

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**Sintesi e Caratterizzazione di Ibridi Polimero-Proteina Tramite
Polimerizzazioni Radicaliche Controllate**

Relatore: Prof. Edmondo Maria Benetti

Laureando: Lisa Clelia Martin

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

1. INTRODUZIONE	2
2. SEZIONE SPERIMENTALE	7
2.1. Materiali	7
2.2. Metodi di caratterizzazione	8
2.3. Coniugazione iniziatore ATRP-lisozima	8
2.3.1. Sintesi dell'iniziatore	8
2.3.2. Strategia di attacco dell'iniziatore ATRP al lisozima	12
2.4. Sintesi del coniugato POEGMA-lisozima	13
2.4.1. Polimerizzazione modello per ottimizzare le condizioni	13
2.4.2. Polimerizzazione da lisozima	17
3. CARATTERIZZAZIONE	18
3.1. ESI-TOF-MS	18
3.2. ¹H NMR	20
3.2.1. Cinetiche di polimerizzazione	20
3.3. Dynamic Light scattering	23
3.3.1. Misura del raggio idrodinamico R_h	23
4. CONCLUSIONI	24
5. BIBLIOGRAFIA	24

1. INTRODUZIONE

Le biomacromolecole sono grandi biopolimeri prodotti dalle cellule il cui compito è quello di eseguire diverse funzioni biologiche essenziali per la vita. Si dividono in 4 grandi categorie: proteine, acidi nucleici, carboidrati e lipidi¹.

Ognuna di queste classi comprende biomacromolecole con elevata selettività ed efficienza. Tuttavia, generalmente esse soffrono di instabilità causate da fattori esterni che ne limitano le applicazioni in ambito farmaceutico e industriale. In particolare, proteine come gli enzimi, la cui funzione è quella di biocatalizzatori, sono estremamente sensibili alle variazioni nell'ambiente di reazione, quali, per esempio, la composizione del solvente, il pH e la temperatura. Questi cambiamenti portano ad una variazione significativa della struttura terziaria (denaturazione) dell'enzima e di conseguenza alla perdita dell'attività enzimatica.

Per limitare queste problematiche e migliorare le caratteristiche delle biomacromolecole sono stati sviluppati e studiati degli ibridi polimero-proteina. Questi hanno mostrato tipicamente stabilità e proprietà migliori, quali, in particolare, la farmacocinetica e la termoresistività²⁻⁴.

Le applicazioni dei coniugati polimero-proteina sono molteplici, i maggiori impieghi possibili si riscontrano in ambito biomedico, per esempio come biosensori, come trasportatori di farmaci o come protettori di superficie. In ambito industriale vengono prevalentemente utilizzati come catalizzatori resistenti in solventi non acquosi o a temperature di lavoro elevate, o per modificare e funzionalizzare superfici³.

Per coniugare i polimeri alle biomacromolecole vengono tipicamente utilizzati due approcci: "grafting-to" e "grafting-from".

Nell'approccio "grafting-to" si forma un legame covalente tra un polimero pre-sintetizzato e un sito specifico della proteina. Questa tipologia di approccio è caratterizzata da efficienza di attacco relativamente bassa dovuta all'ingombro sterico delle due macromolecole e perciò risulta un basso grado di funzionalizzazione della proteina. Inoltre, la purificazione del coniugato tramite rimozione del polimero non reagito è difficoltosa a causa delle dimensioni, spesso

paragonabili, dei due reagenti. Un altro svantaggio di questa tecnica è il poco controllo verso i siti di attacco del polimero, in quanto, se non ottimizzate le condizioni di reazione, si ha una distribuzione casuale nell'attacco delle catene polimeriche sui vari siti proteici, portando spesso ad una perdita di attività del coniugato.

La seconda tipologia, "grafting-from", implica la modifica della superficie della proteina tramite l'attacco di piccole molecole di iniziatore dalle quali si farà crescere il polimero. Con questo approccio si ottiene tipicamente un numero maggiore di catene aggraffate poiché è presente un minor ingombro sterico delle molecole di iniziatore, con la possibilità di controllare meglio i siti dove cresceranno le catene. Inoltre, la purificazione è più semplice, in quanto è sufficiente una dialisi per eliminare le molecole di monomero ed iniziatore non reagiti. Le maggiori limitazioni per questa tipologia sono riferite al controllo della polimerizzazioni in condizioni fisiologiche, essendo necessario lavorare in ambiente acquoso, a pH pressoché neutro e temperatura generalmente inferiore ai 37°C per salvaguardare le funzioni proteiche^{2,5}.

Le differenza tra le due tipologie viene evidenziata in Figura 1.

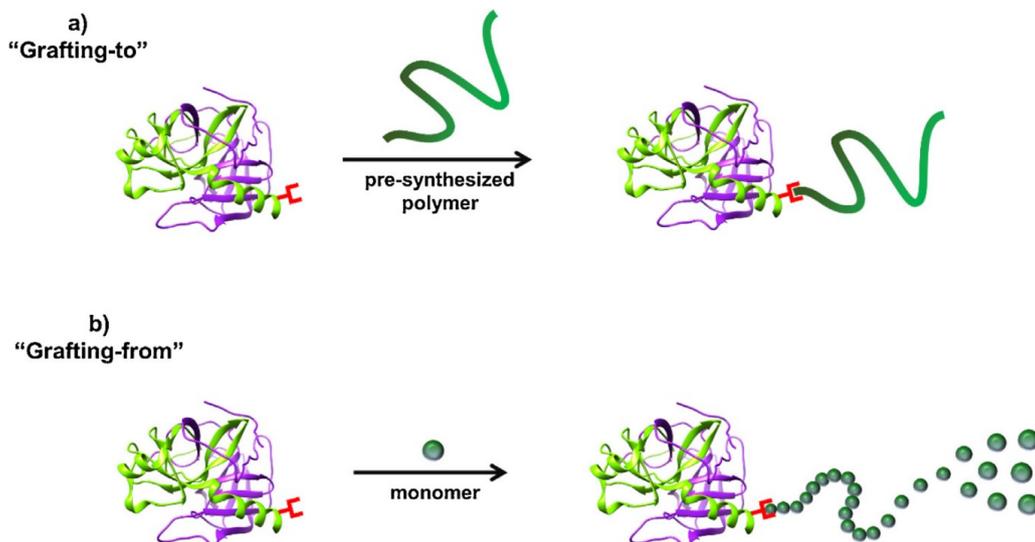


Figura 1 Sintesi dell'ibrido polimero-proteina con approccio a) Grafting-to e b) Grafting-from².

Per avere un controllo preciso dei pesi molecolari e sulla loro distribuzione nei polimeri prodotti da monomeri vinilici si utilizzano tipicamente le polimerizzazioni radicaliche per disattivazione reversibile o RDRP (reversible deactivation radical polymerization). Tra queste la più usata per preparare coniugati di polimeri e (macro)molecole biologiche è la polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico o ATRP (atom transfer radical polymerization).

