



**UNIVERSITA DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
XXIV CICLO**

DOTT. SALVATORE DAVIDE DI PUMA

**PROGETTAZIONE SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA
DI LIPOPEPTIDI CONTENENTI CLUSTERS MULTIMERICI
DELL'EPITOPO IMMUNODOMINANTE PDTRP PER
L'IMMUNOTERAPIA
ATTIVA DEL CANCRO**

Tutor:

Prof. Angelo Spadaro

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Ronsisvalle

TRIENNIO 2008 – 2011

INDICE

Ringraziamenti	IV
Abbreviazioni e Acronimi	V
Partecipazione a congressi	VIII
Summary	IX
1. <u>INTRODUZIONE</u>	1
1.1 I Tumori	1
1.2 Un nuovo approccio alla terapia antitumorale: l'immunoterapia attiva	4
1.3 MUCINE	6
1.3.1 Antigeni associati alle mucine	9
1.3.2 Antigeni carboidratici associati alle mucine	11
1.3.3 Epitopo immunodominante PDTRP	15
2. <u>PROGETTO DI RICERCA</u>	18
2.1 Effetto <i>Cluster</i> e impiego dei Calixareni	18
2.2 Progetto di ricerca	25
2.3 MATERIALI E METODI	34
2.3.1 Metodi analitici	34
2.3.2 Reattivi e solventi	36

2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE	37
2.4.1 SINTESI in fase solida del pentapeptide PDTRP	37
2.4.1.1 Condensazione di Fmoc-Arg(Mtr)-OPfp all'H-Pro-2ClTrt- <i>resin</i>	40
2.4.1.2 Condensazione di Fmoc-Thr(OtBu)-OH a Arg-Pro-2ClTrt- <i>resin</i>	41
2.4.1.3 Condensazione di Fmoc-Asp(OtBu)-OPfp a Thr-Arg-Pro 2ClTrt- <i>resin</i>	42
2.4.1.4 Condensazione di Fmoc-Pro-OPfp a Asp-Thr-Arg-Pro-2ClTrt- <i>resin</i>	44
2.4.1.5 Distacco del pentapeptide PDTRP dalla 2Cl-Trt- <i>resin</i>	45
2.4.2 SINTESI di Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]-P₃CS	47
2.4.2.1 Tri-propilazione del <i>p</i> -terz-butilcalix[4]arene	49
2.4.2.2 Alchilazione della restante funzione fenolica con BrCH ₂ COOEt	50
2.4.2.3 Ipso-nitrazione del composto ottenuto e successiva riduzione	51
2.4.2.4 <i>Coupling</i> tra gli ammino gruppi dello <i>scaffold</i> con altrettante unità di glicina <i>N</i> -protetta	52
2.4.2.5 Idrolisi alcalina del legame estereo e aggancio dell'immunoadiuvante P ₃ CS	53
2.4.2.6 Deprotezione dei residui di glicina	55
2.4.2.7 <i>Coupling</i> tra i gruppi -NH ₂ delle glicine ed il carbossile terminale libero del peptide PDTRP, protetto nelle altre funzioni reattive	56
2.4.2.8 Deprotezione e purificazione del derivato peptidico calixarenico sintetizzato	58
2.4.3 SINTESI di Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]-P₃CS	61
2.4.3.1 Epta- <i>p</i> -bromobenzoilazione del <i>p</i> -terz-butilcalix[8]arene	63
2.4.3.2 Alchilazione della restante funzione fenolica con BrCH ₂ COOEt	64
2.4.3.3 Idrolisi basica e trattamento con ioduro di propile	64
2.4.3.4 Ipso-nitrazione del composto ottenuto e successiva riduzione	65
2.4.3.5 <i>Coupling</i> tra gli ammino gruppi dello <i>scaffold</i> con altrettante unità di glicina <i>N</i> -protetta	67

2.4.3.6	Idrolisi alcalina del legame estereo e aggancio dell'immunoadiuvante P ₃ CS	68
2.4.3.7	Deprotezione dei residui di glicina	71
2.4.3.8	<i>Coupling</i> tra i gruppi -NH ₂ delle glicine ed il carbossile terminale libero del peptide PDTRP protetto nelle altre funzioni reattive	72
2.4.3.9	Deprotezione e purificazione del derivato peptidico calixarenico sintetizzato	74
2.5	VALUTAZIONE BIOLOGICA	78
3.	<u>CONCLUSIONI</u>	81
4.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	82

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Giuseppe Ronsisvalle, in qualità di coordinatore del Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche dell'Università di Catania.

Ringrazio il mio tutor, insegnante e amico, Prof. Angelo Spadaro, per gli insegnamenti che con costanza mi ha impartito e per avermi trasmesso la passione per questa disciplina sin dai tempi del mio internato per la tesi di laurea.

Ringrazio la Prof.ssa Maria S. Pappalardo, per la sua disponibilità e gentilezza, e per avermi sostenuto in questi 3 anni.

Ringrazio il Prof. Ennio Bousquet,, uomo di grande umanità e simpatia, che mi ha permesso di cominciare questo cammino iniziato con la tesi sperimentale di laurea.

Ringrazio la Dott.ssa Corrada Geraci, dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Catania, per avermi accolto nel suo laboratorio.

Ringrazio tutti i colleghi del Dottorato di Ricerca, con i quali ho condiviso questi tre anni di dottorato.

Un immenso ringraziamento va ai miei genitori, che mi hanno costantemente sostenuto in tutti i modi possibili durante tutta la mia vita. Devo tutto ciò essenzialmente a loro.

Voglio ringraziare, Giulia, la mia fidanzata per l'affetto e l'appoggio che mi ha sempre dato, soprattutto nei momenti più difficili.

Abbreviazioni e Acronimi

AA	Aminoacido
AcCl	Cloruro di Acetile
AcEt	Acetato di Etile
AcOH	Acido Acetico
Arg	Arginina
Asp	Acido Aspartico
CH₂Cl₂	Diclorometano
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DCI	Dicicloesilcarbodiimmide
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIPEA	N,N-Diisopropiletilammina
DMF	Dimetilformammide
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanolo
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
HBTU	O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-esafluorofosfato
HCl	Acido Cloridrico
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HOBt	Idrossibenzotriazolo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
KI	Ioduro di Potassio
KOH	Idrossido di Potassio
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Light
MeOH	Metanolo
Mtr	4-Metossi-2,3,6-trimetilfenil-sulfonil
N₂	Azoto
NaH	Idruro di Sodio
NMR	Risonanza Magnetica Nucleare
OPfp	<i>O</i> -Pentafluorofenil
P₃CS	Tripalmitoil-S-glicerilcisteinilserina
Pam	Polyacrylamide <i>o</i> Poly(2-propenamide)
PDTRP	L-Prolil-L-Aspartil-L-Treonil-L-Arginil-L-Prolina
Pro	Prolina
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Rf	Fattore di ritenzione
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
<i>t</i>-Bu	Terz-Butil
TFA	Acido Trifluoroacetico
TFE	Trifluoroetanolo
TIS	Triisopropilsilano
TLC	Thin Layer Chromatography

TNBS	Acido Trinitro-Benzensolfonico
Tre	Treonina
Trt	Tritile

Risultati preliminari di questa ricerca sono stati presentati ai seguenti meetings:

- **Di Puma S. D.**, Pappalardo M., Geraci C., Ronsisvalle G., Spadaro A. DESIGN, SYNTHESIS AND IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF LIPOPEPTIDES CONTAINING MULTIMERIC CLUSTERS OF PDTRP ANTIGEN FOR ACTIVE IMMUNOTHERAPY OF CANCER. Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Catania, Italy, 30 Giugno-2 Luglio 2011.
- **Di Puma S. D.** DESIGN, SYNTHESIS AND IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF LIPOPEPTIDES CONTAINING MULTIMERIC CLUSTERS OF PDTRP ANTIGEN FOR ACTIVE IMMUNOTHERAPY OF CANCER. XXXI Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E. Duranti” National Seminar for PhD Students, Urbino, Italy, 3-8 Luglio 2011.

Summary

During carcinogenesis **MUC-1** cell-surface carbohydrates undergo incomplete glycosylation that causes exposure of highly immunodominant peptide PDTRP contained in the tandem repeat sequence of mucin core (GVTSA**PDTRP**APGSTAPPAH). The incomplete glycosylation results also in the exposure of the normally cryptic carbohydrate antigens like Tn (**GalNAc-*O*-Ser/Thr**). In a previous work, we synthesized a macromolecular construct containing four unit of Tn antigen clustered onto a calix[4]arene scaffold bearing an immunoadjuvant moiety (**P₃CS**). This construct gave in mice higher immune response when compared to monovalent reference compound, and the outlined data clearly showed a so called "cluster effect".

The aim of this project was to synthesize multimeric lipopeptide constructs containing clusters of the PDTRP antigen assembled on calixarene scaffolds together with the immunoadjuvant tripalmitoyl-S-glyceryl-Cys-Ser (P₃CS). The purpose was to investigate the role of the "cluster effect" in amplifying the antibody production with respect to a simple concentration increase of antigen units. In addition, the role of the scaffold flexibility was also examined using the relatively rigid tetrameric calix[4]arene and the more flexible calix[8]arene as platforms to realize the constructs.

The PDTRP sequence was assembled by solid-phase peptide synthesis using Fmoc-protected amino acids in combination with Barlos's resin. The protected PDTRP-COOH was coupled via glycine spacer to calix[4]arene and calix[8]arene derivatives containing, at the upper rim, 4 and 8 glycine unit respectively, and, at the lower rim, 1 unit of P₃CS. These calixarenes constructs were synthesized as previously reported in collaboration with CNR-ICB of Catania (Dr C. Geraci). The final constructs were characterized by ¹H-NMR and MALDI-TOF. Five groups of six mice were immunized two times, at 1-week intervals, by intraperitoneal

injections of the two synthesized constructs (0.030 $\mu\text{m}/\text{mouse}$) or the reference compound, Mono-PDTRP- P_3CS , administered at three concentration levels (0.030, 0.120 and 0.240 $\mu\text{m}/\text{mouse}$). After 21 days from the first immunization antibodies specific to PDTRP antigen in sera were detected and quantified by end-point dilution ELISA.

Mice immunized with the synthesized multimeric constructs showed a substantial and significant production of antibodies. For **Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]arene- P_3CS** and **Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]- P_3CS** a significant ($p < 0.05$) increase of the end-point titers of 32- and 8-fold were measured with respect to the mice group immunized using equimolar level of the reference monovalent construct. Even when the concentration of monovalent construct was increased 4- and 8-fold, in order to compare solutions with the same number of PDTRP antigen units, the reactivity elicited by octameric and tetrameric constructs were significantly higher ($p < 0.05$) with a 8- and 4-fold increase in the end-point titer values. The immunogenic response induced by the Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]- P_3CS was significantly higher ($p < 0.05$) with respect to the tetrameric construct with an increase of 4-fold in the antibodies production.

Novel, well-defined synthetic multivalent lipopeptide vaccine candidates have been designed and synthesized. All the multimeric constructs are able to induce specific PDTRP antibodies production in mice. The most active derivative is the Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]- P_3CS that ensure an activity double with respect to the tetrameric construct. In addition, the "cluster effect" observed is more evident for the octameric construct that is more flexible with respect to the calix[4]arene construct. The increased conformational flexibility could allow a better arrangement of PDTRP antigens array on the calix[8]arene scaffold, ensuring a good mimicking of the natural motif encountered in vivo in the cancer cells. This reveals perspectives for potential applications in cancer immunotherapy.

1. INTRODUZIONE

1.1 I Tumori

Il tumore è definito come una nuova formazione tissutale, detta anche neoplasia, dovuta alla crescita e alla proliferazione abnorme di cellule, caratterizzate da un'alterata e/o da una compromessa funzionalità. Quando la crescita cellulare è limitata ad un tessuto di un determinato distretto dell'organismo si è in presenza di tumore benigno; se, in seguito alla loro proliferazione, le cellule neoplastiche assumono la capacità di perdere aderenza con le cellule circostanti, invadere i vasi ematici e linfatici e colonizzare altri tessuti a distanza dove continuare a riprodursi allora le cellule possono dare metastasi e quindi si è in presenza di tumore maligno. Le mutazioni genetiche che inducono la trasformazione neoplastica sono correlate nel 90% dei casi allo stile di vita e/o a fattori ambientali i quali sono da ricercarsi nel consumo di alcol e di tabacco, nella modificazione del regime alimentare come l'aumento dell'assunzione di grassi e la diminuzione dell'assunzione di fibre (*carcinoma coloretale*) e la carenza di vitamina A. Una delle cause di cancro meglio documentate sono le radiazioni ionizzanti, sia da sorgenti naturali sia da esposizione professionale. La componente ultravioletta della luce del sole è responsabile della maggior parte dei tumori cutanei, come carcinomi a cellule squamose, basaliomi e melanomi. Il carcinoma della mammella, dell'ovaio, dell'utero e della prostata sono tumori ormonocorrelati. Alcuni agenti infettivi come il virus di Epstein-Barr (*Linfoma di Burkitt*), il virus delle epatiti B e C (*Epatocarcinoma*), Herpes Simplex II e Papillomavirus (*Carcinoma della cervice uterina*) rappresentano i principali esempi di neoplasie a eziologia infettiva.

Oggi, grazie agli approcci terapeutici antitumorali sempre più evoluti e alle moderne tecniche di prevenzione, il tasso di mortalità per cancro si è ridotto sebbene ancora rimanga la seconda causa di morte nei paesi industrializzati dopo le malattie cardiovascolari: 1 persona su 3 si ammala di cancro e 1 su 5 ne muore (si tenga conto che queste informazioni provengono da dati disponibili solo nei paesi più evoluti, nei quali sono attivi i meccanismi di sorveglianza epidemiologica e i registri di popolazione in cui vengono continuamente riportati i nuovi casi d'incidenza delle malattie). La mortalità complessiva negli uomini è circa 1,5 volte quella delle donne e il cancro del polmone, della mammella e del colon rappresentano da soli il 50% della mortalità per tumore, seguiti da quello della prostata, del pancreas e dell'ovaio.

La possibilità di sconfiggere il cancro in via definitiva non è una chimera e ciò si realizzerà con il miglioramento e la sinergia di quattro fattori: diagnosi precoce, screening di massa, interventi di prevenzione e terapie meno invasive. L'obiettivo principale della diagnosi precoce è quello di diagnosticare la malattia quando le probabilità di guarigione sono maggiori, ma è destinata al singolo paziente sintomatico o asintomatico che si rivolge spontaneamente al medico; lo screening di massa è un intervento di sanità pubblica rivolto a una ben definita popolazione asintomatica con caratteristiche di rischio e deve tener conto della riduzione dei costi e dell'aumento dell'attendibilità dei test; le terapie meno invasive hanno lo scopo di risolvere i problemi legati all'assunzione dei farmaci chemioterapici citotossici la cui azione è diretta al danneggiamento del DNA o all'inibizione della replicazione cellulare, processi entrambi in grado di causare la morte delle cellule tumorali ma anche di quelle normali in fase di replicazione, fenomeno dovuto proprio alla loro aspecificità. L'assenza di specificità d'azione dei farmaci chemioterapici si manifesta con mielosoppressione, mucosite, alopecia, astenia e alterazioni delle funzioni cardiache, neurologiche, renali e gastroenteriche.

Recentemente la ricerca di farmaci antitumorali ha compiuto passi da gigante e ciò ha reso possibile la disponibilità di una vasta gamma di nuove strategie terapeutiche basate sull'impiego di agenti ad azione specifica nei confronti delle cellule tumorali come ad esempio anticorpi monoclonali, vaccini antitumorali, inibitori delle proteine *tirosin-kinasi*, inibitori delle *metalloproteinasi* della matrice extracellulare, inibitori della via di attivazione dell'oncogene ras.

1.2 Un nuovo approccio nella terapia antitumorale: l'immunoterapia attiva

La terapia antitumorale dipende da diversi fattori: il tipo di tumore, lo stato di avanzamento del tumore e la sua localizzazione. Esistono diverse tecniche per curare il cancro che comprendono la chirurgia, la terapia con radiazioni e la terapia con farmaci. Quest'ultima si basa su l'utilizzo di quattro categorie di farmaci: farmaci citotossici (*chemioterapia*), ormoni e antiormoni (*terapia endocrina*), farmaci a bersaglio molecolare (*target therapy*) e farmaci biologici e farmaci immunoterapici (*immunoterapia*).

Negli ultimi 50 anni si sono registrati notevoli miglioramenti nella terapia del cancro grazie agli sforzi della ricerca scientifica che, fornendo dettagliate spiegazioni riguardo l'instaurarsi e l'evoluzione della malattia, ha contribuito a perfezionare le tecniche di trattamento e ad aumentare le aspettative di vita dei pazienti affetti da tumore. Molti casi clinici sono stati superati con successo proprio grazie alla diagnosi precoce e all'impiego dei chemioterapici, come ad esempio nel caso del *cis*-diamino-dicloro-platino (*cisplatino*), farmaco impiegato nel trattamento del tumore ai testicoli, che ha aumentato la guarigione, completa o parziale, dell'85% e il tasso di sopravvivenza a 5 anni del 90%. L'impiego di farmaci citotossici, come detto, produce danni anche alle cellule normali quindi è sempre più necessario l'uso di nuove terapie prive di effetti collaterali tossici.

E' stato ampiamente dimostrato che il sistema immunitario gioca un ruolo fondamentale nella distruzione selettiva di cellule tumorali e, poiché la sua azione non è sempre efficace e risolutiva nello sconfiggere il tumore, l'utilizzo di agenti immunoterapici in grado di stimolare ed amplificare la risposta immunitaria specifica ha un grande potenziale terapeutico rispetto alle terapie tradizionali.

Nell'ambito delle terapie immunitarie un approccio molto promettente è l'immunoterapia attiva, che si basa su l'impiego di nuovi vaccini capaci di stimolare una risposta immunitaria specifica. Inoltre negli ultimi anni è stato scoperto che le cellule del cancro esprimono sulla loro superficie, insieme al sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), strutture antigeniche specifiche in grado di stimolare una risposta immunitaria specifica.¹⁻² La scoperta di antigeni associati a tumori, dapprima dimostrata nel melanoma ed in seguito in altri tipi di cancro, ha aperto la strada ad un nuovo approccio nella terapia antitumorale. Infatti vaccini basati su antigeni antitumorali permetterebbero la produzione di una risposta anticorpale e cellulo-mediata nei confronti delle cellule tumorali riconosciute come *non-self*.³

1.3 LE MUCINE

Le mucine sono un particolare gruppo di macromolecole che presentano la caratteristica comune di essere espresse dai tessuti di origine epiteliale. A esse sono attribuibili le proprietà delle secrezioni mucose del tratto orale, respiratorio, gastrointestinale e genitale degli animali superiori. Per questo motivo funzionano come colloidali protettivi, oltre che come lubrificanti delle mucose del tratto gastrointestinale e del bolo alimentare. Inoltre proteggono le mucose dall'attacco degli enzimi digestivi, delle secrezioni acide e di microrganismi.⁴⁻⁵⁻⁶

Da un punto di vista strutturale le mucine sono glicoproteine ad alto peso molecolare di tipo *O-linked*, costituite da un *core* proteico completamente ricoperto da catene oligosaccaridiche complesse ed altamente ramificate, che si dipartono radialmente da esso (figura 1).

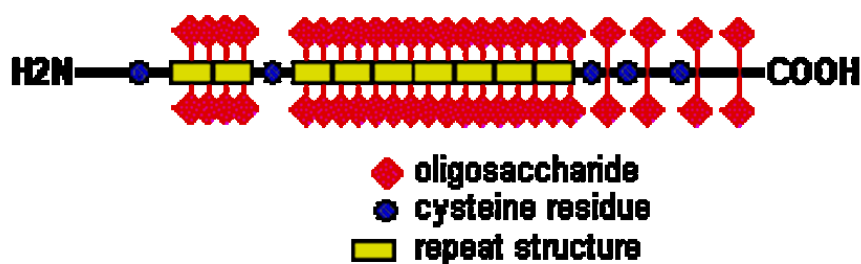


Figura 1. Rappresentazione di un monomero di mucina.

La distribuzione delle catene oligosaccaridiche su tutta la sequenza del *core* proteico, da un punto di vista quali-quantitativo, non è uniforme, infatti tali catene si organizzano a formare dei domini, detti *clusters*⁷ (figura 2).



Figura 2. Clusters saccaridici della mucina.

Nell'uomo sono stati scoperti diversi tipi di mucine epiteliali, indicati, in base all'ordine di scoperta, con la sigla **MUC-** accompagnata da un numero progressivo; in particolare ne sono state identificate e studiate nove (**MUC-1 – MUC-9**).⁸

MUC-1 è la più studiata tra le mucine, in quanto è espressa abbondantemente in diversi processi degenerativi di tipo tumorale, come ad esempio il cancro al seno, al pancreas, al polmone, etc.⁹

Il grado di glicosilazione ha un ruolo molto importante nella sopravvivenza della cellula. Infatti nelle cellule normali, il *core* proteico è praticamente inaccessibile per la presenza di un ampio strato di strutture oligosaccaridiche; invece, nelle cellule tumorali maligne, poiché

la sintesi delle catene oligosaccaridiche è alterata, si avranno sistemi di glicosilazione alterati sia nella misura che nella distribuzione (figura 3).

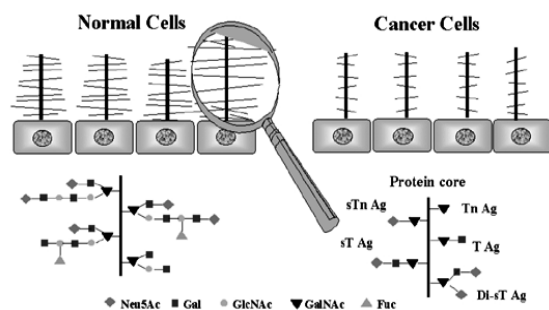


Figura 3. Pattern di glicosilazione in cellule normali e in cellule tumorali.

1.3.1 Antigeni associati alle Mucine

Le mucine sono le molecole più polimorfiche prodotte dagli organismi eucarioti, anche più delle immunoglobuline e dei recettori delle cellule T. Ciò è dovuto alla presenza in esse di centinaia di siti di *O*-glicosilazione, che possono essere estesi e modificati in maniera unica. Le mucine presenti sulle cellule tumorali rappresentano una versione incompleta e scarsamente glicosilata delle mucine espresse dalle cellule normali.¹⁰

Quanto detto è determinante nella formazione di due possibili strutture antigeniche:

- a. la catena saccaridica troncata;
- b. regioni del *core* proteico esposte all'esterno.

Entrambi i target possono essere riconosciuti come *non-self* dal sistema immunitario, stimolando così una risposta immunitaria specifica.

La maggior parte delle catene carboidratiche presenti sulle mucine sono di tipo “*O*-linked” e sono legate a MUC-1 attraverso la formazione di un legame covalente tra una molecola di N-acetilgalattosammina e l'atomo di ossigeno della Ser o della Thr¹¹ (*O*-glicosidi).

Il *core* proteico di MUC-1 è suddiviso in tre distinte regioni:

- una regione intracellulare costituito da 72 aminoacidi, che presenta l'estremità N-terminale e che si estende nel citoplasma;
- una regione transmembrana costituito da 31 aminoacidi, che essendo altamente idrofobico permette l'ancoraggio della mucina alla membrana lipidica;
- una regione extracellulare costituito da 1000-2200 aminoacidi, in cui è presente un dominio altamente glicosilato che subisce spesso la glicosilazione incompleta tipica delle cellule tumorali.

