

## **XVII-XX lezione di Laboratorio di PESF** (Preparazione Estrattiva e Sintetica dei Farmaci)

*Se ho visto più lontano degli altri è stato grazie ai giganti sulle cui spalle stavo seduto*

***Isaac Newton***



Isaac Newton occupa una posizione di grande rilievo nella [storia della scienza](#) e della [cultura](#) in generale. Il suo nome è associato a una grande quantità di [leggi](#) e [teorie](#) ancora oggi insegnate: *dinamica newtoniana*, leggi newtoniane del [moto](#), di [teorie della gravitazione](#). Più in generale ci si riferisce al *newtonianesimo* come a una concezione del mondo che ha influenzato la cultura europea e ha contribuito alla Rivoluzione scientifica.

# Sintesi peptidica

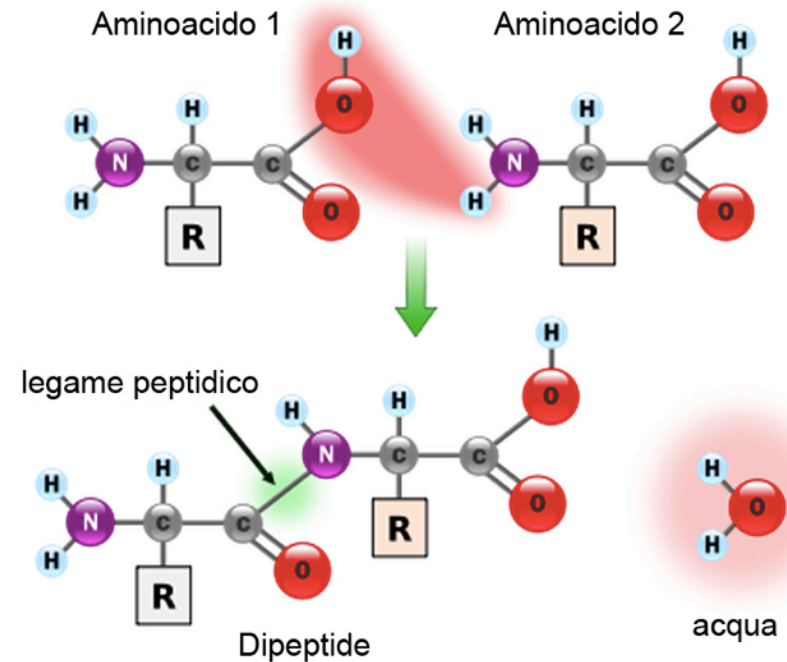
*Peptide* : πεπτιχος = digeribile

I **peptidi** sono molecole di peso molecolare inferiore ai 5000 dalton, costituiti da una catena di pochi amminoacidi, uniti tra di loro attraverso un legame peptidico (o *carboamidico*). I peptidi più corti sono i dipeptidi;

*Proteina* : πρωτεϊος = primo posto

Alcune proteine sono formate da un solo peptide, altre da più peptidi aggregati, altre ancora da uno o più peptidi uniti ad una molecola non peptidica, detta gruppo prostetico.

Un peptide viene denominato iniziando con il nome dell'amminoacido che ha il gruppo aminico libero, sostituendo con il suffisso "il" la desinenza "ina". Per es., un tripeptide formato, da Glicina, Acido aspartico e Alanina, in cui la Glicina è l'amminoacido con il gruppo aminico (-NH<sub>2</sub>) libero, e l'Alanina l'amminoacido con il gruppo carbossilico (-COOH) libero, si chiamerà "*Glicil-Aspartil-Alanina*"



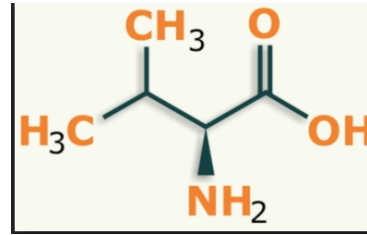
# Sintesi peptidica

**Premessa:** La maggior parte dei veleni e delle sostanze che hanno effetto fisiologico sono di natura peptidica e per questo fra l'800 e il '900 si è cercato di riprodurre i peptidi per via sintetica.

I primi tentativi sono stati ovviamente disastrosi infatti non si era a conoscenza della struttura dei peptidi e non si era capaci di proteggere selettivamente i gruppi funzionali degli AA, si usavano condizioni di reazione che deterioravano il legame peptidico, inoltre non era sviluppata la consapevolezza del problema legato alla catena laterale dell'AA.

**Vediamo quali sono i giganti il cui lavoro ci ha portato oggi a produrre con successo su scala industriale un numero elevato di sostanze di natura peptidica che sono utilizzati terapeuticamente e teranosticamente**

# Sintesi peptidica



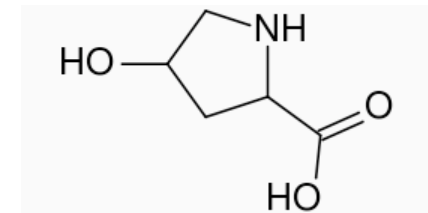
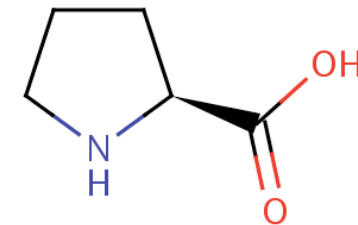
**Hermann Emil Fischer** (nasce a [Euskirchen](#), [9 ottobre 1852 Berlino](#), muore il [15 luglio 1919](#)) è stato un [chimico tedesco](#), fra i principali contributori al progresso della [Biochimica](#) e della [Chimica organica](#) classica. Nel [1875](#), a 23 anni, scopre un importante composto, l'[idrazina](#), largamente impiegata nelle [sintesi organiche](#) e nella [chimica organica analitica](#). Durante la [prima guerra mondiale](#), l'[idrazina](#) fu utilizzata anche come [propellente liquido](#) per [razzi](#).

Ma Fischer trovò in questa sostanza la chiave per accedere alla [chimica dei carboidrati](#) (o [zuccheri](#)) della quale egli fu il pioniere. E dai suoi [zuccheri sintetici](#) giunse alle ricerche sugli [enzimi](#) (o fermenti) della cui chimica è considerato il fondatore.

Stabilì anche la chimica delle sostanze che sono in relazione con l'[acido urico](#), da lui chiamate *purine*, e ne iniziò la sintesi.

Nel 1899 isola per idrolisi da alcune proteine tre AA importanti: **Valina, Prolina e Idrossiprolina**.

Nel 1902 ottenne il **premio Nobel per la chimica** per i grandissimi risultati ottenuti nel campo della chimica degli zuccheri.





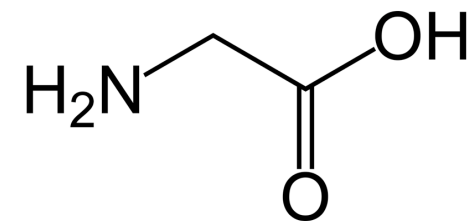
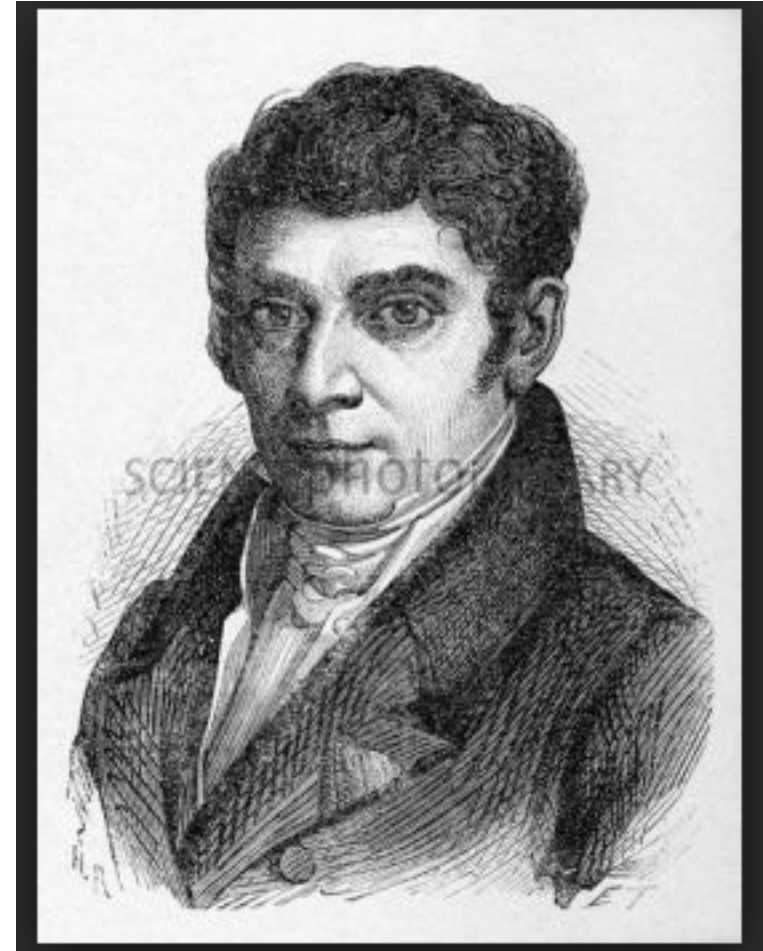
# Sintesi peptidica

**Henri Braconnot** ([Commercy](#), [29 maggio 1780](#), [Nancy](#), [15 gennaio 1855](#)) è stato un [chimico](#) e [farmacista francese](#). Nell'ambito della biochimica vegetale, Braconnot contribuì all'isolamento e alla descrizione di molteplici composti, la maggioranza dei quali si rivelò, più tardi, essere costituita a sua volta da sostanze più semplici.

Tra gli altri, Braconnot scoprì gli acidi [gallico](#) e [ellagico](#) ([1818](#)) e l'[acido pirogallico](#) (*pirogallo*) che consentirono, anni dopo, lo sviluppo della [fotografia](#).

Nel [1811](#), inoltre, scoprì nei [funghi](#) la [chitina](#), il primo [polisaccaride](#) conosciuto. Nel [1819](#) pubblicò un trattato in cui descrisse per la prima volta il procedimento per convertire [legno](#), [paglia](#) e [cotone](#) in uno [zucchero](#) mediante un trattamento basato sull'[acido solforico](#). Dumas avrebbe proposto 24 anni più tardi il nome [glucosio](#) per uno zucchero ottenuto in modo analogo da [amido](#), [cellulosa](#) o [miele](#).

Mediante il medesimo processo Braconnot ottenne una "**gelatina zuccherina**", chiamata poi *glicocollo*, e oggi nota come **Glicina**, dalla gelatina e dalla [leucina](#) delle fibre muscolari. Inoltre, facendo reagire [acido nitrico](#) concentrato su legno o cotone, Braconnot ottenne un prodotto infiammabile, la xyloidina (un precursore del *collodio*), che poteva essere trasformato in una vernice vetrosa. Questa sostanza può essere considerata come il primo [polimero](#) o materiale plastico creato da un chimico.



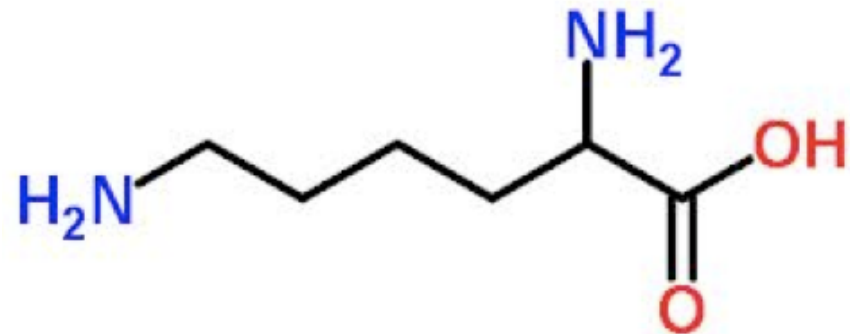
# Sintesi peptidica

## Heinrich Ferdinand Edmund Drechsel

chimico tedesco (Lipsia 1843-Napoli 1897). Isolò la **Lisina** (1887).

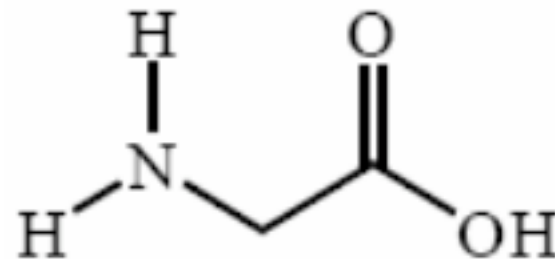
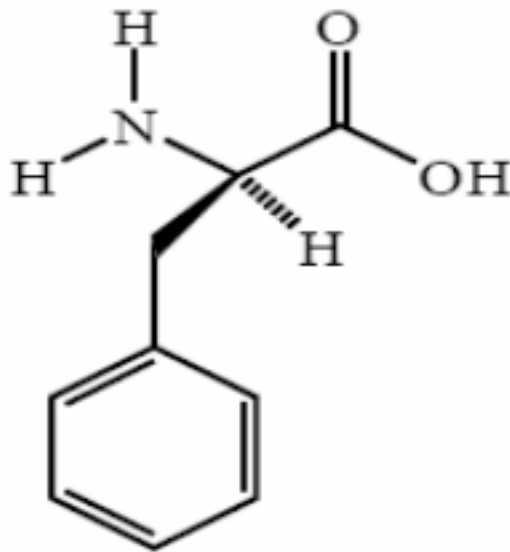
Ottenne la sintesi dell'acido ossalico da anidride carbonica e sodio metallico. Il suo nome è legato a un apparecchio usato per il lavaggio dei gas (*bottiglia di Drechsel*).

La lisina si ottiene sotto forma di sale dell'acido picrico dagli idrolisati acidi di varie proteine quali ad es. la caseina



# Sintesi peptidica

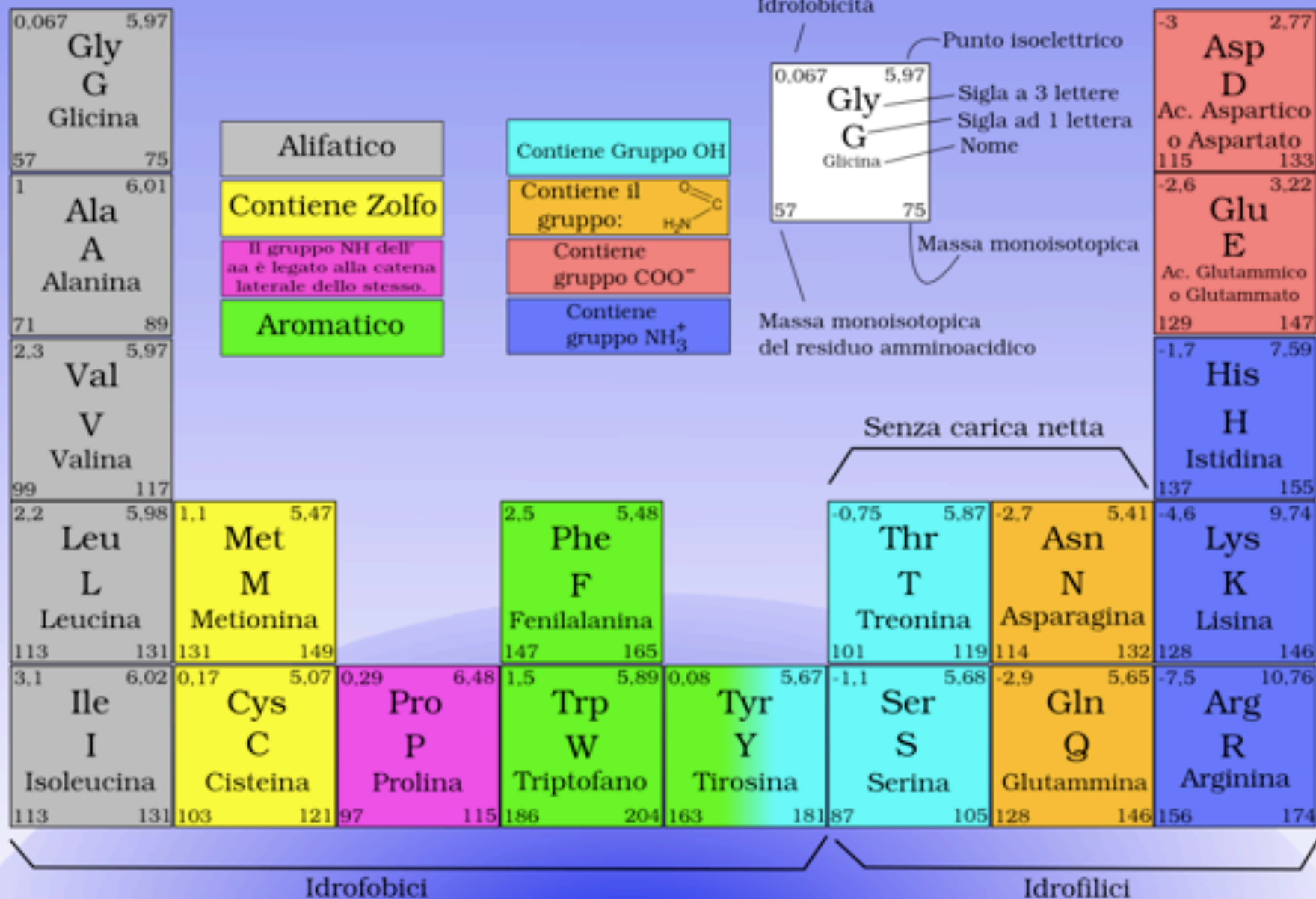
Gli AA devono essere viste come molecole bi o tri-funzionali e sono classificati classicamente in base alla loro catena laterale in idrofobici, polari non carichi, acidi e basici ma vi sono altre classificazioni





SOME RIGHTS RESERVED

# Tavola degli Amminoacidi



# Gli AA catalogazione

NON POLARI		
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Lau	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M

POLARI, NON CARICHI		
Serina	Ser	S
Prolina	Pro	P
Treonina	Thr	T
Cisteina	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutammina	Gln	Q

AROMATICI			
Fenilalanina	Phe	F	
Tirosina	Tyr	Y	
Triptofano	Trp	W	

CARICHI POSITIVAMENTE			
Lisina	Lys	K	
Istidina	His	H	
Arginina	Arg	R	

CARICHI NEGATIVAMENTE			
Acido aspartico	Asp	D	
Acido glutammico	Glu	E	

### Aminoacidi con R non polare

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}$ 

**Glicina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ 

**Alanina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{matrix}$ 

**Valina**

---

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{matrix}$ 

**Leucina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ 

**Isoleucina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \end{matrix}$ 

**Prolina**

### Aminoacidi con gruppi aromatici

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{matrix}$ 

**Fenilalanina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ | \\ \text{OH} \end{matrix}$ 

**Tirosina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C} = \text{CH} \\ | \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{H} \\ | \\ \text{C}_5\text{H}_4 \end{matrix}$ 

**Triptofano**

---

### Aminoacidi con R carico posit.

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{NH}_3^+ \end{matrix}$ 

**Lisina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C} = \text{NH}_2 \\ | \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$ 

**Arginina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C} - \text{NH} \\ / \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{H} \\ | \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{N} \\ | \quad \backslash \\ \text{H} \end{matrix}$ 

**Triptofano**

---

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{S} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ 

**Metionina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{matrix}$ 

**Asparagina**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{matrix}$ 

**Glutammina**

---

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COO}^- \end{matrix}$ 

**Ac. aspartico**

$\begin{matrix} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COO}^- \end{matrix}$ 