La distribuzione di pesi molecolari di un polimero, detta anche dispersità (\mathcal{D}), è espressa dal rapporto tra la massa molecolare media ponderale (M_w) e la massa molecolare media numerica (M_n) (Equazione 1). Per le polimerizzazioni controllate $\mathcal{D} \leq 1,3$.

$$\mathcal{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (1)$$

In ATRP, l'iniziazione ha velocità significativamente più alta rispetto alla velocità di propagazione, le reazioni di terminazione e trasferimento sono ridotte al minimo e il tempo di vita della catena crescente è notevolmente esteso rispetto al caso di una polimerizzazione radicalica libera. Ciò è possibile grazie all'introduzione di un equilibrio dinamico tra un radicale transiente ed una specie dormiente (radicale persistente).

La specie dormiente è un alogenuro alchilico (P_nX), il quale viene attivato da un complesso metallico, dove il metallo di transizione è nel suo stato di ossidazione più basso (Mt^m/L). Questa reazione genera il radicale alchilico transiente ($P_n\cdot$) ed il complesso metallo-alogenuro con numero di ossidazione più alto ($X-Mt^{m+1}/L$).

Il radicale alchilico transiente può propagare aggiungendo monomero, venendo successivamente disattivato nella corrispondente specie dormiente dal complesso metallo-alogenuro ($X-Mt^{m+1}/L$) che funge da disattivatore^{3,4,6,7}.

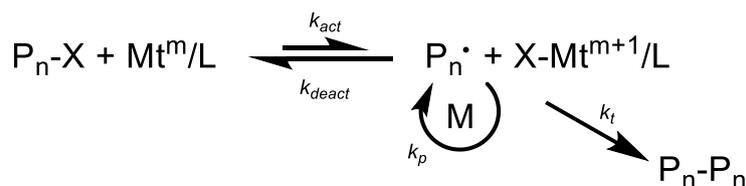


Figura 2 Meccanismo di reazione ATRP.

In ATRP è quindi presente un equilibrio di attivazione/disattivazione, spostato verso la specie dormiente (P_nX), espresso dalla costante K_{ATRP} (Equazione 2).

$$K_{ATRP} = \frac{k_{act}}{k_{deact}} = \frac{[P_n^*][X-Mt^{m+1}/L]}{[P_n-X][Mt^m/L]} \quad (2)$$

La tecnica usata in questo lavoro di tesi è nello specifico una *Activator ReGenerated by Eletron Transfer* (ARGET) ATRP, in cui si impiegano agenti riducenti in grado quindi di rigenerare il complesso metallico in basso stato di ossidazione Mt^m/L per riduzione del complesso ossidato $X-Mt^{m+1}/L$. In questo metodo viene utilizzato infatti in partenza un complesso di Cu (II) che viene poi ridotto in situ a formare la specie attivante di Cu(I).

I vantaggi legati a questo metodo sono l'utilizzo di minori quantità di catalizzatore, la buona risposta in ambiente acquoso e la più fruibile fase sperimentale che prevede unicamente il degassamento con argon per rimuovere l'ossigeno^{3,5,6}.

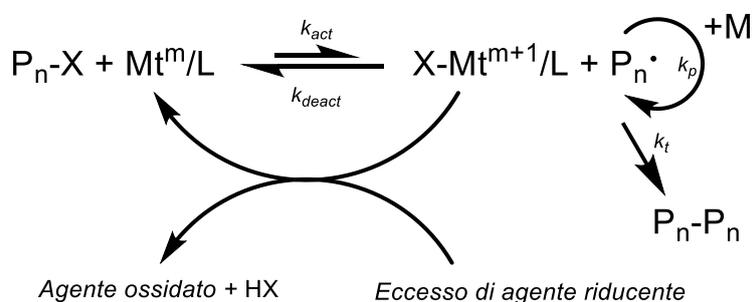


Figura 3 Meccanismo ARGET ATRP.

ARGET ATRP, come tutte le tecniche ATRP, è sensibile alla presenza di ossigeno, il quale termina le catene radicaliche diminuendo la conversione di monomero e portando a oligomeri o polimeri con bassi pesi molecolari.

In questo elaborato si vuole ricercare un protocollo per ottimizzare la coniugazione di Poli(etilene glicole)metil etere metacrilato (POEGMA) su una proteina modello e migliorarne la riproducibilità e robustezza.

Come proteina modello è stato scelto il lisozima, in quanto è economico, moderatamente stabile (la struttura terziaria è stabilizzata dalla presenza di 8 cisteine che formano ponti disolfuro) e ha 7 possibili siti di ancoraggio, derivanti dalla presenza di sei lisine, aventi nella catena laterale un'ammina primaria e un'ammina primaria terminale.

Si è lavorato in tampone fosfato per emulare il pH fisiologico a 7,4, adoperando l'approccio "grafting-from" e utilizzando un legante in grado di formare con il Cu un complesso con elevata attività per la riduzione degli alogenuri alchilici. Il legante è TPMA (Tris(2-piridilmetil) ammina). In precedenti lavori su sistemi simili, il legante scelto era tipicamente HMTETA (1,1,4,7,10,10-Esametiltrielenetetrammina), il quale però forma un complesso con minore attività. Pertanto, si è preferito usare TPMA il quale forma un complesso di rame con potenziale di riduzione più negativo e quindi maggiore potere riducente rispetto a Cu/HMTETA, che risulta in K_{ATRP} più elevata, come mostrato dalla correlazione riportata in Figura 4.

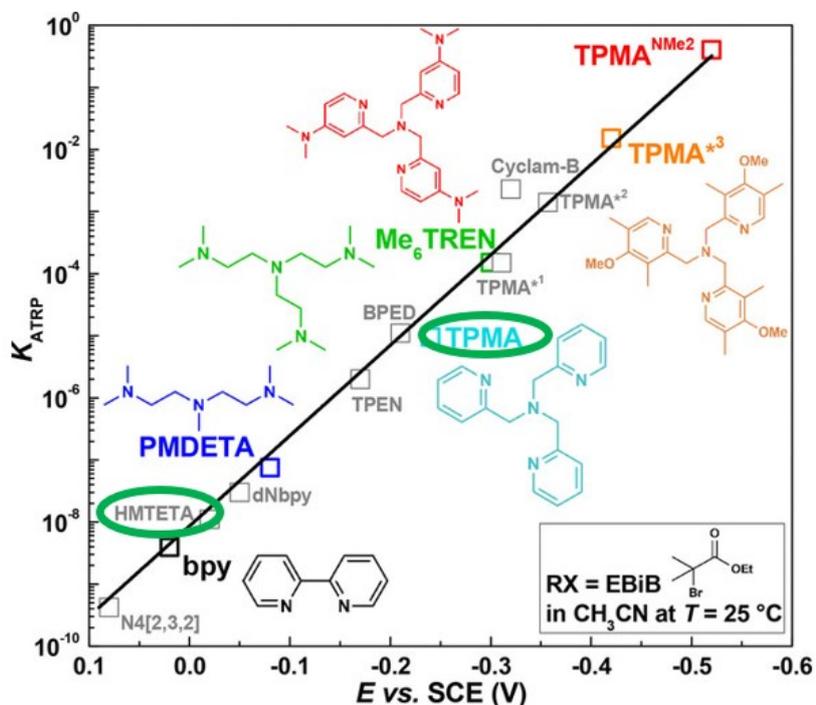


Figura 4. Correlazione tra il potenziale standard di riduzione di $Br-Cu^{II}/L^+$ e le K_{ATRP} corrispondenti, in CH_3CN a $T=25^\circ C$.⁸

2. SEZIONE SPERIMENTALE

2.1. Materiali

Tabella 1 Sono riportati i reagenti e i solventi utilizzati nelle esperienze.

