

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Sintesi e caratterizzazione chimico-biologica  
di nanosistemi a base peptidica ad attività antitumorale**

Relatore: Prof.ssa Marta De Zotti

Dipartimento di Scienze Chimiche

Correlatore: Prof. Vincenzo Amendola

Dipartimento di Scienze Chimiche

Controrelatore: Prof.ssa Elisabetta Schievano

Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureando: Giorgia Di Cintio

Anno Accademico 2021/2022



# INDICE

## ABBREVIAZIONI

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Terapia peptidica</b>	<b>1</b>
1.1.1 Peptidi bioattivi: i peptaibolici	4
<b>1.2 Nanomedicina e nanoparticelle</b>	<b>9</b>
1.2.1 Supporti nanometrici: nanoparticelle d'oro	12
<b>1.3 Tumore al seno: malattia, diagnosi e trattamenti</b>	<b>16</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Sintesi peptidica</b>	<b>20</b>
3.1.1 Sintesi peptidica in fase solida (SPPS)	20
3.1.2 Sintesi peptidica in soluzione	25
3.1.3 Kaiser test	27
<b>3.2 Purificazione del peptide</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Caratterizzazione peptide</b>	<b>29</b>
3.3.1 Cromatografia liquida ad alta prestazione	29
3.3.2 Spettrometria di massa	30
3.3.3 Dicroismo circolare	32
<b>3.4 Sintesi di nanoparticelle d'oro: ablazione laser in liquido (LAL)</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Caratterizzazione nanoparticelle</b>	<b>36</b>
3.5.1 Spettrometria ad assorbimento UV-Vis	36
3.5.2 Dynamic Light Scattering (DLS)	37
<b>3.6 Funzionalizzazione dei peptidi sulle nanoparticelle</b>	<b>38</b>
<b>3.7 Caratterizzazione dei nanosistemi a base peptidica</b>	<b>38</b>
3.7.1 Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)	38
<b>3.8 Linee cellulari</b>	<b>39</b>
3.8.1 MDA-MB-231	40
3.8.2 MCF10A	41
<b>3.9 Analisi <i>in vitro</i></b>	<b>41</b>
3.9.1 Saggio di vitalità MTS	42

3.9.2 Analisi Citofluorimetrica	43
<b>4. RISULTATI</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi</b>	<b>44</b>
4.1.1 Peptide1	44
4.1.2 Peptide3	47
4.1.3 Peptide3-FITC	49
4.1.4 Peptide3-Lipoico	52
4.1.5 Peptide 2	54
4.1.6 Peptide4	57
4.1.7 Peptide4-FITC	59
4.1.8 Peptide4-Lipoico	62
<b>4.2 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle</b>	<b>66</b>
4.2.1 Nanoparticelle d'oro	66
<b>4.3 Funzionalizzazione dei peptidi su AuNPs e caratterizzazione</b>	<b>67</b>
<b>4.4 Risultati del saggio MTS</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Risultati di citofluorimetria</b>	<b>76</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>78</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>80</b>

## ABBREVIAZIONI

aa	Amminoacido
ACN	Acetonitrile
Aib	acido $\alpha$ -amminoisobutirrico
Boc	tert-butossicarbonile
CD	Dicroismo circolare
DCM	Diclorometano
DIC	N,N-Diisopropilcarbodiimmide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium with nutrient mixture F-12
DMF	N,N- Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
EDT	Etanditiolo
ESI	Electron Spray Ionization
EtO <sub>2</sub>	Etere dietilico
EtOH	Etanolo
FBS	Foetal Bovine Serum
FITC	5/6-Fluoresceina isotiocianato
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
HFIP	1,1,1,3,3,3-esfluoroisopropanolo

HOBt	1-idrossibenzotriazolo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Horse Serum
IR	Infrarosso
LC-MS	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
Lol	leucinolo
MeCN	Acetonitrile
MeOH	Metanolo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazolio
MW	Peso molecolare
NMM	N-metil morfolina
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O.N.	Over night
Oxyma pure	Etil cianoidrossi immينو acetato
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Glicole polietilenico
RPC	Reverse Phase Chromatography
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodio dodecilsolfato
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis

TEA	triethylamina
TEM	Transmission Electron Microscope
TFA	Acido trifluoroacetico
TFE	trifluoroetanolo
TIS	triisopropilsilano
TLC	Thin layer chromatography

## ABSTRACT

La terapia peptidica sta largamente prendendo piede negli ultimi anni poiché, oltre ad essere economicamente vantaggiosa rispetto alle terapie con anticorpi monoclonali comunemente in uso, offre la possibilità di sviluppare una medicina personalizzata e di sfruttare il trasporto attivo e non solo passivo per raggiungere il target riducendo così il rischio di agire sui tessuti sani. Questa terapia può essere applicata per il trattamento di tumori, malattie genetiche, malattie autoimmuni o problemi infiammatori ma presenta lo svantaggio di non poter essere somministrata per bocca poiché i peptidi sono facilmente degradati dagli enzimi proteolitici. Tra i peptidi bioattivi di origine naturale troviamo i lipopeptaibolici, una classe di peptidi antimicrobici e membrano-attivi che presentano resistenza alla degradazione enzimatica, capacità di interagire in maniera specifica con le membrane plasmatiche ed una struttura elicoidale stabile di tipo misto  $\alpha/3_{10}$ . Il capostipite dei lipopeptaibolici è la Tricogina GA IV, peptide debolmente anfifilico di 11 residui amminoacidici, prodotto dal fungo *Trichoderma longibrachiatum*. Il presente lavoro di tesi è nato con l'obiettivo di sfruttare la membrano-attività di peptaibolici analoghi della Tricogina GA IV e valutarne l'interazione preferenziale con le cellule tumorali rispetto alle cellule sane, per applicazioni future di drug-delivery. I peptidi analoghi sintetizzati nel presente lavoro di tesi sono due: **Api8**, dove il residuo dell'acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico (Aib) in posizione 8 nel peptide wild-type è stato sostituito da un acido 4-amminopiperidin-4-carbossilico (Api); e **Leu4**, dove l'Aib in posizione 4 nel wild-type è stato sostituito con una Leucina (Leu). Questi analoghi sono stati sintetizzati con una combinazione di sintesi in fase solida (SPPS) ed in soluzione, in modo da avere diverse funzionalità all'estremità C-terminale, utili a varie applicazioni: (i) l'estremità C-terminale Leucinolo (Lol) della tricogina nativa è stata sostituita con una Leucina-ammide per abbattere i costi di produzione. Il peptide con estremità ammidica è stato utilizzato per saggiarne la citotossicità. (ii) Il peptide legato alla 5/6-fluoresceina isotiocianato (FITC) è stato utilizzato per analisi di citofluorimetria. (iii) Il peptide legato all'acido lipoico è stato legato a nanoparticelle d'oro (AuNPs) prodotte per ablazione laser ed è stato utilizzato per



valutare l'interazione di questi sistemi con le membrane cellulari e la loro citotossicità. I peptidi sintetizzati sono stati caratterizzati con varie strumentazioni quali HPLC a fase inversa (RP-HPLC), spettrometria di massa (MS), dicroismo circolare (CD). I sistemi nanoparticellari funzionalizzati con peptidi sono stati caratterizzati con spettrometria UV-Vis, Dynamic Light Scattering (DLS) e Transmission Electron Microscopy (TEM). Tutti i sistemi a base peptidica sono stati testati *in vitro* su cellule di adenocarcinoma della ghiandola mammaria (linea MDA-MB-231) e su cellule epiteliali di ghiandola mammaria (linea MCF10A) come controparte sana. La citotossicità dei peptidi e delle nanoparticelle funzionalizzate con i peptidi è stata valutata con il saggio MTS, mentre la loro internalizzazione con la citofluorimetria. Le nanoparticelle d'oro risultano inerti all'interno dell'organismo e, se utilizzate per trasportare un farmaco, possono ridurre la clearance e rilasciarlo in maniera controllata in seguito ad un determinato stimolo. I sistemi a base peptidica individuati in questo lavoro di tesi, presentano un'interazione preferenziale verso le cellule tumorali e introducono un obiettivo a lungo termine: fornire nuovi strumenti terapeutici alternativi ai trattamenti antitumorali classici.

# 1. Introduzione

## 1.1 Terapia peptidica

I peptidi sono sequenze composte da 2 a 50 amminoacidi e possono essere di origine naturale o sintetica. Alcune di queste molecole riescono a regolare e modulare i processi fisiologici, motivo per cui suscitano l'interesse dei laboratori chimici e biologici. Tali peptidi, definiti 'bioattivi', hanno trovato innumerevoli applicazioni, molte delle quali essenziali alla sopravvivenza dell'uomo.

Peptide	Fonte	Introduzione alla clinica	Descrizione della sequenza
Insulina	Isolato da pancreata canina e bovina	1920	Nativo
Ormone adrenocorticotropo (ACTH)	Isolato dalla ghiandola pituitaria bovina e suina	anni '50	Nativo
calcitonina	Isolato dalla ghiandola ultimobranchiale del salmone	1971	Nativo
Ossitocina	Sintetico	1962	Nativo
Vasopressina	Sintetico	1962	Nativo
Octreotide	Analogo sintetico della somatostatina	1988	Analogo octapeptidico ciclico della somatostatina-14
Leuprorelina	Analogo sintetico della gonadorelina	1984	Analogo non peptidico della gonadorelina decapeptide

Figura 1. Primi peptidi bioattivi con applicazione in ambito medico<sup>3</sup>.

Sebbene i primi peptidi siano stati isolati da tessuti di mammifero, è in aumento sul mercato il numero di prodotti sintetici e di prodotti ricombinanti candidati all'uso medico<sup>3</sup>. Selettività, efficacia, sicurezza e tollerabilità sono solo alcune delle caratteristiche dei peptidi nativi e non<sup>1</sup>. Si deve, però, tenere in considerazione l'eventuale instabilità dei peptidi in ambiente fisiologico: aggregazione, digestione enzimatica, riconoscimento da parte del sistema immunitario e clearance, ne riducono il tempo di emivita nel corpo<sup>1</sup>.

Advantages	Disadvantages
High potency	Poor metabolic stability
High selectivity	Poor membrane permeability
Broad range of targets	Poor oral bioavailability
Potentially lower toxicity than small molecules	High production costs
Low accumulation in tissues	Rapid clearance
High chemical and biological diversity	Sometimes poor solubility
Discoverable at peptide and/or nucleic acid levels	

Tabella 1. Vantaggi e svantaggi dei peptidi non nativi applicati in terapia peptidica<sup>2</sup>.

Per migliorare le proprietà fisiche, la stabilità o nascondere i siti di cleavages sono state sviluppate varie strategie come la sostituzione di amminoacidi, ad esempio con i corrispondenti D, l'incorporazione di amminoacidi non naturali, la ciclizzazione o la coniugazione con molecole che ne migliorano la solubilità e la permeabilità (PEG e lipidi) o con supporti che prolungano l'emivita (nanoparticelle)<sup>2 3</sup>.

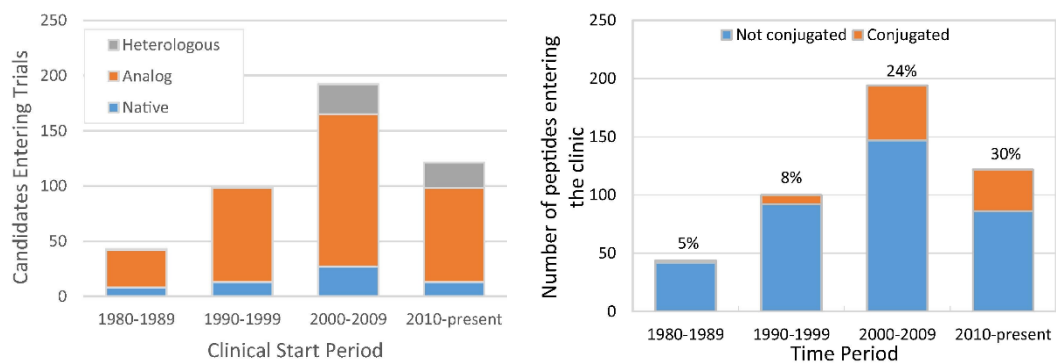


Figura 2. Numero di peptidi candidati all'uso clinico ed in corso di studi: numero di peptidi nativi e non (a sinistra) e percentuale di peptidi coniugati e non (a destra)<sup>3</sup>.

Col tempo si è andati verso una standardizzazione dei protocolli di sintesi, che ha permesso di modulare le proprietà farmacocinetiche e di specificità verso il target secondo le necessità dell'operatore, in maniera facile ed economica.

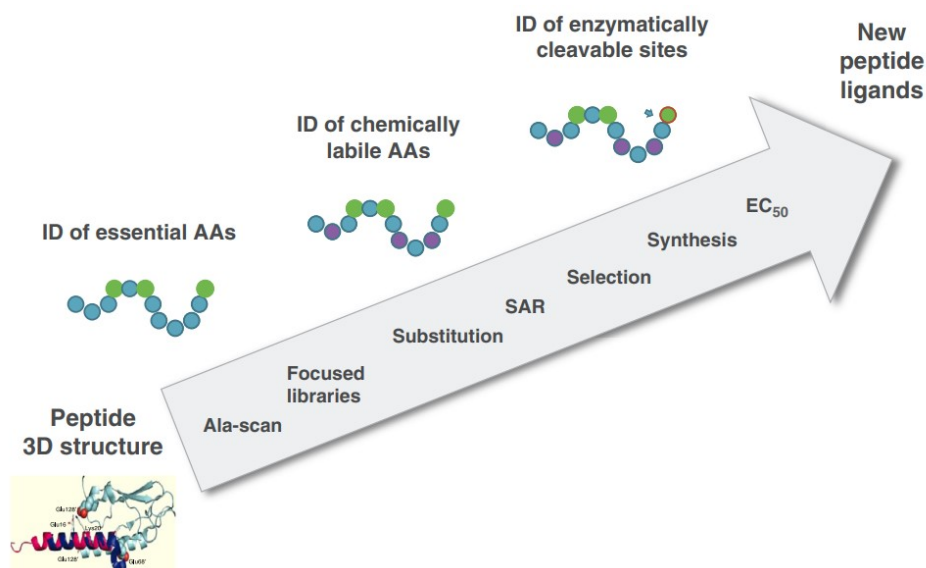


Figura 3. Workflow per la terapia peptidica. Studi in-silico per: sostituzioni amminoacidiche, identificazione della relazione struttura-attività, selezione dei cloni migliori; approccio in laboratorio per: sintesi e test di efficacia del prodotto<sup>1</sup>.

La possibilità di utilizzare queste molecole come biomarcatori (interazione con recettori o proteine), carrier per il drug-delivery o supplementi ormonali le rende adatte alla teranostica per malattie metaboliche, malattie cardiovascolari e malattie oncologiche<sup>3</sup>. Il numero di peptidi utilizzati per applicazioni cliniche ed in fase di studio per approvazione è aumentato nel corso degli anni e, secondo una statistica del 2017<sup>3</sup>, continuerà ad aumentare. Come recentemente dichiarato nella rivista *Viruses*<sup>4</sup>, ci sono attualmente più di 400 farmaci a base peptidica in via di sviluppo e valutazione ed oltre 60 già approvati per l'uso clinico: vaccini ed anticorpi monoclonali a base peptidica sono sulla via per essere la nuova classe di farmaci.

Year	Technological era	Molecular classes and/or approaches	Regulatory environment
1960	Chemistry	Natural products, screening, rational design	Activity paramount
1980	Molecular biology	Biologics (insulin, growth factors, EPO)	↓ Safety paramount
2000	Genome & proteomics	New target identification and validation	
2020	Peptide drugs? Plant factories?	Personalized medicine Increased specificity Cheaper manufacture	

Tabella 2. Variazione dei trends nel design dei farmaci peptidici<sup>2</sup>.

### 1.1.1 Peptidi bioattivi: i peptaibolici

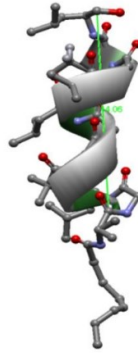
Un'arma che negli ultimi anni ha attratto sempre più l'attenzione delle case farmaceutiche è costituita dai peptidi bioattivi. I peptidi antimicrobici vengono prodotti da tutti gli organismi come prima difesa contro i patogeni ma svolgono anche altri ruoli come la chemiotassi e la funzione immuno-modulatoria <sup>8</sup>. Tra questi vi sono i lipopeptaibolici isolati da colture di funghi *Trichoderma longibrachiatum* (*trichogin*), *Trichoderma koningii* (*trikoningins*), *Trichoderma polysporum* (*trichopolyns*), *Trichoderma viride* (*trichodecenins*), *Tolyocladium geodes* (*antibiotics LP 237*) e *Mycogone rosea* (*helioferins*). I lipopeptaibolici identificati mostrano delle similarità a livello della loro sequenza amminoacidica<sup>5</sup>.

<b>TRICHOGIN</b>	GA IV	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	FA-Aib-Gly- <b>Leu</b> -Aib-Gly-Gly- <b>Leu</b> -Aib-Gly-Ile-Lol
	KBI		FA-Aib-Gly- <b>Val</b> -Aib-Gly-Gly- <b>Val</b> -Aib-Gly-Ile-Lol
	KBII		FA- <b>Iva</b> -Gly- <b>Val</b> -Aib-Gly-Gly- <b>Val</b> -Aib-Gly-Ile-Lol
<b>ANTIBIOTICS LP237</b>	F5		FA-Aib-Pro- <b>Tyr</b> -Aib-Gln-Gln-Aib- <b>Etn</b> -Gln-Ala-Lol
	F7		FA-Aib-Pro- <b>Phe</b> -Aib-Gln-Gln-Aib- <b>Aib</b> -Gln-Ala-Lol
	F8		FA-Aib-Pro- <b>Phe</b> -Aib-Gln-Gln-Aib- <b>Etn</b> -Gln-Ala-Lol
<b>TRICHOPOLYNS</b>	I	1 2 3 4 5 6 7 8 9	FA-Pro-AHMO-Ala-Aib-Aib- <b>Ile</b> -Ala-Aib- <b>Aib</b> -AMAE
	II		FA-Pro-AHMO-Ala-Aib-Aib- <b>Val</b> -Ala-Aib- <b>Aib</b> -AMAE
	III		FA-Pro-AHMO-Ala-Aib-Aib- <b>Ile</b> -Ala-Aib- <b>Ala</b> -AMAE
	IV		FA-Pro-AHMO-Ala-Aib-Aib- <b>Val</b> -Ala-Aib- <b>Ala</b> -AMAE
	V		FA'-Pro-AHMO-Ala-Aib-Aib- <b>Ile</b> -Ala-Aib- <b>Aib</b> -AMAE
<b>HELIOFERINS</b>	A	1 2 3 4 5 6 7 8	FA-Pro-AHMO-Ala-Aib-Ile-Ile-Aib-Aib- <b>AAE</b>
	B		FA-Pro-AHMO-Ala-Aib-Ile-Ile-Aib-Aib- <b>AMAE</b>
<b>TRICHODECENINS</b>	I	1 2 3 4 5 6	FA-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly- <b>Ile</b> -Lol
	II		FA-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly- <b>Leu</b> -Lol

Figura 4. Primi lipopeptaibolici identificati e testati. In grassetto, gli amminoacidi che variano tra sequenze simili<sup>5</sup>.

Questa classe di peptidi è stata così nominata per le caratteristiche lipofile dell'estremità N-terminale. In seguito a mutazioni puntiformi nei peptidi wild-type, sono stati identificati gli amminoacidi essenziali per far svolgere alla molecola l'attività membranolitica antimicrobica<sup>6 7</sup>.

Il capostipite dei lipopeptaibolici, su cui si è focalizzato il gruppo di ricerca in cui è stato svolto il presente lavoro di tesi, è la Tricogina GA IV, prodotto da colture di funghi di *Trichoderma longibrachiatum*.



$^0\text{Oct} - ^1\text{Aib} - ^2\text{Gly} - ^3\text{Leu} - ^4\text{Aib} - ^5\text{Gly} - ^6\text{Gly} - ^7\text{Leu} - ^8\text{Aib} - ^9\text{Gly} - ^{10}\text{Ile} - ^{11}\text{Lol}$

Figura 5. Immagine tridimensionale del peptide wild-type Tricogina GA IV e sequenza amminoacidica.

Lo studio della struttura secondaria del peptide wild-type ha permesso di distinguere diverse zone nella sua sequenza amminoacidica<sup>9</sup>:

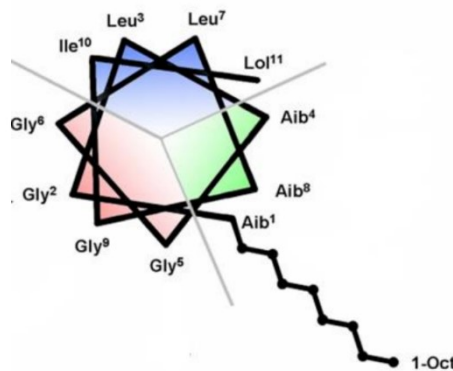


Figura 6. Distribuzione amminoacidica del peptide wild-type Tricogina GA IV nella struttura elicoidale: zona strutturale (verde), zona idrofobica (blu), zona debolmente idrofilica non carica (rosso), catena lipofilica (Oct)<sup>10</sup>.

- zona strutturale dove troviamo tre Aib, amminoacidi non codificati, tetra sostituiti sul carbonio  $\alpha$ : conferiscono rigidità strutturale e sono induttori di strutture secondarie elicoidali<sup>9</sup>. L'ingombro sterico garantisce, inoltre, resistenza alle proteasi<sup>6</sup>;

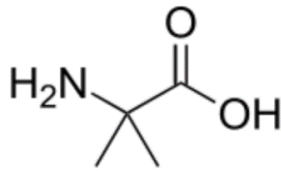


Figura 7. Acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico (Aib)

- zona idrofobica, composta da leucine, un'isoleucina ed un leucinolo. Il Leucinolo è un amminoacolo, ossia una molecola con gruppo funzionale amminico ed alcolico, che limita l'accesso delle proteasi all'estremità C-terminale <sup>9</sup>. La sostituzione del Lol con Leucina ammide aumenta la stabilità dell'elica, perché inserisce un ulteriore legame a idrogeno<sup>10</sup>.

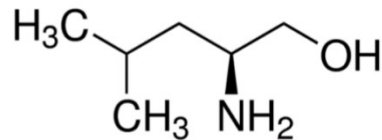


Figura 8. 1,2 –amminoalcol leucinolo (Lol)

- zona debolmente idrofilica, ricca di glicine. La sostituzione di questi amminoacidi con delle lisine aumenta il carattere anfifilico del peptide e ne favorisce la solubilità in acqua. Inoltre, ne aumenta la tossicità. La sostituzione di una delle due glicine in mezzo alla sequenza con un Aib, intensifica la rigidità dell'elica <sup>10</sup>.
- un ottanoile (Oct), catena acilica lunga, che caratterizza i lipopeptaibolici e protegge l'estremità N-terminale dalle proteasi<sup>9</sup>. Garantisce idrofobicità in questa parte del peptide e favorisce l'interazione del peptide con le membrane fosfolipidiche <sup>40</sup>.

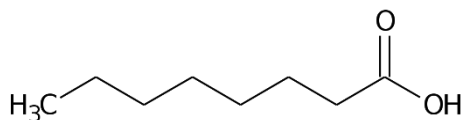


Figura 9. Acido ottanoico (Oct).

Le modifiche alle estremità N e C-terminale influenzano la citotossicità del peptide<sup>11</sup>. Tale peptide ha una lunghezza complessiva di 16 Å <sup>41</sup>, corrispondente a

circa metà dello spessore di un doppio strato fosfolipidico, caratteristica importante in riferimento all'attività antimicrobica che si manifesta come perturbazione della permeabilità delle membrane. Il peptide ha la capacità di legarsi alle membrane cellulari senza la necessità di interagire con uno specifico recettore ed in seguito a studi di dinamica molecolare sono stati distinti due diversi meccanismi di azione:

- modello a tappeto, dove i peptidi si accumulano in maniera parallela alla membrana e portano al disfacimento del doppio strato lipidico con formazione di micelle;
- modello a doghe a botte, dove i peptidi dimerizzano e si dispongono perpendicolarmente all'interno del doppio strato, formando un canale<sup>8</sup>: ioni ed acqua fluiscono nei pori e questo comporta la perturbazione dell'omeostasi della cellula<sup>12</sup>.

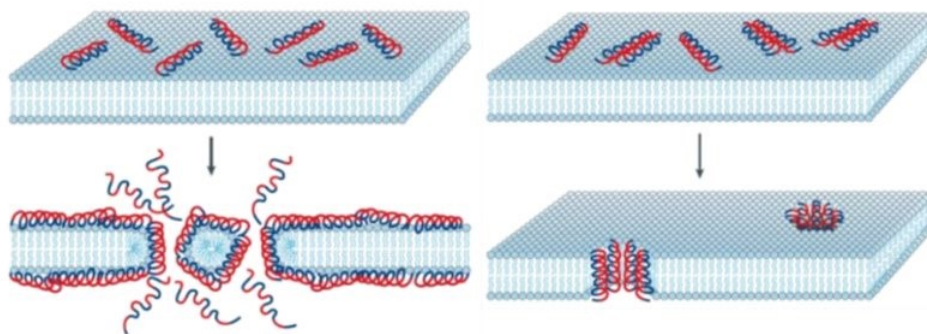


Figura 10. Meccanismi di azione membranolitica della Tricogina GA IV: modello a doghe a botte (a destra) e modello a tappeto (a sinistra).

La dimerizzazione del peptide è associata alla ri-orientazione trans-membrana<sup>12 13</sup> e la sua funzione è stata testata in esperimenti di leakage dove l'induzione della permeabilità delle membrane è associata al rilascio di carbossifluoresceina<sup>14</sup>. Il meccanismo di azione, comunque, non è stato ancora chiarito completamente. Attualmente, si pensa che il meccanismo dipenda dalla composizione della membrana: entrambi sono stati riportati in letteratura, con una prevalenza di osservazioni sperimentali a favore del meccanismo a tappeto.

Per quanto concerne la struttura secondaria, il peptide è caratterizzato da un'elica destrorsa mista  $\alpha$  elica/ elica  $3_{10}$ .



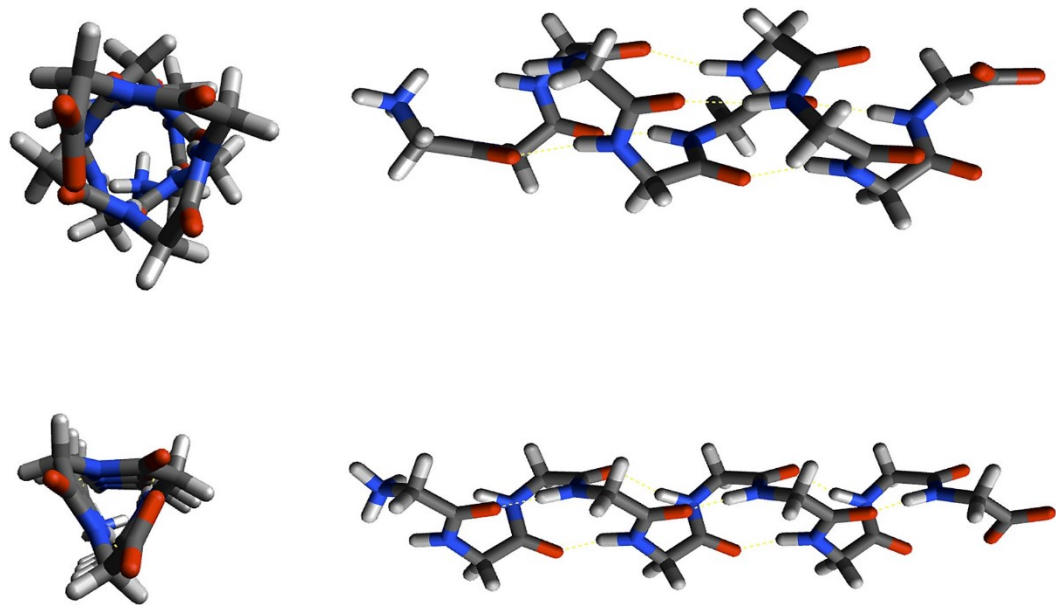


Figura 11. Visione laterale e dall'alto dell' $\alpha$  elica (sopra) e dell'elica  $3_{10}$  (sotto).

La conformazione elicoidale  $3_{10}$ , come l' $\alpha$  elica, è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari. Le due strutture secondarie, però, si differenziano per la distanza di interazione tra l'ossigeno del gruppo carbonilico e l'idrogeno del gruppo ammidico: nell' $\alpha$  elica si ha interazione a quattro amminoacidi di distanza, mentre nella  $3_{10}$  a tre amminoacidi di distanza, risultando in un'elica più stretta ed allungata.

