

Università degli Studi di Padova – Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica e dei Materiali

***Relazione per la prova finale***  
***«Peptidi che penetrano le cellule per la***  
***decorazione di nanoparticelle d'oro»***

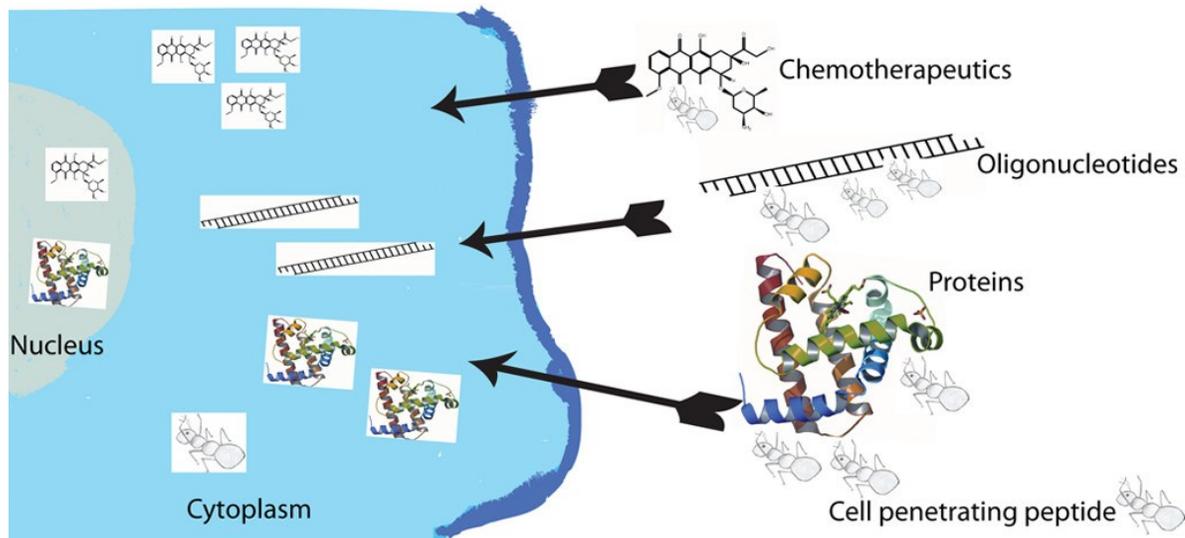
Tutor universitario: Prof.ssa Monica Dettin

Laureando: *Alessandro Del Bianco*

Padova, 26/09/2023

## CELL PENETRATING PEPTIDES (CPPs)

I CPPs sono corte sequenze peptidiche costituite da un massimo di 30 aminoacidi, che hanno la capacità di penetrare all'interno delle cellule attraversando la membrana cellulare



I CPPs si suddividono in :

- Cationici;
- Idrofobici;
- Anfipatici.

In questo lavoro è stato preparato un CPP cationico ovvero contenente una sequenza di aminoacidi carichi positivamente.

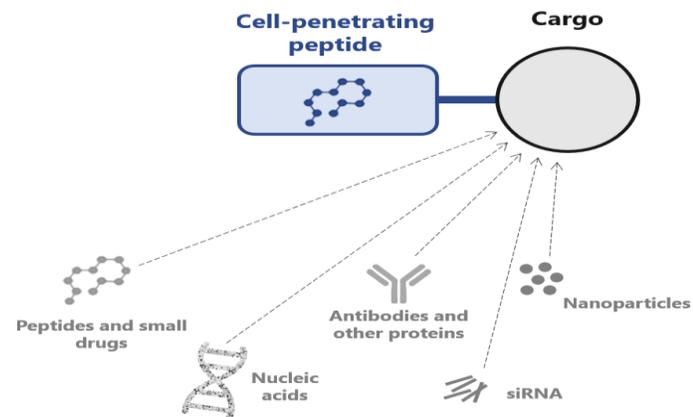
I CPPs cationici interagiscono con la membrana cellulare carica negativamente e vengono internalizzati attraverso un meccanismo recettore-indipendente.

## CELL PENETRATING PEPTIDES (CPPs)

All'inizio degli anni '90 il primo CPPs ad essere scoperto ed inseguito sintetizzato, è stato il 1° "attivatore trascrizionale transattivante" o TAT, ricavato dal virus HIV-1.