Sostanze	Marca
2-Idrossietil-2-bromoisobutirato (HEBIB)	Sigma Aldrich
Tampone fosfato	Sigma Aldrich
CuBr₂	Sigma Aldrich
TPMA	Ambeed
Oligo(etilenglicole)metil etere metacrilato OEGMA DP500	Sigma Aldrich
N,N-dimetilformammide (DMF)	Carlo Erba
Dimetilsolfossido (DMSO)	Carlo Erba
Acqua deuterata	Eurisotop
Ascorbato di sodio	Acros organics 99%
β-alanina	Sigma Aldrich 99%
Diclorometano (DCM)	Carlo Erba
Acetato di etile	Carlo Erba
Etere dietilico	Carlo Erba
Esano	Carlo Erba
2-propanolo	Carlo Erba
NaBr	Sigma Aldrich
HCl	Sigma Aldrich
Ossido di alluminio basico	Sigma Aldrich
N, N-diisopropilcarbodiimmide	Sigma Aldrich
N-idrossisuccinimide	Alfa Aesar

Per le dialisi sono state utilizzate le sacche Spectrum™ Spectra/Por™ da 12,000 a 14,000 Dalton MWCO.

Prima dell'utilizzo occorre separare il monomero dall'inibitore tramite filtrazione su allumina basica e filtro in teflon.

2.2. Metodi di caratterizzazione

Spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR)

La conversione del monomero è stata monitorata qualitativamente tramite ^1H NMR. Per le cinetiche di polimerizzazione è stato utilizzato il Varian 400, utilizzando D_2O come solvente, mentre per l'iniziatore è stato utilizzato il CDCl_3 . I chemical shift (δ) sono riportati in ppm e le costanti di accoppiamento (J) sono riportate in Hz.

Spettrometro di massa ESI TOF

Per avere una stima qualitativa di quante ammine sono state coniugate con l'iniziatore NHS-Br è stato utilizzato lo spettrometro di massa Xevo G2-XS Q-TOF. Lo strumento è accoppiato ad un UPLC, ma i campioni sono stati iniettati direttamente nello spettrometro di massa, mediante fast flow injection.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Per verificare la crescita del raggio idrodinamico (R_h) del polimero è stato utilizzato il dynamic light scattering. Per gli esperimenti è stato utilizzato il Malvern ZS nano Dynamic Light Scattering.

2.3. Coniugazione iniziatore ATRP-lisozima

2.3.1. Sintesi dell'iniziatore

Considerando i siti di attacco della proteina modello è stato scelto un iniziatore neutro specifico per le ammine primarie, quale il N-2-bromo-2-metilpropanoil-P-alanina N'-ossisuccinimide estere (NHS-Br, Figura 5). Questo perché a pH fisiologico ($\text{pH}=7,4$) i siti amminici delle lisine sono protonati, in quanto l'ammina primaria terminale ha $\text{p}K_a = 8,95$ e l'ammina presente nella catena laterale dei residui lisinici ha $\text{p}K_a = 10,53$.

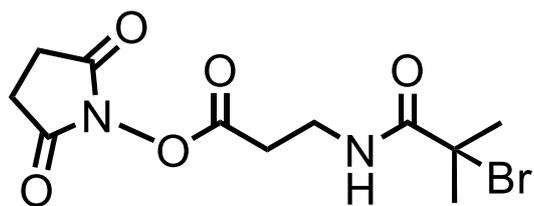


Figura 5 Struttura dell'iniziatore NHS-Br.

Reazione di sintesi:

- **PRIMO STEP**

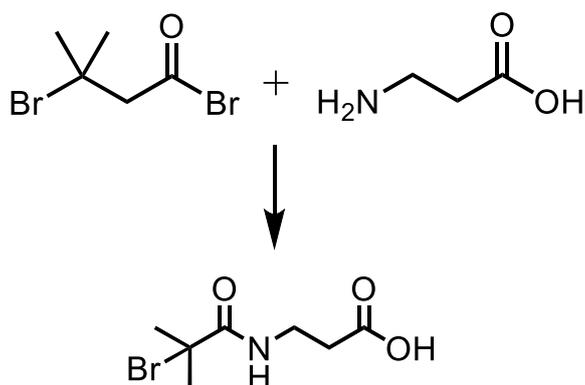


Figura 6 Reazione del primo stadio di sintesi dell'iniziatore NHS-Br, formazione dell'intermedio N-2-bromo-metilpropionil-P-alanina.

- **SECONDO STEP**

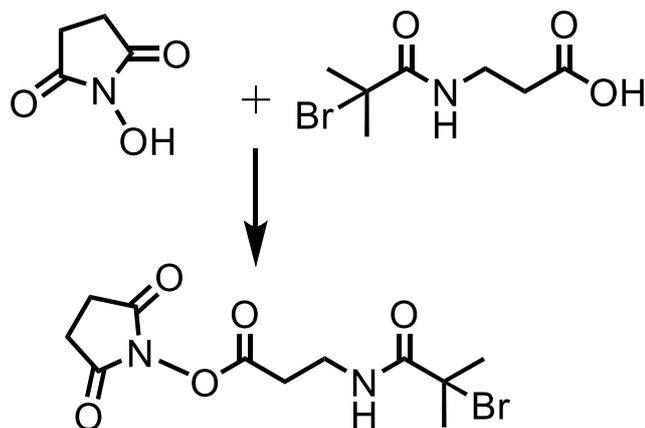


Figura 7 Schema di reazione del secondo step di sintesi dell'iniziatore NHS-Br.

La miscela formata da 2-bromo-2-metilpropionil bromuro (100 mmol; 12,4 mL) e 50 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente alla soluzione formata da 8,9 g di β -alanina (100 mmol) e 21 g di NaHCO_3 (250 mmol) in 200 mL di acqua

deionizzata a 0°C. La miscela formata è stata poi lasciata sotto agitazione per 2 ore a temperatura ambiente ed è stata successivamente trasferita all'interno di un imbuto separatore. La fase acquosa è stata lavata con 3x100 mL di diclorometano ed è stata portata a pH 2 con HCl concentrato a 0 °C. La fase è stata poi nuovamente versata all'interno di un imbuto separatore e il prodotto è stato estratto con 6 x150 mL di acetato di etile. La fase organica è stata poi anidrificata con MgSO₄ e si è eliminato il solvente tramite evaporazione. Successivamente la N-2-bromo-metilpropionil-P-alanina è stata isolata tramite ricristallizzazione in miscela di etere dietilico ed esano (1:9). Il solvente è stato poi rimosso utilizzando un rotavapor ed è stato svolto un NMR sul prodotto ottenuto (Figura 10).

In un altro pallone sono stati aggiunti 4,8 g di N-2-bromo-metilpropionil-P-alanina (20 mmol) (precedentemente sintetizzati), 2,5 g di N-idrossisuccinimide (22 mmol) e 200 mL di diclorometano. Alla miscela sono stati aggiunti 2,8 g di N, N-diisopropilcarbodiimmide (22 mmol) a 0°C per precipitare l'urea (Figura 8).