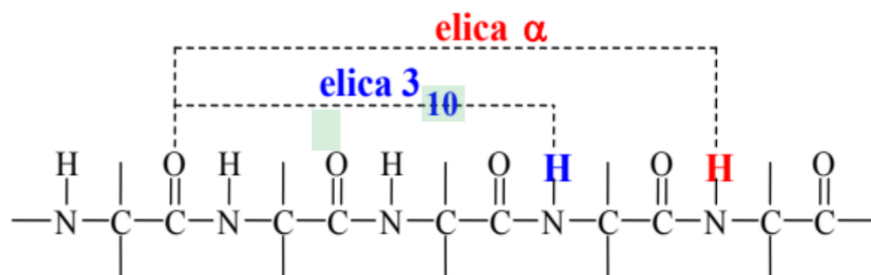


Figura 12. Legame a H dell' $\alpha$ -elica e dell'elica  $3_{10}$

Negli anni sono state valutate delle varianti della tricogina wild-type in particolare col fine di applicarle in abito agricolo per combattere l'azione di funghi nocivi per piante e frutti (es. *B.cinerea*)<sup>7</sup>, ma anche in ambito biologico contro batteri Gram

+ e Gram - (*S.aureus*, *S.epidermis*, *P.aeruginosa*, *E.coli*)<sup>16</sup>. Modificare il backbone del peptide è un approccio che permette di saggiarne le proprietà biochimiche e biofisiche ed offre, inoltre, la possibilità di variarne alcune caratteristiche per ampliarne le applicazioni.<sup>15</sup> Queste varianti, chiamate analoghi, hanno lunghezza compresa tra 4 e 21 amminoacidi. In particolare, il presente lavoro di tesi, si è focalizzato sulla sintesi di:

**PEPTIDE 1: Api8**, peptide ottenuto per sostituzione dell'Aib in posizione 8 con un acido 4-amminopiperidin-4- carbossilico (Api).<sup>9</sup>



**PEPTIDE 2: Leu4**, peptide ottenuto per sostituzione dell'Aib in posizione 4 con una Leucina.



La sostituzione di uno o più Aib ha dimostrato una variazione dell'attività biologica rispetto al peptide wild-type.<sup>6 9</sup> Studi preliminari hanno evidenziato l'inattività di Peptide2 come battericida fino a concentrazioni > 64 mg/mL. Inoltre, l'analogo risulta non tossico verso gli eritrociti umani fino a concentrazioni > 128 mg/mL. Queste caratteristiche, unite alla sua intatta capacità di interagire efficacemente con le membrane, lo rendono un ottimo candidato come trasportatore di farmaci, ad esempio legato a nanoparticelle.

## 1.2 Nanomedicina e nanoparticelle

La nanomedicina si è evoluta velocemente a partire dagli anni '90 grazie allo sviluppo della tecnologia. I nanoterapici sono classificati in base ai materiali utilizzati nelle loro formulazioni per cui distinguiamo cinque macrogruppi: a base lipidica, a base polimerica, a base proteica, a base inorganica e farmaci nanocristallini.

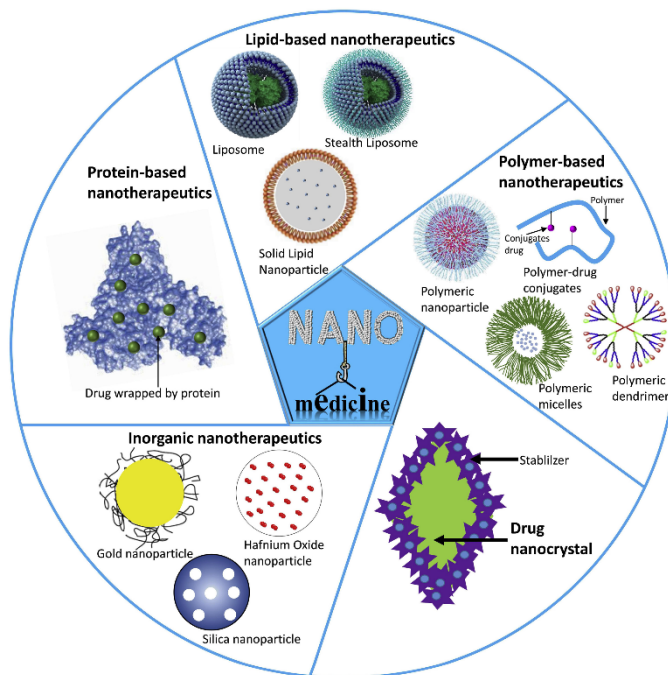


Figura 14. Formulazioni dei nanoterapici attualmente in uso<sup>17</sup>.

Ben 50 composti nanoterapici hanno ricevuto l'approvazione per la commercializzazione da parte di FDA ed EMA per uso clinico e le loro applicazioni spaziano tra terapie per: compensare la mancanza del ferro, trattamenti antifungini, affrontare malattie genetiche rare (es. *Onpattro*), infezioni, maculopatia degenerativa legata all'età (es. *Visudyne*) o trattamenti oncologici<sup>18</sup>.

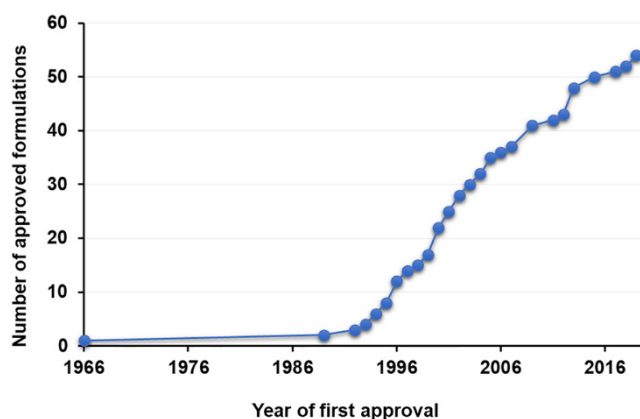
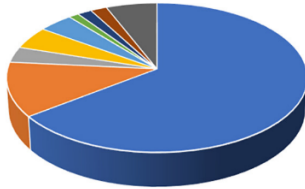


Figura 15. Numero di formulazioni nanomediche approvate negli anni da Food and Drug Administration (FDA) ed Agenzia Europea per i Medicinali (EMA).

Il 65% dei clinical trial dei nanoterapici sono orientati verso l'identificazione precoce dei biomarker del cancro ed il trattamento oncologico mirato col fine di

eradicare la malattia o, anche, di ridurre gli effetti secondari legati ai trattamenti attualmente in corso<sup>19</sup>.

A) Clinical indications in ongoing clinical trials



■ cancer ■ pain/ anesthesia ■ infection ■ other ■ imaging ■ nervous system ■ eye disease ■ genetic disease ■ vaccine

B) Categorization of clinical trials on nanomedicines from 2016 to 2020 according to indication.

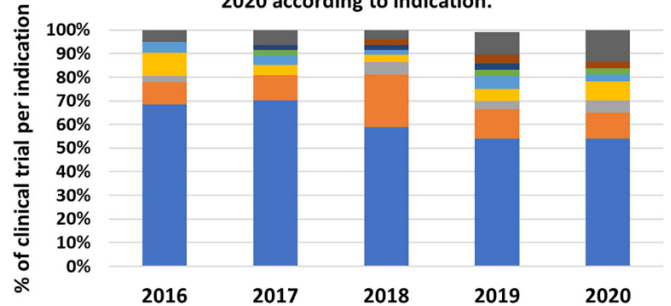


Figura 16. Applicazioni della nanomedicina tra il 2016 ed il 2020<sup>18</sup>.

La farmacodinamica e la biodistribuzione<sup>17</sup> dei medicinali risultano essere un grande problema per cui è stato utile sperimentare delle strutture che incapsulassero i farmaci per:

- rallentare il rilascio così da aumentare l'emivita dei medicinali. Questo metodo è adatto soprattutto per le cellule tumorali ed i tessuti infiammati che, per targeting passivo e per la Enhanced Permeability and Retention (EPR), subiscono un ricircolo di sangue elevato.
- permetterne il trasporto nel sito di interesse per targeting attivo (mediato da molecole) seguito dal rilascio controllato (stimuli-responsive nano-carrier).

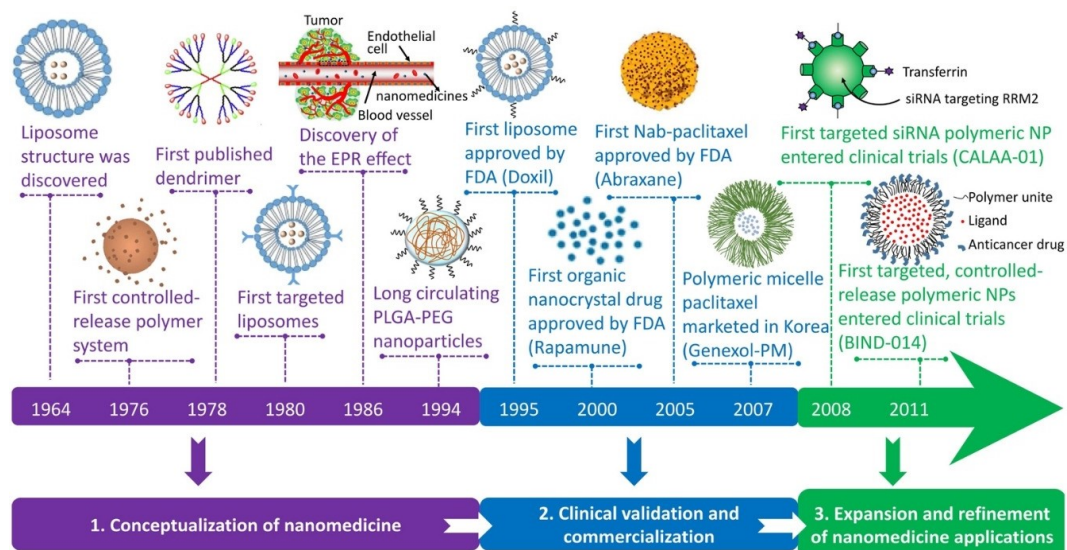
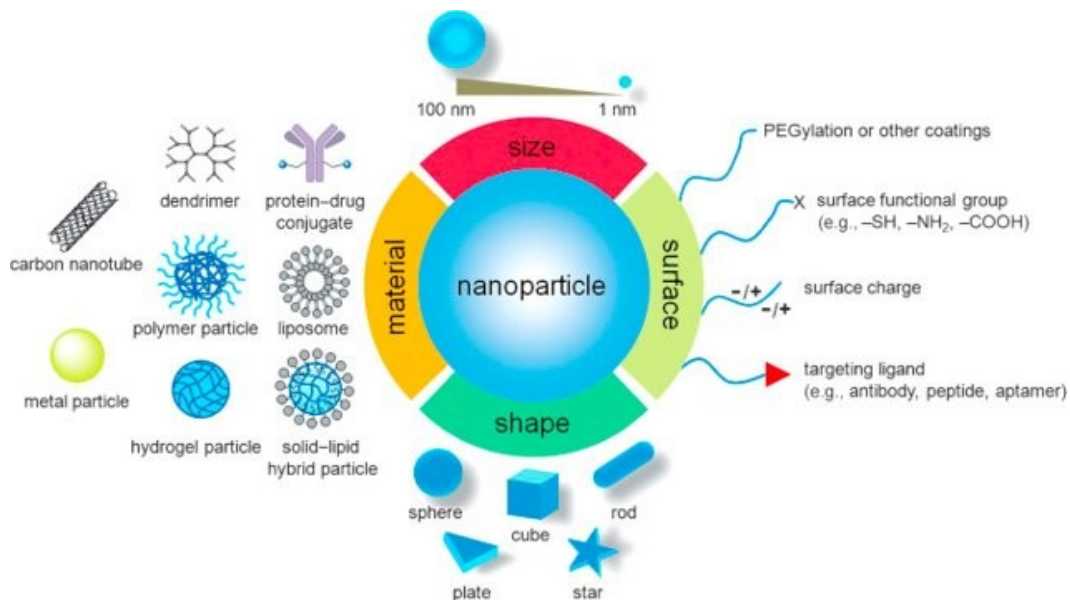


Figura 17. Sviluppo della nanomedicina negli anni<sup>17</sup>.

Tali carrier nanodimensionali hanno permesso di ampliare la finestra terapeutica sfruttando non solo il targeting passivo ma anche quello attivo. Tra questi abbiamo le nanoparticelle, che possono essere composte da liposomi, metalli, hydrogel, grafene e polimeri. Delivery, sensing ed imaging sono le tre applicazioni per cui vengono utilizzati questi supporti nanoparticellari. Obiettivo futuro è quello di evitare danni ai tessuti sani con l'utilizzo di componenti non tossiche nel breve e lungo periodo e sfruttare il targeting attivo e la reattività agli stimoli per migliorare l'efficacia terapeutica favorendo l'accumulo dei farmaci nei pressi dei target.

### 1.2.1 Supporti nanometrici: nanoparticelle d'oro

Le nanoparticelle sono dei supporti di dimensione compresa tra 1 nm e 100 nm e possono differire per composizione, forma e funzionalizzazione.



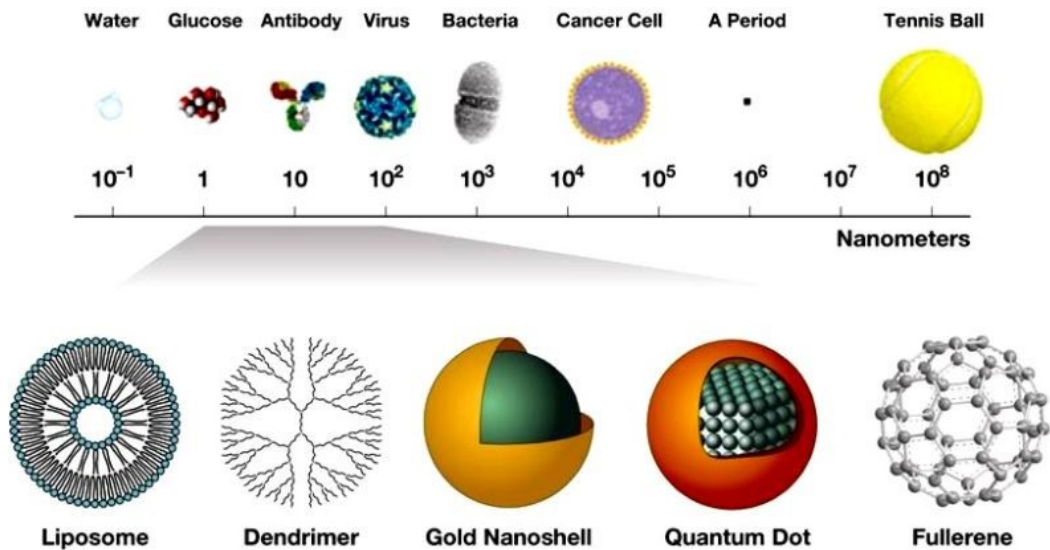


Figura 18. Caratteristiche variabili nelle nanoparticelle.

Nel presente lavoro si tesi ci si è focalizzati sulle nanoparticelle di oro (AuNPs) sferiche, che rientrano tra i nanoterapici a base inorganica (vedi paragrafo 1.2). Le nanoparticelle possono essere sintetizzate in varie forme (tetraedrica, ottaedrica, decaedrica ecc.) ma le due forme più utilizzate per trattamenti biologici sono quella sferica ed i nanorods. Le AuNPs sono chimicamente stabili, non tossiche e fotostabili<sup>42</sup>. In ambiente fisiologico la possibile interazione delle nanoparticelle con varie molecole come proteine, acidi nucleici, lipidi e polisaccaridi porta alla formazione di una corona sulla superficie che attiva i pathways della caspasi, l'apoptosi o la risposta infiammatoria<sup>23</sup>. Per ridurre il rischio di opsonizzazione le nanoparticelle vengono funzionalizzate con varie molecole come GSH o PEG<sup>25 20</sup>; inoltre è possibile legare una molecola per medicina mirata (small-interfering RNA, peptidi, polimeri<sup>21 22</sup>): a seconda della sua composizione, la superficie delle nanoparticelle può interagire covalentemente e fisicamente con vari gruppi chimici come i tioli, le ammine ed i gruppi carbossilici<sup>23 42</sup>. La bio-distribuzione delle nanoparticelle dipende anche dalla dimensione di queste ultime: nanoparticelle con dimensioni sotto i 20 nm raggiungono pressoché ogni organo, mentre nanoparticelle di dimensioni maggiori restano nel circolo ematico e raggiungono milza e fegato.<sup>21</sup> Nei test in vivo il raggio ideale non deve superare i 20 nm in quanto nanoparticelle superiori a tale dimensione vengono con difficoltà trasportate nel circolo ematico ed eliminate per via urinaria<sup>20</sup>. I metalli nobili come l'oro utilizzati per creare nanopiattaforme, si distinguono dalle

nanoparticelle magnetiche e polimeriche per via della risonanza plasmonica di superficie (SPR) dovuta all'eccitazione collettiva degli elettroni di conduzione da parte della radiazione elettromagnetica<sup>43</sup>.

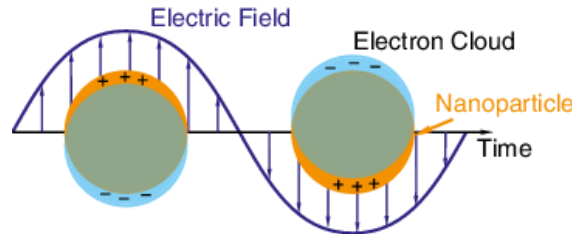


Figura 19. SPR: eccitazione collettiva degli elettroni di conduzione delle nanoparticelle d'oro ad opera del campo elettrico della radiazione elettromagnetica<sup>38</sup>.

Per via di questa eccitazione vi è assorbimento della luce incidente, misurabile con lo spettrometro ad assorbimento UV-Vis. Dimensioni, aggregazione, forma, funzionalizzazione e forza ionica influenzano le proprietà fisico-chimiche e quindi la SPR.

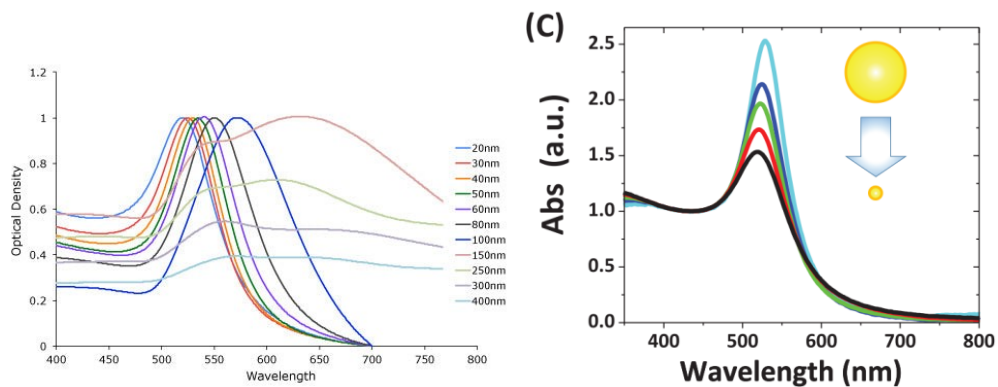


Figura 20. Variazioni nello spettro di assorbimento in seguito all'aumento delle dimensioni delle nanoparticelle o in seguito ad aggregazione (size effect).

AuNPs più piccole di 20 nm mostrano una banda SPR alla lunghezza d'onda di 520 nm, nella regione del visibile. Andando ad aumentare le dimensioni o la forma delle nanoparticelle, o a causa dell'aggregazione, si noterà un red shift della banda ed anche un allargamento del segnale<sup>43</sup>. L'aggregazione delle AuNPs è intuibile, oltre che tramite spettrometria UV-Vis, anche visivamente in quanto è

un fenomeno associato ad un cambio di colore della sospensione che varia dal rosso al marrone/viola/blu.<sup>25</sup>



Figura 21. Diversi livelli di aggregazione delle nanoparticelle d'oro portano ad uno shift del colore: la soluzione rossa non è aggregata/poco aggregata; la soluzione viola è aggregata.

Le AuNPs presentano inoltre facilità di sintesi, biocompatibilità, stabilità chimica, possibilità di essere modificate sulla superficie<sup>21</sup>. Le caratteristiche descritte, unite alla capacità di creare dei legami oro-zolfo con molecole tiolate, rendono le nanoparticelle d'oro adattabili a penetrare le membrane delle cellule tumorali e svolgere ruolo di sensibilizzatori (terapia fototermica e fotodinamica, radioterapia grazie all'elevato coefficiente di assorbimento dei raggi X)<sup>26</sup>, sensing ed imaging (tomografia a raggi X)<sup>19</sup>.



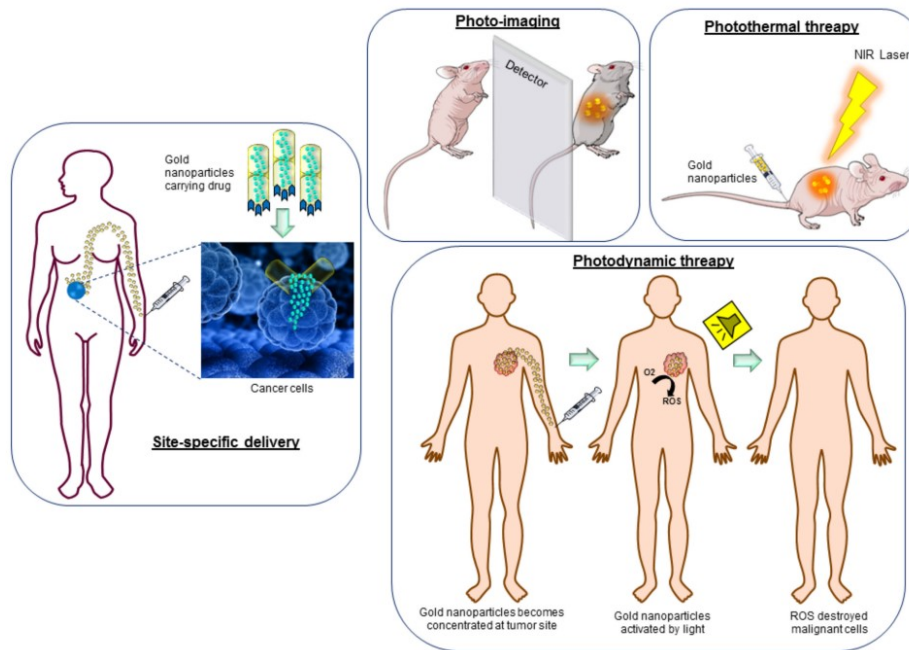


Figura 22. Applicazioni delle AuNPs nella teranostica del tumore<sup>19</sup>.

Per saggiare l'azione antitumorale dei peptidi e dei nanosistemi a base peptidica sono stati effettuati test in vitro su due modelli cellulari: cellule di adenocarcinoma della ghiandola mammaria (linea MDA-MB-231) e cellule epiteliali di ghiandola mammaria (linea MCF10A) come controparte sana.

### 1.3 Tumore al seno: malattia, diagnosi e trattamenti

Il tumore al seno risulta essere il tumore più diffuso tra le donne nel mondo (30% di tutti i tumori diagnosticati), nonché il più statisticamente mortale. Nel 2020 secondo l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ci sono stati 2,3 milioni di donne con diagnosi di cancro al seno e 685000 decessi per cancro al seno a livello globale. I sintomi che possono portare alla scoperta della malattia consistono nella presenza di uno o più noduli e/o nell'alterazione della forma del seno o dell'areola. Spesso tali sintomi vengono ignorati supponendo la presenza di tessuti fibrosi o cisti.

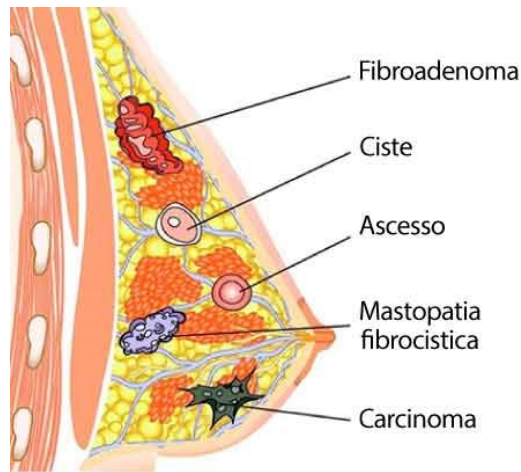


Figura 23. Masse benigne e maligne che si possono trovare a livello del seno.

Si hanno vari stadi di sviluppo del tumore a seconda della sua invasività nel tessuto mammario e per attribuire uno di tali stadi al paziente si osserva il TNM, un sistema di riferimento che prende in considerazione: l'estensione della malattia (T), il coinvolgimento dei linfonodi (N) e la presenza di metastasi (M).

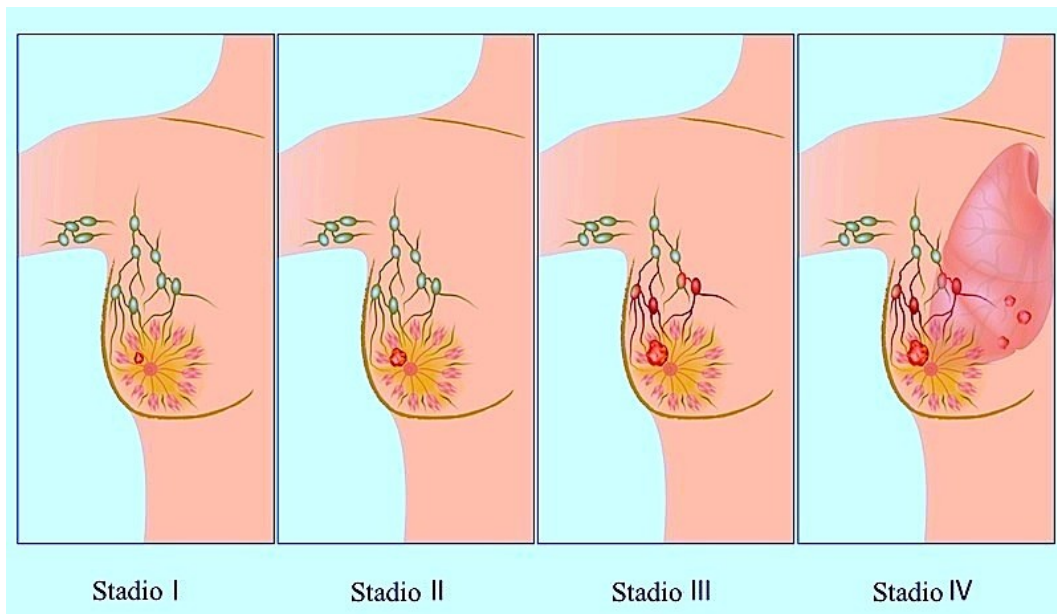


Figura 24. Stadi di sviluppo del tumore al seno secondo i parametri TNM.

Esistono vari tipi di tumore al seno e, nella maggior parte dei casi, si tratta di carcinomi, ossia tumori che si originano da cellule epiteliali: 70% dai dotti (c.duttale), 10% dal lobulo (c.lobulare), 20% da altri punti (tubulare, papillare, mucinoso, cribriforme).

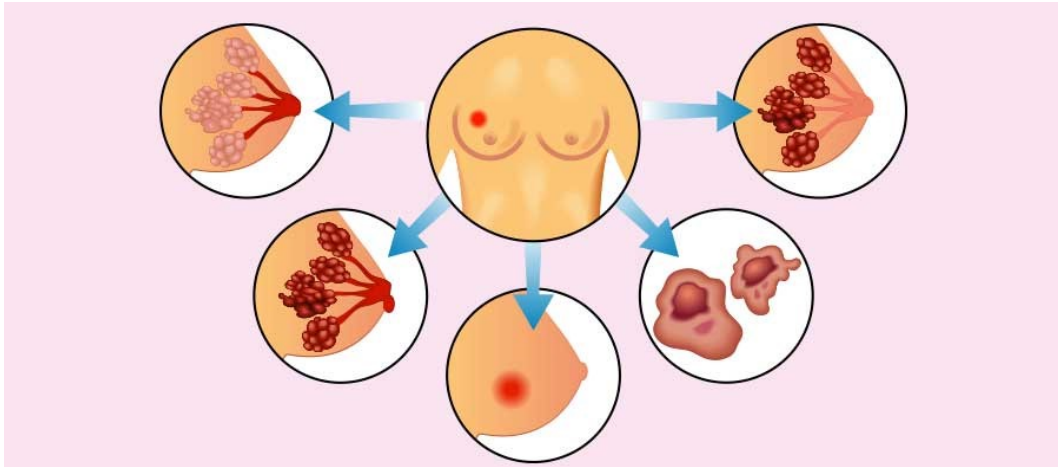


Figura 25. Forme più comuni di tumore al seno.