Inoltre MUC-1, assumendo una conformazione rigida tipo *rod-like* ed estendendosi ad una grande distanza (200-500 nm) dalla superficie della membrana cellulare, potrebbe rappresentare il primo e forse il più importante punto di contatto delle cellule tumorali con le cellule del sistema immunitario (figura 4). MUC-1 ha un ruolo altresì importante nella crescita del tumore e nella formazione delle metastasi, poiché è in grado di destabilizzare i meccanismi di adesione tra cellula e cellula permettendo, così, alle cellule neoplastiche di migrare e formare tumori secondari; inoltre si è dimostrato essere capace di sopprimere le funzioni immunitarie.²

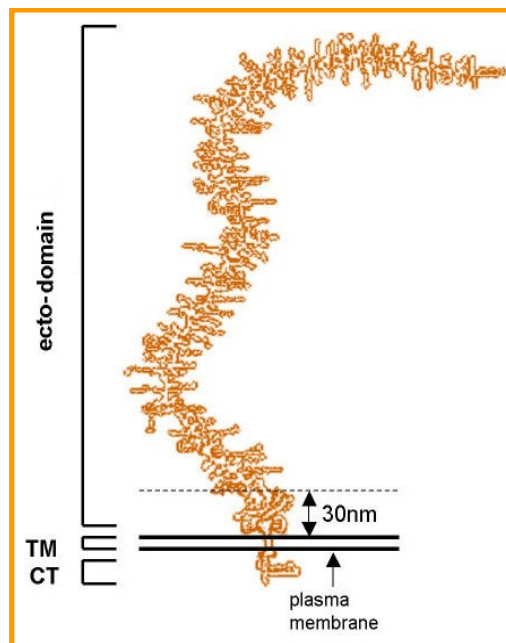


Figura 4. Organizzazione cellulare del *core* proteico nella MUC-1.

1.3.2 Antigeni carboidratici associati alla MUC-1

Le catene oligosaccaridiche tronche della MUC-1 esprimono strutture antigeniche carboidratiche, che originano, come detto, da una scarsa glicosilazione, tipica delle mucine tumorali. Ciò è dovuto alla down-regulation delle glicosaminiltransferasi ed alla over-expression delle sialosiltransferasi. Tra gli antigeni carboidratici (figura 5), espressi dalla MUC-1, è doveroso menzionare l'antigene T ($\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc-Thr/Ser}$), scoperto da Thomsen e Friedenreich, l'antigene Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) e il corrispondente sialosilato, l'antigene STn ($\text{NeuAc}\alpha 2\rightarrow\text{GalNAc}\alpha 1\rightarrow\text{O-Thr/Ser}$).¹²

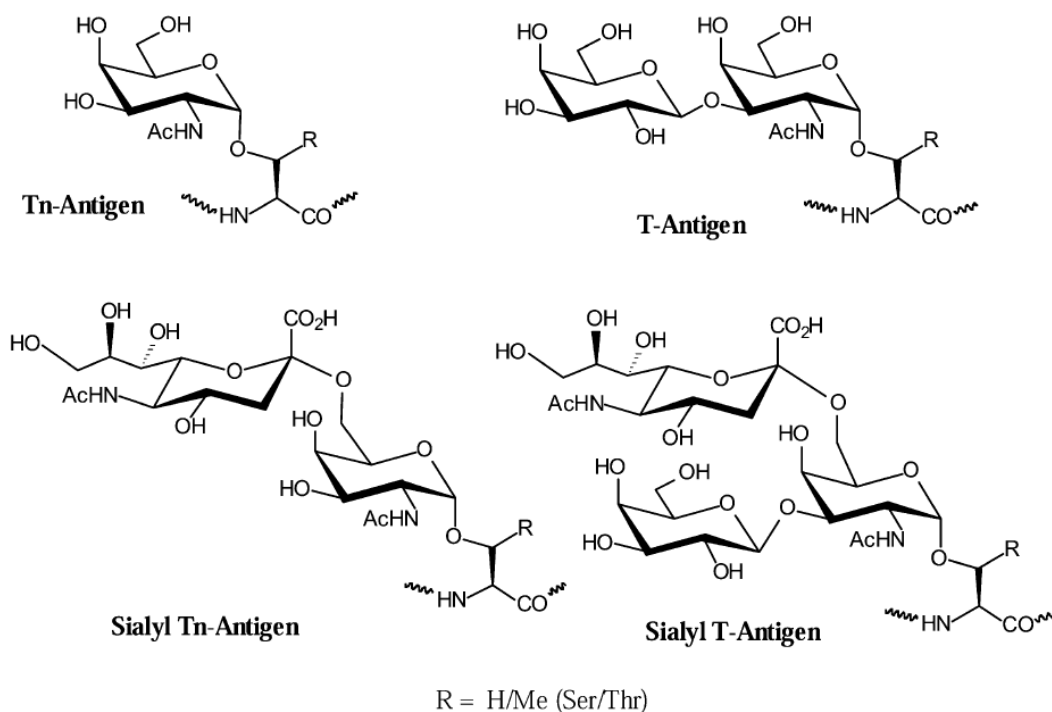


Figura 5. Antigeni carboidratici associati alla MUC-1.

Tali antigeni, come detto, sono praticamente assenti nelle cellule normali, in quanto sono criptici per l'ulteriore allungamento che porta alla formazione di oligosaccaridi complessi. Nelle cellule tumorali, a causa del blocco della sintesi delle catene carboidrati che, tali antigeni risultano esposti sulla superficie cellulare. L'identificazione di tali antigeni è stata effettuata mediante anticorpi monoclonali specifici. Il determinante Tn (α -D-GalNAc-Ser/Thr), la cui caratterizzazione è stata effettuata attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali (mAbs)¹³⁻¹⁴, come ad esempio MLS128 e di lectine¹⁵⁻¹⁶, rappresenta la struttura chimica più semplice degli antigeni α -O-linked. Questo antigene fornisce un potenziale target terapeutico, in quanto è largamente espresso in una grande varietà di adenocarcinomi (tumore gastrointestinale, del polmone, della mammella, dell'ovaio, melanoma etc)¹⁷⁻¹⁸, mostrando una correlazione diretta tra la sua densità e l'aggressività del carcinoma¹⁹, è coinvolto nelle metastasi tumorali²⁰, può essere riconosciuto dal sistema immunitario come *non-self*²¹⁻²², ed è stato identificato nella glicoproteina gp120 presente nell'envelope di diversi HIV.²³ Nell'ambito dell'immunoterapia attiva antitumorale sono stati sintetizzati da Bousquet et al. vaccini antitumorali monomerici dell'antigene Tn e di suoi glicomimetici (figura 6), che si sono dimostrati attivi sia *in vitro* che *in vivo* (figura 7b).²⁴

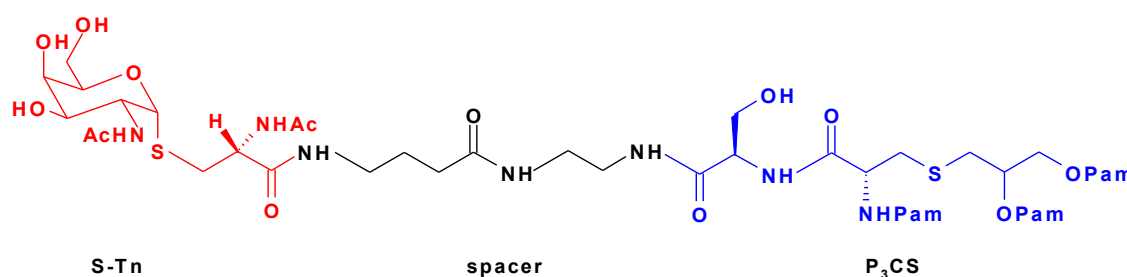


Figura 6. Vaccino monometrico Tn S-glicosidico.

Il vaccino P₃CS-S-Tn, riportato in figura 6, è costituito da un analogo tioglicosidico glicomimetico dell'antigene Tn (S-Tn) legato, mediante un opportuno spaziatore, all'immunoadiuvante Tripalmitoil-Cisteinil-Serina (P₃CS), un lipopeptide totalmente sintetico che deriva dalla porzione N-terminale della proteina principale della membrana esterna di *E. Coli*. Questo vaccino si è dimostrato più attivo rispetto a quello assemblato utilizzando l'antigene naturale *o*-glicosidico (figura 7a), per la maggiore stabilità chimica e metabolica dei tioglicosidi. I derivati tioglicosidici, infatti, rispetto ai corrispondenti derivati ossigenati, resistono maggiormente all'idrolisi acida essendo meno basici. Lo ione sulfonio possiede inoltre, una maggiore stabilità rispetto allo ione ossicarbenico e quindi in seguito a protonazione non da rottura idrolitica spontanea. Per quel che riguarda la stabilità metabolica, bisogna ricordare, che il legame alfa-glicosidico presente nell'antigene Tn, tra N-acetilgalattosamina e serina (o treonina), può essere scisso in vivo dalle glicosidasi. La formazione dello ione ossicarbenico è un importante step nell'azione catalitica delle glicosidasi, pertanto la sua mancata formazione determina una riduzione dell'attività enzimatica²⁴.

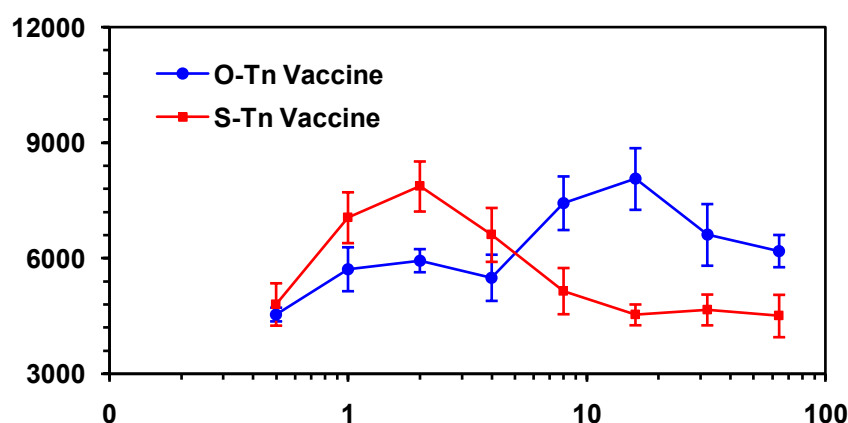


Figura 7a. Curva dose-risposta di incorporazione di ³H-timidina in splenociti murini (Balb/c C57Bl/6) dopo stimolazione con i vaccini P₃CS-Tn e P₃CS-S-Tn.

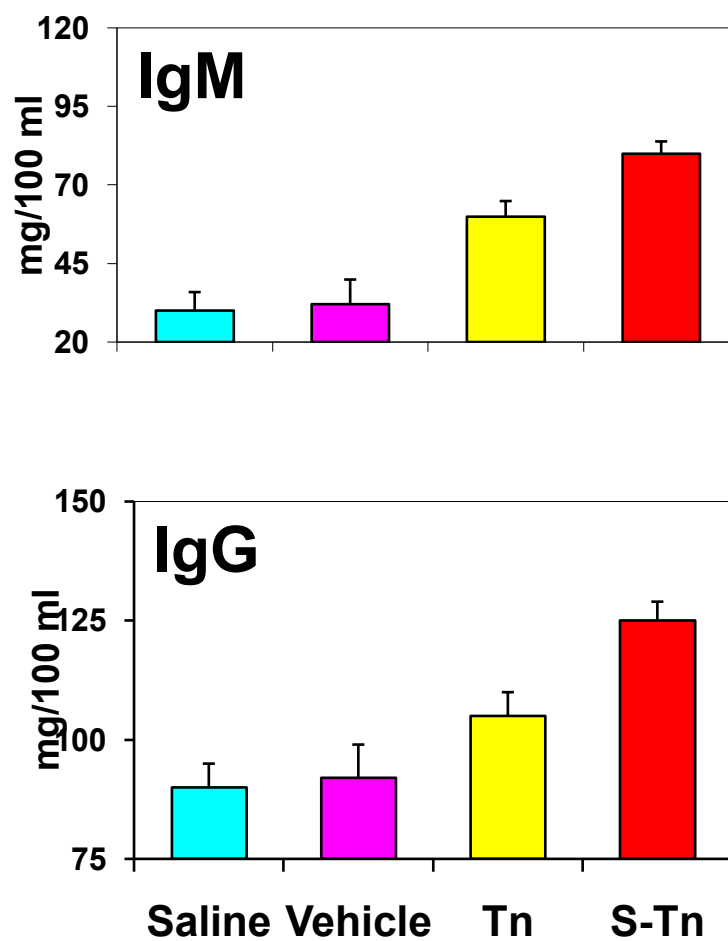


Figura 7b. Livelli plasmatici di IgG e igM in topi balb/c dopo stimolazione con i vaccini P₃CS-Tn e P₃CS-S-Tn. ($p < 0.05$ Fisher test followed by ANOVA).

1.3.3 Epitopo immunodominante PDTRP

La regione extracellulare del *core* proteico della MUC1 è caratterizzato da sequenze ripetute di 20 AA denominate *tandem repeats* costituite da 20 AA, HGVTS**PDTRP**APGSTAPPA, in cui sono presenti cinque possibili siti di *O*-glicosilazione, tre di treonina e due di serina. Il numero di *tandem repeats* varia da individuo a individuo ed è solitamente compreso tra 30 e 120, questo spiega l'elevato polimorfismo delle mucine. Il gene MUC-1 che codifica per la glicoproteina è localizzato sul cromosoma 1Q21-24 e contiene 7 esoni, il secondo dei quali contiene a sua volta l'intera sequenza *tandem repeat*. Ulteriori variazioni sarebbero, inoltre, causate da differenze nella misura e nella distribuzione delle catene carboidratiche.²⁵

All'interno della sequenza dei 20 AA è posta la porzione pentapeptidica **PDTRP (Pro-Asp-Thr-Arg-Pro)** (figura 8). Questa porzione è stata identificata come epitopo capace di generare una risposta immunitaria attiva, sia di tipo umorale sia di tipo cellulare, come è dimostrato dall'attività di numerosi anticorpi monoclonali anti-MUC-1 specifici e dei linfociti T citotossici in grado di interagire con il pentapeptide, in quanto completamente esposto, a causa della ridotta glicosilazione conseguente il processo tumorale.²⁶⁻²⁷⁻²⁸⁻²⁹

Studi conformazionali della sequenza *tandem repeat* hanno evidenziato che essa in soluzione assume una conformazione di tipo β -Turn II e che la porzione PDTRP forma un *loop*-immunodominante esposto verso il solvente e proteso rispetto all'asse longitudinale della mucina²⁸⁻³⁰⁻³¹.

Un altro studio condotto da Dokurno et al.³² mediante studi di diffrazione ai raggi X ha dimostrato che l'anticorpo monoclonale SM3, specifico per il carcinoma al seno, è in grado di legarsi in maniera specifica alla sequenza *tandem repeat*. In particolare, gli autori hanno

scoperto che l'interazione avviene tra la *loop*-immunodominante PDTRP e la cavità CDR-loop dell'anticorpo SM3, che di conseguenza risulta essere specifico per tale sequenza peptidica.

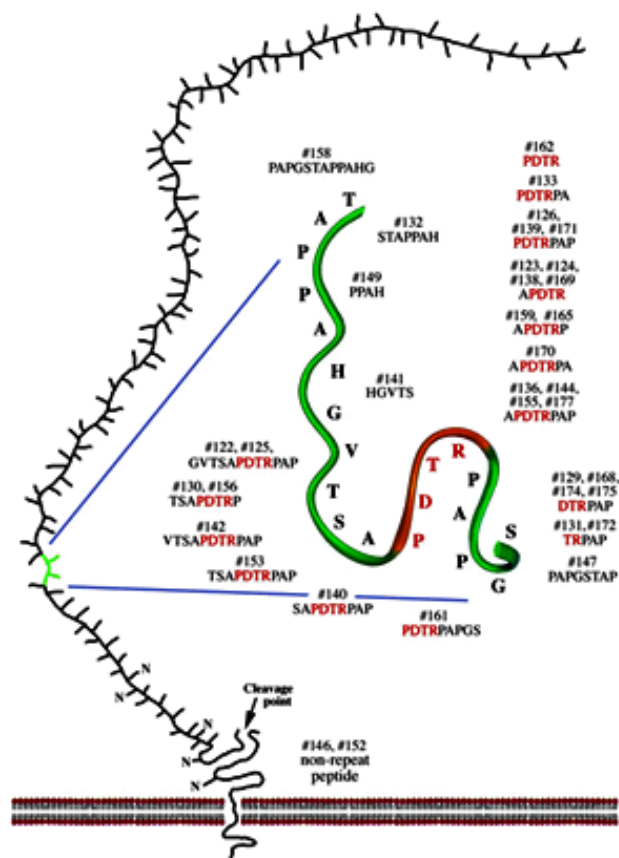


Figura 8. Sequenza aminoacidica identificata come l'epitopo nel dominio extracellulare di MUC-1.

Sulla base di queste evidenze sperimentali è stato sintetizzato nel gruppo di ricerca presso quale ho svolto la mia attività il costrutto multivalente glicolipopeptidico assemblato utilizzando come componenti molecolari: l'antigene carboidratico **Tn**, la sequenza pentapeptidica **PDTRP** e l'immunoadiuvante **P₃CS** (figura 9)³³.

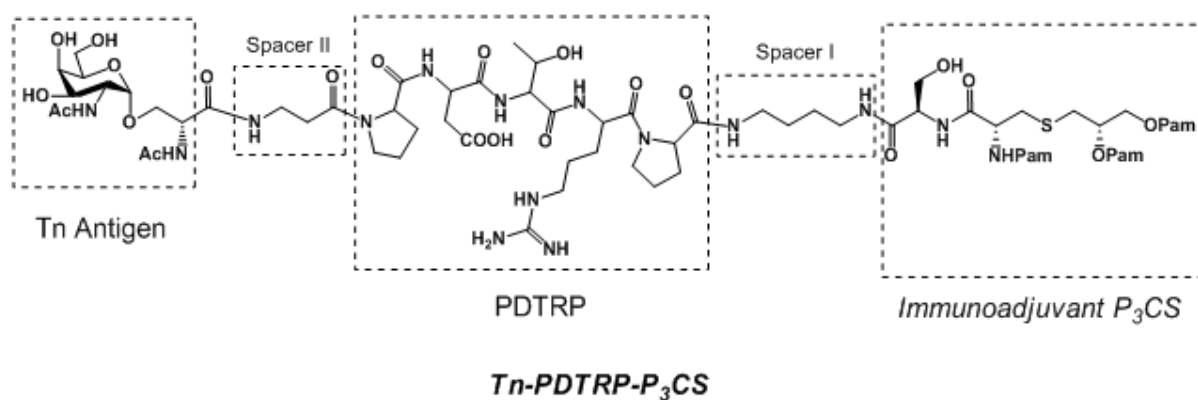


Figura 9. Vaccino monomerico Tn-PDTRP-P₃CS.

Questo costrutto si è dimostrato in grado di determinare la produzione di anticorpi anti-Tn ed anti PDTRP e di prolungare la sopravvivenza in topi in cui era stato impiantato un tumore che esprimeva l'antigene Tn³³.

2. PROGETTO DI RICERCA

2.1 Effetto *Cluster* e impiego dei Calixareni

Diverse evidenze sperimentali ci suggeriscono che il sistema immunitario identifica una struttura più complessa dell'antigene Tn costituita, cioè, da multipli di tali unità. Osinaga³⁴, conducendo studi di affinità di legame tra glicopeptidi sintetici, contenenti 1, 2 o 3 unità Tn, e gli anticorpi monoclonali MLS128 e 83D4, ha dimostrato che occorre almeno un cluster dimerico dell'antigene Tn per poter ottenere delle affinità di legame significative. Infatti, l'autore ha osservato che quando un amminoacido non glicosilato è introdotto tra due unità Tn, sia MLS128 che 83D4 perdono completamente la loro capacità di legarsi all'antigene, e questo dimostra chiaramente che due unità Tn consecutive sono necessarie per il legame con questi mAbs. In particolare si è visto che 83D4 si lega con la stessa affinità sia a cluster dimerici che trimerici dell'antigene Tn, mentre MLS128 mostra una affinità più alta per cluster trimerici. A sostegno di quanto detto, risultati analoghi riguardo MLS128 sono stati ottenuti anche da altri autori³⁵. L'effetto "clustering" sembra non essere ristretto all'epitopo identificato da MLS128 e 83D4. Infatti, Iida³⁶ ha dimostrato che la lectina dei macrofagi umani di tipo C (calcio dipendente) Tn-specifica, che gioca un ruolo importante nel riconoscimento delle cellule tumorali, si lega scarsamente a strutture monometriche dell'antigene Tn e che l'affinità di legame aumenta al crescere del numero di GalNAc presenti. Reddish³⁷ ha dimostrato che alcuni anticorpi riconoscono l'antigene sialosil-Tn come una struttura isolata (mAb 195.3) mentre altri per potersi legare hanno bisogno di clusters (mAb b72.3 e CC49). Nel 1999, Tanaka³⁸ ha dimostrato che un cluster tetramerico di sialosil-Tn è essenziale per il legame dell'anticorpo monoclonale MLS132.

Il ruolo biologico dei clusters rispetto alle strutture monomeriche non è ancora stato del tutto chiarito, comunque, Ogata³⁹ ha riportato che clusters di sialosil-Tn compaiono durante la trasformazione maligna della mucosa del colon umano. L'abilità di sintetizzare monomeri oppure clusters degli antigeni Tn o sialosil-Tn sullo scheletro polipeptidico mucinico dipende dai siti di *O*-glicosilazione presenti sull'apomucina e dal repertorio e specificità delle glicosiltransferasi necessarie per la biosintesi che esistono nei tessuti normali rispetto a quelli cancerosi.

Sulla base dei risultati ottenuti sopra citati, il gruppo di ricerca di cui ho fatto parte, nell'ambito di una collaborazione tra il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Catania e l'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Catania, ha progettato la sintesi di vaccini antitumorali glicolipopeptidici contenenti clusters multimerici degli antigeni Tn, dell'epitopo PDTRP e di una combinazione dei due, al fine di incrementare la densità dei residui antigenici, per poter meglio mimare l'epitopo naturale presente sulle cellule tumorali, ottenendo così una stimolazione immunitaria più efficace. A tale scopo sono stati impiegati gli *scaffolds* calixarenici. I Calixareni sono polifenoli macrociclici ottenuti, in ambiente basico, per condensazione di fenoli *para*-sostituiti con formaldeide. A seconda delle condizioni di reazione si ottengono cicli a flessibilità crescente, in cui n unità fenoliche ($n \geq 4$) sono legate mediante ponti metilenici nelle posizioni *orto*. L'uso del termine calix[n]areni (dal greco *calix*, calice), introdotto da Gutsche⁴⁰ nel 1978, fu suggerito dalla particolare forma del tetramero, il quale allo stato solido, e generalmente anche in soluzione, adotta una conformazione a "calice". Essi sono ormai considerati gli ideali materiali di partenza per la sintesi di una vasta schiera di molecole più complesse, in particolare di macromolecole bioattive⁴¹. Oggi, grazie al lavoro di Gutsche⁴², al quale va il merito di aver portato i calixareni alla ribalta nella chimica supramolecolare, sono

ormai note le condizioni di reazione per ottenere in un unico passaggio calixareni con 4, 6 e 8 unità *t*-butilfenoliche, con rese rispettivamente del 50, 85 e 63% dopo cristallizzazione. La natura del calixarene formato dipende dalla quantità ed identità della base (KOH, NaOH), nonché dal solvente e dalla temperatura di reazione.

La chimica dei calixareni è stata investigata utilizzando i tetrameri come composti modello, per i quali è stata introdotta una terminologia ormai comunemente accettata anche per gli oligomeri superiori. Riferendosi alla struttura a cono dei calix[4]areni è stato definito il cosiddetto *lower rim*, relativo al bordo inferiore che porta gli OH fenolici, e l'*upper rim*, relativo al bordo superiore costituito dalle posizioni *para* degli anelli fenolici stessi (figura 10).

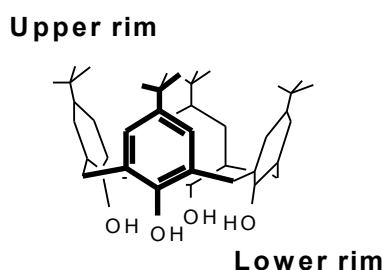


Figura 10. Struttura a cono dei calix[4]areni.

Questi due bordi sono i siti comunemente usati per funzionalizzare lo *scaffold* calixarenico. La funzionalizzazione al *lower rim*, di solito procede mediante eterificazione o esterificazione degli OH fenolici, mentre l'*upper rim* è in genere oggetto di attacco elettrofilo aromatico. Generalmente, tutte le sostituzioni possibili su fenoli possono essere condotte anche sui calixareni o sui loro derivati alchil eterici o esterei: alogenazione, nitrificazione, solfonazione, solfoclorurazione, acilazione, clorometilazione, accoppiamento con sali di diazonio, etc.

