

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE – XVIII  
CICLO  
2003 - 2005

**PEPTIDI PER LA PROGETTAZIONE DI BIOMATERIALI**  
**INNOVATIVI: SINTESI E STUDI CONFORMAZIONALI**

TUTORE: CH.MA PROF.SSA GABRIELLA D'AURIA

RELATORE: CH.MA PROF.SSA CRISTINA DE CASTRO

DOTTORANDA: DOTT.SSA ROBERTA GAMBARETTO

COORDINATORE: CH.MA PROF.SSA ROSA LANZETTA



# INDICE

<i>Abbreviazioni</i> .....	pag. vii
<b>INTRODUZIONE</b> .....	pag. 1
<b>Biomateriali ed ingegneria tessutale</b> .....	pag. 3
<b>Evoluzione dei biomateriali</b> .....	pag. 4
<b>Adesione cellulare alla superficie dei biomateriali</b> .....	pag. 4
<b>Materiali biomimetici</b> .....	pag. 6
<b>Biomateriali per protesi ossee</b> .....	pag. 8
<i>Modifiche superficiali di biomateriali</i> .....	pag. 12
<i>Bulk modifications e scaffolds</i> .....	pag. 16
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	pag. 23
<b>PROGETTO DI RICERCA</b> .....	pag. 27
<b>Peptidi di adesione</b> .....	pag. 29
<i>Sintesi dei peptidi adesivi</i> .....	pag. 29
<i>Saggi di adesione in vitro</i> .....	pag. 31
<i>Funzionalizzazione con fluoresceina</i> .....	pag. 31
<i>Funzionalizzazione di superfici con molecole bioattive</i> .....	pag. 32
Funzionalizzazione covalente di superfici di titanio .....	pag. 32
Funzionalizzazione covalente di idrogeli di alginato .....	pag. 33
<b>Frammenti della BMP-2 umana</b> .....	pag. 35
<i>Sintesi di frammenti della BMP-2</i> .....	pag. 35
<i>Saggi biologici</i> .....	pag. 36
<b>Peptidi auto-assemblanti</b> .....	pag. 36
<i>Sintesi di peptidi auto-assemblanti ionico-complementari</i> .....	pag. 36
<b>Studi conformazionali</b> .....	pag. 38
<i>Studi conformazionali dei peptidi bioattivi</i> .....	pag. 38
<i>Studi conformazionali dei peptidi auto-assemblanti</i> .....	pag. 39

<b>METODI</b> .....	pag. 41
<b>Sintesi peptidica</b> .....	pag. 43
<i>Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)</i> .....	pag. 43
Resine per la SPPS .....	pag. 46
Attivazione del gruppo $\alpha$ -carbossilico .....	pag. 50
<i>Sblocco del peptide dalla resina</i> .....	pag. 54
<i>Purificazione</i> .....	pag. 58
<i>Caratterizzazione</i> .....	pag. 60
Elettroforesi capillare .....	pag. 60
Analisi amminoacidica .....	pag. 61
Spettrometria di massa .....	pag. 63
<i>Funzionalizzazione con fluoresceina</i> .....	pag. 66
<b>Studi conformazionali</b> .....	pag. 69
<i>Dicroismo circolare (CD)</i> .....	pag. 69
<i>Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)</i> .....	pag. 75
<i>Risonanza magnetica nucleare in due dimensioni (NMR-2D)</i> ....	pag. 80
<b>PARTE SPERIMENTALE</b> .....	pag. 83
<b>Materiali</b> .....	pag. 85
<b>Strumentazione</b> .....	pag. 87
<b>Sintesi dei peptidi adesivi</b> .....	pag. 88
<i>RGD (1<sup>a</sup> sintesi)</i> .....	pag. 89
<i>RGD (2<sup>a</sup> sintesi)</i> .....	pag. 92
<i>GRGDSPK (1<sup>a</sup> sintesi)</i> .....	pag. 93
<i>GRGDSPK (2<sup>a</sup> sintesi)</i> .....	pag. 97
<i>(GRGDSP)<sub>4</sub>K</i> .....	pag. 98
<i>(340-365)HVP</i> .....	pag. 102
<i>(340-352)HVP (1<sup>a</sup> sintesi)</i> .....	pag. 106
<i>(340-352)HVP (2<sup>a</sup> sintesi)</i> .....	pag. 110
<i>(352-365)HVP</i> .....	pag. 111
<i>(352-360)HVP</i> .....	pag. 116
<i>(352-360)HVP ciclico</i> .....	pag. 120
<i>(352-360)HVP ammido terminale</i> .....	pag. 126
<i>(352-360)HVP Sc</i> .....	pag. 128



<i>(GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato</i> .....	pag. 132
Attacco fluoresceina 1 .....	pag. 132
Attacco fluoresceina 2 .....	pag. 135
<i>(340-352)HVP fluorescinato</i> .....	pag. 139
Attacco fluoresceina 1 .....	pag. 139
Attacco fluoresceina 2 .....	pag. 142
<i>GRGDSPK fluorescinato</i> .....	pag. 146
<i>RGD fluorescinato</i> .....	pag. 149
<b>Sintesi dei frammenti della BMP-2</b> .....	pag. 153
<i>(68-87)BMP-2</i> .....	pag. 153
<i>(77-87)BMP-2</i> .....	pag. 157
<i>(58-87)BMP-2</i> .....	pag. 161
<b>Sintesi dei peptidi auto-assemblanti</b> .....	pag. 166
<i>EAK 16-II</i> .....	pag. 166
<i>RGD-(EAK 16-II)</i> .....	pag. 170
<i>EAK 8-II</i> .....	pag. 174
<i>RGD-(EAK 16-II) Sc</i> .....	pag. 177
<i>DAK 16-II</i> .....	pag. 182
<i>DAK 8-II</i> .....	pag. 186
<i>DAOrn 16-II</i> .....	pag. 189
<i>DAOrn 8-II</i> .....	pag. 194
<i>EAbuK 16-II</i> .....	pag. 197
<i>EAbuK 8-II</i> .....	pag. 202
<i>EYK 16-II</i> .....	pag. 205
<i>EYK 8-II</i> .....	pag. 209
<b>Saggi biologici sui peptidi bioattivi</b> .....	pag. 213
<i>Saggi di adesione in vitro</i> .....	pag. 213
Saggi di adesione su polistirene .....	pag. 213
Saggi di adesione su matrice ossea acellulare .....	pag. 215
<i>Saggi biologici sui frammenti della BMP-2</i> .....	pag. 218
<b>Funzionalizzazione di superfici con molecole bioattive</b> .....	pag. 220
<i>Funzionalizzazione covalente di superfici di titanio</i> .....	pag. 224
<i>Funzionalizzazione covalente di idrogeli di alginato</i> .....	pag. 227

<b>Studi conformazionali dei peptidi adesivi .....</b>	pag. 229
<i>Dicroismo circolare (CD) .....</i>	pag. 229
GRGDSPK .....	pag. 230
(GRGDSP) <sub>4</sub> K .....	pag. 231
(340-365)HVP .....	pag. 233
(340-352)HVP .....	pag. 235
(352-365)HVP .....	pag. 237
(352-360)HVP .....	pag. 239
(352-360)HVP ciclico .....	pag. 241
(352-360)HVP Sc .....	pag. 243
<i>Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) .....</i>	pag. 247
(340-365)HVP .....	pag. 248
(340-352)HVP .....	pag. 249
(352-365)HVP .....	pag. 251
(352-360)HVP .....	pag. 252
(352-360)HVP ciclico .....	pag. 254
<i>Risonanza magnetica nucleare in due dimensioni (NMR-2D) ...</i>	pag. 255
<b>Studi conformazionali dei frammenti della BMP-2 .....</b>	pag. 260
<i>Dicroismo circolare (CD) .....</i>	pag. 260
(68-87)BMP-2 .....	pag. 261
(77-87)BMP-2 .....	pag. 262
(58-87)BMP-2 .....	pag. 264
<b>Studi conformazionali dei peptidi auto-assemblanti .....</b>	pag. 269
<i>Dicroismo circolare (CD) .....</i>	pag. 269
EAK 16-II .....	pag. 270
EAK 8-II .....	pag. 273
DAK 16-II .....	pag. 276
DAK 8-II .....	pag. 279
DAOrn 16-II .....	pag. 282
DAOrn 8-II .....	pag. 285
EAbuK 16-II .....	pag. 288
EAbuK 8-II .....	pag. 291
EYK 16-II .....	pag. 294
EYK 8-II .....	pag. 297

RGD-(EAK 16-II) .....	pag. 300
RGD-(EAK 16-II) Sc .....	pag. 303
<b>Preparazione di membrane utilizzando peptidi auto-assemblanti ..</b>	<b>pag. 311</b>
<b><i>DISCUSSIONE</i></b> .....	<b>pag. 317</b>
<b>Peptidi di adesione</b> .....	<b>pag. 319</b>
<b>Frammenti della BMP-2</b> .....	<b>pag. 325</b>
<b>Peptidi auto-assemblanti</b> .....	<b>pag. 326</b>
<b><i>CONCLUSIONI</i></b> .....	<b>pag. 333</b>
<b><i>Bibliografia</i></b> .....	<b>pag. 337</b>



## *Abbreviazioni*

A / Ala = alanina

C / Cys = cisteina

D / Asp = acido aspartico

E / Glu = acido glutammico

F / Phe = fenilalanina

G / Gly = glicina

H / His = istidina

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

Abu = acido 2-amminobutirrico

Orn = ornitina

Abs = assorbanza

Acm = acetamidemetile

AcOH = acido acetico

BMP = Bone Morphogenetic Protein

2-Br-Z = 2-bromobenzilossicarbonile

Bzl = benzile

CD = Circular Dicroism

CE = Capillary Electrophoresis

CF = 5-carbossifluoresceina

2-Cl-Z = 2-clorobenzilossicarbonile

DCC = N,N'-dicicloesilcarbodiimmide  
DCM = diclorometano  
DCU = N,N'-dicicloesilurea  
DEA = dietilammina  
DIC = N,NC-diisopropilcarbodiimmide  
DIEA = N,N-diisopropilettilammina  
DMAP = 4-dimetilamminopiridina  
DMF = N,N-dimetilformammide  
DMS = dimetilsolfuro  
ECM = Extracellular Matrix  
EDA = etilendiammina  
EDC = N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide  
EDT = 1,2-etanditiolo  
ESI = Electrospray Ionization  
Et<sub>2</sub>O = etere dietilco  
EtOH = etanolo  
FITC = fluorescein-5-isotiocianato  
Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile  
FT-IR = Fourier Transform - Infrared Radiation  
HATU = O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato  
HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato  
HOAt = 7-aza-1-idrossibenzotriazolo  
HOBt = 1-idrossibenzotriazolo  
HVP = Human Vitronectin Protein  
IR = Infrared Radiation  
MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization  
MeOH = metanolo  
MS = Mass Spectrometry  
NaOAc = acetato di sodio  
NMP = N-metil-2-pirrolidone  
NMR = Nuclear Magnetic Resonance  
OtBu = *terz*-butilossi  
PITC = fenilisotiocianato

Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonile  
PTC-AA = feniltiocarbammil amminoacido  
PTH-AA = feniltioidantoin amminoacido  
RP-HPLC = Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography  
SAM = Self Assembled Monolayers  
SDS = sodiododecilsolfato  
SEM = microscopia elettronica a scansione  
SLA = superficie sabbata e trattata con acidi  
SPPS = Solid Phase Peptide Synthesis  
*t*-Boc = *terz*-butilossicarbonile (abbreviato Boc)  
*t*-Bu = *terz*-butile  
TEA = trietilammina  
TES = trietilsilano  
TFA = acido trifluoroacetico  
TFE = 2,2,2 trifluoroetanolo  
TGF = Transforming Growth Factor  
TOF = Time Of Flight  
Tos = tostile  
Trt = tritile (trifenilmetile)  
UV = Ultra Violet

# ***INTRODUZIONE***





## BIOMATERIALI ED INGEGNERIA TESSUTALE

Il non corretto funzionamento di organi e/o tessuti rappresenta uno dei più frequenti, devastanti e costosi problemi della medicina [1]. Questo genere di patologie possono essere trattate tramite il trapianto di organi da un individuo all'altro (trapianto eterologo), o utilizzando tessuto prelevato dal paziente stesso (trapianto autologo), o utilizzando protesi artificiali. Purtroppo tutte queste strategie presentano diversi inconvenienti: gli organi donati sono molto inferiori al numero di pazienti che ne avrebbero bisogno e nonostante i controlli per accertarne la biocompatibilità, i rischi di rigetto dell'organo o tessuto trapiantato dovuti alle reazioni del sistema immunitario del ricevente sono sempre elevati; il trapianto autologo, nonostante riduca al minimo i rischi di rigetto, è possibile solo in casi particolari, tipo il trapianto di porzioni limitate di pelle o di osso, e comporta comunque un ulteriore disagio da parte del paziente; per quanto riguarda le protesi artificiali, infine, difficilmente esse sono in grado di assolvere a tutte le funzioni di un singolo organo e perciò non possono prevenire un progressivo peggioramento delle condizioni del paziente.

L'*ingegneria tessutale* [2] è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita al fine di sviluppare sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni tessutali. A tale scopo, enorme importanza ha assunto la ricerca sui biomateriali.

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

Possono essere utilizzati sia in impianti permanenti o protesi (campo biomedico), sia in dispositivi che sono a contatto con il corpo umano per un periodo di tempo limitato (campo farmaceutico) [3]. Alcuni dispositivi medici possono essere utilizzati identicamente per qualsiasi paziente ne abbia necessità, altri invece devono essere realizzati per il singolo caso clinico, con forma, dimensioni e caratteristiche individuali; questo aumenta la difficoltà della progettazione e della scelta dei materiali. Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro biofunzionalità e biocompatibilità. La *biofunzionalità* si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico; la *biocompatibilità*, invece, alla capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto ed è strettamente connessa, quindi, alle interazioni tra i biomateriali ed i tessuti con cui vengono a contatto [4]. Due

sono le caratteristiche principali che vanno considerate nella valutazione della biocompatibilità di un materiale: la resistenza del materiale ai processi di degradazione e gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti.

## **EVOLUZIONE DEI BIOMATERIALI**

Vari materiali sono stati impiegati nell'implantologia in campo medico durante gran parte del XX secolo. Nonostante si sia assistito ad un ovvio miglioramento nel tempo in quanto a sofisticazione e qualità dei materiali, solo durante gli ultimi vent'anni si è verificata una rivoluzione nell'approccio ai concetti di materiali per protesi mediche.

Secondo il vecchio approccio le protesi venivano costruite con materiali sintetici, come ad esempio il polietilene o materiali ceramici ricoperti di titanio in associazione col polietilene, a basso coefficiente di frizione, massima inerzia e capacità minima di indurre irritazioni.

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

## **ADESIONE CELLULARE ALLA SUPERFICIE DEI BIOMATERIALI**

La biocompatibilità dei biomateriali è strettamente legata al comportamento delle cellule in contatto con essi ed in particolare all'adesione cellulare alla loro superficie. Ad esempio, perchè gli impianti ortopedici o dentali siano efficaci è indispensabile che si crei un'interfaccia meccanicamente solida con fusione completa tra la superficie del materiale ed il tessuto osseo senza che si formi una capsula fibrosa tra impianto e tessuto.

Le caratteristiche superficiali dei materiali, la loro topografia, composizione chimica ed energia superficiale, giocano un ruolo essenziale nel processo di adesione cellulare al biomateriale [5-13]. Dato che l'attacco, l'adesione e la diffusione appartengono alla prima fase dell'interazione cellula/materiale, la qualità di questa prima fase influenzerà la capacità delle cellule di proliferare e differenziarsi una volta a contatto con l'impianto.

All'interfaccia tessuto-impianto, in ambiente fisiologico, hanno luogo tutta una serie di eventi. La superficie di un impianto, chirurgicamente inserito all'interno di un sito anatomico, viene a trovarsi in stretto contatto con i tessuti esposti. Conseguentemente, si genera una serie di interazioni di natura fisica, chimica e biochimica nelle quali sono coinvolte macromolecole provenienti dai tessuti e dai fluidi biologici [14-16]. In realtà non è ancora disponibile una spiegazione dettagliata ed esauriente dei processi e dei meccanismi all'interfaccia tra impianto e tessuto biologico. Recentemente Kasemo e Gold [17], hanno suggerito una plausibile descrizione degli eventi che, dalla scala molecolare a quella cellulare, seguono l'inserimento chirurgico di un impianto dentale; tali eventi hanno luogo su scale diverse nel tempo e nello spazio. In particolare, la sequenza dei fenomeni che riguardano le modificazioni all'interfaccia appare più rapida nelle fasi immediatamente successive all'inserimento dell'impianto, piuttosto che in quelle a più lungo termine. Una volta inserito, l'impianto espone la sua superficie all'ambiente biologico, nel quale prevale la presenza di molecole di acqua: esse si legano rapidamente alla superficie formando, nell'arco di qualche nanosecondo, uno strato semplice o doppio, la cui struttura è molto diversa da quella dell'acqua liquida e dipende fortemente dalle proprietà idrofiliche/idrofobiche superficiali. Una volta formato lo strato di molecole d'acqua, gli ioni presenti nell'ambiente (ad esempio  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) vengono dapprima solvatati e poi inglobati, secondo una disposizione spaziale che dipende, ancora una volta, dalle caratteristiche della superficie. In un periodo di tempo successivo, le biomolecole contenute nel fluido biologico che circonda l'impianto giungono in contatto con la superficie, dove sono coinvolte in una serie di fenomeni che vanno dall'adsorbimento, a variazioni conformazionali, alla eventuale denaturazione. Nel complesso, lo strato proteico che si deposita è composto dalle prime proteine adsorbite e da quelle che, in ordine di tempo, sono giunte per ultime ma che manifestano un legame più forte con la superficie. Ovviamente la composizione dello strato proteico, così come la conformazione delle proteine presenti, risentono inevitabilmente delle caratteristiche originarie della superficie: a seconda delle proprietà idrofiliche o idrofobiche, le proteine espongono alla superficie i loro domini idrofilici o idrofobici, conservando nel primo caso le molecole d'acqua di idratazione. Lo strato proteico deve essere comunque considerato come uno strato dinamico, nel senso che, anche per effetto dei fluidi biologici in contatto con esso, la composizione e la conformazione delle proteine varia per tutto l'arco di tempo necessario per il processo di guarigione. La specificità delle interazioni tra impianto e tessuto biologico sembra dunque dovuta, almeno in parte, proprio al modo in cui si compone e si

organizza il *layer* di proteine che si depositano superficialmente; le caratteristiche dello strato proteico dipendono, a loro volta, da come la superficie dell'impianto è in grado di legare le molecole d'acqua, gli ioni e le altre biomolecole trasportate dai fluidi biologici. Una volta formato lo strato di proteine, i fenomeni all'interfaccia cominciano a riguardare una scala dimensionale più grande: quella delle cellule, le cui dimensioni sono da  $10^2$  a  $10^4$  volte maggiori di quelle delle proteine e la cui complessità strutturale e funzionale è enormemente superiore. Le cellule interagiscono con lo strato proteico depositato sulla superficie dell'impianto attraverso la membrana, più in particolare attraverso i recettori e le proteine di legame presenti sulla membrana stessa. La specificità delle interazioni dipende da come è organizzato lo strato proteico, oltre che dalla temperatura, dal pH e dalla rugosità: in altri termini, il contatto tra cellule e materiale è mediato dagli strati che si depositano via via sulla superficie. Le cellule aderiscono alla superficie e, mediante l'attivazione di una sequenza di funzioni biologiche, crescono, migrano, si differenziano, sintetizzano matrice extracellulare (ECM) e producono nuovo tessuto [18]. Si può quindi concludere che, quando i biomateriali sono esposti all'ambiente biologico, le proteine dell'ECM sono adsorbite in modo non specifico sulla superficie di tutti i biomateriali; in seguito, le cellule interagiscono indirettamente con la superficie del biomateriale attraverso le proteine. Non solo la natura delle molecole adsorbite ma anche la loro conformazione influenzerà l'adesione cellulare.

La matrice extracellulare (*ECM*) è costituita principalmente di proteine fibrose incluse in un gel idrato di polisaccaridi. Le due principali classi di macromolecole extracellulari che compongono la matrice sono: i polisaccaridi glicosaminoglicani (GAG), che solitamente si trovano uniti alle proteine per mezzo di un legame covalente sotto forma di proteoglicani, e le proteine fibrose. Queste ultime si dividono in due classi in base alla loro funzione: principalmente strutturale (collagene e elastina) o principalmente adesiva (fibronectina, laminina, vitronectina).

## **MATERIALI BIOMIMETICI**

La progettazione di materiali *biomimetici* [19, 20], ovvero che mimano il comportamento e le caratteristiche dei tessuti biologici, prevede la creazione di materiali che possano promuovere specifiche risposte cellulari in grado di dirigere la formazione di nuovo tessuto [21].

Il riconoscimento biomolecolare dei materiali da parte delle cellule può essere ottenuto attraverso due strategie: un primo approccio consiste nel dotare i biomateriali di bioattività tramite l'incorporazione di molecole solubili, come fattori di crescita o DNA plasmidico, in *carriers* cosicché le molecole bioattive possano essere rilasciate dal materiale e promuovere o modulare la formazione di nuovo tessuto [22-25]; l'altro approccio riguarda l'incorporazione di proteine o peptidi in grado di legare le cellule sulla superficie o all'interno di biomateriali attraverso modifiche chimiche o fisiche.

Le molecole in grado di interagire in modo specifico con i recettori della superficie cellulare includono proteine dell'ECM intere o piccole sequenze derivate da tali proteine in grado di promuovere specifiche funzioni cellulari. Sicuramente nella progettazione di un materiale biomimetico grande importanza rivestono parametri quali la densità, la distribuzione spaziale, l'orientamento della biomolecola. L'uso di proteine intere risulta tuttavia limitato dalla scarsa stabilità, dall'elevato costo e, a volte, dalla difficile reperibilità. Per ovviare a tali problemi è stata messa a punto una strategia, nota come *peptide mimicry*, che offre la possibilità di individuare frammenti delle proteine native in grado di ritenere, almeno in parte, l'attività biologica propria della proteina intera. Brevi sequenze peptidiche possono essere sintetizzate per via chimica in grandi quantità e purificate fino ad elevati gradi di omogeneità. I peptidi sono economicamente più accessibili, possono essere conservati più a lungo e facilmente delle proteine da cui derivano in quanto più stabili e in genere sono più facilmente solubili in ambiente acquoso. Inoltre, possono essere opportunamente modificati per aumentarne la stabilità rispetto alla degradazione proteolitica.

I materiali biomimetici sono in grado potenzialmente di mimare molte funzioni dell'ECM nei tessuti. Per esempio, l'immobilizzazione di peptidi-segnale può rendere la superficie di un biomateriale adesiva quando in origine la stessa non promuoveva assolutamente l'adesione delle cellule, oppure, l'incorporazione di opportune sequenze-segnale nel materiale può renderlo attaccabile da parte di enzimi proteolitici e dunque degradabile.

Il legame del recettore cellulare con il ligando (proteina o peptide bioattivo) presente sul materiale biomimetico determina la forza dell'adesione della cellula alla superficie [26], la velocità di migrazione della cellula sopra o attraverso il materiale [27-29] e l'estensione della formazione e l'organizzazione del citoscheletro [30]. Poiché le risposte biologiche sono dipendenti da molteplici variabili come l'affinità tra recettore e ligando, la densità e la distribuzione spaziale del ligando, questi debbono essere considerati parametri fondamentali per la progettazione del materiale biomimetico. Tra le variabili importanti

ricordiamo: la concentrazione del ligando [31] e lo *spacer* [32] utilizzato per distanziare il ligando dalla superficie o comunque dal sito di attacco sul materiale. Alcuni studi per mettere a fuoco la concentrazione superficiale di proteine dell'ECM in grado di fare aderire efficacemente le cellule, condotti da Humphries *et al.* [33], affermano che la concentrazione minima di fibronectina ancorata a superficie in grado di dare *spreading* cellulare è pari a 1300 fmoli/cm<sup>2</sup>. Altri studi indicano la concentrazione superficiale minima per ottenere lo *spreading* di fibroblasti in 400 fmoli/cm<sup>2</sup> per la vitronectina e in 100 fmoli/cm<sup>2</sup> per la fibronectina [34, 35]. Tali valori risultano bassi se comparati alla concentrazione peptidica necessaria per indurre uno *spreading* sufficiente nei fibroblasti. E' stato infatti dimostrato che per aderire su un substrato di idrogel di acido poliacrilico funzionalizzato con un peptide RGD tramite uno *spacer* di PEG è necessaria una concentrazione superficiale di 12 pmoli/cm<sup>2</sup> [36]. Va inoltre considerato che un'ottimizzazione dell'adesione per modifica della densità superficiale non si configura necessariamente come l'ottimizzazione delle fasi seguenti di migrazione e proliferazione cellulari. Neff *et al.* [37] hanno infatti osservato un massimo di proliferazione nei fibroblasti su polistirene funzionalizzato con sequenza RGD a concentrazioni più basse di quelle ottimali per l'adesione e pari a 1.33 pmoli/cm<sup>2</sup>, suggerendo che esiste anche una concentrazione ottimale per la proliferazione cellulare che non coincide con la concentrazione ottimale per promuovere l'adesione cellulare. Per mantenere l'attività biologica del peptide dopo l'immobilizzazione va assicurata alla sequenza peptidica un'opportuna flessibilità e un ingombro sterico minimo che possano assicurare una agevole interazione con il recettore cellulare. A tale fine sono stati utilizzati spaziatori costituiti di PEG oppure da sequenze non specifiche (GGGG oppure PVELP).

## **BIOMATERIALI PER PROTESI OSSEE**

L'utilizzo di biomateriali in grado di integrarsi in modo ottimale è particolarmente richiesto nell'ambito delle protesi ossee. Attualmente il trattamento delle malformazioni cranio-maxillo-facciali riguardano in primo luogo la necessità di intervento su soggetti in crescita ed in tali pazienti è indispensabile non interferire con i normali processi di accrescimento. Ora, poiché gli impianti con migliori risultati, eseguiti cioè con autodonazione, vanno incontro a riassorbimento e comunque gli innesti autologhi non seguono lo stesso tasso di crescita del resto dell'organismo, la situazione teoricamente ideale è quella che permetterebbe di disporre di grandi quantità di osso, privo di capacità

antigeniche, che non debba essere prelevato dal paziente. Di qui il tentativo di costruire *in vitro* un sostituto osseo già preformato contenente osteoblasti autologhi.

In questo campo le strategie finora adottate prevedono l'isolamento di cellule deputate a svolgere una particolare funzione e successivamente il loro impianto nell'organismo ricevente come tali oppure preventivamente seminate su particolari matrici naturali o sintetiche che fungono da supporto [38, 39]. In quest'ultimo caso, un fattore importante per la ricostruzione delle bioprotesi *in vitro* è l'adesione delle cellule al supporto, che spesso deve essere migliorata con opportuni fattori di adesione. La formazione di nuovo tessuto è notevolmente influenzata da diverse sostanze, quali proteine di adesione, ormoni o fattori di crescita [40, 41], ed il successo di tale approccio dipende dalla presenza di tali fattori nei compartimenti in cui è richiesta la loro azione e, più a monte, dalla loro produzione e disponibilità commerciale su larga scala. In particolare, nella ricostruzione di tratti ossei può essere determinante disporre di osteoblasti autologhi per colonizzare opportuni supporti naturali o sintetici. In tale caso l'adesione degli osteoblasti al supporto deve essere garantita in quanto tale fattore determina la successiva proliferazione e la conseguente produzione e deposizione di matrice extracellulare da parte degli osteoblasti.

Il tessuto osseo è una forma specializzata di tessuto connettivo, caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extracellulare che conferisce al tessuto notevole durezza e resistenza. Il tessuto osseo è costituito da cellule e da una matrice intercellulare organica ed inorganica. Nelle ossa in accrescimento si distinguono quattro tipi cellulari: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti ed osteoclasti. Gli osteoblasti partecipano direttamente alla formazione del tessuto osseo, secernendo i componenti organici della matrice e regolando anche la deposizione dei sali minerali. La matrice inorganica è costituita principalmente da fosfato e carbonato di calcio e rappresenta circa il 65% del peso secco dell'osso. La matrice extracellulare organica è composta per il 90% da proteine collageniche (97% collagene di tipo I e 3% collagene di tipo V) e per il 10% da proteine non collageniche (NCP): 20% osteocalcina, 20% osteonectina, 12% sialoproteina ossea, 10% proteoglicani, osteopontina, fibronectina, fattori di crescita, ecc...

Tutte queste proteine sono sintetizzate dagli osteoblasti e la maggior parte sono coinvolte nella loro adesione. Proteine come la fibronectina [42, 43] e la vitronectina [44] hanno dimostrato essere coinvolte nell'adesione degli osteoblasti *in vitro*.

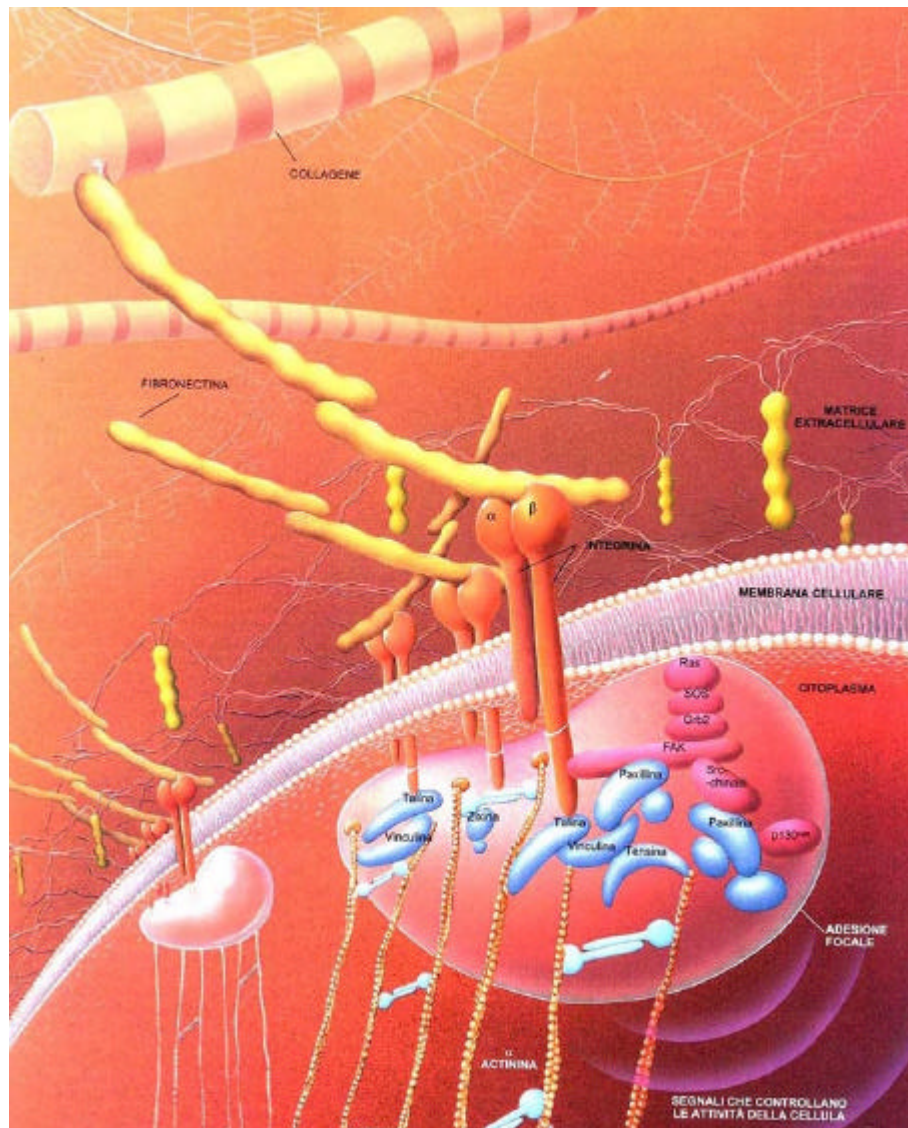
Le molecole di adesione situate sulla membrana degli osteoblasti sono caratterizzate dalla loro capacità di interagire con un ligando specifico, che può essere situato sulla membrana delle cellule vicine o può essere una proteina della matrice extracellulare.



Sono noti due distinti meccanismi di adesione degli osteoblasti ad un supporto che prevedono:

1. l'interazione tra le integrine e le proteine della matrice extracellulare, tramite la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp);
2. l'interazione tra il proteoglicano eparan solfato della membrana cellulare e le proteine della matrice extracellulare contenenti il sito di legame per l'eparina.

Le integrine, proteine recettoriali molto importanti perché rappresentano la via fondamentale attraverso la quale le cellule si legano alla matrice extracellulare e risponde ai suoi stimoli (Fig. 1), sono eterodimeri transmembrana costituite da due sub-unità diverse associate in maniera non covalente. Ogni subunità è formata da un grande dominio extracellulare, un dominio transmembrana, ed un piccolo dominio citoplasmatico.



**Fig. 1:** Interazione tra le integrine e le proteine della matrice extracellulare.

Le integrine, attraversando la membrana cellulare, agiscono come un'interfaccia tra i compartimenti inter- e intra-cellulari e possono tradurre l'attacco di ligandi esterni in informazioni interne che portano all'adesione, diffusione o migrazione cellulare e di conseguenza regolare la crescita cellulare e la differenziazione.

Circa venti anni fa venne individuata nella fibronectina la sequenza RGD che viene riconosciuta dalle integrine e che determina quindi l'adesione cellulare [45, 46]. La fibronectina è una glicoproteina fibrosa ad elevato peso molecolare appartenente alla matrice extracellulare presente in tutti i vertebrati. È un dimero composto di due subunità unite da due legami disolfuro localizzati vicino all'estremità carbossiterminale della molecola [47]. Inoltre la sequenza RGD è presente in altre proteine della matrice extracellulare come vitronectina, fibrinogeno, laminina, trombospondina, entactina, tenascina, osteopontina, sialoproteina ossea e collagene [48]. Studi su vari peptidi contenenti la sequenza RGD hanno dimostrato l'importanza della conformazione con cui questa sequenza si presenta al recettore al fine dell'attività ed è stata evidenziata l'interazione del recettore anche con i residui amminoacidici che fiancheggiano la sequenza-segnale [49].

Il secondo meccanismo di adesione, specifico per gli osteoblasti, comporta l'interazione tra i proteoglicani di membrana, come l'eparano solfato, e le proteine della matrice extracellulare che contengono il sito di legame per l'eparina [50]. I proteoglicani sono delle glicoproteine costituite da amminozuccheri, molti dei quali modificati per aggiunta di gruppi solforici.

Studi riguardanti le sequenze della regione di legame per l'eparina nella vitronectina umana [51-55], nell'apolipoproteina E e B-100 e nel fattore piastrinico IV hanno portato ad individuare sequenze-segnale comuni di tipo X-B-B-X-B-X e X-B-B-B-X-X-B-X dove B rappresenta un amminoacido basico e X un residuo idropatico neutro [56-58]. Tale iniziale analisi è stata in seguito estesa ad altre proteine di adesione presenti nel tessuto osseo: fibronectina, trombospondina, sialoproteina ossea e osteopontina.

Per quanto riguarda la crescita, la proliferazione e il differenziamento degli osteoblasti un ruolo importante è giocato dai fattori di crescita. I principali fattori di crescita identificati sono stati suddivisi in tre grandi famiglie: gli IGF (Insulin like Growth Factor), i FGF (Fibroblast Growth Factor) e la superfamiglia dei TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) [59] a cui appartengono le BMP (Bone Morphogenetic Protein), ad eccezione della BMP-1.

Tra i fattori di crescita, particolarmente interessante è la BMP-2, una delle proteine più rappresentative e studiate del gruppo delle BMP [60-62]. Le BMP, come tutti i TGF- $\beta$ , sono molecole omodimeriche, una struttura di fondamentale importanza per l'esplicazione della loro attività *in vivo*. Il monomero consiste di circa 120 residui amminoacidici, tra i quali giocano un ruolo fondamentale 7 residui di Cys che formano una specie di nodo tra le due catene. Questa originale strutturazione, nota come cysteine-knot, conferisce stabilità alla molecola [63]. Una volta che queste proteine si sono legate alla matrice extracellulare ne deriva: 1) una vita media maggiore dovuta ad una incrementata stabilità al pH, alla temperatura e all'attacco di enzimi proteolitici, 2) una favorita esposizione dei siti di interazione con i recettori cellulari e 3) un lento rilascio controllato della proteina.

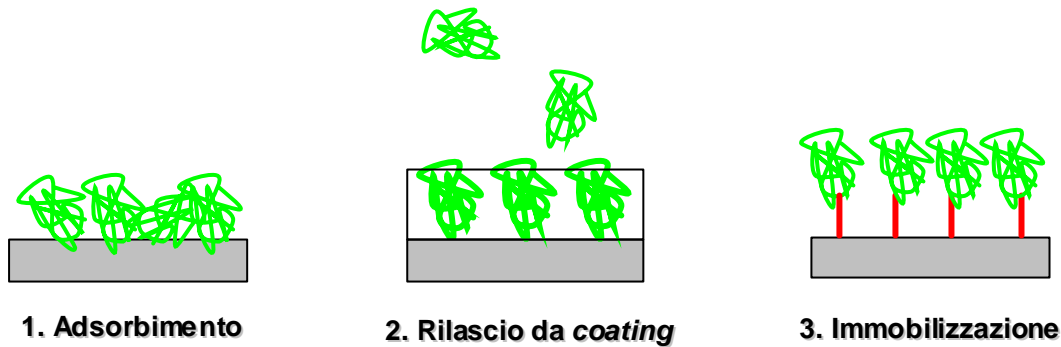
Le BMP-2 promuovono la formazione e la rigenerazione di ossa e cartilagine e sono coinvolte in fenomeni come l'organogenesi, la differenziazione e proliferazione cellulare, l'apoptosi [64]. Queste molecole presentano due epitopi chiamati rispettivamente *wrist epitope* e *knuckle epitope*. Il *wrist epitope* si pensa sia in grado di legare il recettore IA delle BMP mentre il *knuckle epitope* il recettore denominato type II. Comunque, la regione esatta di legame con il recettore nelle BMP-2 non è ancora stata ben identificata. Studi riportati in letteratura sul peptide sintetico NSVNSKIPKACCVPTELSAI, corrispondente ai residui 68-87 che si trovano nel *knuckle epitope* nella BMP-2 umana [65-67], hanno dimostrato come questo peptide sia in grado di indurre la calcificazione ectopica quando immobilizzato su un gel di alginato covalentemente cross-linkato e impiantato nel muscolo del polpaccio di ratto. Studi di cristallografia ai raggi X condotti sulla proteina nativa, indicano che la metà C-terminale del frammento di BMP-2 sintetizzato corrisponde ad un tratto in  $\beta$ -sheet nella proteina cristallizzata mentre la metà N-terminale costituisce un tratto di raccordo con una zona in  $\alpha$ -elica [63].

### ***Modifiche superficiali di biomateriali***

Una volta identificate le proteine o i peptidi da utilizzare per la promozione dell'adesione e della crescita cellulare, si pone il rilevante problema di permetterne il trasporto ed il rilascio in corrispondenza del sito ove è auspicabile possano svolgere la loro funzione, ovvero all'interfaccia tra l'impianto ed il tessuto biologico. I metodi finora messi a punto (Fig. 2) prevedono di [68]:

- 1) depositare la molecola biologicamente attiva sulla superficie dell'impianto dove aderisce per semplice adsorbimento;

- 2) includere la molecola in un *carrier* riassorbibile che, degradandosi nell'ambiente biologico, ne permette il rilascio;
- 3) ancorare chimicamente la molecola alla superficie dell'impianto, con formazione di un legame covalente.



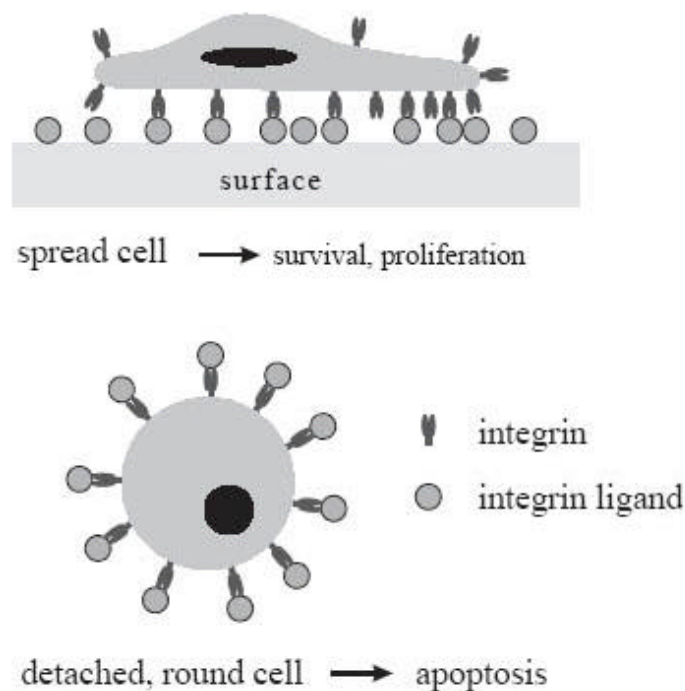
**Fig. 2:** Metodi per veicolare una molecola ad una superficie.

Ciascuno dei tre metodi presenta vantaggi e svantaggi che vengono di seguito brevemente illustrati. L'adsorbimento sfrutta le semplici interazioni tra peptidi e/o proteine e la superficie del materiale; si realizza lasciando in contatto con la superficie dell'impianto una soluzione contenente il peptide e/o la proteina per un tempo prestabilito, in condizioni controllate. È un metodo estremamente semplice, poco costoso e facilmente realizzabile, ma presenta il grande inconveniente di non permettere una deposizione controllata sulla superficie e quindi una valutazione certa della quantità di biomolecole per unità di superficie del materiale. Inoltre, le proteine semplicemente adsorbite possono staccarsi ed eventualmente allontanarsi dalla superficie dell'impianto durante le procedure di innesto. Infine, a causa dell'adsorbimento, la conformazione delle proteine può essere alterata con conseguente denaturazione ed eventuale perdita di attività biologica [69].

L'inclusione in un *carrier* della biomolecola richiede l'utilizzo di una matrice per la veicolazione dei fattori di adesione o di crescita all'interfaccia tra tessuto ed impianto [70]. Alla luce dell'importanza della concentrazione e dell'esposizione della biomolecola ai fini di una risposta cellulare e tissutale, tale approccio risulta promettente perché può guidare o modulare il rilascio dei fattori bioattivi. In questo caso, il peptide e/o la proteina vengono inglobati all'interno di un materiale (generalmente polimerico) che ne consente il trasporto ed il rilascio secondo una cinetica che varia in funzione delle caratteristiche del materiale medesimo e del metodo utilizzato per l'inclusione: il peptide e/o la proteina possono essere semplicemente disciolti nel *carrier* o legati chimicamente ad esso [71-73]. Diversi sono i prodotti commerciali utilizzati a questo scopo: tra i più diffusi vi sono i co-polimeri

dell'acido lattico e acido glicolico [74, 75], l'acido ialuronico [76] e gli idrogeli a base di alginato [77-80]. Questi prodotti devono ovviamente possedere caratteristiche particolari: essere biocompatibili, biodegradabili e biorisorbibili, non ostacolare o mascherare l'attività biologica delle molecole trasportate, aderire al materiale senza comprometterne la possibilità di impiego in sede chirurgica. Sono stati anche proposti *coating* a base di collagene in quanto tale proteina fibrosa mima il supporto sul quale le biomolecole sono adsorbite nella matrice ossea.

Un possibile svantaggio nell'utilizzo di questa tecnica, come pure per il semplice adsorbimento di una molecola bioattiva ad una superficie, è che l'eccessivo rilascio di proteina o peptide dal coating può causare l'effetto opposto a quello voluto in quanto le molecole libere possono andare a bloccare i siti di *binding* delle cellule impedendo l'interazione con la superficie [71]. In Fig. 3 è riportato un esempio degli effetti opposti dell'interazione integrina-ligandi: i ligandi immobilizzati agiscono come agonisti dell'ECM portando all'adesione cellulare e quindi alla sopravvivenza delle cellule mentre i ligandi non immobilizzati agiscono come antagonisti portando al distacco delle cellule, che assumono la forma rotonda, e all'apoptosi.



**Fig. 3:** Interazione delle integrine con ligandi immobilizzati ad una superficie e liberi.

Per quanto riguarda la funzionalizzazione covalente, molte tecniche sono state studiate per l'immobilizzazione di proteine su supporti solidi da impiegare in varie applicazioni. Per esempio, derivati carbossiattivati di vari polimeri sono stati ricoperti con fattori di crescita,

fibronettina e collagene mediante legami covalenti usando carbodiimmide come agente condensante [81]. In generale, questo metodo permette di utilizzare i gruppi reattivi esistenti sulla superficie di un materiale per legare covalentemente le molecole di interesse, nella proporzione teorica di una per ogni sito di legame. Il legame può essere diretto o realizzato attraverso l'introduzione di una ulteriore molecola con funzione di distanziatore (*spacer*). L'utilizzo di uno *spacer* può produrre una maggior flessibilità della sequenza bioattiva e quindi una maggior adattabilità della stessa al sito di legame del recettore cellulare. L'approccio è stato abbondantemente applicato alla superficie di materiali polimerici [82], di vetri e substrati a base di  $\text{SiO}_2$  [83, 84] e per la funzionalizzazione di superfici metalliche e di ossidi [85-91]. Per le applicazioni ortopediche e dentali, le superfici metalliche impiegate possiedono relativamente pochi siti funzionali in grado di essere utilizzati per l'ancoraggio di biomolecole. I film di ossidi che vengono prodotti per passivazione contengono gruppi ossidrilici che possono essere utilizzati quali siti di funzionalizzazione. L'uso della chimica dei silani ha permesso di immobilizzare peptidi, enzimi e proteine adesive a differenti materiali, inclusi il titanio e le leghe NiTi, Ti6Al4V e Co-Cr-Mo. L'esito della funzionalizzazione del biomateriale dipende dal particolare tipo di silano, dalle condizioni sperimentali, dal substrato usato e dalle biomolecole. Le strategie utili a risolvere il problema della carenza di gruppi funzionali sul metallo includono i trattamenti al plasma [92] e la deposizione di monostrati auto-assemblati (SAMs, *self-assembled monolayers*) [93]. I trattamenti al plasma possono essere utilizzati non solo per incrementare il numero dei gruppi ossidrilici ma anche per *depositare* gruppi amminici e carbossilici, ovvero gruppi funzionali che offrono grande versatilità nelle reazioni di condensazione delle biomolecole. La deposizione di strati SAMs riguarda invece sia il processo di silanizzazione che la copertura del metallo con oro. La strategia chimica degli organosilani [94], composti organici in grado di legare una funzione amminica all'ossido superficiale (per esempio  $\text{SiO}_2$  o  $\text{TiO}_2$ ), permette di disporre di una seconda funzione amminica alla quale viene ancorato il peptide o la proteina o, in alternativa, uno *spacer* bifunzionale capace di legare a sua volta il peptide o la proteina. Gli organosilani formano uno strato monomolecolare sulla superficie del materiale che, di fatto, ne modifica le proprietà. Una strategia chimica alternativa può essere utilizzata sulla superficie dei materiali, purché questa sia stata preventivamente trattata con oro [95, 96]. Si tratta, in questo caso, di sfruttare l'affinità delle funzioni tioliche per l'oro utilizzando peptidi che contengano un residuo di cisteina. Anche se quest'ultima procedura rappresenta un buon

approccio alla funzionalizzazione di una superficie, la preliminare ricopertura con oro e il necessario ricorso a peptidi con residui di cisteina ne limita, ovviamente, l'applicazione.

Infine, per i substrati che mancano di specifici gruppi funzionali per l'ancoraggio, è possibile l'utilizzo di un metodo di immobilizzazione fotochimico [97].

Al fine di dimostrare che la risposta cellulare verso la superficie biomimetica viene indotta esclusivamente dalla sequenza peptidica, solitamente gli esperimenti *in vitro* vengono svolti in colture prive di siero.

Ovviamente, le modifiche superficiali dei materiali con proteine o peptidi in grado di legarsi alle cellule offre la possibilità di controllarne il comportamento solamente sulla superficie del materiale.

### ***Bulk modifications e scaffolds***

Le *bulk modifications* riguardano l'utilizzo di peptidi-segnale incorporati nel materiale per fornire siti di riconoscimento cellulare non solo superficiali ma disseminati tridimensionalmente nel biomateriale. In particolare le *bulk modifications* risultano funzionali all'ingegneria tessutale quando il materiale biomimetico risulta niетtabile e viene richiesto per riempire la mancanza di tessuto nel sito in cui si è creato un difetto. Un'altra sfida per i metodi di *bulk modification* è riuscire a incapsulare nel materiale biomimetico cellule in grado di modulare la proliferazione, la migrazione e la secrezione di matrice. Molti peptidi bioattivi sono stati incorporati in matrici tridimensionali (*scaffolds*) attraverso metodi chimici [98], fisici [99], fotochimici [100] e tramite reticolazione ionica [101] mantenendo l'attività biologica e sono risultati in grado di promuovere specifiche risposte cellulari sia *in vitro* che *in vivo*.

La formazione di tessuto osseo è il risultato di una serie di eventi sequenziali che iniziano con il reclutamento e la proliferazione di cellule progenitrici dell'osso dai tessuti circostanti, seguito dalla differenziazione, dalla formazione di matrice e dalla mineralizzazione. Un approccio tipico dell'ingegneria tessutale per trattare i difetti scheletrici coinvolge l'uso di *scaffolds* di biomateriali osteoconduttivi da ripopolare con cellule ostogeniche e fattori osteoinduttivi. In particolare l'abilità del materiale biomimetico di promuovere l'adesione e la migrazione di cellule progenitrici dell'osso nei primissimi stadi del processo di rigenerazione e guarigione è cruciale per le fasi successive della formazione di nuovo tessuto. Fisiologicamente molte proteine dell'ECM vengono espresse durante la formazione di nuovo osso. Tra queste sono state individuate

l'osteopontina, la trombospondina e le sialoproteine dell'osso che ricoprono un ruolo fondamentale nella migrazione, proliferazione deposizione di matrice organica e mineralizzata delle cellule dell'osso. Poichè l'integrazione di *scaffolds* biomimetici entro il tessuto osseo ha luogo all'interfaccia tessuto-materiale ed è spesso determinata dalle interazioni cellulari iniziali con la superficie del materiale, risulta fondamentale progettare *scaffolds* funzionalizzati con proteine, o preferibilmente con peptidi correlati che mostrano bioattività analoga, della matrice ossea.

Mentre materiali che possono essere modificati solo superficialmente (vetro, quarzo, ossidi di metalli) si prestano esclusivamente alla sintesi di *scaffolds* pre-fabbricati con un ben delineato volume e forma (ad esempio viti implantari), i polimeri biodegradabili trasformati dai peptidi bioattivi in materiali biomimetici possono essere iniettati assumendo la forma di difetti irregolari o di dimensioni soggette a variazioni. Alcuni idrogeli legati a peptidi bioattivi di nuova progettazione possono, per esempio, trasformarsi da liquidi in gel solidi a contatto con i liquidi biologici.

Gli *scaffold* ideali per i biomateriali dovrebbero rispondere ai seguenti criteri [102, 103]:

1. unità di base che possono essere progettate e modificate;
2. grado controllato di biodegradabilità;
3. assenza di citotossicità;
4. caratteristiche che promuovano o inibiscono in modo specifico le interazioni cellula-materiale;
5. caratteristiche tali da indurre una risposta immunitaria e infiammatoria minima;
6. facili da produrre in differenti scale, da purificare e processare;
7. chimicamente compatibili con le soluzioni acquose e le condizioni fisiologiche.

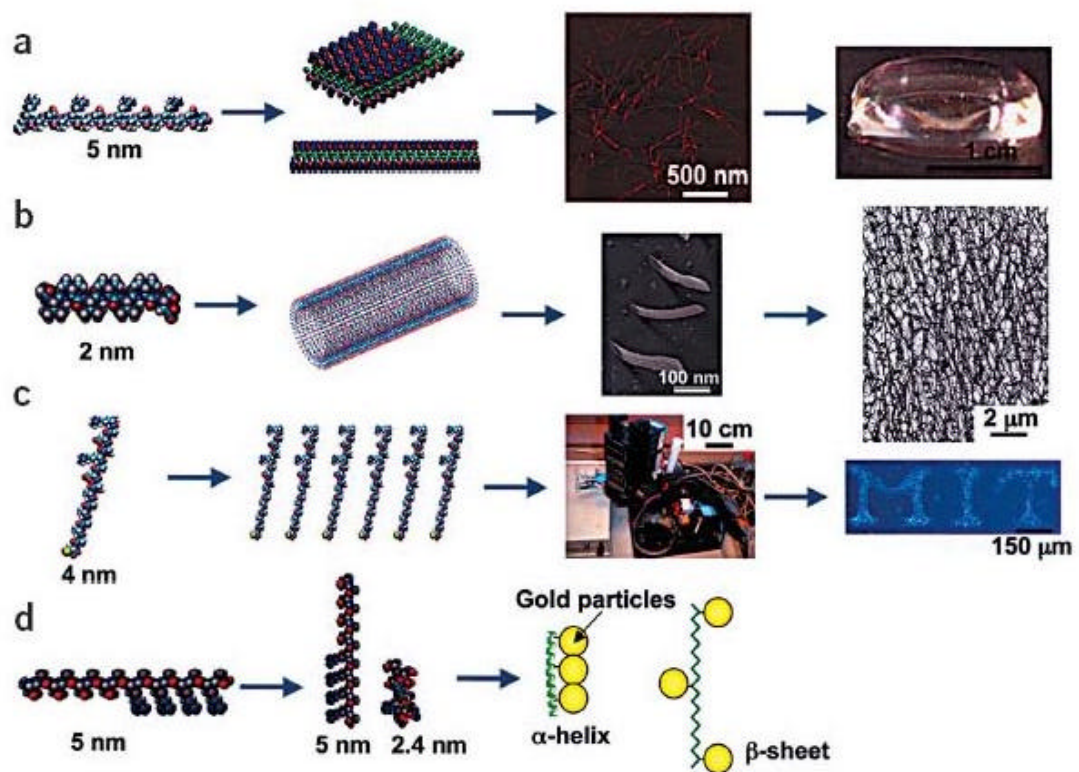
Tra gli *scaffold* sintetici più promettenti, in quanto potenzialmente in grado di soddisfare tutti i requisiti citati, vi sono quelli composti da peptidi auto-assemblati, ovvero molecole in grado di organizzarsi spontaneamente in una struttura macroscopica ordinata e ben definita tramite l'instaurarsi di interazioni non covalenti come ad esempio i legami ad idrogeno, quelli ionici, le interazioni idrofobiche e di van der Waals [104-112]. Gli elementi chiave per l'auto-assemblaggio sono la complementarietà chimica e la compatibilità strutturale [113].

Tali molecole permettono di ottenere strutture bi- o tri-dimensionali da utilizzare per promuovere le interazioni cellula-cellula multidimensionali ed incrementare la densità cellulare. A tale proposito, molti tipi di materiali naturali derivati da animali, come per esempio le matrici di collagene, possono essere utilizzati quali supporti sui quali crescere



le cellule. Ciononostante per molti di questi *scaffold* un grave aspetto negativo è rappresentato dal rischio di trasmissione di patogeni quali per esempio l'encefalopatia spongiforme trasmissibile (TSE). Un vantaggio proprio dei materiali sintetici è che essi minimizzano il rischio di trasportare patogeni e contaminanti. Un altro importante vantaggio è che essi possono venire progettati per soddisfare specifiche necessità. Inoltre, quando i materiali sintetici sono composti di amminoacidi, tale tipologia di monomeri assicura una eccellente compatibilità fisiologica e una minima tossicità.

Esistono diversi sistemi costituiti da peptidi auto-assemblanti (Fig. 4) che sono stati classificati nel seguente modo da Zhang [113], l'autore che ha scoperto la classe di peptidi auto-assemblanti ionico-complementari: il *Tipo I*, "Lego molecolare" che forma idrogeli che possono essere utilizzati come *scaffold* nell'ingegneria tissutale, il *Tipo II*, "interruttori molecolari" che operano come un azionatore molecolare; il *Tipo III*, "uncino molecolare" e "velcro molecolare" utilizzati per l'ingegneria di superfici; il *Tipo IV*, nanotubi peptidici e nanovesiciche o "capsula molecolare" per il trasporto di geni e proteine e il *Tipo V*, "cavità molecolare" per la biomineralizzazione. I sistemi costituiti da peptidi auto-assemblanti sono semplici, versatili e facili da produrre.



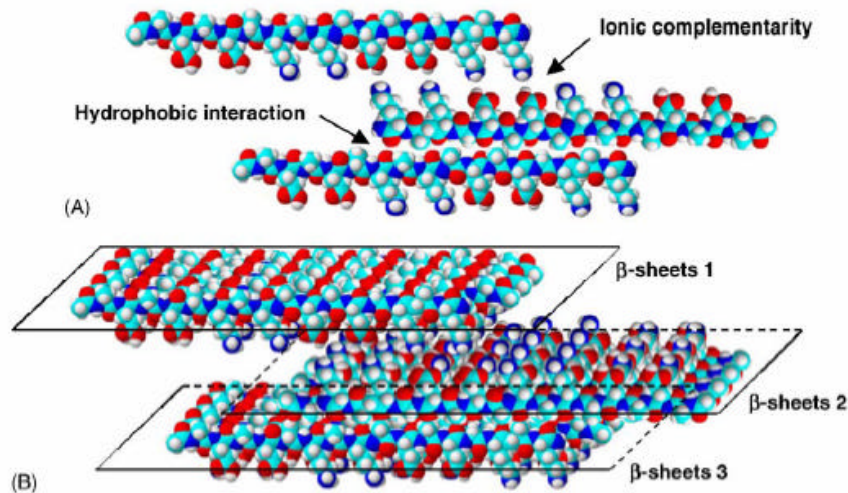
**Fig. 4:** Fabbricazione di diversi materiali peptidici. Le varie nanostrutture riportate in figura si sono formate a partire da peptidi auto-assemblanti appartenenti alle seguenti classi di Zhang: (a) *Tipo I*, "Lego molecolare"; (b) *Tipo IV*, nanotubi peptidici e nanovesiciche; (c) *Tipo III*, "uncino molecolare" e "velcro molecolare"; (d) *Tipo II*, "interruttori molecolari".

Una nuova classe di biomateriali, attualmente molto studiata, è composta da peptidi auto-assemblanti ionico-complementari caratterizzati dall'alternanza di residui amminoacidi con carica positiva e residui con carica negativa separati da residui idrofobici. I peptidi auto-assemblanti che presentano questo particolare *pattern* amminoacidico appartengono alla classe denominata *Tipo I* da Zhang e in genere assumono, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo  $\beta$ -sheet che, grazie ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico, può assemblarsi in fibre, membrane e idrogeli all'aumentare della concentrazione o variando altri parametri fisico-chimici [114-121]. Il processo di auto-assemblaggio dipende fortemente dalla sequenza peptidica [122, 123], dalla concentrazione [124], dal pH [125], dalla presenza di sali e dal tempo [126]. In base a studi AFM [113], è stato possibile stabilire che le membrane formate da questi peptidi sono costituite da nanofibre intrecciate aventi diametri compresi tra i 10-20 nm e pori intorno ai 50-200 nm di diametro.

I peptidi appartenenti alla classe *Tipo I* sono stati ulteriormente suddivisi in diversi moduli in base alla superficie idrofila delle molecole che presenta catene laterali cariche alternativamente + e -; ad esempio, le molecole del modulo I presentano il seguente alternarsi di cariche, - + - + - + - +; il modulo II, - - + + - - + +; il modulo IV, - - - - + + + +, ecc...

Il primo membro di questa classe di peptidi, scoperto da Zhang *et al.* [127], è il peptide EAK 16 che è formato dall'alternanza di residui idrofobici e idrofilici; questo arrangiamento ripetitivo di amminoacidi impartisce proprietà anfifiliche al peptide che tende a formare  $\beta$ -sheet che auto-assemblano in membrane, completamente atossiche, a seguito dell'aggiunta di sali in soluzione (più precisamente ioni monovalenti positivi, anche se non è ancora chiaro come essi intervengano nel favorire la formazione di strutture supramolecolari). Il tipo di sale utilizzato sembra giocare un ruolo importante nell'indurre il processo di auto-assemblaggio [126, 127]: l'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ . In particolare l'aggiunta di  $\text{Cs}^+$  produce precipitazione di aggregati più che formazione di membrane. Le membrane formate dal peptide EAK 16-II ( $\text{Ac-AEAEAKAKAEAEAKAK-NH}_2$ ) possono sopportare temperature elevate fino a  $90^\circ\text{C}$  per più di 4 ore in soluzioni all'1% di SDS, sono resistenti alla digestione con diverse proteasi – inclusa tripsina,  $\alpha$ -chimotripsina, papaina, proteasi K e pronasi – alla concentrazione di  $100 \mu\text{g/mL}$ , sono meccanicamente stabili e possono essere trasferite da una soluzione ad un'altra per mezzo di supporti solidi [126, 127].

La resistenza inusuale delle strutture supramolecolari derivanti da questo peptide si pensa sia dovuta alla stabilizzazione dei  $\beta$ -sheet in seguito all'auto-assemblaggio [120, 126, 127], processo che si ipotizza avvenire tramite interazioni idrofobiche e ionico-complementari (Fig. 5).



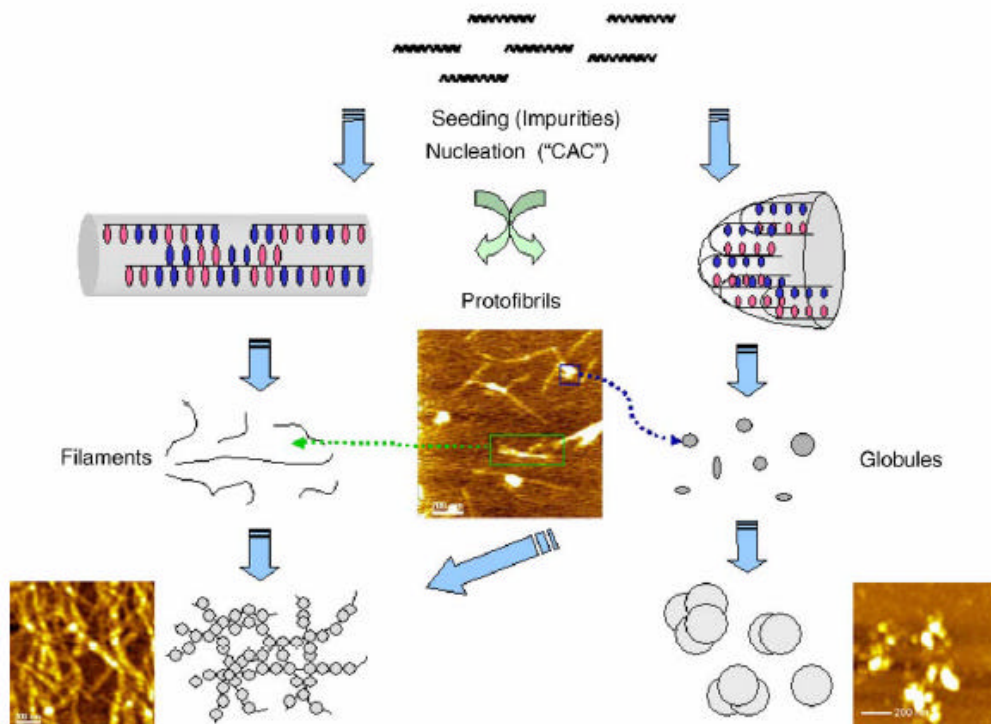
**Fig. 5:** (A) Schema di auto-assemblaggio del peptide EAK 16-II attraverso interazioni idrofobiche e ionico-complementari. (B) Modello proposto per l'auto-assemblaggio del peptide EAK 16-II tramite aggregati basati sui  $\beta$ -sheet. In aggiunta ai legami idrogeno, le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche aiutano a stabilizzare i  $\beta$ -sheet.

Le membrane, secondo il modello proposto, vengono a formarsi dall'accatastarsi di foglietti di strutture  $\beta$ -sheet; ciascun foglietto si lega al precedente, tramite ponti ionici tra i gruppi carichi delle catene laterali (residui di acido glutammico e di lisina), e al successivo, tramite interazioni idrofobiche tra le catene laterali dei residui di alanina.

È noto che la struttura secondaria è di fondamentale importanza nel processo che porta all'auto-assemblaggio dei peptidi. In genere i peptidi auto-assemblanti tendono ad assumere una struttura secondaria ordinata prevalente,  $\alpha$ -elica o  $\beta$ -sheet, e si pensa che la causa principale che porta alla formazione dell'una o dell'altra sia dovuta alle interazioni intra e/o inter-molecolari attraverso legami idrogeno [126].

L'auto-assemblaggio è una proprietà ben nota di molte biomolecole naturali ma il meccanismo coinvolto nella formazione di diversi tipi di nano e microstrutture auto-assemblate a partire da peptidi non è ancora chiaro. È stato riportato che la maggior parte dei peptidi ionici auto-complementari formano  $\beta$ -sheet ed alcuni possono eventualmente auto-assemblarsi per formare membrane. La formazione dei  $\beta$ -sheet è principalmente dovuta ai legami idrogeno mentre il processo di assemblamento richiede diversi passaggi per essere completato. Zhang e Altman [128] hanno ipotizzato che i fogli di  $\beta$ -sheet

possono accatastarsi per formare aggregati più estesi attraverso interazioni ionico-complementari e idrofobiche come accennato per il peptide EAK 16-II. Gli aggregati inizialmente appaiono come filamenti che in seguito possono aggregare ulteriormente per formare membrane. Fung *et al.* [124] hanno recentemente proposto un modello di auto-assemblaggio basato su studi del peptide EAK 16-II. Il modello prevede 2 stadi per la formazione di fibre: durante il primo stadio i monomeri di peptide si auto-assemblano in protofibre tramite processi di nucleazione e/o di insemminazione (*seeding*) a seconda della concentrazione della soluzione. Al di sopra della CAC (concentrazione critica di aggregazione), i nuclei sono formati principalmente dall'auto-associazione del peptide mentre al di sotto della CAC i nuclei sono formati solo dai 'semi' (impurità) presenti in soluzione. Una volta che si sono formati i nuclei, essi possono crescere in protofibre tramite associazione dei monomeri di peptide. Le protofibre possono adottare due differenti nanostrutture, ovvero aggregati globulari e filamenti; entrambe le strutture sono composte da  $\beta$ -sheet, che sono tenuti insieme principalmente tramite legami idrogeno. Le strutture globulari possono anche essere formate tramite l'assemblaggio di  $\beta$ -turn. Il secondo stadio previsto da questo modello coinvolge l'aggregazione delle protofibre per formare fibre costituite dagli aggregati globulari che si allineano lungo i filamenti (Fig. 6) [126].



**Fig. 6:** Modello proposto per l'auto-assemblaggio del peptide ionico-complementare EAK 16-II.

La nuova frontiera negli *scaffolds* di peptidi auto-assemblanti è la modulazione della capacità di indurre particolari funzioni cellulari legata all'inserimento, nelle sequenze che creano lo *scaffold*, di specifiche sequenze-segnale per l'adesione specifica o la crescita di alcuni tipi di cellule [117].

# ***SCOPO DELLA RICERCA***



Lo scopo del presente lavoro di dottorato è lo studio e la messa a punto di procedure per la realizzazione di biomateriali innovativi per impianti o sostituti ossei.

Il progetto si è articolato a vari livelli che vanno dall'individuazione di peptidi bioattivi in grado di promuovere l'adesione e la proliferazione degli osteoblasti grazie alla strategia nota come *peptide mimicry*, allo studio di come veicolare tali peptidi alla superficie o all'interno di un biomateriale.

In particolare, le linee di ricerca intraprese nel corso del dottorato sono riassumibili come segue:

1. Progettazione, sintesi e caratterizzazione di sequenze peptidiche che promuovono l'adesione cellulare da utilizzare per ottenere materiali biomimetici. Uno dei segnali molecolari per l'adesione cellulare più studiato è il motivo RGD. Tale tripeptide, oltre a sequenze più estese che lo contengono sempre appartenenti alla fibronectina, è stato proposto con modalità diverse (ripetizione o meno del motivo segnale) in peptidi lineari. Oltre a peptidi recanti il motivo RGD, il lavoro comprende la progettazione, sintesi e caratterizzazione di sequenze innovative in grado di promuovere in modo specifico l'adesione degli osteoblasti per l'ottenimento di materiali biomimetici. Un'analisi delle sequenze delle principali proteine che fisiologicamente mediano l'adesione degli osteoblasti attraverso un meccanismo specifico che coinvolge i proteoglicani di membrana, ha permesso l'individuazione di potenziali sequenze-segnale per l'adesione cellulare nel frammento 340-365 della vitronectina umana.
2. Progettazione, sintesi e caratterizzazione di frammenti bioattivi di fattori di crescita per lo sviluppo di materiali biomimetici innovativi. La strategia denominata *peptide mimicry* è stata applicata anche a fattori di crescita potenzialmente utili per la messa a punto di biomateriali innovativi per impianti o sostituti ossei. In particolare si sono individuati e riprodotti per sintesi chimica 3 frammenti appartenenti alla BMP-2 umana.
3. Progettazione, sintesi e caratterizzazione di *scaffold* tridimensionali composti di peptidi auto-assemblanti.



Tutti i peptidi sintetizzati verranno ampiamente caratterizzati mediante analisi dicroiche, FT-IR ed NMR in soluzione.

La capacità delle sequenze sintetiche di promuovere la specifica attività biologica richiesta (adesione, crescita, proliferazione) verrà valutata tramite saggi biologici *in vitro* e *in vivo* in collaborazione con altri gruppi di ricerca.

Ad alcuni dei peptidi sintetizzati verrà legato selettivamente un gruppo fluoroforo al terminale amminico in previsione di studi sul grado di funzionalizzazione di matrici o sulla velocità di rilascio del peptide bioattivo da *coating* di differente composizione.

Verranno inoltre utilizzate differenti strategie per veicolare le molecole bioattive alla superficie implantare (adsorbimento, arricchimento di un *carrier* o funzionalizzazione covalente).

Anche in questo caso, la valutazione del grado di funzionalizzazione ottenuto e delle caratteristiche superficiali dell'impianto biomimetico verrà effettuata attraverso tecniche di analisi superficiale in collaborazione con altri gruppi di ricerca.

# ***PROGETTO DI RICERCA***



## PEPTIDI DI ADESIONE

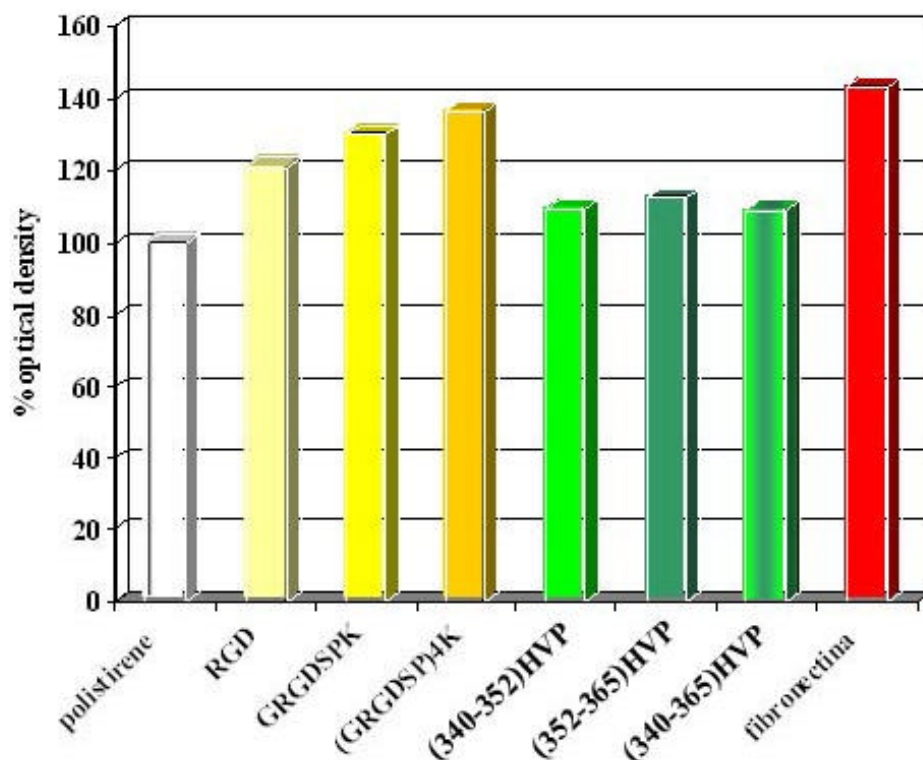
### *Sintesi dei peptidi adesivi*

Finora sono stati individuati due possibili meccanismi di adesione degli osteoblasti:

1. il primo, molto noto e comune a svariati tipi di cellule, prevede l'interazione tra la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp), contenuta in proteine della matrice extracellulare, e i recettori della membrana cellulare chiamati integrine;
2. il secondo meccanismo, specifico per gli osteoblasti, prevede l'interazione tra i proteoglicani della membrana cellulare e i siti di legame per l'eparina presenti nelle proteine della matrice extracellulare.