Uno screening regolare è essenziale per prevenire la proliferazione del tumore con un trattamento tempestivo, riducendo così il tasso di mortalità dei pazienti. Lo screening prevede generalmente una risonanza magnetica, una mammografia o un'ecografia.<sup>29</sup> La percentuale di soggetti che effettua uno screening è ridotta a causa di limitazioni economiche, geografiche, sociali o per mancanza di propaganda precauzionale<sup>30 31 32</sup>. L'incidenza del tumore al seno viene valutata su donne con età superiore ai 20 anni ed è variabile in base all'etnia, a fattori genetici (ereditarietà di mutazioni nei geni BRCA1/2), allo stile di vita (alimentazione, fumo, alcol, attività fisica), ai cambiamenti ormonali, al peso<sup>33 34</sup>. Le opzioni terapeutiche attualmente disponibili includono la chirurgia (quadrantectomia o mastectomia), la radioterapia, la chemioterapia, l'ormonoterapia e le terapie biologiche, che si possono usare da sole o in combinazione in base allo stadio di avanzamento della malattia.<sup>35</sup>

## **2. Scopo della tesi**

Trovare nuove cure che possano sostituire o affiancare i trattamenti attualmente in uso per combattere i tumori porta ad interessarsi allo sviluppo dei peptidi bioattivi. Il presente lavoro di tesi ha lo scopo di saggiare peptaibolici analoghi della Tricogina GA IV valutandone l'interazione preferenziale con le cellule tumorali rispetto alle cellule sane per applicazioni future di targeting attivo e drug-delivery. Per fare questo i peptidi sintetizzati sono stati legati sia a nanoparticelle d'oro mediante legami oro-zolfo (acido lipoico), sia ad una sonda fluorescente 5/6-fluoresceina isotiocianato (FITC), per valutare l'internalizzazione. La citotossicità dei peptidi liberi e dei nanosistemi a base peptidica è stata valutata tramite saggi *in vitro* su cellule di adenocarcinoma della ghiandola mammaria (linea MDA-MB-231) e su cellule epiteliali della ghiandola mammaria (linea MCF-10A), prese come modello di riferimento sano. Test di citofluorimetria hanno permesso di attribuire specificità di interazione dei peptidi testati verso i tessuti tumorali.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Sintesi peptidica

I peptidi sono sequenze di  $\alpha$ -amminoacidi. Negli organismi viventi, la sintesi peptidica avviene in direzione ammino-carbossi-terminale mentre, nella sintesi chimica in laboratorio avviene in direzione opposta, in modo da minimizzare la trasformazione di composti otticamente attivi in isomeri a configurazione invertita (epimerizzazione), con conseguente perdita di purezza ottica.

##### 3.1.1 Sintesi peptidica in fase solida (SPPS)

La SPPS è stata introdotta negli anni 70 da R. B. Merrifield (premio Nobel nel 1984). La finalità della tecnica utilizzata è quella di creare legami ammidici tra il gruppo carbossilico di un amminoacido ed il gruppo amminico dell'amminoacido successivo per cui, devono essere lasciati liberi di reagire solo questi due gruppi funzionali. Per impedire sotto-reazioni indesiderate, gli amminoacidi entranti utilizzati sono mascherati, alla loro estremità ammidica, dal gruppo protettore uretanico Fmoc. Questo gruppo protettore deve essere usato con una resina che si sblocca in ambiente acido in quanto esso viene rimosso in ambiente basico.

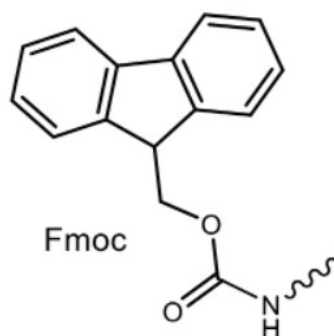


Figura 26. Gruppo uretanico 9-Fluorenilmetossicarbonile (Fmoc).

L'amminoacido Api utilizzato per la sintesi presenta un gruppo amminico in catena laterale che compete con la formazione del legame peptidico, motivo per cui è protetto da un secondo gruppo protettore uretanico, chiamato Boc.

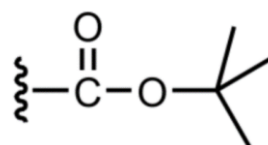


Figura 27. Gruppo protettore ter-butossicarbonile (Boc).

Tale gruppo risulta stabile in condizioni basiche e questa caratteristica di ortogonalità rispetto al gruppo protettore Fmoc, gli impedisce di essere rimosso fino al termine della sintesi. Per rimuovere il Boc si utilizzano condizioni acide, quale HCl in MeOH anidro (-20 °C).

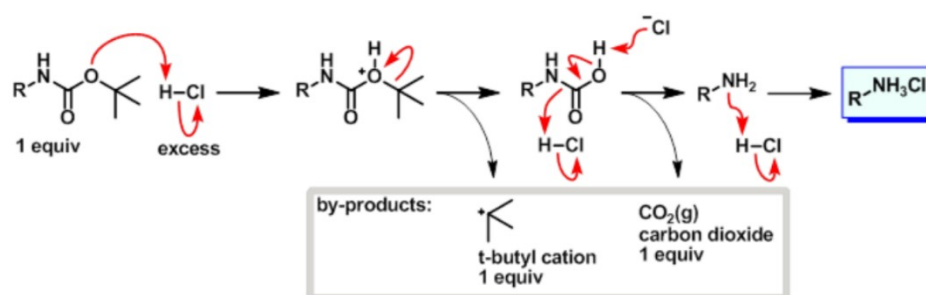


Figura 28. Reazione di rimozione del Boc con HCl in MeOH anidro.

La reazione si svolge in un pallone sigillato ed è costantemente agitata da un'ancoretta grazie ad una piastra magnetica. Dopo un'ora si porta a secco la soluzione con il rotavapor e si fa ripartire la reazione con reagenti freschi, per un'altra ora. Per accertarsi della rimozione del gruppo protettore, si eseguono delle analisi in HPLC.

Per il presente lavoro di tesi, si ha la volontà di mantenere inalterati alcuni amminoacidi durante la sintesi degli analoghi, col fine di conservare le proprietà del peptide wild-type Tricogina GA IV. A tale scopo, si ritrovano sempre: Ottanoile (Oct), gruppo acilico a catena lunga (8 C) che favorisce l'azione di interazione con le membrane e acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico (Aib) induttore di eliche.

Il primo componente utilizzato per la sintesi è la resina, un supporto solido inerte costituito da sfere di polistirene reticolato con l'1-2% di divinilbenzene. La resina viene scelta in base al gruppo funzionale con cui si progetta di far terminare il peptide. Ogni resina è caratterizzata da un parametro, detto "loading" ed espresso

in mmol/g, che indica la concentrazione di siti attivi disponibili al legame con il peptide. Il legame tra la resina ed il primo amminoacido è mediato da un linker legato covalentemente alla resina. In base al linker utilizzato, si va a determinare la tecnica di distacco del peptide maturo dalla resina. La resina, una volta pesata ed inserita in siringa, deve essere sottoposta ad un processo di swelling in DMF (20 minuti x 2) così da reidratarla e permetterle di esporre i siti di legame.



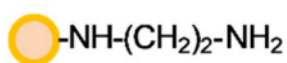
Figura 29. Siringa per SPPS.

In questo lavoro di tesi sono state usate<sup>27</sup>:

- Fmoc-Rink-amide resin (Novabiochem®, loading 0.65mmol/g). Il peptide viene rilasciato con l'estremità C-terminale ammidica. Questa resina è stata usata per la sintesi di Peptide1 e Peptide2, che presentano un'amide terminale. Prima di utilizzare questa resina bisogna eseguire un passaggio di deprotezione per permettere l'esposizione del gruppo amminico per creare il legame tra la resina ed il primo amminoacido.



- 1,2 Diaminoethane trityl resin (Novabiochem®, loading 0.81 mmol/g). Il peptide viene rilasciato con un'estremità amminica primaria. Questa resina è stata utilizzata per la sintesi degli analoghi derivatizzati con FITC ed acido lipoico



Gli step della tecnica SPPS sono:

- a) coupling con Fmoc-aa ed attivatori, disciolti in DMF (55 minuti). Il legame peptidico si viene a creare durante lo step del coupling. Questo step è mediato da due attivatori solubili in DMF: DIC, una carbodiimmide, che reagisce con il gruppo carbossilico dell'amminoacido entrante formando la prima specie intermedia reattiva, poi sostituita da Oxyma Pure, meno reattivo e in grado di inibire la racemizzazione, formando l'estere attivo che verrà attaccato dal gruppo amminico libero della catena in crescita.

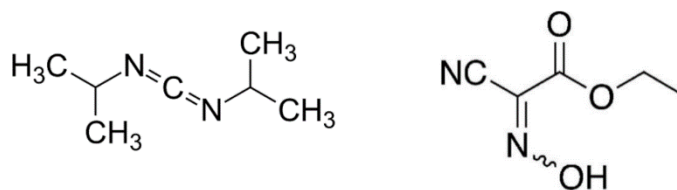


Figura 30. Attivatori della reazione di coupling: DIC (a sinistra) ed Oxyma pure (a destra)

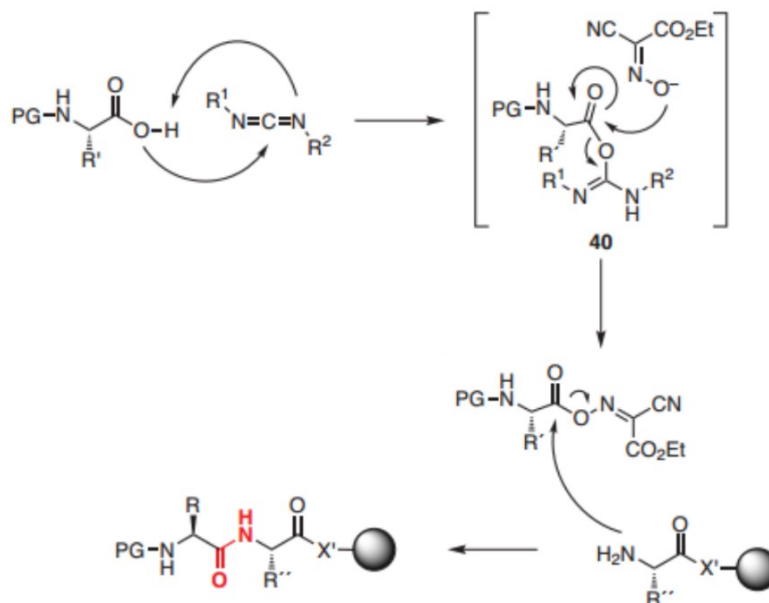


Figura 31. Formazione del legame peptidico mediato dagli attivatori.

- b) lavaggi in DMF (x6). Servono per eliminare l'amminoacido non legato, gli attivatori in eccesso e l'urea che si forma dopo che il DIC ha agito come attivatore.



- c) rimozione del gruppo protettore Fmoc (5 minuti + 10 minuti). Alla fine della formazione del legame peptidico, il gruppo protettore Fmoc deve essere rimosso per continuare la sintesi e questo è possibile in presenza di un'ammina secondaria (ad es., Piperidina al 20% in DMF). La piperidina reagisce anche con la molecola di dibenzofulvene prodotta dalla deprotezione, formando un addotto che sarà eliminato nei lavaggi successivi.

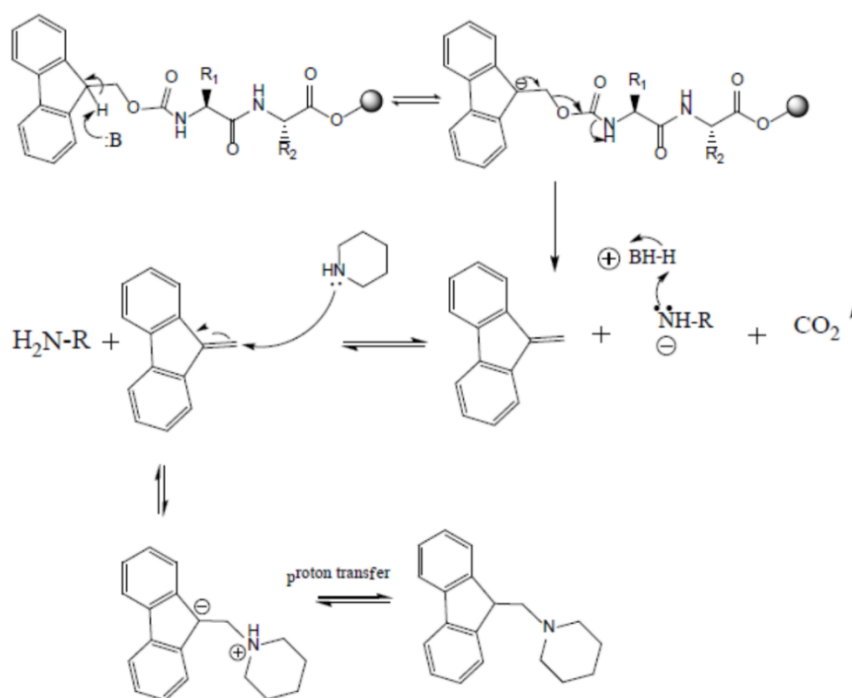


Figura 32. Reazione di rimozione del gruppo protettore Fmoc.

- d) Lavaggi in DMF (x6). Questi lavaggi sono fondamentali per rimuovere l'addotto formato dal legame tra il dibenzofulvene e la piperidina.
- e) Sblocco dalla resina. Al termine della sequenza, il peptide viene sbloccato mediante una miscela contenente acido trifluoroacetico (TFA) al 95% (per la resina Rink amide) o una soluzione di 1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo (HFIP) 30% in DCM (per la resina clorotritilica). Si lava la resina con DCM mentre è ancora nella siringa di sintesi, poi si versa all'interno la miscela di sblocco, scelta in base alla resina utilizzata (ed in base a delle prove di sblocco effettuate primariamente). Dopo un'ora e 30 minuti si raccoglie la sospensione eluita che, al contrario di quanto accaduto fino a

questo punto della sintesi, dovrà essere conservata perché contenente il peptide. In una provetta falcon si lasciano evaporare i solventi, aggiungendo poco DCM alla volta. Segue l'aggiunta dell'Et<sub>2</sub>O che permette la precipitazione del peptide, non solubile in tale solvente. Questo step ha durata O.N. a 4 °C e permette di separare il peptide da eventuali molecole solubili in Et<sub>2</sub>O. Il giorno seguente si procede con la centrifugazione (6500 rpm per 10 minuti): il surnatante è separato dal pellet che contiene il campione ed entrambe le parti separate sono portate a secco in flusso di azoto per poi essere analizzate e purificate.

### 3.1.2 Sintesi peptidica in soluzione

Tale sintesi prevede l'aggiunta, all'interno del mix di reazione con solvente anidro (DCM o DMF), di: due reagenti che si vogliono legare, due attivatori di coupling che permettono di formare un estere attivo (HOBt/HOAt ed EDC) e una base per deprotonare l'ammina e favorire la reazione (NMM o TEA).

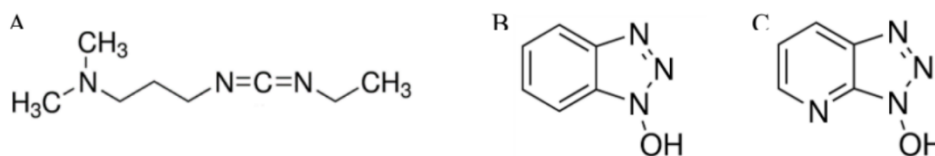


Figura 33. Attivatori EDC, HOBt, HOAt

EDC è una carbodiimmide, solubile in acqua, che agisce come la DIC, formando O-acilisourea. Quest'ultima reagisce con HOAt/HOBt a formare l'estere attivo. Questi reagenti hanno natura esplosiva per cui è preferibile usare un numero ridotto di equivalenti.

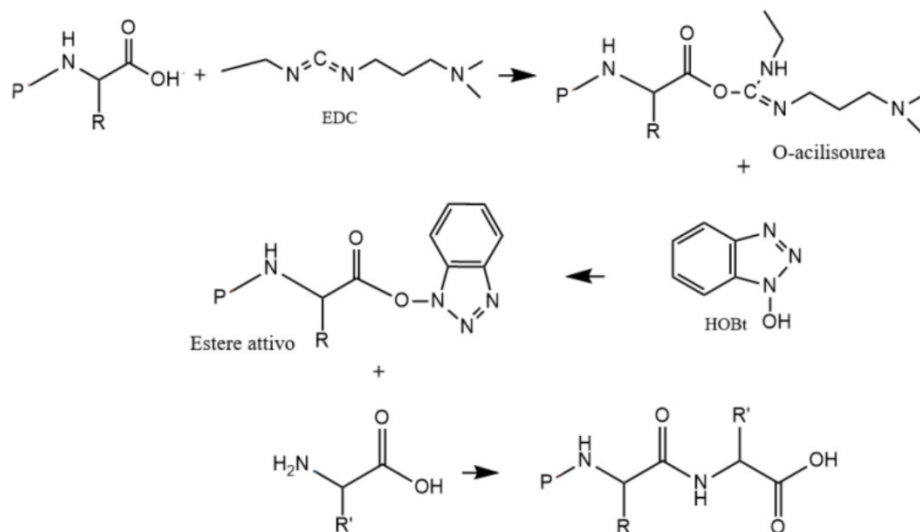


Figura 34. Formazione del legame peptidico mediata dagli attivatori EDC ed HOBt.

Per assicurare la deprotonazione dell'ammina, il pH deve essere mantenuto ad 8 con la base NMM o TEA. Nella sintesi in soluzione bisogna prestare attenzione agli equivalenti che si vanno ad utilizzare in quanto, dopo il completamento della sintesi, non si ha un'eluizione dei reagenti in eccesso ma segue uno step di evaporazione dei solventi e risulta difficoltoso eliminare i reagenti in eccesso. Anche qui, come per la SPPS, si possono identificare vari step:

- La reazione avviene in un pallone chiuso da un tubo contenente  $\text{CaCl}_2$  che garantisce l'assorbimento dell'acqua, mantenendo la reazione anidra:  
Dissolvere il reagente in DCM o DMF anidro: si ha l'ammina deprotonata. Lo stesso solvente è utilizzato per dissolvere in una vial il secondo reagente, HOBt ed EDC: si ha l'estere attivo. Aggiunto il contenuto delle vial al pallone se ne misura il pH, cercando di mantenerlo pari ad 8 con NMM o TEA.
- Per avere conferma del completamento della reazione, ossia la scomparsa dei reagenti e la comparsa dei prodotti, si esegue un'analisi HPLC. Portare a secco la reazione con il rotavapor per assicurare la rimozione della maggior parte del solvente usato. Aggiunte ripetute di toluene e successiva liofilizzazione permettono di eliminare DMF.

Segue lavaggio della miscela di reazione, ridisciolta in DCM, in imbuto separatore, ottenendo la separazione delle componenti idrosolubili (sali, reagenti) dal peptide. Si susseguono lavaggi con acqua acida, acqua deionizzata, acqua basica ed acqua deionizzata.

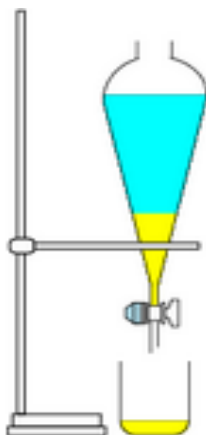


Figura 35. Separazione in pallone separatore: DCM nella parte inferiore ed acqua nella parte superiore.

### 3.1.3 Kaiser test

Questo test permette di verificare la presenza di ammine libere su resina SPPS. Se utilizzato dopo una reazione di coupling permette di valutare la completa /non completa formazione dei legami peptidici in tutti i siti disponibili. Prelevata una quantità esigua di resina dalla siringa di sintesi, si effettua il test: è un saggio colorimetrico e la reazione avviene per interazione tra la ninidrina e le ammine libere che formano un dimero dal colore blu.

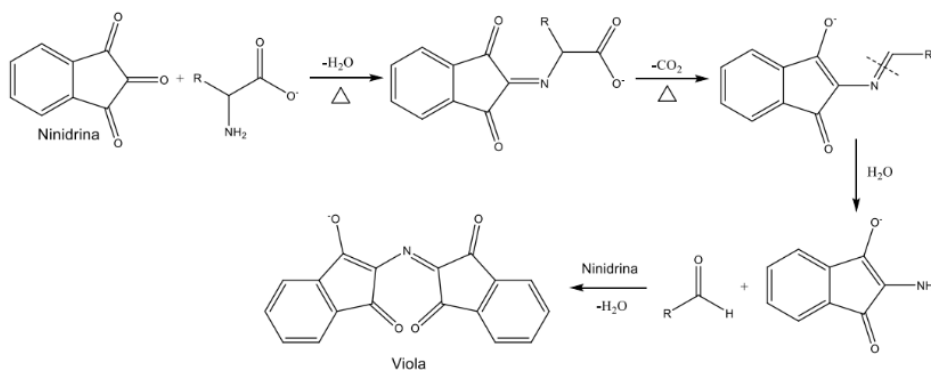


Figura 36. Reazione colorimetrica del Kaiser test.

Questo test viene eseguito soprattutto post legame di un amminoacido difficile in quanto le catene laterali dell'amminoacido stesso o della catena peptidica in formazione, potrebbero impedirne l'accesso al sito di legame. Il test permette di individuare reazioni di coupling incomplete ed evita la sintesi di sottoprodotti di lunghezza inferiore corrispondenti a peptidi mancanti di uno o più amminoacidi. Ottenere sottoprodotti durante la reazione di sintesi, implica la necessità di una purificazione più accurata e complessa e non sempre è possibile separare i prodotti. Il test non funziona bene con amminoacidi tetrasostituiti come Aib.

### 3.2 Purificazione del peptide

Per quanto concerne la purificazione del peptide, si può utilizzare un sistema Biotage Isolera Prime (Biotage® Isolera Prime™, flash chromatography LC-33). Il metodo si avvale di una colonna di silice derivatizzata con catene alchiliche (C18), con la quale le molecole interagiscono a seconda della loro polarità. La separazione avviene in fase inversa: le prime molecole eluiscono con il solvente acquoso (A: H<sub>2</sub>O /ACN in rapporto molare 9/1 + 0.05% HCl), mentre le molecole apolari interagiranno con le catene alchiliche legate alla silice ed eluiscono solo con l'aumento del gradiente dell'acetonitrile (B: H<sub>2</sub>O/ACN in rapporto molare 1/9 + 0.05% HCl). Dopo aver disegnato il gradiente che si ritiene adatto alla purificazione del peptide di interesse, si procede con il condizionamento della colonna, tramite il passaggio di 3 volumi colonna (cv) di B 100%, B 50%, B 0%. Il campione viene risospeso e poi caricato all'interno del cartridge, una precolonna che permette di iniettare il campione in maniera omogenea. A seconda della quantità di peptide che si pensa di aver sintetizzato, si sceglie la colonna: 12 g per quantità dai 50 mg ai 150 mg, o 30 g per quantità maggiori di 150 mg. La scelta della colonna influenza anche l'impostazione del flusso.

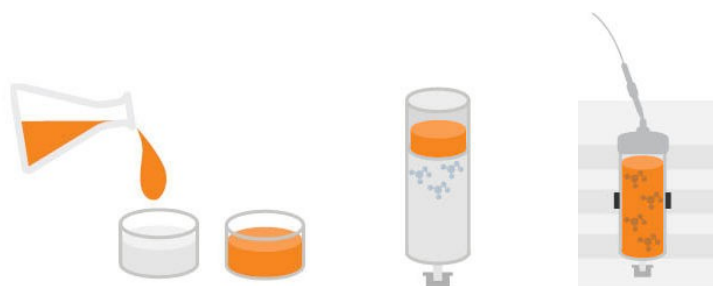


Figura 37. Sequenza di caricamento del cartridge e purificazione del prodotto con colonna cromatografica.

Iniziata la purificazione, gli eluenti fluiscono nello strumento, poi in colonna e di nuovo ancora nello strumento dove il sistema di detection permette di tracciare in simultanea alla purificazione uno spettro di assorbimento nelle lunghezze d'onda di interesse: questa capacità dello strumento permette all'operatore di modificare in tempo reale il gradiente, così da ottenere la migliore purificazione possibile. L'eluato viene raccolto all'interno di provette contenute in dei rack oppure viene mandato nel waste di raccolta. Lo strumento in maniera automatica effettua una separazione in base alla variazione dell'assorbanza ma l'operatore può scegliere di separare il centro del picco dalla testa e dalla coda. Al termine della purificazione, i campioni devono essere analizzati in HPLC per valutarne la purezza e decidere quali provette unire. Rotavapor (Buchi Rotavapor RE-111) e Liofilizzatore sono gli strumenti mediante i quali sarà possibile rimuovere i solventi e portare a secco il prodotto per poi caratterizzarlo.

### 3.3 Caratterizzazione peptide

Per caratterizzazione del peptide si intende sia analisi della sequenza che della conformazione. Tali risultati si ottengono mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC), spettrometria di massa (MS), dicroismo circolare (CD).

#### 3.3.1 Cromatografia liquida ad alta prestazione

L'HPLC è una tecnica analitica che permette la separazione dei componenti di una miscela in base alla loro diversa affinità per le fasi stazionaria e mobile. Il principio di separazione è il medesimo descritto per la purificazione (cap. 3.2). Lo strumento utilizzato è un cromatografo analitico GE Pharmacia Ekta 900, dotato di pompa binaria, rivelatore UV diode array (DAD), che permette la rivelazione a più lunghezze d'onda contemporaneamente, e iniettore semiautomatico. Dopo l'iniezione manuale tramite siringa si avvia lo strumento HPLC e l'iniettore collega il loop contenente il campione al flusso dell'eluente, la cui composizione percentuale dipende dal gradiente scelto (A, H<sub>2</sub>O /ACN in rapporto molare 9/1 +

0.05% TFA; B, ACN/H<sub>2</sub>O in rapporto molare 9/1 + 0.05% TFA), portando il campione in colonna. Sullo schermo del computer appare il cromatogramma, con i picchi di assorbimento alle lunghezze d'onda selezionate. Il primo segnale, o picco di iniezione, è dato dalle molecole del solvente della miscela analizzata e da altre molecole affini alla fase mobile che non hanno interagito con la fase stazionaria della colonna (sali, solventi, reagenti polari). Sebbene sia possibile lavorare in condizioni isocratiche, l'analisi solitamente prevede un gradiente dei due eluenti: diminuisce il solvente polare (A) ed aumenta il solvente organico (B). Il segnale viene registrato dal detector in base ai settaggi dell'operatore che può scegliere tra diverse lunghezze d'onda a cui rilevare l'assorbanza, ad esempio: 215 nm, dove assorbe il legame peptidico e 280 nm, dove assorbono amminoacidi con catene aromatiche. Lo strumento, terminata l'esecuzione del gradiente disegnato, completa lo spettro di assorbimento e lo fornisce come risultato dell'analisi.

### 3.3.2 Spettrometria di massa

Lo strumento utilizzato per questa analisi è una LC-MS della Agilent (*LC*: Agilent 1200 Series HPLC; *MS*: 6120 ESI-Quadrupole MS). Disegnato il gradiente per l'analisi, si procede con l'iniezione del campione, che può essere diretta o mediante colonna cromatografica: nel primo caso avremo uno spettro di massa con tutte le masse contenute nel campione, senza distinzione di polarità; nel secondo caso, avremmo una separazione cromatografica e potremo ricondurre ad ogni picco del cromatogramma i rispettivi picchi di massa. La cromatografia avviene in maniera analoga a quanto descritto nel capitolo 3.3.1. Le molecole dell'eluato sono poi ionizzate da parte della sorgente di ionizzazione ESI.

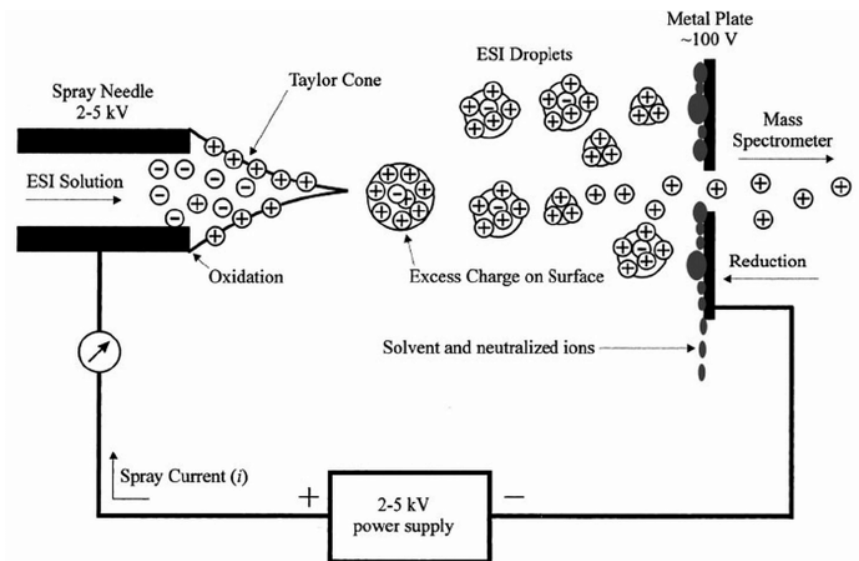


Figura 38. Sorgente di ionizzazione Electrospray ionisation (ESI)

Successivamente, gli ioni con uno specifico rapporto massa/carica sono filtrati applicando una combinazione di voltaggi alternati tramite il quadrupolo. Il quadrupolo è un componente dello strumento che racchiude due coppie di elettrodi a carica opposta.

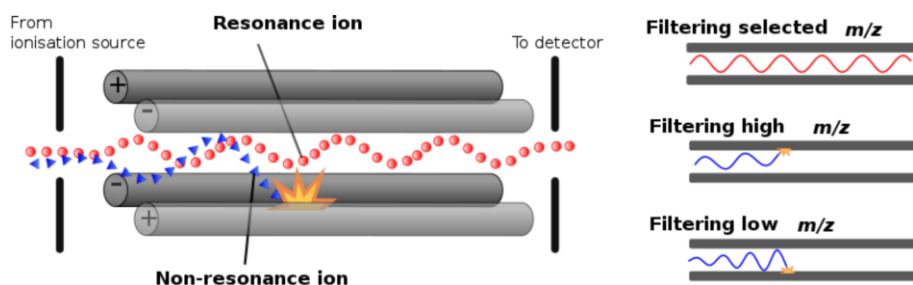


Figura 39. Quadrupolo.