E' sorprendente notare come sia vasto il potenziale campo di applicazione dei calixareni, il quale spazia dal loro utilizzo come leganti specifici in chimica analitica, in sensoristica e in diagnostica medica, all'uso come decontaminanti di acque reflue, alla costruzione di enzimi artificiali e alla sintesi di nuovi materiali in microelettronica. Per questo motivo, la chimica dei calixareni ha ricevuto un notevole impulso negli ultimi trent'anni.

Nel 2008, è stato sintetizzato dal gruppo di ricerca presso quale ho svolto la mia attività⁴³ un vaccino antitumorale contenente un *cluster* tetramerico dell'antigene glicomimetico Tio-Tn utilizzando come *scaffold* rigido un derivato tetrammino-calixarenico (figura 11).

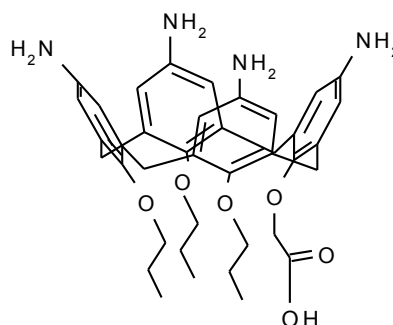


Figura 11. Derivato tetrammino-calixarenico.

Il progetto di sintesi di tale costruito ha previsto il coupling di quattro unità di antigene glicomimetico S-Tn, mediante uno spaziatore glicinico, ai gruppi amminici dello *scaffold* presenti sul suo bordo superiore (*upper rim*). Al bordo inferiore (*lower rim*) è stata invece prevista l'introduzione, mediante spaziatore etilendiamminico, dell'immunoadiuvante P₃CS, il cui enantiometro attivo è stato precedentemente sintetizzato dal medesimo gruppo di lavoro. Il vaccino così ottenuto, Tetra-STnAg-Gly-CX-P₃CS⁴³, è rappresentato in figura 12. La valutazione biologica preliminare è stata effettuata mediante il dosaggio di anticorpi anti-Tn in

topi BALB/c. Come composto di riferimento è stato utilizzato un costrutto glicomimetico monovalente dell'antigene Tn (P_3CS -mono-S-Tn) precedentemente sintetizzato (figura 6). Il costrutto monovalente di riferimento è stato utilizzato a due diversi dosaggi (1X e 4X) rispetto al vaccino tetramerico. La determinazione degli anticorpi è stata effettuata mediante la tecnica “*End Point Titers Elisa*” che consente di identificare e quantificare gli anticorpi totali specifici anti-Tn IgG.

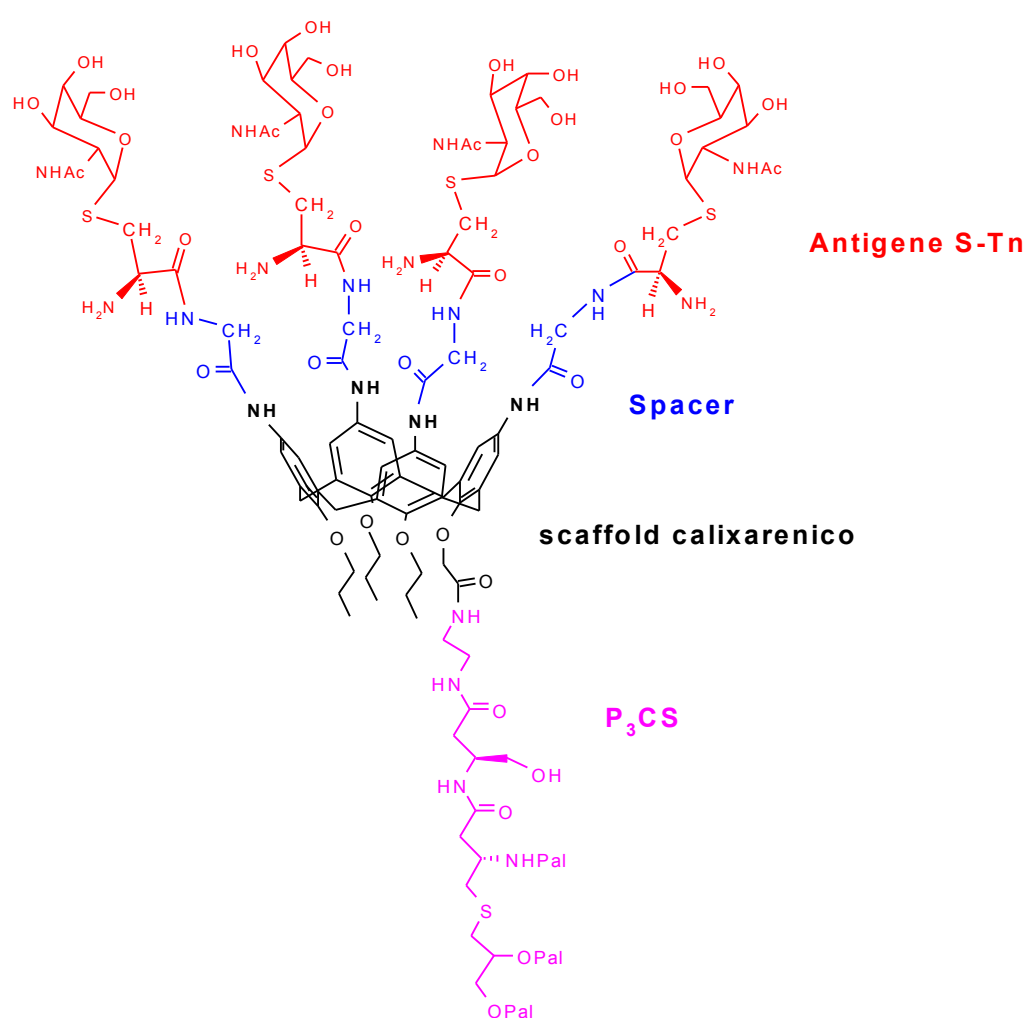


Figura 12. vaccino glicolipopeptidico tetramerico Tetra-STnAg-Gly-CX-P₃CS.

Sono state utilizzate piastre CovaLink™ NH, caratterizzate da una superficie contenente un gruppo amminico secondario, opportunamente spaziato, che consente di legare covalentemente l'antigene Tn alla struttura polistirenica. Come riportato nella figura 13, tutti e tre i gruppi trattati con i costrutti in esame determinano un incremento della produzione di anticorpi specifici anti-Tn rispetto al gruppo di animali controllo.

Nella gamma di diluizione del siero in esame, i topi immunizzati con il costrutto tetravalente (STn-CX[4]-P₃CS) hanno mostrato un sostanziale e significativo ($p < 0.05$) incremento della produzione di anticorpi con un aumento dell'*end point titer* di 4-volte rispetto al gruppo di topi immunizzati utilizzando una concentrazione equimolare (0,030 μ M/mouse) di P₃CS-mono-STn utilizzato come costrutto di riferimento monovalente (1:16000 e 1:4000 rispettivamente).

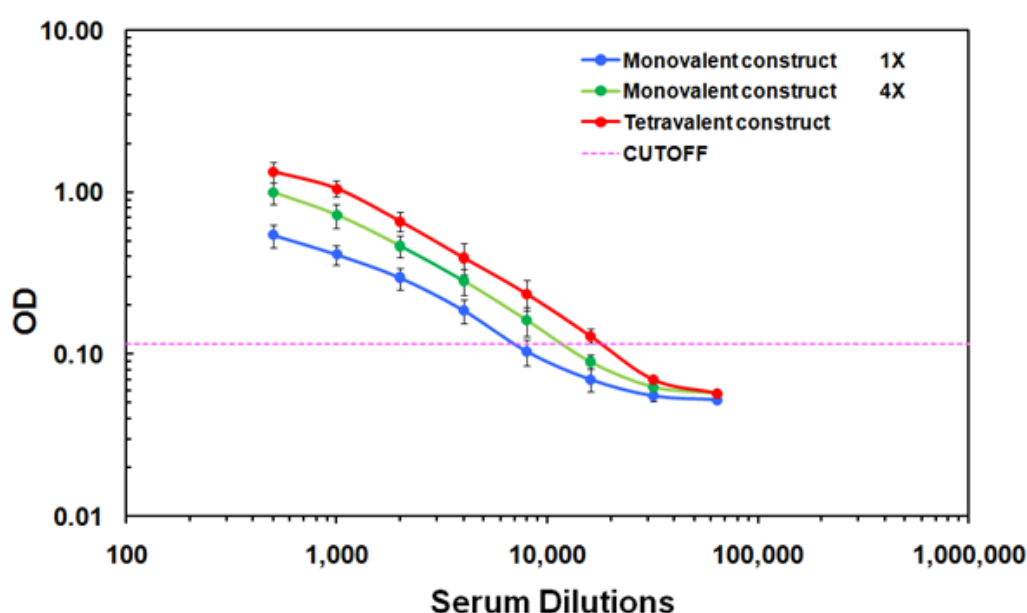


Figura 13. Livelli di anticorpi anti-Tn specifici IgG per i costrutti Tetra-STn-CX[4]-P₃CS e P₃CS-mono-STn. Il costrutto monomerico è stato saggiato a due diverse concentrazioni 1X e 4X rispetto all'addotto tetrameric.

E' interessante notare che anche quando la concentrazione del costrutto monovalente è stata aumentata di 4 volte rispetto al derivato tetramerico (0.120 μ M/mouse), in modo da mettere a confronto composti con lo stesso numero di unità di antigene Tn, l'*end point titer* del costrutto monomero è aumentata di solo 2 volte (da 1:4000 a 1:8000).

Questi risultati dimostrano chiaramente l'esistenza di un cosiddetto effetto *cluster* che è responsabile della maggiore attività immunostimolante specifica dell'addotto tetramerico. Inoltre, questi dati mettono in evidenza come lo schieramento delle unità Tn sullo *scaffold* rigido calix[4]arenico è in grado di mimare in maniera efficiente il *cluster* Tn naturale che si riscontra in vivo sulle cellule tumorali.⁴³

2.2 Progetto di ricerca

Sulla base di un'accurata disamina dei risultati ottenuti, dal gruppo di ricerca, di cui ho fatto parte in qualità di dottorando di ricerca, nel 2000²⁴, nel 2007⁴³ e nel 2011³³ è stata progettata la sintesi di costrutti contenenti clusters multimerici dell'antigene Tn, dell'epitopo immunodominante PDTRP e di una combinazione dei due (figura 14). I costrutti progettati seguono lo schema riportato in figura 15: esse contengono 4 e 8 unità antigeniche (PDTRP, PDTRP-Tn, Tn) che saranno assemblate su opportuni *scaffolds* a flessibilità conformazionale crescente.

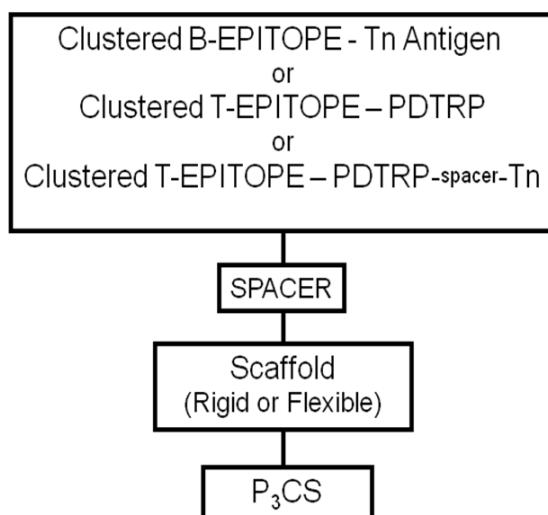


Figura 14. Schema dei costrutti multimerici progettati.

Per la realizzazione di questi costrutti sono stati scelti due *scaffolds*: il calix[4]arene rigido, e il calix[8]arene meno rigido, secondo gli schemi riportati in figura 15.

Nei costrutti tetramerici quattro unità antigeniche verranno legate mediante un spaziatore glicinico all'*upper rim* dello *scaffold* tetraminocalix[4]arenico. Al *lower rim* è stata invece prevista l'introduzione, mediante spaziatore etilendiamminico, dell'immunoadiuvante P₃CS. Nei costrutti ottamerici otto unità antigeniche verranno legate all'*upper rim* dello *scaffold* octaminocalix[8]arenico, mediante spaziatore glicinico. Al *lower rim*, analogamente al derivato tetrameric, verrà legato l'immunoadiuvante P₃CS. L'utilizzo di uno *spacer* di glicina, tra lo scaffold calixarenico e gruppi pentapeptidici, è stato scelto per permettere una certa flessibilità, che può essere vantaggiosa nei fenomeni di riconoscimento antigene-anticorpo. È ormai noto che lo scaffold calix[4]arenico è dotato di una notevole rigidità conformazionale mentre la piattaforma calix[8]arenica è meno rigida. La maggiore flessibilità conformazionale degli addotti calix[8]arenici rispetto a quelli calix[4]arenici è dovuta alla maggiore larghezza dell'anello (figura 16).⁴⁴ E' stato dimostrato che il calix[8]arene può dare almeno 16 conformazioni "up-down", e numerose altre conformazioni in cui uno o più anelli aromatici sono proiettati fuori rispetto all'asse costituito dall'anello.⁴⁴

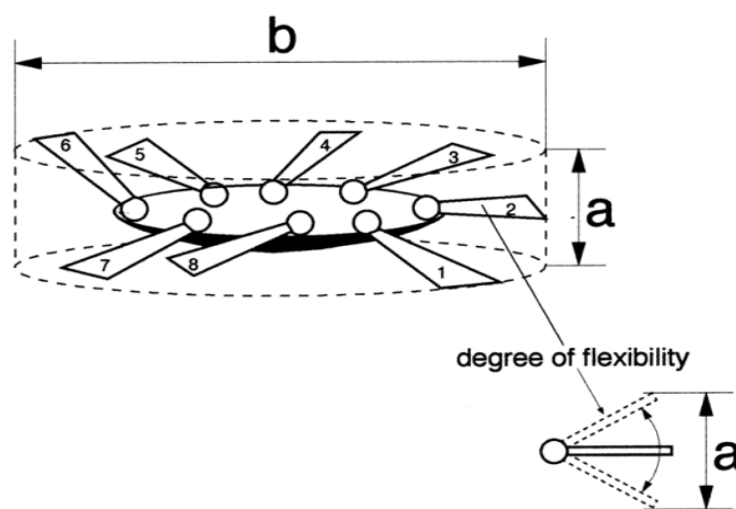


Figura 16. Libertà conformazione di anelli calix[8]arenici.

Allo stato solido e in solventi apolari è stata dimostrata la cosiddetta conformazione *pleated-loop* (loop pieghettato), capace di interconvertirsi in maniera continua con la sua immagine speculare (figura 17).

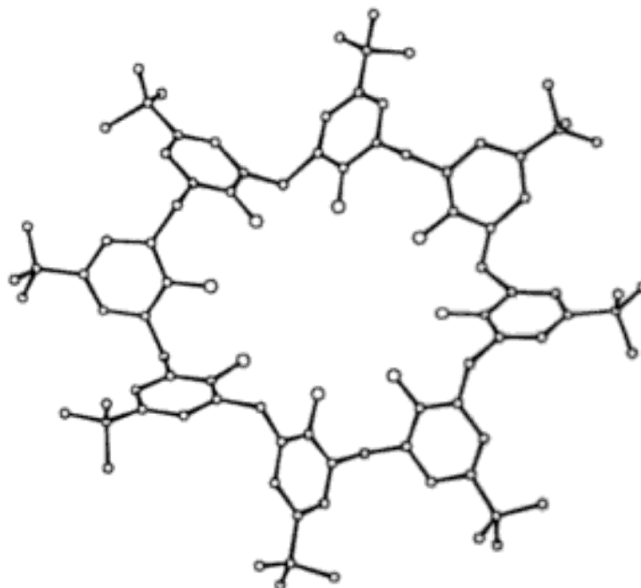


Figura 17. Conformazione *Pleated-loop* del 4-tert-butyl-calix[8]arene.

Questa conformazione è stabilizzata dall'instaurarsi di legami a idrogeno intramolecolari. In solventi polari l'effetto schermante del solvente comporta la distruzione di tali legami intramolecolari determinando una maggiore libertà conformazionale rispetto all'addotto calix[4]arenico.⁴⁴ L'utilizzo di dello *scaffold* calix[8]arenico ha l'obiettivo di creare una situazione intermedia, in termini di flessibilità conformazionale, tra la rigidità dell'addotto calix[4]arenico e quella di uno *scaffold* aciclico relativamente flessibile. La conformazione dei derivati calix[8]arenici può anche essere notevolmente influenzata dalle dimensioni e dalla

natura chimica dei sostituenti presenti, la cui natura può avere dei risultati sorprendenti sulla loro organizzazione tridimensionale.

Ad esempio, per un derivato calix[8]arenico perbenzilato sono state dimostrate le conformazioni *syn* e *anti* (figura 18).⁴⁵

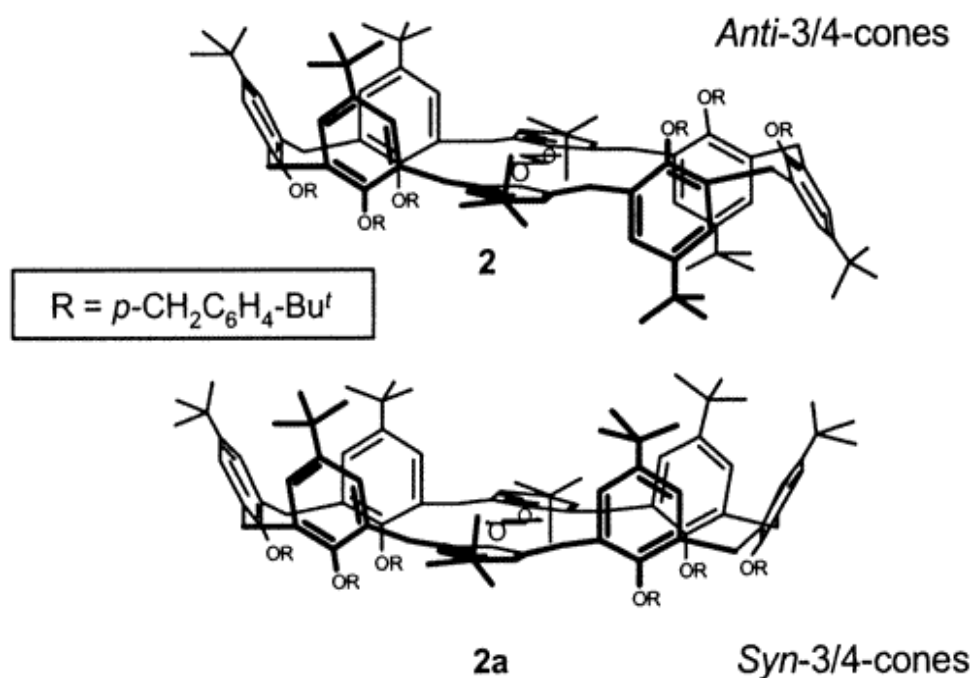


Figura 18. Conformazione *Syn* e *Anti* di derivati calix[8]arenici perbenzilati.

Tali conformazioni, nel caso in cui i sostituenti debbano andare a costituire un cluster antigenico, potrebbero avere notevoli ripercussioni sull'attività immunostimolante.

Lo scopo del mio lavoro di dottorato, dunque, è stato quello di acquisire informazioni sui requisiti strutturali ottimali per la sintesi di due dei costrutti del progetto in corso d'opera, contenenti clusters multimerici dell'epitopo PDTRP assemblati su piattaforme rigide e meno rigide, in modo da riprodurre l'epitopo naturale presente sulle cellule tumorali. Il progetto si articola nelle seguenti fasi:

A. Sintesi in fase solida del pentapeptide **PDTRP (figura 19)**

1. Condensazione di Fmoc-Arg(Mtr)-OPfp all'H-Pro-2ClTrt-*resin*;
2. Condensazione di Fmoc-Thr(OtBu)-OH a Arg-Pro-2ClTrt-*resin*;
3. Condensazione di Fmoc-Asp(OtBu)-OPfp a Thr-Arg-Pro-2ClTrt-*resin*;
4. Condensazione di Fmoc-Pro-OPfp a Asp-Thr-Arg-Pro-2ClTrt-*resin*;
5. Distacco del pentapeptide PDTRP dalla 2Cl-Trt-*resin*.

B. Sintesi di **Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]-P₃CS (figura 20)**

1. Tri-propilazione del *p-terz*-butilcalix[4]arene;
2. Alchilazione della restante funzione fenolica con BrCH₂COOEt;
3. Ipso-nitrazione del composto ottenuto e successiva riduzione;
4. *Coupling* tra gli ammino gruppi dello *scaffold* con altrettante unità di glicina *N*-protetta;
5. Idrolisi alcalina del legame estereo e aggancio dell'immunoadiuvante P₃CS;
6. Deprotezione dei residui di glicina;
7. *Coupling* tra i gruppi -NH₂ delle glicine ed il carbossile terminale libero del peptide PDTRP, protetto nelle altre funzioni reattive;

8. Deprotezione e purificazione del derivato peptidico calixarenico sintetizzato.

C. Sintesi di Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]-P₃CS (figura 21)

1. Epta-*p*-bromobenzoilazione del *p*-terz-butylcalix[8]arene;
2. Alchilazione della restante funzione fenolica con BrCH₂COOEt;
3. Idrolisi basica e trattamento con ioduro di propile;
4. Ipso-nitrazione del composto ottenuto e successiva riduzione;
5. *Coupling* tra gli ammino gruppi dello *scaffold* con altrettante unità di glicina *N*-protetta;
6. Idrolisi alcalina del legame estereo e aggancio dell'immunoadiuvante P₃CS;
7. Deprotezione dei residui di glicina;
8. *Coupling* tra i gruppi -NH₂ delle glicine ed il carbossile terminale libero del peptide PDTRP protetto nelle altre funzioni reattive.

D. Valutazione biologica di Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]-P₃CS e Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]-P₃CS.

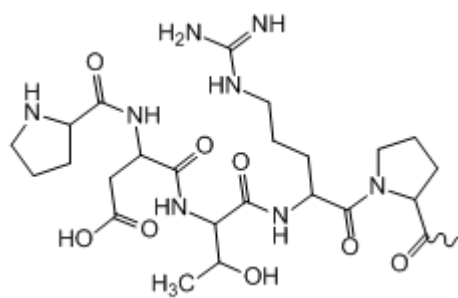


Figura 19. Pentapeptide PDTRP.