**Ac. glutammico**

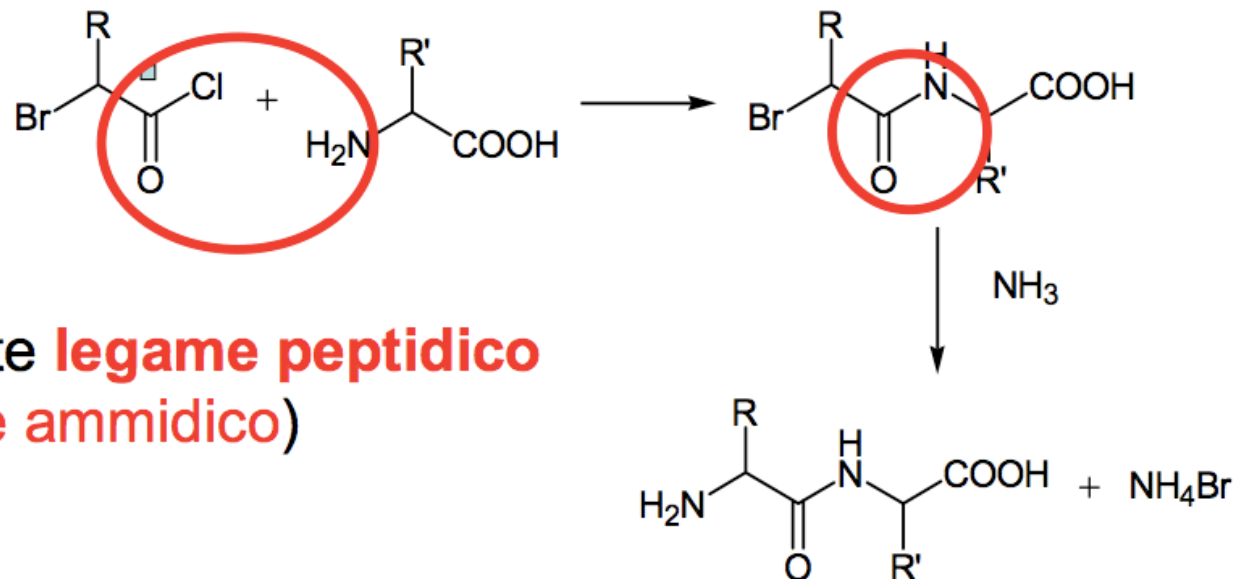


**1903:** Fisher riesce a sintetizzare e caratterizzare il primo polipeptide costituito da 18 amminoacidi legati tra loro



**Elongazione della catena peptidica nella direzione C → N**

utilizzando cloruri di  $\alpha$ -alogeno acidi

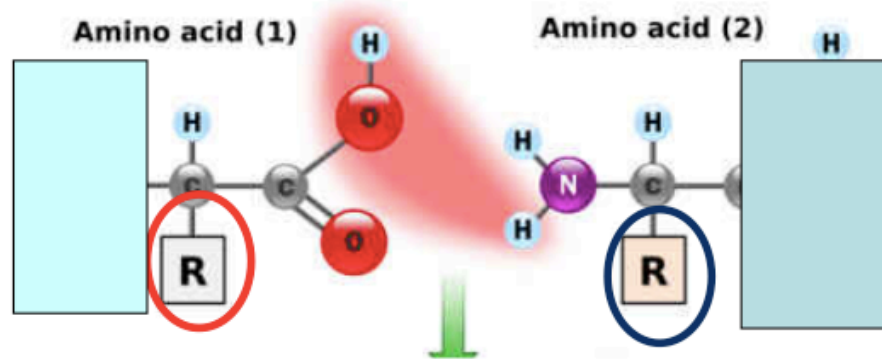


mediante **legame peptidico**  
(**legame ammidico**)

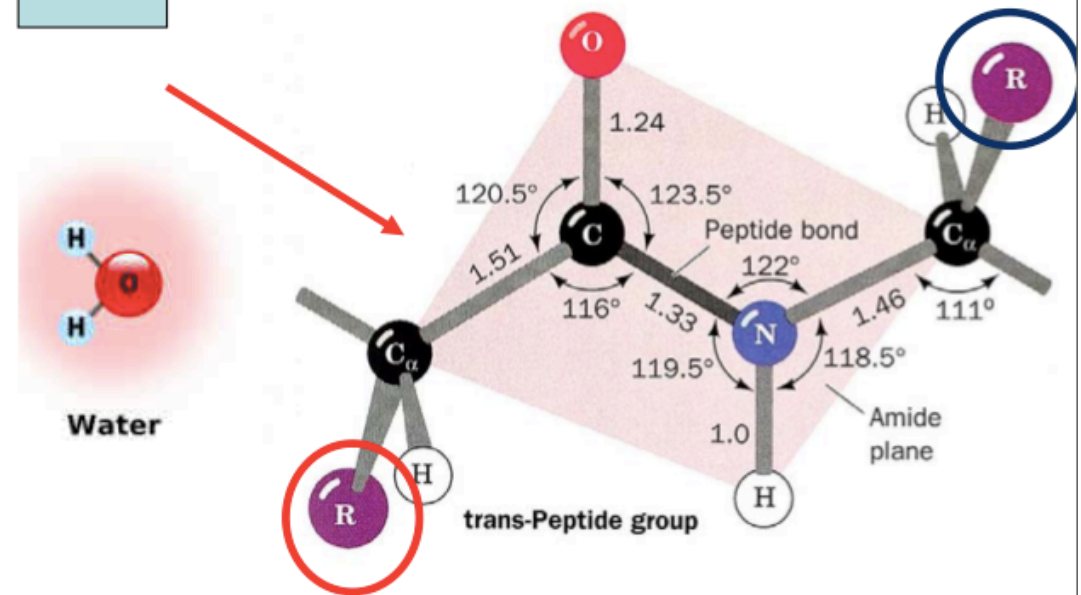
Fischer E., Otto E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1903**, 36, 2106-2116; Fischer E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1907**, 40, 1754-1767.



A cosa porta la sintesi chimica di un dipeptide se non sono protette le funzioni che sono ugualmente reattive e che non vogliamo far reagire?



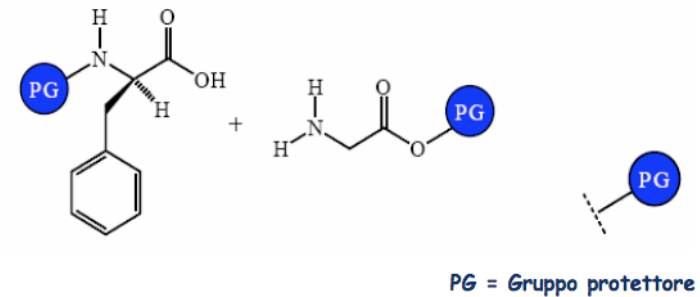
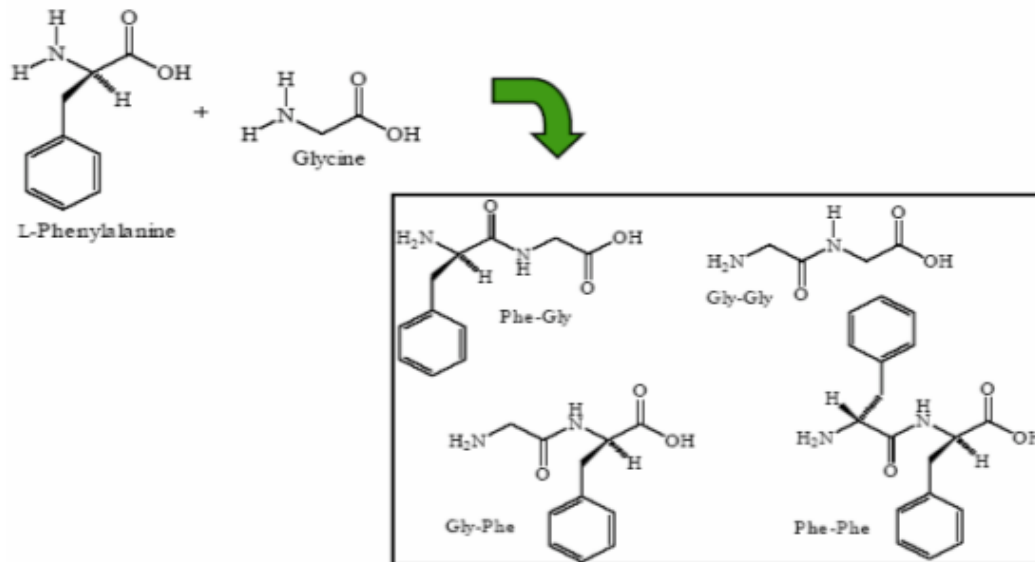
Una miscela di almeno 4 prodotti



# Sintesi peptidica

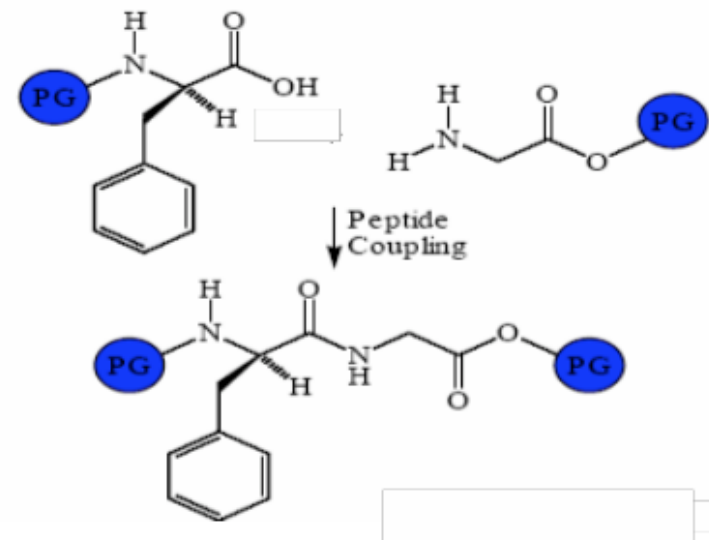
Si dice che la sintesi peptidica deve essere regiospecifica, è necessario infatti proteggere le funzioni che non devono interferire con le reazioni desiderate

Possibili prodotti dalla condensazione di  
Fenilalanina e Glicina

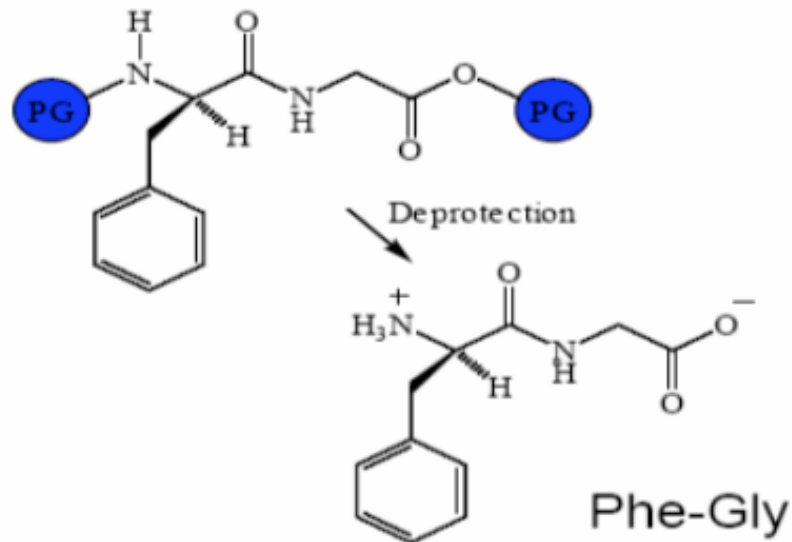


# Sintesi peptidica

Fase di accoppiamento (coupling)



Fase di deprotezione finale



Fase di purificazione

La purificazione è di pari se non superiore, complessità rispetto alla sintesi!

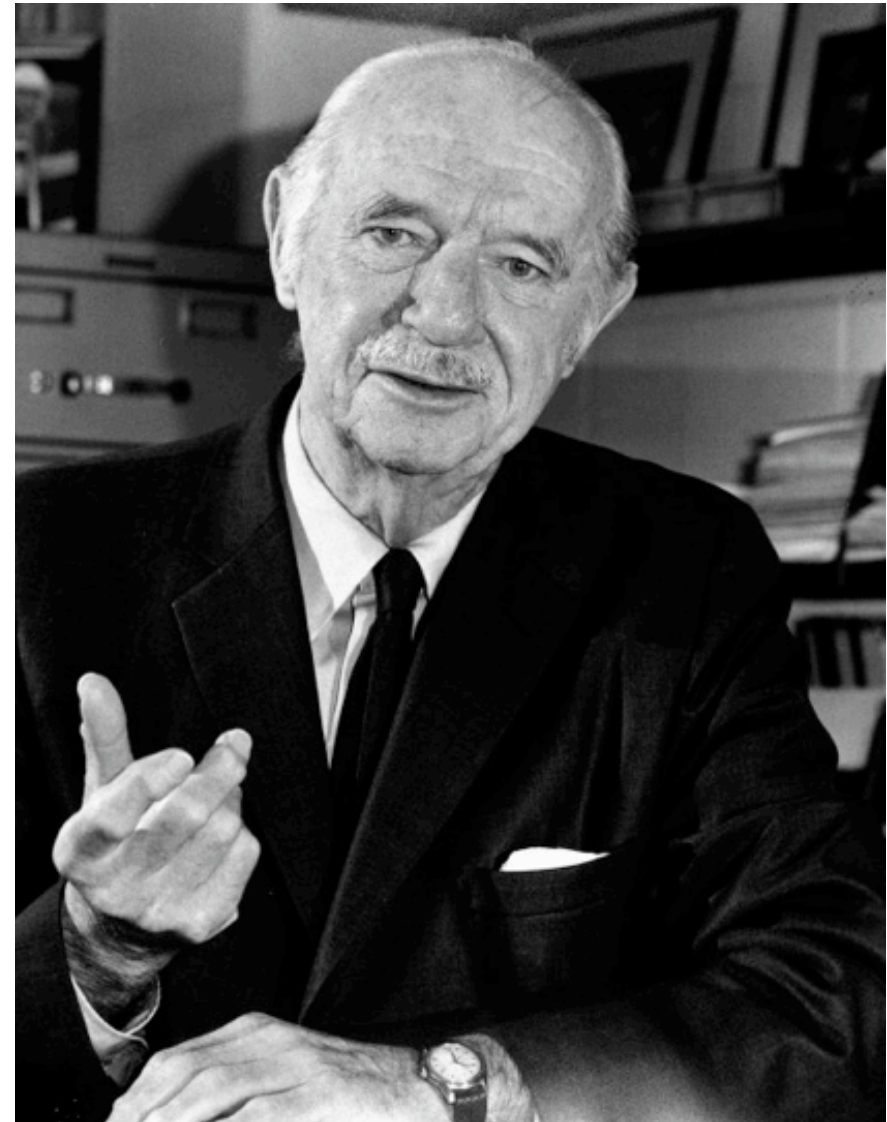
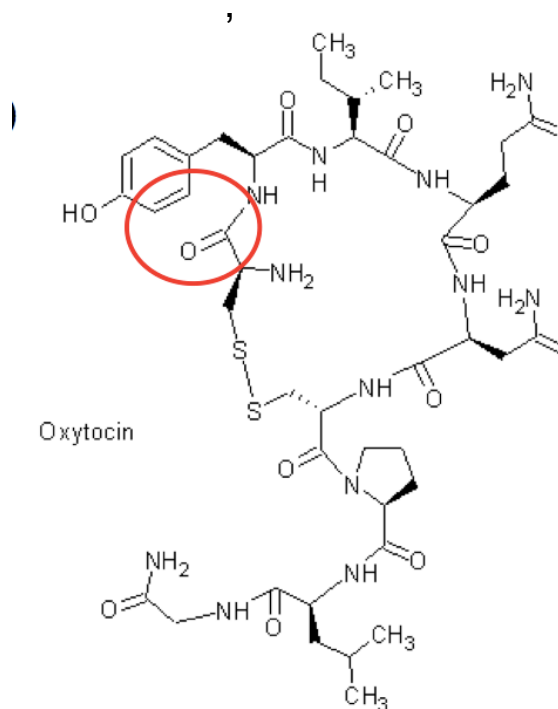
Questa è l'ultima fase della sintesi di un peptide.

Si avvale di molte tecniche cromatografiche e di elettroforesi.

# Sintesi peptidica

Vincent du Vigneaud ([Chicago, 18 maggio 1901](#) , [White Plains, 11 dicembre 1978](#)) è stato un [biochimico statunitense](#). Isolò, e determinò la struttura e sintetizzò gli [ormoni](#) dell'asse [ipofisi- ipotalamo](#) [ossitocina](#) e [vasopressina](#).

Vinse il [premio Nobel per la chimica nel 1955](#) per il suo lavoro sui composti solforati biochimicamente importanti, specialmente per la prima sintesi di un ormone [polipeptidico \(ossitocina\)](#)



*"for his work on biochemically important sulphur compounds, especially for the first synthesis of a polypeptide hormone"*

# Sintesi peptidica

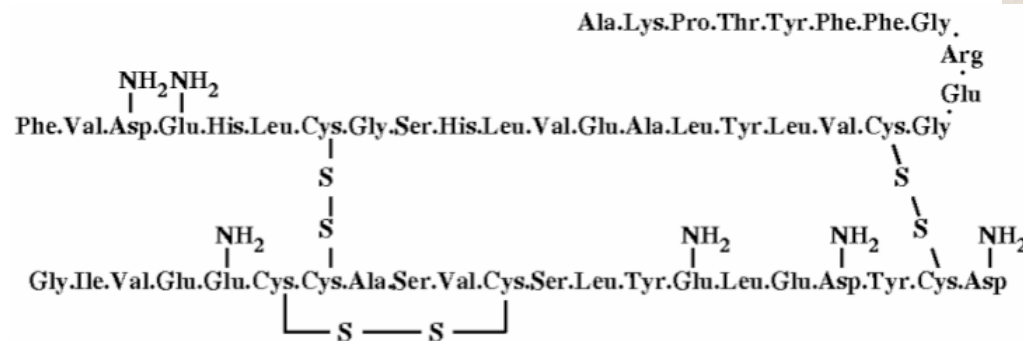
**Frederick Sanger** ([Gloucestershire, 13 agosto 1918](#), [Cambridge, 19 novembre 2013](#)) è stato un [chimico britannico](#), quarta persona nella storia ad essere premiata con due [Premi Nobel](#).

Nel 1958 riceve il premio per la determinazione strutturale dell'insulina.

Nel 1980 insieme a W. Gilbert e P. Berg riceve il premio per la comprensione della sequenza di basi negli acidi nucleici (DNA ricombinante)



*"for his work on the structure of proteins, especially that of insulin"*



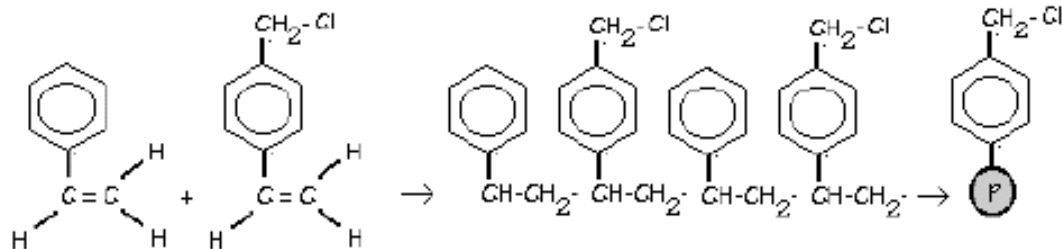
*"for his pivotal role in nucleic acid sequencing"*



# Sintesi peptidica

**Robert Bruce Merrifield** (Fort Worth, 15 luglio 1921, 14 maggio 2006) è stato un biochimico statunitense che vinse il premio Nobel per la chimica nel 1984 per l'invenzione del processo della sintesi proteica in fase solida, che sostituì la normale sintesi peptidica considerata sconveniente.

Con la sintesi di Merrifield si possono sintetizzare polipeptidi di grandi dimensioni in modo automatizzato. Gli amminoacidi (costituenti delle proteine) si legano dall'estremità N terminale. La sintesi avviene su un supporto polimerico di resina di polistirene clorometilato.