In base a studi precedentemente svolti su vari peptidi contenenti la sequenza RGD si è deciso di sintetizzare tre diversi peptidi contenenti questa particolare sequenza segnale (Tab. 1, in blu sono evidenziati i residui amminoacidici corrispondenti al sito attivo) [129]. L'analisi delle sequenze di proteine adesive quali fibronectina, vitronectina, sialoproteina dell'osso, trombospondina e osteopondina provenienti da ratto, topo, uomo e pollo ha permesso di individuare nella sequenza della vitronectina umana una sequenza molto interessante a livello dei residui 347-359: si tratta della presenza a breve distanza di un motivo X-B-B-X-B-X e di un motivo X-B-B-B-X-B-B-X (dove B è un amminoacido basico e X un residuo non basico) potenzialmente capaci di promuovere in maniera specifica l'adesione degli osteoblasti mediata dall'eparansolfato. Al fine di studiare questa sequenza, nel corso della mia tesi di laurea, era stato sintetizzato un peptide riprodotto la sequenza 340-365 della vitronectina umana nonché i due frammenti più corti in esso contenuti (340-352) e (352-365) recanti una sola sequenza-segnale ciascuno (Tab. 1, le sequenze-segnale sono evidenziate in rosso e in verde). Saggi di adesione condotti su supporti di polistirene pretrattati con soluzioni contenenti questi tre peptidi ricavati da sequenze della vitronectina [129] hanno permesso di individuare il peptide (352-365)HVP quale molecola più attiva nel promuovere l'adesione degli osteoblasti mediata da proteoglicani (Fig. 7).

Nel corso del dottorato si è deciso di risintetizzare questi peptidi, alcuni dei quali avevano comportato dei problemi a livello di sintesi e purificazione e quindi era stato possibile isolare solo quantità estremamente esigue di prodotto, per condurre ulteriori studi sia conformazionali che biologici.



**Fig. 7:** Saggi di adesione di osteoblasti, estratti da teche craniche di ratti Sprague-Dawley neonati, su polistirene pretrattato con peptidi sintetici.

L'indagine sulla sequenza minima attiva ha portato alla sintesi del frammento (352-360)HVP. Tale nonapeptide verrà inoltre ciclizzato per condensazione del terminale amminico con il terminale carbossilico al fine di indurre una minor libertà conformazionale. Per valutare la specificità dell'interazione si è deciso di sintetizzare anche una sequenza *scrambled* del peptide 7, denominata (352-360)HVP Sc.

**Tab. 1:** Sequenze dei peptidi di adesione che si è deciso di sintetizzare durante il dottorato.

	<i>Sigla</i>	<i>Sequenza</i>
1	RGD	<b>R G D</b>
2	GRGDSPK	G <b>R G D S P K</b>
3	(GRGDSP) <sub>4</sub> K	G <b>R G D S P G R G D S P G R G D S P G R G D S P K</b>
4	(340-365)HVP	MA P R P S L A <b>K K Q R F R H R N R K G Y R S Q R G</b>
5	(340-352)HVP	MA P R P S L A <b>K K Q R F</b>
6	(352-365)HVP	F <b>R H R N R K G Y R S Q R G</b>
7	(352-360)HVP	F <b>R H R N R K G Y</b>
8	(352-360)HVP ciclico	F <b>R H R N R K G Y</b>
9	(352-360)HVP Sc	R N Y H R G F R K

## ***Saggi di adesione in vitro***

I saggi di adesione cellulare verranno condotti presso il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Parnigotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova, utilizzando osteoblasti estratti da midollo osseo di femori di ratto Sprague-Dowley adulto.

Una prima serie di esperimenti verrà condotta su polistirene (materiale di cui sono fatte le piastre di coltura cellulare) trattato con i vari peptidi e fibronectina come riferimento, mentre la seconda serie prevede l'utilizzo di matrice ossea acellulare per rendere le condizioni di adesione più simili a quelle fisiologiche.

Dato che si suppone che i vari peptidi restino adesi in misura diversa al polistirene e alla matrice ossea acellulare, al fine di rendere il dato di incremento dell'adesione cellulare indipendente dal numero effettivo di nmoli di peptide presenti sulla superficie trattata verrà misurata la quantità di ciascun peptide adsorbita su polistirene o matrice. Per fare questo verranno costruite delle rette di taratura (nmoli di peptide *vs* area picco cromatografico corrispondente) e si ricaverà la quantità di peptide adsorbito al polistirene o alla matrice andando a misurare la quantità di peptide rimasto in soluzione dopo il pretrattamento per condizionare le piastre usate per condurre i saggi di adesione.

## ***Funzionalizzazione con fluoresceina***

La sintesi di peptidi marcati con fluoresceina sta assumendo sempre maggiore importanza grazie al loro possibile utilizzo in campi che vanno dalla chimica bioorganica, alla biologia cellulare, alla farmacologia ed alla medicina [130-132].

Nell'ambito del presente lavoro di dottorato, si vogliono utilizzare peptidi marcati con un gruppo fluoroforo per studi sulla velocità di rilascio di tali peptidi da *coating* di differente composizione o per valutare la quantità di peptide adeso, per adsorbimento o legame covalente, ad una particolare superficie. I peptidi che si intendono marcare con fluoresceina per degli studi preliminari sono: RGD, GRGDSPK, (GRGDSP)<sub>4</sub>K e (340-352)HVP.

Sono possibili due differenti approcci per produrre peptidi marcati: il peptide può essere sintetizzato utilizzando un amminoacido già marcato, oppure il marcatore può essere aggiunto una volta completata la sintesi del peptide. Per l'attacco della fluoresceina si è deciso di usare la seconda strategia ma prendendo particolari accorgimenti per rendere la

reazione specifica, ovvero per legare selettivamente il gruppo fluoroforo al terminale amminico in modo da non interferire con il sito attivo del peptide.

### ***Funzionalizzazione di superfici con molecole bioattive***

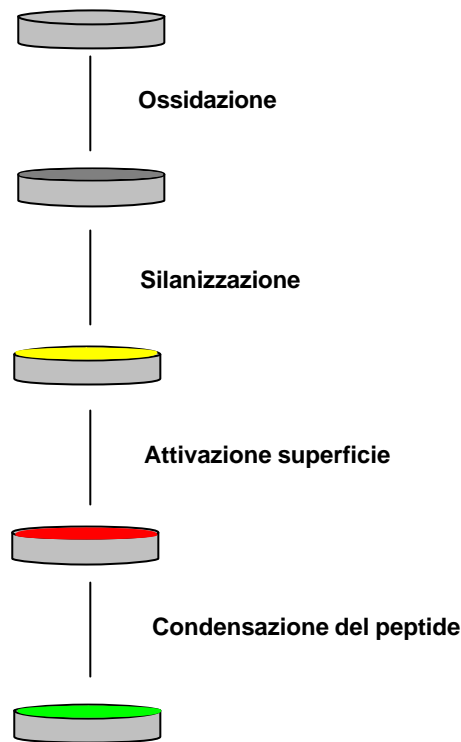
Una volta identificate le proteine e/o i peptidi da utilizzare per la promozione dell'adesione e della crescita cellulare, si pone il problema di come trasportarle e rilasciarle nel sito dove possano svolgere la funzione attesa. Bisogna inoltre considerare la difficoltà di controllare la concentrazione locale delle proteine e/o dei peptidi: una concentrazione troppo bassa non darebbe luogo ad alcun effetto, mentre una concentrazione, anche istantanea, troppo elevata potrebbe provocare risposte indesiderate [68, 71].

### **Funzionalizzazione covalente di superfici di titanio**

Una delle possibili strategie per veicolare una molecola bioattiva all'interfaccia tra un tessuto biologico e la superficie di un impianto consiste nel legare covalentemente la molecola alla superficie di quest'ultimo.

Il titanio è considerato il materiale d'elezione per gli impianti ossei grazie alle sue proprietà specifiche: elevata resistenza meccanica, notevole resistenza alla corrosione e ottima biocompatibilità [133]. Si è quindi deciso di mettere a punto un sistema per legare covalentemente un peptide, contenente l'opportuna sequenza-segnale, ad una superficie di titanio.

La metodica che si è scelto di seguire [69] prevede, come primo passaggio, la silanizzazione della superficie di dischetti di titanio preventivamente sabbiati ed ossidati [134] con il (3-amminopropil)trietossisilano. A questo punto, sulla superficie dei dischetti, sono presenti dei gruppi amminici che possono essere fatti reagire con molecole bifunzionali, che a loro volta possono legare covalentemente un peptide bioattivo (Fig. 8). Legando covalentemente un peptide alla superficie di un impianto, risulta più facile determinare la quantità esatta di peptide presente sulla superficie e la funzionalizzazione risulta più stabile che sfruttando il semplicemente adsorbimento della molecola.



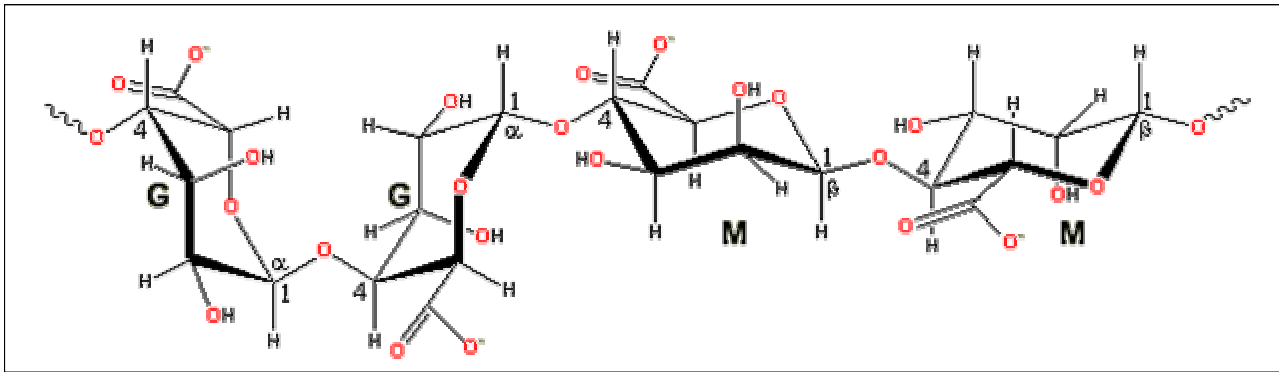
**Fig. 8:** Schema della funzionalizzazione covalente di un dischetto di titanio con un peptide.

### **Funzionalizzazione covalente di idrogeli di alginato**

Vari idrogeli, sia di natura sintetica che naturale, sono stati recentemente utilizzati come matrici extracellulari (ECM) sintetiche per l'immobilizzazione cellulare, il trapianto di cellule o l'ingegneria tissutale [77]. Le ECM sintetiche sostituiscono molte delle funzioni delle ECM naturali, organizzando le cellule in strutture tridimensionali che forniscono integrità meccanica al nuovo tessuto e generando uno spazio idratato che permette la diffusione di nutrienti e metaboliti da e verso le cellule. Gli alginati sono polisaccaridi che si trovano in natura e che sono stati utilizzati estensivamente come idrogeli per ECM sintetiche [101].

Gli alginati sono polisaccaridi lineari non ramificati composti da monomeri uniti da legami  $\beta$ -(1-4) di acido  $\beta$ -D-manuronico (unità M) e acido  $\alpha$ -L-guluronico (unità G) che variano per quantità e distribuzione sequenziale lungo la catena del polimero in relazione alla fonte dell'alginato (Fig. 9).





**Fig. 9:** Esempio di struttura dei alginati.

Gli idrogeli di alginato, grazie alle loro caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità, possono essere impiegati sia come *scaffolds* biorisorbibili che come *coatings* per impianti.

Nel presente lavoro di tesi si è deciso di utilizzare un particolare tipo di alginato *cross-linkato* denominato AGA-100 [79]. Reticolare covalentemente l'alginato, infatti, permette di minimizzare le reazioni causate da corpo estraneo e quindi di ridurre al minimo la citotossicità di questo materiale una volta a contatto con i tessuti del corpo. Questo tipo di idrogel ha lo svantaggio di essere molto fragile, e questo ne limita le applicazioni, ma presenta il vantaggio di essere completamente riassorbito nel giro di tre mesi.

I monomeri che compongono l'alginato presentano dei gruppi carbossilici che possono essere utilizzati per legare i gruppi amminici liberi di un peptide o una proteina attraverso la formazione di legami ammidici [135].

Per incrementare l'adesione degli osteoblasti a queste ECM sintetiche è quindi possibile sia legare covalentemente un opportuno peptide bioattivo all'alginato, sia inglobarlo all'interno dell'idrogel.

Come nel caso del titanio, si è deciso di funzionalizzare covalentemente la superficie di dischetti di AGA-100 facendo reagire in modo specifico il gruppo amminico N-terminale del peptide con i gruppi carbossilici presente sull'alginato. Il processo di adesione cellulare ad una superficie, infatti, rappresenta il primo stadio dell'interazione tessuto-impianto e si può considerare concluso nel giro di poche ore, prima cioè che eventuali biomolecole contenute all'interno di una matrice biorisorbibile abbiano avuto il tempo di essere rilasciate.

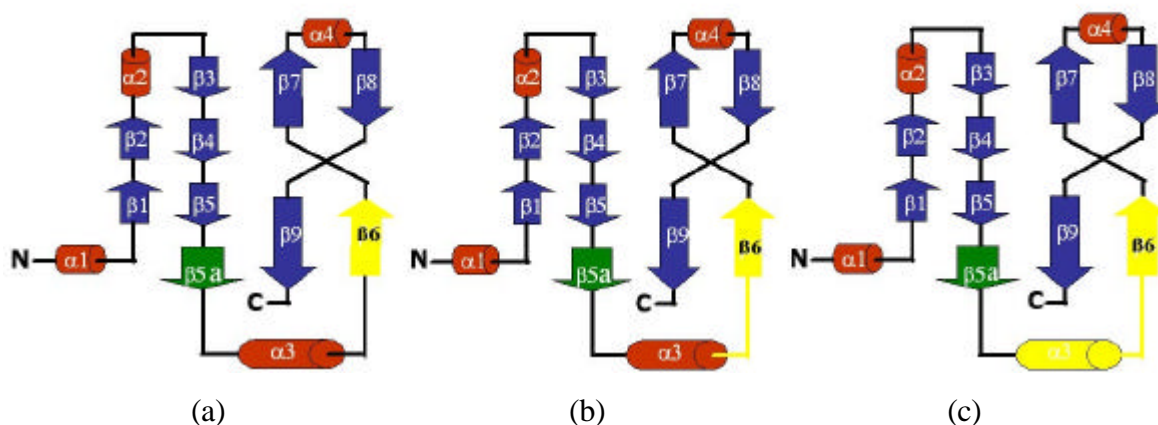
## FRAMMENTI DELLA BMP-2 UMANA

### Sintesi di frammenti della BMP-2

Dato che in letteratura è sottolineata l'importanza della conformazione affinché le molecole appartenenti alla famiglia delle BMP, e più in generale dei TGF, possano esplicare la loro attività *in vivo*, si è deciso di sintetizzare tre frammenti della BMP-2 che riproducono regioni caratterizzate da differenti strutture secondarie [63] (Fig. 10, in giallo sono evidenziati i tratti di sequenza corrispondenti ai tre frammenti sintetizzati): il frammento 68-87, riportato in letteratura e che si è dimostrato essere biologicamente attivo; un tratto più corto della stessa sequenza corrispondente ai residui 77-87, che nella proteina nativa si trova nella conformazione  $\beta$ -sheet, e una sequenza più lunga, comprendente anche il tratto in  $\alpha$ -elica della proteina nativa che precede il peptide attivo, che corrisponde ai residui 58-87. In Tab. 2 sono elencate le sequenze sintetizzate.

**Tab. 2:** Frammenti della BMP-2 sintetizzati.

	Sigla	Sequenza
10	(68-87)BMP-2	NSVNSKIPKACCVPTELSAI
11	(77-87)BMP-2	ACCVPTELSAI
12	(58-87)BMP-2	TNHAIIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAI



**Fig. 10 :** Rappresentazione schematica della struttura terziaria della BMP-2 con evidenziati in giallo i tratti di sequenza corrispondenti ai peptidi (77-87)BMP-2 (a), (68-87)BMP-2 (b), (58-87)BMP-2 (c).

In base agli studi conformazionali su queste sequenze si vuole vedere se, una volta separati dal resto della molecola, questi frammenti mantengono la capacità di assumere la struttura

secondaria che presentano nella proteina intera ed approfondire le possibili correlazioni tra struttura ed attività biologica.

### ***Saggi biologici***

Saggi biologici *in vitro* sui tre frammenti della BMP-2 sintetizzati verranno condotti, come i saggi di adesione, presso il laboratorio diretto dal Prof. P.P. Parnigotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova.

Per gli esperimenti verranno utilizzati osteoblasti estratti da midollo osseo di femori di ratti Sprague-Dowley adulti. In tutti i saggi, il giorno successivo alla semina degli osteoblasti su piastra verranno aggiunti i frammenti della BMP-2 al mezzo di coltura.

Per valutare l'attività biologica di questi frammenti verrà eseguito il saggio della fosfatasi alcalina, che evidenzia la differenziazione cellulare.

## **PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI**

### ***Sintesi di peptidi auto-assemblanti ionico-complementari***

In base agli studi eseguiti da Zhang su peptidi auto-assemblanti appartenenti alla classe *Tipo I* [113], se si sostituiscono i residui carichi, ad esempio le lisine cariche positivamente con le arginine anch'esse cariche positivamente oppure gli acidi glutammici carichi negativamente con gli acidi aspartici carichi negativamente, non si osservano drastici effetti nel processo di auto-assemblaggio. Comunque, se si sostituiscono i residui carichi positivamente, Arg e Lys, con i residui carichi negativamente, Asp e Glu, o viceversa, i peptidi non possono più subire un processo di auto-assemblaggio per formare materiali macroscopici, sebbene essi possano ancora formare strutture  $\beta$ -sheet in presenza di sali. Se le alanine sono sostituite con residui più idrofobici, come ad esempio Leu, Ile, Phe o Tyr, le molecole presentano generalmente una maggiore tendenza ad auto-assemblarsi e a formare matrici peptidiche più resistenti.

Nell'ambito del presente lavoro di dottorato sono state progettate numerose sequenze auto-assemblanti per migliorare e diversificare gli *scaffolds* per biomateriali. In particolare si sono apportate modifiche alla sequenza del peptide EAK16-II, un peptide ionico-complementare appartenente alla classe *Tipo I* modulo II dei peptidi auto-assemblanti, noto per essere in grado di formare spontaneamente membrane in presenza di sali di litio, sodio

o potassio, le quali risultano notevolmente resistenti alla digestione proteolitica, a variazioni di pH e temperatura, non si dissolvono per aggiunta di SDS/urea o guanidina HCl e sono completamente atossiche. Inoltre, tali membrane sono meccanicamente stabili e possono essere trasferite da una soluzione all'altra usando un supporto solido [127].

La ricerca sull'ottimizzazione delle proprietà auto-assemblanti delle sequenze peptidiche valuterà due aspetti differenti: l'importanza del tipo di residuo acido o basico prescelto, ovvero della variazione della lunghezza di catena dei gruppi che generano i legami ionici tra i vari foglietti  $\beta$ -sheet, e l'importanza dei residui idrofobici, in particolare confrontando il ruolo dei residui alifatici rispetto a quello dei residui aromatici.

In Tab. 3 sono riportate le sequenze che si è deciso di sintetizzare a tale scopo. Dato che il blocco di entrambi i terminali N e C del peptide non risulta essenziale per la formazione di membrane [127], si è deciso di sintetizzare i peptidi come ammidi C-terminali lasciando il gruppo amminico N-terminale libero al fine di ottenere una carica netta non nulla e quindi, presumibilmente, peptidi più solubili.

**Tab. 3:** Sequenze dei peptidi ionico-complementari che si è deciso di sintetizzare.

	<i>Sigla</i>	<i>Sequenza</i>
1	EAK16-II	H-A E A E A K A K A E A E A K A K-NH <sub>2</sub>
2	EAK8-II	H-A E A E A K A K-NH <sub>2</sub>
3	DAK16-II	H-A D A D A K A K A D A D A K A K-NH <sub>2</sub>
4	DAK8-II	H-A D A D A K A K-NH <sub>2</sub>
5	DAOrn16-II	H-A D A D A Orn A Orn A D A D A Orn A Orn-NH <sub>2</sub>
6	DAOrn8-II	H-A D A D A Orn A Orn-NH <sub>2</sub>
7	EAbuK16-II	H-Abu E Abu E Abu K Abu K Abu E Abu E Abu K Abu K-NH <sub>2</sub>
8	EAbuK8-II	H-Abu E Abu E Abu K Abu K-NH <sub>2</sub>
9	EYK16-II	H-Y E Y E Y K Y K Y E Y E Y K Y K-NH <sub>2</sub>
10	EYK8-II	H-Y E Y E Y K Y K-NH <sub>2</sub>
11	RGD-(EAK16-II)	H-R G D A E A E A K A K A E A E A K A K-NH <sub>2</sub>
12	RGD-(EAK16-II) Sc	H-R G D A A K A E A E A A E K A K A E K-NH <sub>2</sub>

Gli amminoacidi Orn (ornitina) e Abu (acido 2-amminobutirrico) non sono naturali; l'Orn differisce dalla Lys in quanto presenta un gruppo CH<sub>2</sub> in meno in catena laterale, mentre l'Abu ha un gruppo CH<sub>2</sub> in più in catena laterale rispetto all'Ala.

Come si può vedere dalla Tab. 3, si è deciso di sintetizzare anche la sequenza RGD-(EAK16-II) la quale contiene, legata alla posizione N-terminale del peptide EAK16-II, una

sequenza-segnale che dovrebbe promuovere l'adesione cellulare. Oggetto di studio sarà la perturbazione che tale sequenza aggiunta può provocare nella formazione di strutture auto-assemblate. Al fine di discriminare tra i contributi dovuti alla presenza della sequenza-segnale per l'adesione cellulare e allo *scaffold* peptidico auto-assemblante sarà sintetizzata una sequenza *scrambled* di EAK16-II condensata alla sequenza RGD (vedi Tab. 3).

In letteratura è riportato che il peptide EAK8-II [120], formato dall'unità che viene ripetuta in EAK16-II, non forma membrane nelle medesime condizioni in cui la sequenza doppia le forma; al fine di ottenere maggiori informazioni sul possibile meccanismo che porta alla formazione di membrane si è deciso di sintetizzare anche le sequenze da 8 residui per ognuno dei peptidi da 16.

## STUDI CONFORMAZIONALI

### *Studi conformazionali dei peptidi bioattivi*

Le indagini conformazionali preliminari eseguite sulle sequenze bioattive sintetizzate hanno quale finalità ultima la ricerca di eventuali correlazioni tra struttura secondaria e attività biologica dei peptidi.

Le tecniche che si intendono utilizzare a tal fine sono il dicroismo circolare (CD) e la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR). Inoltre, i vari peptidi sintetizzati verranno sottoposti ad analisi NMR presso il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Livio Paolillo del Dipartimento di Chimica dell'Università di Napoli Federico II.

Molte molecole possono interconvertirsi rapidamente tra varie forme strutturali (conformeri) che esistono in equilibrio dinamico. Tali conformazioni possono non essere rilevabili tramite spettroscopia NMR, se il tempo di vita delle forme strutturali è breve, ma possono essere rilevate tramite spettroscopia IR o CD che posseggono veloci scale dei tempi quantificabili rispettivamente in  $10^{-12}$  e  $10^{-15}$  secondi. La scala dei tempi della spettroscopia NMR, invece, va dall'ordine dei secondi ai  $10^{-5}$  secondi; conseguentemente, tutti i conformeri derivati da interconversioni che non comportano rotazione attorno al legame peptidico conducono a dei parametri NMR medi, la cui interpretazione va presa con cautela.

Essendo generalmente accettata l'ipotesi che la conformazione biologicamente attiva si ottenga solo nel complesso peptide-recettore, ed essendo quest'ultimo non noto nel caso specifico, gli studi CD che si intendono svolgere hanno semplicemente lo scopo di

investigare i conformeri dei vari peptidi presenti in soluzioni diverse: H<sub>2</sub>O, miscele H<sub>2</sub>O/2,2,2-trifluoroetano (TFE), soluzioni tampone di sodio fosfato a diversi pH fisiologici, soluzione micellare di sodiododecilsolfato (SDS) in tampone fosfato.

L'acqua e le soluzioni tampone si utilizzano per mimare, in una certa misura, il mezzo fisiologico in cui si trovano le proteine da cui derivano i peptidi; spesso, inoltre, individuare un conformero principale in un mezzo così competitivo nella formazione di legami ad idrogeno significa trovare una conformazione molto favorita da un punto di vista energetico.

I peptidi le cui sequenze derivano da proteine generalmente mostrano poca o nessuna propensione a strutturarsi in  $\alpha$ -elica in acqua ma possono essere indotti ad assumere questa conformazione utilizzando miscele H<sub>2</sub>O/TFE [136]. Nelson *et al.* [137] suggeriscono che la costante dielettrica del TFE, più debole di quella dell'acqua, comporta una diminuzione della formazione di legami idrogeno tra i protoni ammidici e le molecole di solvente che li circondano promuovendo in questo modo la formazione di legami idrogeno intramolecolari e quindi stabilizzando la struttura secondaria dei peptidi. Cammers-Goodwin *et al.* [138] hanno ipotizzato che la struttura  $\alpha$ -elicoidale è assunta preferenzialmente in presenza di TFE perchè è una conformazione compatta che massimizza i legami idrogeno intramolecolari e minimizza l'esposizione al solvente. Chiaramente, strutture intermolecolari di  $\beta$ -sheet, come quelle formate in gel proteici, possono raggiungere il medesimo risultato [139].

La soluzione micellare di SDS in tampone fosfato, infine, serve a mimare le condizioni all'interfaccia con una membrana biologica.

Per poter escludere la presenza di fenomeni di aggregazione all'aumentare della concentrazione, verranno infine eseguite misure CD a concentrazioni comprese tra  $5 \times 10^{-5}$  e  $10^{-3}$  M in H<sub>2</sub>O.

Gli studi FT-IR saranno condotti in soluzione al 10% D<sub>2</sub>O in TFE per poter confrontare i dati ottenuti con le misure NMR eseguite in soluzioni analoghe.

### ***Studi conformazionali dei peptidi auto-assemblanti***

I vari peptidi auto-assemblanti ionico-complementari sintetizzati nel corso del dottorato verranno sottoposti a studi conformazionali tramite CD nelle medesime condizioni adottate per i peptidi di adesione e i frammenti della BMP-2, ovvero sciolti nei seguenti solventi: H<sub>2</sub>O, miscele H<sub>2</sub>O/2,2,2-trifluoroetano (TFE), soluzioni tampone di sodio fosfato a

diversi pH fisiologici, soluzione micellare di sodiododecilsolfato (SDS) in tampone fosfato.

Inoltre, verranno eseguite delle misure alle condizioni suggerite per la formazione di membrane [127], ovvero nel seguente tampone: 150 mM NaCl / 10 mM sodio fosfato, pH 7.4.

Per poter studiare se esiste una correlazione tra fenomeni di aggregazione e aumento della concentrazione, verranno eseguite misure CD a concentrazioni comprese tra  $10^{-5}$  e  $10^{-3}$  M in H<sub>2</sub>O.

# ***METODI***





# SINTESI PEPTIDICA

## *Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)*

La tecnica SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis), messa a punto nel 1963 ad opera di Bruce Merrifield [140, 141], è attualmente il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica.

La sintesi di un peptide con tale tecnica richiede in genere 5 passaggi:

1. assemblaggio della catena;
2. sblocco dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
3. purificazione;
4. eventuali modifiche chimiche post-sintesi;
5. caratterizzazione.

La SPPS si basa sull'aggiunta sequenziale di residui amminoacidici, protetti in catena laterale e al gruppo  $\alpha$ -ammino, ad un supporto polimerico insolubile (resina) [142].

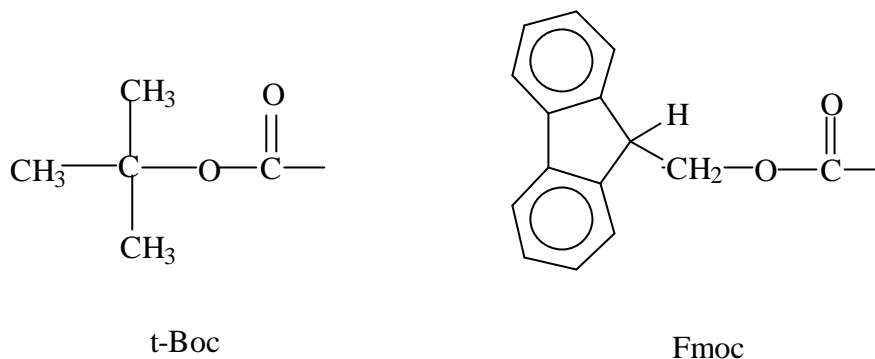
Il peptide è assemblato dall'estremità C-terminale a quella N-terminale con il gruppo  $\alpha$ -carbossilico dell'ultimo amminoacido della sequenza ancorato ad un supporto solido tramite un *linker*: si ha così la crescita della catena polimerica in fase eterogenea. L'ancoraggio ad una matrice insolubile costituisce il vantaggio principale di questa tecnica in quanto permette di condurre l'intera sintesi nello stesso contenitore (reattore); il peptide in crescita, infatti, può essere isolato dopo ogni passaggio dai reagenti in eccesso o da sottoprodotti solubili attraverso semplici lavaggi e filtrazioni. Questo comporta un minor spreco di materiale dovuto ad una minore manipolazione ed una sensibile riduzione dei tempi di lavoro in quanto la procedura può essere automatizzata. Con la sintesi su fase solida si possono ottenere catene peptidiche lunghe fino a 50 amminoacidi o più, cosa molto difficile in soluzione a causa della scarsa solubilità dei peptidi protetti in catena laterale.

In base alla scelta del *linker* per ancorare il peptide in crescita al supporto solido si può ottenere, in seguito allo sblocco (*cleavage*), un peptide acido o ammidico terminale.

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.

Come protezione del gruppo  $\alpha$ -ammino si può usare o il gruppo acido-labile *t*-Boc (chiamato più semplicemente Boc), ovvero *t*-butilossicarbonile, rimosso in genere con

TFA [143], o il gruppo base-labile Fmoc, 9-fluorenilmetilossicarbonile, rimosso in genere con piperidina [144, 145] (Fig. 11).



**Fig. 11:** Strutture dei gruppi N- $\alpha$  protettori denominati *t*-Boc e Fmoc.

Nelle condizioni di rimozione del gruppo N- $\alpha$  protettore, i gruppi protettori delle catene laterali devono risultare stabili; tale strategia va sotto il nome di protezione ortogonale.

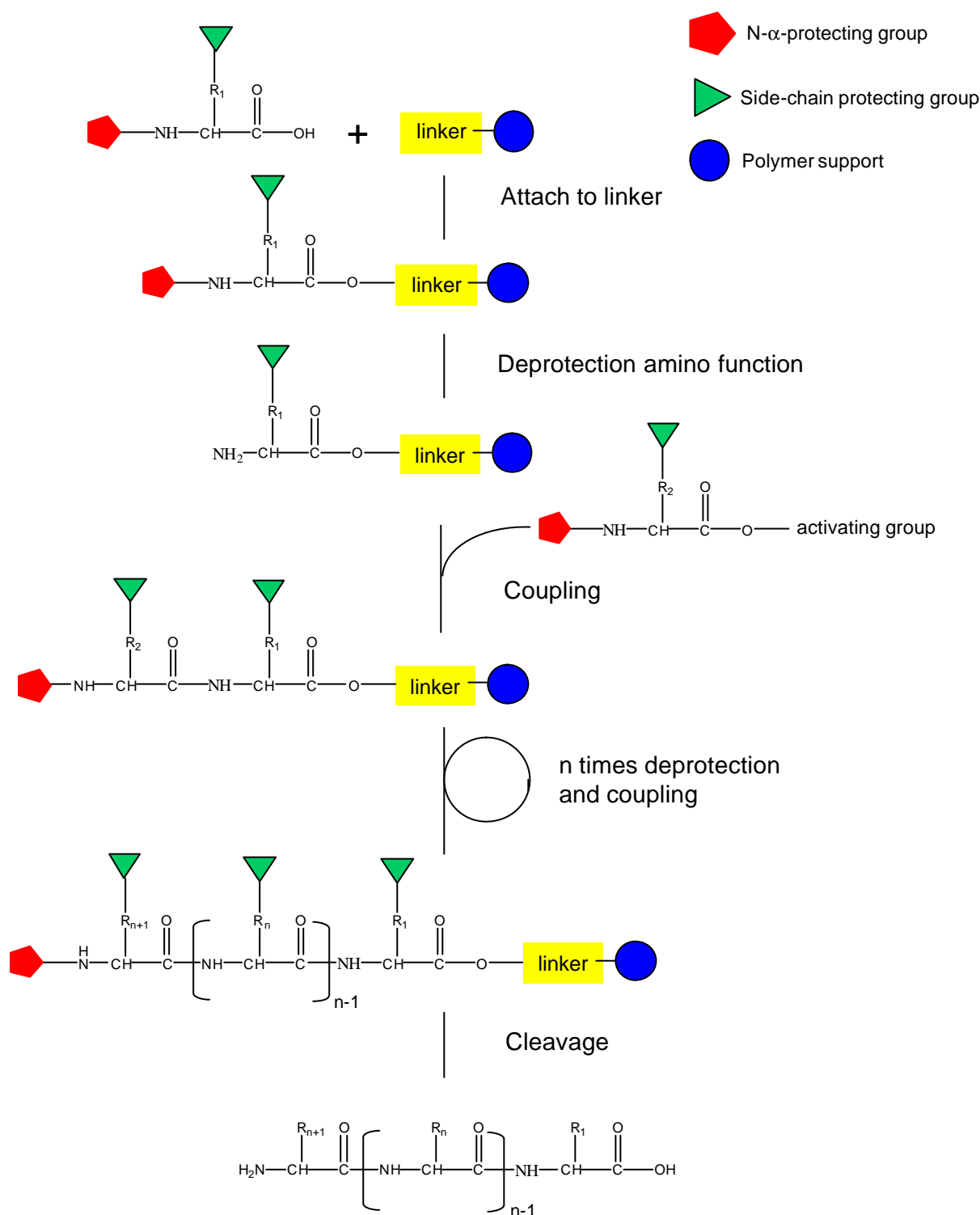
In genere, le protezioni in catena laterale sono scelte in modo che possano essere rimosse simultaneamente allo sblocco del peptide dalla resina, ma esistono anche vari gruppi protettori che possono essere rimossi in maniera selettiva nel caso si vogliano operare modifiche post-sintesi.

Dopo lo sblocco del gruppo protettore  $\alpha$ -amminico del residuo legato alla matrice insolubile, si effettua una reazione di condensazione tra il gruppo amminico appena deprotetto e la funzione  $\alpha$ -carbossilica attivata di un nuovo residuo, con formazione di un legame peptidico: l'assemblaggio della catena consiste perciò in una serie di deprotezioni e condensazioni o *coupling* (Fig. 12).

Lo sblocco finale del peptide dalla resina e la deprotezione delle catene laterali richiede in genere acidi forti: TFA nel caso della chimica Fmoc e HF in quello della chimica Boc.

Nel presente lavoro di dottorato si è scelto di sintetizzare i vari peptidi utilizzando la chimica Fmoc, in quanto la reazione di sblocco con TFA risulta molto più semplice e meno pericolosa rispetto allo sblocco con HF, ma nei casi in cui la tecnica Fmoc non ha fornito risultati apprezzabili si è utilizzata la chimica Boc.

Un limite della sintesi su fase solida è rappresentato dalla crescita di sequenze incomplete (mancanti di uno o più residui oppure troncate) oltre alla sequenza corretta che, in quanto simili al prodotto voluto, possono creare problemi nella fase di purificazione. Nel caso ci si aspetti una sintesi difficile è consigliabile monitorare le reazioni di *coupling* tramite test alla ninidrina (o Kaiser test).



**Fig. 12:** Schema generale della SPPS.

Più un peptide è lungo, maggiore è la necessità di ottenere rese elevate per le reazioni di *coupling* (nel presente lavoro di dottorato si sono considerate accettabili le rese superiori al 98%). Nel caso di una reazione di condensazione con rese non ottimali è possibile insistere eseguendo un secondo *coupling* con lo stesso amminoacido prima di sbloccare il gruppo

protettore al terminale  $\alpha$ -amminico del peptide in crescita (*coupling* doppio), oppure si possono utilizzare agenti condensanti diversi o aumentare i tempi di reazione.

### **Resine per la SPPS**

Le resine migliori per la sintesi peptidica sono quelle costituite da particelle di piccole dimensioni e scarsamente reticolate; tali resine permettono una rapida diffusione dei reagenti all'interno dei granuli e il loro notevole rigonfiamento permette di accomodare meglio le catene del peptide in crescita [142].

Come supporti solidi si utilizzano solitamente resine quali polistirene copolimerizzato all'1% con *m*-divinilbenzene o resine poliacrilammidiche, che possiedono la proprietà di rigonfiarsi abbondantemente in solventi polari non protici come DMF e NMP, fino a raggiungere un volume pari a 10 volte quello iniziale [142].

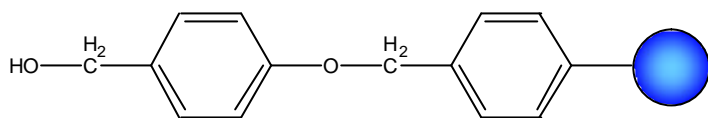
In commercio sono disponibili resine derivatizzate con un'ampia varietà di *linker* o già funzionalizzate con un amminoacido protetto al gruppo  $\alpha$ -amminico e in catena laterale se richiesto. In base alla tecnica che si vuole utilizzare (chimica Boc o Fmoc) e in base al tipo di peptide che si vuole ottenere (acido, estere o ammide terminale, protetto o meno in catena laterale, ecc...), si sceglierà la resina opportuna.

Nel presente lavoro di dottorato sono state utilizzate le seguenti resine (Fig. 13):

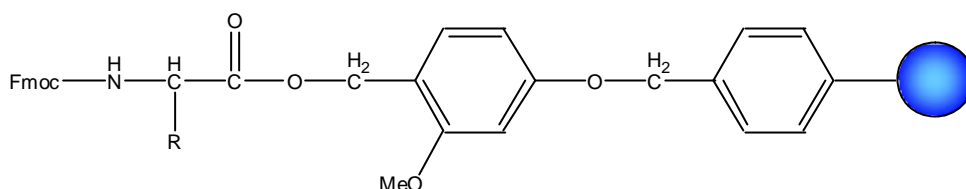
- per la chimica Fmoc:
  1. HMP Resin;
  2. Fmoc-Lys(Boc)-Wang Resin;
  3. Fmoc-Tyr(tBu)-Sasrin Resin;
  4. Fmoc-Phe-Sasrin Resin;
  5. Fmoc-Asp(OtBu)-Sasrin Resin;
  6. Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin Resin;
  7. Rink Amide MBHA Resin;
  8. Sieber Amide Resin;
- per la chimica Boc:
  9. N- $\alpha$ -Boc-Gly-Pam Resin.

La resina HMP, conosciuta anche come Wang Resin, permette di ottenere peptidi acidi dopo lo sblocco con una miscela al 95% di TFA, mentre la resina Rink Amide MBHA fornisce peptidi ammide-terminali.

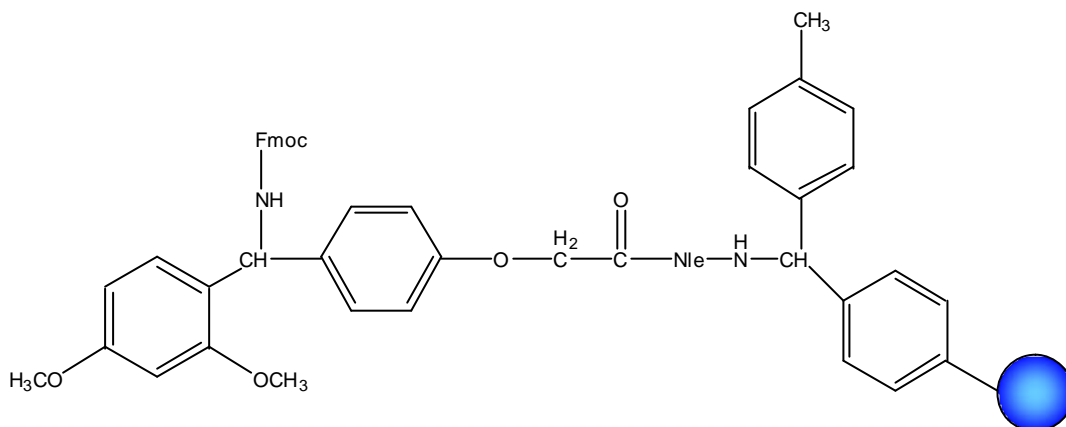
Resina HMP (o resina Wang): resina p-benzilossibenil alcool.



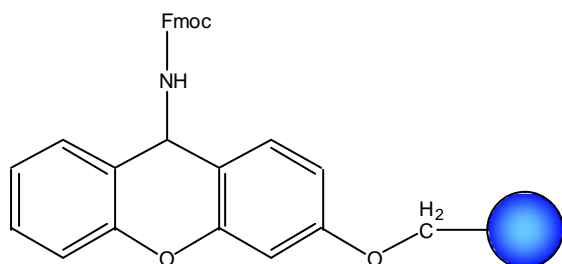
Amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto attaccato alla resina Sasrin.



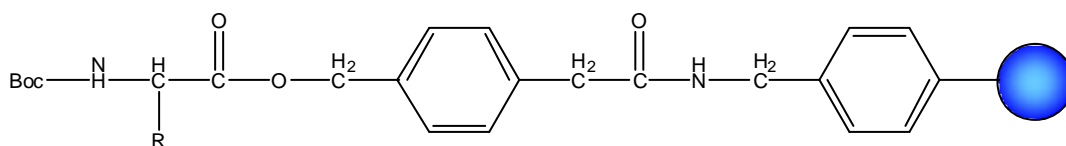
Resina Rink Amide MBHA: resina 4-(2',4'-dimetossifenil-Fmoc-amminometil)-fenossiacetamide-norleucil-4-metilbenzidrilamina.



Resina Sieber Amide: resina 9-Fmoc-ammino-xanten-3-ilossi-Merrifield.



Amminoacido N- $\alpha$ -Boc-protetto attaccato alla resina PAM.



**Fig 13:** Resine utilizzate nel presente lavoro di dottorato

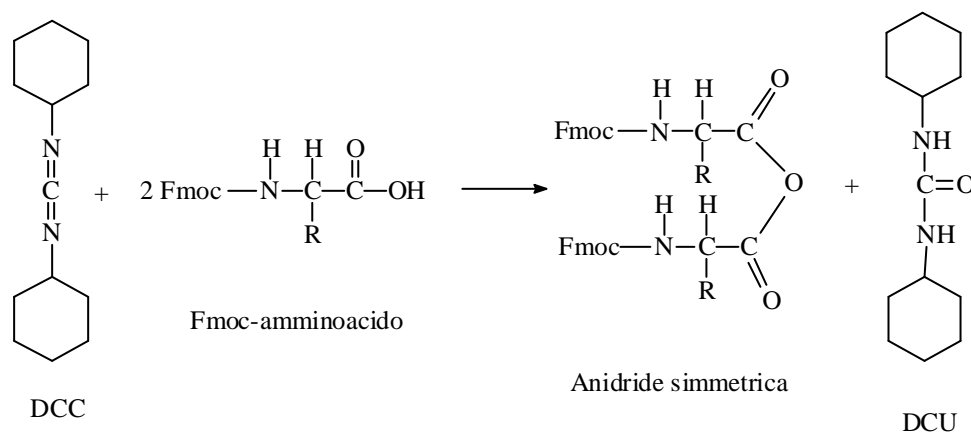
Le resine super acido-labili Sasrin, che presentano la stessa struttura delle resine HMP a parte l'aggiunta di un gruppo metossilico in posizione orto nell'anello benzilico, in seguito allo sblocco con miscele all'1% di TFA, danno peptidi con un gruppo carbossilico C-terminale e protetti in catena laterale, mentre la resina Sieber Amide, tramite la medesima procedura di sblocco, fornisce peptidi protetti in catena laterale ma amide-terminali. Tramite sblocco con HF, infine, è possibile ottenere peptidi con un gruppo carbossilico C-terminale sintetizzati a partire da resine PAM.

### Funzionalizzazione della resina HMP con l'amminoacido C-terminale

Nei casi in cui si utilizza la resina HMP non funzionalizzata con l'amminoacido C-terminale, si procede all'ancoraggio di quest'ultimo seguendo la procedura riportata nel manuale d'uso del sintetizzatore automatico.

Solitamente si usa un leggero eccesso di resina HMP per assicurare che una funzionalizzazione dei siti disponibili inferiore al 100% non impedisca di iniziare la sintesi con le richieste 0.25 mmoli di amminoacido legato al supporto (quantità prevista dal programma di sintesi denominato *Standard Scale* messo a punto per il sintetizzatore 431A Applied Biosystems).

Per la realizzazione del *coupling* il gruppo carbossilico dell'amminoacido deve essere attivato [146, 147]. A tale scopo, il metodo utilizzato nel presente lavoro di dottorato prevede la formazione di un'anidride simmetrica altamente reattiva a partire da DCC (N,N'-dicicloesilcarbodiimmide) e 2 equivalenti di Fmoc-amminoacido protetto in catena laterale [142] (Fig. 14).



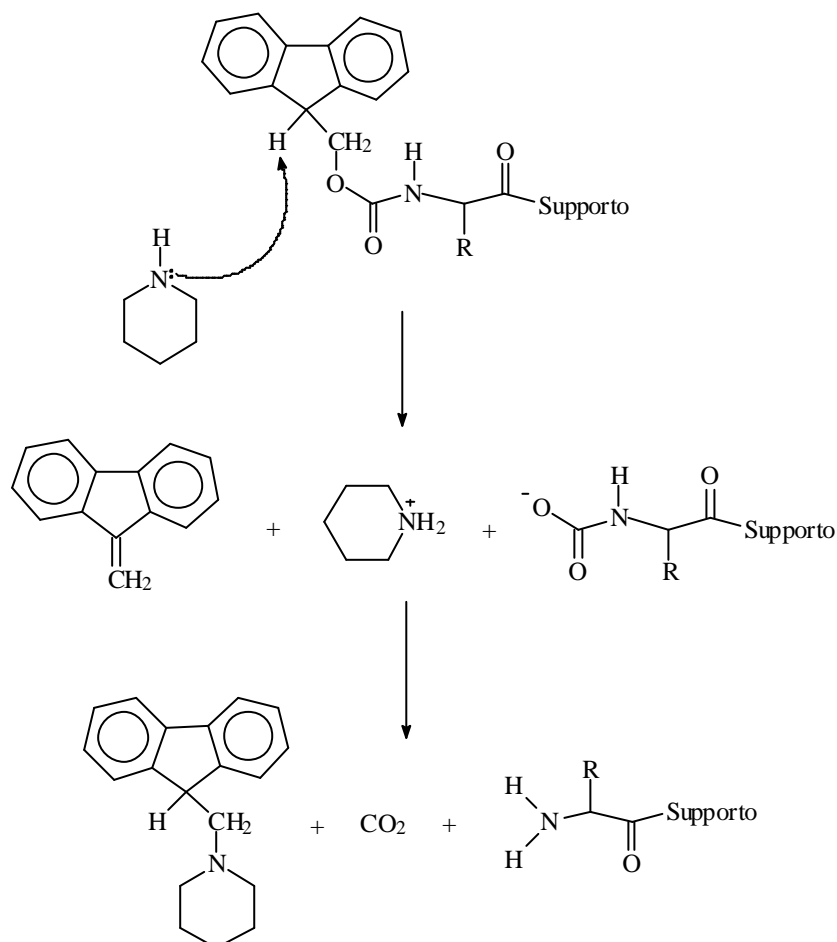
**Fig. 14:** Attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto tramite DCC via anidride simmetrica.

La dicicloesilurea (DCU) che si forma come sottoprodotto è un composto altamente insolubile che deve essere rimosso per filtrazione prima che l'anidride venga trasferita dal sito di attivazione al reattore contenente la resina.

La procedura *Standard Scale* prevede di far reagire la resina con 1 mmole di Fmoc-amminoacido protetto in catena laterale (ovvero 4 equivalenti) e la reazione è eseguita in doppio *coupling*, utilizzando come agente condensante una soluzione DCC/NMP 1 M e come catalizzatore 0.1 equivalenti di DMAP. La procedura è automatizzata.

### Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

La funzionalizzazione della resina con l'amminoacido protetto al terminale amminico ed in catena laterale viene stimata utilizzando la seguente procedura [142]: 4 ÷ 8 mg di resina funzionalizzata, seccata sotto vuoto per 1 ora, vengono accuratamente pesati e trattati con 0.5 mL di piperidina 20% 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 ( $\epsilon=7800$ ) (Fig. 15).





**Fig. 15:** Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

Dopo aver portato la miscela ad un volume finale (V) di 50 mL con DMF, si misura l'assorbanza della soluzione a 301 nm.

La sostituzione, espressa in mmol/g viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Sostituzione (mmoli/g)} = [A_{301} \times V \text{ (mL)}] / [7800 \times \text{wt (g)}]$$

dove wt indica il peso del campione di resina in grammi dopo che è stato seccato sotto vuoto.

### **Attivazione del gruppo $\alpha$ -carbossilico**

Prima del *coupling*, il gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -protetto deve essere attivato, cioè reso più elettrofilo.

Il gruppo attivante deve essere scelto con attenzione per raggiungere efficienze di *coupling* molto elevate ed allo stesso tempo evitare potenziali reazioni secondarie. Tra i vari possibili metodi di attivazione, i seguenti sono i più diffusi:

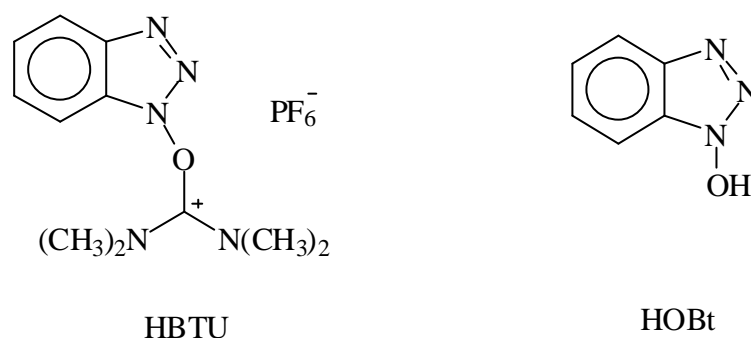
1. uso di un agente condensante (carbodiimmide): tra le più usate c'è la DCC che porta alla formazione di O-acilisourea; l'inconveniente principale quando si usa DCC è che si forma DCU durante l'attivazione, che è insolubile in DCM e NMP, e che deve essere separata e rimossa dal derivato amminoacidico attivato quando la soluzione è trasferita dal recipiente di attivazione a quello di reazione;
2. uso di anidridi simmetriche: usate soprattutto con la chimica Boc, sono altamente reattive e sono generate usando due equivalenti di amminoacido protetto ed un equivalente di DCC; un inconveniente nell'utilizzo di anidridi simmetriche è che la loro preparazione è piuttosto dispendiosa in quanto richiede l'utilizzo di 2 equivalenti di amminoacido per ottenere 1 equivalente di specie attivata che comunque deve essere utilizzata in eccesso rispetto alle moli di peptide su resina in crescita;
3. sintesi di esteri attivi: tra gli esteri attivi di amminoacidi protetti più utilizzati ci sono gli esteri di N-idrossibenzotriazolo che possono essere formati facilmente a partire da DCC e HOBt (1-idrossibenzotriazolo); questi esteri possono essere generati anche utilizzando altri agenti condensanti quali HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato), TBTU (2-(1H-

benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato), DIPCDI (diisopropilcarbodiimmide), BOP (benzotriazol-1-il-ossi-tris-(dimetilammino)-fosfonio esafluorofosfato) e PyBOP (benzotriazol-1-il-ossi-tris-pirrolidino-fosfonio esafluorofosfato) [148].

Nel presente lavoro di dottorato è stata utilizzata la procedura chiamata FastMoc, messa a punto dalla Applied Biosystems, per l'attivazione del gruppo carbossilico [149]. Questa strategia prevede l'utilizzo dell'agente condensante HBTU che viene dissolto in una soluzione di HOBt e DMF (Fig 16).

L'attivazione *in situ* con HBTU/HOBt è più veloce ed efficace rispetto all'attivazione con DCC, che prevede fasi di attivazione e condensazione separate [150, 151].

La procedura denominata *Standard Scale* prevede di iniziare la sintesi con 0.25 mmoli di resina e l'utilizzo di 4 equivalenti di amminoacido attivato per ogni mole di peptide in crescita su resina.



**Fig. 16:** Strutture dei reagenti denominati HBTU e HOBt.

La procedura automatizzata prevede la dissoluzione dello Fmoc-amminoacido da legare al peptide in crescita in una soluzione composta da 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 mmol 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* possono durare da 20 min a 2 ore. La procedura *FastMoc* standard prevede reazioni di *coupling* singolo della durata di 25 min.

Basse rese di *coupling* sembrano essere correlate ad una scarsa solvatazione del peptide su resina che potrebbe essere dovuta, ad esempio, a fenomeni di aggregazione del peptide protetto in crescita che bloccano le interazioni del terminale amminico deprotetto con

l'amminoacido attivato. Di conseguenza, in molti casi la sequenza peptidica influenza notevolmente l'efficienza del *coupling*.

Come accennato in precedenza, tra le strategie per aumentare la resa delle reazioni di *coupling* le più utilizzate prevedono di eseguire un secondo *coupling* con lo stesso amminoacido prima di sbloccare il gruppo protettore al terminale  $\alpha$ -amminico del peptide in crescita (*coupling* doppio), oppure si possono aumentare i tempi di reazione o utilizzare agenti condensanti diversi.

Nel presente lavoro di tesi di dottorato, nei casi in cui le reazioni di condensazione sono risultate inferiori al 98% anche in seguito a *coupling* doppio, si è deciso di insistere tramite *coupling* eseguito manualmente utilizzando come agenti condensanti HATU e HOAt. Questi reagenti, come riportato in letteratura [152-154], sono risultati essere più reattivi rispetto ad HBTU e HOBt ma essendo anche molto più costosi si è deciso di utilizzarli solo in caso di necessità.

La procedura di *coupling* eseguito manualmente prevede di trasferire il peptide in crescita su resina seccato dal reattore ad un pallone e di aggiungere 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto sciolta in 1.5 mL di NMP ed attivata con la seguente soluzione: 1 mmole di HOAt, 1 mmole di HATU e 0.32 mL di DIEA in 2 mL di DMF. La miscela viene lasciata reagire per 2 ore a temperatura ambiente e mescolando manualmente. Al termine, il peptide in crescita su resina è filtrato su gooch G3, lavato con NMP e DCM, seccato, e trasferito nuovamente nel reattore.

### Test alla ninidrina

Per valutare la percentuale di *coupling* dopo ogni ciclo di acilazione, si utilizza il Kaiser test o test alla ninidrina [155].

Un campione di resina, tra 2 e 8 mg, viene lavato con 3 aliquote di metanolo, la prima delle quali con aggiunta di 2-3 gocce di acido acetico (per evitare eventuali reazioni di sblocco dello Fmoc), seccato sotto vuoto per 1 ora e pesato accuratamente.

Il protocollo, successivamente, prevede:

- 1 - addizione in sequenza di: 75  $\mu$ L di Monitor 1, 100  $\mu$ L di Monitor 2 e 75  $\mu$ L di Monitor 3 (cfr. pag. 85);
- 2 - riscaldamento della miscela a bagnomaria a 100°C per 5 min;
- 3 - aggiunta di 4.8 mL di soluzione di etanolo al 60%;
- 4 - dopo centrifugazione, misura di assorbanza del liquido surnatante a 570 nm.

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

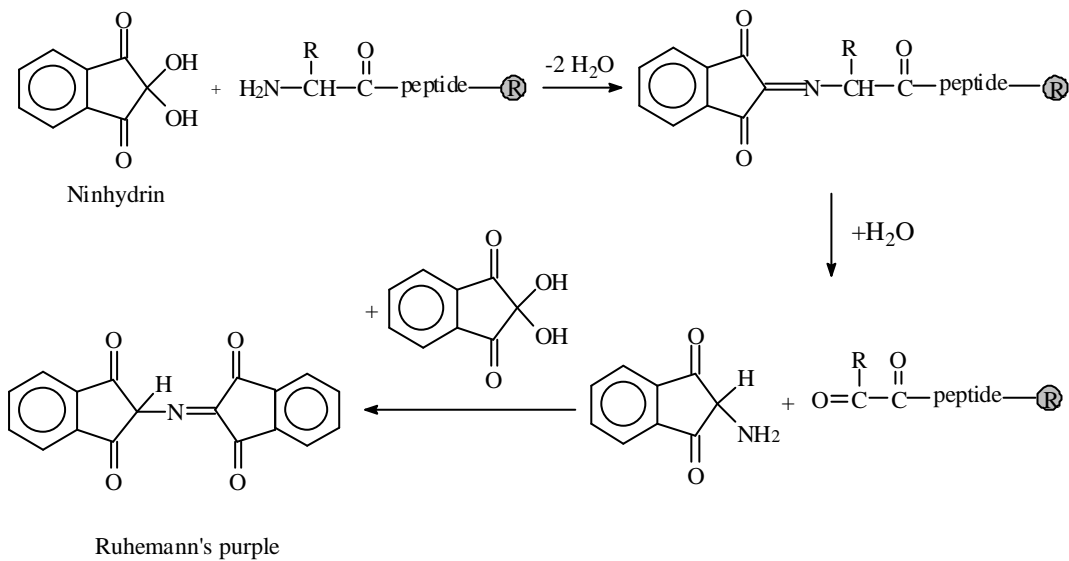
$$\mu\text{moli/g di gruppi amminici} = [A \times V \times 10^{-6}] / [\epsilon \times P]$$

dove A è il valore di assorbanza a 570 nm del campione meno il valore di assorbanza della soluzione di riferimento (75  $\mu\text{L}$  di Monitor 1, 100  $\mu\text{L}$  di Monitor 2 e 75  $\mu\text{L}$  di Monitor 3 in 4.8 mL di soluzione di etanolo al 60%); V è il volume del campione espresso in mL;  $\epsilon$  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:

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

La reazione attraverso la quale si ottiene il gruppo cromoforo che assorbe nel visibile è riportata in Fig. 17:



**Fig. 17:** Reazione della ninidrina con il residuo N-terminale del peptide in crescita.

Questo meccanismo di reazione è stato ipotizzato per le ammine primarie; la prolina, essendo un'ammina secondaria, reagisce con la ninidrina con formazione di un addotto diverso di colore giallo.

## 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 [156].

La deprotezione delle catene laterali genera specie altamente reattive (ad esempio carbocationi) che possono provocare modificazioni covalenti dei residui suscettibili. L'uso di reagenti nucleofili, noti come *scavengers* (reattivi che hanno proprietà chimiche simili a quelle delle specie da proteggere), assieme al TFA o all'HF durante lo sblocco, riduce grandemente le reazioni collaterali indesiderate [157-159].

La miscela di *scavengers* varia a seconda degli amminoacidi presenti nella sequenza e in base al tipo di gruppi protettori usati per le catene laterali.

Nel presente lavoro di tesi si sono utilizzate le seguenti protezioni in catena laterale per le sintesi con chimica Fmoc: Pmc per Arg, Trt per Asn, Gln e His, OtBu per Asp e Glu, Acn per Cys, Boc per Lys e *t*Bu per Ser, Thr e Tyr. Le protezioni usate per le sintesi con chimica Boc sono: Tos per Arg, Boc per His, 2-Cl-Z per Lys, Bzl per Ser, 2-Br-Z per Tyr; la Met è stata introdotta come solfossido.

Nel caso di sblocco dalla resina di peptidi sintetizzati con chimica Fmoc e contemporanea deprotezione delle catene laterali utilizzando TFA, sono possibili le seguenti reazioni secondarie indesiderate:

- lo sblocco con TFA dei gruppi *t*-Bu e *t*-Boc provoca la formazione di *t*-butil cationi e *t*-butil trifluoroacetati; queste specie sono responsabili della *t*-butilazione del gruppo tioetereo della Met e della posizione 3' della Tyr, seppur in misura molto limitata. Allo scopo di evitare queste reazioni collaterali si utilizzano come *scavengers* EDT, per i *t*-butiltrifluoroacetati, e H<sub>2</sub>O, per i cationi *t*-butilici;
- l'ossidazione catalizzata da acidi della Met al suo solfossido non avviene in presenza di tioanisolo nella miscela di sblocco;
- è stato dimostrato che il gruppo Pmc attacca il gruppo ε-amminico della Lys durante la reazione di acidolisi. Inoltre può O-solfonare le catene laterali di Ser e Tyr: ciò viene minimizzato se alla miscela di reazione vengono aggiunti EDT, H<sub>2</sub>O e tioanisolo. È anche stato sperimentalmente osservato che quest'ultimo accelera la deprotezione di Arg(Pmc) ad opera di TFA;
- il fenolo fornisce protezione da agenti elettrofili alla Tyr e al Trp.

Con i recenti progressi nelle tecnologie dei *linker* e dei gruppi protettori, l'uso di *scavengers* come l'EDT e il tioanisolo, composti tossici e maleodoranti, non è più necessario se non in situazioni particolari. La sostituzione di questi due *scavengers* con trialchilsilani, come ad esempio il TES (triethylsilano), si è rivelata efficace in un gran numero di casi [160].

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate entrambe le miscele di blocco.

Il tempo richiesto per la reazione di sblocco dipende soprattutto dalla natura e dal numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale e dalla scelta della miscela di sblocco.

Per quanto riguarda lo sblocco di peptidi sintetizzati con chimica Boc con contemporanea deprotezione delle catene laterali, il reagente più utilizzato è l'HF. L'HF anidro a temperatura ambiente è un gas estremamente tossico, corrosivo e volatile (b.p. 19°C) che richiede, per essere utilizzato, un apparato particolare, generalmente in Teflon, che può essere sigillato e delle opportune protezioni per l'operatore.

Lo sblocco con HF in genere richiede dai 30 ai 60 min e la reazione deve essere condotta ad una temperatura tra i - 5 e gli 0°C in cui l'HF risulta liquido. Peptidi contenenti Arg(Tos) possono richiedere tempi di reazione più lunghi.

Uno degli *scavengers* più utilizzati durante lo sblocco con HF è l'anisolo, che previene l'alchilazione del Trp ad opera dei cationi t-butile e benzile. In combinazione con il DMS (dimetilsolfuro) e il p-tiocresolo, l'anisolo previene l'alchilazione della Met e della Cys.

### Resine per chimica Fmoc: sblocco dal supporto e deprotezione delle catene laterali (Procedura di sblocco I)

Questa strategia è adatta allo sblocco da resine HMP (o Wang) e Rink Amide MBHA.

Conclusa la sintesi, si libera la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc (piperidina 20% in NMP) con procedura automatizzata. Al peptide su resina, seccato per almeno 2 ore sotto vuoto (fino a peso costante) e trasferito dal reattore in un pallone, si aggiunge una miscela di sblocco che dipende dagli amminoacidi presenti nella sequenza e dalle protezioni in catena laterale utilizzate; nel presente lavoro di dottorato sono state utilizzate le due seguenti miscele di sblocco:

- miscela 1: 0.75 g di fenolo (se sono presenti Tyr o Trp), 0.25 mL di EDT, 0.5 mL di tioanisolo, 0.5 mL di H<sub>2</sub>O e 10 mL di TFA;
- miscela 2: 0.75 g di fenolo (se sono presenti Tyr o Trp), 0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL di TFA.

La miscela viene mantenuta sotto 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));

La resina viene eliminata tramite filtrazione con gooch G3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a piccolo volume in rotavapor. Il peptide, in seguito all'aggiunta di etere dietilico freddo (~ 4°C), compare sottoforma di precipitato bianco che viene successivamente filtrato con gooch G4 e seccato.

*Resine per chimica Fmoc super acido-labili: sblocco dal supporto senza deprotezione delle catene laterali (Procedura di sblocco II)*

Questa procedura è adatta allo sblocco da resine Sasrin e Sieber Amide di peptidi protetti in catena laterale.

Conclusa la sintesi, si libera la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc con procedura automatizzata. Nel caso si voglia far reagire la funzione C-terminale del peptide lasciando protetto il terminale amminico, è possibile sbloccare il gruppo Fmoc in un secondo momento prima di rimuovere le protezioni in catena laterale.

Il peptide su resina, seccato per almeno 2 ore sotto vuoto (fino a costanza di peso), viene trasferito dal reattore in un *beaker* e il peptide protetto in catena laterale viene sbloccato dalla resina nel seguente modo:

1. si aggiungono 20 mL di soluzione all'1% di TFA in DCM al *beaker* contenente il peptide su resina e si mescola manualmente per 15 min;
2. si filtra la resina con gooch G3 e si fa gocciolare la soluzione in cui è disciolto il peptide protetto in un pallone contenente 5 mL di DMF fredda (~ 4°C);
3. si concentra la soluzione a piccolo volume (1-2 mL) in rotavapor;
4. si fa precipitare il peptide protetto con H<sub>2</sub>O fredda (~ 4°C) e lo si filtra con gooch G4;
5. si ritrasferisce la resina, con eventualmente altro peptide attaccato, dal gooch G3 al *beaker* e si ripetono i passaggi da 1 a 4;
6. si ripete il passaggio 5 finché al passaggio 4 non si forma più nuovo precipitato;
7. si mette a seccare sotto vuoto il precipitato in presenza di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e KOH che servono rispettivamente a disidratare il peptide protetto e a neutralizzare l'eventuale acido ancora presente.

Per rimuovere i gruppi protettori in catena laterale si utilizza la *Procedura di sblocco I*, evitando ovviamente il passaggio di rimozione della resina per filtrazione.





come nel caso dello sblocco con TFA, varia a seconda delle protezioni presenti in catena laterale: in genere la reazione si può considerare conclusa dopo 30-60 min ma se sono presenti molte Arg(Tos) nella sequenza, per esempio, possono essere necessari tempi più lunghi. Al termine della reazione, l'acido è allontanato facendolo evaporare; per far questo si utilizza un flusso di azoto e si mantiene la temperatura tra i - 5 e gli 0°C.

Per trasferire il peptide e la resina dal reattore e allontanare gli *scavengers*, si aggiunge etere dietilico freddo e si filtra la miscela con gooch G4. Dopo aver seccato la resina ed il peptide precipitato, si trasferiscono in un *beaker* contenente 30 mL di una soluzione al 30% AcOH in H<sub>2</sub>O e si mescola per 15 min (I estrazione). Si rimuove la resina tramite filtrazione con il gooch G4 usato in precedenza e la si sottopone ad una seconda estrazione, sempre per 15 min, con una soluzione al 50% AcOH in H<sub>2</sub>O. Si rimuove nuovamente la resina tramite filtrazione e si liofilizzano le soluzioni derivate dalle 2 estrazioni contenenti il peptide grezzo.

## **Purificazione**

La purificazione dei vari peptidi sintetizzati durante il dottorato è stata realizzata utilizzando la tecnica cromatografica RP-HPLC (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography).

Il termine cromatografia riunisce un gruppo di importanti e differenti metodi in grado di separare componenti assai simili da miscele complesse.

Il campione viene sciolto in una fase mobile (gas, liquido o fluido supercritico), che viene poi fatta passare attraverso una fase stazionaria immiscibile. Quei componenti che vengono maggiormente trattenuti dalla fase stazionaria si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile, mentre quelli debolmente trattenuti si muovono più rapidamente. 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 planare.

Un'evoluzione della cromatografia liquida classica è l'HPLC in cui si utilizzano colonne riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli 3-10  $\mu\text{m}$ ), lunghe tra i 10 e i 30 cm e con diametro interno tra i 3.9 e gli 8.0 mm. La quantità di prodotto che può essere purificata dipende dalle dimensioni della colonna e dalle specifiche del riempimento.

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. Poiché tale modifica comporta una drastica riduzione del flusso della fase mobile e un insostenibile aumento dei tempi di separazione, la tecnica richiede 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 la facilità con cui si adatta a separazioni quantitative accurate, in particolare di specie non volatili termicamente labili (ad es. peptidi) [161].

La RP-HPLC è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari: nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate 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 (in genere acetonitrile).

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. Nel secondo caso, un aumento graduale della concentrazione di acetonitrile rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente desorbimento dell'analita ad una data percentuale di acetonitrile e successiva eluizione.

In genere, i peptidi sono separati meglio in ambiente acido, conseguentemente la maggior parte delle fasi mobili contengono basse concentrazioni di acido TFA (0.05% nel caso degli eluenti usati durante il dottorato) il quale agisce come coppia ionica incrementando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria; tale composto, inoltre, non assorbe nella regione UV utilizzata per la rivelazione ed è facilmente rimosso.

La composizione della fase mobile, in genere, influenza maggiormente la separazione rispetto al tipo di fase stazionaria legata utilizzata.

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 ( $\lambda$ ) a 214 nm, ovvero in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico.

## ***Caratterizzazione***

### **Elettroforesi capillare**

L'elettroforesi (*Capillary Electrophoresis*, CE) [162] è una tecnica analitica che sfrutta le diverse velocità di migrazione di molecole cariche all'interno di un campo elettrico.

L'elettroforesi capillare può essere impiegata per separare un'ampia gamma di composti biologici come amminoacidi, peptidi, proteine ed acidi nucleici, così come qualsiasi altro tipo di composto organico contenente gruppi ionizzabili e solubile in tampone acquoso.

La tecnica prevede l'utilizzo di un capillare in silice fusa, con un diametro interno tra 25 e 100  $\mu\text{m}$  e contenente un tampone appropriato, le cui estremità pescano in due serbatoi separati, contenenti due elettrodi responsabili della generazione del campo elettrico. La CE presenta notevoli vantaggi rispetto all'elettroforesi tradizionale: l'uso di tubi capillari minimizza infatti i problemi derivanti dallo sviluppo di calore causato dal moto delle particelle cariche quando sono poste su un gel.

Il diametro ridotto del capillare fa in modo che sia molto alto il rapporto tra la superficie e il volume del capillare e ciò aumenta considerevolmente la dissipazione del calore con conseguente eliminazione sia dei moti convettivi all'interno del capillare che della dispersione dei campioni per effetto della diffusione. Non è quindi necessario includere all'interno del capillare un mezzo di supporto stabilizzante ed è così possibile fare l'elettroforesi in fase libera.

Alte efficienze di separazione sono ottenute utilizzando campi elettrici elevati; la lunghezza del capillare non influisce sull'efficienza del processo ma gioca un ruolo importante nel tempo di migrazione e, quindi, sulla durata dell'analisi. Comunemente si utilizzano potenziali compresi tra 15 e 30 kV con capillari di 50-100 cm di lunghezza.

Sperimentalmente si procede introducendo una piccola quantità di soluzione del campione (solitamente 5-30 nL contenenti poche femtomoli di prodotto) dall'estremità anodica di un capillare in silice fusa contenente un tampone adatto al composto che si vuole analizzare; i

campioni analizzati nel presente lavoro di dottorato sono stati introdotti tramite iniezione sotto vuoto.

Per la separazione della miscela nei suoi componenti viene applicata una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare per cui le molecole del campione, con carica positiva o negativa, cominciano a migrare con velocità differenti. La mobilità elettroforetica è funzione sia della carica che delle dimensioni delle particelle e quindi, dato che la carica dipende dal numero di gruppi ionizzabili presenti nella molecola e dal loro grado di ionizzazione, è legata al pH del tampone utilizzato. La differenza di potenziale provoca, inoltre, il movimento delle molecole della soluzione tampone con carica positiva verso l'elettrodo di carica opposta. La differenza di potenziale ha quindi un doppio effetto sul moto dei componenti di una miscela: gli analiti sono separati in base alle diverse velocità di migrazione elettroforetica ed allo stesso tempo essi vengono spinti verso il catodo per il fenomeno dell'elettroosmosi del tampone. Essendo la velocità del flusso elettroosmotico molto maggiore della velocità di migrazione degli analiti, tutti gli ioni, indipendentemente dalla loro carica, si spostano verso il catodo. Le molecole con carica positiva raggiungono il catodo più velocemente perché la migrazione elettroforetica e il flusso elettroosmotico sono diretti verso la stessa direzione e, quindi, si sommano; le molecole neutre si muovono alla stessa velocità del flusso elettroosmotico, mentre gli ioni negativi si muovono più lentamente in quanto la migrazione elettroforetica e il flusso elettroosmotico sono diretti in direzioni opposte e, quindi, si sottraggono.

In vicinanza del catodo le molecole attraversano una finestra dove è situato un rivelatore costituito, nel presente lavoro di tesi, da uno spettrofotometro UV a lunghezza d'onda variabile.

In media una separazione impiega dai 10 ai 30 minuti.