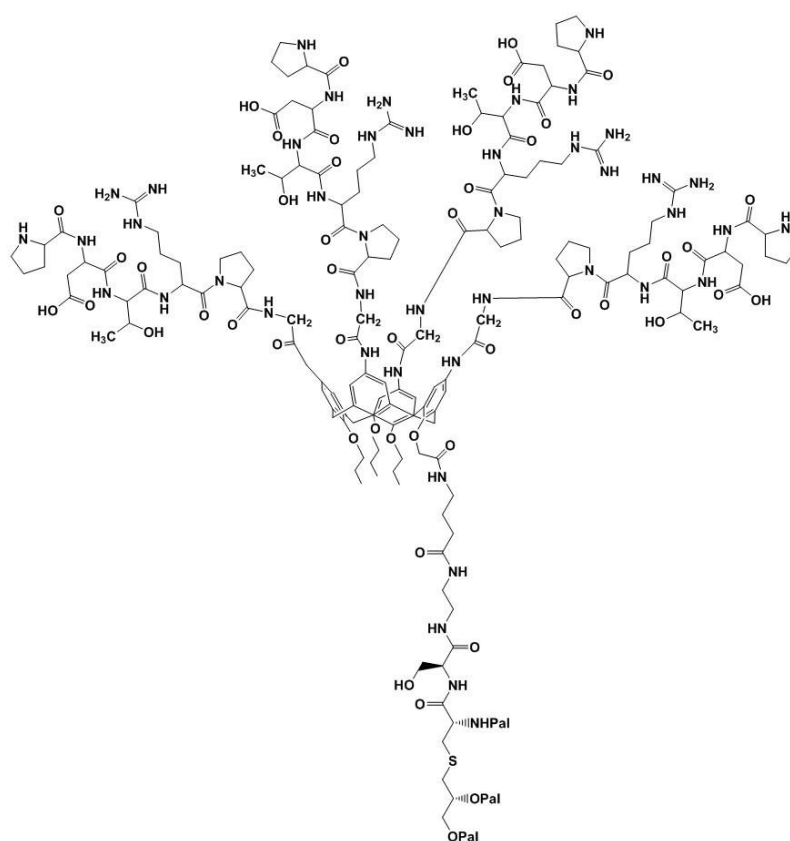


Figura 20. Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]-P₃CS

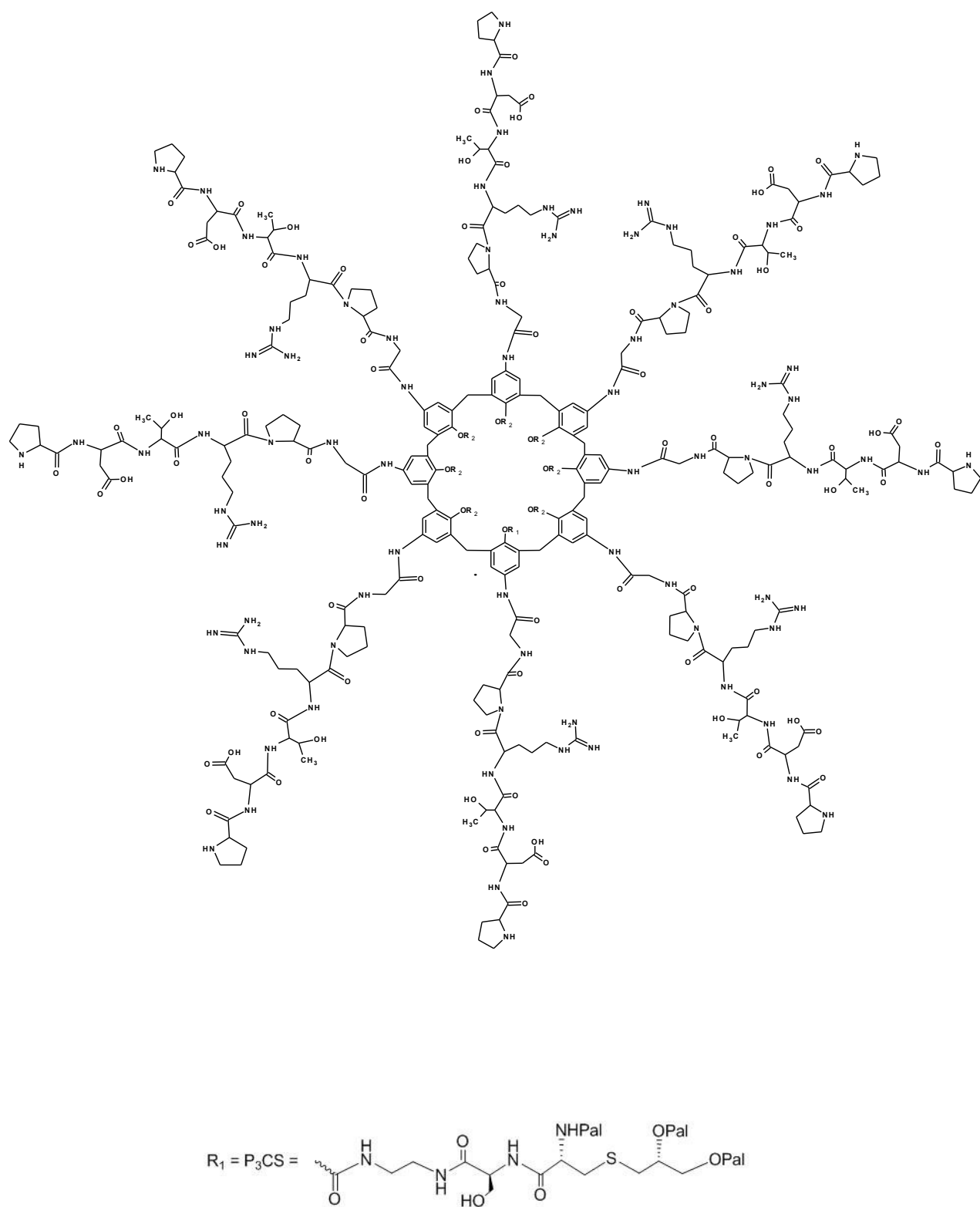


Figura 21. Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]-P₃CS.

2.3 MATERIALI E METODI

2.3.1 Metodi analitici

Cromatografia su strato sottile (TLC). Le separazioni sono state effettuate utilizzando come fase solida lastre in Gel di Silice 60 (spessore 0.25 mm, 230–400 mesh) stratificata su fogli di alluminio con indicatore di fluorescenza F-254 (Merck). Per la rivelazione degli spots sono stati impiegati radiazioni UV (254 e 366 nm) e reattivi opportunamente preparati: Ninidrina 0,4%; NaClO 50% v/v; EtOH 95%, sol. 1% amido solubile e KI in H₂O.

Cromatografia su colonna. Le purificazioni in colonna sono state effettuate utilizzando come fase stazionaria gel di silice 60 (230-400 mesh, E. Merck). La cromatografia su colonna ad esclusione molecolare è stata effettuata utilizzando Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden).

Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). Gli spettri ¹H-NMR (400.13 MHz), ¹³C-NMR (100.61 MHz) e 2D-NMR sono stati registrati su uno spettrometro VARIAN-INOVA. Chemical shift (δ) sono espressi in parti per milione (ppm).

Spettrometria di massa. Gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro di massa Waters Micromass ZQ 2000 model ESI-MS e su uno spettrometro VOYAGER-DE MALDI-TOF Applied Biosystems. Gli spettri di massa **FAB** sono stati registrati su uno spettrometro KRATOS MS-50.

HPLC. Le separazioni in hplc sono state effettuate con uno strumento HP 1100 (Agilent Technologies, Milano, Italia) fornito del software HP ChemStation, di una pompa binaria G1312A, di una rivelatore a serie di diodi (DAD) G1315A e di un vano colonna termostato G1316A. Il lipopeptide Fmoc-Pro-Asp(OtBu)-Thr(OtBu)-Arg(Mtr)-Pro-OH è stato

analizzato utilizzando una colonna PLRP-S (Agilent) (4.6 x 250 mm, 5 μ m, 300 Å pore). E' stato utilizzato un gradiente lineare da 0% di B a 100 % di B in 20 min. (A = 20 % CH₃CN, 80 % H₂O and B = 80 % CH₃CN, 20 % H₂O, sia A che B contenevano TFA allo 0.1 %). Il monitoraggio è stato effettuato a 214 nm e il flusso era di 1.0 mL/min. Il volume di campione iniettato era 10 μ L (1 mg/ml di analita).

ELISA. Gli animali utilizzati in questo studio sono topi BALB/c femmina di 5-8 settimane di vita (Charles River, Calco LC, Italy). I costrutti confrontati: P₃CS-Calix[8]arene-Octa-PDTRP, P₃CS-Calix[4]arene-Tetra-PDTRP e P₃CS-Mono-PDTRP. Gli animali sono stati suddivisi in cinque gruppi e trattati nel seguente modo:

- 1) P₃CS-Calix[8]arene-Octa-PDTRP,
- 2) P₃CS-Calix[4]arene-Tetra-PDTRP,
- 3) P₃CS-Mono-PDTRP,
- 4) non immunizzati,
- 5) veicolo.

Il trattamento è stato condotto nel modo seguente: 2 immunizzazioni per gruppo a distanza di una settimana, tramite iniezione intraperitoneale alla medesima concentrazione per CX-Tetra-PDTRP e CX-Octa-PDTRP (0.030 μ m/mouse) e a concentrazioni crescenti per Mono-PDTRP (0.030, 0.120 e 0.240 μ m/mouse rispettivamente). Dopo 21 giorni dalla prima immunizzazione i sieri vengono prelevati e conservati a -80°C prima di effettuare il test ELISA.

2.3.2 Reattivi e solventi

Tutti i reagenti e i solventi chimici sono stati ottenuti da fonti commerciali e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. La resina 2-chlorotritil, H-Pro-2-ClTrt è stata fornita da Novabiochem (Milano, Italy). Matrice polimerica contenente 1% di stirene (DVB), 200-400 mesh.

2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.4.1 SINTESI in fase solida del pentapeptide PDTRP

Per la sintesi pentapeptide PDTRP è stata impiegata la tecnica della Sintesi Peptidica in Fase Solida (SPPS) che prevede l'aggiunta sequenziale di α -amminoacidi, opportunamente protetti in catena laterale, ad un supporto polimerico insolubile. La strategia sintetica seguita ha previsto l'utilizzo di residui amminoacidici Fmoc-protetti e OPfp-attivati. La funzione carbossilica dell'amminoacido N- α -protetto è stata attivata in situ con DCI e HOBt. I solventi utilizzati per *coupling/deprotection/washing* sono DCM (ottimo per lo *swelling* del supporto polistirenico), DMF (per aumentare la solubilità di alcuni reagenti) e Isopropanolo. I gruppi protettori delle catene laterali degli amminoacidi Arg, Thr, Asp, sono stati scelti in modo tale da essere stabili durante le fasi di *coupling/deprotection/cleavage*, ma simultaneamente rimovibili in condizioni acide molto spinte (95% TFA), dopo il distacco del peptide dalla resina. A tale scopo è stata utilizzata una resina iper-acidolabile, *H-Pro2-chlorotrytil resin Barlos's* (figura 22), perché particolarmente indicata per la Fmoc-SPPS di peptide parzialmente protetti.

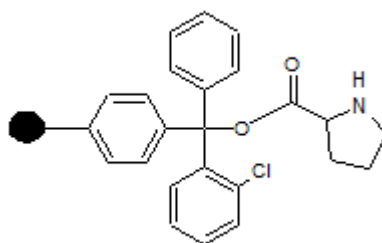


Figura 22. H-Pro-2Cl-Trt-Resin.

La resina di Barlos ha una matrice polimerica costituita da copoli (stirene-1% DVB), con granuli di dimensioni pari a 200-400 mesh. Per la natura del linker tritilico tale tipo di resina è ideale per la preparazione di peptidi contenenti residui di Pro all'estremità C-terminale. Infatti il notevole ingombro sterico del linker clorotritilico sopprime totalmente la formazione di dichetopiperazine conseguente alla deprotezione del gruppo Fmoc del secondo residuo aminoacidico. Il linker clorotritilico riduce anche la racemizzazione che si verifica durante l'attacco del primo aminoacido alla resina; non richiede infatti alcuna attivazione della funzione carbossilica dell'amminoacido *N- α -protetto*. Inoltre i cationi tritilici che si generano nella fase di distacco del peptide della resina, sempre in virtù del loro ingombro sterico, non reagiscono affatto con siti nucleofili delle catene dei residui aminoacidici (es.: Tyr).

Sono stati condotti sui granuli di resina dei test di tipo qualitativo che consentono di monitorare tutte le reazioni di *coupling* e *deprotection* della SPPS, permettendo di evidenziare rispettivamente l'assenza o la presenza di gruppi amminici liberi: TNBS test, CLORANIL test. Inoltre l'alta sensibilità della resina 2-clortritilica nei confronti della miscela AcOH/TFE/DCM 2:2:6, in combinazione con la buona solubilità dei frammenti peptidici in tale miscela, hanno permesso di monitorare le reazioni di *coupling* e *deprotection* e la eventuale formazione di prodotti secondari anche tramite cromatografia su strato sottile (TLC).

La SPPS viene condotta in un apposito *reactor* munito di rubinetto a tre vie e di un disco di vetro sinterizzato che permette sia il gorgogliamento di azoto che l'allontanamento della soluzione dei reattivi utilizzati. Lo step finale prevede il distacco del peptide sintetizzato tramite rottura del legame estereo tra la sua estremità C-terminale ed il linker clorotritilico della

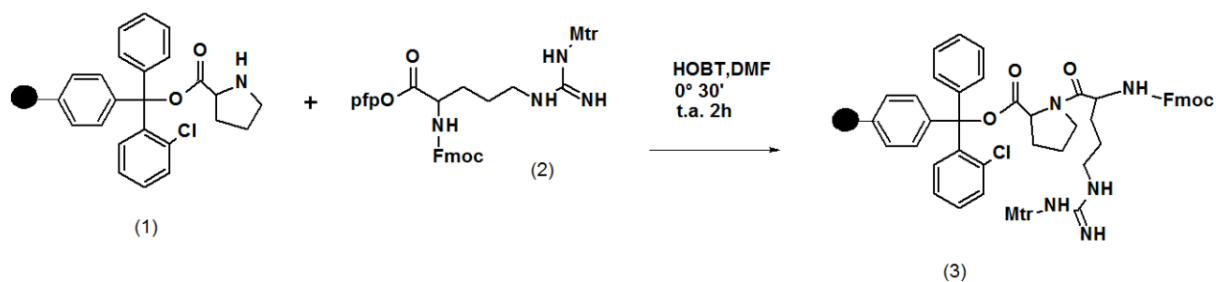
resina. Il distacco del peptide dalla resina è stato ottenuto per trattamento della resina con la miscela AcOH/TFE/DCM 2:2:6. La rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali dei residui amminoacidici verrà effettuata invece con 95% TFA ed opportuni scavengers (Tioanisolo, Tiocresolo, Fenolo, acqua, EDT, TIS).

TNBS Test: 10% v/v DIPEA in DMF; 1% p/v 2,4,6-trinitrobenzen solfonico (TNBS) in DMF; 1 mgr di resina + 2 gocce delle due soluzioni, 5 min. Test positivo: granuli rosso-arancio.

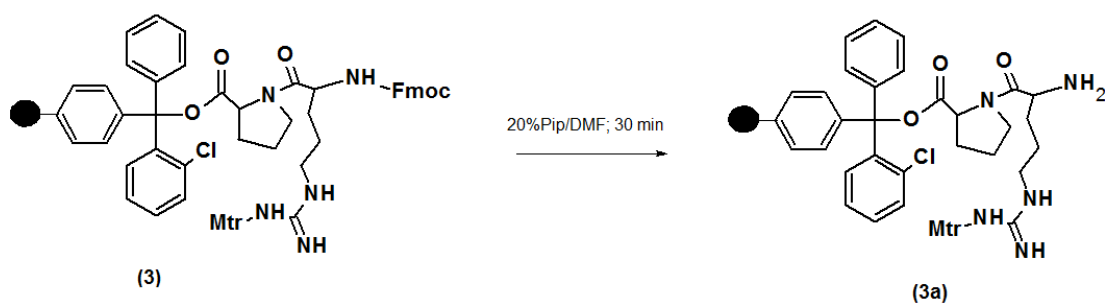
CLORANIL Test (per ammine secondarie): 2% v/v Acetaldeide in DMF; 2% p/v p-Cloranil; 1 mgr di resina + 2 gocce delle due soluzioni, 5 min. Ammine secondarie: granuli blu.

TLC: AcOH/TFE/DCM 2:2:6; 1 mgr di resina + 2 gocce della miscela, 1-2 min; Reattivi di rivelazione: Ninidrina 0,4%, NaClO 50% v/v, EtOH 95%, sol. 1% amido solubile e KI in acqua.

2.4.1.1 Condensazione di Fmoc-Arg(Mtr)-OPfp

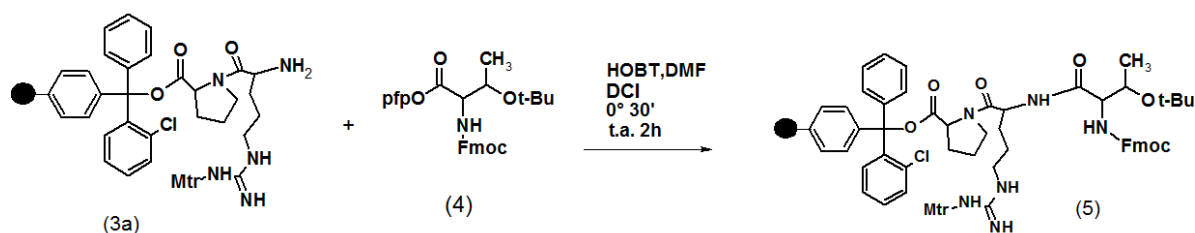


Si procede con l'attivazione di Fmoc-Arg(Mtr)-OPfp (2) con HOBT in DMF; successivamente si procede con il coupling (2) attivato alla resina (1) ($\rightarrow$ SPPS *reactor*). L'assenza di gruppi amminici secondari liberi nel composto (3) è verificata con il Cloranil test.

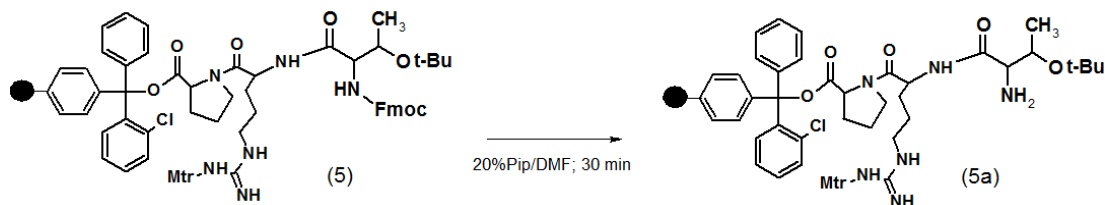


Il composto (3) viene deprotezionato con una soluzione al 20% v/v di piridina in DMF, si filtra sotto vuoto e si eseguono lavaggi con DMF e Isopropanolo. Il TNBS test attesta la presenza di gruppi amminici liberi, quindi la deprotezione è avvenuta correttamente (3a).

2.4.1.2 Condensazione di Fmoc-Thr(OtBu)-OH a Arg-Pro-2ClTrt-resin

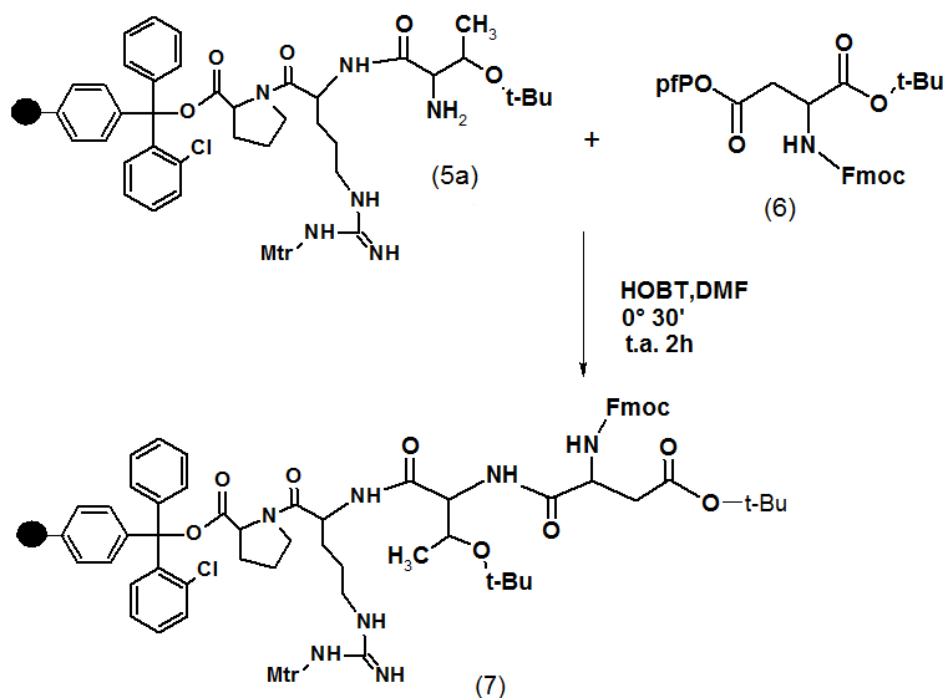


Si procede con l'attivazione di Fmoc-Thr(OtBu)-OH (4) con HOBT e DCI e dopo si effettua il coupling di (4) al composto (3a) precedentemente deprotezionato. Si effettuano i lavaggi con DMF e Isopropanolo e si esegue il TNBS test che ci indica l'assenza di gruppi amminici secondari liberi e che la reazione di condensazione è avvenuta correttamente (5).

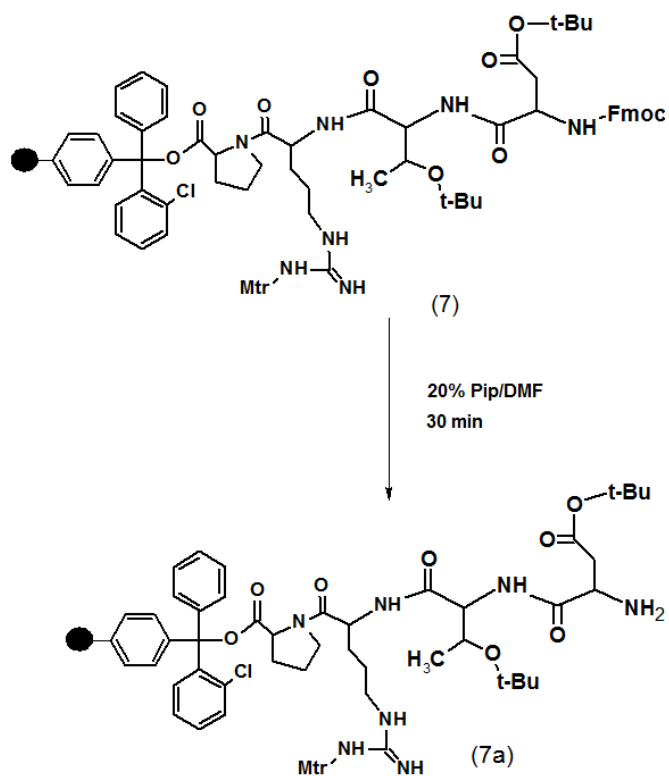


Si procede dunque con la deprotezione del composto (5) con una soluzione al 20% v/v di piperidina in DMF, si filtra sotto vuoto e si lava con DMF e Isopropanolo. Il TNBS test ci conferma l'avvenuta deprotezione (5a).

2.4.1.3 Condensazione di Fmoc-Asp(OtBu)-OPfp a Thr-Arg-Pro-2ClTrt-resin

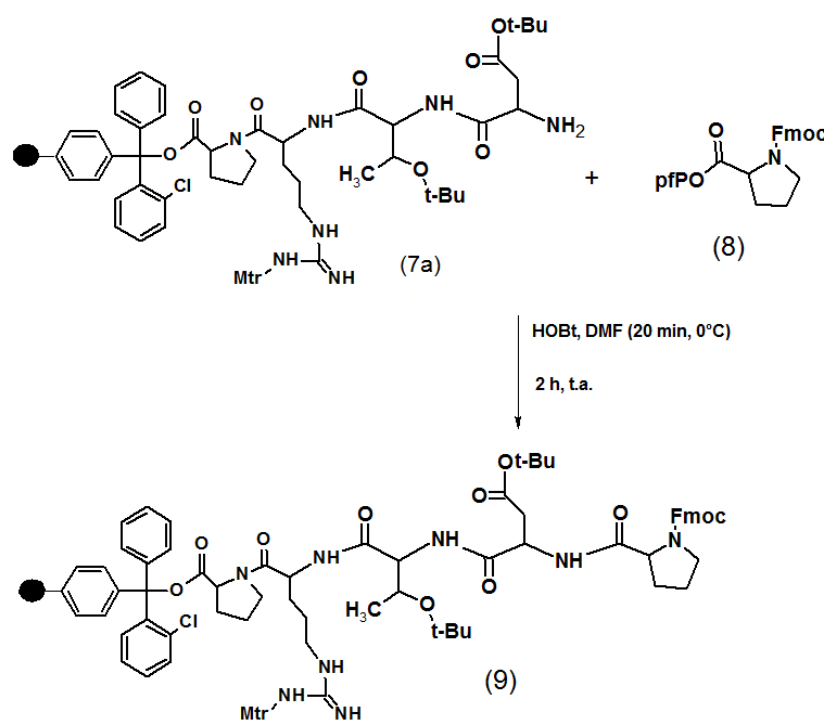


Dopo attivazione del Fmoc-Asp(OtBu)-OPfp con HOBT (6) si procede con il coupling al composto (5a). si eseguono i lavaggi con DMF e Isopropanolo e si esegue il TNBS test che ci attesta l'assenza di gruppi amminici secondari liberi, quindi la condensazione è avvenuta perfettamente (7).