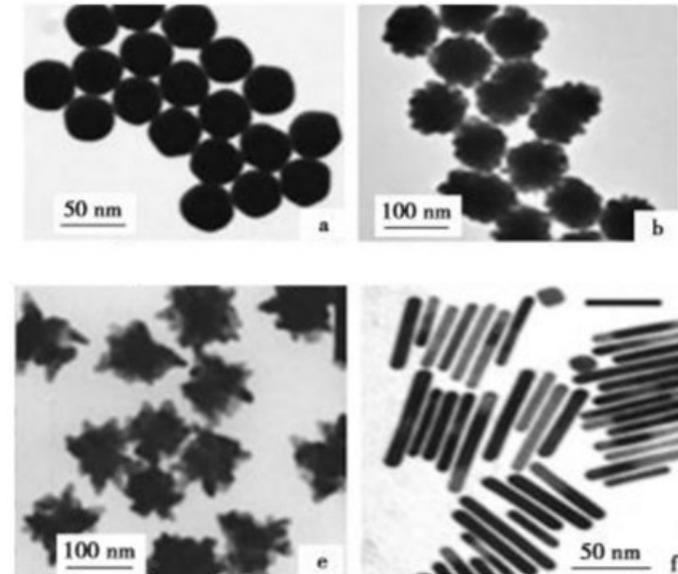
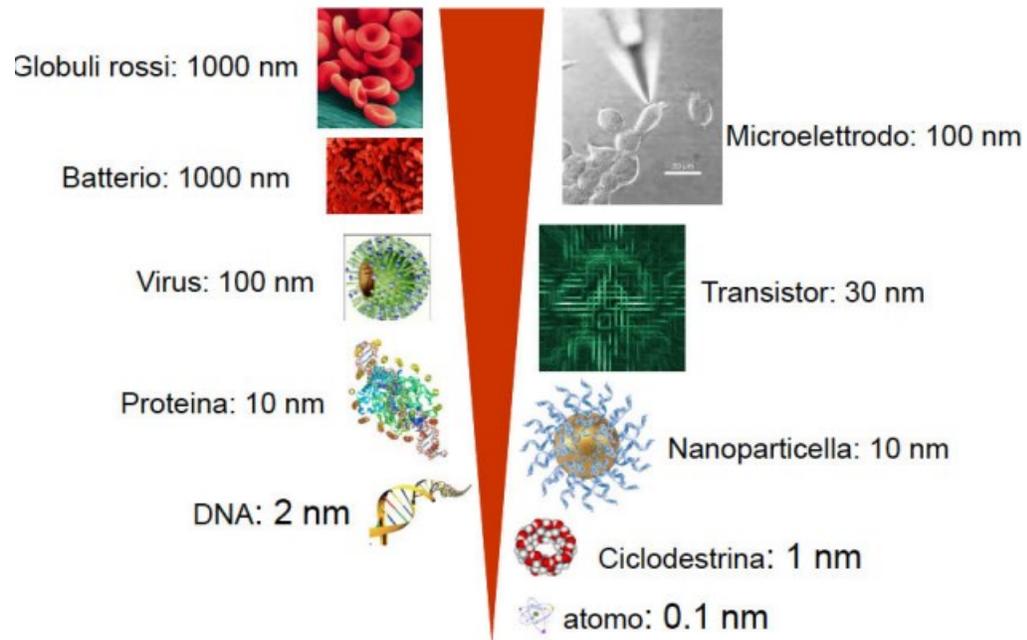


I CPPs vengono utilizzati come *carrier* per il trasporto di acidi nucleici, farmaci e nanoparticelle.



## INTRODUZIONE ALLE NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle hanno una dimensione variabile dai 100 nm fino a pochi nanometri e possono essere composte da semiconduttori come il silicio, o da metalli come l'argento e l'oro.



Le forme più tipiche per le nanoparticelle d'oro sono quella sferica (a), quella a bacchetta (f) e quella anistropa (b-e)

## LE NANOPARTICELLE D'ORO (AuNPs)

Le nanoparticelle d'oro sono state utilizzate per prime dagli antichi Romani ma la loro esistenza si poté dimostrare solo 2000 anni dopo con l'invenzione del microscopio elettronico