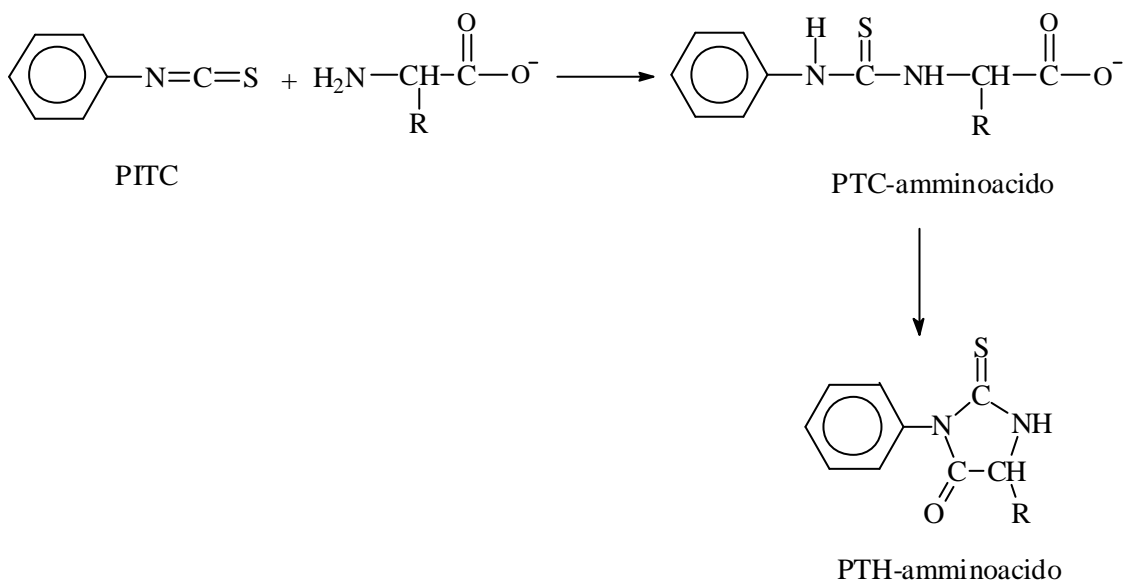
### **Analisi amminoacidica**

Un campione di peptide da analizzare viene innanzitutto idrolizzato come segue: ~ 3 nmoli di peptide vengono trasferite in una provetta e vengono fatte reagire, in un reattore di reazione sigillato in atmosfera di azoto e contenente 250 µL di HCl 6 N e 1-2 cristalli di fenolo nel caso siano presenti Tyr o Trp nella sequenza, alla temperatura di 110°C e per 24 ore (procedura Pico Tag messa a punto per la Pico Tag Work Station della Waters). Le provette utilizzate per i campioni e il reattore di reazione vanno preventivamente lavati con una miscela 1:1 di HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sciacquati abbondantemente con H<sub>2</sub>O MilliQ, EtOH e

seccati sotto vuoto. Su tale campione e, parallelamente, su 5  $\mu\text{L}$  di soluzione standard di amminoacidi della Pierce (2500 mmoli/mL) si opera come segue:

1. si portano a secco le soluzioni;
2. si aggiungono 20  $\mu\text{L}$  di soluzione redry (metanolo,  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, TEA, in rapporto (v:v:v) 2:2:1);
3. si portano a secco le soluzioni;
4. si derivatizzano gli amminoacidi con 20  $\mu\text{L}$  di una soluzione contenente metanolo,  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, TEA, PITC in rapporto (v:v:v:v) 7:1:1:1 per 10 min esatti;
5. si portano a secco le soluzioni;
6. si aggiungono 30  $\mu\text{L}$  di metanolo e si portano nuovamente a secco i campioni;
7. si aggiungono 400  $\mu\text{L}$  di diluente PicoTag allo standard mentre per i campioni se ne impiegano 250  $\mu\text{L}$ ;
8. si sonicano i campioni per 2 min;
9. si filtrano le soluzioni.

La metodica descritta permette di funzionalizzare ciascun residuo con il PITC ottenendo così un derivato, un PTH-amminoacido (feniltioindantoin derivato), (Fig. 19) facilmente rilevabile a 254 nm e adatto ad essere separato per via cromatografica su colonna a fase inversa.



**Fig. 19:** Reazione tra PITC e un amminoacido generico.

L'analisi cromatografica è stata condotta, nel presente lavoro di dottorato, utilizzando una colonna Pico Tag ( $3.9 \times 300$  mm) mantenuta a temperatura costante di  $46^\circ\text{C}$ , eluenti A e B per il sistema Pico Tag (cft. pag. 87), flusso 1 mL/min e il seguente gradiente binario: 100% di A per 1 min, dallo 0% di B su A al 46% di B in 20 min, dal 46% al 100% di B in 1 min, 100% di B per 5 min; lettura dell'assorbanza a 254 nm.

L'integrazione dei picchi cromatografici degli standard ha permesso la formulazione di rette di taratura per ciascun feniltiocarbamilamminoacido e quindi la quantificazione del contenuto amminoacidico del campione. Questa analisi permette di quantificare la concentrazione esatta di un peptide in soluzione in quanto il valore di concentrazione calcolato a partire dalla quantità pesata di peptide non tiene conto della percentuale di acqua che rimane nel prodotto in seguito a liofilizzazione.

### **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 sconosciuti, anche avendone a disposizione quantità estremamente esigue.

Una molecola, per poter essere misurata dallo spettrometro di massa, deve essere prima ionizzata. 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:

1. una camera di ionizzazione (S);
2. un analizzatore (A);
3. un rivelatore (R).

Il campione non è necessario che sia 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; 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).

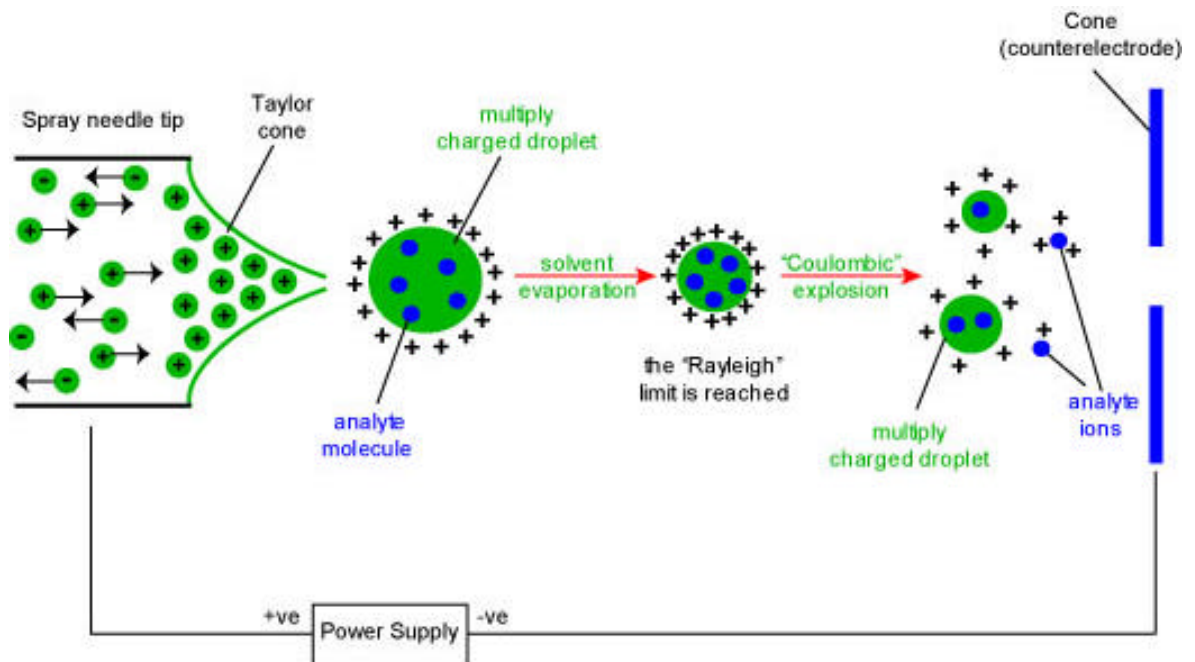
Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, oppure ad opera di una elevata differenza di potenziale, a seconda della tecnica di ionizzazione utilizzata. Alcune tecniche di

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 (*source*) 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 in un caso uno strumento MALDI-TOF. La tecnica di ionizzazione ESI (Electrospray Ionization) [163] utilizza un gas inerte (di solito azoto) per favorire un 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'ES 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 (Fig. 20).



**Fig. 20:** Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione che avviene in una sorgente ES.

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 termicamente labili. Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della crescente densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina “scoppia” creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l’analizzatore. Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di specie multicarica.

La tecnica di ionizzazione MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [164] può essere considerata l’evoluzione della tecnica FAB (Fast Atom Bombardment): il campione è immerso in un largo eccesso di matrice, come nella tecnica FAB, 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). In genere questa tecnica di ionizzazione è associata ad un analizzatore TOF (Time of Flight).

Il principio su cui si basa l’analizzatore a tempo di volo (TOF) è 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 funzionano 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.

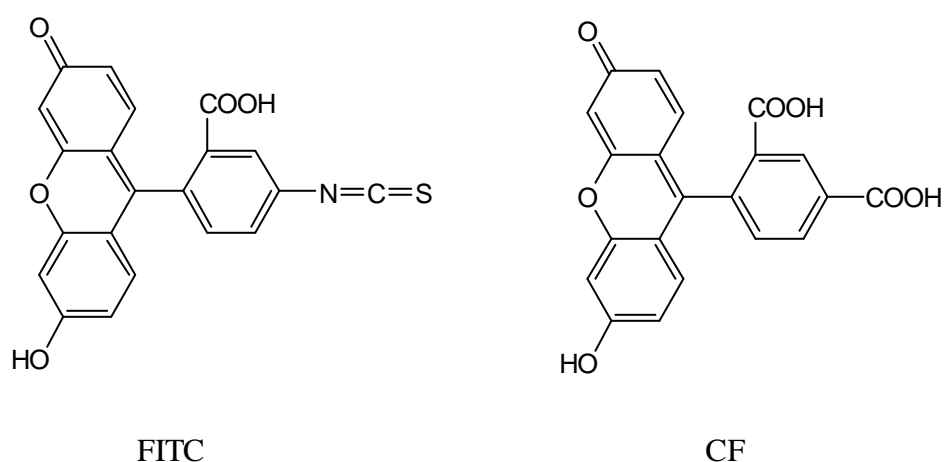
Lo spettrometro “consegna” i risultati sotto forma di uno spettro di massa, cioè di una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di  $m/z$



mentre sull'asse delle Y sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. L'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.

### ***Funzionalizzazione con fluoresceina***

Per legare selettivamente al terminale amminico di alcuni dei peptidi sintetizzati il gruppo fluoroforo fluoresceina, in previsione di studi sul grado di funzionalizzazione di matrici o sulla velocità di rilascio del peptide bioattivo da *coating* di differente composizione, si sono tentate due differenti strategie che impiegano due diversi derivati della fluoresceina: il FITC (fluorescein-5-isotiocianato) e la CF (5-carbossifluoresceina) (Fig. 21) [165].

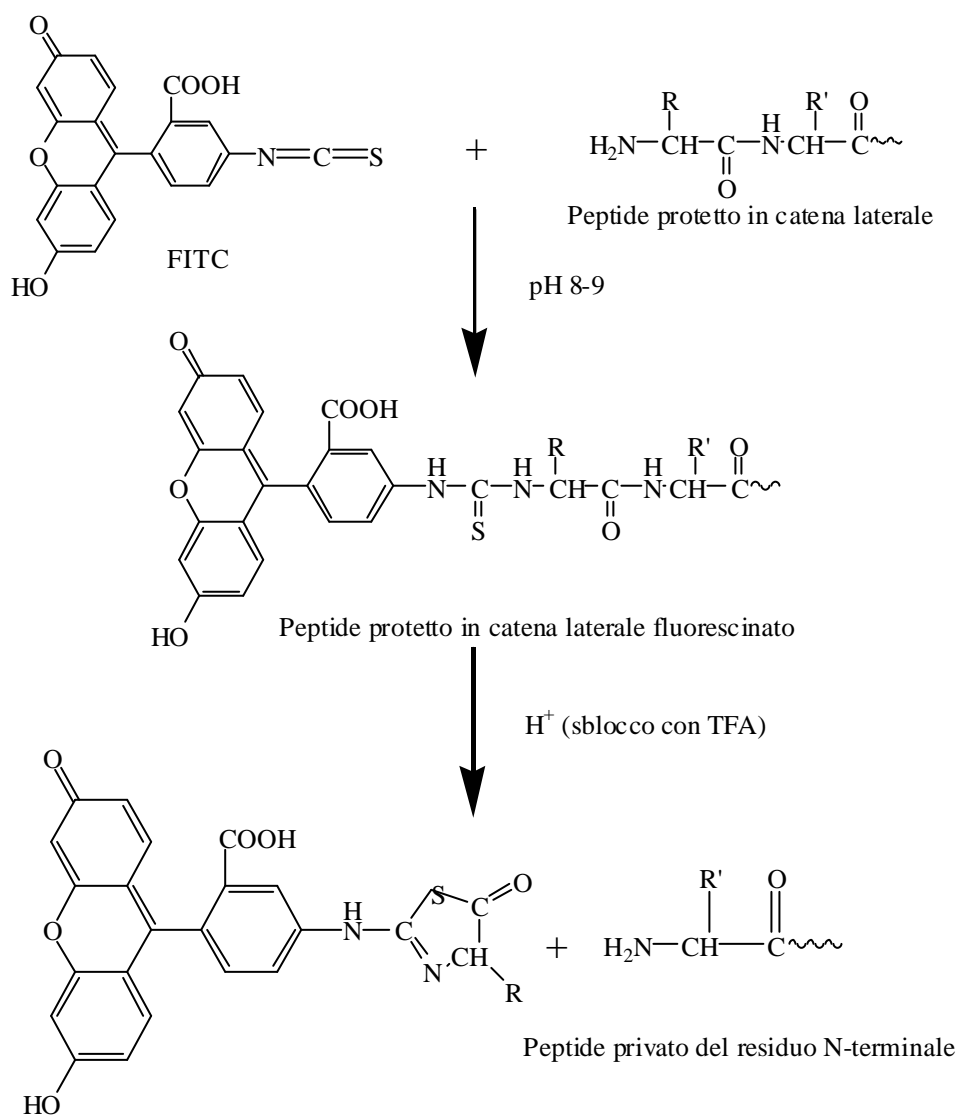


**Fig. 21:** Struttura del FITC e della CF.

I composti contenenti fluoresceina sono caratterizzati da un massimo di assorbimento poco sopra i 490 nm, con un coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) intorno ai  $77\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ , e da

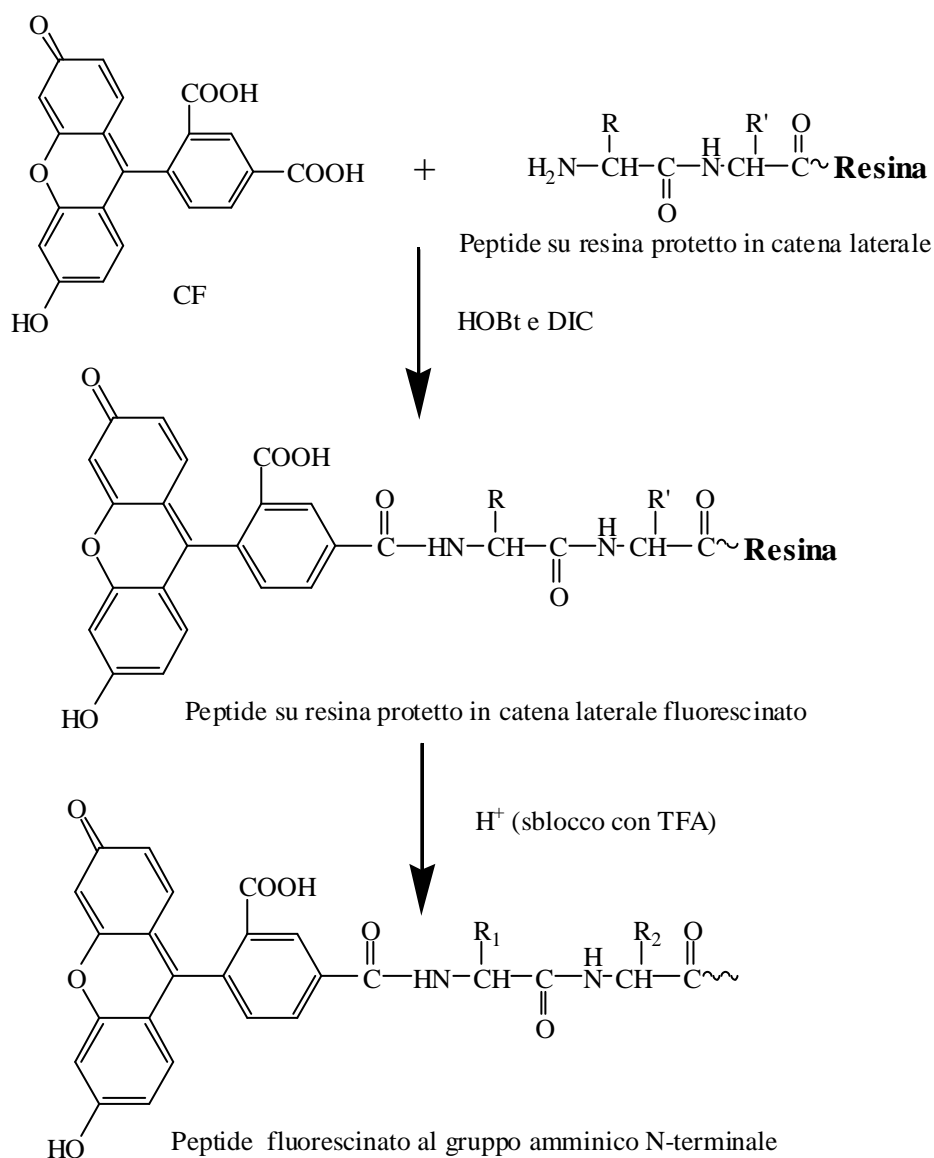
un massimo di emissione di fluorescenza ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) corrispondente a 520 nm circa.

La prima strategia di sintesi prevede l'attacco del gruppo fluoroforo fluoresceina ai vari peptidi grezzi protetti in catena laterale utilizzando come reagente di partenza il FITC in largo eccesso (25-26 equivalenti) e in ambiente tamponato a pH 9.0 (Fig. 22). Questa procedura si è rivelata inadatta all'utilizzo per la funzionalizzazione del terminale amminico in quanto il successivo sblocco dei gruppi protettori in catena laterale con una soluzione al 95% di TFA ha comportato il contemporaneo distacco del residuo N-terminale, a cui si era legato il FITC, con un meccanismo analogo alla degradazione di Edman.



**Fig. 22:** Reazione di funzionalizzazione con fluoresceina utilizzando FITC.

Si è allora deciso di usare, quale reagente alternativo, la CF (5-carbossifluoresceina) (Fig. 23). In particolare, la reazione di fluorescinazione è avvenuta aggiungendo a 5-10  $\mu\text{mol}$  di peptide su resina protetto in catena laterale 10 equivalenti dei seguenti composti: CF; HOBt (1-idrossibenzotriazolo) e DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimmide) sciolti in 100-200  $\mu\text{L}$  DMF (dimetilformammide) in modo da ottenere una soluzione 0.5 M CF/HOBt/DIC in DMF. La miscela di reazione è stata lasciata reagire per 1 ora a  $25^\circ\text{C}$  e mescolando ad intervalli tramite sonicazione. Al termine della reazione il peptide su resina fluorescinato al terminale amminico e protetto in catena laterale è stato filtrato con gooch G3 e lavato con DMF e DCM. A questo punto il peptide fluorescinato è stato sbloccato dalla resina e dalle protezioni in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela di sblocco 2.



**Fig. 23:** Reazione di funzionalizzazione con fluoresceina utilizzando CF.

La purificazione e caratterizzazione dei peptidi fluorescinati sono state condotte in maniera analoga a quanto fatto per gli altri peptidi sintetizzati durante il dottorato. Questa seconda strategia di sintesi ha permesso di ottenere i vari peptidi fluorescinati con rese quasi quantitative, in tempi più brevi, non essendo necessario sbloccare la resina e le protezioni in catena laterale in tempi diversi, e con una spesa inferiore, dato che la CF costa meno di un centesimo del FITC.

## STUDI CONFORMAZIONALI

### Dicroismo circolare (CD)

Il CD può essere considerato un caso particolare di spettroscopia di assorbimento elettronico nella zona della radiazione UV-visibile e viene utilizzato ai fini dello studio delle conformazioni assunte dalle macromolecole in soluzione [166].

Questa tecnica è legata alla proprietà delle molecole asimmetriche di interagire con la luce polarizzata.

La luce planarmente polarizzata si può scomporre in due componenti, polarizzata circolarmente sinistra (L) e destra (R), aventi la stessa lunghezza d'onda, fase e ampiezza ma opposto senso di rotazione.

Le due componenti attraversano un mezzo otticamente attivo con velocità  $v_L$  e  $v_R$  diverse, dovute ai differenti indici di rifrazione,  $n_L$  e  $n_R$ ; di conseguenza, uscendo sfasate, si verifica una rotazione del piano di polarizzazione, dando origine al fenomeno della rotazione ottica. Il potere rotatorio  $\Phi$  misura l'angolo di rotazione del piano di polarizzazione della radiazione emergente rispetto a quello della radiazione incidente, secondo la relazione:

$$\Phi = 180 \times l \times [(n_L - n_R) / \lambda]$$

dove  $l$  è il cammino ottico e  $n_L - n_R$  è la birifrangenza circolare.

La dispersione ottica rotatoria, ORD, è la variazione della rotazione ottica  $\Phi$  in funzione della lunghezza d'onda  $\lambda$ , per effetto della birifrangenza circolare.

Assorbimenti  $A_L$  e  $A_R$  diversi (se presenti), relativi alle due componenti della luce piano polarizzata, escono da un mezzo otticamente attivo con diversa ampiezza: ciò è imputabile ai differenti coefficienti di estinzione molare,  $\epsilon_L$  e  $\epsilon_R$ . Ricombinate, le due componenti

circolarmente polarizzate destra e sinistra danno luogo ad una radiazione polarizzata ellitticamente.

L'angolo la cui tangente è il rapporto fra l'asse minore (a) e quello maggiore (b) dell'ellisse è l'ellitticità  $\theta$ :

$$\theta = \text{arctg} (a / b)$$

$\theta$  è legato alla differenza delle assorbanze  $A_L$  e  $A_R$  secondo la relazione:

$$\theta = 2.303 \times (180 / 4\pi) \times (A_L - A_R) = 33 \times \Delta A$$

Variando la lunghezza d'onda  $\lambda$  varia anche  $\Delta A$ . Il dicroismo circolare studia quindi la variazione di ellitticità  $\theta$  in funzione della lunghezza d'onda  $\lambda$ .

Per meglio confrontare campioni diversi per concentrazione e cammino ottico, è stata introdotta la seguente grandezza molare:

$$[\theta] = \theta / (C \times l) = 33 \times \Delta \epsilon$$

dove C è la concentrazione molare della soluzione contenente il campione. Tuttavia  $[\theta]$  è tradizionalmente espresso in un sottomultiplo:

$$[\theta] = 3300 \times \Delta \epsilon$$

In particolare, per peptidi e proteine si parla di ellitticità molare per residuo:

$$[\theta]_R = [\theta] / (n^\circ \text{residui} - 1)$$

dove con  $n^\circ \text{residui} - 1$  si intende il numero di cromofori presenti nella molecola in assenza di altri gruppi CD visibili, ovvero il numero di legami peptidici.

Perché un composto presenti attività chirottica, e sia quindi CD attivo, si devono verificare due condizioni:

1. il composto deve possedere cromofori in grado di assorbire determinate  $\lambda$ ;
2. i cromofori devono essere chirali, o intrinsecamente (asimmetria configurazionale), o per induzione da centri asimmetrici vicini, o per asimmetria conformazionale (elicoidale).

La spettroscopia CD è stata estensivamente applicata alla caratterizzazione strutturale di peptidi e proteine.

Sia il gruppo peptidico che gli anelli aromatici dei residui Trp, Tyr e Phe sono cromofori planari simmetrici, e quindi achirali, che diventano otticamente attivi per induzione

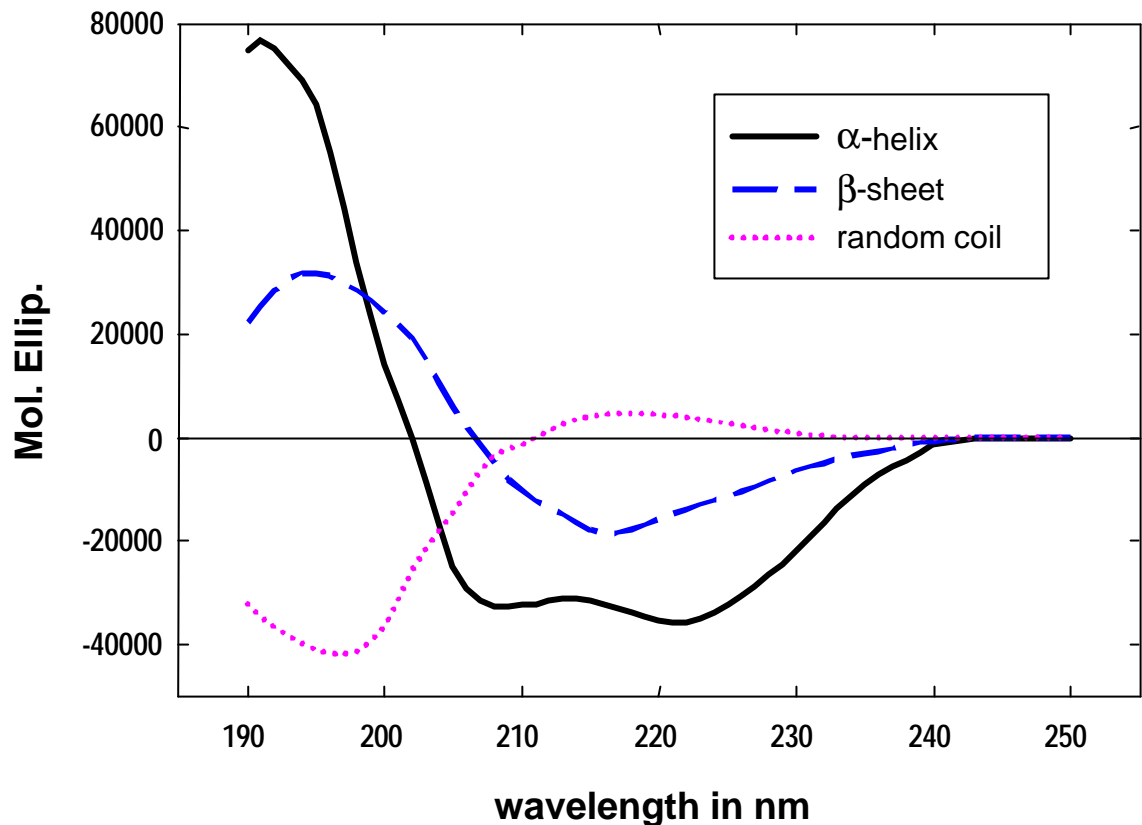
asimmetrica sia da parte dei carboni  $C_{\alpha}$  di ciascun residuo, sia da parte della struttura secondaria chirale della catena polipeptidica. L'importanza della spettroscopia CD per studi conformazionali sta nel fatto che le proprietà ottiche rotatorie sono estremamente sensibili alla geometria molecolare: differenti conformazioni di catene polipeptidiche danno luogo a differenti modi di accoppiamento dei momenti di transizione dei gruppi cromofori presenti, con effetti vistosi sugli spettri CD.

Le applicazioni del CD per gli studi conformazionali di peptidi (o proteine) possono essere raggruppate in:

- 1) monitoraggio delle variazioni conformazionali (dovute ad esempio a denaturazione della proteina o del peptide, interazione con un substrato, variazioni di solvente, pH o temperatura, ecc.);
- 2) stima del contenuto di strutture secondarie.

Il metodo più diretto per analizzare lo spettro CD di una proteina in termini di struttura secondaria è quello di interpolarlo (*fitting*) con una combinazione di spettri CD di riferimento di strutture secondarie 'pure'.

Greenfield e Fasman [167] furono i primi ad introdurre questa procedura; si basarono sugli spettri della poli(L-lisina) in soluzione acquosa in  $\alpha$ -elica destrorsa (pH > 10.5 a T ambiente), in struttura  $\beta$  (o  $\beta$ -sheet, a pH > 10.5 e T  $\geq$  50°C) e disordinata (*random-coil*, a pH < 10.5) (Fig. 24).



**Fig. 24:** Spettri della poli(L-lisina) in soluzione acquosa in diverse condizioni:  $\alpha$ -elica destrogira, pH > 10.5 a T ambiente;  $\beta$ -sheet, pH > 10.5 e T  $\geq$  50°C; random-coil, pH < 10.5.

Studi condotti su un gran numero di peptidi sintetici e naturali hanno consentito di definire degli spettri *standard* per tre importanti tipi di conformazione:  $\alpha$ -elica, struttura  $\beta$  e *random-coil* [168-170].

Lo spettro relativo all' $\alpha$ -elica mostra una larga banda negativa intorno a 222 nm dovuta alla transizione  $n-\pi^*$ , elettricamente proibita ma dotata di elevato momento magnetico, mentre la transizione  $\pi-\pi^*$  genera due bande di segno opposto: una negativa a 208 nm ed una positiva a 192 nm, polarizzate rispettivamente parallelamente e perpendicolarmente all'asse dell'elica. La forma e l'intensità delle bande nello spettro di una sequenza in conformazione  $\alpha$ -elicoidale sono influenzate in maniera trascurabile dal solvente e dalla natura degli amminoacidi che compongono il peptide tranne nel caso che siano presenti residui con catene laterali aromatiche [171].

Lo spettro della struttura  $\beta$  antiparallela è caratterizzato da una sola banda negativa localizzata a 216-218 nm, dovuta alla transizione  $n-\pi^*$ , e da una banda positiva a 195 nm corrispondente alla transizione  $\pi-\pi^*$ .

Infine, lo spettro CD della struttura disordinata ha un andamento generale dominato da una banda negativa a circa 197 nm, dovuto alla transizione  $\pi-\pi^*$ , e da un secondo segnale

molto debole intorno a 220 nm, che può avere sia segno negativo che positivo, dovuto alla transizione  $n-\pi^*$ .

In Tab. 4 sono riportati i valori di  $\lambda$  relativi ai massimi e minimi di ellitticità molare per le tre conformazioni finora discusse.

**Tab. 4 :** Valori di  $\lambda$  relativi ai massimi e minimi di ellitticità molare per  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -sheet antiparallelo e *random-coil*.

Struttura secondaria	Segno della banda	Transizione	Posizione della banda	Intensità (deg cm <sup>2</sup> dmoΓ <sup>1</sup> )
$\alpha$ -elica	+	$\pi-\pi^*$	192 nm	60,000 ÷ 80,000
	-	$\pi-\pi^*$	208 nm	-36,000 ± 3,000
	-	$n-\pi^*$	222 nm	-36,000 ± 3,000
$\beta$ -sheet antiparallelo	+	$\pi-\pi^*$	195 nm	30,000 ÷ 50,000
	-	$n-\pi^*$	216 – 218 nm	-10,000 ÷ -20,000
<i>Random coil</i>	-	$\pi-\pi^*$	197 nm	-20,000
	+/-	$n-\pi^*$	220 nm	piccola
(molto debole)				

Più complessa risulta invece la definizione di curve tipiche per i vari tipi di  $\beta$ -turn [172-175]. Sembra comunque accertato che il  $\beta$ -turn di tipo I e di tipo III generalmente danno spettri CD tipici della classe C secondo la distinzione operata da Woody [176] (Tab. 5), che presenta spettri simili all' $\alpha$ -elica leggermente spostati verso il blu e con bande meno intense; spettri tipici relativi a  $\beta$ -turn di tipo I misurati in acqua o TFE mostrano una banda positiva a 186 nm e due bande negative a 205 e 216 nm. I  $\beta$ -turn di tipo II esibiscono invece spettri di classe B.

**Tab. 5:** Definizione delle classi degli spettri CD secondo Woody.

Classe	Segno della banda	Range di $\lambda$
A	-	210-220
	+	195-200
	-	<190
B	-	>220



	+	200-210
	-	<190
C	-	200-210
	+	180-195
D	-	>225
	+	210-220
	-	190-200
	+	<190

La spettroscopia CD può distinguere i  $\beta$ -turn di tipo I da quelli di tipo II solo se le loro popolazioni sono sufficientemente elevate e gli spettri di classe B e C (di Woody) non sono sovrapposti dai forti spettri CD di conformazioni periodiche estese ( $\alpha$ -elica o  $\beta$ -sheet) o oscurati dal contributo chirale dei cromofori in catena laterale (ad esempio amminoacidi aromatici).

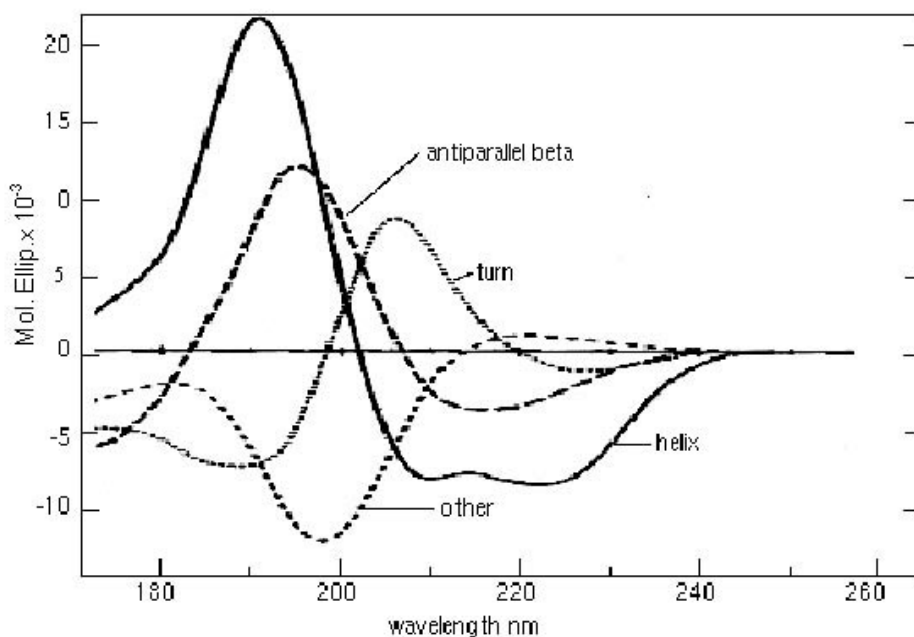
L'assegnazione delle bande CD deve essere comunque fatta con prudenza e possibilmente supportata da dati ottenuti con altre tecniche (IR, NMR, ecc.) in quanto:

- è noto che lo spettro CD dell' $\alpha$ -elica dipende dalla sua lunghezza;
- la posizione esatta e l'intensità delle bande relative ed assolute dei  $\beta$ -sheet (in pratica solo antiparalleli) variano da caso a caso;
- non è chiaro quali spettri CD debbano attribuirsi ai vari tipi di  $\beta$ -turn;
- lo spettro del *random coil*, che è di solito utilizzato per rappresentare la parte dello spettro che corrisponde ai residui non assegnati a nessun'altra categoria strutturale, presenta una caratteristica banda negativa a 190-200 nm, ma quest'ultima varia notevolmente per intensità e la debole banda a più elevate lunghezze d'onda può variare addirittura nel segno (in realtà poi, i residui di una proteina che non si trovano in una delle tre conformazioni ordinate non sono sempre e comunque disordinati);
- si dovrebbe inoltre tener conto delle distorsioni nella geometria di  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -sheet e del contributo dei gruppi aromatici delle catene laterali anche nel lontano UV.

Le catene laterali aromatiche dei residui Phe, Tyr e Trp hanno bande di assorbimento sia nella zona del gruppo peptidico, sia nel vicino UV, nell'intervallo spettrale tra 230 e 300 nm. In questa stessa zona si ha pure un debole assorbimento dei ponti -S-S- della cisteina. I contributi predominanti all'assorbimento nel vicino UV sono dovuti ai residui Trp e Tyr, mentre l'assorbimento del residuo Phe, dovuto ad una transizione  $\pi$ - $\pi^*$  proibita per ragioni di simmetria, è molto debole. Gli spettri CD nel vicino UV sono estremamente

sensibili all'intorno dei cromofori aromatici e alle loro interazioni con gruppi vicini e permettono quindi di studiare i dettagli di struttura di particolari zone di conformazione proteiche. Gli spettri dei residui Trp e Tyr sono pH dipendenti, e ciò è dovuto al fatto che protonazione e deprotonazione influiscono direttamente sul sistema coniugato dei due cromofori.

In Fig. 25 sono riportati gli spettri standard relativi alle seguenti strutture secondarie:  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -sheet antiparallelo,  $\beta$ -turn di tipo II e *random-coil*.



**Fig. 25:** Spettri CD standard.

Per alcuni composti, gli spettri misurati durante le titolazioni si intersecano in un punto, a circa 200 nm, che è chiamato punto isodicroico; questo punto si trova indipendentemente dal numero di conformazioni presenti se solo due di esse sono variate da uno spettro all'altro.

Le varie bande dicroiche sono caratterizzate non solo dalla posizione nello spettro ma anche dalla loro intensità; di conseguenza, tutti i metodi di analisi CD richiedono una conoscenza accurata del valore della concentrazione.

In generale, tutti i metodi per la stima del contenuto in struttura secondaria assumono che lo spettro di una proteina possa essere rappresentato da una combinazione lineare di spettri di elementi di struttura secondaria più un termine correttivo che include il contributo dei cromofori aromatici.

Questi metodi riescono a prevedere il contenuto in  $\alpha$ -elica con una buona precisione ma variano molto nelle capacità di prevedere  $\beta$ -sheet e  $\beta$ -turn.

Sono oggi disponibili vari programmi per l'elaborazione dei dati CD, atti a prevedere il contenuto in  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn per un dato peptide.

Secondo Greenfield e Fasman [167], è possibile valutare la percentuale di  $\alpha$ -elica in un peptide o in una proteina utilizzando la seguente formula:

$$\% \alpha\text{-elica} = ([\theta]_{208} + 4000)/(-33000 + 4000)$$

dove  $[\theta]_{208}$  è l'ellitticità molare misurata a 208 nm. Questa formula deriva dall'osservazione che i contributi di  $\beta$ -sheet e *random coil* sono entrambi piccoli ed uguali a questa lunghezza d'onda e corrispondono a circa -4 000 deg cm<sup>2</sup>/dmole mentre l' $\alpha$ -elica presenta un estremo a questo punto uguale a circa 33 000 deg cm<sup>2</sup>/dmole.

## Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa è una tecnica non distruttiva che offre informazioni circa la natura del composto in esame, in particolare sui gruppi funzionali in esso presenti, e sulla quantità dello stesso.

Inviando su una molecola radiazioni infrarosse si originano dei fenomeni di assorbimento quantizzato di energia che interessano transizioni di tipo vibrazionale e rotazionale.

Alla spettroscopia infrarossa è stata riconosciuta sin dagli anni '50 la capacità di fornire informazioni sulla struttura secondaria di peptidi e proteine in soluzione; tuttavia, la bassa sensibilità inerente agli spettrofotometri IR, l'assorbimento del solvente e la difficoltà nel separare tra loro gli andamenti riconducibili ai diversi motivi conformazionali, ha limitato l'impiego pratico di questa tecnica. Tali limiti sono stati superati con l'applicazione della trasformata di Fourier alla spettroscopia infrarossa. L'FT-IR, infatti, rispetto alle tecniche dispersive convenzionali, rende le prestazioni strumentali nettamente migliori, fornendo misure caratterizzate da maggiore risoluzione, sensibilità e rapporto segnale-rumore. In particolare, l'alta sensibilità rende possibile l'ottenimento di spettri anche in solventi dotati di elevata assorbanza come l'acqua; il favorevole valore del rapporto segnale-rumore comporta poi l'efficacia dell'applicazione delle tecniche di aumento di risoluzione (*resolution enhancement*) quali l'ottenimento della derivata seconda e la *Fourier self-deconvolution* [177].

Gli spettri FT-IR ottenuti da peptidi e proteine in soluzione sono spesso formati da bande larghe e molto sovrapposte tra loro che generano uno spettro costituito da un complesso

andamento a multicomponenti non strumentalmente risolvibile. Le due procedure di aumento di risoluzione citate, sebbene non producano alcun effettivo aumento nella risoluzione strumentale, rendono possibile una migliore visualizzazione delle componenti individuali sovrapposte di uno spettro di assorbimento.

L'FT-IR, inoltre, permette di acquisire uno spettro IR in tempi molto ristretti rispetto alla tecnica tradizionale; ciò grazie all'*interferometro*, un dispositivo che, sostituito al tradizionale monocromatore, consente l'analisi simultanea di tutte le frequenze durante la scansione, aumentando l'energia disponibile a tutto vantaggio della velocità e della capacità risolutiva.

Uno dei maggiori vantaggi della spettroscopia FT-IR utilizzata per la caratterizzazione strutturale, comunque, è che può essere applicata indipendentemente dallo stato fisico del campione e dalle sue dimensioni: i campioni possono essere analizzati come soluzioni acquose o organiche, film idratati, dispersioni non omogenee o solidi [178].

Il gruppo peptidico genera 9 bande caratteristiche nell'IR: tra queste, le principali con i modi vibrazionali che le originano, sono le seguenti [179]:

- la banda ammidica A corrisponde alla vibrazione di stiramento del legame N-H: questa banda è estremamente sensibile alla presenza di legami idrogeno ma è poco sensibile alla conformazione dello scheletro polipeptidico perciò non è stata presa in considerazione nella seguente analisi conformazionale;
- la banda ammidica I è dovuta per circa l'80% alla vibrazione di stiramento del legame C=O e per la restante percentuale allo stiramento del legame C-N;
- la banda ammidica II è legata a due contributi, circa di pari entità, dati dallo stiramento del legame C-N e dalla deformazione del legame N-H nel piano del gruppo peptidico;
- la banda ammidica III ha origine dagli stessi modi vibrazionali della banda ammidica II ma con accoppiamento di fase diverso.

Nel presente lavoro di dottorato viene presa in considerazione solo la banda ammidica I (compresa all'incirca tra 1620 e 1690  $\text{cm}^{-1}$ ) essendo la più interessante ai fini dell'analisi conformazionale.

Variazioni nella lunghezza e direzione dei legami idrogeno causano variazioni nella forza di legame. I gruppi ammidici in una proteina sono coinvolti in strutture secondarie di qualche tipo a cui sono associate disposizioni particolari di legame ad idrogeno tra i gruppi C=O e N-H; ci si aspetta quindi che ogni tipo di struttura secondaria dia origine ad assorbimenti ammidici I caratteristici e dato che tutte le proteine contengono più di un

motivo strutturale ne consegue che si avranno contemporaneamente più assorbimenti per ogni molecola [180].

La banda ammidica I [181, 182], oltre che dipendere dalla conformazione della catena polipeptidica, risente anche dalla presenza o meno di legami ad idrogeno coinvolgenti il gruppo carbonilico come protoni accettori, i quali possono essere di natura intramolecolare o intermolecolare oppure interessare il solvente.

Lo spettro FT-IR di peptidi o proteine in soluzione acquosa presenta un grosso inconveniente derivante dalla forte banda di assorbimento dell'acqua che si sovrappone alla banda di assorbimento ammidica I. Utilizzando soluzioni in D<sub>2</sub>O, la banda relativa all'assorbimento dovuto alla vibrazione di *bending* è spostata di circa 400 cm<sup>-1</sup> verso numeri d'onda inferiori rispetto a quella dell'H<sub>2</sub>O rendendo più facile la risoluzione delle varie componenti che costituiscono la banda ammidica I senza però modificare sostanzialmente la struttura assunta dalla molecola in acqua. La dissoluzione di proteine in D<sub>2</sub>O invece che in H<sub>2</sub>O, inoltre, permette di discriminare meglio tra le strutture secondarie di  $\alpha$ -elica e *random coil* i cui assorbimenti in acqua sono quasi sovrapposti.

I moti vibrazionali possono accoppiare tra di loro dando origine a bande differenti correlate alle strutture secondarie presenti.

Il metodo più comune per quantificare la struttura secondaria di una proteina coinvolge il *curve fitting* della banda ammidica I. Il primo passo consiste nell'applicazione di una o entrambe le tecniche di aumento di risoluzione (derivata seconda e *Fourier self-deconvolution*) per ottenere una stima del numero e della posizione degli assorbimenti discreti che danno origine al profilo complesso della banda ammidica I [179]. Da questa stima delle componenti, come pure dalla stima della loro ampiezza, altezza e forma, è possibile ottenere i dati iniziali da inserire in un programma interattivo che utilizza il metodo dei minimi quadrati per cercare di riprodurre il profilo ottenuto sperimentalmente della banda ammidica I variando questi parametri. L'area integrata sotto ogni banda dopo l'interazione finale è calcolata come una percentuale dell'area totale della banda ammidica I e il suo valore è preso come percentuale della particolare struttura secondaria nella proteina.

Un metodo basato sull'aumento di risoluzione per ottenere i parametri necessari per il *curve fitting* è stato sviluppato da Byler e Susi [180]. Questi autori hanno studiato la banda ammidica I di 21 proteine differenti in D<sub>2</sub>O e hanno confrontato i dati ottenuti con quelli derivanti da indagini di diffrazione ai raggi X per la maggior parte delle proteine studiate.

In questi studi, ogni proteina esibisce una banda ammidica I che deriva dalla combinazione di un certo numero di componenti. Le componenti sono state osservate a 11 frequenze caratteristiche, sebbene non tutte le proteine mostrano componenti a tutte queste frequenze (Tab. 6). Inoltre, proteine con strutture simili non esibiscono necessariamente componenti della banda con frequenze identiche.

**Tab. 6:** Frequenze della banda ammidica I deconvoluta e assegnazioni ( $\text{cm}^{-1}$ ) [180].

Media arrotondata $\pm$ deviazione assoluta massima	Assegnazioni
1624 $\pm$ 4	<i>Extended chains</i>
1631 $\pm$ 3	<i>Extended chains</i>
1637 $\pm$ 3	<i>Extended chains</i>
1645 $\pm$ 4	<i>Unordered</i>
1654 $\pm$ 3	<i>Helix</i>
1663 $\pm$ 4	<i>Turns and bends</i>
1670 $\pm$ 2	<i>Turns and bends</i>
1675 $\pm$ 4	<i>Extended chains</i>
1683 $\pm$ 2	<i>Turns and bends</i>
1688 $\pm$ 2	<i>Turns and bends</i>
1694 $\pm$ 2	<i>Turns and bends</i>

Sfortunatamente, i casi in cui non è chiara l'assegnazione di una particolare struttura secondaria ad una componente della banda sono piuttosto frequenti; in particolare, gli assorbimenti derivanti dalle strutture *turn* sono difficili da assegnare a causa delle diverse caratteristiche dei legami idrogeno presenti nei vari tipi di *turn* [183].

Più in generale, si può prevedere che la frequenza ammidica I più bassa sia generata dalle catene estese nel polipeptide, come quelle che si trovano nelle proteine denaturate: in tali catene estese il legame idrogeno intramolecolare non è possibile mentre la natura estesa delle catene permette allineamenti molto stretti di catene vicine che favoriscono la formazione di legami idrogeno intermolecolari molto forti. Ci si aspetta che la formazione di questi legami idrogeno molto forti produca corrispondenti massimi nella banda ammidica I verso le basse frequenze: è stato infatti osservato che le proteine aggregate denaturate sono

caratterizzate da un caratteristica componente intensa nella zona compresa tra 1610 e 1628  $\text{cm}^{-1}$ .

Nella caratteristica struttura a  $\beta$ -*sheet* antiparallelo, le costrizioni steriche comportano che la forza dei legami idrogeno intramolecolari che stabilizzano il  $\beta$ -*sheet* sia inferiore rispetto a quella dei legami idrogeno intermolecolari che stabilizzano gli aggregati estesi: ci si aspetta quindi che la frequenza relativa nella banda ammidica I aumenti. Il massimo della banda ammidica I per proteine note per essere prevalentemente in struttura  $\beta$ -*sheet* antiparallela, infatti, è stato osservato tra i 1630 e i 1640  $\text{cm}^{-1}$ . A questo tipo di struttura può inoltre essere assegnato un assorbimento sopra i 1670  $\text{cm}^{-1}$  che deriva dall'accoppiamento di transizione di dipolo.

La lunghezza del legame idrogeno formato nelle strutture ad  $\alpha$ -elica è leggermente più lungo, e quindi più debole, rispetto a quello delle strutture  $\beta$ -*sheet* antiparallelo e la risultante frequenza ammidica I è ulteriormente aumentata: proteine che si trovano prevalentemente in  $\alpha$ -elica esibiscono un massimo attorno ai 1648 – 1658  $\text{cm}^{-1}$ .

In Tab. 7 sono riportate delle correlazioni generiche tra le strutture comuni delle proteine e le frequenze della banda ammidica I, sviluppate da Jackson e Mantsch [178], che possono essere usate come linee guida per la spettroscopia IR applicata allo studio della struttura secondaria di peptidi e proteine.

**Tab. 7:** Correlazioni tra strutture delle proteine e frequenze della banda ammidica I

Struttura	Frequenza Ammidica I ( $\text{cm}^{-1}$ )
<i>Antiparallel <b>b</b>-sheet/aggregated strands</i>	1675 – 1695
<i><math>3_{10}</math>-Helix</i>	1660 – 1670
<i><b>a</b>-Helix</i>	1648 – 1660
<i>Unordered</i>	1640 – 1648
<i><b>b</b>-Sheet</i>	1625 – 1640
<i>Aggregated strands</i>	1610 – 1628

## Risonanza magnetica nucleare in due dimensioni (NMR-2D)

La spettroscopia NMR-2D è oggi una delle tecniche più utilizzate per lo studio conformazionale di peptidi e proteine in soluzione; essa è capace di fornire informazioni specifiche sui singoli residui della catena polipeptidica, quali distanze e relazioni geometriche tra nuclei e localizzazione di ponti a idrogeno intramolecolari, come pure sulle interazioni di sistemi polipeptidici con ioni e molecole piccole.

Gli spettri NMR-2D sono spettri in cui sia l'ascissa che l'ordinata sono assi di frequenze; un esperimento di questo tipo richiede due trasformate di Fourier ortogonali tra loro su due assi dei tempi indipendenti, per arrivare a due assi delle frequenze perpendicolari.

Un esperimento di NMR-2D classico (Fig. 26) è costituito dai seguenti periodi di tempo:

- preparazione: intervallo di tempo, lungo rispetto al tempo di rilassamento degli *spin* nucleari, durante il quale il sistema è riportato all'equilibrio termico;
- evoluzione  $t_1$ : intervallo di tempo successivo all'impulso, che viene progressivamente incrementato, durante il quale la magnetizzazione evolve per effetto del *chemical shift* e dell'accoppiamento scalare;
- *mixing*: periodo di tempo, che consiste di uno o più impulsi separati da *delay* di tempo, che consente il trasferimento di magnetizzazione tra gli *spin*;
- acquisizione  $t_2$ : intervallo di tempo in cui la magnetizzazione osservabile viene rilevata e registrata sotto forma di FID (*Free Induction Decay*) che successivamente viene convertito, tramite la trasformata di Fourier (FT), da un segnale in funzione del tempo ad un segnale in funzione della frequenza.

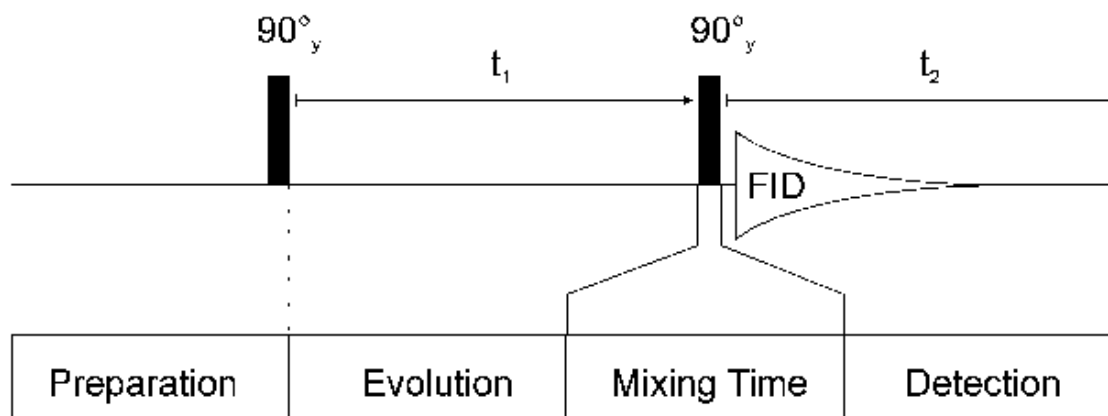


Fig. 26: Periodi di tempo che caratterizzano un esperimento NMR-2D classico.



Gli esperimenti bidimensionali sono basati sull'accoppiamento tra nuclei. Questi accoppiamenti possono verificarsi tramite legami (accoppiamento scalare) o tramite lo spazio (accoppiamento dipolare). Se la correlazione si instaura tra nuclei uguali gli esperimenti NMR bidimensionali vengono classificati come omonucleari, se i nuclei sono diversi vengono detti eteronucleari.

Le principali tecniche che si basano su correlazioni omonucleari scalari sono: COSY e le tecniche derivate modificando la sequenza originale di impulsi, come ad esempio COSY45, che permette di ridurre l'intensità dei segnali in diagonale in modo da evitare che segnali di correlazione che cadono troppo vicino alla diagonale siano perturbati, COSY-DQF (*Double Quantum Filter*), che permette di eliminare i segnali come quelli dei solventi che sono singoletti, COSY LR(*Long Range*), in cui sono enfatizzati *coupling* piccoli come quelli allilici o quelli para in sistemi aromatici, ed infine TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), tecnica più sensibile del COSY e nella quale si ha il trasferimento di magnetizzazione a tutto il sistema di *spin*.

L'esperimento COSY (*CORrelation Spectroscopy*) ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) consente, rispetto all'esperimento protonico monodimensionale, di individuare la sequenza degli accoppiamenti dei vari nuclei presenti in una molecola. Il risultato del COSY è un diagramma simmetrico. La proiezione dello spettro  $^1\text{H}$ -NMR unidimensionale appare sulla diagonale (*diagonal signal*). I segnali di correlazione (o *cross-peak*) sono fuori diagonale ed indicano connettività tra protoni e protoni, ossia accoppiamenti vicinali, geminali e *long range*.

In una maniera simile lo spettro TOCSY mostrerà su una sola riga tutto l'intero sistema di *spin*.

Le tecniche che si basano sugli accoppiamenti omonucleari dipolari sono: NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) e ROESY (*Rotating-Frame NOE Spectroscopy*).

Il NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) è la variazione dell'intensità di un segnale I per saturazione di un nucleo S dipolarmente accoppiato ad esso.

Nell'accoppiamento dipolare si ha uno scambio incoerente di magnetizzazione tra due *spin* fisicamente vicini (processo di *cross-relaxation*) e quindi gli spettri NOESY e ROESY daranno informazioni sulle distanze tra nuclei vicini nello spazio. In una molecola organica, NOESY identificherà in modo peculiare protoni adiacenti (sullo stesso o su carboni adiacenti) e protoni che sono costretti alla vicinanza dalla geometria della molecola.

L'NMR è la tecnica più versatile nelle scienze fisiche e può essere utilizzata anche per determinare la struttura globale (*large-scale*) di oggetti, inclusa l'anatomia del corpo umano. Il principale vantaggio nell'utilizzo di questa tecnica per lo studio di biomacromolecole è che non è necessario l'ottenimento di cristalli (cosa a volte molto difficile o impossibile), come per la spettroscopia ai raggi X, e quindi la molecola può essere studiata nelle condizioni *native-like*. Inoltre, è possibile studiare interazioni molecolari in soluzione come ad esempio quelle tra un ligando ed il suo recettore.

# ***PARTE SPERIMENTALE***



## MATERIALI

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

- resina per SPPS: HMP;
- soluzioni per sintetizzatore automatico: 0.1 M DMAP in DMF e 1.0 M DCC in NMP;
- DIEA;
- 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.

I prodotti forniti dalla ditta Bachem (Weil am Rhein, Germany) sono:

- resine per SPPS Sasrin.

Il prodotti forniti dalla ditta Baker Analyzed (Deventer, Holland) è:

- acido citrico monoidrato.

I prodotti forniti dalla ditta Biosolve (Valkenswaard, Netherlands) sono:

- piperidina e TFA.

I prodotti forniti dalla ditta Carlo Erba (Milano, Italy) sono:

- NaOH; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; sodiofosfato monobasico; toluene.

I prodotti forniti dalla ditta Chem-Impex-International (Wood Dale, IL, USA) sono:

- HBTU e HOBt.

I prodotti forniti dalla ditta Fluka (Buchs, Switzerland) sono:

- DMS; EDA; EDT; tioanisolo.

I prodotti forniti dalla ditta Janssen (Geel, Belgium) sono:

- anisolo e D<sub>2</sub>O.

I prodotti forniti dalla ditta Lab-Scan (Dublin, Ireland) sono:

- CH<sub>3</sub>CN; DCM; DMF; Et<sub>2</sub>O; EtOH; MeOH; NMP.

Il prodotto fornito dalla ditta Merck (Darmstadt, Germany) è:

- fenolo.

Il prodotto fornito dalla ditta Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) è:

- FITC.

I prodotti forniti dalla ditta Novabiochem (Langelfingen, Switzerland) sono:

- tutti gli amminoacidi Fmoc e Boc protetti;
- le seguenti resine per SPPS: Fmoc-Lys(Boc)-Wang, Rink Amide MBHA, Sieber Amide, N- $\alpha$ -Boc-Gly-Pam.

I prodotti forniti dalla ditta PerSeptive Biosystems (Warrington, UK) sono:

- HATU e HOAt.

I prodotti forniti dalla ditta Pierce (Rockford, IL, USA) sono:

- standard H per analisi amminoacidica e PITC.

Il prodotto fornito dalla ditta Praxair (Oevel, Belgium) è:

- HF.

I prodotti forniti dalla ditta Prolabo (Paris, France) sono:

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; KOH; NaOAc; NaCl; SDS.

I prodotti forniti dalla ditta Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) sono:

- AcOH; alginato di sodio; (3-amminopropil)trietossisilano; CF; DIC; EDC; glutaraldeide; HCl; HNO<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2-mercaptopiridina; TEA; TES; TFE

I prodotti forniti dalla ditta Waters (Milford, MA, USA) sono:

- Reagenti utilizzati nell'analisi amminoacidica:
  - soluzione diluente PicoTag ( $3.9 \times 10^{-6}$  M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O, pH 7.4, CH<sub>3</sub>CN 5%);
  - eluente A della PicoTag (soluzione a pH 6.4 preparata aggiungendo 19.0 g di NaOAc  $\times$  3 H<sub>2</sub>O, 0.5 mL di TEA, 200  $\mu$ L di soluzione di EDTA (100 mg EDTA

in 100 mL H<sub>2</sub>O MilliQ) a 940 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, alla quale sono stati aggiunti 60 mL di CH<sub>3</sub>CN);

- eluente B della PicoTag (200 µL di soluzione di EDTA (100 mg EDTA in 100 mL H<sub>2</sub>O MilliQ) aggiunta di una miscela di 600 mL di CH<sub>3</sub>CH e 400 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ).

## **STRUMENTAZIONE**

### *Sintesi su fase solida*

Per la sintesi dei peptidi è stato utilizzato un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431A.

### *Test alla ninidrina*

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

### *Cromatografia*

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

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

- HPLC Waters 600E, munito di autocampionatore modello 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 490E. L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Millennium 2010 versione 2.00 ed Empower (Waters);
- HPLC Waters 600 Controller, munito di autocampionatore modello 712 Wisp e di rivelatore UV/Vis a *photo diodi array* di fotodiodi modello 996. L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Millennium 2010 versione 2.15 ed Empower (Waters).

Le colonne utilizzate sono le seguenti:

- Delta-Pak C<sub>18</sub> semipreparativa (15 µm, 100 Å, 7.8 × 300 mm) fornita dalla Waters;
- Nova-Pak HR C<sub>18</sub> semipreparativa (6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm) fornita dalla Waters;
- Nova-Pak HR C<sub>18</sub> analitica (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm) fornita dalla Waters;
- Vydac C<sub>18</sub> semipreparativa (5 µm, 300 Å, 10 × 250 mm) fornita dalla Vydac (Hesperia, CA, USA);
- Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm) fornita dalla Vydac;
- Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm) fornita dalla Phenomenex.

### ***Elettroforesi capillare***

Lo strumento usato è il modello 270A dell'Applied Biosystems; l'acquisizione e l'elaborazione dei dati avviene attraverso il programma Maxima 820 (Waters).

### ***Analisi amminoacidica***

La preparazione dei campioni è stata condotta con Pico-Tag Work Station della Waters; per l'analisi cromatografica è stata utilizzata la colonna fornita dalla stessa ditta, Pico-Tag Column (3.9 × 300 mm).

### ***Analisi spettroscopiche***

Le misure di dicroismo circolare sono state ottenute con uno spettropolarimetro Jasco (Tokyo, Japan) modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla Jasco. Le celle cilindriche in quarzo fuso, aventi cammini ottici di 0.01 cm, 0.02 cm e 0.05 cm sono state fornite dalla Hellma mentre la cella da 0.1 cm è stata acquistata dalla Jasco.

Gli spettri IR sono stati acquisiti con spettrofotometro Jasco in trasformata di Fourier modello 300E. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stata ottenuta tramite un programma specifico fornito dalla medesima ditta.

La cella utilizzata per le misure IR ha pareti di CaF<sub>2</sub> e cammino ottico di 0.1 mm ed è stata fornita dalla Specac.



## SINTESI DEI PEPTIDI ADESIVI

### *RGD (1<sup>a</sup> sintesi)*

*Sequenza:*

*PM: 346.35 Da*

H-Arg-Gly-Asp-OH

### *Sintesi*

Il peptide RGD è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina HMP (sostituzione: 0.92 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Asp e Pmc per Arg.

295.3 mg di resina HMP (0.2717 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Asp(OtBu)-OH e usando come agente condensante una soluzione di DCC 1 M in NMP e 0.1 equivalenti di DMAP come catalizzatore. La resa della reazione è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 99.75%.

La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min.

Le due reazioni di condensazione successive sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 471.0 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 89.38%).

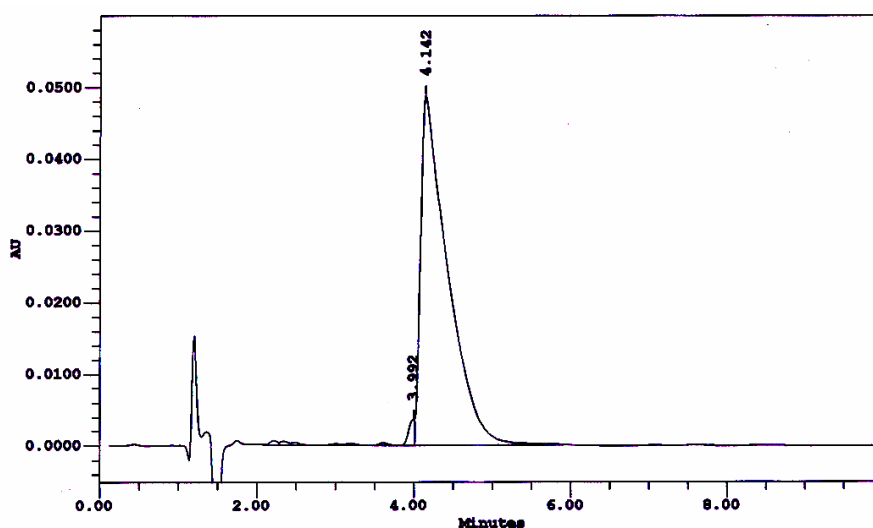
### *Sblocco dalla resina*

Lo sblocco del peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2

(0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 100.9 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### *Analisi grezzo*

0.32 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 320 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire delle corse analitiche in RP-HPLC alle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm. Una prima analitica è stata fatta iniettando 10 µL di soluzione di peptide grezzo (Fig. 27) ed una seconda è stata fatta aggiungendo ai 10 µL di soluzione di grezzo una pari quantità di soluzione alla medesima concentrazione di peptide RGD purificato che era disponibile in laboratorio. La coeluizione ha confermato la riuscita della sintesi.



**Fig. 27:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide RGD grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm.

### *Purificazione*

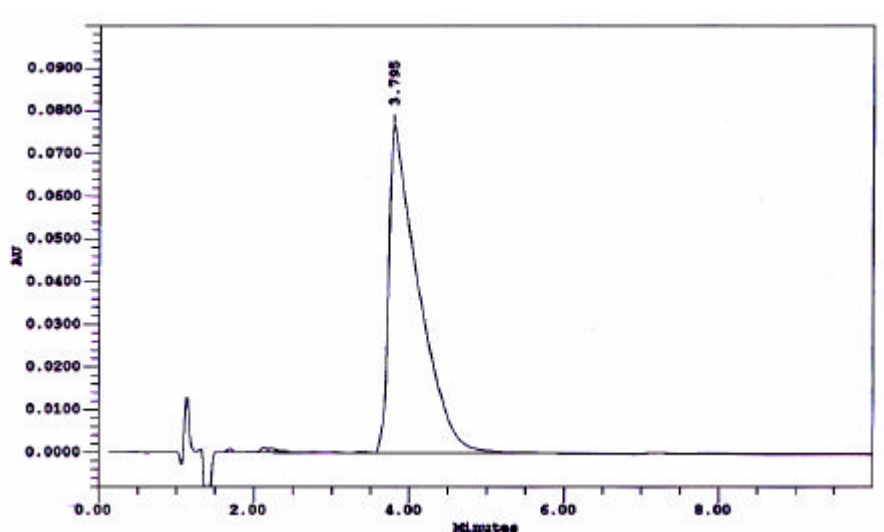
Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa alle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica al 100% di A; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state

analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 75,11 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 10.34 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 5.03 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95% e 1.13 mg con grado di purezza tra il 75 e il 90%.

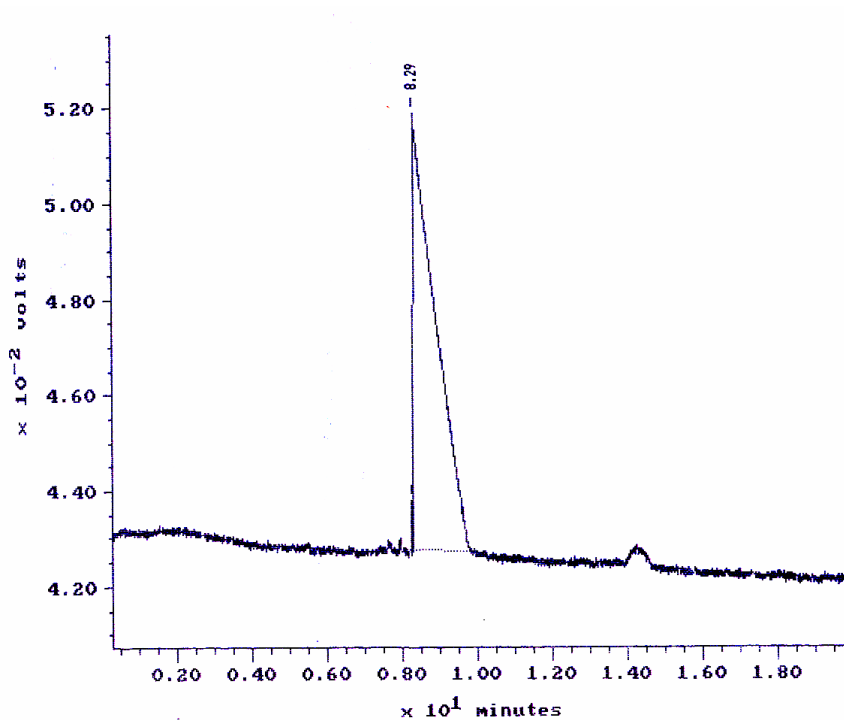
### **Caratterizzazione**

La caratterizzazione del prodotto purificato con grado di purezza superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm) (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm) (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.71% (Fig. 28);
- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.82% (Fig. 29)



**Fig. 28:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide RGD con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 µm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm.



**Fig. 29:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide RGD con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## **RGD (2<sup>a</sup> sintesi)**

### *Sintesi*

Il peptide RGD è stato sintetizzato una seconda volta utilizzando la resina super acidolabile Sasrin per ottenere il peptide protetto in catena laterale necessario per la funzionalizzazione selettiva del terminale amminico con il gruppo fluoroforo fluoresceina tramite reazione con FITC.

Il peptide è stato ottenuto tramite tecnica SPPS con chimica Fmoc e utilizzando 506.9 mg di resina (0.2535 mmoli), già funzionalizzata con l'amminoacido C-terminale, Fmoc-Asp(OtBu)-Sasrin (sostituzione: 0.50 mmoli/g).

La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min.

Le due reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto (si è scelto il gruppo protettore Pmc per la catena laterale dell'Arg).

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2

mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 511.1 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 89.33%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di 318.7 mg di peptide su resina (62.36% sul totale ottenuto) per ottenere il peptide protetto in catena laterale, è stato realizzato seguendo la procedura di sblocco II (cft. pag. 56), ovvero trattando ripetutamente il peptide protetto su resina con una soluzione all'1% TFA in DCM e lasciandola reagire per 15 min mescolando manualmente. Il peptide protetto, date le sue dimensioni molto piccole, è risultato solubile nell'H<sub>2</sub>O fredda di precipitazione e quindi non è stato possibile isolarlo per filtrazione dopo ogni sblocco parziale: per recuperare il peptide protetto disciolto si è deciso di liofilizzare la soluzione acquosa. Non potendo stabilire il completamento della reazione di sblocco del peptide dalla resina basandosi sulla mancanza di formazione di nuovo precipitato all'aggiunta di acqua, si è deciso di eseguire un totale di 4 sblocchi parziali successivi. Riunendo i liofilizzati dei vari sblocchi si sono ottenuti 52.94 mg di peptide grezzo protetto in catena laterale (resa della reazione di sblocco = 56.06%).

## **GRGDSPK (1<sup>a</sup> sintesi)**

***Sequenza:***

***PM: 715.77 Da***

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

### ***Sintesi***

Il peptide GRGDSPK è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc utilizzando come supporto solido 326.3 mg (0.2512 mmoli) di resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang (sostituzione: 0.77 mmoli/g). Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Ser, OtBu per Asp e Pmc per Arg. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min.

Le sei reazioni di condensazione successive sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

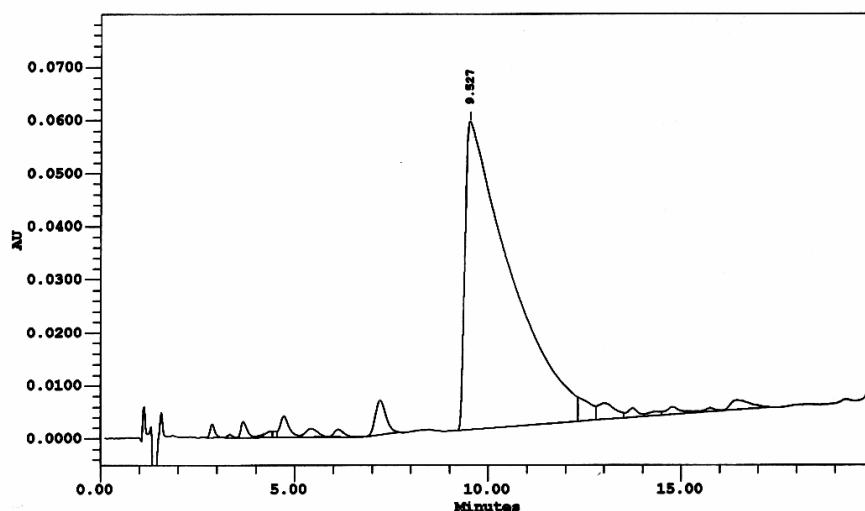
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 518.9 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 100%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco del peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 238.3 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

0.52 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 520  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire delle corse analitiche in RP-HPLC alle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4  $\mu$ m, 60 Å, 3.9  $\times$  150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm. Una prima analitica è stata fatta iniettando 10  $\mu$ L di soluzione di peptide grezzo (Fig. 30) ed una seconda è stata fatta aggiungendo ai 10  $\mu$ L di soluzione di grezzo una pari quantità di soluzione alla medesima concentrazione di peptide GRGDSPK purificato che era disponibile in laboratorio. La coeluizione ha confermato la riuscita della sintesi.



**Fig. 30:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide GRGDSPK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm.

### ***Purificazione***

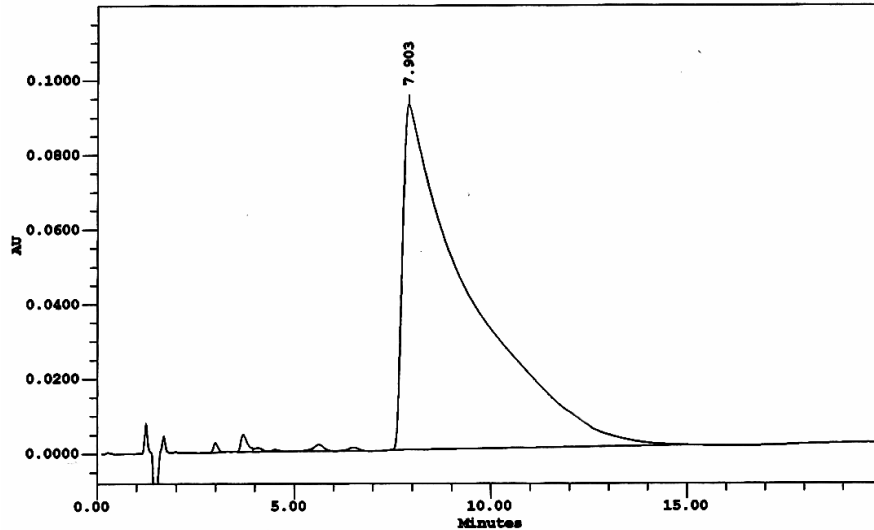
Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa alle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6 μm, 60 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, 100% di A per 20 min e dallo 0 al 10% di B in 10 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 179.20 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 12.40 mg con grado di purezza tra il 53 e il 65% ed una frazione, 2.92 mg, con grado di purezza pari all'80.63%.