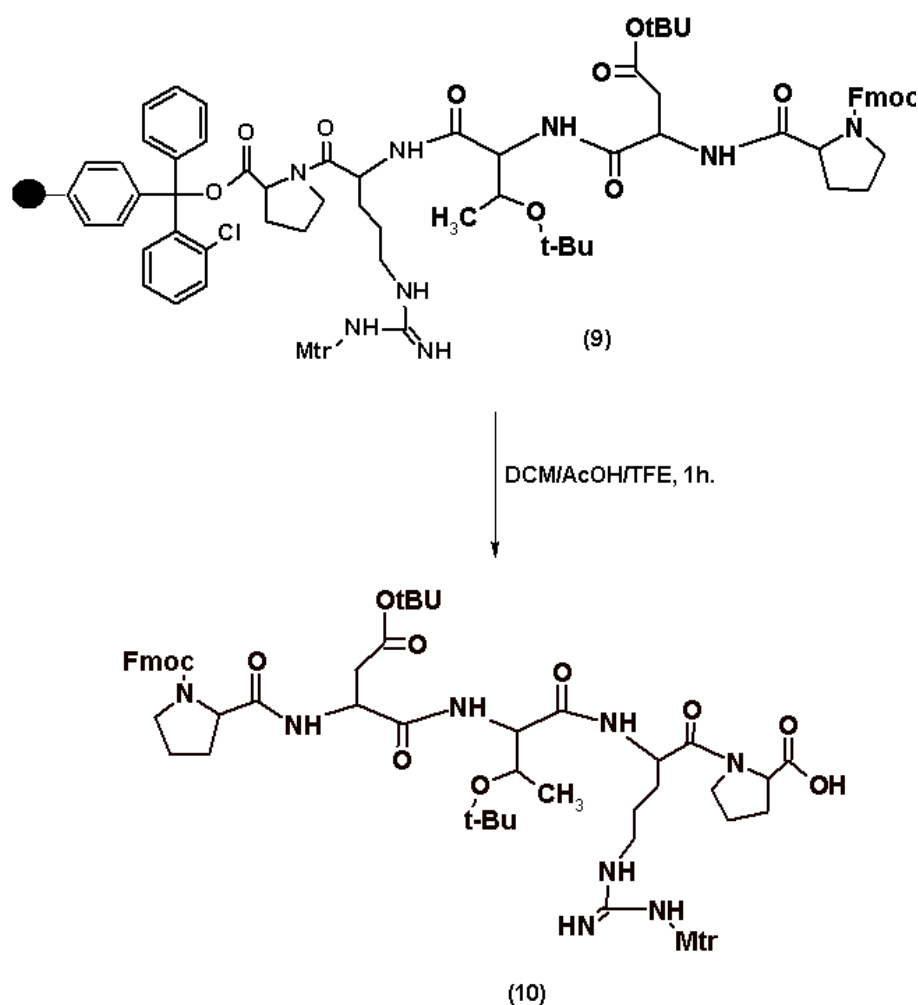
Si procede con la deprotezione di (7) utilizzando la medesima soluzione impiegata per le precedenti deprotezioni. Dopo filtrazione e lavaggi si esegue il TNBS test che ci conferma l'avvenuta deprotezione (7a).

2.4.1.4 Condensazione di Fmoc-Pro-OPfp a Asp-Thr-Arg-Pro-2ClTrt-resin



Si esegue l'attivazione del Fmoc-Pro-OPfp con HOBT (8) e successivamente il coupling di (8) con (7a). dopo i lavaggi si esegue il TNBS test, che da esito positivo e ci conferma l'avvenuta condensazione (9).

2.4.1.5 Distacco del pentapeptide PDTRP dalla 2Cl-Trt-resin



Il composto (9) viene trattato con una soluzione DCM/AcOH/TFE 6:2:2 che viene aggiunta (4 ml) nel SPPS reactor e si lascia gocciolare per 1h; si aggiungono altri 2 ml di miscela alla resina e si filtra sotto vuoto. Si lava per tre volte (10) con 2 ml della stessa miscela. Infine si lava (10) con DCM abbondante (circa 3 ml). I solventi vengono eliminati per evaporazione a pressione ridotta, quindi si eseguono una serie di lavaggi utilizzando in sequenza DCM (2 ml), etere dietilico (2 ml) ed etanolo (2 ml), quest'ultimo servirà ad eliminare tutto l'acido acetico. Il prodotto residuo (PDTRP) è una polvere bianca.

Fmoc-Pro-Asp(OtBu)-Thr(OtBu)-Arg(Mtr)-Pro-OH: Colorless oil, yield 80%. Anal. (C₅₇H₇₈N₈O₁₄S) C, H, S, N. (calcd 60.51, 6.95, 2.83, 9.90; found 60.86, 6.67, 3.22, 10.17). R_f=0.75. R_t=24.28 min. (purity 99.1%). MS(FAB) m/z 1131 (M⁺), 1152 (M⁺Na⁺). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 174.6; 172.6; 170.9; 170.6; 170.4; 169.2; 163.3; 158.3; 156.5; 144.3; 141.2; 138.5; 136.5; 133.5; 127.7; 127.1; 125.1; 124.5; 121.0; 120.0; 81.9; 74.9; 67.7; 66.1; 64.1; 60.6; 58.1; 57.9; 55.4; 50.3; 47.1; 47.0; 43.3; 40.5; 36.5; 29.2; 29.1; 29.0; 27.9; 27.8; 24.7; 24.5; 24.0; 23.8; 20.6; 18.3; 11.8.

2.4.2 SINTESI di Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]-P₃CS

Come già detto nel paragrafo 2.2, è stata scelta la piattaforma calix[4]arenica alla quale vengono legate, attraverso una esatta geometria, quattro unità del pentapeptide PDTRP, che rappresenta l'epitopo della MUC-1 *over*-espressa sulla superficie delle cellule tumorali epiteliali. Tra lo scaffold calixarenico e i quattro gruppi pentapeptidici è stato introdotto uno *spacer* di glicina e, al *lower rim* del macrociclo, il gruppo immunoadiuvante P₃CS al fine di amplificare l'intensità della eventuale risposta immunitaria. Di seguito verrà esposta la strategia sintetica, già consolidata in letteratura, utilizzata per la realizzazione del costrutto, ad attività immunostimolante specifica, di cui al paragrafo 2.2 e rappresentato in figura 23.

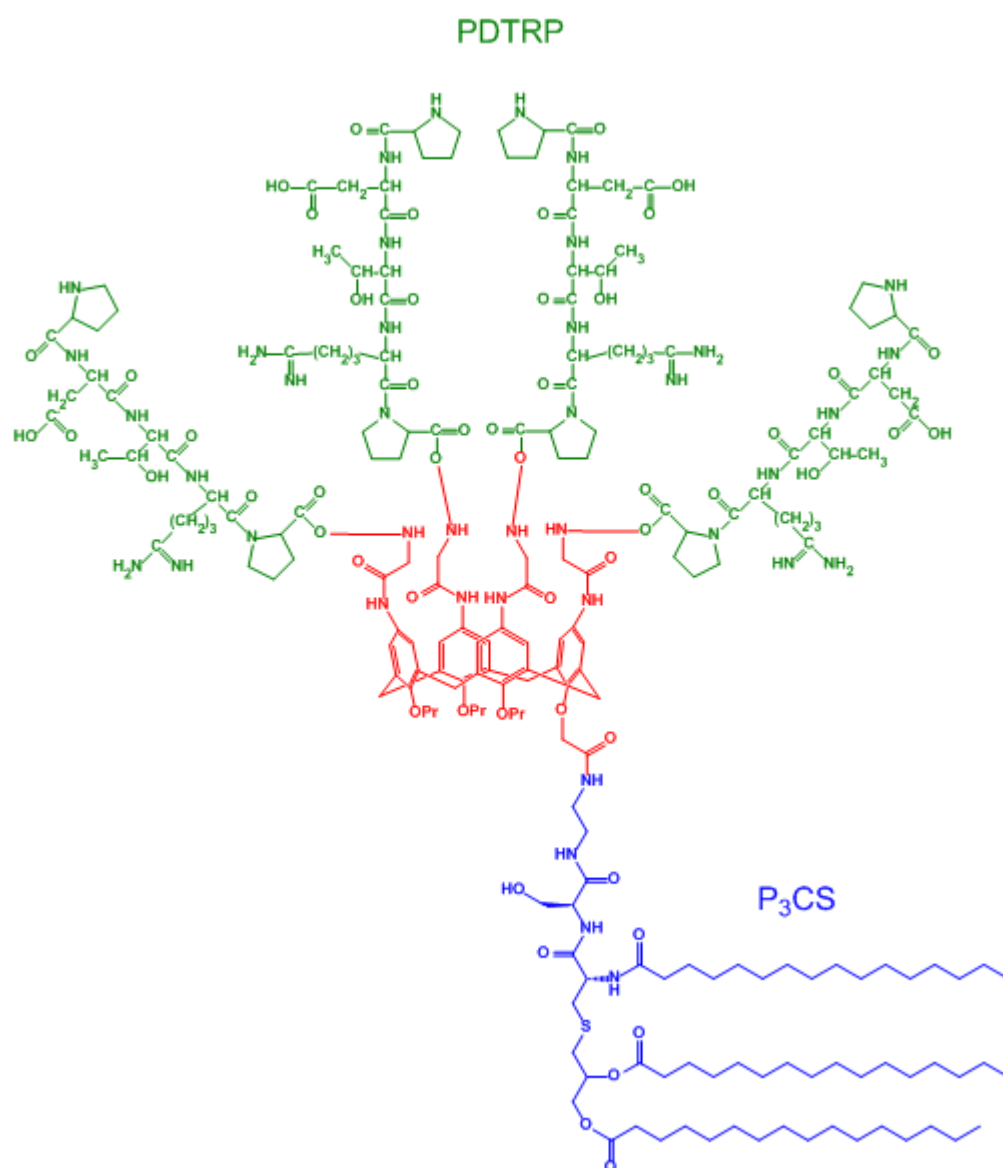


Figura 23. Tetra-PDTRP-Gly-Calix[4]-P₃CS.

2.4.2.1 Tripropilazione del p-terz-butilcalix[4]arene

Il primo step sintetico per la preparazione dello *scaffold* prevede la tri-propilazione degli -OH fenolici al *lower rim* del calix[4]arene, che è stata condotta utilizzando la procedura elaborata e riportata da Shinkai.³⁴

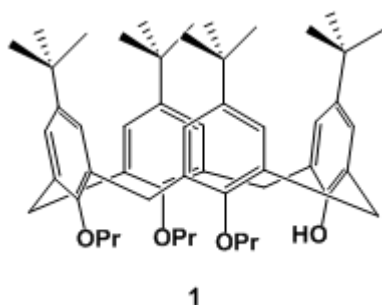


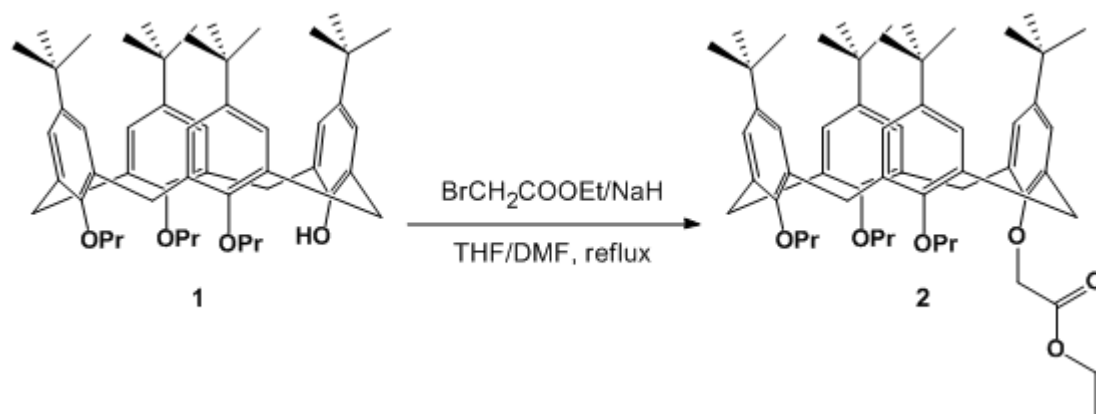
Figura 24: 5,11,17,23-*p*-terz-butil-25,26,27-Tripropossi-28-idrossi-calix[4]arene.

Il *terz*-butilcalix[4]arene è stato sospeso in DMF, la miscela è stata trattata con ioduro di propile in presenza di idrossido e ossido di bario. L'utilizzo di tale base è necessaria per ottenere, come prodotto nettamente preponderante, il derivato tri-sostituito bloccato nella conformazione a cono (figura 24).

La struttura di **1** è stata verificata mediante analisi ¹H-NMR, per confronto con i dati riportati in letteratura.

2.4.2.2 Alchilazione della restante funzione fenolica con BrCH₂COOEt

Il secondo step sintetico è consistito nell'alchilazione della restante funzione fenolica di **1** mediante il trattamento con BrCH₂COOEt.

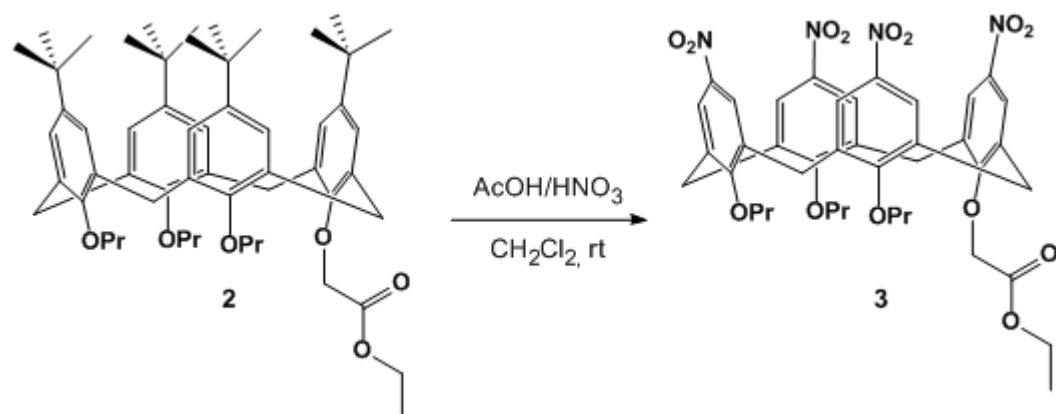


La reazione è stata condotta in presenza di NaH in una soluzione di THF/DMF a temperatura ambiente ed è stata mantenuta in agitazione per 4h.

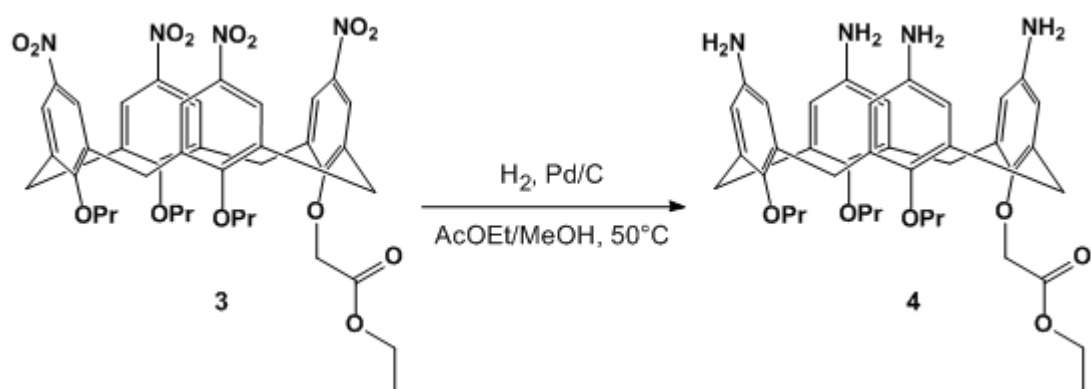
La struttura di **2** è stata verificata mediante analisi ¹H-NMR, per confronto con i dati riportati in letteratura.⁴³

2.4.2.3 Ipso-nitrazione del composto ottenuto e successiva riduzione

Durante questo passaggio di reazione è stato funzionalizzato l'*upper rim* del calixarene mediante la sostituzione elettrofila (*ipso-nitration*) del gruppo *tert*-butilico con un gruppo nitro, per trattamento di **2** con HNO₃ fumante in CH₃COOH/CH₂Cl₂, come rappresentato di seguito.



La struttura di **3** è stata verificata mediante analisi ¹H-NMR, per confronto con i dati riportati in letteratura.⁴³

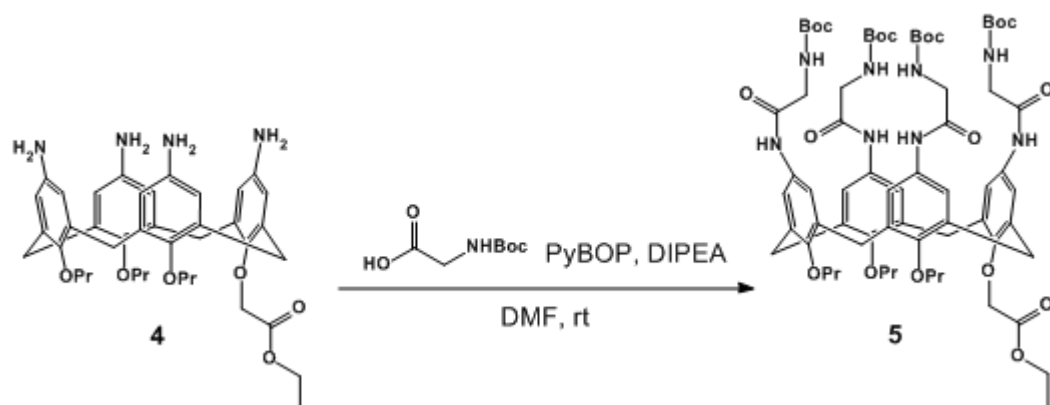


Il composto **4** è stato ottenuto mediante idrogenazione (H₂, 1 atm) catalitica (Pd/C) di **3**.

La struttura di **4** è stata verificata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, per confronto con i dati riportati in letteratura.⁴³

2.4.2.4 *Coupling tra gli ammino gruppi dello scaffold con altrettante unità di glicina N-protetta*

In questo passaggio di reazione è stato sintetizzato l'intermedio **5** mediante reazione di *coupling* del derivato **4** con la glicina protetta all'ammino gruppo con il *tert*-butossicarbonile (Boc).

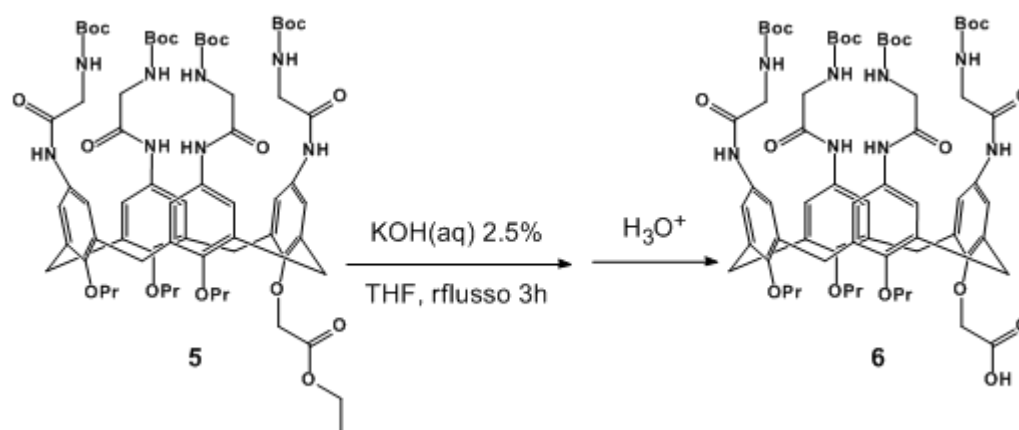


L'agente condensante utilizzato in questa reazione per l'ottenimento del composto **5**, come suggerito da dati sperimentali e di letteratura, è PyBOP in presenza di DIPEA. Si è dunque proceduto all'attivazione della Boc-glicina con PyBOP e DIPEA, ed è stato quindi aggiunto il composto **4** mantenendo la miscela di reazione sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo essere stato allontanato il solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, il trattamento del residuo di reazione con HCl 0.1N (fino a pH circa 4) ha fornito un precipitato che è stato filtrato e lavato con acqua. Dopo purificazione cromatografica, il derivato **5** è stato ottenuto con una resa del 75%.

La struttura di **5** è stata verificata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, per confronto con i dati riportati in letteratura.⁴³

2.4.2.5 Idrolisi alcalina del legame estereo e aggancio dell'immunoadiuvante P_3CS

Il derivato **5** è stato sottoposto ad idrolisi alcalina per liberare la funzione carbossilica del gruppo (etossicarbonil)metossi e renderla così disponibile per il successivo *coupling* con l'immunoadiuvante P_3CS .

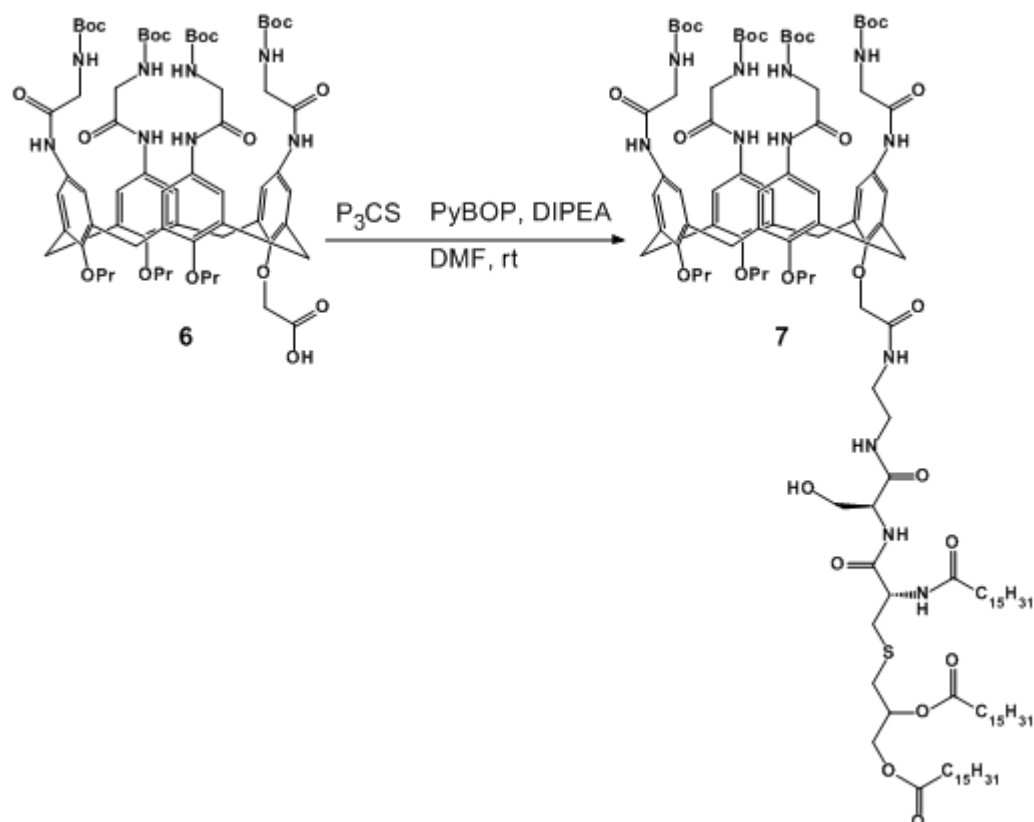


La reazione è stata condotta in THF in presenza di una soluzione acquosa al 2.5% di KOH, a refluxo per tre ore. La reazione è stata bloccata aggiungendo HCl 0.1N. Il derivato **6** è stato estratto in solvente organico (CH_2Cl_2) e portato a secco in vacuum.