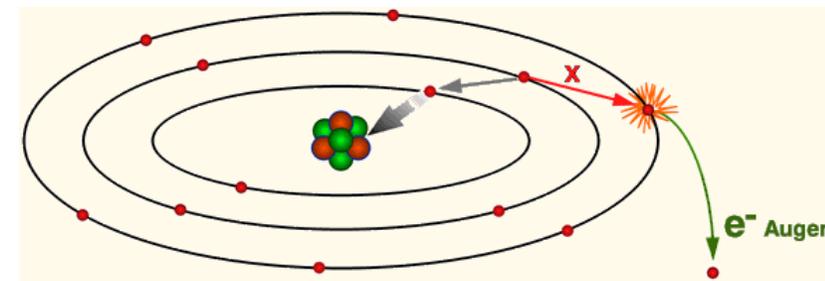


Coppa di Licurgo, prima testimonianza della applicazione delle AuNPs

Le principali proprietà delle AuNPs sono:

- Proprietà ottiche;
- Proprietà termiche;
- Proprietà chimiche;

Queste proprietà si riconducono all'elevato rapporto superficie/volume, alla loro dimensione ridotta e all'effetto Auger, in cui se le AuNPs vengono colpite da un fascio di fotoni emettono una certa quantità di energia.



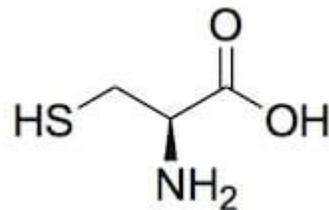
Emissione Auger o effetto Auger

## SCOPO DEL LAVORO SPERIMENTALE

Lo scopo del tirocinio è stato la sintesi, purificazione e caratterizzazione del seguente peptide:



Questo peptide, oltre alla sequenza TAT, presenta, in posizione N terminale, dopo uno spaziatore ( l'acido 7-aminoeptanoico) e l'amminoacido *cisteina* che consentirà l'ancoraggio del CPP a nanoparticelle d'oro in collaborazione con la prof. Iole Venditti dell'Università Roma Tre.