Ioni di una data massa emergono senza essere deviati e vengono recepiti dal detector in base al loro rapporto massa/carica. Terminata l'analisi si procede con l'osservazione dello spettro e con l'attribuzione delle molecole alle diverse masse. L'analisi di massa ad alta risoluzione (ESI-HRMS, a quattro cifre decimali) è stata svolta presso il servizio di spettrometria di massa attivo presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, tramite spettrometro Waters Xevo o Micromass.



### 3.3.3 Dicroismo circolare

Lo strumento utilizzato per questa analisi è il dicrografo Jasco J-1500. Questo strumento lavora in atmosfera di azoto, che sostituisce l'ossigeno per evitare la formazione di ozono e ridurre l'assorbimento, che sottrarrebbe la luce necessaria all'esperimento. La cuvetta in quarzo (cammino ottico 0.1 cm Hellma) è inserita nel supporto dello strumento che, per registrare il segnale CD in corrispondenza delle bande di assorbimento del cromoforo peptidico, viene fatto lavorare tra 280 nm e 190 nm e fornisce come risultato uno spettro che permette di valutare che tipo di struttura secondaria assuma il peptide in soluzione:  $\alpha$ -elica, elica  $3_{10}$ ,  $\beta$ -sheet, random coil (rc).

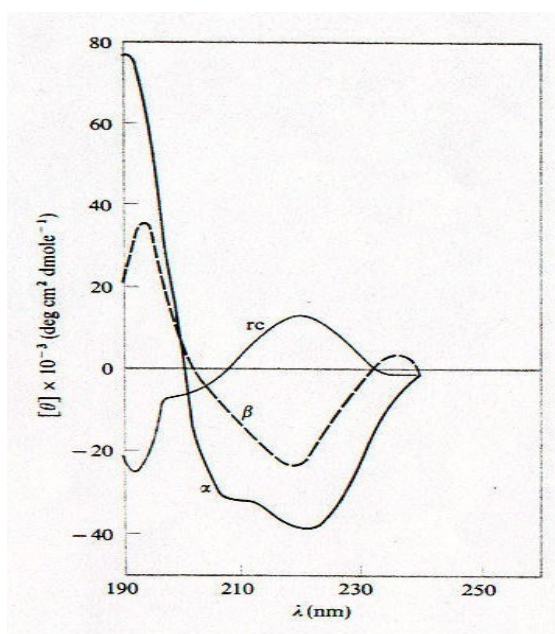


Figura 40. CD delle strutture secondarie dei peptidi.

L'analisi può essere svolta solo su campioni chirali, poiché il CD si basa sul diverso assorbimento delle due componenti polarizzate circolarmente destra e sinistra da parte di una sostanza chirale: l'effetto di assorbimento di una delle due componenti porta a una polarizzazione ellittica della luce. Dal rapporto tra le due assi dell'ellisse si ricava l'ellitticità, che dipende dal cammino ottico e dalla concentrazione del campione. Questa tecnica non distruttiva permette anche di seguire il folding proteico in base all'interazione con ligandi, al legame con altre molecole o al solvente di sospensione. I risultati sono elaborati per renderli indipendenti dal cammino ottico e dalla concentrazione e vengono espressi in

termini di ellitticità molare ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ). Il cromoforo peptidico è planare, per cui non ha bande di assorbimento otticamente attive, ma la vicinanza a centri chirali e/o l'appartenenza a strutture tridimensionali chirali le rendono attive. L' $\alpha$ -elica è un esempio di struttura tridimensionale chirale che può avvolgersi in un senso o nell'altro (levogira o destrogira): la chiralità si propaga al cromoforo (legame peptidico), il quale acquista un'asimmetria globale di struttura secondaria e diventa chirale: si possono osservare le transizioni  $\pi\rightarrow\pi^*$  (permessa) e  $n\rightarrow\pi^*$  (proibita).

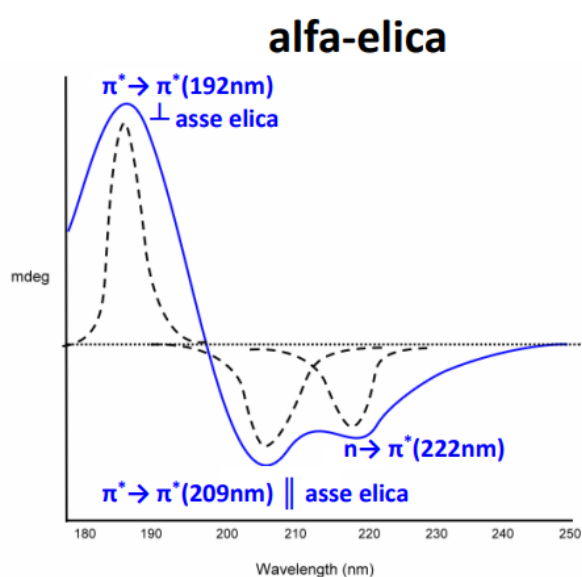


Figura 41. CD di una  $\alpha$ -elica.

La Tricogina GA V ed i suoi analoghi, sono caratterizzati da una struttura composta da:

- $\alpha$ -elica, con un massimo positivo a circa 192 nm relativa all'exciton coupling delle transizioni  $\pi\rightarrow\pi^*$  del peptide e due massimi negativi di pari intensità a 209 nm (transizione  $\pi\rightarrow\pi^*$ ) e a 222 nm (transizione  $n\rightarrow\pi^*$ );
- elica  $3_{10}$ , simile all'  $\alpha$ -elica ma con i massimi negativi che presentano diverse intensità e la banda corrispondente alla transizione  $\pi\rightarrow\pi^*$  è spostata a lunghezze d'onda leggermente inferiori.

Grazie al fatto che ogni struttura secondaria ha un fingerprint nello spettro dicroico è possibile analizzare i peptidi prodotti, liberi e legati alle nanoparticelle ed osservarne le preferenze conformazionali in diversi solventi. L'analisi è svolta

a 25°C ed i campioni sono preparati ad una concentrazione di  $10^{-4}$  M disciolti in tre diversi solventi: H<sub>2</sub>O, una soluzione acquosa di SDS 100mM, che permette di saggiare la struttura del peptide in presenza di micelle, o TFE che è un solvente strutturante.

### 3.4 Sintesi di nanoparticelle d'oro: ablazione laser in liquido (LAL)

La sospensione di nanoparticelle d'oro può essere ottenuta con un approccio top-down, corrispondente alla Ablazione Laser o un approccio bottom-up, corrispondente alla riduzione chimica partendo dall'Au<sup>3+</sup>(Figura 42).

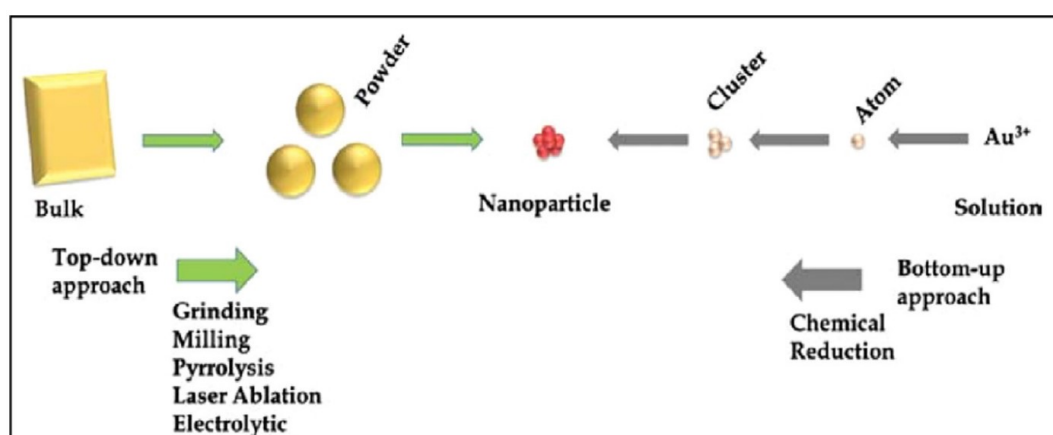


Figura 42. Due strategie di sintesi delle nanoparticelle d'oro: approccio top-down ed approccio bottom-up<sup>26</sup>.

Le due tecniche sono opposte:

- Ablazione laser: prevede l'utilizzo di un materiale bulk di partenza (piastra di oro) che verrà scalfita con un laser pulsato fino a portare al rilascio di frammenti nanodimensionali. Si inizia preparando una soluzione di H<sub>2</sub>O ed NaCl  $2 \cdot 10^{-4}$  M, che sarà il solvente in cui saranno sospese le nanoparticelle. Il sale in soluzione è necessario per garantire la stabilità del colloide di oro che si ottiene tramite il processo, in quanto una piccola frazione di ioni Cl<sup>-</sup> si adsorbono sulla superficie delle nanoparticelle di oro conferendo loro una carica elettrica negativa. La placca d'oro viene adagiata sul supporto ed il laser lavora ad energia di 42 mJ/impulso e frequenza 50 Hz. La sintesi avviene a temperatura ambiente, anche se la

soluzione acquosa può riscaldarsi nel corso del processo arrivando anche ad una temperatura di 40°C circa. La placca d'oro circolare viene irradiata seguendo un percorso a spirale. Non appena il laser inizia ad irradiare la placca questa si riscalda assorbendo energia e si viene a formare una bolla di cavitazione, la cui estinzione causa un'onda d'urto che porta al rilascio di ioni e particelle/frammenti. La sintesi dura fino a quando si ottiene la concentrazione desiderata di nanoparticelle. A quel punto, il colore della sospensione diventa rosso vinaccio e lo spettro di assorbimento presenta il caratteristico picco di assorbimento intorno ai 520 nm<sup>28</sup>.

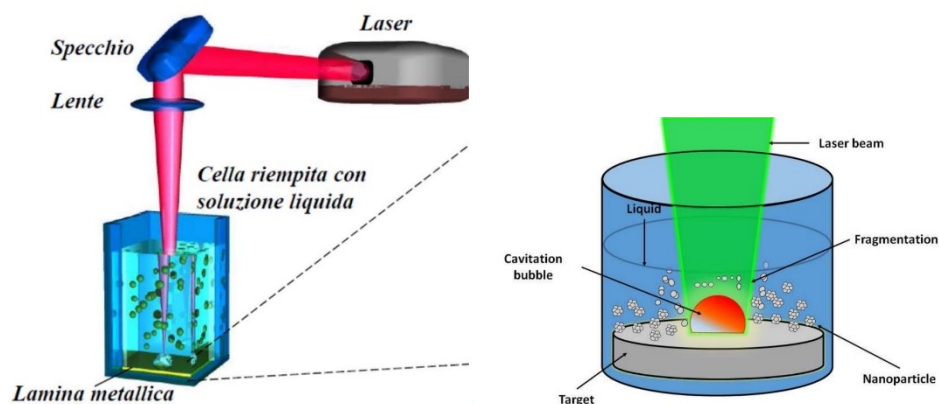


Figura 43. Sintesi di nanoparticelle d'oro per ablazione laser.

- Riduzione chimica: può essere eseguita con due metodi differenti, il Turkevich Method (una fase) ed il The Brust and Shreffin Method (due fasi)<sup>25</sup>. In entrambi i casi la sintesi prevede l'utilizzo di un sale dell'oro come acido tetra-cloro-aurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), uno stabilizzatore (tioli o polimeri), un agente riducente (citrato, acido ascorbico o boroidrato). L'oro viene disciolto in acqua ed  $\text{NaCl}$  per stabilizzare la reazione e segue una reazione di riduzione per ottenere  $\text{Au}^0$ . Infine, gli atomi neutri dell'oro aumentano di concentrazione fino a giungere ad un valore critico tale per cui avviene un fenomeno di nucleazione, seguito da crescita delle dimensioni degli aggregati: si ha una sospensione di nanoparticelle.

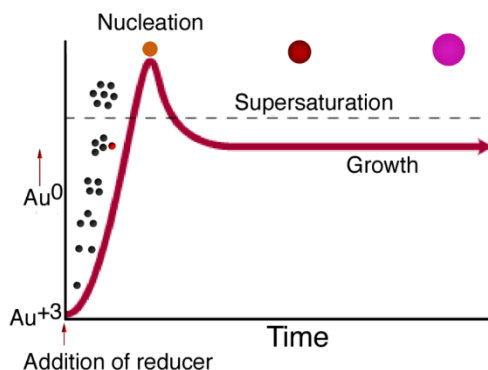


Figura 44. Modello di LaMer in cui si distinguono due fasi: nucleazione e crescita.

Per il presente lavoro di tesi la sospensione di nanoparticelle d'oro è stata ottenuta per ablazione laser. I limiti di questa tecnica sono: l'impossibilità di controllare la dimensione media delle nanoparticelle in soluzione ed i costi di acquisto di un macchinario per ablazione laser. D'altro canto, questo tipo di sintesi avviene in modo automatico, rapido e porta ad avere una minima quantità di materiali di scarto, partendo da materiale bulk poco costoso (piastra d'oro). La tecnica è quasi del tutto automatizzata eccetto per il settaggio iniziale dei parametri, che viene effettuato dall'operatore insieme al posizionamento corretto della piastra d'oro e della cella di ablazione.

### 3.5 Caratterizzazione nanoparticelle

Per caratterizzazione delle nanoparticelle si intende l'analisi della sospensione per valutarne le dimensioni, la concentrazione e la dispersione/agggregazione. Queste analisi vengono effettuate per mezzo della spettrometria ad assorbimento UV-Vis e Dynamic Light Scattering (DLS)

#### 3.5.1 Spettrometria ad assorbimento UV-Vis

AuNPs con diametro fino a 20 nm mostrano nella regione del visibile una banda data dalla SPR alla lunghezza d'onda di 520 nm ed una banda relativa alle transizioni interbanda dell'oro ad una lunghezza d'onda di circa 400 nm.

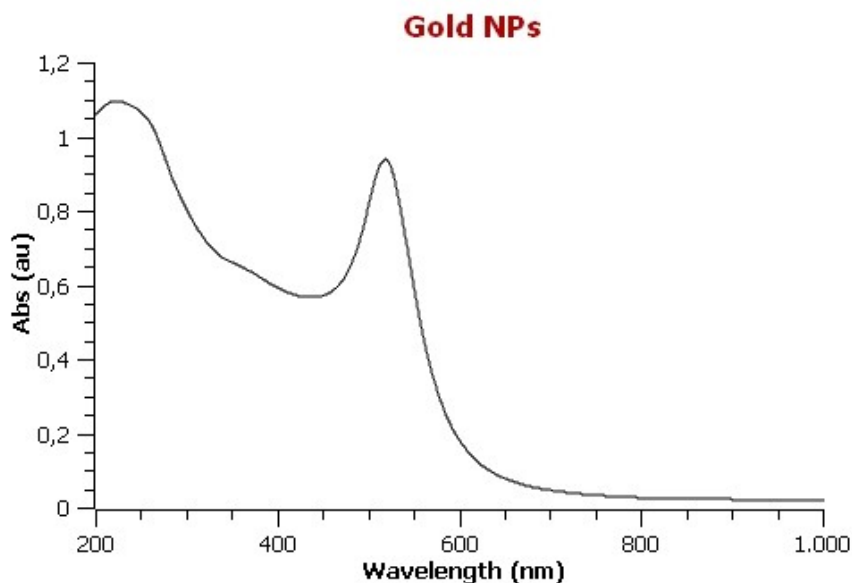


Figura 45. Spettro di assorbimento di una sospensione di nanoparticelle d'oro.

L'aggregazione comporta un red-shift nella banda: poiché legando i peptidi alle nanoparticelle con legami oro-zolfo ci si aspetta una diminuzione della stabilità colloidale dovuta allo scalzamento degli ioni  $\text{Cl}^-$  adsorbiti sulle nanoparticelle e, soprattutto, ad un aumento dell'interazione tra le molecole di peptide sulla superficie. Dunque, si osserva un red-shift della banda di assorbimento plasmonica. L'acquisizione dello spettro UV-vis viene eseguita tra 200 nm e 1200 nm, con una velocità di 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . I campioni sono posti in cuvette in quarzo con cammino ottico di 2 mm ed analizzati con spettrofotometro JASCO V770. La baseline è acquisita con acqua ed  $\text{NaCl } 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , soluzione in cui sono sospese le nanoparticelle durante il processo di Ablazione laser.

### 3.5.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

Lo strumento utilizzato per la DLS, detta anche Photon Correlation Spectroscopy (PCS), è un DLS-Malvern Panalytical Zetasizer Nano ZS. Tale tecnica viene usata per studiare il comportamento di diffusione delle macromolecole in soluzione<sup>28</sup>. A parità di temperatura e di viscosità, le particelle piccole si muovono rapidamente mentre quelle più grandi si muovono lentamente, dando variazioni nell'intensità di scattering nel tempo. Associare questa variazione ad un coefficiente di diffusione permette di convertire i dati in diametro idrodinamico. Per il presente lavoro di tesi, lo strumento è stato utilizzato per valutare la distribuzione di dimensioni

idrodinamiche delle nanoparticelle prima e dopo il legame con i peptidi tiolati. Viene dunque stimato il raggio idrodinamico medio (raggio medio delle nanoparticelle in sospensione). I campioni, prima di essere analizzati con questo strumento, devono essere diluiti fino ad avere un'assorbanza di 0.2 alla lunghezza d'onda di 633 nm.

### 3.6 Funzionalizzazione dei peptidi sulle nanoparticelle

Per quanto concerne la densità di packing dei peptidi sulle nanoparticelle, il rapporto tra le due componenti è stato assunto con una stima di due molecole di legante per nm quadrato di nanoparticella.

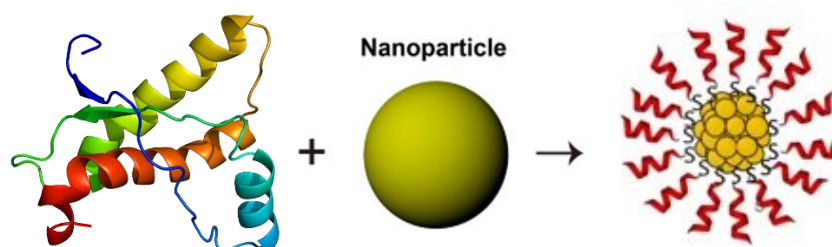


Figura 46. Funzionalizzazione delle AuNPs: legame oro-zolfo.

L'aggiunta del peptide tiolato alla soluzione comporta la formazione di legami oro-zolfo. Poiché i peptidi tendono ad interagire tra di loro, si avrà interazione anche tra le nanoparticelle che, essendo meno disperse, daranno una banda plasmonica shiftata ed allargata.

### 3.7 Caratterizzazione dei nanosistemi a base peptidica

Per caratterizzazione si intende la valutazione della stabilità conformazionale dei peptidi tramite CD (vedi cap 3.3), Dynamic Light Scattering (vedi cap3.5.2) e Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM).

#### 3.7.1 Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Il microscopio elettronico a trasmissione è uno strumento che permette di fare analisi di microscopia in base al fascio di elettroni che viene trasmesso attraverso un substrato molto sottile e composto da elementi poco densi (C, O) sul quale sono disposte le nanoparticelle che, essendo di oro, sono opache al fascio elettronico. Il limite di risoluzione del microscopio elettronico è circa 1 nm nel

caso dello strumento utilizzato per questa tesi, ma può essere molto inferiore in strumenti di tipologia più avanzata. L'immagine che si forma è data dall'interazione tra gli elettroni ed il campione.

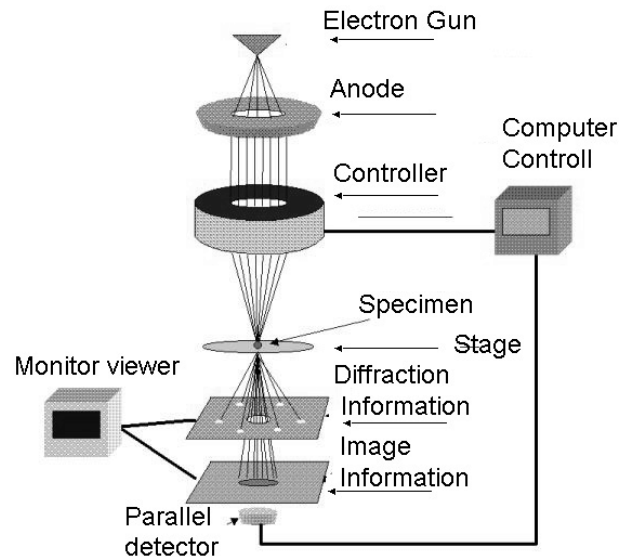


Figura 47. Schema di funzionamento del TEM.

Questo strumento viene utilizzato per misurare la dimensione geometrica (non idrodinamica) delle nanoparticelle e, in alcuni casi, consente di osservare la presenza di uno strato di peptidi autoassemblanti intorno ad esse, che diventa visibile come un contorno con livello di opacità inferiore rispetto alle nanoparticelle di oro ma superiore rispetto al sottile substrato sul quale è disposto il campione.

### 3.8 Linee cellulari

Per saggiare l'azione antitumorale dei peptidi e dei nanosistemi a base peptidica sono stati effettuati test *in vitro* su due modelli cellulari: cellule di adenocarcinoma della ghiandola mammaria (linea MDA-MB-231) e cellule epiteliali di ghiandola mammaria (linea MCF10A), come controparte sana. Le linee cellulari utilizzate in questo progetto di tesi sono state acquistate dalla ditta American Type Culture Collection (ATCC). I diversi terreni di coltura sono preparati risospesando le componenti in polvere in acqua milliQ deionizzata ( $R > 18 \text{M}\Omega\text{cm}$ ) e filtrata (sistema Milli-Q della Millipore®).



### 3.8.1 MDA-MB-231

MDA-MB-231 è una linea cellulare derivante dalle metastasi di un adenocarcinoma della ghiandola mammaria di una donna caucasica di 51 anni.

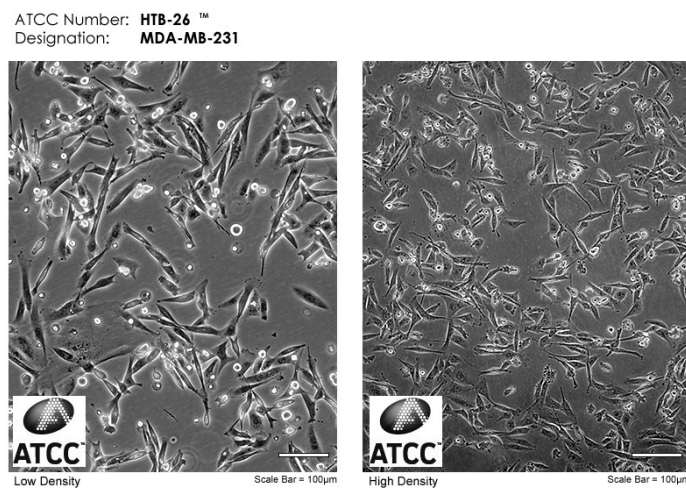


Figura 48. Cellule MDA-MB-231 (ATCC).

Si tratta di un carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) estremamente aggressivo, invasivo e poco differenziato. Sono cellule mancanti dei recettori per l'estrogeno (ER) e per il progesterone (PR), con un'aumentata sintesi di recettori per il fattore di crescita epidermico 2 (HER2). La conseguenza di queste variazioni sull'espressione dei tre recettori spesso determina l'inefficacia delle cure. Si tratta del tumore al seno con più alto tasso di mortalità: solo il 12,2% delle pazienti sopravvive a cinque anni dalla diagnosi e la sopravvivenza globale media è generalmente inferiore a 2 anni. Le cellule MDA-MB-231 crescono in adesione in fiasche T75 cm<sup>2</sup>, in terreno liquido per colture cellulari DMEM (con GlutaMAX™, addizionato con L-glutammina, 4.5 g/L in D-glucosio e sodio piruvato, fornito dalla Life Technologies) addizionato con FBS (Life Technologies) al 10% ed antibiotici (10000 unità/mL di penicillina G e 10000 µg/mL di streptomina, fornita dalla Life Technologies)

### 3.8.2 MCF10A

MCF 10A è una linea cellulare epiteliale isolata nel 1984 dalla ghiandola mammaria di una donna caucasica di 36 anni con seno fibrocistico.

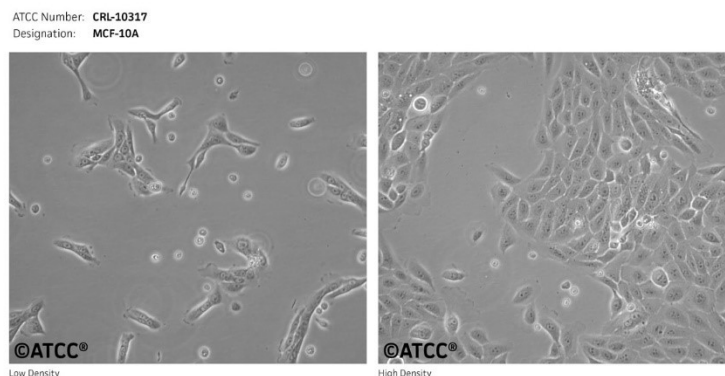


Figura 49. Cellule MCF10A (ATCC).

Si tratta di tessuto mammario proliferativo ma benigno, le cui cellule se poste in coltura vanno spontaneamente in contro al processo di immortalizzazione. Questa linea cellulare è stata depositata dalla Michigan Cancer Foundation e si tratta del modello di cellule mammarie comunemente più usato come controparte sana delle cellule tumorali di seno. Le cellule MCF10A crescono in adesione, in terreno DMEM/F12 (con GlutaMAX™, fornito dalla Life Technologies) addizionato con HS (Life Technologies) al 5% ed antibiotici.

### 3.9 Analisi *in vitro*

Per valutare l'effetto e la localizzazione delle molecole e delle strutture nanomolecolari funzionalizzate con i peptidi, sono state effettuate le seguenti analisi: saggio di vitalità MTS e misure di internalizzazione tramite citofluorimetria. Per gli esperimenti, le cellule sono staccate dalle fiasche, nelle quali sono coltivate, con Tripsina (Life Technologies) allo 0.25%; l'azione dell'enzima è bloccata dopo pochi minuti con l'aggiunta di siero. Le cellule risospese sono contate nella camera di Burker con l'utilizzo del colorante ad esclusione vitale Trypan blue allo 0.4% (Sigma-Aldrich), per poi essere seminate. Per quanto concerne la semina nelle piastre multiwells da 96 pozzetti destinate al

saggio MTS, sono state seminate 8000 cellule/pozzetto in 150  $\mu$ L di terreno completo. Per quanto concerne invece la semina nelle piastre multiwells da 24 pozzetti destinate alle analisi di citofluorimetria sono state seminate 80000 cellule MDA-MB-231/pozzetto e 70000 cellule MCF10A/pozzetto in 500  $\mu$ L di terreno completo. Le cellule sono state mantenute in incubatore (Thermo scientific, Series 8000 DH) a 37 °C con il 90% di umidità ed il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore. Le piastre sono state poi trattate con i peptidi sintetizzati chimicamente (vedi cap. 3.1). I peptidi vengono disciolti alla concentrazione 10 mM e conservati in frigo. Da queste soluzioni si preparano delle diluizioni seriali in terreno completo che sono poi utilizzate per i trattamenti, nei quali vengono somministrati alle cellule concentrazioni crescenti di peptide. Ogni peptide è stato testato a diverse concentrazioni in triplicato ed ogni saggio successivo è stato eseguito a 24 ore dall'inizio del trattamento.

### 3.9.1 Saggio di vitalità MTS

L'MTS è un saggio che permette di valutare la vitalità cellulare in una coltura di cellule che crescono in adesione. Questo test prevede l'utilizzo di un kit fornito dalla Promega (CellTiter-96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) e si basa sulla riduzione del composto MTS mediata dall'enzima succinato deidrogenasi dei mitocondri delle cellule. La reazione di riduzione comporta la variazione del colore del terreno da giallo a violetto grazie alla formazione dei sali di formazano. Questo shift colorimetrico viene registrato allo spettrofotometro come valore di assorbanza a 492 nm.

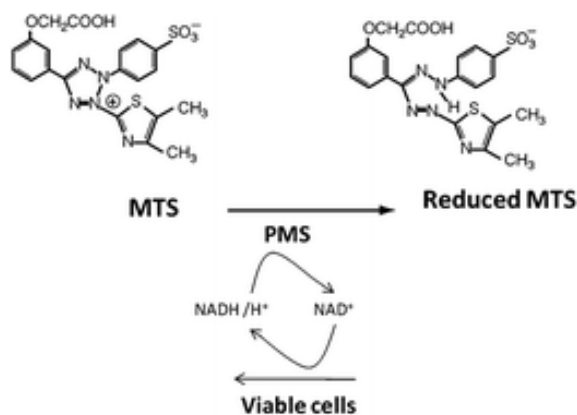


Figura 50. Reazione chimica nel saggio di vitalità MTS.