La struttura di **6** è stata verificata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, per confronto con i dati riportati in letteratura.⁴³

La formazione del legame ammidico tra il gruppo carbossilico di **6** e la funzione amminica libera del residuo etilendiamminico con cui è funzionalizzato opportunamente il P_3CS

è stata effettuata, anche in questo caso, mediante reazione di *coupling* (PyBOP, DIPEA in DMF), come mostrato di seguito.

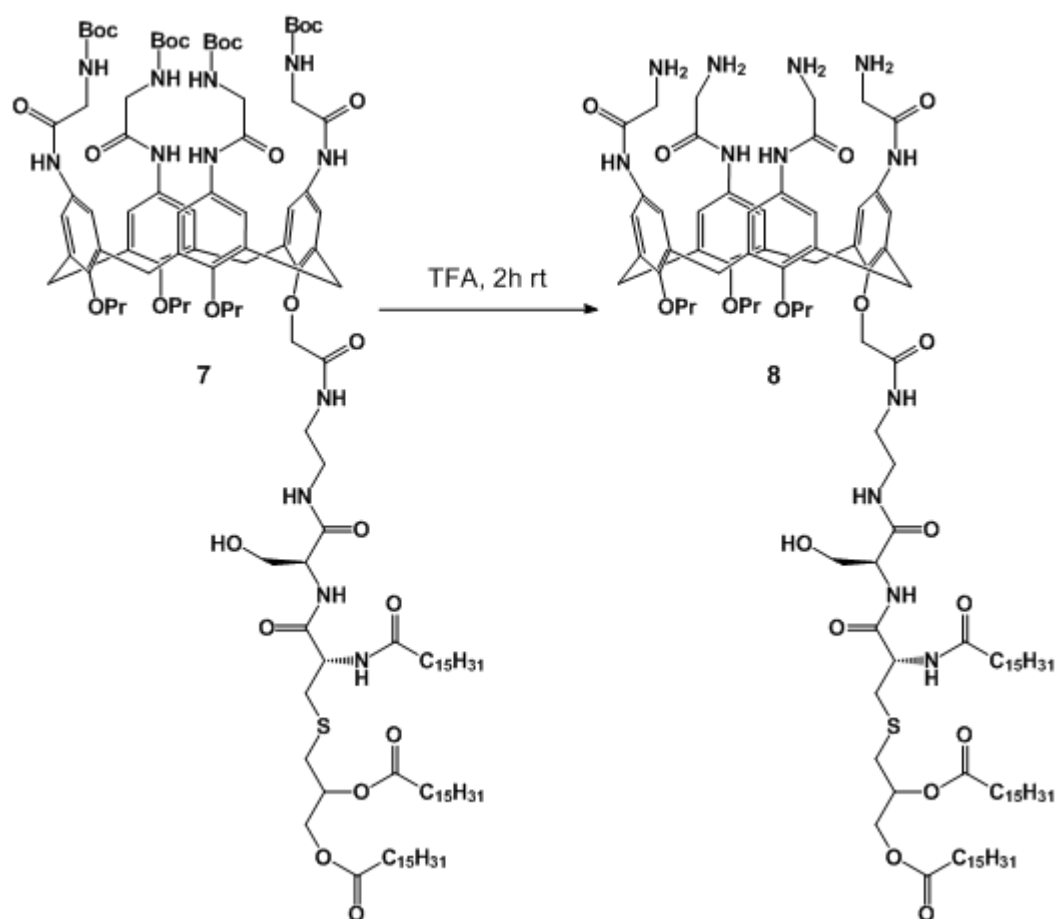


Questo schema rappresenta, dunque, l'attivazione del composto **6** con PyBOP e DIPEA; è stato aggiunto il P_3CS e la risultante miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per tutta la notte. Dopo aver portato a secco la miscela di reazione, è stato aggiunto HCl 0.1 N (fino a pH circa 4). Il derivato **7**, purificato su TLC preparativa, è stato ottenuto con una resa del 63%.

La struttura di **7** è stata verificata mediante analisi 1H -NMR, per confronto con i dati riportati in letteratura.⁴³

2.4.2.6 Deprotezione dei residui di glicina

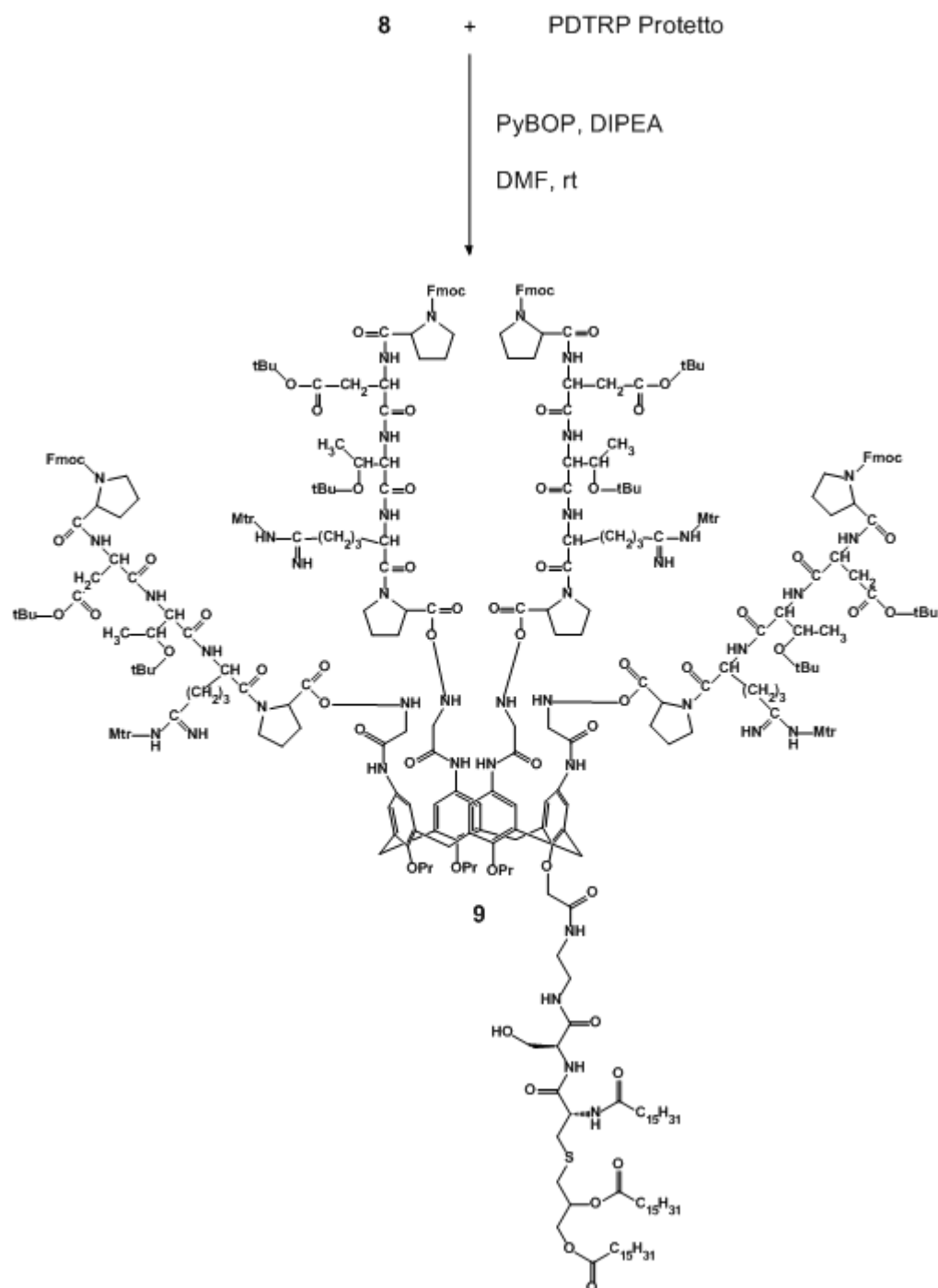
Un passaggio fondamentale, prima di procedere con la coniugazione del pentapeptide con lo *scaffold* calixarenico, è stata la deprotezione del gruppo amminico della glicina che funge da *linker*.



Per la reazione di deprotezione il composto **7** è stato trattato con TFA. Dopo evaporazione della miscela, è stato ottenuto il composto **8**. L'analisi ¹H-NMR di **8** ha dato uno spettro in cui si evince la scomparsa dei segnali a **1.42** e **1.46**, relativi ai gruppi metilici dei gruppi Boc, che erano invece presenti nel composto **7**.

2.4.2.7 Coupling tra i gruppi $-NH_2$ delle glicine ed il carbossile terminale libero del peptide PDTRP, protetto nelle altre funzioni reattive

PDTRP, opportunamente protetto con Fmoc, Mtr e *t*-Bu, è stato attivato con PyBOP e DIPEA (come mostrato nello schema a seguire), in analogia con quanto precedentemente visto per l'introduzione della glicina sulla piattaforma calixarenica. Successivamente è stato aggiunto il composto **8** solubilizzato in DMF e la miscela di reazione è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. La formazione del legame ammidico, tra l'azoto amminico della glicina con il carbossile libero della prolina C-terminale del pentapeptide, ha fornito il composto **9** che è stato purificato su TLC in gel di silice con una resa pari al 68%.



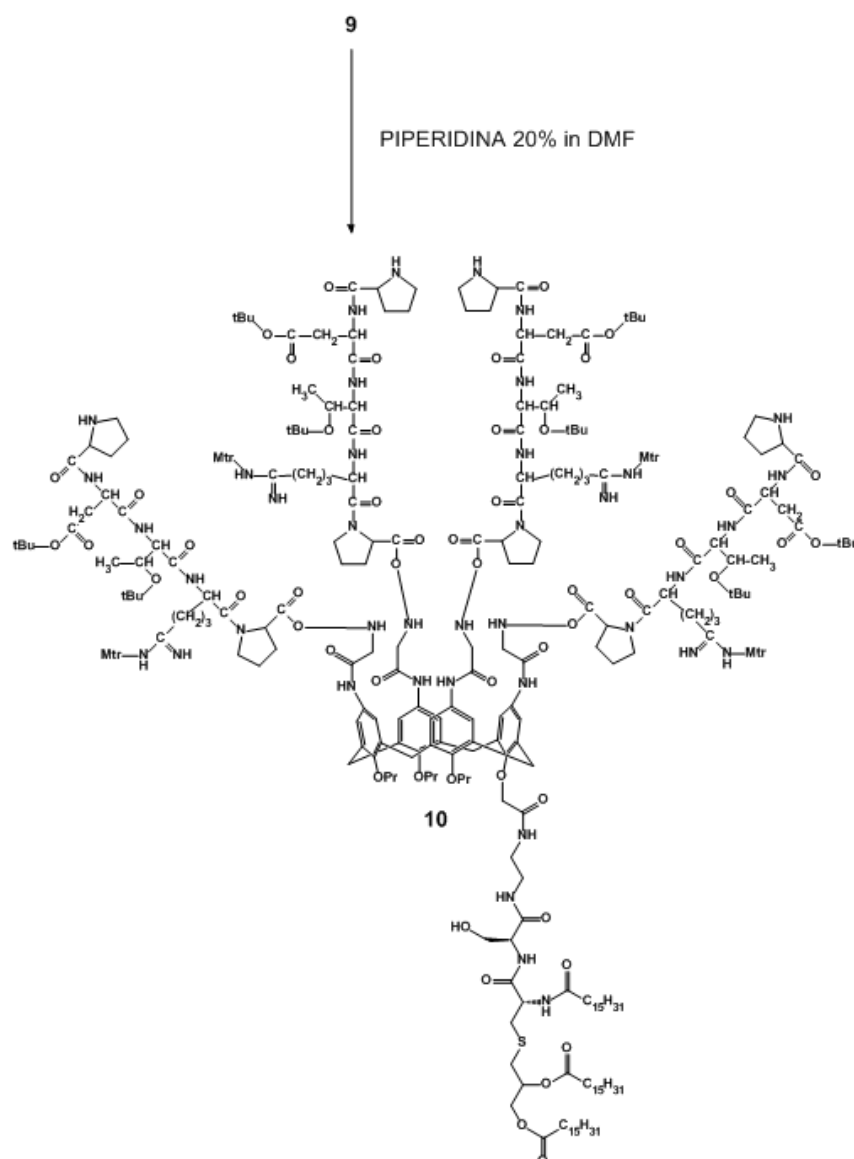
Il composto **9** è stato caratterizzato mediante ^1H -NMR.

Lo spettro di **9** tuttavia è risultato molto complesso, ma alcuni segnali sono risultati diagnostici per confermare l'avvenuta introduzione di quattro gruppi sullo *scaffold* calixarenico, con conformazione bloccata a cono. I segnali in questione sono quelli relativi ai gruppi

protettori del PDTRP, quelli relativi agli ArCH_2Ar del ponte calix[4]arenico, nonché quelli relativi ai palmitoili del P_3CS .

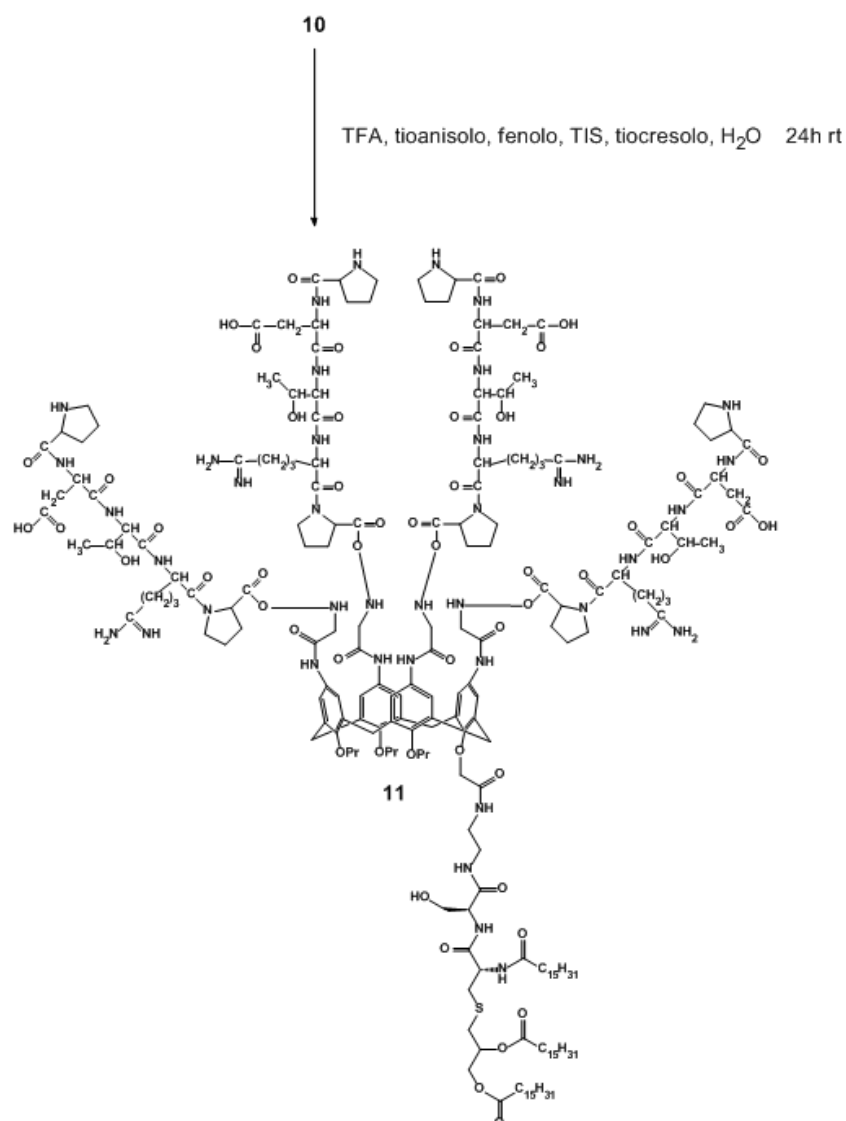
2.4.2.8 Deprotezione e purificazione del derivato peptidico calixarenico sintetizzato

Per la deprotezione di degli amminoacidi delle quattro penta peptidiche di **9** è stato dapprima rimosso il gruppo Fmoc dalle proline *N*-terminali, mediante una soluzione al 20% di piperidina in DMF.



Nelle condizioni basiche di rimozione dello Fmoc gli altri gruppi protettori risultano resistenti alla deprotezione. Dopo purificazione su Sephadex LH20 è stato ottenuto il prodotto **10** con una resa pari al 68%.

I rimanenti gruppi protettori (Mtr e *t*-Bu) sono stati rimossi contemporaneamente con una miscela di TFA, tioanisolo, fenolo, TIS, tiocresolo e acqua, come rappresentato di seguito.



Il prodotto, dopo purificazione su Sephadex LH20, è stato ottenuto in resa del 79%.

L'avvenuto distacco dei suddetti gruppi protettori è stato osservato mediante ^1H -NMR, lo spettro protonico, nonostante sia abbastanza complesso, mostra chiaramente, ad esempio, la scomparsa dei segnali a 6.44 ppm e a 7.22-7.80 ppm relativi rispettivamente ai gruppi Mtr e Fmoc. Un'ulteriore conferma strutturale è stata fornita dallo spettro di massa (MALDI-TOF) che ha mostrato la presenza del picco molecolare a m/z 4182.7 corrispondente al segnale $(M + H)^+$.

2.4.3 SINTESI di Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]-P₃CS

Il calix[8]arene è l'omologo superiore del calix[4]arene a conformazione flessibile. Esso ci ha permesso di sintetizzare un analogo derivato multivalente del potenziale vaccino antitumorale in grado di coniugare ben otto funzioni antigeniche (figura 24). Il calix[8]arene rappresenta un potenziale *scaffold* abbastanza vantaggioso nelle interazioni supramolecolari di tipo adattativo (*induced fit*), proprio per la sua struttura mobile. Diversi dati sperimentali, infatti, ci informano che la flessibilità o la rigidità di un costrutto molecolare possono influenzare la sua attività biologica. Allo scopo di indagare su un eventuale incremento nella risposta immunogenica, la piattaforma calix[8]arenica è stata funzionalizzata in maniera analoga a quanto descritto per lo scaffold calix[4]arenico. La strategia sintetica utilizzata e qui di seguito esposta, anche in questo caso, è stata effettuata secondo metodologia già riportata in letteratura.

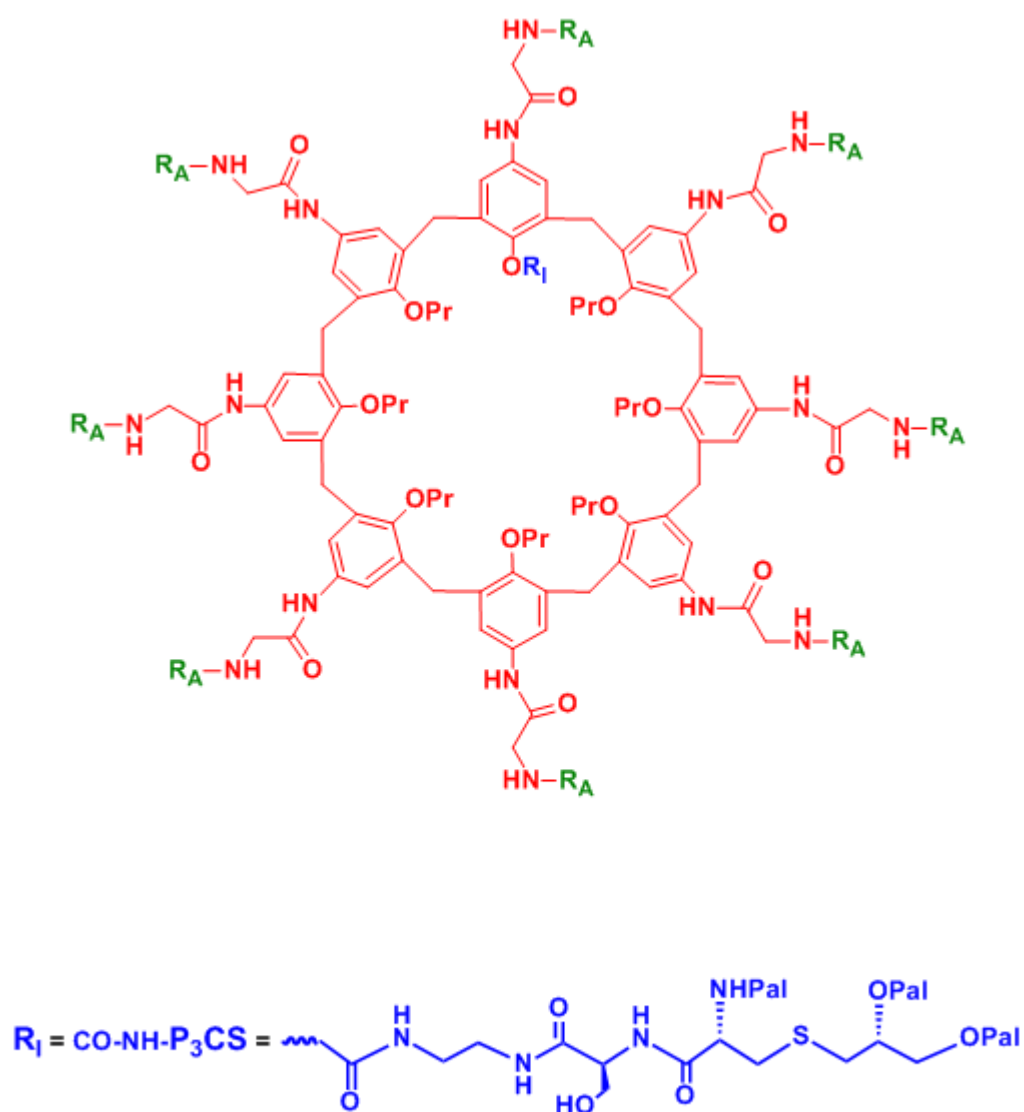
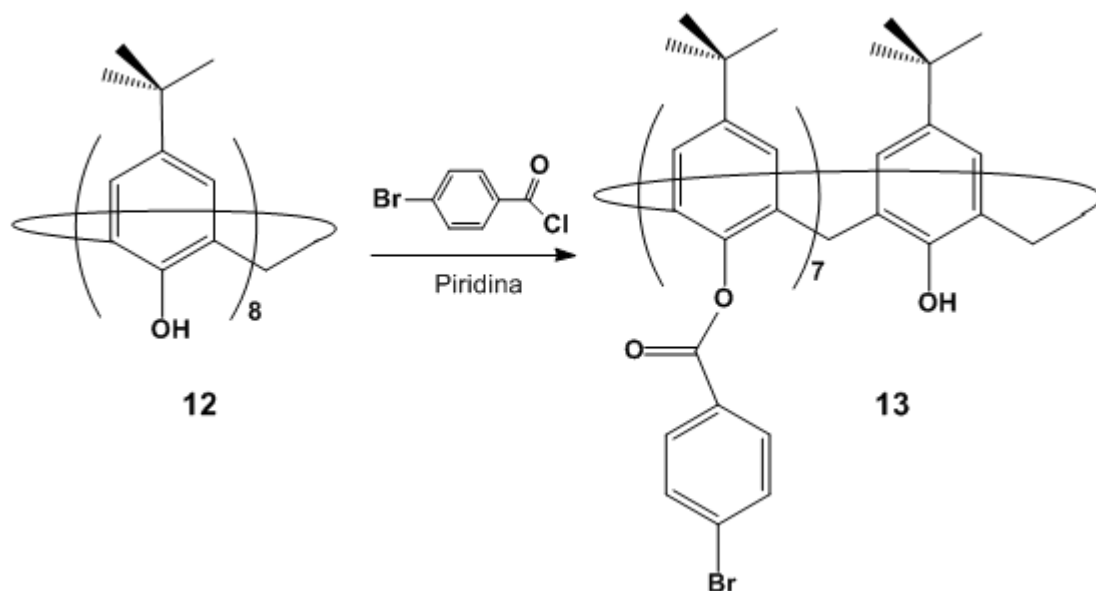


Figura 24. Octa-PDTRP-Gly-Calix[8]-P₃CS.

