



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI PROCESSI CHIMICI DELL'INGEGNERIA

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI
PROCESSI INDUSTRIALI**

**PROGETTAZIONE, REALIZZAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE DI SUPERFICI BIOMIMETICHE
OSTEOINDUTTIVE PER APPLICAZIONI PROTESICHE**

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Correlatore: Dott.ssa. Paola Brun

Laureando: GIANLUCA GALLINA

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012

Riassunto

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sulla preparazione e la valutazione di superfici metalliche biomimetiche osteoinduttive.

Le superfici sono costituite da dischetti di titanio silanizzato, funzionalizzate covalentemente con sequenze peptidiche auto-assemblanti, cioè particolari molecole che sono in grado di auto-aggregarsi, formando strutture fibrose gradite ai sistemi cellulari.

Allo strato iniziale, sono state poi adsorbite altre molecole di auto-assemblanti, arricchite o meno di peptidi aggreganti coniugati covalentemente con fattori adesivi (RGD) o fattori di crescita (IGF-1).

Si è testata la capacità delle cellule del tessuto osseo (osteoblasti) di aderire alle matrici, e di proliferare sulle stesse; valutando così il substrato migliore.

La finalità pratica degli esperimenti, è di creare delle superfici biomimetiche e bioattive gradite alle cellule, che possano apportare dei miglioramenti in campo protesico.

Indice

Riassunto.....	I
Indice.....	III
Capitolo 1 - Introduzione.....	1
1.1 Storia e sviluppo dei biomateriali.....	1
1.2 Biomateriali per la rigenerazione del tessuto osseo.....	2
1.3 Cellule del tessuto osseo.....	3
1.4 Adesione cellulare e proteine di adesione.....	5
1.5 Sequenze adesive: RGD e HVP.....	5
1.6 Peptidi auto-assemblanti.....	6
1.7 Fattore di crescita IGF-1.....	8
1.8 <i>Chemoselective</i> ligation via ossima.....	9
1.9 Scopo della tesi.....	10
Capitolo 2 – Materiali e metodi.....	11
2.1 Materiali.....	11
2.1.1 Reagenti.....	11
2.1.2 Peptidi e proteine per la funzionalizzazione.....	13
2.1.3 Strumentazione.....	14
2.2 Metodi.....	16
2.2.1 Sintesi peptidica in fase solida.....	16
2.2.1.1 Test di funzionalizzazione della resina.....	18
2.2.1.2 Attivazione del gruppo carbossilico.....	20
2.2.1.3 Test alla ninidrina.....	20
2.2.1.4 Sblocco del peptide dalla resina.....	22
2.2.2 Cromatografia RP-HPLC.....	23
2.2.3 Spettrometria di massa.....	25
2.2.4 Spettroscopia UV/Vis.....	28
2.2.5 Test MTT.....	30
2.2.6 Spettrometria elettronica per analisi chimiche.....	30
2.2.7 Misura dell'angolo di contatto.....	32
Capitolo 3 – Parte sperimentale.....	33
3.1 Sintesi peptidica.....	33
3.1.1 Sintesi del peptide EAbuK.....	33
3.1.1.1 Sequenza.....	33
3.1.1.2 Sintesi del peptide su fase solida.....	33
3.1.1.3 Caratterizzazione del peptide grezzo.....	34
3.1.1.4 Deprotezione del gruppo Fmoc dall'amminoacido N-terminale.....	36

3.1.1.5	Acetilazione	36
3.1.1.6	Sblocco del peptide su resina senza rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali	37
3.1.2	Sintesi del peptide Aoa-EAbuK.....	37
3.1.2.1	Sequenza	37
3.1.2.2	Sintesi.....	37
3.1.2.3	Caratterizzazione del peptide grezzo	39
3.2	Chemoselective ligation.....	40
3.2.1	Coniugazione tra Aoa-EAbuK e (GRGDSP) ₄ K.....	41
3.2.1.1	Preparazione di (GRGDSP) ₄ K-chetone	41
3.2.1.2	Sblocco di Aoa-EAbuK dalla resina	43
3.2.1.3	Preparazione del coniugato EAbuK-RGD	44
3.2.2	Coniugazione tra Aoa-EAbuK e HVP	49
3.2.2.1	Preparazione di HVP-chetone.....	49
3.2.2.2	Sblocco di Aoa-EAbuK dalla resina	52
3.2.2.3	Preparazione del coniugato EAbuK-HVP.....	53
3.3	Preparazione dei dischetti di titanio	55
3.3.1	Preparazione della superficie	55
3.3.1.1	Prima ossidazione	55
3.3.1.2	Seconda ossidazione	55
3.3.1.3	Silanizzazione	56
3.3.2	Funzionalizzazione dei dischetti	57
3.3.2.1	Descrizione dei substrati	57
3.3.2.2	Campioni delle diverse superfici e loro preparazione.....	59
3.4	Saggi biologici	63
3.4.1	Coltura cellulare.....	63
3.4.2	Semina delle cellule	63
3.4.3	Test di adesione cellulare.....	64
3.4.4	Test di proliferazione cellulare	64
Capitolo 4	– Risultati e discussione	65
4.1	Analisi XPS.....	65
4.2	Bagnabilità	71
4.3	Risultati del test di adesione cellulare.....	72
4.4	Risultati del test di proliferazione cellulare	74
Conclusioni	76
Abbreviazioni	77
Bibliografia	79
Ringraziamenti	83

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Storia e sviluppo dei biomateriali

Si definiscono i biomateriali come: “*materiali sintetici progettati per un uso prolungato a contatto con i mezzi biologici, che minimizzano le eventuali reazioni avverse da parte dell’organismo*” [3].

Biomateriali sono dunque tutti quei materiali specificatamente progettati o utilizzati in applicazioni biomediche che costituiscono i componenti delle protesi.

La necessità di utilizzare protesi per riparare o sostituire parti del corpo umano esiste fin dall’antichità: all’interno di numerosi scavi etruschi sono state trovate protesi dentarie in metallo; risalgono all’antico Egitto esempi di protesi di legno e pelle che riproducono alluci artificiali; il chirurgo, anatomista padovano Fabrizio d’Acquapendente (1533-1616) in un suo trattato sull’apparato visivo parla di occhio artificiale: “*Per correggere la deformità che residua all’enucleazione o la perdita di un occhio, bisogna rimpiazzarlo con un occhio di vetro, di pietra, d’argento o di un’altra materia che sia il più possibile rassomigliante per colore, forma e grandezza. Se l’occhio è rimosso interamente bisogna adattare uno sferico; se ne rimane una parte, bisogna applicare un guscio concavo in vetro*” [4].

Risale alla guerra civile americana il caso, divenuto classico, di una frattura del femore di un soldato fissata con un chiodo da carpentiere in ferro.

Gli esempi elencati finora costituiscono biomateriali di prima generazione. 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* che *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 [5].

In questo lavoro si considera in particolare il caso dei biomateriali per dispositivi endossei e quindi destinati a contatto diretto e permanente con il tessuto osseo (per es., protesi articolari di anca spalla o ginocchio, viti e supporti per implantologia orale o altre applicazioni ortopediche).

1.2 Biomateriali per la rigenerazione del tessuto osseo

I materiali metallici risultano particolarmente adatti alla costruzione di strutture capaci di sopportare carichi senza il rischio di grandi deformazioni elastiche; per questo sono adatti alla sostituzione di tessuti duri come ossa e denti. La biocompatibilità è legata al potere corrosivo dei fluidi biologici nei loro confronti; la corrosione può determinare il rilascio di ioni metallici *in situ* e nel tempo il loro accumulo in altri distretti dell'organismo. In particolare, per le caratteristiche di biocompatibilità, resistenza alla corrosione (garantita da uno strato di TiO_2 che si forma spontaneamente per contatto con l'aria o attraverso passivazione chimica) e per le eccellenti proprietà meccaniche il titanio e le leghe di titanio sono da tempo materiali molto utilizzati in chirurgia orale, maxillo-facciale e ortopedica.

È stato dimostrato che la rugosità delle superfici influenza la capacità di adesione delle cellule dell'osso; si può affermare che la misura dei "difetti" superficiali del materiale deve essere almeno dello stesso ordine di grandezza delle cellule che vengono adsorbite (μm) e delle proteine che vi aderiscono (nm).

Per ottenere la rugosità desiderata, la superficie di titanio viene ricoperta con un materiale che presenta rugosità di dimensioni ottimali. I trattamenti possibili possono essere di tipo meccanico (sabbatura), fisico (plasma spray), chimico (ossidazione) e altri ancora [6].

Oltre ad apportare modifiche dirette al materiale, si cerca di modificarne la superficie con molecole organiche in grado di "colloquiare" con le cellule del tessuto ospite.

È dunque necessario veicolare proteine o piccole sequenze peptidiche all'interfaccia tra ambiente biologico e materiale.

Questo può avvenire in modi diversi:

1. attraverso l'adsorbimento superficiale delle molecole biologicamente attive;
2. includendo le biomolecole all'interno di un vettore riassorbibile (di solito un materiale polimerico) che viene poi impiegato come rivestimento della superficie, veicolando le molecole. Il rilascio avviene nel tempo durante la degradazione della matrice del vettore;
3. ancorando le molecole alla superficie attraverso un legame covalente.

Le molecole possono essere ancorate direttamente o attraverso l'introduzione di una molecola con funzione di spaziatore, che permette di esporre meglio la biomolecola alle cellule conferendo maggiori gradi di libertà orientazionale [7].

Nelle superfici metalliche, solitamente il numero di gruppi funzionali in superficie non è adeguato, per questo, solitamente, il metallo viene ossidato in modo da aumentare il numero di gruppi ossidrilici.

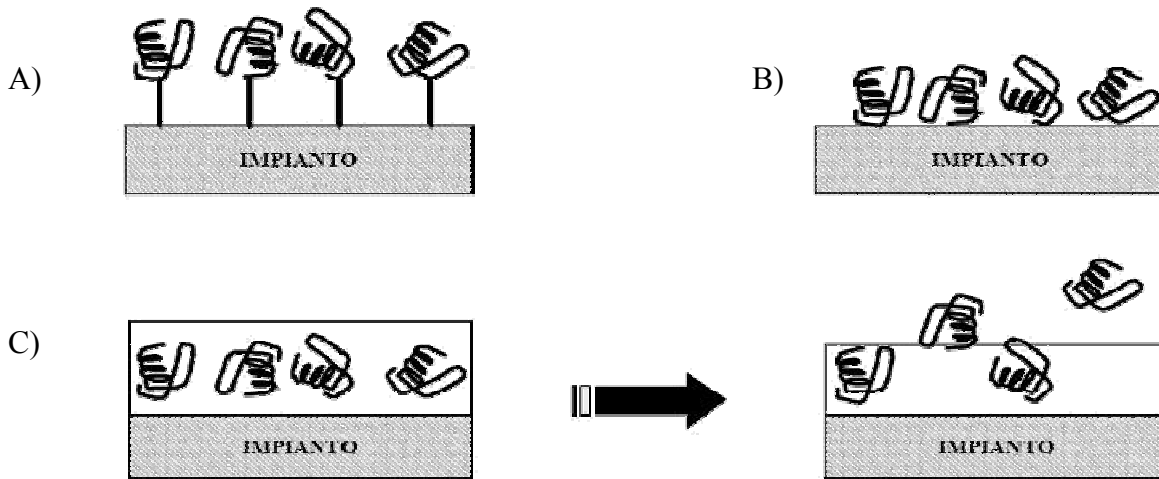


Figura 1.1: Ancoraggio mediante legame covalente con spacer (A), per adsorbimento (B) e rilascio da carrier di una proteina (C).

In assenza di particolari accorgimenti, peptidi e proteine si legano ai gruppi funzionali della superficie in maniera casuale: non è possibile controllare quale gruppo funzionale la singola biomolecola utilizzi per la formazione del legame covalente. Questo provoca una orientazione non uniforme delle biomolecole in superficie, che possono quindi esporre o meno il sito di legame verso i recettori cellulari.

Si può ovviare a questo inconveniente facendo ricorso a tecniche di **immobilizzazione covalente specifica** grazie alle quali si inducono tutte le molecole a legarsi alla superficie utilizzando il medesimo gruppo funzionale.



Figura 1.2: immobilizzazione covalente aspecifica e specifica

1.3 Cellule del tessuto osseo

Le cellule del tessuto osseo responsabili della sintesi dei componenti della matrice, sono gli osteoblasti: tali cellule sono costantemente impegnate nelle fasi di formazione dell'osso e nella sintesi dei componenti molecolari che andranno a costituire sia le fibre che le glicoproteine della matrice extracellulare (ECM).

Quando hanno esaurito la loro funzione, gli osteoblasti entrano in uno stato di quiescenza, oppure rimangono intrappolati nella matrice ossea calcificata trasformandosi in cellule meno attive, dette

osteociti. Questi, nel loro insieme, costituiscono circa il 90% del patrimonio cellulare osseo. Pertanto, gli osteociti rappresentano un successivo momento funzionale di una stessa cellula.

Un altro tipo di cellule del tessuto osseo sono gli osteoclasti; una tipologia di cellule deputata a produrre e secernere enzimi che degradano la matrice calcificata, permettendo il riassorbimento dell'osso. Questi enzimi entrano in gioco sia nei processi di crescita, durante i quali è necessaria la sostituzione del tessuto osseo immaturo in tessuto osseo lamellare adulto, sia per permettere le successive rimodellazioni dell'osso.

Oltre che da cellule, il tessuto osseo è costituito da una abbondante matrice di natura proteica, prodotta dalle cellule del tessuto e nella quale le cellule stesse sono disperse. Si riconoscono componenti organiche (30-35%) ed inorganiche (65-70%).

La frazione organica della matrice ossea è formata da una componente fibrillare, costituita da fasci intrecciati di fibre proteiche (collagene), e da una componente amorfa di natura proteoglicanica.

L'elemento organico più abbondante è il collagene di tipo I, organizzato in fibre, con funzione di supporto (matrice) per la sedimentazione di sali durante il processo di mineralizzazione. Altri componenti proteici (osteocalcina, osteonectina, osteopontina) modulano il processo di formazione, mineralizzazione ed adesione tra le cellule e la matrice ossea.

Oltre a proteoglicani e collagene, nella matrice sono presenti glicoproteine di vario tipo, che hanno per lo più ruolo di proteine di adesione.

Tra queste, particolarmente importanti sono:

- *l'osteonettina*. È la più abbondante tra le proteine del tessuto osseo. Si ritiene che agisca come elemento di enucleazione dei cristalli minerali e che dia luogo così all'avvio della precipitazione del fosfato di calcio;
- *la fosfatasi alcalina (alkaline phosphatase protein, ALP)*. È un enzima capace di idrolizzare i gruppi fosfato legati a substrati organici, attivo in ambiente alcalino. Si pensa che abbia un ruolo attivo nei processi di mineralizzazione, mettendo a disposizione ioni fosfato per la formazione di cristalli minerali.
- *la fibronettina*. È una macromolecola di adesione, localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare; è caratterizzata da una porzione capace di legarsi al collagene. Si ritiene che la fibronettina sia coinvolta nei processi di migrazione, di adesione alla matrice e di organizzazione delle cellule ossee.

Gli elementi minerali presenti nella matrice ossea, costituiscono un'impalcatura dura e compatta essenziale per le funzioni di sostegno e di locomozione proprie dell'osso stesso. Tale componente minerale è costituita principalmente da calcio, combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno a formare una molecola cristallina definita idrossiapatite [1,2].

1.4 Adesione cellulare e proteine di adesione

Nei meccanismi di interazione e riconoscimento cellulare, svolgono un ruolo fondamentale le **integrine**. Si dice integrina, una glicoproteina integrale di membrana che lega le proteine della matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM), in particolare le fibronettine. Svolge un ruolo nel collegamento della cellula con la matrice extracellulare (ECM) e nella trasduzione del segnale dalla ECM alla cellula.

Le integrine sono eterodimeri obbligati contenenti due distinte catene, chiamate subunità α (alpha) e β (beta), entrambe caratterizzate da un ampio dominio extracellulare, una zona idrofobica immersa nella membrana, e una corta coda citoplasmatica. Attraverso le differenti combinazioni di queste subunità alpha e beta, sono generate 24 forme diverse di integrine.

Una sequenza di amminoacidi riconosciuta da questi importanti recettori è Arg-Gly-Asp (RGD), presente in molte proteine della ECM come vitronectina, fibrinogeno, laminina, trombospondina, entactina, tenascina, osteopontina, sialoproteina ossea e collagene [8].

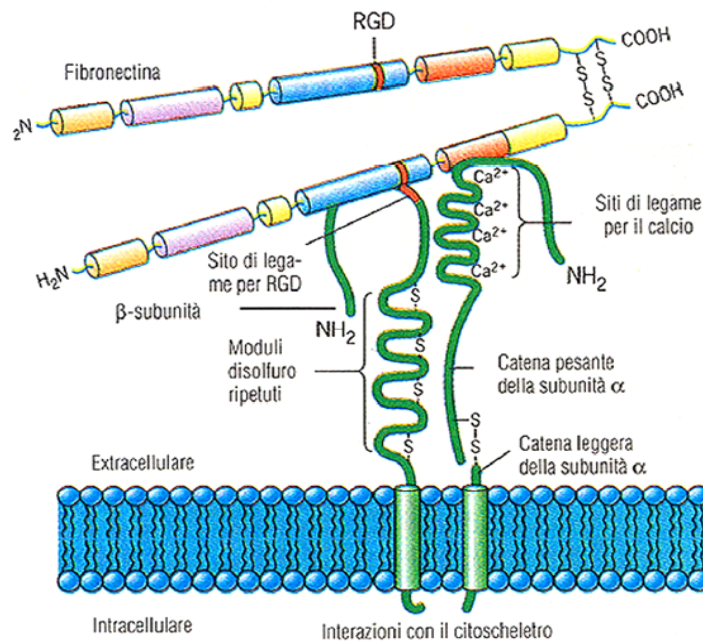


Figura 1.3: raffigurazione del legame integrina-fibronectina mediante riconoscimento del motivo RGD.

1.5 Sequenze adesive: RGD e HVP

I peptidi RGD sono catene aminoacidiche di varia lunghezza, a partire da semplici tripeptidi, caratterizzate dalla presenza nella loro struttura della sequenza Arginina-Glicina-Acido Aspartico (le lettere RGD rappresentano le abbreviazioni di questi tre aminoacidi nel codice ad una lettera).

Questa sequenza aminoacidica è presente ubiquitariamente nell'organismo ed è coinvolta in numerose funzioni fisiologiche. È importante per la sua abilità nell'attivare più di un tipo di

recettore cellulare per l'adesione (integrine) e per l'impatto biologico su cellule ancoraggio-dipendenti per quanto riguarda sia l'adesione che il comportamento e la sopravvivenza.

L'attività del tripeptide è legata anche al blocco del terminale carbossilico o alla presenza di amminoacidi che fiancheggiano la sequenza.

L'attività varia come segue: GRGDSP > RGDS > RGD amide-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.

È stato verificato che tale sequenza è in grado di promuovere l'adesione di osteoblasti di teca cranica di ratto neonato e di osteoblasti da midollo osseo di ratto adulto in maniera più efficace rispetto a sequenze più brevi o a molecole ramificate contenenti 8 sequenze segnale [9].

L'HVP (*Human Vitronectin Precursor*) è un nonapeptide che mappa la sequenza (352-360) della vitronectina umana.

L'HVP configura un sito di legame per l'eparina, e si suppone che promuova un meccanismo di adesione mediato dai glicosamminoglicani, diverso da quello che coinvolge sequenze RGD ed integrine. Dalton B.A. et al [10] hanno dimostrato che i siti di legame per l'eparina sono riconosciuti dalle cellule derivate da tessuto osseo. I siti di legame per l'eparina sono presenti in poche proteine della matrice extracellulare, principalmente nella fibronectina e nella vitronectina, e mostrano *pattern* di gruppi carichi che vanno ad interagire con i proteoglicani di membrana degli osteoblasti [11].

1.6 Peptidi auto-assemblanti

Una nuova frontiera negli *scaffolds* per la crescita di cellule, è costituita dalle matrici di peptidi auto-assemblanti.

I peptidi auto-assemblanti sono una particolare classe di molecole caratterizzate dalla capacità di organizzarsi in strutture ordinate mediante la creazione di legami non covalenti quali le forze di *Van der Waals*, legami idrogeno e ionici, ed interazioni idrofobiche.

Tali molecole permettono di ottenere strutture bi- o tri- dimensionali da utilizzare per promuovere le interazioni cellula-cellula multidimensionali ed incrementare la densità cellulare.

La vasta gamma dei peptidi auto-assemblanti è stata suddivisa da Zhang [39] 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 [12].

In questo lavoro vengono utilizzati peptidi appartenenti al Tipo I, detti peptidi auto-assemblanti ionico-complementari. Questi peptidi sono caratterizzati dall'alternanza di residui amminoacidi con carica positiva e residui con carica negativa separati da residui idrofobici. I peptidi appartenenti a questa classe in genere assumono, 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 e una faccia idrofobica. Grazie ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico numerosi piani di β -sheet possono assemblarsi in strutture tridimensionali (figura 3.4). Il processo di auto-assemblaggio dipende fortemente dalla sequenza peptidica, dalla concentrazione, dal pH, dalla presenza di sali e dal tempo.

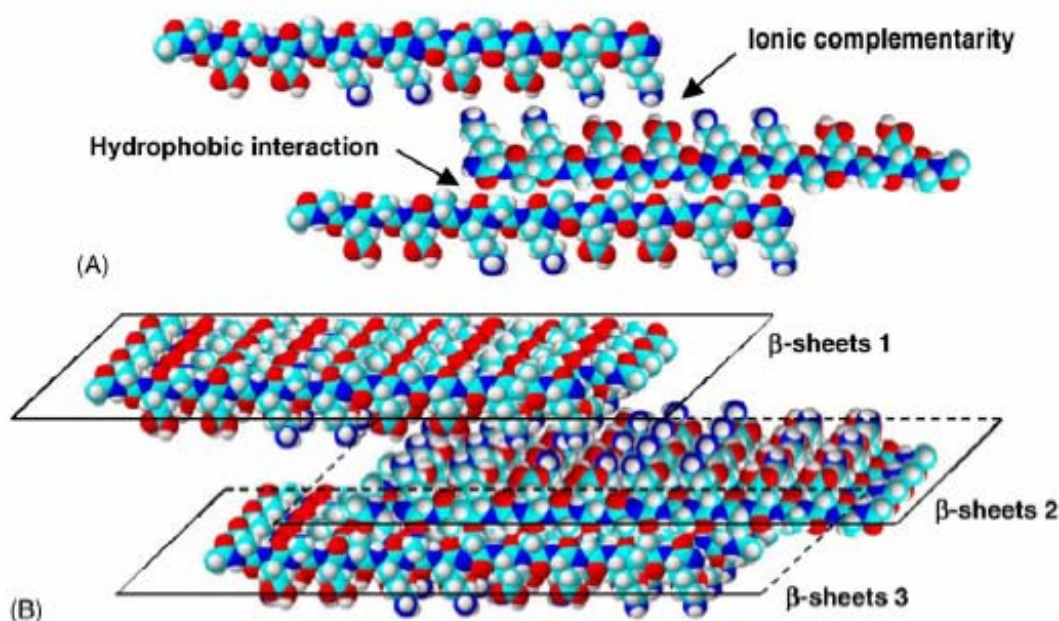


Figura 1.4: (A) Schema di auto-assemblaggio del peptide autoassemblante EAK 16-II attraverso interazioni idrofobiche e ionico-complementari. (B) Modello proposto per l'auto-assemblaggio del peptide EAK 16-II tramite aggregati basati sui β -sheet. In aggiunta ai legami idrogeno, le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche aiutano a stabilizzare i β -sheet.

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 sale utilizzato sembra giocare un ruolo importante nell'indurre il processo di auto-assemblaggio: l'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$.

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 [13].

Le modificazioni proposte non hanno riguardato nessun cambiamento nel *pattern* tipico dei peptidi auto-assemblanti (alternanza di residui polari e apolari e periodicità dei residui carichi).

In questa tesi è stato utilizzato il peptide EAbuK, in cui il residuo idrofobico Ala (A) è stato sostituito con acido α -ammino butirrico (Abu).

Peptidi auto-assemblanti hanno trovato applicazione (i) quali substrati per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi [14,15]; (ii) quali promotori di nanofibre iniettabili per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali [16]; (iii) come *scaffold* per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine [17].

I peptidi auto-assemblanti sono stati studiati come biomateriali potenzialmente utili nelle terapie di ripristino del tessuto osseo, in quanto forniscono risultati migliori del MatrigelTM nel promuovere la rigenerazione ossea su difetti cronici prodotti in topi [18]. 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 Fattore di crescita IGF-1

I fattori di crescita insulino-simili, noti anche come IGF (acronimo di *insulin-like growth factor*) o somatomedine, sono un gruppo di ormoni peptidici dalle proprietà anaboliche, prodotti dal fegato sotto lo stimolo dell'ormone della crescita (GH) prodotto dall'ipofisi.

Ne esistono due isoforme.

- IGF-1 (somatomedina C o SM-C) è massimo in pubertà e diminuisce con la vecchiaia. Esso è strettamente GH dipendente.
- IGF-2 (somatomedina A o SM-A) è presente soprattutto nella vita fetale, ed è solo parzialmente GH dipendente.

Le somatomedine sono i mediatori dell'ormone della crescita (GH) nell'osso, nella cartilagine, nel muscolo scheletrico, e in generale sulla proteosintesi. A livello dell'osso stimolano la sintesi di collagene di tipo VI e IX, proteine di legame e la proliferazione cellulare; a livello di altri organi o tessuti stimolano la proteosintesi, la sintesi di DNA e RNA, l'aumento del numero e della dimensione cellulare [40].

Come tutti gli ormoni di natura proteica anche l'IGF-1 ha bisogno di specifici recettori cellulari per espletare la propria azione. Tali recettori si concentrano soprattutto in alcuni tessuti come quello muscolare, osseo, cartilagineo, cutaneo, nervoso e renale. La loro attività è molto simile a quella dei recettori per l'insulina e non a caso, una piccola quota di somatomedina viene captata proprio dai recettori insulinici.

IGF-1 è stato utilizzato per incrementare la proliferazione di cellule cardiache, coadiuvato da una matrice di peptici autoassemblanti [41].

1.8 Chemoselective ligation via ossima

La bioconiugazione consiste nel legare covalentemente biomolecole a supporti solidi oppure nel coniugare due o più biomolecole per ottenere un complesso avente le proprietà combinate dei suoi componenti.

Si parla di *Chemoselective ligation* quando vengono coniugate covalentemente due molecole biologiche in un mezzo acquoso e in condizioni blande, senza l'utilizzo di sostanze attivanti, ma semplicemente per reazione selettiva tra un gruppo presente nel peptide e un altro gruppo specifico localizzato in una proteina o in un altro peptide.

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

Francis *et al* [19] 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 (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 [20].

La transaminazione con PLP prevede la condensazione del gruppo amminico N-terminale della proteina con piridossal-5-fosfato e la successiva idrolisi per formare piruvammide (figura 1.5). Poi per reazione della proteina_{chetone/aldeide} con un'ossiammina si ha la formazione di un'ossima (figura 1.6).

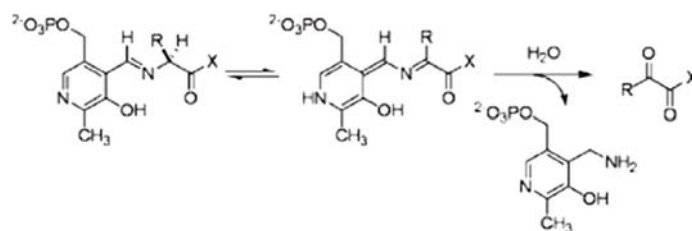


Figura 1.5: Formazione di piruvamide

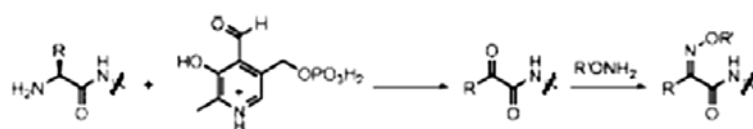


Figura 1.6: Schema generale della transaminazione N-terminale mediata da PLP con la successiva formazione dell'ossima.