### ***Caratterizzazione***

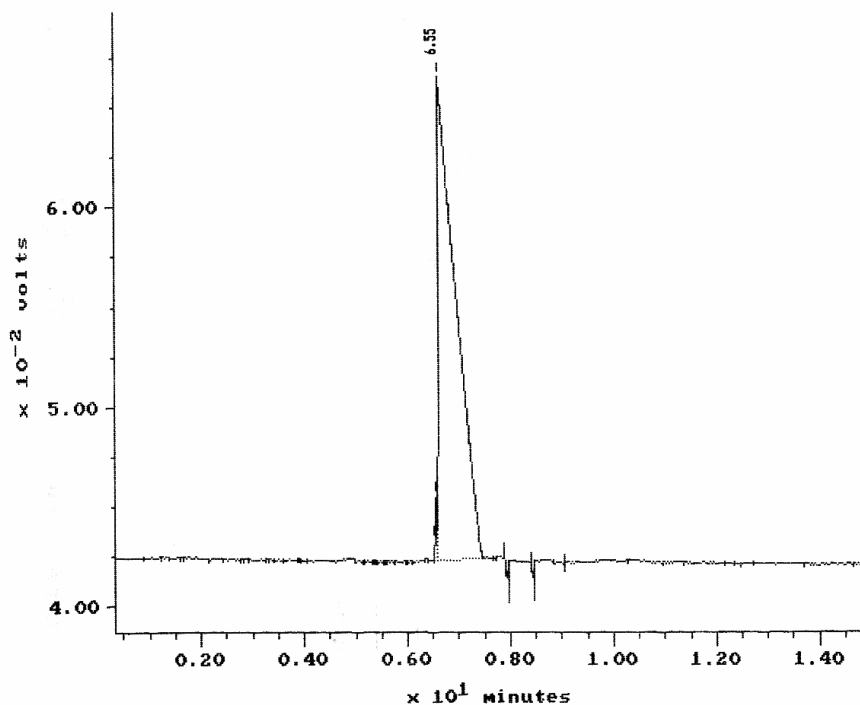
La caratterizzazione del prodotto purificato con grado di purezza superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.73% (Fig. 31);

- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.05% (Fig. 32)



**Fig. 31:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide GRGDSPK con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C<sub>18</sub> analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 32:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide GRGDSPK con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



## **GRGDSPK (2<sup>a</sup> sintesi)**

### ***Sintesi***

Il peptide GRGDSPK è stato sintetizzato una seconda volta utilizzando la resina super acido-labile Sasrin per ottenere il peptide protetto in catena laterale necessario per la funzionalizzazione selettiva del terminale amminico con il gruppo fluoroforo fluoresceina tramite reazione con FITC.

Il peptide è stato ottenuto tramite tecnica SPPS con chimica Fmoc e utilizzando 418.9 mg (0.2513 mmoli) di resina, già funzionalizzata con il residuo C-terminale, Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin (sostituzione: 0.60 mmoli/g). Si sono usate le stesse protezioni in catena laterale utilizzate nella prima sintesi. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. Le sei reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo aver rimosso dal terminale amminico il gruppo protettore Fmoc, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 717.5 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 100%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di 400.9 mg di peptide su resina (55.87% sul totale ottenuto) per ottenere il peptide protetto in catena laterale, è stato realizzato seguendo la procedura di sblocco II (cft. pag. 56), ovvero trattando ripetutamente il peptide protetto su resina con una soluzione all'1% TFA in DCM e lasciandola reagire per 15 min mescolando manualmente. In seguito al quarto trattamento con acido (sblocco parziale) non si è formato nuovo precipitato all'aggiunta di acqua e si è quindi considerato concluso lo sblocco. I precipitati dei vari sblocchi parziali sono stati riuniti e seccati sotto vuoto in presenza di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e KOH; si sono ottenuti 163.54 mg di peptide grezzo protetto in catena laterale (resa della reazione di sblocco = 97.51%).

## **(GRGDSP)<sub>4</sub>K**

**Sequenza:**

**PM: 2424.51 Da**

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-OH

### **Sintesi**

Il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc utilizzando come supporto solido 417.8 mg (0.2507 mmoli) di resina Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin (sostituzione: 0.60 mmoli/g).

Si è utilizzata la resina super acido-labile Sasrin per ottenere il peptide protetto in catena laterale necessario per la funzionalizzazione selettiva del terminale amminico con il gruppo fluoroforo fluoresceina tramite reazione con FITC.

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Ser, OtBu per Asp e Pmc per Arg. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. Tutte le reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* doppio utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 1.1520 g di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 84.18%).

Si è deciso di sbloccare circa metà del peptide su resina protetto con la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) per ottenere direttamente il peptide grezzo deprotetto in catena laterale. La parte restante del peptide su resina è stata trattata con la procedura di sblocco II (cft. pag. 56) in previsione della funzionalizzazione con FITC.

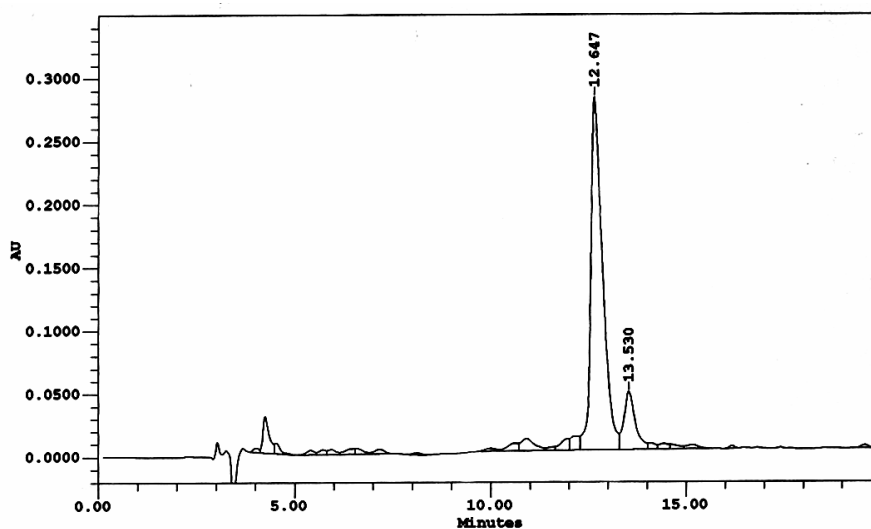
### **Sblocco dalla resina I**

Sono stati sbloccati 551.2 mg di peptide su resina (47.84% sul totale) dalla resina e dai gruppi protettori in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): data la presenza di

numerose Arg(Pmc) si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 2 ore mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 237.3 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 96.98%).

### *Analisi grezzo 1*

0.44 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 440  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire delle corse analitiche in RP-HPLC alle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm. Una prima analitica è stata fatta iniettando 20  $\mu\text{L}$  di soluzione di peptide grezzo (Fig. 33) ed una seconda è stata fatta aggiungendo a 10  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo una pari quantità di soluzione alla medesima concentrazione di peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K purificato che era disponibile in laboratorio. La coeluzione ha confermato la riuscita della sintesi.



**Fig. 33:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm.

### *Purificazione 1*

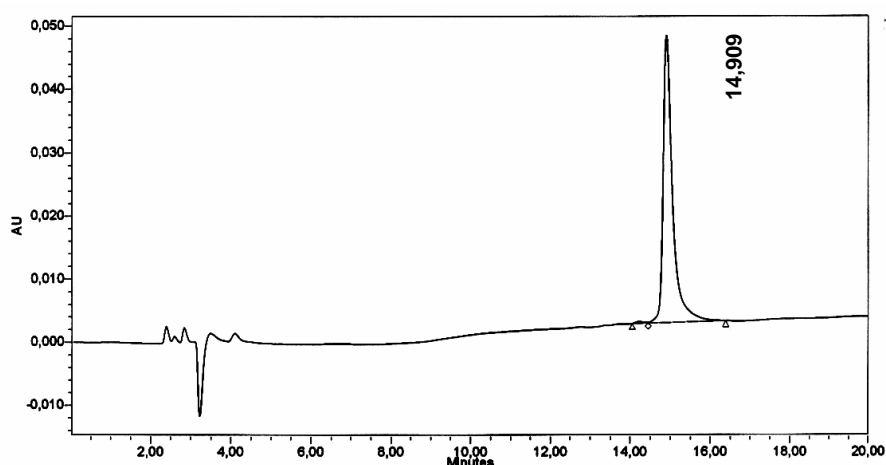
Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa alle seguenti condizioni: colonna Delta Pak  $\text{C}_{18}$  SP (15  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dallo 0 al 5% di B in 2 min e dal 5 al 12% di B in 28 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime

condizioni utilizzate per il peptide grezzo; le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 25.93 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 46.80 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 12.16 mg con grado di purezza tra l'89 e il 95% e 2.96 mg con grado di purezza tra il 75 e l'89%.

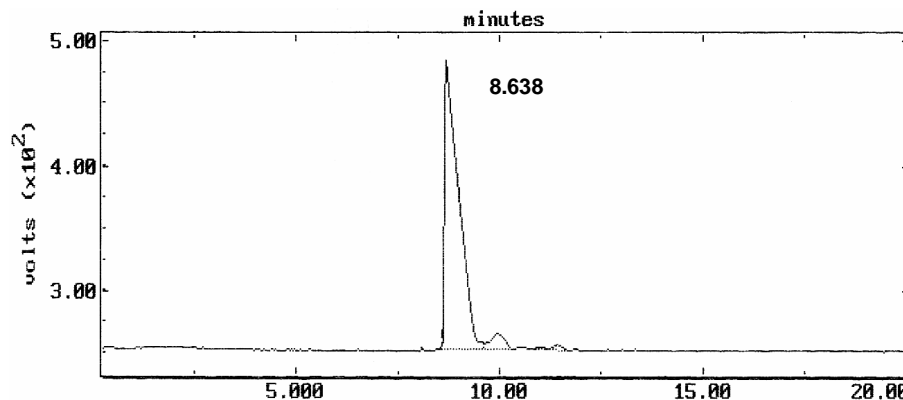
### **Caratterizzazione 1**

La caratterizzazione del prodotto purificato con grado di purezza superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

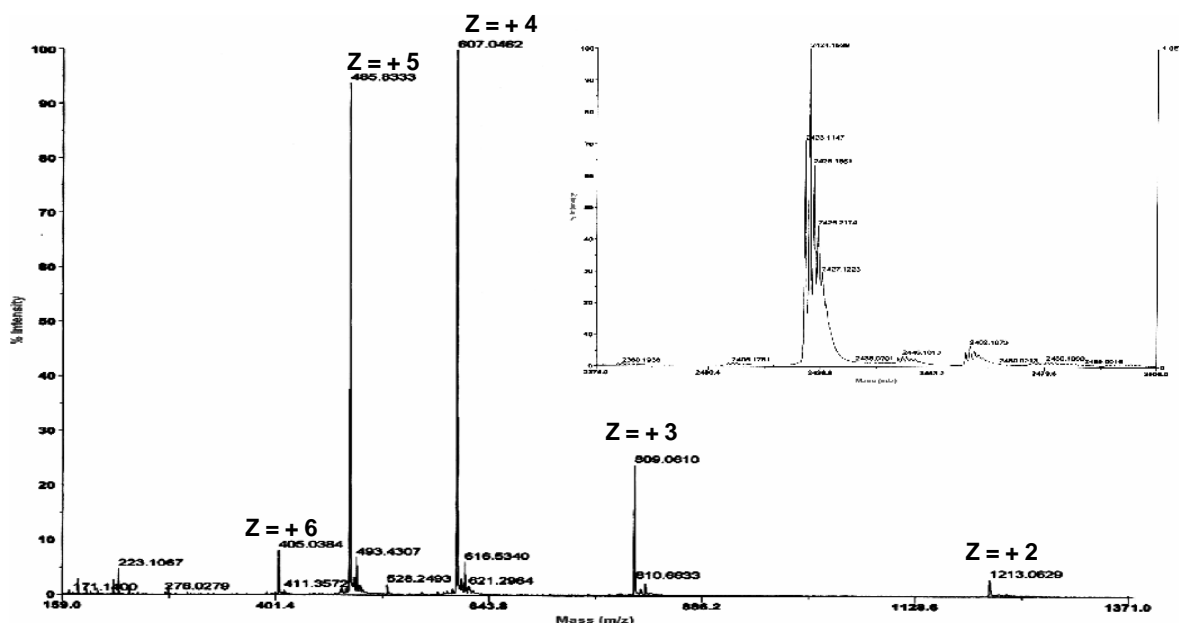
- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.41% (Fig. 34);
- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 93.77% (Fig. 35)
- spettrometria di massa: è stata eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 2424.1 Da in seguito a deconvoluzione (Fig. 36).



**Fig. 34:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 35:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 36:** Analisi di massa della riunione delle frazioni del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K con grado di purezza superiore al 98% eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione che ha fornito un valore di massa pari a 2424.1 Da.

### ***Sblocco dalla resina 2***

Ciò che restava del peptide su resina, 600.8 mg (52.16% sul totale), è stato trattato ripetutamente con una soluzione all'1% TFA in DCM (procedura di sblocco II, cft. pag. 56) per ottenere il peptide protetto in catena laterale. In seguito al quarto trattamento con acido non si è formato nuovo precipitato all'aggiunta di acqua e si è quindi considerato concluso lo sblocco. I precipitati dei vari sblocchi parziali sono stati riuniti e seccati sotto vuoto in presenza di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e KOH; si sono ottenuti 367.80 mg di peptide grezzo protetto in catena laterale (resa della reazione di sblocco = 82.74%).

## (340-365)HVP

*Sequenza:*

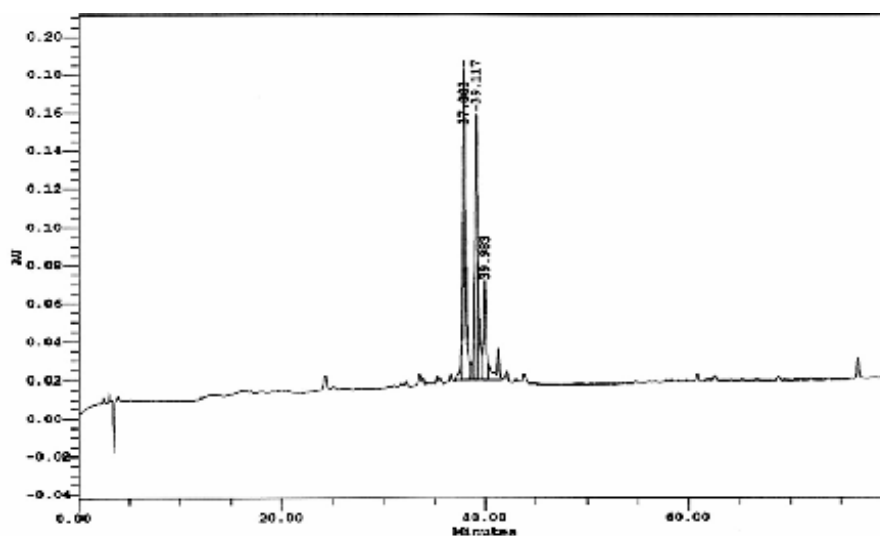
*PM: 3182.74 Da*

H-Met-Ala-Pro-Arg-Pro-Ser-Leu-Ala-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-Arg-His-Arg-Asn-Arg-Lys-Gly-Tyr-Arg-Ser-Gln-Arg-Gly-OH

### *Sintesi*

Il peptide (340-365)HVP è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Boc utilizzando come supporto solido 516.4 mg (0.2479 mmoli) di resina N- $\alpha$ -Boc-Gly-PAM (sostituzione: 0.48 mmoli/g).

Si è deciso di utilizzare la chimica Boc perchè una sintesi precedente di questo peptide con chimica Fmoc aveva fornito un prodotto grezzo molto complesso (Fig. 37) e la purificazione tramite HPLC, sia in fase inversa che a scambio ionico, non era riuscita a fornire un prodotto con un elevato grado di purezza in quando un sottoprodotto contenente una Gly in meno in posizione 359 coeluiva esattamente con il peptide voluto.



**Fig. 37:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (340-365)HVP grezzo ottenuto con chimica Fmoc condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 40% di B in 80 min; detector, 214 nm.

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: Tos per Arg, Bzl per Ser, 2-Br-Z per Tyr, 2-Cl-Z per Lys, Boc per His. Il residuo di Met è stato introdotto come solfossido. La deprotezione del gruppo Boc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 25% TFA in DCM per 3 min e al 50% TFA in DCM per 16 min. Prima di continuare la sintesi si è provveduto a neutralizzare l'acido in eccesso

tramite due trattamenti con una soluzione al 5% DIEA in NMP. Tutte le reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* doppio utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Boc-protetto.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Boc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico dal gruppo Boc, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 1.6189 g di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 92.18%).

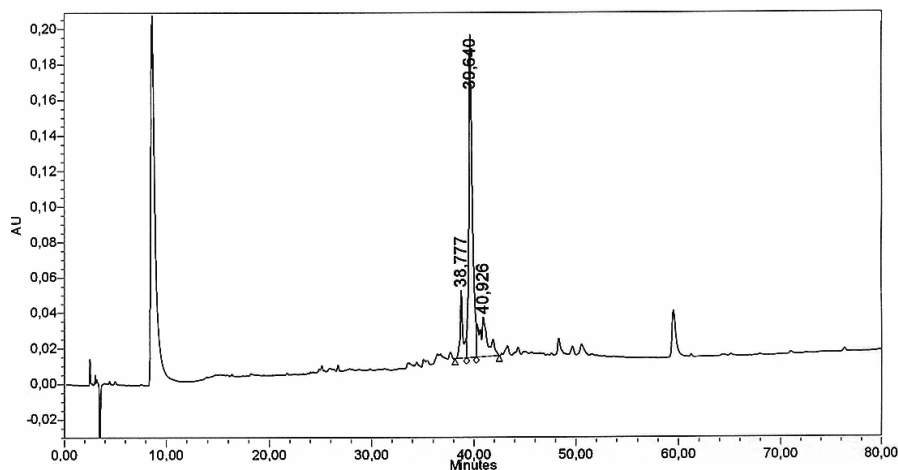
Si è deciso di sbloccare circa un terzo del peptide su resina protetto con la procedura di sblocco III (cft. pag. 57) per ottenere direttamente il peptide grezzo completamente deprotetto.

#### ***Sblocco dalla resina***

Sono stati sbloccati 564.3 mg di peptide su resina (34.86% sul totale) dalla resina e dai gruppi protettori in catena laterale seguendo la procedura di sblocco III (cft. pag. 57) e utilizzando la seguente miscela di sblocco: 0.5 mL anisolo, 0.5 mL DMS, 88.5 mg 2-mercaptopiridina, 5 mL abbondanti di HF. Data la presenza di numerose Arg(Tos) nella sequenza si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 2 ore mescolando ad una temperatura compresa tra i -5 e gli 0°C con agitatore magnetico. In seguito ad estrazione con le soluzioni acquose al 30 e al 50% di AcOH e a liofilizzazione, si sono ottenuti 333.3 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

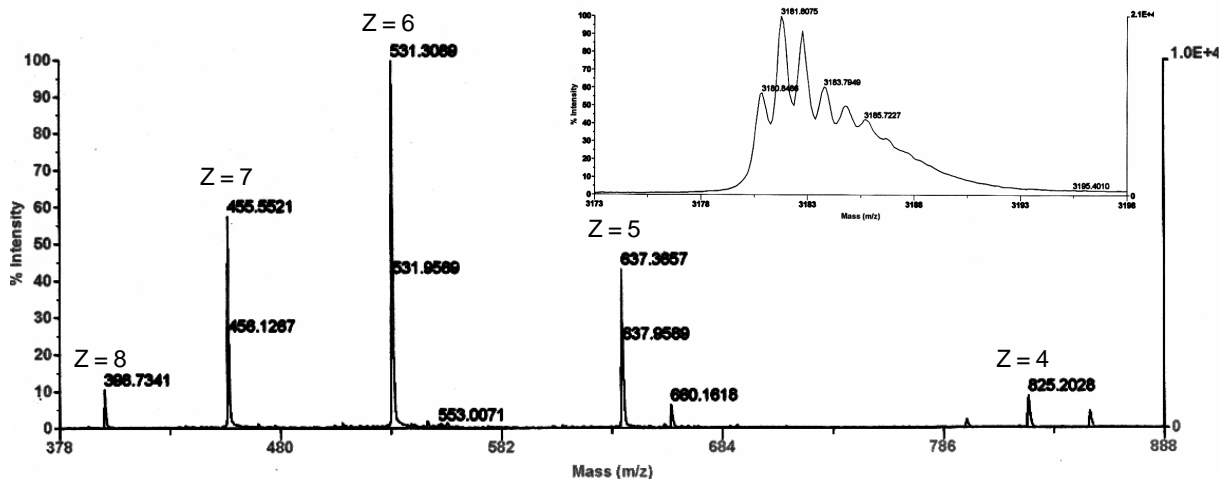
#### ***Analisi grezzo***

0.70 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 700  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, dallo 0 al 40% di B in 80 min; detector, 214 nm (Fig. 38).



**Fig. 38:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (340-365)HVP grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 40% di B in 80 min; detector, 214 nm.

È stata eseguita un'analitica semipreparativa su 200 μL di soluzione di grezzo alle medesime condizioni della corsa da 20 min fatta in precedenza ed il picco principale è stato raccolto e portato a secco in seedvac per poter poi eseguire un'analisi di massa. Quest'ultima ha confermato che il picco principale che si vede in Fig. 38 con  $t_R = 39.640$  min coincide con il peptide voluto (Fig. 39).



**Fig. 39:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig. 38 con  $t_R = 39.640$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione.

### **Purificazione**

Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in

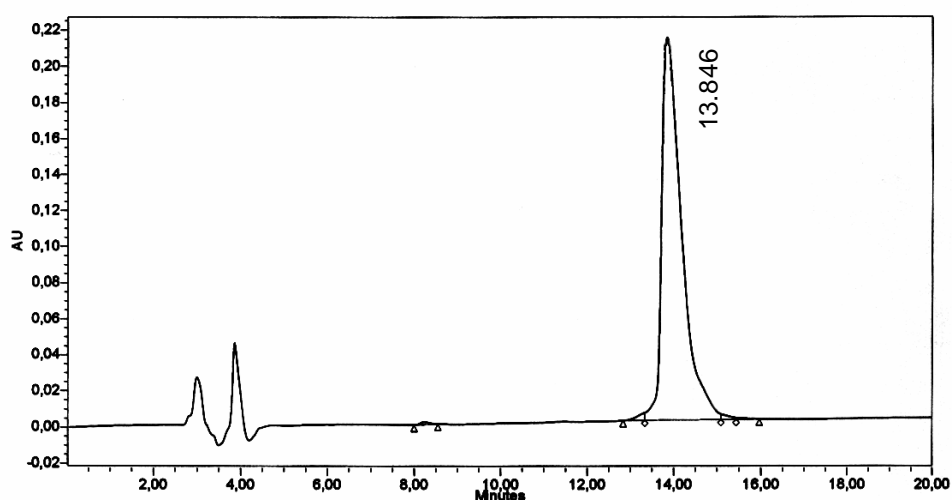


CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'8% di B in 1 min e dal 8 al 17% di B in 27 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 7.40 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 37.73 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 7.87 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95% e 15.19 mg con grado di purezza tra il 70 e il 90%.

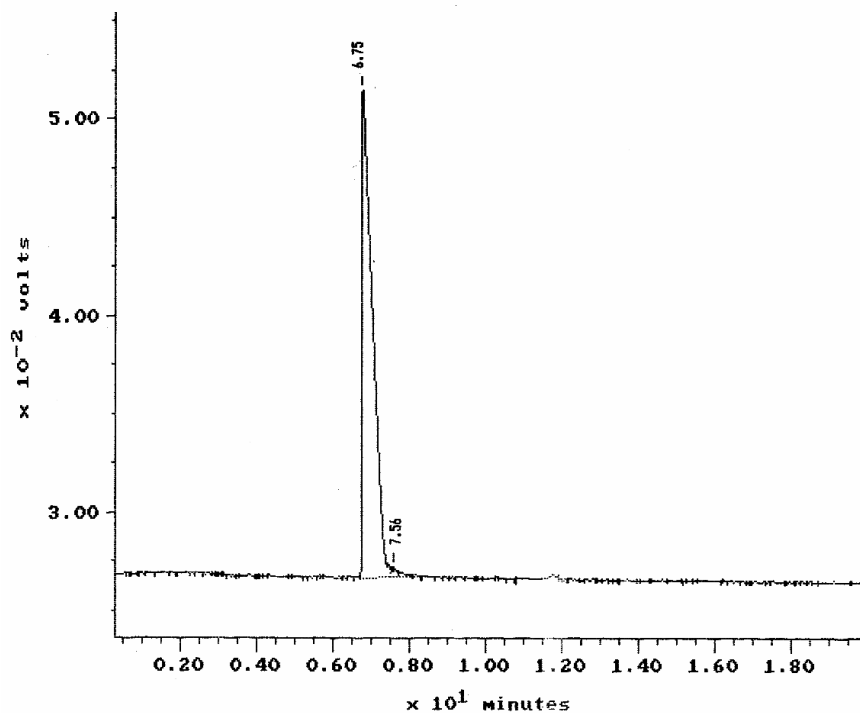
### **Caratterizzazione**

La caratterizzazione del prodotto purificato con omogeneità superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.24% (Fig. 40);
- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 98.69% (Fig. 41).



**Fig. 40:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (340-365)HVP con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 41:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (340-365)HVP con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

### **(340-352) HVP (1<sup>a</sup> sintesi)**

**Sequenza:**

**PM: 1529.88 Da**

H-Met-Ala-Pro-Arg-Pro-Ser-Leu-Ala-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-OH

### **Sintesi**

Il peptide (340-352) HVP è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina HMP (sostituzione: 0.92 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: Pmc per Arg, Trt per Gln, Boc per Lys e *t*Bu per Ser. 292.1 mg di resina HMP (0.2688 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Phe-OH e usando come agente condensante una soluzione di DCC 1 M in NMP e 0.1 equivalenti di DMAP come catalizzatore. La resa della reazione è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min.

Tutte le reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* doppio utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto.

Dato che in una precedente sintesi del medesimo peptide si erano avuti problemi al livello dell'Ala<sup>347</sup>, si è deciso di controllare la resa della reazione di *coupling* per questo residuo tramite test alla ninidrina: la resa è risultata essere del 98.1% e si è quindi deciso di continuare la sintesi.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

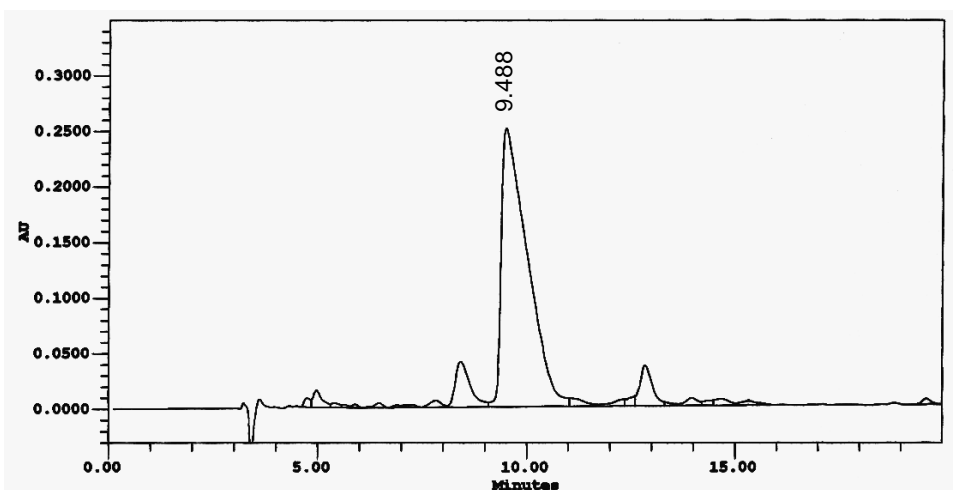
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 909.1 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 93.19%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco del peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 459.7 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

1.35 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1350  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire delle corse analitiche in RP-HPLC alle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 14 al 24% di B in 20 min; detector, 214 nm. Una prima analitica è stata fatta iniettando 10  $\mu$ L di soluzione di peptide grezzo (Fig. 42) ed una seconda è stata fatta aggiungendo ai 10  $\mu$ L di soluzione di grezzo una pari quantità di soluzione alla medesima concentrazione di peptide (340-352) HVP purificato che era disponibile in laboratorio. La coeluizione ha confermato la riuscita della sintesi.



**Fig. 42:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (340-352) HVP grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 14 al 24% di B in 20 min; detector, 214 nm.

### *Purificazione*

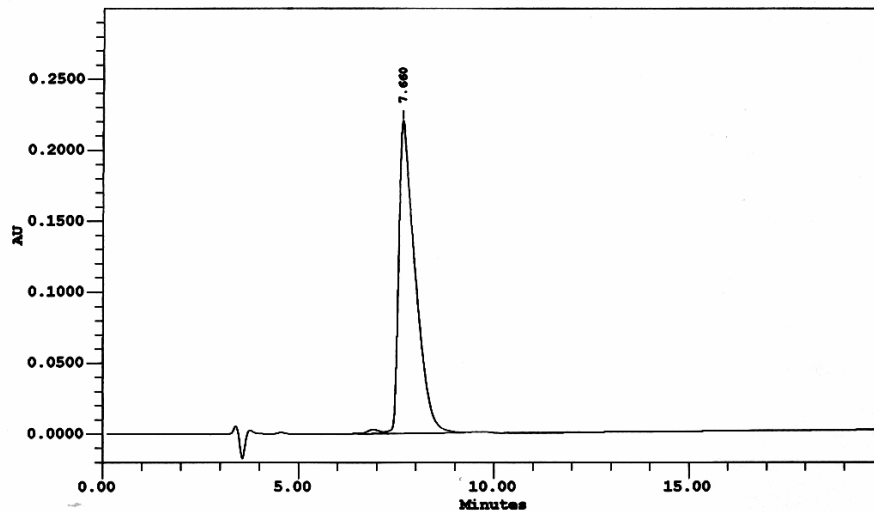
Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'8% di B in 2 min e dall'8 al 18% di B in 40 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 14 al 24% di B in 20 min; detector, 214 nm; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 294.75 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98% e 20.17 mg con grado di purezza tra il 77 e il 98%.

### *Caratterizzazione*

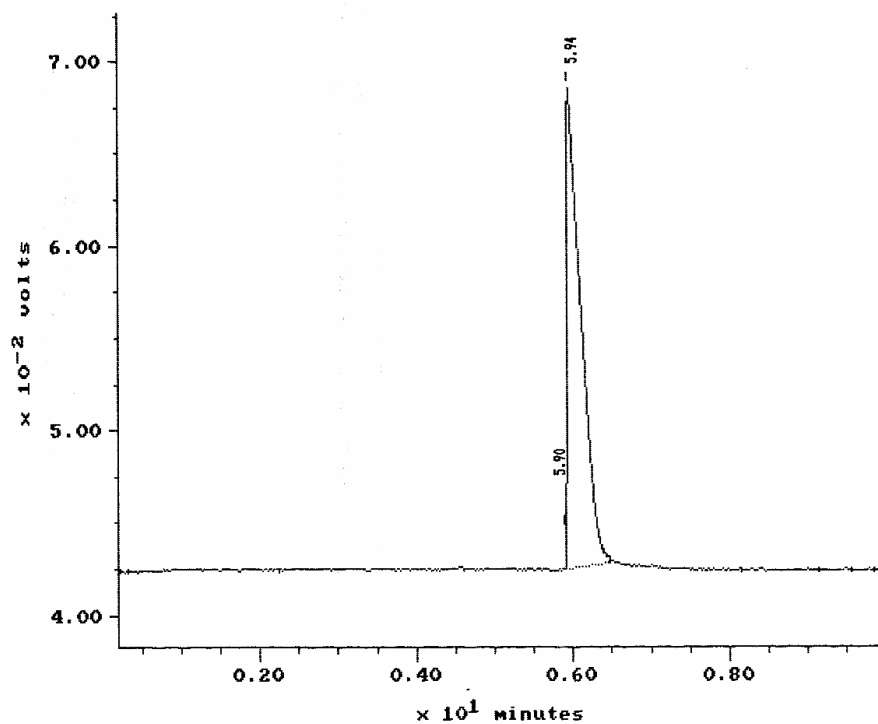
La caratterizzazione del prodotto purificato con omogeneità superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 14 al 24% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.14% (Fig. 43);

- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.37% (Fig. 44)



**Fig. 43:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (340-352) HVP con grado di omogeneità superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 14 al 24% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 44:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (340-352) HVP con grado di omogeneità superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## **(340-352) HVP (2<sup>a</sup> sintesi)**

### ***Sintesi***

Il peptide (340-352) HVP è stato sintetizzato una seconda volta utilizzando la resina super acido-labile Sasrin per ottenere il peptide protetto in catena laterale necessario per la funzionalizzazione selettiva del terminale amminico con il gruppo fluoroforo fluoresceina tramite reazione con FITC.

Il peptide è stato ottenuto tramite tecnica SPPS con chimica Fmoc e utilizzando 372.6 mg (0.2496 mmoli) di resina, già funzionalizzata con il residuo C-terminale, Fmoc-Phe-Sasrin (sostituzione: 0.67 mmoli/g). Si sono usate le stesse protezioni in catena laterale utilizzate nella prima sintesi. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. Tutte le reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* doppio utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo aver rimosso dal terminale amminico il gruppo protettore Fmoc, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 870.7 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 95.13%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di 497.0 mg di peptide su resina (57.08% sul totale ottenuto) per ottenere il peptide protetto in catena laterale, è stato realizzato seguendo la procedura di sblocco II (cft. pag. 56), ovvero trattando ripetutamente il peptide protetto su resina con una soluzione all'1% TFA in DCM e lasciandola reagire per 15 min mescolando manualmente. In seguito al quinto trattamento con acido (sblocco parziale) non si è formato nuovo precipitato all'aggiunta di acqua e si è quindi considerato concluso lo sblocco. I precipitati dei vari sblocchi parziali sono stati riuniti e seccati sotto vuoto in presenza di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e KOH; si sono ottenuti 332.67 mg di peptide grezzo protetto in catena laterale (resa della reazione di sblocco = 95.82%).

## (352-365)HVP

*Sequenza:*

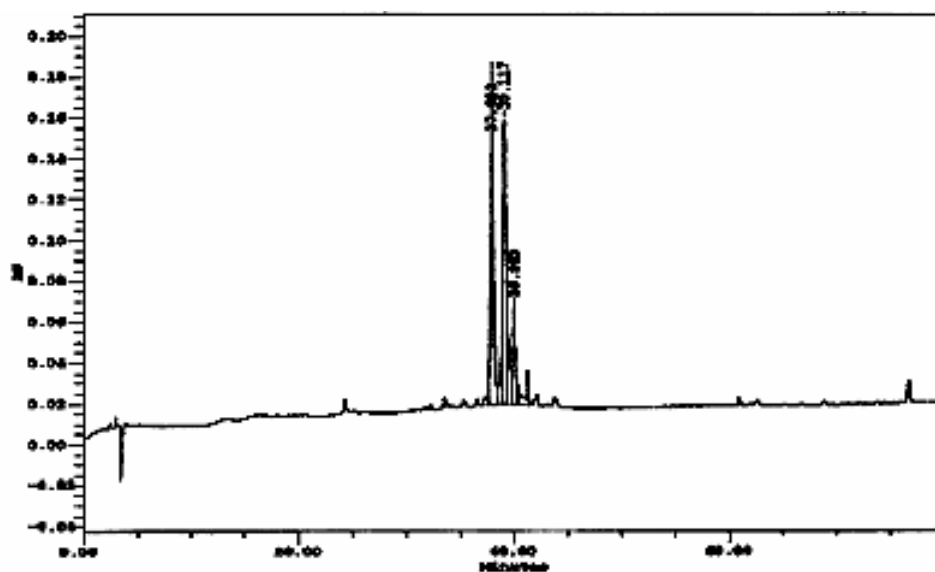
*PM: 1818.05 Da*

H-Phe-Arg-His-Arg-Asn-Arg-Lys-Gly-Tyr-Arg-Ser-Gln-Arg-Gly-OH

### *Sintesi*

Il peptide (352-365)HVP è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Boc utilizzando come supporto solido 521.4 mg (0.2503 mmoli) di resina N- $\alpha$ -Boc-Gly-PAM (sostituzione: 0.48 mmoli/g).

Si è deciso di utilizzare la chimica Boc perchè una sintesi precedente di questo peptide con chimica Fmoc aveva fornito un prodotto grezzo molto complesso (Fig. 45) e la purificazione tramite HPLC, sia in fase inversa che a scambio ionico, non era riuscita a fornire un prodotto con un elevato grado di purezza in quando un sottoprodotto contenente una Gly in meno in posizione 359 coeluiva esattamente con il peptide voluto (come nella sintesi del frammento 340-365 della vitronettina).



**Fig. 45:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-365)HVP grezzo ottenuto con chimica Fmoc condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 40% di B in 80 min; detector, 214 nm.

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: Tos per Arg, Bzl per Ser, 2-Br-Z per Tyr, 2-Cl-Z per Lys e Boc per His. La deprotezione del gruppo Boc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 25% TFA in DCM per 3 min e al 50% TFA in DCM per 16 min. Prima di continuare la sintesi si è

proceduto alla neutralizzazione dell'acido in eccesso tramite due trattamenti con una soluzione al 5% DIEA in NMP. Tutte le reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* doppio utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Boc-protetto.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Boc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 1.2508 g di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 100%).

Si è deciso di sbloccare tutto il peptide su resina con la procedura di sblocco III (cft. pag. 57) per ottenere direttamente il peptide grezzo completamente deprotetto.

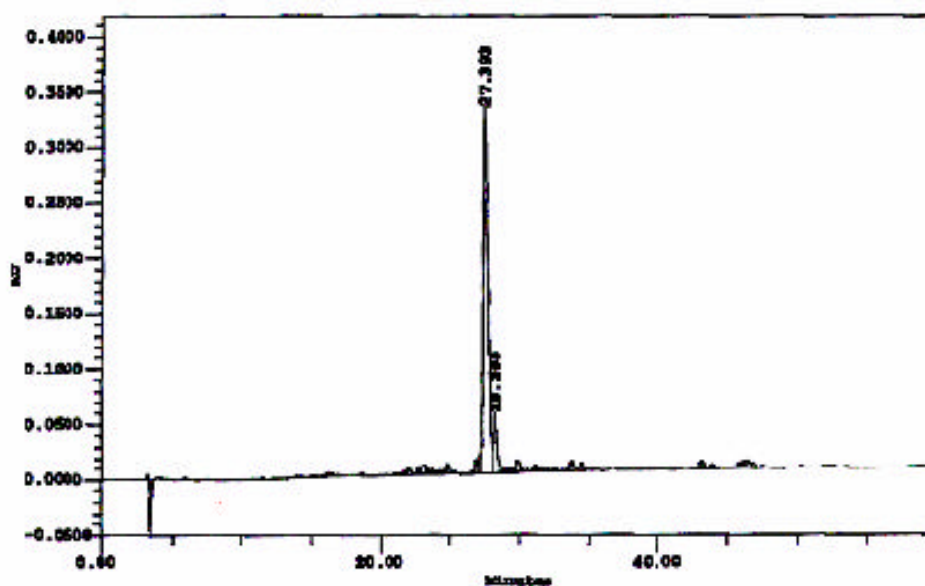
### ***Sblocco dalla resina***

Il peptide è stato sbloccato dalla resina e dalle protezioni in catena laterale seguendo la procedura di sblocco III (cft. pag. 57) e utilizzando la seguente miscela di sblocco: 1.0 mL anisolo, 1.0 mL DMS e 10 mL abbondanti di HF. Data la presenza di numerose Arg(Tos) nella sequenza si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 2 ore mescolando ad una temperatura compresa tra i -5 e gli 0°C con agitatore magnetico. In seguito ad estrazione con le soluzioni acquose al 30 e al 50% di AcOH e a liofilizzazione, si sono ottenuti 577.62 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

0.59 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 590  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, dallo 0 al 30% di B in 60 min; detector, 214 nm (Fig. 46). Una seconda analitica è stata fatta aggiungendo ai 20  $\mu$ L di soluzione di grezzo una pari quantità di soluzione alla medesima concentrazione di peptide (352-365) HVP purificato che era disponibile in laboratorio; la coeluizione è stata fatta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 7 al 17% di B in 20 min; detector, 214 nm; ed ha confermato la riuscita della sintesi.





**Fig. 46:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-365)HVP grezzo (ottenuto con chimica Boc) condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 30% di B in 60 min; detector, 214 nm.

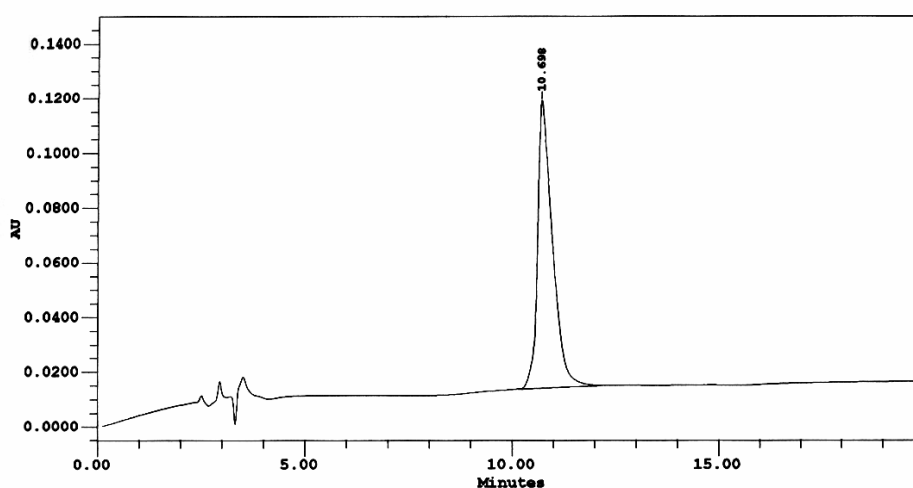
### ***Purificazione***

444.3 mg di grezzo sono stati purificati tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> SP (5 μm, 300 Å, 10 × 250 mm); flusso, 3.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 4% di B in 3 min e dal 4 al 12% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 7 al 17% di B in 20 min; detector, 214 nm; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 15.97 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC del 100%, 158.14 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 16.32 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98% e 4.07 mg con grado di purezza tra l'85 e il 95%.

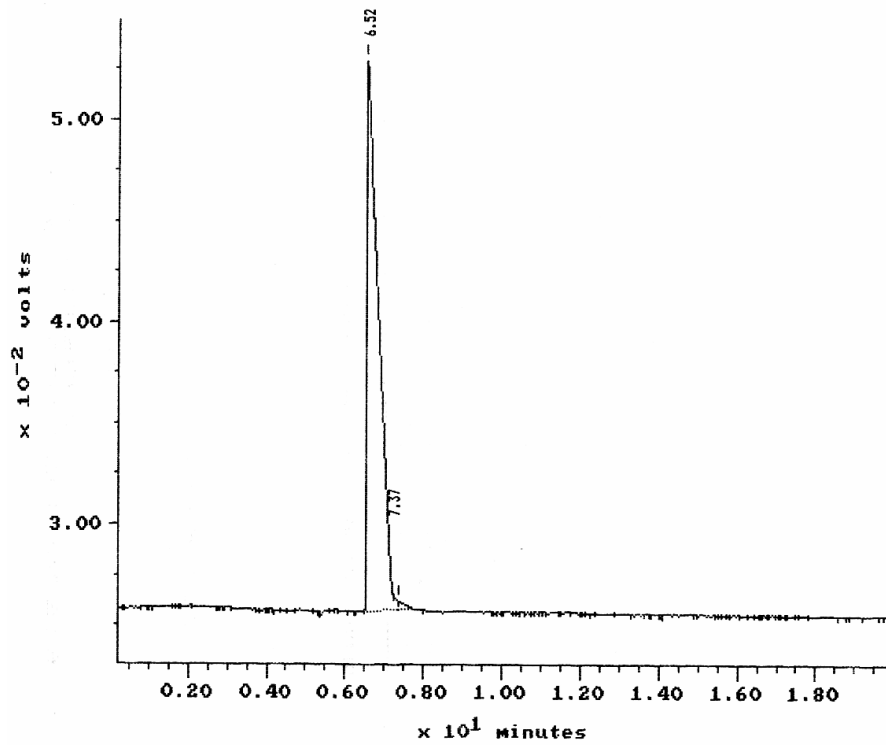
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione del prodotto purificato con omogeneità del 100% in HPLC è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

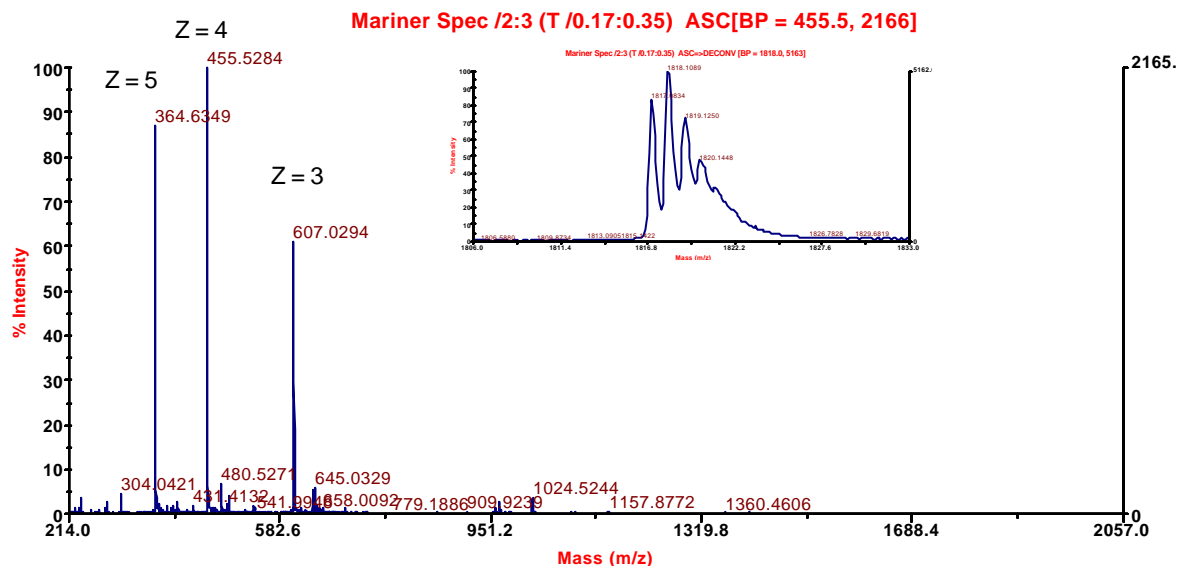
- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 7 al 17% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 47);
- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.27% (Fig. 48).
- spettrometria di massa: è stata eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1818.1 Da in seguito a deconvoluzione (Fig. 49).



**Fig. 47:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (352-365)HVP con grado di purezza pari al 100% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 7 al 17% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 48:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (352-365)HVP con grado di purezza pari al 100% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 49:** Analisi di massa della riunione delle frazioni del peptide (352-365)HVP con grado di purezza pari al 100% eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione che ha fornito un valore di massa pari a 1818.1 Da.

## **(352-360) HVP**

*Sequenza:*

*PM: 1233.41 Da*

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

### *Sintesi*

Il peptide (352-360) HVP è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc utilizzando come supporto solido 361.4 mg (0.2494 mmoli) di resina Fmoc-Tyr(*t*Bu)-Sasrin (sostituzione: 0.69 mmoli/g).

Dato che si vuole sintetizzare anche l'analogo ciclico, si è utilizzata la resina super acido-labile Sasrin per ottenere il peptide protetto in catena laterale necessario per la reazione di ciclizzazione.

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Tyr, Boc per Lys, Pmc per Arg e Trt per Asn e His.

La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. Dato che la sintesi del frammento più lungo, (352-365) HVP, con chimica Fmoc aveva creato dei problemi, si è deciso di monitorare, tramite test alla ninidrina, la resa di ogni reazione di condensazione eseguita in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. Tutte le reazioni di *coupling* singolo hanno avuto rese superiori al 99% e quindi non è stato necessario eseguire *coupling* doppi o cambiare reagenti di condensazione per aumentare le rese di reazione.

Al termine della sintesi il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 751.2 mg di peptide su resina protetto in catena laterale e al terminale amminico con il gruppo Fmoc (resa della reazione di sintesi = 77.53%).

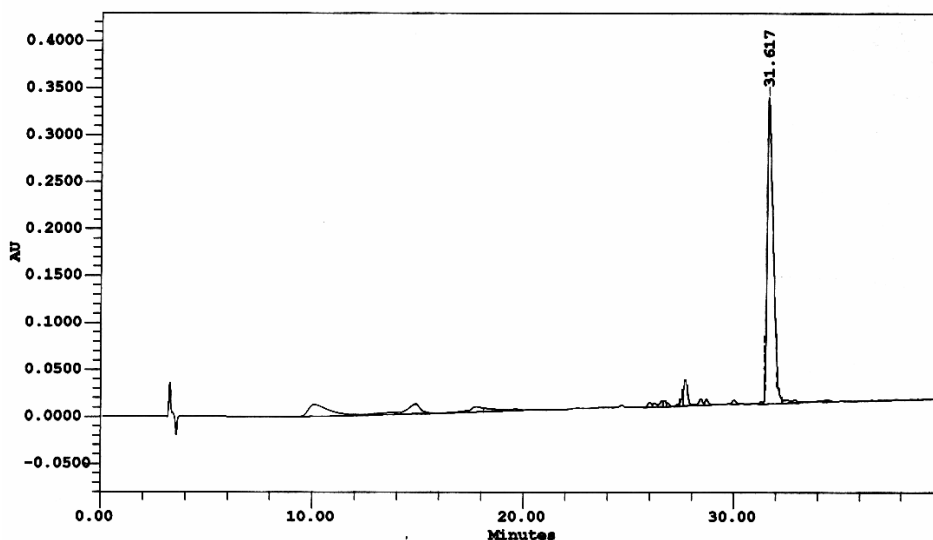
Si è deciso di sbloccare circa un terzo del peptide su resina protetto con la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) per ottenere direttamente il peptide grezzo sbloccato dalle protezioni in catena laterale e il resto con la procedura di sblocco II (cft. pag. 56) in previsione della reazione di ciclizzazione.

### ***Sblocco dalla resina***

251.8 mg di peptide protetto su resina (33.52% sul totale) sono stati deprotetti dal gruppo Fmoc N-terminale tramite procedura automatizzata sul sintetizzatore. Successivamente il peptide è stato sbloccato dalla resina e dai gruppi protettori in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 1 (0.25 mL EDT, 0.5 mL H<sub>2</sub>O, 0.5 mL tioanisolo, 0.75 g fenolo, 10 mL TFA): data la presenza di numerose Arg(Pmc) si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 104.16 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

0.34 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 340 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dallo 0 al 20% di B in 40 min; detector, 214 nm (Fig. 50).



**Fig. 50:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360) HVP grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 20% di B in 40 min; detector, 214 nm.

### ***Purificazione***

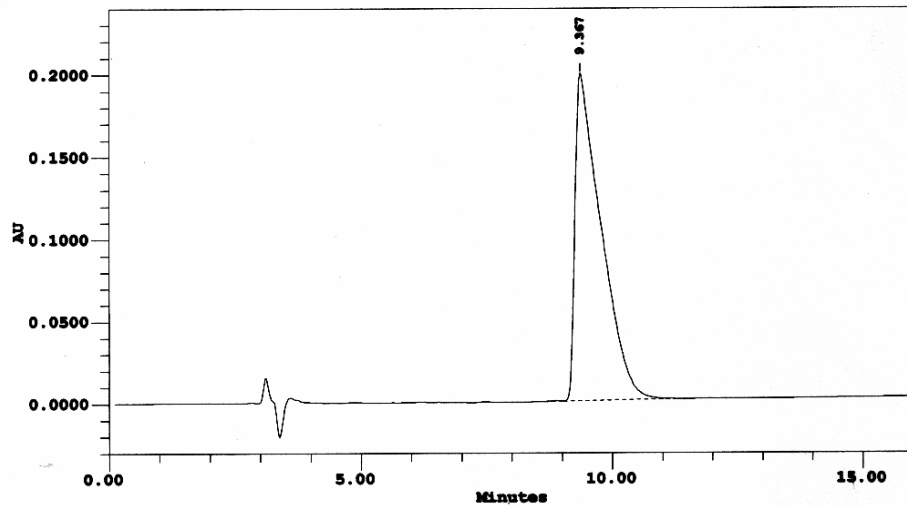
Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 µm, 100 Å, 7.8 × 300

mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 5% di B in 1 min e dal 5 al 13% di B in 24 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 9 al 19% di B in 20 min; detector, 214 nm; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 31.74 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 20.08 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 10.76 mg con grado di purezza tra il 93 e il 95%, 9.79 mg con grado di purezza tra l'80 e il 93% e 4.43 mg con grado di purezza tra il 60 e l'80%.

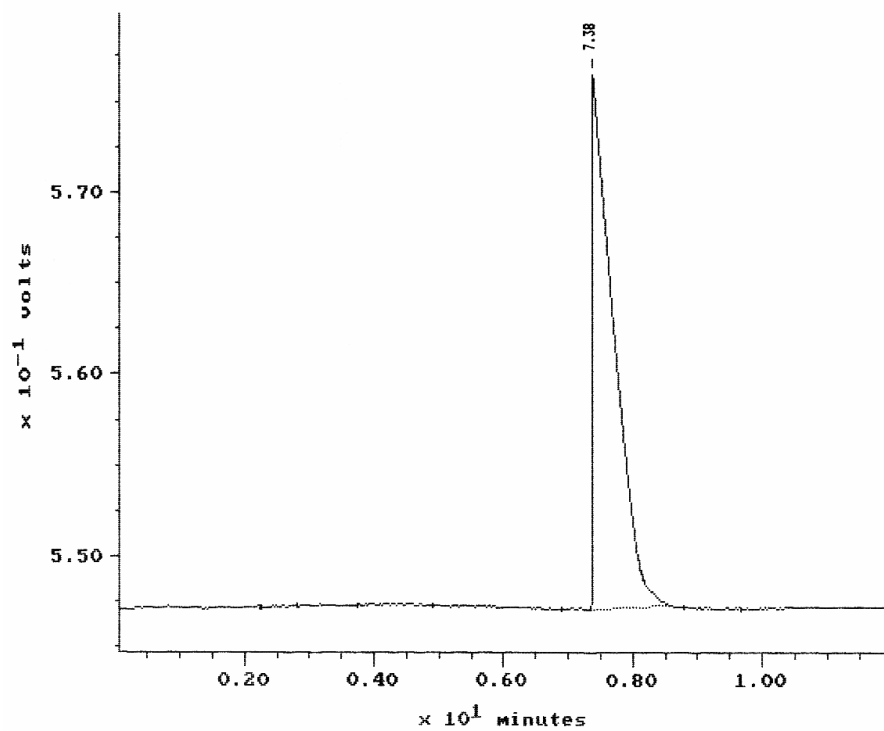
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione del prodotto purificato con omogeneità superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

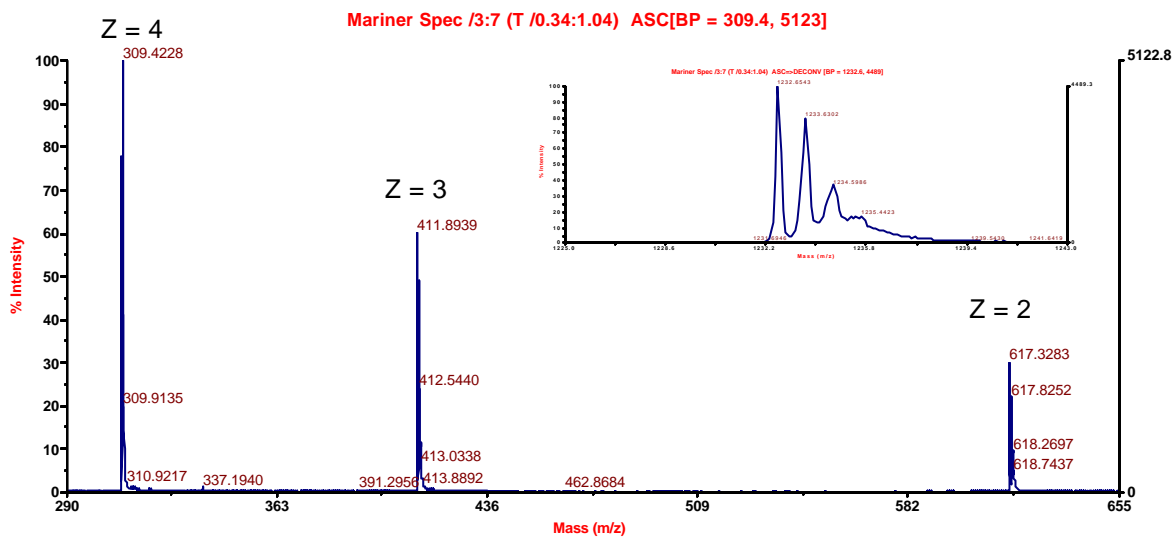
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita delle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 9 al 17% di B in 16 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.91% (Fig. 51);
- elettroforesi capillare eseguita delle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 52)
- spettrometria di massa: è stata eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1232.6 Da in seguito a deconvoluzione (Fig. 53).



**Fig. 51:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  analitica ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $300\ \text{\AA}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ); flusso,  $1.0\ \text{mL/min}$ ; eluente A,  $0.05\%$  TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B,  $0.05\%$  TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dal 9 al 17% di B in 16 min; detector,  $214\ \text{nm}$ .



**Fig. 52:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di  $72\ \text{cm}$ ; temperatura,  $30^\circ\text{C}$ ; voltaggio,  $15\ \text{kV}$ ; detector,  $214\ \text{nm}$ ; tampone, sodio citrato  $20\ \text{mM}$ ,  $\text{pH}\ 2.5$ .

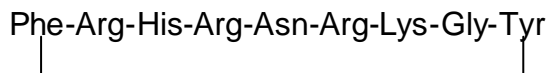


**Fig. 53:** Analisi di massa della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP con grado di purezza superiore al 98% eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione che ha fornito un valore di massa pari a 1232.6 Da.

### (352-360) HVP ciclico

*Sequenza:*

*PM: 1215.39 Da*



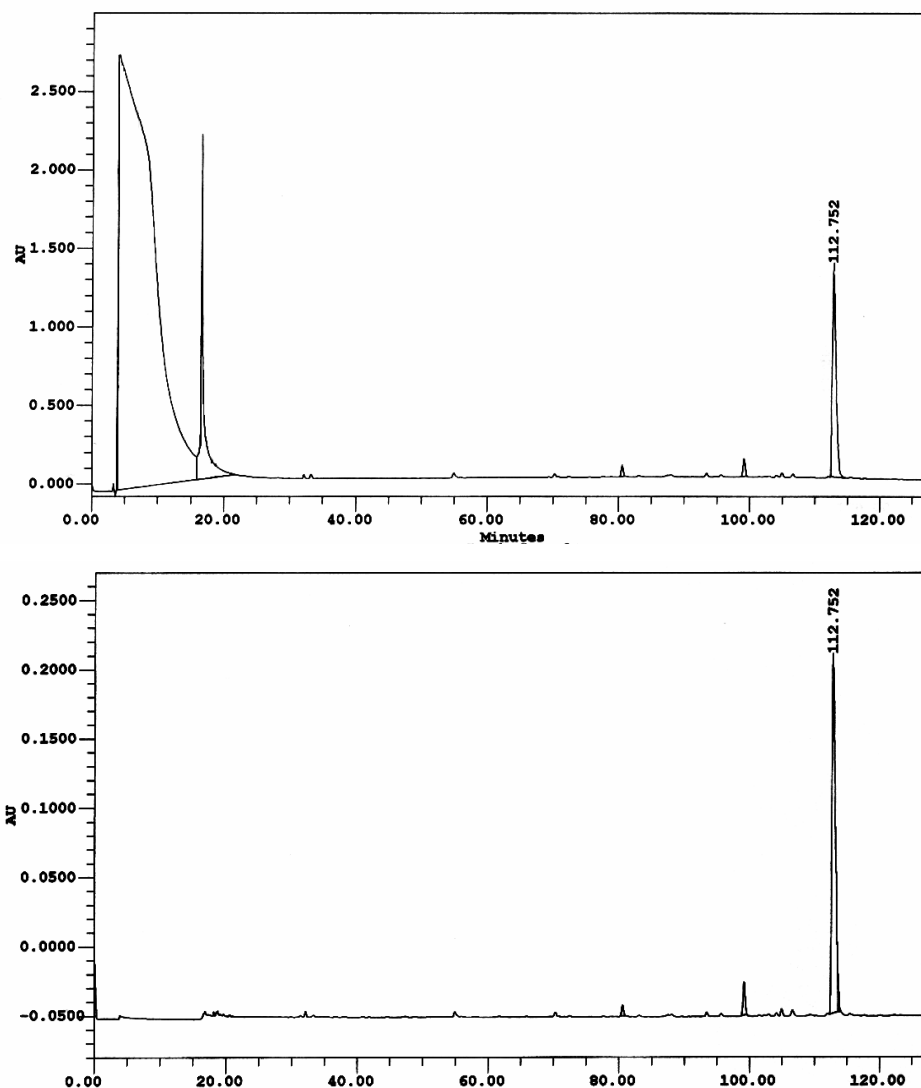
#### *Sblocco dalla resina*

Ciò che restava del peptide protetto su resina dalla sintesi del peptide (352-360) HVP, 499.4 mg (66.48% sul totale), è stato trattato ripetutamente con una soluzione all'1% TFA in DCM (procedura di sblocco II, cft. pag. 56) per ottenere il peptide protetto in catena laterale e al terminale amminico. In seguito al quarto trattamento con acido non si è formato nuovo precipitato all'aggiunta di acqua e si è quindi considerato concluso lo sblocco. I precipitati dei vari sblocchi parziali sono stati riuniti e seccati sotto vuoto in presenza di  $P_2O_5$  e KOH; si sono ottenuti 294.3 mg di peptide grezzo protetto (resa della reazione di sblocco = 61.30%).

0.34 mg di peptide protetto sono stati sciolti con 150  $\mu$ L di DMF; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $H_2O$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $CH_3CN$ ; iniezione, 10  $\mu$ L;

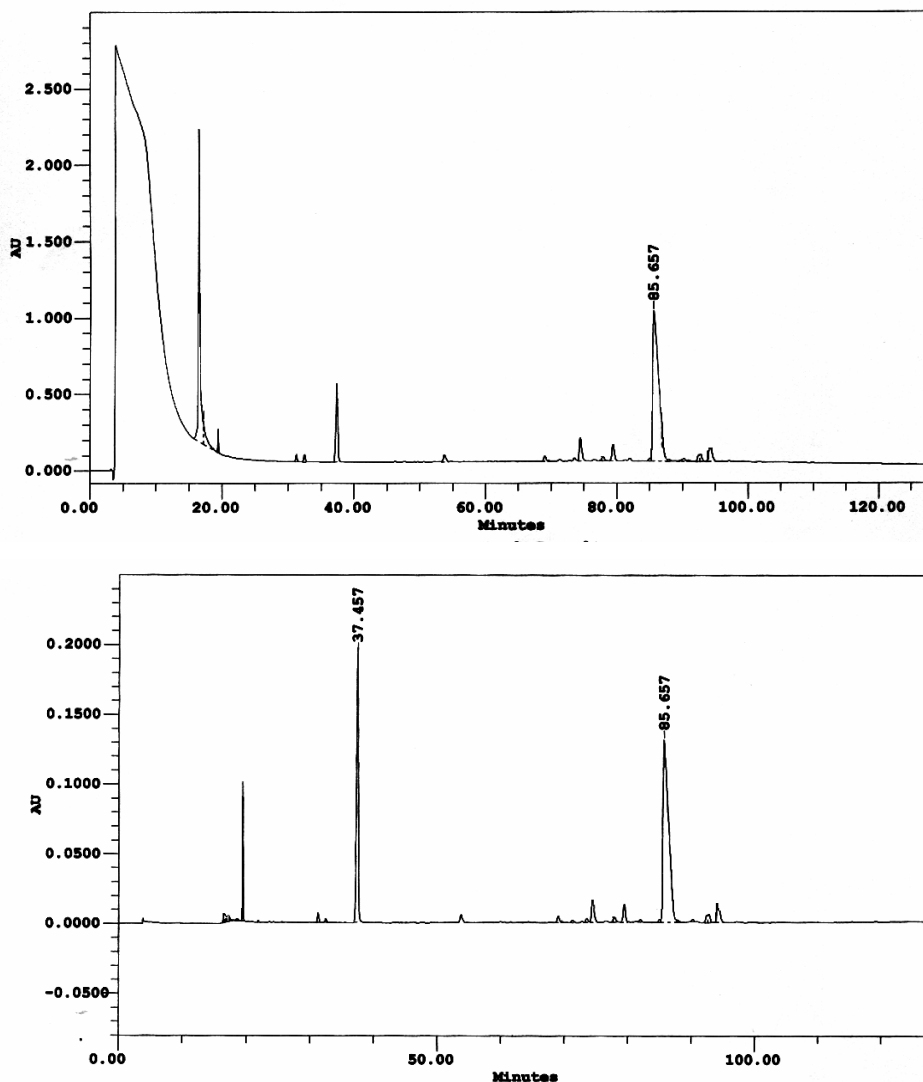


gradiente, 0% di B per 7 min, dallo 0 al 40% di B in 1 min, dal 40 al 100% di B in 120 min; detector, 214nm e 264 nm ( $\lambda$  a cui assorbe il gruppo Fmoc) (Fig. 54).



**Fig. 54:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360)HVP protetto in catena laterale ed al terminale amminico condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10  $\mu$ L; gradiente, 0% di B per 7 min, dallo 0 al 40% di B in 1 min, dal 40 al 100% di B in 120 min; detector, 214 nm (in alto) e 264 nm (in basso).

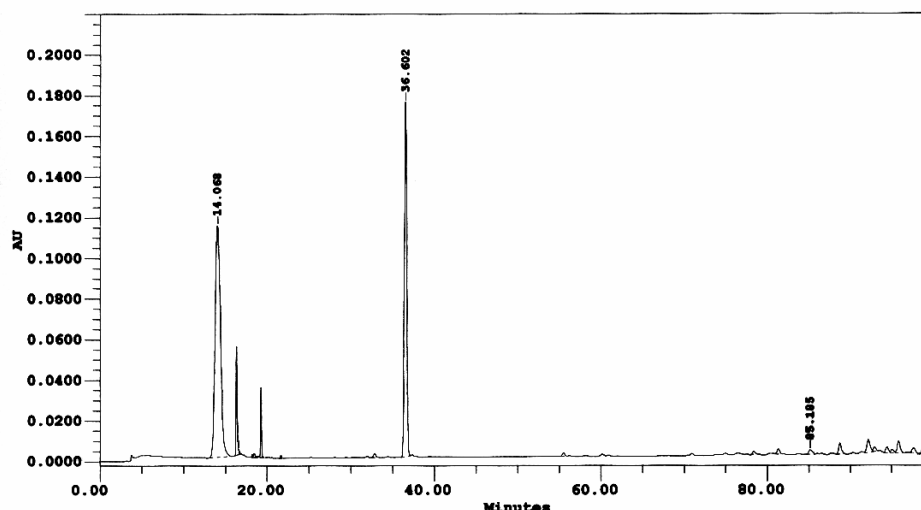
201.3 mg di peptide protetto (0.070 mmoli) sono stati trattati per 2 ore con 10 mL di una soluzione al 10% DEA in DMF mescolando con agitatore magnetico per rimuovere il gruppo Fmoc dal terminale amminico. È stata eseguita una corsa analitica iniettando 5  $\mu$ L di soluzione nelle medesime condizioni utilizzate per l'analisi del peptide protetto al fine di verificare il distacco del gruppo Fmoc (Fig. 55). La soluzione contenente il peptide protetto in catena laterale è stata portata a secco per eliminare il solvente e la DEA.



**Fig. 55:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360) HVP protetto in catena laterale condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  analitica ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $300\ \text{\AA}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ); flusso,  $1.0\ \text{mL/min}$ ; eluente A,  $0.05\%$  TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B,  $0.05\%$  TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; iniezione,  $5\ \mu\text{L}$ ; gradiente,  $0\%$  di B per  $7\ \text{min}$ , dallo  $0$  al  $40\%$  di B in  $1\ \text{min}$ , dal  $40$  al  $100\%$  di B in  $120\ \text{min}$ ; detector,  $214\ \text{nm}$  (in alto) e  $264\ \text{nm}$  (in basso).

### *Ciclizzazione*

$0.070\ \text{mmoli}$  di peptide protetto in catena laterale sono stati sciolti in  $100\ \text{mL}$  di DMF contenenti  $1.5$  equivalenti di HOAt ( $14.29\ \text{mg}$ ),  $1.5$  equivalenti di HATU ( $39.92\ \text{mg}$ ) e  $3$  equivalenti di DIEA ( $36.6\ \mu\text{L}$ ). La miscela è stata mescolata a temperatura ambiente con agitatore magnetico e il completamento della reazione è stato confermato tramite cromatografia in fase inversa iniettando  $10\ \mu\text{L}$  di soluzione prelevati dopo  $2$  ore di reazione ed eseguendo una analitica nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  analitica ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $300\ \text{\AA}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ); flusso,  $1.0\ \text{mL/min}$ ; eluente A,  $0.05\%$  TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B,  $0.05\%$  TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente,  $0\%$  di B per  $7\ \text{min}$ , dallo  $0$  al  $40\%$  di B in  $1\ \text{min}$ , dal  $40$  all' $86\%$  di B in  $92\ \text{min}$ ; detector,  $214\ \text{nm}$  e  $264\ \text{nm}$  (Fig. 56).



**Fig. 56:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360) HVP ciclico protetto in catena laterale condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, 0% di B per 7 min, dallo 0 al 40% di B in 1 min, dal 40 all'86% di B in 92 min; detector, 264 nm

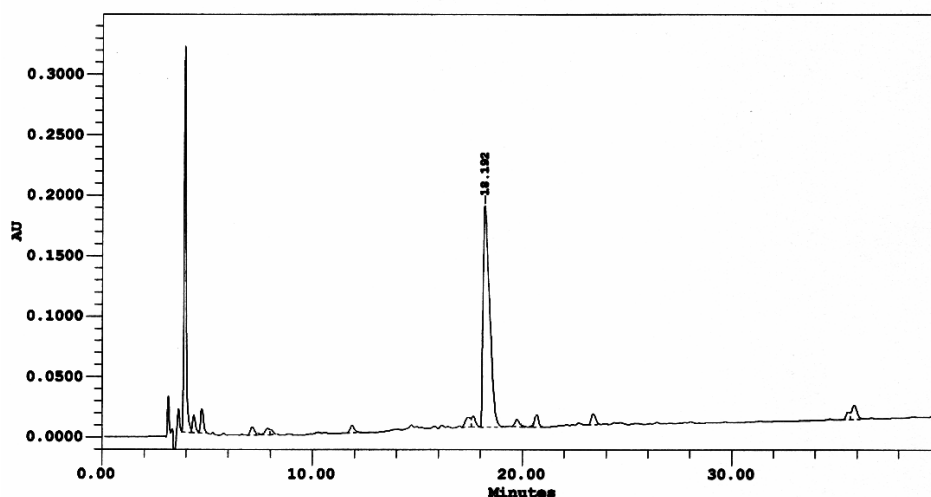
Al termine della reazione di ciclizzazione la soluzione è stata concentrata a piccolo volume in rotavapor ed il peptide ciclico protetto in catena laterale è stato precipitato con H<sub>2</sub>O fredda, filtrato con gooch G4 e portato a secco in sotto vuoto in presenza di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Si sono ottenuti 176.97 mg di peptide ciclico protetto in catena laterale (resa della reazione di ciclizzazione = 94.57%).

#### ***Sblocco dalle protezioni in catena laterale***

Tutto il peptide ciclico protetto ottenuto è stato sbloccato dalle protezioni in catena laterale utilizzando la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 1 (0.25 mL EDT, 0.5 mL H<sub>2</sub>O, 0.5 mL tioanisolo, 0.75 g fenolo, 10 mL TFA): data la presenza di numerose Arg(Pmc) si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 141.62 mg di peptide ciclico grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

#### ***Analisi grezzo***

0.20 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 200 μL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10 μL; gradiente, dal 10 al 30% di B in 40 min; detector, 214 nm (Fig. 57).



**Fig. 57:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360)HVP ciclico grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 10 al 30% di B in 40 min; detector, 214 nm.

### *Purificazione*

Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa alle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 µm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 7% di B in 1 min e dal 7 al 17% di B in 30 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 30.23 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 4.46 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 3.49 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95%, 5.78 mg con grado di purezza tra il 70 e il 90% e 9.09 mg con grado di purezza tra il 50 e il 70%.