Figura 8 Soluzione prima e dopo l'aggiunta di N, N-diisopropilcarbodiimmide, con formazione di urea.

La miscela è stata lasciata sotto agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente. L'urea è stata successivamente separata tramite filtrazione sottovuoto e si è fatto evaporare il solvente dal filtrato. L' N-2-bromo-2-metilpropanoil-P-alanine N'-ossisuccinimide estere è stato purificato per ricristallizzazione a caldo con 2-propanolo. Dallo spettro NMR riportato in Figura 11 si riscontrano i

picchi caratteristici della molecola desiderata con presenza di residui dei solventi impiegati, quali acqua ($\delta = 1,56$ ppm) e isopropanolo ($\delta = 1,22$ ppm).



Figura 9 Cristalli di N-2-bromo-2-metilpropanoill-P-alanine N'-ossisuccinimide estere dopo 24 ore.

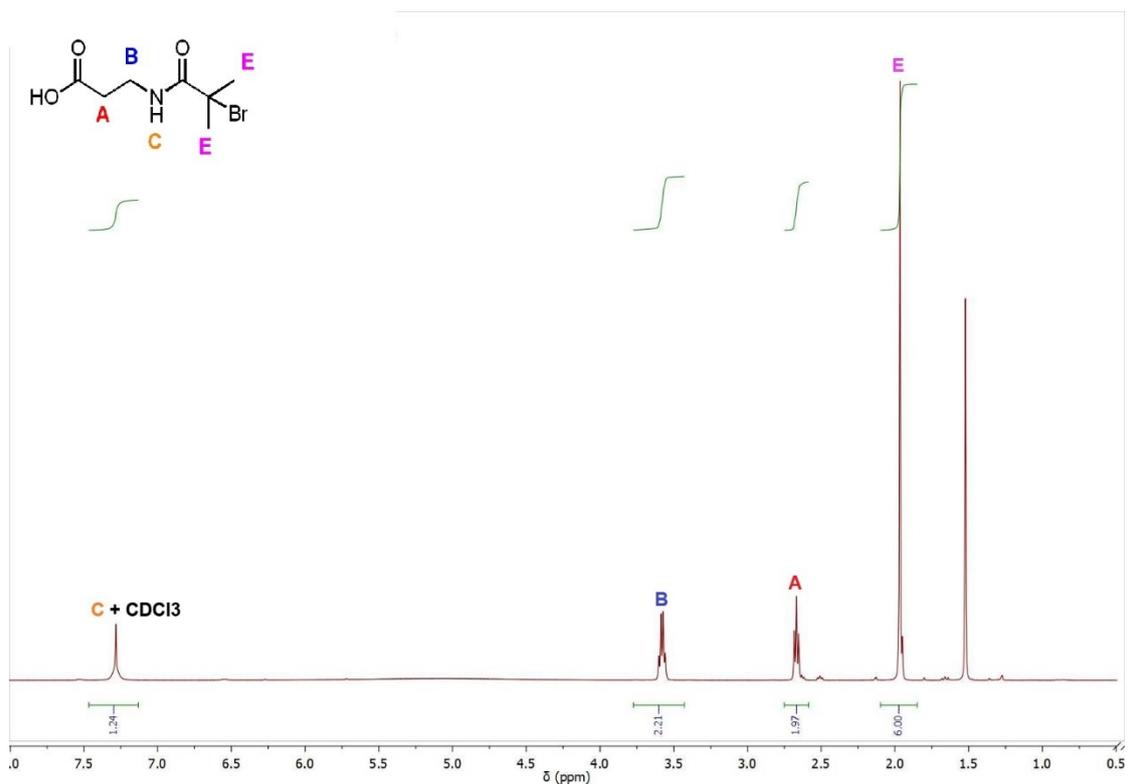


Figura 10 Spettro ¹H NMR dell'intermedio N-2-bromo-metilpropionil-P-alanina, come solvente deuterato è stato utilizzato CDCl₃.

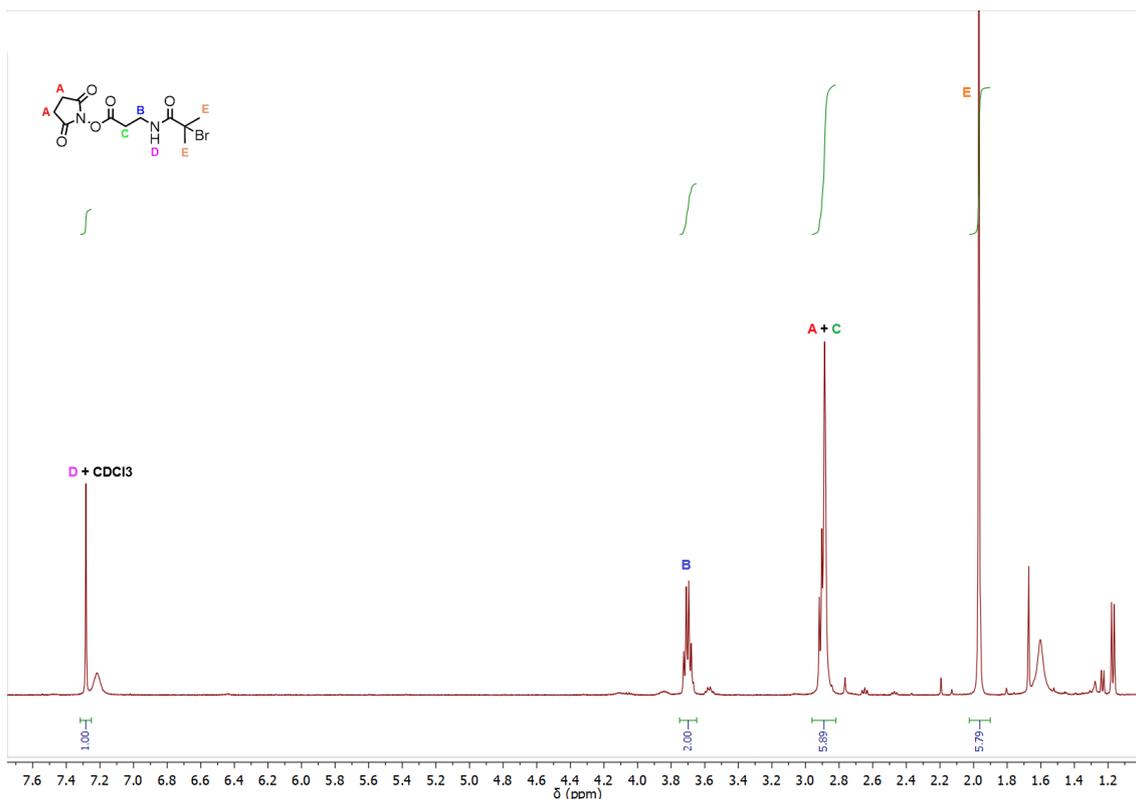


Figura 11 Spettro ^1H NMR di NHS-Br, come solvente deuterato è stato utilizzato CDCl_3 .