Lo scopo della maggior parte delle procedure di coniugazione delle proteine è creare prodotti stabili con un buon mantenimento dello stato nativo e dell'attività biologica. Idealmente, qualunque

derivatizzazione dovrebbe dare come risultato una proteina che si comporta esattamente come la sua forma immodificata, ma con una funzionalità aggiunta impartita da ciò che vi è coniugato. In questo progetto, la tecnica della *chemoselective ligation* è stata utilizzata per coniugare il peptide autoassemblante AoaEabuK con il chetone della sequenza adesiva (GRGDSP)₄K, ed in un secondo momento con il chetone della sequenza adesiva HVP.

1.9 Scopo della tesi

La presente tesi ha come scopo la preparazione di superfici metalliche biomimetiche osteoinduttive. In particolare molecole in grado di auto-aggregarsi, formando strutture fibrose gradite ai sistemi cellulari, verranno legate covalentemente alla superficie metallica previa ossidazione e silanizzazione della stessa.

Alla superficie funzionalizzata covalentemente con le sequenze auto-assemblanti verranno poi legate per self-assembling altre molecole di auto-assemblanti arricchite o meno di peptidi aggreganti coniugati covalentemente con fattori adesivi (nel nostro caso motivi RGD ripetuti linearmente) o arricchite o meno di fattori di crescita (nel nostro caso la proteina IGF-1) inglobati nell'idrogel di auto-assemblanti.

Utilizzando il sistema dell'auto-aggregazione si intendono formare strati di fibre nanometriche che mimino la matrice extracellulare e che possano essere arricchiti in segnali biochimici specifici a differenti concentrazioni.

Il lavoro di tesi proposto si articolerà nelle seguenti attività:

1. sintesi del peptide auto-assemblante da ancorare in modo specifico e selettivo alla superficie metallica silanizzata;
2. sintesi, purificazione e caratterizzazione della sequenza auto-assemblante da coniugare covalentemente in modo specifico e selettivo ai gruppi N-terminali del fattore adesivo debitamente modificati;
3. preparazione, purificazione e caratterizzazione del coniugato covalente tra sequenza auto-assemblante e fattore adesivo;
4. preparazione dei dischetti in titanio funzionalizzati covalentemente e in modo specifico con i peptidi auto-assemblanti;
5. preparazione dei dischetti descritti al punto 4 ulteriormente arricchiti con strati di auto-assemblante anche addizionati nel coniugato auto-assemblante-fattore di adesione;
6. preparazione dei dischetti descritti al punto 4 ulteriormente arricchiti con strati di auto-assemblante e IGF-1;
7. caratterizzazione chimico-fisica dei campioni mediante XPS, AFM e determinazione dell'angolo di contatto in collaborazione con il Prof. G. Marletta (Università di Catania) e la Prof.ssa G. Iucci (Università Roma Tre);
8. caratterizzazione biologica mediante saggi di adesione e proliferazione con osteoblasti umani in collaborazione con il Prof. I. Castagliuolo e la Dott.ssa P. Brun (Università di Padova).

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

Prodotti forniti dalla ditta *Advanced Biotech Italia* (Milano, Italia):

- HoBt;
- HBTU.

Prodotti forniti dalla *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germania):

- TES;
- Acetone;
- APTES;
- H₂SO₄;
- HCl;
- MTT;
- Acetonitrile;
- Metanolo;
- P₂O₅;
- Acido acetico
- DMF;
- Toluene;
- PLP.

I prodotti forniti dalla ditta *Applied Biosystems* (Perkin-Elmer, Analytical Instruments, Norwalk, CT, USA) sono:

- I reagenti per il test alla ninidrina:
 - Monitor 1: soluzione al 76% (w/w) fenolo/etanolo;
 - Monitor 2: soluzione 0,2 mM di KCN/piridina;
 - Monitor 3: soluzione 0,28 M ninidrina/etanolo.

Prodotti forniti dalla *Carlo Erba* (Milano, Italia):

- metanolo;
- sodio fosfato monobasico.

Prodotti forniti dalla *Biosolve* (Valkenswaard, Olanda)

- NMP;
- TFA;
- Piperidina.

Prodotti forniti dalla *Novabiochem* (Langelfingen, Svizzera):

- tutti gli amminoacidi protetti.

Prodotti forniti dalla *Prolabo* (Parigi, Francia):

- H₂O₂;
- KOH.

Prodotti forniti dalla *Gibco* (Paisley, UK):

- terreno di coltura cellulare DMEM;
- RPMI 1640;
- 5% Trypsin EDTA.

Prodotto fornito dalla ditta *Merck* (Darmstadt, Germania):

- idrossido di sodio;
- HCl.

2.1.2 Peptidi e proteine per la funzionalizzazione

I peptidi utilizzati per la funzionalizzazione covalente specifica delle superfici sono:

(GRGDSP)₄K

(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

Già disponibile.

HVP

(PM: 1232.43 Da)

Sequenza:

H-Phe-Arg-His-Arg-Asn-Arg-Lys-Gly-Tyr-NH₂

Già disponibile.

EAbuK

(PM: 1728.332 Da)

Sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-OH

Preparato nel corso della tesi.

AoaEAbuK

(PM: 1800.392 Da)

Sequenza:

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

Preparato nel corso della tesi.

AoaEAbuK-RGD

(PM: 4205.902 Da)

Sequenza:

Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Arg-Gly -Pro-Ser-Asp-Gly-Arg-Gly -Pro-Ser-Asp-Gly-Arg-Gly -Pro-Ser-Asp-Gly-Arg-Gly-CO-CH=N-O-CH₂-CO-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys- NH₂

Preparato nel corso della tesi.

IGF-1

(PM: 7649 Da)

Sequenza:

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMY

Prodotto fornito dalla *Increlex* (Boulogne-Billancourt, Francia)

2.1.3 Strumentazione

Sintesi su fase solida

Per la sintesi dei peptidi è stato utilizzato un sintetizzatore automatico prodotto dalla *MultiSynTech* (Witten, Germania) modello Syro I (Fig. 3.1).



Figura 2.1: Sintetizzatore Syro I

Test alla ninidrina

Per condurre la reazione a 100°C è stato impiegato un blocco termico fabbricato dalla *Pierce* (Rockford, IL, USA), modello Reacti-Therm heating module, mentre l'assorbimento delle soluzioni è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 della *Perkin Elmer* (Waltham, MA, USA).

Cromatografia

L'acqua utilizzata in cromatografia è stata bidistillata con un sistema messo a punto dalla ditta *Cecchinato* (Mestre, Italia), desalificata e privata degli organici con il sistema MilliQ della *Waters* (Milford, MA, USA).

Per la purificazione e l'analisi dei peptidi sono stati utilizzati i seguenti sistemi cromatografici:

- HPLC Waters 600E System Controller, munito di autocampionatore modello 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487.

L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Empower (*Waters*);

- HPLC Waters 600 Controller, munito di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. L'acquisizione dei dati è stata eseguita tramite un registratore distribuito dalla *Carlo Erba Strumentazione* e prodotto dalla *Kipp & Zonen* (Delft, Olanda) modello BD40/BD41 Recorder.

Le colonne utilizzate sono le seguenti:

- Delta-Pak C₁₈ semipreparativa (15 µm, 100 Å, 7,8 × 300 mm) fornita dalla *Waters* ;
- Zorbax C₁₈ semipreparativa (5 µm, 100 Å, 9,4 × 250 mm) fornita dalla *Agilent* (Santa Clara, California);
- Symmetry Shield C₈ analitica (5 µm, 60 Å, 4,6 × 250 mm) fornita dalla *Waters*;
- Nova-Pak C₁₈ analitica (4 µm, 60 Å, 3,9 × 150 mm) fornita dalla *Waters*.

Analisi di massa

Le analisi di massa effettuate dal Dott. D. Dalzoppo, del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova, 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 (*PerSeptive Biosystems*, Framingham, MA, USA).

Chemoselective ligation

Per mantenere la miscela di reazione a 37°C per 24 h è stato utilizzato un riscaldatore da banco prodotto dalla *Boekel Scientific* (Feasterville, PA, USA) modello 111002.

2.2 Metodi

2.2.1 Sintesi peptidica in fase solida

La sintesi peptidica è un processo complesso, data la natura polifunzionale degli aminoacidi che si vogliono condensare per formare la sequenza proteica.

Il problema fondamentale deriva dal fatto che l'unico legame che deve formarsi, è quello peptidico, è dunque necessario proteggere i gruppi funzionali che, nel corso delle diverse reazioni, non debbono reagire.

In particolare, oltre ai gruppi funzionali in catena laterale, devono essere protetti sia il gruppo amminico del primo aminoacido, sia il gruppo carbossilico dell'aminoacido seguente; questo serve per non avere sottoprodotti indesiderati.

La tecnica SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis), messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield [20,21], è attualmente il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica.

La sintesi in fase solida, richiede di ancorare la funzione carbossilica del primo aminoacido, con il gruppo amminico protetto reversibilmente, ad una resina (supporto polimerico) non solubile opportunamente funzionalizzata, in grado di rigonfiarsi in presenza di adeguati solventi, solitamente polari non protici, come N,N-dimetilformamide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM).

Una volta allontanata la protezione dal gruppo amminico dell'aminoacido legato alla resina, si fa avvenire la condensazione con l'aminoacido successivo, che ha il terminale carbossilico preventivamente attivato, e il gruppo amminico protetto. In questo modo, il dipeptide rimane "agganciato" al supporto, mentre i prodotti secondari ed i reagenti in eccesso vengono allontanati mediante cicli di lavaggio e filtrazione.

Ripetendo questa serie di operazioni tante volte quante sono le unità monometriche da assemblare, si ottiene la sequenza desiderata.

Le due chimiche più comuni per la sintesi di catene peptidiche tramite SPPS si basano sulla reattività dei gruppi impiegati come protettori del terminale α -amminico: Fmoc (N^α-9-fluorenilmetilossicarbonil), e t-Boc (tert-butyloxycarbonyl), il primo rimosso in ambiente basico (generalmente piperidina), il secondo in ambiente acido (generalmente acido trifluoroacetico (TFA)).

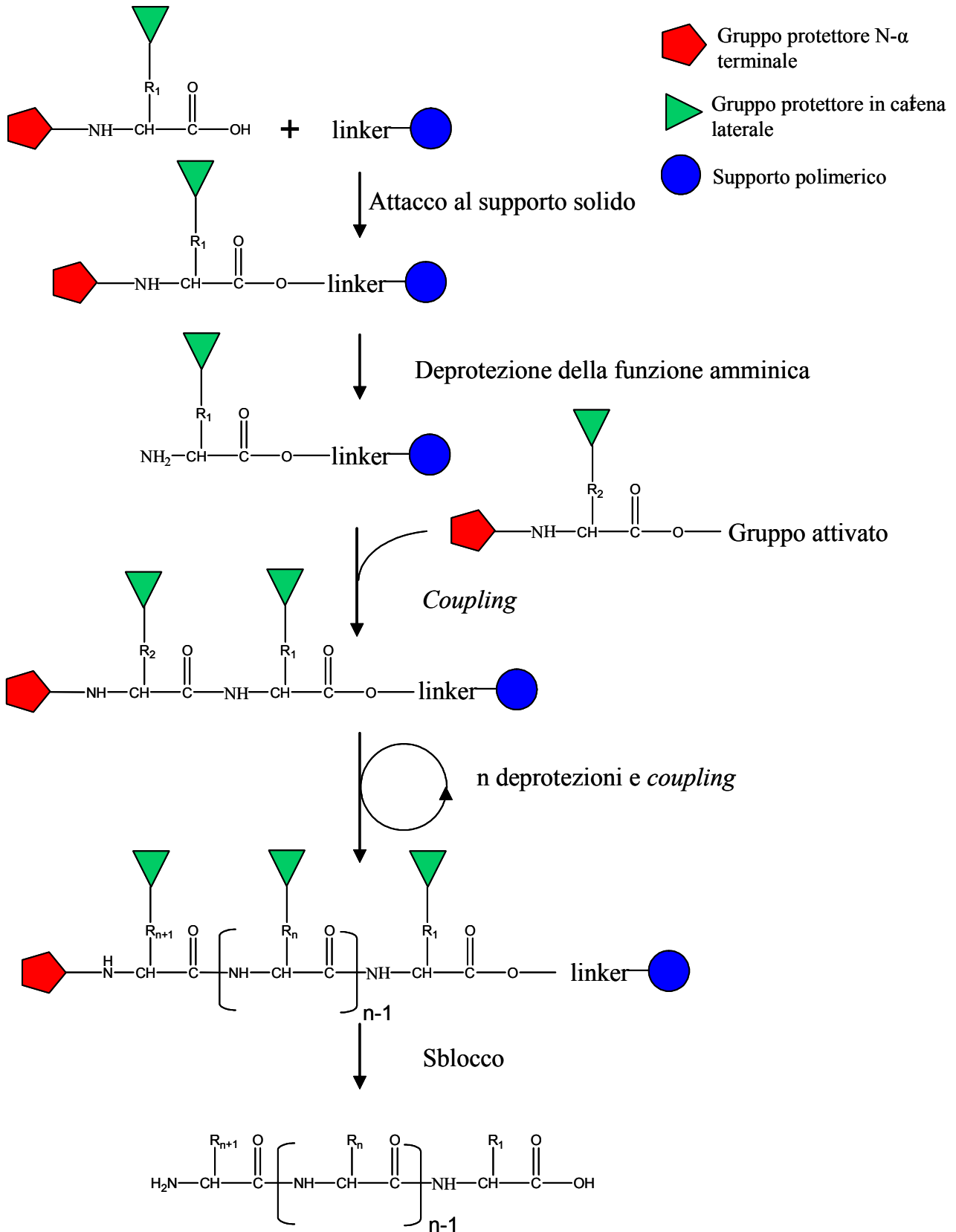


Figura 2.2: Schema generale della Sintesi Peptidica su Fase Solida (SPPS).

In base alla scelta del *linker* per ancorare il peptide in crescita al supporto solido si può ottenere, dopo lo sblocco (*cleavage*); un peptide acido, ammide terminale o caratterizzato dalla presenza di un particolare gruppo funzionale. In commercio sono disponibili 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.

Nel caso si vogliano condurre reazioni che coinvolgono selettivamente il terminale amminico o carbossilico, inoltre, è possibile sbloccare il peptide dalla resina lasciando inalterate le protezioni in catena laterale scegliendo un *linker* opportuno.

Un limite alla sintesi su fase solida è rappresentato dalla crescita, oltre alla sequenza corretta, di sequenze incomplete (mancanti di uno o più residui, oppure troncate) che, essendo simili al prodotto desiderato, possono comportare problemi durante la purificazione.

Per questo motivo, nel caso ci si aspetti una sintesi difficile, è consigliabile monitorare le reazioni di *coupling* tramite il test alla ninidrina (o Kaiser test). Le reazioni di condensazione non raggiungono mai il 100%: in genere si considerano accettabili rese superiori al 98%.

2.2.1.1 Test di funzionalizzazione della resina

Per valutare la funzionalizzazione della resina, ossia l'attacco del primo amminoacido alla resina, si effettua una procedura chiamata *test alla piperidina*. Questo permette in pratica di calcolare la resa di reazione.

Questo test impiega la quantificazione spettrofotometrica del prodotto l'N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che si forma a seguito dello sblocco del gruppo Fmoc dal peptide su resina. La procedura è descritta in seguito [25].

Un campione di 4÷8 mg di resina funzionalizzata, seccato sotto vuoto per 1 ora, e accuratamente pesato, viene trattato con 0,5 mL di una soluzione al 20% di piperidina in DMF. La soluzione viene lasciata a contatto con la resina per 15 min 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 ad un volume finale 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:

$$\text{Sostituzione (mmoli/g)} = \frac{\text{Abs}_{301\text{nm}} \times \text{Vol(ml)}}{7800 \times \text{wt(g)}}$$

dove wt indica la massa del campione di resina seccata espresso in grammi, $\text{Abs}_{301\text{nm}}$ indica l'assorbanza determinata sperimentalmente ed il valore 7800 indica la costante di estinzione molare ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Si può dunque calcolare la resa della reazione:

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

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

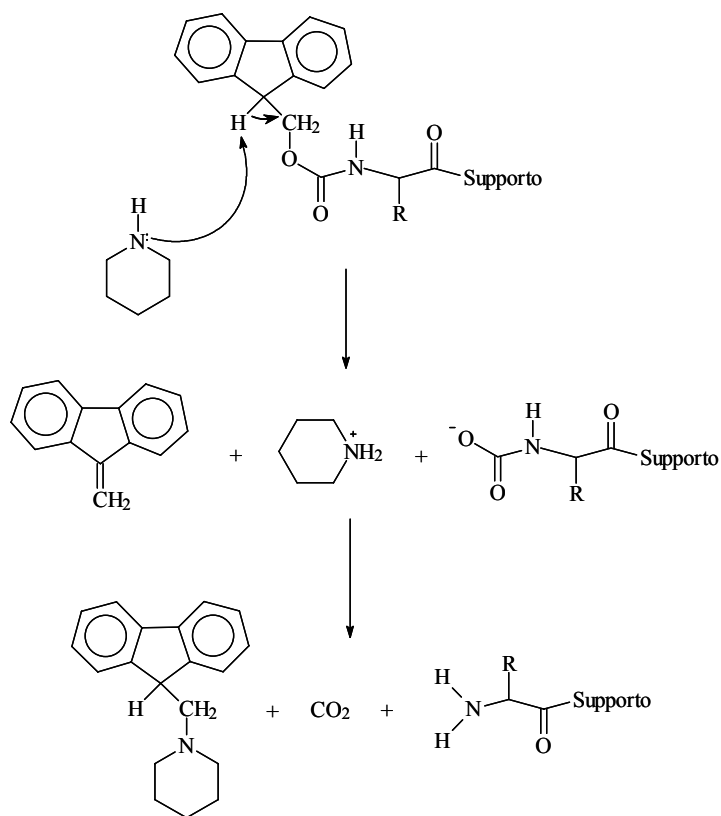


Figura 2.3: Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

2.2.1.2 Attivazione del gruppo carbossilico

Per permettere la formazione del legame peptidico, il gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -protetto, da condensare alla catena peptidica in crescita, deve essere attivato, vale a dire che il carbonio del gruppo carbonilico va reso più elettrofilo [24].

In questo lavoro di tesi si è utilizzata la procedura *FastMoc*, messa a punto dalla Applied Biosystems, che prevede l'utilizzo dell'agente condensante HBTU che viene sciolto in una soluzione di HOBt e DMF (Figura 2.4).

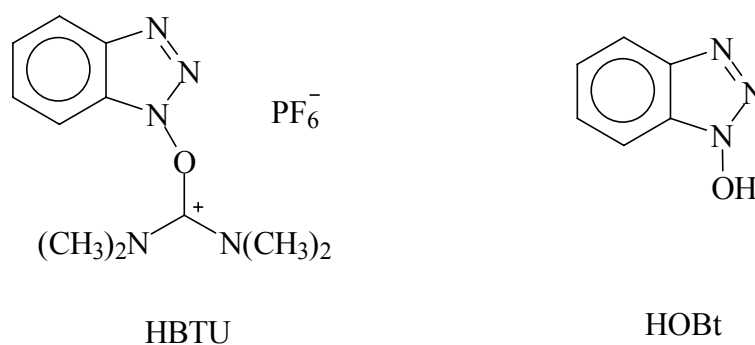


Figura 2.4: Strutture dei reagenti denominati HBTU e HOBt.

La procedura automatizzata prevede la solubilizzazione dello Fmoc-amminoacido da legare al peptide in crescita, in una miscela composta di 2,1 g di NMP e 2,2 g di una soluzione 0,45 M di HBTU/HOBt in DMF (200 mL di una soluzione 0,5 M di HOBt cui si aggiungono 100 mmoli di HBTU). La soluzione è poi trasferita direttamente al reattore, dove vengono aggiunti 0,32 mL di DIEA che catalizzano *in situ* la reazione di *coupling*. La maggior parte delle reazioni di *coupling* può durare da 20 min a 2 ore. La procedura *FastMoc* standard prevede l'inserimento di un residuo in 55 min, oppure in 98 min se previsto un *coupling* doppio.

2.2.1.3 Test alla ninidrina

Per valutare la resa della reazione di condensazione dopo ogni ciclo di acilazione, si utilizza il Kaiser test, o test alla ninidrina, che evidenzia la presenza di gruppi amminici liberi [24,25,28].

La procedura adottata, prevede la preparazione di 2 provette: una utilizzata per la soluzione di riferimento, ed una per la soluzione di misura.

Viene prelevato un campione di resina tra 2 e 8 mg e trasferito in una provetta, questo va lavato con 2-3 mL di metanolo, alle quali si aggiungono 2-3 gocce di acido acetico (per evitare un eventuale sblocco dello Fmoc). Il campione è poi seccato sotto vuoto per 1 ora e pesato accuratamente.

Si procede osservando il seguente protocollo:

- addizione in sequenza di: 75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3 (cfr. cap. 3.1: materiali);
- riscaldamento della miscela a bagnomaria a 100°C per 5 min;
- aggiunta di 4,8 mL di soluzione di etanolo al 60%;
- dopo centrifugazione, misura di assorbanza del liquido surnatante a 570 nm.
- La quantità di funzioni amminiche libere è calcolata mediante la seguente formula:

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

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 che assorbe nel visibile è riportata in figura 2.5.

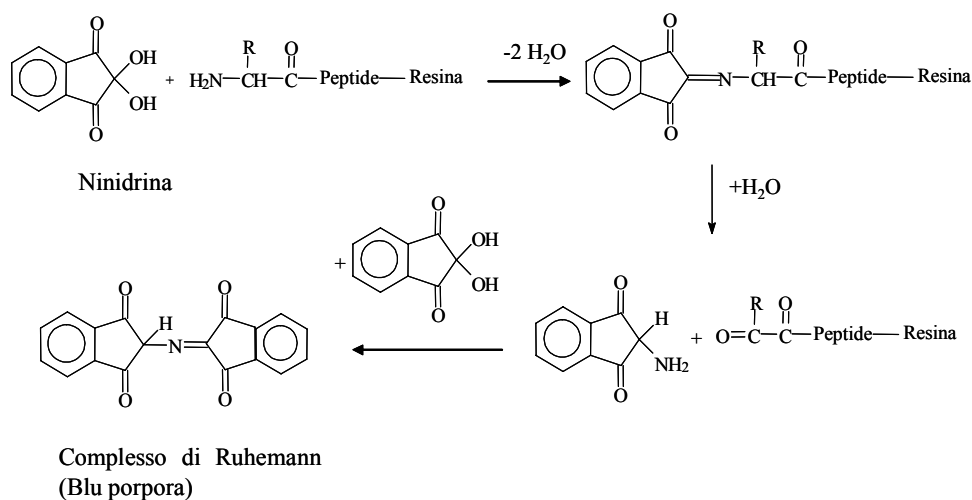


Figura 2.5: Reazione della ninidrina con il residuo N-terminale del peptide in crescita

2.2.1.4 Sblocco del peptide dalla resina

Quando si tratta il peptide su resina con la miscela di sblocco, si può ottenere la concomitante liberazione delle catene laterali dai rispettivi gruppi protettori, oltre al distacco del peptide dalla resina [25,28,29].

La deprotezione delle catene laterali genera specie altamente reattive (ad esempio carbocationi) che possono provocare modificazioni covalenti di alcuni residui. L'uso 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.

La miscela di *scavengers* varia secondo gli amminoacidi presenti nella sequenza e in base al tipo di gruppi protettori usati per le 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 di sblocco completo:

1. conclusa la sintesi, si libera la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc (piperidina 20% in NMP) con procedura automatizzata;
2. il reattore con il peptide su resina è lavato con DCM e posto a seccare per almeno 2 ore sotto vuoto (fino a peso costante);
3. il peptide su resina è trasferito in un pallone, e addizionato della miscela di sblocco costituita generalmente da 95% TFA, 2,5% H₂O MilliQ e 2,5% TES;
4. la miscela è mantenuta sotto blanda agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per 1 h e 30 min, tempo che può essere incrementato in funzione del numero e tipo di gruppi protettori presenti in catena laterale (in particolare, il tempo di reazione aumenta proporzionalmente al numero di Arg(Pmc) presenti nella sequenza);
5. la resina viene eliminata tramite filtrazione su *gooch* G3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a piccolo volume con evaporatore rotante. In seguito all'aggiunta di etere dietilco freddo (~ 4°C), si ha la precipitazione del peptide, che viene successivamente filtrato con *gooch* G4, seccato, poi sciolto con H₂O MilliQ e liofilizzato.

Procedura di sblocco parziale:

Nel caso in cui vi sia la necessità di mantenere i gruppi protettori in catena laterale la procedura di sblocco varia leggermente:

1. conclusa la sintesi, si libera la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc (piperidina 20% in NMP) con procedura automatizzata;
2. il reattore con il peptide su resina è lavato con DCM e posto a seccare per almeno 2 ore sotto vuoto (fino a peso costante);
3. il peptide su resina è trasferito in un pallone, e addizionato della miscela di sblocco costituita generalmente da 1% TFA in DCM;
4. la miscela è mantenuta sotto agitazione per 15 min, dopodiché la soluzione viene separata dalla resina tramite filtrazione in gooch G3, e fatta gocciolare in un pallone contenente 3 mL di DMF fredda;
5. la soluzione viene quindi portata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. In seguito all'aggiunta di acqua MilliQ fredda ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), si ha la precipitazione del peptide, che viene successivamente filtrato con gooch G4, seccato, poi sciolto in H_2O MilliQ con l'aggiunta di qualche goccia di TFA (vista la poca solubilità in acqua a causa dei gruppi protettori ancora presenti) e liofilizzato.

Questo tipo di sblocco richiede spesso numerosi cicli (4-6), in quanto la soluzione all'1% TFA non è in grado di liberare tutto il peptide in così poco tempo, ma concentrazioni o tempi più elevati rischierebbero di sbloccare anche i gruppi protettori che si vogliono mantenere legati.

2.2.2 Cromatografia RP-HPLC

La purificazione dei vari peptidi sintetizzati durante questo lavoro di tesi è stata realizzata tramite cromatografia RP-HPLC (*Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*) [30].

La cromatografia, nata come tecnica preparativa e affermata poi anche come tecnica analitica, è una tecnica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità 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 di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

Il campione viene sciolto nella fase mobile che fluisce in modo continuo attraverso la fase stazionaria immiscibile. I componenti che presentano maggiore affinità per la fase stazionaria, vengono trattenuti in modo considerevole, per questo si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile; mentre quelli con minore affinità, sono solo debolmente trattenuti e quindi si muovono in modo più rapido. A causa della diversa mobilità, quindi, i componenti del campione si separano

in bande discrete e possono perciò essere analizzati qualitativamente e/o quantitativamente oppure essere isolati e raccolti.

I vari metodi cromatografici possono essere classificati in base al tipo di fase mobile e stazionaria o in base al tipo di equilibri che i soluti instaurano tra le due fasi: in particolare, nella cromatografia liquida (LC), la fase mobile è costituita da un liquido mentre la fase stazionaria può essere un solido (cromatografia di adsorbimento), o un altro liquido immiscibile adsorbito su particelle solide impaccate in una colonna (cromatografia di ripartizione), o uno scambiatore anionico o cationico (cromatografia a scambio ionico). Si può distinguere inoltre tra la cromatografia su colonna e quella su superficie (TLC).

Un'evoluzione della cromatografia liquida classica è l'HPLC in cui si utilizzano colonne riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli con diametro pari a 3-10 μm), lunghe tra i 10 e i 30 cm e con diametro interno tra i 3,9 e gli 8,0 mm.