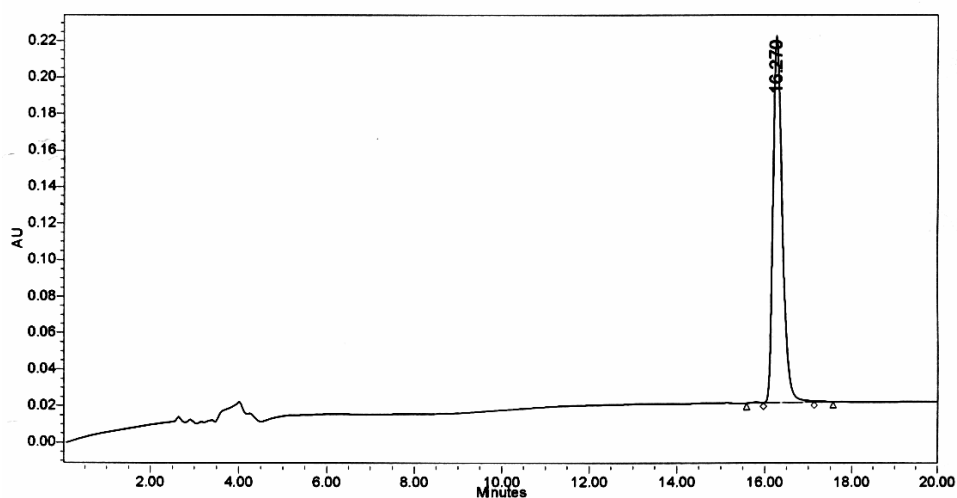
### *Caratterizzazione*

La caratterizzazione del prodotto purificato con omogeneità superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

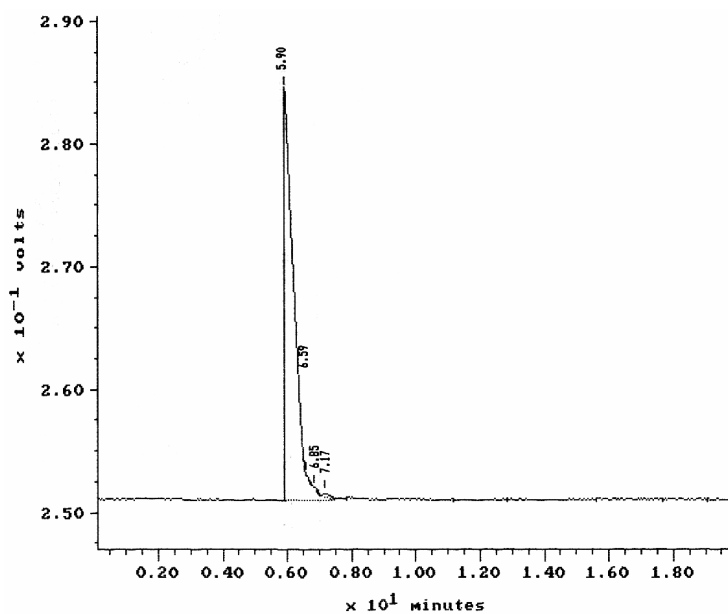
- cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA

in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.49% (Fig. 58);

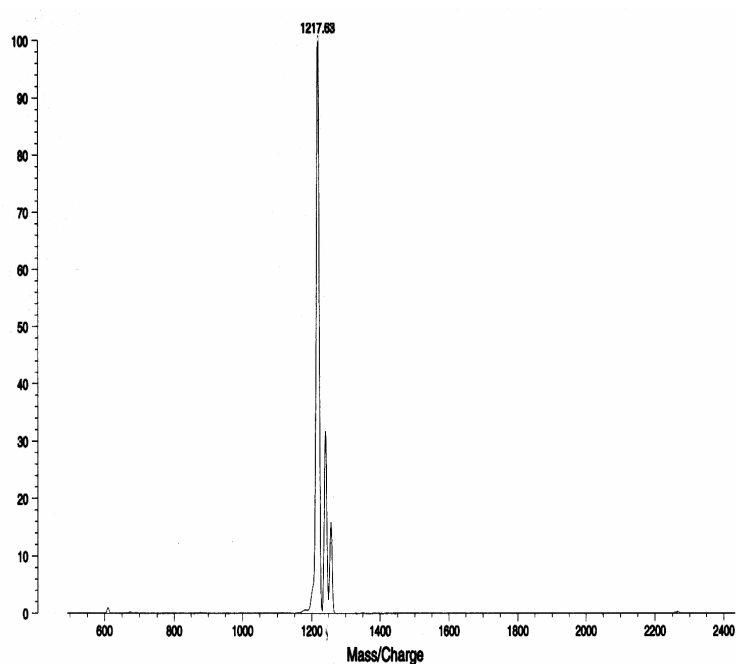
- elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.25% (Fig. 59).
- spettrometria di massa: è stata eseguita con uno strumento MALDI-TOF (Kratos Analytical Compact Maldi I). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1217.6 Da (Fig. 60).



**Fig. 58:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP ciclico con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 59:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP ciclico con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 60:** Analisi di massa della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP ciclico con grado di purezza superiore al 98% eseguita con uno strumento MALDI-TOF. L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1217.6 Da.

### **(352-360)HVP ammido terminale**

**Sequenza:**

**PM: 1232.43 Da**

H-Phe-Arg-His-Arg-Asn-Arg-Lys-Gly-Tyr-NH<sub>2</sub>

#### **Sintesi**

Il peptide (352-360)HVP ammido terminale è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc utilizzando come supporto solido 1.1378 g (0.2503 mmoli) di resina Sieber Amide (sostituzione: 0.22 mmoli/g). Con questa resina è possibile ottenere il peptide ammido terminale e protetto in catena laterale da utilizzare nella funzionalizzazione specifica covalente di idrogeli di alginato.

Sono state utilizzate le stesse protezioni in catena laterale impiegate nella sintesi del peptide (352-360) HVP. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. La funzionalizzazione della resina è stata fatta tramite *coupling* doppio mentre tutte le reazioni di condensazione successive sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di

DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%.

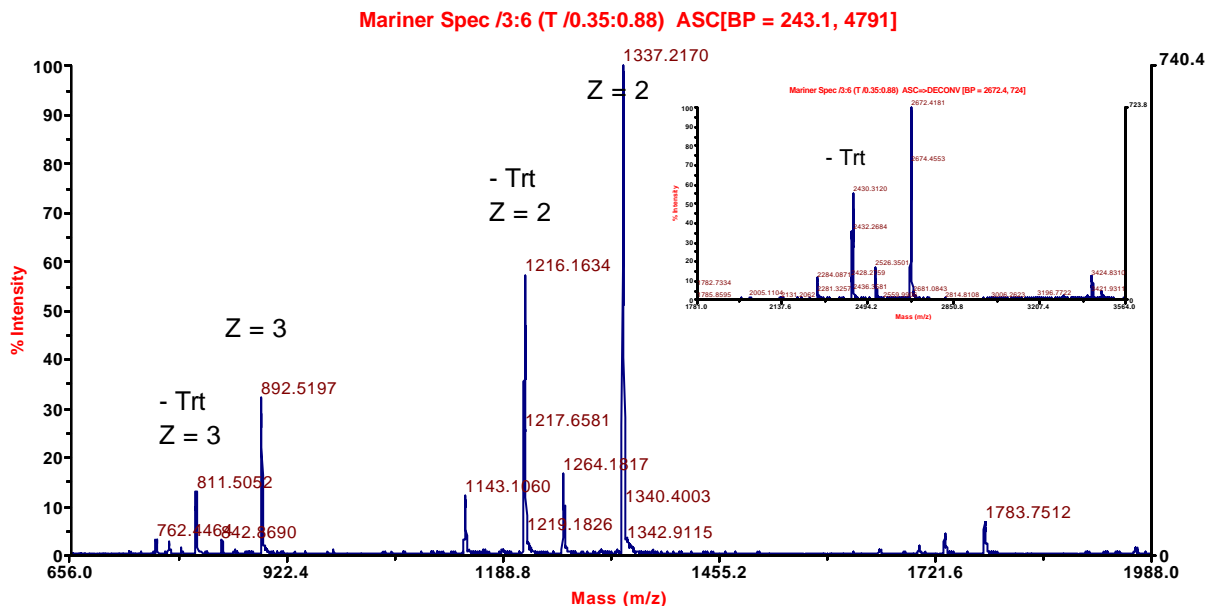
Al termine della sintesi il peptide su resina protetto è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 1.8919 g di peptide su resina protetto in catena laterale e al terminale amminico con il gruppo Fmoc (resa della reazione di sintesi = 100%).

Si è deciso di sbloccare circa metà del peptide su resina protetto dal gruppo Fmoc N-terminale e dalla resina tramite la procedura di sblocco II (cft. pag. 56) per ottenere il peptide grezzo protetto in catena laterale.

### ***Sblocco dalla resina***

890.4 mg di peptide protetto su resina (47.06% sul totale) sono stati deprotetti dal gruppo Fmoc N-terminale tramite procedura automatizzata sul sintetizzatore. Successivamente il peptide protetto è stato sbloccato dalla resina utilizzando la procedura di sblocco II (cft. pag. 56), ovvero trattando ripetutamente il peptide protetto su resina con una soluzione all'1% TFA in DCM e lasciandola reagire per 15 min mescolando manualmente. In seguito al sesto trattamento con acido non si è formato nuovo precipitato all'aggiunta di acqua e si è quindi considerato concluso lo sblocco. I precipitati dei vari sblocchi parziali sono stati riuniti e seccati sotto vuoto in presenza di  $P_2O_5$  e KOH; si sono ottenuti 320.67 mg di peptide grezzo protetto in catena laterale (resa della reazione di sblocco = 100%).

L'analisi di massa del prodotto grezzo ha confermato la buona riuscita della sintesi: come si può vedere dalla deconvoluzione (Fig. 61), il grezzo è costituito principalmente dal peptide protetto voluto (PM = 2672.4 Da) e da un sottoprodotto, con valore di massa pari a 2430.3 Da, dovuto al distacco di un gruppo protettore Trt in catena laterale durante la fase di sblocco dalla resina.



**Fig. 61:** Analisi di massa del peptide grezzo protetto (352-360)HVP ammido terminale eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione da cui risulta che la componente principale corrisponde al peptide protetto voluto (PM = 2672.4 Da) mentre il sottoprodotto più abbondante, con valore di massa pari a 2430.3 Da, corrisponde al peptide protetto ma con un gruppo protettore Trt in catena laterale in meno.

### (352-360)HVP Sc

**Sequenza:**

**PM: 1233.41 Da**

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

### Sintesi

Il peptide (352-360)HVP Sc è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc utilizzando come supporto solido 331.4 mg (0.2552 mmoli) di resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang (sostituzione: 0.77 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Tyr, Boc per Lys, Pmc per Arg e Trt per Asn e His. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. In base ai dati della sintesi del peptide (352-360) HVP, si è deciso di eseguire tutti *coupling* singoli utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.



Al termine della sintesi, il peptide su resina, deprotetto dal gruppo Fmoc N-terminale, è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 824.7 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 92.24%).

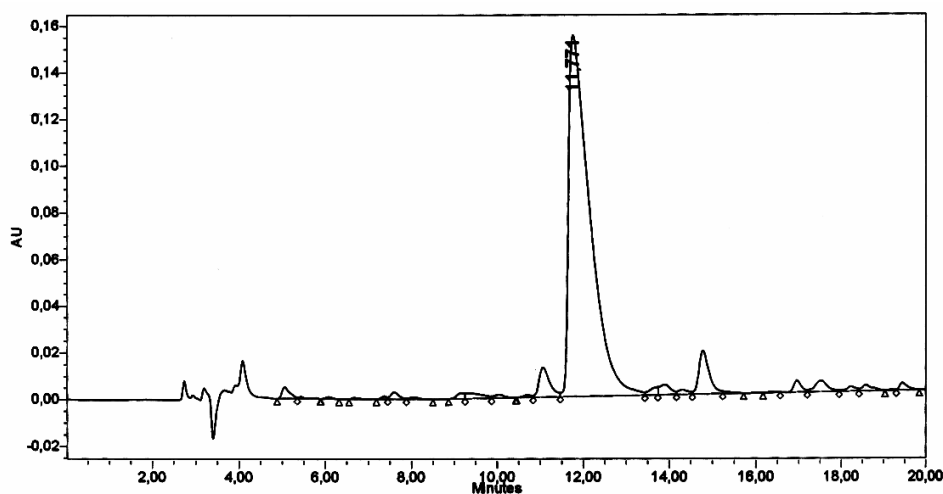
Si è deciso di sbloccare solo parte del peptide su resina con la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) per ottenere direttamente il peptide grezzo sbloccato dalle protezioni in catena laterale.

### ***Sblocco dalla resina***

340.4 mg di peptide su resina (41.28% sul totale) sono stati sbloccati dalla resina e dai gruppi protettori in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL H<sub>2</sub>O, 0.25 mL TES, 0.75 g fenolo, 9.5 mL TFA): data la presenza di numerose Arg(Pmc) si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 157.74 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

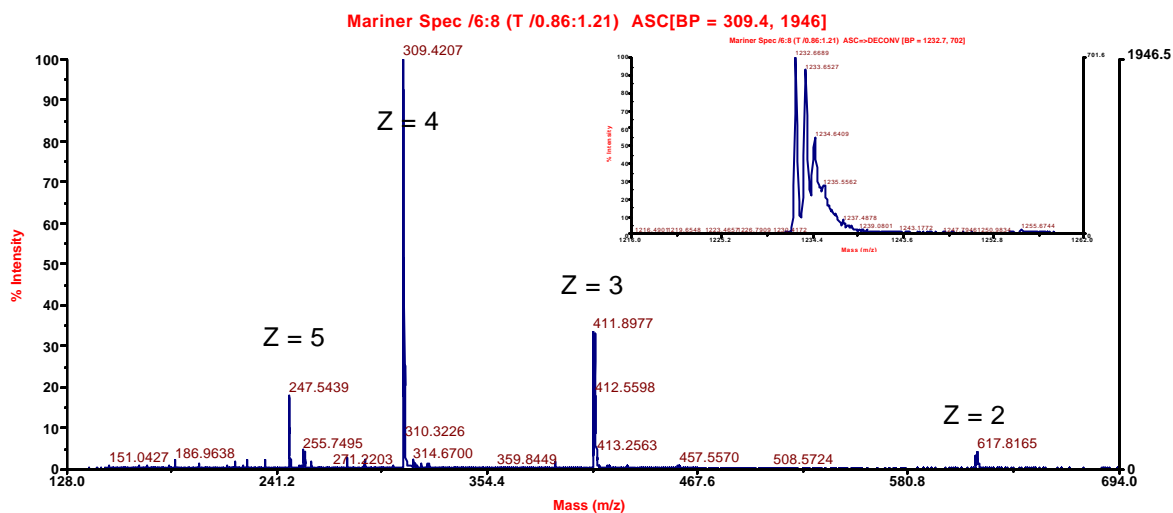
### ***Analisi grezzo***

0.36 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 360 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 62).



**Fig. 62:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360)HVP Sc grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa precedente. L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig. 62 con  $t_R = 11.771$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 63).



**Fig. 63:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig. 62 con  $t_R = 11.771$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

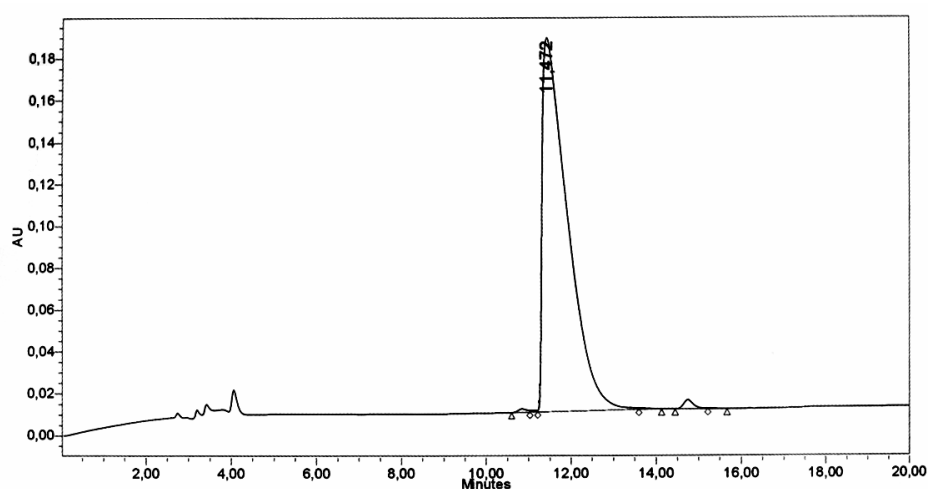
### Purificazione

Tutto il grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  SP ( $5 \mu\text{m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ ,  $10 \times 250$  mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dallo 0 al 3% di B in 1 min e dal 3 al 13% di B in 30 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo; le frazioni con omogeneità inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 39.46 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 35.45 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95%, 19.08 mg con grado di purezza tra l'80 e il 90% e 26.34 mg con grado di purezza tra il 60 e l'80%.

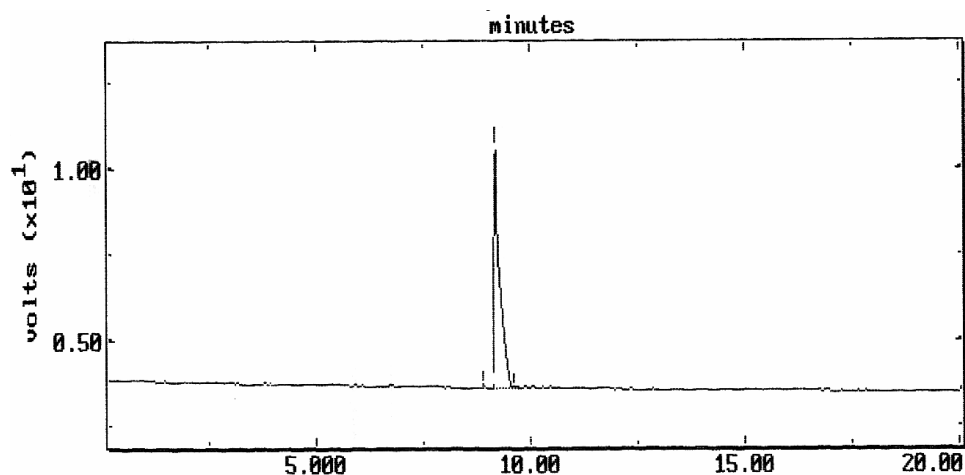
### Caratterizzazione

La caratterizzazione del prodotto purificato con omogeneità superiore al 98% è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.45% (Fig. 64);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.04% (Fig. 65).



**Fig. 64:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP Sc con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 65:** Elettroforesi capillare della riunione delle frazioni del peptide (352-360)HVP Sc con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## **(GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato**

### **Attacco fluoresceina 1**

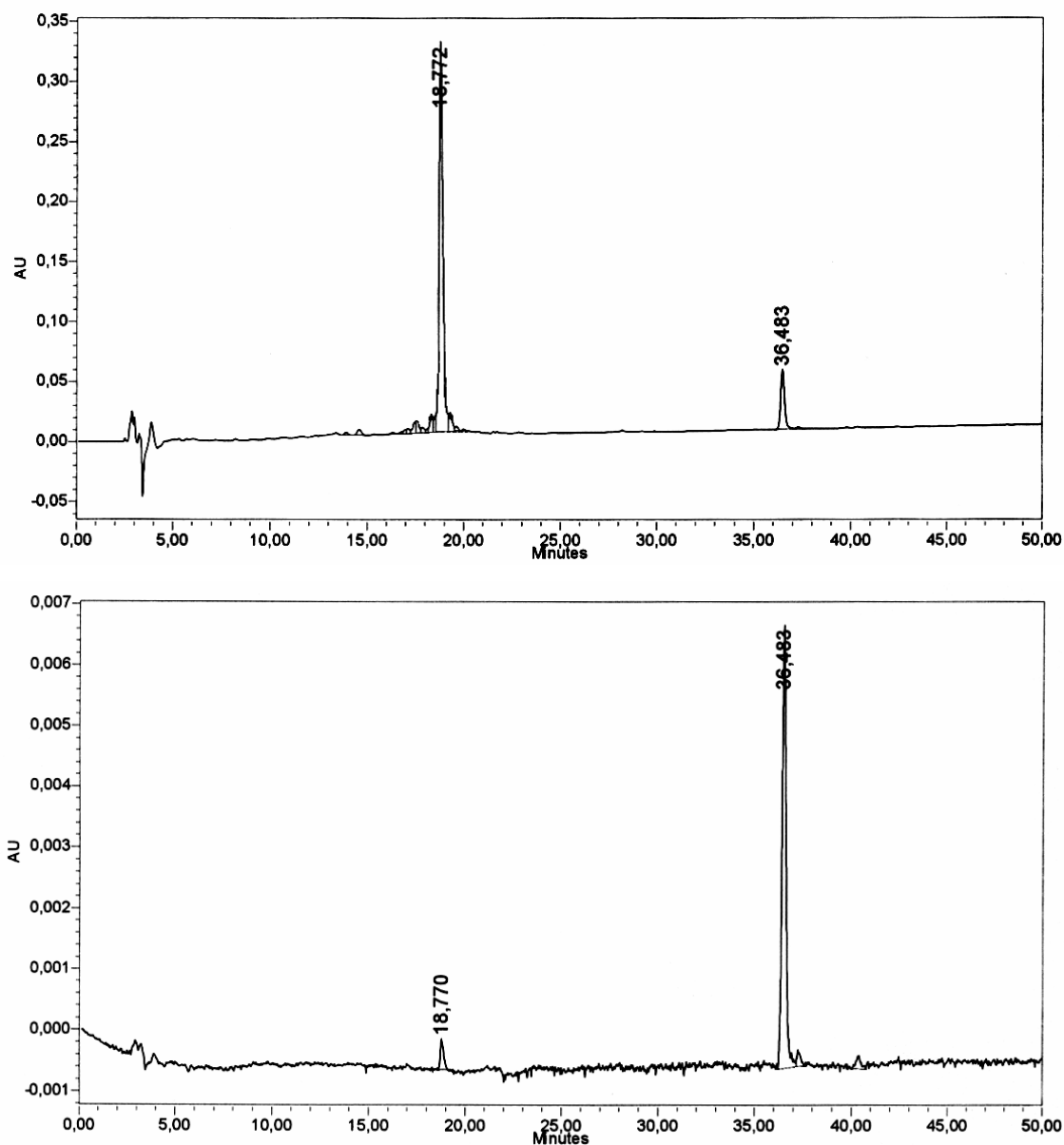
60.3 mg (0.015 mmoli) di peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K grezzo protetto in catena laterale (cft. pag. 101) e 149.0 mg (0.383 mmoli) di FITC (fluorescein-5-isotiocianato) sono stati sciolti con 5 mL di DMF. Alla miscela si sono aggiunti 2.5 mL di soluzione tampone di sodio bicarbonato 0.05 M a pH 9.0. La soluzione è stata posta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente e al buio per 24 ore.

### ***Sblocco dalle protezioni in catena laterale 1***

Dopo avere portato a secco la soluzione di reazione, il peptide fluorescinato (1) è stato deprotetto in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 2 ore mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico e al buio. Si sono ottenuti 43.53 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

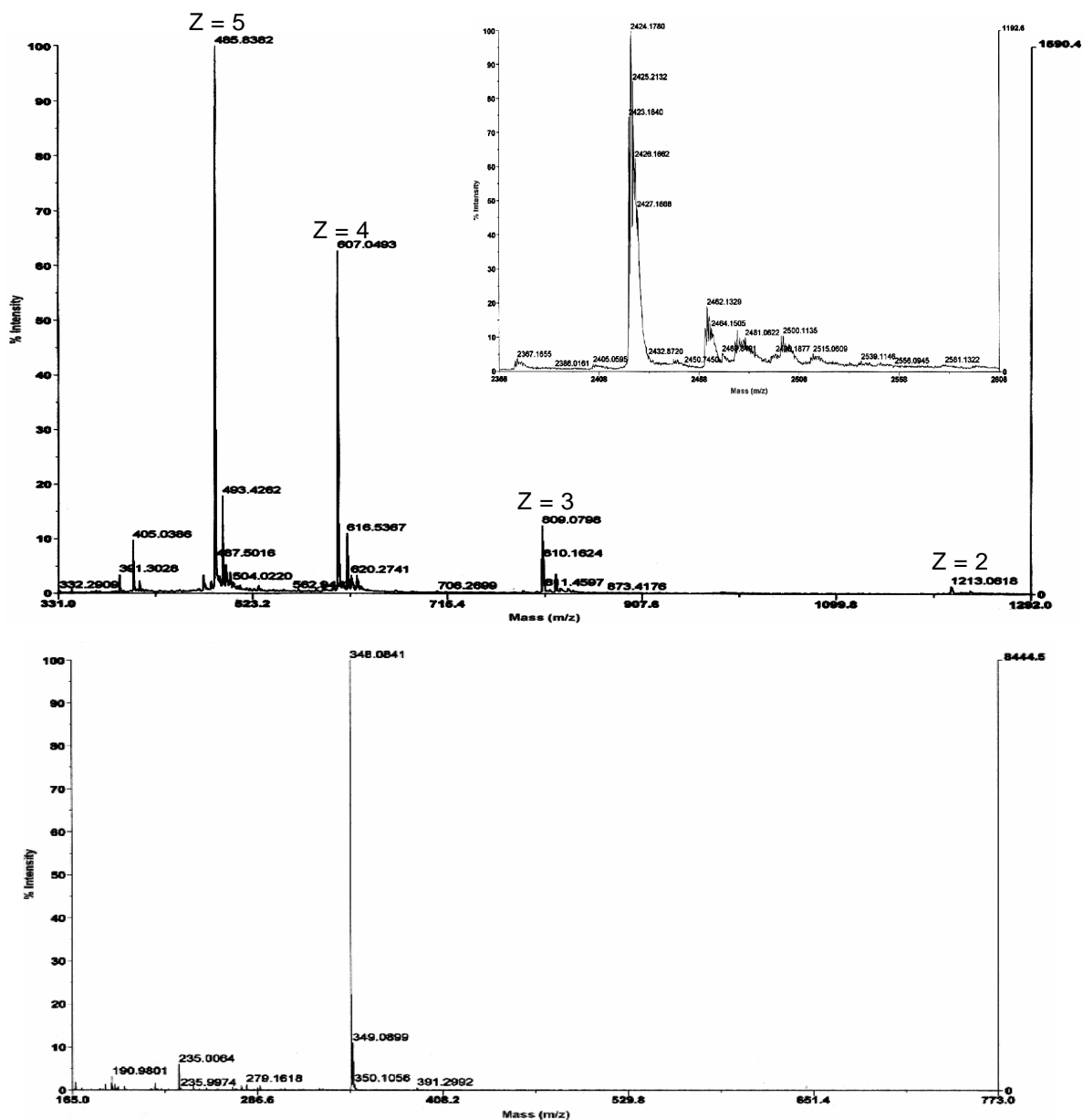
### ***Analisi grezzo 1***

1.50 mg di peptide fluorescinato grezzo (1) sono stati sciolti con 1500 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 5 al 30% di B in 50 min; detector, 214 e 490 nm (Fig. 66).



**Fig. 66:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato grezzo (1) condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 5 al 30% di B in 50 min; detector, 214 nm(in alto) e 490 nm (in basso).

È stata eseguita una corsa analitica su 190 μL di soluzione di grezzo per isolare campioni dei picchi principali nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 μL; gradiente, dal 5 al 35% di B in 30 min; detector, 214 e 490 nm. Campioni relativi ai picchi principali che eluiscono a  $t_R = 18.772$  min e  $t_R = 36.483$  min in Fig. 66, sono stati raccolti e portati a secco in speedvac per poter poi eseguire un'analisi di massa (Fig. 67).



**Fig. 67:** Analisi di massa delle frazioni contenenti i picchi che si vedono in Fig. 66 con  $t_R = 18.772$  min (nella prima immagine) e con  $t_R = 36.483$  min (nella seconda immagine) eseguite con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

L'analisi di massa del picco che eluisce a 18.772 min (Fig. 66), ha fornito un valore di 2424.1 Da pari a quello del peptide non funzionalizzato. Si può quindi dedurre che il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K ( $PM_{teorico} = 2424.5$  Da) non ha praticamente reagito con il FITC, come si era temuto data la scarsa assorbanza a 490 nm del prodotto principale del grezzo. L'analisi di massa del composto con  $t_R = 36.483$  min (Fig. 66), che presenta un forte assorbimento a 490 nm, ha fornito un valore pari a 348.1 Da, probabilmente dovuto ad un prodotto di degradazione del FITC (389.4 Da).

Come ulteriore tentativo di fluorescinare il peptide utilizzando FITC si sono modificate le condizioni di reazione come segue.

### **Attacco fluoresceina 2**

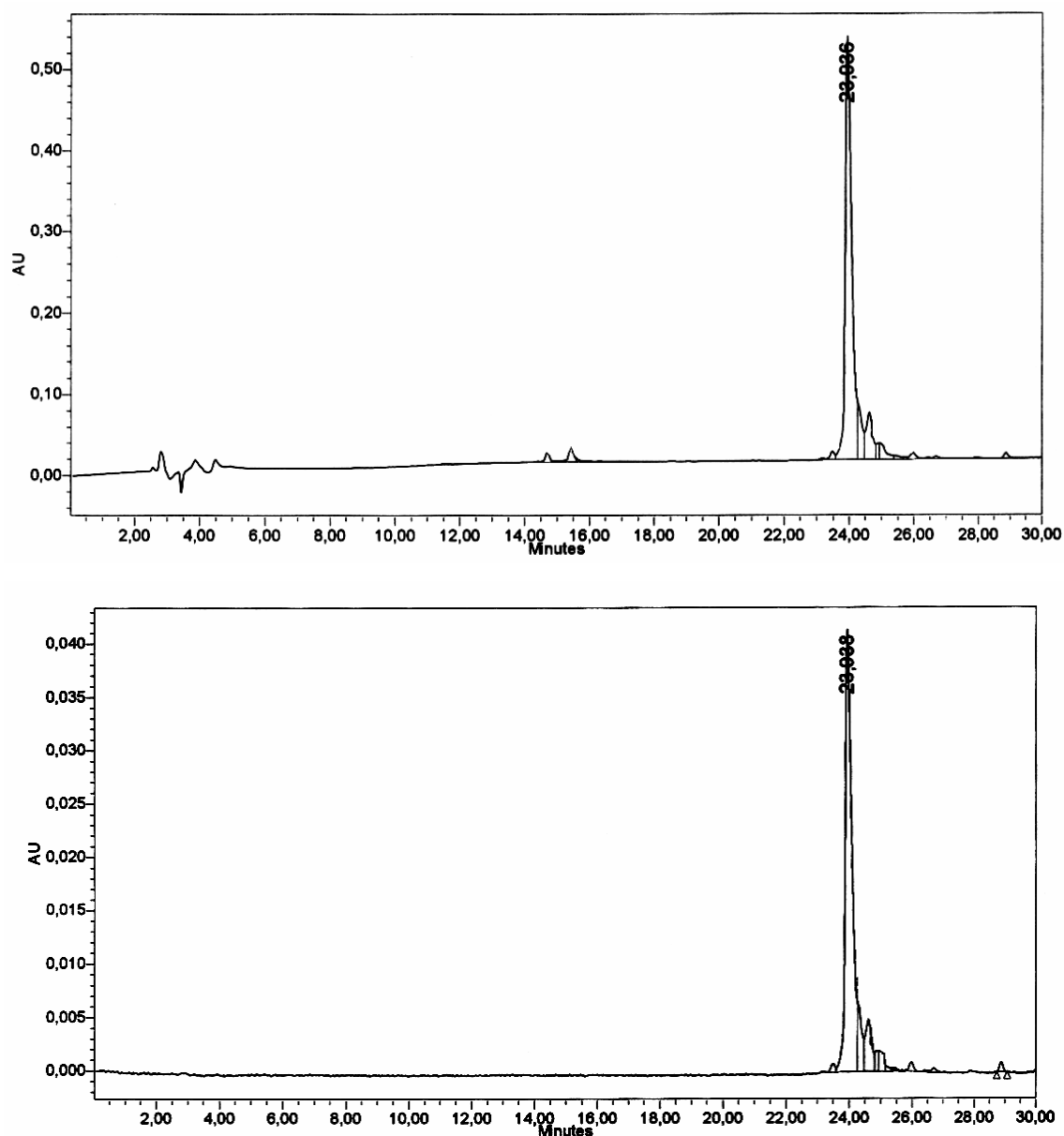
118.8 mg (0.029 mmoli) di peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K grezzo protetto in catena laterale (cft. pag. 101) e 295.1 mg (0.758 mmoli) di FITC (fluorescein-5-isotiocianato) sono stati sciolti con 5 mL di DMF e si sono aggiunti 105.6  $\mu$ L di TEA (0.758 mmoli). Si è mescolata con agitatore magnetico la soluzione per 20 ore a temperatura ambiente e al buio.

### ***Sblocco dalle protezioni in catena laterale 2***

Il peptide fluorescinato (2) è stato deprotetto in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 2 ore mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico e al buio. Si sono ottenuti 57.29 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 69.19%).

### ***Analisi grezzo 2***

0.66 mg di peptide fluorescinato grezzo (2) sono stati sciolti con 660  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10  $\mu$ L; gradiente, dal 5 al 35% di B in 30 min; detector, 214 e 490 nm (Fig. 68).



**Fig. 68:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato grezzo (2) condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 5 al 35% di B in 30 min; detector, 214 nm(in alto) e 490 nm (in basso).

È stata eseguita una cromatografia analitica su 50 μL di soluzione di grezzo nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza ed il picco principale, che si vede in Fig. 68 a  $t_R = 23.936$  min, è stato raccolto e portato a secco in speedvac per poter poi eseguire un'analisi di massa.

L'analisi di massa del prodotto con  $t_R = 23.936$  min in Fig. 68, che presenta un forte assorbimento a 490 nm, ha fornito un valore pari a 2696.1 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro, ovvero ~ 118 Da in meno rispetto al valore atteso (PM (GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato teorico: 2813.9 Da), probabilmente dovuto ad un prodotto di degradazione della fluoresceina legata al peptide (Fig. 69).



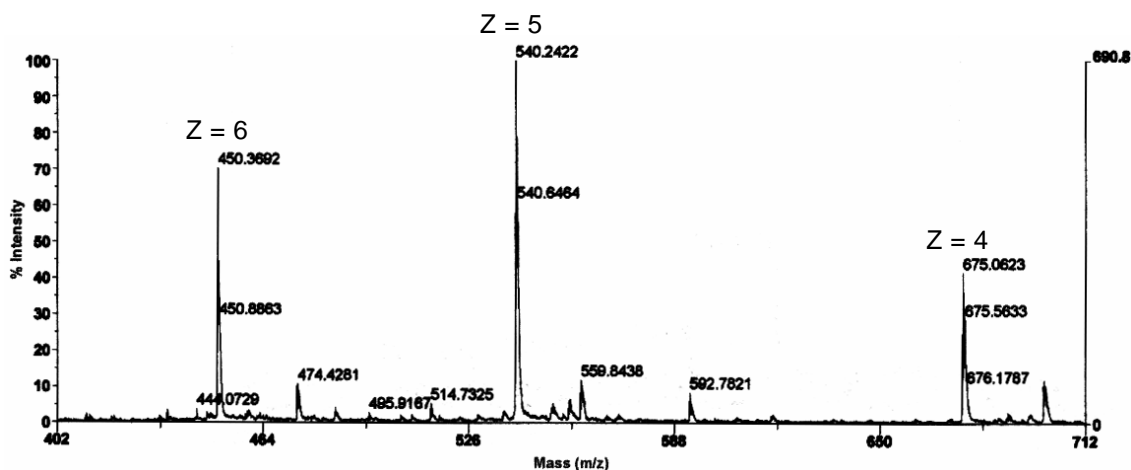


Fig. 69: Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig. 68 con  $t_R = 23.936$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220).

È stata fatta una misura di fluorescenza del composto con PM 2696.1 Da per stabilire se si potesse utilizzare comunque il prodotto ottenuto (Fig. 70). Una soluzione acquosa contenente il campione ( $C = 1.30 \times 10^{-7}$  M; cella, 1 cm  $\times$  1 mm) è stata eccitata con una radiazione di lunghezza d'onda pari a 494 nm e si è ottenuta una banda di emissione con massimo intorno ai 520 nm a conferma della presenza di un gruppo fluoroforo derivato dalla fluoresceina legato al peptide.

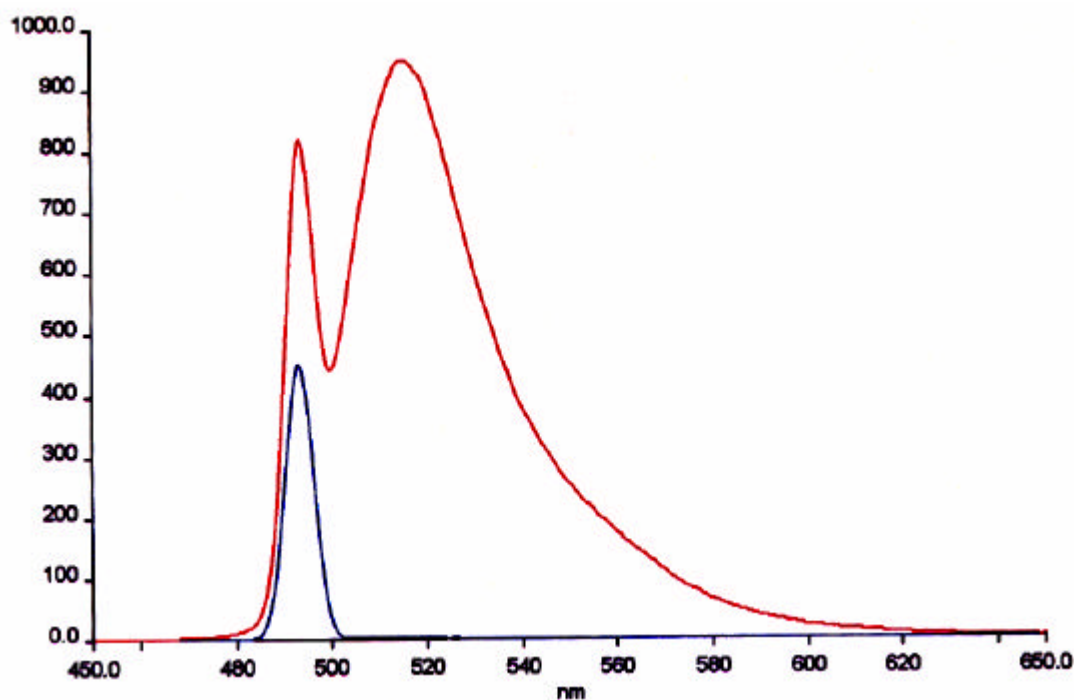


Fig. 70: Misura di fluorescenza del composto con PM 2696.1 Da ( $\lambda$  di eccitazione = 494 nm): in blu è riportato lo spettro di emissione dovuto all'acqua MilliQ ed in rosso è riportato lo spettro relativo al prodotto ottenuto con l'aggiunta del contributo dell'acqua.

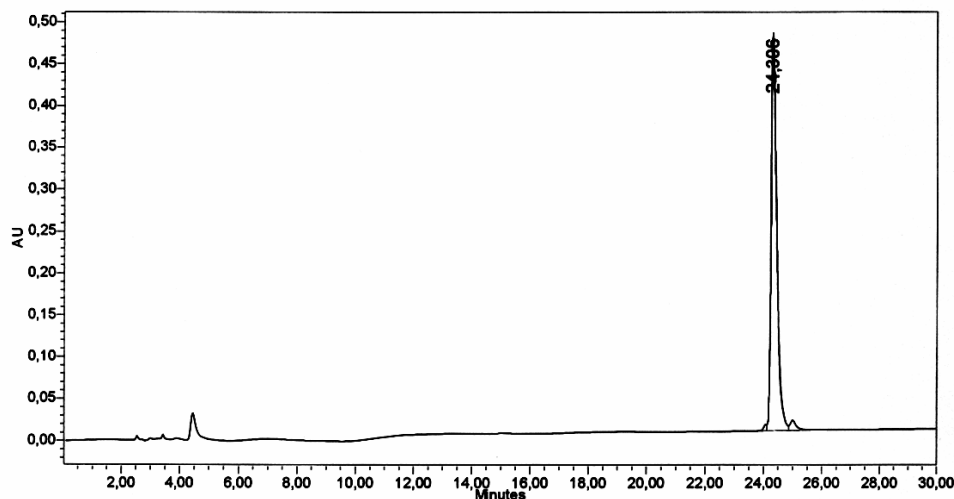
### ***Purificazione***

Si è deciso di purificare tutto il peptide fluorescinato grezzo ottenuto tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 20 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 µm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 5 min e dal 10 al 30% di B in 30 min; detector, 214 e 490 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo (gradiente, dal 5 al 35% di B in 30 min); le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate ripassandole in colonna semi-preparativa. Alla fine, riunendo le frazioni con omogeneità simile, si sono ottenuti 8.52 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC tra il 96 e il 98%, 2.51 mg con grado di purezza tra il 95 e il 96%, 4.43 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95% e 1.78 mg con grado di purezza tra l'80 e il 90%.

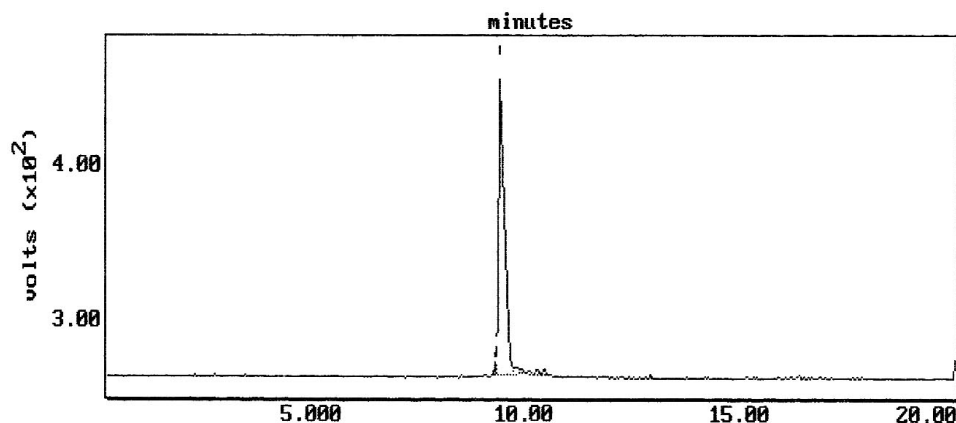
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 5 al 35% di B in 30 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 96.62% (Fig. 71);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 94.73% (Fig. 72).



**Fig. 71:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 5 al 35% di B in 30 min; detector, 214 nm.



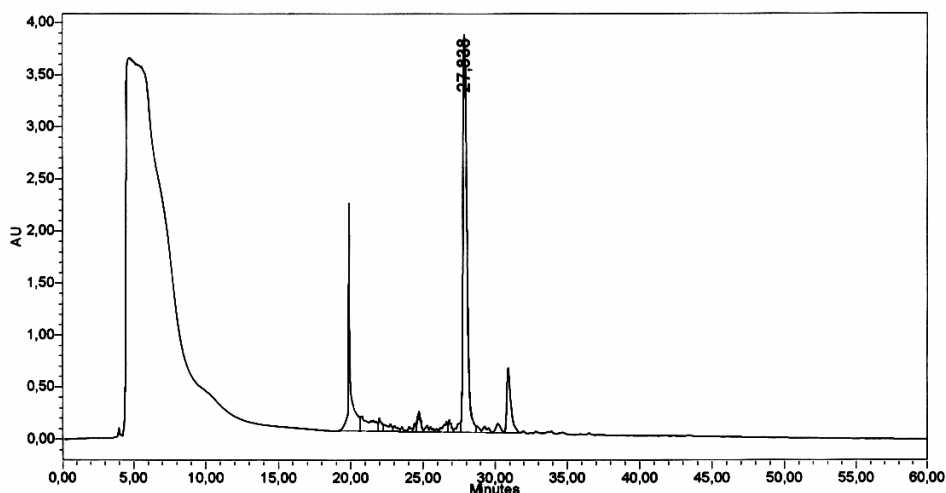
**Fig. 72:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## **(340-352)HVP fluorescinato**

### ***Attacco fluoresceina 1***

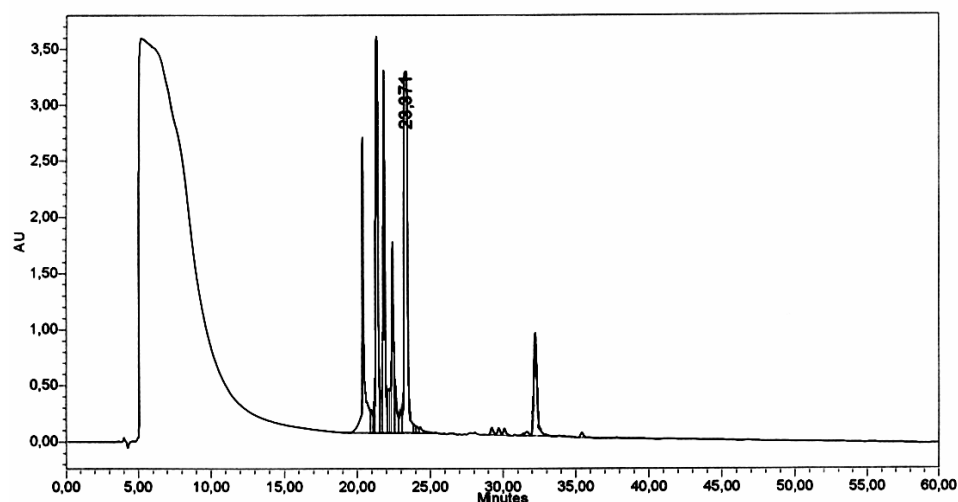
Nel primo tentativo di marcatura con fluoresceina del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K non era stato controllato il pH della soluzione di reazione. Si è deciso di provare a riutilizzare la medesima strategia ma assicurandosi di avere il pH basico necessario per il decorrere della reazione. Inoltre, si è deciso di monitorare il decorso della reazione tramite corse cromatografiche iniettando 5 μL di soluzione di reazione prelevati dopo 5, 75 e 150 min dal mescolamento dei reagenti. Per poter individuare il picco cromatografico relativo al prodotto di partenza, 0.67 mg di peptide grezzo protetto in catena laterale sono stati sciolti

con 670  $\mu\text{L}$  di DMF; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $300\ \text{\AA}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ); flusso,  $1.0\ \text{mL}/\text{min}$ ; eluente A,  $0.05\%$  TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B,  $0.05\%$  TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; iniezione,  $50\ \mu\text{L}$ ; gradiente,  $0\%$  di B per  $9\ \text{min}$ , dallo  $0$  al  $60\%$  di B in  $1\ \text{min}$ , dal  $60$  al  $100\%$  di B in  $40\ \text{min}$  e  $100\%$  di B per  $10\ \text{min}$ ; detector,  $214$  e  $490\ \text{nm}$  (Fig. 73).



**Fig. 73:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (340-352)HVP grezzo protetto in catena laterale condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $300\ \text{\AA}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ); flusso,  $1.0\ \text{mL}/\text{min}$ ; eluente A,  $0.05\%$  TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B,  $0.05\%$  TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente,  $0\%$  di B per  $9\ \text{min}$ , dallo  $0$  al  $60\%$  di B in  $1\ \text{min}$ , dal  $60$  al  $100\%$  di B in  $40\ \text{min}$  e  $100\%$  di B per  $10\ \text{min}$ ; detector,  $214\ \text{nm}$ .

$76.8\ \text{mg}$  ( $0.030\ \text{mmoli}$ ) di peptide (340-352)HVP grezzo protetto in catena laterale (cft. pag. 110) e  $300.4\ \text{mg}$  ( $0.771\ \text{mmoli}$ ) di FITC (fluorescein-5-isotiocianato) sono stati sciolti con  $30\ \text{mL}$  di DMF e si sono aggiunti  $15\ \text{mL}$  di soluzione tampone di sodio bicarbonato  $0.05\ \text{M}$  a  $\text{pH}\ 9.0$ . Tramite cartina di tornasole è stato controllato il  $\text{pH}$  della soluzione di reazione che è risultato essere leggermente acido: si è corretto il  $\text{pH}$  portandolo a  $\sim 9$  aggiungendo  $\text{NaOH}$ . Si è mescolata con agitatore magnetico la soluzione a temperatura ambiente e al buio. In base alle corse cromatografiche eseguite nelle stesse condizioni utilizzate per il peptide grezzo protetto in catena laterale, la reazione di fluorescinazione sembra essere estremamente veloce in quanto già dopo  $5\ \text{min}$  dall'unione dei reagenti il picco relativo al peptide grezzo protetto in catena laterale, con  $t_{\text{R}} = 27.838\ \text{min}$  in Fig. 73, risulta scomparso (Fig. 74, il picco a  $t_{\text{R}} = 23.371\ \text{min}$  è dovuto al FITC) e i tracciati delle varie corse analitiche fatte in tempi diversi risultano pressoché sovrapponibili. Si è quindi interrotta la reazione dopo  $3\ \text{ore}$  dall'inizio del mescolamento dei vari reagenti.



**Fig. 74:** Cromatografia analitica in RP-HPLC ottenuta iniettando 5  $\mu\text{L}$  di soluzione di reazione per la fluorescizzazione del peptide (340-352)HVP grezzo protetto in catena laterale prelevati dopo 5 min dal mescolamento dei reagenti condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, 0% di B per 9 min, dallo 0 al 60% di B in 1 min, dal 60 al 100% di B in 40 min e 100% di B per 10 min; detector, 214 nm.

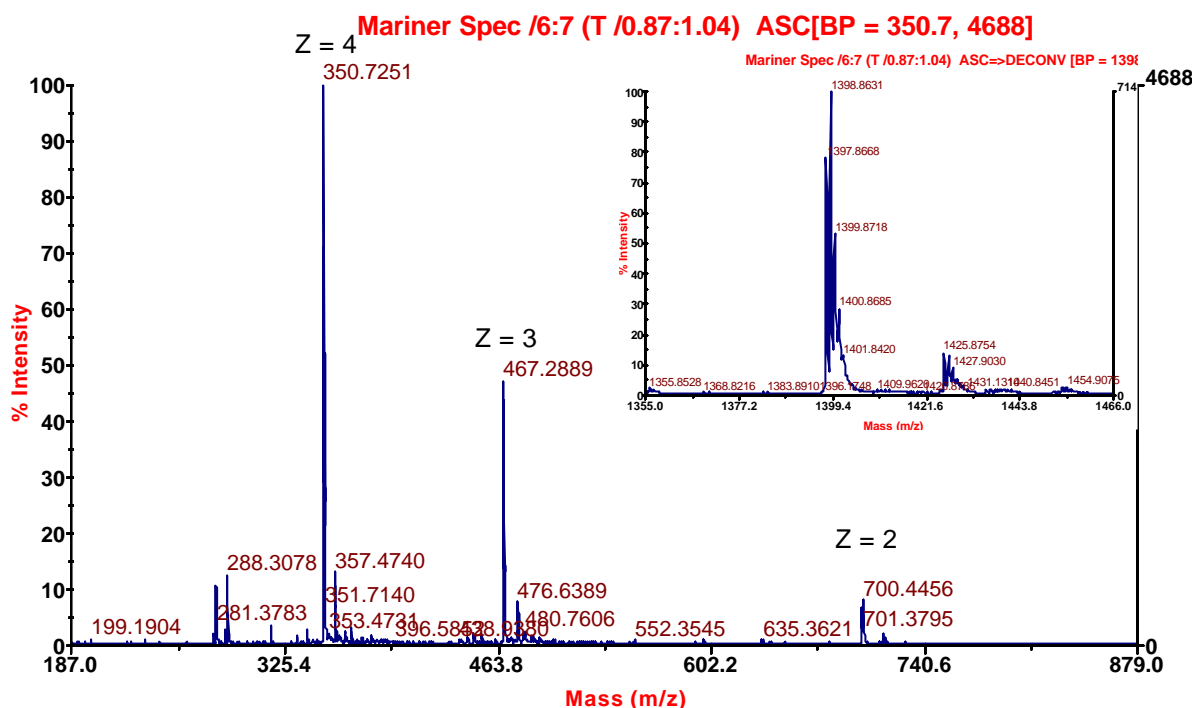
Al termine della reazione la soluzione è stata portata a secco in evaporatore rotante e si sono sbloccate le protezioni in catena laterale.

### ***Sblocco dalle protezioni in catena laterale 1***

Il peptide fluorescinato (1) è stato deprotetto in catena laterale seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 2 ore mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico e al buio. Si sono ottenuti 47.94 mg di liofilizzato color giallo intenso.

### ***Analisi grezzo 1***

Si è deciso di eseguire un'analisi di massa direttamente sul prodotto grezzo ottenuto (Fig. 75): la deconvoluzione ha fornito un valore pari a 1398.8 Da che coincide con il peso molecolare del peptide (340-352)HVP privato della Met N-terminale ( $\text{PM}_{\text{teorico}}$  (341-352)HVP: 1398.7 Da).



**Fig. 75:** Analisi di massa del peptide (340-352)HVP grezzo fluorescinato (1) eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

A questo punto risulta evidente che l'utilizzo di FITC non è adatto per legare il gruppo fluoresceina in maniera selettiva al terminale amminico di un peptide in quanto, nonostante la reazione di addizione avvenga in tempi brevi e con rese elevate, il successivo trattamento acido per rimuovere le protezioni in catena laterale del peptide comporta una reazione indesiderata, analoga alla degradazione di Edman, che porta al distacco del residuo terminale legato al gruppo fluoroforo.

Si è allora deciso di usare, quale reagente alternativo, la 5-carbossifluoresceina (CF).

### ***Attacco fluoresceina 2***

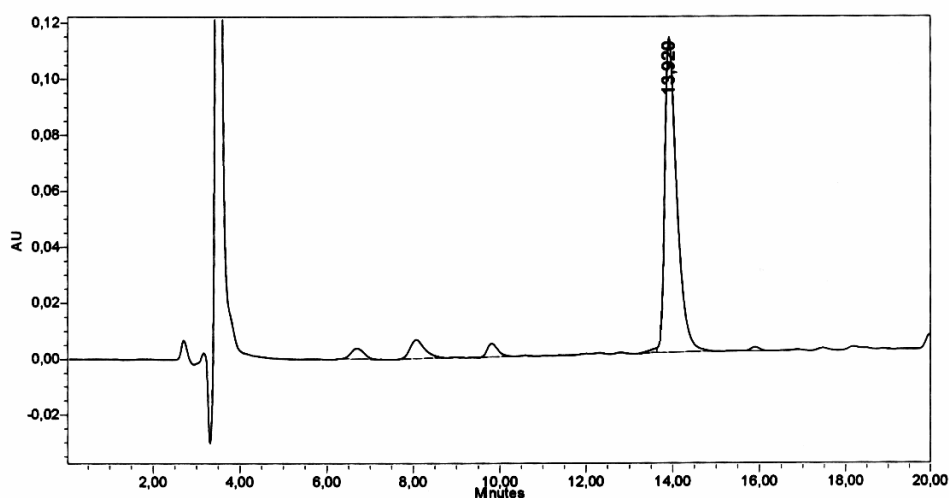
A 19.02 mg (5.18  $\mu$ mmoli) di peptide (340-352)HVP su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 110) sono stati aggiunti 7.58 mg (56.09  $\mu$ moli) di HOBt, 18.89 mg (50.20  $\mu$ moli) di CF e 7.82  $\mu$ L (49.94  $\mu$ moli) di DIC sciolti con 100  $\mu$ L di DMF. La miscela così ottenuta è stata lasciata reagire per 1 ora a 25°C mescolando ad intervalli tramite sonicazione. Al termine della reazione, il peptide su resina protetto e fluorescinato è stato filtrato su gooch G3, lavato abbondantemente con DMF e DCM e messo a seccare sotto vuoto al buio. Si sono ottenuti 17.43 mg di prodotto (resa della reazione di fluorescinazione = 83.57%).

### ***Sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale 2***

Il peptide su resina fluorescinato (2) è stato deprotezionato in catena laterale e sbloccato dalla resina seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando un decimo della miscela 2 (0.025 mL TES, 0.025 mL H<sub>2</sub>O, 0.95 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico e al buio. Si sono ottenuti 11.90 mg di peptide grezzo fluorescinato (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo 2***

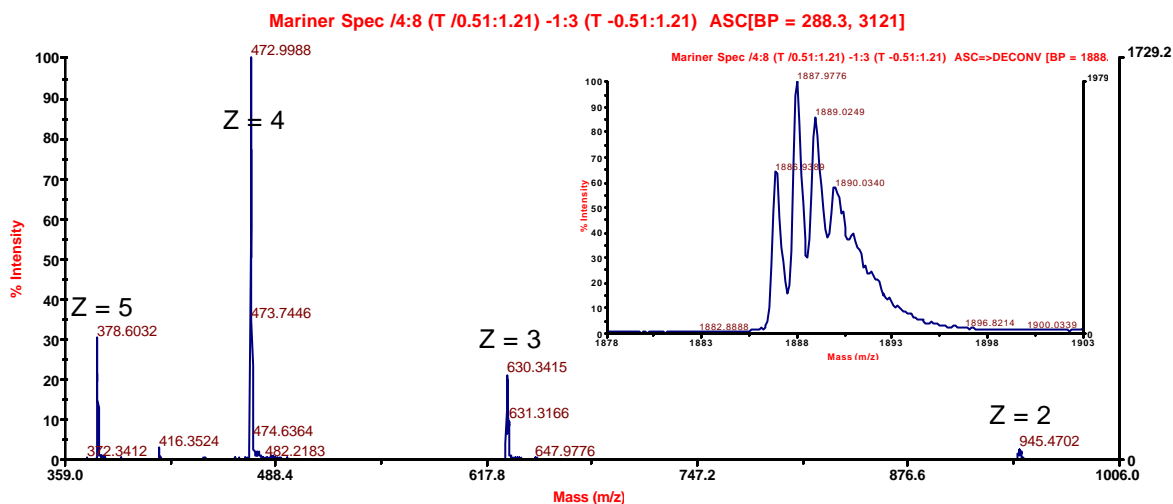
0.61 mg di peptide fluorescinato grezzo (2) sono stati sciolti con 610 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dal 23 al 33% di B in 20 min; detector, 214 e 490 nm (Fig. 76).



**Fig. 76:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (340-352)HVP fluorescinato grezzo (2) condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 23 al 33% di B in 20 min; detector, 214 nm.

È stata eseguita una corsa cromatografica su 50 µL di soluzione di grezzo nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza ed il picco principale, che si vede in Fig. 76 a  $t_R = 13.920$  min, è stato raccolto e portato a secco in speedvac per poter poi eseguire un'analisi di massa (Fig. 77).

L'analisi di massa ha fornito un valore pari a 1888.0 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro confermando che il picco a  $t_R = 13.920$  min in Fig. 76 coincide con il prodotto voluto ( $PM_{teorico} = 1888.18$  Da).



**Fig. 77:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 76 con  $t_R = 13.920$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### Purificazione

Tutto il peptide fluorescinato grezzo ottenuto è stato sciolto con 5 mL eluente A, filtrato e purificato tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15  $\mu$ m, 100 Å, 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 20% di B in 5 min e dal 20 al 30% di B in 30 min; detector, 214 e 490 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche alle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo (gradiente, dal 23 al 33% di B in 20 min). Alla fine, riunendo le frazioni con grado di purezza simile, si sono ottenuti 3.45 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 0.96 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98% e 1.39 mg con grado di purezza tra il 60 e il 95%.

### Caratterizzazione

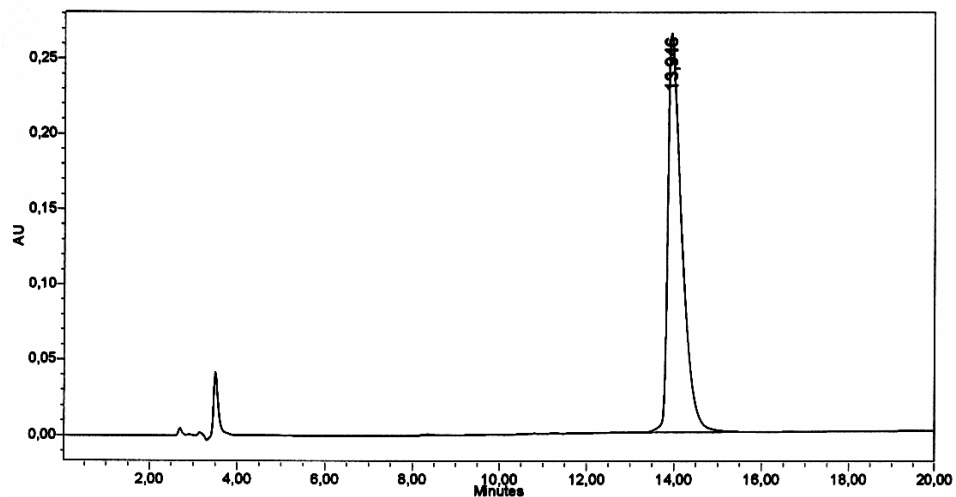
La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A,

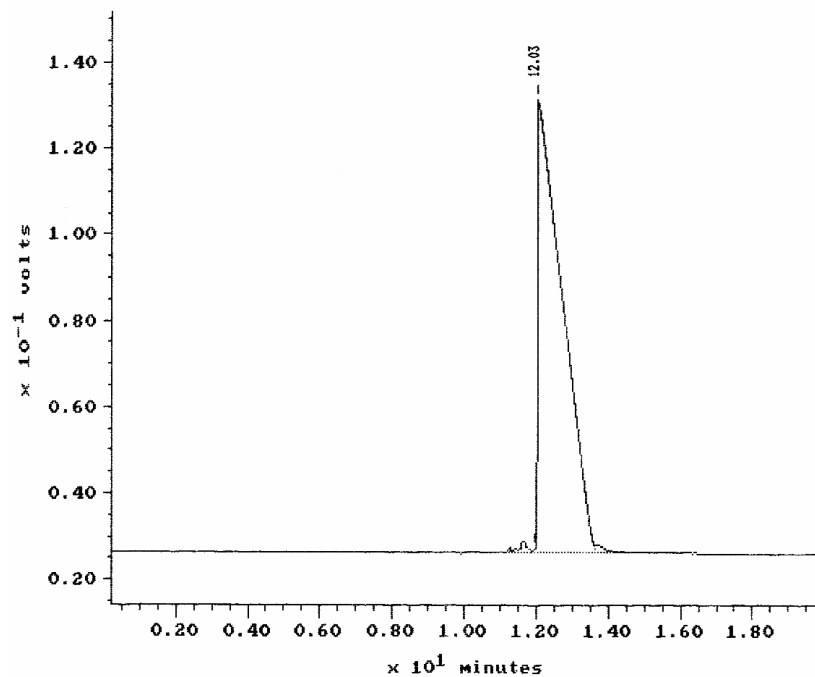


0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 23 al 33% di B in 20 min; detector, 214 e 490 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.66% (Fig. 78);

- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 98.66% (Fig. 79)



**Fig. 78:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide (340-352)HVP fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 23 al 33% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 79:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide (340-352)HVP fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## **GRGDSPK fluorescinato**

### *Attacco fluoresceina*

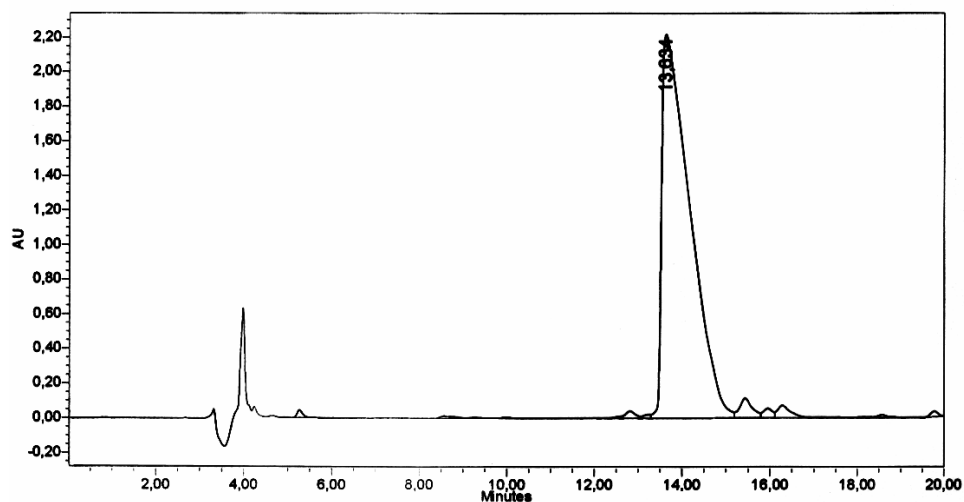
A 12.15 mg (5.08  $\mu$ mmoli) di peptide GRGDSPK su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 97) sono stati aggiunti i seguenti composti (circa 10 equivalenti): 6.81 mg di HOBt, 18.97 mg di CF e 7.82  $\mu$ L di DIC sciolti con 100  $\mu$ L di DMF, in modo da ottenere una soluzione 0.5 M HOBt/CF/DIC in DMF. La miscela è stata lasciata reagire per 1 ora a 25°C mescolando ad intervalli tramite sonicazione. Al termine della reazione, il peptide su resina protetto e fluorescinato è stato filtrato su gooch G3, lavato abbondantemente con DMF e DCM e messo a seccare sotto vuoto al buio. Si sono ottenuti 10.87 mg di prodotto (resa della reazione di fluorescinazione = 77.80%).

### *Sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale*

Il peptide su resina fluorescinato è stato deprotetto in catena laterale e sbloccato dalla resina seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando un decimo della miscela 2 (0.025 mL TES, 0.025 mL H<sub>2</sub>O, 0.95 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico e al buio. Si sono ottenuti 4.24 mg di peptide grezzo fluorescinato (resa della reazione di sblocco = 100%).

### *Analisi grezzo*

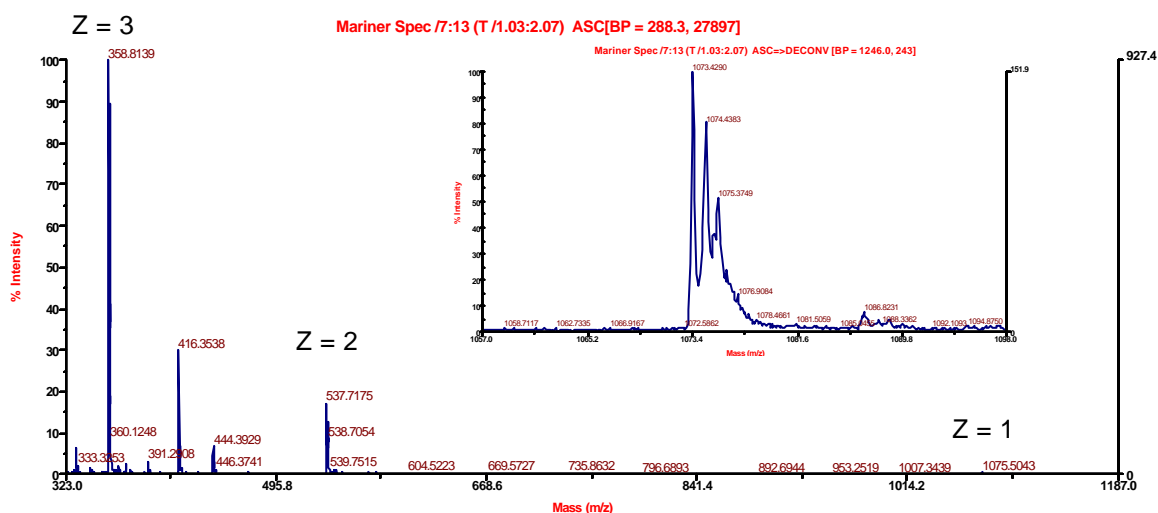
0.59 mg di peptide fluorescinato grezzo sono stati sciolti con 590  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10  $\mu$ L; gradiente, dal 15 al 25% di B in 20 min; detector, 214 e 490 nm (Fig. 80).



**Fig. 80:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide GRGDSPK fluorescinato grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 15 al 25% di B in 20 min; detector, 214 nm.

È stata eseguita una corsa analitica su 50  $\mu$ L di soluzione di grezzo alle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza ed il picco principale, che si vede in Fig. 80 a  $t_R = 13.634$  min, è stato raccolto e portato a secco in speedvac per poter poi eseguire un'analisi di massa (Fig. 81).

L'analisi di massa ha fornito un valore pari a 1073.4 Da in seguito a deconvoluzione confermando che il picco a  $t_R = 13.634$  min in Fig. 80 coincide con il prodotto voluto ( $PM_{teorico} = 1074.1$  Da).



**Fig. 81:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 80 con  $t_R = 13.634$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

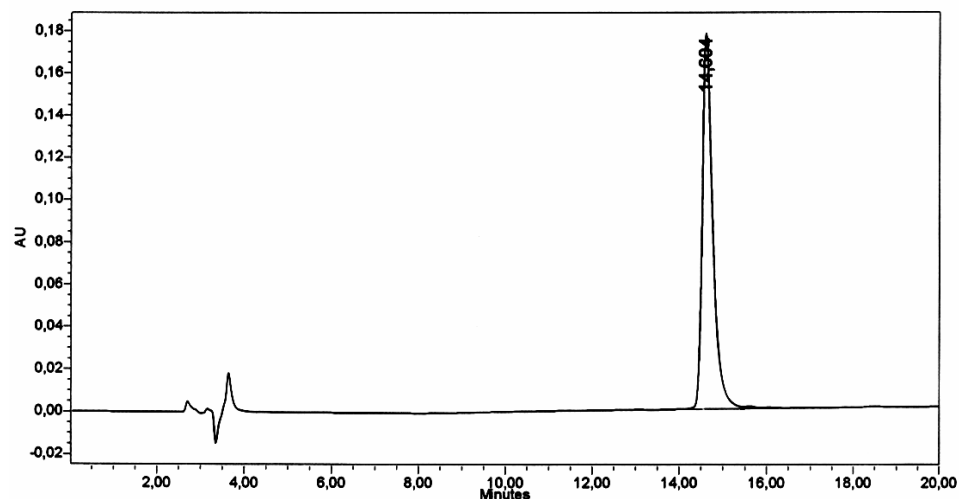
### ***Purificazione***

Tutto il peptide fluorescinato grezzo ottenuto è stato sciolto con 5 mL di eluente A, filtrato e purificato tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 µm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 12% di B in 5 min e dal 12 al 22% di B in 30 min; detector, 214 e 490 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche alle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo (gradiente, dal 15 al 25% di B in 20 min). Alla fine, riunendo le frazioni con grado di purezza simile, si sono ottenuti 2.24 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 0.79 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 0.50 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95% e 0.17 mg con grado di purezza tra il 60 e il 90%.

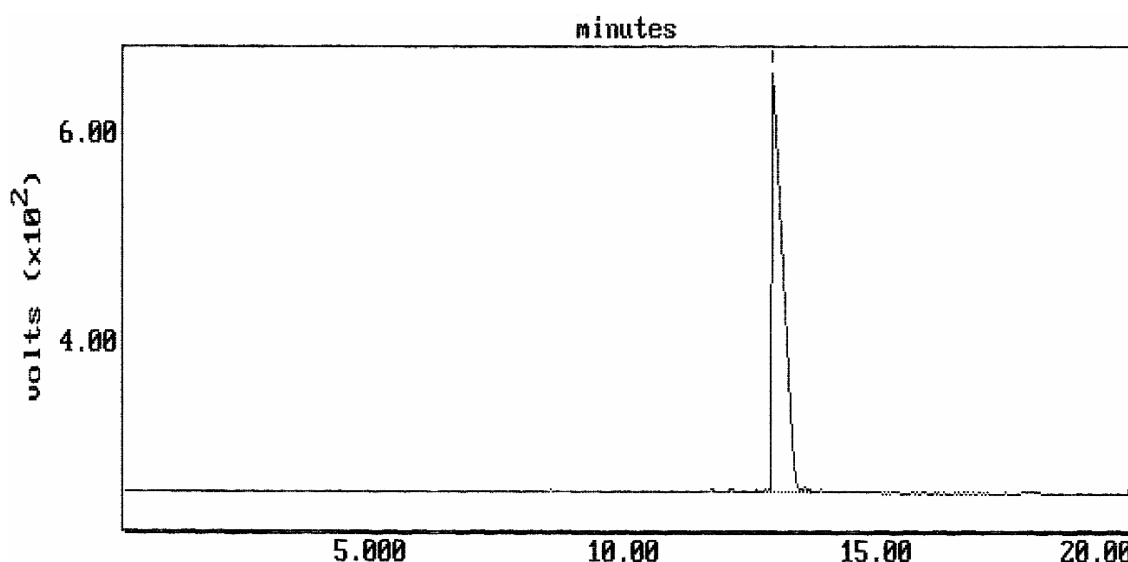
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 15 al 25% di B in 20 min. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.14%; detector, 214 nm (Fig. 82);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 98.04% (Fig. 83)



**Fig. 82:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide GRGDSPK fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 15 al 25% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 83:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide GRGDSPK fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## RGD fluorescinato

### *Attacco fluoresceina*

A 22.72 mg (10.06 μmmoli) di peptide RGD su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 93) sono stati aggiunti i seguenti composti (circa 10 equivalenti): 13.48 mg di HOBt, 37.83 mg di CF e 15.66 μL di DIC sciolti con 200 μL di DMF, in modo da ottenere una soluzione 0.5 M HOBt/CF/DIC in DMF. La miscela è stata lasciata reagire per 1 ora a 25°C mescolando ad intervalli tramite sonicazione. Al termine della reazione, il peptide su

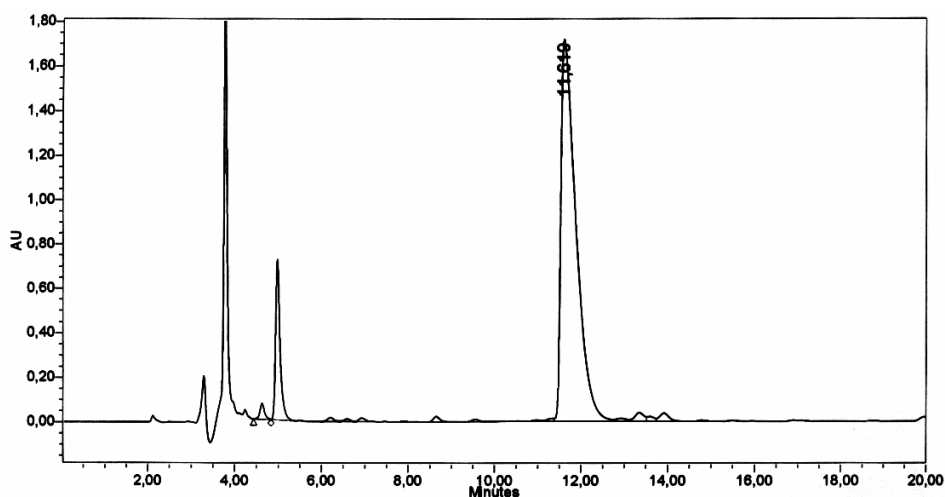
resina protetto e fluorescinato è stato filtrato su gooch G3, lavato abbondantemente con DMF e DCM e messo a seccare sotto vuoto al buio. Si sono ottenuti 19.07 mg di prodotto (resa della reazione di fluorescinazione = 72.44%).