Per effettuare il saggio, per prima cosa si rimuove il terreno dai pozzetti della piastra e, successivamente, si aggiungono a ciascun pozzetto 20  $\mu\text{L}$  di reagente MTS e 100  $\mu\text{L}$  di terreno DMEM senza siero. Dopo aver applicato il trattamento, la piastra viene incubata a  $37^{\circ}\text{C}$  per un tempo variabile tra i 45 ed i 90 minuti prima di procedere con la misurazione dell'assorbanza allo spettrofotometro. Il saggio è stato eseguito anche in tre pozzetti in cui si hanno cellule non trattate (controlli) ed in tre pozzetti privi di cellule per ottenere il valore di assorbanza del solo terreno (bianchi). I valori registrati dallo strumento vengono sottratti del valore medio dell'assorbanza dei bianchi e normalizzati in base ai controlli. Si ottengono poi le percentuali di vitalità cellulare dei singoli pozzetti: tale valore percentuale è calcolato come rapporto tra i valori di assorbanza di ciascun campione ed il valore medio dell'assorbanza delle cellule di controllo, moltiplicato per cento.

### 3.9.2 Analisi Citofluorimetrica

Le analisi di citofluorimetria sono state eseguite per verificare se ci fosse un'interazione preferenziale dei peptidi con le cellule tumorali rispetto alle cellule sane. Per questa analisi è stato usato un citofluorimetro BD LSRFortessa<sup>TM</sup>. Il primo step sperimentale prevede la semina di 80000 cellule per pozzetto in 500  $\mu\text{L}$  di terreno completo. Dopo 24 ore, si procede con il trattamento delle cellule con peptidi-FITC alla concentrazione 5  $\mu\text{M}$  e 7.5  $\mu\text{M}$ . Trascorse altre 24 ore dal trattamento, le cellule sono lavate con versene (PBS a cui viene addizionato 0.2 g/L di acido etilendiamminotetracetico; PBS: soluzione a base acquosa di sali inorganici quali NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g/L) e staccate con Tripsina 0.25%. L'azione della tripsina viene bloccata dopo pochi minuti con l'aggiunta di FBS. Le cellule staccate dalla piastra sono trasferite in provette da citofluorimetria e centrifugate per 6 minuti a 1200 rpm (Alc 4237R, Sanco). Il surnatante viene rimosso, mentre il pellet è risospeso in versene prima dell'acquisizione al citofluorimetro. Oltre ai due peptidi prodotti per il presente lavoro di tesi, è stato testato anche un peptide come riferimento, sul quale erano stati effettuati degli studi preliminari (K6-FITC<sup>27</sup>).

## 4. Risultati

### 4.1 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi

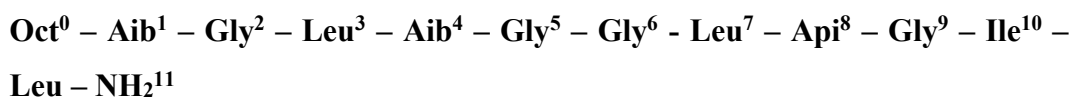
I peptidi sintetizzati in SPPS sono:

PEPTIDI	NOME UTILIZZATO NELLE ANALISI
Api8 ammido	Peptide1
Leu4 ammido	Peptide2
Api8 ammina	Peptide3
Leu4 ammina	Peptide4

I peptidi sintetizzati in soluzione sono:

PEPTIDI	NOME UTILIZZATO NELLE ANALISI
Api8 Lipoico	Peptide3-Lipoico
Api8 FITC	Peptide3-FITC
Leu4 Lipoico	Peptide4-Lipoico
Leu4 FITC	Peptide4-FITC

#### 4.1.1 Peptide1



La Figura 51 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw, un editor molecolare usato per visualizzare la struttura del peptide e calcolare l'esatto peso molecolare, che dovrà essere ritrovato nello spettro di MS nella fase di caratterizzazione del peptide.

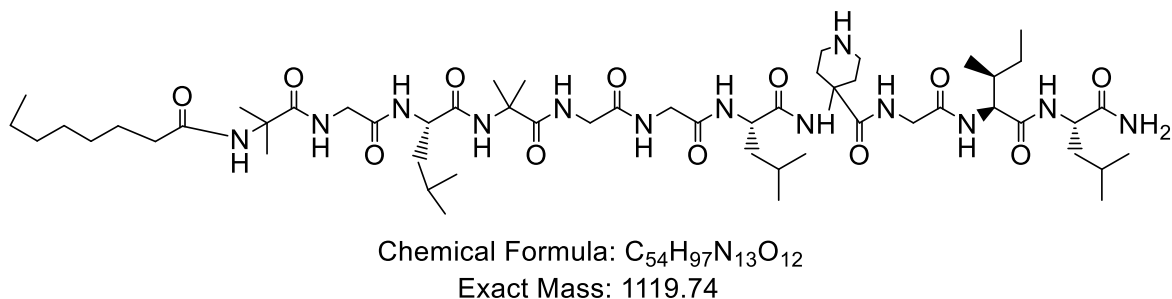


Figura 51. Struttura chimica del Peptide1 e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1119.74 g/mol. La sintesi è svolta come SPPS su resina Rink-amide ed è calcolata la resa teorica:

$$\text{g resina} * \text{loading resina} * \text{MW peptide} = 363.91\text{mg}$$

Post SPPS e post sblocco, il prodotto è analizzato in:

**RP-HPLC** per valutarne la purezza. È utilizzata una colonna Phenomenex C18 ed un gradiente che va dal 40%B al 100%B in 15 minuti, flusso 1 mL/min, lunghezza d'onda 216nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 95%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 52.

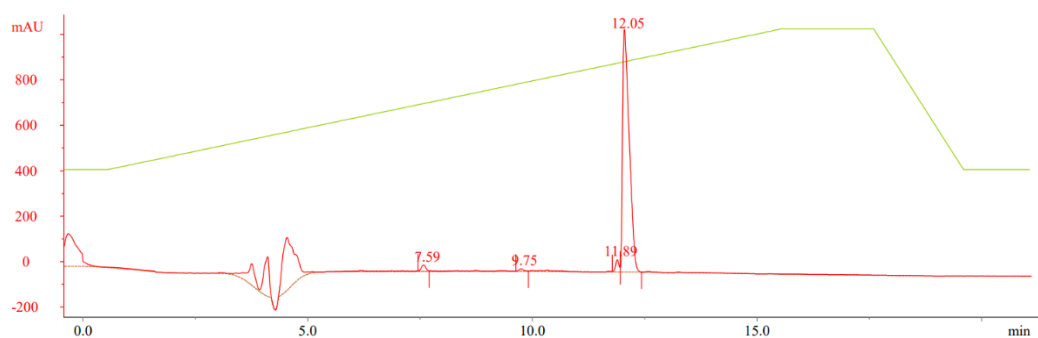


Figura 52. Cromatogramma del Peptide1.

**ESI-HRMS ad iniezione diretta** per valutare la sintesi di un prodotto con la corretta massa.

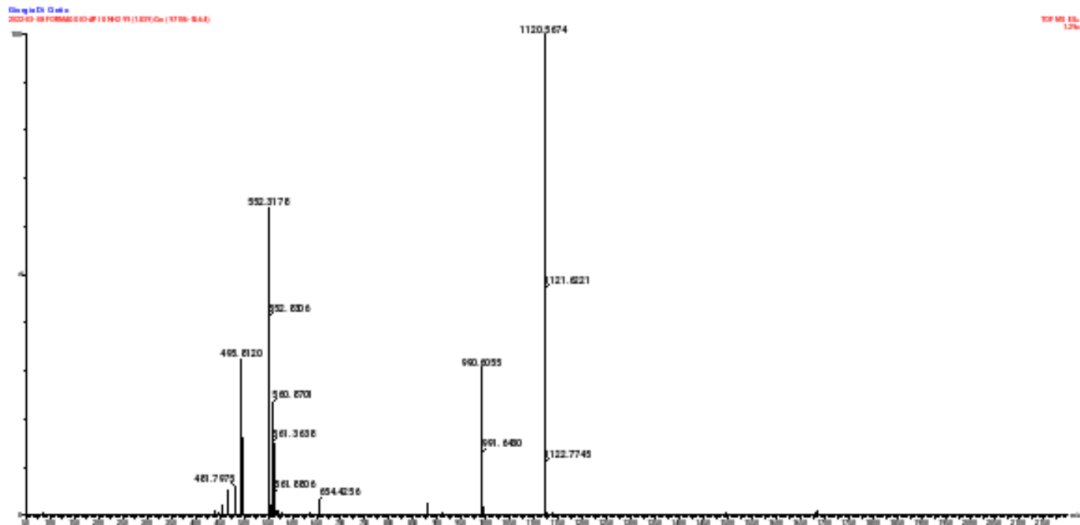


Figura 53. MS ad alta risoluzione (ESI-HRMS) ad iniezione diretta del Peptide1.

$$[MW+H]^+_{\text{sper}} = 1120.5674 \text{ g/mol} ; [MW+2H]^{++}_{\text{sper}} = 560.6701 \text{ m/z} ; [MW-\text{Oct}+H]^+ = 990.6055 \text{ m/z} ; [MW-\text{Oct}+2H]^{++} = 495.8120 \text{ m/z}.$$

Il prodotto è trasferito in una provetta tarata, pesata per calcolare la resa:

Peso provetta con purezza 95% : 195.52 mg

Peso provetta con purezza 88% : 23.85 mg

Resa: 60.28 %

**CD** per valutare la struttura secondaria del peptide in H<sub>2</sub>O, SDS 100mM in H<sub>2</sub>O e TFE.

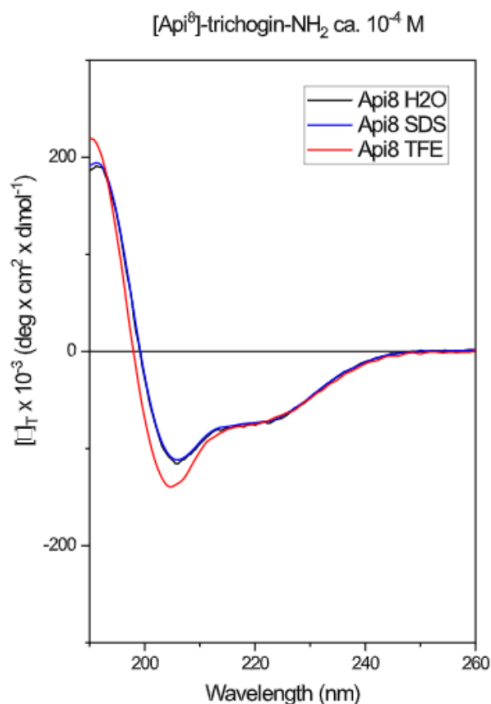


Figura 54. Spettro CD del peptide Peptide1. Concentrazione peptidica 0.1mM.

Dal rapporto tra le intensità dei due massimi negativi, si osserva che tutto il peptide Api8 presenta una struttura ad elica destrorsa mista  $\alpha/3_{10}$  in tutti e tre i solventi. La presenza di spettri quasi sovrapponibili nei tre diversi ambienti evidenzia una struttura tridimensionale stabile. Infatti, Api è un amminoacido tetra-sostituito e condivide con Aib la marcata preferenza ad adottare angoli diedri tipici di strutture elicoidali.

#### 4.1.2 Peptide3

**Oct<sup>0</sup> – Aib<sup>1</sup> – Gly<sup>2</sup> – Leu<sup>3</sup> – Aib<sup>4</sup> – Gly<sup>5</sup> – Gly<sup>6</sup> – Leu<sup>7</sup> – Api<sup>8</sup> (Boc) – Gly<sup>9</sup> – Ile<sup>10</sup> – Leu – NH<sup>11</sup> – CH<sub>2</sub>– CH<sub>2</sub>– NH<sub>2</sub>**

La Figura 55 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw. Il peptide ha il gruppo protettore Boc su Api, che consente la derivatizzazione dell'ammina C-terminale in soluzione.



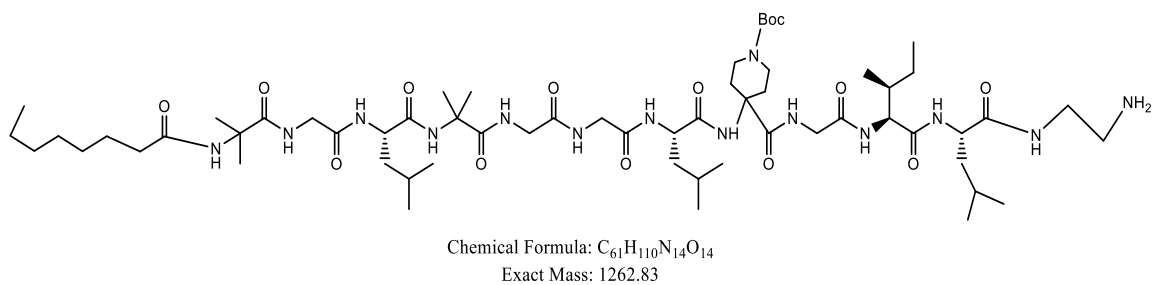


Figura 55. Struttura chimica del Peptide3 e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1262.83 g/mol. La sintesi è svolta in SPPS su resina 1,2-diamminoetano tritile ed è calcolata la resa teorica:

$$g \text{ resina} * \textit{loading resina} * MW \text{ peptide} = 511.77 \text{mg}$$

Post sintesi e post sblocco, il prodotto è analizzato in:

**RP-HPLC** È utilizzata una colonna Phenomenex C4 ed un gradiente che va dal 40%B al 100%B in 15 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216 nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 93%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 56.

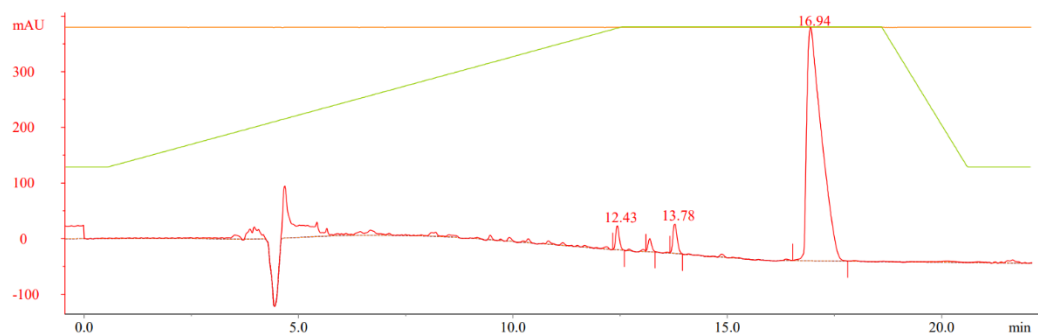


Figura 56. Cromatogramma del Peptide3.

**MS ad iniezione diretta.**

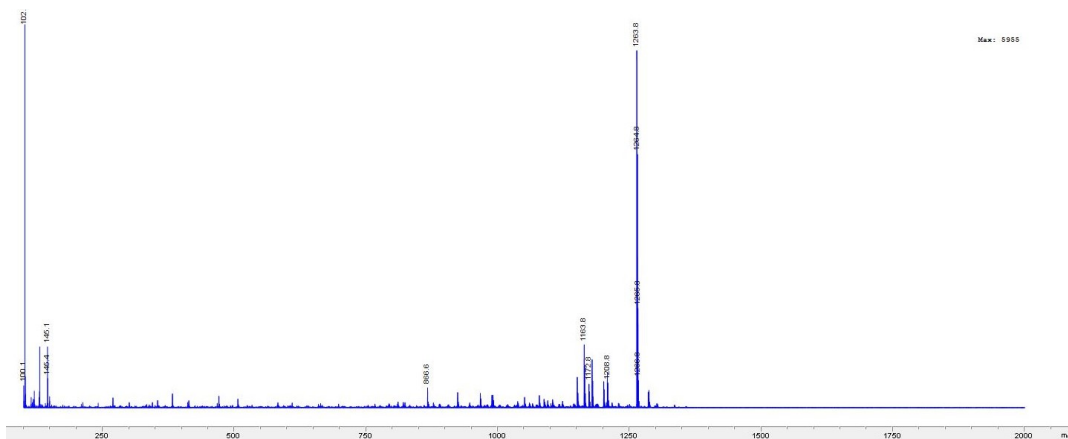


Figura 57. MS ad iniezione diretta del Peptide3.  $[MW+H]^+_{\text{sper}} = 1263.8 \text{ m/z}$ ;  
 $[MW- \text{Boc}+H]^+_{\text{sper}} = 1163.8 \text{ m/z}$

Il prodotto è trasferito in una provetta tarata, pesata per calcolare la resa:

Peso provetta 1h di sblocco: 380 mg

Peso provetta 2h di sblocco: 11,35 mg

Peso provetta O/N di sblocco: 2 mg

Resa: 78,86 %

#### 4.1.3 Peptide3-FITC

**Oct<sup>0</sup> – Aib<sup>1</sup> – Gly<sup>2</sup> – Leu<sup>3</sup> – Aib<sup>4</sup> – Gly<sup>5</sup> – Gly<sup>6</sup> – Leu<sup>7</sup> – Api<sup>8</sup> (Boc) – Gly<sup>9</sup> – Ile<sup>10</sup> – Leu – NH<sup>11</sup> – CH<sub>2</sub>– CH<sub>2</sub>– NH – FITC**

La Figura 58 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw.

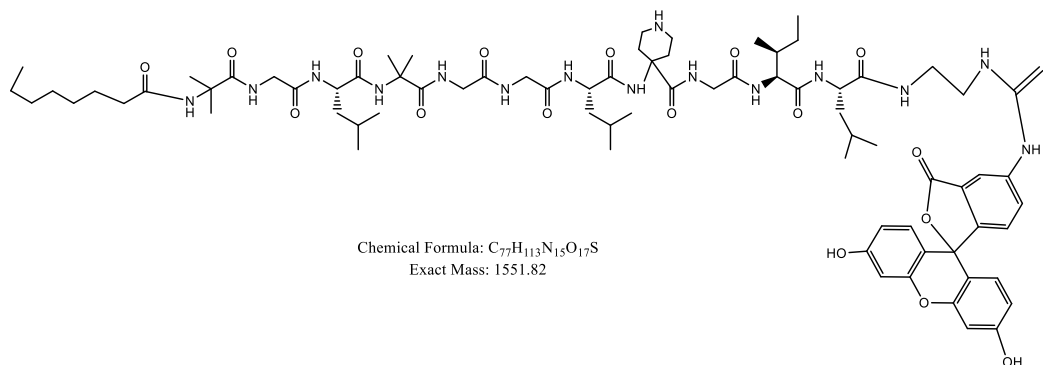


Figura 58. Formula di struttura del Peptide3-FITC e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1551.82 g/mol. La sintesi è svolta in soluzione partendo da 92,5 mg di Peptide3, 0.8 equivalenti di FITC e 1 equivalente di TEA. I reagenti sono disciolti e fatti reagire in DMF anidro. Dopo la sintesi segue la rimozione del Boc, la purificazione del prodotto e la caratterizzazione con:

**RP-HPLC.** È stata utilizzata una colonna Phenomenex C4 ed un gradiente che va dal 40% B al 100% B in 13 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216 nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 93%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 59.

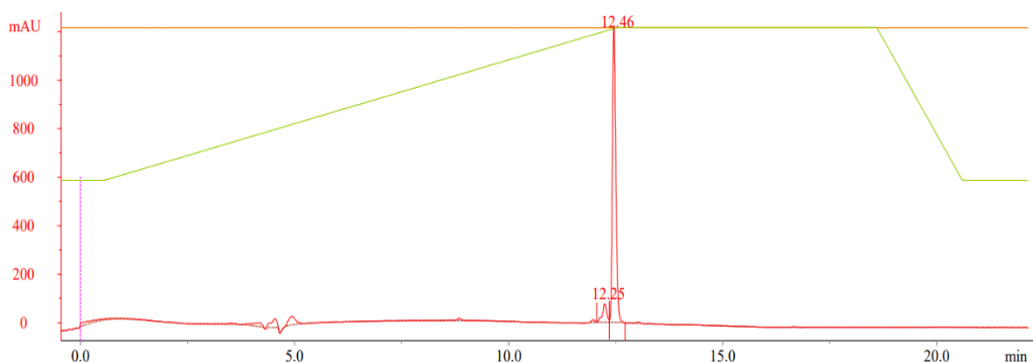


Figura 59. Cromatogramma HPLC di Peptide3-FITC.

### **ESI-HRMS ad iniezione diretta.**

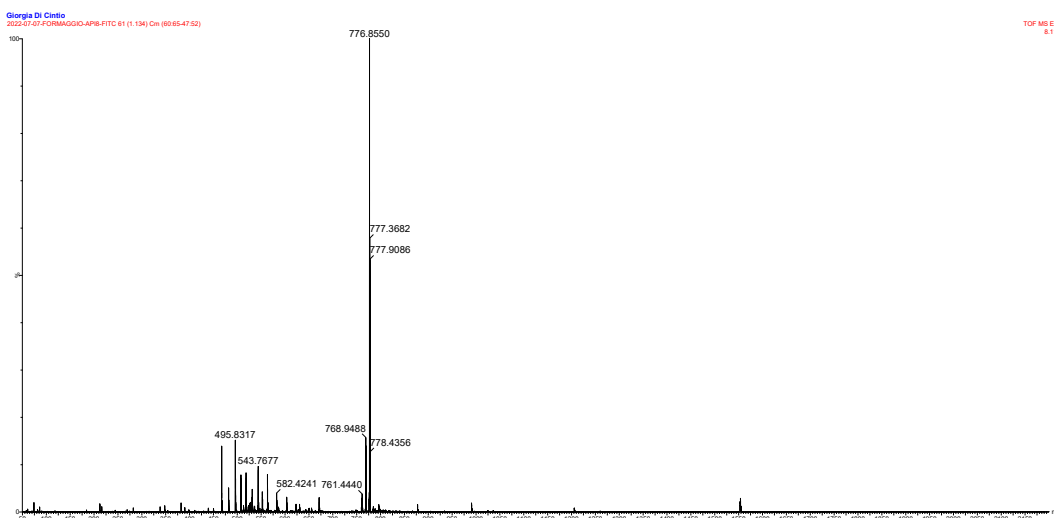


Figura 60. MS ad alta risoluzione (ESI-HRMS) ad iniezione diretta del Peptide3-FITC.  $[MW+H]^+_{\text{sper}} = 1553.8671 \text{ m/z}$ ;  $[MW+2H]^{++}_{\text{sper}} = 776.8550 \text{ m/z}$ ;  $[MW-FITC+2H]^{++}_{\text{sper}} = 582.4241 \text{ m/z}$

**CD** per valutare la struttura secondaria del peptide sintetizzato.

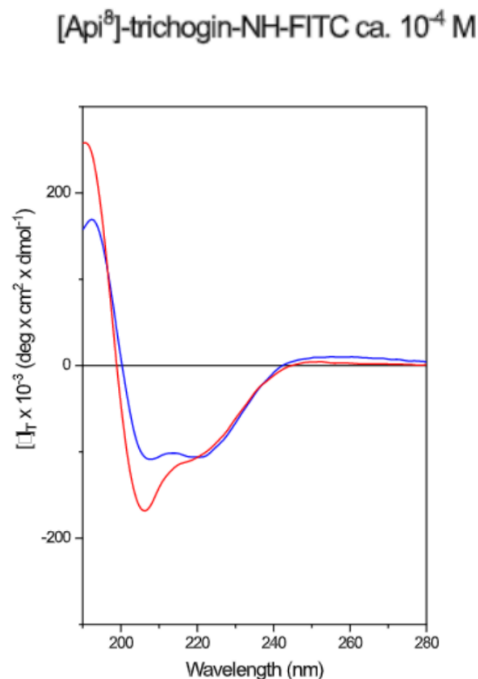


Figura 61. Spettro CD del peptide Peptide3-FITC in soluzione acquosa di SDS 100mM (blu) e TFE (rosso). Concentrazione peptidica 0.1mM.

Mentre in solvente organico lo spettro del peptide Api8-FITC risulta simile a quello registrato per il peptide Api8 ammide (elica mista  $\alpha/3_{10}$ ), in ambiente membrano-mimetico (SDS 100mM in H<sub>2</sub>O) il profilo dicroico mostra il massimo negativo a circa 208 nm meno intenso. Lo spettro registrato in presenza di micelle può essere diagnostico di un maggiore carattere di alfa elica, che però solitamente si accompagna anche ad un massimo positivo a circa 195 nm più intenso. La presenza del fluoroforo FITC, molto ingombrato, potrebbe anche rendere il peptide più tendente all'aggregazione. L'aggregazione, di solito, comporta un massimo negativo a 222nm più fondo rispetto a quello a circa 208 nm (rapporto R tra l'ellitticità molare a 222 e a 208nm >1). È comunque comune un aumento del contributo alfa elicoidale in SDS, sottolineato dalla posizione della banda negativa della transizione  $\pi-\pi^*$  che si sposta da 206 nm a 208 nm. Si può quindi concludere

che la presenza del FITC potrebbe sia spostare l'equilibrio conformazionale verso un'elica di tipo alfa, che promuovere l'aggregazione del peptide in SDS. Un diverso profilo in solvente organico e in SDS sottolinea anche una certa perdita di rigidità strutturale dovuta alla presenza dell'ingombro sterico del FITC. Il peptide non è stato testato in acqua perché non solubile.

#### 4.1.4 Peptide3-Lipoico

**Oct<sup>0</sup> – Aib<sup>1</sup> – Gly<sup>2</sup> – Leu<sup>3</sup> – Aib<sup>4</sup> – Gly<sup>5</sup> – Gly<sup>6</sup> – Leu<sup>7</sup> – Api<sup>8</sup> (Boc) – Gly<sup>9</sup> – Ile<sup>10</sup> – Leu – NH<sup>11</sup> – CH<sub>2</sub>– CH<sub>2</sub>– NH– Lipoico**

La Figura 62 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw.

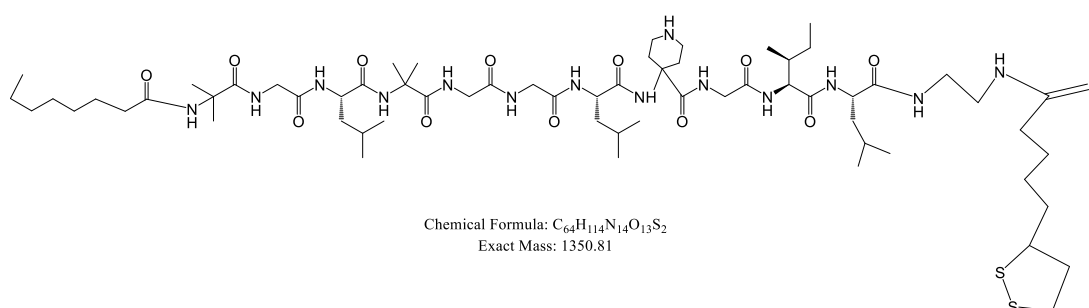


Figura 62. Struttura chimica del Peptide3-Lipoico con lipoico ossidato e peso molecolare calcolato dal programma.

Il peptide pesa 1350.81 g/mol. La sintesi è svolta in soluzione, partendo da 185 mg di Peptide3, 1.1 equivalenti di Acido Lipoico, HOBt, EDC ed 1 equivalente di NMM. I reagenti sono disciolti e fatti reagire in DCM anidro. Dopo la sintesi segue la rimozione del Boc, la purificazione del prodotto e la caratterizzazione con:

**RP-HPLC** per valutarne la purezza. È utilizzata una colonna Phenomenex C4 ed un gradiente che va dal 40%B al 100%B in 13 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216 nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 96%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 63.

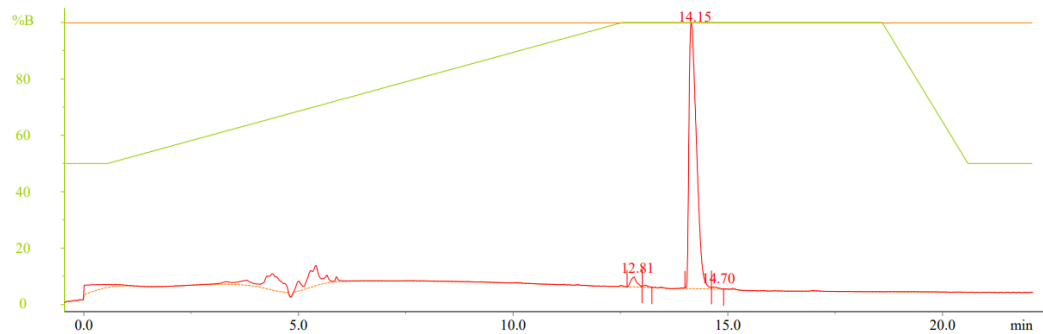


Figura 63. Cromatogramma ottenuto per il Peptide3-Lipoico.