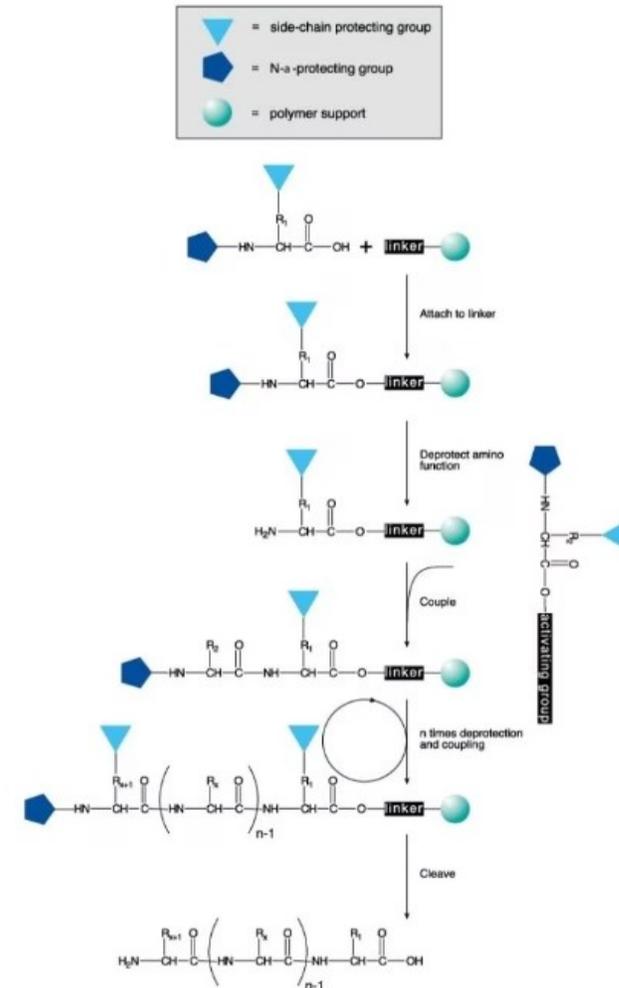
Struttura della *cisteina*

## LAVORO SPERIMENTALE

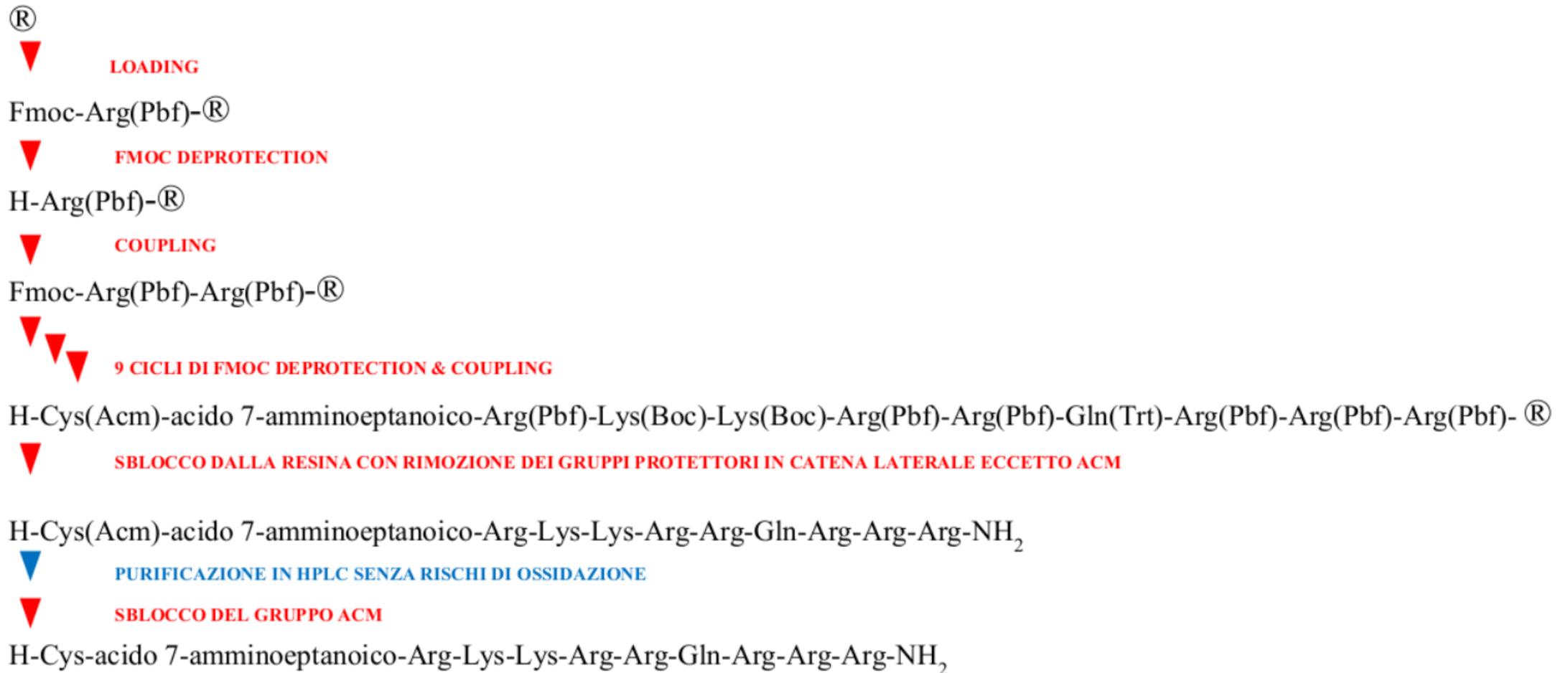
- Sintesi peptidica su fase solida;
- Purificazione del peptide grezzo;
- Caratterizzazione del peptide purificato.

### SINTESI

La **sintesi**, eseguita su fase solida, è stata ottenuta utilizzando la resina *Rink-Amide MBHA*. Il *loading* del primo aminoacido (*Arg*) alla resina è stato verificato secondo il test alla Piperidina che ha dato una resa del 100%.