Tale tecnica nasce dall'esigenza di incrementare l'efficienza delle colonne cromatografiche diminuendo il diametro delle particelle di riempimento e ottimizzando l'impaccamento della fase stazionaria. Questa modifica comporta però una drastica riduzione del flusso della fase mobile con un conseguente aumento dei tempi di separazione, perciò è necessario l'utilizzo di pompe per forzare la fase mobile attraverso la colonna.

L'HPLC è una tecnica non distruttiva molto diffusa per la sua elevata sensibilità e per la facilità con cui si adatta a separazioni quantitative accurate, in particolare di specie non volatili termicamente labili (ad es. peptidi).

Le analisi svolte in questo lavoro di tesi sono state condotte con la tecnica HPLC a fase inversa, RP-HPLC, una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari: nel nostro caso sono state usate colonne con gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio.

Come fase mobile possono essere utilizzate miscele a vario titolo composte da soluzioni acquose e solventi organici.

L'interazione che permette la ritenzione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente. In quest'ultimo caso, un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente deadsorbimento dell'analita ad una data percentuale di solvente organico e successiva eluizione.

Generalmente, i peptidi si separano meglio in ambiente acido, per questo la maggior parte delle fasi mobili contiene basse concentrazioni di acido TFA (0,05% nel caso degli eluenti usati in tesi) il quale agisce come coppia ionica, aumentando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria. In questo lavoro di tesi le analisi sono state effettuate utilizzando come eluenti 0,05% di TFA in H_2O MilliQ e 0,05% di TFA in acetonitrile.

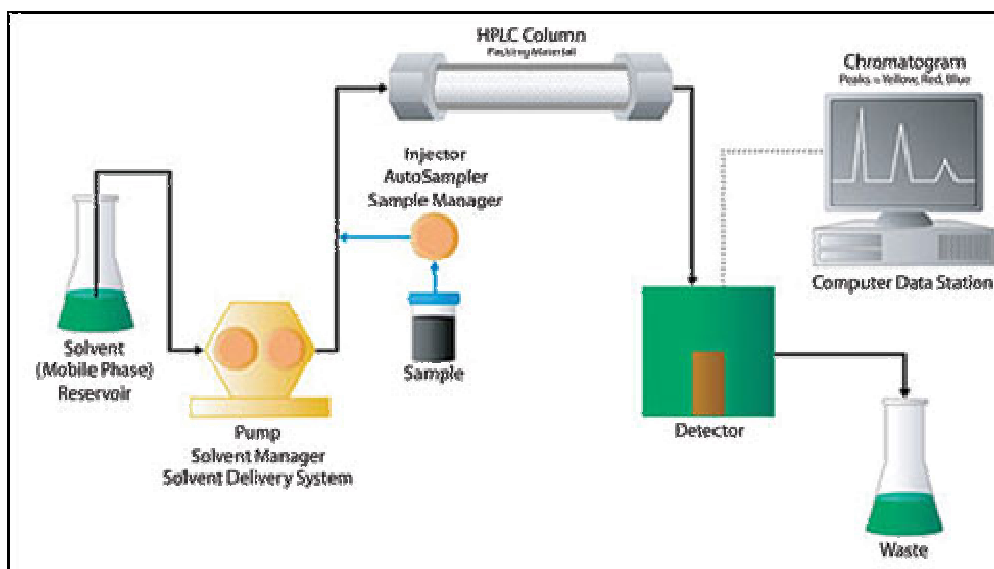


Figura 2.6: Schema di funzionamento di un HPLC.

La soluzione contenente il campione può essere introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione o iniezione. All'uscita della colonna cromatografica è posto un rivelatore che può essere di varia natura: gli strumenti adoperati nel presente lavoro utilizzano spettrofotometri UV come detector e si è impostata la lunghezza d'onda (λ) a 214 nm, ovvero in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico.

2.2.3 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 [31].

Il principio su cui si basa, è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono 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).

Tutti gli spettrometri di massa richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto, per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici, e sono costituiti essenzialmente da tre parti (Figura 2.7) :

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

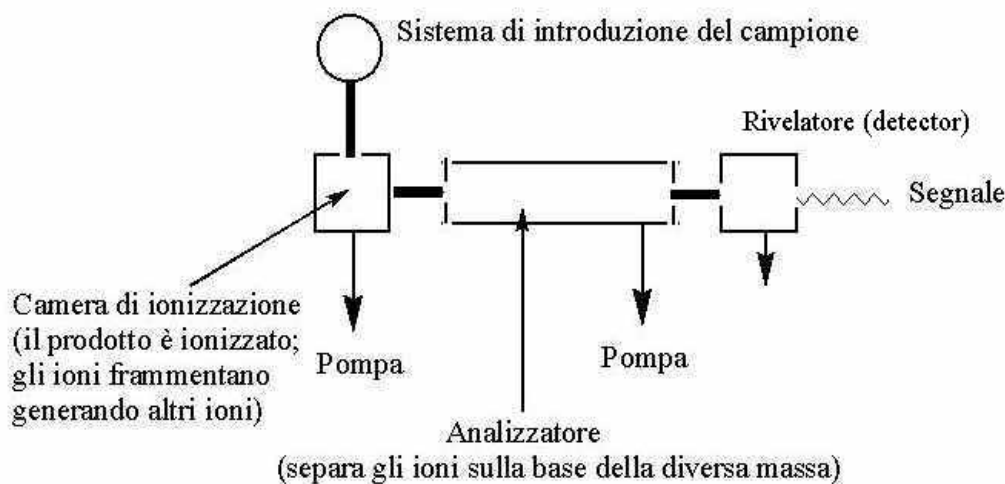


Figura 2.7: Schema di uno spettrometro di massa. Lo strumento è costituito dalle seguenti parti: a. sistema di introduzione del campione; b. camera di ionizzazione; c. analizzatore di ioni; d. detector; e. registratore.

Il campione non deve essere necessariamente puro e può essere introdotto sotto diverse forme fisiche: i gas si trovano già nella forma fisica adatta; i solidi e i liquidi devono prima essere vaporizzati; mentre nei casi di sostanze poco volatili si ricorre a derivatizzazione. Per introdurre il campione è necessario avere un'interfaccia per passare dalla pressione atmosferica al vuoto ($\sim 10^{-6}$ torr).

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, secondo la tecnica di ionizzazione utilizzata. 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*).

Le tecniche di ionizzazione si dividono in base al tipo di sorgente utilizzata.

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. La tecnica di ionizzazione ESI (*ElectroSpray Ionization*) 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).

Le due caratteristiche essenziali dell'ESI sono che la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica e sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla.

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.

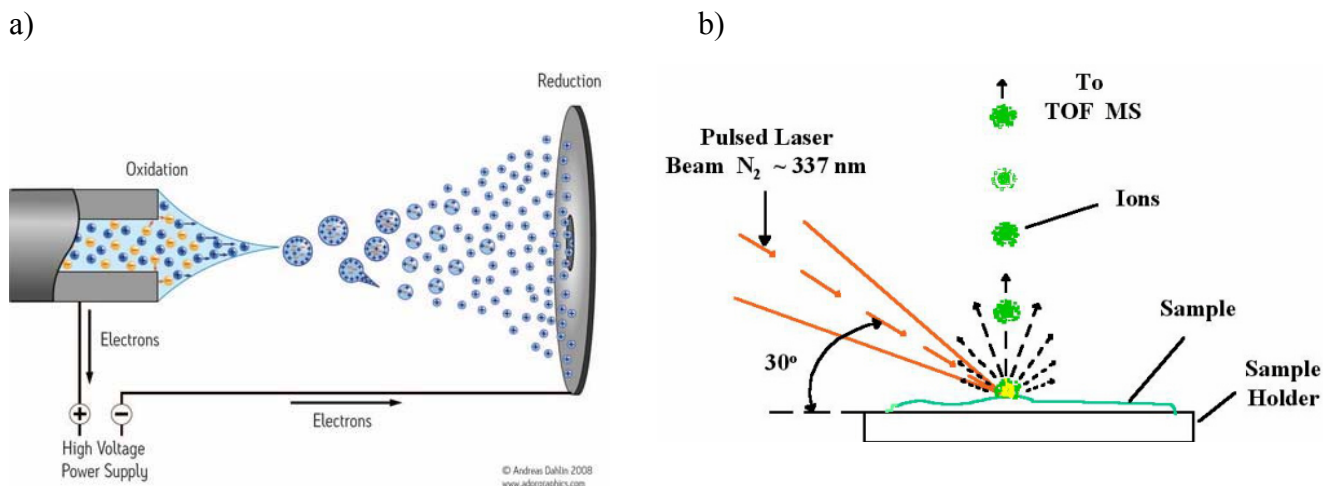


Figura 2.8: Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione che avviene in una sorgente ESI (a) e MALDI (b).

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 (Fig. 2.9 a). Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di specie multicarica.

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 quasimolecolari 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).

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.

2.2.4 Spettroscopia UV/Vis

La radiazione UV/Vis copre un'ampia parte dello spettro elettromagnetico tra i 700 e i 10 nm; di quest'intervallo generalmente le parti più utilizzate a scopi analitici sono il visibile (700-400 nm) e l'UV vicino (400-200 nm) [32].

Il principio dell'UV/Vis è quello di eccitare attraverso la radiazione gli elettroni che si trovano nei livelli energetici di una certa molecola, promuovendoli in orbitali molecolari ad energia maggiore. Affinché tale transizione abbia luogo, l'energia assorbita deve corrispondere esattamente alla differenza di energia tra i due orbitali.

Poiché le misurazioni analitiche avvengono sempre in soluzione, l'utilizzo di uno strumento a doppio raggio rappresenta un vantaggio.

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.

Le applicazioni di questa tecnica sono molteplici.

La legge che descrive i rapporti tra assorbanza misurata, concentrazione del campione e lunghezza del cammino ottico, è la legge di Lambert-Beer:

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

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 ad 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.



Figura 2.9: Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 2

2.2.5 Test MTT

Il test MTT serve a determinare la crescita cellulare di una coltura. Le cellule vengono contate sfruttandone il viraggio nella colorazione, dovuto al trattamento con una particolare sostanza, sensibile alla loro vitalità.

L'MTT è un composto di colore giallo, che viene ridotto dai mitocondri delle cellule viventi e trasformato in formazano, una sostanza di colore blu/violaceo. La riduzione ha luogo solo se gli enzimi riduttasi dei mitocondri sono attivi: la conversione può, quindi, essere direttamente correlata al numero di cellule vitali.

Il metodo MTT viene utilizzato in saggi di citotossicità, nella determinazione della crescita cellulare in risposta ad agenti mutageni, a stimoli antigenici, a fattori di crescita e in saggi di adesione. Nel seguito, si riporta la procedura relativa a quest'ultima circostanza.

Una soluzione di MTT viene aggiunta al materiale di test, sul quale, preliminarmente, sono state lasciate aderire le cellule per un tempo opportuno. Il supporto assume, in questo modo, una colorazione giallognola. Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule adese (e vitali) tagliano l'anello tetrazolio, producendo cristalli di formazano di colore viola, insolubili in acqua. Il formazano, invece, non passa attraverso la membrana citoplasmatica e una volta prodotto si accumula all'interno delle cellule. Segue un periodo di incubazione, al termine del quale al terreno contenente MTT viene aggiunta una soluzione che solubilizza il formazano.

Il tutto viene messo ad agitare per assicurarsi che i cristalli si sciolgano e formino una soluzione omogenea. Infine, si misura la densità ottica della soluzione finale, grazie ad uno spettrofotometro, selezionando una lunghezza d'onda opportuna (di solito tra 500 e 600 nm). L'assorbanza è direttamente proporzionale alla quantità di formazano e, a sua volta, al numero di cellule.

La misura può essere espressa relativamente ad un campione, scelto come controllo. Per avere una quantificazione assoluta del numero di cellule, è necessario costruire una curva standard nel piano che correla numero di cellule e densità ottica; di norma sono sufficienti 5 punti. Nella pratica, questi si ottengono misurando la densità ottica di pozzetti in cui sia noto, per altra via, il numero di cellule presenti.

2.2.6 Spettrometria elettronica per analisi chimiche

La tecnica XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) è un tipo di spettroscopia a fotoemissione che usa una sorgente di raggi X per ottenere informazioni sulla natura di tipo chimico della superficie di un materiale (fino al nanometro di profondità). Tale spettroscopia a fotoemissione si basa sull'*effetto fotoelettrico*: quando un fascio energetico di appropriata frequenza colpisce la superficie di un materiale, la sua energia può venire assorbita dagli elettroni dei primi strati atomici, e se l'energia è sufficiente, questi vengono emessi creando una corrente elettrica superficiale facilmente misurabile.

L'energia cinetica E_k degli elettroni emessi è dipendente dalla loro energia di legame E_b dall'espressione:

$$E_k = hf - E_b - W$$

Dove h è la costante di Planck, f la frequenza del raggio incidente e W è la funzione lavoro del materiale (ovvero l'energia necessaria per estrarre un elettrone, ovvero l'energia necessaria a portarlo dal suo livello energetico ad un livello infinito).

Nel caso dell'XPS, l'energia incidente è talmente elevata da riuscire ad estrarre gli elettroni dei primi livelli energetici, quelli cioè degli orbitali più vicini al nucleo (fig 2.10). È possibile quindi misurare l'energia cinetica di tutti gli elettroni di un atomo, e note le energie di legame risalire quindi al tipo di atomo con estrema precisione.

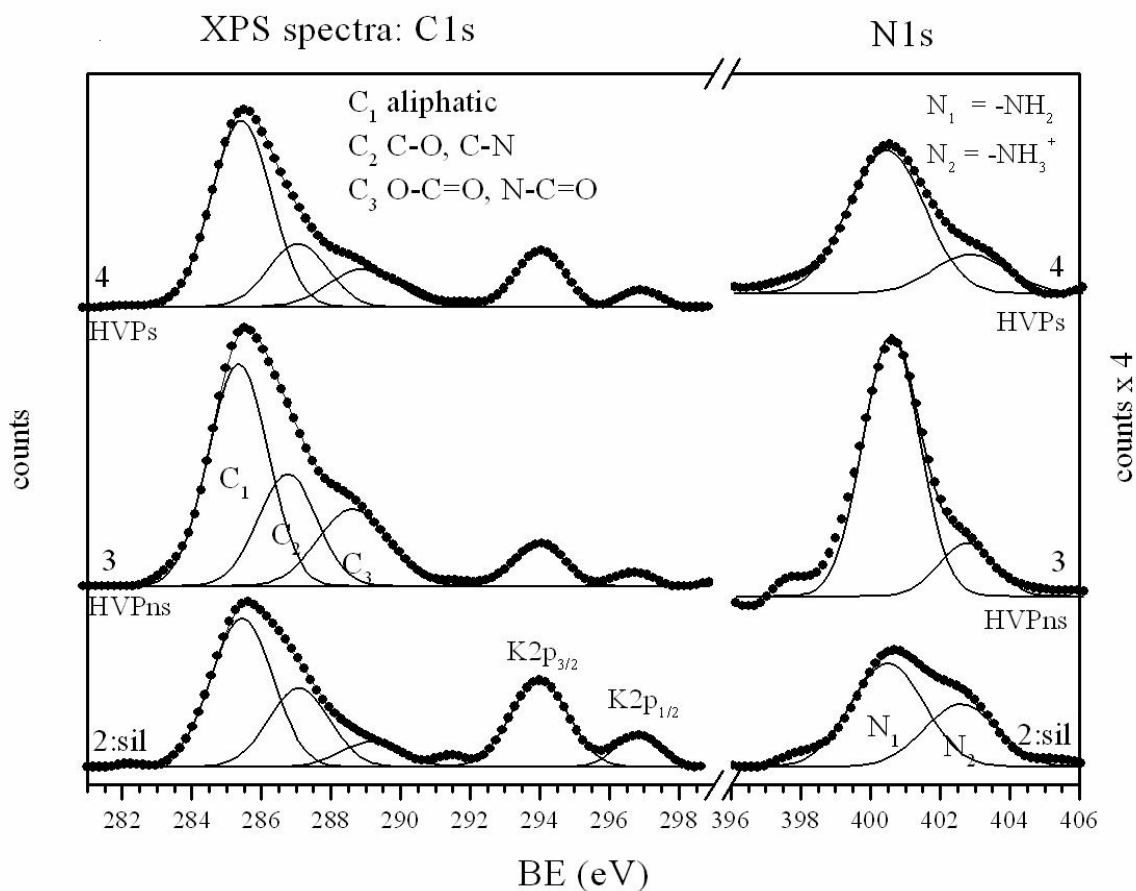


Figura 2.10: Spettro XPS del segnale del carbonio ed azoto di un campione di ossido di titanio funzionalizzato covalentemente con HVP.

Per la misurazione dell'energia cinetica viene utilizzato un analizzatore di elettroni, strumento in grado di rilevare energia e numero degli elettroni emessi dal materiale. Si ottiene quindi un grafico con in ascissa l'energia di legame ed in ordinata il numero di elettroni corrispondente a tale energia. Avremo quindi uno spettro di emissione con picchi alle energie di legame corrispondenti ai relativi atomi. Dalle aree dei picchi, inoltre, è possibile risalire alla percentuale dell'elemento presente nel materiale, con una sensibilità di concentrazione dello 0.01%. Altra caratteristica fondamentale è la sensibilità alla variazione dell'energia di legame in base al tipo di legame che l'atomo stesso ha con

quelli adiacenti. Di conseguenza riusciamo a conoscere anche i tipi di legami esistenti tra i vari atomi, e il loro stato di ossidazione.

I lati negativi di questa tecnica sono tutti dovuti al rumore di fondo: nel caso infatti che gli elettroni abbiano degli urti nel cammino di uscita dalla superficie, la loro energia calerà notevolmente ed andrà a rovinare la parte bassa dello spettro di emissione. Questo è anche il motivo per cui la risoluzione in profondità non è elevata: più a fondo si va con il fascio, più probabile è che gli elettroni uscendo subiscano urti con gli atomi che si frappongono al loro cammino. Per lo stesso motivo la sensibilità è massima al primo strato atomico della superficie.

2.2.7 Misura dell'angolo di contatto

L'angolo di contatto è una misura indicativa della capacità di un liquido di distribuirsi su una superficie. Il metodo consiste nella misura dell'angolo tra la tangente al profilo di una goccia, depositata sulla superficie del campione, e la superficie stessa. Questo metodo di indagine fornisce diverse informazioni sul carattere della superficie esaminata: bagnabilità (se si utilizza acqua), energia superficiale (se si utilizzano liquidi diversi), omogeneità (con l'isteresi tra angolo di avanzamento e angolo di arretramento di una goccia in movimento sulla superficie). Nel caso di campioni ad uso biomedico, il parametro più importante è la bagnabilità del materiale. La goccia d'acqua posta sulla superficie del campione tende ad allargarsi quando la superficie è bagnabile, viceversa, assume una forma sferica quando la superficie non è bagnabile (figura 2.11)

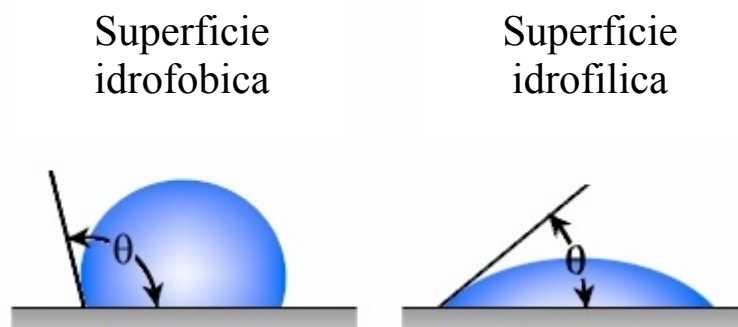


Figura 2.11. Misura dell'angolo di contatto su una superficie idrofobica e una idrofilica.

In pratica, se con θ si indica l'angolo di contatto, sono possibili tre situazioni:

- $\theta = 0^\circ$, la superficie è completamente bagnabile;
- $0^\circ < \theta < 90^\circ$, la superficie è parzialmente bagnabile;
- $\theta > 90^\circ$, la superficie non è bagnabile.

Angoli di contatto bassi sono, di conseguenza, auspicabili per un biomateriale che debba essere colonizzato dalle cellule.

Capitolo 3

Parte sperimentale

3.1 Sintesi peptidica

3.1.1 Sintesi del peptide EAbuK

3.1.1.1 Sequenza

(PM: 1728.332 Da)

Ac-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Glu(OtBu)-Abu-Lys(Boc)-Abu-Lys(Boc)-OH

3.1.1.2 Sintesi del peptide su fase solida

Il peptide autoassemblante EAbuK è stato ottenuto tramite il processo di sintesi su fase solida, tramite un sintetizzatore Syro I, utilizzando la chimica Fmoc. Il supporto solido utilizzato per la sintesi è la resina superacidolabile Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin (sostituzione 0,60 mmoli/g), precaricata con il primo amminoacido della sequenza (Lys); sono stati usati 208,00 mg (pari a 0,125 mmoli).

1. Sono state preparate delle soluzioni 0,63M dei seguenti amminoacidi (in H₂O MilliQ):
 - a. Fmoc-Glu(OtBu);
 - b. Fmoc-Lys(Boc);
 - c. Fmoc-Abu-OH.
2. Sono stati effettuati 4 lavaggi della resina con DMF, dopodiché è stata avviata la sintesi.
3. 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 1mL di una soluzione al 40% piperidina in DMF per 3 min.

4. 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 2,1 mL di NMP con l'aggiunta di 1,4 mL di soluzione 0,45 M HBTU/HOBt in DMF e 0,5 mL di DIPEA.
5. Il primo amminoacido della sequenza (Lys) è già attaccato alla resina; si è dunque proceduto con la condensazione tra primo e secondo amminoacido (primo ciclo) mediante un *coupling* singolo; allo stesso modo è avvenuta la condensazione fino al quarto ciclo, cioè fino ad ottenere un peptide con 5 residui.
6. Poiché si è osservato che la resina rimaneva attaccata al fondo del reattore durante il processo di mescolamento (vortex), si è deciso di interrompere la sintesi, per verificare il successo della reazione.

Sono stati prelevati 4,68 mg di peptide su resina, trasferiti in un reattore prepesato e si è proceduto con lo sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale.

È stata aggiunta la miscela di sblocco:

- 0,95 mL TFA (acido trifluoroacetico);
- 0,025 mL TES (triethylsilano);
- 0,025 mL H₂O MilliQ.

Il procedimento seguito è descritto nel paragrafo 4.1.4 (Procedura di sblocco completo), con la differenza che, anziché liofilizzare il precipitato, è stato messo a seccare sotto vuoto per 20 min.

Il campione così ottenuto è stato analizzato mediante spettrometria di massa (ESI); è stato così confermato che il peso molecolare del peptide (796,40 Da) corrisponde a quello teorico (796,012 Da), il peptide sintetizzato contiene dunque la sequenza esatta di amminoacidi.

7. Si è dunque proceduto con la sintesi, al termine della quale si è ottenuto il peptide autoassemblante EAbuK, protetto su resina, con Fmoc. Per i successivi 11 amminoacidi è stato eseguito un *coupling* doppio. Al termine della sintesi, il peptide protetto su resina, con gruppo Fmoc N-terminale è stato lavato con DCM e seccato sotto vuoto per 30 min: sono stati ottenuti 325,5 mg di peptide su resina.
8. È stata sbloccata una piccola aliquota di peptide su resina, seguendo la procedura descritta sopra, il peptide grezzo ottenuto è stato trasferito in un portacampione, e analizzato mediante spettrometria di massa. Ne risulta che il peso molecolare del prodotto di sintesi (1728,0 Da) corrisponde a quello del peptide autoassemblante EAbuK, calcolato teoricamente (1728,332 Da). Il prodotto ottenuto è dunque quello desiderato.

3.1.1.3 Caratterizzazione del peptide grezzo

Il peptide grezzo analizzato è stato poi seccato sotto vuoto, sciolto in 300 μ L di acqua MilliQ, e filtrato.

Si è poi proceduto con un'analisi in RP-HPLC, nelle seguenti condizioni:

Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 40 µL; gradiente dal 10% all'30% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Successivamente, mediante una cromatografia analitica, sono state raccolte le frazioni corrispondenti ai picchi evidenziati in rosso (figura 3.1).

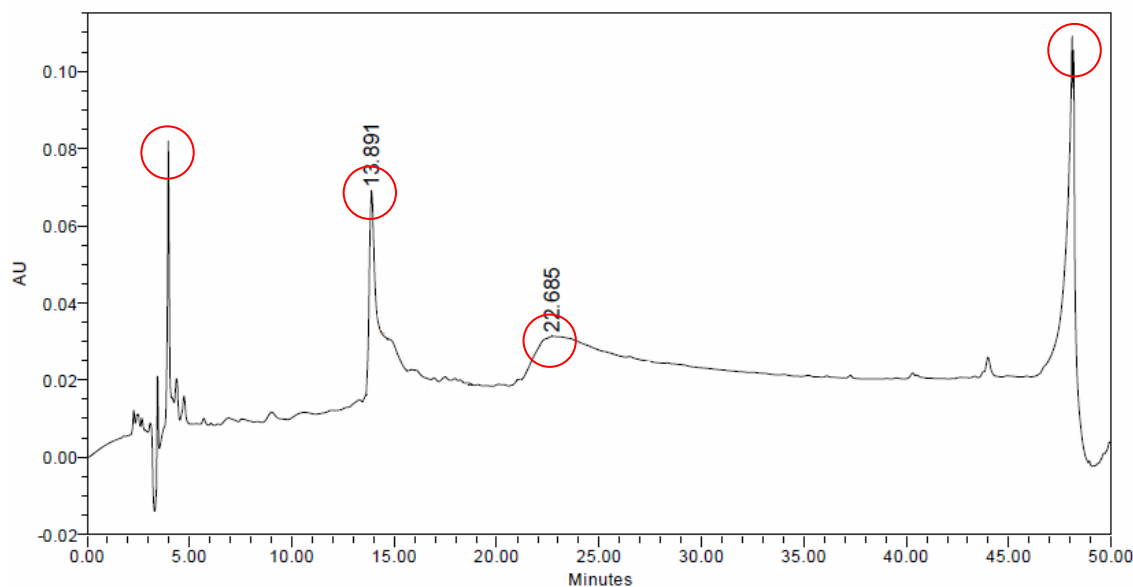
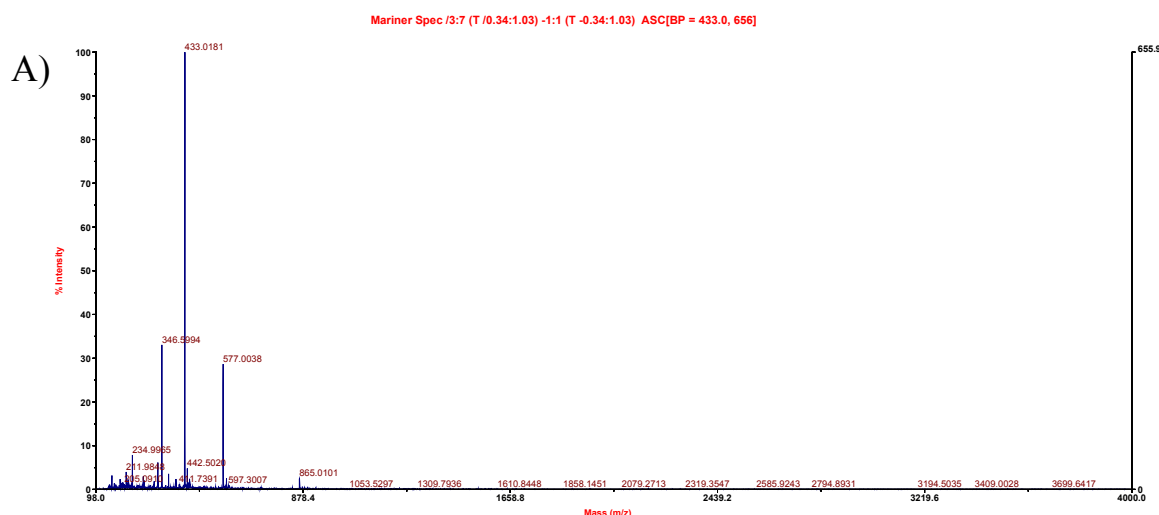


Figura 3.1: Cromatografia analitica del peptide EAbuK grezzo. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 40 µL; gradiente dal 10% all'30% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm. I picchi cerchiati in rosso sono stati raccolti in provette separate.

Mediante analisi di massa (ESI), la presenza di peptide autoassemblante è stata registrata nei picchi a 13,891 e 22,685 min. È stato così confermato che il peso molecolare del peptide (1728,0 Da) corrisponde a quello del prodotto desiderato (figura 3.2).



B)

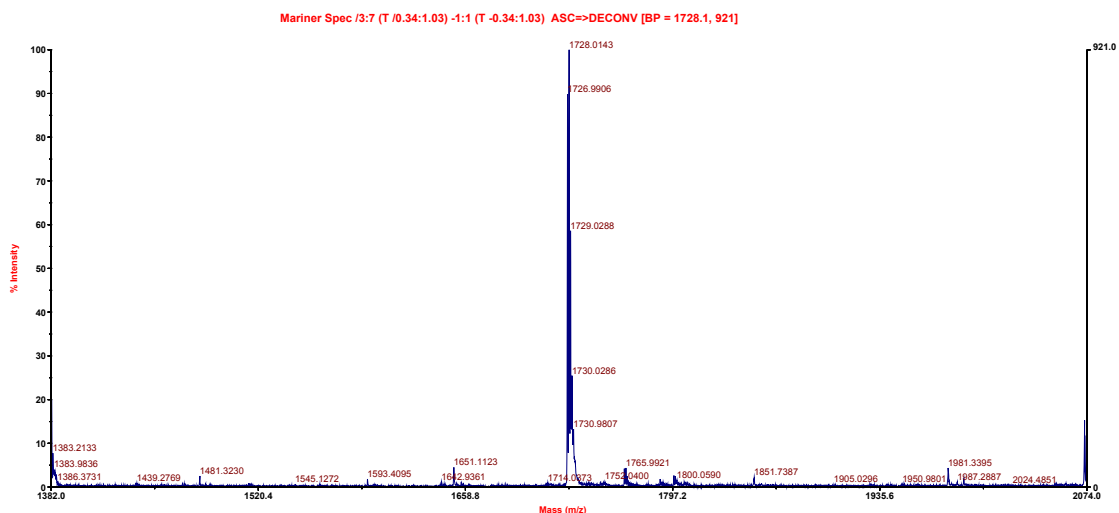


Figura 3.2: (A) Spettro di massa (ESI-TOF) del picco raccolto come indicato nel cromatogramma riportato in Fig. 3.1 con $t_R=13,891$ minuti (B) deconvoluzione dello stesso picco.

3.1.1.4 Deprotezione del gruppo Fmoc dall'amminoacido N-terminale

Al peptide protetto su resina, è stato rimosso il gruppo Fmoc, procedendo come segue: è stato 314 mg di peptide protetto su resina sono stati messi in un pallone da 50 mL e fatti reagire con 15 mL di una miscela con 20% di piperidina in DMF.

La reazione si è protratta per 15 min, sotto blanda agitazione magnetica. La miscela è stata filtrata su gooch G4. Il peptide su resina è stato quindi seccato sotto vuoto per 1 ora.

3.1.1.5 Acetilazione

Il peptide su resina, è stato poi trasferito in un pallone da 50mL ed è stato acetilato per aggiunta di una soluzione al 10% di anidride acetica, 5% isopropil-etilammina in NMP (N-metilpirrolidone) (1 mL anidride acetica, 0,5 mL isopropil-etilammina, 8,5 mL NMP).

La reazione è avvenuta con blanda agitazione magnetica, per un tempo di 10 min. Il peptide su resina, acetilato è filtrato su gooch G4, e poi messo a seccare sotto vuoto per 1 h.

Per verificare la presenza di gruppi amminici liberi, è stato eseguito il test alla ninidrina. Sono stati prelevati 4,15 mg di peptide su resina ed è stato seguito il procedimento descritto nel paragrafo 4.1.3. La quantità di funzioni amminiche libere calcolata, risulta di 1,044 $\mu\text{moli/g}$.

3.1.1.6 Sblocco del peptide su resina senza rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali

Il peptide acetilato è stato sbloccato dalla resina. Vista la necessità di ottenere del peptide protetto in catena laterale, è stata utilizzata la procedura di sblocco parziale.

Il peptide protetto su resina, trattenuto dal gooch, è stato trasferito in un becker. È stato trattato con 10 ml di soluzione all'1% di TFA in DCM sotto agitazione per 15 min. La soluzione è stata filtrata tramite *gooch* G3 per eliminare la resina, e la miscela di sblocco è stata fatta gocciolare in 1 mL di DMF fredda (4°C). La soluzione è stata portata a piccolo volume con evaporatore rotante, e successivamente si è fatto precipitare il peptide per aggiunta di acqua MilliQ fredda (4°C).

La procedura è stata ripetuta 3 volte, al fine di sbloccare completamente il peptide dalla resina.

La verifica è avvenuta visivamente, controllando il progressivo cambiamento nel colore della resina da giallo a rosso rubino, e la presenza di precipitato al momento dell'aggiunta di acqua fredda al pallone.

Il peptide precipitato è stato filtrato in *gooch* G4, sospeso nuovamente in acqua MilliQ e liofilizzato per essere conservato adeguatamente.

Si sono ottenuti in questo modo 88,03 mg di peptide protetto (PM: 2558 Da).

3.1.2 *Sintesi del peptide Aoa-EAbuK*

3.1.2.1 Sequenza

(PM: 1800.392 Da)

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

3.1.2.2 Sintesi

Il peptide autoassemblante Aoa-EAbuK è stato ottenuto tramite il processo di sintesi su fase solida, tramite un sintetizzatore Syro I, utilizzando la chimica Fmoc. Il supporto solido utilizzato per la sintesi è la resina Rink Amide MBHA.

Sono state utilizzate due resine con sostituzione diversa:

- 178,5 mg (pari a 0,1053 mmoli) di resina con sostituzione 0,59mmoli/g;
- 502 mg (pari a 0,0246 mmoli) di resina con sostituzione 0,49mmoli/g;

Il grado di sostituzione medio corrisponde dunque a 0,57 mmoli/g:

$$\text{sostituzione} = \frac{0,1053\text{mmoli} + 0,0246\text{mmoli}}{0,1785\text{g} + 0,502\text{g}} = 0,57\text{mmoli/g}$$

1. Sono state preparate delle soluzioni 0,63M dei seguenti amminoacidi (in H₂O MilliQ):
 - a. Fmoc-Glu(OtBu);
 - b. Fmoc-Lys(Boc);
 - c. Fmoc-Abu-OH.
 - d. BisBoc-Aoa-OH
2. Sono stati effettuati 2 lavaggi della resina con DMF, dopodiché è stata avviata la sintesi.
3. 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 1mL di una soluzione al 40% piperidina in DMF per 3 min.
4. 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 2,1 mL di NMP con l'aggiunta di 1,4 mL di soluzione 0,45 M HBTU/HOBt in DMF e 0,625 mL di DIPEA.
5. La funzionalizzazione della resina con il primo residuo (Lys) è stato eseguita in doppio *coupling*; al termine è stata controllata la resa di reazione tramite test alla piperidina, il procedimento è descritto nel paragrafo 4.1.1. La resa risulta del 110%: visto il buon risultato si è proceduto con la reazione.
6. Sono stati impostati dei *coupling* singoli per i primi 4 residui amminoacidici, per i successivi 12 amminoacidi è stato eseguito un *coupling* doppio. Al termine della sintesi, il peptide protetto su resina, con gruppo Aoa-BisBoc N-terminale è stato lavato con DCM e seccato sotto vuoto per 1 h: sono stati ottenuti 448,3 mg di peptide su resina.
7. Sono stati prelevati 21,9 mg di peptide su resina, trasferiti in un reattore prepesato e si è proceduto con lo sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale.
È stata aggiunta la miscela di sblocco così composta:
 - 1,9 mL TFA (acido trifluoroacetico);
 - 0,05 mL TES (trietilsilano);
 - 0,05 mL H₂O MilliQ.

La soluzione contenente il peptide è stata lasciata a temperatura ambiente per 1h 30min, sotto agitazione magnetica. Dopo filtrazione, la soluzione è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. In seguito all'aggiunta di etere dietilco freddo (~ 4°C), si ha la precipitazione del peptide. L'etere (surnatante) è stato poi recuperato con una pipetta e trasferito in una provetta, la quale è poi stata centrifugata per fare in modo che il peptide in sospensione si depositasse sul fondo. L'etere è stato asportato anche dalla provetta e conservato in frigorifero. L'operazione è stata ripetuta finchè il pallone è venuto a contenere un volume molto piccolo di liquido. A questo punto sia il pallone che la provetta sono stati messi a seccare sotto vuoto.

3.1.2.3 Caratterizzazione del peptide grezzo

Il campione così ottenuto è stato diluito con 2mL di H₂O MilliQ, e poi filtrato.

100 µL della soluzione sono stati seccati sotto vuoto, e analizzati mediante spettrometria di massa (ESI); è stato così confermato che il peso molecolare del peptide (1799,0 Da) è molto vicino a quello teorico (1800.392 Da), il peptide sintetizzato contiene dunque la sequenza esatta di amminoacidi, anche se è presente qualche impurezza (figura 3.3).

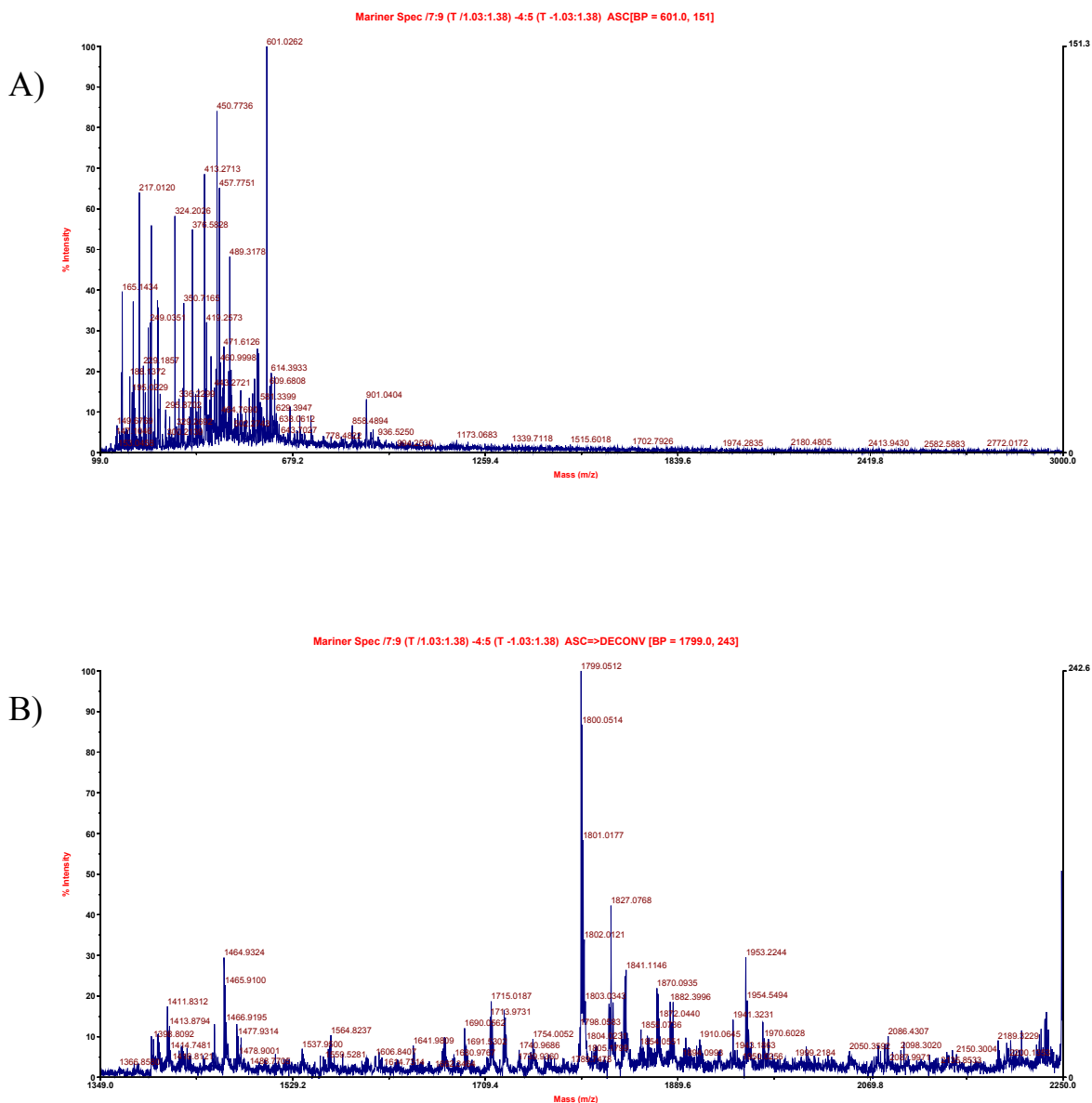


Figura 3.3: (A) Spettro di massa (ESI-TOF) del peptide grezzo Aoa-EAbuk, (B) sua deconvoluzione

Si è poi proceduto con un'analisi in RP-HPLC, nelle seguenti condizioni:

colonna; Symmetry Shield, flusso; 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ, eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN, iniezione; 20 µL; gradiente dal 0% all'80% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm

Successivamente, mediante una cromatografia analitica, sono state raccolte le frazioni corrispondenti ai picchi evidenziati in rosso è stata individuata la presenza di peptide autoassemblante nella frazione compresa tra 27,09 min e 40 min (figura 3.4).

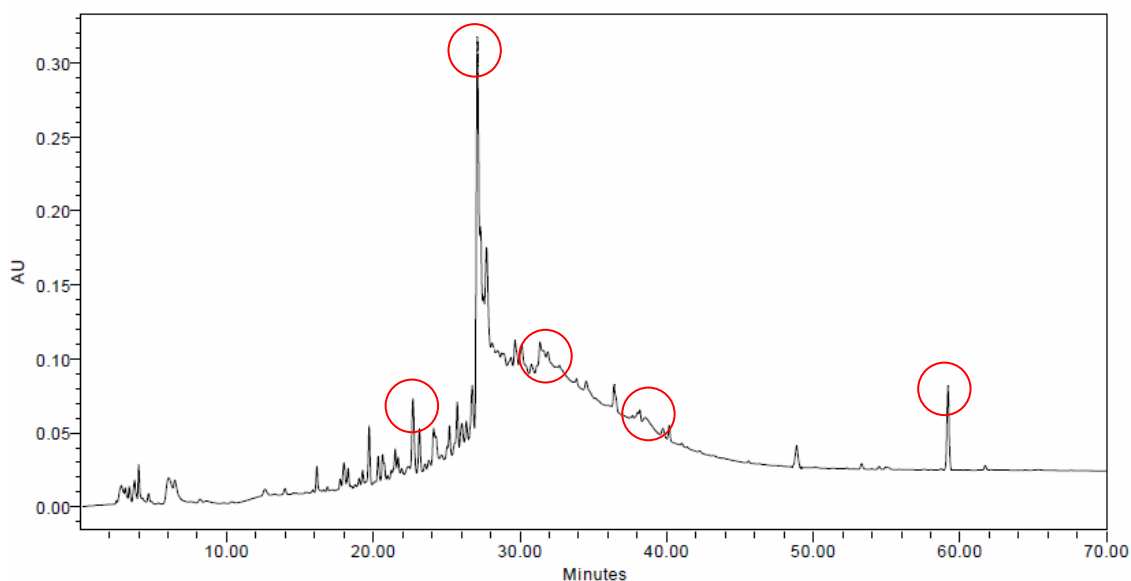


Figura 3.4: Cromatografia analitica del peptide Aoa-EAbuK grezzo. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% all'80% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm. I picchi cerchiati in rosso sono stati raccolti in provette separate.

3.2 Chemoselective ligation

La *bioconiugazione*, o *Chemoselective ligation* consiste nel coniugare covalentemente due molecole biologiche in un mezzo acquoso e in condizioni blande, per reazione selettiva tra il gruppo ossiamminico presente nel peptide ed il gruppo chetonico localizzato all'estremità N-terminale di una proteina, o di un altro peptide. Si ottiene così un'ossima.

In questo lavoro di tesi sono stati coniugati:

- il peptide autoassemblante Aoa-EAbuK ed il peptide (GRGDSP)₄K, contenente la sequenza adesiva RGD.
- il peptide autoassemblante Aoa-EAbuK ed il peptide HVP lineare, contenente la sequenza adesiva HVP.

I peptidi (GRGDSP)₄K e HVP lineare erano già stati sintetizzati presso il laboratorio della Prof.ssa M. Dettin del Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dell'Università di Padova.

Il processo è composto da 2 reazioni principali:

1. La reazione di transaminazione biomimetica, ossia la conversione del gruppo amminico N-terminale del peptide adesivo in gruppo chetonico o aldeidico per reazione con piridossal-5-fosfato (PLP);
2. Formazione del legame peptide-peptide per reazione selettiva del gruppo ossiamminico del peptide autoassemblante e del gruppo chetonico N-terminale del peptide adesivo.

3.2.1 Coniugazione tra Aoa-EAbuK e (GRGDSP)₄K

3.2.1.1 Preparazione di (GRGDSP)₄K-chetone

È stata preparata una soluzione 10 mM di PLP in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5. Sono state fatte reagire $7,6 \times 10^{-5}$ moli di PLP con $3,8 \times 10^{-6}$ moli di (GRGDSP)₄K (rapporto 20:1) in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5; prelevando 7,7 mL della soluzione di PLP e trasferendoli in una provetta di vetro contenente 9,23 mg di (GRGDSP)₄K pesati precedentemente. Il tempo di reazione è stato 18 h. La reazione è stata condotta ad una temperatura di 37 °C (Figura 3.5).

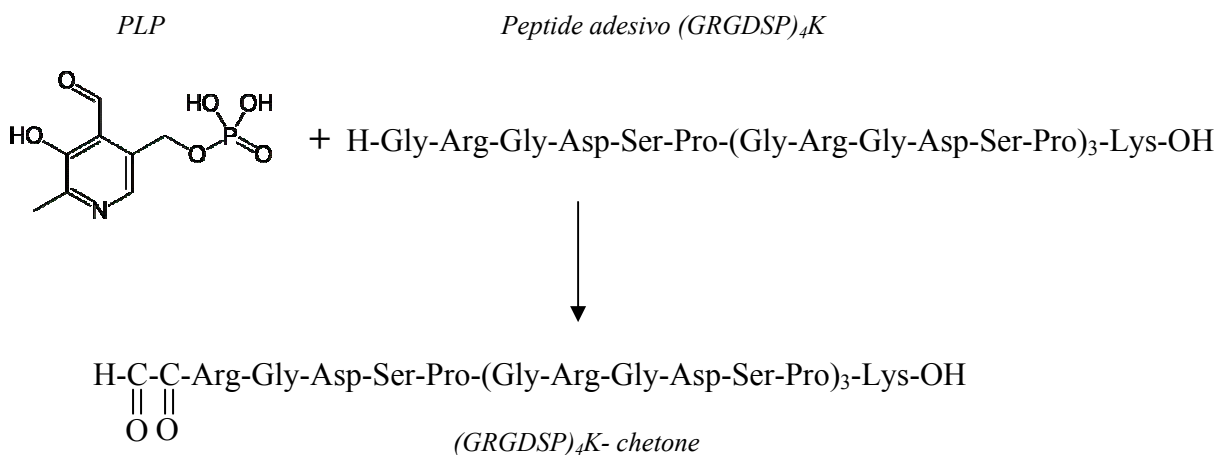


Figura 3.5: reazione tra PLP e il peptide adesivo (GRGDSP)₄K, per formare il chetone.

Finita la reazione, la miscela è stata filtrata in un bicchierino ed iniettata in RP-HPLC semipreparativa, operando nelle seguenti condizioni: colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 13 % di B in 52 minuti, poi all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; detector: 214 nm (figura 3.6).

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

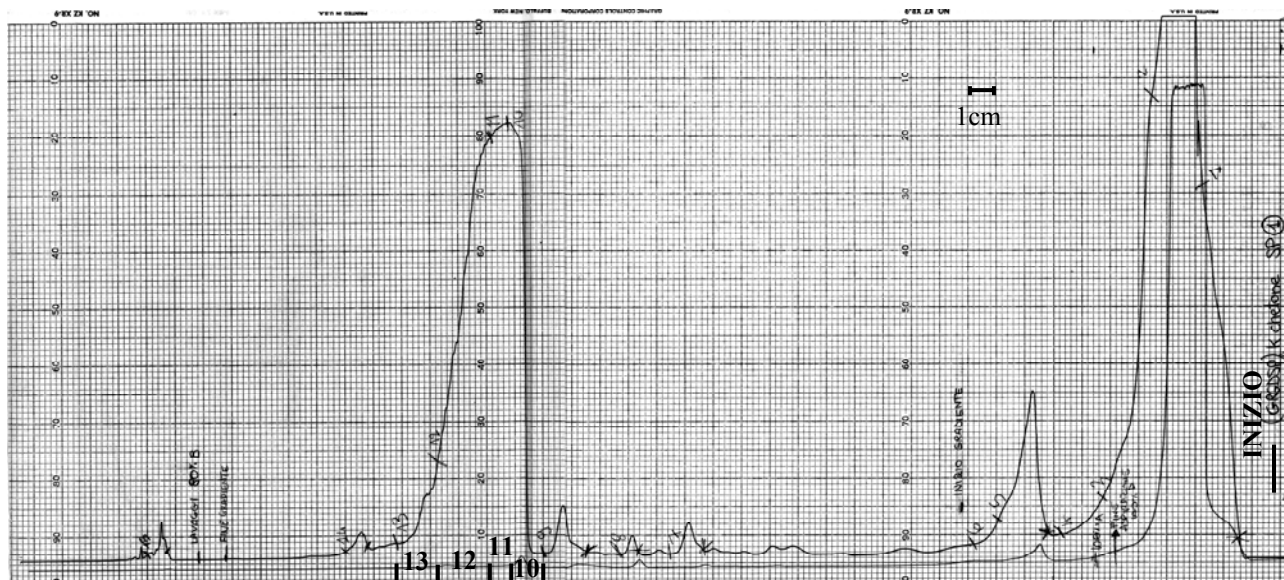


Figura 3.6: Cromatografia semipreparativa in RP-HPLC della miscela di reazione per isolare (GRGDSP)4K-chetone. Colonna Delta-pak C18 B; eluente A: 0,05% TFA in H₂O; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 13 % di B in 52 minuti, poi all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; fondoscala: 2,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm

Le frazioni 10, 11, 12, 13 sono state analizzate in HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% al 30% di eluente B in 30 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm (figura 3.7).

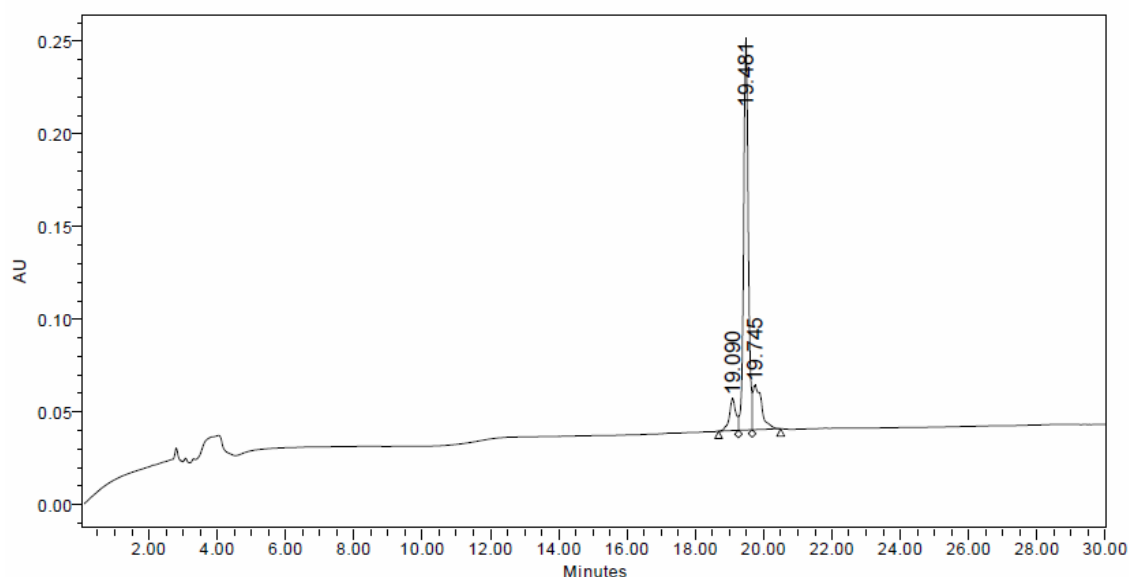


Figura 3.7: Cromatografia analitica della frazione 12 raccolta dalla semipreparativa in figura 3.6. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% al 30% di eluente B in 30 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm

Esaminando i cromatogrammi si è deciso di utilizzare solo le frazioni 11 e 12 per la reazione successiva, in quanto presentavano il picco più alto in corrispondenza del tempo di ritenzione del chetone. In seguito è riportato lo spettro di massa Maldi della frazione 12.

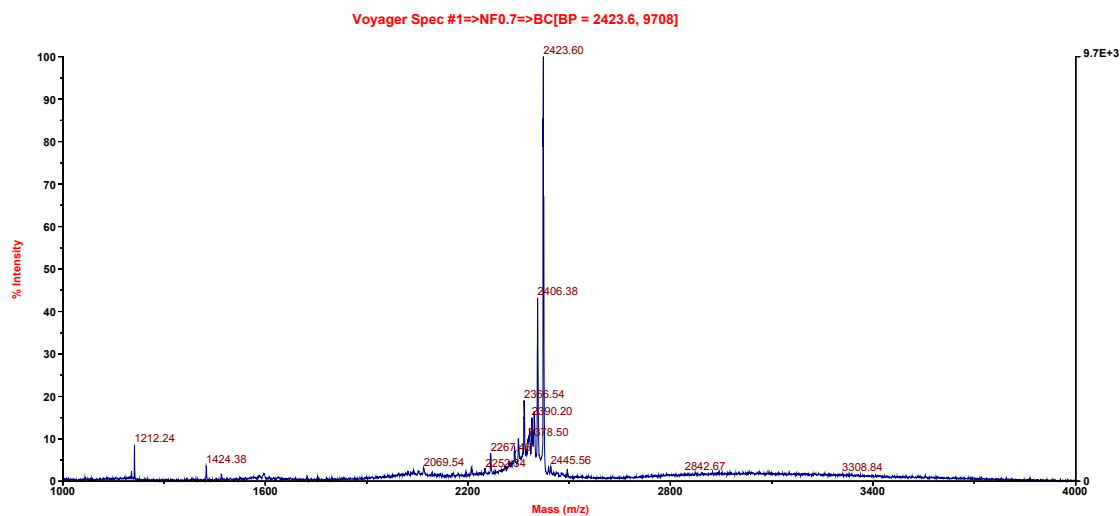


Figura 3.8: (A) Spettro di massa (Maldi) della frazione 12 raccolta dalla semipreparativa in figura 3.6. Il peso molecolare indica la presenza di (GRGDSP)₄K- chetone

Le frazioni 11 e 12, contenenti (GRGDSP)₄K –chetone sono state trasferite in un pallone, e liofilizzate. Sono stati pesati 3,0 mg di chetone, pari a $1,238 \times 10^{-6}$ moli.

3.2.1.2 Sblocco di Aoa-EAbuK dalla resina

Sono stati prelevati 100 mg di peptide Aoa-EAbuK su resina, trasferiti in un reattore a siringa, e si è proceduto con lo sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale.

È stata aggiunta la miscela di sblocco:

- 4,75 mL TFA;
- 0,125 mL TES;
- 0,125 mL H₂O MilliQ.

Il procedimento seguito per lo sblocco è lo stesso descritto nel paragrafo 5.1.2.

Al termine dello sblocco si sono ottenuti 21,24 mg di peptide grezzo; tuttavia sulle pareti del pallone è rimasta adesa una quantità rilevante di peptide, ritenuta sufficiente a raggiungere i 22,287 mg di Aoa-EAbuK necessari per la reazione successiva.

3.2.1.3 Preparazione del coniugato EAbuK-RGD

Sono state fatte reagire $1,238 \times 10^{-5}$ moli di Aoa-EAbuK, con $1,238 \times 10^{-6}$ moli di (GRGDSP)₄K-chetone (rapporto 10:1) in H₂O MilliQ.

È stata preparata una soluzione 1 mM di Aoa-EAbuK: il peptide grezzo (~22,287 mg) contenuto nel pallone è dunque stato diluito con 12,38 mL di H₂O MilliQ.

La soluzione è stata trasferita nel pallone contenente 3 mg di (GRGDSP)₄K-chetone pesati precedentemente. La reazione è avvenuta in un tempo di 24 h, a temperatura ambiente (Figura 3.9).

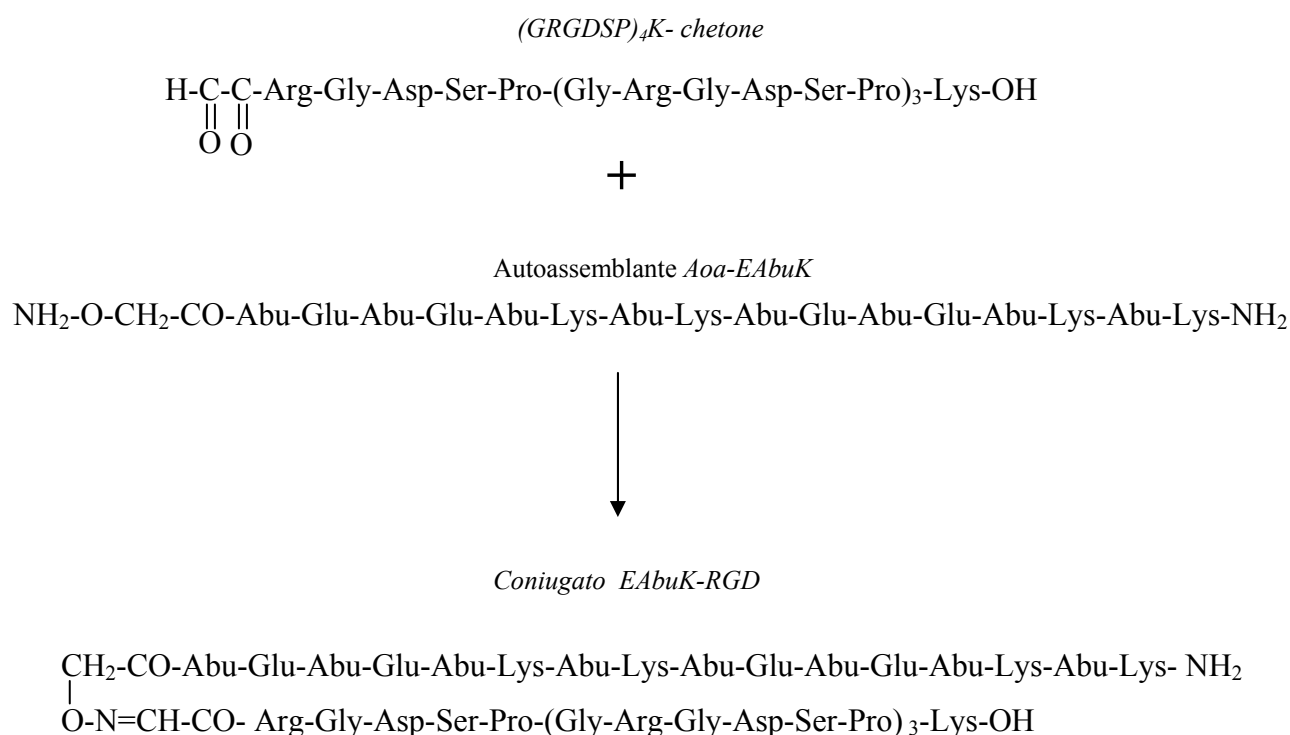


Figura 3.9: reazione tra autoassemblante Aoa-EAbuK e (GRGDSP)₄K-chetone, per formare il coniugato EAbuK-RGD.

Finita la reazione, la miscela è stata filtrata in un bicchierino ed iniettata in RP-HPLC semipreparativa, operando nelle seguenti condizioni: colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 5 % di B in 2 minuti, poi dal 5% al 60 % di B in 110 minuti, poi dal 60% al 75% di B in 22 minuti, infine all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; detector: 214 nm (Figura 3.10).

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

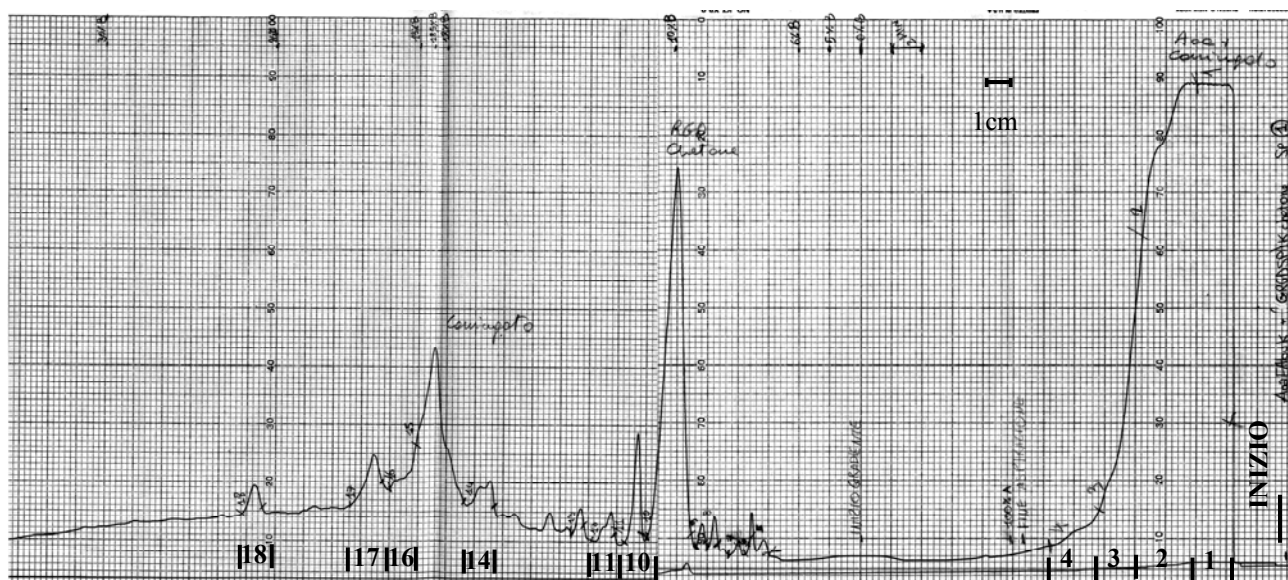
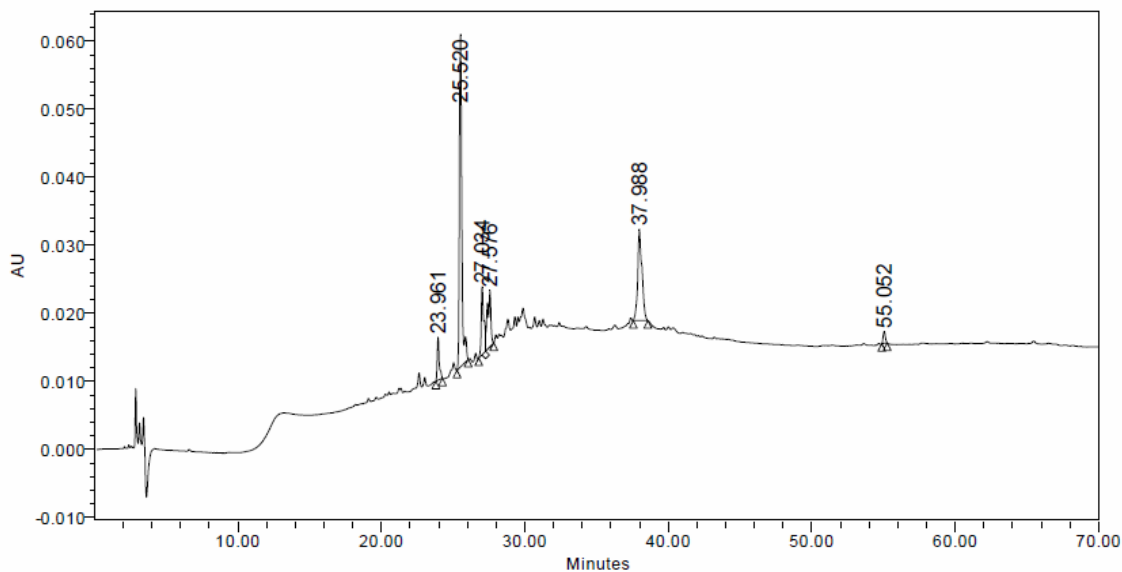


Figura 3.10: Cromatografia semipreparativa in RP-HPLC della miscela di reazione per formare EAbuK-RGD. Colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 5 % di B in 2 minuti, poi dal 5% al 60 % di B in 110 minuti, poi dal 60% al 75% di B in 22 minuti, infine all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; fondoscala: 2,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm.

1 mL della frazione 1 è stato seccato sottovuoto ed analizzato con spettrometria di massa Maldi. I risultati hanno confermato la presenza di un composto con peso molecolare 4206,902 Da, corrispondente a quello del prodotto desiderato (Massa teorica: 4205.902 Da).

Le frazioni 1, 2, 3, 4, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18 sono state analizzate in HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% al 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm (figura 3.11).



Esaminando i cromatogrammi si è deciso di effettuare un' altra corsa semipreparativa con HPLC, iniettando le frazioni 1, 2, 3, 4.

Le 4 frazioni sono dunque state riunite in un bicchierino e diluite con eluente A: 005% TFA in H₂O, fino ad avere un volume complessivo di 100 mL. La soluzione è poi stata iniettata in HPLC, operando nelle seguenti condizioni: colonna Zorbax C₁₈; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 40 % di B in 80 minuti, poi dal 40% all' 80 % di B in 20 minuti, infine all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; detector: 214 nm (Figura 3.12).

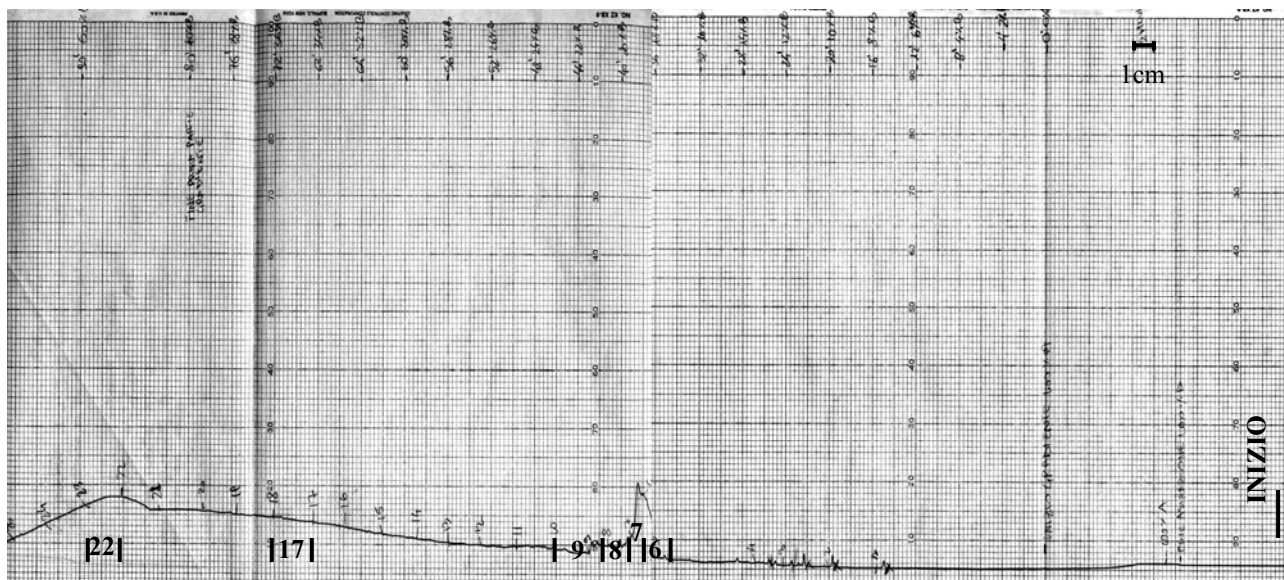


Figura 3.12: Cromatografia semipreparativa in RP-HPLC delle frazioni 1, 2, 3, 4 raccolte dalla semipreparativa in figura 3.10. Colonna Zorbax C₁₈; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 40 % di B in 80 minuti, poi dal 40% all' 80 % di B in 20 minuti, infine all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; fondoscala: 2,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm.

Le frazioni 6, 7, 8, 9, 17, 22 sono state analizzate in HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 50 µL; gradiente dallo 0% al 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm (figura 3.13).

In alcuni cromatogrammi, si nota un picco elevato in corrispondenza di un tempo di ritenzione pari a 25,6 min. Si è deciso di raccogliere tale picco, e di analizzarlo con spettrometria di massa.

Sono state effettuate 2 analitiche, iniettando la frazione 6 della semipreparativa, secondo le condizioni seguenti: Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 100 µL; gradiente dallo 0% al 40% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

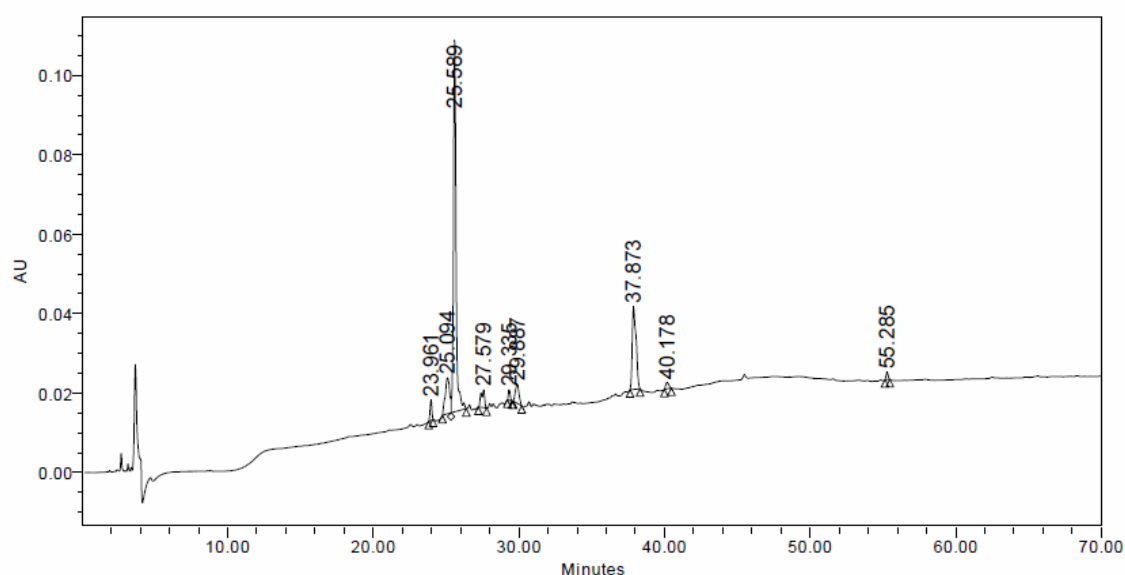


Figura 3.13: Cromatografia analitica della frazione 6, raccolta dalla semipreparativa in figura 3.12. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 100 µL; gradiente dallo 0% al 40% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Il volume raccolto è stato messo a seccare sotto vuoto, e poi analizzato il campione con spettrometro di massa ESI (figura 3.14). I risultati hanno rivelato la presenza del prodotto desiderato (PM: 4206, 902 Da).

In un pallone sono state riunite le frazioni 6 e 7 della semipreparativa in figura 3.12, in quanto contengono il coniugato, senza la presenza di particolari impurezze, il pallone è stato poi messo a liofilizzare. Sono stati ottenuti 0,51 mg.

In un altro pallone, invece, sono state riunite le frazioni 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, contenenti il coniugato, ma con impurezze; sono dunque state effettuate delle analitiche per purificare il coniugato, isolando il picco 25,6 min. Il prodotto desiderato è stato poi trasferito in un pallone e liofilizzato.

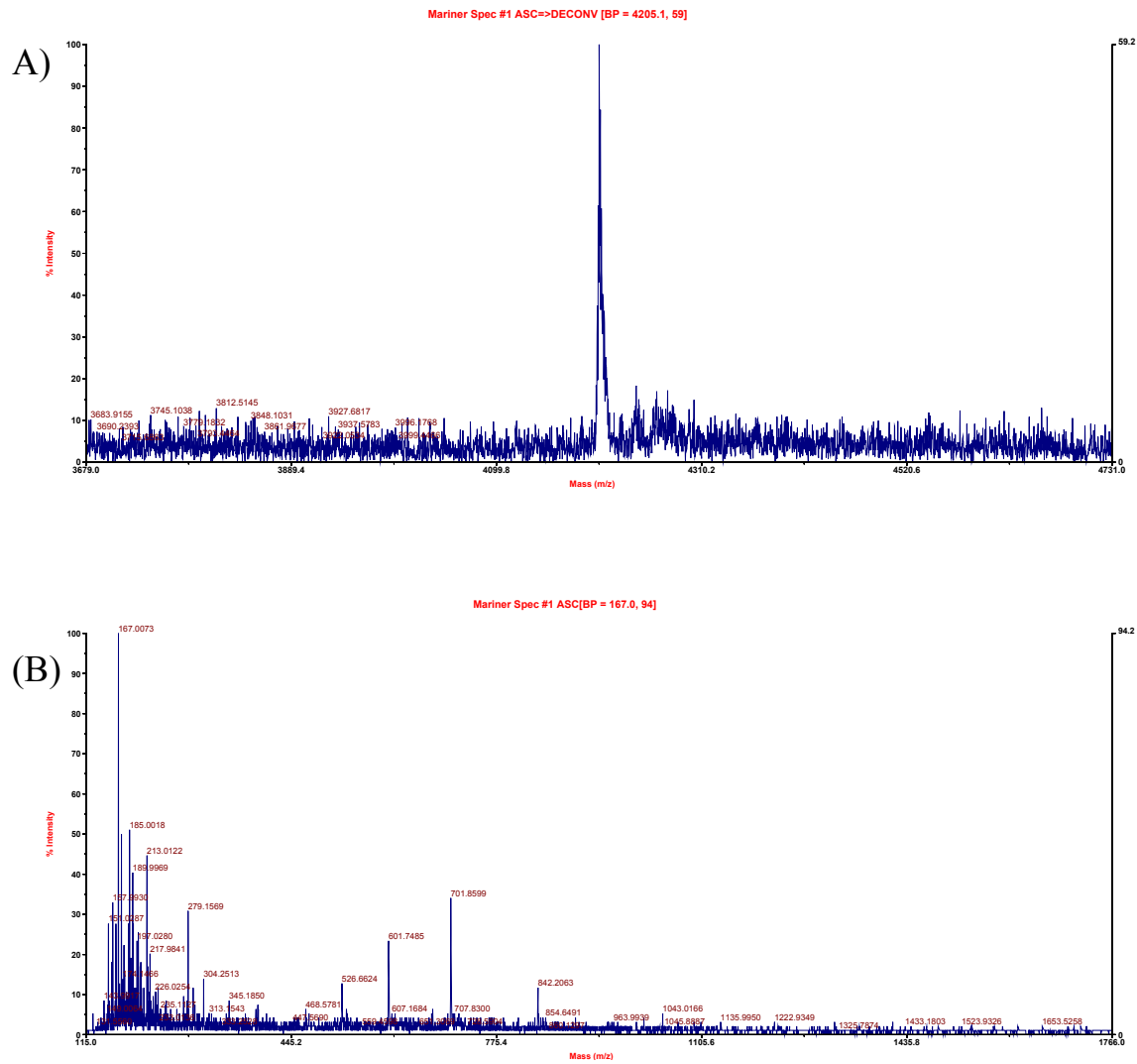


Figura 3.14: (A) Spettro di massa (ESI-TOF) del picco con $t_R=25,6$ minuti rappresentato nel cromatogramma riportato in Fig. 3.13, (B) deconvoluzione dello stesso picco.

3.2.2 Coniugazione tra Aoa-EA_{bu}K e HVP

3.2.2.1 Preparazione di HVP-chetone

È stata preparata una soluzione 10 mM di PLP in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5. Sono state fatte reagire $2,78 \times 10^{-4}$ moli di PLP con $1,39 \times 10^{-6}$ moli di HVP (rapporto 20:1) in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5; prelevando 28,2 mL della soluzione di PLP e trasferendoli in un portacampione in plastica 17,13 mg di HVP pesati precedentemente. La reazione è avvenuta in un tempo di 18 h, ad una temperatura di 37 °C (Figura 3.15).

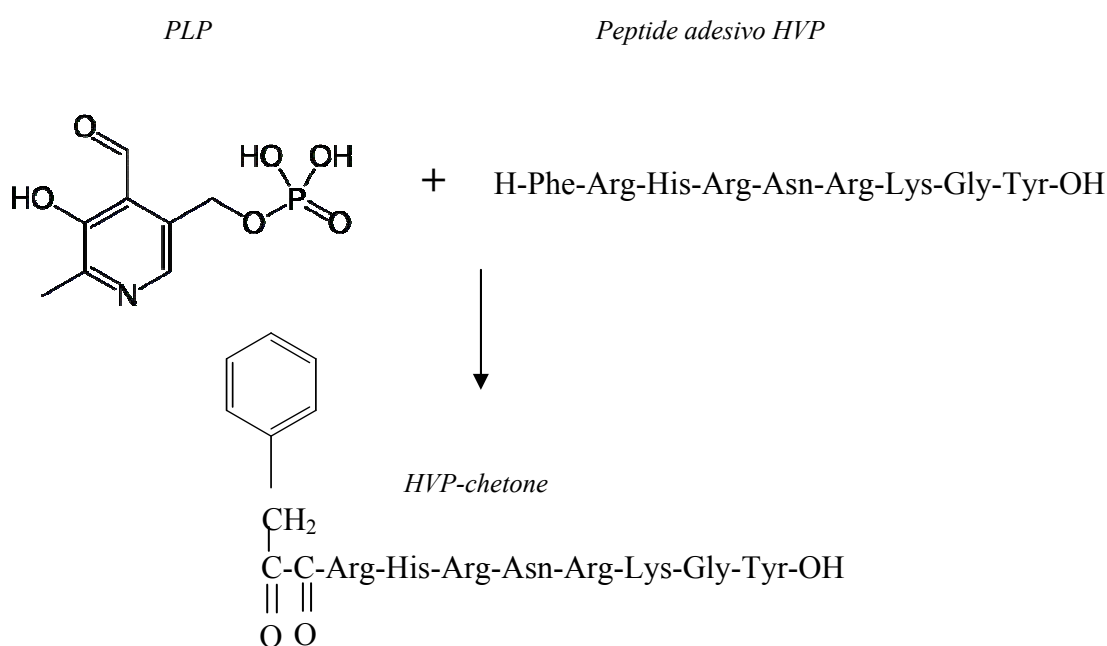


Figura 3.15: reazione tra PLP e il peptide adesivo HVP, per formare il chetone.

Per identificare il tempo di ritenzione del peptide HVP, è stata effettuata una corsa in HPLC analitica, nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 µL; gradiente dallo 0% al 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm (figura 3.16).

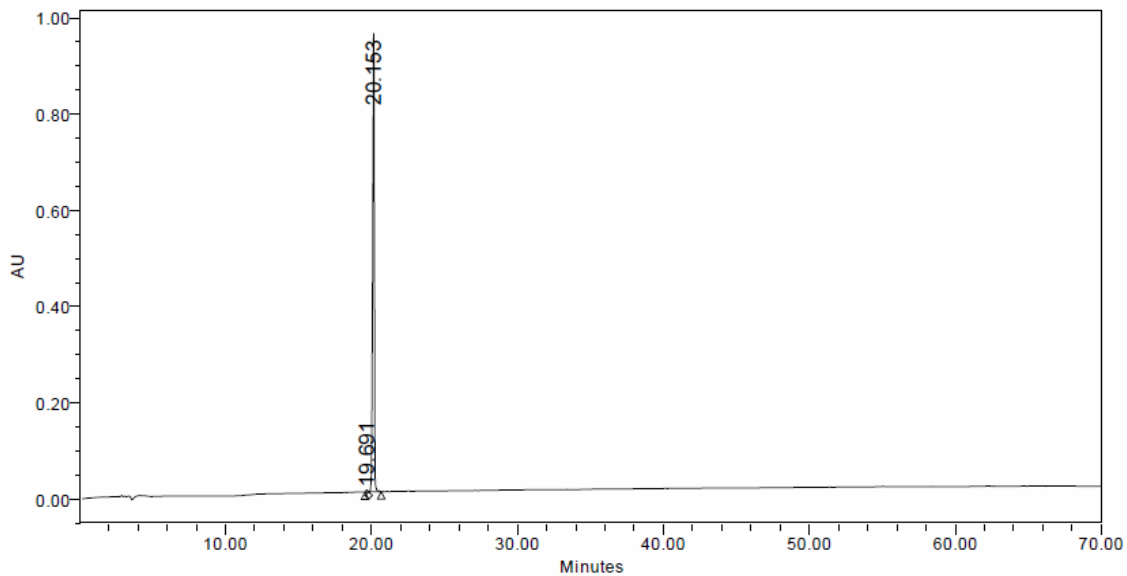


Figura 3.16: Cromatografia del peptide adesivo HVP. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 μL; gradiente dallo 0% al 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Finita la reazione, la miscela è stata filtrata in un bicchierino ed iniettata in RP-HPLC semipreparativa, in 2 volte successive, operando nelle seguenti condizioni: colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 0,05% TFA in H₂O; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 4 % di B in 2 minuti, poi dal 4 al 14% di B in 40 minuti, poi dal 14 all'80% di B in 2 minuti, infine all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; detector: 214 nm (figura 3.17).

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

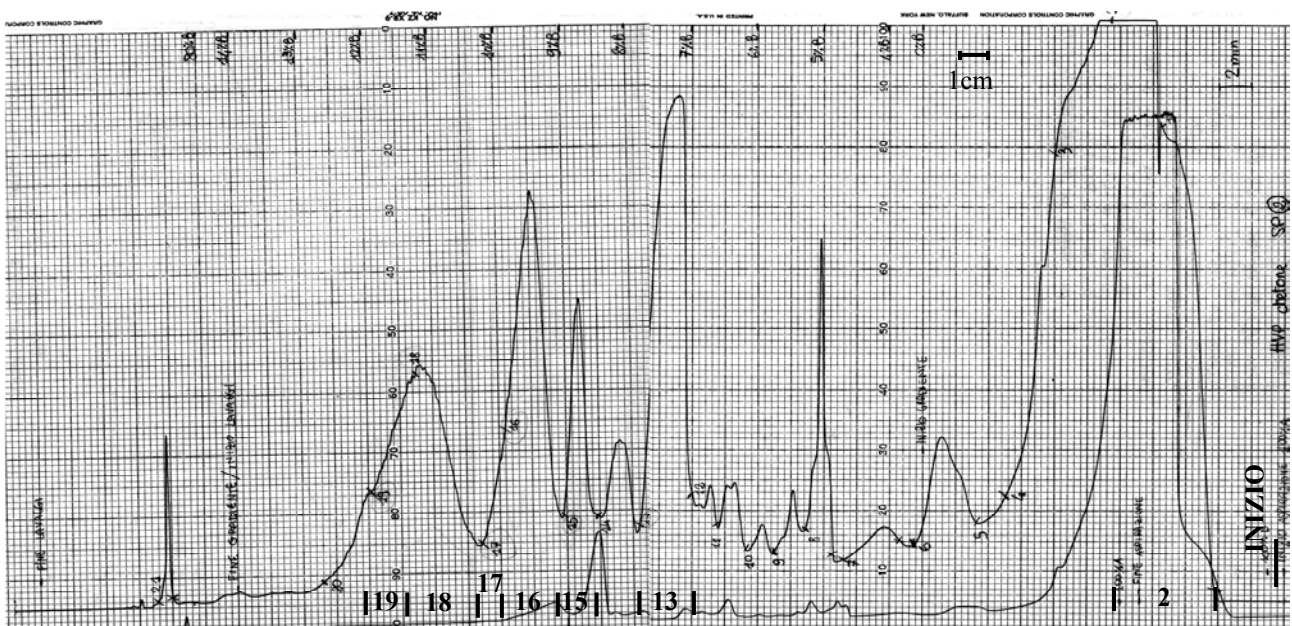


Figura 3.17: Cromatografia semipreparativa in RP-HPLC della miscela di reazione per formare HVP-chetone. Colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 0,05% TFA in H₂O; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 4 % di B in 2 minuti, poi dal 4 al 14% di B in 40 minuti, poi dal 14 all'80% di B in 2 minuti, infine all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; fondoscala: 2,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm

Le frazioni 2, 13, 15, 16, 17, 18, 19 della seconda semipreparativa sono state analizzate in HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% al 50% di eluente B in 50 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm (figura 3.18).