### ESI-HRMS ad iniezione diretta.

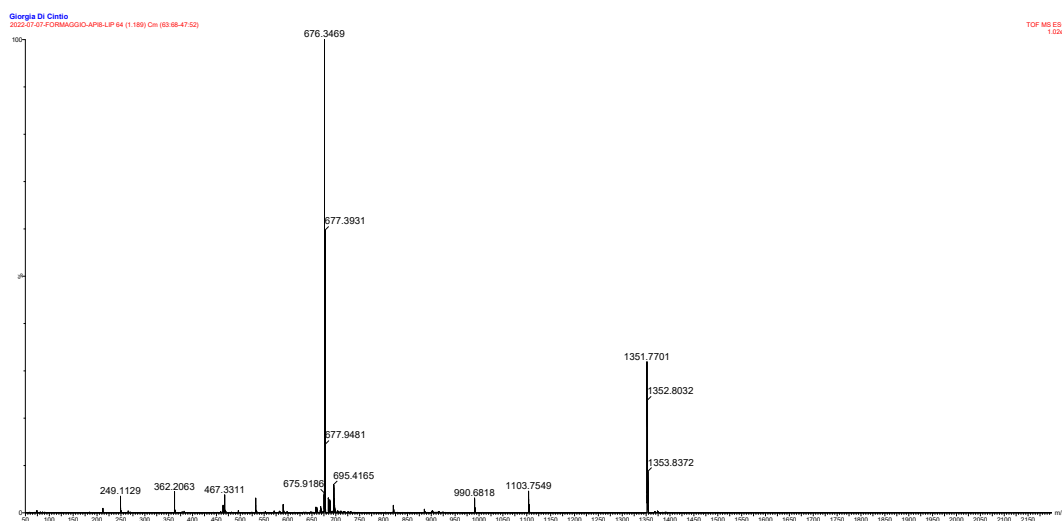


Figura 64. MS ad alta risoluzione (ESI-HRMS) ad iniezione diretta del Peptide3-Lipoico.  $[MW+H]^+_{\text{sper}} = 1351.7701 \text{ m/z}$  ;  $[MW+2H]^{++}_{\text{sper}} = 676.3469 \text{ m/z}$

CD per valutare la struttura secondaria del peptide.

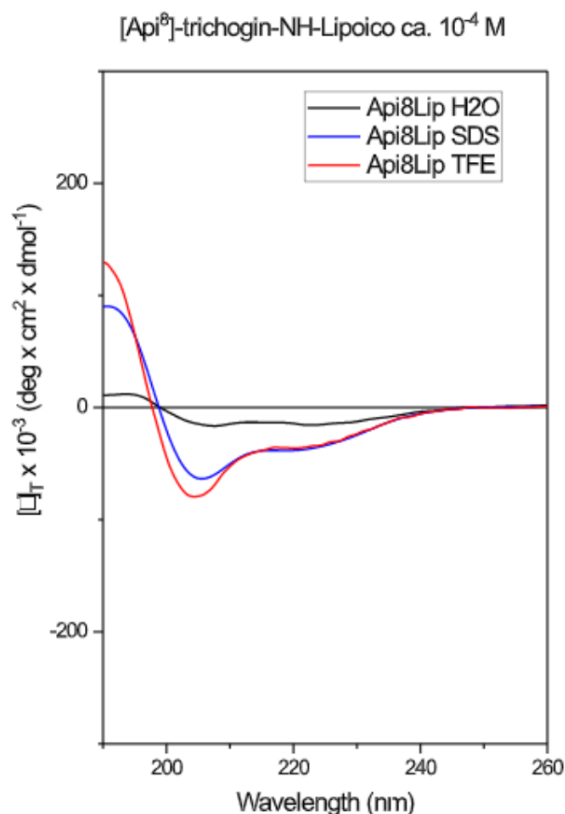


Figura 65. Spettro CD del Peptide3-Lipoico in tre diversi solventi. Concentrazione peptidica: 0.1mM.

Il peptide legato all'acido lipoico mostra poca solubilità in ambiente acquoso con perdita quasi completa del segnale, chiaro indizio della presenza di aggregazione. Il peptide in SDS e TFE mostra un profilo tipico dell'elica mista  $\alpha/3_{10}$ , registrato anche per il Peptide1 (A<sub>pi</sub><sup>8</sup> amide). Da questa analisi si può confermare come effettivamente la presenza del cromoforo FITC, stericamente ingombrato, perturbi la struttura e induca aggregazione nel peptide precedentemente studiato. Con il gruppo lipoile questa situazione non si verifica. Si può quindi concludere che questa funzionalizzazione non perturbi la struttura tridimensionale del peptide nativo.

#### 4.1.5 Peptide 2

**Oct<sup>0</sup> – Aib<sup>1</sup> – Gly<sup>2</sup> – Leu<sup>3</sup> – Leu<sup>4</sup> – Gly<sup>5</sup> – Gly<sup>6</sup> – Leu<sup>7</sup> – Aib<sup>8</sup> – Gly<sup>9</sup> – Ile<sup>10</sup> – Leu – NH<sub>2</sub><sup>11</sup>**

La Figura 66 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw.

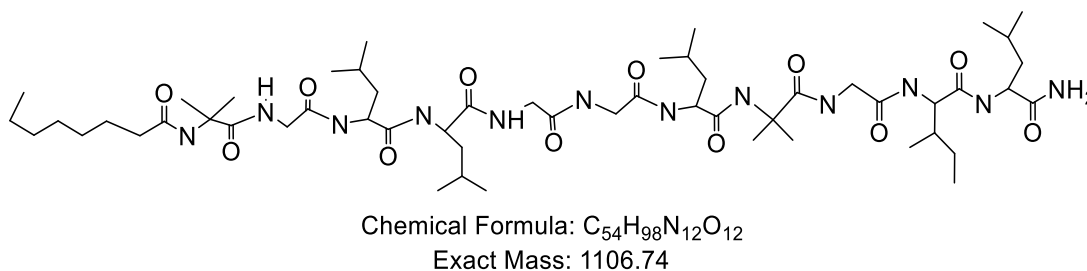


Figura 66. Struttura del Peptide2 e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1106.74 g/mol. La sintesi è svolta su resina Rink-amide ed è calcolata la resa teorica:

$$\text{g resina} * \text{loading resina} * \text{MW peptide} = 359,69\text{mg}$$

Post SPPS e post sblocco, il prodotto è analizzato in:

**RP-HPLC.** È utilizzata una colonna Phenomenex C18 ed un gradiente che va dal 50%B al 100%B in 13 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 98%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 67.

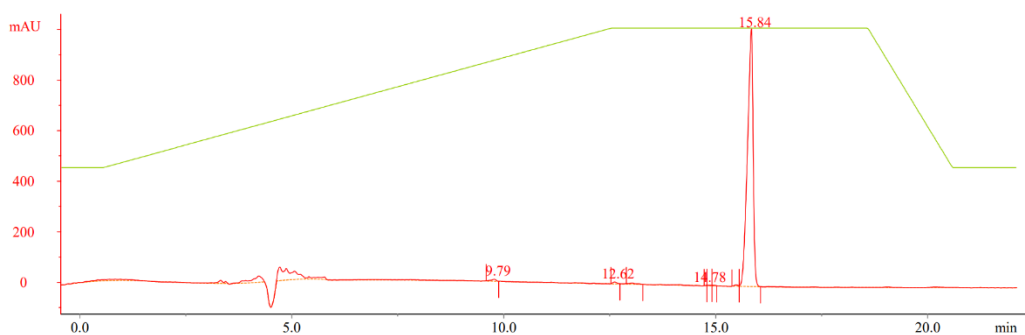


Figura 67. Cromatogramma del Peptide2.

**ESI-HRMS ad iniezione diretta.**



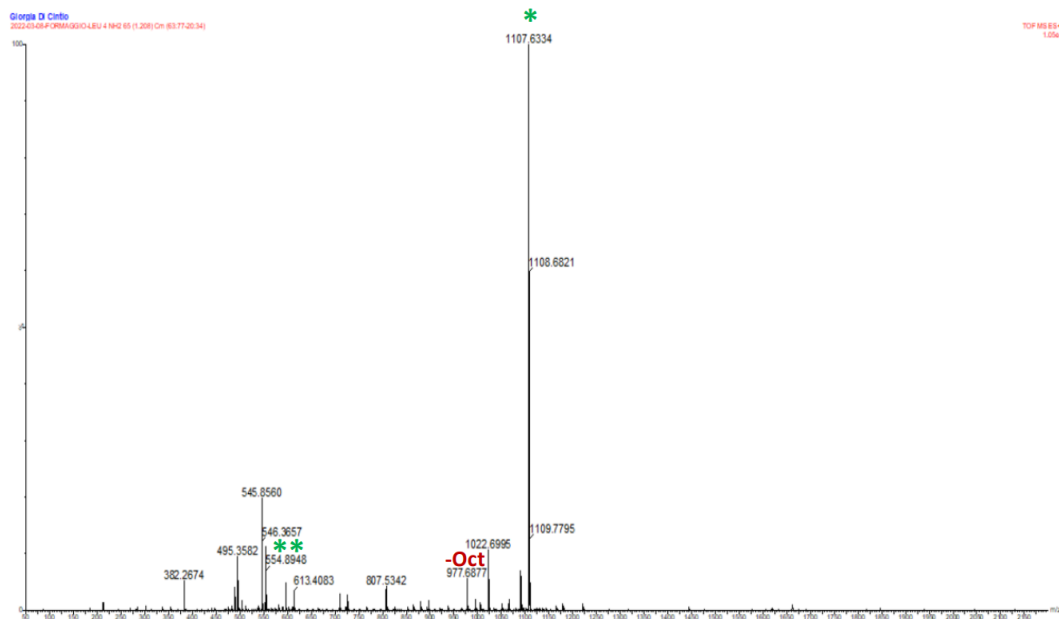


Figura 68. MS ad alta risoluzione (ESI-HRMS) ad iniezione diretta del Peptide2.

$$[\text{MW}+\text{H}]_{\text{sper}}^{+} = 1107.6334 \text{ m/z}; [\text{MW}+2\text{H}]_{\text{sper}}^{++} = 554.8948 \text{ m/z}; [\text{MW}-\text{Oct}+\text{H}]_{\text{sper}}^{+} = 977.6877 \text{ m/z}.$$

Il prodotto è trasferito in una provetta tarata, pesata per calcolare la resa:

Peso provetta con purezza 98%: 260,9mg

Resa: 72.5 %

**CD** per valutare la struttura secondaria del peptide.

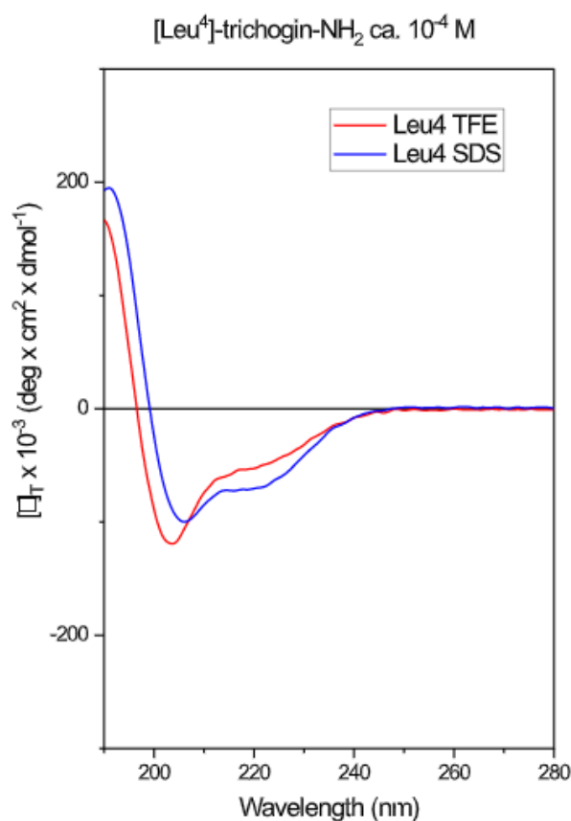
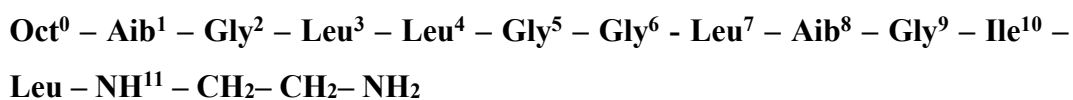


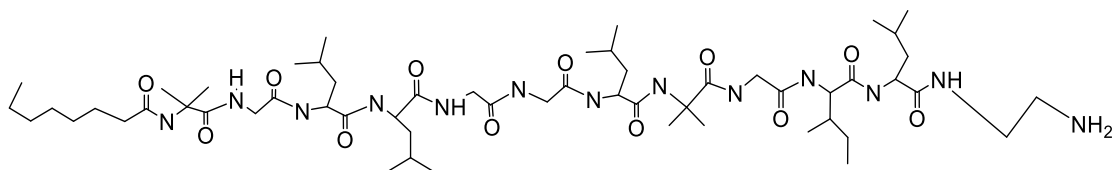
Figura 69. Spettro CD del Peptide2 in due diversi solventi. Concentrazione peptidica: 0.1mM.

Il peptide risulta strutturato in entrambi i solventi, con un maggiore contributo di alfa elica in SDS. Il peptide non è stato testato in acqua perché non solubile. Questa chiara variazione nel profilo dicroico del peptide al variare del solvente sottolinea la perdita di rigidità strutturale dovuta alla sostituzione di un residuo di Aib elicogenico, con uno di Leu, meno strutturante. È noto come la sostituzione del residuo di Aib in posizione 4 faccia perdere l'attività antimicrobica alla Tricogina GA IV, segno dell'importanza di questo residuo. Questo peptide è stato scelto proprio per la sua mancanza di bio-attività e non tossicità.

#### 4.1.6 Peptide4



La Figura 70 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw.



Chemical Formula: C<sub>56</sub>H<sub>103</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>

Exact Mass: 1149.78

Figura 70. Struttura del Peptide4 e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1149.78 g/mol. La SPPS è svolta su resina 1,2-diamminoetano tritile ed è calcolata la resa teorica:

$$\text{g resina} * \text{loading resina} * \text{MW peptide} = 465.96\text{mg}$$

Post sintesi e post sblocco, il prodotto è analizzato in:

**RP-HPLC.** È utilizzata una colonna Phenomenex C4 ed un gradiente che va dal 40%B al 100%B in 15 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 90%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 71.

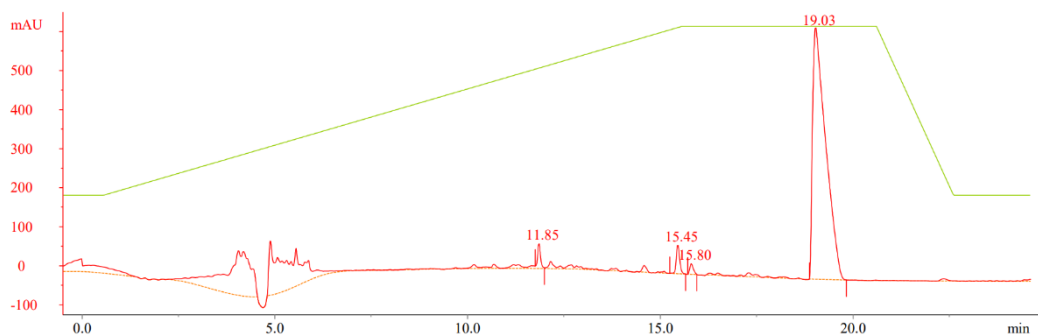


Figura 71. Cromatogramma ottenuto dal Peptide4.

**MS ad iniezione diretta.**

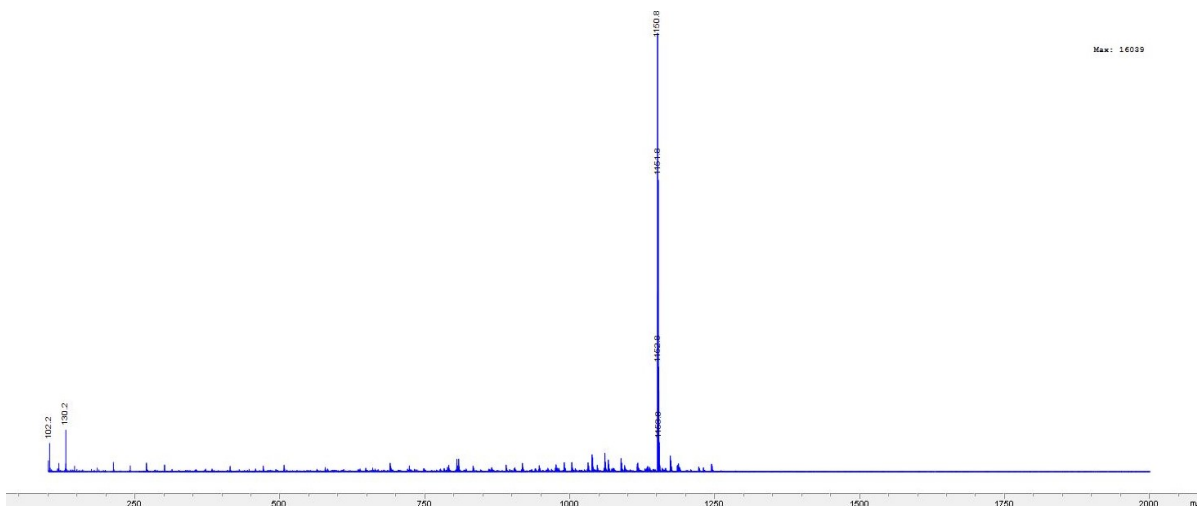


Figura 72. Spettro MS ad iniezione diretta del Peptide4  $[MW+H]^+_{\text{esper}} = 1150.8$   
m/z.

Il prodotto è trasferito in una provetta tarata, pesata per calcolare la resa reale:

Peso provetta 1h sblocco: 415 mg

Peso provetta 2h sblocco: 7.66 mg

Resa: 90.7%

#### 4.1.7 Peptide4-FITC

**Oct<sup>0</sup> – Aib<sup>1</sup> – Gly<sup>2</sup> – Leu<sup>3</sup> – Leu<sup>4</sup> – Gly<sup>5</sup> – Gly<sup>6</sup> – Leu<sup>7</sup> – Aib<sup>8</sup> – Gly<sup>9</sup> – Ile<sup>10</sup> –  
Leu – NH<sup>11</sup> – CH<sub>2</sub>– CH<sub>2</sub>– NH – FITC**

La Figura 73 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw.

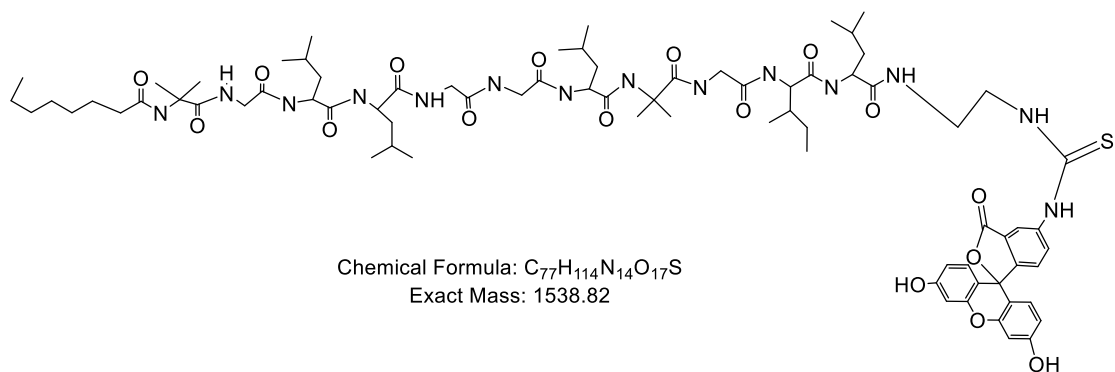


Figura 73. Struttura del Peptide4-FITC e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1538.82 g/mol. La sintesi è svolta in soluzione, partendo da 195 mg di Peptide4, 0.8 equivalenti di FITC e 1 equivalente di TEA. I reagenti sono disciolti e fatti reagire in DMF anidro. Dopo la sintesi il prodotto è purificato ed analizzato in:

**RP-HPLC.** È utilizzata una colonna Phenomenex C18 ed un gradiente che va dal 10%B al 100%B in 15 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 99%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 74.

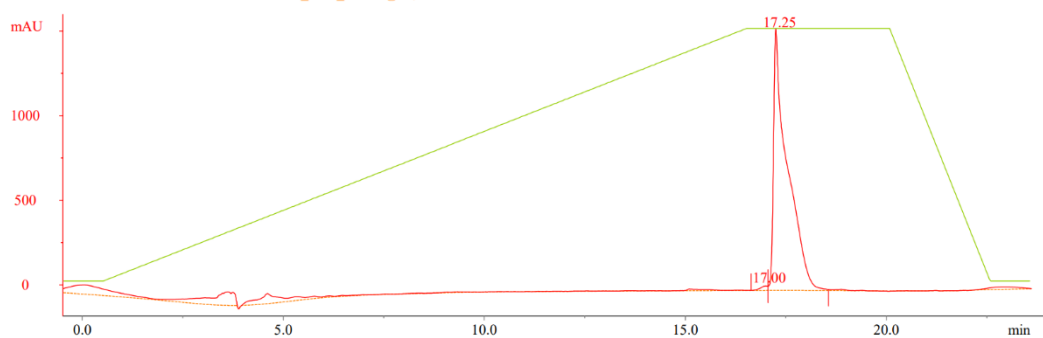


Figura 74. Cromatogramma del Peptide4-FITC.

**ESI-HRMS ad iniezione diretta.**

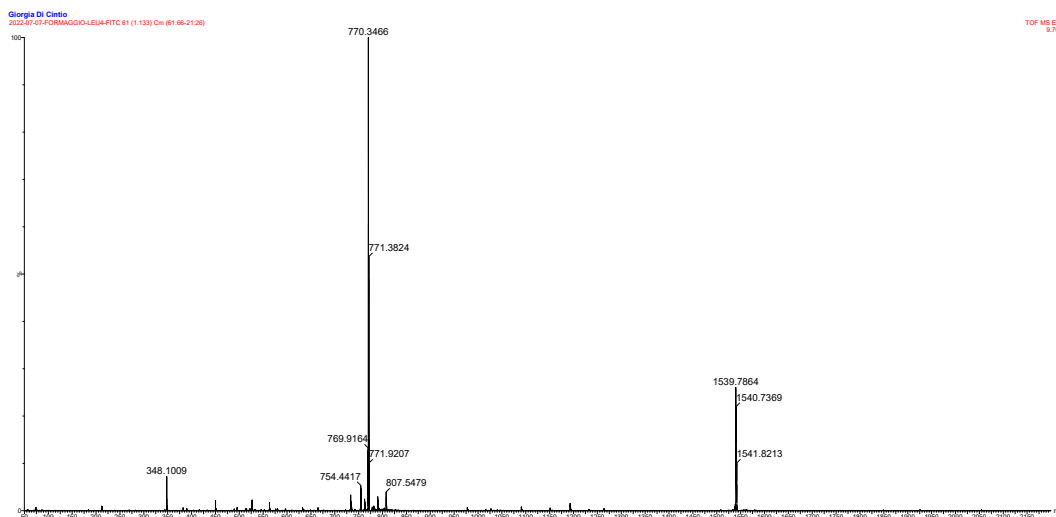


Figura 75. MS ad alta risoluzione (ESI-HRMS) ad iniezione diretta del Peptide4-FITC.  $[MW H]^+_{sper} = 1539.7864 \text{ m/z}$ ;  $[MW+2H]^{++}_{sper} = 770.3466 \text{ m/z}$

**CD** per valutare la struttura secondaria del peptide.

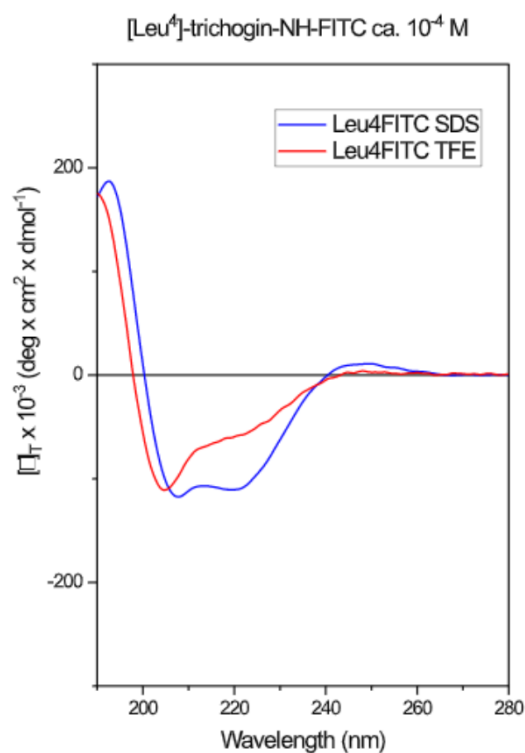


Figura 76. Spettro CD del Peptide4-FITC in tre diversi solventi. Concentrazione peptidica: 0.1mM.

La presenza del fluoroforo FITC, molto ingombrato, come visto precedentemente nel caso del peptide Api8-FITC, abbassa il massimo negativo a 222 nm. Anche in questo caso, si può ipotizzare un aumento del contributo alfa elicoidale in SDS, confermato dalla posizione della banda negativa della transizione  $\pi-\pi^*$ , che si sposta da 205 a 208 nm. Anche in questo caso si conferma la perturbazione strutturale dovuta all'inserimento del cromoforo FITC, molto ingombrato.

#### 4.1.8 Peptide4-Lipoico

**Oct<sup>0</sup> – Aib<sup>1</sup> – Gly<sup>2</sup> – Leu<sup>3</sup> – Leu<sup>4</sup> – Gly<sup>5</sup> – Gly<sup>6</sup> – Leu<sup>7</sup> – Aib<sup>8</sup> – Gly<sup>9</sup> – Ile<sup>10</sup> – Leu – NH<sup>11</sup> – CH<sub>2</sub>– CH<sub>2</sub>– NH – Lipoico**

La Figura 77 riporta la struttura della molecola disegnata con ChemDraw.

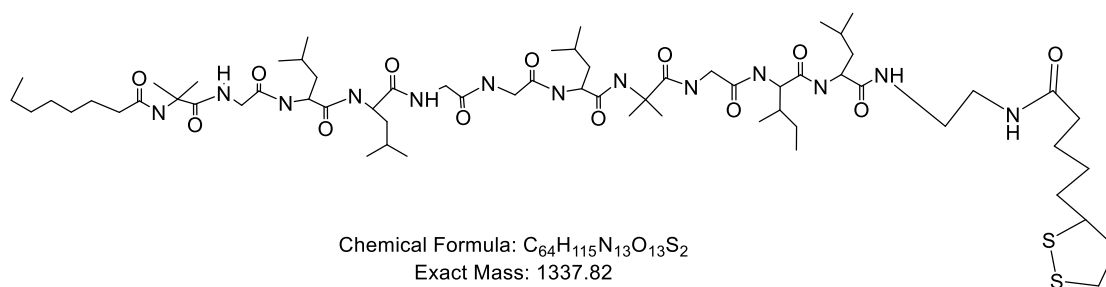


Figura 77. Struttura del Peptide4-Lipoico e peso molecolare calcolato dal programma ChemDraw.

Il peptide pesa 1337.82 g/mol. La sintesi è svolta in soluzione, partendo da 200 mg di Peptide4, 1.1 equivalenti di Acido Lipoico, HOBt, EDC ed 1 equivalente di NMM. I reagenti sono disciolti e fatti reagire in DCM anidro. Dopo la sintesi segue la purificazione del prodotto e caratterizzazione con:

**RP-HPLC.** È utilizzata una colonna Phenomenex C4 ed un gradiente che va dal 40%B al 100%B in 10 minuti, flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 216 nm. È stato ottenuto un prodotto con purezza del 96%, calcolata dal cromatogramma riportato in Figura 78.

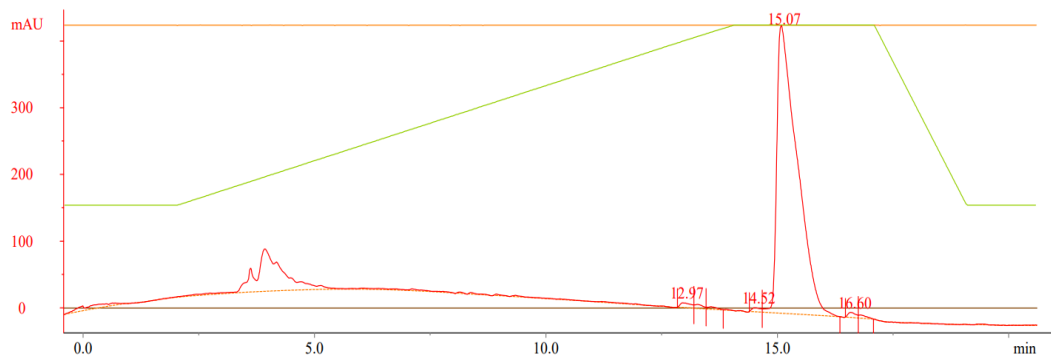


Figura 78. Cromatogramma del Peptide4-Lipoico.