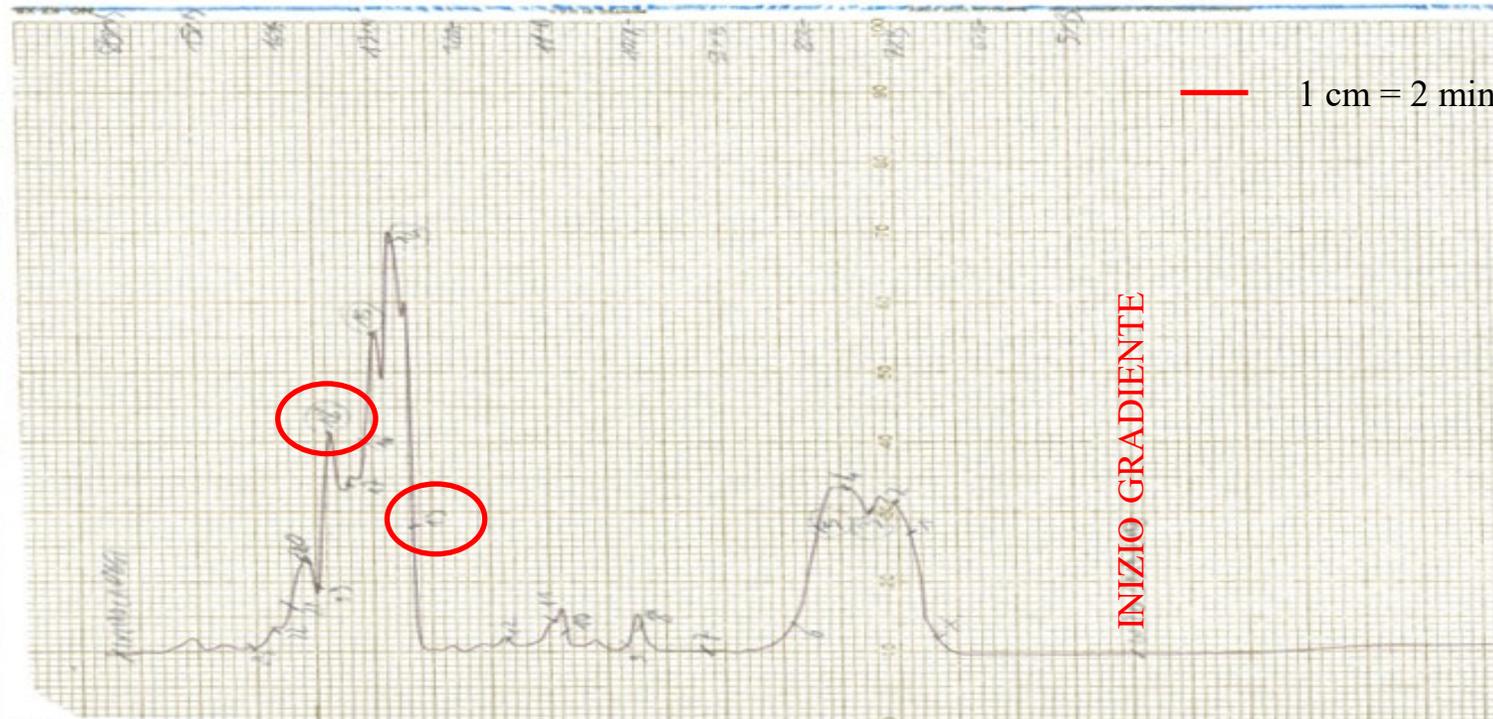
## SCHEMA DI SINTESI



## PURIFICAZIONE

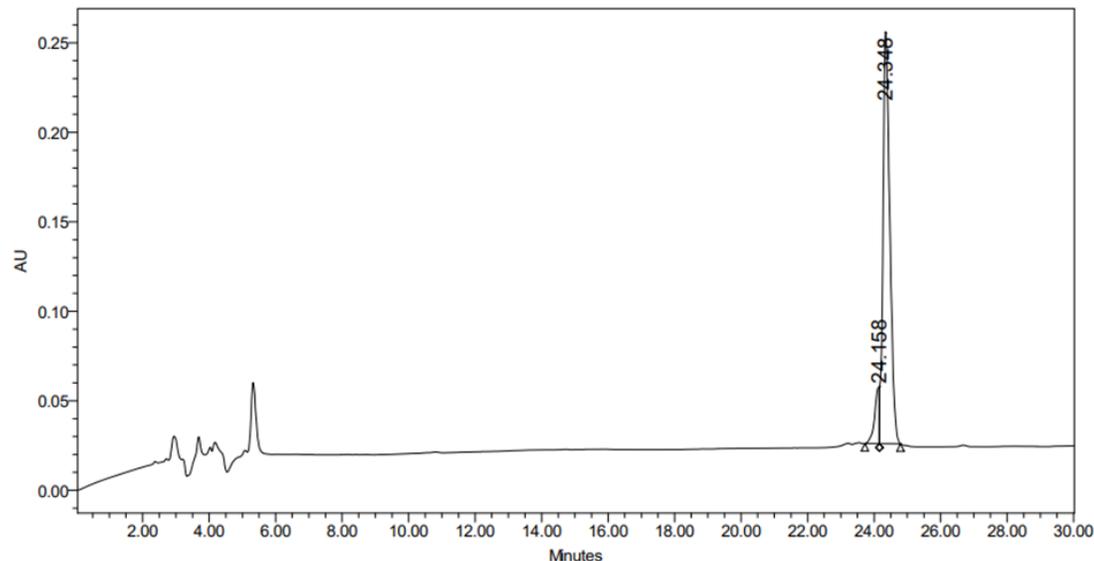
La **purificazione** è stata eseguita mediante alcune corse cromatografiche RP-HPLC semipreparative nelle seguenti condizioni: Colonna: Atlantis C18 ODB preparative, Eluente A: 0.05%TFA in acqua milliQ, Eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile, Flusso: 4 mL/min, Volume di iniezione: 16 mL, Gradiente: da 5% a 15% di eluente B in 30 min, Assorbanza: 214 nm, Velocità carta: 0.5 cm/min, ha permesso di purificare il peptide da possibili impurezze.