2.3.2. Strategia di attacco dell'iniziatore ATRP al lisozima

L'obiettivo è quello di coniugare tutti i 7 siti amminici presenti, si è dunque deciso di lavorare in leggero eccesso di iniziatore NHS-Br, rispetto alla quantità necessaria per reagire con i 7 siti amminici.

Per l'attacco dell'iniziatore alla proteina è stato pesato il lisozima su bilancia analitica ed è stato solubilizzato in 49 mL di tampone fosfato all'interno di un pallone. Nel frattempo, l'iniziatore è stato solubilizzato in 1 mL di DMSO, poiché insolubile in acqua. Successivamente si sono unite le due soluzioni all'interno del pallone di reazione e si è lasciato sotto agitazione per 2 ore. La proteina con l'iniziatore è stata poi purificata tramite dialisi per 24 ore. Infine, è stata eliminata l'acqua dal purificato mediante il liofilizzatore, ottenendo un precipitato bianco (Figura 12).



Figura 12 Lisozima con iniziatore NHS-Br dopo liofilizzazione.

Per controllare il grado di coniugazione del lisozima, ossia in quanti siti è avvenuto effettivamente l'attacco dell'iniziatore, è stata utilizzata la spettrometria di massa ESI-TOF-MS. Gli spettri sono riportati nella sezione 3.1.

2.4. Sintesi del coniugato POEGMA-lisozima

2.4.1. Polimerizzazione modello per ottimizzare le condizioni

Prima di effettuare la polimerizzazione dal lisozima modificato sono state condotte delle prove di polimerizzazione di OEGMA utilizzando un comune alogenuro alchilico solubile in acqua, HEBIB, come iniziatore di ARGET ATRP a diverse condizioni, per ottimizzare la cinetica e il controllo delle reazioni.

Per le prove è stato utilizzato un iniziatore commerciale HEBIB, poiché l'iniziatore ATRP sintetizzato per l'attacco alla proteina, NHS-Br, tende ad idrolizzare in acqua e quindi non è adeguato alle prove in soluzione.

Si riportano in Tabella 2 le condizioni testate.

Tabella 2 Sono riportate le condizioni utilizzate per la polimerizzazione di OEGMA in soluzione acquosa a pH=7,4.

Miscela [OEGMA ₅₀₀]:[Iniziatore]:[CuBr ₂]:[TPMA]: NaAsc]:[NaBr]	Iniziatore	Tempo (h)	Conversione (%)
200 : 1 : 0,1 : 0,2 : 0,05 : 2	HEBIB	22	34
100 : 1 : 0,3 : 0,6 : 0,3 : 3	HEBIB	24	42
200: 1 : 0,3 : 0,6 : 0,02 : 3	HEBIB	22	9
250 : 1 : 0,075 : 0,6 : /	HEBIB	6	36
100 : 1 : 0,1 : 0,2 : 0,05 : 2	NHS-Br	4	20
100 : 1 : 1 : 8 : 0,1 : /	HEBIB	4	60

Inizialmente sono state utilizzate delle soluzioni Stock da 5 mL per i vari componenti, successivamente si è optato per formare le soluzioni pesando direttamente il catalizzatore, il ligando e il sale all'interno della vial di reazione.

In mezzi acquosi, l'utilizzo di concentrazioni basse di catalizzatore causa la quasi completa dissociazione del complesso disattivante $\text{XCu}^{\text{II}}/\text{L}$, diminuendo il controllo della polimerizzazione. Per aggirare il problema, si lavora in eccesso di alogenuri, i quali aumentano la concentrazione della specie disattivante e favoriscono una cinetica lineare del primo ordine⁹.

È stato inoltre osservato come una troppo elevata concentrazione di sali rallenti la polimerizzazione, ciò può essere causato dalla presenza di una concentrazione troppo elevata di $\text{XCu}^{\text{II}}/\text{L}$, o dalla formazione di specie $\text{XCu}^{\text{II}}/\text{L}$ sostanzialmente inattive⁴. Essendo però presenti cloruri all'interno del tampone fosfato, si è deciso di non aggiungere ulteriori sali alogenati.

Per descrivere la procedura sperimentale prenderemo come riferimento la polimerizzazione avente le condizioni $[\text{OEGMA}_{500}] : [\text{Iniziatore}] : [\text{CuBr}_2] : [\text{TPMA}] : [\text{NaAsc}] = 100 : 1 : 1 : 8 : 0,1$.

Preparazione delle soluzioni:

Per l'iniziatore HEBIB è stata utilizzata una soluzione stock di 5 mL con concentrazione 0,00216 g/mol di iniziatore in acqua MilliQ.

Mediante bilancia analitica sono stati pesati CuBr₂ (0,0216 mmol; 0,0048 g, 0,00216 g/mol) e TPMA (0,173 mmol; 0,0502 g; 0,01728 g/mol), i quali sono stati solubilizzati all'interno della vial di reazione con 100 µL di DMF, prelevati mediante siringa Hamilton. Il catalizzatore e il ligando vengono solubilizzati in DMF poiché questo funge da standard interno per il ¹H NMR. Sono stati poi aggiunti 1 mL di monomero (0,216 g/mol), 100 µL della soluzione di iniziatore, 8,4 mL di tampone fosfato e un'ancoretta magnetica. Prima di chiudere la vial con un setto in gomma e del parafilm è stato preso un campione per l'analisi ¹H NMR della cinetica di reazione (tempo di polimerizzazione $t = 0$). Successivamente la soluzione di polimerizzazione è stata lasciata degassare sotto flusso di Ar per circa 25 minuti prima dell'introduzione dell'agente riducente nell'ambiente di reazione. Il flusso di Argon è stato successivamente sostituito con un palloncino precedentemente riempito con Argon.

Successivamente in un'altra vial è stata preparata la soluzione di ascorbato di sodio (0,027 mmol; 0,0053 g; 0,000216 g/mol) in 5 mL di acqua MilliQ. La soluzione è stata chiusa utilizzando un setto in silicone e parafilm ed è stata lasciata degassare sotto flusso di Ar.

Il setup sperimentale (Figura 13) consiste in uno stativo avente 3 morsetti: in quello più in alto si posiziona una vial vuota (chiamata trappola), ma posta in flusso di Ar, che servirà per degassare le siringhe utilizzate per prelevare campioni durante la polimerizzazione, nel morsetto intermedio si posiziona la soluzione di ascorbato di sodio e in quello inferiore la soluzione di polimerizzazione; al di sotto della quale viene posto un agitatore magnetico.



Figura 13 Set-up sperimentale per la reazione di polimerizzazione di POEGMA.

Aggiunte di agente riducente e prelievi di campioni per le analisi cinetiche.

Le aggiunte di ascorbato di sodio sono state fatte tramite una siringa Hamilton con ago lungo opportunamente degassata. Si prelevano poi 100 μL di ascorbato di sodio e si inseriscono all'interno della soluzione di reazione.

I prelievi di campioni della soluzione di polimerizzazione vengono effettuati con una siringa da 5 mL con ago lungo, precedentemente avvinata all'interno della trappola. Questa operazione viene effettuata prima dell'aggiunta di ascorbato di sodio.

