis*, LPPS) o in fase solida (*Solid-Phase Peptide Synthesis*, SPPS) e, sebbene entrambe siano metodologie ben note e consolidate, ancora oggi continuano ad essere oggetto di numerosi studi al fine di rendere queste sintesi più efficienti, ecosostenibili e versatili. L'introduzione, ad esempio, di ausiliari idrofobici su amminoacidi C-terminali mediante l'impiego di alcoli benzilici caratterizzati da lunghe catene alifatiche (l'alcool **1**, Fig. 1a [H. Tamaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2001, **74**, 733]) permette di aumentare notevolmente la solubilità dei corrispondenti amminoacidi "marcati" nei comuni solventi organici (DCM, THF) e diminuirne, di conseguenza, la solubilità in solventi polari (metanolo). La sintesi di un peptide utilizzando tali amminoacidi può essere condotta in soluzione e la sua purificazione può essere effettuata mediante semplice cristallizzazione e filtrazione, unendo così i vantaggi di una LPPS e di una SPPS (Fig. 1a). Un limite di questo approccio sta nel fatto che se il gruppo carbossilico C-terminale di un peptide deve essere ulteriormente modificato, è necessario effettuare questo processo di funzionalizzazione in soluzione perdendo di fatto i vantaggi legati all'impiego di ausiliari idrofobici. Il gruppo di Sunazuka ha proposto un metodo complementare [T. Sunazuka, *Chem. Sci.*, 2023, DOI: [10.1039/d3sc01432k](https://doi.org/10.1039/d3sc01432k)], nel quale l'ausiliario idrofobico è rappresentato dal carbonato **TCbz-OAr_F** (Fig. 1a), il quale viene inserito in un amminoacido mediante formazione di un legame carbammico con il suo gruppo amminico.

In questo modo un'eventuale funzionalizzazione dell'amminoacido C-terminale del peptide può avvenire

in presenza del gruppo idrofobico facilitandone la successiva purificazione (Fig. 1a). **TCbz-OAr_F**, la cui sintesi è stata ottimizzata su scala di grammi (6 g, 99%), risulta essere un ottimo reattivo per la modifica di numerosi amminoacidi e può essere, inoltre, rimosso ortogonalmente rispetto ai convenzionali gruppi protettivi utilizzati nella chimica dei peptidi.

La possibilità di utilizzare amminoacidi senza gruppi protettivi è un altro aspetto molto studiato in sintesi peptidica, soprattutto in LPPS, tenendo presente gli ovvi vantaggi di non dover effettuare per ogni amminoacido introdotto il passaggio di protezione e rimozione del gruppo protettivo e conseguente purificazione. In questo contesto, una strategia molto efficace consiste nella formazione *in situ* di strutture cicliche a cinque termini ottenute per reazione tra amminoacidi con il gruppo α -amminico e α -carbossilico non protetto e specie elettrofile come il trimetilalluminio [H. Yamamoto, *Chem. Sci.*, 2023, DOI: [10.1039/d3sc00208j](https://doi.org/10.1039/d3sc00208j)]. Tali intermedi ciclici reagiscono facilmente con il gruppo amminico dell'amminoacido C-terminale per formare il legame peptidico senza la necessità di utilizzare un agente condensante (Fig. 1b). Tale procedura è stata applicata per la sintesi *one-pot* di un diverso numero di tripeptidi, ottenuti con ottime rese, così come per la sintesi di tetra e penta-peptidi, mediante addizione successiva di amminoacidi non protetti e AlMe_3 .



2023, DOI: [10.1039/d3sc01432k](https://doi.org/10.1039/d3sc01432k)], nel quale l'ausiliario idrofobico è rappresentato dal carbonato **TCbz-OAr_F** (Fig. 1a), il quale viene inserito in un amminoacido mediante formazione di un legame carbammico con il suo gruppo amminico.





Steered molecular dynamics per lo studio della dissociazione di un ligando dal sito attivo

La tecnica di simulazione *Steered Molecular Dynamics* (SMD) è utilizzata nel campo del *drug design* per calcolare l'energia libera di legame ligando-proteina e per studiarne il processo di dissociazione. È una tecnica particolarmente adatta a spiegare come substrati e prodotti entrano ed escono dal sito attivo di un enzima e per prevedere nuovi meccanismi di interazioni farmaco-ligando. Inoltre, è possibile calcolare i parametri cinetici della dissociazione ligando-proteina [P. Do, *J. Chem. Inf. Model.*, 2018, DOI: [10.1021/acs.jcim.8b00261](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00261)] e sfruttare l'equazione di Jarzynski per stimare, a livello quantitativo, la differenza di energia libera tra i due stati.