*"for his development of methodology for chemical synthesis on a solid matrix"*

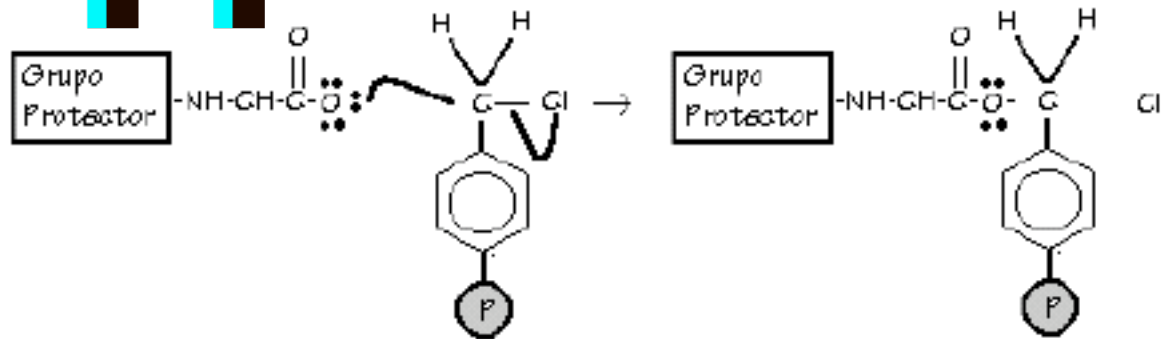


Visualizzazione...

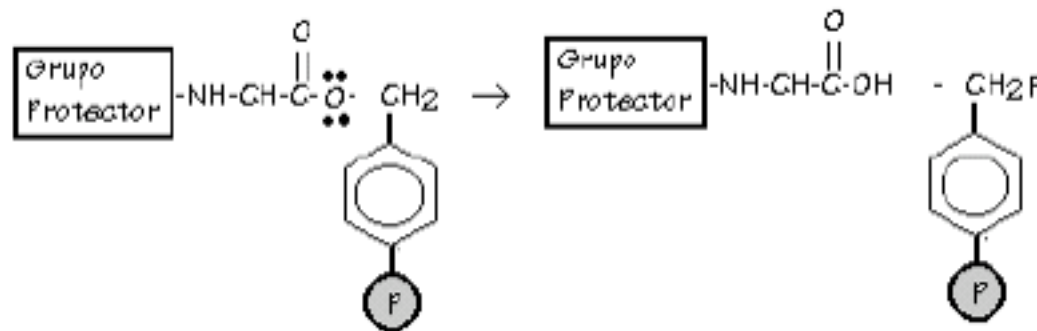




# Sintesi peptidica



La catena si costruisce sul gruppo aminico, operando gli step di protezione e deprotezione in modo ciclico, avendo ancorato al supporto polimerico il gruppo COOH del I AA che viene bloccato



Al termine della costruzione si rompe il legame del peptide con il polimero con HF

# Sintesi peptidica

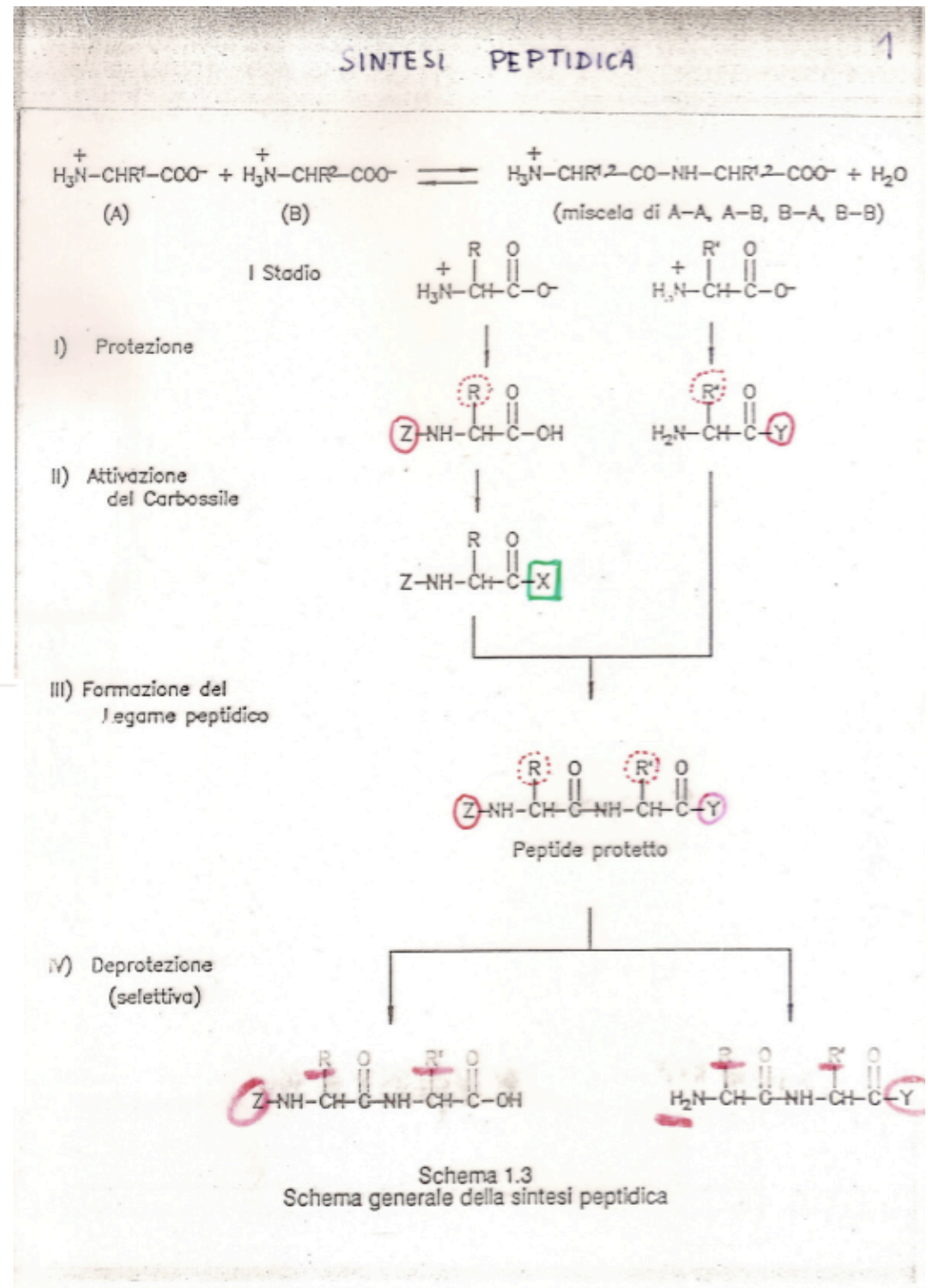
## Caratteristiche generali di un supporto solido per sintesi peptidica:

"It should contain reactive sites at which the peptide chain can be attached and later removed, and yet it must be stable to the physical and chemical conditions of the synthesis; the support must allow rapid unhindered contact between the growing peptide chain and the reagents. It must be readily separable from the liquid phase at every stage of the synthesis and be physically stable during these operations. In addition, the support must provide enough points of attachment to give a useful yield of peptide per unit of volume and must minimize the interactions between bound peptide chains."

Merrifield (1976)

Table 1. Reaction protocol for the basic Merrifield procedure (1969).

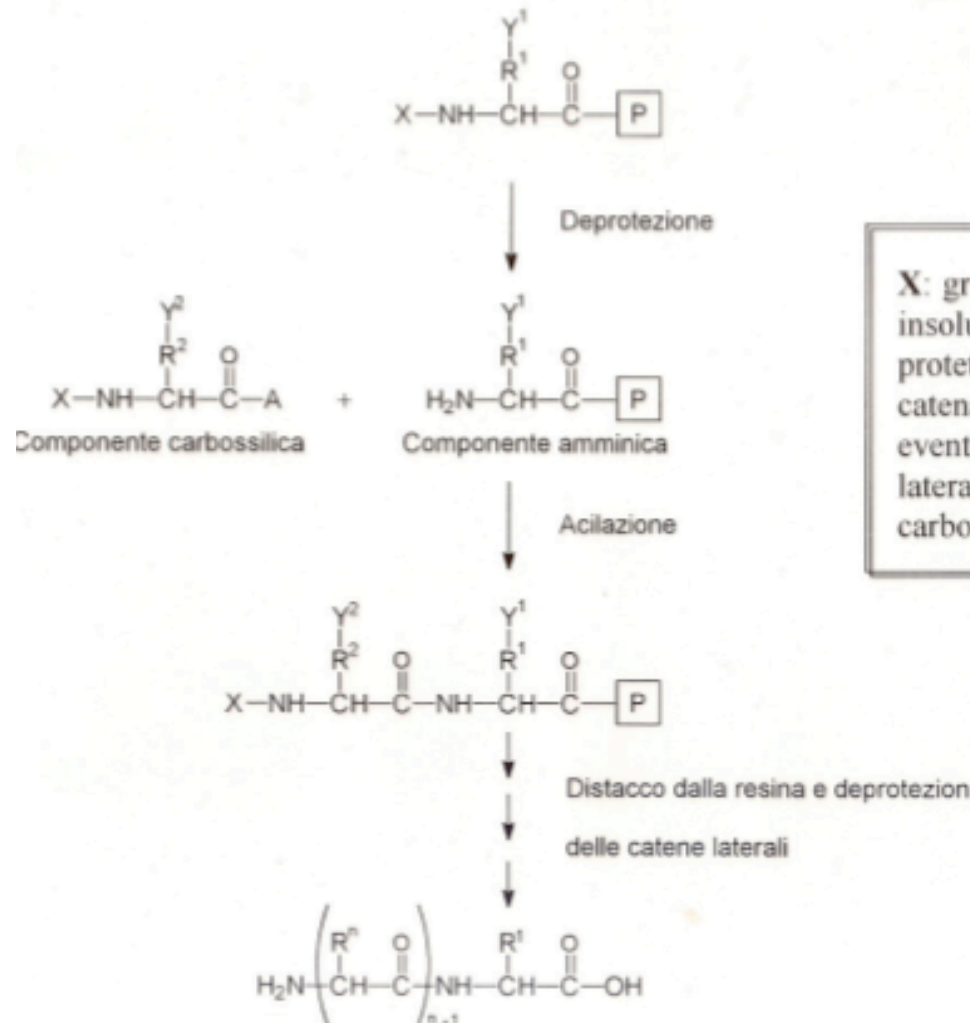
Operation	Rpts	Time (min)
1. Dichloromethane wash	2	2
2. Trifluoroacetic acid in dichloromethane (1:1)		2
3. Trifluoroacetic acid in dichloromethane (1:1)		21
4. Dichloromethane wash	5	2
5. Chloroform wash	3	2
6. Triethylamine in chloroform (1:10)		7
7. Chloroform wash	3	2
8. Dichloromethane wash	3	2
9. Boc-amino acid (3 eq.) in dichloromethane		7
10. DCCI (3 eq.) in dichloromethane		300
11. Dichloromethane wash	2	2
12. Ethanol wash	3	2



# Sintesi peptidica

## SPPS Solid Phase Peptide Synthesis

### SPPS



**X:** gruppo protettore di  $\alpha-NH_2$ , **P:** polimero insolubile che funziona anche come gruppo protettore per il gruppo carbossilico, **R:** catena laterale dell'amminoacido, **Y:** eventuale gruppo protettore per la catena laterale, **A:** gruppo attivatore per il carbossile.

# Sintesi peptidica

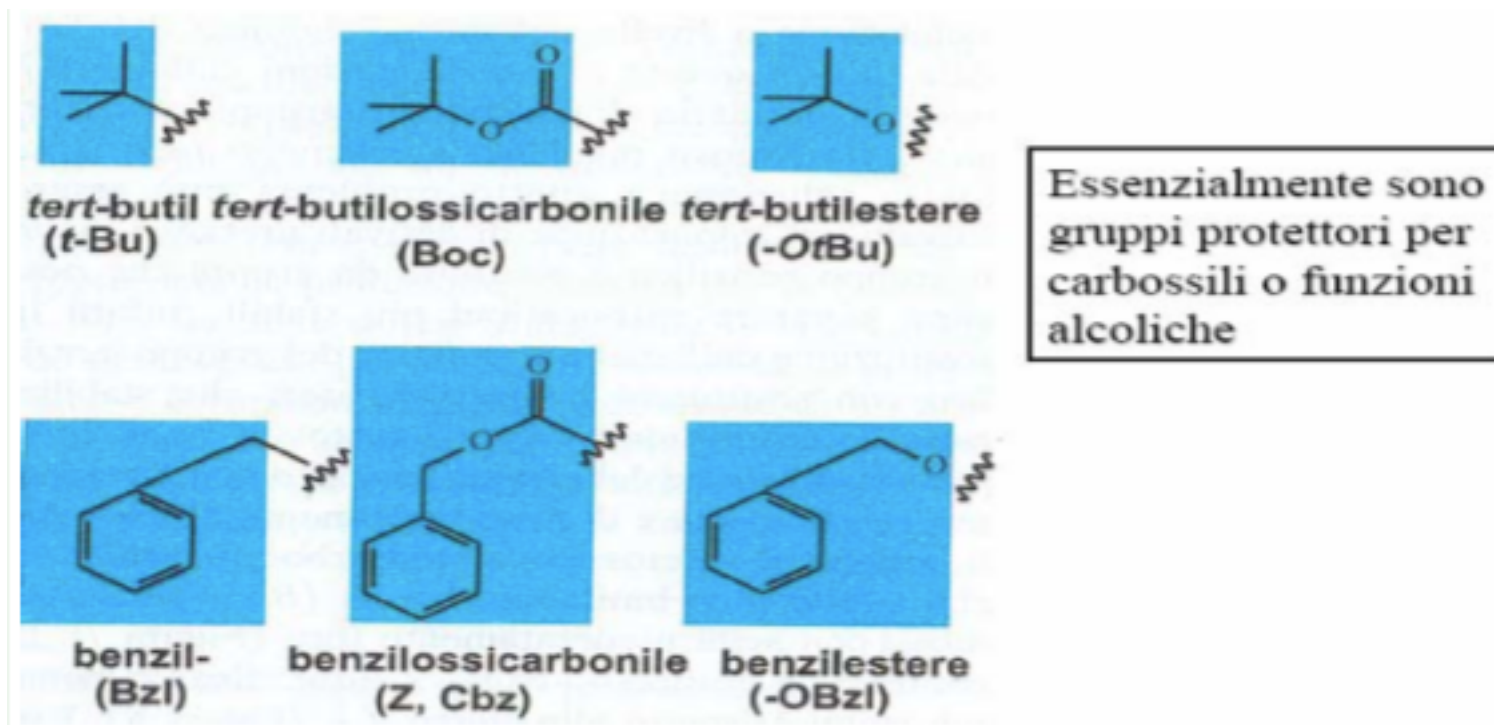
i gruppi protettori introdotti possono essere classificati secondo:

- Condizione di rimozione
  - Tipologia del legame che formano con il gruppo da proteggere
1. *gruppi protettori acido-labili con formazione di un carbocatione;*
  2. *gruppi protettori base-labili con formazione di un carbanione;*
  3. *gruppi protettori rimovibili mediante riduzione e ossidazione;*
  4. *gruppi protettori fotolabili;*
  5. *gruppi protettori rimovibili mediante metalli pesanti;*
  6. *gruppi protettori rimovibili mediante spostamento nucleofilo;*
  7. *gruppi protettori rimovibili mediante idrolisi enzimatica;*
  8. *gruppi protettori rimovibili mediante ioni fluoro.*



# Sintesi peptidica

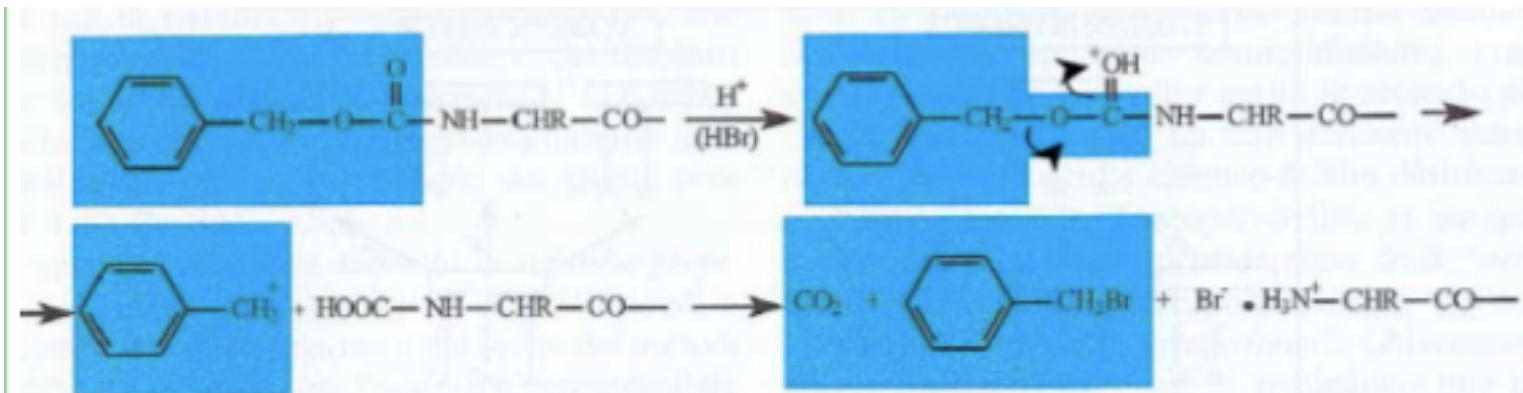
Gruppi protettori labili agli acidi, con rilascio di carbocationi





# Sintesi peptidica

## il gruppo benzilossicarbonile



Schema 4 - Meccanismo di rimozione del gruppo Z.

L'acido protona l'ossigeno portando ad uno ione ossonio.

Segue la scissione eterolitica del legame sigma (l'ossigeno attira la coppia di elettroni di legame) con formazione di un carbocatione. L'elevata stabilità di questi carbocationi è la "driving force" della reazione di deprotezione

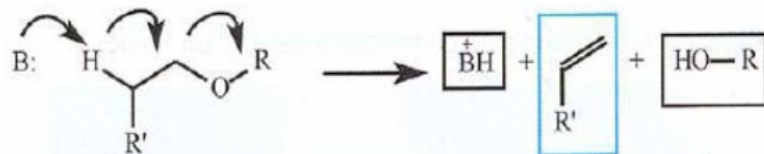
# Sintesi peptidica

Gruppi protettori base-labili con formazione di un anione o di carbanione.