Queste procedure sono state ripetute una volta all'ora per tutta la durata della reazione, quindi per 4 ore.

La reazione è stata poi terminata per esposizione all'aria. Infatti, in presenza di ossigeno le specie di Cu(I) vengono rapidamente ossidate e l'assenza di complesso attivatore fa sì che non vengano generati radicali e la polimerizzazione si ferma.

Sono state condotte 3 prove utilizzando le condizioni di reazione descritte sopra, ottenendo risultati confrontabili (Tabella 3). I bassi valori di dispersità ottenuti suggeriscono che ci sia buon controllo sulla polimerizzazione.

Tabella 3 Sono riportati i valori della massa molecolare media ponderale (M_w), la massa molecolare media numerica (M_n) e la dispersità delle 3 prove eseguite utilizzando le condizioni [OEGMA₅₀₀] : [Iniziatore] : [CuBr₂] : [TPMA] : [NaAsc] = 100 : 1 : 1 : 8 : 0,1.

Tentativo	M_n [Da]	M_w [Da]	\bar{D}
1	22700	26100	1,15
2	23900	29600	1,24
3	24000	27000	1,13

2.4.2. Polimerizzazione da lisozima

Per la polimerizzazione di OEGMA dal lisozima modificato tramite reazione con NHS-Br (Sezione 2.3.2) sono state svolte le seguenti operazioni.

Sono stati pesati 73 mg di coniugato (0,0048 mmol di coniugato; 0,0216 mmol di ammine coniugate), in quanto si vuole ottenere un DP 100. Il grado di polimerizzazione (DP) indica il numero di unità ripetitive presenti in un polimero, in questo caso l'obiettivo è quindi formare su ogni sito di iniziazione una catena polimerica avente 100 unità di monomero OEGMA.

Si è assunto che ciascun enzima presentasse 4,5 siti di iniziazione, sulla base delle caratterizzazioni svolte (ESI-MS e test TNBS). All'interno della soluzione di polimerizzazione sono presenti 1 mL di monomero, 0,0048 g di CuBr₂ (0,0216 mmol, 0,00216 g/mol), 0,0502 g di TPMA (0,173 mmol; 0,01728 g/mol), 100 μ L di DMF e 8,5 mL di tampone fosfato. Separatamente è stata preparata una soluzione acquosa di ascorbato di sodio, analoga a quella preparata per le ARGET-ATRP iniziate da HEBIB.

Il procedimento sperimentale impiegato per le polimerizzazioni dal lisozima è analogo a quello descritto per l'iniziatore HEBIB.

La crescita del polimero è stata monitorata tramite analisi DLS.

3. CARATTERIZZAZIONE

3.1. ESI-TOF-MS

L'ESI-TOF-MS è stata utilizzata per valutare il grado di coniugazione del lisozima dopo reazione con NHS-Br, confrontando lo spettro del lisozima prima della coniugazione (Figura 14) con quello successivo alla reazione (Figura 15).

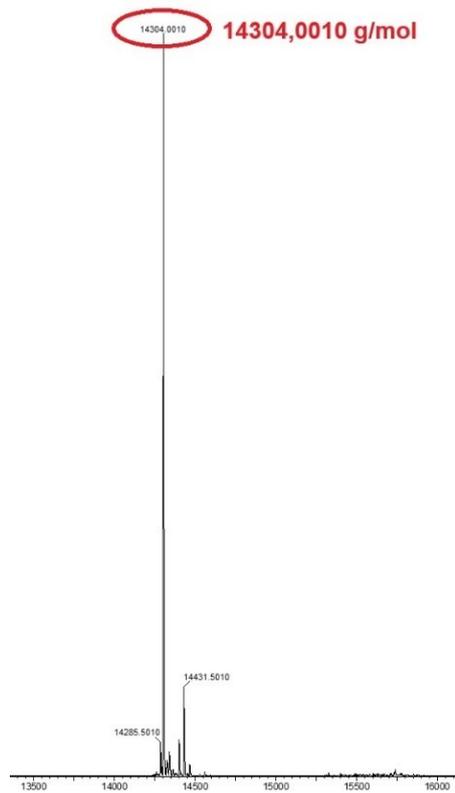


Figura 14 Spettro di massa del lisozima nativo.

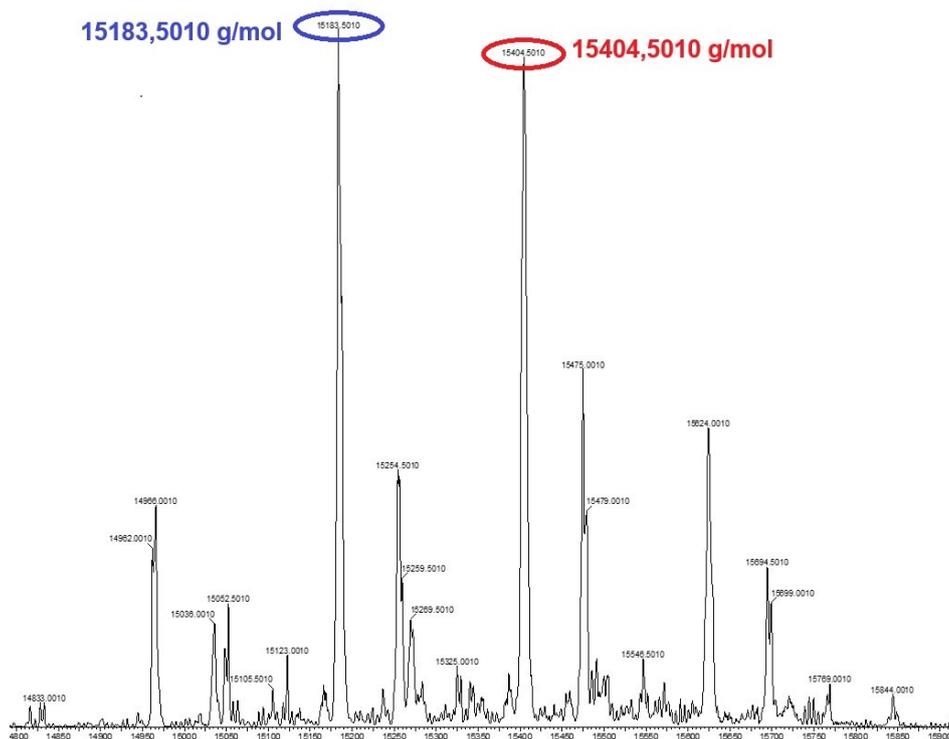


Figura 15 Spettro di massa del lisozima coniugato con NHS-Br.

Lo spettro del lisozima dopo coniugazione (Figura 15) mostra in generale valori di massa più elevati rispetto al lisozima nativo (Figura 14). Tuttavia, si può notare che sono presenti popolazioni con masse differenti. Per determinare il grado di coniugazione delle popolazioni predominanti è stata utilizzata l'Equazione 3:

$$\text{Grado di coniugazione} = \frac{\text{massa del coniugato} - \text{massa del nativo}}{\Delta\text{massa}} \quad (3)$$

Dove $\Delta\text{massa} = 220,06 \text{ g/mol}$, corrisponde alla massa del frammento dell'iniziatore NHS-Br ($221,07 \text{ g/mol}$) dopo la coniugazione al lisozima, considerando la perdita dell'idrogeno dell'ammina primaria ($1,01 \text{ g/mol}$) per formare l'ammide (Figura 16).