Per simulare il processo di dissociazione dal sito attivo, la SMD applica un vettore forza $F = k(\Delta x - vt)$ (dove v è la velocità di *pulling*, Δx è lo spostamento degli atomi rispetto alla posizione iniziale e k è la costante di forza) al ligando, mantenendo la proteina ferma. Alla fine della dinamica i risultati evidenziano la distribuzione della forza nei diversi stati del processo di dissociazione ed il valore della F_{max} , o forza di rottura (forza massima dello stato di trazione) può essere confrontato con l'affinità di legame. Allontanare dal sito di legame molecole attive dovrebbe comportare forze di rottura superiori a quelle osservate per composti inattivi ed è possibile fare un 'ranking' di affinità tra diverse molecole sulla base dei valori di F_{max} .

I risultati della SMD dipendono ovviamente dalla scelta della direzione lungo la quale il ligando viene tirato e fatto uscire dalla tasca. Da un lato sono possibili diversi percorsi, dall'altro non sempre

la direzione seguita del modello coincide con il percorso sperimentale.

Per decidere la direzione della forza esistono due tipologie di approcci SMD: uni-direzionale o multi-direzionale. Nel metodo multi-direzionale dell'accelerazione casuale RAMD [S.K. Lüdemann, *J. Mol. Biol.*, 2000, DOI: [10.1006/jmbi.2000.4154](https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4154)] viene applicata una forza sul ligando con direzione casuale e, in base allo spostamento del ligando in un certo periodo di tempo, la direzione può essere o non essere aggiornata. Questo processo continua fino a quando il ligando non viene rilasciato dal recettore.

In questo lavoro [N.L. Nguyen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2022, DOI: [10.1021/acs.jctc.1c01158](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c01158)] gli autori propongono un nuovo metodo per la determinazione dei percorsi multidirezionali. La direzione della forza viene determinata da una semplice funzione di *score* che minimizza l'interazione recettore-ligando (di tipo van der Waals ed elettrostatica) e per la minimizzazione dell'energia viene utilizzato un algoritmo di ottimizzazione chiamato evoluzione differenziale (DE, Fig. 2). La simulazione è divisa in brevi intervalli e per ogni intervallo la direzione uni-direzionale è identificata dall'algoritmo DE che orienta in modo ottimale il ligando spostandolo dal punto i al punto $i + 1$ con un percorso a zigzag.

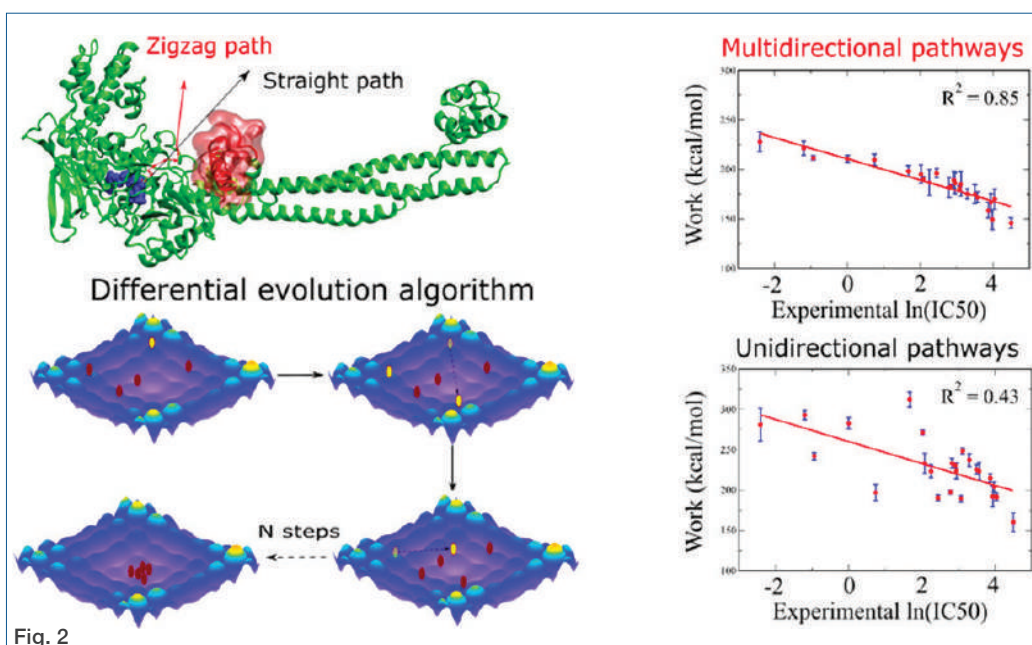


Fig. 2