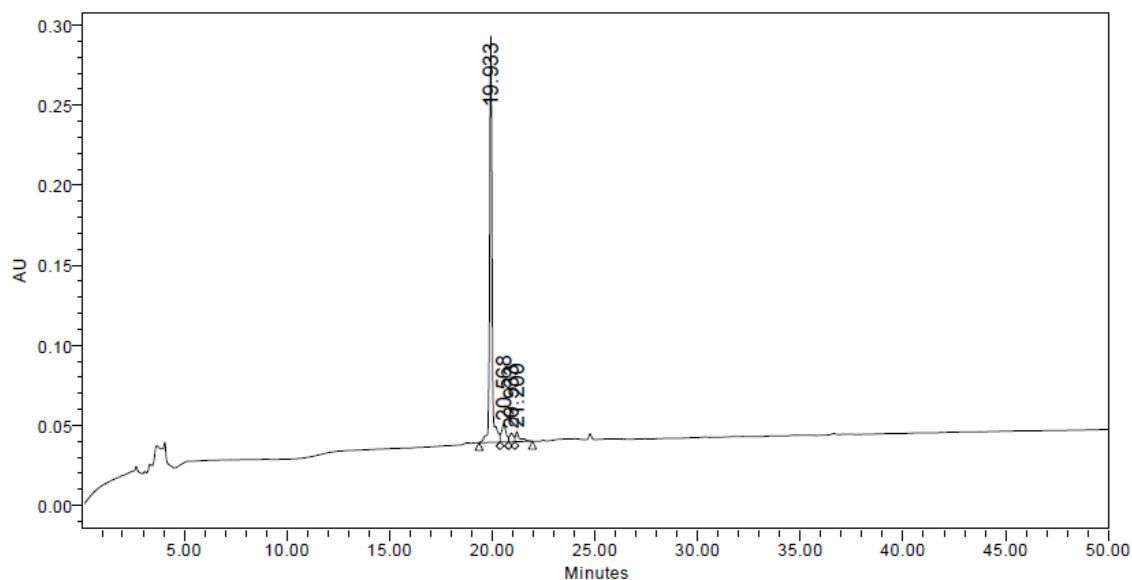
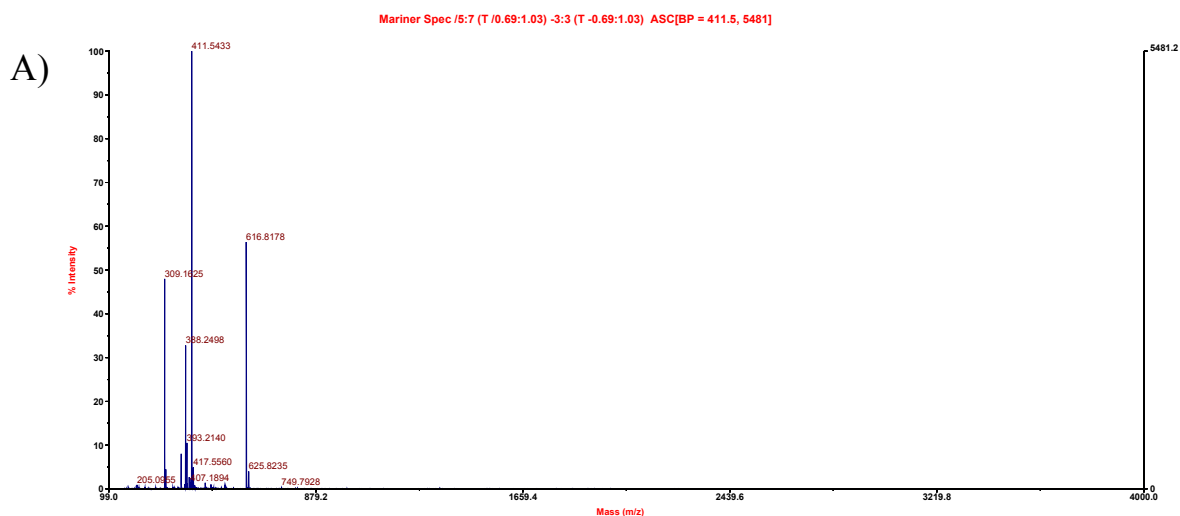


Figura 3.18: Cromatografia analitica della frazione 15 raccolta dalla semipreparativa in figura 3.17. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% al 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Sono stati prelevati 100 µl dalle frazioni 15, 16, 18 della seconda semipreparativa; sono stati seccati sotto vuoto ed analizzati con spettrometro di massa (figura 3.19).



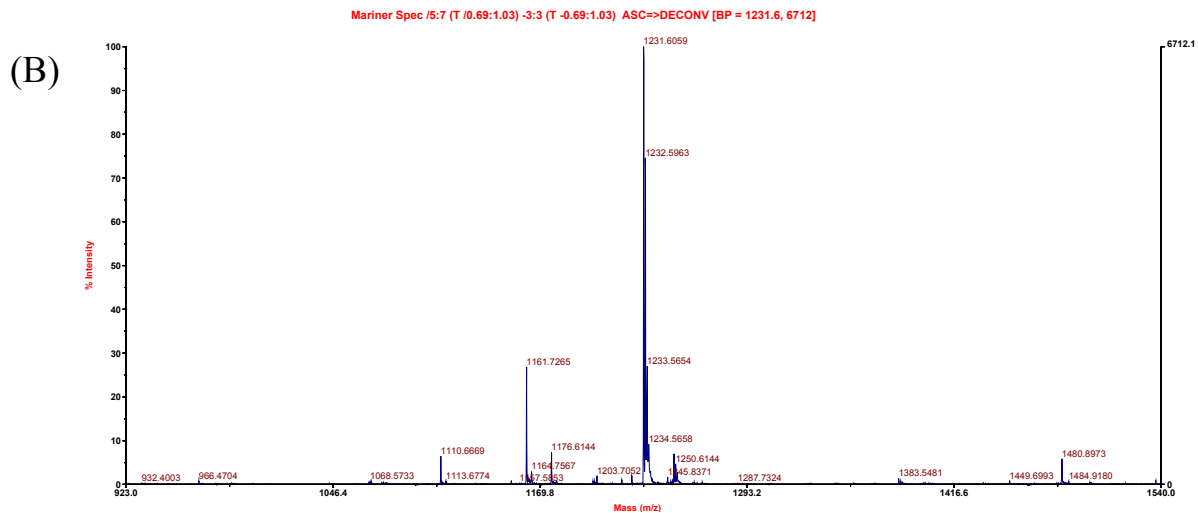


Figura 3.19: (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione 18 della SP in figura 3.17, contenente il chetone del peptide HVP e (B) sua deconvoluzione.

I risultati delle analisi indicano che la frazione 18 corrisponde al chetone (PM: 1232 Da), mentre le frazioni 15 e 16 corrispondono all'addotto con PLP (PM: 1461 Da).

In un pallone sono state riunite le frazioni 20, 21 e 22 della prima semipreparativa e le frazioni 18, 19 e 20 della seconda semipreparativa. Il pallone è stato poi messo a liofilizzare; sono stati pesati 1,42 mg di chetone.

3.2.2.2 Sblocco di Aoa-EAbuK dalla resina

Sono stati prelevati 117,05 mg di peptide Aoa-EAbuK su resina, trasferiti in un reattore a siringa, e si è proceduto con lo sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale.

È stata aggiunta la miscela di sblocco:

- 4,75 mL TFA (acido trifluoroacetico);
- 0,125 mL TES (trietilsilano);
- 0,125 mL H₂O MilliQ.

Il procedimento seguito per lo sblocco è lo stesso descritto nel paragrafo 2.2.1.4 (Procedura di sblocco completo)

Risultano 25 mg di Aoa-EAbuK sbloccato, grezzo.

3.2.2.3 Preparazione del coniugato EAbuK-HVP

Sono state fatte reagire $1,152 \times 10^{-5}$ moli di Aoa-EAbuK, con $1,152 \times 10^{-6}$ moli di HVP-chetone (rapporto 10:1) in H₂O MilliQ.

È stata preparata una soluzione 1 mM di Aoa-EAbuK: 20,7 mg di peptide grezzo sono stati trasferiti in un pallone, e diluiti con 11,54 mL di H₂O MilliQ.

In una cartina sono stati pesati 1,42 mg di HVP-chetone, poi trasferiti nel pallone contenente la soluzione di peptide autoassemblante. La reazione è avvenuta in un tempo di 24 h, a temperatura ambiente (Figura 3.20).

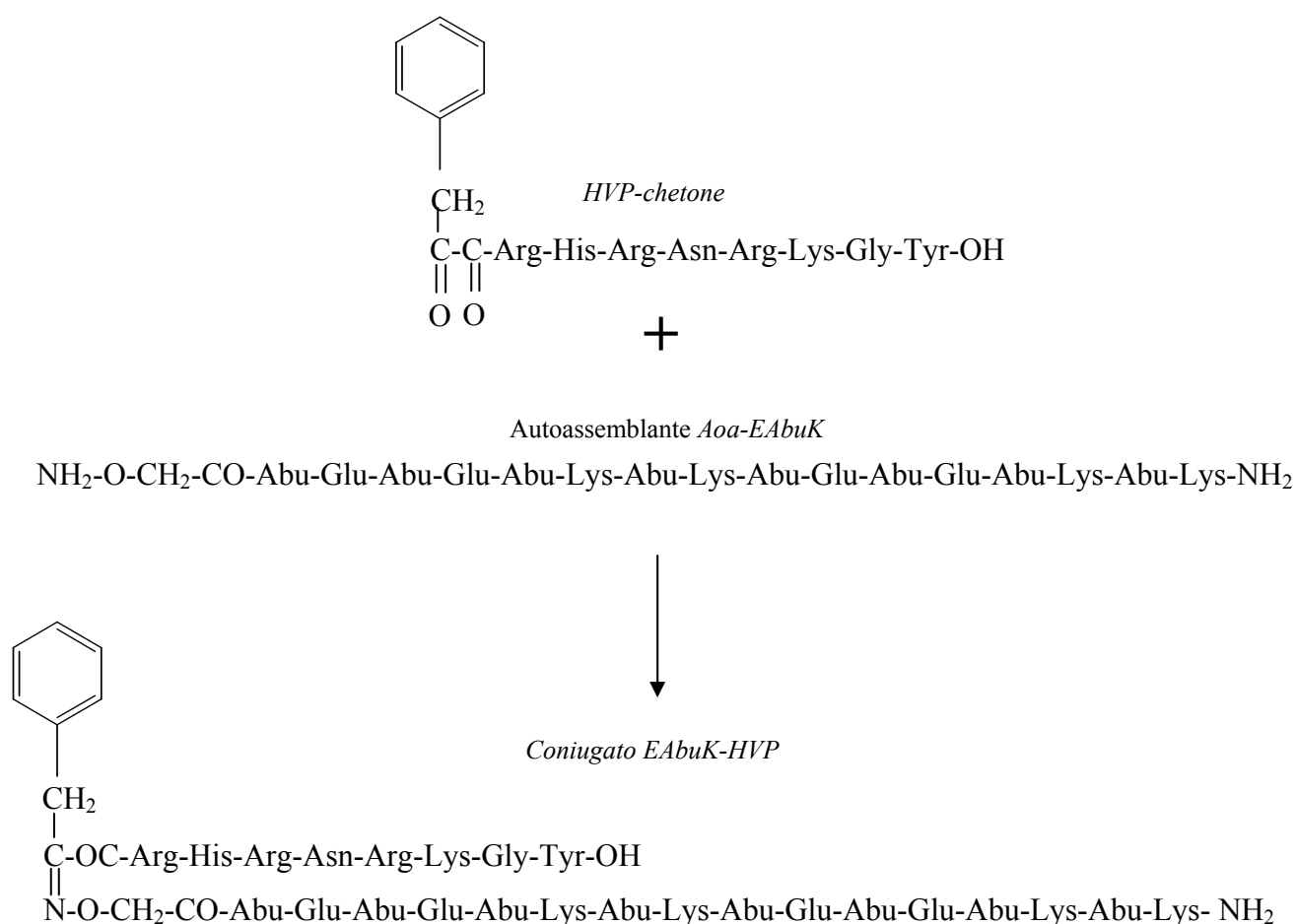


Figura 3.20: reazione tra autoassemblante Aoa-EAbuK e HVP-chetone, per formare il coniugato EAbuK-HVP.

Finita la reazione, la miscela è stata diluita con H₂O MilliQ, e portata ad un volume di 75 mL; filtrata in un bicchierino ed iniettata in RP-HPLC semipreparativa, operando nelle seguenti condizioni: colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 50 % di B in 100 minuti, poi all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; detector: 214 nm (figura 3.21).

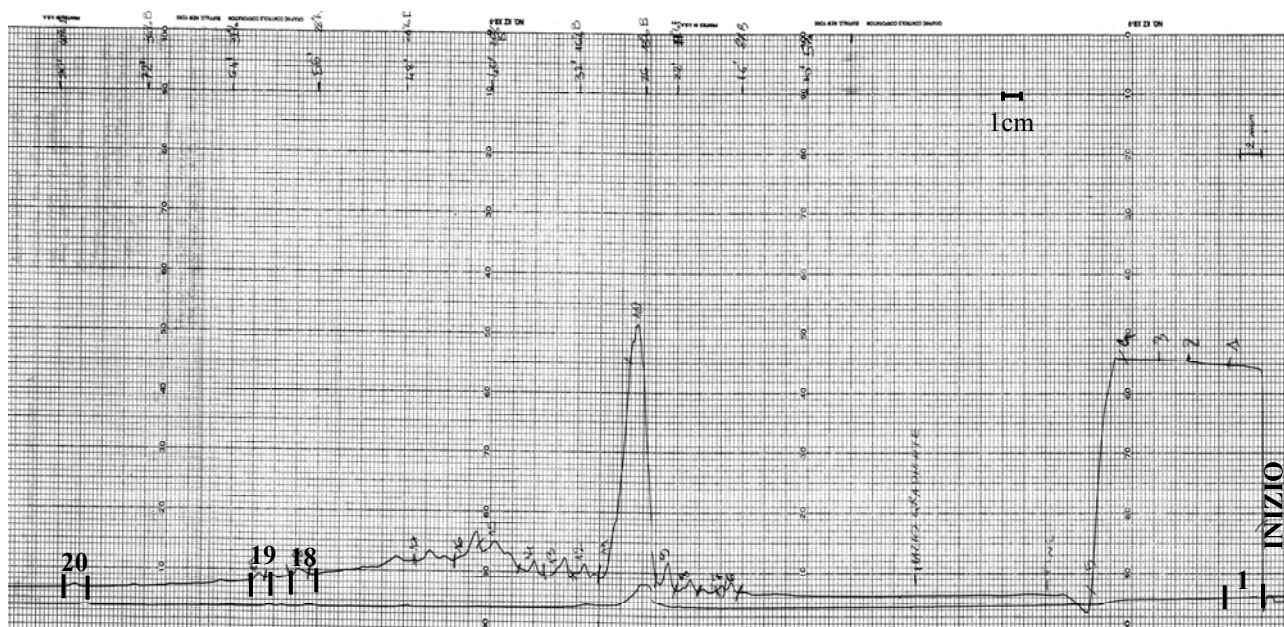


Figura 3.21: Cromatografia semipreparativa in RP-HPLC della miscela di reazione per formare HVP-chetone. Colonna Delta-pak C₁₈ B; eluente A: 005% TFA in H₂O; eluente B: 005% TFA in CH₃CN; gradiente: dallo 0 al 50 % di B in 100 minuti, poi all'80% di B per 10 min; flusso: 1 mL/min; fondoscala: 2,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

Sono stati prelevati 500 µl dalla frazione 1, e 400 µl dalle frazioni 18, 19, 20 della semipreparativa; sono stati seccati sotto vuoto ed analizzati con spettrometro di massa ESI. Non è stata rilevata la presenza di coniugato in alcuna frazione.

3.3 Preparazione dei dischetti di titanio

3.3.1 Preparazione della superficie

I dischetti di titanio utilizzati nell'esperimento (\varnothing 14.2 mm; altezza 2.5 mm), sono stati ricavati da barre cilindriche, mediante operazioni di troncatura e tornitura.

I dischetti ottenuti sono stati levigati con carta abrasiva di grana 80 o 200 e sono poi stati sabbiati con Corundrum 400 μm [33,34,35].

Sono poi stati effettuati i seguenti trattamenti chimici:

3.3.1.1 Prima ossidazione

Reagenti:

- 120 mL H₂O MilliQ.
- 40 mL HCl 37%.
- 40 mL H₂SO₄ conc.

I dischetti sono stati messi in un pallone da 1 L, riscaldato esternamente da una camicia termica. La reazione è avvenuta in riflusso, alla temperatura di ebollizione della soluzione, in un tempo di 6 min.

I dischetti sono stati trasferiti in un cristallizzatore e lavati con :

- H₂O bidistillata (3 lavaggi da 3 min ciascuno).
- Acetone (3 lavaggi da 3 min ciascuno).
- Toluene (3 lavaggi da 3 min ciascuno).

Le operazioni sono state effettuate in un bagno ad ultrasuoni.

Al termine dei lavaggi, i dischetti sono stati messi a seccare sotto vuoto per 1 ora.

3.3.1.2 Seconda ossidazione

Reagenti:

- 50mL H₂SO₄
- 50mL H₂O₂

La reazione è avvenuta in un cristallizzatore, a temperatura ambiente, per 2 h.

I dischetti sono stati poi lavati con :

- H₂O bidistillata (3 lavaggi da 3 min ciascuno).
- Acetone (3 lavaggi da 3 min ciascuno) .
- Toluene (3 lavaggi da 3 min ciascuno).

I lavaggi sono stati effettuati in un bagno ad ultrasuoni.

I dischetti sono stati messi a seccare sotto vuoto per 1h.

3.3.1.3 Silanizzazione

Reagenti:

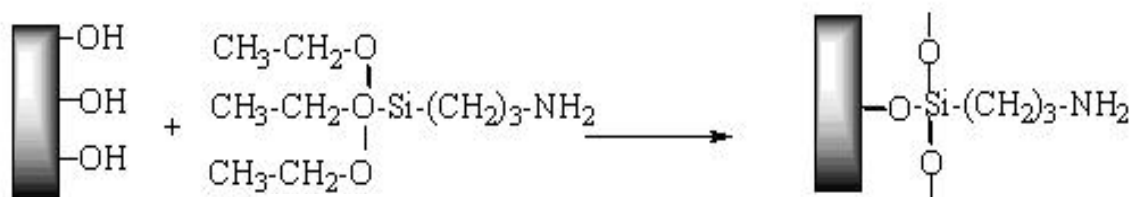
- 10 mL (3-Aminopropil) trietilsilano (APTES)
- 90 mL Toluene

La reazione è avvenuta in un pallone da 1L, in riflusso, alla temperatura di ebollizione della soluzione, in un tempo di 4h.

I dischetti sono stati poi lavati con :

- Toluene (1 lavaggio da 3 min) senza sonicare.

Il cristallizzatore è stato messo a seccare sotto vuoto per 1 ora, poi è stato trasferito in forno, dove è rimasto per 2h ad una temperatura di 100°C.



Substrato1: Titanio ossidato

APTES

Substrato2: Titanio silanizzato

Figura 3.1.: Modifiche chimiche apportate alla superficie in seguito alla silanizzazione con APTES

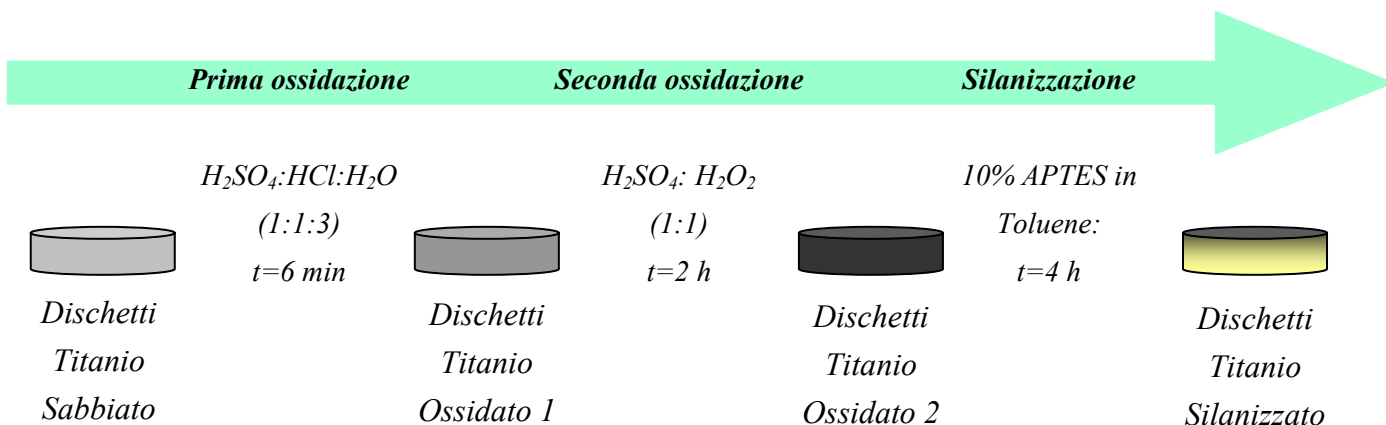


Figura 3.2: Schema riassuntivo delle reazioni effettuate sui dischetti di titanio

3.3.2 Funzionalizzazione dei dischetti

I dischetti di titanio silanizzato, sono stati modificati con peptidi in differenti modi per promuovere l'adesione e la proliferazione degli osteoblasti.

Sono state preparate le seguenti superfici:

3.3.2.1 Descrizione dei substrati

I substrati esaminati sono i seguenti:

1. Ti Sil

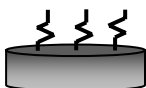
Descrizione: dischetti di titanio silanizzato (Ti Sil).



Ti Sil

2. Ti Sil + EAbuK (cb)

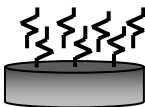
Descrizione: dischetto di titanio silanizzato con uno strato di autoassemblante legato covalentemente alla superficie.



Ti Sil + EAbuK (cb)

3. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK

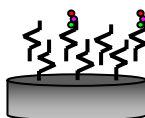
Descrizione: dischetto di titanio silanizzato, funzionalizzato con uno strato di autoassemblante legato covalentemente alla superficie, con aggiunta di un secondo strato di autoassemblante adsorbito sul primo strato.



Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK

4. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK + EAbuK-RGD

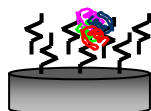
Descrizione: dischetto di titanio silanizzato, funzionalizzato con uno strato di autoassemblante legato covalentemente alla superficie, al primo strato è adsorbito un secondo strato composto da una miscela di autoassemblante ed autoassemblante legato covalentemente alla sequenza adesiva RGD.



Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK-RGD

5. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK + IGF-1

Descrizione: dischetto di titanio silanizzato, funzionalizzato con uno strato di autoassemblante legato covalentemente alla superficie, al primo strato è adsorbito un secondo strato composto da una miscela di autoassemblante e da fattore di crescita IGF-1.



Ti Sil + EAbuK (cb) + IGF-1

6. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK + EAbuK-RGD + IGF-1

Descrizione: dischetto di titanio silanizzato, funzionalizzato con uno strato di autoassemblante legato covalentemente alla superficie, al primo strato è adsorbito un secondo strato composto da una miscela di autoassemblante, autoassemblante legato covalentemente alla sequenza adesiva RGD e da fattore di crescita IGF-1.



Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK-RGD + IGF-1

3.3.2.2 Campioni delle diverse superfici e loro preparazione

In questo paragrafo vengono descritte le soluzioni di peptidi con cui sono stati funzionalizzati i dischetti, il metodo con cui le superfici sono state trattate, e il tipo di test effettuato sui dischetti.

Sono state preparate le seguenti soluzioni:

1. Soluzione M_0 :
 - 70,08 mg di EAbuK acetilato, con gruppi laterali protetti;
 - 30 mL di NMP;
 - 15 μ L di DIPEA;
 - 66 μ L di HBTU/HOBt 0,45 M.

2. Soluzione M_1 :
 - 6,58 mg di EAbuK;
 - 0,658 mL di H₂O MilliQ.

3. Soluzione M_2 :
 - 0,51 mg di EAbuK-RGD;
 - 51 μ L di H₂O MilliQ.

4. Soluzione M_3 :
 - 10 mg di IGF-1;
 - 1 mL di H₂O MilliQ.

1. Ti Sil

I seguenti campioni sono stati preparati con il protocollo riportato nel paragrafo 3.3.1, e così utilizzati:

- 3 dischetti per il test di adesione cellulare;
- 3 dischetti per il test di proliferazione cellulare;

2. Ti Sil + EAbuK (cb)

Preparazione: i dischetti di titanio silanizzato sono stati ripartiti in 3 cristallizzatori diversi, in modo che non si sovrapponevano. Sono poi stati ricoperti con la soluzione M_0 . La reazione di ancoraggio del peptide ai dischetti è durata 18 h.

Al termine della reazione, i dischetti sono stati lavati con NMP per 3 volte, e con acetone per 3 volte; poi sono stati trasferiti in un unico cristallizzatore e seccati sotto vuoto per 1 h.

Successivamente sono stati sbloccati i gruppi laterali del peptide. La soluzione di sblocco è la seguente:

- 1 mL di TES;
- 1 mL di H₂O MilliQ;
- 38 mL di TFA

La soluzione è stata versata nel cristallizzatore contenente i dischetti, ricoprendoli tutti. La reazione è durata 1 h.

Al termine della reazione, la soluzione è stata rimossa e sono stati effettuati 3 lavaggi con TFA e 3 lavaggi con acetone. I dischetti sono poi stati messi a seccare sotto vuoto per 1h.

I campioni di questa superficie sono stati utilizzati così:

- 3 dischetti per il test di adesione cellulare;
- 3 dischetti per il test di proliferazione cellulare.
- 1 dischetto per analisi XPS.

3. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK

Preparazione: sono stati utilizzati dischetti con Ti Sil + EAbuK (cb), ai quali sono stati aggiunti:

- 11,8 µL di soluzione M₁;
- 11,8 µL di soluzione 8% di glucosio in H₂O;
- 47,3 µL di RPMI (soluzione tampone contenente HEPES 25 mM),

Per questo tipo di substrato sono stati considerati:

- 3 dischetti per il test di adesione cellulare;
- 3 dischetti per il test di proliferazione cellulare.
- 1 dischetto per analisi XPS.

4. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK + EAbuK-RGD

Preparazione: sono stati utilizzati dischetti con Ti Sil + EAbuK (cb), ai quali sono stati aggiunti:

- 10,62 µL di soluzione M₁;
- 11,8 µL di soluzione 8% di glucosio in H₂O;
- 47,3 µL di RPMI (soluzione tampone contenente HEPES 25 mM).