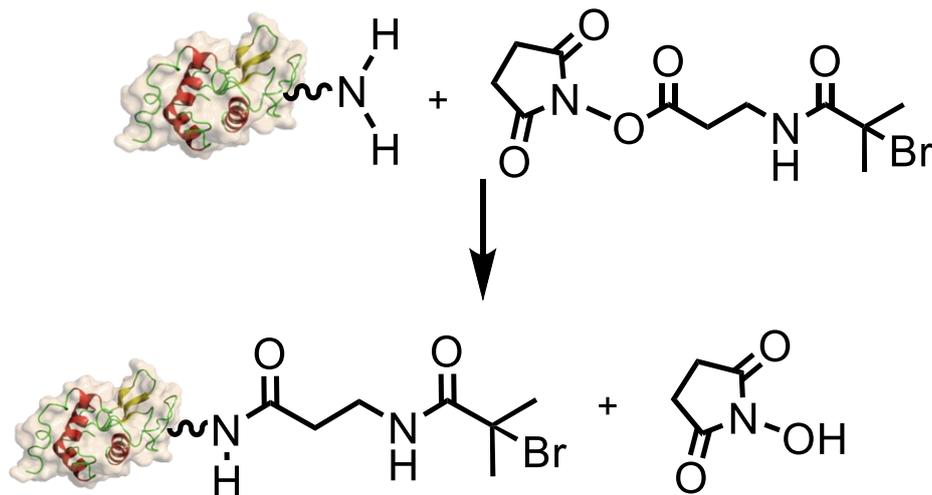


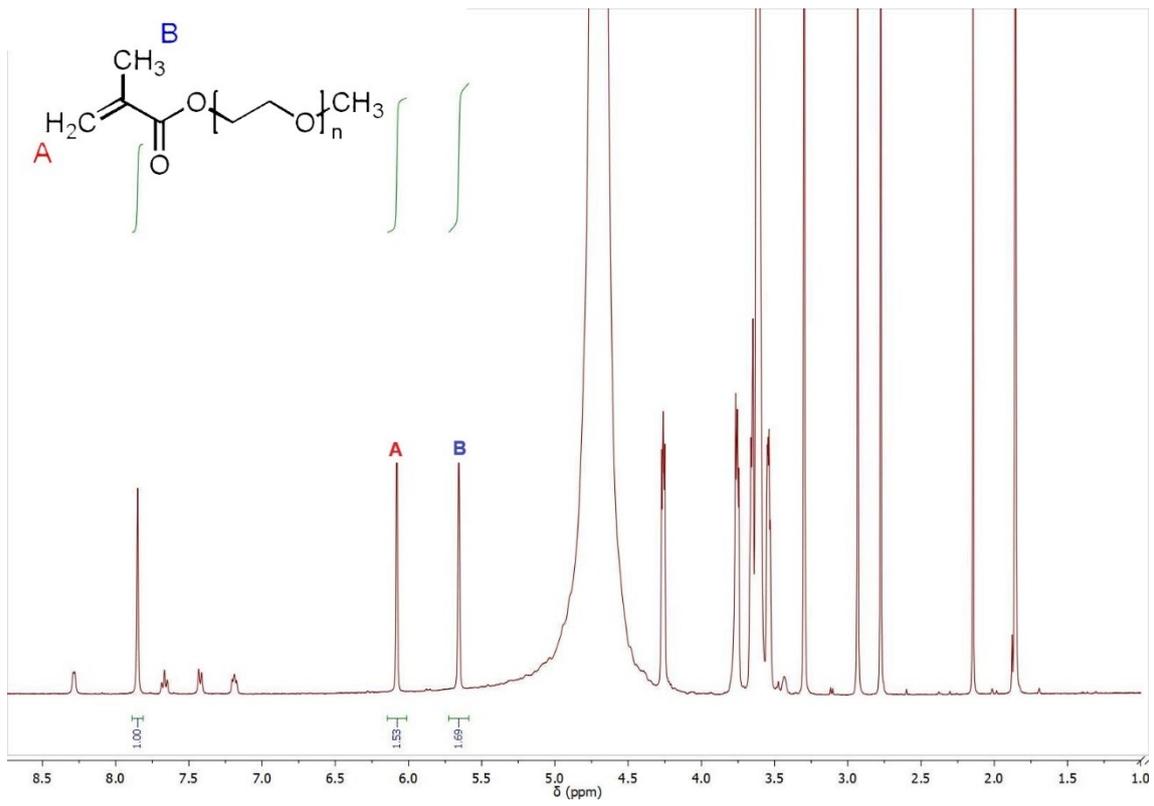
Figura 16 Meccanismo di attacco dell'iniziatore NHS-Br a lisozima.

Nel caso specifico risulta che l'iniziatore è stato coniugato in media su circa 4,5 siti, in quanto sono presenti principalmente le popolazioni con grado di coniugazione 4 e 5.

3.2. ¹H NMR

3.2.1. Cinetiche di polimerizzazione

Le cinetiche di polimerizzazione, impiegando HEBIB o il lisozima modificato come iniziatori, sono state determinate analizzando i campioni prelevati nel corso delle reazioni tramite ¹H NMR. Monitorando la variazione dei segnali dei protoni vinilici del monomero (A e B in Figura 17) rispetto al segnale corrispondente al protone aldeidico del DMF.