### ***Sblocco dalla resina e dalle protezioni in catena laterale***

Il peptide su resina fluorescinato è stato deprotetto in catena laterale e sbloccato dalla resina seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando un decimo della miscela 2 (0.025 mL TES, 0.025 mL H<sub>2</sub>O, 0.95 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico e al buio. Si sono ottenuti 6.93 mg di peptide grezzo fluorescinato (resa della reazione di sblocco = 97.74%).

### ***Analisi grezzo***

0.28 mg di peptide fluorescinato grezzo sono stati sciolti con 280  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10  $\mu$ L; gradiente, dal 18 al 28% di B in 20 min; detector, 214 e 490 nm (Fig. 84).

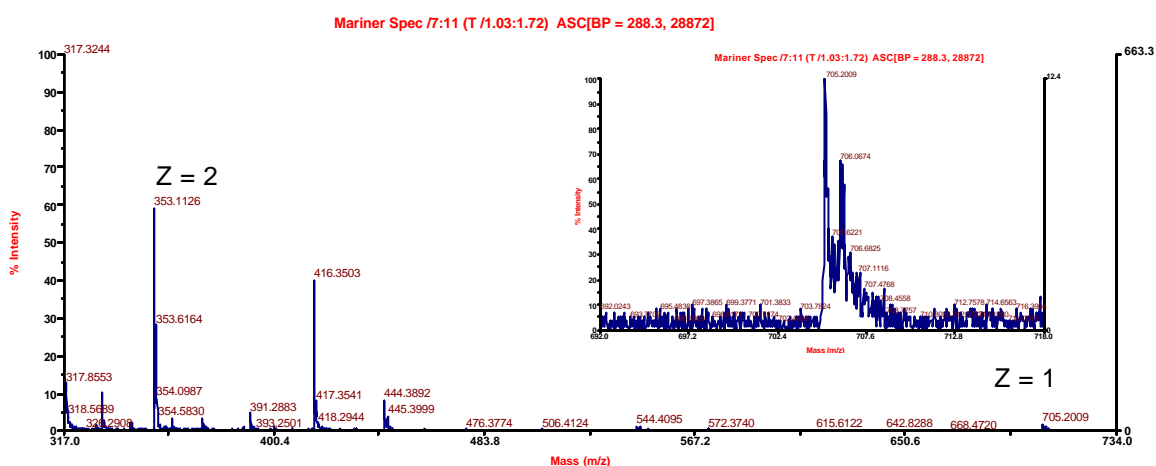


**Fig. 84:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide RGD fluorescinato grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 18 al 28% di B in 20 min; detector, 214 nm.

È stata eseguita una corsa cromatografica su 50  $\mu$ L di soluzione di grezzo alle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza ed il picco principale, che si vede in Fig. 84 a  $t_R$

= 11.619 min, è stato raccolto e portato a secco in speedvac per poter poi eseguire un'analisi di massa (Fig. 85).

L'analisi di massa ha fornito un valore pari a 705.2 Da per lo ione  $MH^+$  e 353.1 Da per lo ione  $MH_2^{2+}$  confermando che il picco a  $t_R = 11.619$  min in Fig. 84 coincide con il prodotto voluto ( $PM_{teorico} = 704.7$  Da).



**Fig. 85:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 84 con  $t_R = 11.619$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportato un ingrandimento del picco a 705.2 Da.

### ***Purificazione***

Tutto il peptide fluorescinato grezzo ottenuto è stato sciolto con 5 mL di eluente A, filtrato e purificato tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak  $C_{18}$  SP (15  $\mu m$ , 100  $\text{Å}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $H_2O$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $CH_3CN$ ; gradiente, dallo 0 al 15% di B in 5 min e dal 15 al 25% di B in 30 min; detector, 214 e 490 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche alle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo (gradiente, dal 18 al 28% di B in 20 min). Alla fine, riunendo le frazioni con grado di purezza simile, si sono ottenuti 3.44 mg di prodotto con grado di purezza in HPLC superiore al 98%, 0.89 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 0.91 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95% e 0.94 mg con grado di purezza tra l'80 e il 90%.

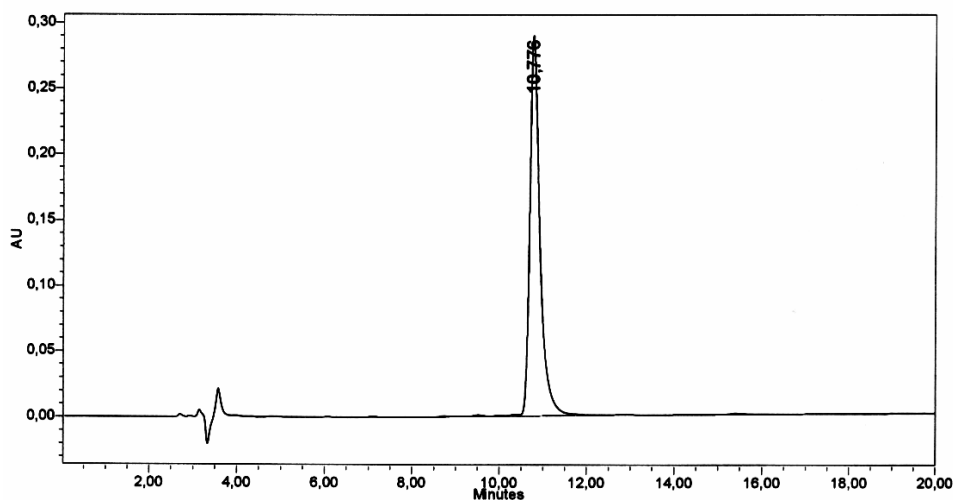
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

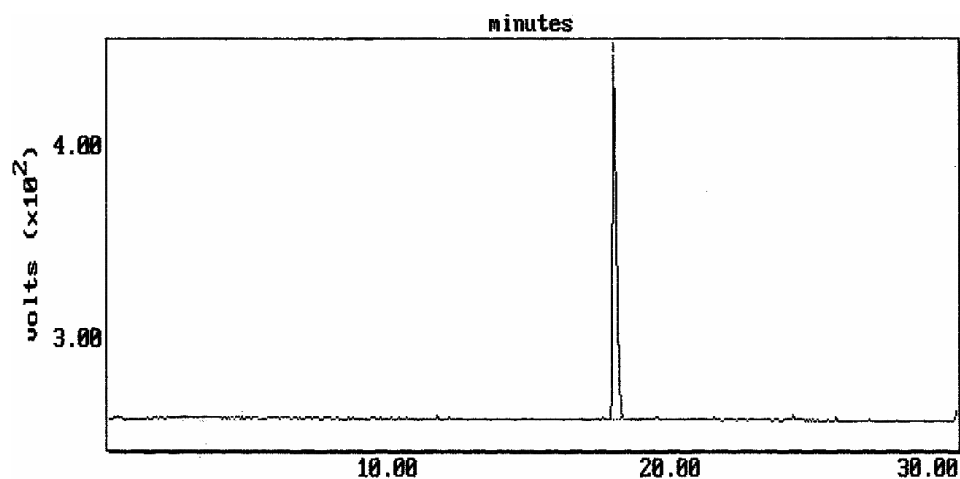
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  analitica (5  $\mu m$ , 300  $\text{Å}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A,

0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 18 al 28% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.16% (Fig. 86);

- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 87)



**Fig. 86:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide RGD fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 18 al 28% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 87:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide RGD fluorescinato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



## SINTESI DEI FRAMMENTI DELLA BMP-2

### (68-87)BMP-2

#### *Sequenza:*

*PM: 2216.62 Da*

H-Asn-Ser-Val-Asn-Ser-Lys-Ile-Pro-Lys-Ala-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-OH

#### *Sintesi*

Il peptide (68-87) BMP-2 è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina HMP (sostituzione: 0.89 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Ser e Thr, OtBu per Glu, Acm per Cys, Boc per Lys e Trt per Asn.

286.3 mg di resina HMP (0.2548 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Ile-OH e usando come agente condensante una soluzione di DCC 1 M in NMP e 0.1 equivalenti di DMAP come catalizzatore. La resa della reazione è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. Le prime cinque reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, mentre le successive in *coupling* doppio.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 986.8 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 90.00%).

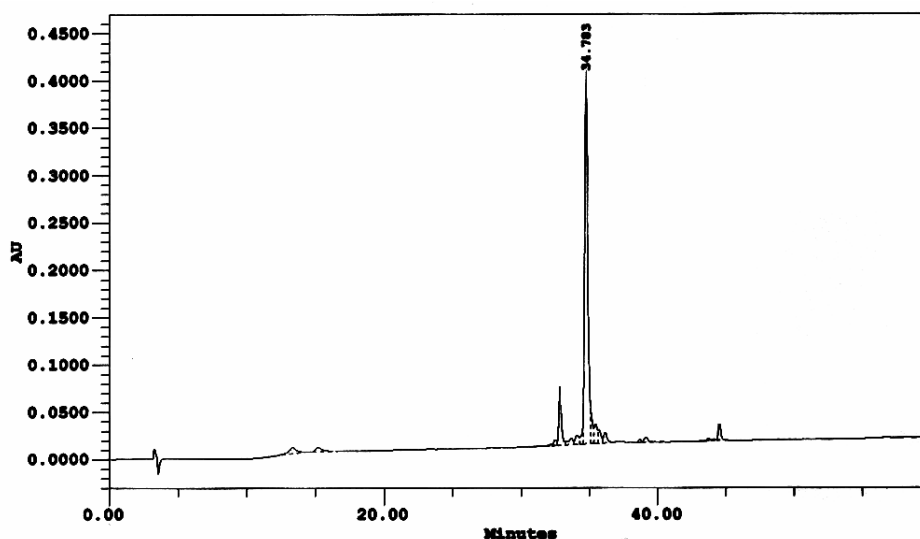
### ***Sblocco dalla resina***

Sono stati sbloccati solo 485.3 mg (49.18% sul totale) di peptide su resina al fine di utilizzare la quantità residua per sintetizzare il peptide (58-87)BMP-2 nel caso in cui la sintesi del frammento (68-87)BMP-2 sia avvenuta con successo.

Lo sblocco del peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali ad eccezione del gruppo Acn legato alla Cys, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 266.59 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

0.46 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 460 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dallo 0 al 60% di B in 60 min; detector, 214 nm (Fig. 88).



**Fig. 88:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (68-87)BMP-2 grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 60% di B in 60 min; detector, 214 nm.

### ***Purificazione***

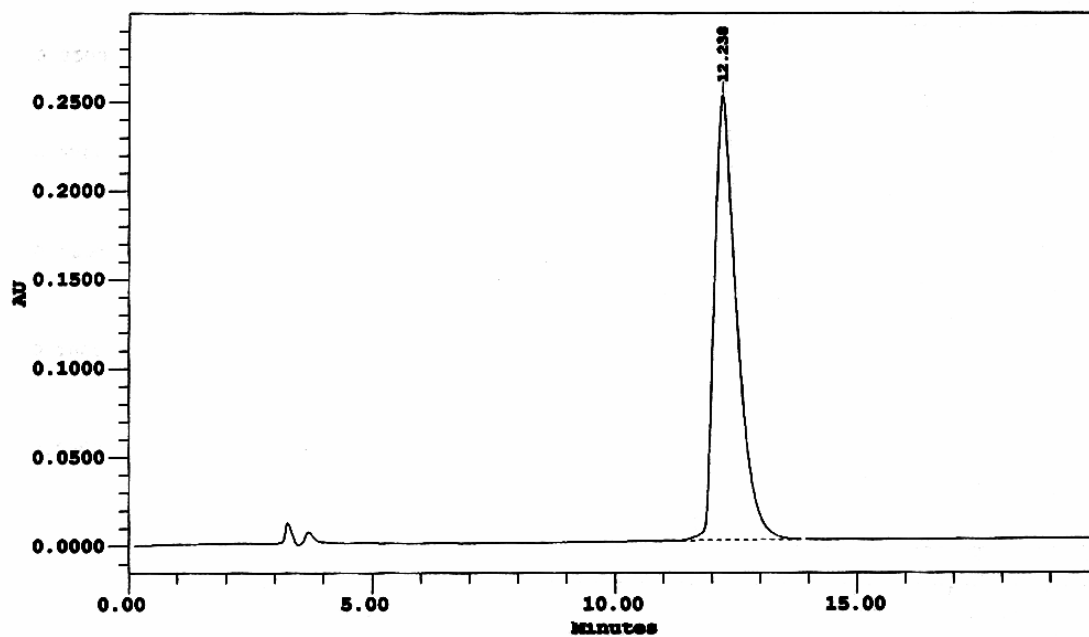
80.42 mg di grezzo sono stati purificati tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna

semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 15% di B in 1 min e dal 15 al 30% di B in 45 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 22 al 32% di B in 20 min; detector, 214 nm. Alla fine, riunendo le frazioni con grado di purezza simile, si sono ottenuti 5.25 mg di prodotto con grado di purezza del 100%, 23.24 mg di prodotto con grado di purezza tra il 98 e il 100%, 5.19 mg con grado di purezza tra il 95 e il 98%, 7.08 mg con grado di purezza tra il 90 e il 95%, 6.42 mg con grado di purezza tra l'80 e il 90% e 3.25 mg con grado di purezza tra il 60 e l'80%.

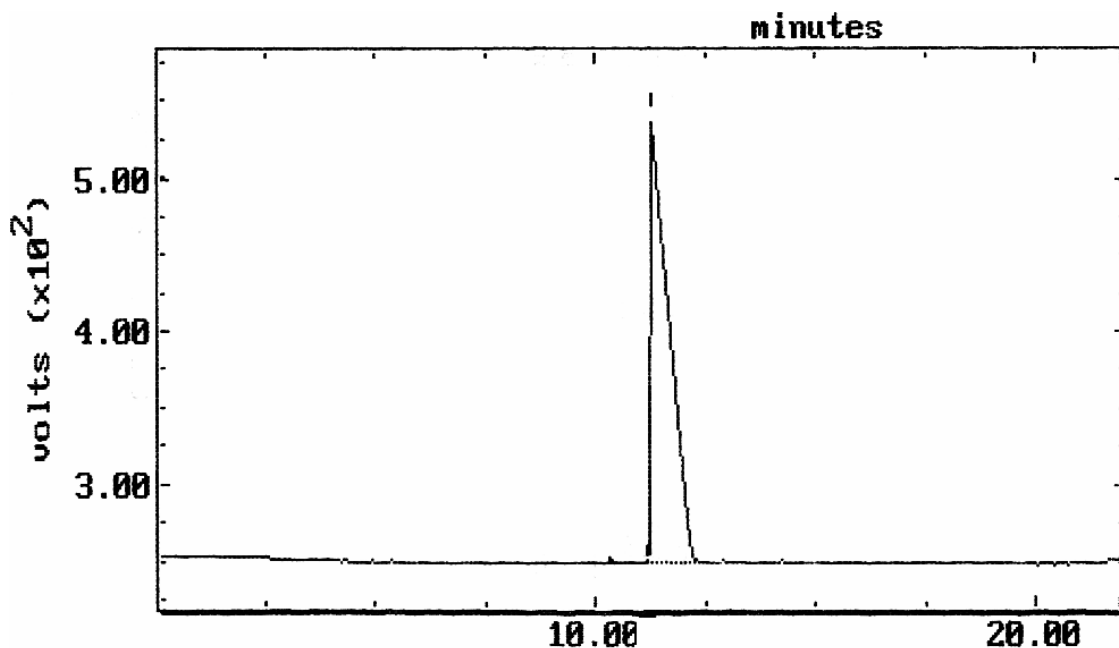
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

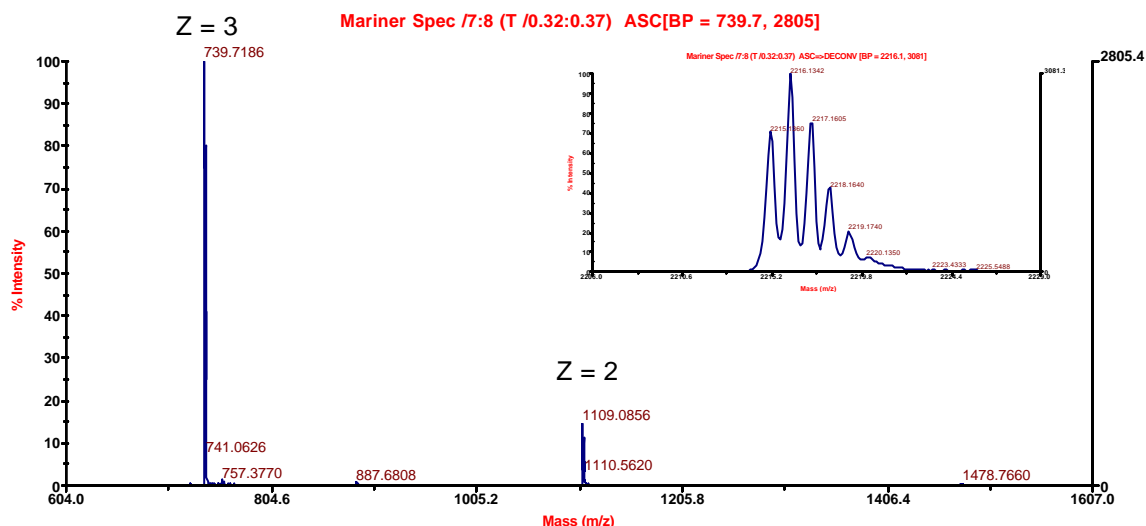
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 22 al 32% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 89);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.86% (Fig. 90)
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 2216.1 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (Fig. 91).



**Fig. 89:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide (68-87)BMP-2 condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 22 al 32% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 90:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide (68-87)BMP-2 condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 91:** Analisi di massa della frazione migliore del peptide (68-87)BMP-2 eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

## (77-87)BMP-2

**Sequenza:**

**PM: 1248.49 Da**

H-Ala-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-OH

### Sintesi

Il peptide (77-87)BMP-2 è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina HMP (sostituzione: 0.89 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Ser e Thr, OtBu per Glu e Acm per Cys.

286.5 mg di resina HMP (0.2550 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Ile-OH e usando come agente condensante una soluzione di DCC 1 M in NMP e 0.1 equivalenti di DMAP come catalizzatore. La resa della reazione è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. Le prime cinque reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, mentre le successive in *coupling* doppio.

L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa.

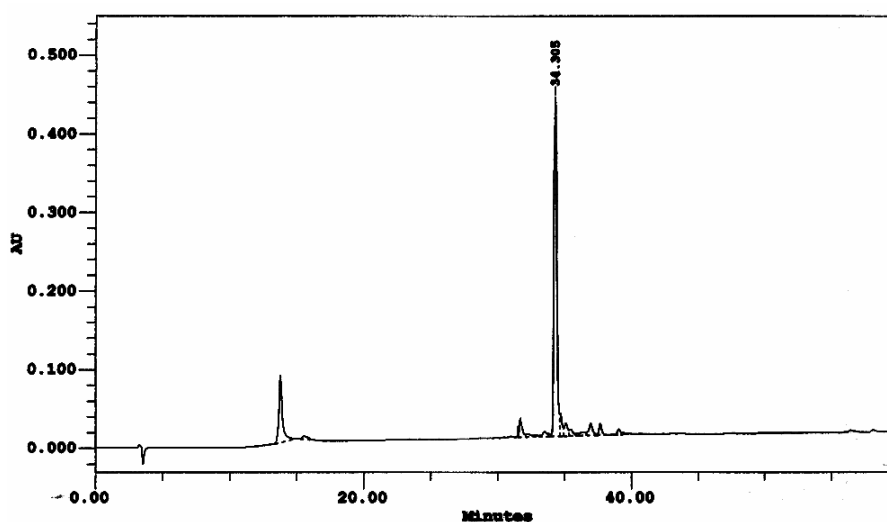
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 646.8 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 96.9%).

### ***Sblocco dalla resina***

Si è deciso di sbloccare tutto il peptide ottenuto dalla resina e dalle protezioni in catena laterale, ad eccezione del gruppo Acn legato alla Cys, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 268.0 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 87.00%).

### ***Analisi grezzo***

0.49 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 490  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10  $\mu$ L; gradiente, dallo 0 al 60% di B in 60 min; detector, 214 nm (Fig. 92).



**Fig. 92:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (77-87)BMP-2 grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 60% di B in 60 min; detector, 214 nm.

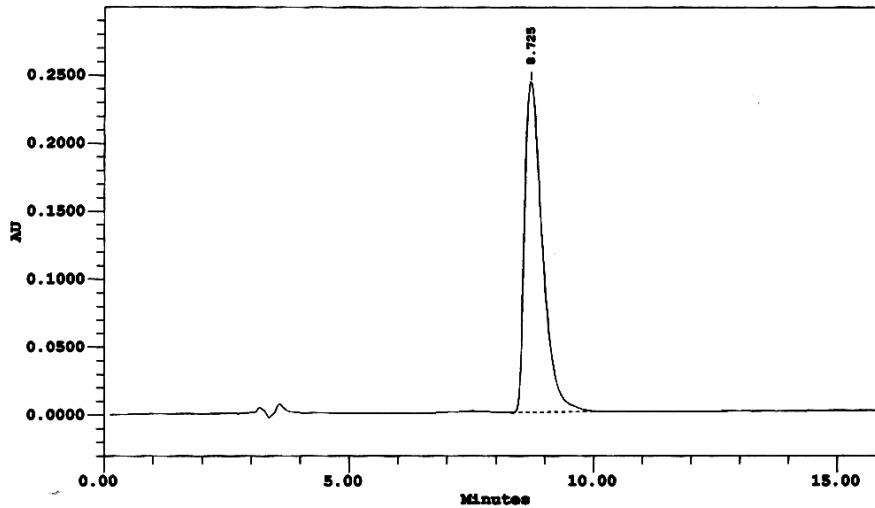
### ***Purificazione***

73.4 mg di grezzo sono stati purificati tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 15% di B in 1 min e dal 15 al 30% di B in 45 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 23 al 31% di B in 16 min; detector, 214 nm. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni, i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 7.17 mg al 100%, 7.44 mg tra il 98 e il 100%, 4.91 mg tra il 95 e il 98%, 16.24 mg tra il 90 e il 95%, 9.66 mg tra l'80 e il 90% e 3.76 mg tra il 60 e l'80%.

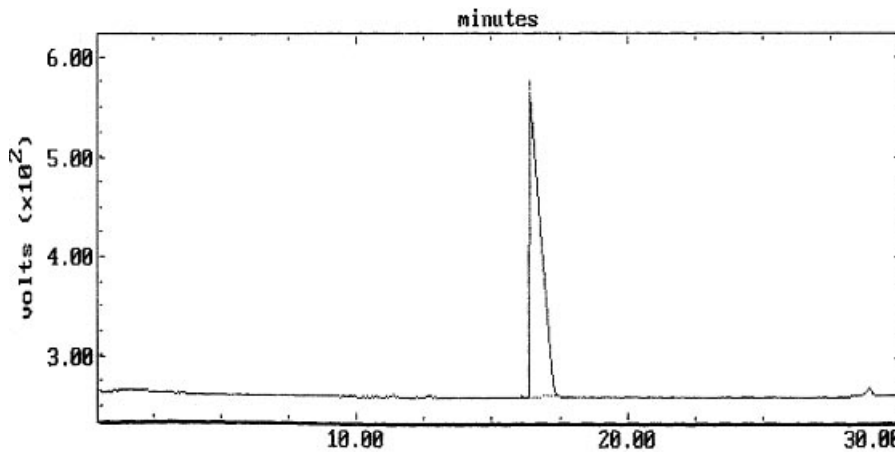
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

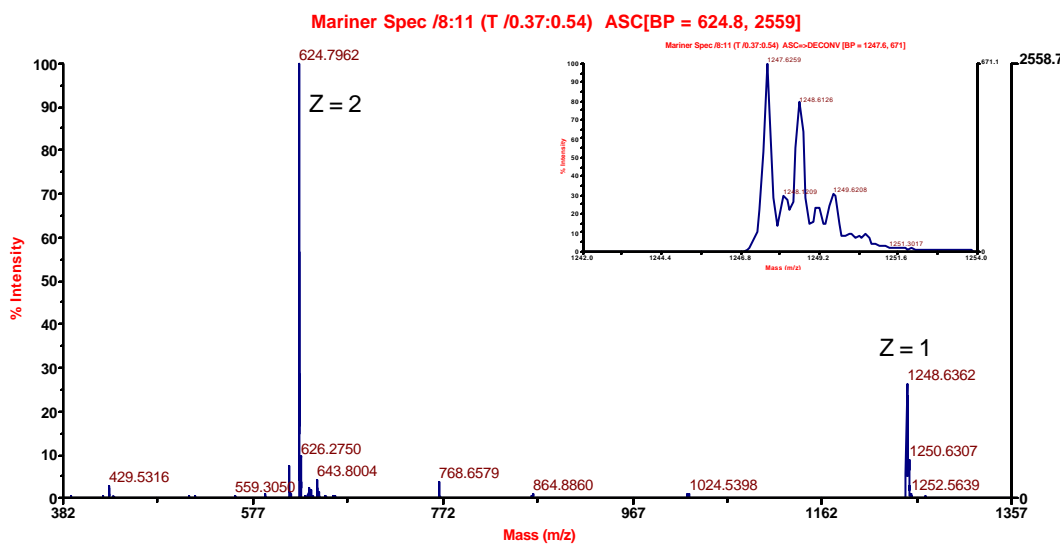
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 23 al 31% di B in 16 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 93);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.94% (Fig. 94)
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1247.6 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (Fig. 95).



**Fig. 93:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide (77-87)BMP-2 condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 23 al 31% di B in 16 min; detector, 214 nm.



**Fig. 94:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide (77-87)BMP-2 condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 95:** Analisi di massa della frazione migliore del peptide (77-87)BMP-2 eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.



## (58-87)BMP-2

### *Sequenza:*

*PM: 3293.88 Da*

H-Thr-Asn-His-Ala-Ile-Val-Gln-Thr-Leu-Val-Asn-Ser-Val-Asn-Ser-Lys-Ile-Pro-Lys-Ala-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-OH

### *Sintesi*

Il peptide (58-87)BMP-2 è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc utilizzando, come materiale di partenza, 501.5 mg (0.1165 mmoli) di peptide (68-87)BMP-2 protetto in catena laterale e ancora legato alla resina HMP.

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Ser e Thr, OtBu per Glu, Acm per Cys, Boc per Lys e Trt per Asn, Gln e His.

La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. Tutte le reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* doppio, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, e monitorate tramite test alla ninidrina: nei casi in cui la resa delle reazioni di *coupling* è risultata inferiore al 98% si è proceduto ad una ulteriore reazione di condensazione tramite *coupling* eseguito manualmente utilizzando come agenti condensanti HATU e HOAt. La procedura di *coupling* eseguito manualmente prevede di trasferire il peptide in crescita su resina seccato dal reattore ad un pallone e di aggiungere 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto sciolta in 1.5 mL di NMP ed attivata con la seguente soluzione: 1 mmole di HOAt, 1 mmole di HATU e 0.32 mL di DIEA in 2 mL di DMF. La miscela viene lasciata reagire per 2 ore a temperatura ambiente, mescolando manualmente. Al termine, il peptide in crescita su resina è stato filtrato su gooch G3, lavato con NMP e DCM, quindi seccato, e trasferito nuovamente nel reattore.

Le indicazioni relative alle rese percentuali ottenute tramite *coupling* doppio, e quelle relative all'eventuale successivo *coupling* eseguito manualmente (evidenziate in rosso), sono riassunte nella seguente tabella:

AA	Sostituzione	mg resina	Abs <sub>570nm</sub>	mmoli/g di ammina	Resa %
Val <sup>67</sup>	0.21697	3.2	0.017	1.77083	99.18
Leu <sup>66</sup>	0.21177	4.7	0.030	2.12766	99.00
Thr <sup>65</sup>	0.20495	4.2	0.033	2.61905	98.70
Gln <sup>64</sup>	0.19048	3.5	0.046	4.38095	97.70
<b>Gln<sup>64M</sup></b>	0.19048	3.2	0.018	1.87500	<b>99.02</b>
Val <sup>63</sup>	0.18695	3.0	0.072	8.00000	95.72
<b>Val<sup>63M</sup></b>	0.18695	3.5	0.034	3.23810	<b>98.27</b>
Ile <sup>62</sup>	0.18308	3.6	0.057	5.27778	97.12
<b>Ile<sup>62M</sup></b>	0.18308	3.2	0.020	2.08333	<b>98.86</b>
Ala <sup>61</sup>	0.18073	3.3	0.032	3.23232	98.21
His <sup>60</sup>	0.16913	3.2	0.027	2.81250	98.34
Asn <sup>59</sup>	0.15951	3.4	0.035	3.34137	97.85
<b>Asn<sup>59M</sup></b>	0.15951	3.3	0.016	1.61616	<b>98.99</b>
Thr <sup>58</sup>	0.15561	3.6	0.028	2.59259	98.33

<sup>M</sup> indica coupling eseguito manualmente

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 589.3 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 81.33%).

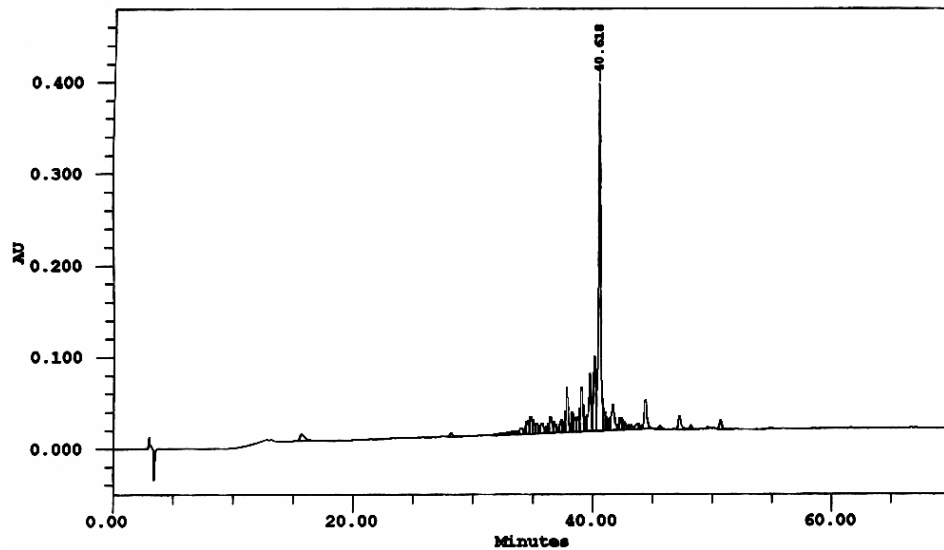
### ***Sblocco dalla resina***

Si è deciso di sbloccare tutto il peptide dalla resina e dalle protezioni in catena laterale, ad eccezione del gruppo AcM legato alla Cys, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min mescolando a temperatura ambiente con agitatore magnetico. Si sono ottenuti 331.21 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

0.65 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 650 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0

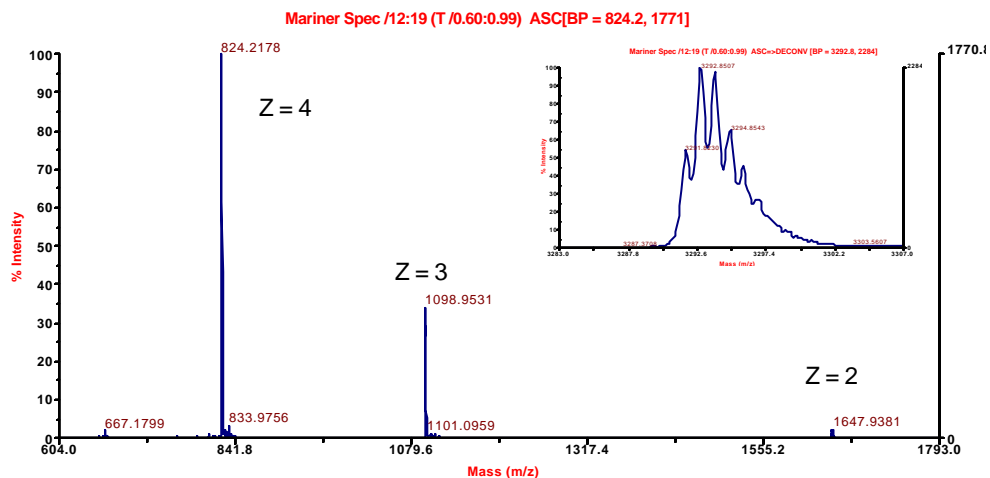
mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dallo 0 al 70% di B in 70 min; detector, 214 nm (Fig. 96).



**Fig. 96:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (58-87)BMP-2 grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 70% di B in 70 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 µL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 29 al 39% di B in 20 min; detector, 214 nm.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 96 con  $t_R = 40.618$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 97).



**Fig. 97:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 96 con  $t_R = 40.618$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

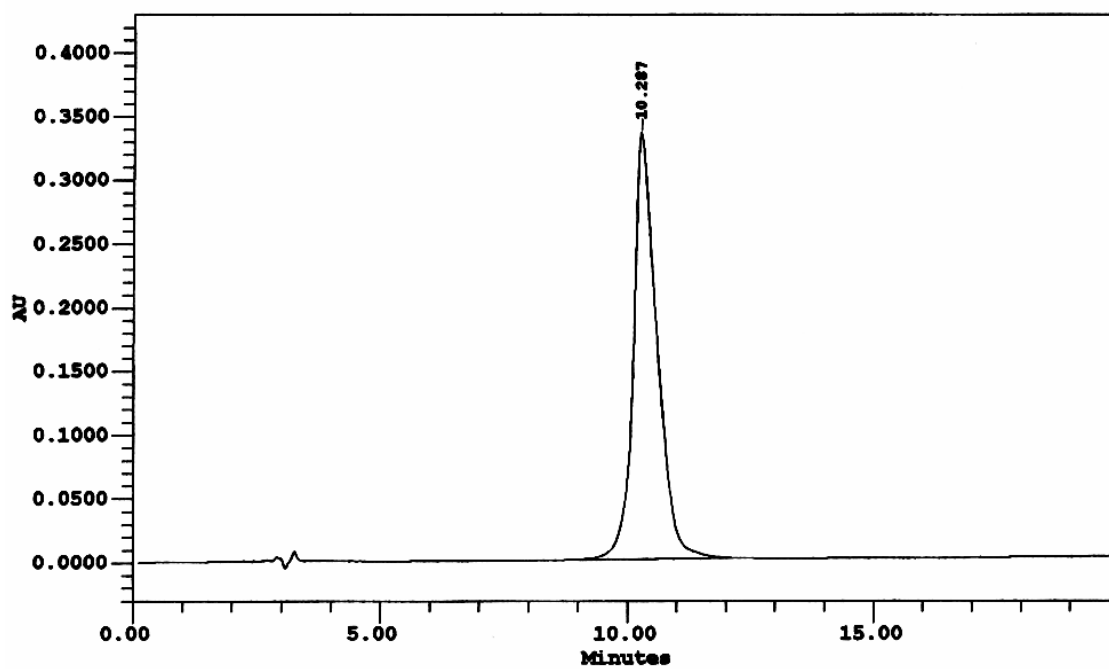
### ***Purificazione***

Si è deciso di purificare circa metà del grezzo ottenuto (161.4 mg) tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Delta Pak C<sub>18</sub> SP (15 µm, 100 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 20% di B in 1 min e dal 20 al 35% di B in 45 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 29 al 39% di B in 20 min; detector, 214 nm; le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 4.36 mg al 100%, 13.73 mg con grado di purezza superiore al 98%, 15.37 mg tra il 96 e il 98%, 7.77 mg tra il 90 e il 96% e 12.94 mg tra l'80 e il 90%.

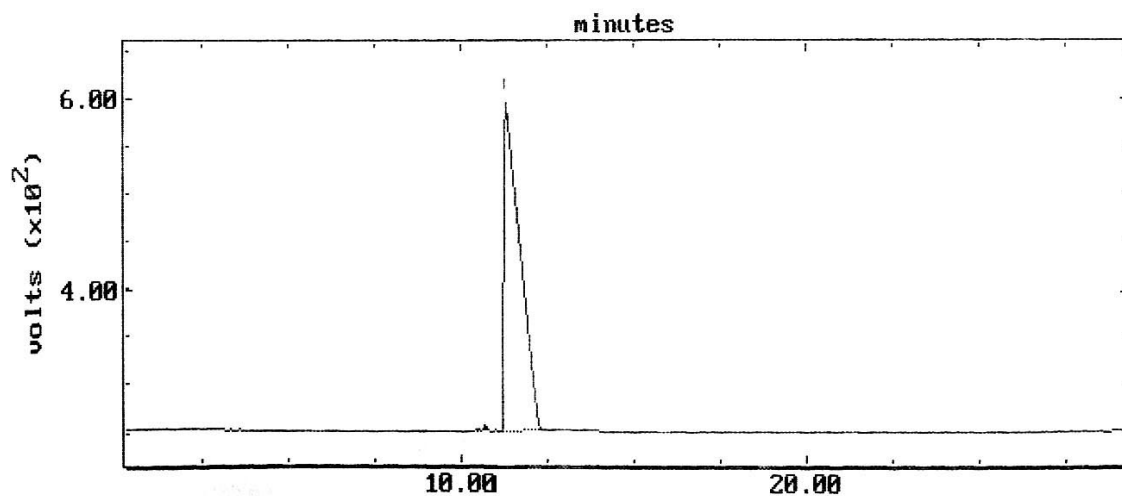
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 29 al 39% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 98);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.69% (Fig. 99)



**Fig. 98:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide (58-87)BMP-2 condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 29 al 39% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 99:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide (58-87)BMP-2 condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

# SINTESI DEI PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI

## EAK 16-II

*Sequenza:*

*PM: 1614.83 Da*

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

### *Sintesi*

Il peptide EAK 16-II è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.59 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Glu e Boc per Lys.

453.9 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2678 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. Le successive quattro reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, mentre le rimanenti undici in *coupling* doppio.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 889.33 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 89.87%).

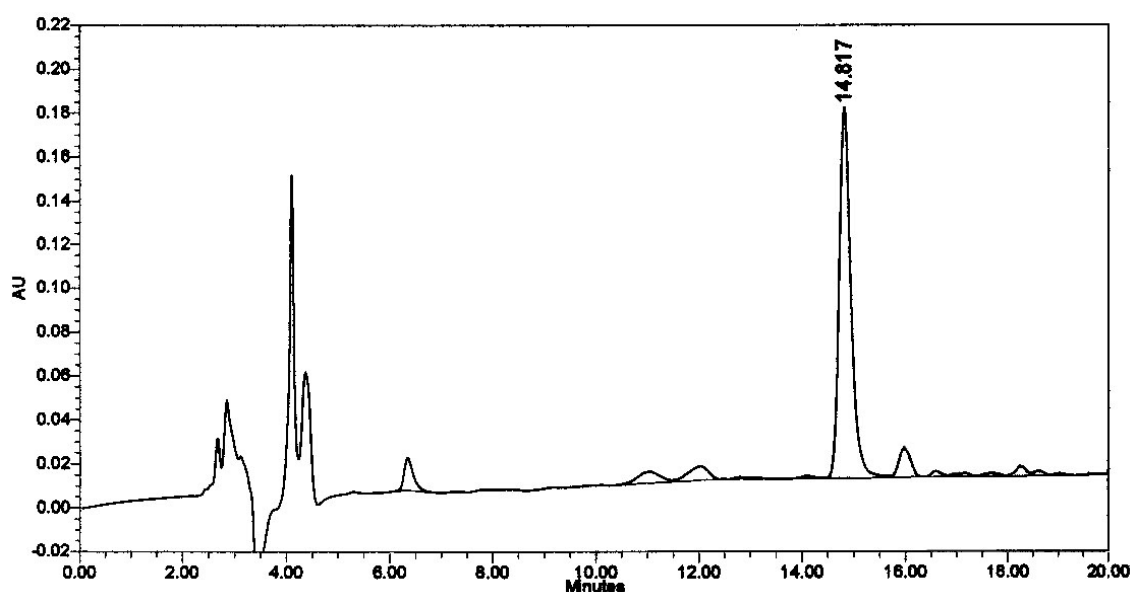
### *Sblocco dalla resina*

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di

sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 388.64 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 91.10%).

### *Analisi grezzo*

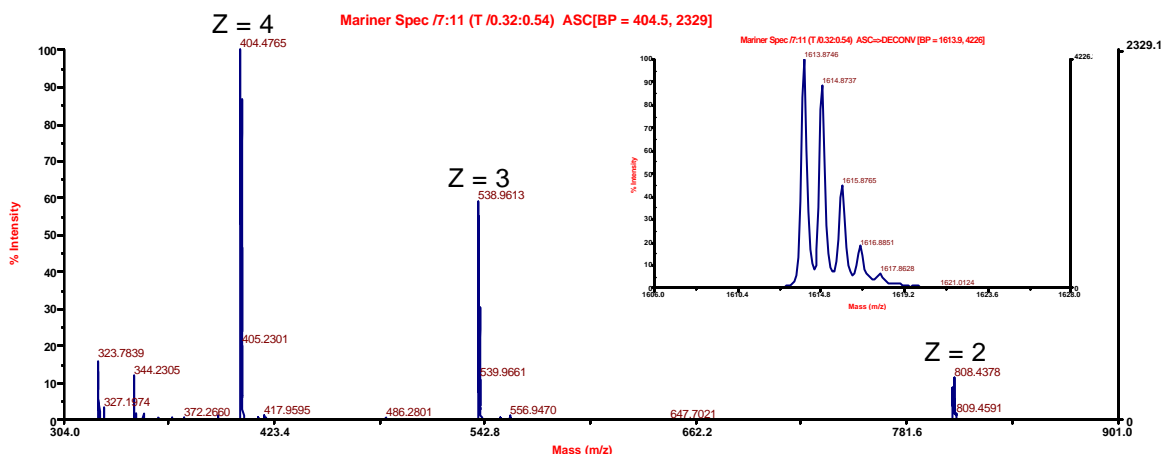
1.02 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1020  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 100).



**Fig. 100:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide EAK 16-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 100 con  $t_{\text{R}} = 14.817$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 101).



**Fig. 101:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 100 con  $t_R = 14.817$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### **Purificazione**

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'8% di B in 2 min e dall'8 al 16% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo (gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 min); le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 32.62 mg con grado di purezza superiore al 98%, 8.65 mg tra il 97 e il 98%, 2.59 mg tra il 95 e il 97%, 11.01 mg tra il 90 e il 95% e 3.91 mg tra il 60 e il 90%.

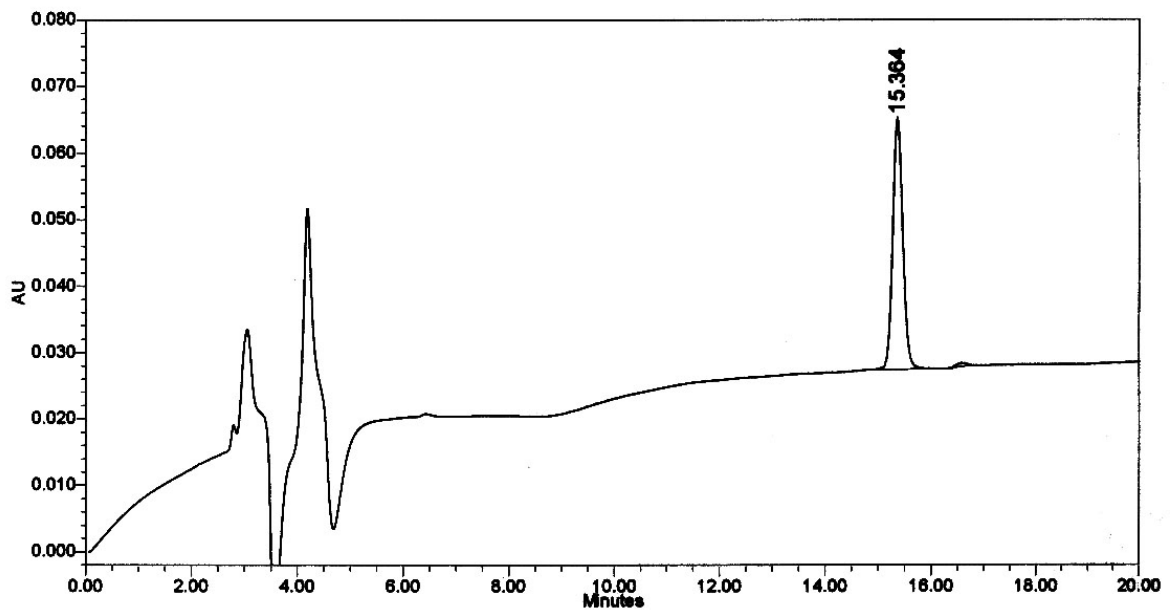
### **Caratterizzazione**

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

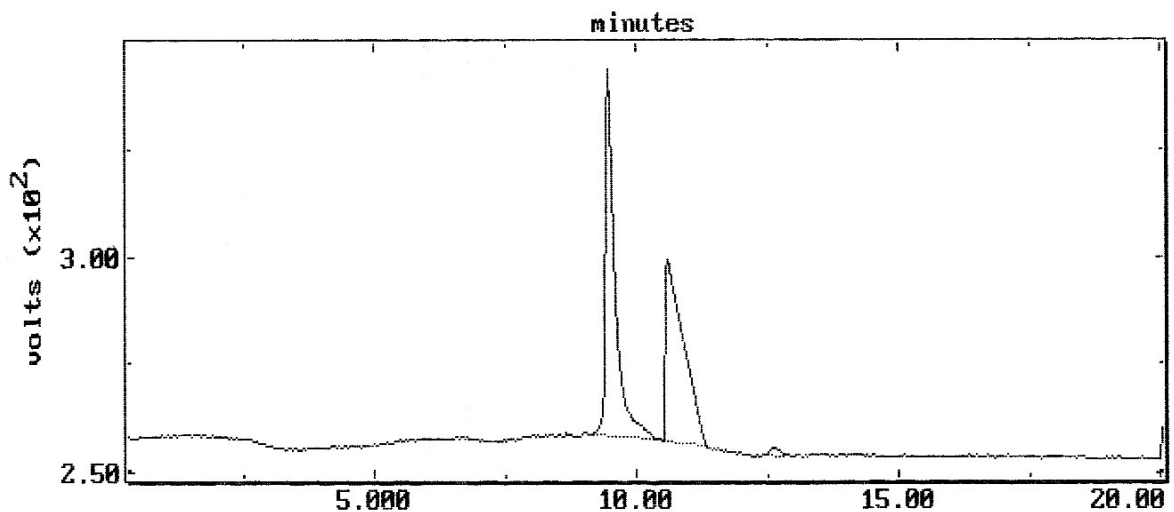
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.67% (Fig. 102);



- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. Come era prevedibile, l'elettroferogramma mostra la presenza di più picchi dovuti al verificarsi di fenomeni di aggregazione indotti dagli ioni  $\text{Na}^+$  presenti nel tampone (Fig. 103).



**Fig. 102:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EAK 16-II condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna  $\text{C}_{18}$  analitica ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $100\ \text{\AA}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ); flusso,  $1.0\ \text{mL/min}$ ; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 103:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide EAK 16-II condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## RGD-(EAK 16-II)

*Sequenza:*

*PM: 1943.16 Da*

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

### *Sintesi*

Il peptide RGD-(EAK 16-II) è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.66 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Asp e Glu, Pmc per Arg e Boc per Lys.

386.1 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2549 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 99.44%. Sono state eseguite quattro reazioni di condensazione in *coupling* singolo, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, e tre reazioni in *coupling* doppio, con successivo sblocco del gruppo Fmoc N-terminale, prima di interrompere la sintesi per prelevare circa un quarto del peptide su resina dopo averlo seccato sotto vuoto per due ore. Dalla sintesi parziale si sono ottenuti in totale 630.49 mg di peptide EAK 8-II su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi parziale = 100%), di questi, 148.03 mg (23.48% sul totale) sono stati usati per ottenere l'ottapeptide e i rimanenti 482.46 mg sono stati rimessi nel reattore per continuare la sintesi. Le successive undici reazioni di condensazione sono state condotte in *coupling* doppio.

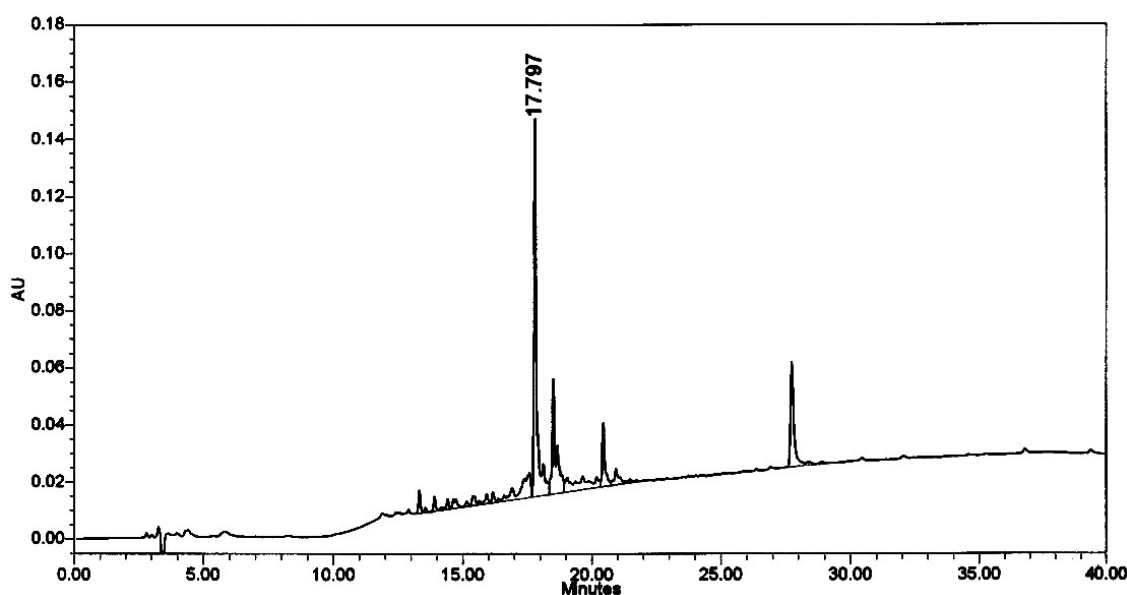
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 717.5 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 90.10%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 386.41 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### ***Analisi grezzo***

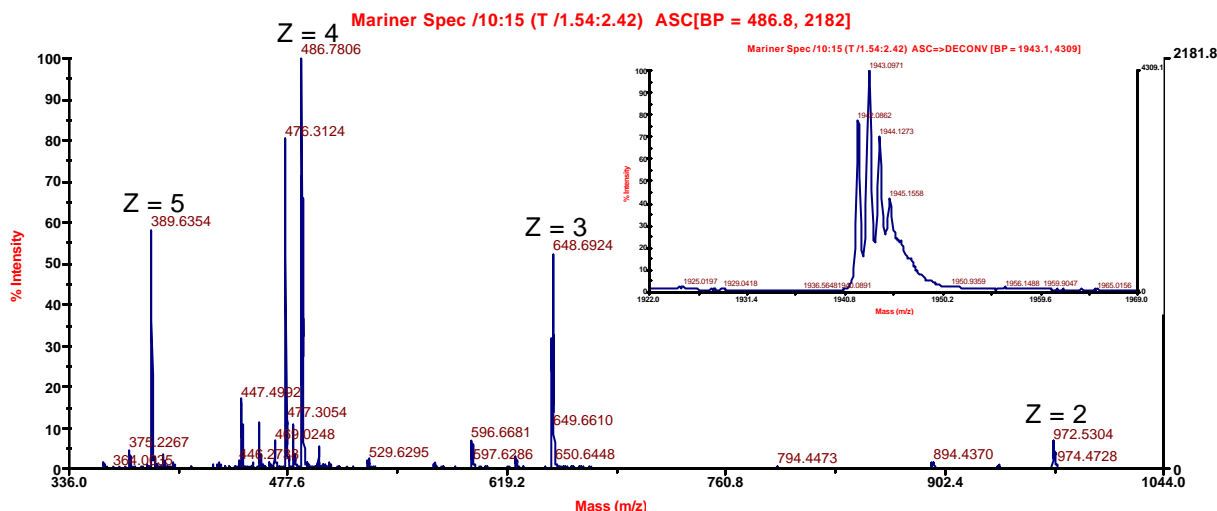
1.48 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1480 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm (Fig. 104).



**Fig. 104:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide RGD-(EAK 16-II) grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 µL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa da 40 min fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 104 con  $t_R = 17.797$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 105).



**Fig. 105:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 104 con  $t_R = 17.797$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### Purificazione

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu$ m, 60 Å, 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 7% di B in 2 min e dal 7 al 16% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 39.49 mg con grado di purezza superiore al 98%, 3.97 mg tra il 95 e il 98% e 2.23 mg tra il 60 e il 95%.

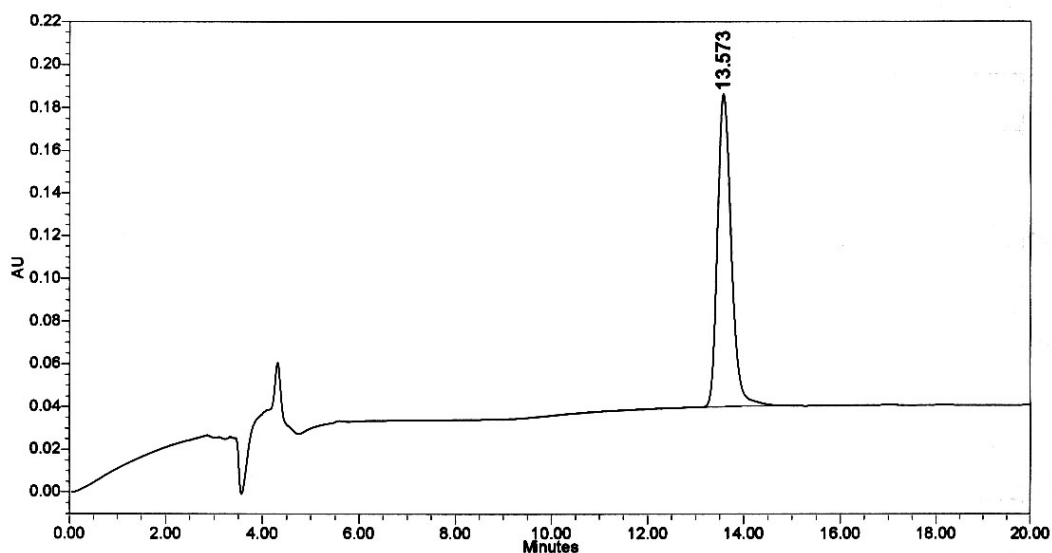
### Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

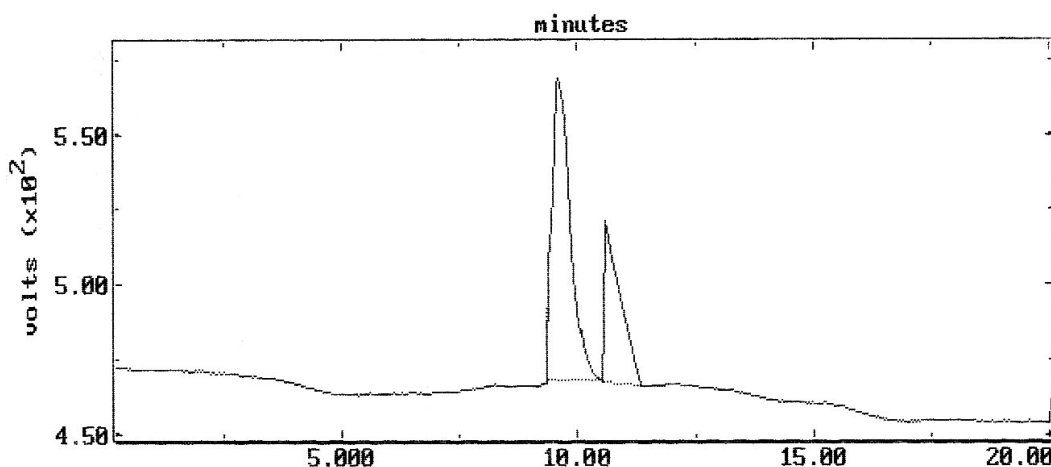
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in

20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.78% (Fig. 106);

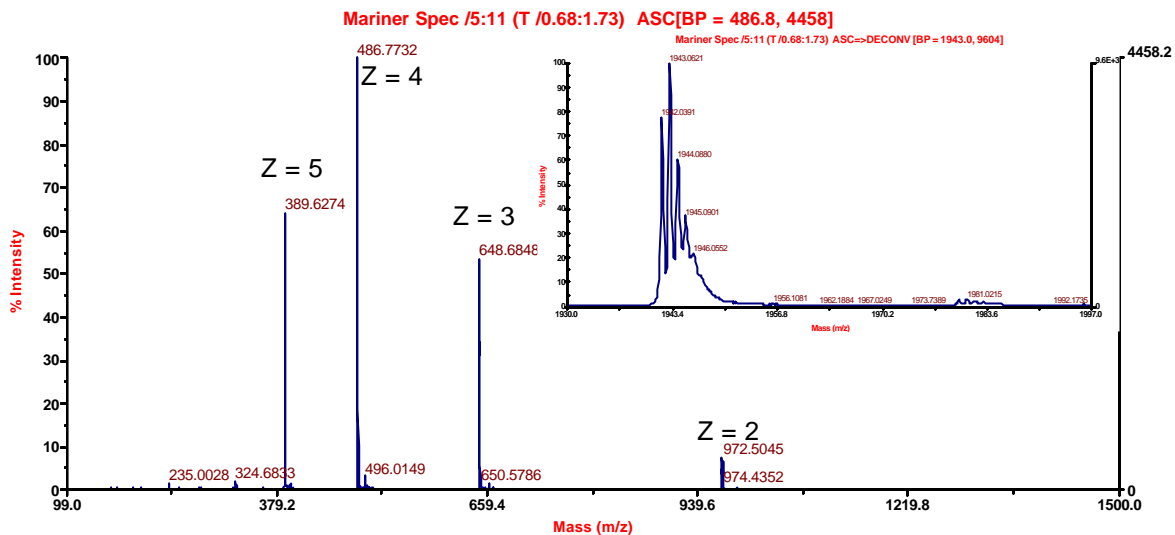
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. Come era prevedibile, l'elettroferogramma mostra la presenza di più picchi dovuti al verificarsi di fenomeni di aggregazione indotti dagli ioni  $\text{Na}^+$  presenti nel tampone (Fig. 107).
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1943.0 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (Fig. 108).



**Fig. 106:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide RGD-(EAK 16-II) condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica ( $5 \mu\text{m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ ,  $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 107:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide RGD-(EAK 16-II) condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 108:** Analisi di massa della frazione migliore del peptide RGD-(EAK 16-II) eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

## EAK 8-II

**Sequenza:**

**PM: 815.93 Da**

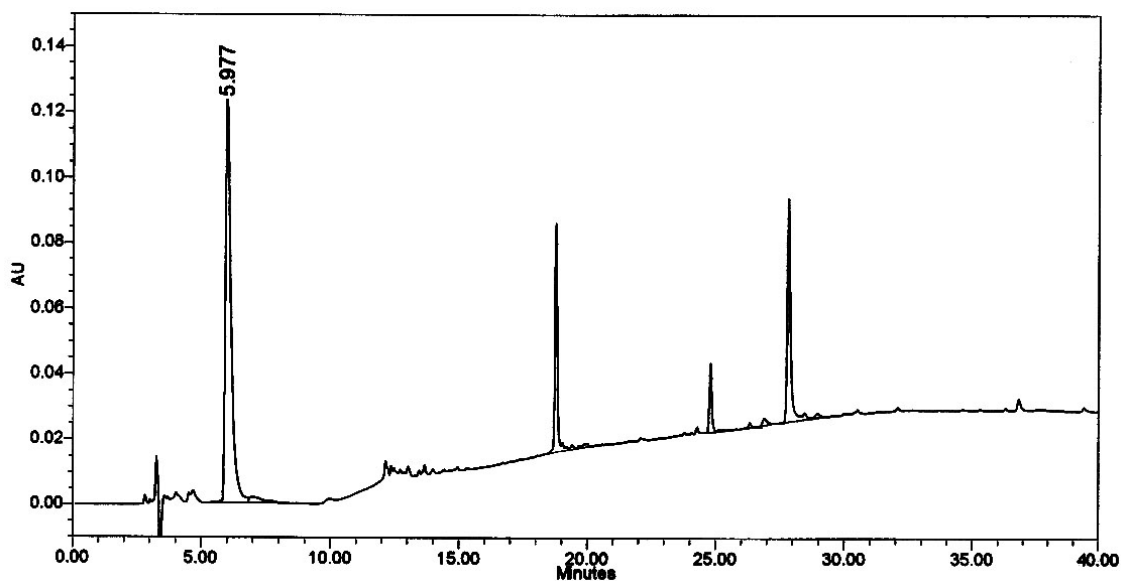
H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

### *Sblocco dalla resina*

148.03 mg ( $5.8646 \times 10^{-5}$  moli) di peptide su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 170), sono stati sbloccati dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 51.38 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### *Analisi grezzo*

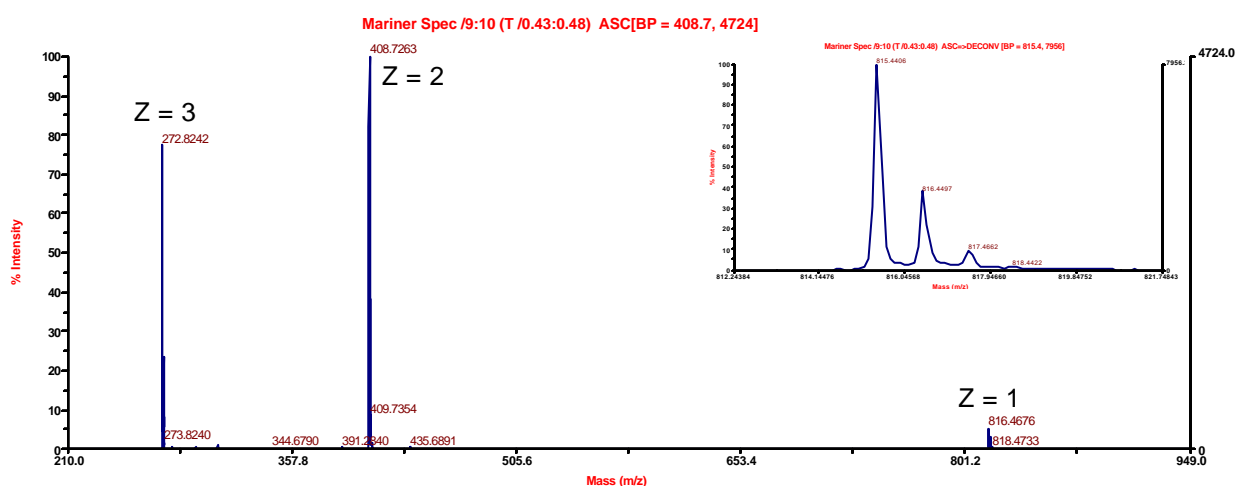
0.81 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 810  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 10  $\mu$ L; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm (Fig. 109).



**Fig. 109:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide EAK 8-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200  $\mu$ L di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa da 40 min fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 109 con  $t_R = 5.977$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 110).



**Fig. 110:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 109 con  $t_R = 5.977$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### Purificazione

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna

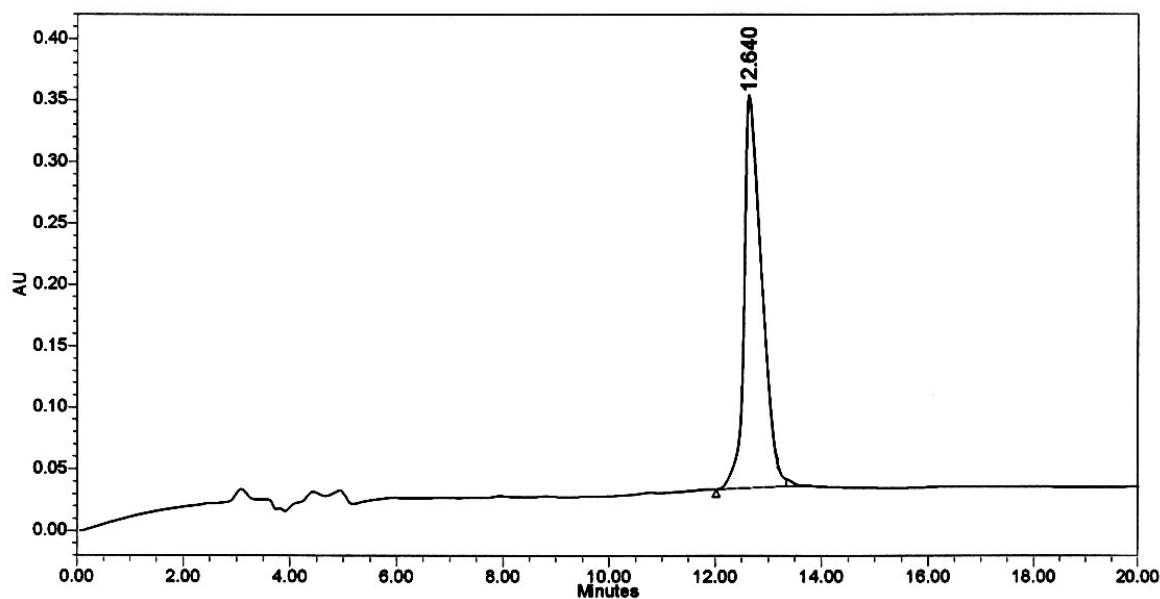
semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, 100% di A per 10 min, dallo 0 al 10% di B in 10 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 2 al 12% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 26.15 mg con grado di purezza superiore al 98%, 1.56 mg tra il 95 e il 98% e 3.04 mg tra l'80 e il 95%.

### ***Caratterizzazione***

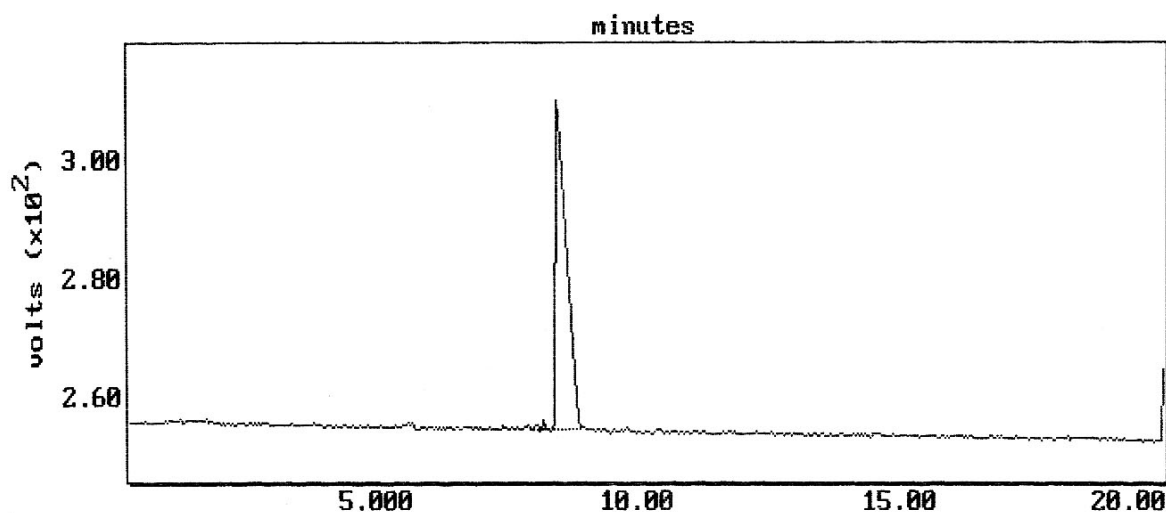
La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 2 al 12% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.41% (Fig. 111);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.07% (Fig. 112)





**Fig. 111:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EAK 8-II condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 2 al 12% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 112:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide EAK 8-II condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## **RGD-(EAK 16-II) Sc**

*Sequenza:*

*PM: 1943.16 Da*

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Glu-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Lys-NH<sub>2</sub>

## ***Sintesi***

Il peptide RGD-(EAK 16-II) Sc è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.66 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: Pmc per Arg, OtBu per Asp e Glu e Boc per Lys.

393.8 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2599 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 96.18%. Data la resa non ottimale per la funzionalizzazione (inferiore al 98%) si è deciso di bloccare i siti della resina che non hanno reagito tramite *capping*: prima di sbloccare il gruppo Fmoc N-terminale si è eseguito un *coupling* singolo utilizzando 2 mmoli (0.45 g) di anidride benzoica. Le successive quattro reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, mentre le rimanenti in *coupling* doppio.

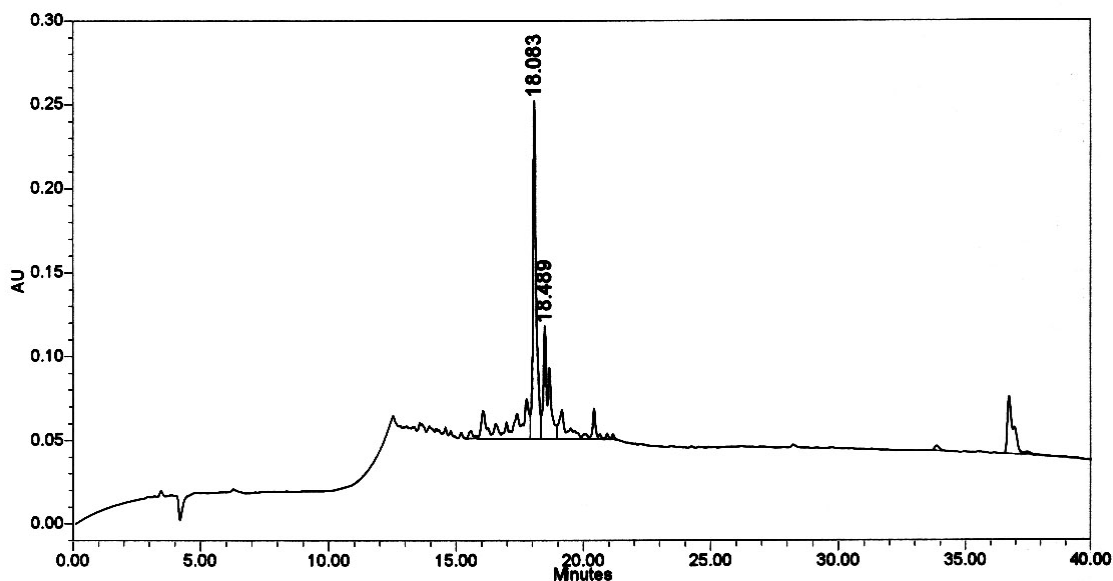
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 998.9 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 97.41%).

## ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 449.43 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 96.47%).

### *Analisi grezzo*

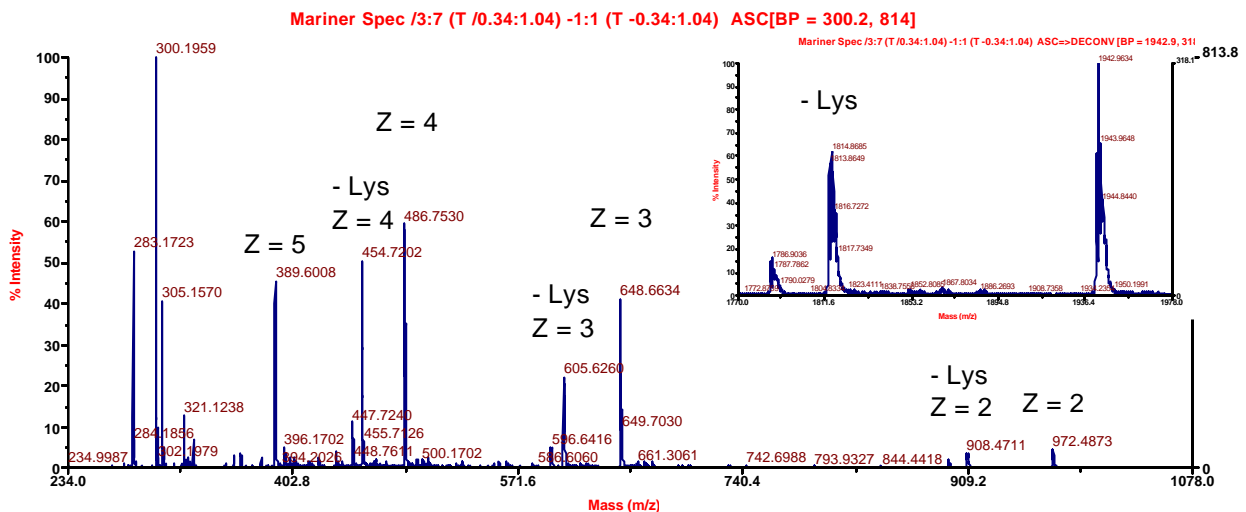
1.21 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1210  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm (Fig. 113).