2.4.3.1 Epta -*p*-bromobenzoilazione del *p*-terz-butilcalix[8]arene

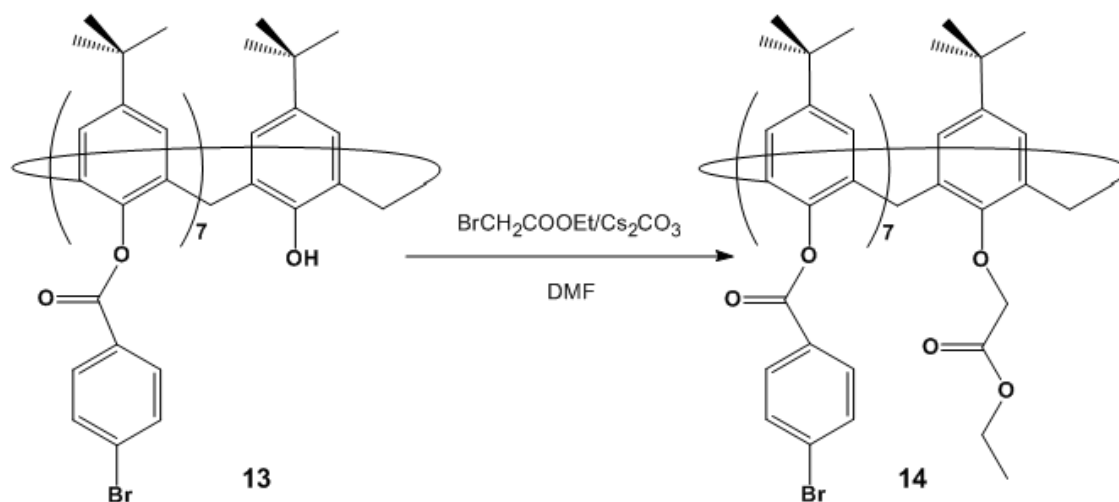
Analogamente alla preparazione della piattaforma calix[4]arenica, anche in questo caso i primi steps sintetici sono consistiti nella funzionalizzazione del *lower rim* del calix[8]arene. Il costruito finale contiene sette gruppi propilici e una funzione (etossicarbonil)metossilica. Sfortunatamente per quanto riguarda calix[8]areni è molto complicato controllare selettivamente l'ingresso dei sostituenti, siano essi al *lower rim* che all'*upper rim*. In particolare nel caso della propilazione al bordo inferiore, la sostituzione esaustiva è favorita rispetto alle funzionalizzazioni parziali. È noto che la reazione del *p*-terz-butilcalix[8]arene (**12**) con il *p*-bromobenzoil cloruro in piridina porta alla formazione selettiva del composto *epta*-sostituito con una resa dell'80%.⁴⁷



Sfruttando questo protocollo si è proceduto alla funzionalizzazione selettiva al *lower rim* del macrociclo che ha portato alla formazione dell'*epta*-bromobenzoil-derivato **13**.

2.4.3.2 Alchilazione della restante funzione fenolica con BrCH₂COOEt

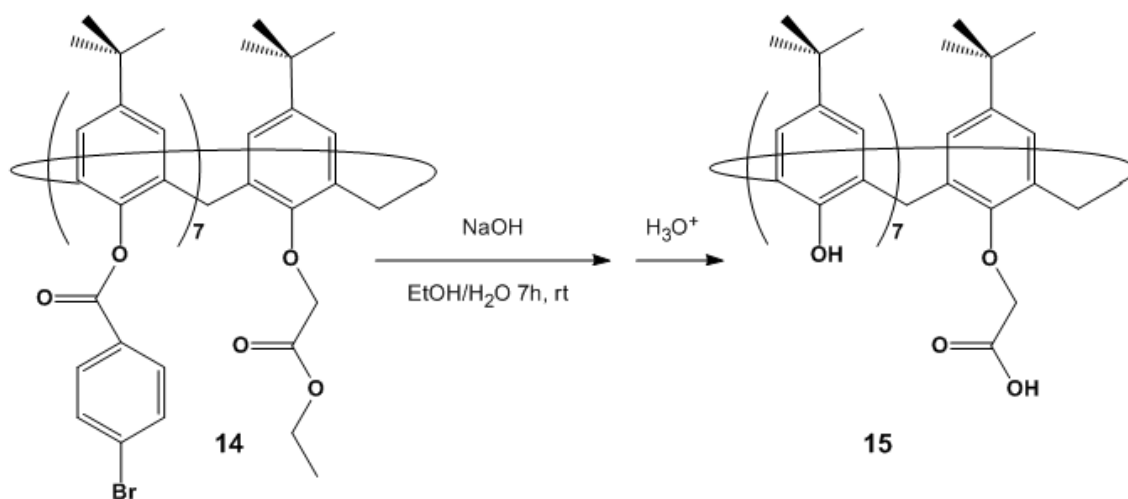
Il prodotto **13** è stato successivamente alchilato nella restante funzione fenolica mediante il reattivo BrCH₂COOEt, come mostrato di seguito.



L'ingresso di tale sostituito generalmente viene condotta in presenza di una base forte, quale NaH. L'utilizzo di tale base però potrebbe provocare il distacco di alcuni gruppi *p*-bromo-benzoilici. Per evitare tali reazioni secondarie, la base è stata sostituita con una più debole, Cs₂CO₃. La struttura di **14** (resa 90 %) è stata verificata mediante analisi ¹H-NMR che, oltre ai segnali relativi alla presenza di sette gruppi -OCOC₆H₄Br, mostra segnali diagnostici che confermano la presenza del gruppo -OCH₂COOEt.

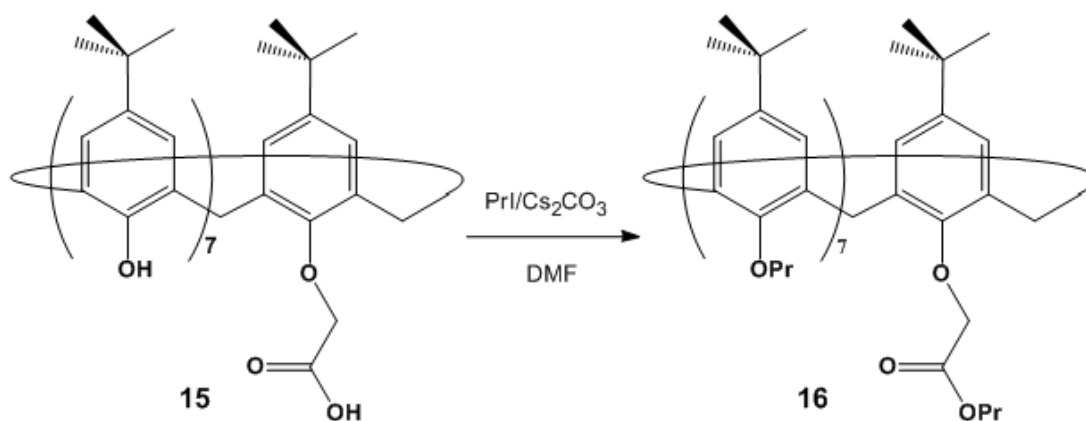
2.4.3.3 Idrolisi basica e trattamento con ioduro di propile

Successivamente **14** viene trattato con una soluzione basica in etanolo/acqua di NaOH (circa al 2%); ciò porta alla liberazione dei gruppi benzoilici e, contemporaneamente, della funzione carbossilica del sostituito (etossicarbonil)metossi, come mostrato di seguito.



Il distacco esaustivo di tutti i gruppi protettori è stato confermato dallo spettro protonico di **15**, nel quale mancano i segnali relativi ai gruppi benzoilici e al gruppo etilico estereo (resa 95 %).

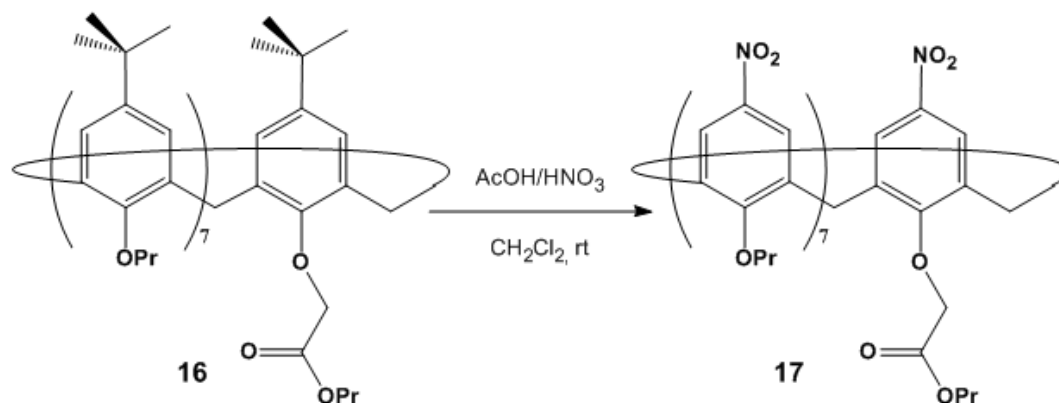
A questo punto **15** è stato trattato con ioduro di propile in presenza di Cs_2CO_3 e ciò ha portato alla formazione del derivato **16** (resa 75 %), la cui struttura è stata confermata mediante analisi ^1H -, ^{13}C -NMR.



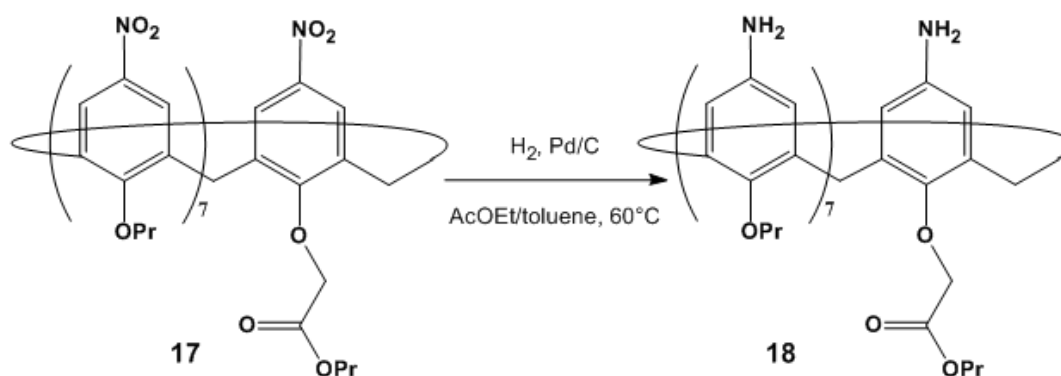
2.4.3.4 Ipso-nitrazione del composto ottenuto e successiva riduzione

In questo passaggio di reazione è stato funzionalizzato l'*upper rim* del calixarene mediante la sostituzione elettrofila (*ipso-nitration*) del gruppo *tert*-butilico con un gruppo nitro,

per trattamento di **16** con HNO₃ fumante in CH₃COOH/CH₂Cl₂, come descritto di seguito (resa 40 %).



Lo spettro ¹H-NMR di **17** ha confermato l'avvenuta nitratura in seguito alla scomparsa dei segnali relativi ai gruppi *terz*-butilici e allo *shift* caratteristico a campi più bassi dei segnali dei protoni aromatici in orto ai nitro-gruppi introdotti. Lo spettro ESI-MS ha mostrato lo ione pseudomolecolare a m/z 1626 (M+Na)⁺.

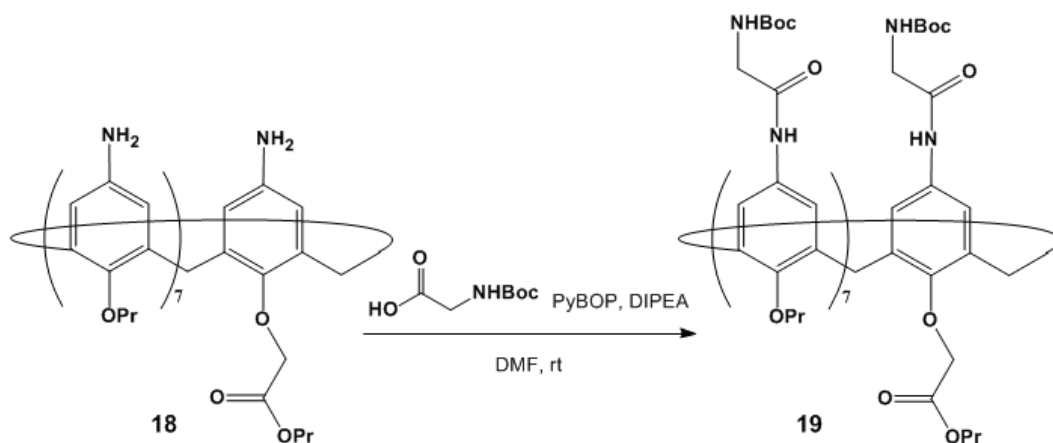


Successivamente si è proceduto con l'idrogenazione (H₂, 1 atm) catalitica (Pd/C) di **3**, per ottenere il composto **18** con una resa pari al 90% (*si veda* 2.4.2.3).

La struttura di **18** è stata verificata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$. Lo *shift* a campi più alti presentato dai segnali dei protoni aromatici in orto al gruppo amminico, rispetto ai corrispondenti segnali presenti nello spettro di **17**, hanno evidenziato l'avvenuta riduzione. Lo spettro ESI-MS ha mostrato lo ione pseudomolecolare a m/z 1364 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2.4.3.5 Coupling tra gli ammino gruppi dello scaffold con altrettante unità di glicina *N*-protetta

Mediante una reazione di *coupling* del derivato **18** con la glicina protetta all'ammino gruppo con il *tert*-butossicarbonile (Boc) viene preparato l'intermedio di sintesi **19**, come mostrato sotto.



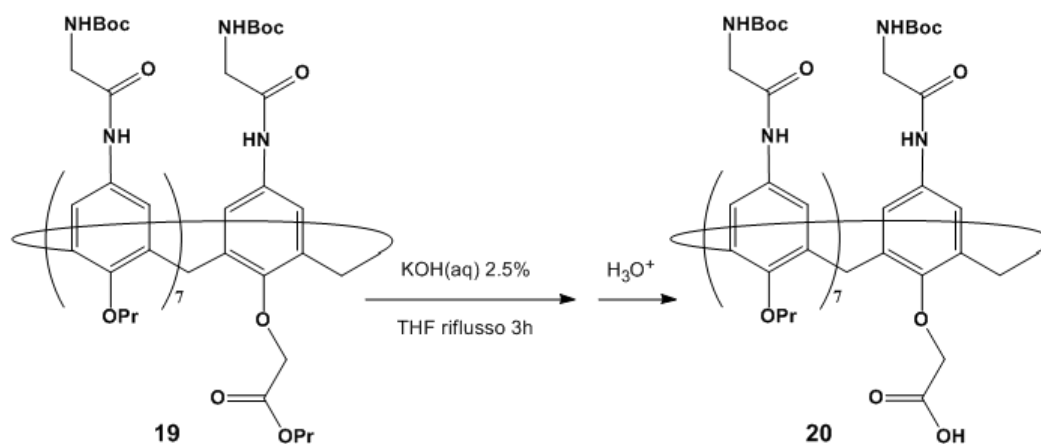
Per la formazione del legame ammidico è stato utilizzato come agente condensante il PyBOP in presenza di DIPEA (in analogia al derivato calix[4]arenico, si veda paragrafo 2.4.2.4). E' stato così attivato il gruppo Boc-glicina con PyBOP e DIPEA, e quindi è stato aggiunto il composto **18** mantenendo la miscela di reazione sotto agitazione a temperatura

ambiente. Dopo essere stato allontanato il solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, il trattamento del residuo di reazione con HCl 0.1N (fino a pH ~ 4) ha fornito un precipitato che è stato filtrato e lavato con acqua. Dopo purificazione cromatografica, il derivato **19** è stato ottenuto con una resa del 75%.

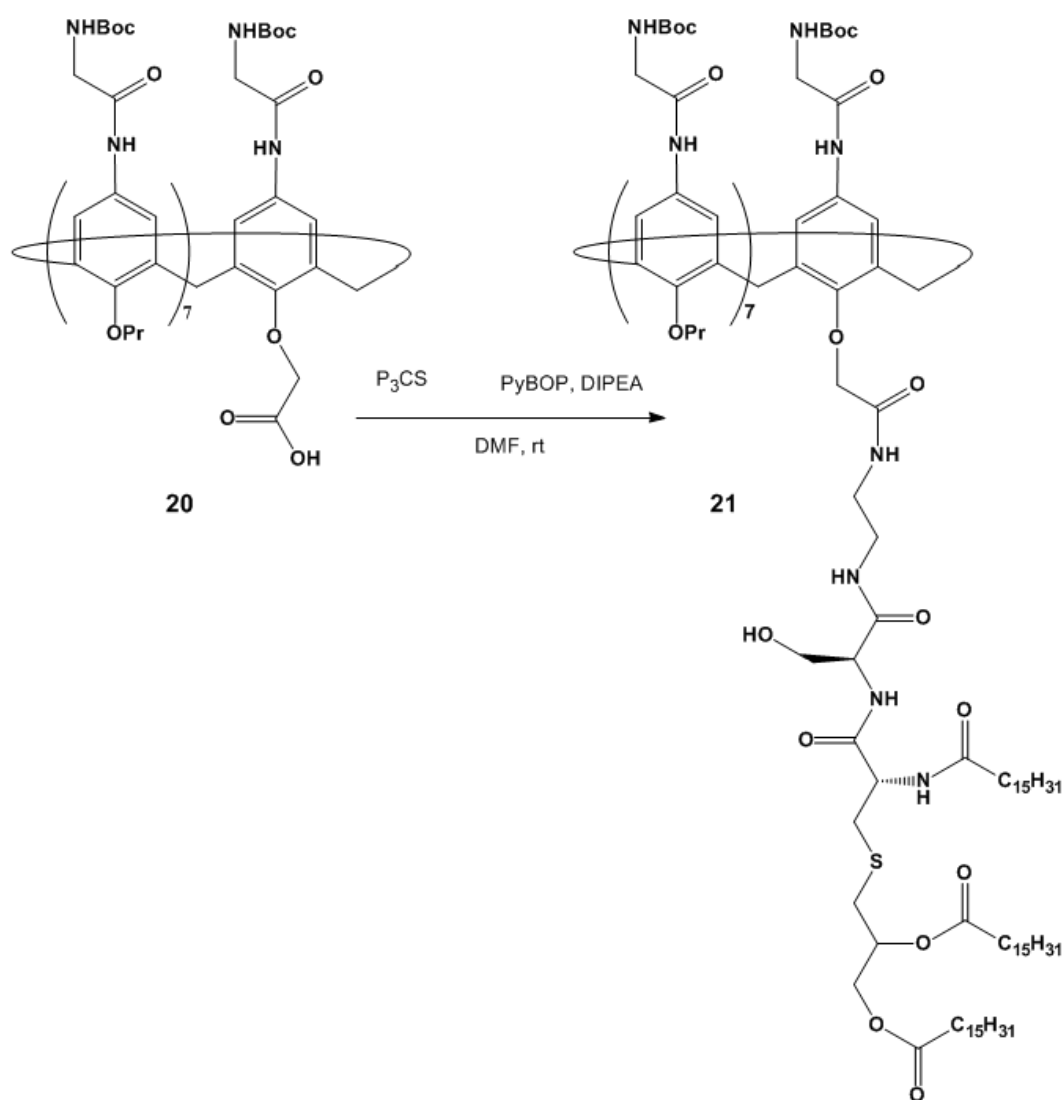
La struttura di **19** è stata verificata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$; dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ è stato possibile accertare l'esauriva funzionalizzazione dell'*upper rim* sulla base dell'integrazione dei segnali a 1.41 ppm relativi ai protoni dei residui $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ del gruppo protettore Boc dell'ammino acido. Inoltre lo spettro ESI-MS ha rivelato un segnale m/z pari m/z 1333 corrispondente allo ione pseudomolecolare $(\text{M} + 2\text{Na})^{2+}$.

2.4.3.6 Idrolisi alcalina del legame estereo e aggancio dell'immunoadiuvante P_3CS

Il derivato **19** è stato sottoposto ad idrolisi alcalina per liberare la funzione carbossilica del gruppo (etossicarbonil)metossi (vedi schema di seguito) e renderla così disponibile per il successivo *coupling* con l'immunoadiuvante P_3CS .



La reazione è stata condotta in THF in presenza di una soluzione acquosa al 2.5% di KOH, a riflusso per tre ore. La reazione è stata bloccata aggiungendo HCl 0.1N. Il derivato **20** è stato estratto in solvente organico (CH_2Cl_2) e portato a secco in vacuo e ottenuto in resa del 95%. La formazione del legame ammidico tra il gruppo carbossilico di **20** e la funzione amminica libera del residuo etilendiamminico con cui è funzionalizzato opportunamente il P_3CS è stata effettuata, anche in questo caso, mediante reazione di *coupling* (PyBOP, DIPEA in DMF).

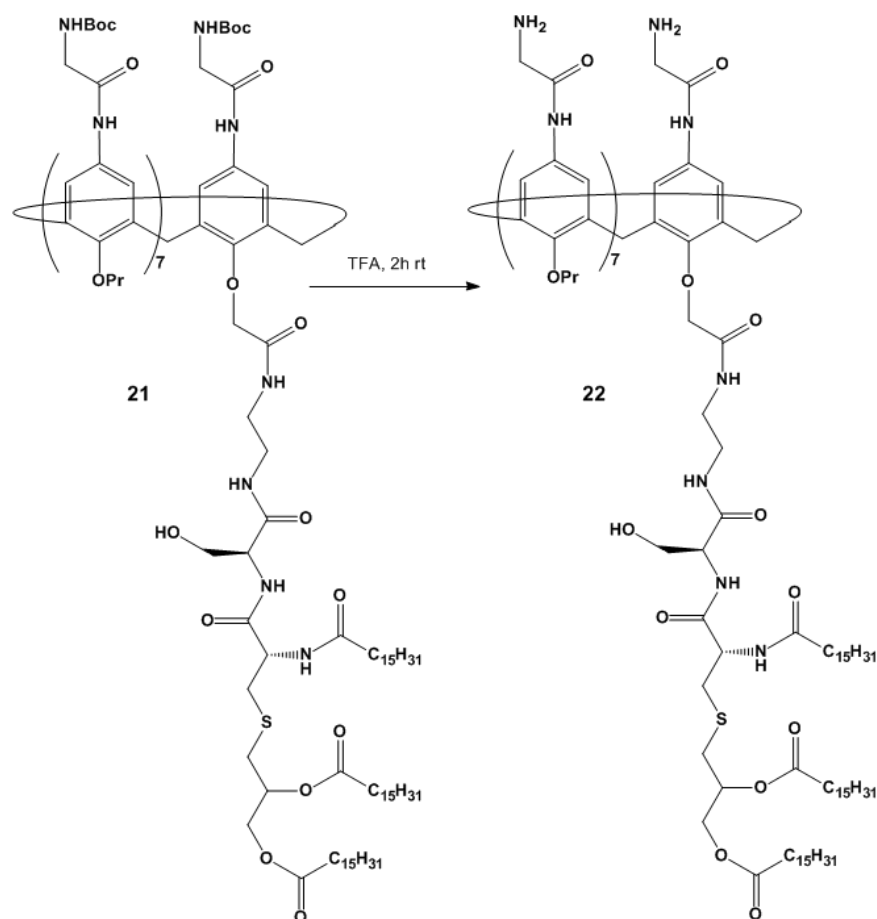


Si è proceduto pertanto all'attivazione del composto **20** con PyBOP e DIPEA; quindi è stato aggiunto il P₃CS e la risultante miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per tutta la notte. Dopo aver portato a secco la miscela di reazione, è stato aggiunto HCl 0.1 N (fino a pH ~ 4). Il derivato **21**, purificato su colonna cromatografica in gel di silice, è stato ottenuto con una resa del 84%.

La struttura di **21** è stata verificata mediante analisi ¹H-NMR. Lo spettro ¹H-NMR è risultato complesso, in quanto presentava segnali molto allargati e in alcuni casi sovrapposti. Tuttavia con l'aiuto di tecniche NMR monodimensionali (¹H-, ¹³C-NMR e DEPT) e bidimensionali (COSY, HSQC, HMBC), è stato possibile effettuare la completa caratterizzazione di **21**.

2.4.3.7 Deprotezione dei residui di glicina

Prima di coniugare il pentapeptide allo *scaffold* calixarenico è stato necessario deproteggere il gruppo amminico della glicina che funge da *linker*.