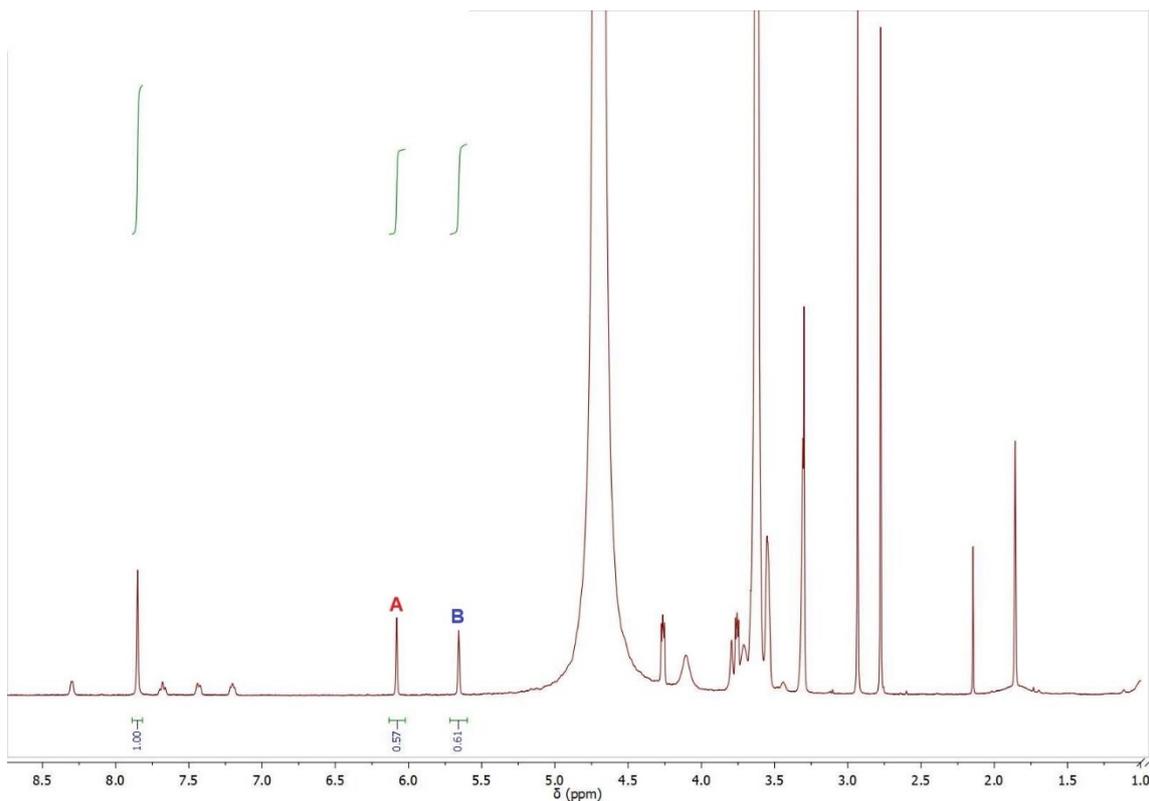


Figura 17 Spettri NMR di ARGET ATRP modello (i.e., con HEBIB come iniziatore) relativi ai campioni prelevati al tempo $t = 0$ (t_0 in Tabella 4) e $t = 4$ h (t_4). Nello specifico questi spettri si riferiscono alla reazione di polimerizzazione di OEGMA.

Tabella 4 Si riportano i valori di conversione del monomero OEGMA e i valori di integrazione dei segnali ^1H NMR dei protoni vinilici (A e B in figura 17) all'aumentare del tempo di reazione.

Prelievi	$\int A$	$\int B$	Conversione %
t_0 ($t = 0$)	1,53	1,69	0
t_1 ($t = 1$ h)	1,06	1,15	29
t_2	0,82	0,86	46
t_3	0,69	0,75	55
t_4	0,57	0,61	63

In termini della cinetica di polimerizzazione, è stato osservato un andamento lineare nel grafico semilogaritmico che riporta il consumo di monomero nel tempo (Figura 18), i.e., $\ln \frac{[M]_0}{[M]}$ vs t (dove M è il monomero), indicando una cinetica di primo ordine.

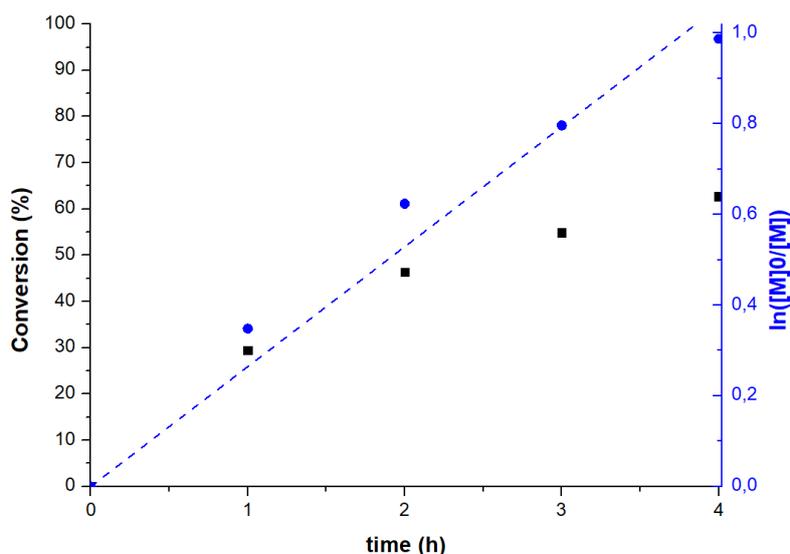


Figura 18 Nel grafico sono evidenziati gli andamenti della conversione e del $\ln([M]_0/[M])$ rispetto al tempo di reazione.

3.3. Dynamic Light scattering

3.3.1. Misura del raggio idrodinamico R_h

Per monitorare la crescita delle catene polimeriche dal lisozima è stato osservato l'aumento del raggio idrodinamico (R_h) dell'enzima mediante DLS.

Tabella 5 Si riportano i valori del raggio idrodinamico del lisozima nativo, del lisozima dopo la coniugazione (lisozima + iniziatore), del coniugato dopo polimerizzazione (lisozima + polimero), con le relative deviazioni standard.

Campione	Raggio idrodinamico (nm)	Deviazione standard (nm)
Lisozima	1,4	0,4
Lisozima + iniziatore	3,8	0,5
Lisozima + polimero	9,0	0,1

Si è osservato quindi un aumento del raggio idrodinamico dopo la polimerizzazione, indice della crescita polimerica sulla superficie della proteina. Questa tecnica però non fornisce informazioni riguardo all'omogeneità nella crescita delle catene nei vari siti né rispetto alla loro lunghezza. Tali informazioni potrebbero essere ricavate da analisi di spettrometria di massa oppure rimuovendo le catene polimeriche dall'enzima tramite opportuni trattamenti acidi

e sottoponendo poi il polimero ad analisi di cromatografia ad esclusione dimensionale.

4. CONCLUSIONI

Gli obiettivi posti in questa tesi sono stati raggiunti, infatti è stata ottenuta con successo una ARGET ATRP “grafting-from” in tampone fosfato per la polimerizzazione dell'OEGMA in condizioni di reazione fisiologiche, ottimizzando la polimerizzazione da proteina utilizzando TPMA come ligando e raggiungendo buone conversioni in 4 ore.

La crescita di polimero da proteina è stata qualitativamente osservata con DLS, tramite l'incremento di raggio idrodinamico.

È stata inoltre ottimizzata la procedura di attacco dell'iniziatore NHS-Br alla proteina ed è stata caratterizzata con analisi ESI-TOF-MS.

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Cao, L.; Wang, L. *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 8516–8549.
- (2) Kaupbayeva, B.; Russell, A. J. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *101*, 101194.
- (3) Baker, S. L.; Kaupbayeva, B.; Lathwal, S.; Das, S. R.; Russell, A. J.; Matyjaszewski, K. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 4272–4298.
- (4) Simakova, A.; Averick, S. E.; Konkolewicz, D.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2012**, *45*, 6371–6379.
- (5) Moncalvo, F.; Lacroce, E.; Franzoni, G.; Altomare, A.; Fasoli, E.; Aldini, G.; Sacchetti, A.; Cellesi, F. *Macromolecules* **2022**, *55*, 7454–7468.
- (6) Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4015–4039.
- (7) Russell, A. J.; Baker, S. L.; Colina, C. M.; Figg, C. A.; Kaar, J. L.; Matyjaszewski, K.; Simakova, A.; Sumerlin, B. S. *AIChE J.* **2018**, *64*, 3230–3245.
- (8) Lorandi, F.; Matyjaszewski, K. *Isr. J. Chem.* **2020**, *60*, 108–123.
- (9) Fantin, M.; Isse, A. A.; Gennaro, A.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2015**, *48*, 6862–6875.