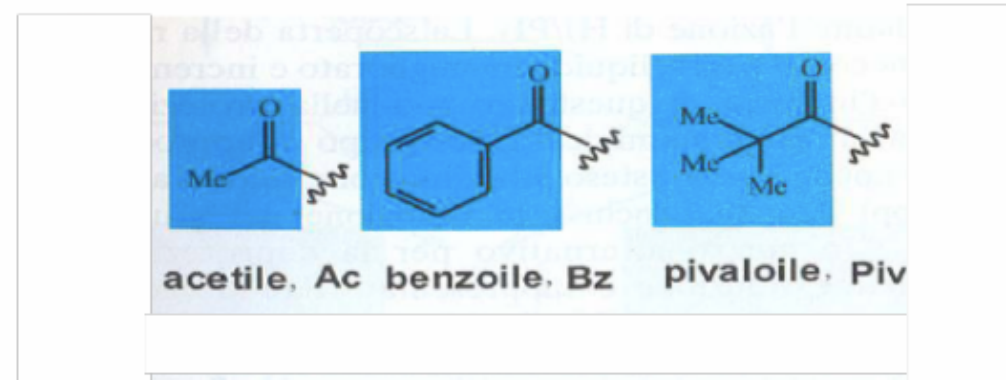
Sono i gruppi più diffusi e relativamente al meccanismo si possono distinguere due categorie:

1. Idrolisi basica

2.  $\beta$ -eliminazione (base indotta)



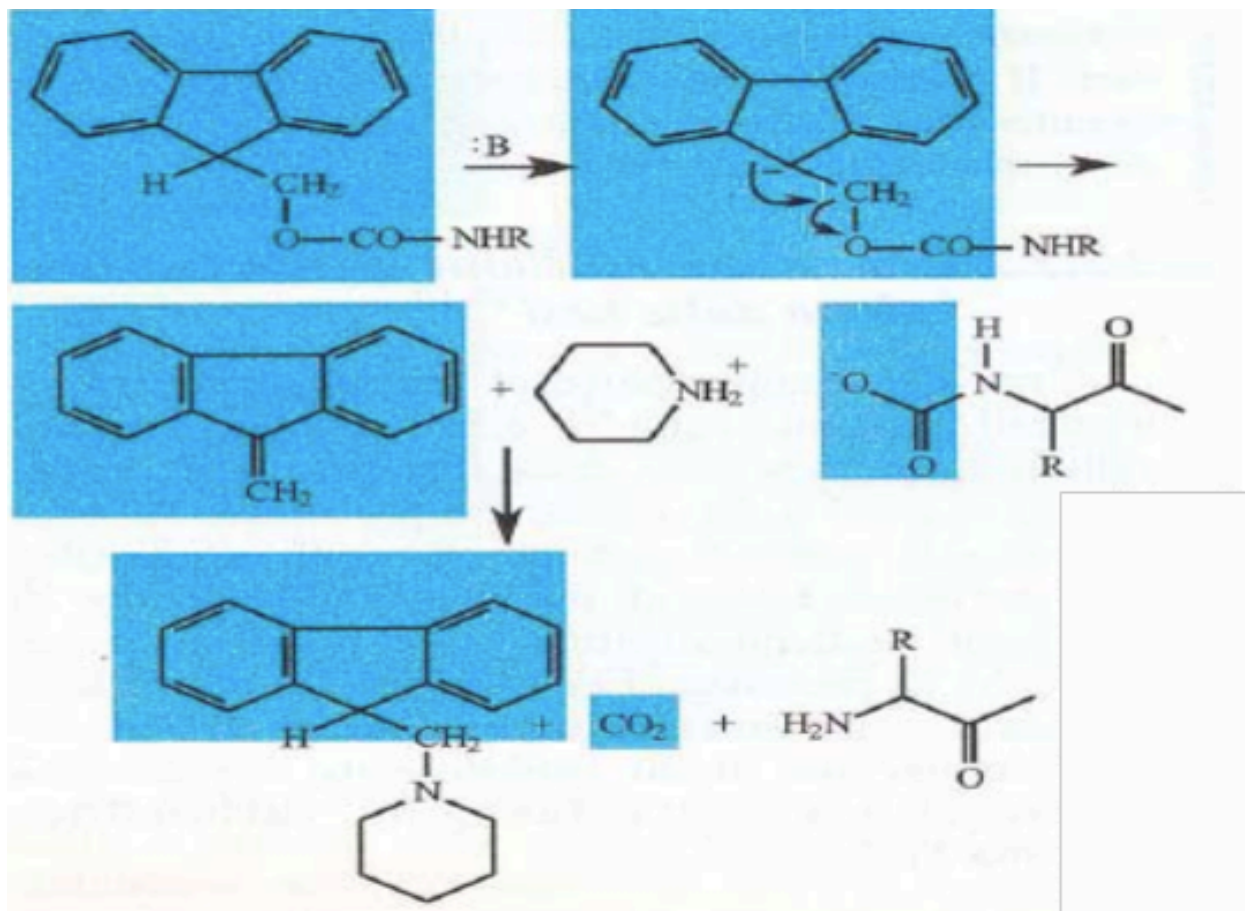
1. Idrolisi basica



Questi gruppi acilici formano, in genere, legami esterei che possono essere scissi per idrolisi basica.

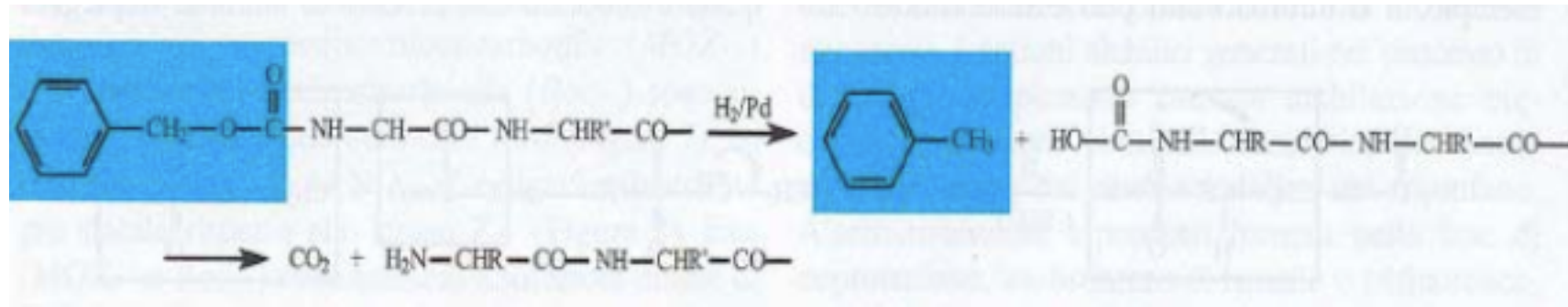
# Sintesi peptidica

Meccanismo di rimozione del gruppo Fmoc (fluorenilmetossicarbonile)



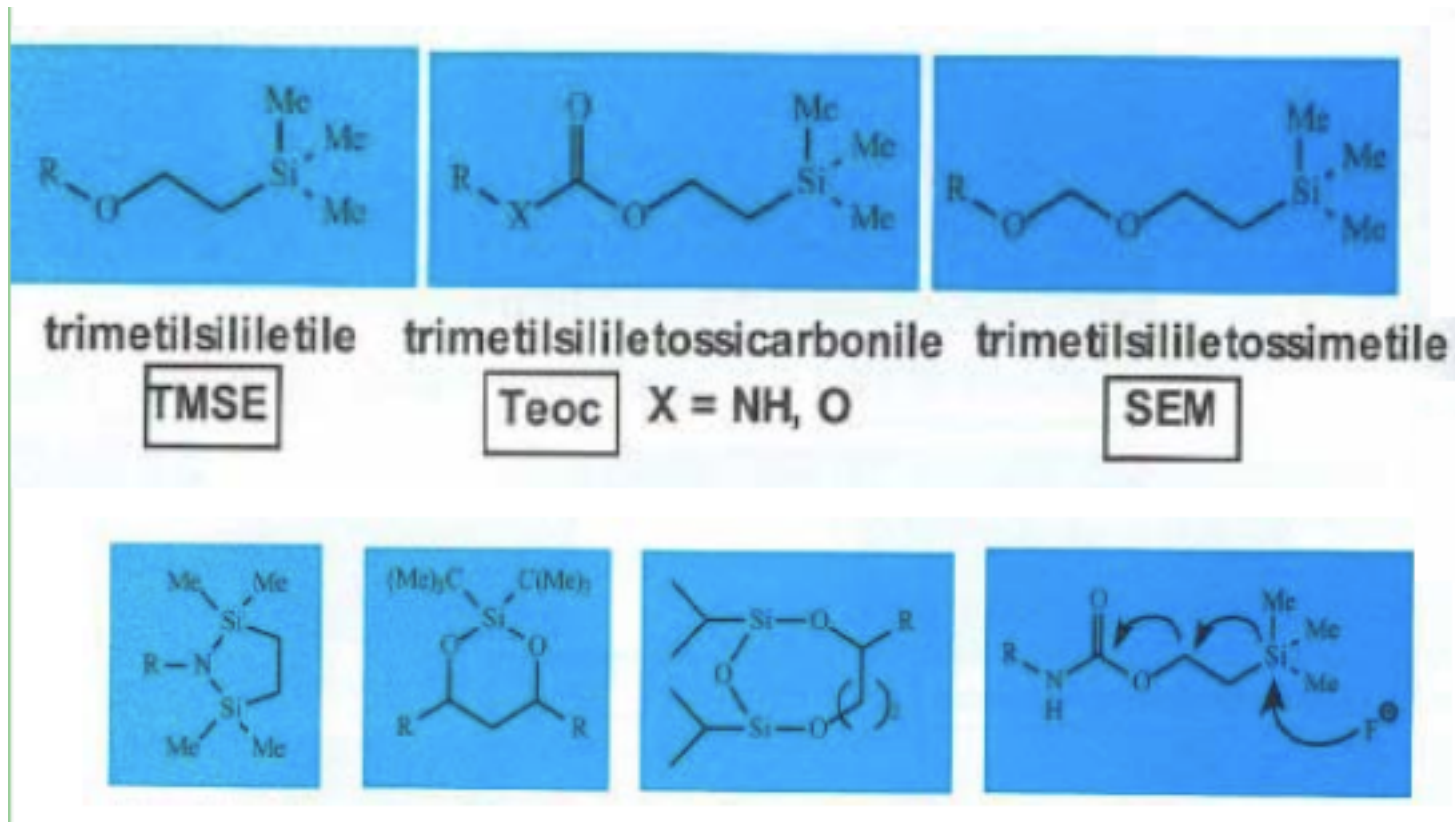
# Sintesi peptidica

Rimozione per idrogenolisi dei gruppi benzilici



# Sintesi peptidica

Silil-eteri: gruppi protettori rimossi con ioni fluoruro

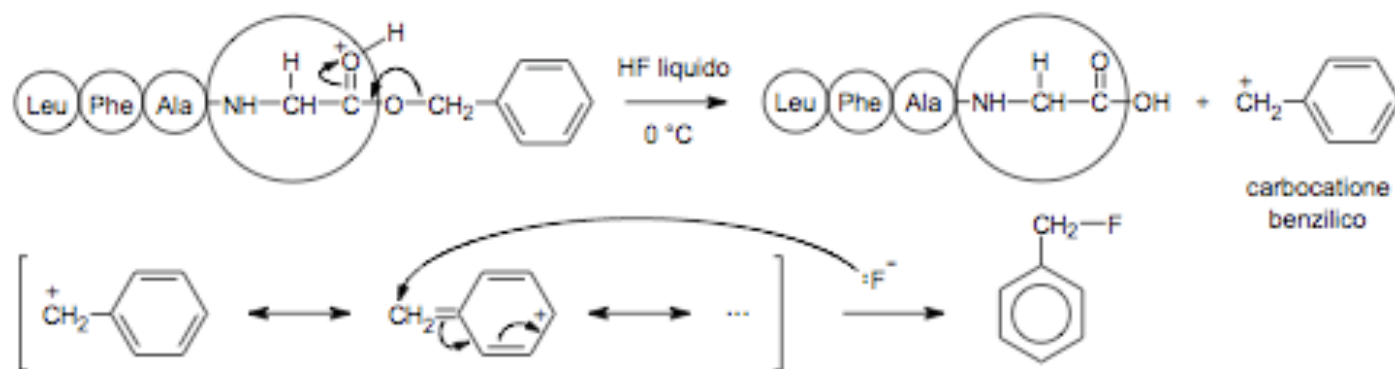


# Protezione del gruppo carbossilico

Uno dei più usati protettori del gruppo carbossilico terminale è il **gruppo benzilico, Bzl**. Questo inibisce la reattività del carbossile trasformandolo in un estere benzilico

L'estere benzilico è stabile nelle condizioni di sblocco del Boc con TFA / DCM (1:1), ma viene scisso in **HF liquido anidro a 0 °C**, ambiente in cui il legame ammidico è stabile.

Le ammidi, infatti, per essere scisse richiedono la presenza di un nucleofilo come l'acqua con il quale danno una reazione di sostituzione nucleofila (SN acilica). In HF liquido anidro non ci sono buoni nucleofili, quindi il legame ammidico è stabile. L'estere benzilico, invece, si scinde dato che può reagire con un meccanismo di tipo diverso, SN1, grazie alla **stabilità del carbocatione benzilico**. Es. di sblocco del gruppo benzilico nel tetrapeptide Leu-Phe-Ala-Gly-OBzl:



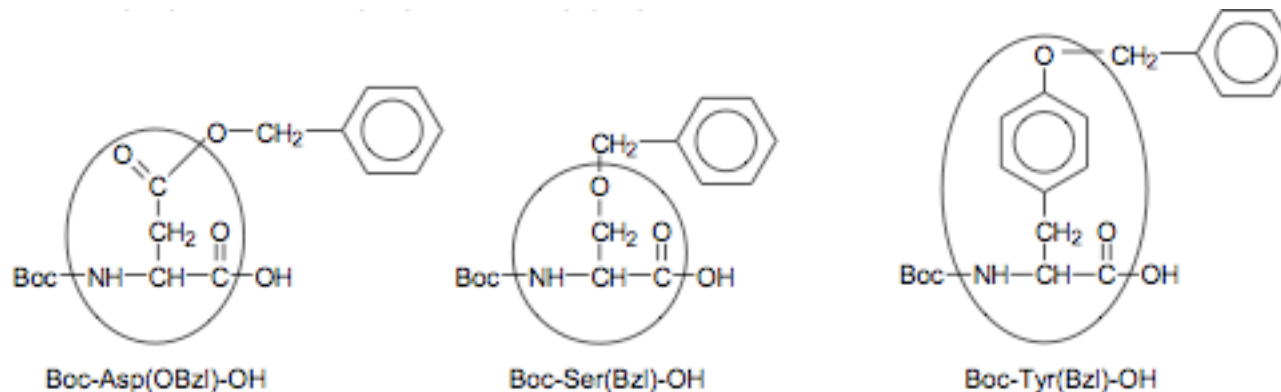


# Protezione del gruppo carbossilico

Il gruppo benzilico è anche usato come protettore di gruppi funzionali che si trovano nella **catena laterale** di alcuni aminoacidi. Per esempio, i carbossili  $\beta$  e  $\gamma$  degli acidi aspartico e glutammico vengono protetti come **esteri benzilici**; gli ossidrili di serina, treonina e tirosina vengono protetti come **eteri benzilici**.

Questi aminoacidi vengono utilizzati nella sintesi di peptidi con una **doppia protezione** al gruppo amminico in  $\alpha$  e al gruppo funzionale in catena laterale.

Il protettore in catena laterale viene indicato tra parentesi, avremo quindi: Boc-Asp(OBzl)-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Tyr(Bzl)-OH.



# Attivazione del gruppo carbossilico

Nella sintesi di peptidi per allungamento graduale di catena, il legame ammidico viene realizzato facendo reagire un **Boc-amminoacido attivato al carbossile** con il gruppo amminico di un peptide protetto al carbossile.

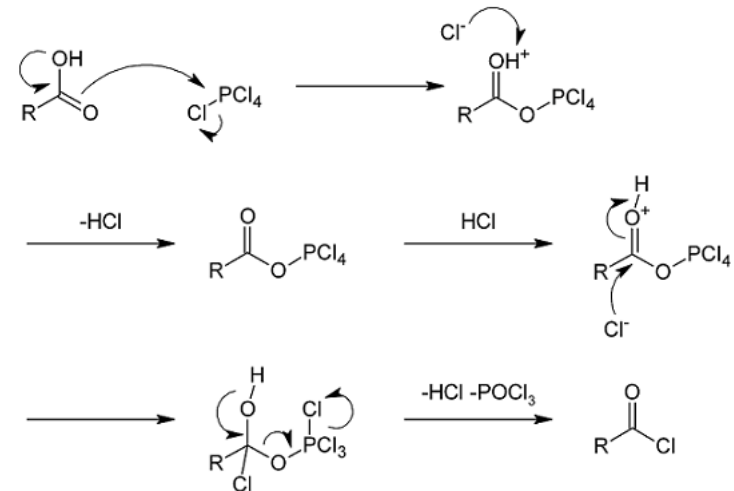
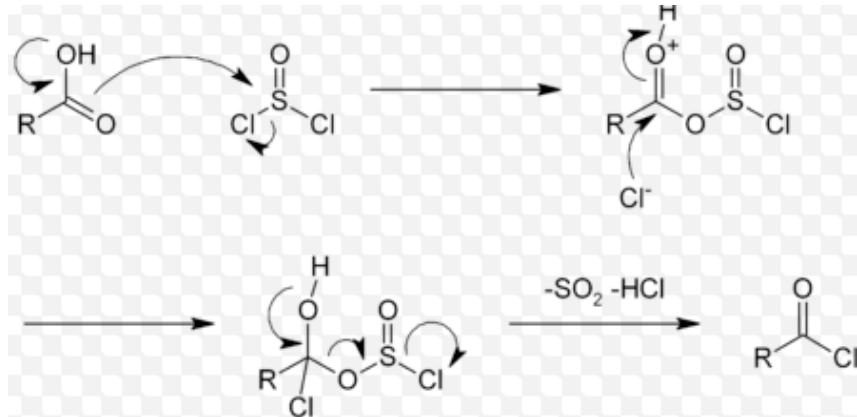
Quattro sono le diverse tecniche di attivazione:

1. Metodo del cloruro acido
2. Metodo delle anidridi simmetriche
3. Metodo dell'estere attivo
4. Metodo della carbodiimmide DCC
5. Metodo della N-idrossisuccinimide

# Attivazione del gruppo carbossilico

NO

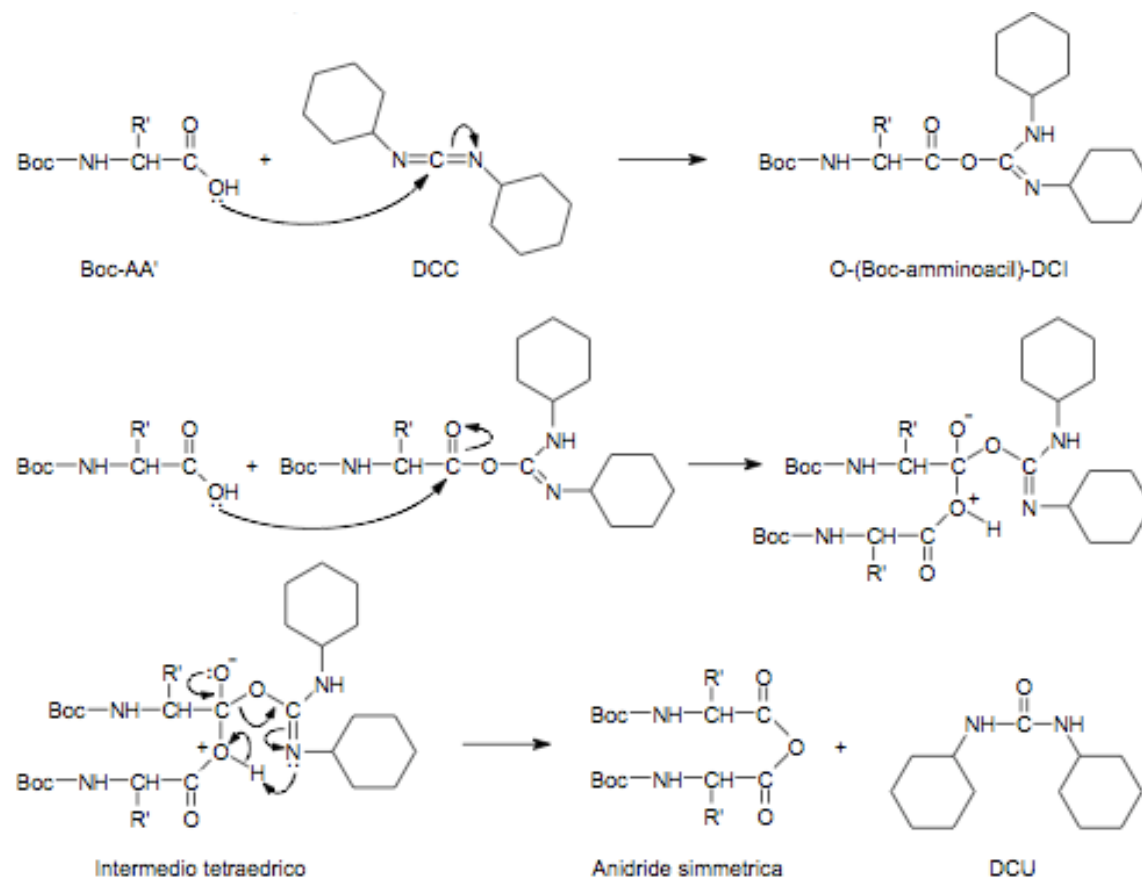
**1. Cloruri acilici** Il gruppo carbossilico di un Boc-ammino acido può essere attivato trasformandolo nel corrispondente cloruro acilico. Può sembrare il modo più semplice per sintetizzare il legame ammidico ma è stata abbandonata perché richiede l'impiego di reattivi troppo violenti come  $\text{SOCl}_2$  o  $\text{PCl}_5$  incompatibili con molti AA. Inoltre i cloruri acilici dei Boc-amminoacidi e dei peptidi, sono derivati troppo attivati che ciclizzano spontaneamente per dare gli ossazoloni, intermedi ciclici che possono facilmente racemizzare!