Il peptide mediante cromatografia analitica delle frazioni è risultato presente nelle frazioni che vanno dalla 13 alla 19.

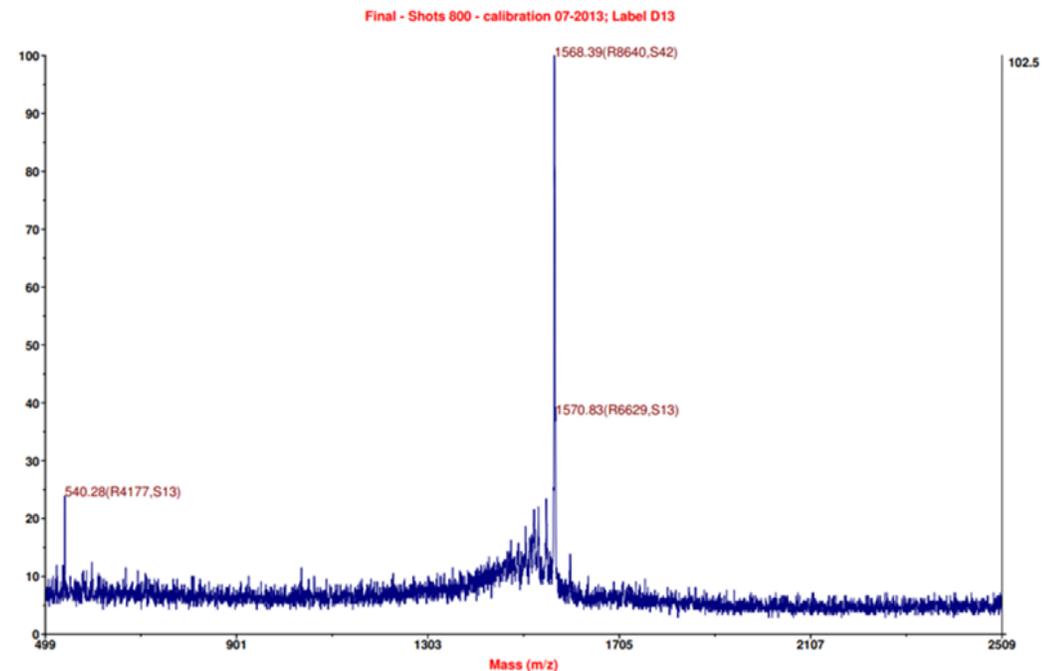


## CARATTERIZZAZIONE

La **caratterizzazione** consiste nella verifica del grado di purezza del peptide mediante cromatografia analitica e nella verifica del suo peso molecolare attraverso la spettrometria di massa MALDI/TOF.



Cromatografia analitica eseguita nelle seguenti condizioni:  
Colonna: Atlantis C18, Eluente A: 0.05%TFA in acqua milliQ, Eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile, Flusso: 1 mL/min, Volume di iniezione: 30  $\mu$ L, Gradiente: da 5% al 20% di eluente B in 30 minuti, Assorbanza: 214 nm.  
Il prodotto, a tempo di ritenzione 24,35 minuti, è risultato omogeneo al 91%.



Il valore di massa sperimentale (1568,39 g/mol) conferma l'identità del peptide ( valore di massa teorico = 1568,98 g/mol).

## CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

La prova di tirocinio ha avuto esito positivo avendo ottenuto il peptide desiderato, confermato dalla spettrometria di massa, con una elevata purezza superiore al 91%.

La prof.ssa Venditti, dell'Università Roma Tre, sta studiando di utilizzare gli elettroni Auger, prodotti dall'interazione di fotoni con atomi di oro, per indurre il danneggiamento di cellule tumorali senza utilizzare elementi radioattivi.

Le nanoparticelle d'oro preparate nei laboratori di Roma verranno decorate con il peptide CYS – x – TAT per facilitare la loro penetrazione all'interno di cellule tumorali.

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE