



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA DEI MATERIALI**

**IDROGELI DI PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI PER
SOSTITUTI VALVOLARI CARDIACI “SELF-SEEDING”:
SINTESI E CARATTERIZZAZIONE**

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin
Correlatore: Dott.ssa Annj Zamuner

Laureando: PIETRO ROSSI

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

A mio Nonno Tino

Riassunto

Il seguente lavoro di tesi è un contributo alla ricerca di materiali innovativi destinati alla progettazione di valvole cardiache “*self-seeding*”.

L’attenzione si è focalizzata sulla realizzazione di matrici di peptidi auto-assemblanti quali substrati per cellule vascolari interstiziali in vista di un utilizzo degli idrogeli come *filler* per protesi di valvole cardiache decellularizzate.

A tal fine sono stati realizzati diversi *scaffold* utilizzando (i) solo peptidi auto-assemblanti, (ii) peptidi auto-assemblanti arricchiti con un coniugato RGD, in tre diverse concentrazioni, (iii) oppure peptidi auto-assemblanti con il fattore di crescita IGF-1 in tre diverse concentrazioni. Per la realizzazione degli *scaffold* sono stati sintetizzati e purificati in laboratorio tutti i peptidi necessari. Le matrici sono state caratterizzate morfologicamente mediante analisi AFM e SEM e biologicamente mediante semina cellulare (VIC) e valutazione dell’adesione e proliferazione cellulari.

La finalità è di creare degli *scaffold* per bioprotesi valvolari graditi alle cellule, in modo da consentirne un completo ripopolamento *in vivo*, evento in grado di determinare notevoli miglioramenti nel campo della cardiocirurgia valvolare.

Indice

CAPITOLO 1 – Introduzione	1
1.1 I BIOMATERIALI	1
1.2 L'INGEGNERIA TESSUTALE	3
1.3 LE VALVOLE CARDIACHE	5
1.3.1 Le valvole cardiache meccaniche	7
1.3.2 Le valvole cardiache biologiche	8
1.3.3 Le valvole cardiache ingegnerizzate	9
1.3.3.1 Valvole ingegnerizzate a supporto sintetico	10
1.3.3.1 Valvole ingegnerizzate a supporto biologico	11
1.3.3.1 Valvole ingegnerizzate a supporto ibrido	12
1.4 L'ADESIONE CELLULARE	13
1.5 PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI	14
1.6 LA SEQUENZA ADESIVA RGD E IL FATTORE DI CRESCITA IGF-1	15
1.7 "CHEMOSELECTIVE LIGATION" VIA OSSIMA	18
1.8 SCOPO DELLA TESI	20
CAPITOLO 2 – Materiali, Strumenti e Metodi	23
2.1 MATERIALI	23
2.1.1 Reagenti	23
2.1.2 Peptide sintetizzato per la realizzazione degli idrogeli	24
2.1.3 Peptidi e proteine per "Chemoselective Ligation"	24
2.1.3.1 AoaEAbuK	25
2.1.3.2 (GRGDSP) ₄ K	25
2.2 STRUMENTI	25
2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida	25
2.2.2 Test alla ninidrina e test alla piperidina	26
2.2.3 Cromatografia	26
2.2.4 Analisi di massa	27
2.2.5 Microscopio elettronico a scansione	27
2.3 METODI	28
2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida	28

2.3.1.1	Test sulla resa di funzionalizzazione della resina.....	31
2.3.1.2	Attivazione del gruppo carbossilico.....	32
2.3.1.3	Test alla ninidrina.....	33
2.3.1.4	Sblocco del peptide dalla resina.....	35
2.3.2	Purificazione mediante caratterizzazione cromatografica.....	35
2.3.3	Spettroscopia UV/Vis.....	38
2.3.4	Spettrometria di massa.....	39
2.3.5	Microscopia elettronica a scansione.....	42
2.3.6	Microscopia a forza atomica.....	44
CAPITOLO 3	– Parte sperimentale.....	47
3.1	SINTESI PEPTIDICA.....	47
3.1.1	Sintesi del peptide EAbuK.....	47
3.1.2	Caratterizzazione del peptide EAbuK.....	48
3.1.3	Sintesi del peptide AoaEAbuK.....	52
3.1.4	Caratterizzazione del peptide AoaEAbuK.....	53
3.1.5	Sintesi del peptide (GRGDSP) ₄ K.....	55
3.1.6	Caratterizzazione del peptide (GRGDSP) ₄ K.....	57
3.2	CHEMOSELECTIVE LIGATION.....	60
3.2.1	Coniugazione tra AoaEAbuK e (GRGDSP) ₄ K.....	61
3.2.1.1	Preparazione di (GRGDSP) ₄ K α -cheto-aldeide.....	61
3.2.1.2	Sblocco del peptide AoaEAbuK dalla resina.....	64
3.2.1.3	Preparazione del coniugato EAbuK-RGD.....	65
3.2.2	Discussione.....	69
3.3	MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE.....	73
3.3.1	Primo esperimento.....	73
3.3.2	Secondo esperimento.....	75
3.3.3	Risultati e discussione.....	76
3.4	MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA.....	77
3.4.1	Discussione.....	78
3.5	SAGGI CELLULARI.....	81
3.5.1	Identificazione della densità peptidica.....	81
3.5.2	<i>Scaffold</i> di EAbuK arricchiti con sequenza RGD e IGF-1.....	87
3.5.3	Risultati e discussione.....	91

CONCLUSIONI.....	99
NOMENCLATURA.....	101
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	103
RINGRAZIAMENTI.....	107

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I Biomateriali

Si definisce *biomateriale* un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II *International Consensus Conference on Biomaterials*, Chester, Gran Bretagna, 1991).

La storia dei biomateriali può essere riassunta in tre tappe fondamentali:

- Biomateriali di **prima generazione**: la caratteristica fondamentale del materiale è di essere *bioinerte*, ovvero di minimizzare le interazioni chimico/fisiche tra organismo e materiale.
- Biomateriali di **seconda generazione**: il materiale deve essere *bioattivo*, ovvero si deve integrare velocemente con l'organismo provocando azioni e reazioni controllate nell'ambiente fisiologico, o *riassorbibile*, se viene gradualmente degradato nell'organismo, senza causare problemi di rigetto o tossicità.
- Biomateriali di **terza generazione**: il materiale deve essere sia *bioattivo* sia *riassorbibile*; rappresentano il presente e il futuro dei biomateriali.

I biomateriali di terza generazione sono definiti materiali *biomimetici*, in quanto interagiscono con i tessuti adiacenti attraverso meccanismi di riconoscimento biomolecolare “suggerendo” alle cellule il modo in cui devono agire [1].

La progettazione di materiali biomimetici, ovvero che mimano il comportamento e le caratteristiche dei tessuti biologici, prevede la creazione di materiali che possano promuovere specifiche risposte cellulari in grado di dirigere la formazione di nuovo tessuto [2]. Il riconoscimento biomolecolare dei materiali da parte delle cellule può essere ottenuto attraverso due strategie: un primo approccio consiste nel dotare i biomateriali di bioattività

tramite l'incorporazione di molecole solubili, come fattori di crescita o DNA plasmidico, in *carriers* cosicchè le molecole bioattive possano essere rilasciate dal materiale e promuovere o modulare la formazione di nuovo tessuto [2-5]; l'altro approccio riguarda l'incorporazione di proteine o peptidi in grado di legare le cellule sulla superficie o all'interno di biomateriali attraverso modifiche chimiche o fisiche. Nella progettazione di un materiale biomimetico rivestono grande importanza parametri quali la densità, la distribuzione spaziale, l'orientamento della biomolecola. L'uso di proteine intere risulta tuttavia limitato dalla scarsa stabilità, dall'elevato costo e, a volte, dalla difficoltà nel reperire i materiali. Per ovviare a tali problemi è stata messa a punto una strategia, nota come *peptide mimicry*, che offre la possibilità di individuare frammenti delle proteine native in grado di mantenere, almeno in parte, l'attività biologica propria della proteina intera. Brevi sequenze peptidiche possono essere sintetizzate per via chimica in grandi quantità e purificate fino ad elevati gradi di omogeneità. I peptidi sono economicamente più accessibili, possono essere conservati più a lungo e più facilmente delle proteine da cui derivano, in quanto più stabili e in genere maggiormente solubili in ambiente acquoso. Inoltre, possono essere opportunamente modificati per aumentarne la stabilità rispetto alla degradazione proteolitica.

Vari materiali sono stati impiegati nell'implantologia in campo medico durante gran parte del XX secolo. Nonostante si sia assistito ad un ovvio miglioramento nel tempo in quanto a sofisticazione e qualità dei materiali, solo durante gli ultimi vent'anni si è verificata una rivoluzione nell'approccio ai concetti di materiali per protesi mediche. Secondo il vecchio approccio le protesi venivano costruite con materiali sintetici, come ad esempio il polietilene o materiali ceramici ricoperti di titanio in associazione col polietilene, a basso coefficiente di frizione, massima inerzia e capacità minima di indurre irritazioni.

Tuttavia, vari studi hanno dimostrato che l'impiego di materiali inerti, che non innescano alcuna reazione nell'organismo ospite, né di rifiuto né di riconoscimento, non ha portato a buoni risultati. Nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli un'incorporazione ed un riconoscimento può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo. Gli studi più recenti sono pertanto rivolti all'impiego di materiali bioattivi, ovvero capaci di promuovere funzioni benefiche nelle cellule e nei tessuti che circondano l'impianto [6].

1.2 L'ingegneria tessutale

La *Tissue Engineering*, o ingegneria tessutale, è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita al fine di sviluppare sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni tessutali [7]. L'abbinamento corretto di materiali (matrice o *scaffold*), segnali biochimici e sistemi cellulari possono portare alla realizzazione di tessuti e, in futuro, anche di interi organi.

Questa disciplina si basa su due tipologie di approccio:

- *in vitro seeding*: è l'approccio tradizionale che prevede il ripopolamento cellulare di una matrice *in vitro* utilizzando un bioreattore per simulare l'ambiente biologico (flusso pulsato);
- *tissue guided regeneration*: in questo approccio si utilizza come bioreattore direttamente il paziente, impiantando lo *scaffold* senza precedente semina cellulare *in vitro*, incentivando il ripopolamento cellulare *in vivo*.

La prima fase della costruzione di un tessuto ingegnerizzato inizia con la progettazione e la costruzione di uno *scaffold*, che funge da supporto per la crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto. Sebbene le caratteristiche finali dipendano dalla specifica applicazione, uno *scaffold* ideale deve possedere alcune caratteristiche basilari tra quelle di seguito indicate (Salgado et al., 2004):

- **Biocompatibilità**: il materiale utilizzato deve suscitare una specifica risposta biologica, benefica per l'organismo, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo (non deve provocare infiammazioni o degradarsi in componenti tossici).
- **Bioattività**: il materiale deve possedere superficie e/o cavità interne con proprietà chimiche e topografiche atte alla promozione dell'adesione, dello *spreading* e della proliferazione cellulare: ad esempio superfici rugose (anziché lisce), o che espongono all'interfaccia determinati gruppi funzionali, favoriscono questi processi, vitali per la regolazione, la crescita, e la differenziazione cellulare e quindi per la formazione dei tessuti.

- Biodegradabilità: successivamente all'impianto i materiali devono degradarsi con velocità proporzionale alla rigenerazione tessutale e al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) in sostanze non tossiche e senza interferire con i tessuti circostanti.
- Struttura tridimensionale: la rigenerazione di tessuti richiede un supporto che emuli la struttura tridimensionale della matrice extracellulare per permettere l'organizzazione delle cellule in strutture complesse. Una struttura porosa con porosità elevata e interconnessa è ideale: a) per assicurare un sufficiente apporto nutritivo e di ossigeno verso le cellule e consentire di rimuovere i prodotti del metabolismo cellulare; b) per permettere la crescita e la riorganizzazione cellulare in vitro; c) per permettere la vascolarizzazione.
- Proprietà meccaniche: lo *scaffold* deve possedere proprietà meccaniche paragonabili a quelle del tessuto da sostituire in condizioni fisiologiche.
- Processabilità: il materiale deve essere facilmente lavorabile e sterilizzabile.

Gli *scaffold* non sono dunque supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente alla ricostruzione dei tessuti: essi assicurano la stabilità meccanica della struttura, necessaria per l'organizzazione tridimensionale delle cellule, e, mentre accompagnano la loro crescita fino alla formazione del nuovo tessuto, il materiale che li compone viene assorbito dalle cellule ospiti con una velocità di degradazione uguale a quella di biosintesi cellulare.

Per la realizzazione di un tessuto ingegnerizzato, oltre allo *scaffold*, servono le cellule del ricevente e i fattori biochimici. I fattori biochimici sono proteine che prevedono la crescita e lo sviluppo delle cellule sulla matrice. Seminando sugli *scaffold* le cellule del ricevente, il paziente diventa "donatore di se stesso" e il tessuto ingegnerizzato, una volta impiantato, non avrà problemi legati alla risposta immunitaria.

L'ingegneria tessutale offre, inoltre, straordinarie possibilità di miglioramento nella realizzazione dei tessuti viventi, ovvero tessuti in grado di crescere in maniera sinergica con l'organismo del ricevente, aspetto fondamentale soprattutto nella cura di pazienti pediatrici. In questo lavoro di tesi ci si concentrerà su *scaffold* per la ricellularizzazione delle valvole cardiache. Utilizzando le tecniche dell'ingegneria tessutale è possibile ricostruire strutture valvolari cardiache viventi; ogni singolo passaggio del processo di costruzione presenta un

punto critico, dalla scelta dello *scaffold*, alla scelta della sorgente cellulare ed il metodo di condizionamento (per l'approccio in vitro) [1].

L'ingegneria tessutale è quindi un nuovo settore multidisciplinare delle biotecnologie che potrebbe rivoluzionare la medicina, consentendo di rigenerare gli organi e i tessuti malati invece di limitarsi semplicemente a ripararli.

1.3 Le valvole cardiache

Il trasporto dell'ossigeno all'interno dell'organismo è affidato al sangue, e la circolazione sanguigna è gestita dal cuore. Il sangue venoso (a basso contenuto di ossigeno) arriva dall'organismo ed entra nell'atrio destro del cuore attraverso la vena cava superiore e la vena cava inferiore; il sangue viene poi trasferito nel ventricolo destro, dal quale viene pompato all'interno dell'arteria polmonare per essere ossigenato nei polmoni. Il sangue ossigenato percorre la vena polmonare ed entra nel atrio sinistro, passando poi all'interno del ventricolo sinistro il quale ha il compito di pompare il sangue ossigenato nell'aorta per la sua redistribuzione all'intero organismo.

La regolazione del flusso sanguigno all'interno del cuore è affidata alle valvole cardiache e il loro movimento di apertura e chiusura è governato da variazioni di pressione intracardiache, senza alcun controllo di tipo nervoso o muscolare.

Le valvole cardiache si dividono in due valvole atrio-ventricolari e due semilunari (Figura 1.2):

- valvola *tricuspide*, separa l'atrio destro dal ventricolo destro;
- valvola *mitrale*, separa l'atrio sinistro dal ventricolo sinistro;
- valvola *aortica*, separa il ventricolo sinistro dall'aorta;
- valvola *polmonare*, separa il ventricolo destro dalla vena polmonare.

Le valvole cardiache sono formate da lembi (sottili foglietti) di tessuto fibroso, rivestito da endotelio, fissati su un anello valvolare fibroso. Le malattie delle valvole cardiache si chiamano valvulopatie e sono di due tipi: *stenosi* (consiste nell'incompleta apertura dei lembi

valvolari, facendo passare il sangue per un orifizio più piccolo del normale) ed *insufficienza* (incompleta chiusura della valvola, parte del sangue torna indietro). Spesso i due fenomeni coesistono nella stessa valvola, dando origine alla *stenoinsufficienza*.

Le malattie che colpiscono il lato destro del cuore, in cui si raggiungono valori di pressioni più bassi, sono rare, mentre sono molto più frequenti quelle riguardanti il lato sinistro del cuore, quindi riguardanti la valvola mitrale e la valvola aortica.

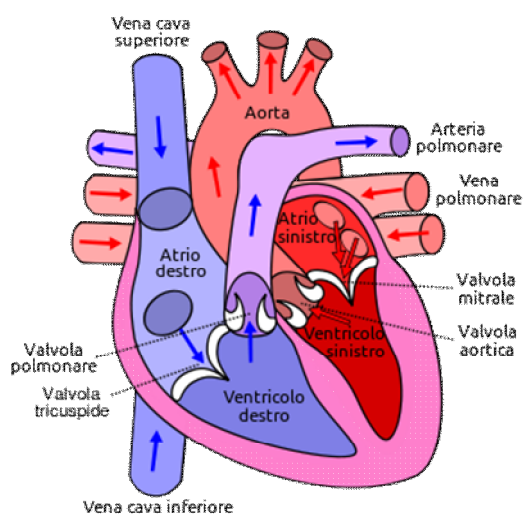


Figura 1.1. Vista interna del cuore, dove si riconoscono la valvola tricuspide e mitrale, la valvola aortica e la valvola polmonare.

Il tipico approccio medico di fronte a queste malattie consiste nell'intervento chirurgico, andando ad agire sulle valvole esistenti (dilatandole con un palloncino nel caso di stenosi) per ridurre il problema. Se il difetto cardiaco persiste, o se si ripresenta dopo breve tempo, è necessario un intervento di sostituzione della valvola mediante l'utilizzo di protesi valvolari. Le protesi valvolari sono impiegate in cardiocirurgia ormai da oltre 40 anni e si differenziano tra loro sulla base di alcune caratteristiche: natura, trombogenicità, durata, profilo emodinamico.

Le protesi valvolari cardiache vengono distinte in due gruppi fondamentali:

- Valvole *meccaniche*, o artificiali, con sistemi di chiusura rigidi prodotti industrialmente;

- Valvole *biologiche*, o bioprotesi, realizzate con lembi naturali di origine umana o animale.

1.3.1 Le valvole cardiache meccaniche

Le valvole cardiache meccaniche sono protesi realizzate in materiale metallico rivestito di carbonio pirolitico (il materiale conosciuto meno trombogenico). Vengono classificate in base alla loro struttura, e si dividono in varie tipologie (Figura 1.2):

- *caged-ball*;
- *single-tilting-disk*;
- *bileaflet-tilting-disk*.

Le valvole cardiache meccaniche sono fortemente trombogeniche e richiedono un terapia anticoagulante a vita. Il potenziale trombogenico è alto nei pazienti a cui è stata innestata una valvola *caged-ball*, basso in pazienti con protesi *bileaflet-tilting-disk* e intermedio in pazienti con protesi *single-tilting-disk*.

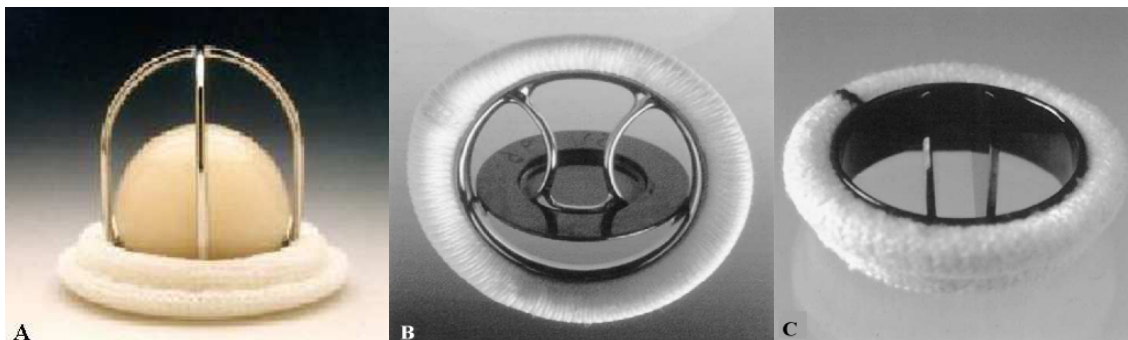


Figura 1.2. Modelli di valvole cardiache meccaniche: A) *caged-ball* (Starr-Edwards); B) *single-tilting-disk* (Medtronic-Hall); C) *bileaflet-tilting-disk* (St. Jude Medical) [1].

Le valvole cardiache meccaniche, salvo rare eccezioni, sono molto durevoli, possono lavorare senza rovinarsi per 20-30 anni. Queste caratteristiche rendono le valvole cardiache

particolarmente adatte per pazienti giovani o con un'aspettativa di vita superiore a 10 o 15 anni, oppure per pazienti che, per altre ragioni, siano già sottoposti a terapia anticoagulante.

1.3.2 Le valvole cardiache biologiche

Le valvole cardiache biologiche rappresentano la principale alternativa alle valvole cardiache meccaniche, e sono principalmente di due tipi:

- *Eterologhe*, valvola porcina o tessuto bovino (pericardio) montato su di un supporto metallico (*stent*);
- *Omologhe*, ovvero valvole umane prelevate da espanti.

Le valvole cardiache biologiche hanno una durata nettamente inferiore rispetto a quelle meccaniche, infatti il 10÷20 % delle protesi omologhe e il 10÷30 % delle protesi eterologhe falliscono tra i 10 e i 15 anni dall'impianto e devono essere sostituite. Le valvole cardiache biologiche in un paziente giovane hanno una vita media di circa 8-10 anni a causa del metabolismo del calcio, molto attivo, che depositandosi sui lembi valvolari può causarne l'indurimento e, quindi, il mal funzionamento. I pazienti con età inferiore ai 40 anni presentano un'alta incidenza di malfunzionamento della valvola eterologa. Le valvole biologiche sono da preferirsi per pazienti anziani o con un'aspettativa di vita inferiore ai 10 o 15 anni, oppure per pazienti ai quali non è possibile (o non è accettabile) proporre la terapia anticoagulante a vita. Infatti il basso potere trombogenico di tali valvole non impone al paziente di seguire alcuna terapia farmacologica.

Le valvole biologiche necessitano di trattamenti chimici di decellularizzazione, al fine di eliminare i componenti che possano indurre rigetto da parte del sistema immunitario del paziente. I trattamenti a cui è soggetto il tessuto modificano le caratteristiche della valvola, andando a peggiorare le proprietà meccaniche. Generalmente i tessuti vengono poi trattati con la glutaraldeide al fine di "fissare" la struttura per restituirle parte delle proprietà meccaniche perse in precedenza. Eventuali residui di glutaraldeide possono però essere rilasciati nel tempo all'interno dell'organismo e dare problemi di citotossicità, risposta immunitaria e calcificazione. Le valvole biologiche non risultano quindi "vitali" in quanto l'insieme dei trattamenti a cui sono sottoposte ne compromette la funzionalità biologica.

1.3.3 Le valvole cardiache ingegnerizzate

La sostituzione delle valvole cardiache con protesi meccaniche o biologiche è ancora oggi molto utilizzata in cardiocirurgia, ma presenta numerose limitazioni. Un aspetto fondamentale è la “non vitalità” delle protesi, ovvero l’incapacità dei tessuti impiantati di svilupparsi e crescere assieme all’organismo; questo è un aspetto di fondamentale importanza soprattutto nei casi pediatrici, dove i pazienti sono costretti a subire numerosi trapianti valvolari nel corso dell’intera vita. Infatti l’1% dei neonati presenta un difetto congenito che richiede un intervento chirurgico a cuore aperto, compresa la sostituzione della valvola aortica.

L’ingegneria tessutale cerca di proporre delle nuove strade nella cura delle valvulopatie, utilizzando delle protesi valvolari ingegnerizzate, ripopolate con le cellule del paziente ricevente (autologhe), capaci di integrarsi perfettamente con l’organismo, che crescano con esso senza richiedere successivi interventi chirurgici e che superino tutti i limiti rilevabili nelle protesi meccaniche e biologiche.

Le tecniche dell’ingegneria tessutale si basano su alcuni passaggi fondamentali [1]:

1. Costruzione di un supporto (*scaffold*) per le cellule che mimi la matrice extracellulare;
2. Prelievo delle cellule dal paziente, necessarie alla cultura cellulare per la semina sul supporto;
3. Semina cellulare ed incubazione in bioreattore;
4. Sostituzione chirurgica della valvola malata con la valvola ripopolata *in vitro*.

In Figura 1.3 sono schematizzati i passaggi necessari per la realizzazione di una valvola cardiaca ingegnerizzata. Nel caso in cui le valvole cardiache ingegnerizzate vengano impiantate direttamente *in vivo*, esse non passano attraverso il bioreattore; fino ad oggi, comunque, l’innesto di valvole cardiache ingegnerizzate sottoposte a precondizionamento *in vitro* ha portato risultati soddisfacenti.

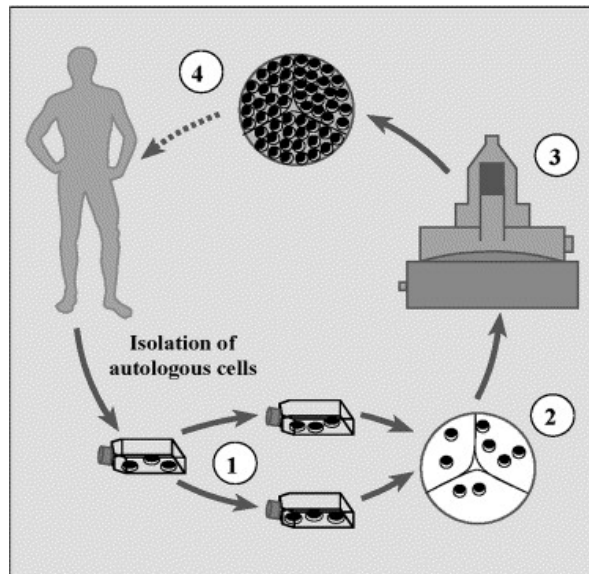


Figura 1.3. Fasi principali necessarie alla realizzazione di una valvola cardiaca ingegnerizzata con cellule autologhe.

Per la realizzazione di valvole cardiache ingegnerizzate è possibile utilizzare 3 diversi tipi di matrice:

- *Scaffold* sintetici;
- *Scaffold* biologici;
- *Scaffold* ibridi.

A prescindere dalla tipologia di *scaffold* utilizzata, si ottengono valvole cardiache compatibili con l'organismo del ricevente ma dotate di caratteristiche diverse a seconda che il supporto sia sintetico o biologico.

1.3.3.1 Valvole ingegnerizzate con supporto sintetico

Gli *scaffold* sintetici sono composti da biopolimeri biodegradabili e biorisorbibili, materiali che, una volta terminata la crescita cellulare *in vitro*, quindi innestati *in vivo*, sono capaci di lasciare spazio all'ulteriore crescita del tessuto. Materiali come questi sono generalmente l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e i loro copolimeri. Questi biopolimeri devono garantire anche un'adeguata lavorabilità poiché dovranno assumere delle ben precise forme e dimensioni. La ricerca di nuovi materiali più adatti a svolgere determinati ruoli

biologici è in continua evoluzione; ad esempio attualmente il PGA e il PLA sono stati abbandonati perché troppo rigidi e non adatti alla crescita cellulare *in vitro* [8], e sono stati progressivamente sostituiti con materiali come il poliidrossialcanoato (PHA) e il poli-4-idrossibutirato (P4HB). Uno *scaffold* in PGA, non intrecciato, rivestito di P4HB rappresenta un materiale con ottima termo-plasticità e consente di modellarlo in complesse forme tridimensionali, come una valvola cardiaca a 3 lembi. Il PHA, infine, è un polimero termoplastico che deriva da un batterio. È un materiale flessibile ma richiede uno speciale processo di lisciviazione salina per ottenere una porosità accettabile per la semina cellulare [9].

Un vantaggio degli *scaffold* in materiale sintetico consiste nella possibilità di variare le caratteristiche di biodegradabilità e biorisorbibilità, modificare le proprietà meccaniche intervenendo sulla composizione chimica e sulla lavorazione. Ulteriore vantaggio è dato dal fatto che il materiale si presta facilmente alla funzionalizzazione con specifici segnali molecolari in grado di favorire i processi di adesione cellulare e di crescita cellulare [1].

Per contro le valvole cardiache con *scaffold* sintetici presentano lo svantaggio di indurre elevata trombogenicità, dovuta ai polimeri, scarsa adesione e rigenerazione cellulare ed inoltre danno molte problematiche nella realizzazione di strutture tridimensionali stabili, resistenti ed allo stesso tempo flessibili.

1.3.3.2 Valvole ingegnerizzate con supporto biologico

Le valvole cardiache ingegnerizzate a supporto biologico possono essere di origine valvolare o non valvolare; la loro realizzazione inizia scegliendo tra un supporto allogenico o eterogenico. Il supporto scelto, qualunque esso sia, viene sottoposto a un trattamento di fissazione con glutaraldeide o di vera e propria decellularizzazione, per rimuovere completamente qualsiasi traccia dell'organismo donatore. In questo modo rimarrà a disposizione la sola matrice extracellulare (ECM), che avrà delle ottime caratteristiche strutturali, presenterà specifici siti di adesione cellulare e conterrà al suo interno i fattori di crescita necessari a rendere l'ambiente ottimale per la ricellularizzazione. Purtroppo i trattamenti di fissazione con glutaraldeide e di decellularizzazione possono alterare alcune proprietà dello *scaffold*, come i fenomeni di calcificazione che compromettono la durata della protesi.

Lo *scaffold* di origine valvolare, una volta decellularizzato, può essere impiantato direttamente nel ricevente, oppure può essere utilizzato come supporto per la crescita preliminare *in vitro* (in bioreattore) di cellule autologhe, e poi impiantato in vivo. Si è dimostrata una certa difficoltà di penetrazione cellulare negli *scaffold* biologici così ottenuti, con conseguente crescita tessutale incompleta [10]. Attualmente sembra che la strada più promettente sia quella dell'impianto di *scaffold* riseminati e preconditionati *in vitro*, dato che gli impianti di valvole decellularizzate e non riseminate hanno dato forti risposte immunogeniche che hanno portato alla degenerazione dei tessuti e al decesso del paziente [11]. L'utilizzo del bioreattore è giustificato dal fatto che i risultati della semina cellulare restituiscono tessuti con maggiore stabilità meccanica, rispetto ai risultati ottenuti con l'approccio della cultura statica. Va ricordato comunque che i circa 48 giorni necessari a portare a termine il processo di ricostruzione della valvola costituiscono un periodo di attesa spesso troppo lungo rispetto alle esigenze cliniche.

Uno dei materiali biologici di origine non valvolare più utilizzati per la realizzazione di valvole cardiache è il pericardio umano decellularizzato. Esso, usato direttamente come *patch* chirurgico o come supporto per la risemina *in vitro* di cellule autologhe, garantisce una certa sicurezza inibendo l'intervento del sistema immunitario, dato che l'organismo lo riconosce come "self". Non avendo disponibilità di tale materiale, attualmente nel settore dell'ingegneria tessutale è molto più utilizzato il pericardio di origine bovina (eventualmente si può utilizzare anche il pericardio di origine porcina o ovina).

1.3.3.3 Valvole ingegnerizzate con supporto ibrido

Gli *scaffolds* ibridi si basano sull'idea di abbinare una componente biologica a una sintetica per la realizzazione delle valvole cardiache. In uno studio del 2004 [12], ad esempio, una valvola porcina decellularizzata è stata rivestita con un sottile strato di polimero biodegradabile, per migliorarne le caratteristiche meccaniche e biologiche. Come detto la rimozione cellulare dagli *scaffold* comporta un deperimento delle proprietà fisiche della struttura valvolare, lasciando esposte le fibre di collagene fortemente trombogeniche. L'utilizzo di valvole ibride matrice/polimero con caratteristiche meccaniche e biologiche migliorate può essere particolarmente vantaggioso.

E' stato dimostrato che il tessuto ibrido viene rapidamente assimilato dall'organismo una volta che sia stato impiantato. Inoltre il rivestimento polimerico attenua l'attività pro-coagulatoria delle componenti della matrice extracellulare. E' ancora materia di dibattito se

queste protesi debbano o meno essere seminate in vitro prima dell'impianto, ma molti studi a lungo termine sono necessari prima di poter pensare all'applicazione clinica sull'uomo [1].

1.4 L'adesione cellulare

Nella matrice extracellulare (ECM) sono presenti numerose "sequenze segnale" che "comunicano" con le cellule dei tessuti circostanti. Le proteine di adesione più importanti sono la fibronectina, la laminina, la tenascina, la vitronectina. Un ruolo fondamentale nel collegamento tra cellula e matrice extracellulare, e nella trasduzione del segnale dalla ECM alla cellula, è affidato alle **integrine**, delle glicoproteine di membrana che legano le proteine della ECM (principalmente le fibronectine). Le integrine sono eterodimeri contenenti due catene, le subunità α (*alpha*) e β (*beta*), che si sviluppano principalmente nella zona extracellulare, ma che sono legate alla cellula attraverso un piccolo tratto idrofobico immerso nella membrana cellulare che si conclude con due piccole code citoplasmatiche; le integrine individuate fino ad oggi sono 24.

Questi recettori di membrana riconoscono una particolare sequenza amminoacidica: la sequenza adesiva RGD (arginina-glicina-acido aspartico). Le superfici biomimetiche sfruttano quindi questo peptide-segnale per l'adesione cellulare; esso è presente nella fibronectina, nella laminina, nella vitronectina, nel collagene di tipo I, nel fibrinogeno, nella trombospodina, nell'osteopontina (OPN), nella tenascina, nell'entactina, nella sialoproteina dell'osso (BSP), in proteine di membrana, in proteine batteriche e virali [13].

Nella Figura 1.4 è possibile vedere la struttura della fibronectina nella quale è evidenziata la presenza della sequenza adesiva RGD.

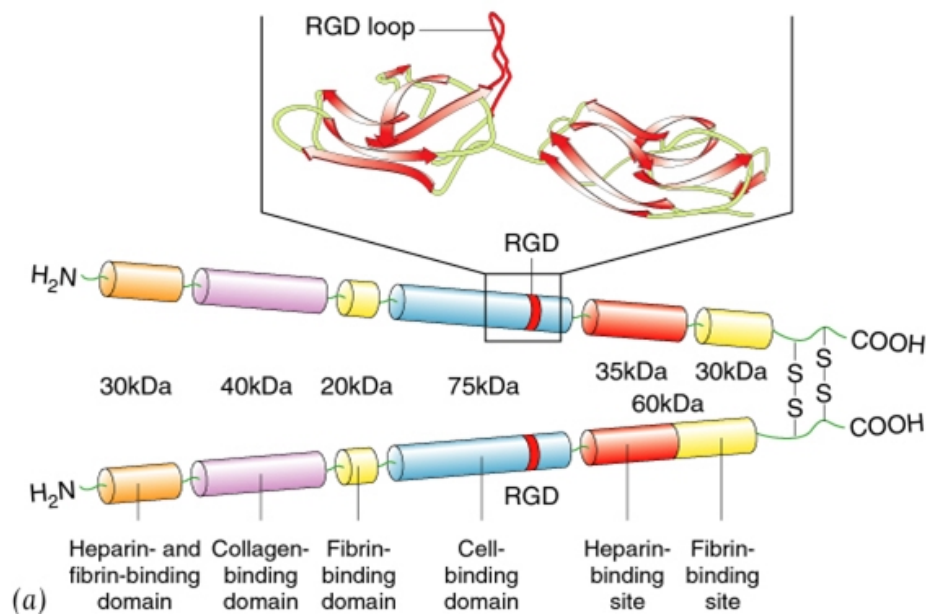


Figura 1.4. Struttura della fibronectina con ingrandimento del loop contenente il motivo RGD.

1.5 La sequenza adesiva RGD e il fattore di crescita IGF-1

La sequenza RGD, individuata nel 1984, è stata molto studiata negli ultimi anni per la sua elevata presenza all'interno dell'organismo, per la sua abilità nell'attivare più di un tipo di recettore di membrana cellulare (integrine) e per il ruolo fondamentale svolto nei meccanismi di adesione, comportamento e sopravvivenza cellulare.

I peptidi con motivo RGD determinano per le cellule ancoraggio-dipendenti sia l'adesione che il comportamento e la sopravvivenza cellulari.

L'attività del tripeptide è influenzata dal tipo di terminale o dalla presenza di amminoacidi che fiancheggiano la sequenza. L'attività varia come segue: GRGDSP > RGDS > RGD ammido-terminale > RGD carbossi-terminale (inattivo). In questo studio è stata utilizzata la sequenza (GRGDSP)₄K: un peptide lineare che presenta 4 sequenze segnale GRGDSP per catena. Tale molecola si è dimostrata particolarmente bioattiva nel promuovere l'adesione cellulare [14].

I fattori di crescita sono delle particolari proteine in grado di promuovere e stimolare la proliferazione e differenziazione cellulare. Esistono differenti tipologie di fattori di crescita ed

hanno funzionalità differenti, che possono coinvolgere più tipi cellulari, oppure essere specifiche.

Gli *insulin-like growth factor* (IGF), i fattori di crescita “insulino-simili”, sono un gruppo di ormoni peptidici dalle proprietà anaboliche, prodotti dal fegato sotto lo stimolo dell'ormone della crescita (GH) prodotto dall'ipofisi.

Le principali proteine che appartengono ai IGFs sono:

- IGF-1 (somatomedina C o SM-C) è presente a livelli massimi in pubertà e diminuisce con la vecchiaia. E' la principale proteina prodotta dell'ormone della crescita e stimola quindi la proliferazione cellulare.
- IGF-2 (somatomedina A o SM-A) è presente soprattutto a livello fetale, ed è solo parzialmente GH dipendente.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato l'IGF-1 per valutarne l'effetto di promozione della proliferazione nei confronti di cellule VIC bovine seminate su matrici di peptidi auto-assemblanti. L'IGF-1 è stato utilizzato per incrementare la proliferazione di cellule cardiache, coadiuvato da una matrice di peptidi auto-assemblanti [15].

Il meccanismo d'azione degli IGFs non è stato ancora del tutto chiarito. Attualmente nella ricerca nell'ambito dell'ingegneria tessutale applicata alle valvole cardiache, occupa un ruolo rilevante lo studio dell'attività che i fattori di crescita svolgono, sia *in vitro* che *in vivo*, una volta applicati direttamente sul tessuto oppure sullo *scaffold*. La ricerca sull'uso dei fattori di crescita nella funzionalizzazione dei biomateriali ha lo scopo principale di ottenere un considerevole miglioramento nelle prestazioni delle attuali protesi valvolari biologiche [1].

1.6 Peptidi auto-assemblanti

L'auto-assemblaggio (*self-assembly*) molecolare viene definito come la spontanea organizzazione di molecole in strutture ben definite e stabili, in condizioni di equilibrio termodinamico. Il fenomeno avviene grazie all'instaurarsi di numerose interazioni non covalenti come i legami a idrogeno e le forze di *Van der Waals*: prese singolarmente queste sono interazioni deboli, ma nell'insieme esse determinano strutture molto stabili.

Tra le molecole in grado di auto-assemblare, una classe particolarmente interessante, che ha aperto un nuovo orizzonte nel mondo degli *scaffold* per la crescita cellulare, è rappresentata dai peptidi auto-assemblanti scoperti da Zhang et al. (1993). I peptidi auto-assemblanti sono una particolare classe di biomolecole caratterizzate dalla capacità di organizzarsi in strutture ordinate 2D o 3D da utilizzare per promuovere le interazioni cellula-cellula multidimensionali ed incrementare la densità cellulare.

L'ampia gamma dei peptidi auto-assemblanti è stata suddivisa da Zhang [16] in cinque classi principali:

1. Tipo I, denominati anche “Lego molecolari”, formano degli idrogel che possono essere utilizzati nella creazione di *scaffold*;
2. Tipo II, ne fanno parte gli “interruttori molecolari”;
3. Tipo III, sono peptidi utilizzati nei trattamenti superficiali: gli “uncini molecolari” ed i “velcro molecolari”;
4. Tipo IV, gruppo a cui appartengono i nano tubi peptidici e le “capsule molecolari” per il trasporto di geni e proteine;
5. Tipo V, ovvero le “cavità molecolari” per la biomineralizzazione [17].

In questo lavoro di tesi vengono utilizzati peptidi di Tipo I, detti peptidi auto-assemblanti ionico-complementari. Questi particolari peptidi sono caratterizzati dall'alternanza di residui con carica positiva e residui con carica negativa, intervallati da residui idrofobici (ad esempio sequenze del tipo: AA carico positivamente / AA idrofobico / AA carico negativamente / AA idrofobico etc.).

I peptidi appartenenti a questa classe possono assumere, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo β -sheet; ogni piano di β -sheet presenta una faccia a carattere ionico con catene laterali cariche positivamente e negativamente ed una faccia idrofobica.

Grazie quindi ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico, numerosi piani di β -sheet possono assemblarsi in strutture tridimensionali (Figura 1.5) in forma di fibre, membrane e idrogeli all'aumentare della concentrazione o variando altri parametri fisico-chimici (Zhang et al., 1994; Schachner M., 2000).

Il processo di auto-assemblaggio dipende fortemente dalla sequenza peptidica, dalla concentrazione, dal pH, dalla presenza di sali e dal tempo.

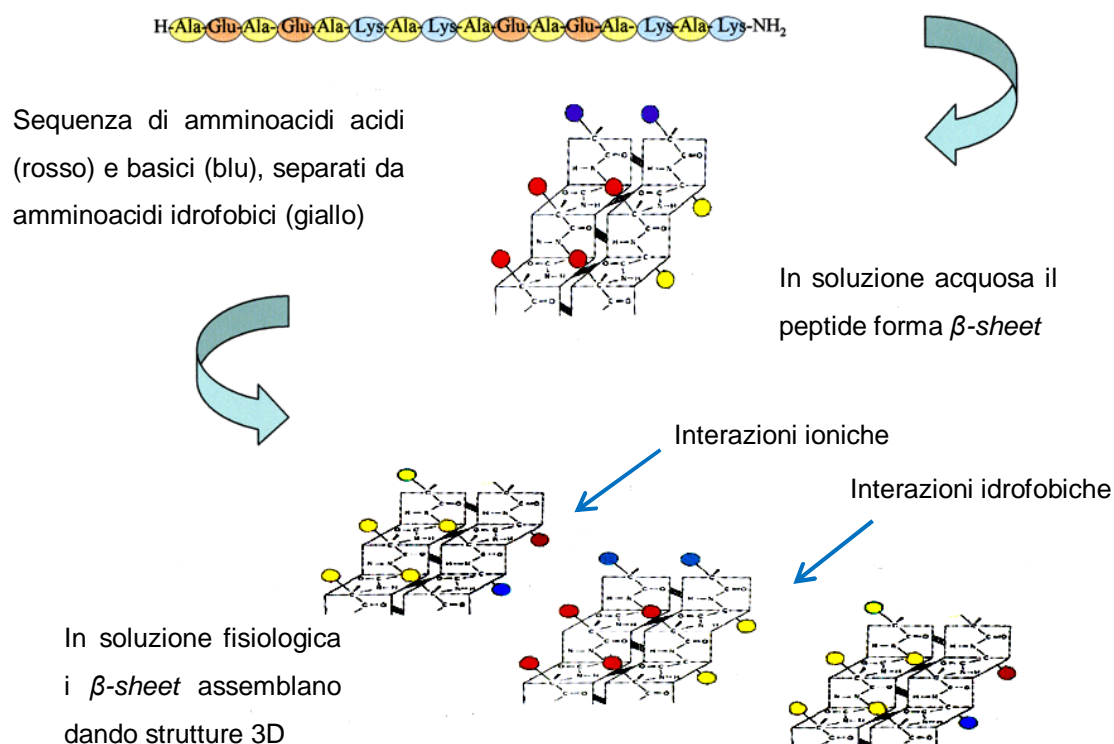


Figura 1.5. Modello proposto per l'auto-assemblaggio di peptidi ionico-complementari. In particolare si riporta la sequenza del peptide EAK con il caratteristico pattern dato dall'alternanza di residui carichi e idrofobici (Dettin, 2009).

Il primo membro di questa classe di peptidi, scoperto da Zhang et al. (1993), è il peptide EAK (AEAEAKAKAEAEAKAK) che si struttura in foglietti β che auto-assemblano in membrane, completamente atossiche, a seguito dell'aggiunta di sali in soluzione (più precisamente ioni monovalenti positivi). Il tipo di ione utilizzato sembra giocare un ruolo importante nell'indurre il processo di auto-assemblaggio: l'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. Le membrane, secondo il modello proposto, vengono a formarsi dall'accatastarsi di foglietti di strutture β -sheet: ciascun foglietto si lega al precedente, tramite ponti ionici tra i gruppi carichi delle catene laterali (residui di acido glutammico e di lisina), e al successivo, tramite interazioni idrofobiche tra le catene laterali dei residui di alanina.

Recentemente, una serie di peptidi auto-assemblanti ionico complementari sono stati progettati per studiare l'abilità di differenti residui amminoacidici di indurre le strutture β -sheet e conseguentemente di formare matrici tridimensionali in presenza di sali [18]. Le modifiche proposte non hanno riguardato nessun cambiamento nel *pattern* tipico dei peptidi

auto-assemblanti (alternanza di residui polari e apolari e periodicità dei residui carichi). La modifica del residuo idrofobico Ala→Abu mantiene la capacità del peptide di formare strutture β -sheet mentre la modifica Ala→Tyr permette la formazione in soluzione di strutture β -hairpin. Entrambi i peptidi auto-assemblano in matrici alla presenza di ioni monovalenti positivi. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il peptide EAbuK, in cui il residuo idrofobico Ala (A) è stato sostituito con acido α -amminobutirrico (Abu).

Peptidi auto-assemblanti hanno trovato applicazione (i) quali substrati per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi [19-20]; (ii) quali promotori di nanofibre iniettabili per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali [21]; (iii) come *scaffold* per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine [22]. I peptidi auto-assemblanti sono stati studiati come biomateriali potenzialmente utili nelle terapie di ripristino del tessuto osseo, in quanto forniscono risultati migliori del *Matrigel*TM nel promuovere la rigenerazione ossea su difetti cronici prodotti in topi [23]. Se per ovviare a piccoli difetti ossei, la consistenza degli *scaffold* di peptidi auto-assemblanti può risultare adeguata, questa è insufficiente per la rigenerazione di ossa sottoposte a carico e nel caso di difetti più consistenti.

1.7 “Chemoselective ligation” via ossima

La *chemoselective ligation* consiste in una reazione di coniugazione covalente tra due molecole biologiche in un mezzo acquoso ed in condizioni blande, senza l’uso di sostanze attivanti, ma per semplice reazione selettiva tra un gruppo presente nel peptide e un altro gruppo specifico localizzato in una proteina o in una altra sequenza peptidica. Poiché i peptidi sono deprotetti, è molto importante che i gruppi scelti presentino poca, o meglio, nessuna reattività nei confronti dei gruppi funzionali delle catene laterali, e siano quindi davvero in grado di reagire in modo specifico con il gruppo *target* [24].

Tali strategie storicamente sono nate per ottenere sequenze peptidiche maggiori di 50 residui, visto che la loro realizzazione risulta difficoltosa per sintesi chimica su fase solida [25,26].

Per la modifica di molecole biologiche, il gruppo ossiamminico è uno dei più utilizzati [26]. Il vantaggio di tale gruppo è quello di formare un’“ossima” molto stabile in mezzo acquoso [27], per reazione con aldeidi a pH 4÷5.5, ciò consente una buona selettività [24].

Affinché la reazione possa avvenire, è necessario modificare preventivamente il gruppo N-terminale della proteina o del peptide da coniugare.

Le reazioni di transaminazione hanno avuto particolare successo per la modifica selettiva dell'amminoacido N-terminale; Francis *et al* [28] hanno messo a punto una strategia che permette di modificare il terminale amminico di una proteina in un gruppo aldeidico o chetonico, attraverso una reazione con piridossal-5'-fosfato (PLP), la quale può avvenire in condizioni blande, in soluzione acquosa a pH 6.5 a 37°C.

La reazione procede con rese elevate nel caso in cui il residuo N-terminale sia Ala, Gly, Asp, Glu o Asn; la resa è invece molto bassa se il residuo N-terminale è Cys, Ser, His, Thr, Trp o Pro [28]. La transaminazione con PLP prevede la condensazione del gruppo amminico N-terminale della proteina con piridossal-5'-fosfato e la successiva idrolisi per formare piruvamide (Figura 1.6). Poi per reazione della proteina_{chetone/aldeide} con un'ossiammina si ha la formazione di un'ossima (Figura 1.7).

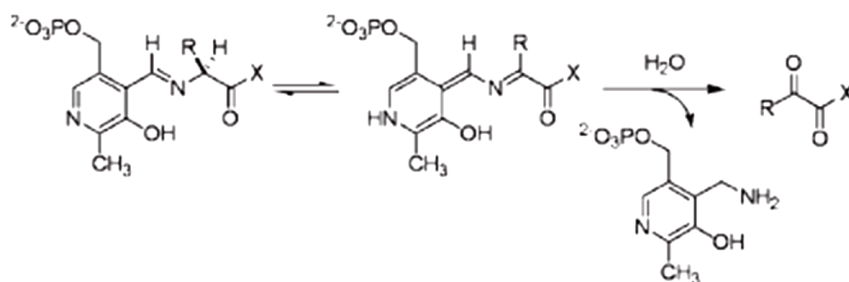


Figura 1.6. Reazione di formazione di piruvamide

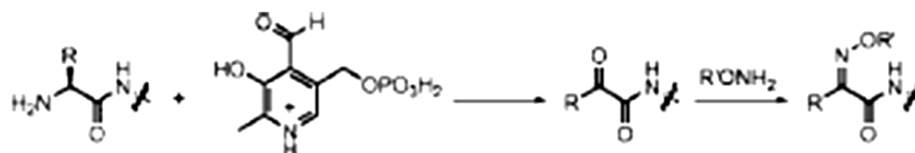


Figura 1.7. Schema della reazione di transaminazione N-terminale mediata da PLP con la successiva formazione dell'ossima.

In questo lavoro di tesi, la *chemoselective ligation* è stata utilizzata per coniugare il peptide auto-assemblante AoaEAbuK con il chetone ottenuto dalla sequenza adesiva (GRGDSP)₄K.

1.8 Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi rientra nel campo della ricerca di sostituti valvolari ingegnerizzati “*self-seeding*”. Il futuro della *tissue engineering* punta alla realizzazione di valvole cardiache in cui non sia richiesto alcun trattamento con glutaraldeide, evitando così problemi di calcificazione, e sulle quali venga incentivato il ripopolamento da parte delle cellule del ricevente. L’obiettivo è di ottenere sostituti valvolari che vantino una durata superiore ai dieci anni garantiti dalle valvole biologiche, e che possano svilupparsi con l’organismo del ricevente, soprattutto per i pazienti pediatrici. Al fine di incentivare la capacità *self-seeding* dei sostituti valvolari, in questa tesi è stata valutata l’efficacia di idrogeli di peptidi auto-assemblanti quali *filler* di pericardio bovino decellularizzato per favorire l’adesione e la proliferazione cellulare non solo superficiale ma interna allo *scaffold*. Durante questo lavoro di tesi sono stati condotti dei saggi di cultura cellulare per identificare le condizioni che consentano di ottimizzare la crescita e la proliferazione cellulare sugli idrogeli. Inizialmente si è verificato quale concentrazione peptidica sia maggiormente gradita alle cellule utilizzando idrogeli rispettivamente con densità 1%, 0.5%, 0.25% e 0.15% (w/v). Successivamente tali idrogeli sono stati arricchiti con tre differenti concentrazioni di un fattore adesivo o di un fattore di crescita. Come fattore adesivo si è proposto il coniugato via ossima tra il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e il peptide adesivo (GRGDSP)₄K. Tale coniugato permette infatti “l’ancoraggio” del peptide adesivo all’idrogel per *self-assembly* e consente una decorazione in 3-D, e non solo superficiale, dell’idrogel. Sono stati poi caratterizzati i substrati utilizzati per le semine cellulari mediante AFM e microscopia elettronica a scansione al fine di poterne conoscere meglio le caratteristiche fisiche.

Il lavoro di tesi è stato suddiviso nei seguenti punti:

- ✍ Sintesi peptidica (sequenza EAbuK, AoaEAbuK e (GRGDSP)₄K) successiva purificazione per ottenere il materiale necessario alla creazione degli idrogeli.
- ✍ Reazione di bioconiugazione tra il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e la sequenza adesiva (GRGDSP)₄K, con successiva purificazione e caratterizzazione.
- ✍ Caratterizzazione fisica e morfologica degli idrogeli di peptidi auto-assemblanti, a differenti livelli di concentrazione, mediante microscopia elettronica a scansione e microscopia a forza atomica.

- ✍ Valutazione dell'adesione e della proliferazione cellulare *in vitro* su *scaffolds* di peptidi auto-assemblanti.
- ✍ Confronto tra peptidi auto-assemblanti, peptidi auto-assemblanti arricchiti con la sequenza adesiva RGD e peptidi auto-assemblanti arricchiti con fattori di crescita IGF-I; analogie e differenze evidenziate nelle semine cellulari *in vitro*.
- ✍ Valutazione dell'effetto che la concentrazione di peptide negli idrogeli comporta nei confronti delle cellule utilizzate per la semina *in vitro*.

Capitolo 2

Materiali, strumenti e metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da Advanced Biotech Italia (Milano, Italia):

- HBTU;
- HOBt.

Reagenti forniti da Biosolve (Valkenswaard, Olanda):

- NMP;
- Piperidina;
- TFA;
- DCM.

Reagenti forniti da Carlo Erba (Milano, Italia):

- Sodio fosfato monobasico.

Reagenti forniti da Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, U.S.A.)

- Metanolo;
- Etanolo.

Reagenti forniti da Sigma-Aldrich (Steinheim-Germania):

- Acetonitrile;
- Acetone;
- Glutaraldeide;
- Lutidina;

- DMF;
- PLP;
- TES;
- PBS;
- P₂O₅;

Reagenti forniti da Applied Biosystems (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA):

- Anidride acetica;
- Reagenti utilizzati per effettuare il *test alla ninidrina* (o *Kaiser test*):
 - ✓ Monitor 1: soluzione al 76% (w/w) di Fenolo/Etanolo;
 - ✓ Monitor 2: soluzione 0.2 mM di KCN/Piridina;
 - ✓ Monitor 3: soluzione 0.28 M di Ninidrina/Etanolo.

Reagenti forniti da Ipsen Pharma (Boulogne-Billancourt, Francia):

- farmaco Increlex contenente IGF-1 (10 mg/mL).

Reagenti forniti da Novabiochem (Merck, Darmstadt, Germania):

- tutti gli amminoacidi protetti usati per la sintesi peptidica su fare solida;

2.1.2 Peptide sintetizzato per la realizzazione degli idrogeli

Per la realizzazione degli idrogeli oggetto di studio è stata necessaria la sintesi e la successiva purificazione di un peptide denominato EAbuK. Questo è un peptide appartenente alla classe dei peptidi auto-assemblanti di Tipo 1. Di seguito vengono riportati, oltre al nome, il valore del peso molecolare e la sequenza amminoacidica:

Nome: EAbuK (ammide terminale)

PM: 1728.01 Da

Sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH₂

2.1.3 Peptidi e proteine per “Chemoselective Ligation”

Al fine di incrementare e velocizzare il riconoscimento biologico tra cellule e *scaffold*, si è deciso di funzionalizzare gli idrogeli con la sequenza adesiva RGD. Per questo è stata

condotta una reazione di bioconiugazione tra il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e la sequenza adesiva (GRGDSP)₄K.

2.1.3.1 AoaEAbuK

Il peptide AoaEAbuK è stato sintetizzato. Appartiene alla classe di peptidi auto-assemblanti di Tipo 1 e presenta le seguenti caratteristiche:

PM: 1800.39 Da.

Sequenza:

NH₂-O-CH₂-CO-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH₂

2.1.3.2 (GRGDSP)₄K

Il seguente peptide, contenente la sequenza adesiva “RGD”, è stato sintetizzato e successivamente purificato. Presenta le seguenti caratteristiche:

PM: 2424.51 Da

Sequenza:

H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-NH₂

2.2 Strumenti

Per la sintesi e la caratterizzazione di tutti i materiali necessari all’ottenimento degli idrogeli sono state utilizzate diverse strumentazioni di laboratorio.

2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida

Per realizzare le sintesi peptidiche è stato utilizzato il sintetizzatore automatico prodotto dalla *MultiSynTech* (Witten, Germania) modello Syro I (Fig. 2.1).

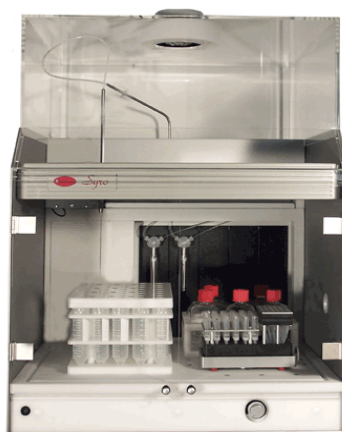


Figura 2.1. *Sintetizzatore Syro I (MultiSynTech).*

Tutte le sintesi eseguite in questo lavoro di tesi sono state eseguite su fase solida. Nella procedura di sblocco dei peptidi dalle resine è stato utilizzato un evaporatore rotante (Laborota 4100-Efficient, Heidolph Instruments s.r.l., Milano, Italia).

2.2.2 Test alla ninidrina e test alla piperidina

Per eseguire questi test è stato necessario l'utilizzo di uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 (Figura 2.2), modello fornito da Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA).



Figura 2.2. Spettrofotometro UV/Vis Lambda 2.

2.2.3 Cromatografia

Le fasi di purificazione peptidica post sintesi sono state effettuate mediante l'utilizzo di tre diversi sistemi cromatografici:

- HPLC Waters 600 Controller, accoppiato a rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. Il cromatogramma viene eseguito da un registratore fornito dalla Carlo Erba Strumentazione e prodotto dalla Kipp & Zonen (Delft, Olanda) modello BD40/BD41 Recorder.
- HPLC Waters 600E Controller, munito di auto campionatore 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. Il cromatogramma e l'integrazione dei dati sono stati sviluppati dal programma Empower (Waters, Milford, MA, USA).
- HPLC Waters 1525 Binary Pump, munito di auto campionatore 2707 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2498. Il

cromatogramma e l'integrazione dei dati sono stati sviluppati dal programma Empower Pro (Waters, Mildford, MA, USA).

Per eseguire le analisi cromatografiche sono stati utilizzati due diversi eluenti:

- Eluente A: 0.05% di TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile (CH₃CN).

L'acqua MilliQ utilizzata è stata distillata con il distillatore della ditta Bibby-Scientific (Staffordshire, UK) ed è stata de-salificata e privata di componenti organici mediante il sistema MilliQ della ditta Waters.

Per le analisi cromatografiche sono state utilizzate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata, con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), che presentano caratteristiche diverse:

- Delta Pak C18 semipreparativa (Waters), 15 µm, 100 Å, 7.8 x 300 mm;
- Nova Pak C 18 semipreparativa (Waters), 6 µm, 60 Å, 7.8 x 300 mm;
- Symmetry Shield C8 analitica (Waters), 5 µm, 100 Å, 4.6 x 250 mm.

Per la conservazione a lungo termine dei composti biologici ottenuti a seguito della purificazione mediante cromatografia è stato utilizzato un liofilizzatore (Lioph. Lock 4.5, Labconco, Kansas city, MO, USA).

2.2.4 Analisi di massa

Le analisi di massa effettuate presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Padova, in collaborazione con il Dott. D. Dalzoppo, sono state eseguite con uno strumento ESI-TOF, modello Mariner System 5220 dell'*Applied Biosystem* (Perkin-Elmer, Analytical Instruments, Norfolk, CT, USA).

Le analisi di massa eseguite dal Dott. G. Picariello dell'Istituto di Scienza dell'Alimentazione del CNR di Avellino sono state effettuate con uno strumento MALDI-TOF, modello Voyager DE-Pro (*PreSeptive Biosystems*, Framingham, MA, USA).

2.2.5 Microscopio elettronico a scansione

L'analisi e l'osservazione della struttura a nano fibre tipica degli idrogeli è stata condotta mediante osservazione con microscopio elettronico a scansione. I campioni sono stati seccati sfruttando il metodo "critical point" e successivamente metallizzati. Le osservazioni sono

state condotte con il microscopio elettronico a scansione modello JSM Jeol 6490 presso il C.U.G.A.S. (Centro universitario grandi apparecchiature scientifiche) dell'Università degli studi di Padova con la collaborazione del dott. Claudio Furlan. E' stato utilizzato anche il microscopio elettronico a scansione Leica Cambridge Stereoscan 440 presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale, settore Materiali, con la collaborazione dell'Ing. Katya Brunelli.

2.3 Metodi

2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida

Tutti i materiali biologici necessari alla realizzazione e alla funzionalizzazione degli idrogeli sono stati ottenuti mediante processi di sintesi peptidica su fase solida. Tale metodologia è stata messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield [28,29], ed è tutt'ora la via più vantaggiosa per ottenere peptidi su piccola/media scala. La tecnica "SPPS" ("*Solid Phase Peptide Synthesis*") è totalmente automatizzata mediante l'utilizzo del sintetizzatore Syro I. La complessità del processo è da attribuirsi alla natura polifunzionale degli amminoacidi che andranno a formare la catena peptidica. Il processo di sintesi prevede di ancorare l'estremità carbossilica del primo amminoacido, con il gruppo amminico protetto reversibilmente, a un supporto polimerico (resina) non solubile tramite un opportuno *linker*. Questo supporto insolubile rappresenta il più grande vantaggio di tale tecnica in quanto garantisce l'isolamento del peptide in crescita dal resto della soluzione di reazione mediante semplici filtrazioni.

I supporti consistono in resine a base polimerica come polistirene copolimerizzato all'1% con divinilbenzene o resine poliacrilammidiche. Questi materiali presentano la capacità di gonfiarsi in presenza di solventi polari non protici come N,N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM).

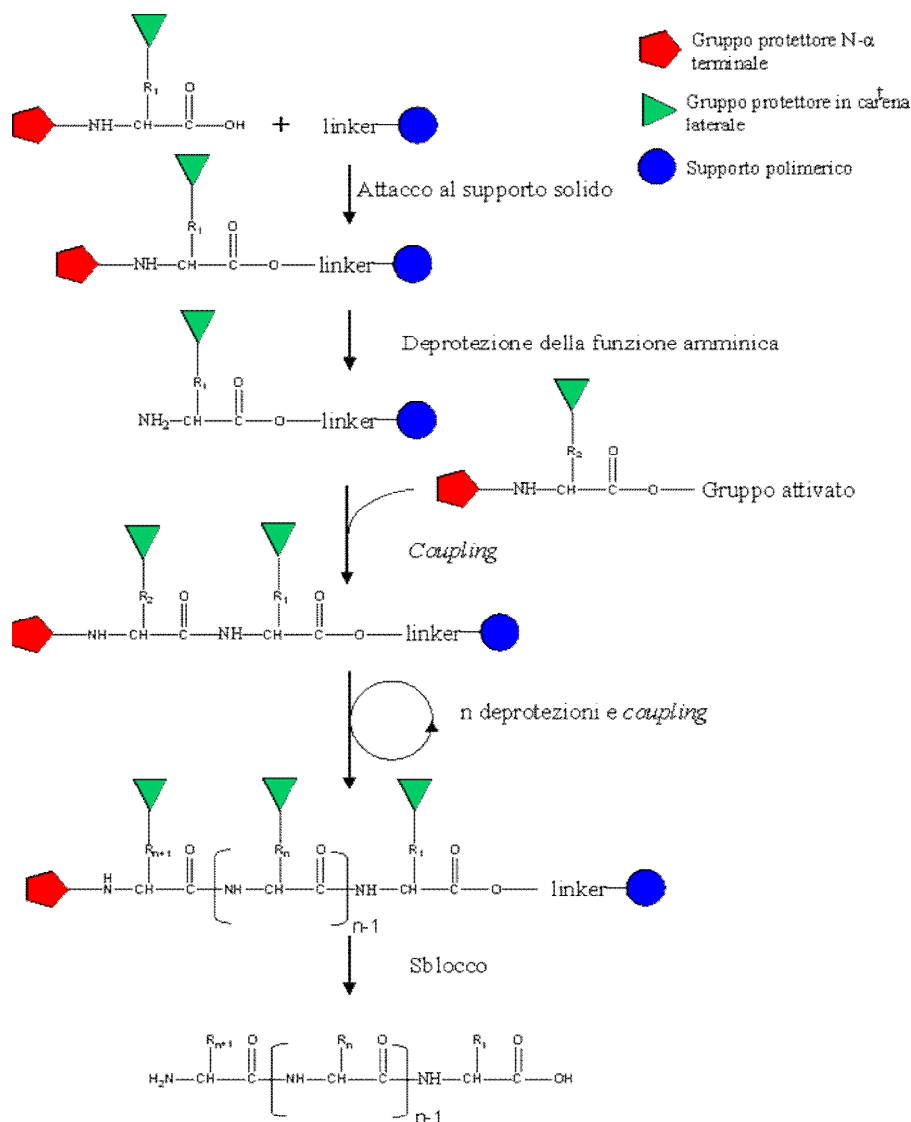


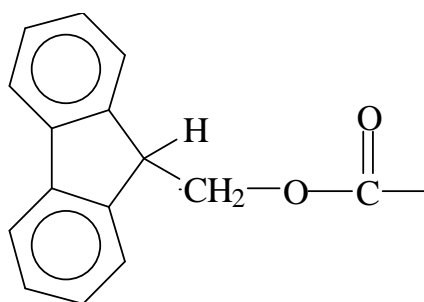
Figura 2.3. Schema generale della Sintesi Peptidica su Fase Solida (SPPS).

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate due diverse resine: per la sintesi del peptide EAbuK e per il AoaEAbuK è stata utilizzata la resina Rink Amide MBHA (100-200 mesh) con due diversi gradi di funzionalizzazione, 0.72 mmoli/g e 0.7 mmoli/g rispettivamente; per la sintesi della sequenza adesiva (GRGDSP)₄K è stata invece usata la resina Sieber Amide (100-200 mesh) con sostituzione 0.72 mmoli/g.

Una volta rimossa la protezione dal gruppo amminico dell'amminoacido legato alla resina avviene la condensazione con l'amminoacido successivo, il quale presenta il terminale carbossilico attivato e il gruppo amminico protetto. In questa maniera il di-peptide resta legato al supporto polimerico ed è possibile allontanare i prodotti secondari mediante i cicli di

lavaggio e filtrazione. Tutto il processo si ripete per ogni amminoacido che si intende legare al peptide in crescita fino all'ottenimento della sequenza proteica desiderata. In base al *linker* scelto per ancorare il peptide in crescita alla resina si può ottenere, in seguito allo sblocco (*cleavage*), un peptide acido, ammide terminale o caratterizzato dalla presenza di un particolare gruppo funzionale. Sono disponibili in commercio resine derivatizzate con un'ampia varietà di *linker* o già funzionalizzate con il primo amminoacido protetto al gruppo α -amminico e in catena laterale, resine acido labili per permettere lo sblocco del peptide dal supporto, preservando le protezioni in catena laterale, resine resistenti in condizioni di acidolisi che riducono la perdita del peptide ancorato, e molti altri supporti per soddisfare particolari esigenze chimiche. La sintesi della catena peptidica coinvolge una serie di cicli di reazione, che consistono in deprotezione e condensazione (*coupling*). Prima viene rimosso il gruppo protettore α -amminico del residuo amminoacidico legato al peptide in crescita; poi segue la reazione di condensazione tra il gruppo α -amminico e la funzione carbossilica attivata di un altro residuo, con la conseguente formazione di un nuovo legame peptidico. La procedura di sintesi peptidica su fase solida SPPS viene schematizzata in Figura 2.3.

I gruppi protettori delle catene laterali sono necessari in virtù del fatto che gli amminoacidi, oltre ai due gruppi funzionali terminali della catena principale, possono contenere in catena laterale gruppi reattivi, che potrebbero interferire con la formazione del legame peptidico voluto. Questi gruppi protettori devono però rimanere stabili nelle condizioni di deprotezione del gruppo protettore α -amminico della catena principale, altrimenti la loro funzione verrebbe meno; questa tipologia di protezione viene denominata "protezione ortogonale". Nella chimica Fmoc, a protezione del gruppo α -amminico dell'amminoacido, è utilizzato il gruppo base-labile Fmoc (9-fluorenilmetilossicarbonile) riportato in Figura 2.4 [30,31], che viene in genere rimosso con piperidina, e in catena laterale vengono utilizzati gruppi protettori acido-labili, rimossi generalmente con acido trifluoroacetico (TFA). Durante la sintesi di un peptide possono crearsi differenti sottoprodotti costituiti da sequenze incomplete; questo rappresenta uno dei limiti della SPPS poiché la purificazione da queste impurezze del prodotto desiderato risulta non sempre immediata, data la grande somiglianza. Per questo motivo si utilizza il test alla ninidrina (*"Kaiser test"*), che permette di monitorare la resa (considerata accettabile se superiore al 98%) delle reazioni di *coupling* durante la sintesi. In questo modo, se il test restituisce un risultato non soddisfacente, è possibile inserire nel programma di sintesi un ulteriore ciclo di *coupling* dello stesso amminoacido prima di passare alla sua deprotezione.



Fmoc

Figura 2.4. Struttura del gruppo protettore del terminale amminico denominato Fmoc.

Come alternativa è possibile bloccare tutti i gruppi amminici terminali che non hanno reagito attraverso una reazione di *capping* con anidride benzoica o acetica.

2.3.1.1 Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

Per la valutazione del grado di funzionalizzazione della resina, ossia l'attacco del primo amminoacido alle resina, si effettua una procedura chiamata "*Test alla piperidina*". Questo test permette di calcolare approssimativamente la resa di reazione mediante la quantificazione spettrofotometrica del prodotto N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che si forma a seguito dello sblocco del gruppo Fmoc dal peptide su resina. La procedura è di seguito descritta.

Un campione di 4-8 mg di resina funzionalizzata, seccato sotto vuoto per circa 1 ora, e accuratamente pesato, viene trattato con una soluzione al 20% di piperidina in DMF. La soluzione viene lasciata a contatto con la resina per 15 minuti e agitata manualmente. La deprotezione del gruppo amminico del residuo legato al supporto, genera l'N-(9-fluorenilmetil) piperidina che assorbe a 301 nm ($\epsilon=7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Dopo aver portato la miscela a un volume di 50 mL con DMF, si misura l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda sopraindicata.

La sostituzione, espressa in [mmoli/g] viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Sostituzione} = \frac{Abs_{301nm} \times Vol(ml)}{7800 \times wt(g)}$$

dove A_{301} è l'assorbanza a 301 nm, V è il volume della soluzione espresso in [mL], e wt indica la massa del campione di resina seccato espressa in grammi.

La resa della reazione si calcola quindi così:

$$\% \text{ RESA} = \frac{\text{Sostituzione sperimentale}}{\text{Sostituzione teorica}} \times 100$$

La sostituzione teorica è riportata sulla confezione o nel data-sheet della resina.

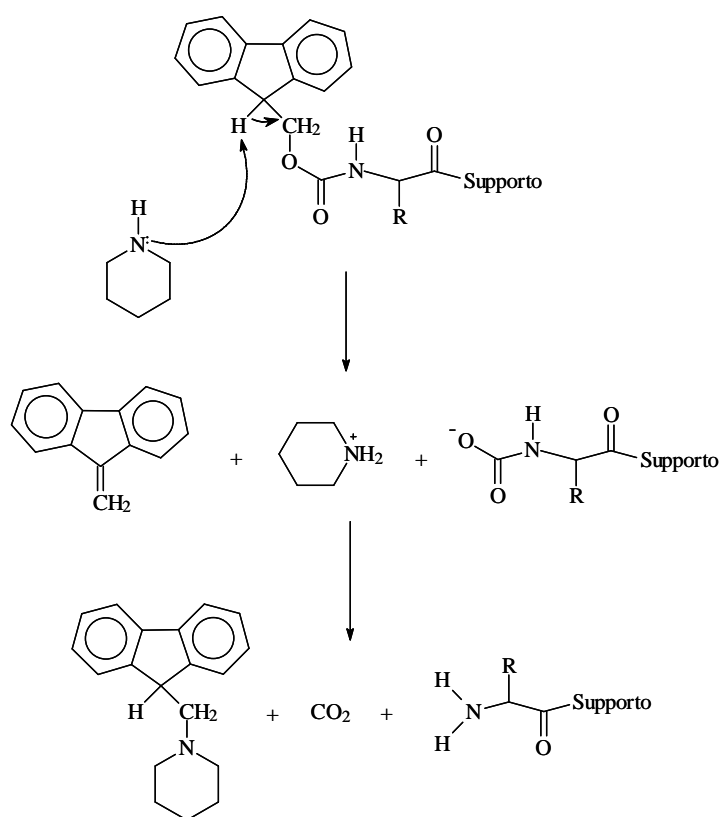


Figura 2.5. Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

2.3.1.2 Attivazione del gruppo carbossilico

La realizzazione delle reazioni di coniugazione amminoacidica coinvolge anche l'estremità carbossilica dell'amminoacido destinato a legarsi al peptide in crescita. Per rendere reattivo il gruppo carbossilico è necessario attivarlo, rendendolo più elettrofilo. Tra i possibili metodi di attivazione del gruppo carbossilico quello utilizzato maggiormente nelle operazioni di sintesi peptidica su fase solida è l'attivazione *in situ*. Questa tecnica prevede l'uso di un agente

attivante, il 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU), in presenza di N-idrossibenzotriazolo (HOBt) e di una base quale l'ammina terziaria N,N-diisopropiletilammina (DIPEA) [32, 33] (Figura 2.6).

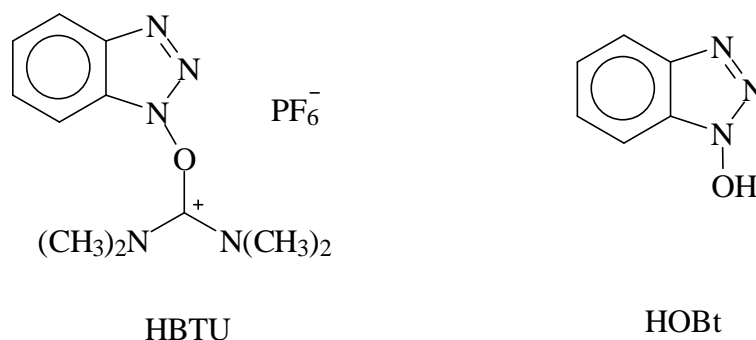


Figura 2.6. Strutture dei reagenti HBTU e HOBt.

La procedura automatizzata prevede l'utilizzo di 1 mL di una soluzione 0.5 M dello Fmoc-amminoacido da legare alla catena peptidica in crescita in DMF, di 1.2 mL di una soluzione 0.45 M di HUTU/HOBt in DMF (200 mL di una soluzione 0.5 M di HOBt cui si aggiungono 100 mmoli di HBTU) e di 0.5 mL di una soluzione di DIPEA in NMP per *coupling*. La maggior parte della reazioni di *coupling* può durare dai 20 minuti alle 2 ore. La procedura standard prevede l'inserimento di un residuo in 45 minuti, oppure in 90 minuti nel caso sia previsto un doppio *coupling*.

2.3.1.3 Test alla ninidrina

Per determinare la resa di *coupling* nelle reazioni di sintesi si utilizza il test alla ninidrina, o *Kaiser test*, il quale determina quantitativamente la presenza di gruppi amminici liberi. La procedura prevede la preparazione di due provette: una contenente la soluzione di riferimento e una la soluzione sulla quale effettuare la misura. Si esegue il prelievo di un campione di resina compreso tra i 2 e gli 8 mg, che deve essere lavato con 3 aliquote di metanolo, alla prima delle quali si aggiungono 2-3 gocce di acido acetico (per evitare un eventuale sblocco dello Fmoc). Il campione viene poi seccato sotto vuoto per circa un'ora e successivamente pesato in maniera accurata. Si procede poi seguendo il seguente protocollo:

- Si aggiungono in sequenza: 75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3;
- Riscaldamento della miscela a bagnomaria a 100°C e la si lascia a tale temperatura per circa 5 minuti;
- Si aggiungono poi 4.8 mL di soluzione di etanolo al 60%;
- Dopo aver centrifugato si misura l'assorbanza del liquido surnatante a 570 nm.

La quantità di funzioni amminiche libere è calcolata mediante la seguente formula:

$$\mu\text{moli/g di gruppi amminici} = \frac{[A \times V \times 10^{-6}]}{\varepsilon \times P}$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento a 570 nm (75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3 in 4.8 mL di soluzione di etanolo al 60%); V è il volume del campione espresso in mL; ε è il coefficiente di estinzione molare pari a $15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; P è il peso del campione espresso in mg.

La resa della reazione di *coupling* è data da:

$$\text{Resa}\% = \left\{ 1 - \left[\frac{\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1} \text{ di gruppi amminici}}{\text{sostituzione} (\text{mmoli} \cdot \text{g}^{-1})} \right] \cdot 10^{-3} \right\} \cdot 100$$

La reazione attraverso la quale si ottiene il cromoforo detto complesso di Ruhemann che assorbe nel visibile a 570 nm è riportata in Figura 2.7.

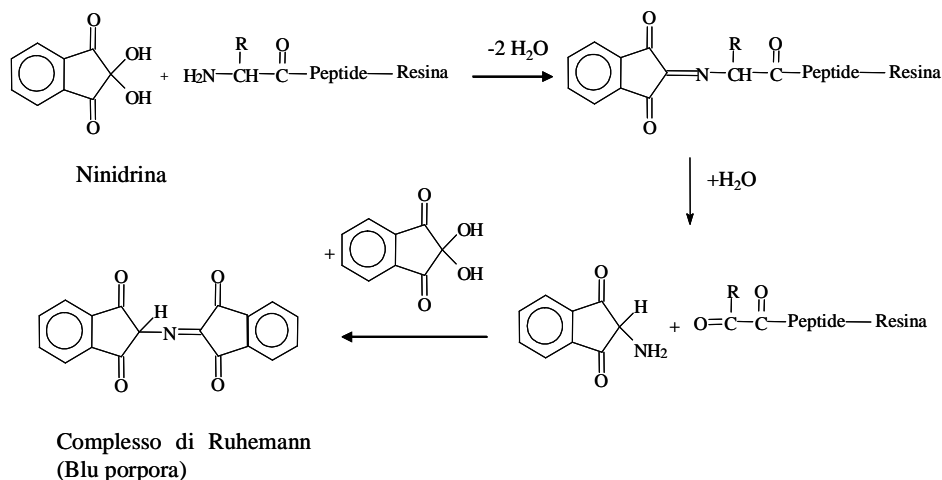


Figura 2.7. Reazione di ninidrina con il residuo N-terminale del peptide in crescita.

2.3.1.4 Sblocco del peptide dalla resina

Quando il peptide ottenuto dalla sintesi su fase solida viene trattato con la miscela di sblocco, si può ottenere la contemporanea liberazione delle catene laterali dai rispettivi gruppi protettori, oltre al distacco del peptide stesso alla resina. La deprotezione delle catene laterali genera però specie altamente reattive, come carbocationi, che possono provocare modificazioni covalenti di alcuni residui amminoacidici. L'utilizzo di reagenti nucleofili, noti come *scavengers* (reattivi che hanno proprietà chimiche simili a quelle delle specie da proteggere), assieme al TFA durante lo sblocco, riduce in modo rilevante le reazioni collaterali indesiderate e pericolose.

La miscela di *scavengers* varia a seconda degli amminoacidi presenti nella sequenza e in base alla tipologia di gruppi protettori usati nelle catene laterali. La scelta della miscela di sblocco e il tempo richiesto dipendono innanzitutto dal tipo di resina impiegata, e dalla natura e dal numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale.

Procedura generale di sblocco completo:

1. Al termine della sintesi si libera, con procedura automatizzata, la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc trattando il peptide protetto su resina con una soluzione 20% piperidina in DMF per 20 minuti;
2. il reattore con il peptide su resina viene lavato con DCM e messo a seccare sottovuoto per circa 2 ore (fino a peso costante);
3. il peptide su resina viene trasferito in un pallone e viene trattato con una soluzione 95% TFA, 2.5% H₂O MilliQ e 2.5% TES (v/v/v);
4. la miscela viene mantenuta sotto blanda agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per circa 1 ora e 30 minuti, tempo indicativo che può essere incrementato in funzione del numero e tipo di gruppi protettori presenti in catena laterale;
5. la resina viene separata per filtrazione su Gooch 3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a volume ridotto mediante evaporatore rotante;
6. si aggiunge poi etere dietilico freddo (~ 4°C), ciò porta alla precipitazione del peptide, che viene poi filtrato utilizzando Gooch 4, seccato, sciolto con H₂O MilliQ e infine liofilizzato.

2.3.2 Purificazione mediante caratterizzazione cromatografica

I peptidi realizzati mediante sintesi su fase solida, utilizzati nel seguente lavoro di tesi, sono stati purificati attraverso la tecnica cromatografica *Reverse Phase – High Performance Liquid*

Chromatography (RP-HPLC). Questa tecnica è nata come tecnica preparativa ma si è affermata poi anche come tecnica analitica, ed è adatta alla separazione di specie non volatili termicamente labili come i peptidi. Essa permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità che vengono a crearsi tra una "fase stazionaria", posta all'interno della colonna cromatografica, e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo detto di "ritenzione"), rispetto a una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

L'HPLC a fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, mentre per la fase mobile si possono utilizzare diverse miscele composte da soluzioni acquose e solventi organici. L'interazione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. Il campione da analizzare viene sciolto all'interno della fase mobile e viene fatto fluire in modo continuo attraverso la fase stazionaria immiscibile. I componenti maggiormente affini alla fase stazionaria vengono trattenuti e per questo motivo si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile. Gli elementi con minor affinità, invece, sono debolmente trattenuti e quindi si muovono più velocemente. L'analisi cromatografica può essere eseguita in modalità isocratica o a gradiente; nel secondo caso si imposta un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua, generando un aumento dell'idrofobicità della fase mobile. In questo modo si crea competizione tra la fase mobile e quella stazionaria provocando il rilascio dell'analita per una ben precisa concentrazione di solvente organico. In questo modo si può sfruttare la diversa mobilità dei componenti per dividerli in picchi discreti e possono così essere analizzati qualitativamente e quantitativamente.

I diversi metodi cromatografici vengono classificati in base al tipo di fase mobile e stazionaria; nella cromatografia liquida, che è stata utilizzata in questo lavoro di tesi, la fase mobile è costituita da un liquido mentre la fase stazionaria consiste in un altro liquido immiscibile adsorbito su particelle solide impaccate in una colonna. La fase stazionaria in altri casi può anche essere composta da un solido o da uno scambiatore anionico o cationico (cromatografia a scambio ionico). Le colonne cromatografiche, al fine di aumentarne l'efficienza, vengono riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli con diametro pari a 3-10 μm), e vengono fatte di lunghezza compresa tra i 10 e i 30 cm e aventi diametri interni che variano tra i 3.9 e gli 8.0 mm. In questo modo riesco a ottimizzare l'impaccamento della fase stazionaria, prestando attenzione a non sovraccaricare la colonna (*over loading*). Il forte

impaccamento comporta un rallentamento del flusso della fase mobile all'interno della colonna, rendendo necessario l'intervento di una pompa per evitare tempi di analisi troppo lunghi.

I peptidi tendono a separarsi meglio in ambiente acido e per questo motivo la maggior parte delle fasi mobili contengono piccole percentuali di TFA (in questa tesi è stata usata come fase mobile H₂O MilliQ addizionata con 0.05% di acido TFA e acetronitrile CH₃CN addizionato con 0.05% di acido TFA) il quale agisce da coppia ionica. L'effetto dell'acido è quello di aumentare la ritenzione e favorire la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanologici presenti nella fase stazionaria.

In Figura 2.8 viene riportato lo schema di funzionamento dell'analisi cromatografica.

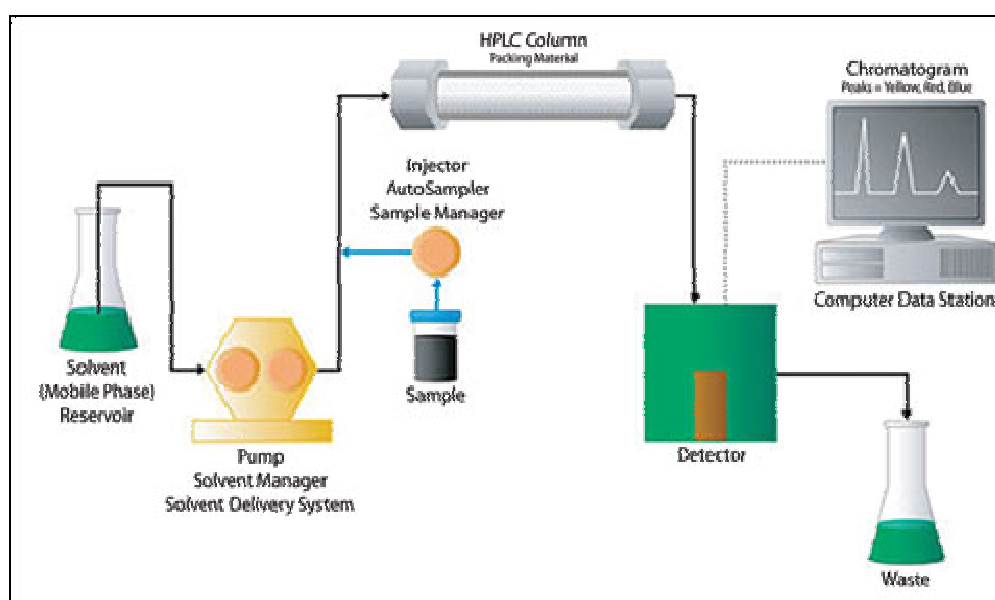


Figura 2.8. Schema generale di funzionamento di una HPLC.

Nel seguente lavoro di tesi sono state eseguite analisi cromatografiche semipreparative ed analitiche. Con le prime si effettuano i primi stadi delle purificazioni peptidiche. Mediante queste cromatografie sono stati isolati i componenti che presentavano tempi di ritenzione diversi, allontanando così i prodotti di reazione indesiderati. Le cromatografie analitiche permettono invece di caratterizzare i peptidi più nel dettaglio, fornendo anche il loro grado di purezza.

2.3.3 Spettroscopia UV/Vis

La radiazione UV/Vis riguarda un'ampia gamma dello spettro elettromagnetico tra i 700 nm e i 10 nm; gli intervalli di spettro maggiormente utilizzati a scopi analitici sono quelli del visibile tra 700-400 nm e l'ultravioletto (UV) vicino (400-200 nm).

Il principio che regola la spettroscopia UV/Vis è quello di eccitare con una radiazione gli elettroni presenti nei livelli energetici di una precisa molecola, promuovendoli negli orbitali molecolari a maggiore energia. Perché ciò si verifichi è necessario che la quantità di energia assorbita dall'elettrone sia almeno uguale alla differenza energetica tra i due orbitali.

In un classico spettrofotometro doppio raggio UV/Vis, una radiazione policromatica generata da una sorgente (lampada a idrogeno o a deuterio per UV, lampada a tungsteno per il visibile) viene inviata ad un monocromatore; questo dispositivo seleziona la lunghezza d'onda d'interesse e la invia contemporaneamente ad una cella (con pareti in quarzo, trasparente alla radiazione) contenente la soluzione con il campione e ad un'altra cella contenente il solvente. In questo modo, con l'acquisizione dei dati tramite un rivelatore ed un registratore computerizzato, si possono facilmente eliminare le bande di assorbimento del solvente, e registrare lo spettro della sostanza in esame. La legge che descrive i rapporti tra assorbanza misurata, concentrazione del campione e lunghezza del cammino ottico, è la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \times b \times c$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento, c è la concentrazione molare, b è il cammino ottico espresso in cm ed ε_{λ} ($M^{-1}cm^{-1}$) è il coefficiente di estinzione molare della sostanza a quella particolare lunghezza d'onda. A basse concentrazioni, per valori di assorbanza nel range 0.1-0.8, esiste una correlazione lineare tra le due grandezze, e l'equazione può essere descritta da una retta passante per l'origine in cui, per un percorso ottico di 1 cm, il coefficiente angolare corrisponde a ε . La scelta della lunghezza d'onda appropriata per effettuare le misure, viene fatta osservando lo spettro della sostanza. Per avere il massimo di sensibilità ci si deve posizionare a λ_{max} di assorbimento; tuttavia spesso vanno considerati anche altri aspetti:

- la lunghezza d'onda scelta deve essere in un intervallo in cui l'assorbanza non vari troppo rapidamente in funzione di λ ;

- se sono presenti altre sostanze o altri gruppi in grado di assorbire a λ_{\max} è preferibile scegliere una banda di assorbimento che sia riconducibile al solo composto in esame.

2.3.4 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttivo, che consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti incogniti, anche avendone a disposizione quantità estremamente esigue [34].

Il principio di base di questa tecnica si fonda sulla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Le molecole vengono ionizzate facendole impattare da un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così diventano instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Una volta creati gli ioni in fase gassosa questi possono essere separati, o nello spazio o nel tempo, in base al loro rapporto m/z (massa/carica). La spettrometria di massa richiede per il suo funzionamento un vuoto molto spinto, per impedire una perdita di ionizzazione dovuta a urti con i gas atmosferici; gli spettrometri sono costituiti essenzialmente da tre parti (Figura 2.9) :

1. una camera di ionizzazione o sorgente;
2. un analizzatore;
3. un rivelatore.

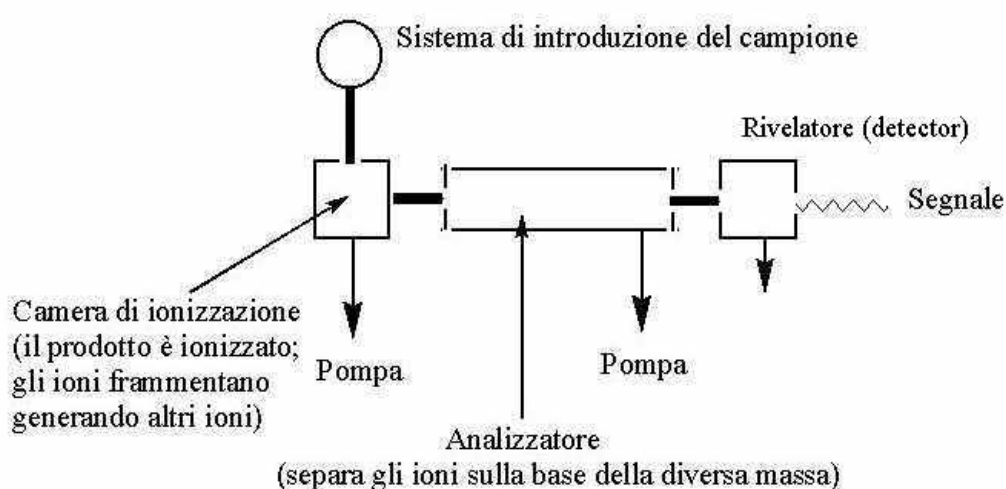


Figura 2.9. Schema di uno spettrometro di massa. Lo strumento è costituito dalle seguenti parti: a. sistema di introduzione del campione; b. camera di ionizzazione; c. analizzatore di ioni; d. detector; e. registratore.

Il campione da analizzare può essere introdotto nello strumento sotto diverse forme fisiche: i gas si trovano già nella forma fisica più corretta; i solidi e i liquidi devono essere prima vaporizzati; mentre nei casi di sostanze poco volatili si ricorre a derivatizzazione. Il campione può anche non presentarsi perfettamente puro. Per essere introdotto è necessario avere un'interfaccia per passare dalla pressione atmosferica al vuoto di circa 10^{-6} torr. In base alla tecnica di ionizzazione il campione viene ionizzato mediante impatto con elettroni, atomi, ioni o fotoni in un'apposita camera di ionizzazione. Alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (tecniche *hard*), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (tecniche *soft*). La tipologia di sorgente utilizzata distingue le varie tecniche di ionizzazione. L'analizzatore è quel settore dello spettrometro di massa in cui avviene la selezione degli ioni, formati nella camera di ionizzazione, sulla base del rapporto massa/carica (m/z). Gli analizzatori possono essere classificati in base al modo in cui effettuano la selezione ionica. Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato uno strumento ESI-TOF e uno strumento MALDI-TOF. Andiamo a vedere le caratteristiche base di queste due tipologie di spettrometri.

1. L'ESI-TOF è uno strumento che sfrutta una tecnica di ionizzazione chiamata *ElectroSpray Ionization* (ESI, Figura 2.10 a). Tale strumento ha due caratteristiche principali: la ionizzazione avviene a pressione atmosferica e sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla. Questa tecnica di ionizzazione utilizza un gas inerte (di solito azoto) per favorire il processo di nebulizzazione provocato da una forte differenza di potenziale applicata all'ago metallico dell'iniettore che genera goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). Questo processo avviene in soluzione (acquosa e organica) che viene poi nebulizzata in una camera termostata, ad 80°C in genere, in cui è applicato un campo elettrico. La nebulizzazione, comporta la formazione di piccole goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). Nella sorgente, il gas fluisce a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare anche composti termolabili. Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della crescente densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina "scoppia" creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore. Una caratteristica peculiare di questa

tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di specie multicarica.

2. La tecnica di ionizzazione MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) può essere considerata l'evoluzione della tecnica FAB (*Fast Atom Bombardment*): il campione è immerso in un largo eccesso di matrice e bombardato da un fascio laser invece che da un fascio di atomi accelerati. L'energia del laser è sufficiente per formare ioni quasi molecolari MH^+ ma si possono anche formare cluster analita-matrice protonati o addotti con eventuali cationi presenti nella matrice. La ionizzazione del campione avviene nel seguente modo: il laser colpisce le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano ad uno stato eccitato e provocano un veloce riscaldamento della regione interessata; si ha quindi l'espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice e una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra le molecole di analita e della matrice, Figura 2.10 b). L'analizzatore utilizzato è di tipo TOF (*Time of Flight* = a tempo di volo). Si basa sul principio che ioni di differente valore m/z hanno uguale energia cinetica ma differente velocità dopo l'accelerazione subita all'uscita della camera di ionizzazione: ne consegue che il tempo che ciascuno ione impiega ad attraversare l'analizzatore è differente. In pratica, gli ioni provenienti dalla sorgente vengono accelerati da un forte campo elettrico e percorrono l'analizzatore, che ha la forma di un tubo in cui è fatto un alto vuoto ed in cui sono assenti sia campi elettrici che magnetici, in base alla velocità dovuta alla loro energia cinetica. Questo analizzatore riesce a misurare valori di massa anche estremamente elevati ed ha un'alta sensibilità. La maggioranza dei rivelatori funziona ad impatto elettronico o per cattura ionica. Entrambi i tipi richiedono una superficie che raccolga gli ioni e dove la carica venga neutralizzata. Si realizza quindi un trasferimento di elettroni ed un flusso di corrente ($TIC = Total Ion Current$), che può essere amplificato ed infine convertito in un segnale registrabile su carta o processabile da un computer. La rielaborazione di tali segnali fornisce uno spettro di massa: una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di m/z mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto *picco base*, cui si assegna arbitrariamente il valore di 100. Il potere risolutivo ($PR = m/\Delta m$), o

risoluzione, dà una misura di quanto sensibile a differenze di massa è lo strumento utilizzato e dipende direttamente dalla massa del campione analizzato. La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici possiede diversi isotopi naturali di cui di solito il più leggero è anche il più abbondante: lo studio del *pattern* isotopico relativo ad un particolare ione, nel caso la risoluzione dello strumento sia sufficientemente elevata da mostrarlo e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale degli isotopi di ogni elemento presente, è un altro strumento possibile per risalire alla formula molecolare di un composto incognito.

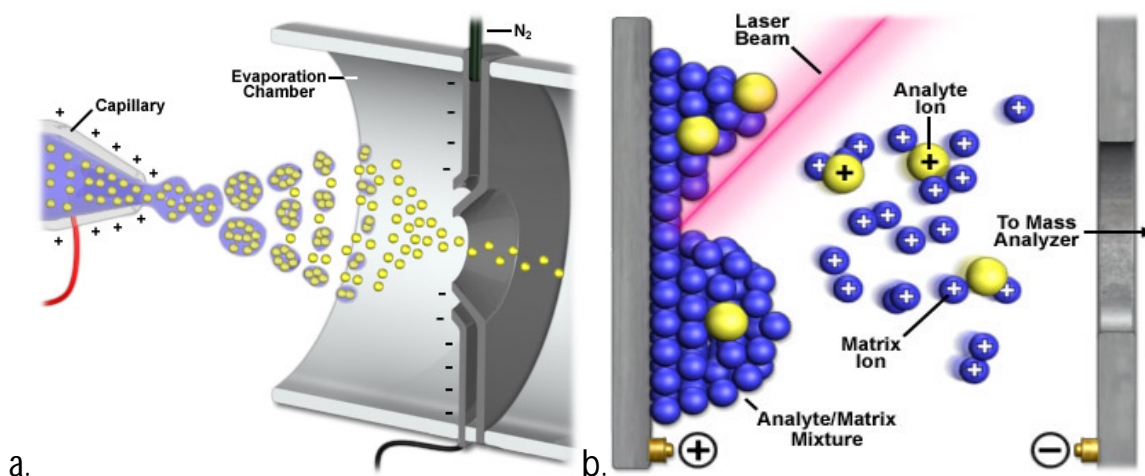


Figura 2.10. Rappresentazione schematizzata del processo di ionizzazione in una sorgente di tipo ESI (a) e di tipo MALDI (b).

2.3.5 Microscopia elettronica a scansione

Per effettuare la caratterizzazione morfologica degli idrogeli ottenuti dai peptidi auto-assemblanti è stata utilizzato il *Scanning electron microscope* (SEM, Figura 2.11). Tale strumento garantisce una buona risoluzione e una notevole profondità di fuoco e ciò permette di eseguire osservazioni ad alti ingrandimenti con sorprendente tridimensionalità delle topografie superficiali dei campioni. Le peculiarità di tale strumento sono quella di poter osservare superfici irregolari e i poter osservare campioni massivi senza la necessità di preparazioni troppo complicate.

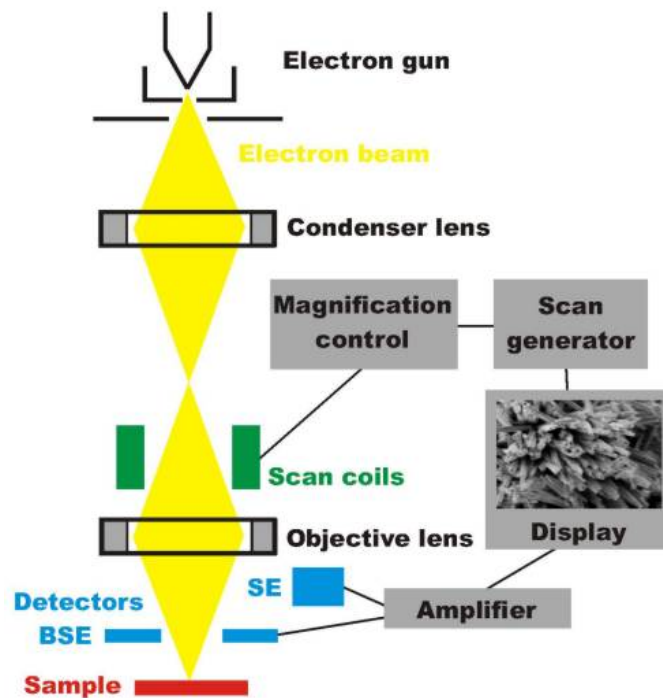


Figura 2.11. Schema di funzionamento di un microscopio elettronico a scansione (SEM).

Il principio di funzionamento di tale strumento consiste nel generare un fascio di elettroni da un filamento (generalmente in tungsteno W) per effetto termoionico. Tale fascio elettronico viene focalizzato in una colonna sotto vuoto (10^{-5} torr) mediante un sistema di lenti elettromagnetiche (due lenti condensatrici e una lente obiettivo) per ottenere un fascio finale di diametro molto piccolo (1-10 nm). Più piccola è la sezione del fascio e migliore è la risoluzione dell'immagine. Il fascio di elettroni focalizzati scandisce la superficie del campione per mezzo di due coppie di bobine di deflessione che lo fanno muovere secondo righe parallele successive, permettendogli quindi di esplorare delle piccole zone (quadrate o rettangolari). Un dispositivo di movimentazione permette di spostare il porta campioni così da poter scansionare zone diverse del campione in esame.

Il fascio incidente dà luogo, oltre a gli elettroni trasmessi, all'emissione di varie particelle: elettroni secondari, elettroni retrodiffusi, elettroni Auger, raggi x o emissione fotonica. La maggior parte degli elettroni della sonda subisce urti anelastici col campione; quelli che di essi fuoriescono dalla superficie del campione sono gli elettroni secondari e sono i più usati in queste tecniche di indagine microscopica. Essi energie molto basse e provengono da

profondità di pochi nanometri. La rivelazione degli elettroni secondari avviene utilizzando una gabbia di Faraday polarizzata positivamente rispetto al campione, la quale attira gli elettroni secondari che vengono poi accelerati verso un cristallo scintillatore ricoperto da un sottile strato di alluminio e mantenuto a circa +10 kV. Con l'energia così acquisita gli elettroni sono in grado di produrre fotoni ottici nello scintillatore i quali entrano in un fotomoltiplicatore che fornisce un segnale elettrico utilizzato per modulare l'intensità dello "spot" (la traccia del pennello elettronico) per produrre un contrasto sullo schermo. Il contrasto delle immagini a elettroni secondari dipende dall'efficienza di emissione la quale a sua volta dipende dall'angolo α che la superficie del campione forma con il fascio incidente.

2.3.6 Microscopia a forza atomica

Il microscopio a forza atomica (AFM, *Atomic Force Microscope*) è un potente microscopio a scansione di sonda. Esso è formato da un braccio flessibile (microleva, *cantilever*) che presenta un raggio di curvatura dell'ordine dei nanometri, alla cui estremità è presente una punta acuminata in materiale piezoelettrico (generalmente in nitruro di silicio). La punta dello strumento viene posizionata sulla frazione di superficie del campione che si vuole esplorare. La repulsione o l'attrazione tra la punta della microleva e gli atomi della superficie, dovute alle forze di Van der Waals, generano delle deflessioni del braccio (la cui costante elastica è nota) in accordo con la legge di elasticità di Hook.

Un raggio generato da un laser viene riflesso dalla sommità della microleva verso un foto detector sensibile alla posizione del raggio. In questo modo viene misurata e registrata ogni deflessione del braccio flessibile durante la scansione.

Le principali metodologie di funzionamento del microscopio a forza atomica sono:

- ✓ a contatto statico (*contact mode*);
- ✓ ad assenza di contatto dinamico (*non-contact mode*);
- ✓ a contatto dinamico (*dynamic mode*).

Nel funzionamento a contatto la forza agente tra la punta e la superficie è mantenuta costante durante la scansione, provocando una deflessione costante. Nella modalità ad assenza di contatto la microleva viene fatta oscillare dall'esterno ad una frequenza prossima o uguale a quella di risonanza; l'oscillazione viene modificata dalle forze d'interazione tra la punta e la

superficie del campione. Il rapporto tra queste oscillazioni e l'oscillazione esterna di riferimento forniscono informazioni riguardo alle caratteristiche del campione. In condizioni ambientali la maggior parte dei campioni sviluppa uno strato di menisco liquido; mantenere la punta della sonda abbastanza vicina al campione, in modo da poter rilevare le forze interatomiche a breve raggio ed evitare allo stesso tempo che la punta si blocchi sulla superficie, rappresenta un notevole ostacolo per la modalità dinamica ad assenza di contatto. Nella modalità a contatto dinamico la microleva viene fatta oscillare così che possa venire a contatto con il campione ad ogni ciclo e, successivamente, viene applicata la forza necessaria per staccare la punta dal campione.

Gli schemi per i funzionamenti ad assenza di contatto e a contatto dinamico includono la modulazione di frequenza e la modulazione di ampiezza. Nella modulazione di frequenza le variazioni della frequenza di oscillazione forniscono informazioni riguardo alle caratteristiche della superficie campione. Nella modulazione d'ampiezza (nota come contatto ad intermittenza o *tapping mode*) le variazioni nell'ampiezza di oscillazione producono informazioni topografiche della superficie campione. In aggiunta, le variazioni di fase delle oscillazioni nella modalità *tapping* possono essere usate per discriminare tra differenti tipologie di materiali sulla superficie.

Il campione in esame viene posto su un tubo piezoelettrico che può spostarlo in direzione perpendicolare (asse z) per mantenere una forza costante e nel piano (assi x e y) per analizzare la superficie in modo da restituire una mappatura della topografia superficiale del campione (piano x-y). Tale strumento è utilizzato, oltre che come metodo d'indagine, come mezzo di manipolazione della materia su scala nanometrica.

Capitolo 3

Parte sperimentale

Nel seguente capitolo verranno esposti i vari passaggi svolti per sintetizzare i materiali di studio della tesi, le procedure di purificazione e caratterizzazione dei materiali e verranno presentati i punti salienti delle fasi di applicazione degli idrogeli con le cellule.

3.1 Sintesi peptidica

3.1.1 Sintesi del peptide EAbuK

Il peptide auto-assemblante EAbuK è stato sintetizzato mediante il processo di sintesi su fase solida, utilizzando il sintetizzatore Syro I e sfruttando la chimica Fmoc. Come fase solida, sulla quale costruire la nostra sequenza peptidica, è stata usata la resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0.72 mmoli/g), della quale ne sono stati pesati, con bilancia analitica, 0.198 g (corrispondenti a 0.1432 mmoli) in un reattore e altri 0.202 g (corrispondenti a 0.1460 mmoli) in un secondo reattore.

Sequenza (PM: 1728.01 Da)

H-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Lys(Boc)-NH₂

Sono stati preparate le soluzioni 0.69 M dei seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Lys(Boc)-OH in DMF;
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH in DMF;
- Fmoc-Abu-OH in DMP.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- soluzione al 40% di piperidina in DMF;
- soluzione di DIPEA in NMP;

- soluzione di 0.45M HBTU/HOBt in DMF.

Sintesi:

La reazione di sintesi ha avuto inizio con 4 cicli di lavaggio della resina con DMF. E' stato impostato un doppio *coupling* dell'amminoacido Lys(Boc) per il *loading* della resina, terminato il quale si è eseguito il "Test alla piperidina" (per valutare il grado di funzionalizzazione della resina); sono stati poi impostati i restanti cicli di sintesi, che si distribuivano in quattro *coupling* singoli seguiti da undici *coupling* doppi. La rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita è stata condotta trattando il peptide con 1 mL della soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta dissolvendo 1 mL della soluzione con gli amminoacidi in 1.4 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF con l'aggiunta di 0.625 mL di DIPEA in NMP. Al termine della sintesi è stato impostato il ciclo di de-protezione dal gruppo Fmoc dell'ultimo amminoacido. A sintesi terminata i due reattori sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi con DCM e messi a seccare sotto vuoto per 1 ora: sono stati ottenuti 447.6 mg di peptide su resina dal primo reattore e 424.1 mg dal secondo.

Sblocco della resina:

Si è poi provveduto a sbloccare il peptide dalla resina, esponendo il contenuto di ciascun reattore di reazione alla seguente soluzione:

- 0.125 mL di H₂O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

Ogni reattore è stato poi lasciato reagire per 1 ora e 30 minuti, mantenendo la soluzione di reazione sotto blanda agitazione magnetica. Terminata la reazione si è filtrata via la resina e la soluzione contenente il peptide grezzo è stata concentrata a piccolo volume in rotavapor. Successivamente il prodotto è stato precipitato mediante aggiunta di etere etilico a 4°C. Il peptide è stato filtrato con un Gooch 4 e messo a seccare sotto vuoto per circa 1 ora.

3.1.2 Caratterizzazione del peptide EAbuK

Per caratterizzare il peptide grezzo è stata pesata una piccolissima frazione (circa 1-0.5 mg), sciolta in H₂O MilliQ in concentrazione 1 mg/1 mL e filtrata. La soluzione così ottenuta è stata sottoposta ad analisi RP-HPLC analitica, nelle seguenti condizioni:

- o Colonna: Symmetry Shield C₈;

- Iniezione da 60 μL ;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H_2O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN ;
- Gradiente: dal 12% di B al 22% di B in 20 minuti.

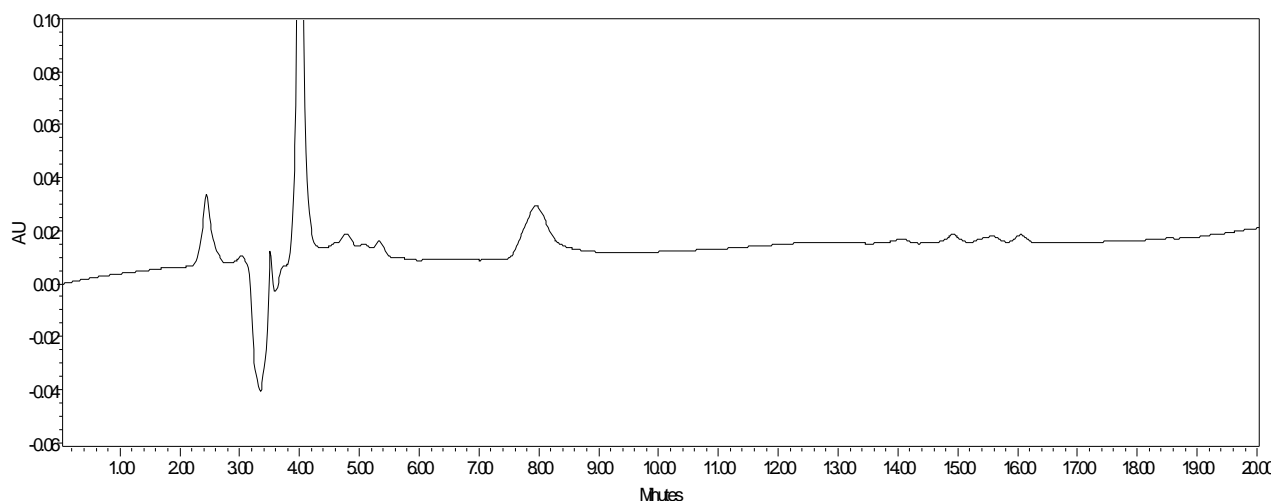


Figura 3.1. Cromatografia analitica del peptide EAbuK grezzo 1. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H_2O MilliQ; eluente B, 0.05% TFA in CH_3CN ; iniezione: 60 μL ; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min, lettura assorbanza a 214 nm.

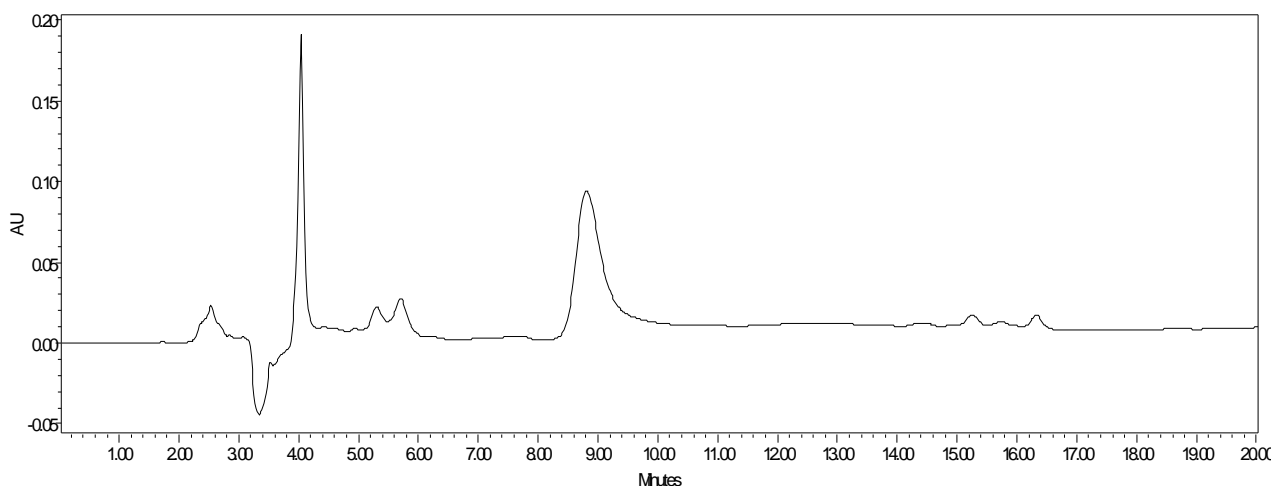


Figura 3.2. Cromatografia analitica del peptide EAbuK grezzo 2. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H_2O MilliQ; eluente B, 0.05% TFA in CH_3CN ; iniezione: 60 μL ; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min, lettura assorbanza a 214 nm.

Sono state condotte numerose analisi HPLC semipreparative del grezzo, in particolare 9 semipreparative del grezzo 1 e 7 semipreparative del grezzo 2.

Per tutte le analisi il peptide grezzo è stato sciolto in H₂O MilliQ e filtrato; poi sono stati iniettati circa 20 mg di peptide grezzo sciolti in 20 mL di eluente A per ogni analisi.

Tutte le cromatografie semipreparative sono state condotte nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Nova Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 10% di B in 2 minuti, quindi dal 10% di B al 50% di B in 40 minuti.

L'eluato è stato frazionato in differenti provette in base al tracciato cromatografico. Tali frazioni sono poi state sottoposte a cromatografia analitica per confermare la presenza del peptide desiderato, escludendo quindi prodotti secondari di sintesi. Le analisi analitiche sono state condotte alle seguenti condizioni operative per tutte le frazioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 100 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 12% di B al 22% di B in 20 minuti.

Si sono presentati dei picchi di assorbanza a tempi di ritenzione di circa 15 minuti, quindi molto diversi dal tempo di ritenzione del prodotto atteso (t_R : 8 minuti). Per verificare la natura della molecola si è deciso di effettuare una analisi di massa (ESI) di una frazione della terza semipreparativa eseguita sul grezzo 2 (Figura 3.4).

La seguente analisi ha confermato che anche il picco a 15 minuti è riconducibile al peptide desiderato ($PM_{\text{Sperimentale}}$: 1727 Da; PM_{Teorico} : 1728 Da).

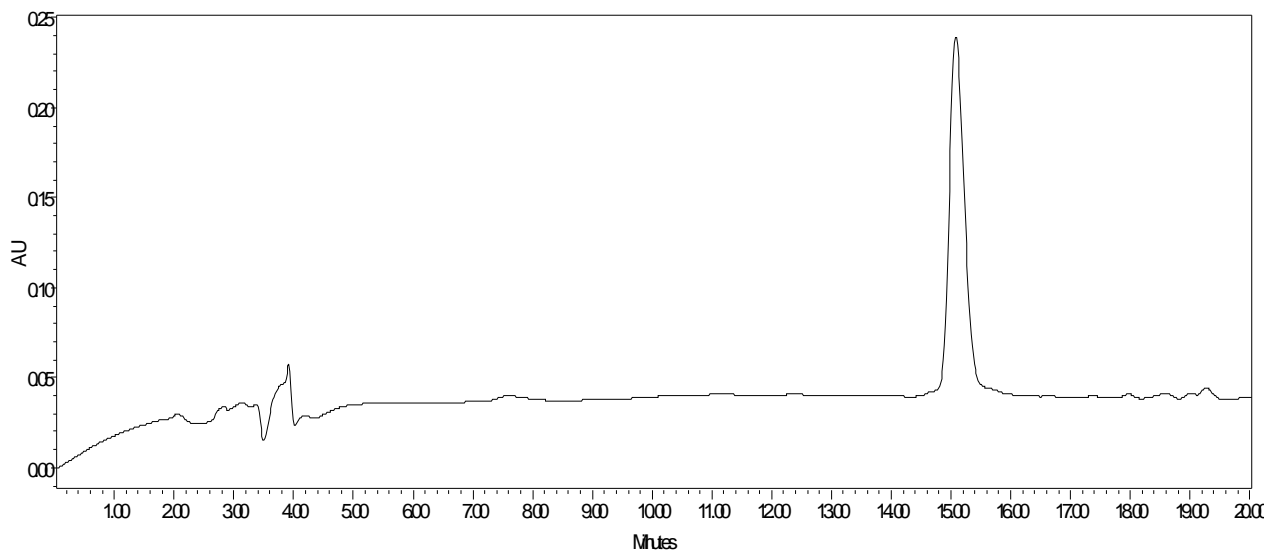


Figura 3.3. Cromatografia analitica del peptide EAbuK grezzo 2, SP3, frazione con picco a $t_R = 15$ minuti. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H_2O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH_3CN ; iniezione: 100 μ L; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

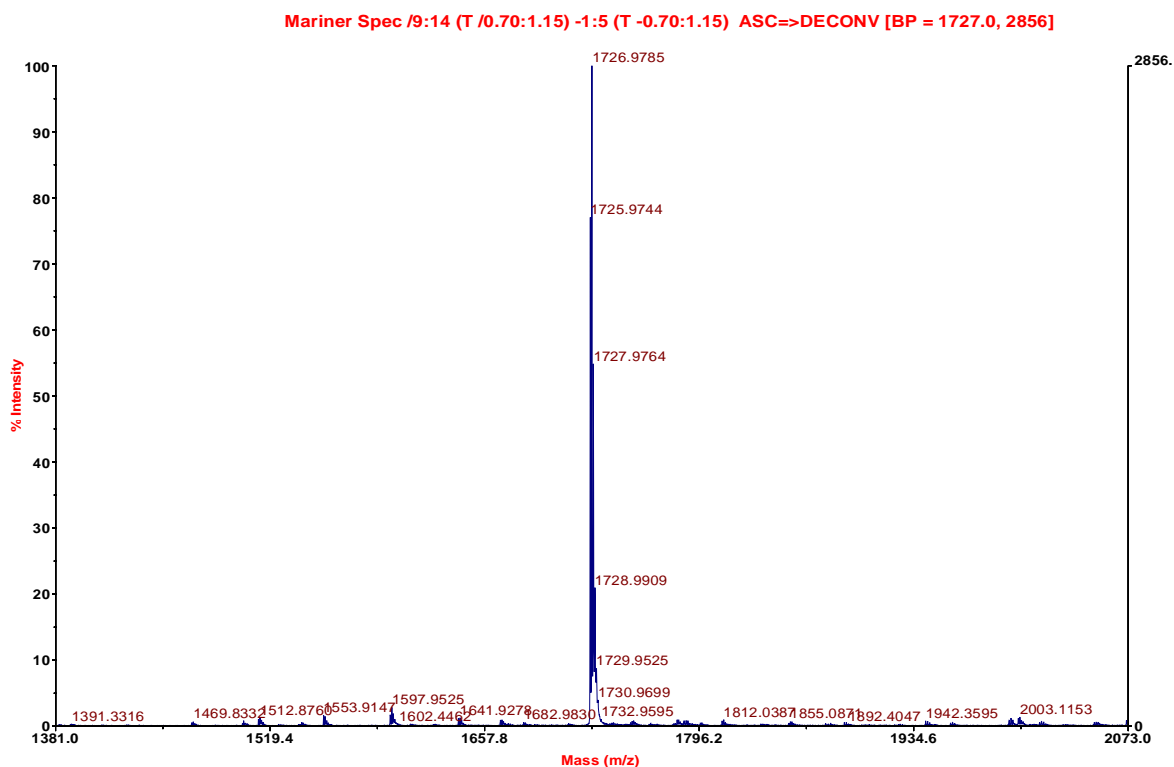


Figura 3.4. Spettro di massa (ESI) del peptide EAbuK grezzo 2, SP3, frazione con picco a $t_R = 15$ minuti.

Sono state condotte poi delle analisi di massa anche di altre frazioni delle semipreparative 2, 3, 4 del grezzo 2 per verificare la presenza del peptide EAbuK.

3.1.3 Sintesi del peptide AoaEAbuK

Il peptide auto-assemblante AoaEAbuK è stato anch'esso sintetizzato mediante il processo di sintesi su fase solida, utilizzando il sintetizzatore Syro I e sfruttando la chimica Fmoc. Come supporto solido si è utilizzata la resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0.70 mmoli/g), della quale sono stati pesati, con bilancia analitica, 178.3 mg (corrispondenti a 0.1248 mmoli) nel reattore n°1 e 177.1 mg (0.1239 mmoli) nel reattore n°2.

Sequenza

(PM: 1800.39 Da)

NH₂-O-CH₂-CO-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Lys(Boc)-NH₂

Sono state preparate le soluzioni 0.61 M dei seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Lys(Boc)-OH in DMF;
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH in DMF;
- Fmoc-Abu-OH in NMP;
- BisBoc-Aoa-OH in DMF.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- soluzione al 40% di piperidina in DMF;
- soluzione di DIPEA in NMP;
- soluzione di 0.45M HBTU/HOBt in DMF.

Sintesi:

La resina è stata inizialmente fatta rigonfiare mediante 3 lavaggi con DMF, è stato impostato un doppio *coupling*, dell'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH per il *loading* della resina, terminato il quale si è eseguito il "Test alla piperidina", necessario a valutare il grado di funzionalizzazione della resina; sono stati poi impostati i restanti cicli di sintesi che consistevano in 16 *coupling* doppi, formati da due *coupling* singoli, ciascuno di 45 minuti. La rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita, è stata condotta trattando il peptide con 1 mL della soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta aggiungendo 1 mL della soluzione con gli amminoacidi a 1.4 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF con l'aggiunta di 0.625 mL di DIPEA in NMP. Al termine della sintesi è stato impostato il ciclo di de-protezione dal gruppo Fmoc dell'ultimo amminoacido in

catena. A sintesi terminata i due reattori sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi con DCM e messi a seccare sotto vuoto per 1 ora: sono stati poi pesati 327.2 mg di peptide su resina dal reattore n°2, mentre il reattore n°1 è stato conservato in congelatore.

Test alla Ninidrina:

Al termine dell'ultimo *coupling*, prima della de-protezione dal gruppo Fmoc, è stato effettuato il test alla ninidrina sul reattore n°1 in quanto la soluzione di reazione aveva assunto una colorazione rossastra anomala e si è voluto quantificare i gruppi amminici liberi presenti. Sono stati fatti quindi 4 lavaggi del reattore con DCM ed è stato messo a seccare per circa un'ora. Ne sono poi stati pesati 3.97 mg ed è stato effettuato il test con la procedura riportata a paragrafo 2.2.1.3.

La percentuale di *coupling* è risultata del 97.6% e si considerano accettabili risultati uguali o superiori al 97%. La sintesi è quindi avvenuta in maniera corretta.

Reazione di Acetilazione:

Poiché il grado di funzionalizzazione della resina è risultato troppo basso (89%), subito dopo il test alla piperidina è stata eseguita una reazione di acetilazione; si sono voluti quindi bloccare tutti i siti reattivi dove non è avvenuto con successo l'aggancio del primo amminoacido della catena per evitare la formazione di prodotti secondari.

Per eseguire la reazione è stata preparata la seguente soluzione: 10% di anidride acetica e 5% di Lutidina in DMF; ne sono stati messi 5 mL in ogni reattore e lasciato reagire per circa 20 minuti sotto blanda agitazione magnetica. La soluzione è stata poi filtrata sottovuoto e sono stati fatti 5 lavaggi dei reattori con DMF.

3.1.4 Caratterizzazione del peptide grezzo AoaEAbuK

Al termine della sintesi, dopo aver pesato il peptide grezzo su resina, è stata impostata la procedura di sblocco; dei 327.2 mg presenti nel reattore n°2 sono stati pesati circa 96 mg e inseriti in un nuovo reattore. Si è così provveduto a sbloccare il peptide dalla resina, esponendo il peptide pesato alla seguente soluzione:

- 0.125 mL di H₂O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

Il reattore contenente la soluzione di sblocco è stato lasciato reagire per 1 ora e 30 minuti, mantenendo la soluzione di reazione sotto blanda agitazione magnetica. Terminata la reazione la resina è stata allontanata per filtrazione, il peptide grezzo in soluzione è stato portato a piccolo

volume in rotavapor e successivamente precipitato mediante aggiunta di etere etilico a 4°C. Il peptide è stato filtrato con un Gooch 4 e messo a seccare sotto vuoto per circa 1 ora. Sono stati ottenuti circa 25.11 mg di peptide grezzo.

0.58 mg di peptide grezzo sono stati sciolti in 0.58 mL di eluente A (0.05% di TFA in H₂O MilliQ) e filtrati. Questa soluzione è stata sottoposta ad HPLC analitico (Figura 3.5) e caratterizzata con analisi di massa (ESI); la cromatografia analitica è stata condotta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 200 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector da 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 50% di B in 50 minuti;

Durante l'analisi sono stati raccolti i picchi principali per eseguire un'analisi di massa. L'analisi di massa (ESI) del picco a tempo di ritenzione t_R : 22.5 minuti (Figura 3.5) è riportata in Figura 3.6.

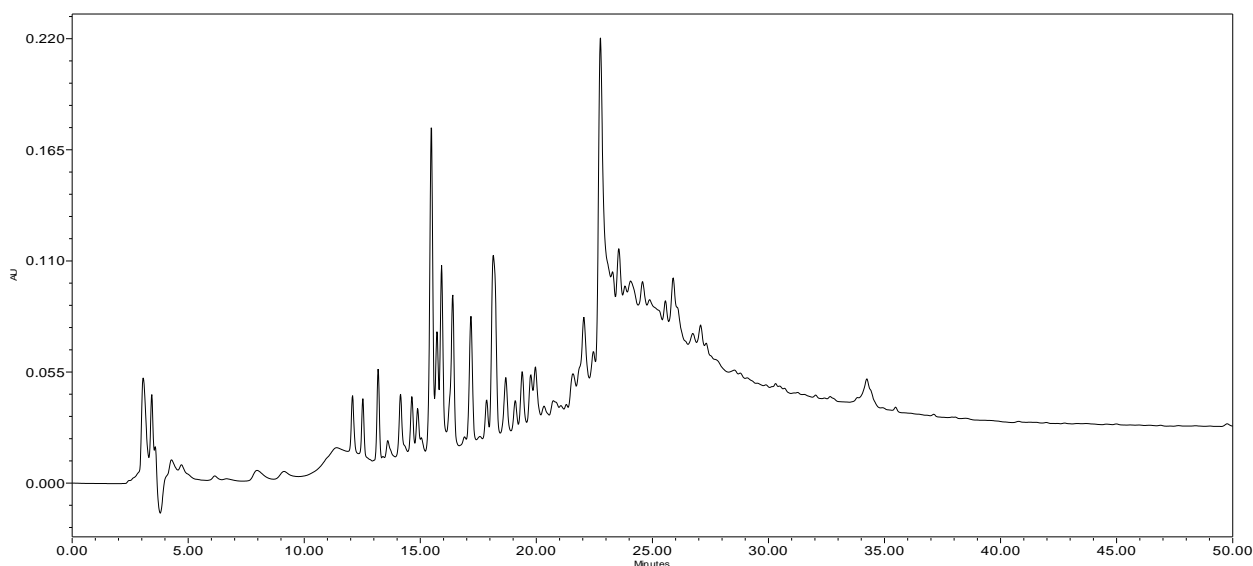


Figura 3.5. Cromatografia analitica del peptide AoaEAbuK grezzo. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; iniezione: 200 µL; gradiente dal 0% all'50% di eluente B in 50 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

- Fmoc-Arg(Pmc)-OH in DMF;
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH in DMF;
- Fmoc-Ser(tBu)-OH in DMF;
- Fmoc-Pro-OH in DMF;
- Fmoc-Lys(Boc)-OH in DMF.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- soluzione al 40% di piperidina in DMF;
- soluzione di DIPEA in NMP;
- soluzione di 0.45M HBTU/HOBt in DMF.

La reazione di sintesi ha avuto inizio con 4 cicli di lavaggio della resina con DMF. E' stato impostato un doppio *coupling* dell'amminoacido Lys(Boc) per il *loading* della resina, terminato il quale si è eseguito il "Test alla piperidina" (per valutare il grado di funzionalizzazione della resina); sono stati poi impostati i restanti cicli di sintesi che prevedevano tutti *coupling* doppi. La rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita è stata condotta trattando il peptide con 1 mL della soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta dissolvendo 1 mL della soluzione con gli amminoacidi in 1.4 mL di soluzione 0.45M HBTU/HOBt in DMF con l'aggiunta di 0.625 mL di DIPEA in NMP. Come ultimo passaggio della reazione di sintesi è stata impostata la de-protezione dal gruppo Fmoc dell'ultimo amminoacido. Una volta conclusasi la sintesi i due reattori sono stati lavati 4 volte con DCM e messi a seccare sotto vuoto per 1 ora: sono stati poi pesati dal reattore n°1 585.02 mg di peptide grezzo su resina, mentre il reattore n°2 è stato conservato in freezer.

Reazione di Acetilazione:

Il test alla piperidina, eseguito in seguito al doppio *coupling* del primo amminoacido sulla resina, ha dato un grado di funzionalizzazione del 95%; poiché generalmente si considerano positivi valori di funzionalizzazione superiori o uguali al 98%, si è deciso di eseguire una reazione di acetilazione. In questo modo si bloccano tutti i siti reattivi nei quali non è avvenuto con successo l'aggancio del primo amminoacido della mia catena peptidica, così da evitare la formazione di prodotti secondari di reazione indesiderati.

Per eseguire la reazione è stata preparata la seguente soluzione: 10% di anidride acetica e 5% di Lutidina in DMF; ne sono stati messi 5 mL in ogni reattore e lasciato reagire per circa 20 minuti

sotto blanda agitazione magnetica. La soluzione è stata poi filtrata sottovuoto e sono stati fatti 5 lavaggi dei reattori con DMF.

Sblocco della resina:

Si è provveduto poi a sbloccare il peptide dalla resina facendo reagire i 585.02 mg pesati dal reattore n°1 con la seguente miscela di reazione (addizionando le varie parti nel seguente ordine):

- 0.125 mL di H₂O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

La soluzione di reazione è stata lasciata nel reattore per circa 1 ora e 30 minuti, mantenendo il tutto sotto blanda agitazione magnetica. Terminata la reazione la resina è stata separata dal peptide grezzo in soluzione per filtrazione. La soluzione, concentrata in rotavapor, è stata addizionata di etere etilico a 4°C. Il peptide precipitato è stato filtrato con un Gooch 4 e messo a seccare sotto vuoto per circa 1 ora.

3.1.6 Caratterizzazione del peptide (GRGDSP)₄K

E' stato pesato il peptide grezzo dopo lo sblocco dalla resina, risultando circa 287 mg. Ne sono stati poi sciolti 0.64 mg in 0.64 mL di eluente A (0.05% di TFA in H₂O MilliQ) per eseguire un'analisi HPLC al fine di identificare la sequenza adesiva. L'analisi è stata condotta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 20 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 30% di B in 30 minuti.

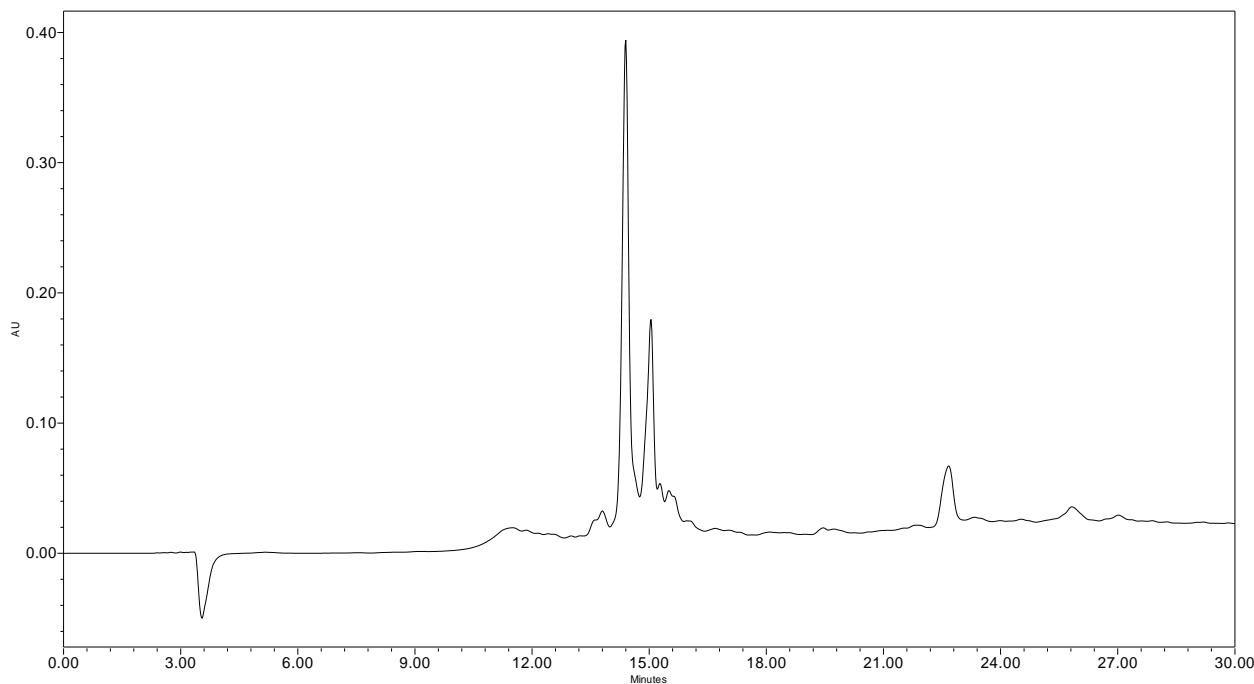


Figura 3.7. Cromatografia analitica del peptide $(GRGDSP)_4K$ grezzo. Colonna: Symmetry Shield C_8 ; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H_2O MilliQ; eluente B, 0.05% TFA in CH_3CN ; iniezione: 20 μL ; gradiente da 0% a 30% di eluente B in 30 min, lettura assorbanza a 214 nm.

In seguito all'identificazione del peptide tramite analisi HPLC analitica sono state condotte 9 analisi HPLC semipreparative del grezzo per ottenere un grado di purezza il più elevato possibile. Per tutte le analisi il peptide grezzo è stato sciolto in eluente A e poi filtrato; sono stati iniettati circa 30 mg di peptide, a concentrazione 1 mg/1 mL, per ciascuna analisi.

Tutte le cromatografie semipreparative sono state condotte nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Nova Pak C_{18} ;
- Flusso: 4 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H_2O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN ;
- Gradiente: da 0% di B al 4% di B in 2 minuti, quindi dal 4% di B al 12% di B in 32 minuti.

Di ciascuna semipreparativa sono stati raccolti i principali picchi in provette, separando così le frazioni che si presentavano a tempi di ritenzione diversi. Queste frazioni sono poi state sottoposte a cromatografia analitica per caratterizzarle, cercando di identificare la sequenza adesiva rispetto a eventuali prodotti secondari di sintesi. Le analisi sono state condotte alle seguenti condizioni operative:

- Colonna: Symmetry Shield C_8 ;

- Iniezione da 20 μL ;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H_2O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN ;
- Gradiente: dallo 0% di B al 25% di B in 25 minuti.

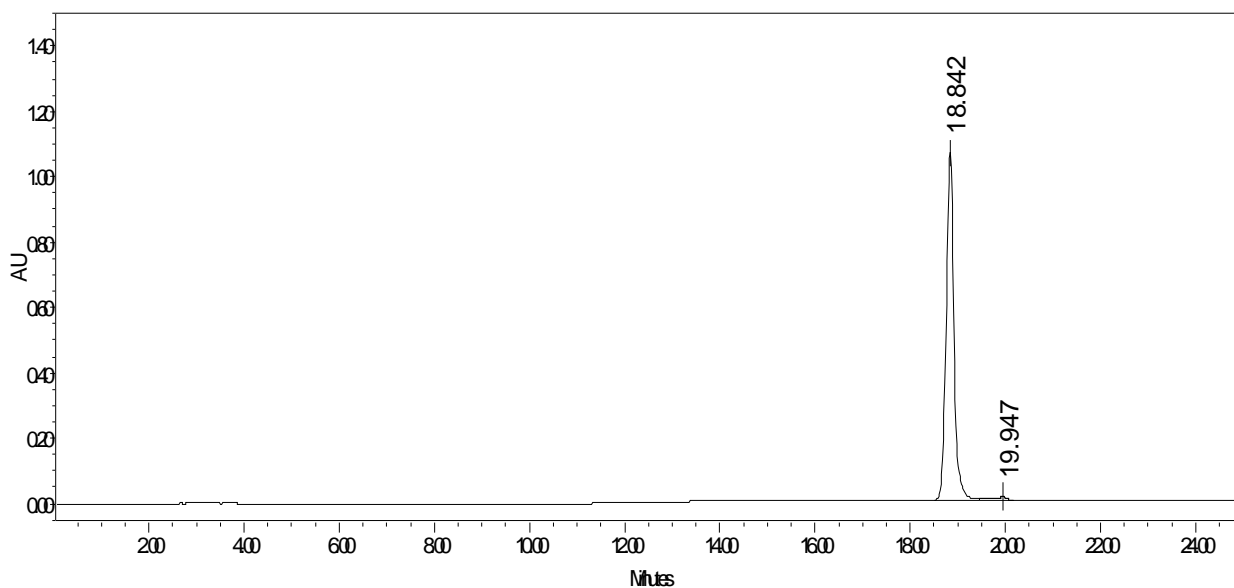


Figura 3.8. Cromatografia analitica del peptide $(\text{GRGDSP})_4\text{K}$, SP1, frazione 8 a $t_R = 15\text{-}17$ minuti. Colonna: Symmetry Shield C_8 ; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H_2O MilliQ; eluente B, 0.05% TFA in CH_3CN ; iniezione: 20 μL ; gradiente da 0% al 25% di eluente B in 25 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Si è poi eseguita un'analisi di massa (ESI) della frazione n°8 della prima semipreparativa (SP 1), frazione che eluiva a tempo di ritenzione compreso tra 15 minuti e 17 minuti a circa il 7.5% di eluente B, per confermare la presenza del prodotto di reazione desiderato.

La seguente analisi ha restituito un peso molecolare di $\text{PM} = 2423.19$ Da, molto vicino al peso molecolare teorico del peptide (Figura 3.9).

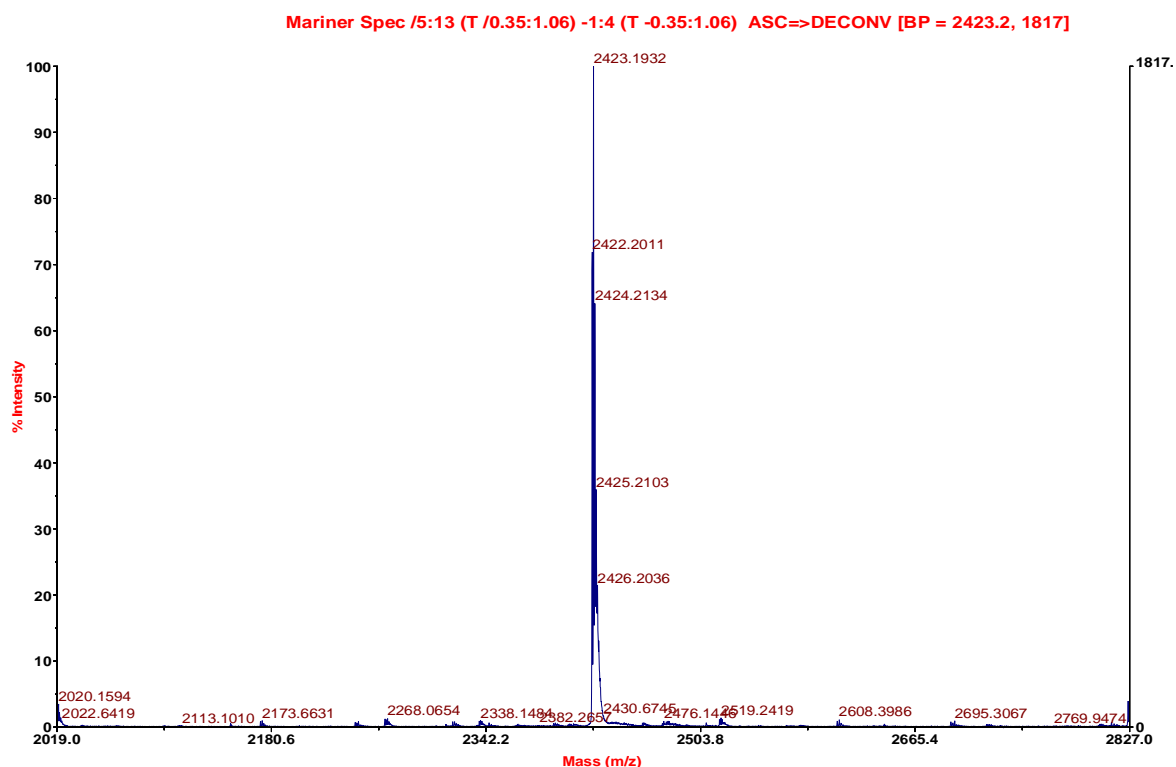


Figura 3.9. Spettro di massa (ESI) del peptide (GRGDSP)₄K, SPI, frazione 8.

Sono state poi raccolte assieme, dalle 9 semipreparative, tutte le frazioni che contenevano il peptide puro e le frazioni contenenti il peptide che presentava delle impurità, sono state liofilizzate e conservate in freezer. Il peptide (GRGDSP)₄K è stato ottenuto ad una purezza del 98%.

3.2 Chemoselective ligation

La Chemoselective ligation è una reazione di bioconiugazione mediante la quale si coniugano covalentemente due molecole biologiche all'interno di un mezzo acquoso in condizioni blande. Il legame tra le biomolecole avviene per reazione selettiva tra il gruppo ossiamminico presente nel peptide e un gruppo aldeidico o chetonico localizzato all'estremità N-terminale di una proteina, o di un altro peptide, ottenendo così un ossima.

In questo lavoro di tesi sono stati coniugati il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e il peptide (GRGDSP)₄K, contenente la sequenza adesiva RGD.

Per eseguire la bioconiugazione sono state impostare due reazioni principali:

- ✓ La reazione di transamminazione biomimetica, ossia la conversione del gruppo amminico N-terminale del peptide adesivo in gruppo α -cheto-aldeidico per reazione con piridossal-5-fosfato (PLP).
- ✓ Formazione del legame peptide-peptide per reazione selettiva del gruppo ossiamminico del peptide auto-assemblante e del gruppo chetonico N-terminale del peptide adesivo.

3.2.1 Coniugazione tra AoaEAbuK e (GRGDSP)₄K

3.2.1.1 Preparazione di (GRGDSP)₄K α -cheto-aldeide

È stata preparata una soluzione 10 mM di PLP in tampone fosfato di sodio 25 mM a pH 6.5. Sono state fatte reagire 2.06×10^{-4} moli (51,7 mg) di PLP con 1.031×10^{-5} moli (25,1 mg) di (GRGDSP)₄K (rapporto molare 20:1) in volume tampone fosfato di sodio 25 mM a pH 6.5; in un beaker sono stati sciolti 51.7 mg di PLP in circa 20.91 mL di tampone sodio fosfato 25 mM per ottenere una soluzione di reazione a concentrazione di PLP 10 mM.

Una volta sciolto il PLP, sono stati introdotti nella soluzione 25.1 mg di (GRGDSP)₄K precedentemente pesati. Il tempo di reazione è stato di circa 18 ore, lasciando la soluzione ad una temperatura di 37 °C. (Figura 3.10).

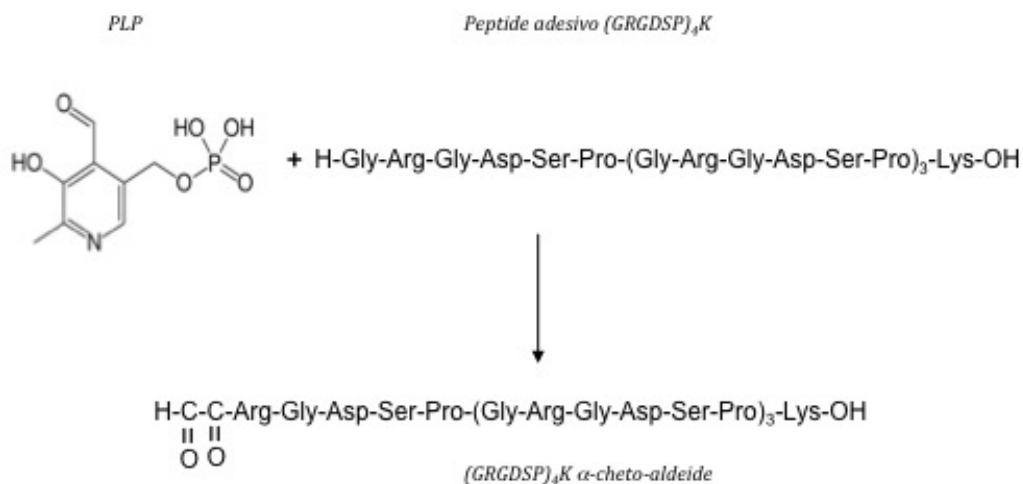


Figura 3.10. Reazione tra il PLP e il peptide (GRGDSP)₄K per formare il (GRGDSP)₄K α -cheto-aldeide.

Sono stati subito prelevati 40 μ L della soluzione di reazione per eseguire una cromatografia analitica a tempo zero ($t=0$ minuti). L'analisi è stata condotta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 40 μ L;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 25% di B in 25 minuti.

Trascorse 3 ore dall'inizio della reazione è stata condotta una seconda cromatografia analitica per monitorare lo stadio della reazione. L'analisi è stata eseguita nelle medesime condizioni utilizzate per l'analitica a $t = 0$ minuti. La stessa operazione si è ripetuta anche a termine reazione ($t=18$ ore). In Figura 3.11 sono riportati i profili delle analitiche della soluzione di reazione condotte a $t=0$ minuti e $t=18$ ore.

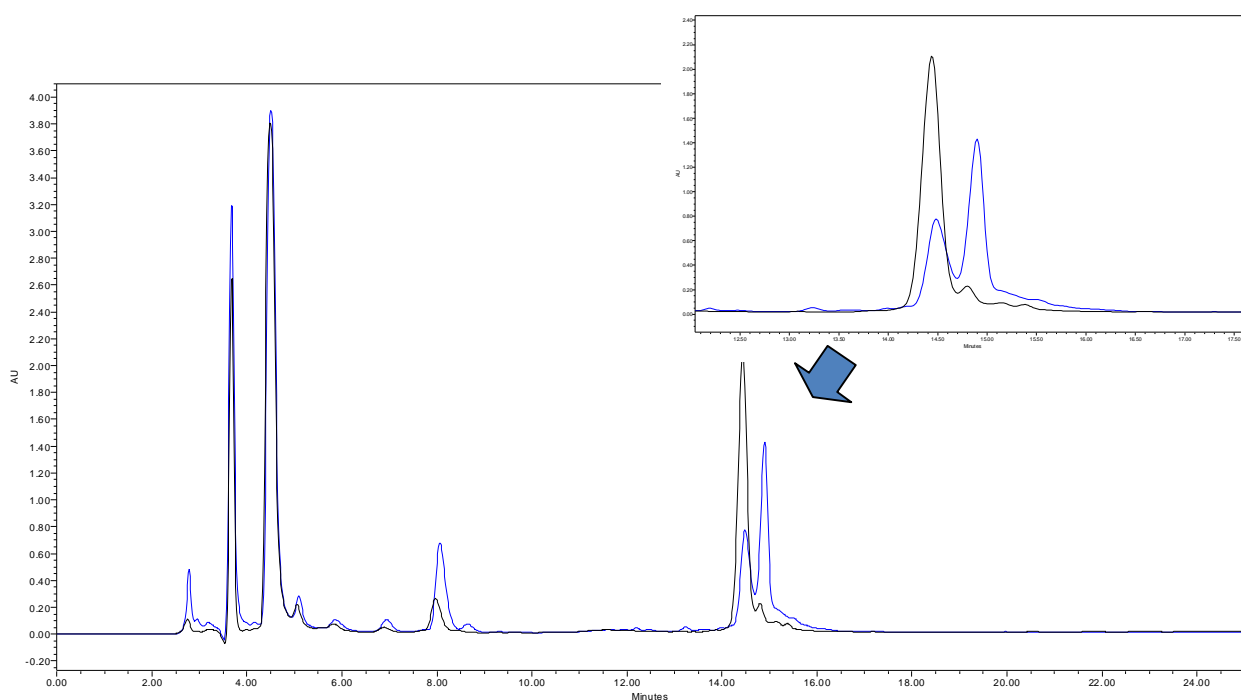


Figura 3.11. Cromatografie analitiche a $t = 0$ (curva nera) e $t = 18$ h (curva blu) della soluzione (GRGDSP)₄K-PLP.

Terminata la reazione la soluzione è stata filtrata in un beaker, iniettata in una colonna semipreparativa (Figura 3.12) e sono state eseguite due corse cromatografiche, iniettando circa 13 mL di soluzione alla volta. Le analisi sono state effettuate nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Delta Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Detector a 214 nm;

- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Velocità carta: 1 cm in 2 minuti;
- Gradiente: da 0% di B al 13% di B in 52 minuti.

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

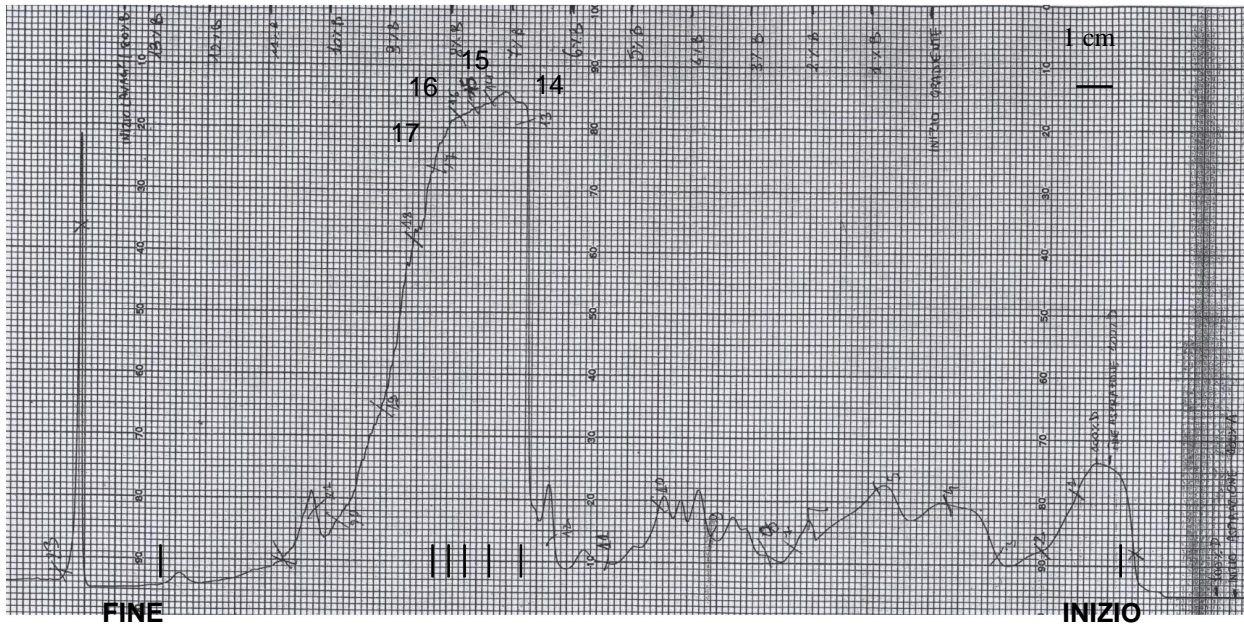


Figura 3.12. Cromatografia semipreparativa SP1 in RP-HPLC della soluzione di reazione (GRGDSP)₄K-PLP per isolare il (GRGDSP)₄K α -cheto-aldeide. Colonna Delta-Pak C₁₈; eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN; flusso: 4 mL/min; ABS: 4.00; λ : 214 nm; gradiente: da 0% a 13% di B in 52 minuti; velocità carta: 1 cm in 2 minuti.

Sono state poi eseguite le cromatografie analitiche delle frazioni raccolte dalla prima semipreparativa (SP1) e dalla seconda (SP2). Le corse sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 20 μ L per le frazioni della SP1 e da 40 μ L per le frazioni della SP2;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 25% di B in 25 minuti.

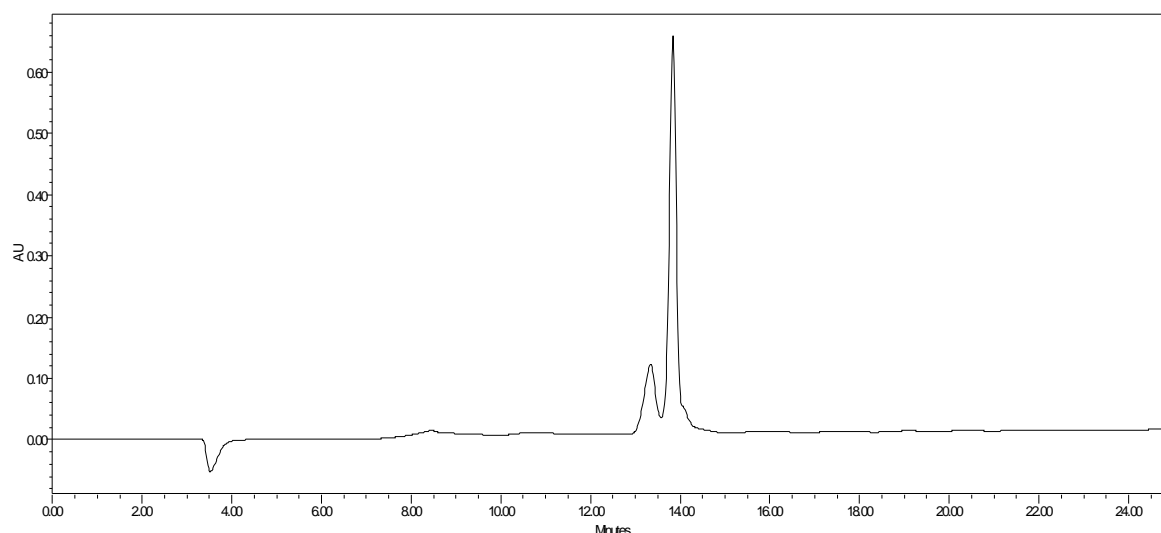


Figura 3.13. Cromatografia analitica della frazione 15 della semipreparativa di Figura 3.12 contenente il (GRGDSP)₄K α -cheto-aldeide. Colonna: Symmetry Shieldk C₈; eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN; flusso: 1 mL/min; iniettato: 20 μ L; λ : 214 nm; gradiente: da 0% a 25% di B in 25 minuti.

Dall'osservazione dei cromatogrammi si è deciso di riunire assieme le frazioni 14, 15, 16, 17 della SP1 e le frazioni della seconda semipreparativa che uscivano agli stessi tempi di ritenzione per utilizzarle nella successiva reazione di bioconiugazione. Esse, infatti, presentavano il picco più alto in corrispondenza del tempo di ritenzione del (GRGDSP)₄K α -cheto-aldeide, attorno a t_R : 14 minuti.

3.2.1.2 Sblocco del peptide AoaEAbuK dalla resina.

Sono stati recuperati 231.2 mg di peptide grezzo su resina, ottenuti dalla sintesi peptidica su fase solida. Si è proceduto quindi alle operazioni di sblocco; direttamente all'interno del reattore a siringa in cui erano contenuti, sono stati inseriti nell'ordine i seguenti elementi della miscela di sblocco:

- 0.125 mL di H₂O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

Il procedimento per eseguire lo sblocco è lo stesso descritto nel paragrafo 2.2.1.4.

Al termine dello sblocco si sono ottenuti circa 81.11 mg di peptide grezzo.

3.2.1.3 Preparazione del coniugato EAbuK-RGD.

Per eseguire la reazione si è deciso di operare con un rapporto molare tra chetone e peptide auto-assemblante di 1:10. In precedenza la reazione era stata eseguita impostando un rapporto molare 1:20, senza però ottenere alcun miglioramento nella resa finale di reazione. Sono state quindi fatte reagire 3.5054×10^{-5} moli (8.49 mg) di (GRGDSP)₄K-chetone con 3.5054×10^{-4} moli (63.1 mg) di AoaEAbuK in H₂O MilliQ.

Per ottenere una concentrazione finale di 2 mM, 63,1 mg di di AoaEAbuk grezzo sono stati sciolti in circa 17.52 mL di H₂O MilliQ. Il peptide è stato inserito in un pallone e fatto sciogliere sotto blanda agitazione magnetica. Sono stati poi introdotti circa 8.49 mg di (GRGDSP)₄K-chetone, pesati precedentemente, ottenendo così una concentrazione finale di (GRGDSP)₄K-chetone di 0.2 mM. La reazione è durata 48 h a temperatura ambiente (Figura 3.14).

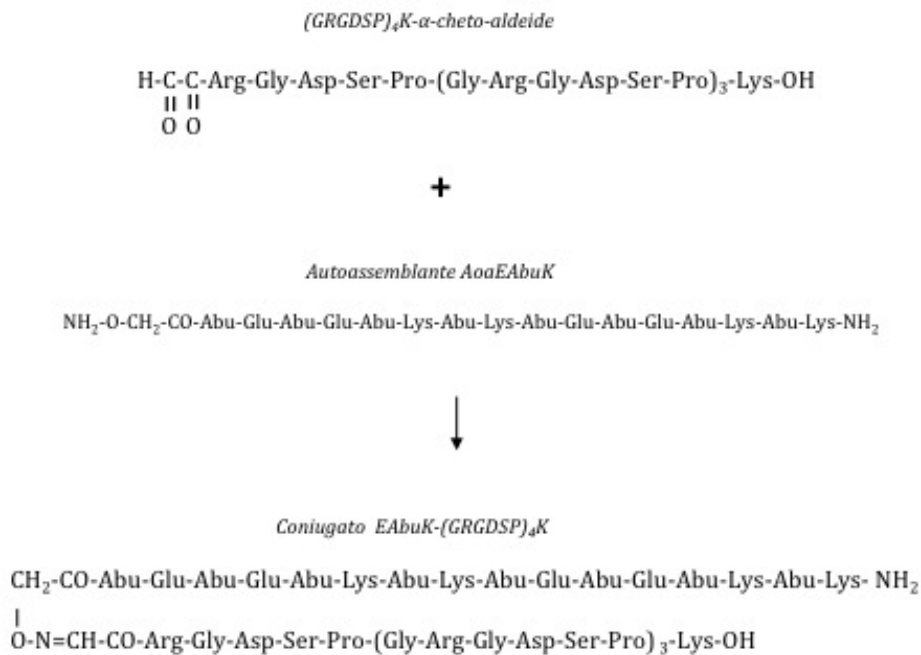


Figura 3.14. Reazione tra auto-assemblante AoaEAbuK e (GRGDSP)₄K- α -cheto-aldeide, per formare il coniugato EAbuK-RGD.

Per monitorare la cinetica di reazione sono state condotte delle cromatografie analitiche a vari step temporali: t=0 minuti, t=6 ore, t=23 ore, t=29 ore, t=46 ore e t=48 ore.

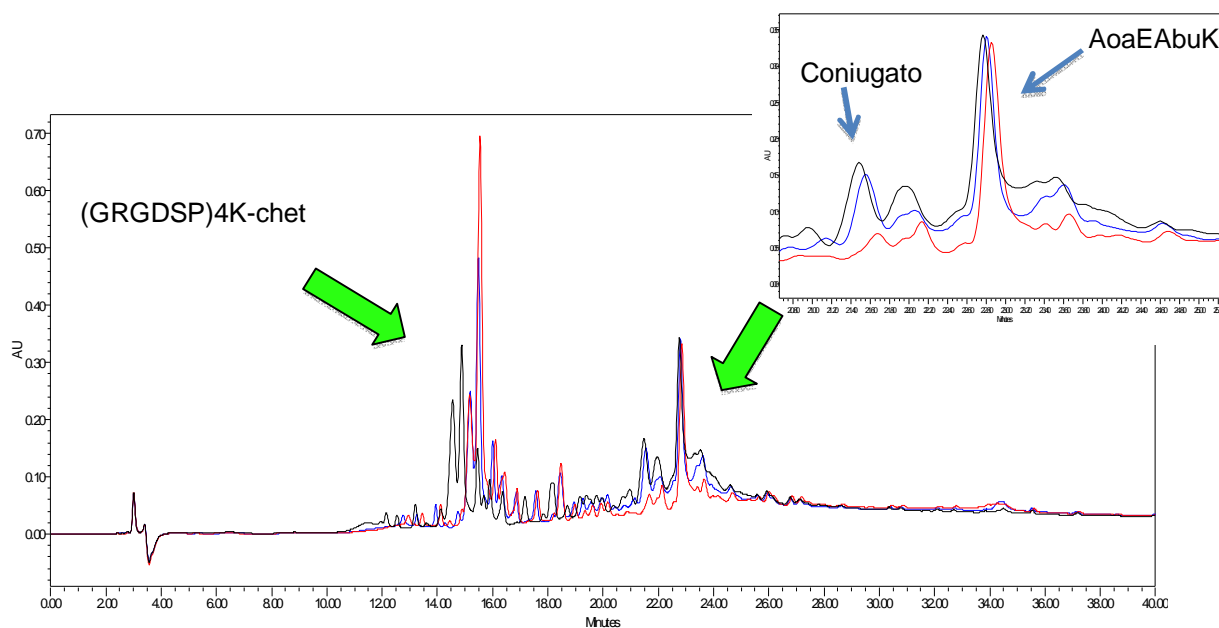


Figura 3.15. Cromatografie analitiche a $t = 0$ (curva rossa), $t = 24$ h (curva blu) e $t = 48$ h (curva nera) della soluzione contenente AoaEAbuK e $(GRGDSP)_4K$ α -cheto-aldeide.

Al termine delle 48 ore la soluzione di reazione è stata iniettata in HPLC semipreparativa. La prima corsa è stata condotta alle seguenti condizioni:

- Colonna: Nova Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Velocità carta: 1 cm in 2 minuti;
- Gradiente: da 0% di B al 5% di B in 2 minuti, quindi dal 5% di B al 35% di B in 60 minuti.

Sono stati iniettati 3 mL di soluzione di reazione, diluiti con circa 6 mL di H₂O MilliQ e filtrati. I picchi principali sono stati raccolti in provette. Nella seconda analisi HPLC semipreparativa è stato iniettato un volume doppio di soluzione di reazione, diluito con H₂O MilliQ e filtrato. Le condizioni di analisi sono rimaste le stesse, ma si è deciso di modificare il gradiente, andando dal 5% di B al 26% di B in 42 minuti. I restanti 9 mL di soluzione di reazione sono stati diluiti con H₂O MilliQ, filtrati e iniettati in altre due analisi HPLC semipreparative. Sono state poi condotte le

cromatografie analitiche per individuare e caratterizzare il coniugato all'interno della miscela di reazione. Le analisi sono state svolte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 40 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 30% di B in 30 minuti.

Si sono quindi riunite assieme e liofilizzate le frazioni principali in cui si riteneva fosse presente il coniugato, ovvero le frazioni che in semipreparativa uscivano a tempo di ritenzione compreso tra 30 e 31 minuti al 19% di eluente B. Il peptide ottenuto, pari a circa 2 mg, è stato poi risolto con eluente A. La soluzione ottenuta, contenente le frazioni buone di coniugato EAbuK-(GRGDSP)₄K, è stata iniettata in HPLC semipreparativa (Figura 3.16) alle seguenti condizioni:

- Colonna: Nova Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Velocità carta: 1cm in 2 min;
- Gradiente: da 0% di B al 12% di B in 2 minuti, quindi dal 12% di B al 24% di B in 48 minuti.

Da questa corsa sono state raccolte le frazioni 3, 4, 5, successivamente caratterizzate in HPLC analitica nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Iniezione da 40 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Detector a 214 nm;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 30% di B in 30 minuti.

Le frazioni 3, 4 e 5 sono state poi sottoposte ad analisi di massa MALDI. Gli spettri di massa delle frazioni presentavano un picco predominante a $PM_{\text{Sperimentale}}$: 4122 Da; era presente anche un picco vicino a PM_{Teorico} : 4205.902 Da che si esprimeva con valori d'intensità nettamente inferiori (Figura 3.17, Figura 3.18, Figura 3.19).

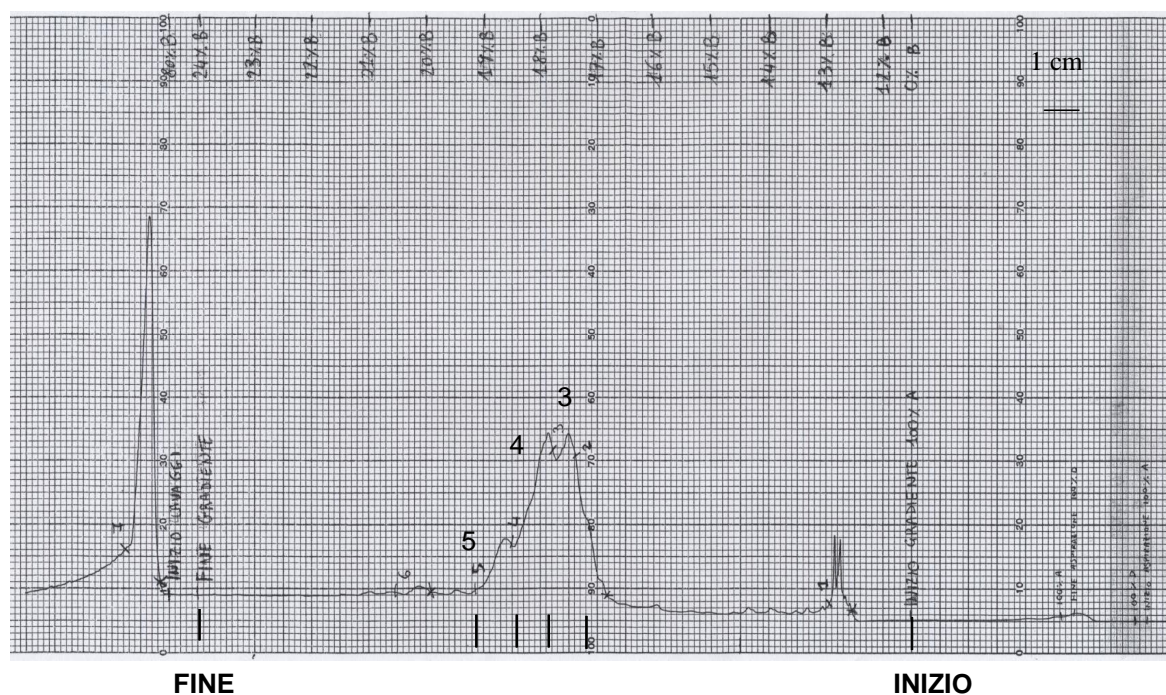


Figura 3.16. Cromatografia semipreparativa SPI in RP-HPLC della frazioni principali di coniugato EAbuK-(GRGDSP)₄K. Colonna Nova-Pak C₁₈; eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN; flusso: 4 mL/min; ABS: 4.00; λ : 214 nm; gradiente: da 0% a 12% di B in 2 minuti, quindi dal 12% al 24% di B in 48 minuti; velocità carta: 1 cm in 2 min.

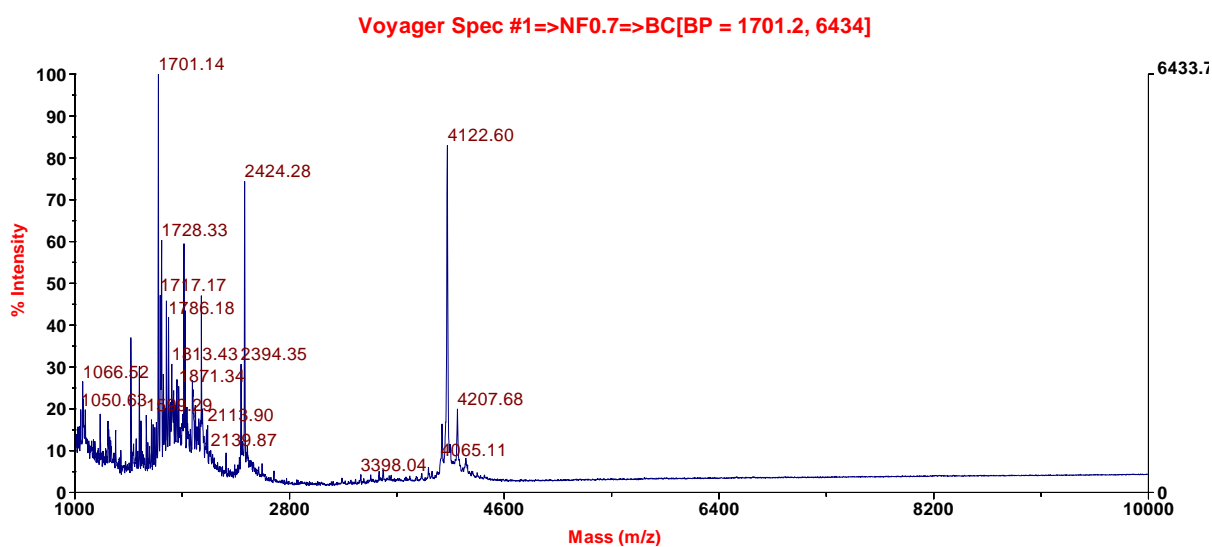


Figura 3.17. Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 3 raccolta dalla semipreparativa il cui cromatogramma è riportato in figura 3.16.

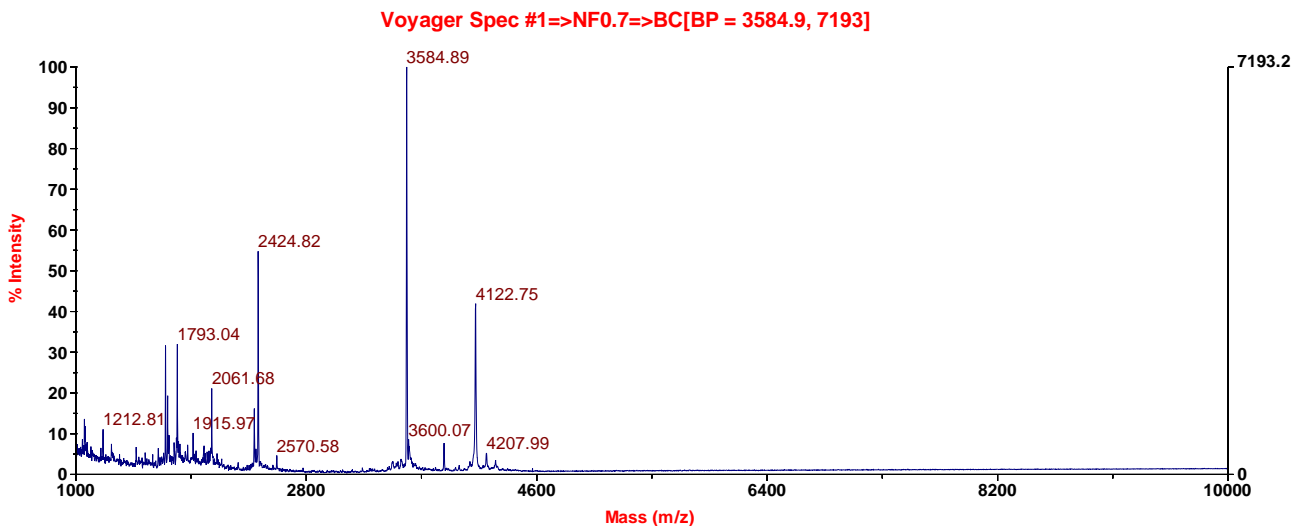


Figura 3.18. Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 4 raccolta dalla semipreparativa il cui cromatogramma è riportato in figura 3.16.

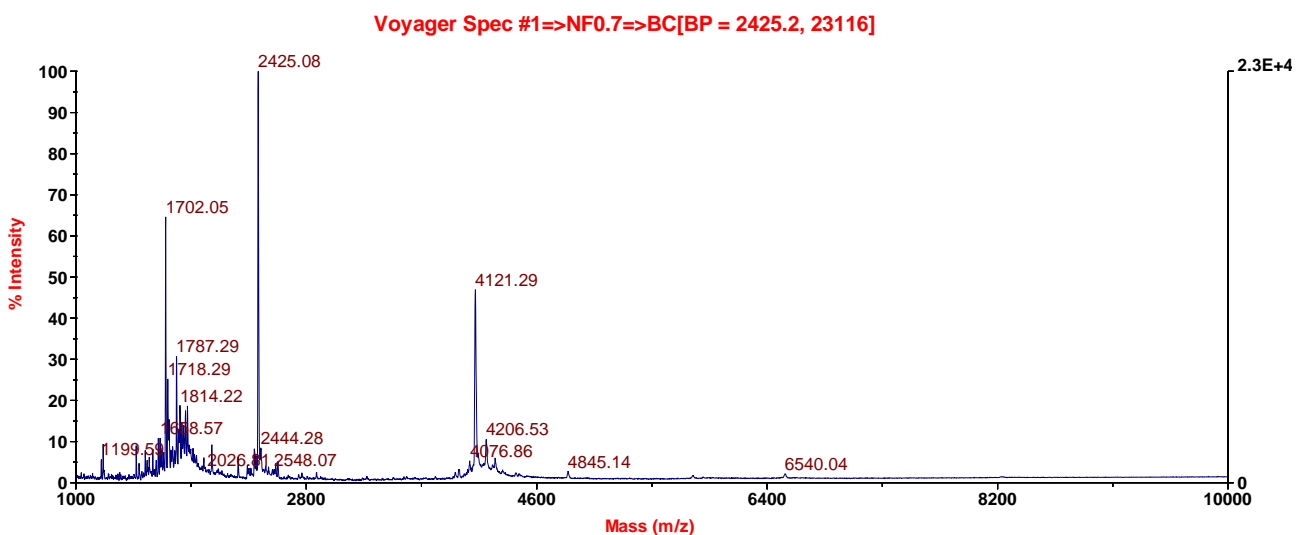


Figura 3.19. Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 5 raccolta dalla semipreparativa il cui cromatogramma è riportato in figura 3.16.

3.2.2 Discussione

La presenza del picco a $PM_{\text{Teorico}}: 4205.902$ Da dimostra che la reazione di bioconiugazione ha prodotto il risultato cercato. Tuttavia l'elevata intensità del picco a $PM_{\text{Sperimentale}}: 4122$ Da suggerisce che la reazione ha portato alla sintesi di un secondo prodotto di reazione in quantità nettamente superiori rispetto al prodotto voluto.

Per formulare un'ipotesi sulle possibili cause che hanno portato alla creazione del prodotto di reazione a massa 4122 Da innanzitutto si è verificata la reale natura dei peptidi utilizzati nella

reazione, mediante analisi di massa MALDI, al fine di accertare che non fossero presenti sequenze amminoacidiche errate che potessero dar luogo alla formazione di un prodotto di reazione a $PM_{\text{Sperimentale}}$: 4122 Da.

Sono quindi stati sottoposti ad analisi di massa MALDI (Figura 3.20 – 3.24) il peptide auto-assemblante AoaEAbuK grezzo (PM_{Teorico} :1800.39 Da), il peptide (GRGDSP)₄K (PM_{Teorico} :2424.51 Da), contenente la sequenza RGD, e il chetone utilizzato per la bioconiugazione (GRGDSP)₄K-chetone (PM_{Teorico} :2423.51 Da).

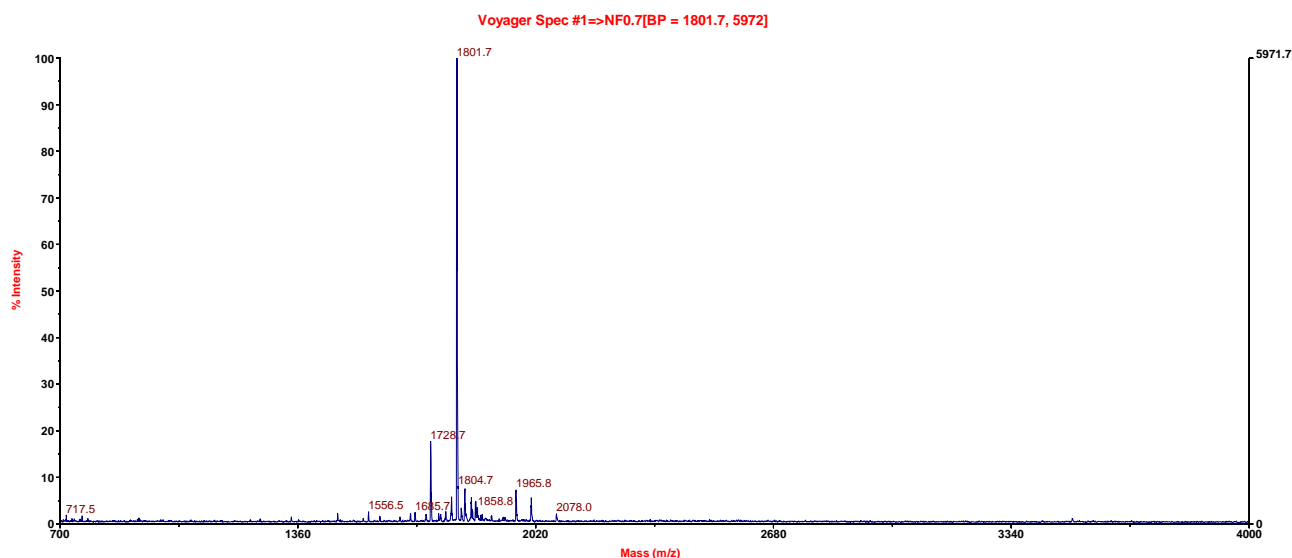


Figura 3.20. Spettro di massa MALDI-TOF del peptide grezzo AoaEAbuK utilizzato nella reazione di bioconiugazione.

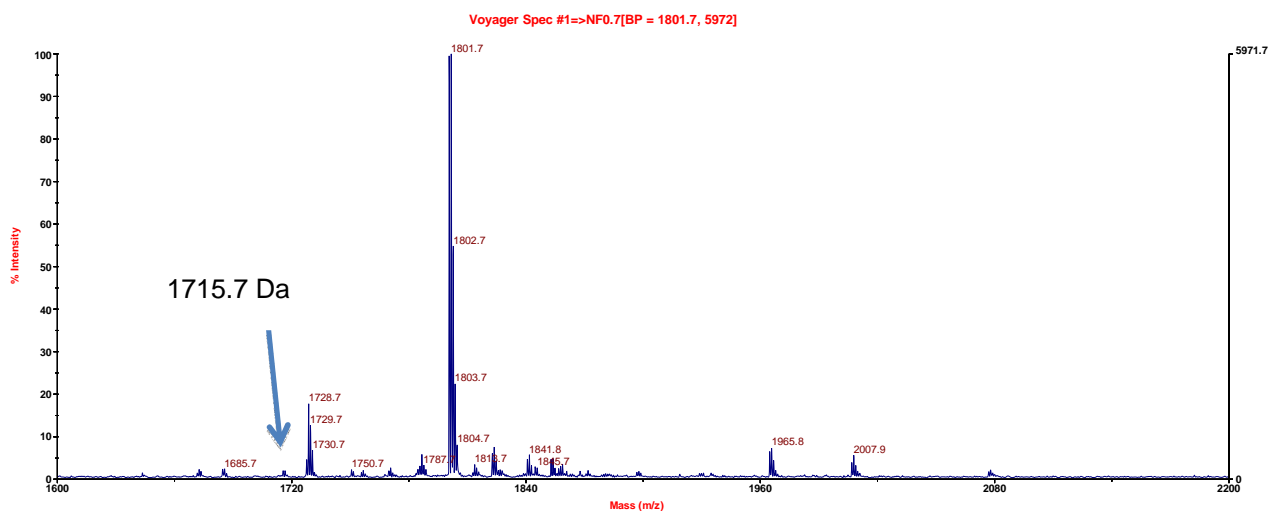


Figura 3.21. Spettro di massa MALDI-TOF del peptide grezzo AoaEAbuK, zoom del picco principale di Figura 3.20 a $PM_{\text{Sperimentale}}$: 1801.7 Da. Il picco a PM : 1715.7 Da è di bassissima intensità.

Le analisi di massa MALDI hanno confermato la natura dei peptidi usati come reagenti nella reazione di bioconiugazione. Il peptide auto-assemblante AoaEAbuK è infatti caratterizzato da un

$PM_{\text{Sperimentale}}$: 1801.7 Da, in accordo con il valore teorico della peptide. Il peptide (GRGDSP)₄K presenta $PM_{\text{Sperimentale}}$: 2424.2 Da e lo stesso vale anche per il (GRGDSP)₄K-chetone, il quale differisce dal peptide di partenza di una sola unità Dalton e presenta infatti $PM_{\text{Sperimentale}}$: 2423.3 Da.

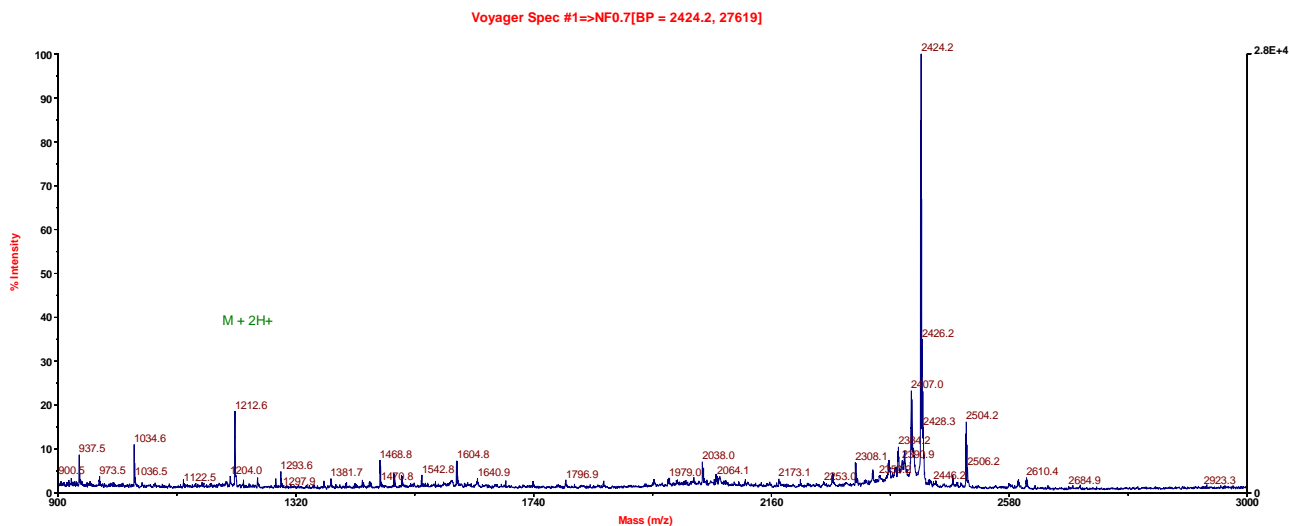


Figura 3.22. Spettro di massa MALDI-TOF del peptide (GRGDSP)₄K utilizzato per realizzare il peptide (GRGDSP)₄K-chetone; il picco principale è a $PM_{\text{Sperimentale}}$: 2424.2 Da.

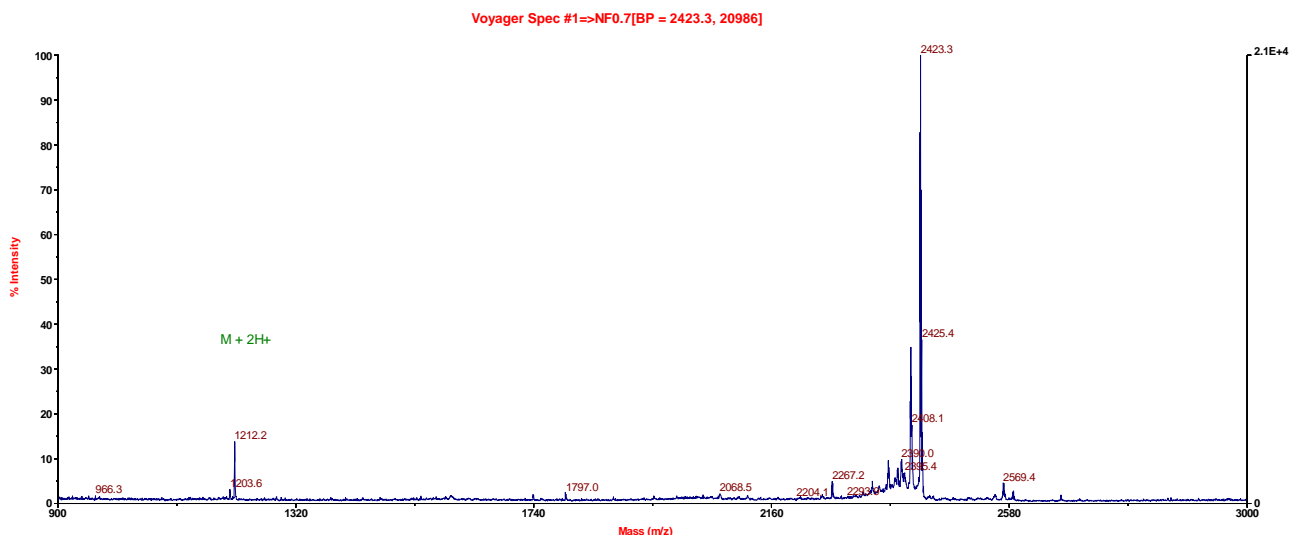


Figura 3.23. Spettro di massa MALDI-TOF del peptide (GRGDSP)₄K-chetone utilizzato nella reazione di bioconiugazione; il picco principale è a $PM_{\text{Sperimentale}}$: 2423.3 Da.

Confermata quindi l'esatta natura dei peptidi di partenza, si sono prese in considerazione le condizioni operative che differissero da quelle utilizzate in un lavoro di tesi del 2011 [14], nel quale è stata eseguita la stessa reazione di bioconiugazione via ossima utilizzando il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e il peptide (GRGDSP)₄K-chetone ottenendo il prodotto desiderato. Una

prima differenza riguarda il valore di concentrazione in AoaEAbuK della soluzione di reazione. In questo lavoro è stata impostata una soluzione a concentrazione 2 mM in AoaEAbuK, doppia rispetto alla concentrazione utilizzata bioconiugazione eseguita nel 2011 [14].

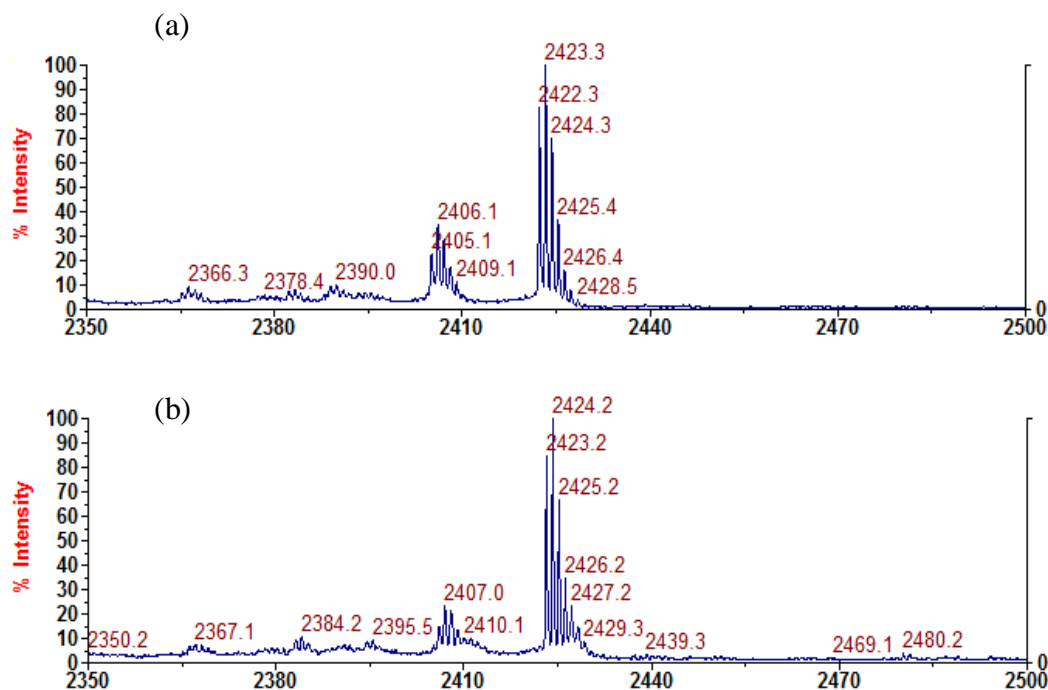


Figura 3.24. Spettro di massa MALDI-TOF del peptide $(GRGDSP)_4K$ -chetone utilizzato nella reazione di bioconiugazione; zoom del picco a $PM_{Sperimentale}$: 2423.3 Da di Figura 3.22 (a). Spettro di massa MALDI-TOF del peptide $(GRGDSP)_4K$ utilizzato per ottenere il chetone necessario alla reazione di bioconiugazione; zoom del picco a $PM_{Sperimentale}$: 2424.2 Da ella Figura 3.23 (b).

Questo aspetto però non dovrebbe influenzare la generazione di prodotti secondari, in quanto garantirebbe solamente una maggiore disponibilità di peptide auto-assemblante per i processi di reazione. Un aspetto che, invece, potrebbe essersi rivelato determinante è il tempo di reazione: nel lavoro di tesi preso come riferimento [14], la reazione è stata interrotta al termine delle 24 ore, mentre in questo caso è stato prolungato il tempo di reazione fino a 48 ore.

Il prolungamento del tempo di reazione potrebbe aver lasciato spazio all'instaurarsi di alcuni riarrangiamenti molecolari che hanno portato alla formazione del prodotto secondario di reazione. Il meccanismo chimico di formazione del coniugato a $PM_{Sperimentale}$: 4122 Da non è noto e in letteratura non è presente alcun lavoro che spieghi le cause che possano portare alla generazione di tale composto.

Andando ad analizzare nel dettaglio i valori dei pesi molecolari riscontrati con l'analisi di massa MALDI si evince che la differenza tra il PM_{Teorico} : 4205.902 Da e il $PM_{\text{Sperimentale}}$: 4122 Da è di circa 83.9 Da, valore che si avvicina molto al PM_{Teorico} : 85.106 Da dell'amminoacido Abu.

Si potrebbe ipotizzare che durante la reazione sia avvenuto un riarrangiamento molecolare che abbia portato all'eliminazione dell'amminoacido Abu legato al terminale ossi-amminico del peptide auto-assemblante AoaEAbuK. L'assenza in letteratura di lavori che descrivano i fenomeni appena citati rende difficoltosa un'analisi del caso più accurata; l'ipotesi potrebbe essere verificata con un'analisi a spettroscopia NMR, tecnica in grado di identificare l'intera sequenza amminoacidica del prodotto di reazione.

3.3 Microscopia elettronica a scansione.

In questo lavoro di tesi sono stati realizzati degli idrogel di peptidi auto-assemblanti al fine di ottenere degli *scaffold* sui quali ottimizzare i processi di adesione e proliferazione cellulare. Per la realizzazione di tale materiale è stato usato il peptide auto-assemblante EAbuK, sintetizzato e caratterizzato durante il periodo di tesi.

L'idrogel è stato prodotto a 4 diversi gradi di densità, preparando delle soluzioni a concentrazioni di peptide auto-assemblante di: 0.15% w/v, 0.25% w/v, 0.5% w/v e 1% w/v. Questo è stato fatto per valutare l'effetto che la densità dello *scaffold* ha nei confronti del gradimento delle cellule. Si è provveduto poi alla caratterizzazione di tali *scaffold*, andando a osservarli mediante microscopia elettronica a scansione.

3.3.1 Primo esperimento

In un primo esperimento sono stati preparati 4 campioni di idrogeli utilizzando dei volumi di materiale pari a quelli che verranno poi utilizzati per realizzare gli *scaffold* negli esperimenti di semina cellulare.

Preparazione campioni

Sono state preparate quattro soluzioni contenenti:

- 1.20 mg di peptide EAbuK sciolti in 40 μL di H_2O MilliQ (1% w/v, 5.79×10^{-3} M);
- 0.60 mg di peptide EAbuK sciolti in 40 μL di H_2O MilliQ (0.5% w/v, 2.89×10^{-3} M);
- 0.30 mg di peptide EAbuK sciolti in 40 μL di H_2O MilliQ (0.25% w/v 1.45×10^{-3} M);
- 0.18 mg di peptide EAbuK sciolti in 40 μL di H_2O MilliQ (0.15% w/v, 8.68×10^{-4} M).

Le soluzioni di peptide sono state sonicate per circa 30 minuti. 40 μL di ciascuna soluzione sono stati posti all'interno di pozzetti a parete rimovibile (*chamber slides*), e addizionati di 80 μL di PBS. Si sono attesi 60 minuti per permettere la gelificazione degli *scaffolds*.

E' stato poi rimosso il liquido in eccesso da ciascun pozzetto e sono stati aggiunti 200 μL di soluzione al 5% di glutaraldeide in H_2O MilliQ come fissativo.

I pozzetti sono stati lasciati riposare immersi nella glutaraldeide per 2 ore a 4°C . E' stata poi rimossa la soluzione con la glutaraldeide e sono stati eseguiti alcuni lavaggi dell'idrogel con H_2O MilliQ. In seguito si è proceduto alla disidratazione dell'idrogel, con cui l'acqua presente nella struttura viene sostituita da solventi volatili come l'etanolo.

La disidratazione è stata condotta mediante progressivi lavaggi dei campioni con soluzioni a percentuali crescenti di etanolo in H_2O MilliQ. I campioni in ciascun pozzetto sono stati trattati con 200 μL di soluzione al 10% di etanolo in H_2O MilliQ per 5 minuti e la soluzione è stata rimossa. Si è ripetuto il trattamento con le stesse modalità utilizzando soluzioni a percentuali crescenti di etanolo (30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% di etanolo in H_2O MilliQ). Per la disidratazione di idrogeli di peptidi auto-assemblanti, data la delicatezza e la sensibilità del materiale, è abitudine eseguire molto lentamente la variazione di solvente.

I campioni sono rimasti immersi in soluzione al 90% di etanolo per circa 16 ore. Rimossa la soluzione al 90% di etanolo in H_2O MilliQ i campioni sono stati trattati con etanolo puro, e quindi metallizzati mediante *sputtering* per renderli conduttivi e per proteggerli dal riscaldamento causato dalla collisione del fascio elettronico.

La metallizzazione avviene all'interno di una camera in cui viene fatto il vuoto e viene inserito dell'Argon per rendere l'atmosfera inerte; una corrente permette poi la polverizzazione dell'oro che andrà a ricoprire i campioni all'interno della camera.

Osservazione campioni

La caratteristica di tali idrogeli, ottenuti da peptidi auto-assemblanti, è di formare reticoli di nanofibre. Dall'osservazione al SEM di tali strutture ci si aspetterebbe di riconoscere lo schema a nanofibre dello *scaffold*, ma in questo primo esperimento le strutture risultavano estremamente impaccate, rendendo quasi impossibile il riconoscimento delle singole fibre, come si può vedere ad esempio in Figura 3.24 (idrogel a concentrazione 1% w/v).

A concentrazioni inferiori è risultato ancora più difficile riuscire a identificare la struttura fibrosa dell'idrogel, e si ritiene che l'elevata quantità di materiale con cui sono stati realizzati i campioni ha

probabilmente influito negativamente sul riconoscimento delle fibre, infatti l'impressione guardando le immagini è che la struttura risulti schiacciata su se stessa.

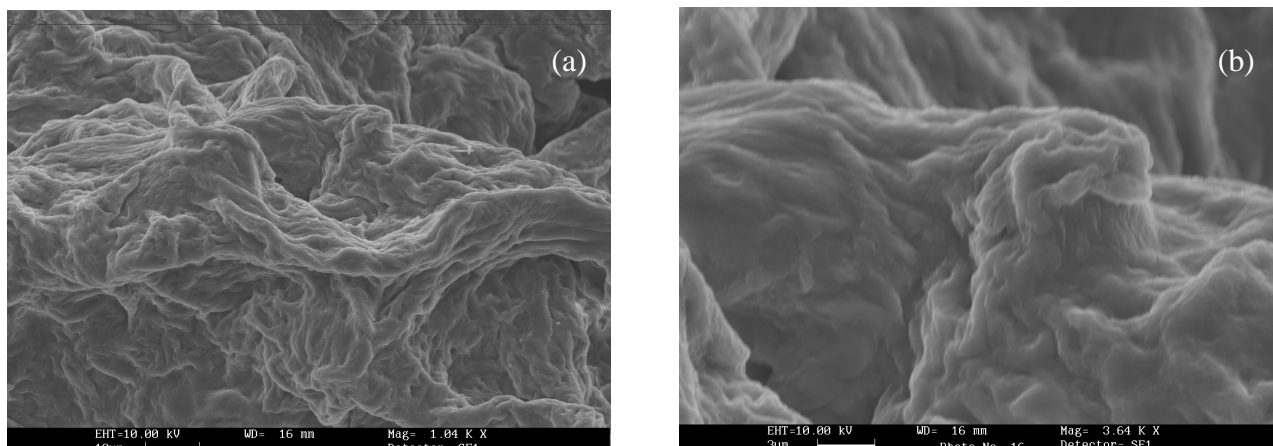


Figura 3.24. Immagini al SEM di idrogeli a concentrazione 1% w/v; (a) ingrandimento 3000 X, tensione 10 kV; (b) ingrandimento 10800 X, tensione 10 KV.

3.3.2 Secondo esperimento

In un secondo esperimento sono stati preparati 4 campioni utilizzando meno materiale di partenza, in modo da poter realizzare un sottile strato di idrogel. Si è cercato di ottenere un “foglietto” di fibre, non più un insieme di fibre sovrapposte.

Preparazione campioni

E' stata preparata una soluzione al 3% w/v (soluzione S₁) con 0.9 mg di peptide auto-assemblante sciolti in 30 µL di H₂O MilliQ. Su dei vetrini da laboratorio sono stati preparati i 4 campioni a concentrazione diverse:

- 5 µL di S₁ + 10 µL di PBS (1 % w/v);
- 5 µL di S₁ (diluita con 5 µL di H₂O MilliQ) + 10 µL di PBS (0.5% w/v);
- 5 µL di S₁ (diluita con 15 µL di H₂O MilliQ) + 10 µL di PBS (0.25 % w/v);
- 5 µL di S₁ (diluita con 25 µL con H₂O MilliQ) + 10 µL di PBS (0.25 % w/v).

I campioni sono stati poi lasciati riposare per circa 60 minuti a temperatura ambiente. E' poi stato rimosso il PBS e sono stati effettuati dei lavaggi dell'idrogel con H₂O MilliQ. Su ogni campione sono stati poi applicati circa 40 µL di soluzione al 5% di glutaraldeide in H₂O MilliQ come

fissativo. In seguito i campioni sono stati disidratati con le stesse modalità utilizzate nel primo esperimento (3.3.1 Primo esperimento). I campioni sono stati poi metallizzati mediante *sputtering* e osservati al microscopio elettronico a scansione.

3.3.3 Risultati e discussione

Lavorando con volumi ridotti di materiale è stato possibile ottenere delle immagini al SEM che identificassero meglio la struttura a nanofibre dell'idrogel. Questo è stato possibile con i campioni realizzati con le soluzioni di peptide auto-assemblante a concentrazioni più basse, 0.25% w/v e 0.15% w/v (Figura 3.25), dove le immagini evidenziano la presenza di un reticolo fibroso costituito da filamenti di dimensioni prossime ai nanometri.

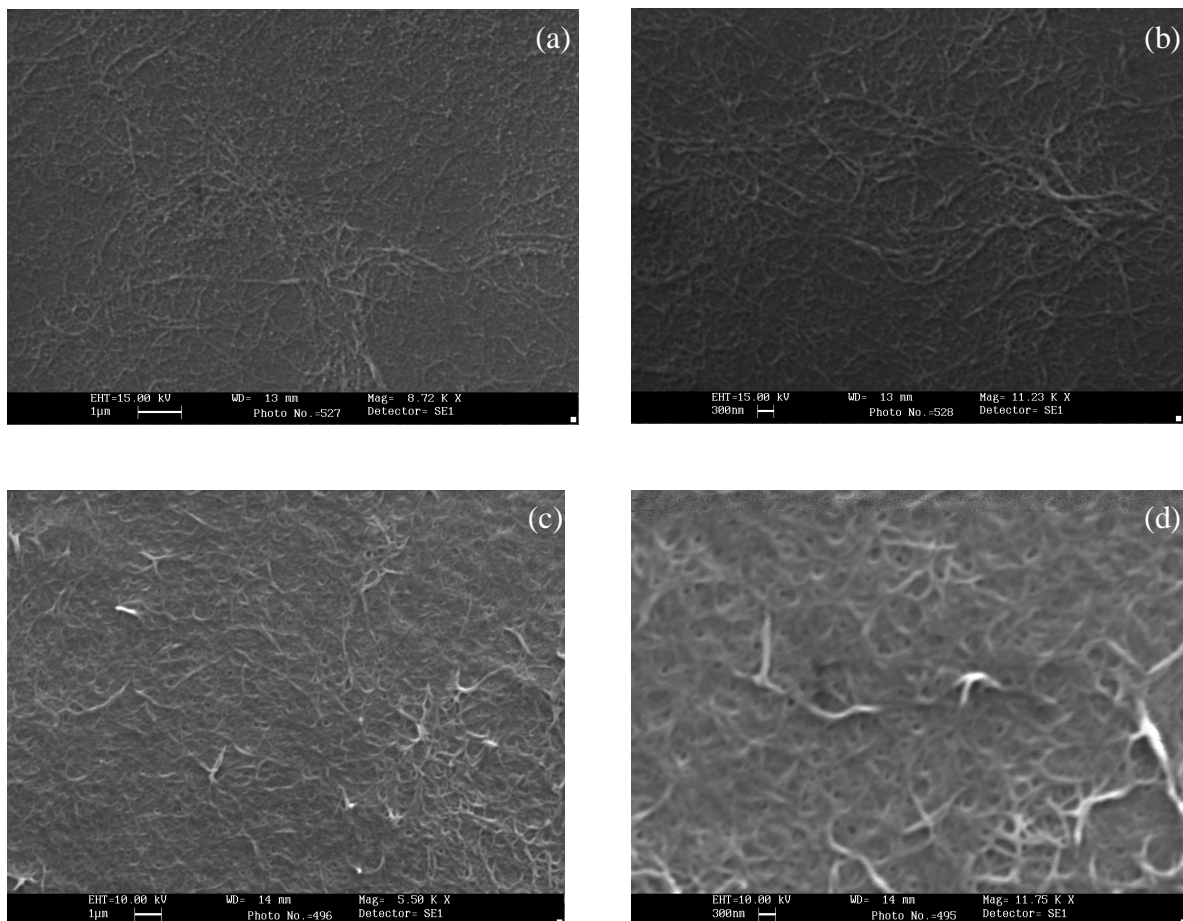


Figura 3.25. Immagini al SEM di idrogeli di peptidi auto-assemblanti: (a) campione a concentrazione 0.15% w/v, ingrandimento 26160 X, tensione 15 kV; (b) dettaglio del campione (a), ingrandimento 33700 X, tensione 15 KV; (c) campione a concentrazione 0.25% w/v, ingrandimenti 16500 X, tensione 10 kV; (d) dettaglio dell'immagine (c), ingrandimenti 35250 X, tensione 10 kV.

Dall'osservazione dei campioni realizzati con la soluzione a concentrazione maggiore, 0.5% w/v e 1% w/v, è stato, invece, difficile individuare il reticolo fibroso della struttura. Le immagini, anche per elevati ingrandimenti, non restituivano alcun risultato che potesse assomigliare ad un reticolo fibroso. Probabilmente le maggiori concentrazioni nelle soluzioni di peptide hanno causato un eccessivo addensamento nella struttura, nonostante si fosse operato con volumi di materiale nettamente inferiori rispetto al primo esperimento.

Nella caratterizzazione al SEM le immagini degli idrogeli di EAbuK allo 0.15% w/v mostrano un *pattern* di nanofibre intrecciate di diametro compreso tra 10 e 100 nm e con maglie di dimensioni inferiori a 300 nm, in accordo con quanto riportato per il peptide auto-assemblante ionico complementare RADA16 e il Matrigel (Gelain et al. PlosONE 2006, 1, e119).

3.4 Microscopio a forza atomica

Per la caratterizzazione fisica e strutturale degli idrogeli sono stati eseguiti studi mediante microscopia a forza atomica. Con questa tecnica d'indagine è possibile eseguire un'analisi dettagliata delle dimensioni (altezza, larghezza e lunghezza) delle fibre che costituiscono la matrice ottenuta con l'idrogel.

Per la realizzazione dei campioni sono state preparate 4 soluzioni di peptide auto-assemblante EAbuK in PBS, ottenendo le concentrazioni di 0.15% w/v, 0.25% w/v, 0.5% w/v e 1% w/v (1 mg/1 μ L). I campioni sono stati preparati utilizzando un volume di circa 3 μ L, disposti su un substrato di mica opportunamente lavato, con cui poter osservare la formazione delle fibre. Per ciascun grado di concentrazione di peptide auto-assemblante sono stati preparati 4 campioni e osservati dopo diversi tempi di incubazione: 1 ora, 1 giorno, 2 giorni e 3 giorni di incubazione. Al termine del tempo d'incubazione i campioni sono stati lavati alcune volte con PBS per eliminare le molecole non aderite alla superficie e poi sono stati ulteriormente lavati con H₂O MilliQ per rimuovere eventuali sali lasciati dal tampone. I campioni sono poi stati asciugati in aria e osservati al microscopio a forza atomica in *tapping mode* (le misurazioni sono state prese su un campo standard di 1 μ m x 1 μ m).

3.4.1 Risultati e discussione

In Figura 3.26 sono riportate le immagini ottenute dall'osservazione dei campioni incubati a concentrazione di peptide dello 0.15% w/v.

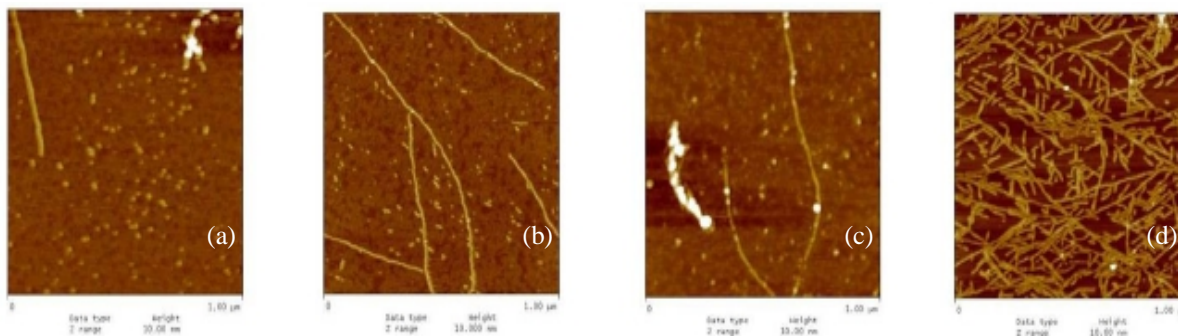


Figura 3.26. Immagini AFM 0.15% w/v; osservazione dopo diversi tempi di incubazione: (a) 1 ora, (b) 1 giorno, (c) 2 giorni, (d) 3 giorni.

Si può vedere come già dopo una sola ora d'incubazione si formino delle fibre (a); lasciando il materiale in incubazione per un tempo maggiore si nota come la quantità di fibre sul substrato aumenti (b, c), coprendo quasi interamente il campione dopo 3 giorni (d).

Le dimensioni delle fibre osservate all'AFM per la concentrazione 0.15% w/v rientrano in un ben preciso intervallo dimensionale: esse, infatti, sono comprese tra i 1.3 ± 0.2 nm e i 1.7 ± 0.1 nm per quanto riguarda l'altezza, mentre si sviluppano tra i 17.2 ± 2.4 nm e i 28.1 ± 2.0 nm in larghezza.

In Figura 3.27 sono invece raffigurate le immagini osservate all'AFM per i campioni a concentrazione di peptide del 0.25% w/v.

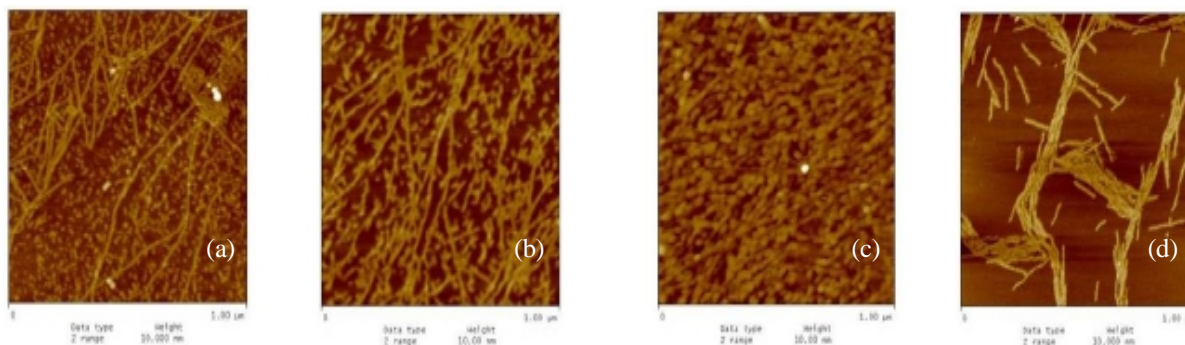


Figura 3.27. Immagini AFM 0.25% w/v; osservazione dopo diversi tempi di incubazione: (a) 1 ora, (b) 1 giorno, (c) 2 giorni, (d) 3 giorni.

Aumentando la concentrazione della soluzione (0.25%) si nota un incremento nel numero di fibre già dopo una sola ora d'incubazione (a); si possono notare, inoltre, dei piccoli aggregati fibrosi che con il passare del tempo tendono ad assemblarsi tra loro aumentando la quantità e la densità delle fibre (b, c). Dopo 3 giorni di permanenza sul substrato è possibile osservare la formazione di un *pattern* costituito da fibre regolarmente assemblate l'una accanto all'altra (d).

Le fibre ottenute dalla soluzione a concentrazione 0.25% w/v presentano le seguenti dimensioni: sono comprese tra i 1.6 ± 0.1 nm e i 1.7 ± 0.1 nm per quanto riguarda l'altezza, mentre si sviluppano tra i 20.3 ± 3.2 nm e i 26.9 ± 2.4 nm in larghezza.

Incrementando ulteriormente la concentrazione della soluzione (Figura 3.28, a concentrazione 0.5%), si ottengono fibre più spesse e definite, che danno luogo alla formazione di un tappetino già dopo un'ora di incubazione (a). Col passare del tempo il tappetino diventa sempre più definito e le fibre tendono ad assemblarsi e a impaccarsi in maniera più decisa e compatta (b); questo comportamento si accentua col progredire del tempo d'incubazione (c, d).

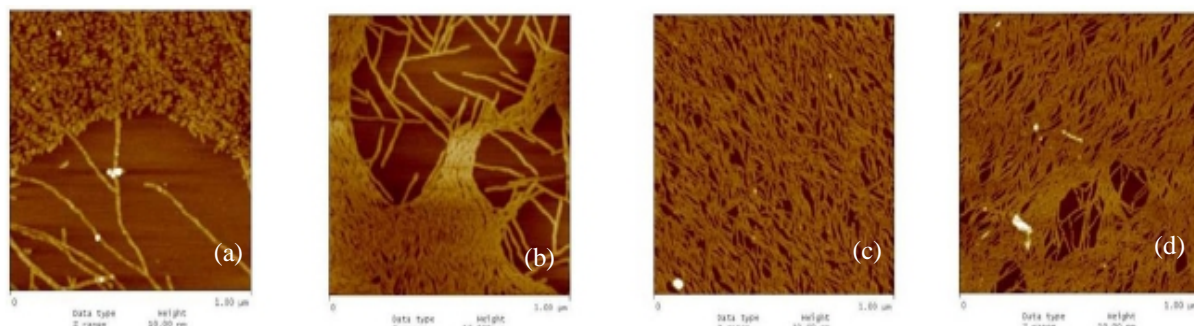


Figura 3.28. Immagini AFM 0.5% w/v; osservazione dopo diversi tempi di incubazione: (a) 1 ora, (b) 1 giorno, (c) 2 giorni, (d) 3 giorni.

Le fibre osservate nei campioni ottenuti con la soluzione a 0.5% w/v presentano le seguenti dimensioni: altezza compresa tra i 1.3 ± 0.2 nm e i 1.9 ± 0.2 nm, mentre la larghezza delle fibre si esprime con valori compresi tra i 14.2 ± 1.8 nm e i 23.6 ± 2.3 nm.

I campioni incubati con la soluzione maggiormente concentrata (1%) hanno offerto delle immagini che mettono in evidenza la formazione di un film fortemente interconnesso, il quale presenta, per brevi tempi d'incubazione (1 ora), maglie ben definite e ben evidenti, le quali lasciano il posto, col passare del tempo, ad un film sempre più fitto.

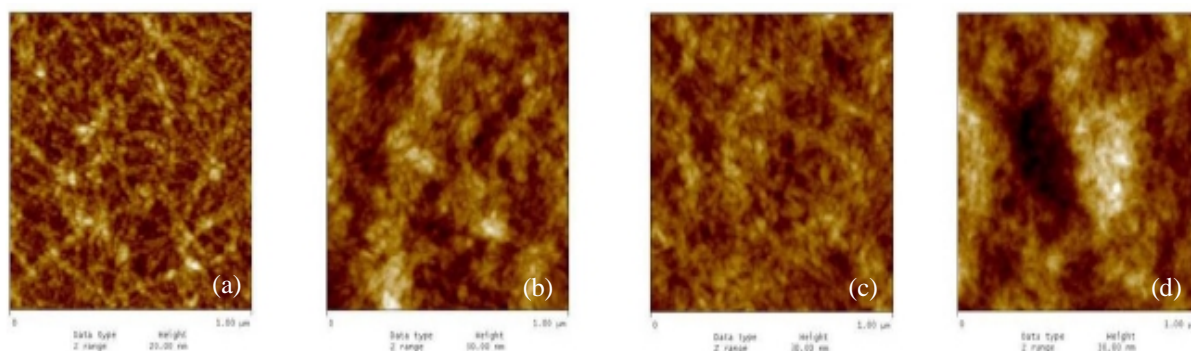


Figura 3.29. Immagini AFM 1% w/v; osservazione dopo diversi tempi di incubazione: (a) 1 ora, (b) 1 giorno, (c) 2 giorni, (d) 3 giorni.

Dall'osservazione dei vari campioni si nota come i valori riguardanti le altezze delle fibre abbiano un andamento abbastanza costante ai vari tempi d'incubazione (Tabella 3.1), mentre non si può dire lo stesso per quel che concerne i valori di larghezza delle fibre. In questo caso è possibile dividere i risultati in due gruppi: uno contenente valori di larghezza compresi tra i 15 e i 17 nm e uno valori compresi tra i 23 e i 27 nm. Le fibre appaiono più strette ad alti valori di concentrazione (0.5%) e per tempi d'incubazione più lunghi (3 giorni), come si può osservare dalla Tabella 3.2.

	Tempo incubazione 1 ora	Tempo incubazione 1 giorno	Tempo incubazione 2 giorni	Tempo incubazione 3 giorni
EAbuK 0.15%	1.5 ± 0.2 nm	1.7 ± 0.1 nm	1.3 ± 0.2 nm	1.7 ± 0.1 nm
EAbuK 0.25%	1.6 ± 0.1 nm	1.7 ± 0.1 nm	1.6 ± 0.2 nm	1.7 ± 0.1 nm
EAbuK 0.5%	1.3 ± 0.2 nm	1.9 ± 0.2 nm	1.5 ± 0.1 nm	1.7 ± 0.1 nm

Tabella 3.1. Medie e deviazioni standard delle altezze delle fibre alle varie concentrazioni di peptide a diversi tempi d'incubazione.

	Tempo incubazione 1 ora	Tempo incubazione 1 giorno	Tempo incubazione 2 giorni	Tempo incubazione 3 giorni
EAbuK 0.15%	28.1 ± 2.0 nm	17.4 ± 1.2 nm	23.9 ± 3.0 nm	17.2 ± 2.4 nm
EAbuK 0.25%	22.9 ± 2.4 nm	25.3 ± 3.2 nm	26.9 ± 2.4 nm	20.3 ± 3.2 nm
EAbuK 0.5%	23.6 ± 2.3 nm	22.1 ± 2.6 nm	14.2 ± 1.8 nm	15.8 ± 1.9 nm

Tabella 3.2. Medie e deviazioni standard delle larghezze delle fibre alle varie concentrazioni di peptide a diversi tempi d'incubazione.

I valori riguardanti le altezze e le larghezze delle fibre riscontrati in questo esperimento sono confrontabili con molti lavori eseguiti su peptidi auto-assemblanti della stessa categoria, come il peptide RADA 16-1 [35-39]. Anche in letteratura, quindi, le analisi AFM eseguite su idrogeli di peptidi auto-assemblanti hanno restituito valori medi delle altezze delle fibre dell'ordine dei 1.4 ± 0.36 nm [35], 2.2 ± 0.2 nm [36], 1.4 ± 0.36 nm [37]. Lo stesso ragionamento può essere fatto per quanto riguarda i valori di ampiezza delle fibre (diametro), dove ci si aggira attorno a 17.5 ± 0.36 nm [35], 21.5 ± 3.3 nm [36], 17.5 ± 1.13 nm [37], 13.5 ± 1.8 nm [38], 16.9 ± 2.3 nm [39].

Si può quindi ipotizzare uno schema che regola la formazione delle fibre in questi *scaffold*: ci sono alcune fibre che crescono sul substrato già dai primi istanti e si presentano ben solvate e, generalmente, larghe, e altre fibre che si riorganizzano col passare del tempo, a tempi lunghi, che si presentano quindi “asciutte”, poichè i ridotti volumi utilizzati nell'esperimento ($3 \mu\text{L}$) vanno rapidamente a secco. Per questo motivo le fibre a tempi lunghi sarebbero de-solvate e, quindi, accartocciate (*shrunked*).

3.5 Saggi cellulari

L'interesse principale di questo lavoro di tesi è valutare l'efficacia di un substrato di idrogeli di peptidi auto-assemblanti ha nel favorire i processi di adesione, crescita e proliferazione cellulare. Si è a tal fine eseguito inizialmente un esperimento volto a identificare la densità di idrogel preferita dalle cellule. Individuata tale densità è stato eseguito un secondo esperimento al fine di valutare adesione e proliferazione in presenza di fattori adesivi o di crescita. Tutto il lavoro svolto sui saggi cellulari è stato eseguito in stretta collaborazione con la dott.ssa Sabrina Facciolo del gruppo di ricerca del Prof. G. Gerosa.

3.5.1 Identificazione della densità peptidica

Per identificare il substrato maggiormente gradito dalle cellule è stato condotto un esperimento preliminare *in vitro* utilizzando due tipologie differenti di cellule: le cellule staminali mesenchimali da midollo osseo umano (MSC) e le cellule interstiziali valvolari di macaco (VIC). Le MSC sono cellule in grado di differenziarsi in condrociti (cellule della cartilagine), in adipociti (cellule del tessuto grasso) o in osteoblasti (cellule del tessuto osseo) e rientrano in una classe di cellule ritenute molto promettenti nel mondo della ricerca. I componenti cellulari presenti nella valvola aortica

normale sono cellule endoteliali, che ne ricoprono la superficie, e cellule interstiziali. Mentre le prime sono responsabili della non trombogenicità tissutale e regolano le risposte immunitaria ed infiammatoria, le seconde sintetizzano i costituenti della matrice extracellulare e sono responsabili del rimodellamento della valvola. Le cellule interstiziali costituiscono una popolazione cellulare che esprime un fenotipo variabile (da fibroblasti a miofibroblasti) in relazione ai diversi fattori biochimici e biomeccanici che giocano un importante ruolo nell'ambiente omeostatico tissutale valvolare. È stato, infatti, dimostrato che la stimolazione meccanica e/o la stimolazione mediante citochine (*transforming growth factor-β1*) possono far variare la biosintesi delle proteine da parte delle cellule interstiziali valvolari e il loro stato contrattile [40].

Procedura sperimentale:

Si è provveduto all'identificazione del substrato maggiormente gradito a queste due tipologie cellulari nelle loro fasi di adesione e proliferazione. Sono stati realizzati quattro substrati differenti, tutti formati da idrogeli ottenuti per auto-assemblaggio del peptide EAbuK ma caratterizzati da diverse concentrazioni dello stesso, quindi idrogeli a diversi gradi di densità.

Per la realizzazione dell'idrogel sono state preparate delle soluzioni di peptide EAbuK sciolto in H₂O MilliQ, alle quali sono state poi aggiunte una soluzione di H₂O MilliQ all'8% di glucosio e il *medium* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM - per le VIC e *Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification* - α-MEM - per le MSC).

Come ambiente di cultura sono state utilizzate delle piastre a 96 pozzetti e si è deciso di lavorare con volumi di 120 μL, mantenendo un rapporto tra la soluzione di peptide auto-assemblante e il *medium* pari a 1:2. I 120 μL presenti in ciascun pozzetto erano composti dai seguenti componenti:

- 20 μL di soluzione di peptide EAbuK in H₂O MilliQ;
- 20 μL di soluzione di H₂O MilliQ all'8% di glucosio;
- 80 μL di *medium*.

Gli idrogeli sono stati realizzati a 4 diversi gradi di densità peptidica, e per ciascun campione sono state preparate 4 soluzioni alle seguenti concentrazioni:

- concentrazione **1% w/v**, è stata utilizzata una soluzione madre al 3% w/v di peptide EAbuK in H₂O MilliQ;
- concentrazione **0.5% w/v**, è stata utilizzata una soluzione madre al 1.5% w/v di peptide EAbuK in H₂O MilliQ;

- concentrazione **0.25% w/v**, è stata utilizzata una soluzione madre al 0.75% w/v di peptide EAbuK in H₂O MilliQ;
- concentrazione **0.15% w/v**, è stata utilizzata una soluzione madre al 0.45% w/v di peptide EAbuK in H₂O MilliQ.

Si è deciso di andare a valutare il grado di adesione e proliferazione cellulare a vari intervalli temporali: dopo 24 ore dalla semina, dopo una settimana e dopo due settimane. Per ogni intervallo temporale si sono preparati 5 pozzetti contenenti rispettivamente:

- cellule seminate su pozzetto in assenza di idrogel;
- cellule seminate su idrogel a concentrazione 1% w/v;
- cellule seminate su idrogel a concentrazione 0.5% w/v;
- cellule seminate su idrogel a concentrazione 0.25% w/v;
- cellule seminate su idrogel a concentrazione 0.15% w/v.

Sono stati quindi preparati 32 pozzetti, 15 per ogni tipo cellulare più due pozzetti (uno contenente le MSC e uno le VIC) di riferimento a tempo zero dall'inizio della semina. In ogni pozzetto sono stati introdotti i 20 µL di soluzione di EAbuK in H₂O MilliQ alla concentrazione desiderata, i 20 µL di soluzione H₂O MilliQ all'8% di glucosio e gli 80 µL di *medium*, dopodichè i pozzetti sono stati inseriti in incubatore a 37°C per 60 minuti, tempo necessario al peptide per gelificare.

Al termine dei 60 minuti è stato rimosso il *medium* e sono stati inseriti in ogni pozzetto circa 100 µL di nuovo *medium*, nel quale erano state precedentemente risospese le cellule desiderate; in ogni pozzetto sono state introdotte, quindi, circa 5000 cellule. Da ciascun pozzetto, al termine di ogni intervallo temporale, è stato rimosso il *medium* in eccesso, è stato eseguito un lavaggio ed è stato raccolto il contenuto del pozzetto dal quale è stato poi estratto il DNA.

Utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis *Nanodrop* è stato rilevato lo spettro di assorbanza in modo da ottenere una quantificazione accurata della densità ottica del campione. Si è ottenuto così un dato correlabile alla quantità di DNA presente nei vari pozzetti. In Tabella 3.3 e 3.4 sono riportati i valori di DNA, in ng/µL, valutati per i diversi valori di densità, ai vari intervalli temporali, per le due tipologie cellulari.

MSC	Concentrazione peptide				
	Intervallo	0%	0.15%	0.25%	0.5%
0 h	4.2	/	/	/	/
24 h	2.9	6.7	3.8	0.8	4.1
1 week	5.1	3.8	3.1	5.0	4.2
2 weeks	9	18.3	4.4	4.9	- 5.4

VIC	Concentrazione peptide				
	Intervallo	0%	0.15%	0.25%	0.5%
0 h	6.6	/	/	/	/
24 h	4.2	1.5	4.4	4.4	4.6
1 week	4.8	2	4.5	2.6	4.7
2 weeks	23.4	4.6	3.1	4.5	7.5

Tabella 3.3. Quantificazione DNA in [ng/ μ L] di ciascun pozzetto ai vari gradi di densità peptidica, nei vari intervalli temporali per le cellule staminali mesenchimali MSC e per le cellule valvolari interstiziali VIC.

Nei diagrammi a barre di Figura 3.30 e 3.31 è riportato l'andamento dei valori di ng/ μ L di DNA per le cellule staminali mesenchimali ai vari intervalli temporali e per i diversi gradi di densità peptidica.

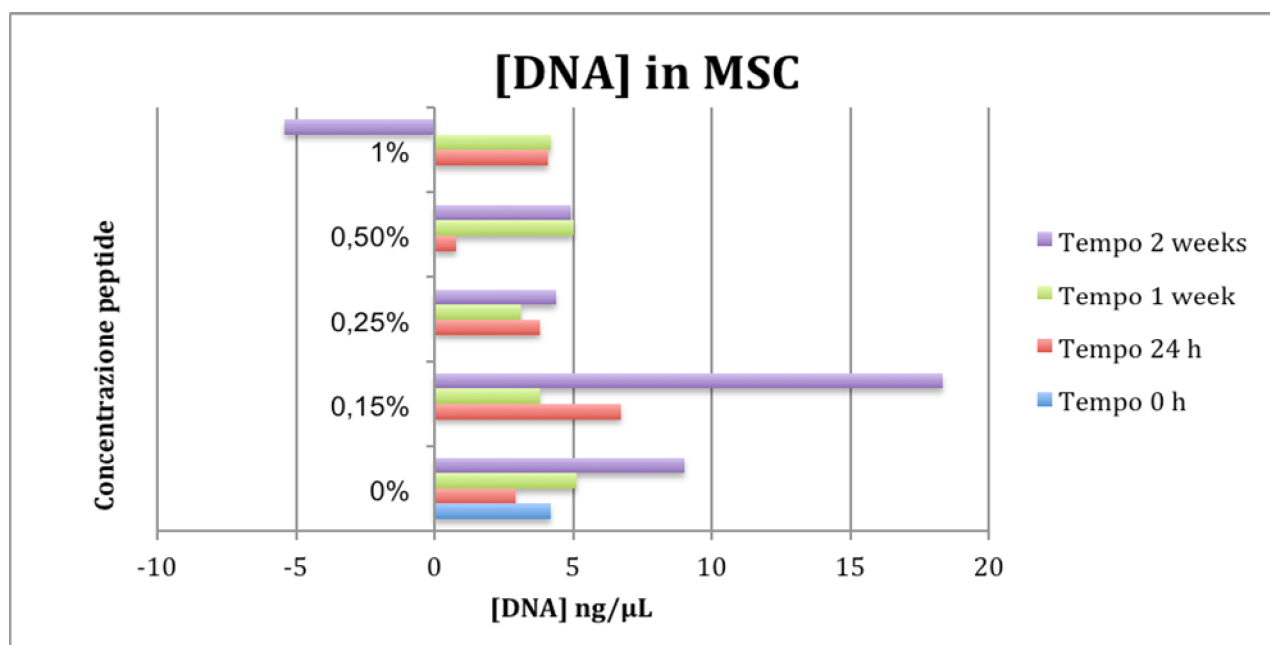


Figura 3.30. Diagramma a barre raffigurante l'andamento dei valori di DNA in ng/ μ L ai vari gradi di densità peptidica e ai vari intervalli temporali per le cellule staminali mesenchimali MSC.

Dall’osservazione dei risultati il dato che si nota maggiormente è il notevole incremento che presenta il contenuto di DNA nell’idrogel a concentrazione più bassa (0.15% w/v) trascorse due settimane dalla semina cellulare. Infatti esso, dopo uno anomalo calo nella quantità di DNA riscontrato al termine della prima settimana, presenta un valore triplicato rispetto a quanto evidenziato trascorse 24 ore dalla semina cellulare.

Per quanto riguarda l’idrogel a concentrazione 0.25% esso non presenta alcun miglioramento, manifestando un andamento dei risultati pressochè costante al trascorrere del tempo. L’idrogel a concentrazione 0.50% evidenzia un incremento nella quantità di DNA dopo sette giorni dalla semina cellulare, incremento che si mantiene poi costante fino al trascorrere delle due settimane. Il campione a concentrazione maggiore, 1% w/v, non manifesta variazioni nelle quantità di DNA al trascorrere del tempo, presentando però un anomalo valore negativo dopo due settimane.

Nei diagrammi a barre di Figura 3.32 e 3.33 sono invece riportati gli andamenti dei valori di ng/μL di DNA per le cellule valvolari interstiziali ai vari intervalli temporali e per i diversi gradi di densità peptidica.

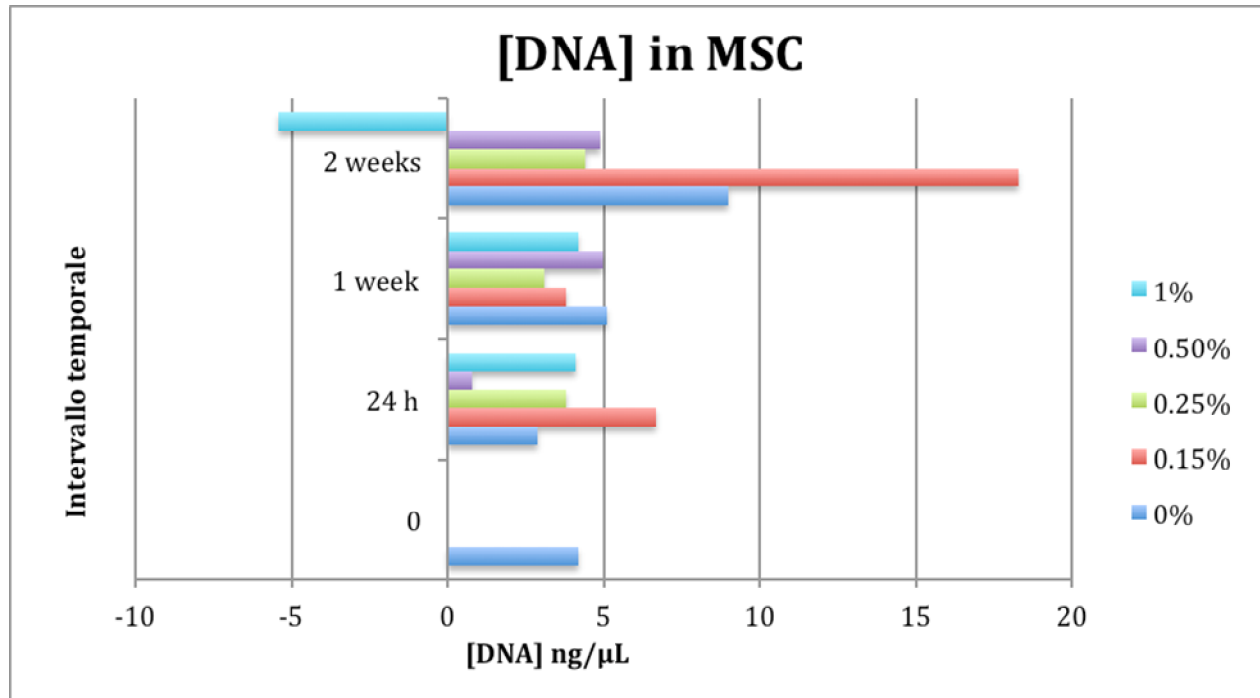


Figura 3.31. Diagramma a barre raffigurante l’andamento dei valori di DNA in ng/μL ai vari gradi di densità peptidica e nei vari intervalli temporali per le cellule staminali mesenchimali MSC.

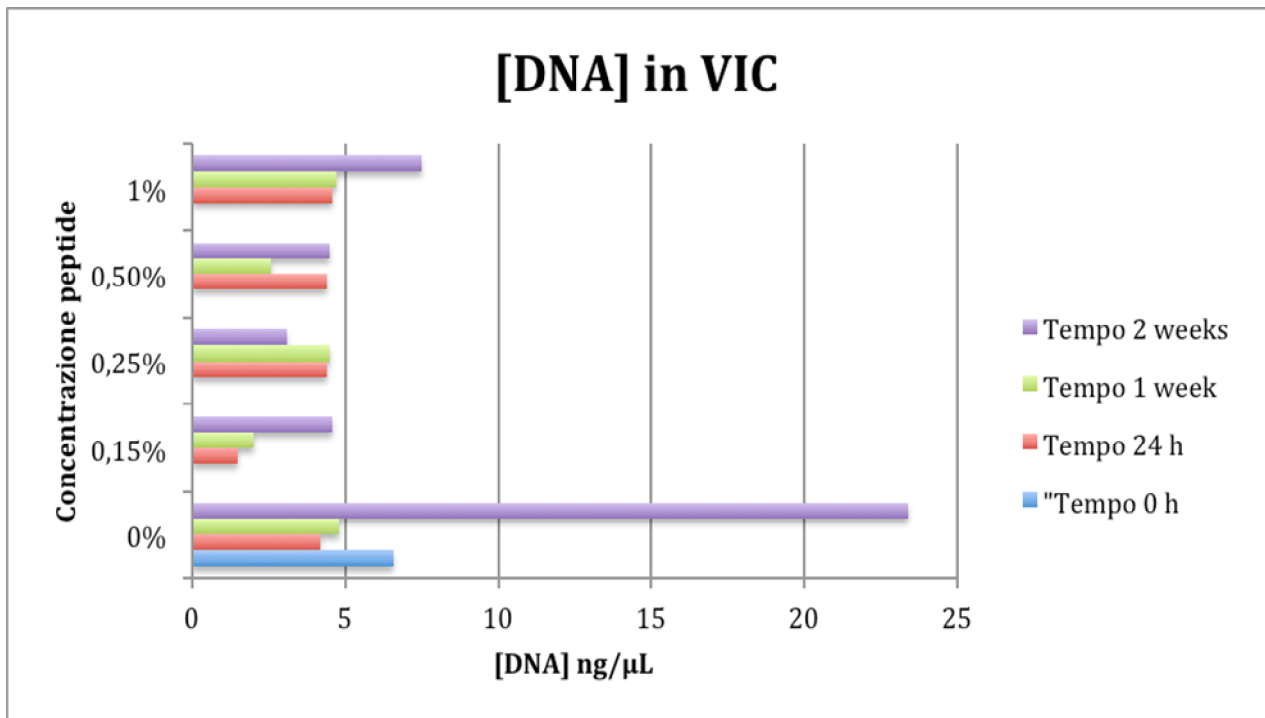


Figura 3.32. Diagramma a barre raffigurante l'andamento dei valori di DNA in ng/μL ai vari gradi di densità peptidica e nei vari intervalli temporali per le cellule valvolari interstiziali VIC.

Dalla lettura di questi dati il risultato che spicca maggiormente è il notevole incremento nel valore di DNA [ng/μL] che presenta il pozzetto in assenza di idrogel. Andando però ad osservare i campioni in cui era presente lo *scaffold* idrogelico, si nota come per basse concentrazioni di peptide auto-assemblante (0.15% w/v) i valori di DNA presentano un incremento abbastanza lineare nel tempo, presentando un valore di 1.5 ng/μL dopo 24 ore dalla semina, crescendo poi fino a 4.6 ng/μL trascorse due settimane. Si può pensare quindi che le cellule abbiano gradito il substrato a concentrazione 0.15% w/v. Per concentrazioni maggiori, 0.25% w/v e 0.5% w/v, gli andamenti dei valori di DNA nel tempo presentano andamenti abbastanza costanti, senza presentare sostanziali miglioramenti nell'adesione cellulare. L'idrogel a concentrazione 0.25% w/v manifesta addirittura un calo nel valore di DNA trascorse 2 settimane. Presenta invece un miglioramento soddisfacente nei valori di DNA l'idrogel a concentrazione 1% w/v trascorse due settimane. Dopo un andamento costante nei valori di adesione cellulare registrati dopo 24 ore e dopo una settimana, si nota un incremento da 4.7 ng/μL a 7.5 ng/μL, dato in disaccordo con quanto osservato nel caso delle MSC. Verrà eseguito in seguito un secondo esperimento di semina cellulare, utilizzando solo cellule valvolari interstiziali bovine (VIC bovine) per confrontare l'effetto nell'adesione e proliferazione cellulare che presentano idrogeli realizzati con solo peptide auto-assemblante EAbuK, idrogeli realizzati con peptide EAbuK arricchito con la sequenza adesiva RGD e idrogeli realizzati con

peptide EAbuK arricchito con il fattore di crescita IGF-1. Per eseguire l'esperimento si è deciso di utilizzare il peptide auto-assemblante EAbuK alla concentrazione 0.15% w/v, concentrazione che ha manifestato i risultati migliori in questo primo esperimento di semina cellulare.

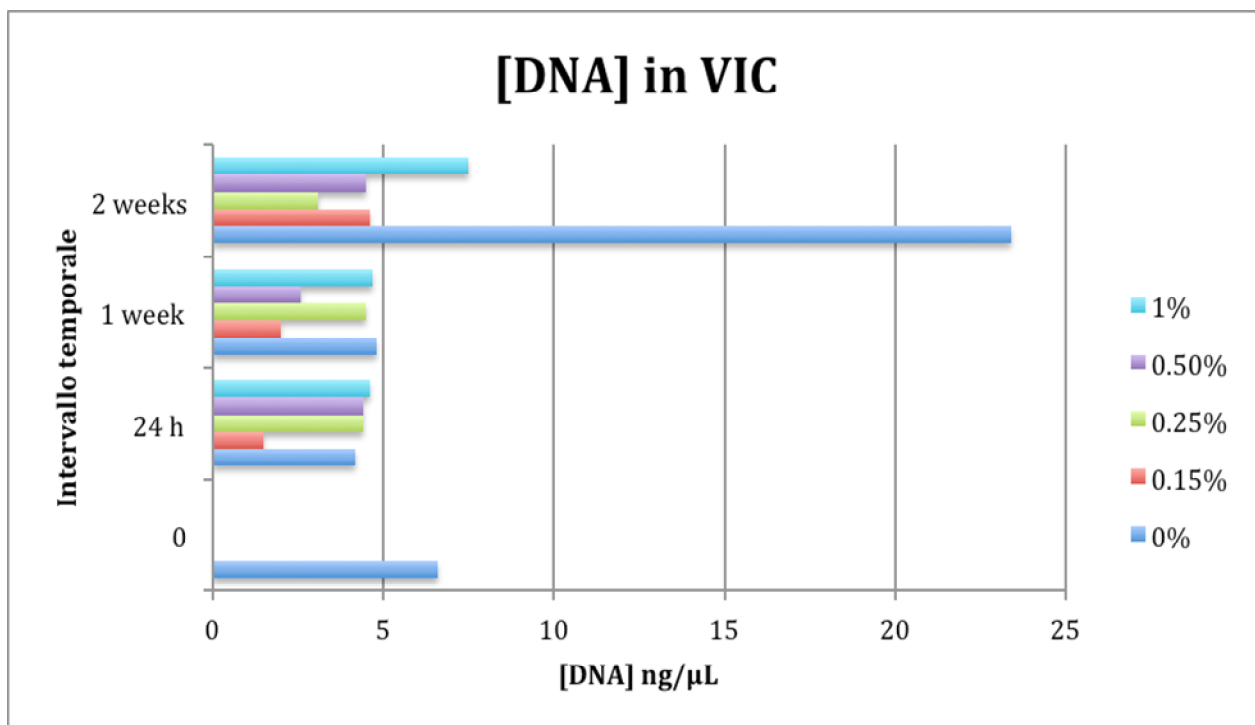


Figura 3.33. Diagramma a barre raffigurante l'andamento dei valori di DNA in ng/μL ai vari gradi di densità peptidica e nei vari intervalli temporali per le cellule valvolari interstiziali VIC.

3.5.2 Scaffold di EAbuK arricchiti con sequenza RGD e IGF-1

E' stato eseguito un secondo esperimento volto a valutare il grado di adesione e proliferazione cellulare su diversi substrati realizzati con idrogeli di peptide auto-assemblante EAbuK arricchiti con la sequenza adesiva RGD e con il fattore di crescita IGF-1.

L'esperimento è stato condotto utilizzando le cellule valvolari interstiziali bovine VIC, e impostando ciascun campione in triplicato, in modo da poter ottenere un dato statistico affidabile.

Procedura sperimentale:

Sono stati pesati 30.12 mg di peptide auto-assemblante EAbuK e sciolti in 2 mL di H₂O MilliQ ottenendo una soluzione di concentrazione 1.5% w/v (soluzione M₀); la soluzione è stata poi filtrata

a 0.22 μm per sterilizzarla. Come terreno di cultura per le VIC è stato utilizzato il *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM).

Sono stati messi a confronto nove diversi substrati caratterizzati da idrogeli realizzati con:

- ✓ il solo peptide auto-assemblante EAbuK a concentrazione 0.15% w/v;
- ✓ il solo peptide EAbuKa concentrazione 0.25% w/v;
- ✓ il peptide EAbuK (0.15% w/v) arricchito con la sequenza adesiva RGD a concentrazione molare 10^{-5} M;
- ✓ il peptide EAbuK (0.15% w/v) arricchito con la sequenza adesiva RGD a concentrazione molare 10^{-6} M;
- ✓ il peptide EAbuK (0.15% w/v) arricchito con la sequenza adesiva RGD a concentrazione molare 10^{-7} M;
- ✓ il peptide EAbuK (0.15% w/v) arricchito con il fattore di crescita IGF-1 a concentrazione molare 10^{-6} M;
- ✓ il peptide EAbuK (0.15% w/v) arricchito con il fattore di crescita IGF-1 a concentrazione molare 10^{-7} M;
- ✓ il peptide EAbuK (0.15% w/v) arricchito con il fattore di crescita IGF-1 a concentrazione molare 10^{-8} M;
- ✓ il peptide EAbuK arricchito con il peptide EAK-RGD in proporzioni 1:1.

Campioni con EAbuK a 0.25% w/v (9 pozzetti): sono stati prelevati 180 μL di soluzione M_0 e diluiti con 180 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio; in ogni pozzetto sono stati poi introdotti 40 μL di questa soluzione diluita e addizionati con 80 μL di medium (DMEM).

Campioni con EAbuK a 0.15% w/v (9 pozzetti): sono stati prelevati 1500 μL di soluzione M_0 e diluiti con 750 μL di H_2O MilliQ per ottenere una soluzione a concentrazione 1% w/v (soluzione M_1). Sono stati poi prelevati 180 μL di soluzione M_1 e diluiti con 180 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio; in ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di quest'ultima soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM).

Campioni con EAbuK a 0.15% w/v + EAbuK-RGD: sono stati pesati 0,6 mg di peptide EAbuK-RGD e sciolti in 60 μL di H_2O MilliQ ottenendo una soluzione 1% w/v (soluzione M_2).