### ESI-HRMS ad iniezione diretta

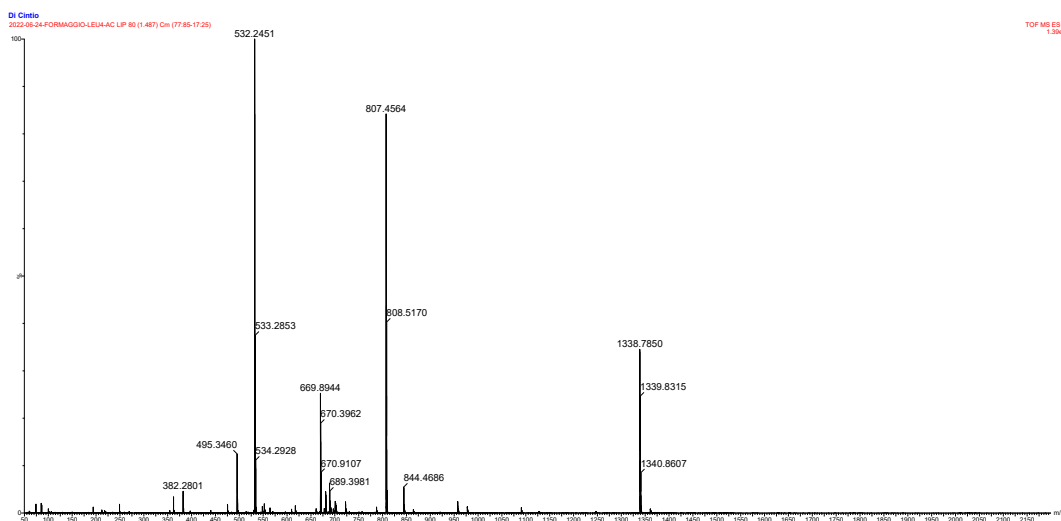


Figura 79. MS ad alta risoluzione (ESI-HRMS) ad iniezione diretta del Peptide4-Lipoico.  $[MW+H]^+_{\text{sper}} = 1338.7850 \text{ m/z}$ ;  $[MW+2H]^{++}_{\text{sper}} = 669.8944 \text{ m/z}$

CD per valutare la struttura secondaria del peptide



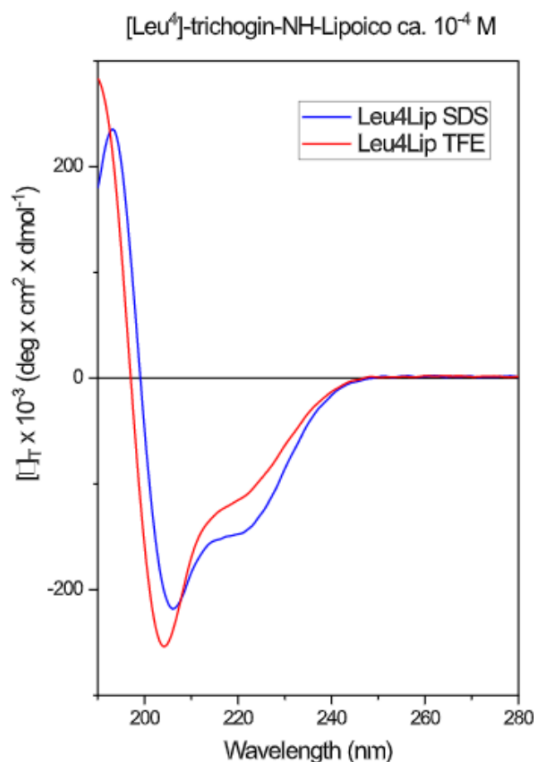
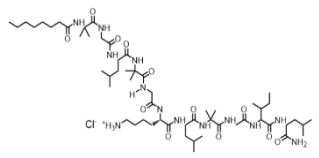


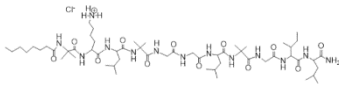
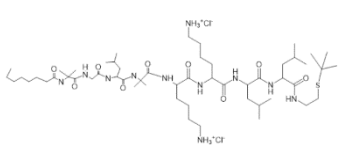
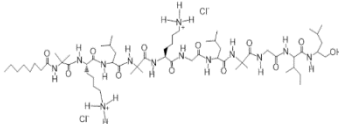
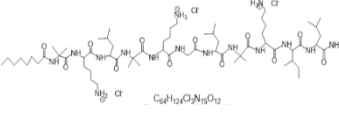
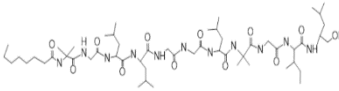
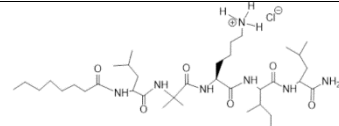
Figura 80. Spettro CD del peptide Peptide4-Lipoico in due diversi solventi.

Concentrazione peptidica: 0.1mM.

In SDS e TFE si ritrova una struttura elicoidale di tipo misto  $\alpha/3_{10}$ . Il peptide è idrofobico per cui è assente l'analisi in acqua. Anche in questo caso si mantiene la scarsa rigidità strutturale dovuta alla sostituzione del residuo di Aib con uno di Leu, molto meno promotore di struttura elicoidale.

In affiancamento ai campioni sintetizzati per il presente lavoro di tesi, sono stati testati anche altri peptidi analoghi della Tricogina GA IV, riportati in Tabella 3.

PEPTIDE	Struttura e MW	Caratteristiche ed attività
<b>K6-NH2</b>	 <p>[MW: 1186,3 Da]</p>	Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale il residuo di glicina in 6 è stato sostituito da una lisina (K) <sup>27 16 36</sup>

<p><b>K2-NH2</b></p>	 <p>[MW: 1186,3 Da]</p>	<p>Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale il residuo di glicina in 2 è stato sostituito da una lisina (K)<sup>16</sup></p>
<p><b>K56-L78-StBu</b></p>	 <p>[MW: 1153,72 Da]</p>	<p>Analogo corto della regione N-terminale del peptide naturale tricogina, nel quale i residui di glicina in 5 e 6 sono stati sostituiti da lisine (K), e a cui è stata aggiunta la leucina in posizione 8 al C-terminale.</p>
<p><b>K25-lol</b></p>	 <p>[MW: 1279,82 Da]</p>	<p>Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale i residui di glicina in 2 e 5 sono stati sostituiti da lisine (K)<sup>16</sup></p>
<p><b>K259-NH2</b></p>	 <p>[MW: 1399,86 Da]</p>	<p>Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale i residui di glicina in 2, 5 e 9 sono stati sostituiti da lisine (K)<sup>16</sup></p>
<p><b>Leu4-lol</b></p>	 <p>[MW: 1093,75 Da]</p>	<p>Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale il residuo di Aib in 4 è stato sostituito da una leucina (L)<sup>9</sup></p>
<p><b>LUKIL</b></p>	 <p>[MW: 733,4 Da]</p>	<p>Analogo corto della regione C-terminale del peptide naturale tricogina, nel quale il residuo di glicina in 9 è stato sostituito da una lisina (K).</p>

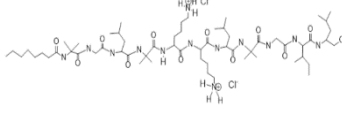
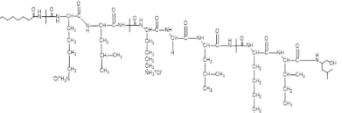
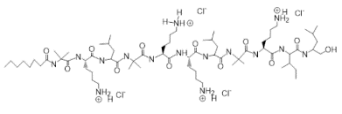
<b>K56-lol</b>	 [MW: 1279,82 Da]	Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale i residui di glicina in 5 e 6 sono stati sostituiti da lisine (K) <sup>16</sup>
<b>K259-lol</b>	 [MW: 1386,87 Da]	Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale i residui di glicina in 2, 5 e 9 sono stati sostituiti da lisine (K) <sup>16</sup>
<b>K2569-lol</b>	 [MW: 1493,92 Da]	Analogo del peptide naturale tricogina, nel quale i residui di glicina in 2, 5, 6 e 9 sono stati sostituiti da lisine (K)

Tabella 3. Lista degli altri peptidi testati *in vitro*: nome, struttura, MW e caratteristiche.

Gli analoghi che presentano delle Gly sostituite con delle Lys assumono una o più cariche positive per cui risultano avvantaggiati nell'interazione con le cellule tumorali in quanto queste ultime hanno un'elevata concentrazione di glicoproteine cariche negativamente rispetto alle cellule sane <sup>37</sup>.

## 4.2 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle

### 4.2.1 Nanoparticelle d'oro

È stata eseguita una sintesi in 240 mL di soluzione H<sub>2</sub>O ed NaCl 2\*10<sup>-4</sup> M. Il raggio idrodinamico medio è stato valutato con un'analisi di DLS mentre la concentrazione è stata ottenuta con spettroscopia UV-Vis.

r [m]	Concentrazione AuNPs [M]
6.50 * 10 <sup>-9</sup>	22.8 * 10 <sup>-9</sup>

Tabella 4. Valori di concentrazione e raggio idrodinamico medio della sospensione di nanoparticelle.

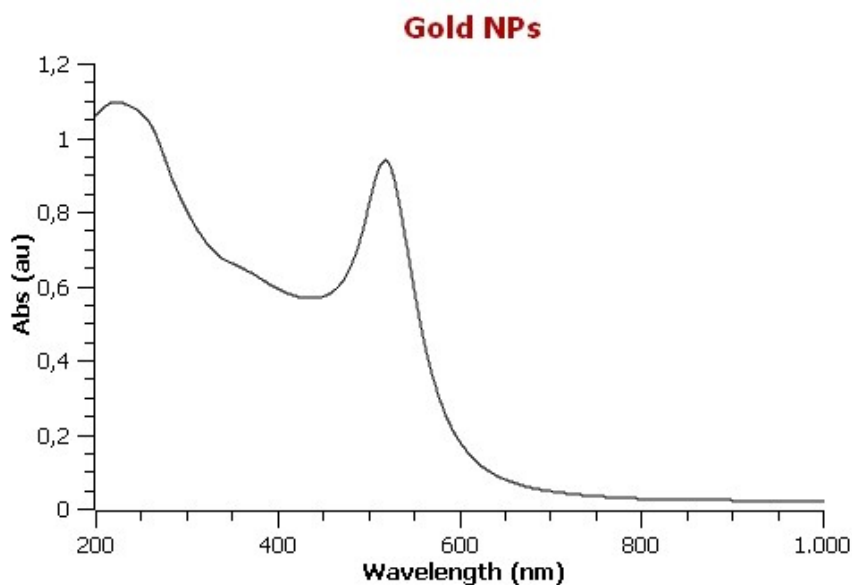


Figura 81. Spettro di assorbimento delle AuNPs nude, post sintesi. Picco di assorbimento a 520 nm.

### 4.3 Funzionalizzazione dei peptidi su AuNPs e caratterizzazione

Data la concentrazione delle nanoparticelle all'interno della sospensione ed il raggio idrodinamico medio, viene stimata la superficie di nanoparticelle libera per andare a creare legami oro-zolfo con i peptidi tiolati assumendo una densità di packing di due molecole di peptide per nanometro quadrato di nanoparticelle. Si ottengono le moli e la concentrazione di peptide necessario per saturare i siti di legame. Chiameremo questa concentrazione 1x, ad indicare il valore di loading esatto richiesto per saturare i siti.

<b>Moli peptide [mol]</b>	<b>Concentrazione peptide [M] 1x</b>
2.42 * 10 <sup>-8</sup>	24.2 * 10 <sup>-6</sup>

Tabella 5. Valori delle moli e della concentrazione di peptide necessari a saturare i supposti siti di legame sulla superficie delle nanoparticelle.

Si può notare che, tra la concentrazione di nanoparticelle e la concentrazione del peptide, vi è un fattore di  $10^3$  di differenza.

I peptidi tiolati Peptide3-Lipoico e Peptide4-Lipoico sono disciolti alla concentrazione massima possibile in modo da ridurre il rischio di diluire la sospensione finale di nanoparticelle. Si diluiscono i peptidi alla concentrazione di  $0.75 \cdot 10^{-2}$  M in MetOH: la percentuale di MetOH nel pozzetto con le cellule non supera l'1% ed è stata dimostrata, in studi preliminari, la tollerabilità ad esso con esperimenti di lisi delle vescicole (leakage)<sup>14</sup>. Dopo la risospensione si procede con le prove di loading:

<b>AuNPs + peptide</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Risultati a 5 ore dalla funzionalizzazione</b>
<b>Peptide4-Lipoico 2x</b>	$48.4 \cdot 10^{-6}$ M	PRECIPITATO
<b>Peptide4-Lipoico 1x</b>	$24.2 \cdot 10^{-6}$ M	PRECIPITATO
<b>Peptide4-Lipoico 0.75x</b>	$18.15 \cdot 10^{-6}$ M	NON PRECIPITATO
<b>Peptide4-Lipoico 0.5x</b>	$12.1 \cdot 10^{-6}$ M	NON PRECIPITATO
<b>Peptide3-Lipoico 2x</b>	$48.4 \cdot 10^{-6}$ M	PRECIPITATO
<b>Peptide3-Lipoico 1x</b>	$24.2 \cdot 10^{-6}$ M	NON PRECIPITATO
<b>Peptide3-Lipoico 0.75x</b>	$18.15 \cdot 10^{-6}$ M	NON PRECIPITATO
<b>Peptide3-Lipoico 0.5x</b>	$12.1 \cdot 10^{-6}$ M	NON PRECIPITATO

Tabella 6. Concentrazioni finali ottenute nella sospensione di nanoparticelle e risultati osservati dopo 5 ore.

Immediatamente si assiste ad uno shift del colore della sospensione da rosso a rosso/violetto in tutti i campioni. Dopo aver atteso cinque ore si osservano le sospensioni e si conclude che per Peptide3-Lipoico si userà un loading 1x, corrispondente ad una concentrazione peptidica  $24.2 \cdot 10^{-6}$  M, mentre per Peptide4-Lipoico si userà un loading 0.75x, corrispondente ad una concentrazione

peptidica  $18.15 \cdot 10^{-6}$  M. Sono acquisiti gli spettri di assorbimento delle sospensioni, per valutare l'aggregazione delle nanoparticelle.

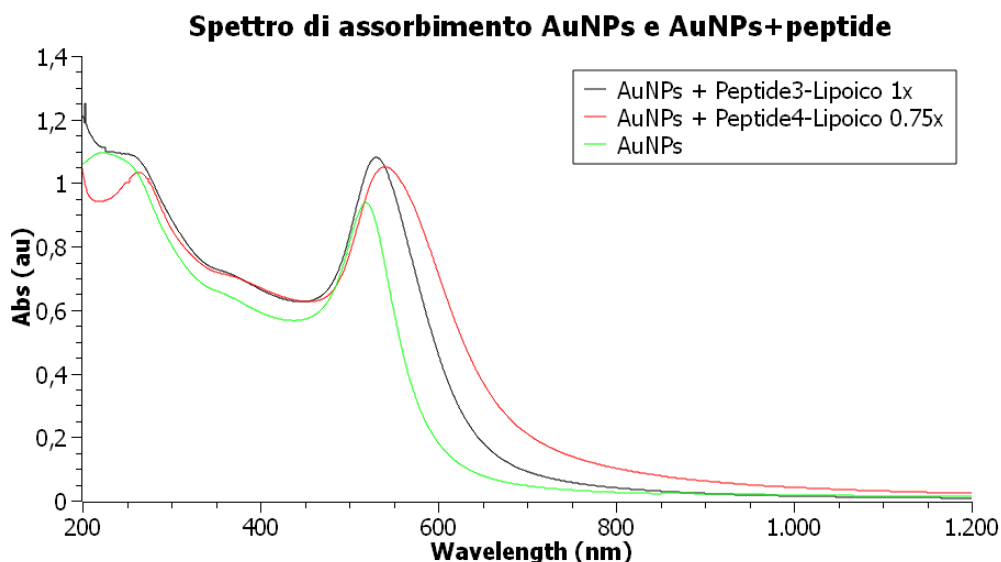


Figura 82. Confronto tra spettri di assorbimento di: AuNPs nude (profilo verde) e funzionalizzate con peptidi tiolati Peptide4-Lipoico 0.75x (profilo rosso) ed Peptide3-Lipoico 1x (profilo grigio).

Data la diminuzione della stabilità colloidale delle nanoparticelle ricoperte di peptide ci si aspettava uno shift della banda a 520 nm verso lunghezze d'onda maggiori ed è effettivamente ciò che si nota: il massimo di assorbimento per la sospensione di NPs + Peptide4-Lipoico 0.75x la si trova a 540 nm, mentre per NP's + Peptide3-Lipoico 1x la si trova a 530 nm. Con gli stessi campioni sono acquisiti degli spettri di DLS per valutare il raggio idrodinamico medio nelle nanoparticelle dopo il legame con i peptidi tiolati. I campioni sono diluiti con H<sub>2</sub>O fino ad ottenere una sospensione con l'assorbanza di circa 0.2 alla lunghezza d'onda di 633 nm. Dagli spettri DLS si nota che il raggio medio è aumentato nelle sospensioni di AuNPs funzionalizzate con peptide rispetto ad AuNPs nude, indice del fatto che le nanoparticelle hanno aumentato l'aggregazione interagendo tra di loro grazie ai peptidi tiolati a cui sono legate. Per quanto riguarda la sospensione con Peptide3-Lipoico, abbiamo una sospensione con aggregati polidispersi con

diametro medio 91.54 nm mentre per quanto riguarda Peptide4-Lipoico abbiamo sospensioni monodisperse con diametro elevato (oltre i 2000 nm).

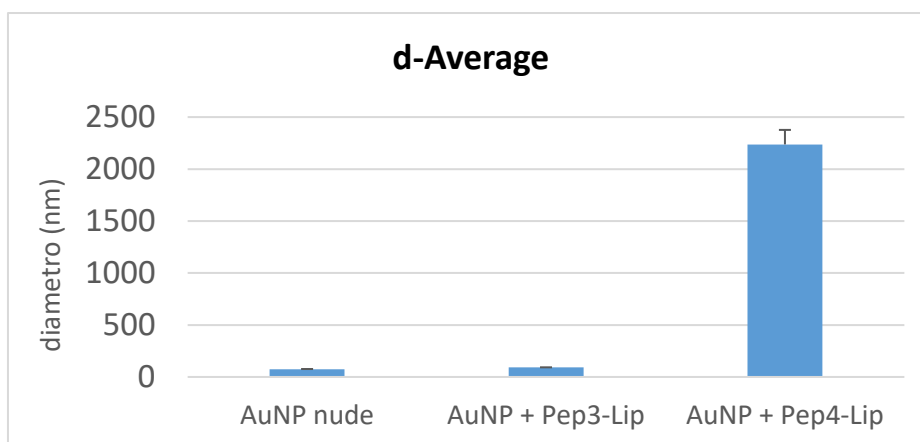


Figura 83. L'istogramma riporta i dati del diametro medio delle nanoparticelle presenti nelle sospensioni di AuNP nude, AuNP legate al Peptide3-Lipoico ed AuNP legate a Peptide4-Lipoico.

Sono acquisiti degli spettri di CD per valutare la variazione della struttura molecolare dei peptidi dopo la funzionalizzazione sulla nanoparticella d'oro. I risultati riportati sono già sottratti del bianco, che corrisponde alla sospensione di nanoparticelle nude (in  $H_2O + NaCl 2 \cdot 10^{-4} M$ ). Per visualizzare l'effetto dei peptidi nanoparticelle nella sospensione acquosa, sono state eseguite analisi TEM delle nanoparticelle funzionalizzate con peptidi. Le immagini TEM sono acquisite per tre campioni: nanoparticelle nude, nanoparticelle funzionalizzate con Peptide3-Lipoico 1x, nanoparticelle funzionalizzate con Peptide4-Lipoico 0.75x.

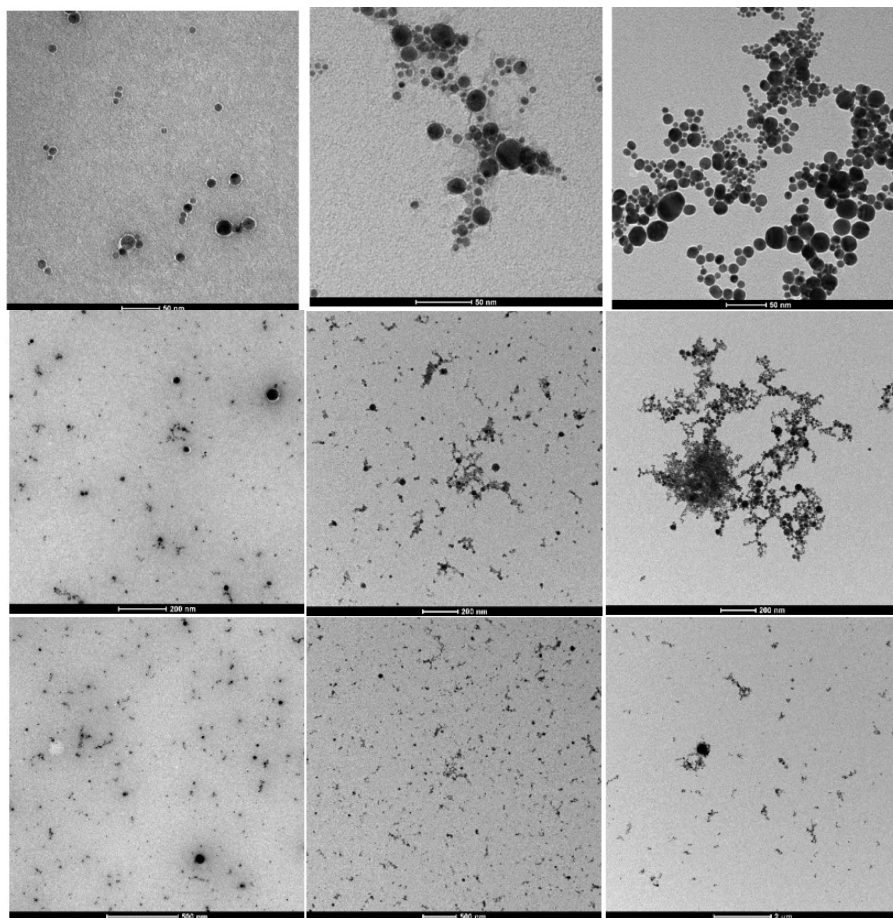


Figura 84. Acquisizioni TEM della sospensione di AuNPs nude (sinistra), AuNPs funzionalizzate con Peptide3-Lipoico 1x (cento), AuNPs funzionalizzate con Peptide4-Lipoico 0.75x (destra).

Le nanoparticelle d'oro sono polidisperse (come osservato nell'analisi di DLS). Dalle immagini a maggiore ingrandimento (prima riga) è possibile osservare che solo nel campione con Peptide3-Lipoico 1x è presente una rete di peptidi autoassemblati, apprezzabile come una matrice che circonda le nanoparticelle, che indica come le nanoparticelle siano indotte ad avvicinarsi tra loro per l'interazione tra i peptidi. La presenza di questa rete peptidica è indice dell'utilizzo di una quantità di peptide elevata rispetto ai siti di legame delle nanoparticelle o dell'interazione di molti peptidi su poche nanoparticelle, le prime con cui sono entrati in contatto. Ciò comporta una maggiore frequenza di aggregati di nanoparticelle rispetto al campione privo di peptidi. Per quanto concerne il Peptide4-Lipoico 0.75x, sono evidenti degli aggregati con diametro maggiore mentre la matrice che circonda le nanoparticelle non è altrettanto visibile, indice

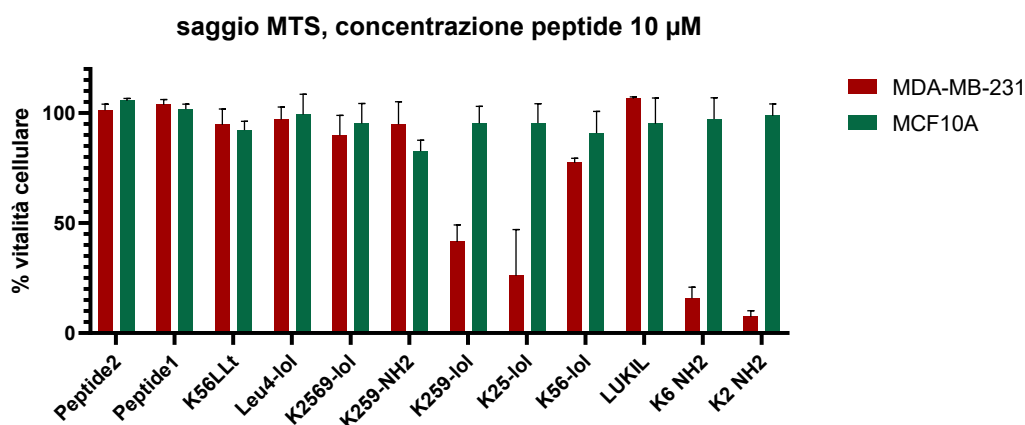


del fatto che in questo caso il rapporto peptide-nanoparticelle non è in eccesso significativo. Si ha dunque una chiara tendenza all'aggregazione delle nanoparticelle ricoperte dai peptidi. Una tale situazione è la prova indiretta dell'efficace derivatizzazione delle nanoparticelle col peptide che, essendo idrofobico, rende meno stabili le nanostrutture in soluzione acquosa.

#### 4.4 Risultati del saggio MTS

I risultati dei trattamenti con soli peptidi su cellule MDA-MB-231 dimostrano che i peptidi non causano morte cellulare ad una concentrazione di 5  $\mu\text{M}$ . Alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  K56LLt, K2596-lol, K259-NH2 e K56-lol riducono la vitalità a valori di circa l'85%; gli altri peptidi causano morte cellulare >50%. Peptide1, Peptide2, Leu4-lol, LUKIL sono non tossici fino ad una concentrazione di 20  $\mu\text{M}$ . Tutti gli altri peptidi testati dimostrano citotossicità significativa nei confronti delle cellule tumorali a 15  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ .

I risultati dei trattamenti su cellule MCF10A dimostrano che tutti i peptidi non causano morte cellulare ad una concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  mentre a 15  $\mu\text{M}$  si ha che K56LLt, K259-NH2 e K2-NH2 causano circa il 20% di morte cellulare e gli altri peptidi il 50%. Peptide1, Peptide2, Leu4-lol e LUKIL sono non tossici fino ad una concentrazione di 20  $\mu\text{M}$  mentre a tale concentrazione K56LLt causa mortalità al 50% e tutti gli altri peptidi inducono la totale mortalità delle cellule trattate.



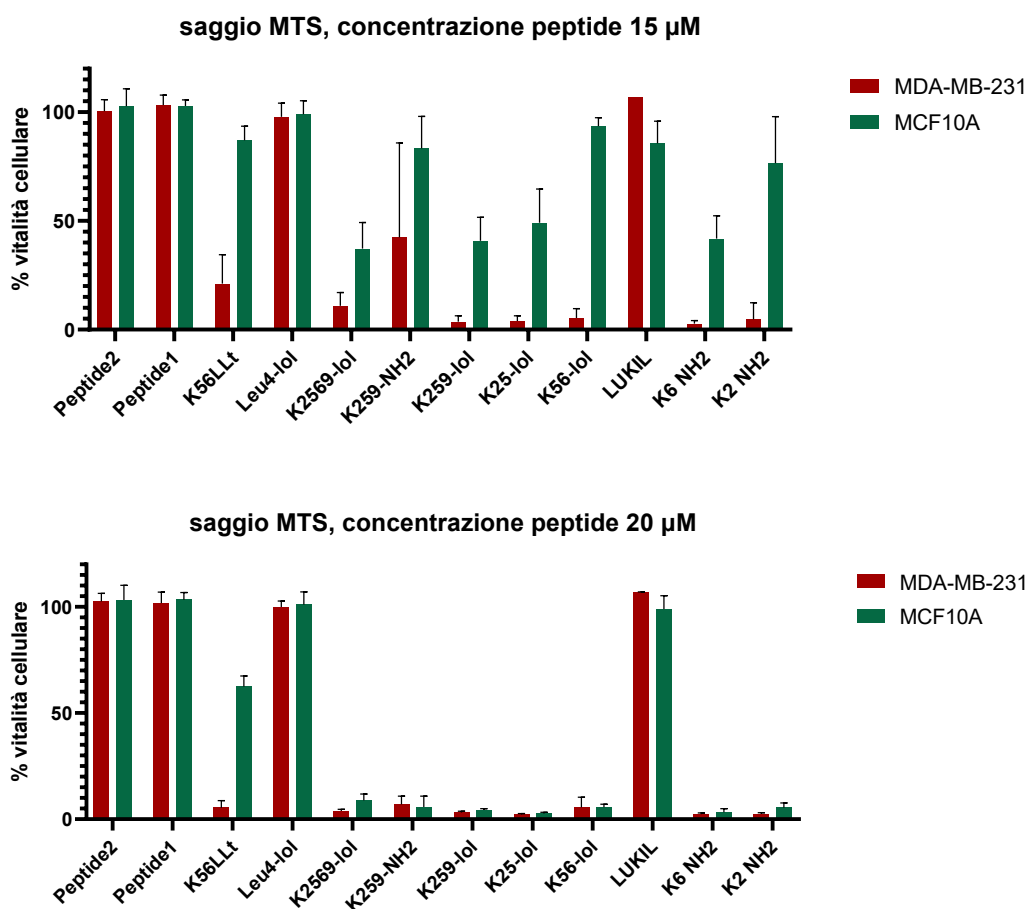


Figura 85. Gli istogrammi riportano i dati di vitalità cellulare delle cellule MDA-MB-231 (in rosso) e delle cellule MCF10A (in verde) in seguito a trattamenti con i peptaibolici a diverse concentrazioni.