# Attivazione del gruppo carbossilico

**2, Anidridi simmetriche** Le anidridi simmetriche dei Boc-amminoacidi si possono preparare facendo reagire il Boc-AA con un blando disidratante, la N,N'-dicicloesilcarbodiimide, DCC, nel rapporto 2 : 1.

La reazione va condotta in DCM a 0°C per 30 minuti.

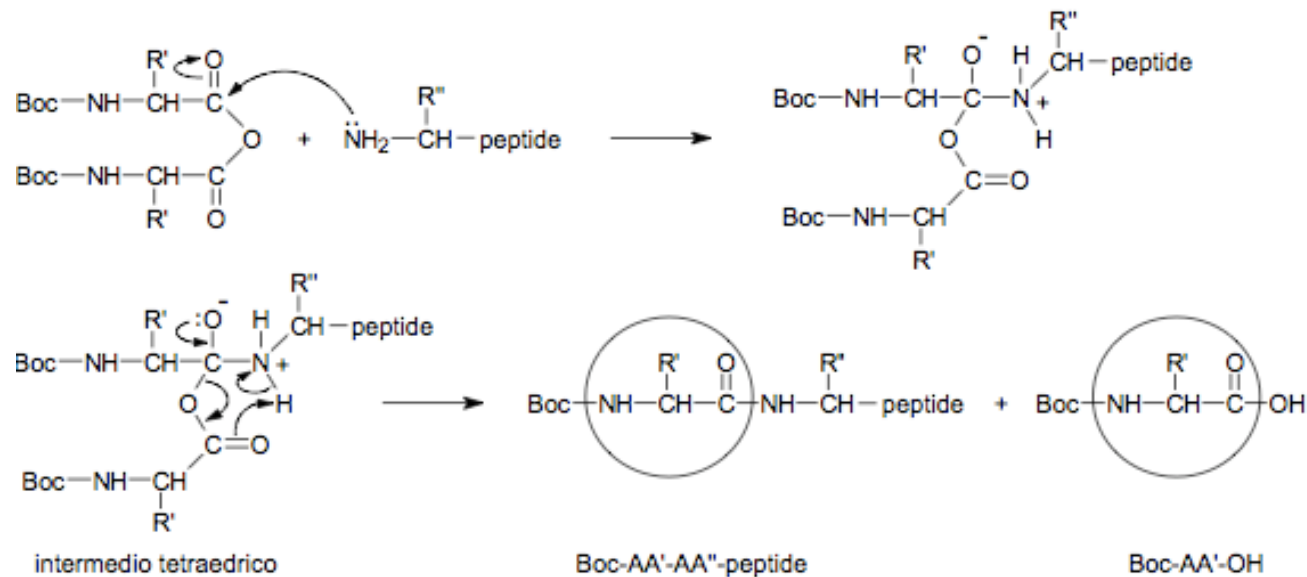


dapprima si forma O-(Boc-aminoacyl)-N,N'-dicicloesilurea, DCI: questo è un forte acilante e può reagire con molti nucleofili per esempio con un secondo Boc, amminoacido, come in questo caso, oppure con un ossidrilico, come nella sintesi degli esteri attivi, o con una ammina, come nella sintesi diretta del legame ammidico con DCC aggiunta in situ. La reattività di DCI dipende da due fattori: 1) dal fatto che la molecola ha un ottimo gruppo uscente, la dicicloesilurea, DCU, ma soprattutto 2) dalla struttura della DCI che, formando un ciclo a sei atomi nell'**intermedio tetraedrico**, può portare un atomo di azoto vicino all'H<sup>+</sup> che rende positivo il Boc-AA, l'N può dare **assistenza anchimerica** strappando l'H<sup>+</sup>, in questo modo il miglior gruppo uscente non è più il Boc-AA, ma la DCU protonata.

# Attivazione del gruppo carbossilico

## Anidridi simmetriche

L'anidride simmetrica, in un secondo momento, può subire amminolisi quando viene fatta reagire con il gruppo amminico del peptide per la formazione del legame amidico



Anche l'anidride simmetrica, come la DCC, ha una reattività che è molto influenzata dalla sua struttura tridimensionale. Infatti l'intermedio tetraedrico, assume un assetto ad esagono che porta il carbonile dell'anidride vicino all'H<sup>+</sup> del gruppo amminico. Il carbonile fornisce **assistenza anchimerica** alla reazione strappando questo H<sup>+</sup>. Di conseguenza non è più l'azoto il miglior gruppo uscente, ma il carbossile del secondo Boc-amminoacido e questo spinge la reazione verso destra!

**RICORDA:** Le anidridi simmetriche dei Boc-amminoacidi sono stabili e non ciclizzano per dare ossazolone.

Le anidridi simmetriche dei peptidi, invece, non sono utilizzabili perchè portano a prodotti racemizzati via ossazolone



# Attivazione del gruppo carbossilico

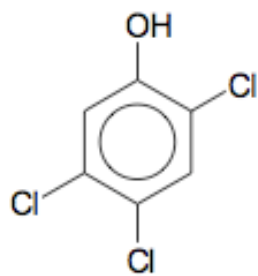
## 3. Estere attivo

Gli esteri attivi sono una classe di esteri particolarmente reattivi perchè contengono alcoli che sono ottimi gruppi uscenti. Questo può essere dovuto a due motivi:

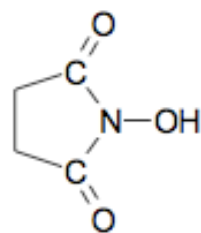
1) l'alcol ha caratteristiche acide e quindi il suo alcossido è stabile. In questa categoria ci sono alcuni derivati del fenolo come p-nitrofenolo e 2,4,5-triclorofenolo.  
2) l'alcol, anche senza essere particolarmente acido, ha una struttura tale da fornire assistenza anchimerica durante la reazione di amminolisi. In questa categoria ci sono i derivati della idrossilammina come N-idrossisuccinimide (HOSu) e N-idrossibenzotriazolo (HOBT).



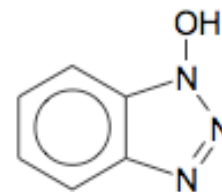
p-nitrofenolo



2,4,5-triclorofenolo



HOSu



HOBT

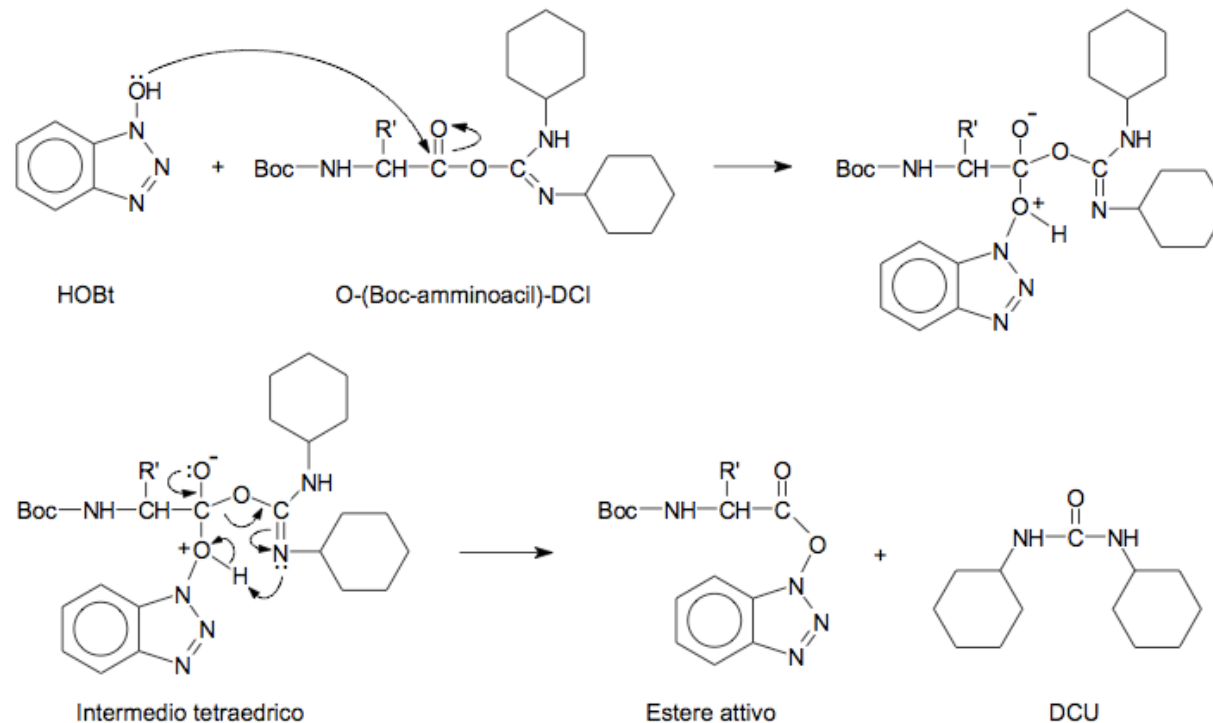
# Attivazione del gruppo carbossilico

## Estere attivo

Un estere attivo molto usato è quello con HOBt, lo si prepara mescolando il Boc-amminoacido, HOBt e DCC nell'ordine in rapporto 1:1:1.

La reazione va condotta in DCM a 0 °C per 30 minuti.

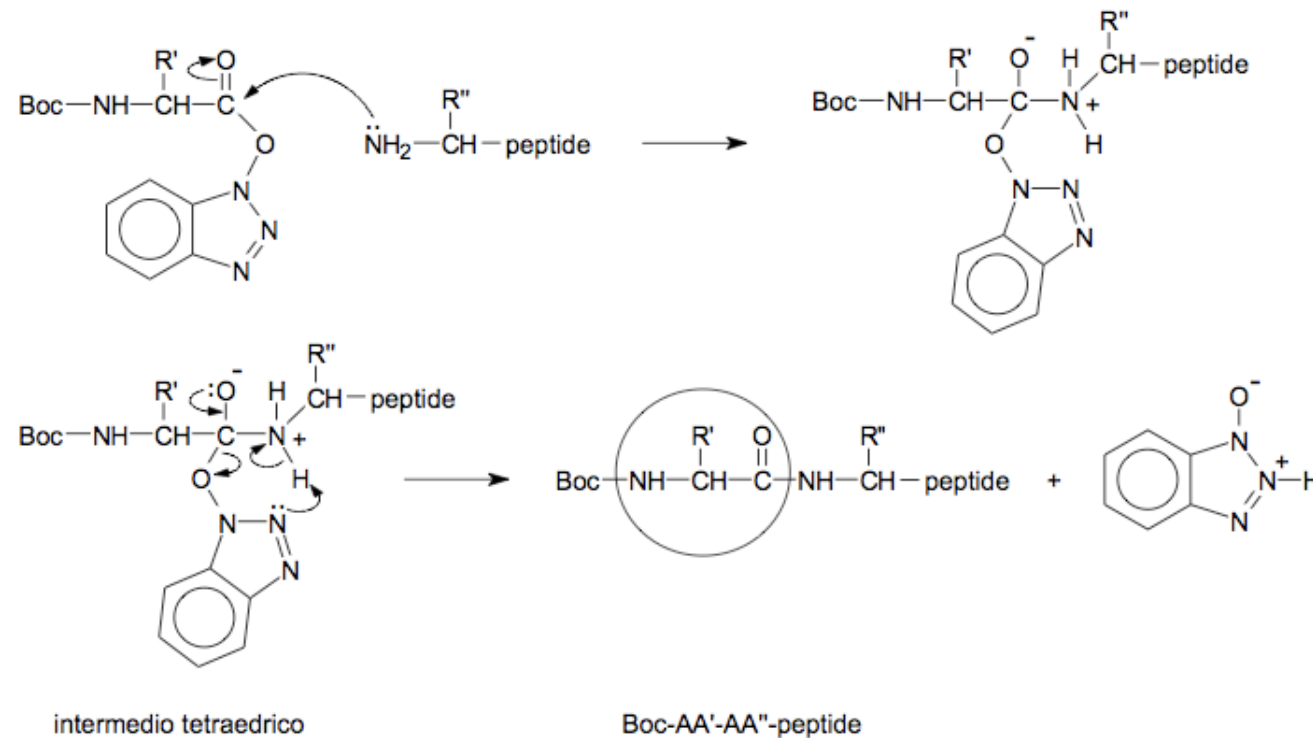
Il Boc-AA reagisce inizialmente con DCC formando dicicloesilisourea, DCI, secondo la reazione già vista, quindi la successiva reazione di HOBt con DCI che è un agente acilante molto reattivo segue un andamento del tipo:



# Attivazione del gruppo carbossilico

## Estere attivo

La dicicloesilisourea, DCI, reagisce preferenzialmente con l'ossidrile di HOBt che è molto più nucleofilo del carbossile di un amminoacido. Anche qui la reazione è facilitata dall'assistenza anchimerica. La dicicloesilisourea, DCU, precipita e può essere eliminata per filtrazione. Si ottiene l'estere attivo del Boc-AA che viene fatto reagire direttamente con il gruppo amminico del peptide per la reazione di aggancio

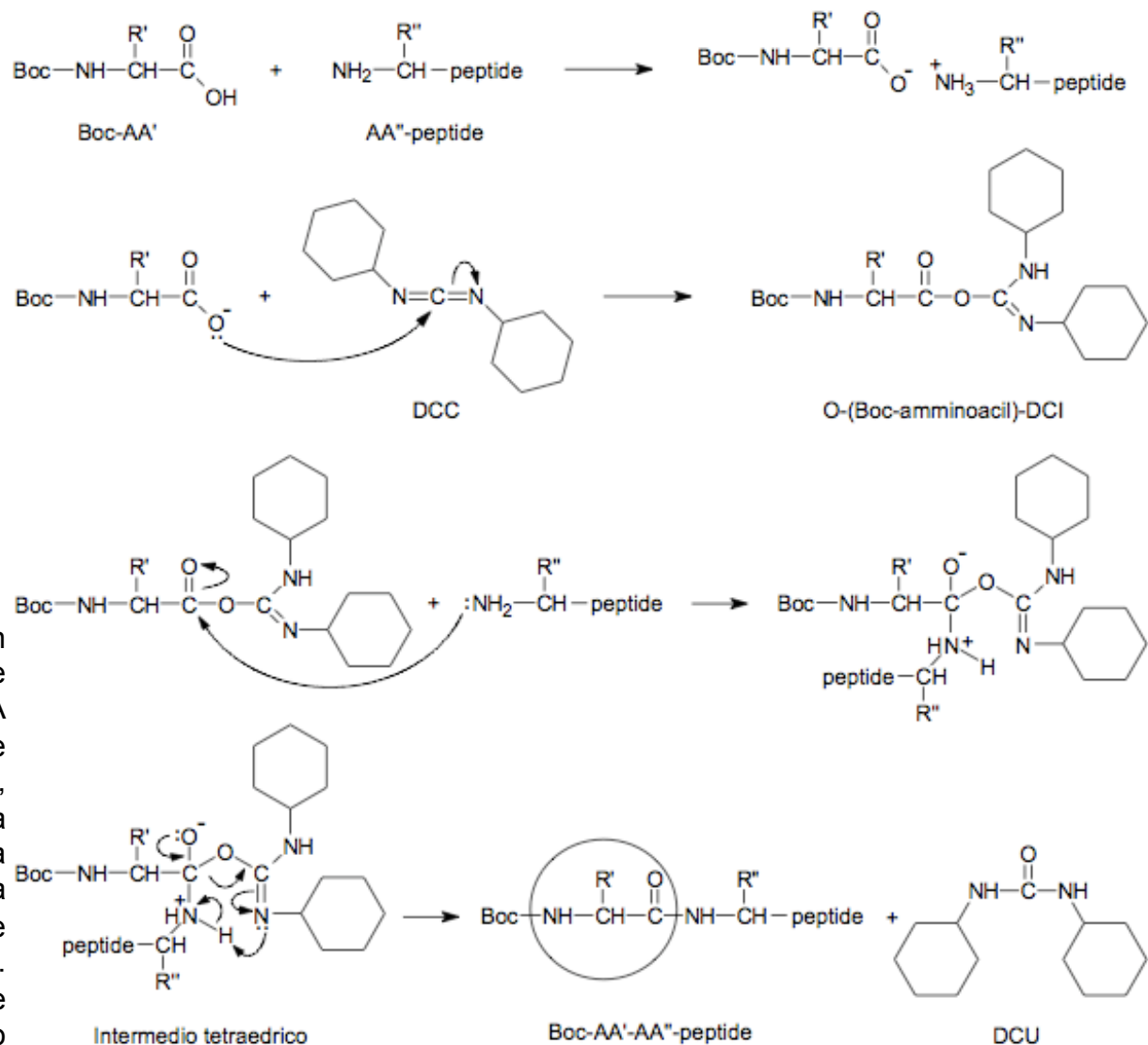


# Attivazione del gruppo carbossilico

## Attivazione della DCC in situ

L'aggiunta di dicicloesilcarbodiimmide, DCC, ad una miscela di Boc-amminoacido e peptide col gruppo amminico libero costituisce il **metodo più semplice ed immediato** per sintetizzare il legame ammidico. Il Boc-AA forma inizialmente un sale con il gruppo amminico del peptide, l'aggiunta di DCC porta alla formazione di O-(Boc-amminoacil)-dicicloesilisourea, DCI, che poi reagisce direttamente con il gruppo amminico del peptide per formare il legame ammidico.

**Commento:** Una parte di DCI, invece che con il gruppo amminico del peptide, può reagire con una seconda molecola di Boc-AA formando l'anidride simmetrica. L'agente acilante che introduce l'AA nel peptide, quindi, non è solo la O-(Boc-amminoacil)-isourea, ma anche l'anidride simmetrica! La tecnica della attivazione con DCC aggiunta in situ è una delle più utilizzate nella sintesi progressiva e permette di ottenere peptidi non racemizzati. Si è osservato che l'aggiunta di HOBT insieme alla DCC durante la reazione di aggancio produce peptidi otticamente puri!