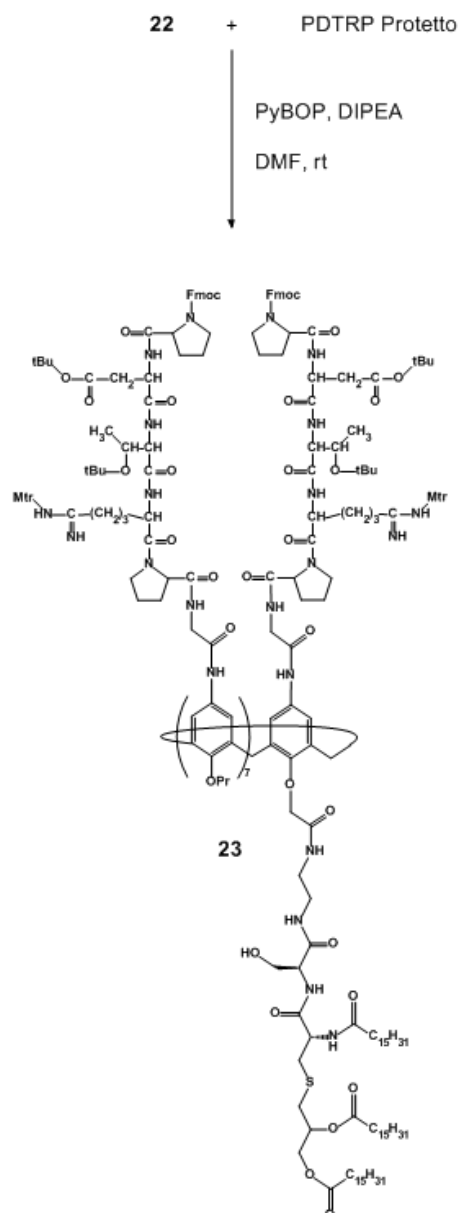
Per la reazione di deprotezione il composto **21** è stato trattato con TFA. Dopo evaporazione della miscela è stato ottenuto il composto **21** in resa quantitativa.

La rimozione dei gruppi Boc è stato confermato dalla sparizione delle risonanze a 1.39 ppm nello spettro ¹H-NMR del composto **21** e dalla presenza nello spettro di massa MALDI-

TOF di **22** di due picchi diagnostici a m/z 2798.7 e a 2820.7 relativi agli ioni quasimolecolari $(M+H)^+$ e $(M+Na)^+$.

2.4.3.8 *Coupling* tra i gruppi $-NH_2$ delle glicine ed il carbossile terminale del peptide PDTRP protetto nelle altre funzioni reattive

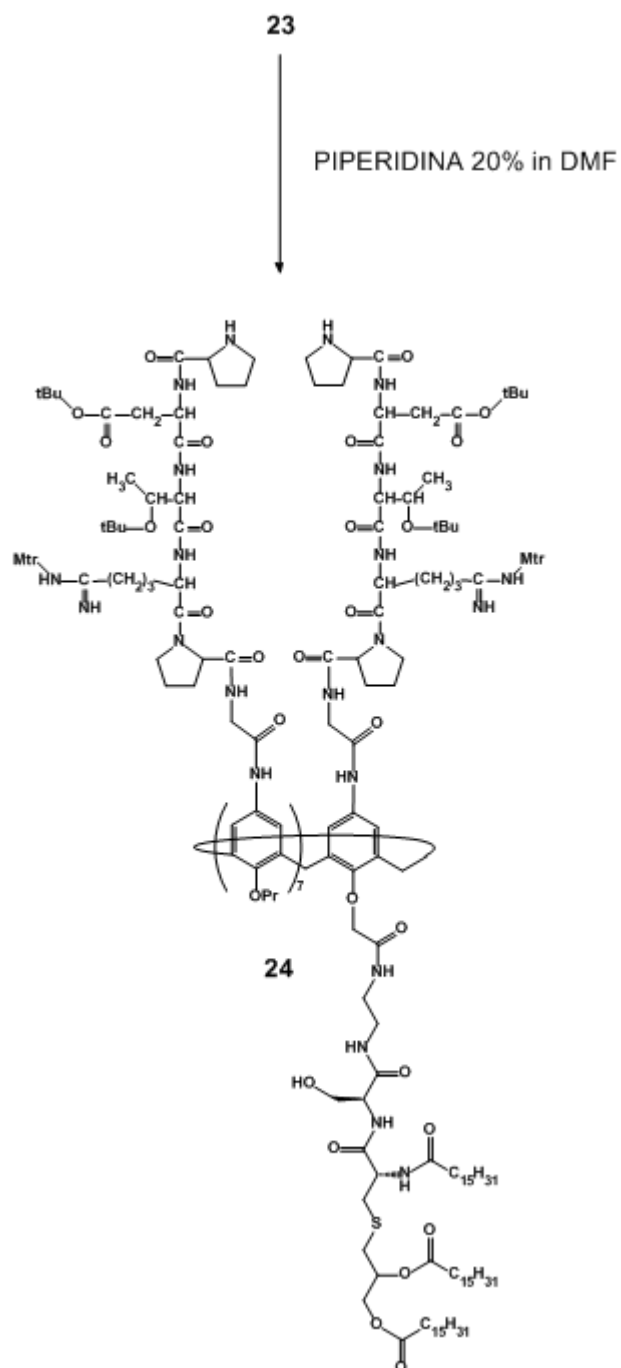
Il pentapeptide PDTRP, sintetizzato precedentemente, opportunamente protetto con Fmoc, Mtr e *t*-Bu, è stato attivato con PyBOP e DIPEA (si veda lo schema di seguito), in analogia con quanto precedentemente visto per l'introduzione della glicina sulla piattaforma calix[4]arenica (**2.4.2.7**). Successivamente è stato aggiunto il composto **22** solubilizzato in DMF e la miscela di reazione è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. La formazione del legame ammidico tra l'azoto amminico della glicina con il carbossile libero della prolina C-terminale del pentapeptide ha fornito il composto **23** che è stato purificato mediante *gel permeation* prima e su TLC in gel di silice poi, con una resa del 40%.



Il prodotto **22** è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$. Lo spettro, tuttavia, è risultato molto complesso ma alcuni segnali sono risultati diagnostici (quali i segnali dei gruppi protettivi del PDTRP, e i palmitoili del P_3CS) per confermare l'introduzione dei gruppi sullo *scaffold* calix[8]arenico.

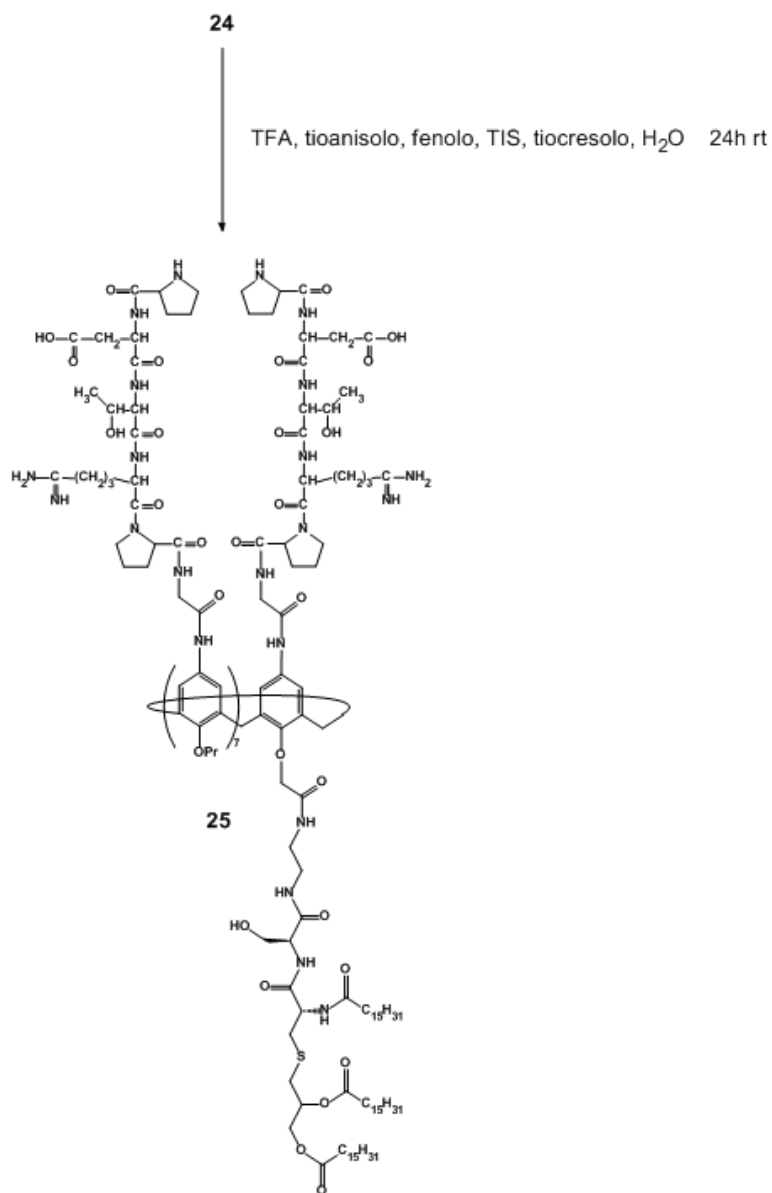
2.4.3.9 Deprotezione e purificazione del derivato peptidico calixarenico sintetizzato

A questo punto si è proceduto con la deprotezione degli AA delle otto catene penta peptidiche del composto **23**. Il primo step di reazione ha previsto la rimozione del gruppo Fmoc dalle proline *N*-terminali, mediante una soluzione al 20% di piperidina in DMF.



Nelle condizioni basiche di rimozione dello Fmoc gli altri gruppi protettori sono resistenti alla deprotezione. Dopo purificazione su Sephadex LH20 è stato ottenuto il prodotto **24** con una resa 91%.

I rimanenti gruppi protettori (Mtr e *t*-Bu) sono stati rimossi contemporaneamente con una miscela di TFA, tioanisolo, fenolo, TIS, tiocresolo e acqua.



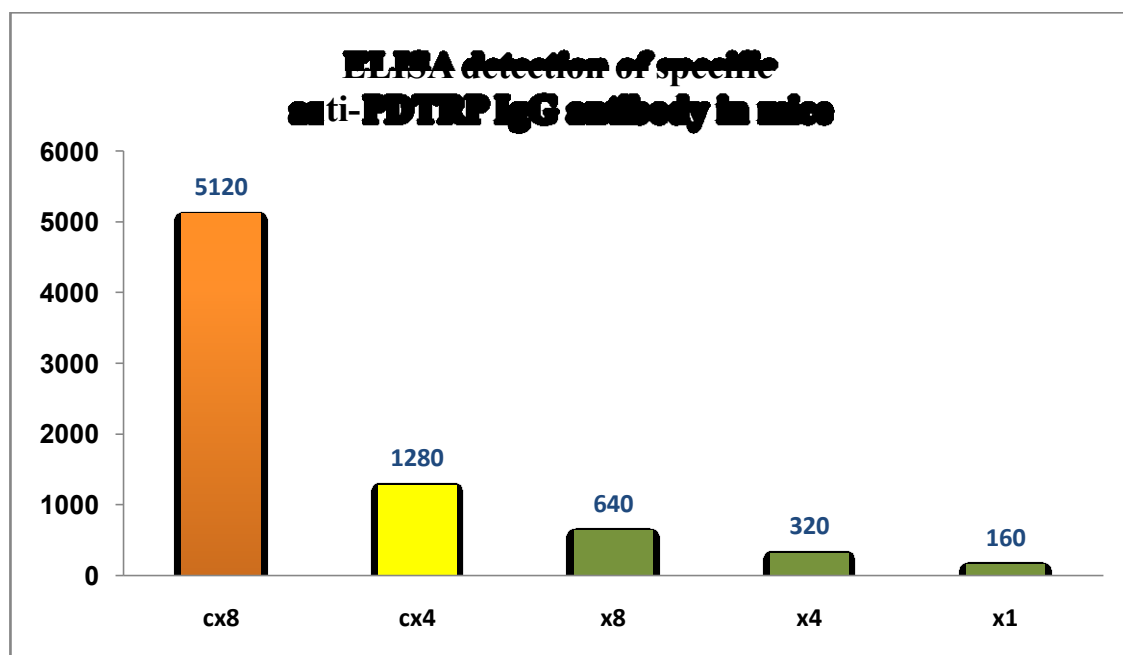
Il prodotto, dopo purificazione su Sephadex LH20, è stato ottenuto con una resa del 82%.

L'avvenuto distacco dei suddetti gruppi protettori è stato osservato mediante ¹H-NMR, lo spettro protonico è abbastanza complesso ma mostra chiaramente, ad esempio, la scomparsa dei segnali relativi rispettivamente ai gruppi Mtr e Fmoc. Purtroppo lo spettro di massa

(MALDI-TOF) ha mostrato oltre alla presenza del picco corrispondente allo ione $[M + 4Na - 3H]^+$ pseudomolecolare a m/z 7417, picchi probabilmente riconducibili ad un epta-derivato del calixarene (cioè con sette gruppi pentapeptidici), per i quali non si è ancora riuscito ad appurare se si tratti di frammentazione avvenute allo spettrometro di massa e/o di impurezze dovute alla parziale e/o non totale funzionalizzazione del derivato **22** durante la reazione di *coupling* con il PDTRP protetto.

2.5 VALUTAZIONE BIOLOGICA

Le prove biologiche sono state effettuate somministrando agli animali (topi BALB/c femmina) i costrutti sintetizzati e andando a dosare mediante test Elisa gli anticorpi specifici anti-PDTRP.⁴⁸ In particolare, sono stati confrontati i costrutti P₃CS-calix[8]arene-PDTRP e P₃CS-calix[4]arene-PDTRP con il vaccino monomerico sintetizzato precedentemente dal nostro gruppo di ricerca. Gli animali impiegati sono stati suddivisi in 5 gruppi e sono state effettuate 2 immunizzazioni per gruppo, tramite iniezione intraperitoneale, a distanza di una settimana l'una dall'altra: un gruppo è stato trattato con il costrutto ottamerico (0.030 µm/mouse), uno con il costrutto tetramerico (0.030 µm/mouse) e gli altri tre gruppi con il costrutto monometrico a tre diversi livelli di concentrazione (0.030, 0.120 e 0.240 µm/mouse). Tre gruppi aggiuntivi sono stati invece trattati con il veicolo e gli scaffold calixarenici privi di immunoadjuvante e antigene PDTRP. Dopo 21 giorni dalla prima immunizzazione sono stati prelevati i sieri e conservati a -80°C. Successivamente è stata effettuata la determinazione degli anticorpi specifici anti-PDTRP mediante ELISA.⁴³⁻⁴⁸ La determinazione degli anticorpi è stata effettuata mediante la tecnica “*End Point Titers Elisa*” che consente di identificare e quantificare gli anticorpi totali specifici IgG. L'*end point titer* viene definito come la diluizione più alta che produce un valore di assorbanza doppio rispetto a quello ottenuto dal gruppo di topi controllo non immunizzati, con un valore di *cut-off* di 0.05.⁴⁹ I risultati degli esperimenti ELISA per la valutazione degli anticorpi specifici anti-PDTRP sono riportati in figura 25.



COSTRUTTO	IgG anti-PDTRP
CX8	5120
Mono x8	640*
CX4	1280
Mono x4	320*
Mono x1	160

*CX8 vs CX4 $p=0.132$ (two samples rank test). All other comparisons were significant ($p<0.05$).

Figura 25. Dosaggio ELISA di IgG anti-PDTRP.

Il derivato ottamerico P₃CS-calix[8]arene-PDTRP si è dimostrato più attivo in maniera statisticamente significativa ($p<0.05$) sia rispetto al derivato tetramerico (4-volte più attivo) che rispetto al costrutto monomerico somministrato alla stessa concentrazione molare (32-volte). La maggiore attività del derivato ottamerico, rispetto a quella del costrutto monomerico, si è

mantenuta anche quando la concentrazione di quest'ultimo è stata incrementata di 8 volte in modo da confrontare lo stesso numero di unità antigeniche, in questo caso l'incremento di produzione di anticorpi specifici è stato 8-volte superiore.

Il derivato tetramerico si è dimostrato più attivo in maniera significativa ($p < 0.05$) rispetto al derivato monomerico, somministrato alla stessa concentrazione molare, con un incremento di 8-volte nella produzione di anticorpi specifici. Quando la concentrazione del derivato monomerico è stata aumentata di 4 volte, in modo da confrontare lo stesso numero di unità antigeniche, il costrutto tetramerico si è dimostrato 4-volte più attivo.

3. CONCLUSIONI

Questi risultati suggeriscono che il cluster ottamerico dell'epitopo PDTRP, assemblato mediante lo scaffold rigido calix[8]arenico, è riconosciuto efficientemente dal sistema immunitario ed è in grado di stimolare una migliore risposta nella produzione di IgG anti-PDTRP specifiche, rispetto al vaccino tetrameric. Inoltre i dati sopra esposti sono una ulteriore prova a sostegno dell'effetto *clustering* di cui si è parlato nel paragrafo 2.1. Quindi, è ragionevole pensare che il vaccino proposto in questa ricerca è in grado di mimare in maniera efficiente i clusters PDTRP naturali che si riscontrano in vivo sulle cellule tumorali.

Allo stato attuale è in corso una accurata analisi strutturale per caratterizzare in maniera completa la struttura degli addotti finali, inoltre è in corso la sintesi per legare il derivato PDTRP-Tn sui scaffolds calixarenici proposti.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Varki A. *Glycobiology*, 3, 97, (1993).
2. Lis H., Sharon, N. *Eur. J. Biochem.* , 218, 1, (1993).
3. Toyokuni T., Singhal A. K. *Chem. Soc. Rev.*, 231, (1995).
4. Gottschalk A. *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam, (1972).
5. Pigman W., Horton D. *The Carbohydrates, II, B, Academic Press, New York*, p. 677, (1970).
6. Spiro R. G. *Ann. Rev. Biochem*, 39, 599, (1970).
7. Caraway K. L., Hull, S. R. *Glycobiology*, 1, 131, (1991).
8. Springer G.F. *Science*, 224, 1198, (1984).
9. Ragupathi G., Park T.K., Zhang S., Kim I.J., et al. *Angew. Chem. Ed. Engl.*, 36 (1/2), (1997).
10. Toyokuni T., Dean B., Cai S., Boivin D., Hakamori S., Singhal A.K. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 395-396, (1994).
11. Hounsell E.F., Davies M.J., Renouf D.V. *Glycoconjugate Journal*, 13, 19-26, (1996).
12. Springer G. F. *J. Mol. Med.*, 75, 594-602, (1997).
13. Hirohashi S., Clausen, H., Yamada, T., Shimosato, Y. and Hakomori, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7039 -7043, (1985).
14. Osinaga E., Pancino, G., Porchet, N., Mistro, D., Aubert, J.P. and Roseto, A. *J. Tumor Marker Oncol.* 7, 13 -24, (1992).
15. Tollefsen, S.E. and Kornfeld, R. *J. Biol. Chem.* 258, 5172 -5176, (1983).

16. Piller, V., Piller, F. and Cartron, J.P. *J. Biol. Chem.* 261, 14069 -14075. (1986).
17. Galli-Stampino, L., Meinjohanns, E., Frische, K., Meldal, M., Jensen, T., Werdelin, O. and Mouritsen, S. *Cancer Res.* 57, 3214 -3222, (1997).
18. Lo-Man, R., Bay, S., Vichier-Guerre, S., De`riaud, E., Cantacuzene, D. and Leclerc, C. *Cancer Res.*, 59, 1520-1524, (1999).
19. Springer, G. *Crit. Rev. Oncogen.* 6, 57 -85, (1995).
20. Schlepper-Schafer, J. and Springer, G. *Biochim. Biophys. Acta* 1013, 266 -272, (1989).
21. Lo-Man R., Bay S., Vichier-Guerre S., De`riaud et al. *Cancer Res.*, 59, 1520 -1524. (1999).
22. Springer, G., *J. Mol. Med.*, 75, 594 -602, (1997).
23. Hansen, J.E., Nielsen, C., Arendrup, M., Olofsson, S., Mathiesen, L., Nielsen, J.O. and Clausen, H. *J. Virol.* 65, 6461 – 6467, (1991).
24. Bousquet E., Spadaro, A., Pappalardo, M. S., Bernardini, R., Romeo, R., Panza, L., Ronsisvalle, G. *J. Carbohydr. Chem.*, 19, 527-541, (2000).
25. Catarina E.H., Qiu H., Chend P.D., Bianz Z., et al. *Vaccine*, 14 (5), 412-418. (1992).
26. Grinstead, J. S., et al. *Biochemistry* 41, 9946-9961, (2002).
27. Grinstead J.S., Schuman J.T., Cambell A.P. *Biochemistry*, 42, 14293-14305, (2003).
28. Liu X., et al. *Glycoconjugate Journal*, 12, 607-617, (1995).
29. Burchell J., et al. *Int. J. Cancer*, 44, 691-696, (1989).
30. Fontetot J.D., et al. *Cancer Research*, 53, 5386-5394, (1993).
31. Fondenot J.D., et al. *J. Biomol. Structure Dymanics*, 13, 245-260, (1995).
32. Dokurno P., Bates H. A., Band L. M. D., Stewart et al. *J. Mol. Biol.*, 284, 713-728, (1998).

33. Pappalardo M., Di Marco R., Ronsisvalle G. and Spadaro A. *Bioconjugate Chemistry* (2012) *in press*.
34. Osinaga E., Bay, S., Tello, D., Babino, A., Pritsch, O., Assemet, K., Cantacuzene, D., Nakada, H. and Alzari, P. *FEBS Lett.* 469, 24–28, (2000).
35. Nakada H., Inoue, M., Numata, Y., Tanaka, N., Funakoshi, I., Fukui, S., Mellors, A. and Yamashina, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2495-2499, (1993).
36. Iida, S., Yamamoto, K. and Irimura, T. *J. Biol. Chem.* 274, 10697-10705, (1999).
37. Reddish, M., Jackson, L., Koganty, R., Qiu, D., Hong, W. and Longenecker, B.M. *Glycoconj. J.* 14, 549-560, (1997).
38. Tanaka, N., Nakada, H., Inoue, M. and Yamashina, I. *Eur. J. Biochem.* 263, 27-31, (1999).
39. Ogata, S., Koganty, R., Reddish, M., Longenecker, B.M., Chen, A., Perez, C. and Itzkowitz, S. *Glycoconj. J.* 15, 29-35, (1998).
40. a) Gutsche, C. D. *Calixarenes; Royal Society of Chemistry: Cambridge*, (1989).
b) Vicens, J.; Böhmer, V. *Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Eds., Kluwer: Dordrecht, (1991). c) Böhmer, V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 713, (1995).
41. Rodik, V.R., Boyko, V.I., and Kalchenko, V.I. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1630-1655, (2009).
42. a) Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H., Muthukrishnan, R. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3782, (1981). b) Dhawan, B., Chen, S. I., Gutsche, C. D. *Makromol. Chem.* 188, 921 (1987).
43. Geraci, C., Consoli, G. M. L., Galante, E., Bousquet, E., Pappalardo, M. and Spadaro, A. *Bioconjugate Chem.* 19, 751-758. (2008).
44. Dei, L., LoNostro, P., Capuzzi, G. and Baglioni, P. *Langmuir*, 14 (15), 4143–4147, (1998).
45. Consoli, G.M.L., Cunsolo, F., Geraci, C., Gavuzzo, E. and Neri, P. *Org. Lett.*, 4 (16), 2649–2652, (2002).

- 46.** Iwamoto, K.; Araki, K.; Shinkai, S. *J. Org. Chem.*, 56, 4955, **(1991)**.
- 47.** Consoli G. M. L., Cunsolo F., Piattelli M., Neri P. *J. Org. Chem.*, 61, 2195. (1996).
- 48.** Chu, Y.; Xia M.; Lin, Y.; Li, A.; Wang, Y.; Liu, R.; Xiong, R. *Cancer Gene Therapy*, 13, 510-519. **(2006)**.
- 49.** Davis, L.; Mancini, M.; Michel M.L.; Whalen R. *Vaccine*, 14, 910 **(1996)**.