Tenendo in considerazione questi dati, sono stati eseguiti i saggi MTS utilizzando le nanoparticelle leganti Peptide3-Lipoico 1x e Peptide4-Lipoico 0.75x. Sono state saggiate tre diverse concentrazioni: 5  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. Non è stata superata la concentrazione di 10  $\mu$ M in quanto, come visto dal grafico precedente, le cellule MCF10A muoiono aumentando i volumi di nanoparticelle.

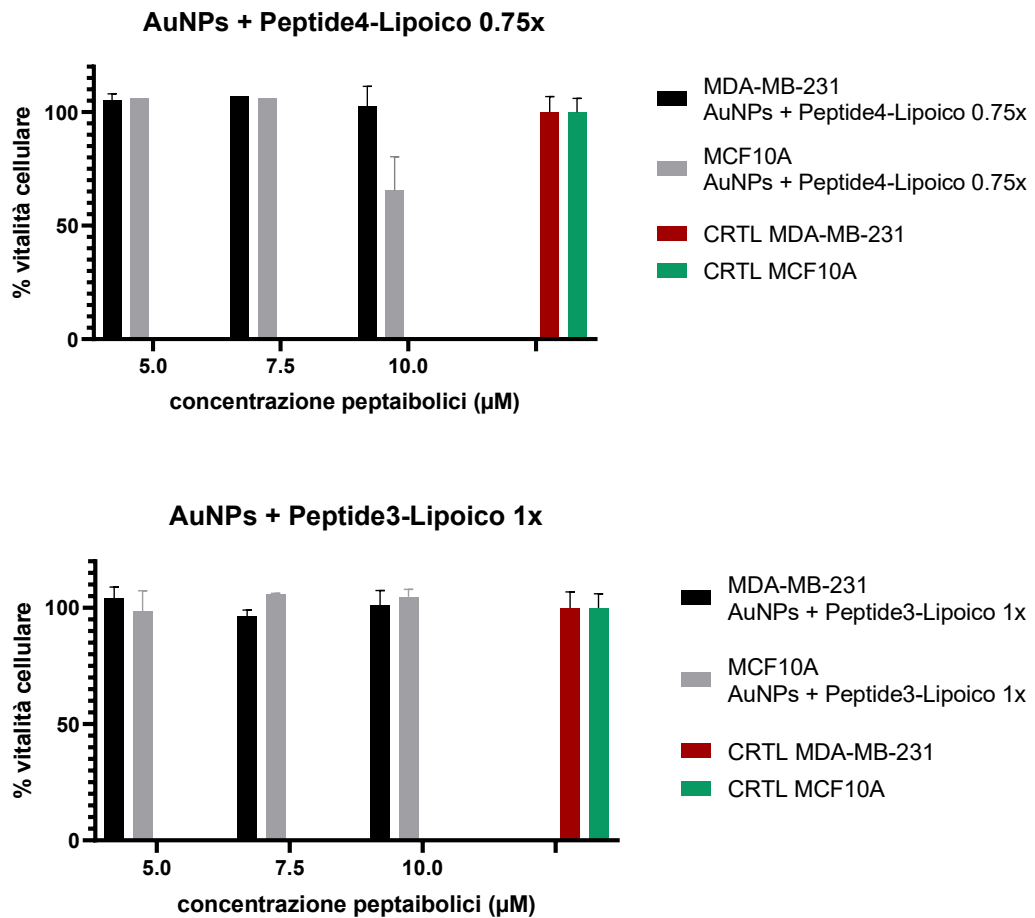


Figura 86. Nei grafici sono riportati i risultati del saggio MTS a diverse concentrazioni di AuNPs funzionalizzate.

Dai grafici a barre si evince che alla concentrazione di 10 μM di Peptide4-Lipoico, le MCF10A riducono la vitalità (70%) mentre alle altre concentrazioni di Peptide4-Lipoico ed a tutte le concentrazioni di Peptide3-Lipoico, la vitalità resta pari al 100%.

Anche i peptidi destinati all'analisi di citofluorimetria sono stati testati con saggi MTS preliminari.

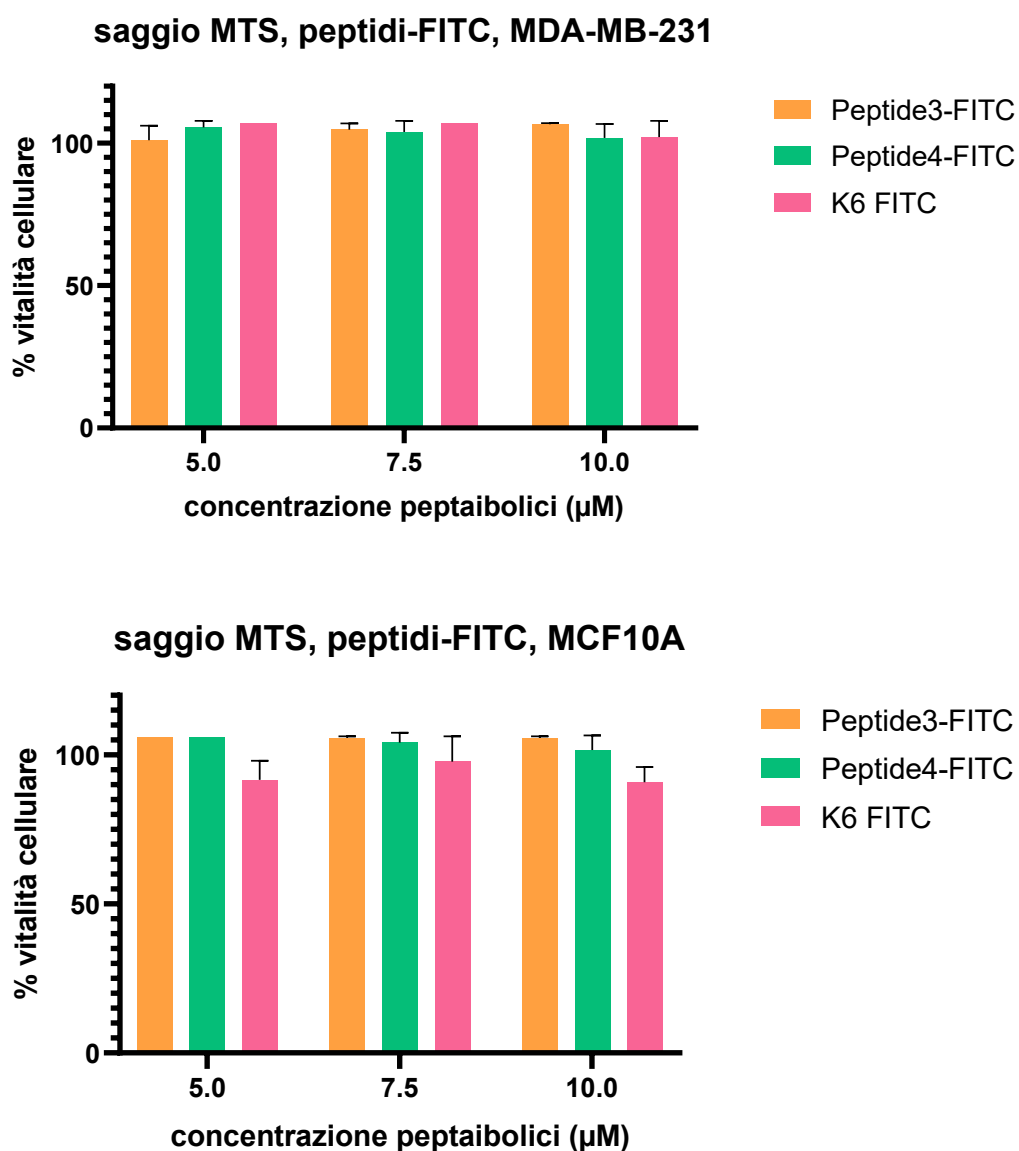


Figura 87. Istogrammi dei saggi MTS dei peptidi-FITC nelle due linee cellulari MDA-MB-231 ed MCF10A.

Dal test si evince che i peptidi legati al FITC non sono tossici fino alla concentrazione di 10 μM. E' evidente una differenza nella tossicità di K6 rispetto ai peptidi senza FITC: il peptide K6-FITC non è tossico alla concentrazione di 10 μM mentre lo è come K6-ammido.

#### 4.5 Risultati di citofluorimetria

Seguendo il procedimento descritto nel capitolo 3.10.2 sono state allestite le piastre destinate alla citofluorimetria. Sono state testate due concentrazioni dei peptidi: 5  $\mu\text{M}$  e 7,5  $\mu\text{M}$ .

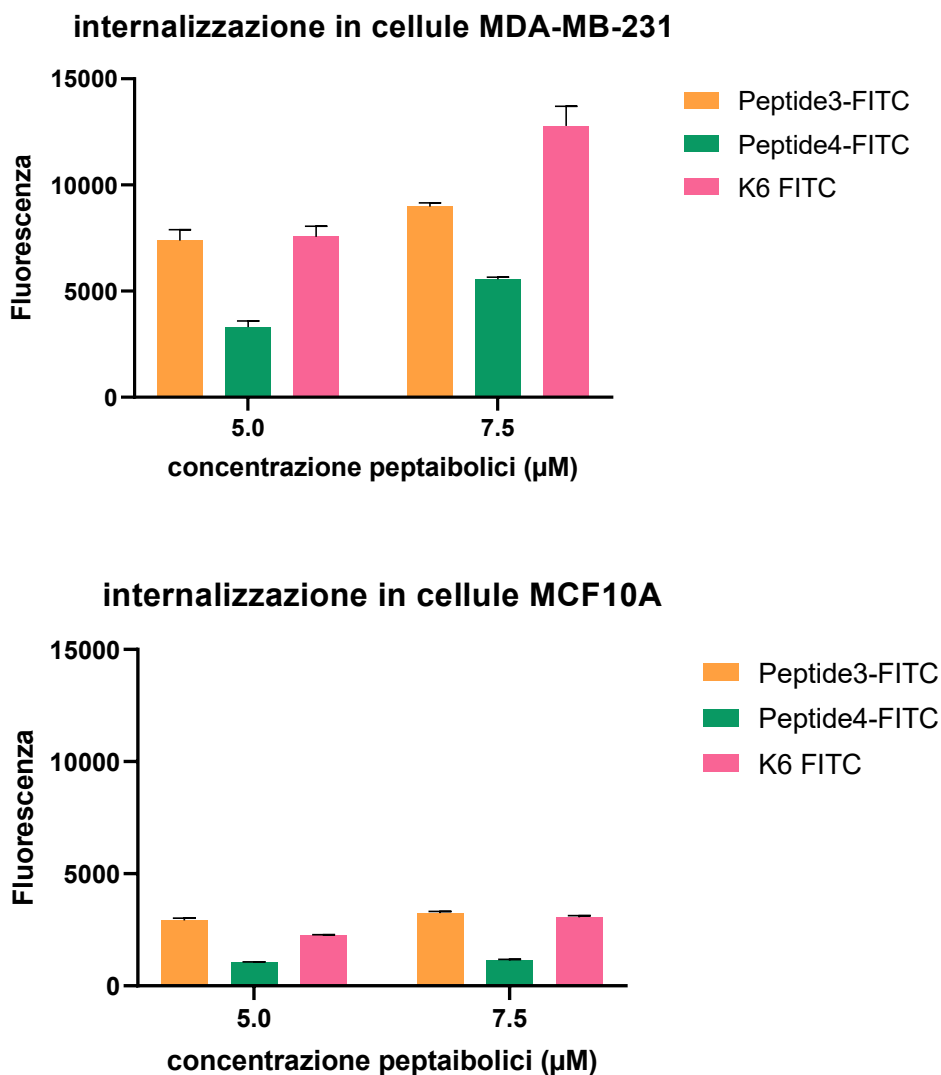


Figura 88. Istogrammi dei valori di fluorescenza dei peptidi-FITC misurati al FACS in funzione della concentrazione nelle linee cellulari MDA-MB-231 e MCF10A

Dai grafici costruiti con i valori di fluorescenza ottenuti al FACS si evince che, anche aumentando la concentrazione peptidica da 5  $\mu\text{M}$  a 7.5  $\mu\text{M}$ , non varia di molto la quantità di molecola che viene internalizzata dalle cellule MCF10A per i tre peptidi. Il Peptide3-FITC interagisce circa il doppio rispetto a Peptide4-FITC

con le cellule sane. Per quanto concerne l'internalizzazione da parte delle cellule MDA-MB-231 si ha: Peptide3-FITC e Peptide4-FITC internalizzano tre volte di più rispetto alle cellule MCF10A e mantengono tra loro circa lo stesso rapporto di internalizzazione visto sulle cellule sane; l'analogo K6-FITC mostra, come attesa, un'elevata internalizzazione.

## 5. Conclusioni

Con lo scopo di migliorare l'attività biologica del peptaibolico wild-type Tricogina GA IV, prodotto dal fungo *Trichoderma longibrachiatum*, e sfruttare la membrano attività di tale peptide sono stati negli anni sintetizzati vari analoghi. I peptidi analoghi sintetizzati per il presente lavoro di tesi sono due: Api8, dove un residuo dell'acido  $\alpha$ -amminoisobutirrico (Aib) in posizione 8 nel wild-type è stato sostituito da uno di acido 4-amminopiperidin-4-carbossilico (Api); e Leu4, dove l'Aib in posizione 4 nel wild-type è stato sostituito con una Leucina (Leu). Questi peptidi sono stati sintetizzati con una combinazione di sintesi in fase solida (SPPS) ed in soluzione, in modo da avere diverse funzionalità all'estremità C-terminale, utili a varie applicazioni: (i) l'estremità C-terminale leucinolo (Lol) della tricogina nativa è stata sostituita con una Leu-NH<sub>2</sub> per abbattere i costi di produzione. I peptidi con estremità ammidica sono stati utilizzati per saggiarne la citotossicità. (ii) I peptidi legati al 5/6-fluorescein-isotiocianato (FITC) sono stati utilizzati per analisi di internalizzazione mediante citofluorimetria. (iii) I peptidi legati all'acido lipoico sono stati legati a nanoparticelle d'oro (AuNPs) prodotte per ablazione laser ed utilizzati per valutare l'interazione di questi sistemi con le membrane cellulari e la loro citotossicità. I peptidi sintetizzati sono stati caratterizzati con varie strumentazioni quali HPLC a fase inversa (RP-HPLC), spettrometria di massa (MS) e dicroismo circolare (CD). Gli spettri CD risultano diagnostici di strutture elicoidali miste  $\alpha$  elica ed elica  $3_{10}$ . In ambiente membrano-mimetico (SDS 100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O) il profilo dicroico acquista maggiore carattere di alfa elica mentre in TFE prevale una struttura ad elica  $3_{10}$ . La presenza del fluoroforo FITC comporta ingombro sterico, abbassando il massimo negativo a 222 nm ed aumentando il contributo alfa elicoidale. In SDS, la posizione della banda negativa della transizione  $\pi$ - $\pi^*$  si sposta da 206 nm a 208 nm in Peptide3-FITC e da 205 a 208 per Peptide4-FITC. Mentre Peptide1 risulta solubile in acqua, quando legato a FITC ed acido lipoico, risulta idrofobico. Leu4, invece, è scarsamente idrosolubile indipendentemente dalla molecola a cui è legato. I sistemi nanoparticellari funzionalizzati con peptidi grazie al gruppo lipoile, sono stati caratterizzati con Spettrometria UV-Vis, Dynamic Light Scattering (DLS), Transmission Electron Microscopy (TEM). La funzionalizzazione dei peptidi sulle nanoparticelle comporta un'aggregazione dei nanosistemi rispetto alla soluzione

di nanoparticelle nude, evidente sia nell'analisi UV-Vis (red-shift della banda), sia nella DLS (raggio idrodinamico medio elevato), sia nel TEM (rete peptidica che avvicina le nanoparticelle). La vicinanza delle nanoparticelle e la forte interazione tra i peptidi comporta una chiara tendenza all'aggregazione. Una tale situazione è la prova indiretta dell'efficace derivatizzazione delle nanoparticelle col peptide che, essendo idrofobico, rende meno stabili le nanostrutture in soluzione acquosa. Per valutare la presenza di un'interazione preferenziale con le cellule tumorali rispetto alle cellule sane per applicazioni future di drug-delivery, tutti i sistemi a base peptidica sono stati testati *in vitro* su cellule di metastasi di adenocarcinoma della ghiandola mammaria (linea MDA-MB-231) e su cellule epiteliali di ghiandola mammaria (linea MCF10A) come controparte sana. La citotossicità dei peptidi è stata valutata con il saggio di vitalità MTS e l'internalizzazione con l'analisi citofluorimetrica. I risultati sperimentali hanno dimostrato che: i peptidi analoghi non sono tossici fino alla concentrazione di: 20  $\mu\text{M}$  per quanto concerne Peptide1 e Peptide2; 10  $\mu\text{M}$  per quanto concerne Peptide3-FITC e Peptide4-FITC; 7.5  $\mu\text{M}$  per AuNPs--Peptide3-Lipoico e AuNPs--Peptide4-Lipoico. Inoltre, grazie all'analisi citofluorimetrica si evidenzia una preferenza di internalizzazione (rapporto 3:1) nelle cellule tumorali rispetto alle sane. Queste conclusioni risultano essere di interesse per eventuali approfondimenti successivi e per un ampliamento dei test anche su altre linee cellulari.



## 6. Bibliografia

- (1) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions*. *Drug Discov. Today* 2015, 20 (1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>.
- (2) *Chem Biol Drug Des - 2012 - Craik - The Future of Peptide-based Drugs.Pdf*.
- (3) Lau, J. L.; Dunn, M. K. *Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions*. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26 (10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.
- (4) *Nuovo Studio Pubblicato Su Viruses.Pdf*.
- (5) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C.; Epanand, R. F.; Epanand, R. M. *Lipopeptaibols, a Novel Family of Membrane Active, Antimicrobial Peptides*: *Cell. Mol. Life Sci.* 2001, 58 (9), 1179–1188. <https://doi.org/10.1007/PL00000932>.
- (6) De Zotti, M.; Biondi, B.; Park, Y.; Hahm, K.-S.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Formaggio, F. *Antimicrobial Lipopeptaibol Trichogin GA IV: Role of the Three Aib Residues on Conformation and Bioactivity*. *Amino Acids* 2012, 43 (4), 1761–1777. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1261-7>.
- (7) De Zotti, M.; Sella, L.; Bolzonello, A.; Gabbatore, L.; Peggion, C.; Bortolotto, A.; Elmaghraby, I.; Tundo, S.; Favaron, F. *Targeted Amino Acid Substitutions in a Trichoderma Peptaibol Confer Activity against Fungal Plant Pathogens and Protect Host Tissues from Botrytis Cinerea Infection*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21 (20), 7521. <https://doi.org/10.3390/ijms21207521>.
- (8) Bobone, S.; Gerelli, Y.; De Zotti, M.; Bocchinfuso, G.; Farrotti, A.; Orioni, B.; Sebastiani, F.; Latter, E.; Penfold, J.; Senesi, R.; Formaggio, F.; Palleschi, A.; Toniolo, C.; Fragneto, G.; Stella, L. *Membrane Thickness and the Mechanism of Action of the Short Peptaibol Trichogin GA IV*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2013, 1828 (3), 1013–1024. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.033>.
- (9) Dalzini, A.; Bergamini, C.; Biondi, B.; De Zotti, M.; Panighel, G.; Fato, R.; Peggion, C.; Bortolus, M.; Maniero, A. L. *The Rational Search for Selective Anticancer Derivatives of the Peptide Trichogin GA IV: A Multi-*

- Technique Biophysical Approach. Sci. Rep.* 2016, 6 (1), 24000. <https://doi.org/10.1038/srep24000>.
- (10) Baccelli, I.; Luti, S.; Bernardi, R.; Favaron, F.; De Zotti, M.; Sella, L. *Water-Soluble Trichogin GA IV-Derived Peptaibols Protect Tomato Plants From Botrytis Cinerea Infection With Limited Impact on Plant Defenses. Front. Plant Sci.* 2022, 13, 881961. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881961>.
- (11) Tavano, R.; Malachin, G.; De Zotti, M.; Peggion, C.; Biondi, B.; Formaggio, F.; Papini, E. *The Peculiar N- and C-Termini of Trichogin GA IV Are Needed for Membrane Interaction and Human Cell Death Induction at Doses Lacking Antibiotic Activity. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2015, 1848 (1), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.005>.
- (12) Afanasyeva, E. F.; Syryamina, V. N.; De Zotti, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Dzuba, S. A. *Peptide Antibiotic Trichogin in Model Membranes: Self-Association and Capture of Fatty Acids. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2019, 1861 (2), 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.006>.
- (13) Salnikov, E. S.; De Zotti, M.; Bobone, S.; Mazzuca, C.; Raya, J.; Siano, A. S.; Peggion, C.; Toniolo, C.; Stella, L.; Bechinger, B. *Trichogin GA IV Alignment and Oligomerization in Phospholipid Bilayers. ChemBioChem* 2019, 20 (16), 2141–2150. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900263>.
- (14) Mazzuca, C.; Stella, L.; Venanzi, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Pispisa, B. *Mechanism of Membrane Activity of the Antibiotic Trichogin GA IV: A Two-State Transition Controlled by Peptide Concentration. Biophys. J.* 2005, 88 (5), 3411–3421. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.056077>.
- (15) De Zotti, M.; Biondi, B.; Peggion, C.; De Poli, M.; Fathi, H.; Oancea, S.; Toniolo, C.; Formaggio, F. *Partial Thioamide Scan on the Lipopeptaibiotic Trichogin GA IV. Effects on Folding and Bioactivity. Beilstein J. Org. Chem.* 2012, 8, 1161–1171. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.129>.
- (16) Tavano, R.; Malachin, G.; De Zotti, M.; Peggion, C.; Biondi, B.; Formaggio, F.; Papini, E. *Comparison of Bactericidal and Cytotoxic*

- Activities of Trichogin Analogs. Data Brief* 2016, 6, 359–367.  
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.006>.
- (17) Zhang, C.; Yan, L.; Wang, X.; Zhu, S.; Chen, C.; Gu, Z.; Zhao, Y. *Progress, Challenges, and Future of Nanomedicine. Nano Today* 2020, 35, 101008.  
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101008>.
- (18) Germain, M.; Caputo, F.; Metcalfe, S.; Tosi, G.; Spring, K.; Åslund, A. K. O.; Pottier, A.; Schiffelers, R.; Ceccaldi, A.; Schmid, R. *Delivering the Power of Nanomedicine to Patients Today. J. Controlled Release* 2020, 326, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.007>.
- (19) Singh, P.; Pandit, S.; Mokkalpati, V. R. S. S.; Garg, A.; Ravikumar, V.; Mijakovic, I. *Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19 (7), 1979.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19071979>.
- (20) Yue, J.; Feliciano, T. J.; Li, W.; Lee, A.; Odom, T. W. *Gold Nanoparticle Size and Shape Effects on Cellular Uptake and Intracellular Distribution of SiRNA Nanoconstructs. Bioconjug. Chem.* 2017, 28 (6), 1791–1800.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00252>.
- (21) Adewale, O. B.; Davids, H.; Cairncross, L.; Roux, S. *Toxicological Behavior of Gold Nanoparticles on Various Models: Influence of Physicochemical Properties and Other Factors. Int. J. Toxicol.* 2019, 38 (5), 357–384. <https://doi.org/10.1177/1091581819863130>.
- (22) Elias, D. R.; Poloukhine, A.; Popik, V.; Tsourkas, A. *Effect of Ligand Density, Receptor Density, and Nanoparticle Size on Cell Targeting. Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 2013, 9 (2), 194–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.015>.
- (23) Zhang, J.; Mou, L.; Jiang, X. *Surface Chemistry of Gold Nanoparticles for Health-Related Applications. Chem. Sci.* 2020, 11 (4), 923–936.  
<https://doi.org/10.1039/C9SC06497D>.
- (24) Lévy, R.; Shaheen, U.; Cesbron, Y.; Sée, V. *Gold Nanoparticles Delivery in Mammalian Live Cells: A Critical Review. Nano Rev.* 2010, 1 (1), 4889.  
<https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.4889>.

- (25) Amina, S. J.; Guo, B. *A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle*. *Int. J. Nanomedicine* 2020, Volume 15, 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>.
- (26) Elahi, N.; Kamali, M.; Baghersad, M. H. *Recent Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: A Review*. *Talanta* 2018, 184, 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.
- (27) Casagrande, N.; Borghese, C.; Gabbatore, L.; Morbiato, L.; De Zotti, M.; Aldinucci, D. *Analogs of a Natural Peptaibol Exert Anticancer Activity in Both Cisplatin- and Doxorubicin-Resistant Cells and in Multicellular Tumor Spheroids*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (16), 8362. <https://doi.org/10.3390/ijms22168362>.
- (28) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. *Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences*. *Biophys. Rev.* 2016, 8 (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (29) Ginsburg, O.; Yip, C.; Brooks, A.; Cabanes, A.; Caleffi, M.; Dunstan Yataco, J. A.; Gyawali, B.; McCormack, V.; McLaughlin de Anderson, M.; Mehrotra, R.; Mohar, A.; Murillo, R.; Pace, L. E.; Paskett, E. D.; Romanoff, A.; Rositch, A. F.; Scheel, J. R.; Schneidman, M.; Unger-Saldaña, K.; Vanderpuye, V.; Wu, T.; Yuma, S.; Dvaladze, A.; Duggan, C.; Anderson, B. O. *Breast Cancer Early Detection: A Phased Approach to Implementation*. *Cancer* 2020, 126 (S10), 2379–2393. <https://doi.org/10.1002/cncr.32887>.
- (30) DeSantis, C. E.; Bray, F.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Anderson, B. O.; Jemal, A. *International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2015, 24 (10), 1495–1506. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0535>.
- (31) Rositch, A. F.; Unger-Saldaña, K.; DeBoer, R. J.; Ng'ang'a, A.; Weiner, B. J. *The Role of Dissemination and Implementation Science in Global Breast Cancer Control Programs: Frameworks, Methods, and Examples*. *Cancer* 2020, 126 (S10), 2394–2404. <https://doi.org/10.1002/cncr.32877>.
- (32) *Cancer - 2020 - Stoltenberg - The Central Role of Provider Training in Implementing Resource-stratified Guidelines for.Pdf*.

- (33) Ellington, T. D.; Miller, J. W.; Henley, S. J.; Wilson, R. J.; Wu, M.; Richardson, L. C. *Trends in Breast Cancer Incidence, by Race, Ethnicity, and Age Among Women Aged  $\geq 20$  Years — United States, 1999–2018*. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2022, 71 (2), 43–47. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7102a2>.
- (34) Wright, E.; Waterman, P. D.; Testa, C.; Chen, J. T.; Krieger, N. *Breast Cancer Incidence, Hormone Receptor Status, Historical Redlining, and Current Neighborhood Characteristics in Massachusetts, 2005–2015*. *JNCI Cancer Spectr.* 2022, 6 (2), pkac016. <https://doi.org/10.1093/jncics/pkac016>.
- (35) Mutebi, M.; Anderson, B. O.; Duggan, C.; Adebamowo, C.; Agarwal, G.; Ali, Z.; Bird, P.; Bourque, J.; DeBoer, R.; Gebrim, L. H.; Masetti, R.; Masood, S.; Menon, M.; Nakigudde, G.; Ng'ang'a, A.; Niyonzima, N.; Rositch, A. F.; Unger-Saldaña, K.; Villarreal-Garza, C.; Dvaladze, A.; El Saghir, N. S.; Gralow, J. R.; Eniu, A. *Breast Cancer Treatment: A Phased Approach to Implementation*. *Cancer* 2020, 126 (S10), 2365–2378. <https://doi.org/10.1002/cncr.32910>.
- (36) Casagrande, N.; Borghese, C.; Gabbatore, L.; Morbiato, L.; De Zotti, M.; Aldinucci, D. *Analogues of a Natural Peptaibol Exert Anticancer Activity in Both Cisplatin- and Doxorubicin-Resistant Cells and in Multicellular Tumor Spheroids*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (16), 8362. <https://doi.org/10.3390/ijms22168362>.
- (37) Li, Z.; Ruan, J.; Zhuang, X. *Effective Capture of Circulating Tumor Cells from an S180-Bearing Mouse Model Using Electrically Charged Magnetic Nanoparticles*. *J. Nanobiotechnology* 2019, 17 (1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0491-1>.
- (38) Derin Sevenler, Neşe Lortlar Ünlü, M. Selim Ünlü, *Nanoparticle Biosensing with Interferometric Reflectance Imaging, Chapter*, (2015).
- (39) Elvin Blanco, Haifa Shen, Mauro Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*, *Nat Biotechnol.* 33 (2015), 941–951.

- (40) Toniolo, Crisma, Formaggio. *Effect of NR-Acyl Chain Length on the Membrane-Modifying Properties of Synthetic Analogs of the Lipopeptaibol Trichogin GA IV*. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 4952-4958
- (41) Toniolo, Peggion, Crisma, Formaggio. *Structure determination of racemic trichogin A IV using centrosymmetric crystals*. *Nat.Struct.Biol.* 1994, 1, 908
- (42) Bravin C.; Amendola V. *asagrande; Plasmonic Adsorption in Antigen-induced Aggregated gold nanoparticles: Toward a Figure of merit for Optical Nanosensors ACS Applied Nano Materials* 2022 5 (1), 578-586.
- (43) Amendola V., Pilot R., Frasconi M.; *Surface Plasmon Resonance in gold nanoparticles: a review; J. Phys* 2017