# Protezione del gruppo aminico

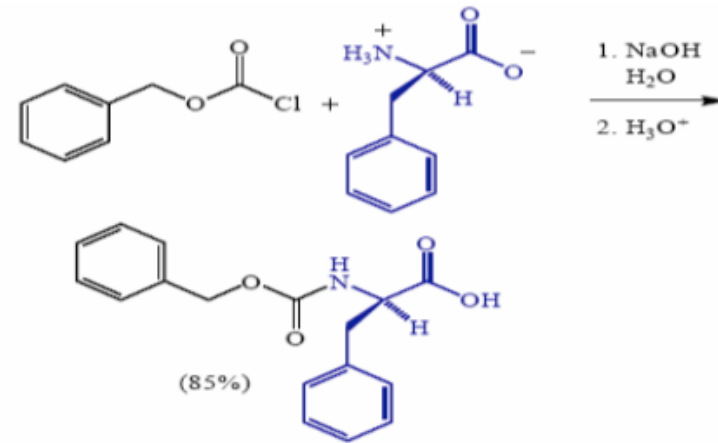
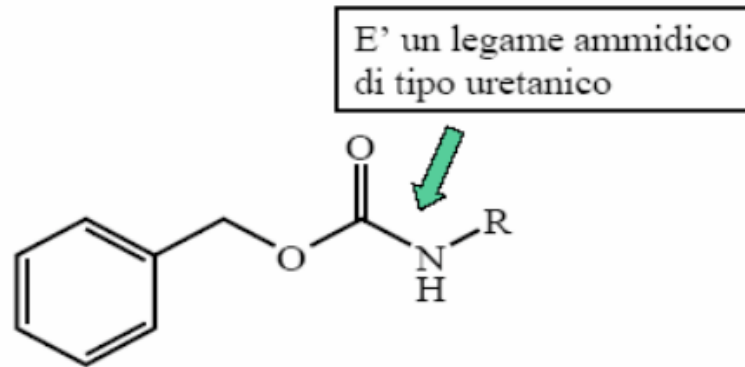
1. **Benzilossicarbonile (Cbz o Z)**
2. **t.Butossicarbonile (Boc)**
3. **Fluorofenilmetilossicarbonile (Fmoc)**
4. **Tritile**
5. **6-nitroveratrilossicarbonile (Nvoc)**
6. **o.Nitrofenilsulfenile (NpS)**
7. **Benzensolfonile**
8. **Formile**
9. **Trifluoroacetile**
10. **Ftalile**
11. **p.Toluensolfonile**



# Protezione del gruppo aminico

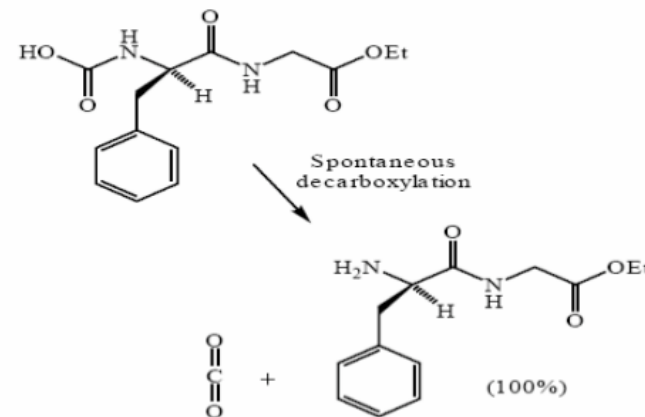
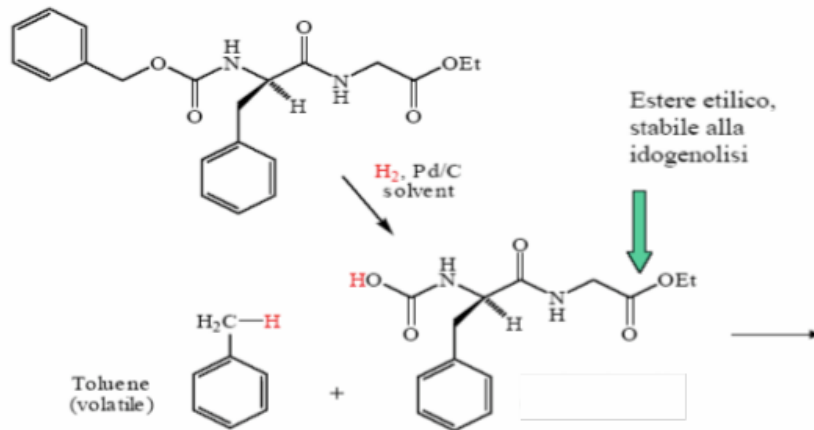
## 1. Benzilossicarbonile (Cbz o Z)

L'introduzione del gruppo carbobenzilossi- su un AA avviene



La rimozione avviene per idrogenolisi

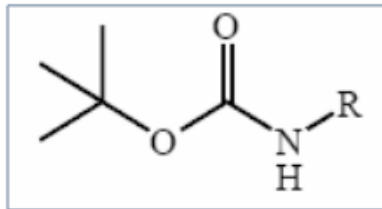
La reazione è una sostituzione nucleofila su di un cloruro di acile (carbonile fortemente reattivo verso i nucleofili)



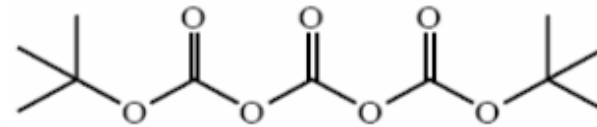
# Protezione del gruppo aminico

## 2. t-Butossicarbonile (Boc)

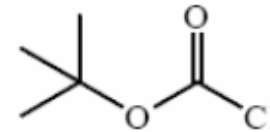
• Con il gruppo amminico forma un legame ammidico di tipo uretano



L'introduzione del gruppo tert-butossicarbonile avviene mediante l'uso dei seguenti reattivi:

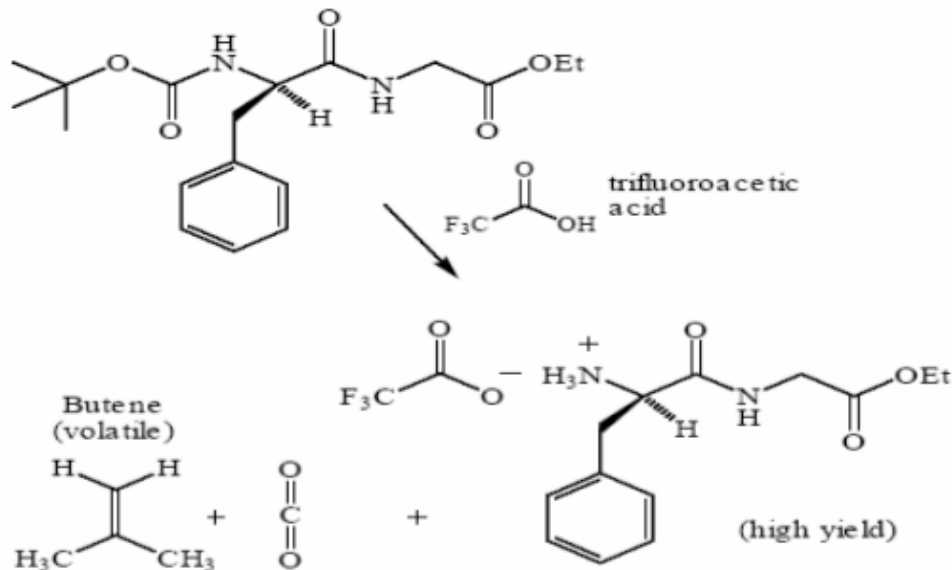


**Boc anidride**



**Boc cloruro**

La rimozione avviene con acidi:



# Protezione del gruppo aminico

## 3. Fluorofenilmetilossicarbonile (Fmoc)

- E' certamente il gruppo protettore più versatile ed usato
- Forma un legame ammidico di tipo uretanico
- E' un gruppo rimovibile in blande condizioni basiche



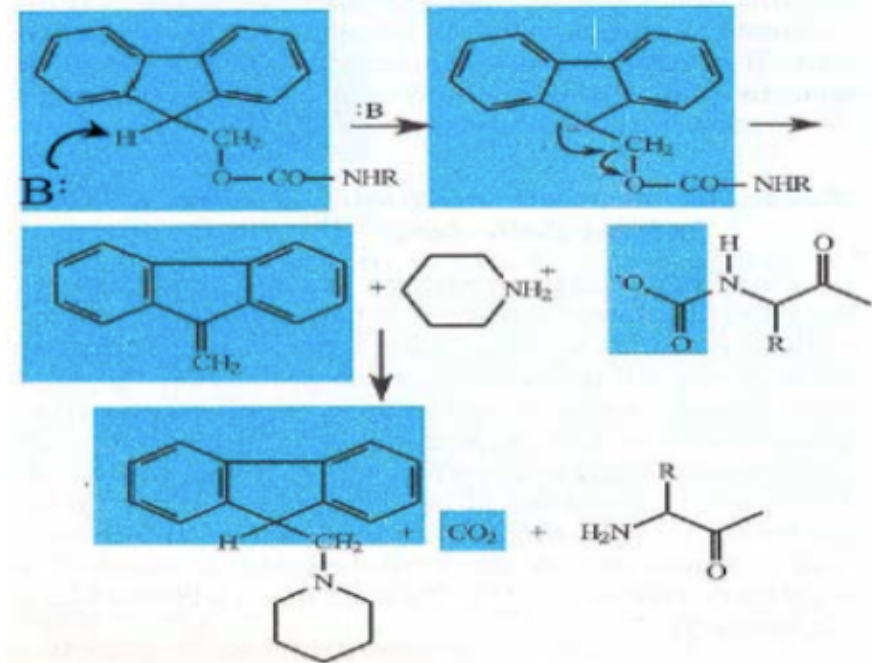
# Protezione del gruppo aminico

## 3. Fluorofenilmetilossicarbonile (Fmoc)

I principali vantaggi all'uso del Fmoc sono:

- alternativa ai gruppi protettori rimovibili in ambiente acido in quanto in queste condizioni avvengono una serie di reazioni collaterali a carico di altri amminoacidi (Met, Tyr, Trp, Asp) dovute alla formazione di specie carbo-cationiche altamente reattive che si generano nel processo di rimozione;
- nella sintesi in fase solida via Boc – i ripetuti trattamenti con TFA danno luogo, anche se in misura ridotta, al distacco del peptide dalla resina e alla deprotezione parziale dei gruppi protettori in catena laterale del tipo -Bzl, permettendo nelle reazioni successive di condensazione l'accrescimento di catene peptidiche non desiderate;

Rimozione del Fmoc con basi come piperidina:



La rimozione del Fmoc è veloce e avviene anche con altri basi

Basi	$t_{1/2}$
Piperidina al 20%	6 s
Piperazina al 5%	20 s
Morfolina al 50%	1 min.
Dicicloesilammina al 50%	35 min.
p-dimetilamminopiridina al 10%	85 min.
Etil-di-isopropilammina al 50%	10.1 h



# Protezione del gruppo aminico

## 3. Fluorofenilmetilossicarbonile (Fmoc)

La quantità di Fmoc rilasciata può essere quantizzata mediante misure spettrofotometriche UV/VIS

Ciò può dare indicazioni sulla resa della reazione nella formazione del legame peptidico

- *il sistema cromoforo 9-fluorenilmetil- presente nel gruppo Fmoc- assorbe fortemente nell'UV ed in particolare a 267 nm ( $\epsilon$  18950), 290 nm ( $\epsilon$  5280) e 301 nm ( $\epsilon$  6200). Questa caratteristica permette il monitoraggio spettrofotometrico sia della reazione di accoppiamento che di deprotezione;*



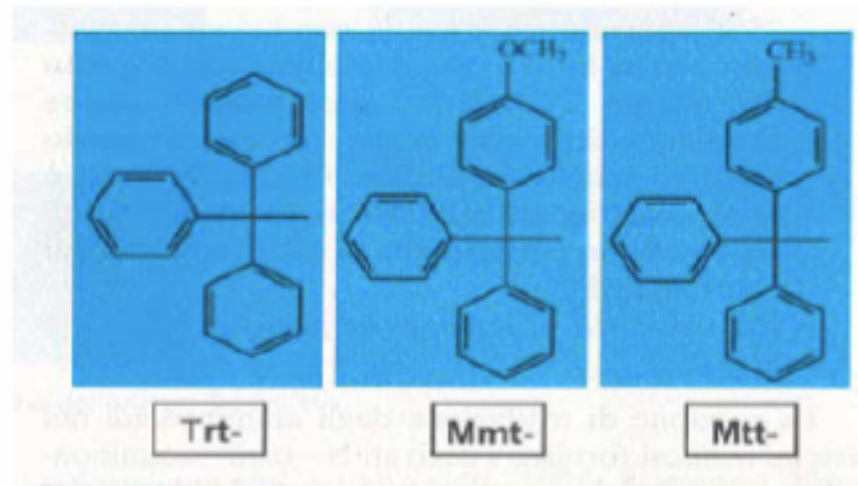
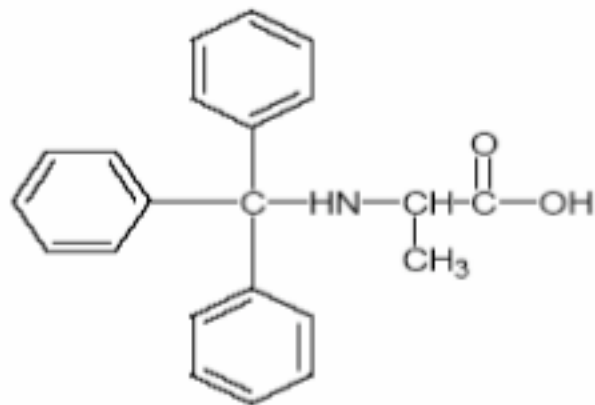
# Protezione del gruppo aminico

## 4. Trifenilmetile (e derivati)

È un gruppo che può essere usato sia per la funzione  $\alpha$ -amminiche sia per il gruppo amminico delle catene laterali (essendo ortogonale al gruppo Fmoc)

Forma un legame di tipo N-alchilico con l'azoto amminico da proteggere

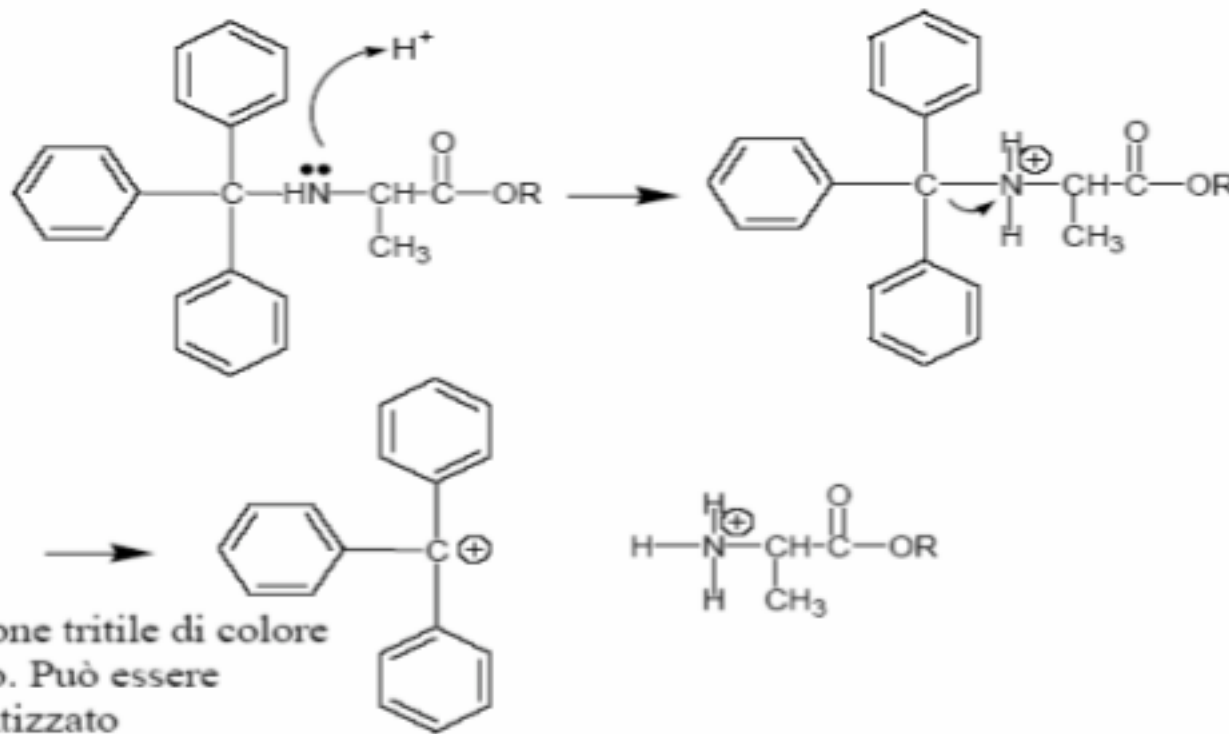
È rimosso in **blande condizioni acide**, modulabile in base alla struttura dei derivati tritilici utilizzati



# Protezione del gruppo aminico

## 4. Trifenilmetile (e derivati)

La rimozione avviene per trattamento con acidi di Bronsted o di Lewis in condizioni anidre

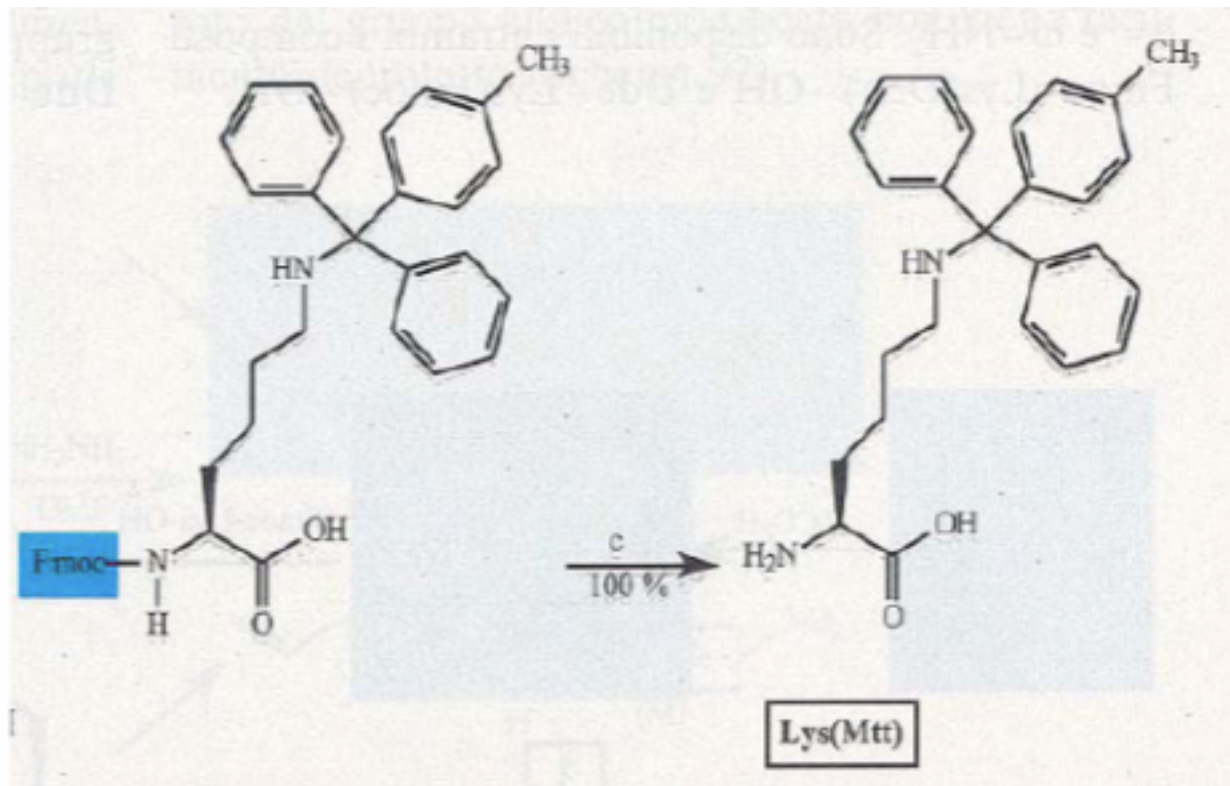


Catione tritile di colore rosso. Può essere quantizzato spettrofotometricamente nel VIS