La soluzione M₂, è stata posta sopra ai dischetti in tre concentrazioni diverse:

- a. Concentrazione C1: 1,18 µL di soluzione M₂;
- b. Concentrazione C2: 1,18 µL di soluzione M₂, diluita 1:10;
- c. Concentrazione C3: 1,18 µL di soluzione M₂, diluita 1:100.

Per ogni concentrazione sono stati considerati:

- 3 dischetti per il test di adesione cellulare;
- 1 dischetto per analisi XPS.

5. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK + IGF-1

Preparazione: sono stati utilizzati dischetti con Ti Sil + EAbuK (cb), ai quali sono stati aggiunti:

- 10,62 μL di soluzione M_1 ;
- 11,8 μL di soluzione 8% di glucosio in H_2O ;
- 47,3 μL di RPMI (soluzione tampone contenente HEPES 25 mM).

La soluzione M_2 , è stata posta sopra ai dischetti in tre concentrazioni diverse:

- a. Concentrazione C1: 1,18 di soluzione M_3 ;
- b. Concentrazione C2: 1,18 μL di soluzione M_3 , diluita 1:10;
- c. Concentrazione C3: 1,18 di soluzione M_3 , diluita 1:100.

Per ogni concentrazione sono stati considerati:

- 3 dischetti per il test di proliferazione cellulare;

6. Ti Sil + EAbuK (cb) + EAbuK-RGD + IGF-1

Descrizione: dischetto di titanio silanizzato, funzionalizzato con uno strato di autoassemblante legato covalentemente alla superficie, al primo strato è adsorbito un secondo strato composto da una miscela di autoassemblante, autoassemblante legato covalentemente alla sequenza adesiva RGD e da fattore di crescita IGF-1.

Preparazione: sono stati utilizzati dischetti con Ti Sil + EAbuK (cb), ai quali sono stati aggiunti:

- 9,44 μL di soluzione M_1 ;
- 11,8 μL di soluzione 8% di glucosio in H_2O ;
- 47,3 μL di RPMI (soluzione tampone contenente HEPES 25 mM).

La soluzione M_2 , è stata posta sopra ai dischetti in tre concentrazioni diverse:

- a. Concentrazione C1: 1,18 μL di soluzione M_2 /1,18 μL di soluzione M_3 ;
- b. Concentrazione C2: 1,18 μL di soluzione M_2 /1,18 μL di soluzione M_3 , diluite 1:10;
- c. Concentrazione C3: 1,18 μL di soluzione M_2 /1,18 di soluzione M_3 , diluite 1:100.

Per ogni concentrazione sono stati considerati:

- 3 dischetti per il test di adesione cellulare;
- 3 dischetti per il test di proliferazione cellulare.

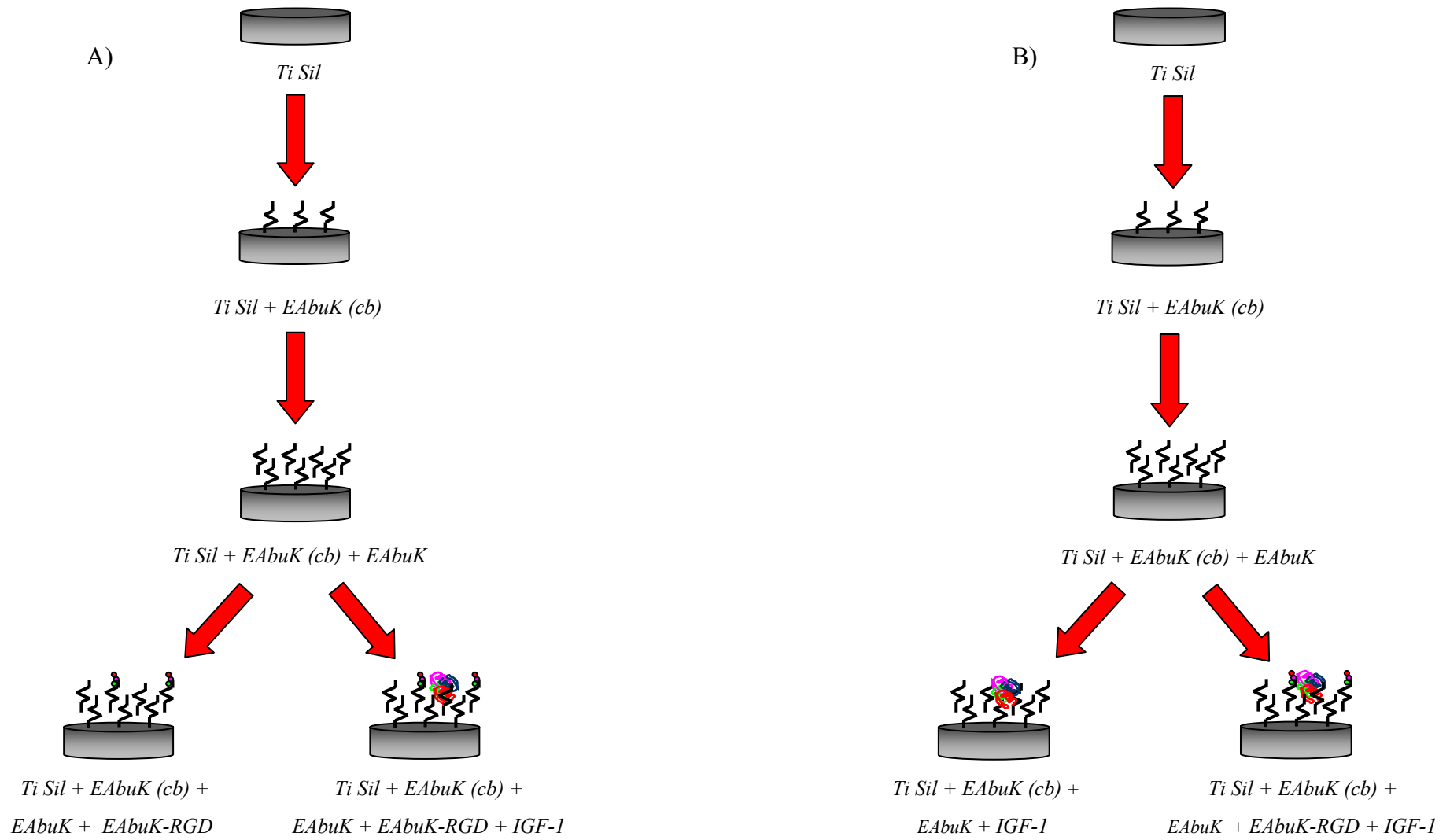


Figura 3.3: Schema riassuntivo degli scaffolds utilizzati nei test. (A) Funzionalizzazioni dei dischetti utilizzati per il test di adesione cellulare, (B) funzionalizzazioni dei dischetti utilizzati per il test di proliferazione cellulare.

3.4 Saggi biologici

3.4.1 Coltura cellulare

Gli osteoblasti umani sono stati isolati dall'osso mandibolare di un uomo sano adulto e coltivati a 37 °C (in atmosfera contenente il 5% di CO₂) in fiasche per coltura cellulare con Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), addizionato di 20% (v/v) di siero bovino fetale (fetal bovine serum, FBS) inattivato al calore, di 10 U/ml di penicillina e streptomina, di 1% (v/v) di sodio piruvato, di 1% (v/v) di amminoacidi non essenziali e di 1 U/ml di insulina. Al raggiungimento del 90% di confluenza, le cellule sono state staccate mediante incubazione con tripsina e coltivate nel terreno di coltura arricchito con 50 µg/ml di acido ascorbico, 10 nM di desametasone e 10 mM di β-glicerofosfato, per almeno 10 gg prima di eseguire i saggi sperimentali. Il terreno è stato rinnovato ogni 3 gg. Tutti i reagenti utilizzati per la coltura cellulare sono stati forniti da Gibco, Milano.

3.4.2 Semina delle cellule

Le cellule crescono adese alla fiasca contenente il terreno di coltura e questo fa sì che sia necessario staccarle prima di poterle utilizzare. Per questo viene prima eliminato il terreno di coltura e successivamente si sciacqua il supporto con terreno di coltura semplice. In questo modo vengono eliminate le cellule morte e quelle non adese.

Si procede quindi all'aggiunta di 3 ml di tripsina, composto in grado di scindere i legami cellulari che tengono unite le cellule le une alle altre ed alla fiasca. Per garantire un'azione efficace, la tripsina deve essere lasciata agire per qualche minuto a 37°, a questo fine il tutto viene depositato in incubatore per una decina di minuti. Dopo tale periodo i supporti con le due colture cellulari vengono estratte dall'incubatore e vi vengono aggiunti 3 ml di terreno di differenziazione, sufficienti a neutralizzare l'azione della tripsina.

Ciascun dischetto è stato collocato all'interno di un pozzetto di piastre in polistirene per colture tessutali da 24 pozzetti (Costar).

Gli *scaffold* sono stati, poi, sterilizzati con 250 µL di etanolo al 20% (v/v) per 10 min. Al termine dei 10 min, l'etanolo è stato rimosso, e i dischetti sono stati lasciati ad asciugare sotto cappa.

Successivamente, sopra ogni dischetto, sono stati aggiunti 50 µL di terreno, contenenti 50000 osteoblasti (1000 cellule/µL).

3.4.3 Test di adesione cellulare

La valutazione dell'adesione cellulare indica il numero di cellule che aderiscono allo *scaffold*. Si semina dunque un numero definito di osteoblasti sopra ai dischetti, e si lascia incubare per 2 ore a 37°C, periodo di tempo sufficiente all'adesione cellulare ma non alla replicazione. Solo una parte delle cellule aderirà dunque alla superficie.

Viene praticato un saggio colorimetrico, che utilizza l'agente ossidante cromogeno 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro (MTT) (vedi paragrafo 4.5).

Dopo 2 h di incubazione dal momento che le cellule sono state seminate sui dischetti, vengono aggiunti 10 µL di una soluzione con concentrazione 1 mg/mL di MTT. Dopo un periodo di incubazione di 4 h a 37 °C, i campioni sono stati trattati con SDS 10% p/v contenente HCl alla concentrazione finale 0,01N. La misura di densità ottica della soluzione finale è stata effettuata a 620 nm dopo una incubazione per 16 ore.

La curva standard è stata ricavata determinando le densità ottiche di 8 pozzetti (4 punti in duplicato), di cui era noto il numero di osteoblasti, ottenuto per conta cellulare con camera di Bürker.

3.4.4 Test di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è calcolata come la differenza tra il numero di cellule presenti sulla superficie dei dischetti in un determinato periodo di tempo, e il numero di cellule seminate all'inizio dell'esperimento. Anche in questo test viene praticato un saggio colorimetrico, che utilizza l'agente ossidante cromogeno 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro (MTT).

Dopo 24 h di incubazione dal momento che le cellule sono state seminate sui dischetti, vengono aggiunti 10 µL di una soluzione con concentrazione 1 mg/mL di MTT. Dopo un periodo di incubazione di 4 h a 37 °C, i campioni sono stati trattati con SDS 10% p/v contenente HCl alla concentrazione finale 0,01N. Dopo 16 ore quindi sono stati prelevati 50 µL dalla soluzione sopra i dischetti, e trasferiti in pozzetti più piccoli al fine di misurare la densità ottica a 620 nm.

La curva standard è stata ricavata determinando le densità ottiche di 4 pozzetti, di cui era noto il numero di osteoblasti, ottenuto per conta cellulare con camera di Bürker.

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1 Analisi XPS

Campioni analizzati dalla professoressa G. Iucci (Dipartimento di Fisica, Università Roma Tre):

Tabella 4.1: Substrati analizzati con tecnica XPS

Sigla	Descrizione
TiSil	Ti ossidato trattato con APTES
TiSil+EAbuK(cb)	TiSil+EAbuK immobilizzato covalentemente
TiSil+EAbuK(cb)+ EAbuK	TiSil+EAbuK(cb) trattato con soluzione EAbuK
TiSil+EAbuK	TiSil trattato con soluzione EAbuK
TiSil+EAbuK(cb) +EAbuK +EAbuK-RGD	TiSil+EAbuK(cb) trattato con soluzione EAbuK + EAbuK-RGD

Sono stati analizzati i principali segnali di fotoemissione per i campioni in esame, effettuando un'analisi qualitativa (tabella 4.2) e quantitativa (tabella 4.3) degli elementi presenti.

Campione Ti Sil

Il campione Ti Sil dovrebbe essere uguale ad altri analoghi campioni analizzati [48], ma gli spettri risultano alquanto diversi. La figura 4.1 mostra il confronto fra gli spettri (Ti2p, O1s, N1s) di uno dei vecchi campioni ed un campione nuovo.

In particolare, non è stato possibile evidenziare il segnale relativo al titanio (Ti2p), a differenza di quanto accadeva per i vecchi campioni; la figura 4.1 mostra il confronto tra spettro vecchio (rosso) e spettro nuovo (nero; blu spettro amplificato x5) nel quale non si vede niente, come se lo spessore dell'overlayer organico fosse troppo elevato per far passare il segnale del substrato di titanio. Questo è molto strano perché la profondità di campionamento

dell'XPS è di circa 50 Å, molto più di quello che può essere lo spessore dell'overlayer di APTES; in effetti, da quello che dice la letteratura [46] probabilmente si è formato un multilayer. Ovviamente anche per tutti i campioni successivi, che hanno un overlayer organico più alto, non è stato possibile evidenziare il segnale del titanio.

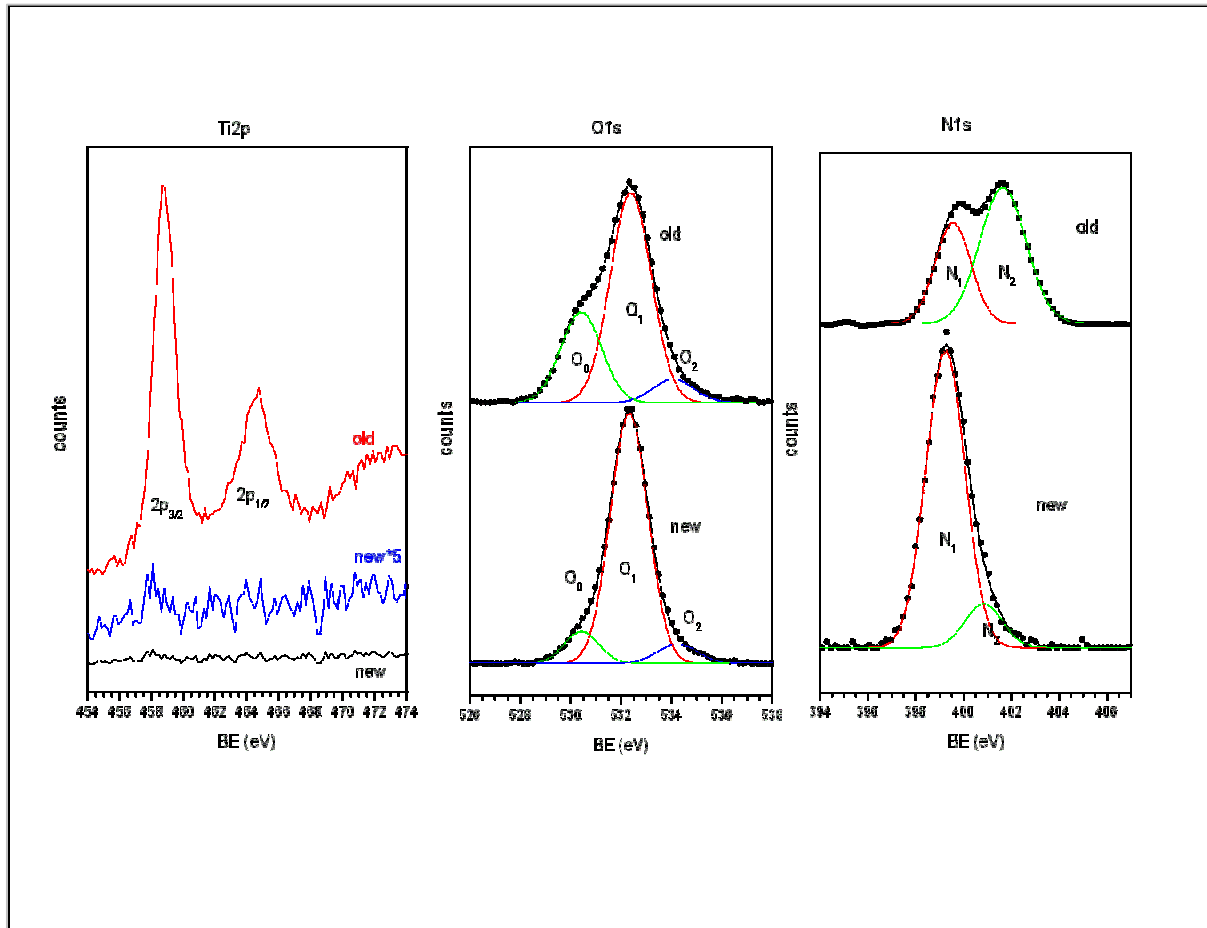


Figura 4.1: Grafico con il confronto tra gli spettri di emissione dei campioni

Anche lo spettro dell'ossigeno (O1s) risulta un po' diverso dagli spettri visti in passato [48]. Gli spettri di campioni analizzati negli anni passati (spettro in alto), mostravano una struttura composta, per cui era stato fatto un fit a più componenti. La prima componente (O0) in ordine di BE crescente è stata attribuita all'ossigeno del substrato inorganico, TiO₂, la seconda (O1) all'overlayer organico e la terza (O2) ad H₂O fisisorbita. Dal confronto fra spettro vecchio e nuovo, è chiaro come anche l'ossigeno legato al titanio sia assai poco visibile nei nuovi campioni.

Il segnale N1s consta di due componenti la prima (N1) dovuta ad azoto di tipo amminico, la seconda a cationi ammonio (N2), o, secondo quanto dicono alcuni lavori [47] ad ammine in diversa situazione di legame idrogeno. Negli spettri dei vecchi campioni (spettro in alto) N2 era la componente prevalente, ovvero la gran parte degli azoti amminici era protonata; questa volta invece (spettro in basso) N1 è di gran lunga la componente prevalente, ovvero solo una frazione molto piccola degli azoti amminici è protonata (o coinvolta in legami idrogeno) e questa, secondo la letteratura è una buona cosa. Infatti un'ammina protonata o coinvolta in legami idrogeno potrebbe indicare che la struttura dell'overlayer di APTES non è quella che vogliamo [44].

Il segnale del carbonio è stato deconvoluto, come al solito, utilizzando 3 componenti; la componente principale (C1) è dovuta a carbonio di tipo alifatico, la seconda (C2) a gruppi C-N o C-O, la terza ad atomi di C a più alto stato di ossidazione (es. C=O).

Per finire, il segnale relativo al silicio Si2p, è alla BE attesa per la struttura che ipotizziamo. Il rapporto Si/N però è molto più alto del valore atteso (1:1) e così il rapporto Si/C (1:3) ; i rapporti inoltre sono un po' diversi nei due campioni.

Campione Ti Sil+EAbuK(cb)

Ciò che maggiormente ci interessa per questo campione e i successivi è sapere se il peptide si è legato. La risposta è sì, come dimostrato dalla diminuzione del rapporto Si/N e (mediamente) Si/C; la variazione in ogni caso non sembra molto elevata.

Un fatto inatteso è la comparsa, in questo campione e in tutti i successivi, di un segnale ad altissima BE (C4), che potrebbe essere dovuto a carbonio legato al fluoro (CF₃-) e forse indicare la presenza di trifluoroacetati; abbiamo quindi cercato anche il segnale del fluoro e l'abbiamo.

In alternativa, il segnale C4 potrebbe essere dovuto non al carbonio ma al potassio (il segnale K2p_{3/2} cade più o meno a quella BE). Ci è venuto il dubbio che questo segnale potesse essere dovuto a tampone fosfato ed in effetti abbiamo trovato tracce di sodio (Na1s) e di fosforo (P2p) con una BE di tipo fosfato.

Campione Ti Sil+EAbuK(cb) +EAbuK

In questo campione si nota un netto aumento dei rapporti N/Si e N/C, sia rispetto al campione a (Ti Sil) che rispetto al b (Ti Sil+EAbuK(cb)), a indicare che si è avuto un notevole adsorbimento di peptide sulla superficie del campione. Aumentano anche i rapporti C2/C1 e C3/C1, dove C1 è un carbonio di tipo alifatico, C3 corrisponde al carbonio peptidico (N-C=O)

e C3 al gruppo C-N α al carbonio peptidico ($O=C-C-N$), a conferma dell'adsorbimento del peptide.

Si osserva anche la comparsa di un segnale dello zolfo (S2p) dovuto all'HEPES, oltre ai segnali relativi a fluoro, sodio e fosforo.

Campione Ti Sil+EAbuK

Rispetto al campione a (Ti Sil) i rapporti N/Si e N/C non variano o variano poco; la quantità di peptide adsorbita in questo caso è veramente minima. Anche per questo campione è presente lo zolfo (HEPES), fluoro, sodio e fosforo.

Campione Ti Sil+EAbuK(cb) +EAbuK+EAbuK-RGD

Anche per questo campione, come per il c, si nota un aumento dei rapporti N/Si e N/C, sia rispetto al campione a (Ti Sil) che rispetto al b (Ti Sil+EAbuK(cb)), a indicare l'avvenuto adsorbimento di peptide sulla superficie del campione; aumentano anche i rapporti C2/C1 e C3/C1. A giudicare dai rapporti atomici (N/Si e N/C) la quantità di peptide adsorbito dovrebbe però essere inferiore a quanto riscontrato per il campione c.

Anche per questo campione sono presenti zolfo, fluoro, sodio e fosforo.

Tabella 4.2: Tabella delle energie di legame relative ai vari campioni

		C1s				N1s		O1s			Si2p	Na1s	F1s	P2p	S2p
		C1	C2	C3	C4	N1	N2	O0	O1	O2					
Ti Sil	1	284,9	286,3	287,7		399,2	401	530,1	532,3	534,6	102,6				
	2	284,9	286,1	288,0		399,3	400,9	530,5	532,4	534,3	102,7				
Ti Sil+EAbuK(cb)	1	285	286,4	288,5	292,2	399,4	401,4	530,5	532,2	534	102,7	1070,8	687,8	132,9	
	2	285	266,6	288,8	292,6	399,6	401,4	530,5	532,2	534	102,7	1070,9	687,7	132,7	
Ti Sil+EAbuK(cb) + EAbuK	1	285	286,2	288,3	291,2	399,3	401,4	529	531,4	533,3	102,2	1071,5	687,8	132,2	
	2	285	286,2	288,1	291,9	399,2	401,3	529,4	531,7	533,8	102,3	1071,3	687,9	132,2	168
Ti Sil+EAbuK	1	285	286,3	288,3	293?	399,5	401,5	530,5	532,3	534,1	102,6	1071,4	687,8	133,2	167,5
	2	285	286,4	288,3	291,7	399,4	401,1	530,5	532,2	534,1	102,5	1071,6	687,8	132,9	168,5
Ti Sil+EAbuK(cb) +EAbuK +EAbuK-RGD	1	285	286,5	288,6	292	399,4	401,1	529,9	532,1	534,1	102,6	1071,6	688,1	132,4	168,3
	2	285	286,5	288,6	292	399,4	401,5	5230,1	532,1	534,2	102,2	1071,5	687,8	132,4	168,4

Assegnazione segnali

C₁ = C alifatici C₂ = C-N amminico o ammidico C₃ = N-C=O, O-C=O C₄ = CF₃

N₁ = ammina, ammide N₂ = catione ammonio o ammina hydrogen-bonded

O₀ = ossigeno di TiO₂ O₁ = C-O ossigeno di tipo organico O₂ = H₂O acqua fisisorbita

Si2p = Silicone, silano (APTES) Na1s = Na⁺ F1s = C-F P2p = fosfato S2p = solfonato (HEPES)

Tabella 4.3: Tabella dei rapporti atomici calcolati con tecnica XPS

campione			$\frac{\text{Si}}{\text{N}}$	$\frac{\text{N}}{\text{C}}$	$\frac{\text{O}}{\text{C}}$	$\frac{\text{Si}}{\text{C}}$	$\frac{\text{F}}{\text{C}}$	$\frac{\text{Na}}{\text{C}}$	$\frac{\text{P}}{\text{C}}$	$\frac{\text{S}}{\text{C}}$	$\frac{\text{C2}}{\text{C1}}$	$\frac{\text{C3}}{\text{C1}}$	$\frac{\text{C4}}{\text{C1}}$	$\frac{\text{N2}}{\text{N1}}$	$\frac{\text{O0}}{\text{O1}}$	$\frac{\text{O2}}{\text{O1}}$
a	Ti Sil	1	3,6	0,18	0,56	0,39					0,38	0,10		0,14	0,107	0,044
		2	2,2	0,15	0,77	0,54					0,16	0,09		0,38	0,117	0,08
b	Ti Sil+EAbuK(cb)	1	1,8	0,24	0,67	0,43	0,069	0,009	0,023		0,3	0,2	0,13	0,21	0,22	0,099
		2	1,5	0,134	0,39	0,20	0,088	0,028	0,021		0,29	0,14	0,056	0,66	0,18	0,084
c	Ti Sil+EAbuK(cb) + EAbuK	1	0,38	0,24	0,5	0,09	0,015	0,034	0,012	*	0,4	0,2	0,021	0,21	0,047	0,075
		2	0,493	0,194	0,48	0,096	0,02	0,02	0,014	0,064	0,63	0,19	0,008	0,445	0,049	0,058
d	Ti Sil+EAbuK	1	2,2	0,18	0,56	0,41	0,016	0,005	0,006	0,015	0,4	0,1	0,04	0,19	0,087	0,078
		2	1,74	0,148	0,50	0,26	0,017	0,003	0,008	0,045	0,33	0,088	0,02	0,28	0,11	0,09
e	Ti Sil+EAbuK(cb) +EAbuK +EAbuK-RGD	1	1,28	0,16	0,51	0,23	0,03	0,04	0,017	0,024	0,7	0,2	0,047	0,32	0,25	0,05
		2	1,04	0,14	0,58	0,15	0,03	0,057	0,018	0,029	0,7	0,2	0,046	0,33	0,13	0,045

* non misurato

4.2 Bagnabilità

La valutazione della bagnabilità degli *scaffold* è stata realizzata tramite misure di angolo di contatto per deposizione di una goccia d'acqua sulla superficie delle matrici. I test sono stati eseguiti presso i laboratori del prof. G. Marletta (Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania).

Tabella 4.3: Misure di angolo di contatto per superfici di TiSil e TiSil +peptidi

Samples	Water contact angle (deg)
Ti Sil	57.9 ± 1.18
Ti Sil+EAbuK (cb)	31.08 ± 1.18
Ti Sil+EAbuK	4.3
Ti Sil+EAbuK (cb)+EAbuK	9.41 ± 3.67
Ti Sil+EAbuK (cb)+EAbuK +EAbuK-RGD	2.6

Analizzando i dati riportati nella tabella 4.1, si nota che la superficie di titanio silanizzato, non funzionalizzata, comporta un angolo di contatto superiore rispetto alle superfici funzionalizzate. Quando sulla superficie viene adsorbito uno strato di peptide autoassemblante (Ti Sil+EAbuK), l'angolo di contatto diminuisce radicalmente, e dunque si ha una bagnabilità maggiore.

Nel caso in cui il peptide venga legato covalentemente alla superficie (Ti Sil+EAbuK (cb)), la bagnabilità è minore rispetto a quella registrata su uno strato adsorbito di peptide, ma comunque maggiore rispetto al titanio silanizzato. In questo caso, infatti, il peptide non crea uno strato superficiale continuo, in quanto la densità peptidica superficiale è nell'ordine delle decine di pmoli/cm². Questo determina una bagnabilità intermedia tra i due casi precedenti.