**Fig. 113:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide RGD-(EAK 16-II) Sc grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza. La frazione raccolta contenente il picco principale è stata controllata tramite corsa cromatografica alle solite condizioni: oltre al picco che si vede in Fig 113 con  $t_{\text{R}} = 18.083$  min è presente anche un secondo picco con  $t_{\text{R}} = 18.489$  min.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 113 con  $t_{\text{R}} = 18.083$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 114), mentre la seconda componente presente è dovuta ad un sottoprodotto contenente una Lys in meno ( $\text{PM}_{\text{teorico}} = 1814.9$  Da), ipotesi confermata anche dalla mancanza del picco a  $z = 5$  per questo composto.



**Fig. 114:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 113 con  $t_R = 18.083$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### Purificazione

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'8% di B in 2 min e dall'8 al 16% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 46.42 mg con grado di purezza superiore al 98%, 2.87 mg tra il 90 e il 95% e 5.64 mg tra il 75 e il 90%.

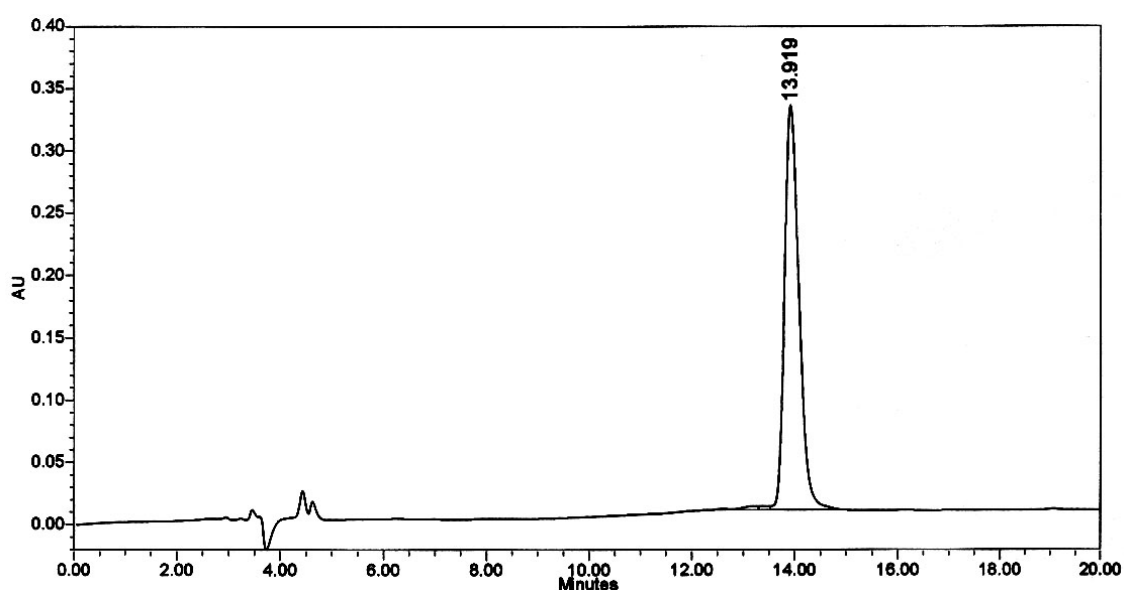
### Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

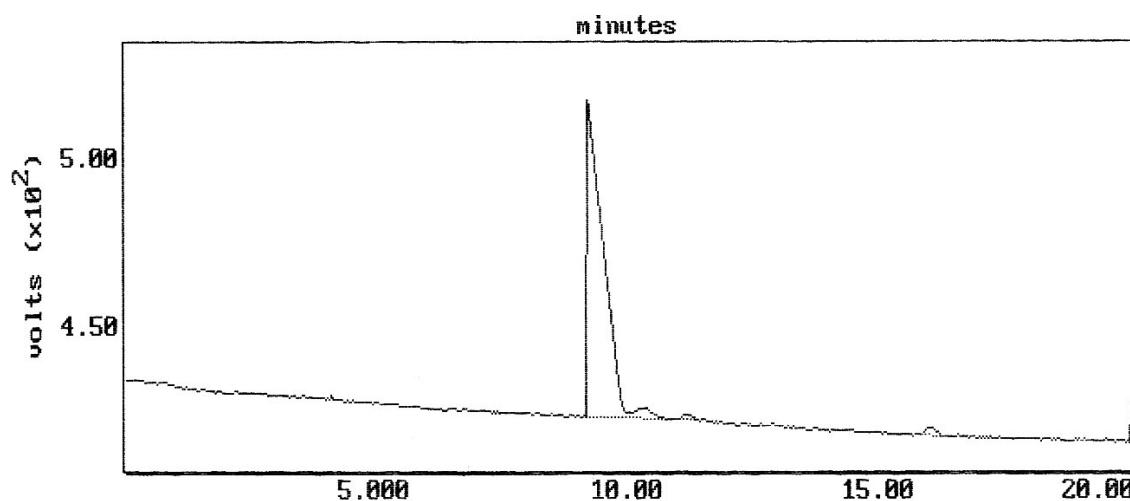
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min;

detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.19% (Fig. 115);

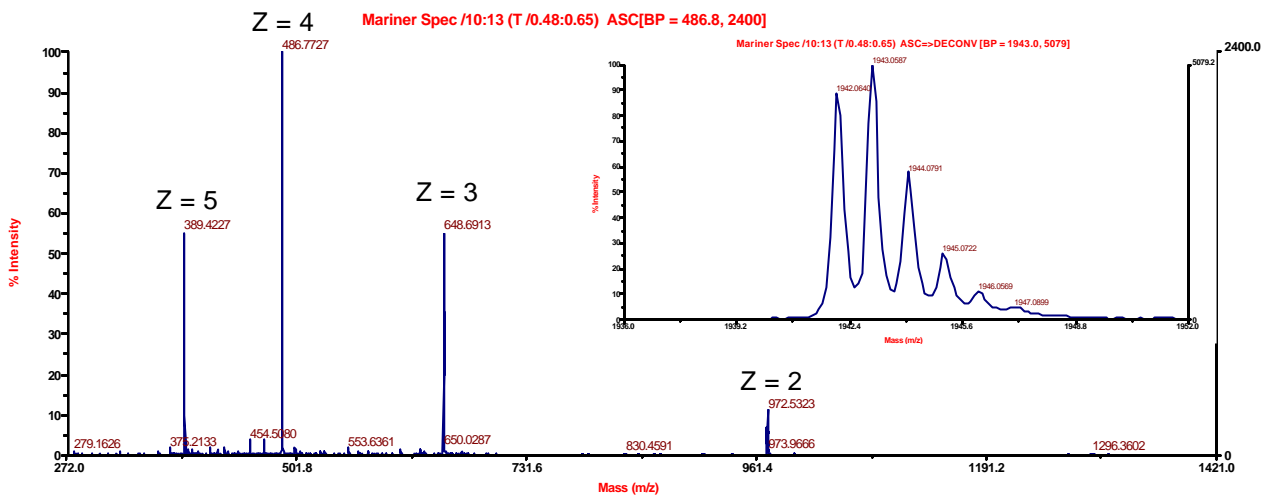
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 93.66% (Fig. 116)
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1943.0 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (Fig. 117).



**Fig. 115:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide RGD-(EAK 16-II) Sc condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 116:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide RGD-(EAK 16-II) Sc condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 117:** Analisi di massa della frazione migliore del peptide RGD-(EAK 16-II) Sc eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

## DAK 16-II

**Sequenza:**

**PM: 1558.72 Da**

H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

### Sintesi

Il peptide DAK 16-II è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.66 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Asp e Boc per Lys.

392.8 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2592 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%.

Sono state eseguite quattro reazioni di condensazione in *coupling* singolo, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, e tre reazioni in *coupling* doppio, con successivo sblocco del gruppo Fmoc N-terminale, prima di interrompere la sintesi per prelevare circa un quarto del peptide su resina dopo averlo seccato sotto vuoto per due ore. Dalla sintesi parziale si sono ottenuti in totale 659.6 mg di peptide DAK 8-II su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi parziale = 100%), di questi, 160.5 mg (24.33% sul totale) sono stati usati per ottenere l'ottapeptide e i rimanenti 499.1 mg sono stati rimessi nel reattore per continuare la sintesi. Le successive otto reazioni di condensazione sono state condotte in *coupling* doppio.

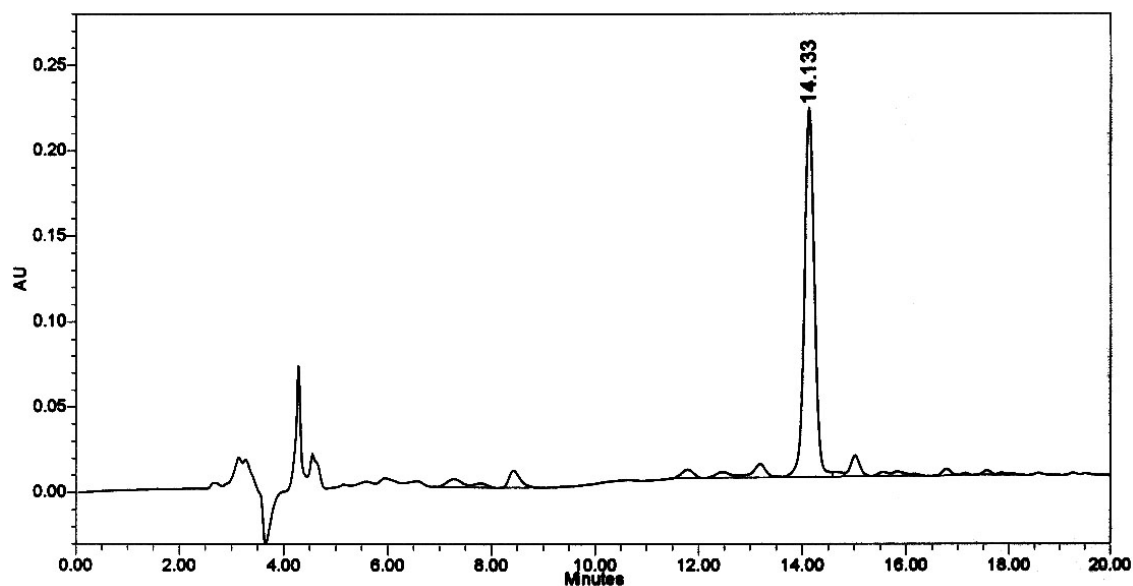
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 671.7 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 98.97%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 257.69 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 85.15%).

### ***Analisi grezzo***

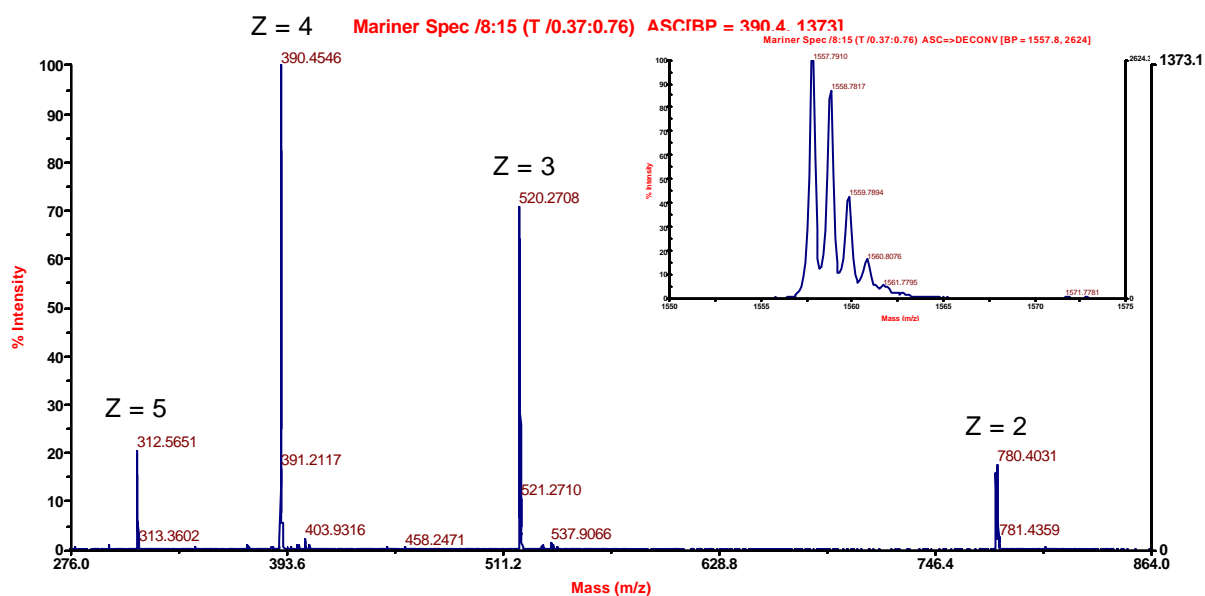
0.60 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 600  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, dal 7 al 17% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 118).



**Fig. 118:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide DAK 16-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 7 al 17% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 μL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 118 con  $t_R = 14.133$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 119).



**Fig. 119:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig con  $t_R = 14.133$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.



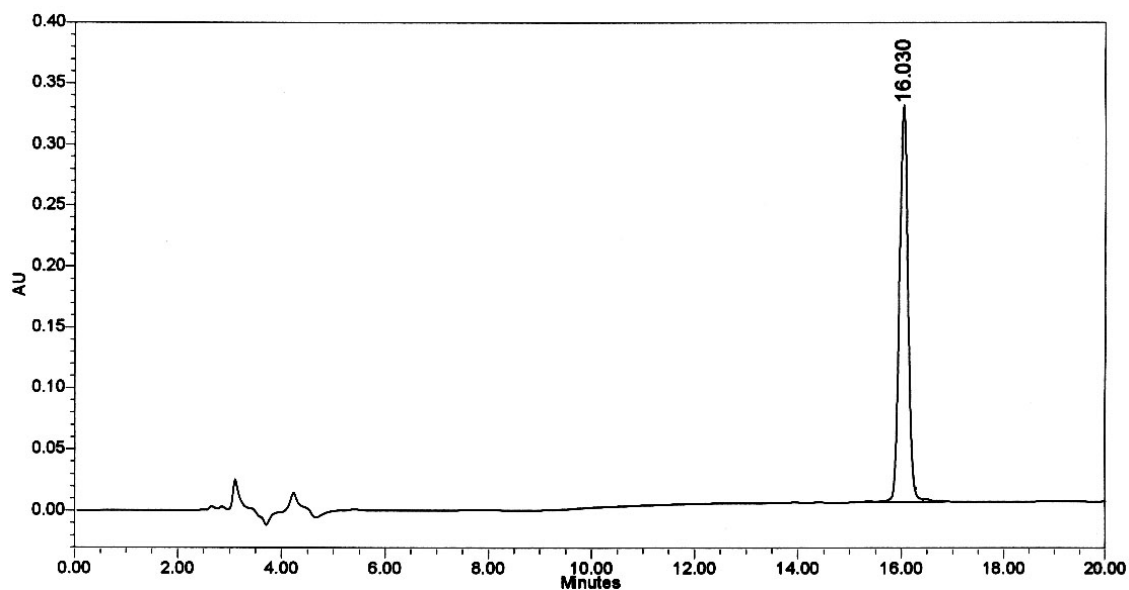
### ***Purificazione***

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 3% di B in 2 min e dal 3 all'11% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 27.98 mg con grado di purezza superiore al 98%, 9.07 mg tra il 97 e il 98%, 5.78 mg tra il 95 e il 97%, 15.41 mg tra il 90 e il 95%, 24.27 mg tra l'80 e il 90%, e 18.14 mg tra il 60 e l'80%.

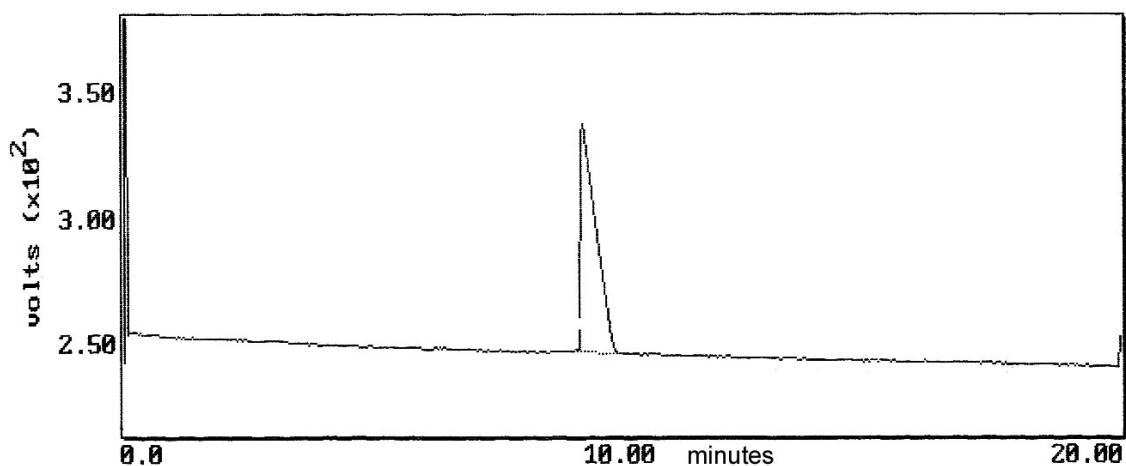
### ***Caratterizzazione***

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.50% (Fig. 120);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.68% (Fig. 121). Stranamente questo peptide non mostra la presenza di più picchi dovuti al verificarsi di fenomeni di aggregazione indotti dagli ioni Na<sup>+</sup> presenti nel tampone come nel caso degli altri peptidi auto-assemblanti da 16 residui sintetizzati.



**Fig. 120:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide DAK 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 6 al 16% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 121:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide DAK 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## DAK 8-II

*Sequenza:*

*PM: 787.88 Da*

H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

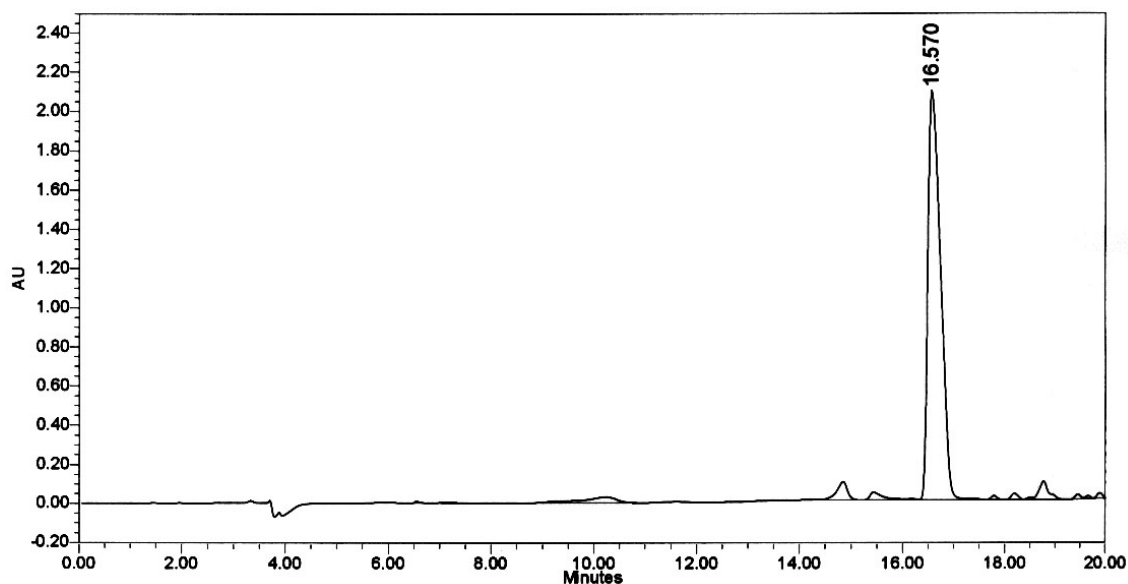
### *Sblocco dalla resina*

160.48 mg ( $6.3079 \times 10^{-5}$  moli) di peptide su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 183), sono stati sbloccati dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene

lateralmente, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 45.41 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 91.37%).

### *Analisi grezzo*

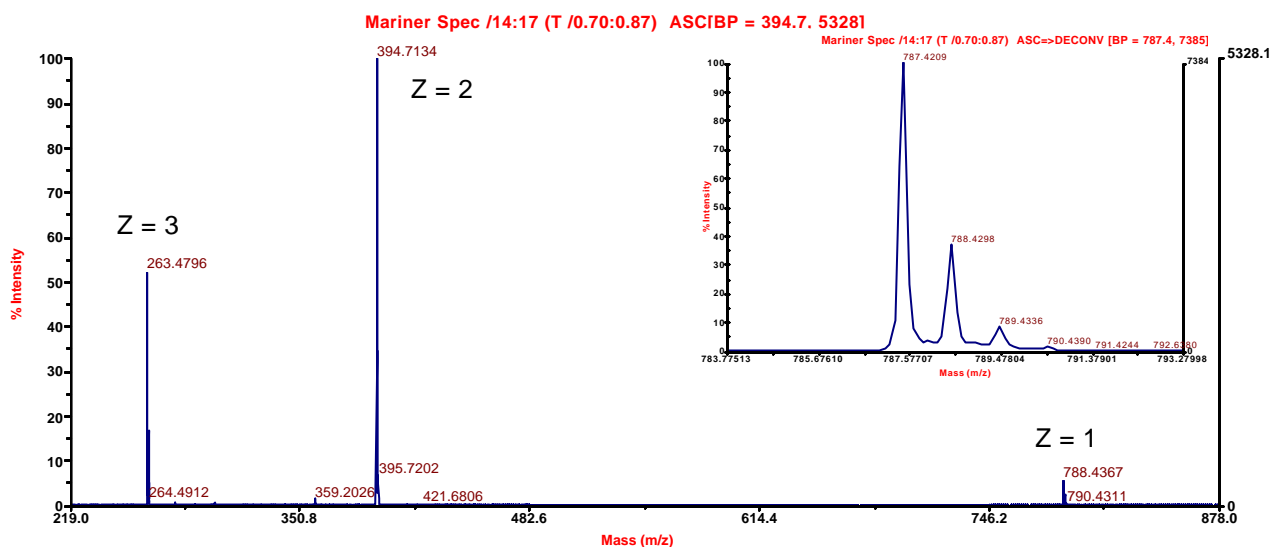
1.12 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1120 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 122).



**Fig. 122:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide DAK 8-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 µL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 122 con  $t_R = 16.570$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 123).



**Fig. 123:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 122 con  $t_R = 16.570$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### Purificazione

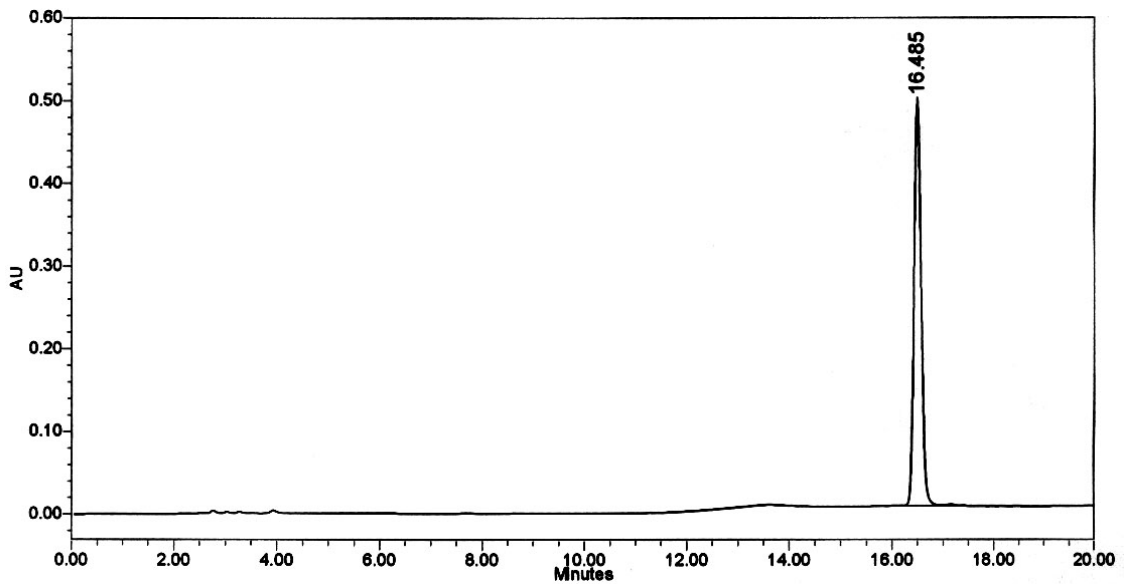
Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica, 100% di A; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il grezzo. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine si è ottenuta una sola frazione di 29.88 mg con grado di purezza superiore al 98%.

### Caratterizzazione

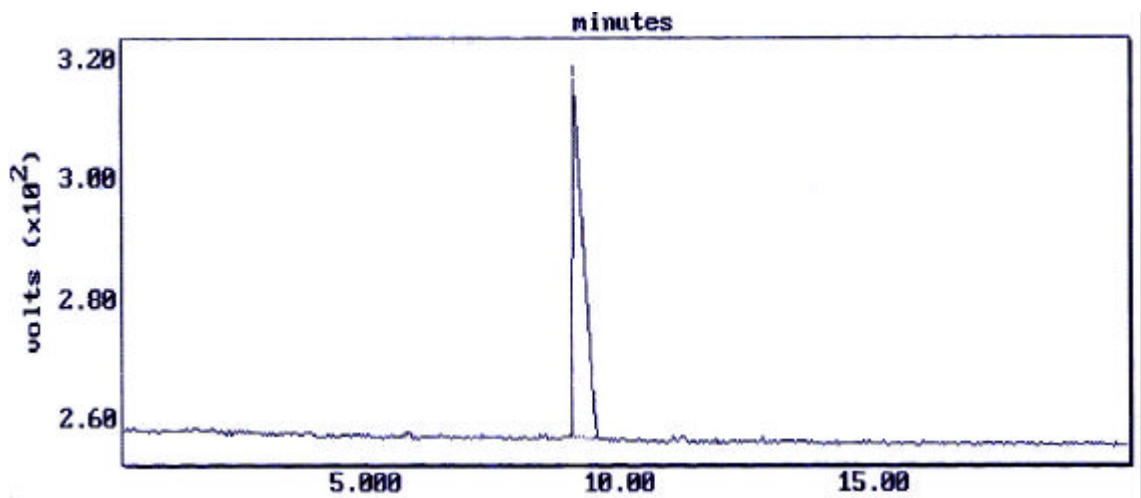
La caratterizzazione del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.52% (Fig. 124);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM,

pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 100% (Fig. 125)



**Fig. 124:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide DAK 8-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 125:** Elettroforesi capillare del peptide DAK 8-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## DAOrn 16-II

*Sequenza:*

*PM: 1502.62 Da*

H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Orn-Ala-Orn-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Orn-Ala-Orn-NH<sub>2</sub>

## ***Sintesi***

Il peptide DAOrn 16-II è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.66 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Asp e Boc per Orn.

386.4 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2550 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Orn(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. Sono state eseguite quattro reazioni di condensazione in *coupling* singolo, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, e tre reazioni in *coupling* doppio, con successivo sblocco del gruppo Fmoc N-terminale, prima di interrompere la sintesi per prelevare parte del peptide su resina dopo averlo seccato sotto vuoto per due ore. Dalla sintesi parziale si sono ottenuti in totale 559.8 mg di peptide DAOrn 8-II su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi parziale = 94.95%), di questi, 96.5 mg (17.24% sul totale) sono stati usati per ottenere l'ottapeptide e i rimanenti 463.3 mg sono stati rimessi nel reattore per continuare la sintesi. Le successive otto reazioni di condensazione sono state condotte in *coupling* doppio.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico dal gruppo Fmoc, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 623.5 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 92.84%).

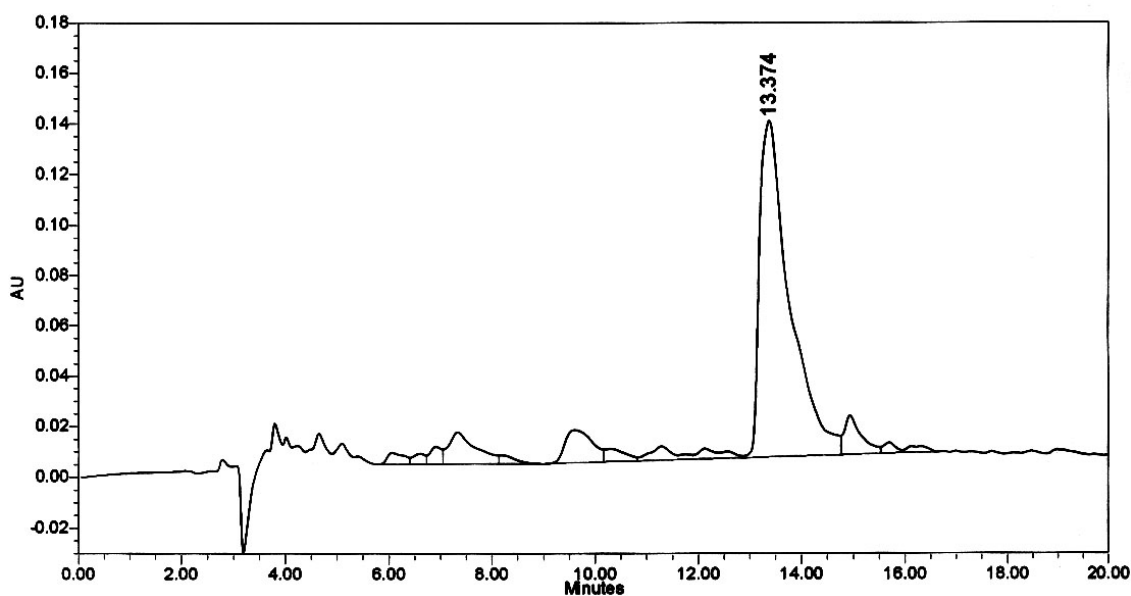
## ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di

sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 275.23 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 85.21%).

### *Analisi grezzo*

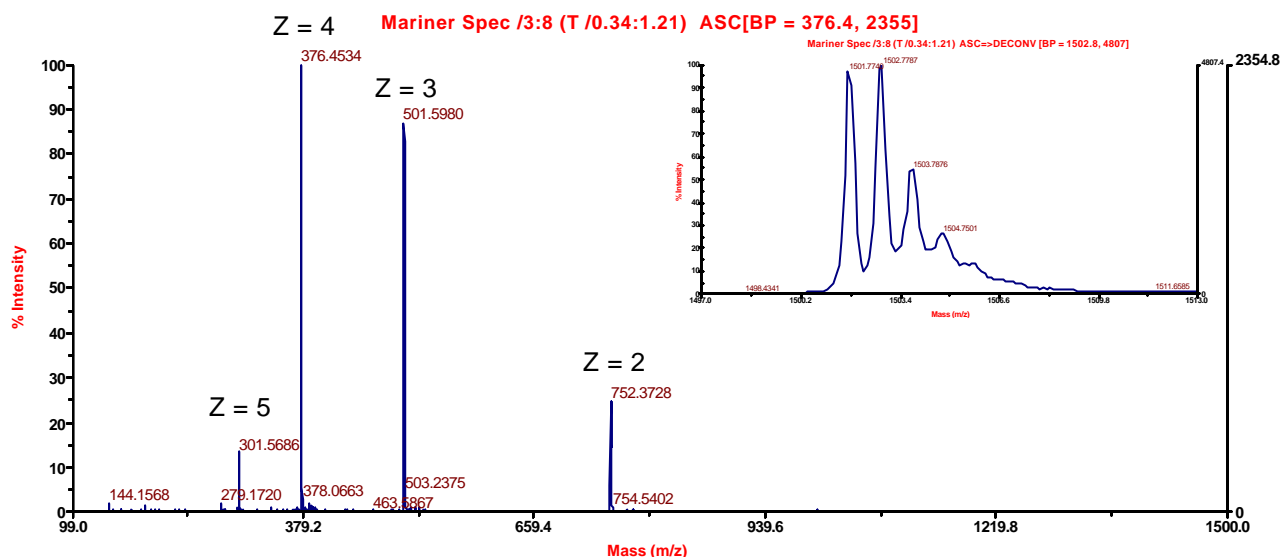
1.40 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1400  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, dal 5 al 15% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 126).



**Fig. 126:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide DAOrn 16-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $\text{C}_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dal 5 al 15% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa da 20 min fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 126 con  $t_R = 13.374$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 127).



**Fig. 127:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig con  $t_R = 13.374$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### Purificazione

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu$ m, 60 Å, 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 5% di B in 2 min e dal 5 al 13% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il grezzo (gradiente, dal 5 al 15% di B in 20 min). Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 3.08 mg con grado di purezza superiore al 98%, 6.10 mg tra il 95 e il 98%, 12.87 mg tra il 90 e il 95%, 24.70 mg tra l'80 e il 90% e 43.10 mg tra il 60 e l'80%.

### Caratterizzazione

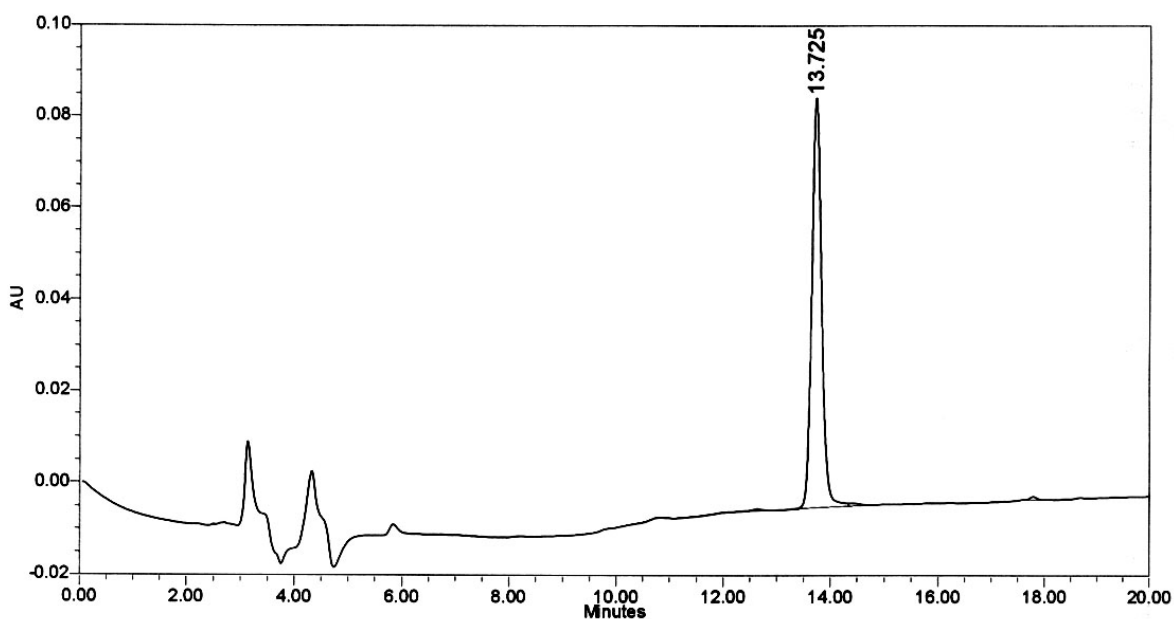
La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 5 al 15% di B in 20 min;

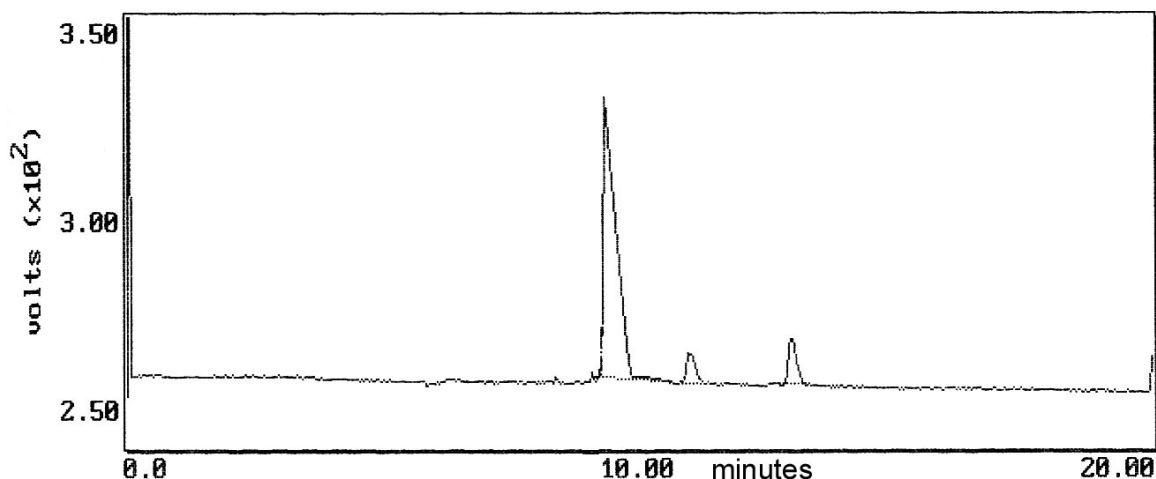


detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.47% (Fig. 128);

- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5 (Fig. 129).



**Fig. 128:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide DAOrn 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 5 al 15% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 129:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide DAOrn 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## DAOrn 8-II

*Sequenza:*

*PM: 759.82 Da*

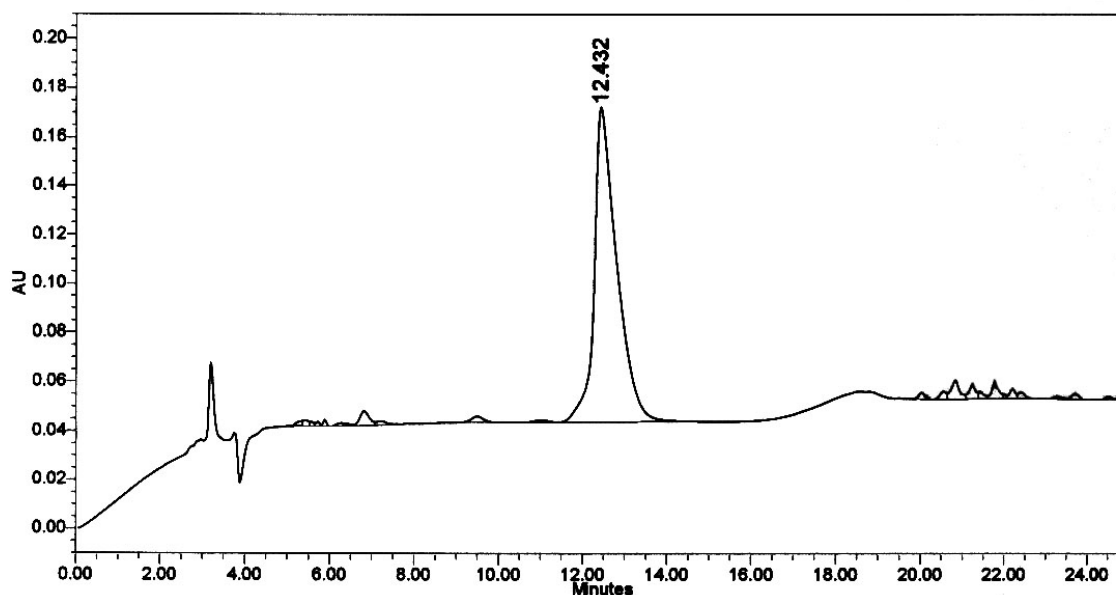
H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Orn-Ala-Orn-NH<sub>2</sub>

### *Sblocco dalla resina*

96.5 mg ( $4.1096 \times 10^{-5}$  moli) di peptide su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 190), sono stati sbloccati dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 45.86 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 100%).

### *Analisi grezzo*

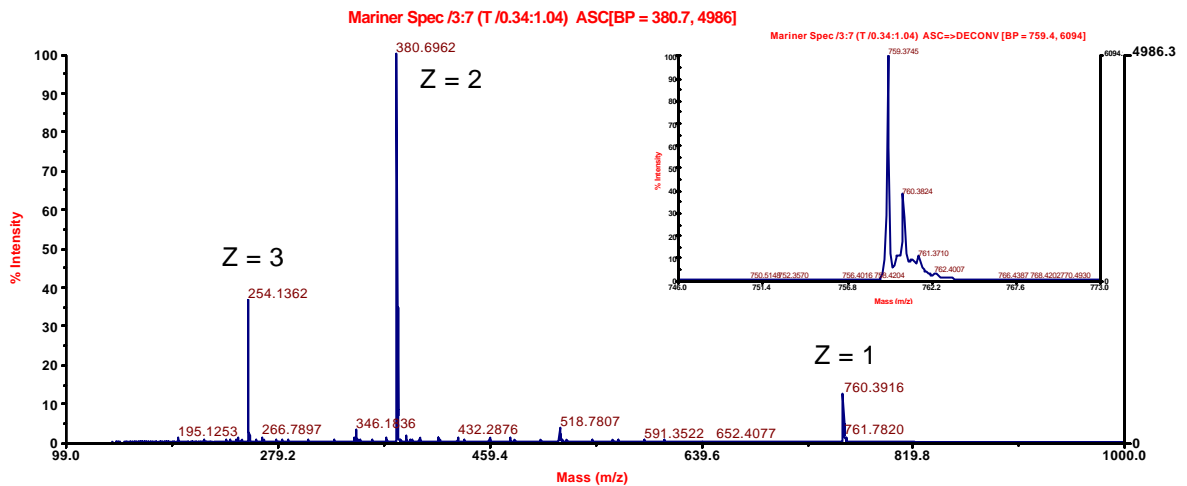
0.65 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 650  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, 100% di A per 5 min, dallo 0 al 10% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 130).



**Fig. 130:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide DAOrn 8II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, 100% di A per 5 min, dallo 0 al 10% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 130 con  $t_R = 12.432$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 131).



**Fig. 131:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 130 con  $t_R = 12.432$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

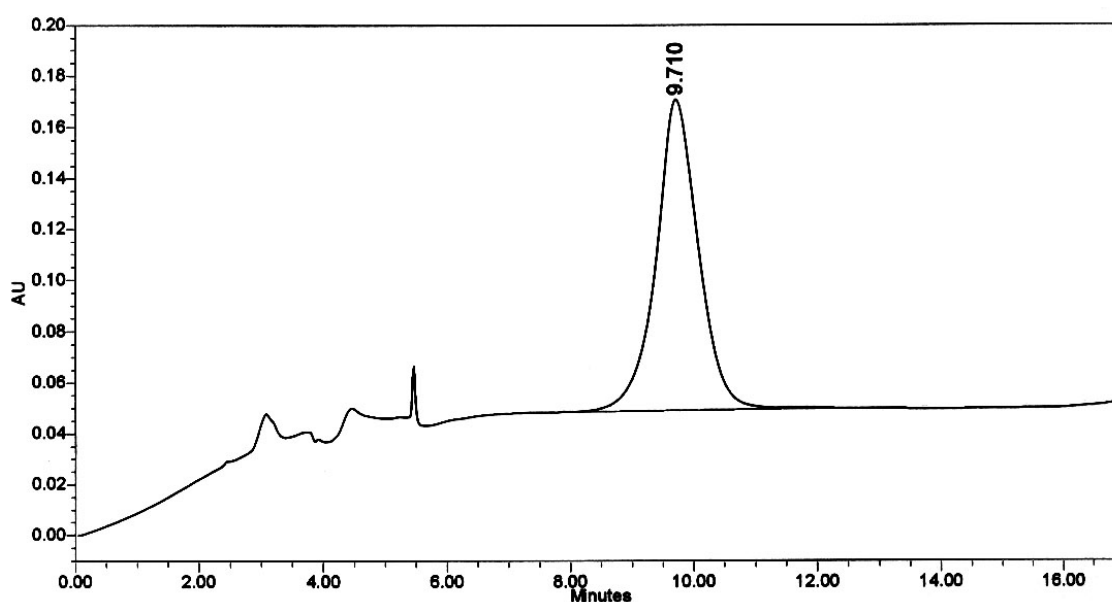
### ***Purificazione***

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratica, 100% di A; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, 100% di A per 5 min, dallo 0 al 6% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 17.93 mg con grado di purezza superiore al 98% e 1.34 mg tra l'80 e il 98%.

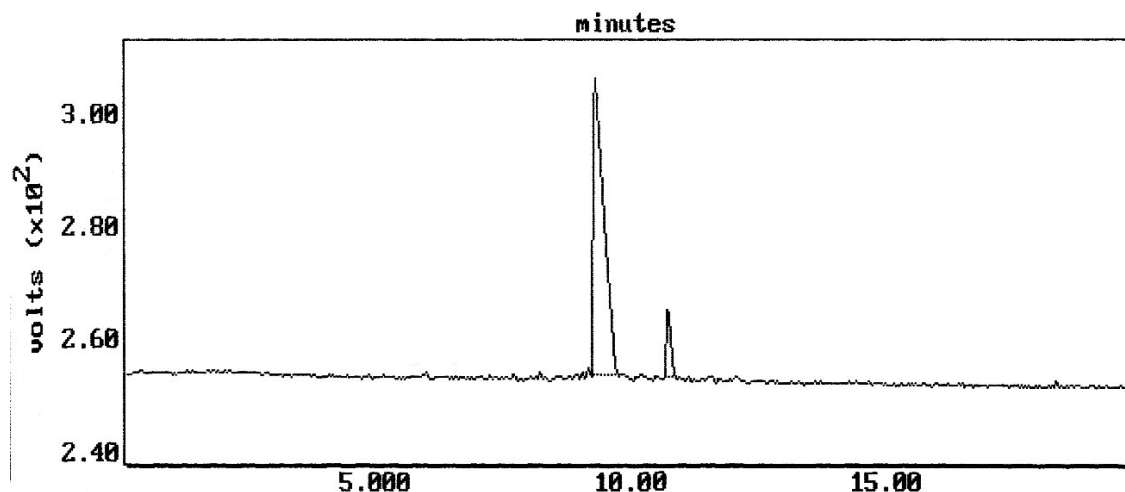
## Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

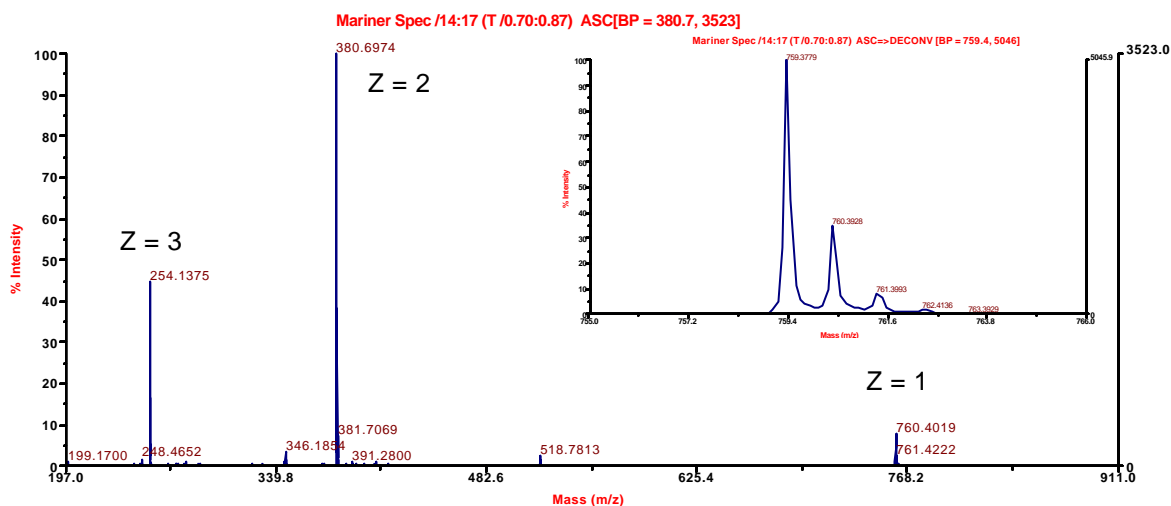
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, 100% di A per 5 min, dallo 0 al 6% di B in 12 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.61% (Fig. 132);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 90.65% (Fig. 133)
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 759.4 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (Fig. 134).



**Fig. 132:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide DAOrn 8II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, 100% di A per 5 min, dallo 0 al 6% di B in 12 min; detector, 214 nm.



**Fig. 133:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide DAOrn 8II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 134:** Analisi di massa della frazione migliore del peptide DAOrn 8-II purificato eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

## EAbuK 16-II

**Sequenza:**

**PM: 1727.05 Da**

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH<sub>2</sub>

### Sintesi

Il peptide EAbuK 16-II è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.66 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Glu e Boc per Lys.

381.9 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2520 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 98.99%. Sono state eseguite quattro reazioni di condensazione in *coupling* singolo, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, e tre reazioni in *coupling* doppio, con successivo sblocco del gruppo Fmoc N-terminale, prima di interrompere la sintesi per prelevare circa un quarto del peptide su resina dopo averlo seccato sotto vuoto per due ore. Dalla sintesi parziale si sono ottenuti in totale 633.2 mg di peptide EAbuK 8-II su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi parziale = 100%), di questi, 159.9 mg (25.25% sul totale) sono stati usati per ottenere l'ottapeptide e i restanti 473.3 mg sono stati rimessi nel reattore per continuare la sintesi. Le successive otto reazioni di condensazione sono state condotte in *coupling* doppio.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 675.7 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 100%).

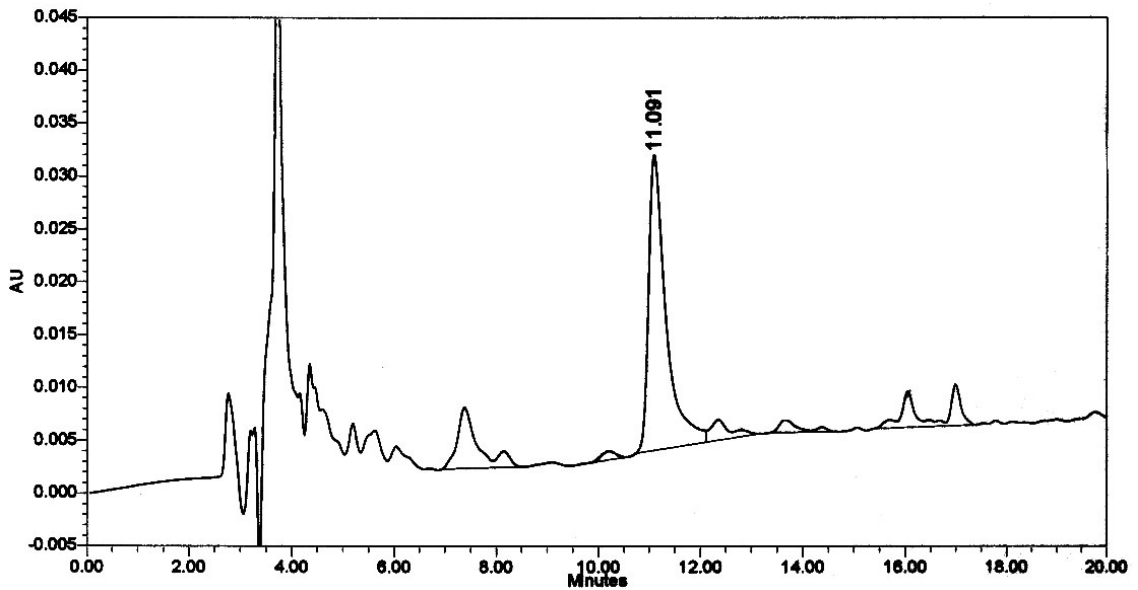
### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 246.30 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 77.22%).

### ***Analisi grezzo***

1.17 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1170  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0

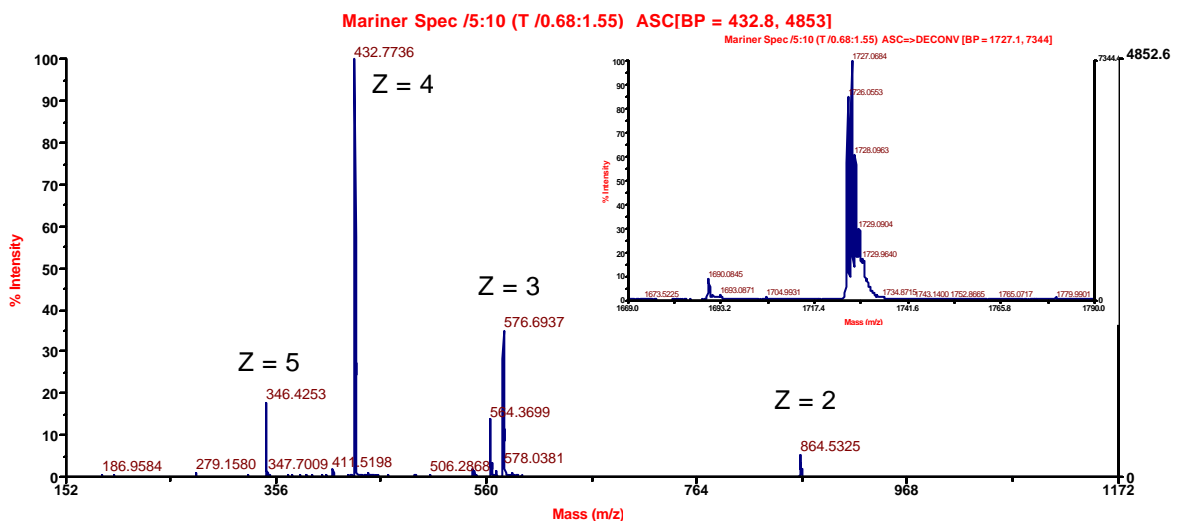
mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm (Fig. 135).



**Fig. 135:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide EAbuK 16-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 µL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa da 20 min fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 135 con  $t_R = 11.091$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 136).



**Fig. 136:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig 135 con  $t_R = 11.091$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### ***Purificazione***

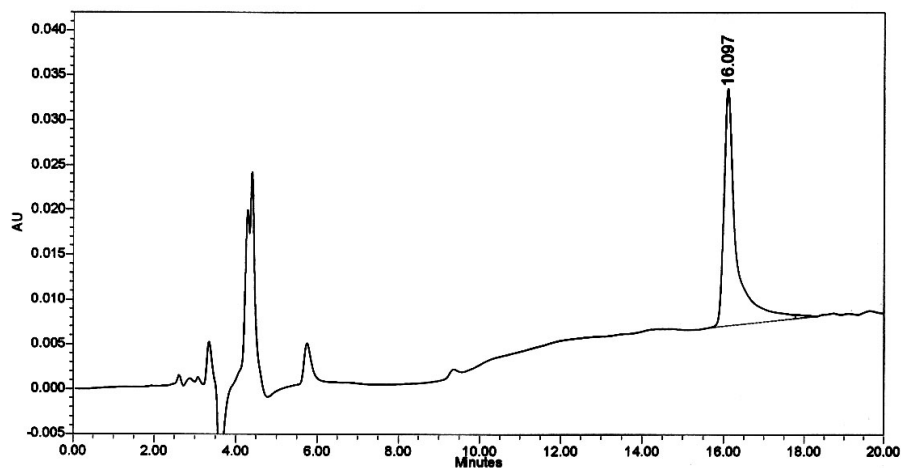
Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> SP (5 µm, 300 Å, 10 × 250 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 2 min e dal 10 al 18% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle medesime condizioni utilizzate per il grezzo (gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min). Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 48.95 mg con grado di purezza superiore al 98%, 4.59 mg tra il 95 e il 98%, 7.69 mg tra il 90 e il 95%, 15.82 mg tra l'80 e il 90% e 1.60 mg tra il 60 e l'80%.

### ***Caratterizzazione***

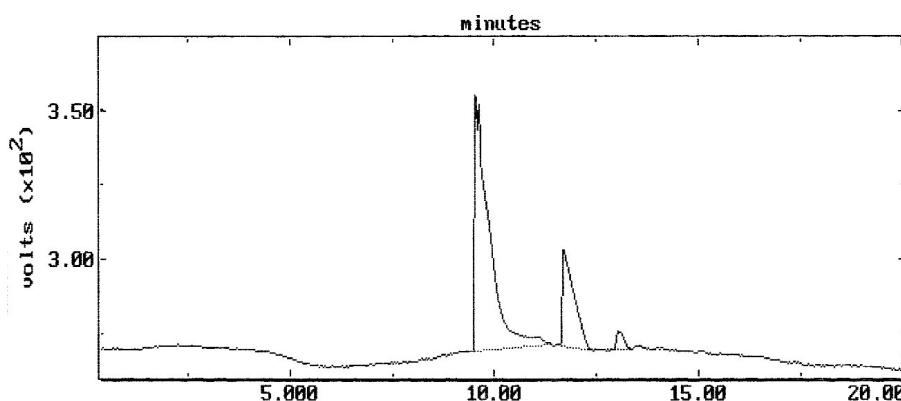
La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.79% (Fig. 137);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5 (Fig. 138). Come era prevedibile, l'elettroferogramma mostra la presenza di più picchi dovuti al verificarsi di fenomeni di aggregazione indotti dagli ioni Na<sup>+</sup> presenti nel tampone.
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1727.0 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (Fig. 139).

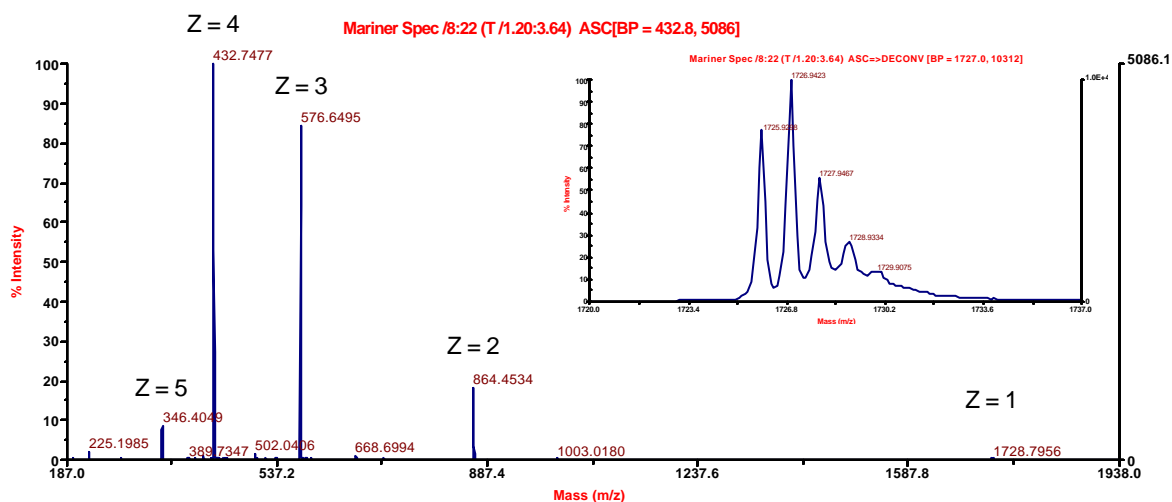




**Fig. 137:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EAbuK 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 138:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide EAbuK 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.



**Fig. 139:** Analisi di massa della frazione migliore del peptide EAbuK 16-II purificato eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

## EAbuK 8-II

*Sequenza:*

*PM: 872.04 Da*

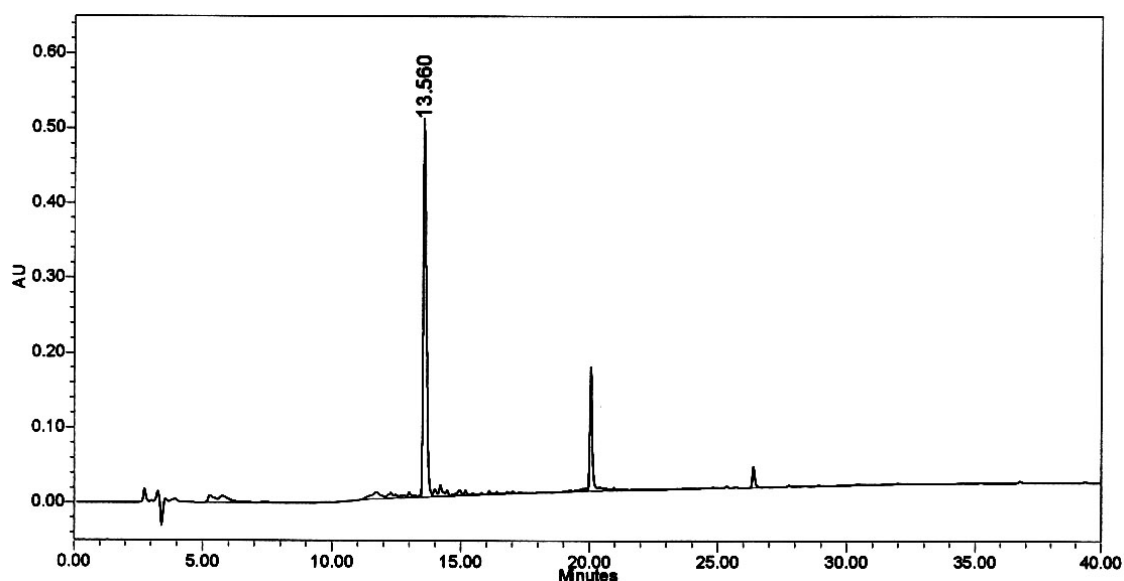
H-Abu-Glu- Abu-Glu- Abu-Lys- Abu-Lys-NH<sub>2</sub>

### *Sblocco dalla resina*

159.9 mg ( $6.2391 \times 10^{-5}$  moli) di peptide su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 198), sono stati sbloccati dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 50.57 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 92.95%).

### *Analisi grezzo*

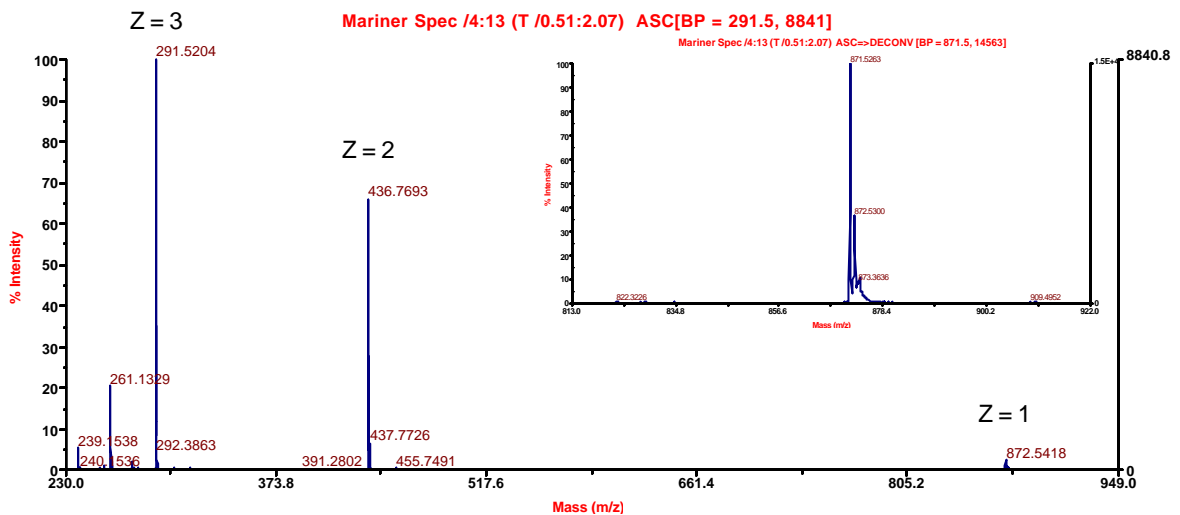
0.97 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 970  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm (Fig. 140).



**Fig. 140:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide EAbuK 8-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 140 con  $t_R = 13.560$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 141).



**Fig. 141:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig con  $t_R = 13.560$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

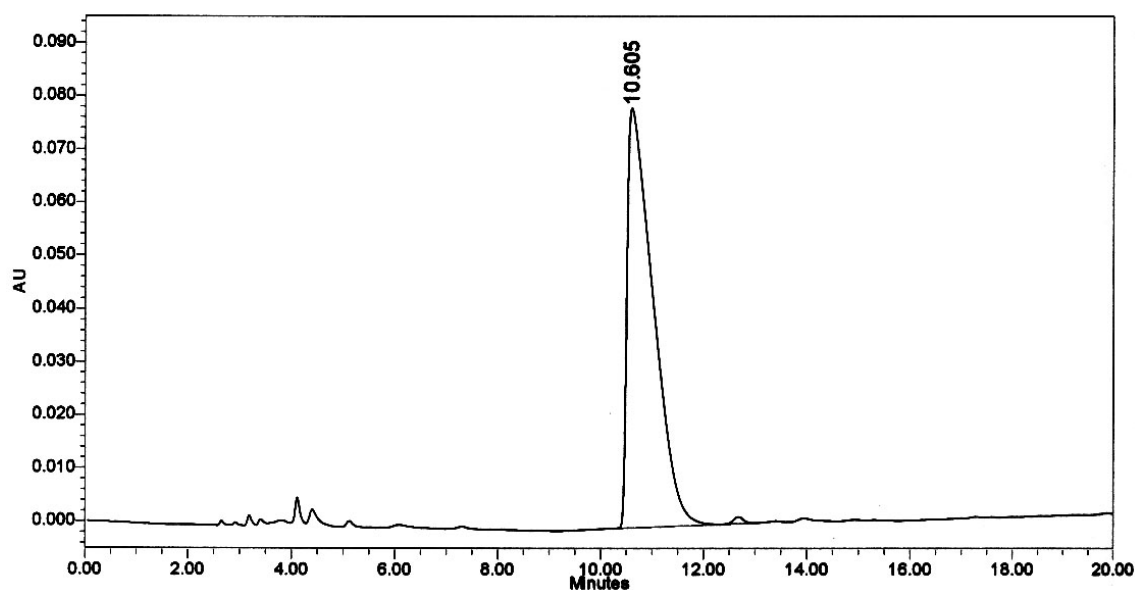
### *Purificazione*

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  SP (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{Å}$ , 10  $\times$  250 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; gradiente, dallo 0 al 3% di B in 2 min, dal 3 all'11% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac  $C_{18}$  analitica (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{Å}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B, 0.05% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 18.30 mg con grado di purezza superiore al 98%, 4.90 mg tra il 95 e il 98% e 5.50 mg tra il 70 e il 95%.

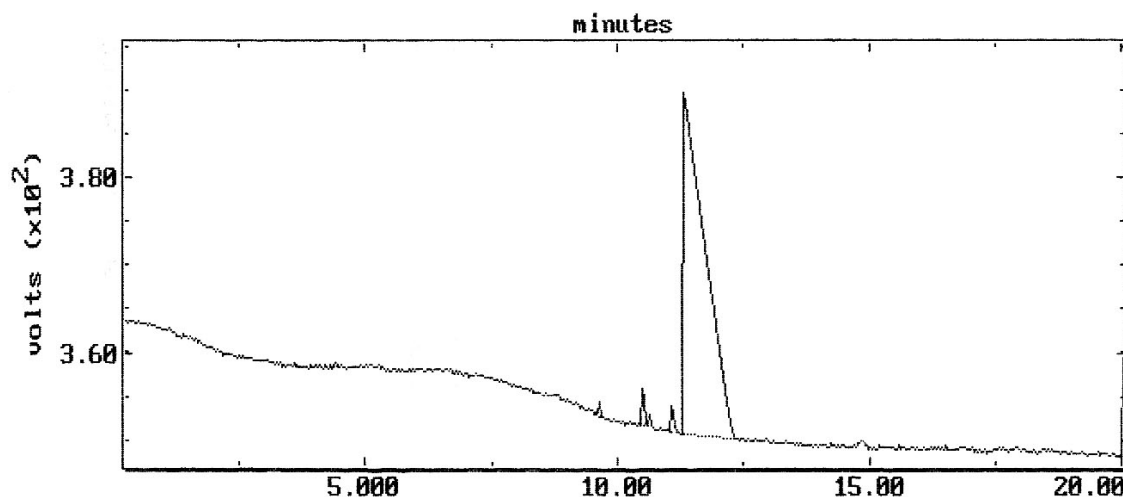
### Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.37% (Fig. 142);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 97.48% (Fig. 143)



**Fig. 142:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EAbuK 8-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 143:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide EAbuK 8II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## EYK 16-II

### *Sequenza:*

*PM: 2351.62 Da*

H-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub>

### *Sintesi*

Il peptide EYK 16-II è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, avvalendosi di un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431 A e utilizzando come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione: 0.66 mmoli/g).

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: *t*Bu per Tyr, OtBu per Glu e Boc per Lys.

395.2 mg di resina Rink Amide MBHA (0.2608 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido con 2.1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2.2 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 3.2 mL di DIEA; ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 min circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%.

Sono state eseguite quattro reazioni di condensazione in *coupling* singolo, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc-protetto, e tre reazioni in *coupling* doppio, con successivo sblocco del gruppo Fmoc N-terminale, prima di interrompere la sintesi per prelevare circa metà del peptide su resina dopo averlo seccato sotto vuoto per due ore. Dalla sintesi parziale si sono ottenuti in totale 807.2 mg di peptide EYK 8-II su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi parziale = 100%), di questi, 170.0 mg (21.05% sul totale) sono stati usati per ottenere l'ottapeptide, 270.6 mg (33.53% sul totale) sono stati messi da parte nel caso la sintesi della seconda metà del peptide EYK 16-II crei dei problemi e i restanti 366.6 mg sono stati rimessi nel reattore per continuare la sintesi. Le successive otto reazioni di condensazione sono state condotte in *coupling* doppio.

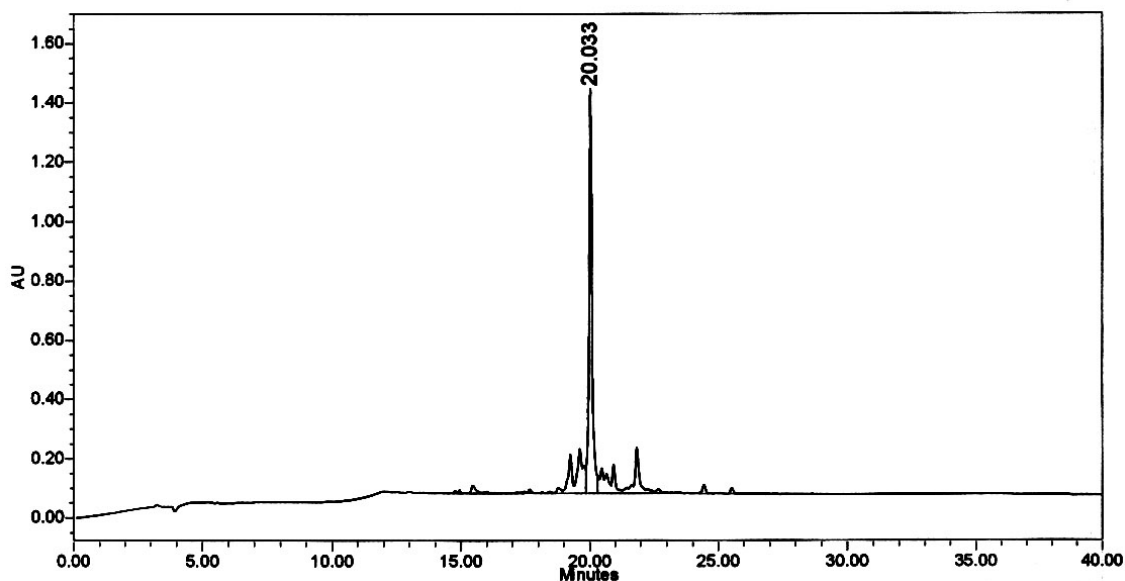
Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico dal gruppo Fmoc, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto ed infine pesato: si sono ottenuti 521.9 mg di peptide su resina protetto in catena laterale (resa della reazione di sintesi = 93.70%).

### ***Sblocco dalla resina***

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 0.75 g fenolo, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 154.51 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 59.19%).

### ***Analisi grezzo***

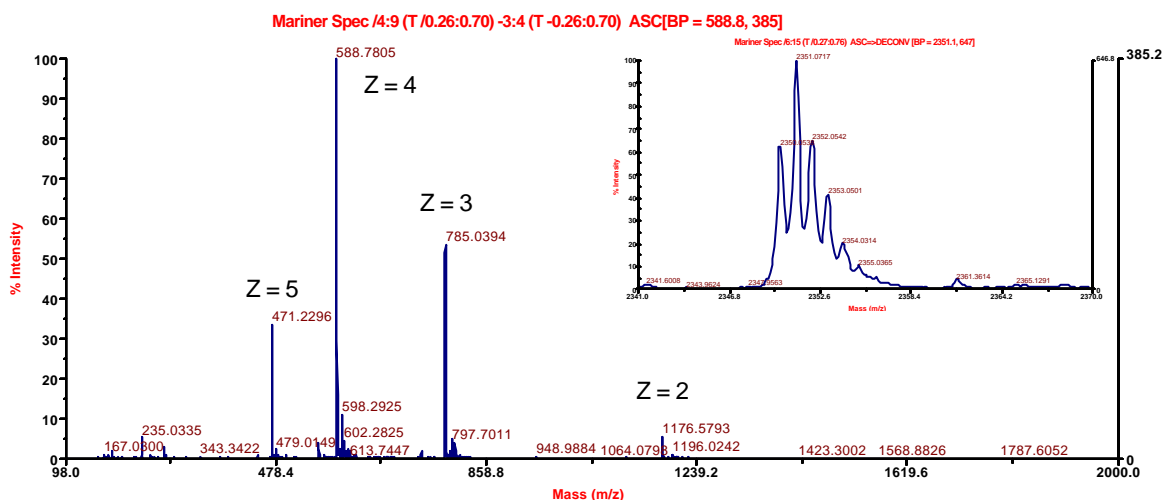
0.52 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 520  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu$ L; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 e 280 nm (Fig. 144).