# Protezione del gruppo aminico

## 4. Trifenilmetile (e derivati)

Il gruppo tritile è ortogonale al Fmoc

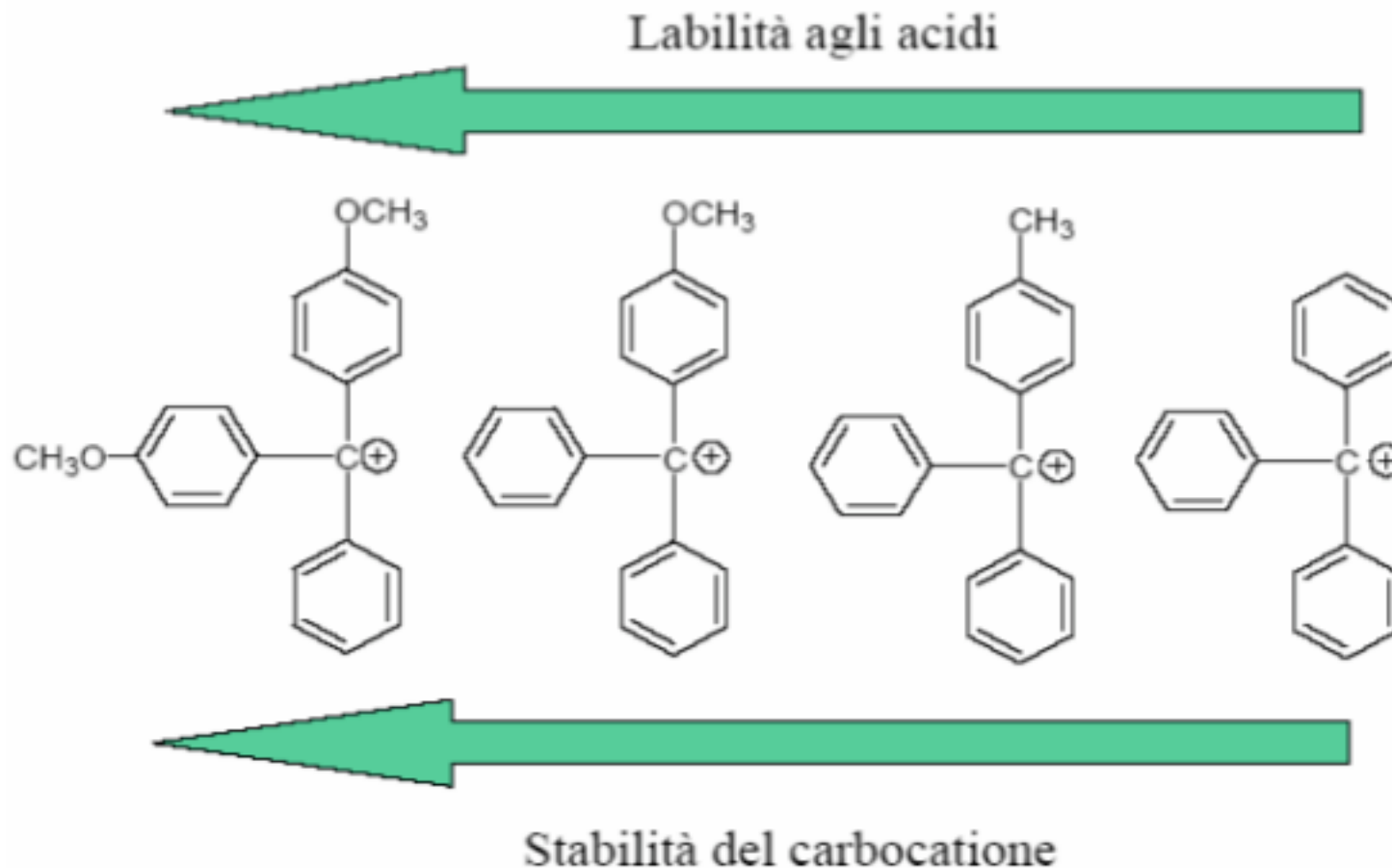


In questo caso il tritile protegge la funzione  $\epsilon$ -amminica della lisina

# Protezione del gruppo aminico

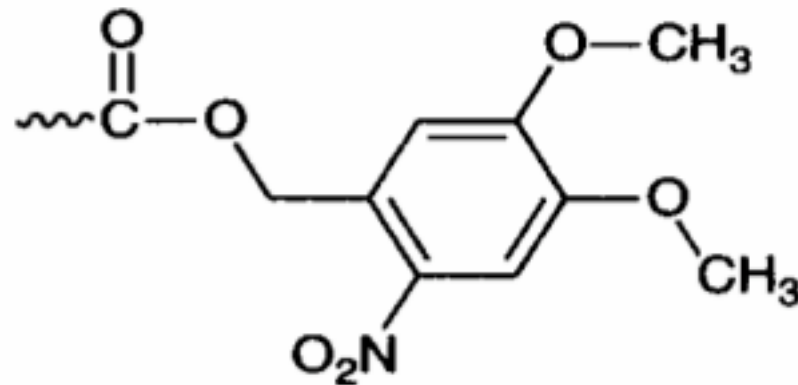
## 4. Trifenilmetile (e derivati)

Labilità dei derivati del tritile agli acidi



# Protezione del gruppo aminico

## 5. 6-Nitroveratrilossicarbonile (Nvoc)

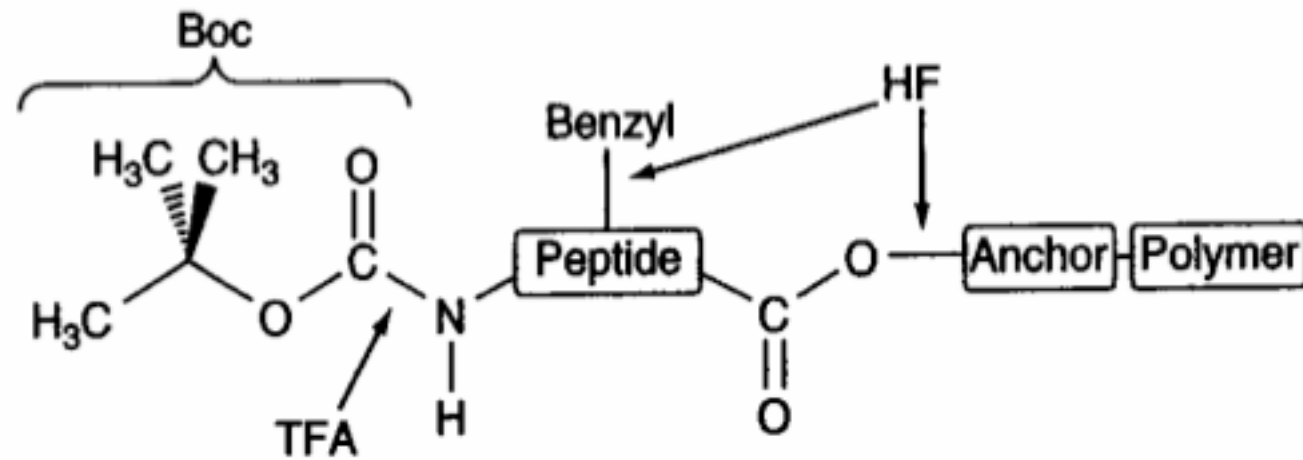


La rimozione di questo gruppo avviene per irraggiamento con radiazioni UV a  $\lambda = 350 \text{ nm}$



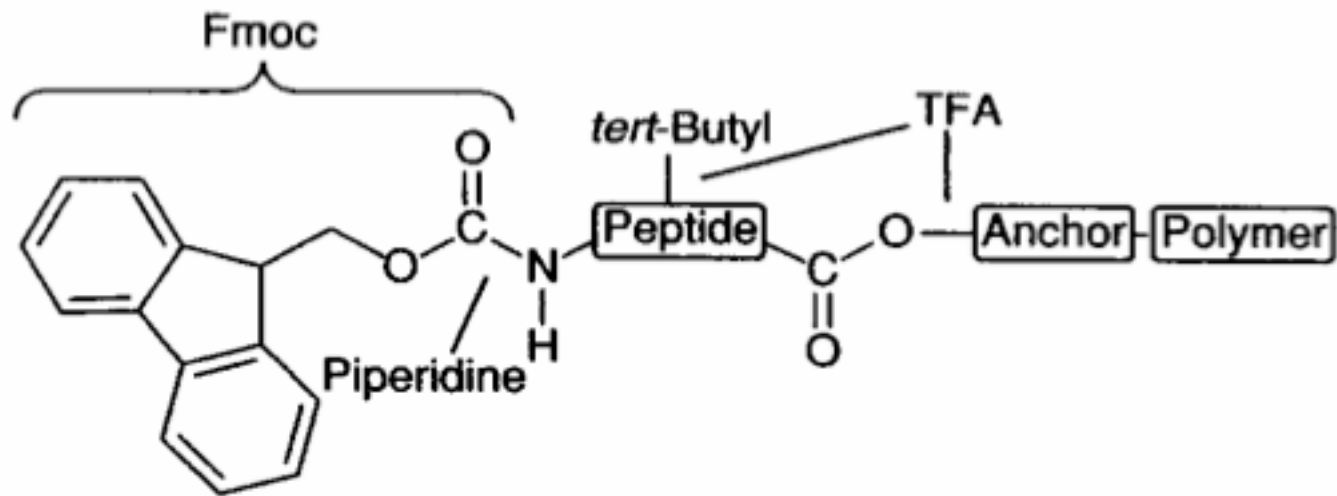
# Sintesi peptidica

Strategia di protezione dei peptidi con chimica Boc



# Sintesi peptidica

Strategia di protezione dei peptidi con chimica Fmoc



# Sintesi peptidica

Nel 1963 Merrifield ha messo a punto una tecnica di **sintesi di peptidi in fase solida** che richiama in parte la biosintesi delle proteine (che avviene nel citoplasma delle cellule al ritmo di **20 amminoacidi al secondo**). L'idea chiave della sintesi in fase solida consiste nel far crescere una catena peptidica legata covalentemente, con il primo amminoacido, ad un polimero insolubile. In questo modo i reagenti in eccesso e i sotto prodotti della sintesi possono essere rimossi per semplice filtrazione e lavaggio del polimero al quale è legato il peptide.

Questa nuova tecnica ha reso **la sintesi di peptidi molto più veloce**:

gli AA vengono introdotti al ritmo di uno ogni **2 ore**, cioè il tempo strettamente necessario per eseguire le reazioni. Infatti i lunghi tempi di purificazione, tipici della sintesi tradizionale, sono stati trasformati in semplici filtrazioni e lavaggi del peptide legato al supporto insolubile. Inoltre, data la semplicità delle operazioni richieste, **l'intero processo può essere automatizzato**.

Una macchina automatica per la sintesi di peptidi in fase solida può introdurre fino a dodici amminoacidi al giorno. Date queste premesse la sintesi in fase solida dovrebbe essere in grado di sintetizzare persino proteine, cioè sequenze peptidiche con più di 100 amminoacidi. In realtà, con questa tecnica, si possono preparare facilmente solo peptidi fino a 30 amminoacidi.

**I fattori che limitano l'efficienza della sintesi in fase solida sono due:**

- 1) la mancanza di purificazioni intermedie**
- 2) il trattamento finale con HF liquido.**

# Sintesi peptidica

## **Mancanza di purificazioni intermedie.**

Se la reazione di aggancio di un certo amminoacido non va a completezza, si ottengono, accanto a catene peptidiche che sono cresciute correttamente, anche un certo numero di catene che non hanno incorporato l'amminoacido in questione. Dato che i peptidi sono legati covalentemente al supporto polimerico, non è possibile eliminare i peptidi errati, anzi ad ogni nuovo ciclo della sintesi il loro numero è destinato ad aumentare. Alla fine, accanto al peptide corretto, si ottengono molti altri peptidi simili tra loro, che possono differire anche per un solo amminoacido e che rendono le operazioni di purificazione finali piuttosto difficili.

Per questo motivo è necessario che la **resa** della reazione con cui viene introdotto ogni amminoacido sia **il più possibile vicina al 100%!!!**

I peptidi errati, anche se non possono essere eliminati, possono almeno essere bloccati nella crescita acetilando il loro gruppo amminico libero con **anidride acetica**. In questo modo, anche se la resa complessiva non aumenta, è almeno più facile la purificazione finale.

# Sintesi peptidica

## Trattamento finale con HF liquido.

In una sintesi standard l'efficienza media delle reazioni raggiunge il 99%, ma le rese finali sono più basse di quanto preveda la teoria. Questo dipende da reazioni collaterali indesiderate che si realizzano durante lo sblocco finale con HF liquido.

Per limitare i danni che il peptide può subire si aggiungono alcune molecole, dette **scavengers** cioè spazzini, come **anisolo**, **dimetilsolfuro**, **etilmercaptano**.

Queste hanno lo scopo di intercettare i carbocationi reattivi generati dallo sblocco dei gruppi protettori e impedire che reagiscano con qualche catena laterale presente nel peptide.

Il trattamento in HF liquido rimane in ogni caso dannoso per i peptidi dato che possono avvenire anche reazioni non controllabili. Per questo motivo si cercano sempre nuove strategie sintetiche di protezione degli AA e di ancoraggio del peptide al polimero che permettano lo sblocco finale in condizioni più blande.

Il principio della sintesi in fase solida è stato applicato con successo non solo alla sintesi di peptidi, ma anche alla sintesi di altre classi di composti polimerici come **polinucleotidi** e **polisaccaridi!!!**



# Sintesi peptidica

Le operazioni necessarie per condurre una sintesi di peptidi in fase solida sono le seguenti:

- 1) Attacco del primo Boc-AA alla resina
- Un ciclo {
  - 2) Sblocco del Boc
  - 3) Neutralizzazione
  - 4) Aggancio del nuovo Boc-AA
  - 5) Acetilazione
- 6) Sblocco del Boc
- 7) Distacco del peptide dalla resina e sblocco dei protettori in catena laterale

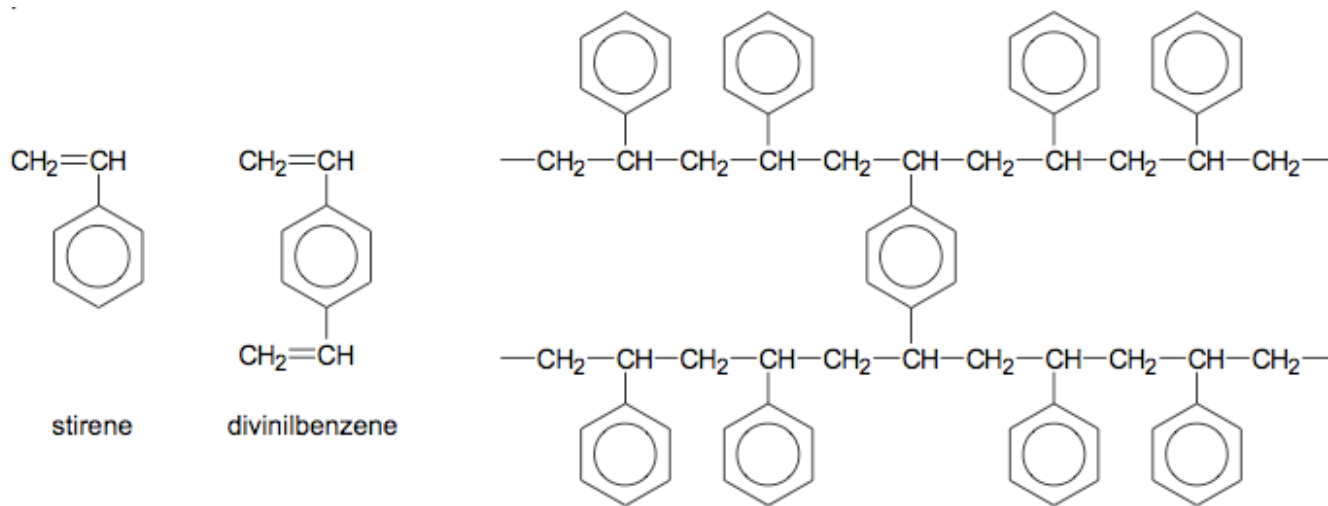
Le operazioni (2), (3), (4) e (5) costituiscono il ciclo di reazioni che viene ripetuto per ogni amminoacido introdotto nella catena peptidica. Quando si è ottenuta la sequenza di amminoacidi desiderata la sintesi viene conclusa con le operazioni finali (6) e (7).

# Sintesi peptidica

## Il supporto polimerico solido

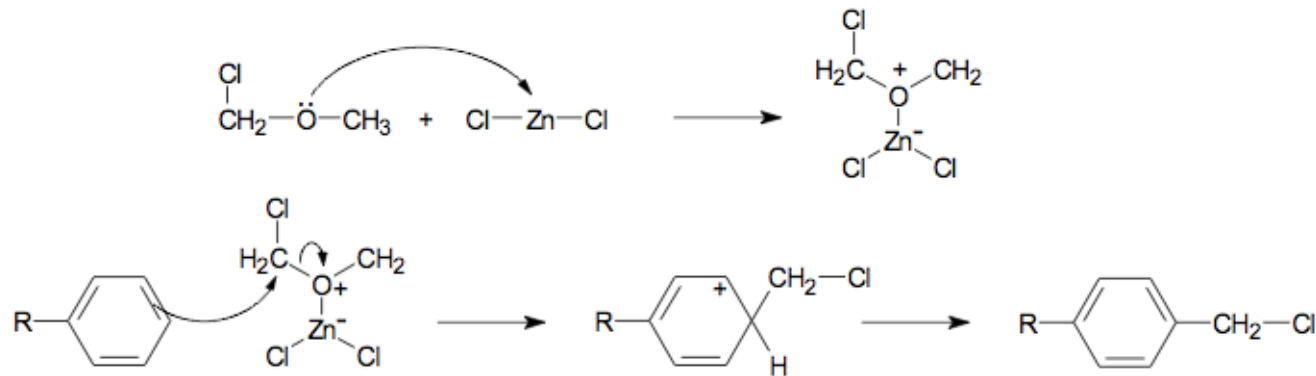
La scelta è caduta su di una **resina polistirenica** copolimerizzata con il 2% di divinilbenzene, questo ha lo scopo di creare dei legami incrociati per rendere la resina insolubile nei solventi organici.

Il livello di reticolazione non può superare il 2% per non irrigidire la resina che deve essere rigonfiabile (swelling) come una spugna quando viene bagnata dal solvente per permettere un facile movimento dei reattivi al suo interno.

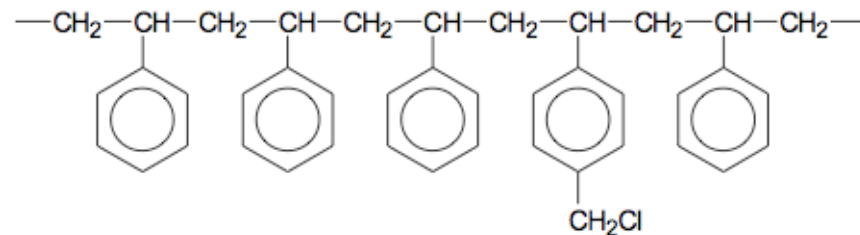


# Sintesi peptidica

La resina polistirenica deve essere derivatizzata per introdurre i punti di ancoraggio sui quali il primo amminoacido si deve legare come estere benzilico. La resina più utilizzata contiene dei gruppi clorometilici che vengono introdotti per reazione con clorometiletere,  $\text{ClCH}_2\text{-O-CH}_3$ , usando  $\text{ZnCl}_2$  come catalizzatore.



La resina clorometilica ha quindi la seguente struttura:

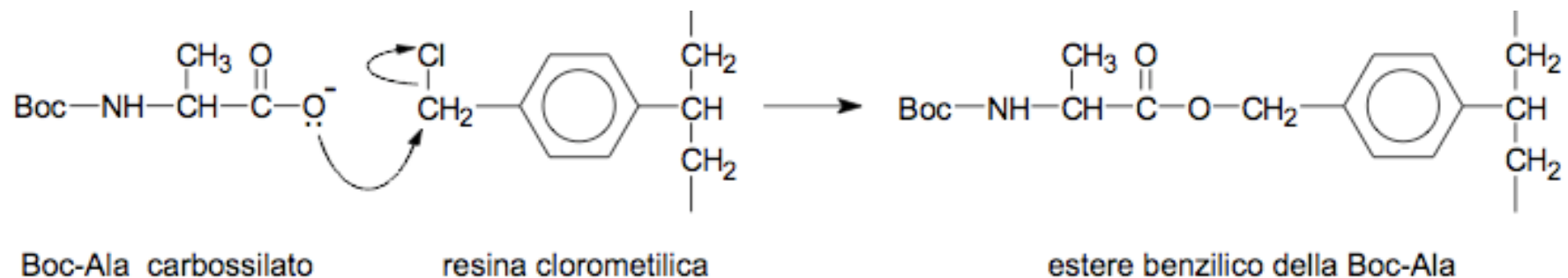


# Sintesi peptidica

## Attacco del primo aminoacido alla resina

Es di sintesi del tetrapeptide Leu-Ser-Glu-Ala.