Quando sullo strato di peptide legato covalentemente viene depositato un secondo strato di autoassemblante (Ti Sil+EAbuK (cb)+EAbuK), la bagnabilità aumenta; si vede infatti che l'angolo di contatto è dello stesso ordine di grandezza di quello definito dal campione (Ti Sil+EAbuK). In entrambi i casi, l'intera superficie del dischetto è ricoperta da uno strato di peptide, che determina un aumento della bagnabilità. Per il campione funzionalizzato con (Ti Sil+EAbuK (cb)+EAbuK +EAbuK-RGD) si può fare la stessa considerazione: l'intera copertura della superficie, comporta un'alta bagnabilità.

4.3 Risultati del test di adesione cellulare

Il numero di cellule adese alla matrice, viene definito attraverso la misura di densità ottica rilevata dallo spettrofotometro.

I risultati ottenuti sono confrontati in un istogramma.

Le cellule dimostrano di aderire bene su tutte le matrici funzionalizzate con le biomolecole, con incrementi significativi dell'ordine del 50-130%, eccetto che su quella con singolo strato di auto-assemblante legato covalentemente. Per comprendere tale dato è necessario ricordare che, il metodo di ancoraggio specifico utilizzato, permette di raggiungere densità peptidiche superficiali nell'ordine delle decine di picomoli per cm^2 [33]: tali densità non permettono di creare scaffold tridimensionali quali quelli che sono alla base del gradimento delle cellule verso gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti. Il fatto che sulla superficie funzionalizzata covalentemente con EAbuK si registri un'adesione cellulare inferiore a quella della superficie silanizzata, potrebbe essere dovuto a una riduzione del layer sull'ossido di titanio, dovuto al trattamento acido per la deprotezione delle catene laterali [42].

L'arricchimento della superficie funzionalizzata covalentemente con EAbuK con uno strato di auto-assemblante, modifica notevolmente il substrato: la presenza della struttura tridimensionale di peptide auto-assemblante promuove l'adesione cellulare che risulta incrementata del 100 % rispetto a quella sulla superficie silanizzata di riferimento (figura 4.2). L'arricchimento ulteriore dello strato di auto-assemblante con il coniugato EAbuK-RGD migliora ulteriormente le proprietà adesive della superficie. Il razionale della coniugazione covalente del fattore adesivo al peptide, in grado di formare una struttura tridimensionale, sta nell'esigenza di ancorare il motivo adesivo alla matrice; in caso contrario, il peptide RGD, come fattore solubile, andrebbe a inibire l'adesione cellulare, in quanto bloccherebbe i siti di *binding* delle integrine.

L'incremento di adesione è maggiore alla concentrazione più bassa di coniugato RGD (C3): l'azione di concentrazioni molto basse di sequenze adesive è testimoniata da parecchi studi tra cui ricordiamo il lavoro di Massia e Hubbell [33] in cui si indica concentrazione di GRGDY legato a vetro di 10 fmoli/cm^2 come ottimale nel promuovere i contatti focali. La presenza contemporanea del fattore di crescita e del fattore d'adesione non porta l'adesione ai valori massimi osservati: sembra quasi esserci un effetto contrario del fattore di crescita, in ogni caso il dato migliore di adesione viene raggiunto con l'utilizzo delle concentrazioni inferiori dei due fattori (C2 e C3).

Studi in letteratura dimostrano che l'inclusione di proteine in *scaffold* di peptidi auto-assemblanti, permette un rilascio rallentato degli stessi; in questo senso i peptici auto-assemblanti assumono un ruolo importante nel *drug-delivery* [41].

I risultati dei saggi biologici *in vitro*, media di tre esperimenti, sono espressi come valori medi \pm deviazione standard. Per valutare la significatività dei valori è stato utilizzato il t-test di

Student, considerando significativi valori $p \leq 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata con il software Microsoft Excel[®].

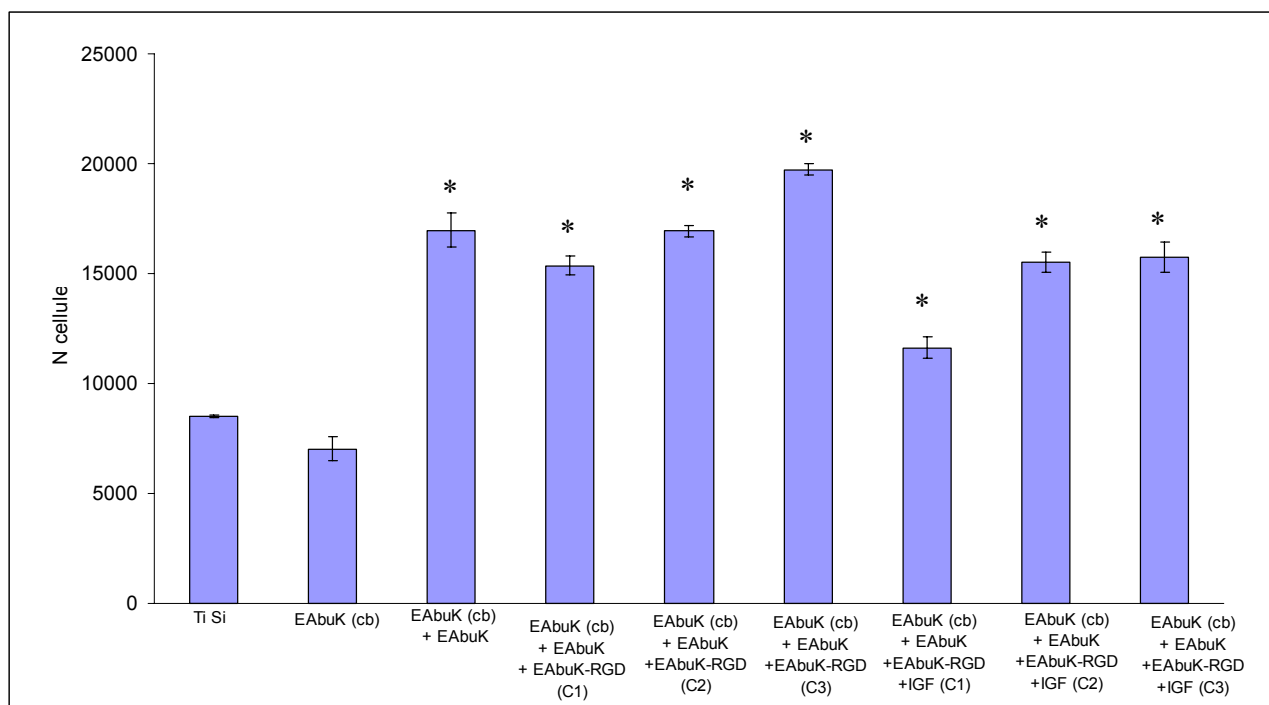


Figura 4.2: Istogramma dell'adesione cellulare sulle varie superfici. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come valore medio del numero di cellule adese \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs *Ti Sil.*, *t-test* di Student.

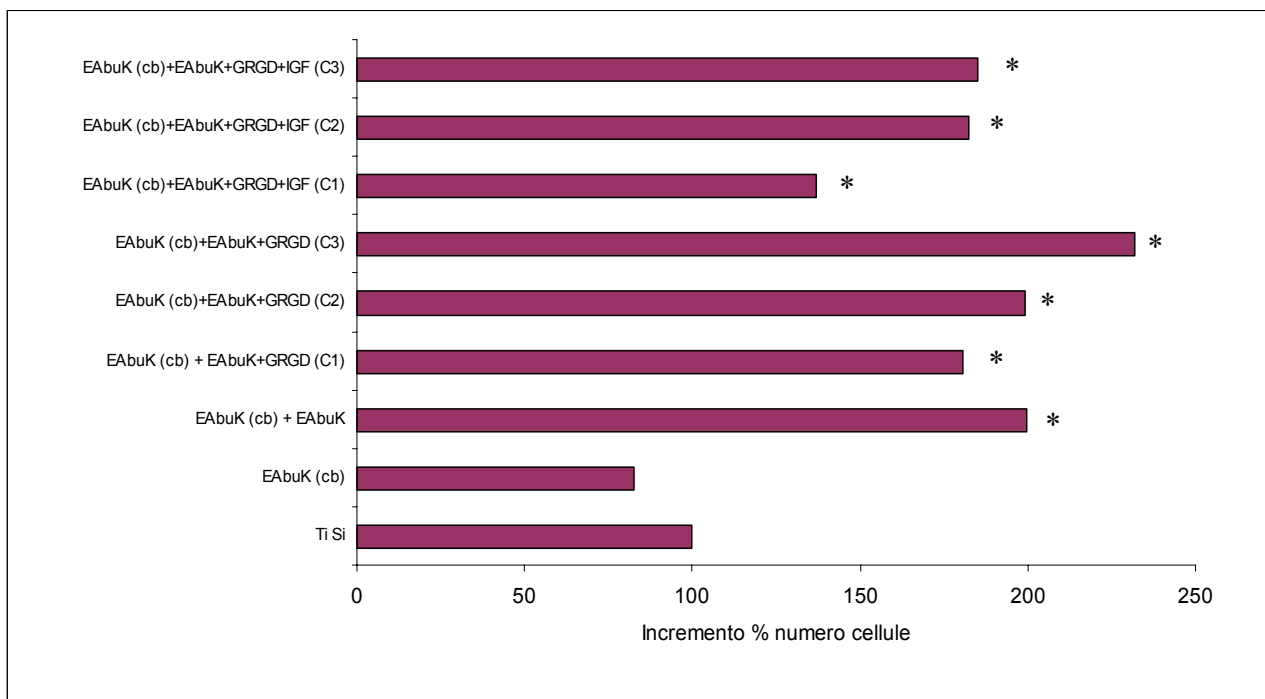


Figura 4.3: Istogramma con valori in percentuale rispetto al riferimento (*Ti Sil.*) dell'adesione cellulare sulle varie superfici. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come valore medio del numero di cellule adese \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs *Ti Sil.*, *t-test* di Student.

4.4 Risultati del test di proliferazione cellulare

Anche nel test di proliferazione, i risultati migliori si sono ottenuti con superfici arricchite. Come nell'adesione, tuttavia, le cellule non sembrano gradire il substrato con il peptide auto-assemblante legato covalentemente.

Si nota che il fattore di crescita IGF-1 influenza positivamente la proliferazione cellulare, come atteso, e a concentrazioni maggiori di proteina, corrisponde un numero maggiore di cellule (effetto dose-dipendente). Si nota un miglioramento dell'84% con concentrazione C1 di IGF-1 (figura 4.4).

Quando vi è la compresenza di EAbuK-RGD e IGF-1, si nota un valore più alto in corrispondenza della concentrazione intermedia (C2). Si suppone che il risultato sia influenzato dalla presenza della sequenza adesiva RGD, che, a concentrazioni basse favorisce una maggiore adesione delle cellule. La concentrazione C2 è dunque una concentrazione ottimale: concilia la presenza simultanea di IGF-1 (che favorisce la proliferazione a concentrazioni elevate) e di RGD (che favorisce l'adesione cellulare a basse concentrazioni). D'altro canto, è noto dal lavoro di Neff e collaboratori che la migliore proliferazione di fibroblasti su polistirene derivatizzato con sequenze RGD si ottiene a concentrazioni del motivo d'adesione più basse di quelle richieste per ottimizzare l'adesione [43].

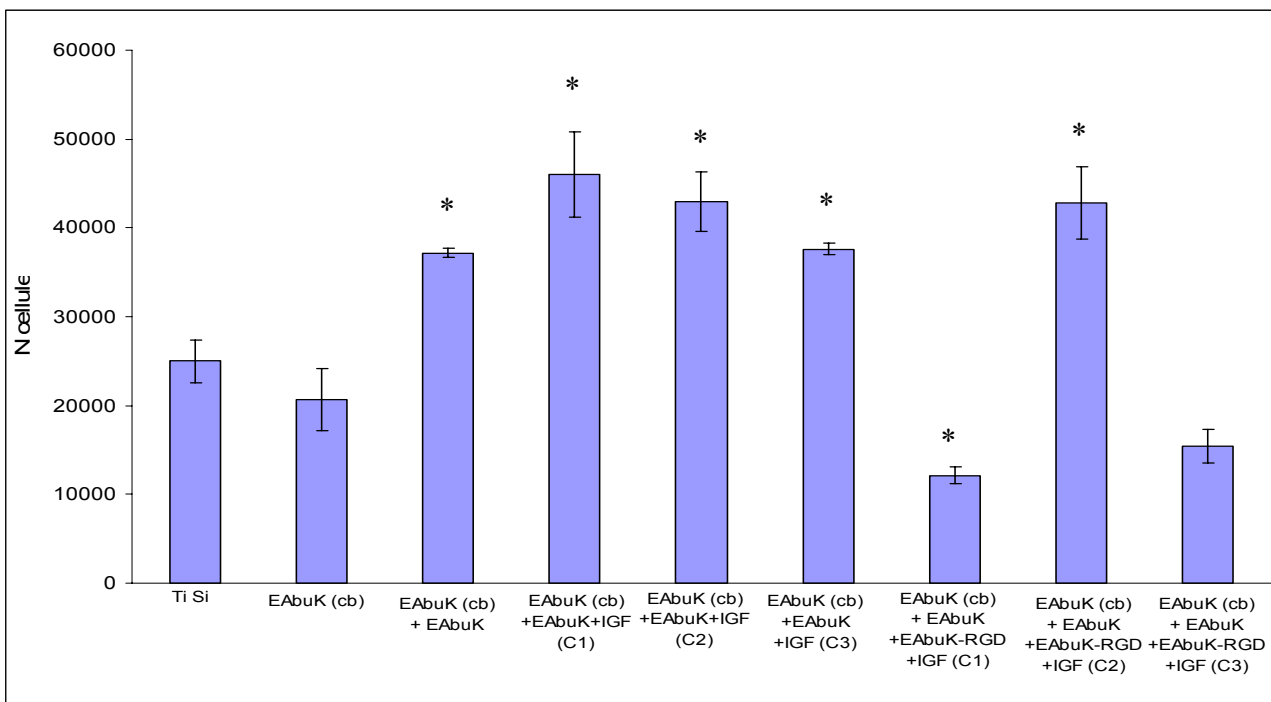


Figura 4.4: Istogramma della proliferazione cellulare sulle varie superfici. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come valore medio del numero di cellule adese \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs Ti Sil., t-test di Student.

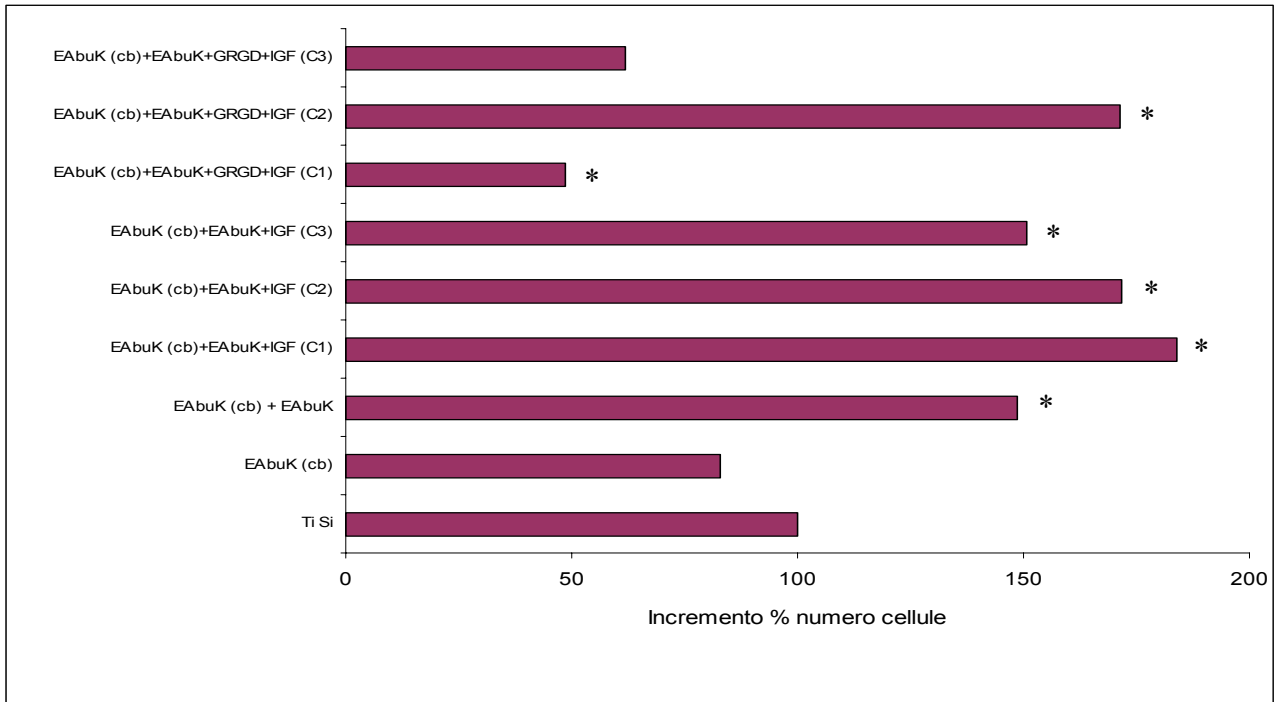


Figura 4.5: Istogramma con valori in percentuale rispetto al riferimento (TiSil) della proliferazione cellulare sulle varie superfici. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come valore medio del numero di cellule adese \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs Ti Sil. , t-test di Student.

Conclusioni

L'analisi XPS rivela che i substrati funzionalizzati dimostrano un aumento dei rapporti N/Si e N/C. Questo indica che i peptidi sono stati effettivamente ancorati alla superficie, e che la deposizione di strati di autoassemblanti ha avuto luogo.

La misurazione dell'angolo di contatto dimostra che l'aggiunta di uno strato peptidico alla superficie, ne aumenta la bagnabilità, e quindi facilita l'interazione con le cellule.

Per quanto riguarda i saggi biologici, si evidenzia che:

1. la presenza degli auto-assemblanti in forma 3D, incentiva in modo sostanziale l'adesione e la proliferazione cellulari;
2. la massimizzazione dell'adesione viene ottenuta arricchendo lo *scaffold* di auto-assemblante covalentemente legato con un motivo RGD;
3. la massimizzazione della proliferazione viene ottenuta per inclusione di un fattore di crescita, o per azione congiunta tra il fattore adesivo ed il fattore di crescita.

In entrambi i saggi gli incrementi risultano altamente significativi.

In questo lavoro di tesi, sono state affinate le vie di sintesi di coniugati molto originali, per la preparazione di *scaffold* biomimetici decorati tridimensionalmente con fattori adesivi e arricchiti di fattori di crescita, nella sfida di proporre matrici sempre più prossime alla matrice extracellulare.

Abbreviazioni

AA / aa = amminoacido

A / Ala = alanina

C / Cys = cisteina

D / Asp = acido aspartico

E / Glu = acido glutammico

F / Phe = fenilalanina

G / Gly = glicina

H / His = istidina

Hyl = idrossilisina

I / Ile = isoleucina

K / Lys = lisina

L / Leu = leucina

M / Met = metionina

N / Asn = asparagina

P / Pro = prolina

Q / Gln = glutammina

R / Arg = arginina

S / Ser = serina

T / Thr = treonina

V / Val = valina

Y / Tyr = tirosina

W / Trp = triptofano

Abs = assorbanza

Abu = acido 2-amminobutirrico

Boc = vedi *t*-Boc

DCM = diclorometano

DIPEA = N,N-diisopropiletilammina

APTES = (3-Aminopropil) trietilsilano

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

EDTA = Acido etilendiamminotetraacetico

DMF = N,N-dimetilformammide

ECM = *ExtraCellular Matrix*
eq = equivalenti
ESI = *ElectroSpray Ionization*
Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile
GAG = glicosamminoglicani
HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HOBt = 1-idrossibenzotriazolo
HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*
IR = *Infrared Radiation*
MTT = 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro
NMP = N-metil-2-pirrolidone
OPN = osteopontina
OtBu = *ter*-butilossi
PBS = soluzione tampone fosfato
RP-HPLC = *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*
SPPS = *Solid Phase Peptide Synthesis*
t-Boc = *terz*-butilossicarbonile (abbreviato Boc)
TES = trietilsilano
TFA = acido trifluoroacetico
UV = Ultravioletto
UV/VIS = Ultravioletto/visibile

Bibliografia

1. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, T.J. Martin, *Principles of bone biology*. Elsevier, (2008).
2. S. Adamo, P. Carinci, M. Molinaro, G. Siracusa, M. Stefanini, E. Ziparo (a cura di), *Istologia di V. Monesi*. Piccin Editore, 5^a edizione.
3. C. Di Bello, *Biomateriali-introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Patron Editore, Bologna (2004).
4. F. d'Acquapendente, *De eruto ed ammisso oculo*. Venezia (1619)
5. C. Di Bello, A. Bagno, *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Patron Editore, Bologna (2009).
6. Anselme K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*, *Biomaterials*, Vol. 21, Issue 7, pp. 667-681 (2000).
7. Nanci, J.D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal, M.D. McKee., *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*, *J.Biomed.Mater.Res.*, Vol. 40, Issue 2, pp. 324-335, United States (1998).
8. Alberts B. *Biologia molecolare della cellula* (III ed.) Zanichelli (1995).
9. Dettin M., Conconi M.T., Gambaretto R., Pasquato A., Folin M., Di Bello C., Parignotto P.P., *Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials* *J Biomed Mater Res.*, 60, 466-71 (2002).
10. Dalton B.A., McFarland C.D., Underwood P.A., Steele J.G., *Role of the heparin binding domain of fibronectin in attachment and spreading of human bone-derived cells* *J. Cell. Sci.*, 108, 2083-92 (1995).
11. Berno G., *Preparazione e caratterizzazione di superfici bioattive per l'adesione di osteoblasti umani*, Laurea Specialistica in Scienza ed Ingegneria dei Materiali, Dipartimento di Ingegneria Meccanica, settore Materiali, Padova (2008).
12. 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).
13. 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.

14. *User Manual*, Model 431A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystem (ed.), versione 1.12.
15. 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
16. Melitta Schachner, *Neurobiology: Nervous engineering*, Nature 405, (2000), pp. 747-748.
17. 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
18. 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
19. Misawa H., Kobayashi N., Soto-Gutierrez A., Chen Y., Yoshida A., Rivas-Carrillo J.D., Navarro-Alvarez N., Tanaka K., Miki A., Takei J., Ueda T., Tanaka M., Endo H., Tanaka N., Ozaki T., *PuraMatrixTM Facilitates Bone Regeneration in Bone Defects of Calvaria in Mice*. Cell Transplantation (2006), 15: 903-910.
20. 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* Angew. Chem. Int. Ed. (2006), 45, 5307-5311.
21. 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.
22. Merrifield B., *Solid Phase Synthesis* Science, (1986) 232, 341-347.
23. Fields G.B., Tian Z., Barany G., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant G.A. (ed), W.H. Freeman and Company (1992) (New York).
24. *User Manual*, Model 431A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystem (ed.), versione 1.12.
25. Fields C.G., Lloyd D.H., Macdonald R.L., Ottenson K.M., Noble R.L., *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis* (1991) Peptide Research, 4, 95-101.
26. Ball H.L., Mascagni P., *Chemical synthesis and purification of proteins: a methodology* (1996) Int. J. Peptide Protein Res., 48, 31-47.

27. Sarin V.K., Kent B.H., Tam J.P., Merrifield R.B., *Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction* (1981) *Analyt. Biochem.*, 117, 147-157.
28. King D.S., Fields C.G., Fields G.B., *A cleavage method which minimized side reaction following Fmoc solid phase peptide synthesis* (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36, 255-266.
29. Siber P., Riniker B., *Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis* (1991) *Tetrahedron Letters*, 32, 739-742.
30. Stulik K., Pacakova V., Suchankova J., Claessens H.A., *Stationary phase for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review* (1997) *Analytica Chimica Acta*, 352, 1-19.
31. Siuzdak G., *The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11290-11297.
32. Bauer H.H., Christian G.D., O'Reilly J.E., *Analisi strumentale* (1985) Piccin.
33. Dettin M., Bagno A., Gambaretto R., Iucci G., Conconi M.T., Tuccitto N., Menti A.M., Grandi C., Di Bello C., Licciardello A., Polzonetti G., *Covalent surface modification of titanium oxide with different adhesive peptides: Surface characterization and osteoblast-like cell adhesion* (2008) *J Biomed Mater Res A*.
34. Bagno A., Piovan A., Dettin M., Brun P., Gambaretto R., Palù G., Di Bello C., Castagliuolo I., *Improvement of Anselme's adhesion model for evaluating human osteoblast response to peptide-grafted titanium surfaces* (2007) *Bone* 41, 704-712.
35. Dettin M., Conconi M.T., Gambaretto R., Pasquato A., Folin M., Di Bello C., Parignotto P.P., *Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials* (2002) *J Biomed Mater Res.*, 60, 466-71.
36. Muncan N., *Reazioni chemoselettive via ossima: coniugazione peptide-proteina e immobilizzazione di proteina nativa su superficie d'oro per applicazioni biotecnologiche*, Laurea Specialistica in chimica e tecnologie farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Padova (2010).
37. Bazan M.C., *Valutazione funzionale el processo di adesione cellulare su superfici biomimetiche*, Laurea Specialistica in Bioingegneria, Padova (2009).
38. Bozza E., *Matrici elettrofilate di peptidi auto-assemblanti per l'ingegneria del tessuto osseo*, Laurea Specialistica in Bioingegneria, Padova (2010).
39. S. Zhang, *Emerging biological materials through molecular self-assembly*, *Biotech. Adv.*, 20, 321-339, (2002).
40. Antonino Barbarino, M. Antonietta Satta, Simonetta Colasanti, *Elementi di endocrinologia*, Vita e Pensiero, Milano (2002).

41. 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).
42. S.P. Massia, J.A. Hubbell, *An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation*, JCB vol. 114 no. 5 1089-1100 (1991).
43. Neff, J.A., Tresco, P.A., and Caldwell, K.D. *Surface Modification for Controlled Studies of Cell-Ligand Interactions*, Biomaterials 20 , 2377-2393 (1999).
44. Guoxin Tan, Lin Zhang, Chengyun Ning, Xujian Liu, Jingwen Liao, *Preparation and characterization of APTES .lms on modi.cation titanium by SAMs*, Thin solid films 519, 4997-5001, (2011).
45. Timothy D. Sargeant, Mukti S. Rao, Chung-Yan Koh, Samuel I. Stupp, *Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers*, Biomaterials, 29 (2008) 1085–1098.
46. Holly J. Martin, Kirk H. Schulz, Joel D. Bumgardner, Keisha B. Walters, *XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface*, Langmuir 2007, 23, 6645-6651.
47. Yan-Yan Song, Helga Hildebrand, Patrik Schmuki, *Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase, and rutile TiO₂*, Surface Science 604 (2010) 346–353.
48. Dettin M., Herath T., Gambaretto R., Iucci G., Battocchio C., Bagno A., Ghezzi F., Di Bello C., Polzonetti G., Di Silvio L., *Assessment of novel chemical strategies for covalent attachment of adhesive peptides to rough titanium surfaces: XPS analysis and biological evaluation*, (2009) J Biomed Mater Res., PART A, ISSN: 1549-3296.

Ringraziamenti

Ringrazio tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi: in particolare la professoressa Monica Dettin, per la professionalità e la disponibilità con cui mi ha accompagnato in questo periodo.

La dottoressa Roberta Danesin, per la pazienza e la dedizione nell'insegnarmi le procedure di laboratorio.

La dottoressa Paola Brun, per la disponibilità che ha dimostrato nell'assistermi durante i test biologici.

Il dott. D. Dalzoppo, del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova, ed il dott. G. Picariello, dell'Istituto delle Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino, per le analisi di massa.

Il prof. G. Marletta, del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania e la prof.ssa G. Iucci, del Dipartimento di fisica dell'università di Roma, per i test eseguiti sui dischetti.

Annj Zamuner per avermi tenuto compagnia (soprattutto durante le lunghissime semipreparative), e per aver lavato le numerose provette utilizzate da me.

I miei genitori che mi hanno sostenuto economicamente e moralmente durante questi anni.