- Concentrazione $\text{C}_1=10^{-5}$ M: è stata preparata una soluzione contenente 21 μL di M_2 , 203 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio e 182 μL di M_1 ; la soluzione ottenuta è stata filtrata. In ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi saranno presenti:
 - 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
 - 18 μL di M_1 ;
 - 2 μL di M_2 ;
 - 80 μL di DMEM.

- Concentrazione $\text{C}_2=10^{-6}$ M: 10 μL di M_2 sono stati diluiti 1:10 aggiungendo 90 μL di H_2O MilliQ ottenendo la soluzione M_3 ; è stata poi preparata una soluzione contenente 21 μL di M_3 , 203 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio e 182 μL di M_1 . La soluzione ottenuta è stata filtrata; in ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi ranno presenti:
 - 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
 - 18 μL di M_1 ;
 - 2 μL di M_3 ;
 - 80 μL di DMEM.

- Concentrazione $\text{C}_3=10^{-7}$ M: 10 μL di M_3 ed è stata ulteriormente diluita 1/10 aggiungendo 90 μL di H_2O MilliQ, ottenendo alla fine la soluzione M_2 diluita 1/100 (soluzione M_4); è stata poi preparata una soluzione contenente 21 μL di M_4 , 203 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio e 182 μL di M_1 . La soluzione ottenuta è stata filtrata; in ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi ranno presenti:
 - 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
 - 18 μL di M_1 ;

- 2 μL di M_4 ;
- 80 μL di DMEM.

Campioni con EAbuK a 0.15% w/v + IGF-1: 10 mg di IGF-1 sono stati sciolti in 1000 μL di H_2O MilliQ ottenendo una soluzione a concentrazione 1% w/v (soluzione M_5) poi filtrata.

- Concentrazione $C_1=10^{-6}$ M: 10 μL di M_5 sono stati diluiti 1:20 aggiungendo 190 μL di H_2O MilliQ; è stata poi preparata una soluzione contenente 18 μL di M_5 diluita 1/20 (soluzione M_6), 180 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio e 162 μL di M_1 . In ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi ranno presenti:
 - 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
 - 18 μL di M_1 ;
 - 2 μL di M_6 ;
 - 80 μL di DMEM.
- Concentrazione $C_1=10^{-7}$ M: 10 μL di M_6 sono stati ulteriormente diluiti 1/10 aggiungendo 90 μL di H_2O MilliQ, ottenendo la soluzione M_7 ; è stata poi preparata una soluzione contenente 18 μL di M_7 , 180 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio e 162 μL di M_1 . In ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi ranno presenti:
 - 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
 - 18 μL di M_1 ;
 - 2 μL di M_7 ;
 - 80 μL di DMEM.
- Concentrazione $C_1=10^{-8}$ M: 10 μL di M_7 sono stati ulteriormente diluiti 1/10 aggiungendo 90 μL di H_2O MilliQ, ottenendo la soluzione M_8 ; è stata poi preparata una soluzione contenente 18 μL di M_8 , 180 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio e 162 μL di M_1 . In ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi ranno presenti:

- 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
- 18 μL di M_1 ;
- 2 μL di M_8 ;
- 80 μL di DMEM.

Campioni a concentrazione 0.15% w/v (50% EAbuK + 50% EAK-RGD): sono stati sciolti 2,1 mg di peptide EAK-RGD in 200 μL di H_2O MilliQ ottenendo una soluzione a concentrazione 1% w/v (soluzione M_9); a questa soluzione sono stati addizionati 200 μL di M_1 e 400 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio, filtrando poi la soluzione finale. In ogni pozzetto sono stati introdotti 40 μL di questa soluzione e addizionati con 80 μL di medium (DMEM). In ogni pozzetto quindi ranno presenti:

- 20 μL di H_2O MilliQ all'8% di glucosio;
- 10 μL di M_1 ;
- 10 μL di M_9 ;
- 80 μL di DMEM.

Sono stati preparati anche dei pozzetti di riferimento, nei quali sono state seminate le cellule VIC in assenza di substrati caratterizzati da idrogeli di peptide auto-assemblanti. Terminata la preparazione tutti i pozzetti sono stati incubati per 60 minuti a 37.5°C. Al termine dei 60 minuti, necessari alla gelificazione dei substrati, sono state risospese in 10 mL di DMEM 500 000 cellule VIC; una volta rimosso il *medium*, in ogni pozzetto sono stati inseriti circa 100 μL di DMEM contenente circa 5000 cellule VIC bovine.

3.5.3 Risultati e discussione

Per valutare l'adesione e la proliferazione delle cellule VIC bovine su tali substrati si è deciso di eseguire l'estrazione del DNA da ciascun pozzetto a diversi step temporali: dopo 24 ore, dopo una settimana e dopo due settimane. Al termine di ogni intervallo temporale è stato raccolto il contenuto di ciascun pozzetto, estratto il DNA, e utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis *Nanodrop* è stato rilevato lo spettro di assorbanza in modo da ottenere una quantificazione accurata della densità ottica del campione. Si è ottenuto così un dato correlabile alla quantità di DNA presente nei vari pozzetti.

Time Point	Substrato	Medie DNA [ng]	Deviazione standard
24 h	0% EAbuK	238.3	40.1
24 h	0.15% EAbuK	235.0	56.8
24 h	0.25% EAbuK	215.0	42.7
24 h	0.15% EAbuK + RGD 10^{-5} M	188.3	24.7
24 h	0.15% EAbuK + RGD 10^{-6} M	211.7	32.5
24 h	0.15% EAbuK + RGD 10^{-7} M	133.3	20.2
24 h	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-6} M	225.0	58.9
24 h	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-7} M	191.7	53.5
24 h	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-8} M	225.0	44.4
24 h	EAbuK/EAK-RGD	165.0	67.3
1 week	0% EAbuK	546.7	63.3
1 week	0.15% EAbuK	265.0	78.6
1 week	0.25% EAbuK	221.7	47.3
1 week	0.15% EAbuK + RGD 10^{-5} M	333.3	66.0
1 week	0.15% EAbuK + RGD 10^{-6} M	271.7	36.9
1 week	0.15% EAbuK + RGD 10^{-7} M	368.3	109.7
1 week	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-6} M	301.7	20.8
1 week	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-7} M	258.3	44.8
1 week	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-8} M	256.7	7.6
1 week	EAbuK/EAK-RGD	320.0	44.4
2 weeks	0% EAbuK	468.3	27.5
2 weeks	0.15% EAbuK	396.7	71.5
2 weeks	0.25% EAbuK	348.3	58.0
2 weeks	0.15% EAbuK + RGD 10^{-5} M	520.0	13.2
2 weeks	0.15% EAbuK + RGD 10^{-6} M	471.7	73.2
2 weeks	0.15% EAbuK + RGD 10^{-7} M	435.0	39.7
2 weeks	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-6} M	463.3	98.8
2 weeks	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-7} M	585.0	147.3
2 weeks	0.15% EAbuK + IGF-1 10^{-8} M	406.7	41.9
2 weeks	EAbuK/EAK-RGD	485.0	17.3

Tabella 3.4. Medie e deviazioni standard in [ng] di DNA presenti ai vari intervallo temporali (24 h, 1 week, 2 weeks) dalla semina delle VIC.

In Tabella 3.5 sono riportati i valori relativi al DNA presente nei vari pozzetti ai diversi intervalli temporali di indagine.

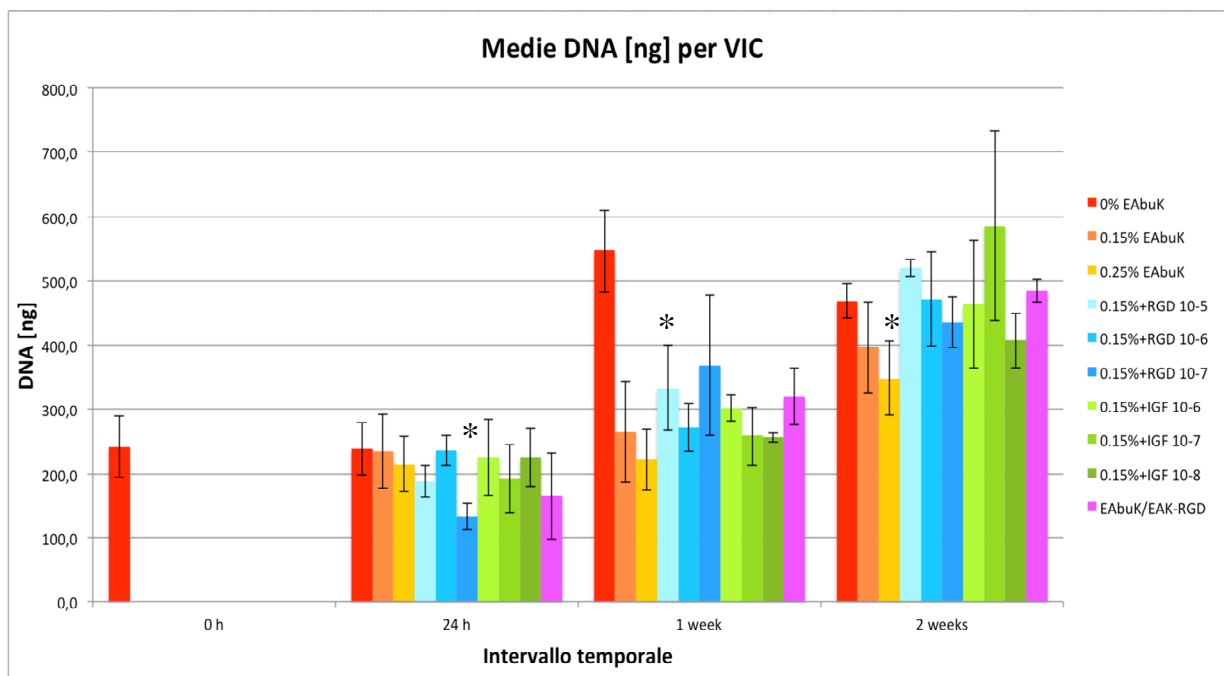


Figura 3.34. Istogramma raffigurante gli andamenti delle medie e deviazioni standard dei valori di DNA in [ng] per i diversi substrati utilizzati e nei vari intervalli temporali per le cellule valvolari interstiziali VIC. * = $p < 0.05$ vs 0.15% EAbuK, t-test di Student.

La maggior parte dei biomateriali polimerici attualmente in uso nella *tissue engineering* quanto nella medicina rigenerativa solitamente presentano strutture microfibrose. Poiché la maggior parte delle cellule hanno dimensioni tra i 5 e i 10 μm , risultano dunque simili o più piccole delle microfibre dei materiali di diametro compreso tra 10 e 100 μm [41]. In base a questa considerazione possiamo ritenere che, nella fase di adesione, le cellule interagiscano con una superficie di tipologia bidimensionale avente un raggio di curvatura che dipende dal diametro della fibra specifica. I materiali polimerici debbono inoltre essere spesso funzionalizzati per potere promuovere le attività biologiche desiderate tramite reazioni chimiche o ricorrendo a *coating*. Inoltre, a causa della loro scala micrometrica, possiedono caratteristiche biomeccaniche che prevengono quell'adattamento strutturale dovuto alle forze esercitate dalle cellule durante la loro adesione, migrazione e maturazione. Possiamo dunque concludere che tali microfibre forniscono uno *scaffold* artificiale che è ancora lontano dall'obiettivo ovvero la matrice extracellulare nanostrutturata e naturale.

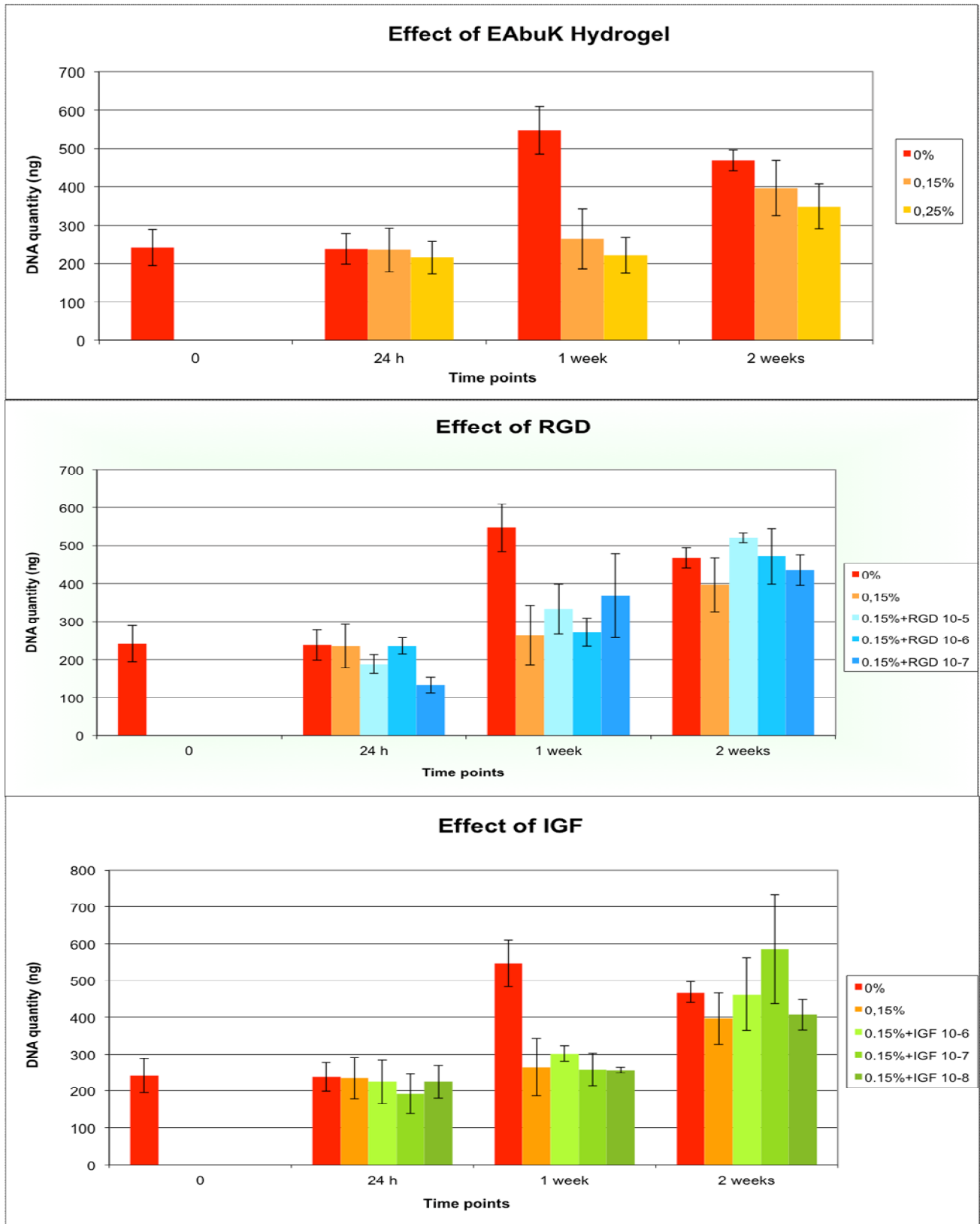


Figura 3.35. *Istogrammi raffiguranti gli andamenti delle medie e deviazioni standard dei valori di DNA in [ng]; effetto del solo idrogel di EAbuK, effetto dell'idrogel arricchito con la sequenza adesiva RGD ed effetto dell'idrogel arricchito con l'IGF-1.*

Le matrici di nanofibre intrecciate sono materiali di grande interesse per il rilascio controllato di molecole bioattive e di cellule viventi, specialmente quando la formazione dello *scaffold* avviene in condizioni fisiologiche senza l'impiego di solventi organici. In questi termini le matrici di peptidi auto-assemblanti (SAP) offrono un'alternativa promettente. I SAP possono venire funzionalizzati con motivi bioattivi e prodotti ad elevato grado di purezza ad un costo ragionevole. Nella progettazione di sistemi nanofibrosi di SAP ogni "ingrediente" dello *scaffold* può essere definito e combinato a fattori solubili in un vero supporto tridimensionale. In questo caso i recettori cellulari possono legare motivi funzionali in un contesto 3D veramente simile all'ECM naturale. In un contesto 2D infatti, solo una parte del corpo cellulare è in contatto con la superficie e l'aggregazione dei recettori (*clustering*) può venire indotta. Nel nostro caso specifico utilizziamo un sistema cellulare, le cellule vascolari interstiziali, di forma affusolata e di lunghezza di circa 100 μm su uno *scaffold* di peptidi auto-assemblanti di diametro compreso tra i 10 e i 100 μm , dunque le cellule sicuramente non interagiscono con l'idrogel come se si trattasse di una superficie bidimensionale [41].

I vantaggi di utilizzare matrici di SAP sono molteplici [41]:

- I peptidi sono progettabili e modificabili a livello di un singolo amminoacido o gruppo funzionale, inoltre sono economici. Tale livello di modifica è assolutamente inattuabile su *scaffold* come il Matrigel o altri *scaffold* polimerici. Il Matrigel è un substrato artificiale per l'adesione cellulare contenente laminina, collagene IV, eparan solfato, proteoglicani e entactina. Il Matrigel viene prodotto come miscela gelatinosa di proteine da cellule di sarcoma di topo.
- A differenza del Matrigel, che contiene componenti incogniti e la cui qualità varia da *batch* a *batch*, gli *scaffold* di SAP sono sintetici di provenienza e biologici di natura, contengono componenti puri e hanno composizione completamente definita.
- Possono essere utilizzati per studi sull'espressione genica e sui processi di *signaling* cellulare.
- Il loro processo di aggregazione non è indotto da variazioni di temperatura che potrebbero danneggiare le cellule.
- Sono facilmente funzionalizzabili e biorisorbibili. I prodotti di degradazione (α -amminoacidi) possono essere riutilizzati dal corpo.

Dai saggi cellulari sopra descritti si possono fare delle osservazioni sia per quanto riguarda la fase di adesione cellulare sugli *scaffold*, sia riguardo i processi di migrazione e proliferazione cellulare.

Osservazioni sull'adesione cellulare (24 h):

- ✓ Le cellule aderiscono all'idrogel allo 0.15% in modo analogo rispetto alla superficie della piastra di riferimento (0% EAbuK). Il dato è positivo in quanto si tratta di una superficie ottimizzata per facilitare l'adesione cellulare. Nella fase di adesione (24 h) le cellule sembrano preferire l'idrogel allo 0.15% rispetto a quello allo 0.25% anche se la differenza non risulta essere significativa.
- ✓ La concentrazione di coniugato RGD intermedia mantiene l'adesione a livelli dell'idrogel allo 0.15%. Il dato è migliore rispetto a quello di EAbuK/EAK-RGD pur a fronte di una concentrazione di RGD maggiore nell'idrogel EAbuK/EAK-RGD. Sembra questo essere in accordo con la presenza di intervalli finestra in cui la concentrazione di RGD ottimizza l'adesione più che un effetto lineare dose-dipendente. Ci si attendeva comunque un effetto più marcato della sequenza RGD nella fase di adesione cellulare (24 h) che non si è verificato. Gli idrogeli arricchiti con IGF-1 presentano un comportamento simile a quello dello allo 0.15% come atteso in quanto IGF-1 non è una molecola adesiva.

Osservazione sulla migrazione e sulla proliferazione cellulare (1-2 weeks):

- ✓ Un incremento nel contenuto di DNA si evidenzia a una settimana e ancora di più a due settimane.
- ✓ Facendo un confronto tra VIC su idrogeli arricchiti e idrogelo allo 0.15% a una settimana possiamo dire che:
 - a) Gli idrogeli arricchiti con la sequenza adesiva RGD sembrano favorire maggiormente la proliferazione. Il dato medio più elevato è quello con RGD alla concentrazione inferiore (10^{-7} M) ma possiede una deviazione standard elevata.
 - b) L'arricchimento con IGF-1 sembra favorire la proliferazione. Il dato medio più elevato è quello con IGF-1 alla concentrazione di 10^{-6} M.
 - c) Anche l'idrogel EAbuK/EAK-RGD restituisce un risultato medio superiore alla media del controllo (0.15%).
- ✓ Facendo un confronto tra VIC su idrogeli arricchiti e idrogelo allo 0.15% a 2 settimane possiamo dire che:

- a) L'arricchimento con RGD produce maggior proliferazione rispetto al controllo a tutte le concentrazioni; l'azione è maggiore alla concentrazione 10^{-5} M di coniugato.
 - b) L'arricchimento con IGF-1 produce un incremento di proliferazione a tutte le concentrazioni rispetto al controllo. La concentrazione maggiormente bioattiva sembra quella intermedia (10^{-6} M) anche se presenta una deviazione standard elevata.
 - c) Anche l'idrogel EAbuK/EAK-RGD migliora la proliferazione rispetto al controllo.
- ✓ A due settimane tutti gli idrogeli decorati con sequenze adesive o arricchiti con IGF-1 migliorano la colonizzazione di cellule VIC rispetto al solo idrogel allo 0.15%. In taluni casi (coniugato RGD a 10^{-5} M; IGF-1 a 10^{-6} M) si supera la proliferazione ottenuta su superficie ottimizzata per l'adesione (0% EAbuK). I dati sembrano dunque promettenti andranno confermati con studi al microscopio confocale in grado di mostrare non solo il numero di cellule ma soprattutto la loro morfologia. Per quanto riportato all'inizio di questa discussione ci si attende infatti che le strutture nanofibrose dei SAP riescano a riprodurre una struttura 3D molto simile alla matrice extracellulare in grado di regolare lo *spreading* e l'orientamento cellulare in modo più naturale e sicuramente diverso da quanto può fare una superficie bidimensionale.

Conclusioni

Gli studi condotti nel presente lavoro di tesi hanno permesso di ottenere matrici di peptidi auto-assemblanti quali substrati per cellule vascolari interstiziali in vista di un utilizzo degli idrogeli come *filler* per protesi di valvole aortiche decellularizzate.

Le principali conclusioni che possiamo trarre dai dati sperimentali ottenuti in questo lavoro di tesi sono brevemente riassunte di seguito:

- ✓ Mentre la sintesi e purificazione del peptide auto-assemblante EAbuK non ha avuto alcun problema particolare, la sintesi del coniugato tra la sequenza SAP e un peptide adesivo di 25 residui via ossima mediante *chemoselective ligation* ha portato ad ottenere un coniugato di massa sperimentale inferiore all'atteso per circa 85 Da. Su tale prodotto purificato sono in corso analisi NMR che potrebbero confermare l'esistenza di un riarrangiamento non ancora noto né mai descritto in letteratura.
- ✓ La caratterizzazione degli *scaffold* di idrogeli ha confermato quanto riportato in letteratura su peptidi dello stesso tipo, secondo cui le matrici sono costituite da reticoli 3D di nanofibre intrecciate tra loro. Questo dato è stato confermato sia dalle immagini al SEM sia dalle immagini e dalle misurazioni ottenute da analisi AFM.
- ✓ Non c'è in letteratura alcuna pubblicazione che riguardi l'interazione tra cellule VIC e idrogeli di SAP.
- ✓ Dai saggi biologici si evince che i substrati realizzati con gli idrogeli presentano dei miglioramenti nei processi di proliferazione e migrazione cellulare, soprattutto dopo 2 settimane dalla semina. Si può vedere come la prestazione dello *scaffold* realizzato con il solo peptide EAbuK sia paragonabile a quella garantita dalla superficie della piastra di cultura (*tissue-culture plate*), che consiste una superficie polimerica bidimensionale ottimizzata per favorire processi di adesione e proliferazione cellulare.
- ✓ Gli idrogeli di peptide auto-assemblante EAbuK, arricchiti con la sequenza adesiva RGD e con il fattore di crescita IGF-1, favoriscono la proliferazione cellulare. I risultati più soddisfacenti si riscontrano a due settimane dalla semina alla

concentrazione di 10^{-5} M per l'arricchimento con il coniugato RGD, e alla concentrazione di 10^{-6} M per il fattore di crescita IGF-1.

Nomenclatura

ECM = matrice extra cellulare

PGA = acido poliglicolico

PLA = acido polilattico

PHA = poliidrossialcanoato

P4HB = poli-4-idrossibutirrato

OPN = osteopontina

BSP = sialoproteina dell'osso

IGFs = *insuline-like growth factors*

GH = ormone della crescita

VIC = *valve interstitial cells*

MSC = *mesenchymal stem cells*

A / Ala = alanina

C / Cys = cisteina

D / Asp = acido aspartico

E / Glu = acido glutammico

G / Gly = glicina

H / His = istidina

K / Lys = lisina

N / Asn = asparagina

P / Pro = prolina

R / Arg = arginina

S / Ser = serina

T / Thr = treonina

V / Val = valina

Y / Tyr = tirosina

W / Trp = triptofano

Abu = acido 2-amminobutirrico

PLP = pirossidal-5-fosfato

AFM = *atomic force microscope*

SEM = *scanning electron microscope*

HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato

HOBt = 1-idrossibenzotriazolo

NMP = N-metil-2-pirrolidone

TFA = acido trifluoroacetico

DCM = diclorometano

DMF = N,N-dimetilformammide

TES = trietilsilano

PBS = soluzione tampone fosfato
P₂O₅ = anidride fosforica
CH₃CN = acetonitrile
UV/VIS = ultravioletto/visibile
HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*
SPPS = *Solid Phase Peptide Synthesis*
RP-HPLC = *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*
Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile
ESI = *ElectroSpray Ionization*
TOF = *Time Of Flight*
MALDI = *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
SAP = *self-assembling peptide*
DIPEA = N,N-diisopropiletilammina
OtBu = *ter*-butilossi
t-Boc = *ter*-butilossicarbonile (abbreviato Boc)
Boc = vedi *t*-Boc
PM = peso molecolare
eq = equivalenti
C / c = concentrazione molare [M]
A = area [cm]
*A*_λ = assorbanza [-]
*w*_t = peso del campione [g]
m = massa [g]
n = numero di moli [mol]
V = volume [cm³] o [mL]
s = spessore [cm]
P = peso del campione [g]
b = cammino ottico [cm]
Dev. St. = deviazione standard
*t*_R = tempo di ritenzione [sec]
ρ = densità [g/mL]
λ = lunghezza d'onda [nm]
*λ*_{max} = lunghezza d'onda di massimo assorbimento [nm]
*ε*_λ = coefficiente di estinzione molare [M⁻¹cm⁻¹]
DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
α-MEM = *Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification*
DNA = acido desossiribonucleico

Riferimenti bibliografici

1. C. Di Bello, A. Bagno, *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Patron Editore, Bologna (2009).
2. Murphy W.L. et al. (1999) *J. Periodontal Res.* 34, 413-419.
3. Whitaker M.J. et al. (2001) *J. Pharm. Pharmacol.* 54,1427-1437.
4. Richardson T.P. et al. (2001) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 11, 47-58.
5. Babensee J.E. et al. (1999) *Pharm. Res.* 17, 497-504.
6. R. Gambaretto, *Peptidi per la progettazione di biomateriali innovativi: sintesi e studi conformazionali*, Dottorato di ricerca in scienze chimiche, Facoltà di scienze matematiche, fisiche, naturali, Napoli (2005).
7. Vacanti J.P. et al. (1999) *Lancet*, 354, 32-34.
8. Vasely I. et al.: *Heart valve tissue engineering*. *Cir. Res.* 2005; 97: 743-755.
9. Flameng W. Et al.: *A new approach to heart valve tissue engineering*. *International Journal of Cardiology*. 2004; 95: 55-56.
10. Knight R.L., Wilcox H.E., Korossis S.A., Fischer J., Ingham E.: *The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves*. *J. Engineering on medicine*. 2008; 222: 129-143.
11. Simon, Kasimir, Seebacher, Weigel, Ullrich, Salzer-Muhar, Rieder, Wolner: *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2003; 23: 1002-6.
12. Stamm, Khosravi, Grabow, Schmohl, Treckmann, Drechsel, Nan, Schmitz, Haubold, Steinhoff: *Biomatrix/Polymer Composite Material for Heart Valve Tissue Engineering*. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 78: 2084-93.
13. Alberts B. *Biologia molecolare della cellula* (III ed.) Zanichelli (1995).

14. Gallina G.: *Progettazione, realizzazione e caratterizzazione di superfici biomimetiche osteoinduttive per applicazioni protesiche*. Tesi di laurea in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali. Università di Padova. 2011.
15. Michael E Davis, Patrick C H Hsieh, Tomosaburo Takahashi, Qing Song, Shuguang Zhang, Roger D Kamm, Alan J Grodzinsky, Piero Anversa, Richard T Lee, *Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction*, PNAS, 103, 8155-8160 (2006).
16. S. Zhang, *Emerging biological materials through molecular self-assembly*, Biotech. Adv, 20, 321-339, (2002).
17. F. Turella, *Nano-Scaffold di polimeri naturali e sintetici per l'ingegneria tessutale: preparazione e caratterizzazione*, Laurea Specialistica in Scienza ed Ingegneria dei Materiali, Dipartimento di Ingegneria Meccanica, settore Materiali, Padova (2008).
18. Gambaretto R., Tonin L, Di Bello C., Dettin M., *Self-Assembling Peptides: Sequence, Secondary Structure in solution and Film Formation*. Biopolymers (2008), 89: 906-915.
19. *User Manual*, Model 431A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystem (ed.), versione 1.12.
20. Todd C. Holmes, Sonsoles de Lacalle, Xing Su, Guosong Liu, Alexander Rich, Shuguang Zhang, *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2000), 97pp. 6728-6733.
21. Melitta Schachner, *Neurobiology: Nervous engineering*, Nature 405, (2000), pp. 747-748.
22. Michael E. Davis, J.P. Michael Motion, Daria A. Narmoneva, Tomosaburo Takahashi, Daihiko Hakuno, Roger D. Kamm, Shuguang Zhang, Richard T. Lee, *Injectable Self-Assembling Peptide Nanofibers Create Intramyocardial Microenvironments for Endothelial Cells*, Circulation (2005) 111, pp. 442-450.

23. J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A. J. Grodzinsky, *Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2002) 99, pp. 9996-10001.
24. Shao J., Tam J.P., *Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages* (1995) J. Am. Chem. Soc., 117, 3893-3899.
25. Canne L.E., Botti P., Simon R.J., Chen Y., Dennis E.A., Kent S.B.H., *Chemical Protein Synthesis by Solid Phase Ligation of Unprotected Peptide Segments* (1999) J. Am. Chem. Soc., 121, 8720-8727.
26. Rose. K., *Facile synthesis of homogeneous artificial proteins* (1994) J. Am. Chem. Soc., 116, 30-33.
27. Kalia J., Raines R.T., *Hydrolytic stability of hydrazones and oximes* (2008) Angew. Chem. Int. Ed., 47, 7523-7526.
28. Gilmore J.M., Scheck R.A., Esser-Kahn A.P., Joshi N.S., Francis M.B., *N-terminal protein modification through a biomimetic transamination reaction* (2006) Angew. Chem. Int. Ed., 45, 5307-5311.
29. Scheck R.A., Dedeo M.T., Iavarone A.T., Francis M.B., *Optimization of a biomimetic transamination reaction* J. Am. Chem. Soc. (2008), 130, 11762-11770.
30. Fields G.B., Noble R.L.: *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*. Int. J. Pept. Prot. Res. 1990; 35: 161-214.
31. Carpino L.A. Han G.Y.: *The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group*. J. Org. Chem. 1972; 37: 3404-3409.
32. Fields C.G., Lloyd D.H., Macdonald R.L., Ottenson K.M., Noble R.L.: *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*. Peptide Research. 1991; 4: 95-101.
33. Ball H.L., Mascagni P. : *Chemical synthesis and purification of protein: amethodology*. Int. J. Peptide Protein Res. 1996; 48: 31-47.

34. Siuzdak G., *The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11290-11297.
35. Zhaoyang Ye, Hangyu Zhang, Hanlin Luo, Shunkang Wang, Qinghan Zhou, Xinpeng Du, Chengkang Tang, Liyan Chen, Jingping Liu, Ying-Kang Shi, Er-Yong Zhang, Rutledge Ellis-Behnke and Xiaojun Zhao: *Temperature and pH effects on biophysical and morphological properties of self-assembling peptide RADA16-I*. Journal of peptide science. 2008; 14: 152-162.
36. Jingping Liu, Lanlan Zhang, Zehong Yang, Xiaojun Zhao: *Controlled release of paclitaxel from a self-seembling peptide hydrogel formed in situ and antitumor study in vitro*. International Journal of Nanomedicine 2011; 6: 2143-2153.
37. Hui meng, Liyan Chen, Zhaoyang Ye, Songtao Wang, Xiaojun Zhao: *The effect of a self-assembling peptide nanofiber scaffold (peptide) when used as a wound dressing for the treatment of deep second degree burns in rats*. Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials. 2009; volume 89B, 2, 379-391.
38. Baichuan Wang, Yongchao Wu, Zengwu Shao, Shuhua Yang, Biao Che, Caixia Sun, Yannan Zhang: *Functionalized self-assembling peptide nanofiber hydrogel as a scaffold for rabbit nucleus pulposus cells*. Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 2012; Volume 100A, 3, 646-653.
39. Zhenwei Zou, Qixin Zheng, Yongchao Wu, Xiaodong Guo, Shuhua Yang, Jingfeng Li, Haitao Pan: *Biocompatibility and bioactivity of designer self-assembling nanfiber scaffold containig FGL motif for rat dorsal root ganglion neurons*. Wiley Online Library, 2010.
40. Vesely I. *Heart valve tissue engineering*. Circ Res 2005; 97:743-55.
41. Fabrizio Gelain, Daniele Bottai, Angelo Vescovi, Shuguang Zhang: *Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffold for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Culteres*. 2006; PLoS ONE 2006; 1, e119.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno assistito e aiutato nella realizzazione di questo lavoro di tesi: la prof.ssa Monica Dettin, per la grande pazienza, professionalità e gentilezza dimostrata lungo tutti questi mesi di lavoro; Annj Zamuner, per avermi controllato durante le pratiche di laboratorio, evitando che combinassi troppi danni!

Ringrazio la dott.ssa Sabrina Facciolo per il grande lavoro svolto nella parte biologica di questo elaborato.

Ringrazio di cuore i miei genitori, Anna e Edoardo, per la fiducia incondizionata che hanno sempre mostrato nei miei confronti, assecondando ogni mia decisione e permettendomi di condurre la mia carriera di studente senza farmi mancare mai nulla.

Ringrazio i miei fratelli, Matteo e Giampaolo, che a loro modo hanno saputo aiutarmi in questi lunghi anni di studio, chi spronandomi a studiare di più e chi ricordandomi che la vita non è fatta di soli libri!

Devo senz'altro ringraziare il Toni e il Gian, per la preziosa compagnia e collaborazione nelle eterne giornate di studio trascorse tra le mura della Jappelli e della biblioteca di ingegneria.

Infine un ringraziamento doveroso va a Marco e Vale, per la bellissima amicizia che mi lega a loro da tantissimi anni e per l'aiuto e l'affetto che mi hanno sempre dimostrato nei momenti difficili.