Il primo passo della sintesi consiste nel legare covalentemente la Boc-alanina, l'amminoacido C-terminale, alla resina come estere benzilico. La sintesi dell'estere avviene in un modo poco usuale: il carbossilato è il nucleofilo che attacca con una reazione SN2 il cloruro di benzile, una reazione possibile solo con cloruri molto reattivi. Si fa reagire la Boc-Ala-OH con trietilammina, TEA, si ottiene il carbossilato di trietilammonio. Questo sale viene fatto reagire con la resina clorometilica in acetato di etile a 25 °C per 24 ore.



# Sintesi peptidica

## Leu-Ser-Glu-Ala.

Dopo l'attacco della **Boc-alanina** alla resina (1), la sintesi del tetrapeptide Leu-Ser-Glu-Ala prosegue con un ciclo di reazioni che viene ripetuto per introdurre ogni aminoacido successivo al primo.

Il ciclo consiste di 4 reazioni: (2) Sblocco del Boc TFA / DCM 1:1

(3) Neutralizzazione del gruppo amminico TEA / DCM 1:9

(4) Aggancio del nuovo Boc-AA anidride simmetrica del Boc-AA

(6) Acetilazione dei gruppi amminici non reagiti anidride acetica / TEA / DCM

La **serina** viene introdotta come Boc-Ser(Bzl)-OH con l'**ossidrile in catena laterale** protetto come **etere benzilico**.

L'**acido glutammico** viene introdotto come Boc-Glu(OBzl)-OH con il **carbossile in catena laterale protetto** come **estere benzilico**.

Dopo l'introduzione dell'ultimo aminoacido, la **leucina**, si eseguono le due reazioni finali.

Per prima cosa si deve

(6) **sbloccare il Boc**, poi si procede al **distacco del peptide dalla resina**

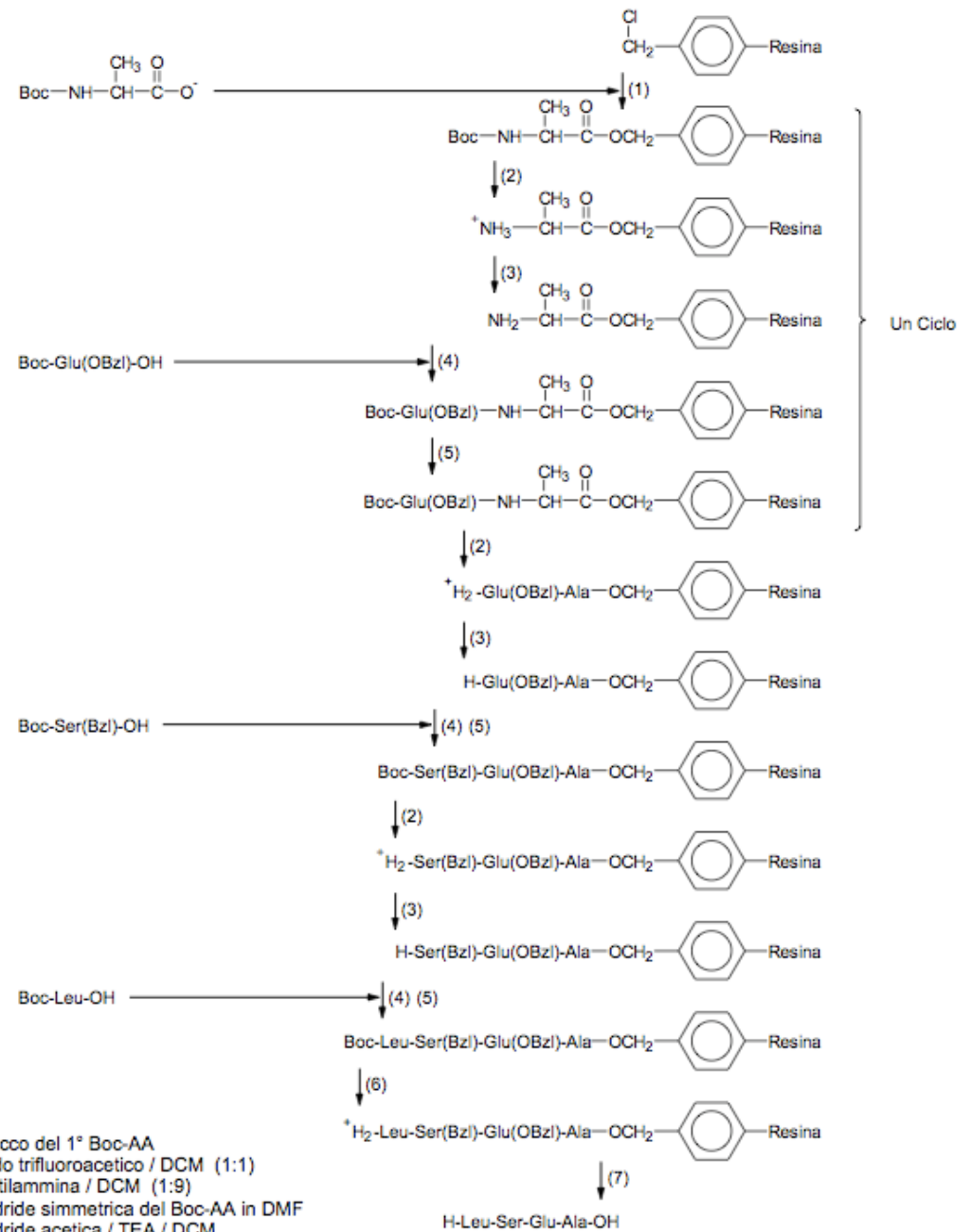
(7) con HF liquido a 0°C in presenza di anisolo.

**In queste condizioni si staccano anche i protettori in catena laterale.**



# Sintesi peptidica

## Leu-Ser-Glu-Ala.



- (1) Attacco del 1° Boc-AA
- (2) Acido trifluoroacetico / DCM (1:1)
- (3) Trietilamina / DCM (1:9)
- (4) Anidride simmetrica del Boc-AA in DMF
- (5) Anidride acetica / TEA / DCM
- (6) Acido trifluoroacetico / DCM (1:1)
- (7) HF liquido 0 °C / Anisolo

# Sintesi peptidica

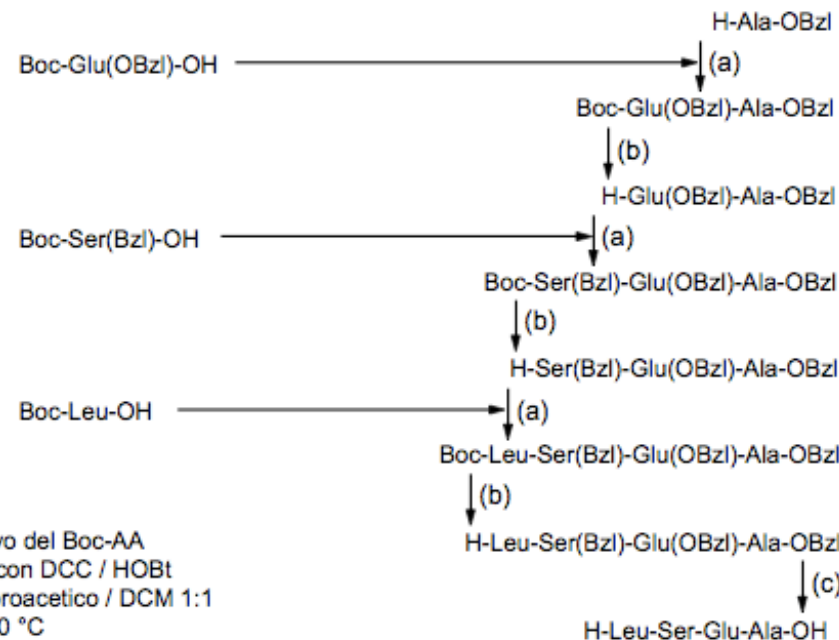
## Leu-Ser-Glu-Ala.

### Sintesi di peptidi in soluzione

La sintesi di peptidi tradizionale in soluzione può essere eseguita con la tecnica di allungamento graduale o con quella di condensazione di segmenti a seconda dei casi. Nella sintesi per allungamento graduale le operazioni necessarie sono le seguenti:

- Aggancio del nuovo Boc-AA
- Sblocco del Boc
- Sblocco del protettore C-terminale e di quelli in catena laterale.

La sintesi comincia dall'AA C-terminale che viene introdotto come H-Ala-OBzl con il carbossile protetto come estere benzilico. Ogni successivo AA viene introdotto con il gruppo amminico protetto come Boc-AA-OH. Il carbossile in catena laterale dell'acido glutammico viene protetto come estere benzilico. L'ossidrilico in catena laterale della serina viene protetto come etere benzilico, .



Le reazioni (a) di aggancio vengono realizzate introducendo il Boc-AA come estere attivo preparato a parte con DCC e HOBt.

Le reazioni (b) di sblocco del Boc sono condotte con TFA / DCM 1:1.

La reazione finale (c) di sblocco del protettore sul carbossile terminale e dei protettori in catena laterale è condotta con HF liquido a 0°C.

# Sintesi peptidica

## Sintesi di peptidi in soluzione

### Commenti alla sintesi in soluzione:

E' necessaria circa 1 ora per la reazione di aggancio e 15 minuti per lo sblocco del Boc.

Da questi dati potrebbe sembrare possibile introdurre in una catena peptidica molti amminoacidi al giorno, ma in realtà i tempi richiesti sono di circa **una settimana per amminoacido!**

Questo dipende non tanto dalle due reazioni citate, ma dalle **operazioni di purificazione** a cui è necessario sottoporre il peptide per isolare i prodotti di reazione dai reagenti in eccesso.

Queste operazioni sono piuttosto lunghe e consistono principalmente in estrazioni con solvente e in cristallizzazioni.

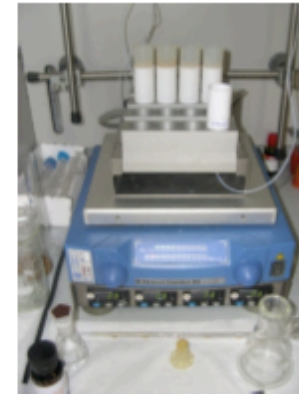
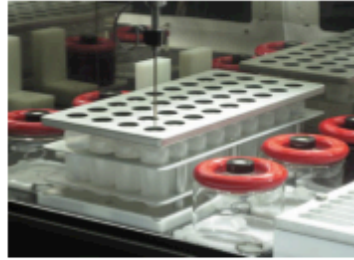
Inoltre spesso la sintesi è rallentata da difficoltà operative dovute alla **scarsa solubilità** che hanno i peptidi completamente protetti e quindi apolari.

La sintesi in soluzione di peptidi con più di 15 AA si presenta spesso lunga e difficile.

D'altra parte, però, fornisce peptidi di grande purezza dato che ad ogni passaggio è possibile eliminare le molecole che non hanno reagito correttamente.

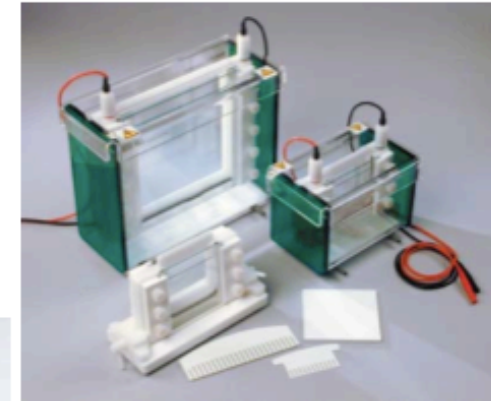
## Sintesi e Purificazione

- ✘ Automatic batch multiple solid-phase synthesizer
- ✘ Semi-automatic continuous-flow peptide synthesizer
- ✘ Manual batch solid-phase synthesizer with heating control
- ✘ Microwave unit
- ✘ Analytical HPLC units
- ✘ Semi-preparative HPLC units



## Caratterizzazione molecolare

- ✗ GC (*Focus, Thermo*)
- ✗ HPLC
- ✗ LC-MS (*Surveyor, Thermo*)
- ✗ ESI-MS (*LCQ Advantage, Thermo*)
- ✗ APCI-MS (*LCQ Advantage, Thermo*)
- ✗ NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , MAS-NMR)







QToF Waters for nanoLC-MS/MS



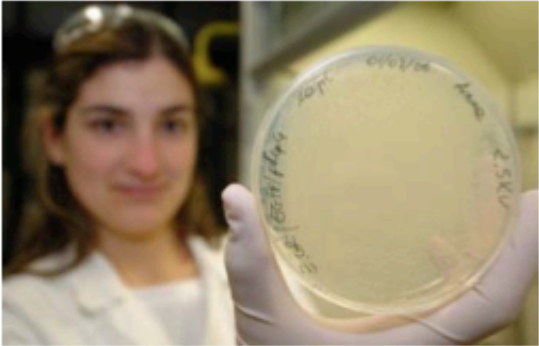
ENTE  
CASSA DI RISPARMIO  
DI FIRENZE





Piattaforma Tecnologica  
di peptidi e proteine

# Caratterizzazione cellulare



**×** *Microscopio Confocale*



**×** *Citofluorimetro*



# Anticorpi monoclonali terapeutici

Monoclonal antibodies registered for therapeutic clinical use					
Generic name	Trade name	Company	Indication	Dose	Route
Muromonab	Orthoclone OKT3	Janssen-Cilag	Renal graft rejection	5 mg per day	Intravenous
Basiliximab	Simulect	Novartis	Renal graft rejection	20 mg direct before and 4 days after transplantation	Intravenous
Daclizumab	Zenapax	Hoffman-la Roche,	Renal graft rejection	1 mg/kg before and 2, 4, 6 and 8 weeks after transplantation	Intravenous
Infliximab	Remicade	Centocor	Rheumatoid arthritis, Crohn's disease	3-10 mg/kg every 4-8 weeks	Intravenous
Rituzimab	Genentech-Roche	Lymphoma*	375 mg/m <sup>2</sup> in four weekly doses	Intravenous	
Trastuzumab	Herceptin	Genentech	Metastatic breast cancer	4 mg/kg initially, followed by 2 mg/kg weekly	Intravenous
Abciximab	Reopro	Lilly	Antiplatelet	0.25 mg/kg initially followed by 0.125 µg/kg per min	Intravenous
Palivizumab	Synagis	Abbott Laboratories	Antiviral†	15 mg/kg	Intravenous

\*Low-grade and follicular non-Hodgkin lymphoma. †Against respiratory syncytial virus.

THE LANCET 335: 735, 2000

# PEPTIDI come PRODOTTI FARMACEUTICI approvati dalla Food & Drug Administration

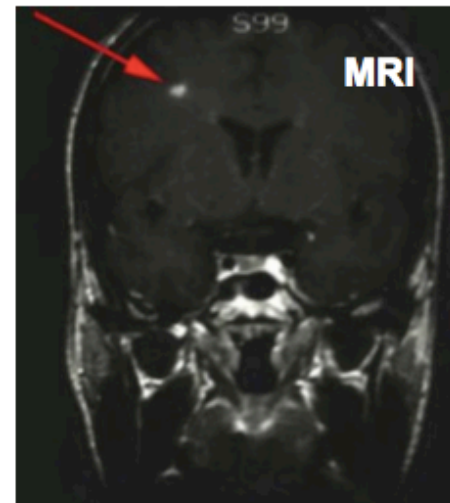
<u>First Generation</u>	<u>Second Generation</u>	<u>New Generation</u>
Oxytocin	Carbetocin	Abarelix
ACTH (1-24) & (1-39)	Terlipressin	Cetrorelix
Vasopressin	Felypressin	Ganirelix
Insulin	Buserelin	Integrilin
Glucagon	Deslorelin	Bivalirudin
Calcitonins	Goserelin	Copaxone
TRH	Histrelin	Techtide P-289
Gonadorelin	Leuprolide	Cubicin
Somatostatin	Nafarelin	Enfuvirtide
GHRH (1-29) & (1-44)	Tryptorelin	Ziconotide
CRF (Human & Ovine)	Lecirelin	Pramlintide
Cyclosporin	Lanreotide	Exenatide
Thymopentin	Octreotide	
Thymosin Alpha-1	Atosiban	
Secretins (Human & Porcine)	Desmopressin	
Parathyroid Hormone (1-34) & (1-84)	Pitressin	
Vasoactive Intestinal Polypeptide	Lypressin	
Brain Natriuretic Peptide	Ornipressin	
Cholecystokinin	ACE Inhibitors	
Tetragastrin	(Enalapril, Lisinopril)	
Pentagastrin	HIV Protease Inhibitors	

# Biomarker

Una qualsiasi misurazione che predica una condizione patologica di un paziente o la risposta ad una terapia e quindi avente un putativo valore diagnostico e/o prognostico

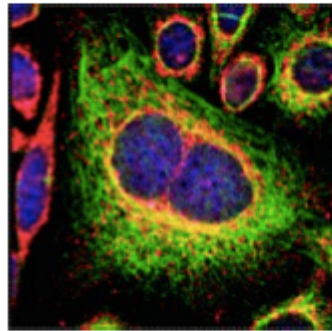


**'Decision-Making Tools'** particolarmente importanti nel processo di validazione di Trattamenti Terapeutici Innovativi e personalizzati





## Disegnare & sviluppare sonde sintetiche per identificare autoanticorpi nel siero di pazienti affetti da malattie autoimmuni



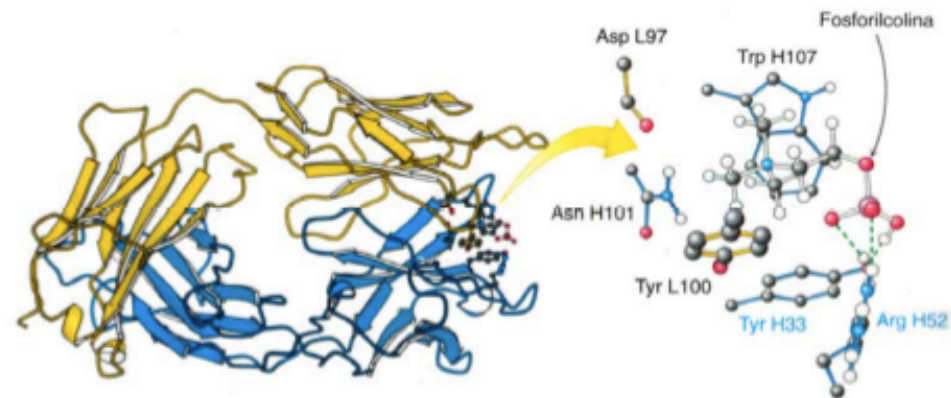
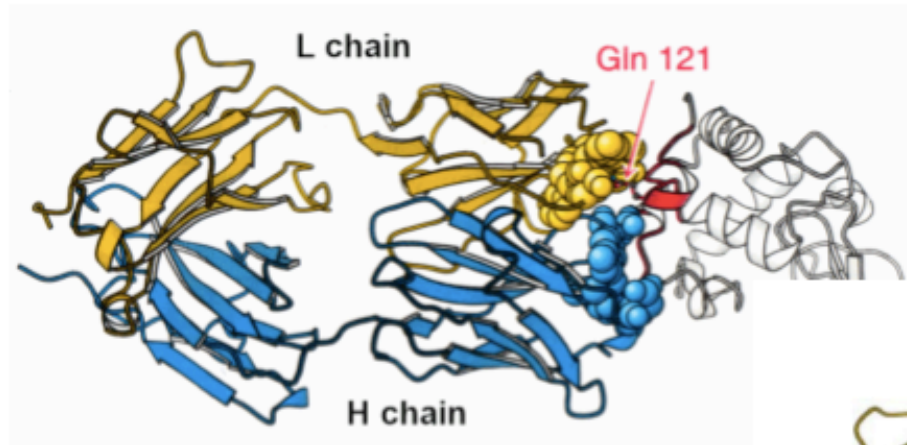
Standardizzazione di test diagnostici/prognostici

→ Per monitorare le malattie

→ Per valutare l'efficacia di trattamenti terapeutici personalizzati e innovativi (alternativa a test sugli animali)

# Caratterizzazione di autoanticorpi nel siero di pazienti come Biomarkers di malattia

Gli autoanticorpi riconoscono peptidi corti negli antigeni proteici



Test basati su peptidi (epitopi lineari o conformazionali)