**Fig. 144:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide EYK 16-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 μL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa da 20 min fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig 144 con  $t_R = 20.033$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 145).



**Fig. 145:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig con  $t_R = 20.033$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### ***Purificazione***

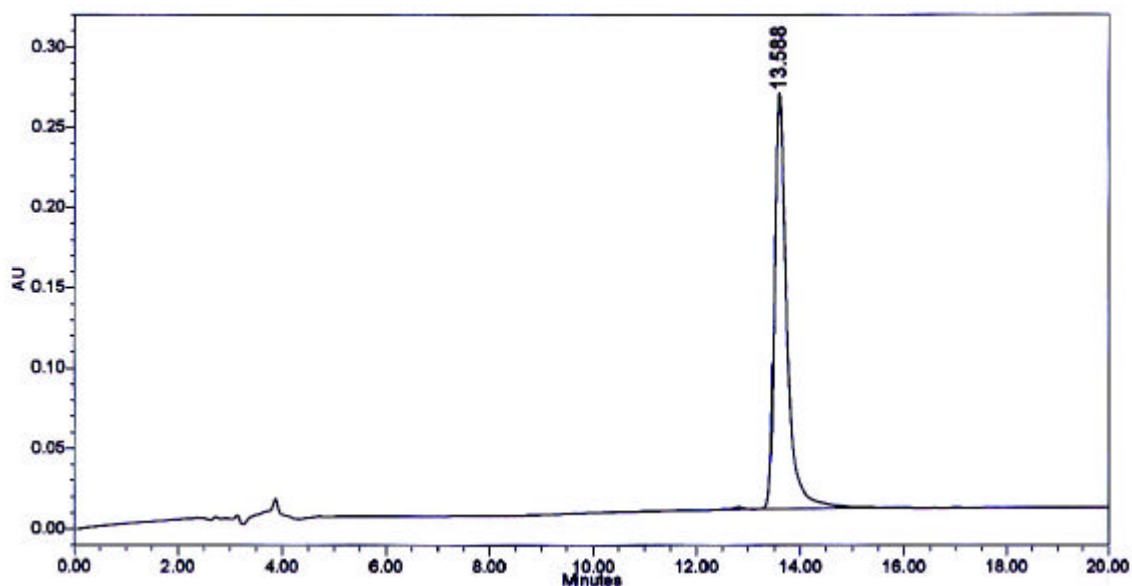
Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'11% di B in 2 min e dall'11 al 19% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 17 al 27% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 24.54 mg con grado di purezza superiore al 98%, 8.39 mg tra il 95 e il 98%, 5.25 mg tra il 90 e il 95%, 11.22 mg tra l'80 e il 90% e 3.53 mg tra il 60 e l'80%.

### ***Caratterizzazione***

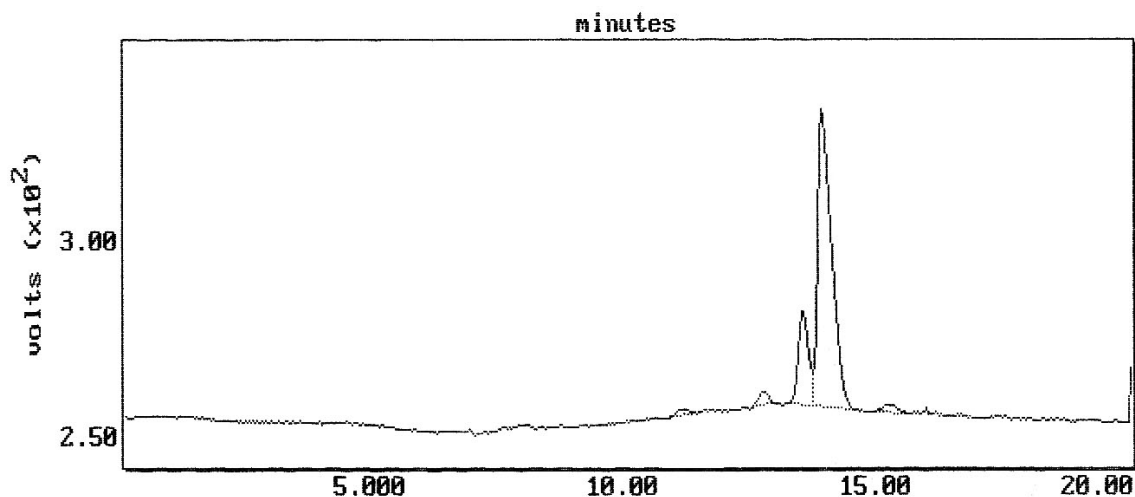
La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 16 al 26% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.74% (Fig. 146);
- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5 (Fig. 147). Come era prevedibile, l'elettroferogramma mostra la presenza di più picchi dovuti al verificarsi di fenomeni di aggregazione indotti dagli ioni Na<sup>+</sup> presenti nel tampone.





**Fig. 146:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EYK 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 16 al 26% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 147:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide EYK 16-II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## EYK 8-II

*Sequenza:*

*PM: 1184.32 Da*

H-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub>

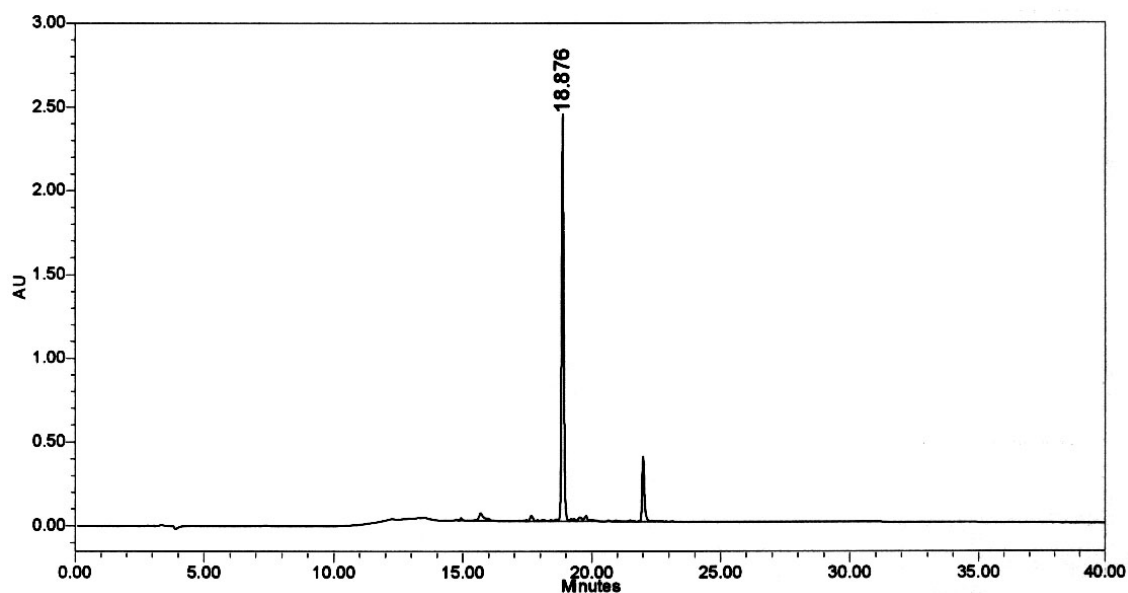
### *Sblocco dalla resina*

170.0 mg ( $5.4918 \times 10^{-5}$  moli) di peptide su resina protetto in catena laterale (cft. pag. 206), sono stati sbloccati dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene

lateralmente, seguendo la procedura di sblocco I (cft. pag. 55) e utilizzando la miscela 2 (0.25 mL TES, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 0.75 g fenolo, 9.5 mL TFA): si è lasciata reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Si sono ottenuti 48.35 mg di peptide grezzo (resa della reazione di sblocco = 74.34%).

### ***Analisi grezzo***

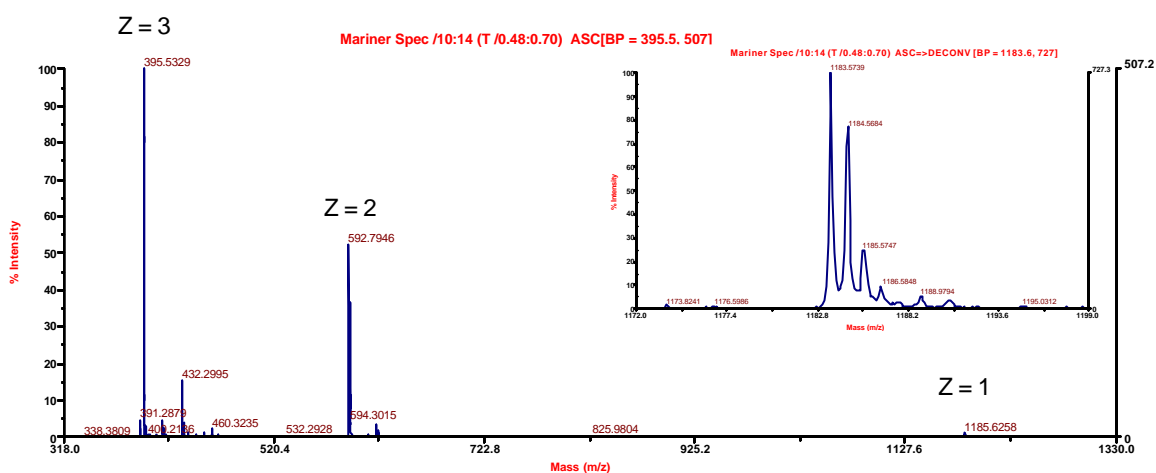
0.54 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 540 µL di H<sub>2</sub>O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 e 280 nm (Fig. 148).



**Fig. 148:** Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide EYK 8-II grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 min; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 µL di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in Fig. 148 con  $t_R = 18.876$  min coincide con il peptide desiderato (Fig. 149).



**Fig. 149:** Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in Fig. 148 con  $t_R = 18.876$  min eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

### *Purificazione*

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semi-preparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak HR C<sub>18</sub> SP (6  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dallo 0 all'8% di B in 2 min, dall'8 al 16% di B in 32 min; detector, 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; iniezione, 20  $\mu\text{L}$ ; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm. Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semi-preparativa. Alla fine, si sono ottenute le seguenti frazioni i quantitativi delle quali vengono di seguito riportati correlati con il grado di omogeneità raggiunto: 21.86 mg con grado di purezza superiore al 98%, 3.92 mg tra il 95 e il 98%, 5.00 mg tra il 90 e il 95% e 2.38 mg tra il 50 e il 90%.

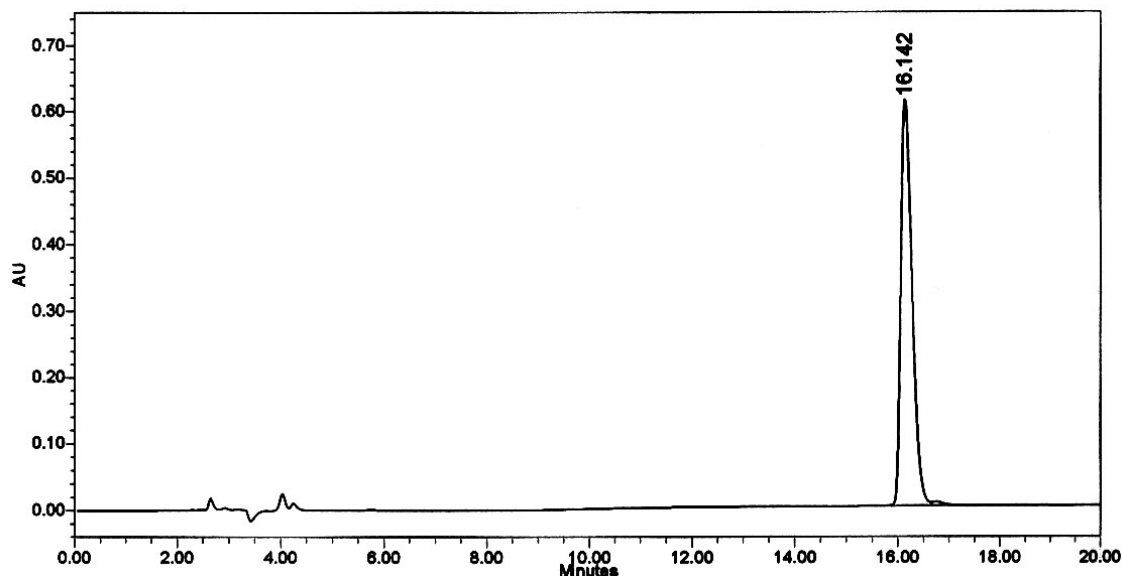
### *Caratterizzazione*

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

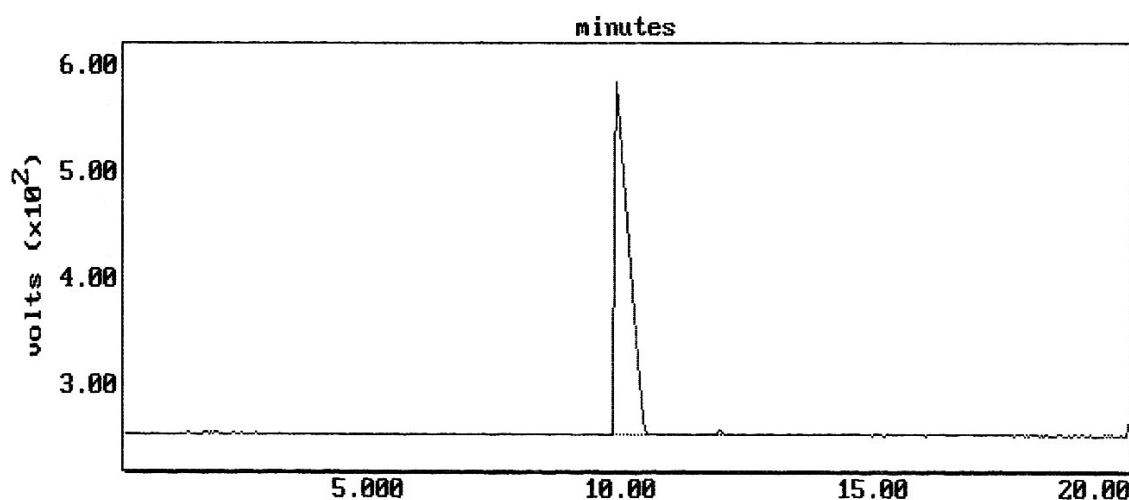
- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min;

detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99.00% (Fig. 150);

- elettroforesi capillare eseguita nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.42% (Fig. 151)



**Fig. 150:** Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EYK 8II purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C<sub>18</sub> analitica (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O; eluente B, 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm.



**Fig. 151:** Elettroforesi capillare della frazione migliore del peptide EYK 8II purificato condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

## SAGGI BIOLOGICI SUI PEPTIDI BIOATTIVI

### *Saggi di adesione in vitro*

I saggi biologici di adesione cellulare riportati nel presente lavoro di dottorato sono stati condotti presso il laboratorio diretto dal Prof. P.P. Parnigotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova.

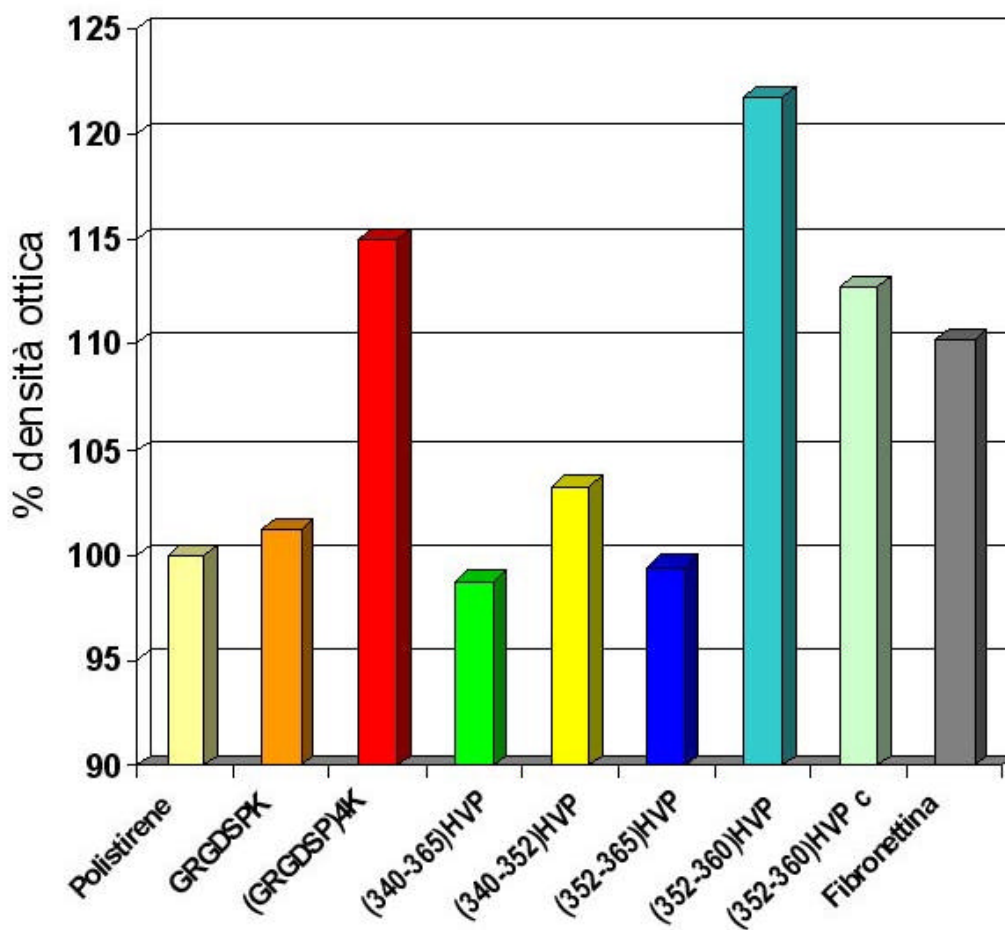
### ***Colture di osteoblasti***

Gli osteoblasti utilizzati sono stati estratti da midollo osseo di femori di ratti Sprague-Dowley adulti. I femori sono stati disseccati asetticamente, spogliati del tessuto muscolare ancora aderente e gli sono state rimosse le epifisi. Il midollo osseo, ottenuto lavando il canale midollare con  $\alpha$ MEM (Minimum Eagle Medium) (Gibco BRL-Life Technologies) contenente il 10% di siero bovino fetale (FBS) (Biochrom AG-Seromed) e i seguenti antibiotici: 100 UI/mL penicillina G, 100  $\mu$ g/mL streptomicina e 0.25  $\mu$ g/mL amfotericina B (Sigma Chemical Co.), è stato raccolto e centrifugato per 5 min a 1500 rpm. Le cellule sono state coltivate in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata di 95% aria e 5% CO<sub>2</sub> e utilizzando il terreno di coltura  $\alpha$ MEM, 10% FBS, 1% soluzione antibiotica, 2 mM glutammina (Sigma), 50  $\mu$ M acido ascorbico (Sigma) e 10<sup>-8</sup> M dexametasone (Sigma). 5 giorni dopo l'estrazione le cellule non adese sono state rimosse tramite due vigorosi lavaggi con una soluzione salina di tampone fosfato (PBS: 80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 11.5 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) ed il terreno di coltura è stato sostituito con dell'altro fresco a cui era stato aggiunto il 2% di ultrosor (Gibco BRL-Life Technologies) e 10 mM di sale disodio  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma). Il fenotipo degli osteoblasti è stato confermato tramite l'attività della fosfatasi alcalina, la formazione di depositi minerali di calcio fosfato e tramite microscopia elettronica a scansione (SEM).

### **Saggi di adesione su polistirene**

Per gli esperimenti di adesione sono state utilizzate colture terziarie di osteoblasti. I saggi sono stati eseguiti su piastre per microtest a 96 pozzetti in polistirene (Falcon) precedentemente condizionate con i peptidi in esame o con la fibronectina (Sigma), usata come riferimento, alla concentrazione di 2 nmoli/cm<sup>2</sup> in soluzione salina tamponata tramite incubazione a 37°C per 60 min. Al termine del periodo di incubazione, le soluzioni contenenti i peptidi sono state rimosse e la quantità di peptide in esse ancora contenuto è

stata valutata tramite analisi cromatografica in RP-HPLC (cft. pag. 216). Le cellule sono state seminate ad una densità di  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> di area superficiale di substrato e poi sono state lasciate aderire per 5 ore nelle condizioni standard per le colture tessutali. Alla fine del periodo di incubazione, le cellule sono state fissate con una soluzione salina tamponata contenente il 10% di formaldeide. Le cellule fissate sono state colorate mediante una soluzione di 0.04% cresil-violetto (Sigma) in 20% metanolo/H<sub>2</sub>O per 30 min. Il colorante assorbito è stato estratto dalle cellule con una soluzione di acido citrico 0.1 M in 50% etanolo/H<sub>2</sub>O e l'assorbanza è stata determinata a 600 nm con un microplate autoreader EL 13 (BIO-TEK instruments). I risultati derivanti dalla media di 4 esperimenti sono stati convertiti in percentuale ed il valore di densità ottica (OD) corrispondente alle colture seminate su pozzetti di polistirene non condizionati è stato preso come 100%. In Fig. 152 sono mostrati in grafico i risultati, riportati in Tab. 8, ottenuti per questi esperimenti [184, 185].



**Fig. 152:** Saggi di adesione di osteoblasti, estratti da midollo osseo di femori di ratti Sprague-Dowley adulti, su polistirene pretrattato con i peptidi di adesione sintetizzati durante il dottorato.

**Tab. 8:** In tabella sono riportati i valori di densità ottica (OD) percentuale media e le relative deviazioni standard per i saggi di adesione degli osteoblasti su polistirene pretrattato con i peptidi di adesione sintetizzati durante il dottorato.

Peptide	% OD	Dev. std
GRGDSPK	101.25	3.20
(GRGDSP) <sub>4</sub> K	115.00	9.06
(340-365)HVP	98.73	0.43
(340-352)HVP	103.25	6.40
(352-365)HVP	99.50	5.20
(352-360)HVP	121.75	10.05
(352-360)HVP c	112.75	4.11
fibronettina	110.25	6.08

#### ***Ottenimento della matrice ossea acellulare***

Alcuni femori, ottenuti da ratti Sprague-Dawley adulti, sono stati sciacquati 4 volte con una soluzione di tampone fosfato (PBS) contenente antibiotici e amfotericina B. Le ossa sono state demineralizzate tramite trattamento con una soluzione 0.5 M di EDTA (Sigma) per 21 giorni a 4°C e poi è stato seguito il procedimento utilizzato da Meezan *et al.* [186] per ottenere una matrice acellulare. A questo punto, le ossa sono state trattate con acqua distillata per 72 ore a 4°C, 4% di deossicolato di sodio (Sigma) per 4 ore e 2000 kU di deossiribonucleasi I (DNase I) (Sigma) per 2 ore. Questa procedura è stata ripetuta due volte. L'assenza di elementi cellulari è stata confermata istologicamente (tramite colorazione con ematossilina e eosina) e le matrici acellulari sono state conservate in tampone fosfato a 4°C fino al loro uso.

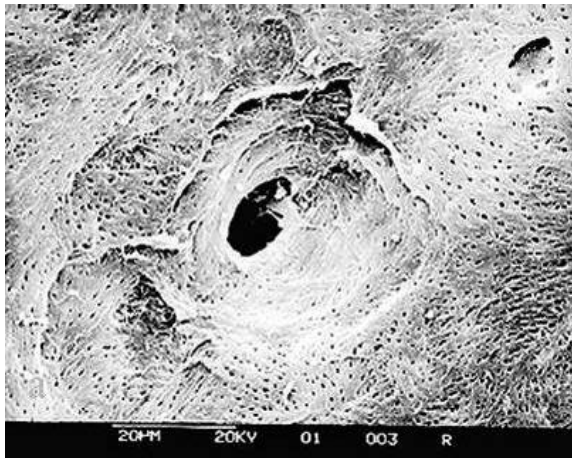
#### **Saggi di adesione su matrice ossea acellulare**

Matrici ossee acellulari sono state condizionate con 2 nmoli/cm<sup>2</sup> di ogni peptide o fibronettina e seminate con  $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Dopo un periodo di incubazione di 24 ore, le colture di cellule sono state fissate con una soluzione al 3% di glutaraldeide (Merck) in tampone cacodilato (Pro-Labo), pH 7.2. Dopo essiccazione al punto critico e *sputtering* con oro, le culture sono state esaminate tramite tecnica SEM (Stereoscan-205 S).

In Fig. 153 sono riportate le immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) della matrice ossea acellulare prima della semina degli osteoblasti e in seguito alla semina delle



cellule su matrici pretrattate in modo diverso: con fibronettina, con il peptide GRGDSPK, con il peptide (352-360)HVP e senza condizionamento con molecole di adesione.



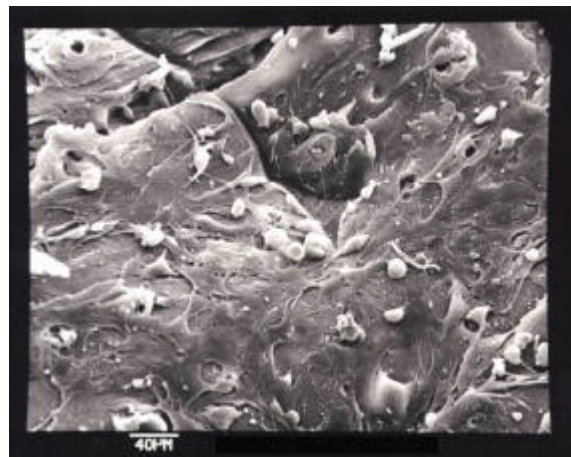
a)



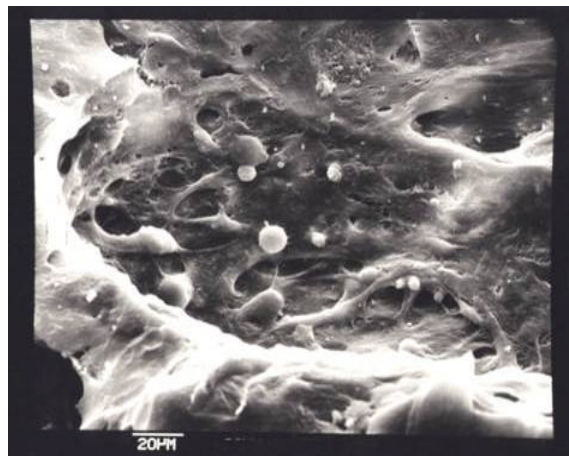
b)



c)



d)



e)

**Fig. 153:** Immagini al SEM di: a) matrice ossea acellulare; b) osteoblasti adesi a matrice non pretrattata; c) osteoblasti adesi a matrice pretrattata con il peptide GRGDSPK; d) osteoblasti adesi a matrice pretrattata con il peptide (352-360)HVP; e) osteoblasti adesi a matrice pretrattata con fibronettina.



### ***Determinazione del peptide adsorbito***

Per cercare di mediare i dati di adesione degli osteoblasti in base alla quantità di peptide effettivamente adsorbito sul polistirene o sulla matrice ossea acellulare, si è quantificato il peptide rimasto in soluzione, dopo il condizionamento delle superfici, tramite cromatografia analitica in fase inversa (RP-HPLC). In questo modo è stato possibile risalire alla quantità di peptide realmente presente sulla superficie considerata tramite differenza tra la quantità di peptide contenuta nelle soluzioni prima del condizionamento e quella rimasta una volta terminato il trattamento.

Per ogni peptide impiegato sono state fatte delle corse analitiche in RP-HPLC, avvalendosi delle condizioni utilizzate per eseguire le analitiche di controllo sui prodotti purificati, iniettando quantità note di peptide a partire dal numero di moli contenuto nelle soluzioni usate per il condizionamento e diminuendo progressivamente la quantità di peptide finché il picco cromatografico corrispondente non risultava indistinguibile dalla linea base. La quantità minima di peptide che si è riusciti a rilevare con questa tecnica è stato di 0.10 - 0.15 nmoli (a seconda del peptide analizzato). Sono state costruite delle rette di taratura per ogni peptide riportando l'area del picco cromatografico *vs* numero di moli di peptide corrispondente. Le soluzioni rimaste dopo il trattamento delle superfici sono state portate a secco in speedvac, ridissolte e iniettate in colonna analitica: dal valore dell'area del picco cromatografico è stato possibile risalire al numero di moli contenuto in ogni soluzione e quindi, tenendo conto anche delle perdite di soluzione nei vari trasferimenti, il numero di moli di peptide adeso alle superfici. In Tab. 9 sono riportate le percentuali di adesione di ogni peptide al polistirene e alla matrice ossea acellulare mediate per i quattro esperimenti condotti.

**Tab. 9:** Percentuali di adesione dei peptidi al polistirene e alla matrice ossea acellulare

Peptide	% di adesione media al polistirene	% di adesione alla matrice ossea acellulare
RGD	59.92	74.55
GRGDSPK	6.98	46.16
(GRGDSP) <sub>4</sub> K	28.83	13.16
(340-365)HVP	91.49	68.20
(340-352)HVP	98.24	93.88
(352-365)HVP	87.44	87.43
(352-360)HVP	89.51	51.45
(352-360)HVP ciclico	96.38	51.99

Purtroppo si sono avute differenze percentuali anche rilevanti, mediate per i quattro esperimenti condotti che andavano da circa l'1 - 2%, per le tre sequenze più lunghe della vitronettina, al 10 - 20% per gli altri peptidi considerati.

### Saggi biologici sui frammenti della BMP-2

I saggi biologici sui tre frammenti della BMP-2 sintetizzati sono stati condotti, come i saggi di adesione, presso il laboratorio diretto dal Prof. P.P. Parnigotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova.

Per gli esperimenti sono stati utilizzati osteoblasti estratti da midollo osseo di femori di ratti Sprague-Dowley adulti (cft. pag. 213). In tutti i saggi, il giorno successivo alla semina degli osteoblasti su piastra sono stati aggiunti i frammenti della BMP-2 al mezzo di coltura contenente tutti i fattori di crescita ma solo il 5% di FBS (siero bovino fetale) e l'1% di Ultrosor. Le cellule sono state incubate per 72 ore dopo l'aggiunta dei peptidi.

Sono stati eseguiti degli studi preliminari sull'attività della fosfatasi alcalina, saggio che evidenzia la differenziazione cellulare, seminando gli osteoblasti su una piastra per microtest a 24 pozzetti in polistirene (Falcon) ad una concentrazione di  $5 \times 10^4$  cellule per pozzetto. Dopo 24 ore il mezzo di coltura è stato rimosso e sostituito con del mezzo fresco addizionato con (77-87)BMP-2, (68-87)BMP-2 e (58-87)BMP-2 ad un dosaggio equivalente a 5, 10, 20 e 40 nM. Passate 72 ore, il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lisate con una soluzione all'1% di Triton X-100 (Sigma); contemporaneamente, si sono determinati l'attività della fosfatasi alcalina cellulare e il contenuto in proteine cellulari.

In Tab. 10 sono riportati direttamente i dati convertiti in percentuale relativi all'attività della fosfatasi alcalina usando come riferimento (100%) il valore corrispondente a una coltura di osteoblasti non trattata con i peptidi.

**Tab. 10:** Variazione percentuale dell'attività della fosfatasi alcalina di colture di osteoblasti estratti da midollo osseo di femori di ratti Sprague-Dowley adulti arricchite con frammenti della BMP-2 rispetto a colture non trattate.

Peptide e relativa concentrazione usata per il condizionamento		% attività fosfatasi alcalina
Controllo		100.0
(77-87)BMP-2	5 nM	112.1
(77-87)BMP-2	10 nM	117.9
(77-87)BMP-2	20 nM	134.9
(77-87)BMP-2	40 nM	118.9
(68-87)BMP-2	5 nM	117.8
(68-87)BMP-2	10 nM	105.6
(68-87)BMP-2	20 nM	117.6
(68-87)BMP-2	40 nM	123.3
(58-87)BMP-2	5 nM	120.3
(58-87)BMP-2	10 nM	88.7
(58-87)BMP-2	20 nM	112.1
(58-87)BMP-2	40 nM	101.7

Sono inoltre in corso i seguenti saggi: saggio MTT, per evidenziare la crescita cellulare; saggio sulla sintesi proteica di collagenasi digeribili, che evidenzia la produzione di matrice, e saggi morfologici e morfometrici.

## FUNZIONALIZZAZIONE DI SUPERFICI CON MOLECOLE BIOATTIVE

La capacità di una superficie biomimetica di attivare o incrementare una risposta cellulare dipende dalla densità superficiale e dall'orientamento della biomolecola ad essa ancorata.

Anche le caratteristiche morfologiche della superficie dell'impianto giocano un ruolo importante nell'adesione cellulare e un'azione sinergica tra rugosità superficiale ottimale e caratteristiche biomimetiche della superficie risulta auspicabile.

Come accennato nell'introduzione, esistono diversi metodi per veicolare una molecola bioattiva ad una superficie, ovvero:

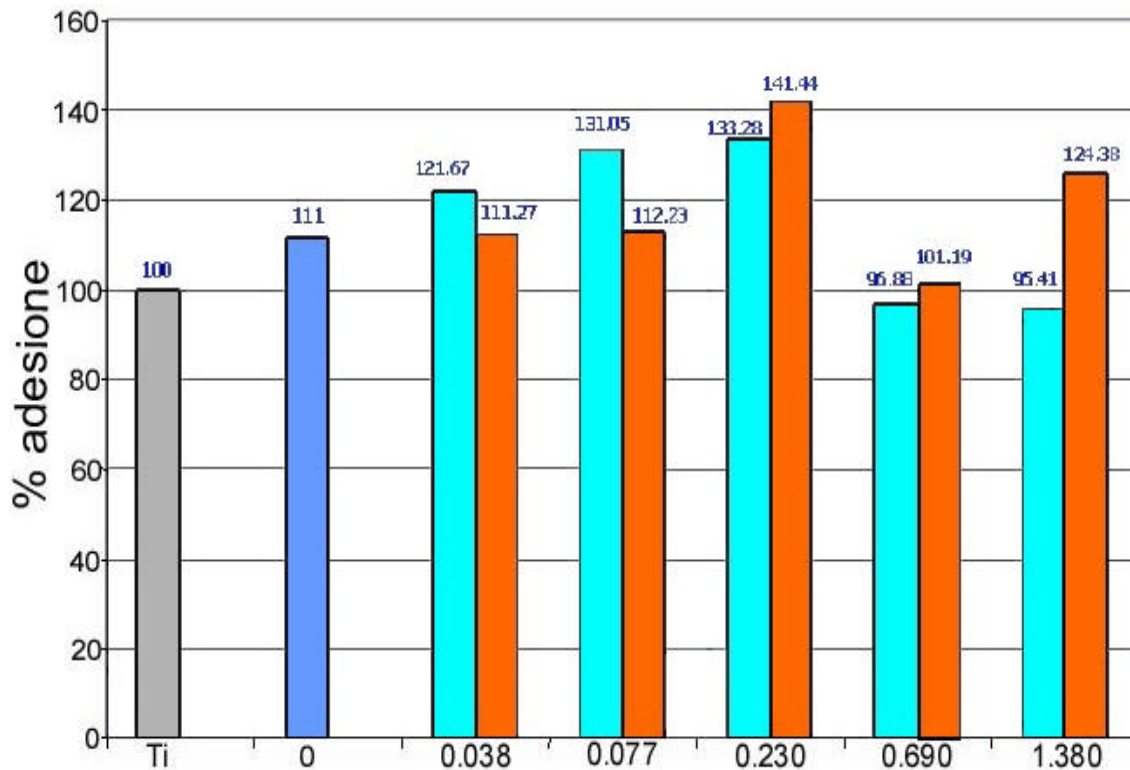
1. la molecola può essere adsorbita dalla superficie;
2. la molecola può essere inglobata in un *coating* biorisorbibile;
3. la molecola può essere immobilizzata legandola covalentemente alla superficie.

Presso il laboratorio diretto dal Prof. Di Bello (Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria – Università degli Studi di Padova), è stata condotta una ricerca, in collaborazione con altri gruppi che si sono occupati di analisi superficiali e saggi biologici, per valutare la validità delle varie strategie nella messa a punto per creare superfici biomimetiche di titanio.

L'adsorbimento di molecole ad una superficie, pur essendo un metodo semplice e poco costoso, presenta lo svantaggio di rendere difficile il controllo della densità superficiale e le biomolecole possono staccarsi durante le procedure di innesto dell'impianto; il processo di adsorbimento, inoltre, può modificare la conformazione della molecola o orientarla in maniera non adatta all'interazione con il recettore. Saggi di adesione condotti su dischetti di Ti preventivamente sabbati (corundum 450  $\mu\text{m}$  per 10 secondi) ed ossidati con una miscela all'ebollizione di  $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$  (1:1:3 (v:v:v) per 6 min) [134] su cui era stato fatto adsorbire il peptide (352-360)HVP o il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K (concentrazione 2 nmoli/cm<sup>2</sup>) hanno fornito i seguenti risultati: 117% per i campioni pretrattati con (352-360)HVP e 112% per i campioni pretrattati con (GRGDSP)<sub>4</sub>K da confrontare con l'adesione a dischetto ossidato non trattato (100%) e a dischetto pretrattato con fibronettina (125%).

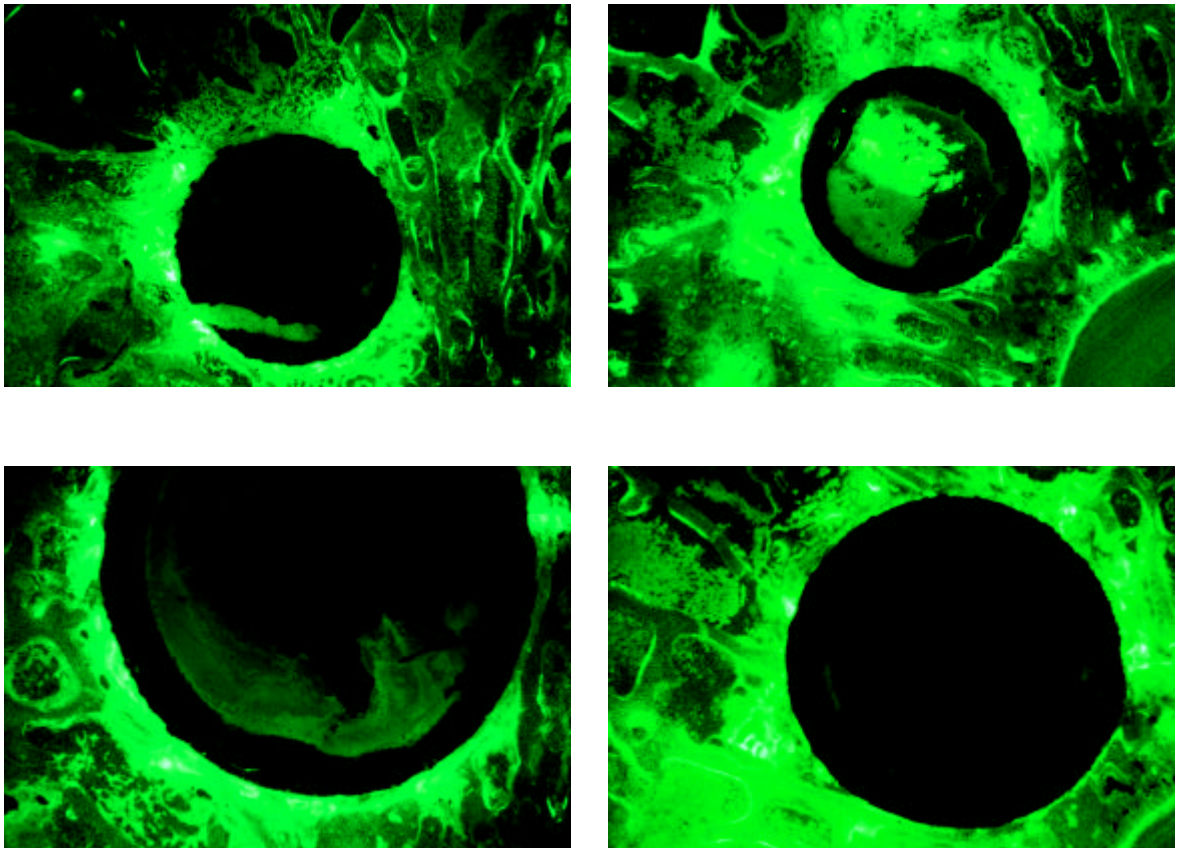
A differenza dell'adsorbimento, il rilascio da *coating* (in genere un polimero) permette di modulare facilmente il rilascio della biomolecola inglobata al suo interno secondo una cinetica che dipende dal tipo di *carrier* e dal metodo di inclusione utilizzato; uno

svantaggio nell'impiego di questo metodo è che i prodotti di degradazione del *coating* possono risultare tossici all'interno dell'organismo, inoltre risulta difficile determinare la quantità di molecola bioattiva effettivamente presente sulla superficie del biomateriale. In aggiunta il film di *carrier* posto sull'impianto deve risultare stabile anche se sottoposto a stress meccanici quali l'inserimento in un sito chirurgico di dimensioni ridotte rispetto all'impianto stesso. Per verificare l'efficacia di questo metodo, sono stati condotti degli studi su dischetti di Ti e Ti6Al4V, utilizzati come supporto, ricoperti con i seguenti *carrier*: acido poli(L-lattico), acido poli(D,L-lattico), copolimero 50:50 acido poli(D,L-lattico-glicolico) e idogel di alginato reticolato secondo la procedura messa a punto da Suzuki *et al.* [78, 79]. Saggi di adesione di osteoblasti su dischetti di Ti rivestiti con i *carrier* arricchiti rispettivamente con 1 - 10 - 100 nmoli di peptide (352-360)HVP e (GRGDSP)<sub>4</sub>K hanno fornito valori di adesione inferiori rispetto al riferimento, costituito da dischetti non ricoperti; in ogni caso l'arricchimento con i peptidi di adesione è stato in grado di incrementare, in misura più o meno elevata a seconda della concentrazione di peptide, l'adesione cellulare rispetto al *coating* senza peptide [187]. Il decremento di adesione in dischetti ricoperti da *carrier* è probabilmente dovuto alla perdita delle caratteristiche morfologiche della superficie dovute allo spessore eccessivo del film. È stato inoltre valutato un *carrier* costituito da un film sottile di gel di silice ottenuto tramite *dipping*. Tramite la tecnica denominata sol-gel è possibile ottenere reticoli inorganici omogenei (vetri o ceramiche) che trattengono una fase liquida a partire da soluzioni di alcossidi di silicio o altri metalli. Sono stati eseguiti dei saggi di adesione di osteoblasti *in vitro* utilizzando dischetti di Ti rivestiti da film di sol-gel arricchito con diverse quantità di peptide (352-360)HVP e (GRGDSP)<sub>4</sub>K; in Fig. 154 sono riportati i risultati ottenuti da questi studi. Come si può vedere dal grafico, la percentuale di adesione varia in funzione della quantità di peptide contenuta nel sol-gel ed è massima, per entrambi i peptidi, ad una concentrazione pari a 0.230 mM. Sono state inoltre valutate le cinetiche di rilascio di due peptidi dal film di silice; sorprendentemente il peptide (352-360)HVP presenta una affinità tale per il film da non venire rilasciato neppure in parte.



**Fig. 154:** Adesione degli osteoblasti a Ti, Ti ricoperto con film sol-gel (0), e Ti ricoperto con film sol-gel arricchito con concentrazioni crescenti di (GRGDSP)<sub>4</sub>K (in turchese) e (352-360)HVP (in arancio), ovvero: 0.038 mM, 0.077 mM, 0.230 mM, 0.690 mM, 1.380 mM.

Sono stati inoltre condotti degli studi *in vivo* utilizzando cilindretti di Ti rivestiti di sol-gel arricchito con il peptide (352-360)HVP: a ciascuno di sei conigli bianchi New Zealand sono stati inseriti 2 impianti (campione + controllo), uno per femore. Gli impianti consistevano in cilindri cavi ( $\varnothing$  3 mm) di Ti ricoperto di film sol-gel (controllo) o di film sol-gel arricchito con (351-359)HVP (0.23 mM) (campione). Gli impianti sono stati inseriti nell'epifisi distale e ad ogni animale è stato somministrato un marcatore di crescita ossea (*calcein green*). Dopo 2 o 4 settimane gli impianti sono stati prelevati assieme al tessuto osseo circostante, fissati in formaldeide, disidratati con alcol, inglobati in resina acrilica (araldite) e quindi divisi in sezioni di circa 100  $\mu$ m. In Fig. 155 sono riportate le immagini di alcune sezioni ossee di femori prelevati dagli animali sacrificati dopo 2 settimane dall'intervento, contenenti l'impianto funzionalizzato con il peptide o quello usato come controllo.



(a)

(b)

**Fig. 155:** Immagini al microscopio ottico di sezioni ossee di femori prelevati dagli animali sacrificati dopo 2 settimane. (a) impianto rivestito semplicemente con sol-gel ; (b) impianto rivestito con sol-gel arricchito con il peptide (352-360)HVP.

Dal confronto dalle immagini di Fig. 155, si può apprezzare una attività osteogenica maggiore intorno agli impianti con il peptide bioattivo (immagini della seconda colonna) rispetto al controllo (immagini della prima colonna) evidenziata da zone più ampie di colore verde più diffuso dovuto al marcatore che si lega al tessuto osseo neoformato. La differenza in termini di attività osteogenica tra i campioni arricchiti e il controllo risulta meno evidente nelle sezioni ossee ottenute dai femori degli animali sacrificati dopo 4 settimane dall'intervento, a conferma che l'attività del peptide bioattivo si esplica nell'arco di breve tempo dall'inserimento dell'impianto (i risultati di questi studi sono riportati nella tesi di laurea in Ingegneria Chimica del dott. Nicola Mela, anno accademico 2003-2004, Università degli Studi di Padova).

È comunque di estremo interesse il fatto che il peptide (352-360)HVP sia in grado di accelerare il processo di osteogenesi *in vivo* senza alterare la normale fisiologia del tessuto con il quale viene in contatto.

Tra le strategie per ottimizzare una superficie biomimetica l'immobilizzazione di un peptide ad una superficie tramite un legame covalente presenta i maggiori vantaggi: adottando questa strategia è infatti possibile (i) controllare la densità superficiale delle biomolecole, (ii) ottimizzare il loro orientamento inserendo uno *spacer* nel caso sia necessario allontanare la biomolecola dalla superficie perchè possa esplicare al meglio la sua attività e (iii) usufruire di un legame tra molecola bioattiva e superficie abbastanza stabile da non venire compromesso durante le operazioni di inserimento dell'impianto nel sito chirurgico.

L'immobilizzazione di biomolecole ad una superficie può essere utilizzata per rendere biomimetici materiali molto diversi tra loro come ad esempio ossidi metallici, materiali polimerici, vetro, quarzo e alti substrati a base di  $\text{SiO}_2$ .

Nel presente lavoro di dottorato si è messa a punto una strategia per funzionalizzare covalentemente la superficie di dischetti di titanio, preventivamente sabbiati e passivati [134] (tramite trattamento con acidi), con i peptidi (352-360)HVP e (GRGDSP)<sub>4</sub>K. Si è scelto di utilizzare questi due peptidi perchè nei saggi biologici *in vitro* si sono rivelati i più attivi nel promuovere l'adesione tramite i due diversi meccanismi noti per gli osteoblasti.

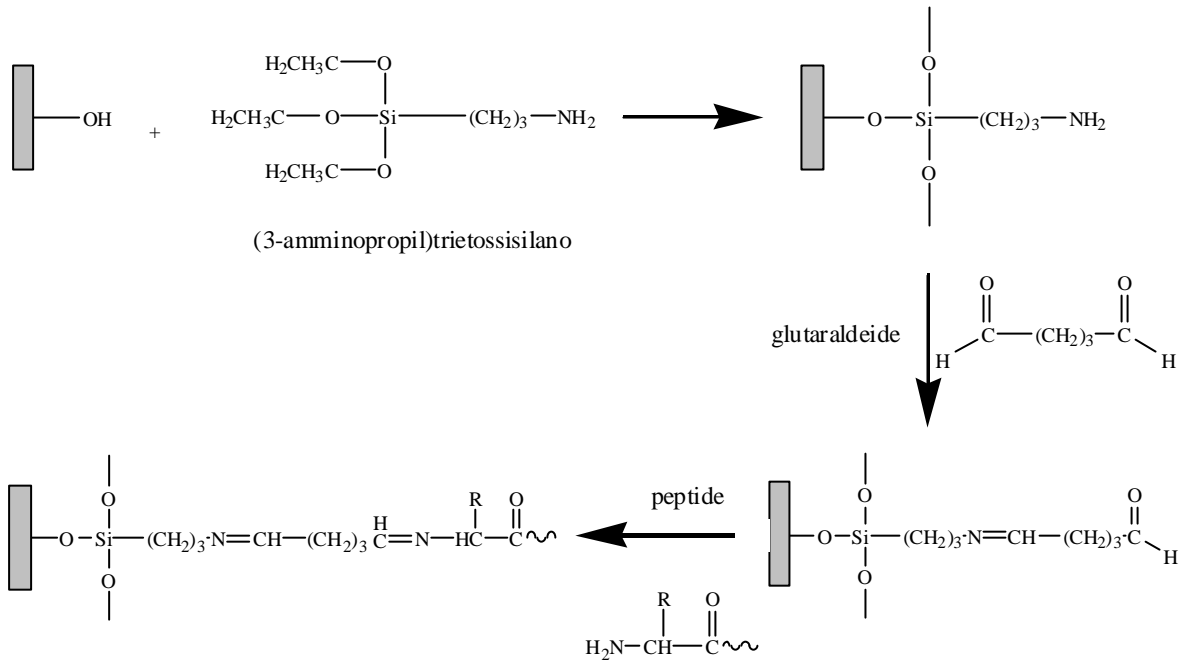
Inoltre il peptide (352-360)HVP è stato utilizzato per ottenere un nuovo materiale biomimetico, a base di alginato di sodio reticolato, da saggiare quale potenziale sostituto di tessuti molli.

#### *Funzionalizzazione covalente di superfici di titanio*

Secondo i dati ottenuti dai saggi di adesione di osteoblasti su polistirene pretrattato con peptidi (cft. pag. 215) si deduce che il peptide (352-360)HVP risulta la sequenza più attiva nel promuovere l'adesione degli osteoblasti mediante un meccanismo specifico mentre il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K risulta la molecola più attiva nel promuovere l'adesione di questo tipo di cellule mediata dall'integrina. Si è quindi deciso di utilizzare unicamente questi due peptidi per funzionalizzare superfici in titanio. Come materiale di partenza sono stati utilizzati dei dischetti di Ti preventivamente sabbiati (corundrum 450  $\mu\text{m}$  per 10 secondi) ed ossidati con una miscela all'ebollizione di  $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$  (1:1:3 (v:v:v) per 6 min) [134]; tale trattamento ha permesso di ottenere una superficie con caratteristiche morfologiche per l'adesione cellulare simili a quelle di impianti commerciali già ottimizzate. Tali superfici sono state ulteriormente ossidate per trattamento con una soluzione di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Questo trattamento serve ad incrementare i gruppi



ossidrilici liberi presenti sulla superficie del materiale, fondamentali per operare un ancoraggio covalente. I supporti sono stati quindi silanizzati e la superficie è stata funzionalizzata con una soluzione all'1% di glutaraldeide in tampone sodio fosfato ed infine derivatizzata tramite immersione in una soluzione di tampone sodio fosfato contenente il peptide (Fig. 156). La glutaraldeide, oltre a permettere l'ancoraggio del peptide, funge anche da *spacer* [69].



**Fig. 156:** Reazioni per la funzionalizzazione covalente di una superficie di Ti ossidata.

### ***Procedura sperimentale***

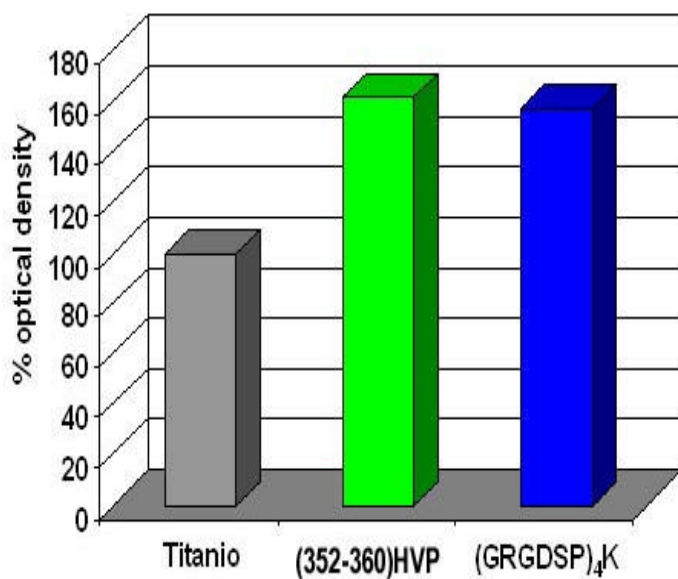
Circa 1 L di toluene è stato disidratato lasciandolo a contatto con sodio metallico per una notte e successivamente è stato distillato in atmosfera di azoto.

- 9 dischetti di Ti, preventivamente sabbati ed ossidati, sono stati lavati per tre volte con il toluene anidro e seccati sotto vuoto per 20 min;
- i dischetti sono stati trattati con 50 mL di soluzione costituita da volumi uguali di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% in H<sub>2</sub>O per 2 ore a 25°C e sotto agitazione magnetica;
- dopo aver lavato per tre volte i dischetti con H<sub>2</sub>O MilliQ, sono stati messi a seccare per 2 ore sotto vuoto;

- i 9 dischetti sono stati silanizzati utilizzando 50 mL di soluzione al 10% di (3-amminopropil)trietossisilano in toluene anidro e scaldando la soluzione a riflusso per 4 ore;
- dopo essere stati lavati tre volte con toluene anidro, i dischetti sono stati messi a seccare per 2 ore sotto vuoto;
- i dischetti sono stati immersi in 25 mL di soluzione all'1% di glutaraldeide in tampone sodio fosfato 0.1 M pH 7.0 per 4 ore a 25°C, sotto agitazione magnetica;
- si sono lavati i dischetti per rimuovere l'eccesso di glutaraldeide utilizzando dell'altra soluzione tampone di sodio fosfato 0.1 M pH 7.0;
- la condensazione del peptide ai supporti è stata realizzata tramite immersione dei dischetti in una soluzione 1 mM di peptide in tampone sodio fosfato 0.1 M pH 7.0 per una notte;
- dopo aver lavato i dischetti con H<sub>2</sub>O MilliQ, sono stati messi a seccare per 2 ore sotto vuoto.

Sono stati condotti dei saggi di adesione cellulare con osteoblasti estratti da midollo di ratto adulto alle solite condizioni (cft. pag. 213) utilizzando i dischetti funzionalizzati con i due peptidi. Sono stati eseguiti 3 esperimenti per ciascun peptide analizzato. In Fig. 157 sono riportati i dati relativi all'adesione media calcolata su tre dischetti, considerando l'adesione su dei dischetti di Ti semplicemente sabbiati ed ossidati (alle stesse condizioni utilizzate per i dischetti impiegati come materiale di partenza per la funzionalizzazione), usati come riferimento, pari al 100%.

Peptide	% adesione	Valore medio % adesione
	169	
(352-360)HVP	143	162.0
	174	
	178	
(GRGDSP) <sub>4</sub> K	152	157.3
	142	



**Fig. 157:** Saggi di adesione degli osteoblasti su dischetti di Ti funzionalizzati covalentemente con i peptidi (352-360)HVP e (GRGDSP)<sub>4</sub>K. Di fianco sono riportati i dati di adesione percentuale per ogni esperimento e la relativa media calcolata.

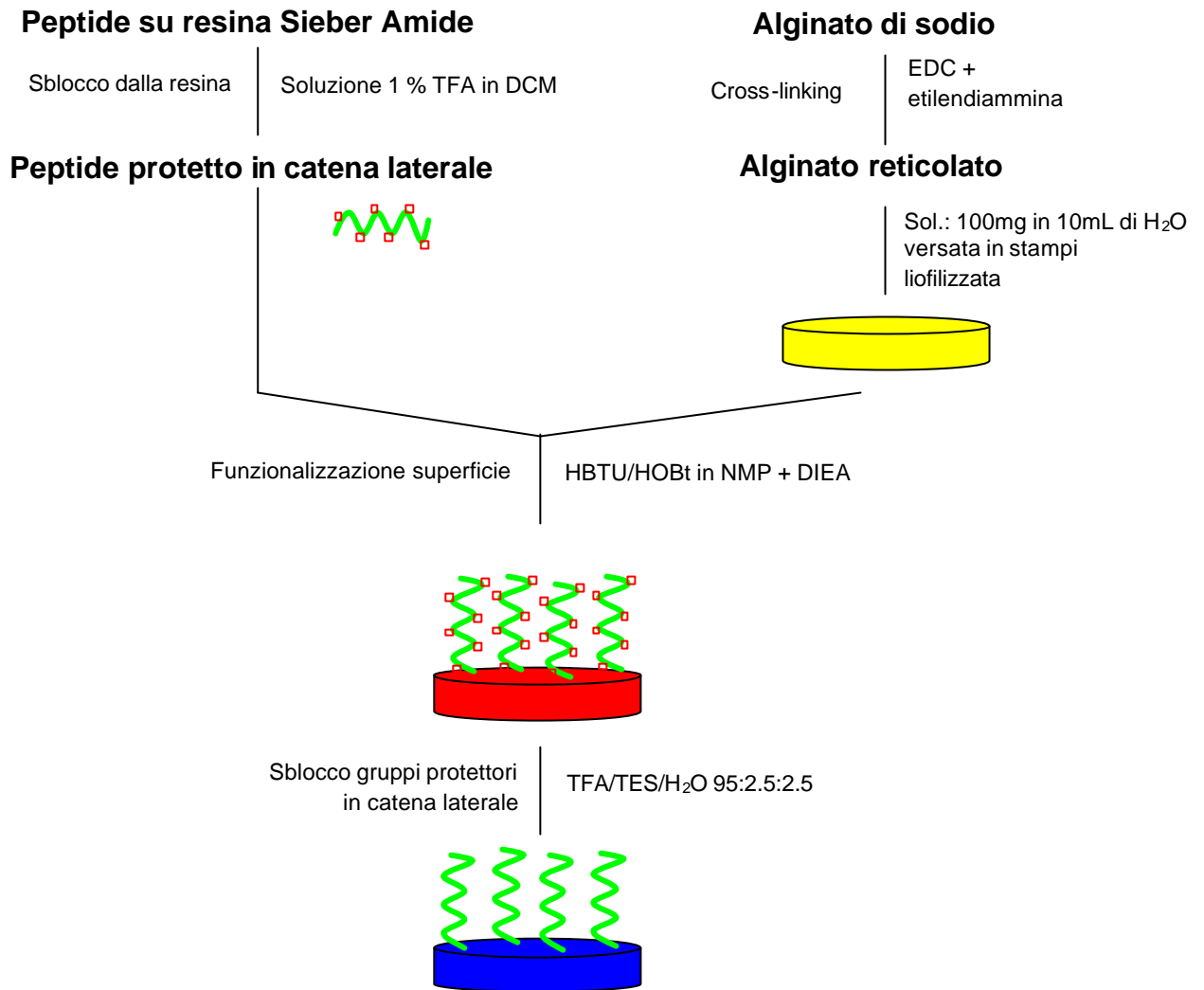
### ***Funzionalizzazione covalente di idrogeli di alginato***

Il peptide (352-360)HVP è stato utilizzato per funzionalizzare in modo specifico dei dischetti di idrogel di alginato. L'idrogel di alginato è stato ottenuto trattando 0.5 g di alginato di sodio con 49 mg di EDC e 17  $\mu$ L di etilendiammina in 50 mL di H<sub>2</sub>O per 24 ore, quindi liofilizzando la miscela [79]. Da prove di solubilità condotte sulla matrice di alginato *cross-linkato* è risultato che quest'ultima è parzialmente solubile in DMF mentre non sembra sciogliersi se lasciata in contatto con NMP, TFA o EtOH per il tempo necessario al decorrere della reazione di funzionalizzazione.

I dischetti sono stati ricavati ponendo 0.5 mL di idrogel, preparato aggiungendo a 100.5 mg di idrogel liofilizzato 5 mL di H<sub>2</sub>O, dentro a stampi cilindrici di diametro 1.25 cm e quindi mettendoli a liofilizzare; si sono ottenuti 9 dischetti con le seguenti caratteristiche medie: peso intorno ai 10.2 mg, diametro di 0.9 cm e spessore di 0.1 cm. Al fine di legare il peptide all'idrogel di alginato utilizzando solo il suo terminale amminico, ovvero in modo specifico, è stato utilizzato il peptide (352-360)HVP ammido terminale protetto in catena laterale. Dato che si desidera ottenere una concentrazione superficiale di peptide di circa 0.4 nmoli/cm<sup>2</sup>, considerando l'area totale dei dischetti si è deciso di preparare una soluzione madre tale per cui 25  $\mu$ L contengono 5.60 nmoli (0.74 mg di peptide (352-360)HVP ammido terminale protetto in catena laterale sono stati sciolti con 1.237 mL di

NMP). Si è quindi eseguito l'attacco del peptide seguendo la procedura di seguito riportata (in Fig. 158 sono mostrati schematicamente i vari passaggi):

- in un bicchiere sono stati posti i 9 dischetti di alginato a cui sono stati aggiunti 6 mL di una soluzione 0.225 M di HBTU/HOBt in NMP, 0.48 mL di DIEA e 25  $\mu$ L di soluzione madre contenente il peptide;
- si è lasciata reagire la soluzione per 24 ore agitando manualmente;
- i dischetti di alginato funzionalizzati con il peptide protetto sono stati lavati per 3 volte con NMP e altrettante con EtOH e sono stati lasciati asciugare all'aria per un giorno;
- si sono liberate le protezioni laterali del peptide trattando i dischetti con la seguente miscela di sblocco: 0.125 mL di TES, 4.750 mL di TFA e 0.125 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ; si è agitato manualmente per 1 ora e 30 min ed in seguito si è rimossa la soluzione di sblocco;
- i dischetti sono stati lavati per 5 volte con EtOH ed in seguito sono stati lasciati asciugare all'aria.



**Fig. 158:** Schema di funzionalizzazione della superficie di dischetti di alginato con un peptide.

Saggi *in vivo* sulla citotossicità, condotti impiantando sottopelle a dei topi i dischetti funzionalizzati con il peptide e dei dischetti di alginato *cross-linkato* non funzionalizzati come riferimento, sono attualmente in corso e permetteranno di valutare il materiale ottenuto come potenziale sostituto di tessuti molli.

## ***STUDI CONFORMAZIONALI DEI PEPTIDI ADESIVI***

Data la sua sequenza di soli tre residui, per il peptide RGD non sono stati condotti studi conformazionali.

### ***Dicroismo circolare (CD)***

Le misure di dicroismo circolare sono state ottenute con uno spettropolarimetro Jasco modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla medesima ditta.

Le misure CD sono state condotte a temperatura ambiente adottando i seguenti parametri: *range*, 185-255 nm; *step resolution*, 0.2 nm; *scan speed*, 5 nm/min; *accumulation*, 2; *response*, 2 sec; *band width*, 2.0 nm; *sensitivity*, 5, 10 o 20 mdeg. Sono state utilizzate celle cilindriche in quarzo fuso con cammino ottico di 0.1 o 0.05 cm.

Le misure CD sono state condotte utilizzando i seguenti solventi:

1. H<sub>2</sub>O MilliQ;
2. miscele TFE/H<sub>2</sub>O nelle seguenti proporzioni: 25 – 50 – 75 – 90 e 98% TFE in H<sub>2</sub>O;
3. tampone fosfato: soluzione 10 mM di sodio fosfato monobasico ai seguenti pH: 6.5 - 7.0 – 7.4 e 8.0;
4. soluzione 14 mM di SDS in tampone fosfato 10 mM, pH 7.0.

Le soluzioni sono state ottenute portando ad un volume di 500 µL, con opportuno solvente, 10 µL di una soluzione madre, preparata sciogliendo quantità pesate di peptide con H<sub>2</sub>O MilliQ in modo da ottenere una concentrazione pari a  $2.5 \times 10^{-3}$  M. Le concentrazioni esatte delle soluzioni di cui si è eseguita la misura CD, preparate in maniera tale da avere una concentrazione per pesata pari a  $5 \times 10^{-5}$  M, sono state determinate tramite analisi amminoacidica quantitativa seguendo la procedura riportata a pag. 61. Si sono ottenute le seguenti concentrazioni sperimentali:  $4.407 \times 10^{-5}$  M per il peptide GRGDSPK,  $4.346 \times 10^{-5}$  M per il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K,  $2.628 \times 10^{-5}$  M per il peptide (340-365)HVP,  $2.570 \times 10^{-5}$  M per il peptide (340-352)HVP,  $2.443 \times 10^{-5}$  M per il peptide (352-365)HVP,  $2.815 \times 10^{-5}$  M per il peptide (352-360)HVP,  $3.283 \times 10^{-5}$  M per il peptide (352-360)HVP ciclico,  $2.805 \times 10^{-5}$  M per il peptide (352-360)HVP Sc.

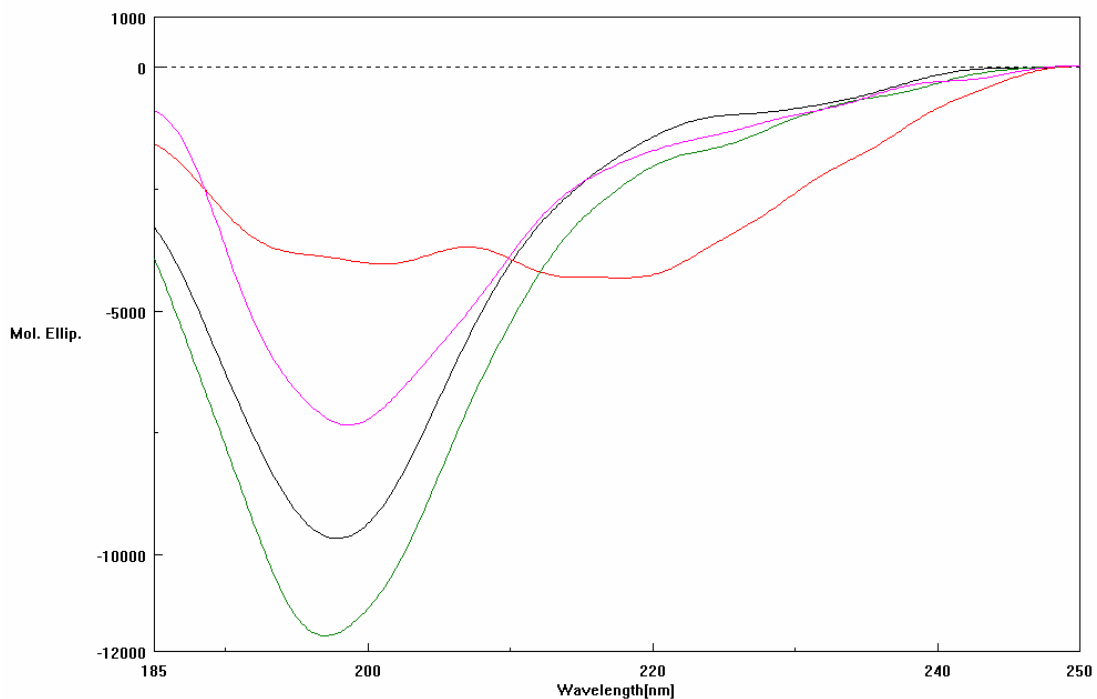
La concentrazione dei cromofori, utilizzata per ottenere gli spettri normalizzati è stata ottenuta moltiplicando la concentrazione esatta delle soluzioni CD ricavata sperimentalmente per il numero di legami peptidici.

Il contenuto di  $\alpha$ -elica è stato valutato utilizzando la formula messa a punto da Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167].

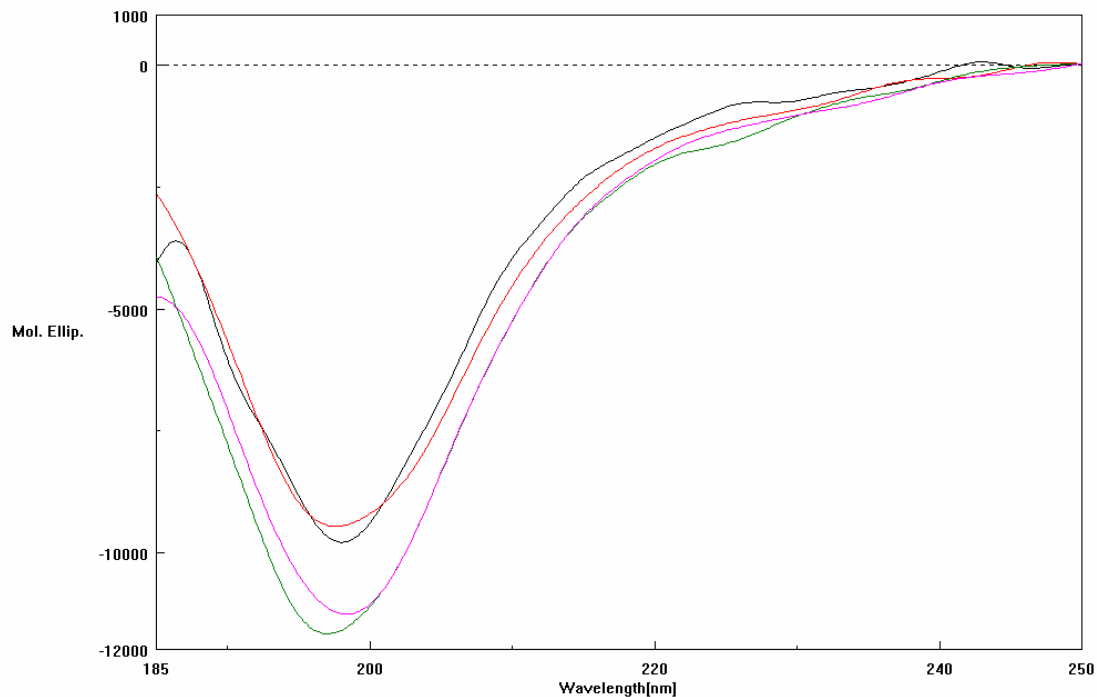
Sono riportati di seguito i risultati relativi a ciascun peptide.

## GRGDSPK

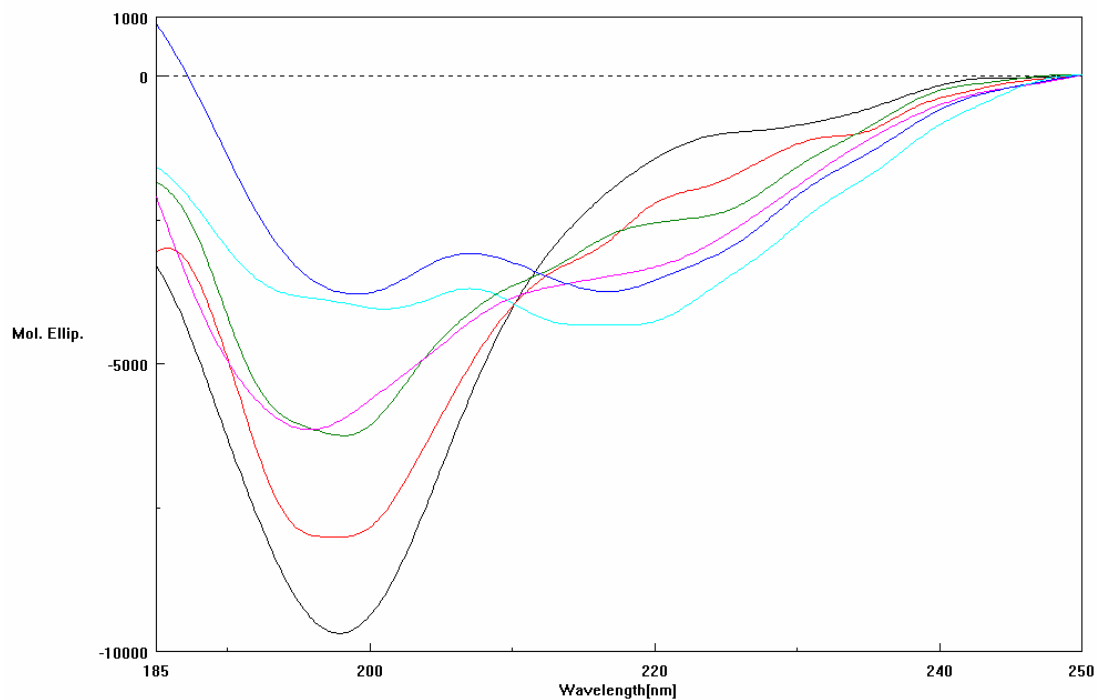
Gli spettri CD riportati in Fig. 159 attestano come in H<sub>2</sub>O MilliQ, in soluzione tampone e in soluzione micellare il peptide è estremamente flessibile; infatti gli spettri presentano tutti una banda negativa intorno ai 197 nm tipica della struttura disordinata. Solo in presenza di TFE il peptide mostra una certa tendenza a strutturarsi (Fig. 161): in base alla diminuzione di intensità della banda a 197 nm e la comparsa di una banda tra i 210 e i 220 nm si può supporre la presenza di contributi di tipo  $\beta$ -sheet (contenuto di  $\alpha$ -elica = 0.90%). Lo spettro ottenuto per il peptide sciolto in soluzione tampone non mostra variazioni significative al variare del pH (Fig. 160).



**Fig. 159:** Spettri CD di GRGDSPK in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (? ), TFE (? ), tampone fosfato pH 7.4 (? ), soluzione micellare di SDS (? ).



**Fig. 160:** Spettri CD di GRGDSPK in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



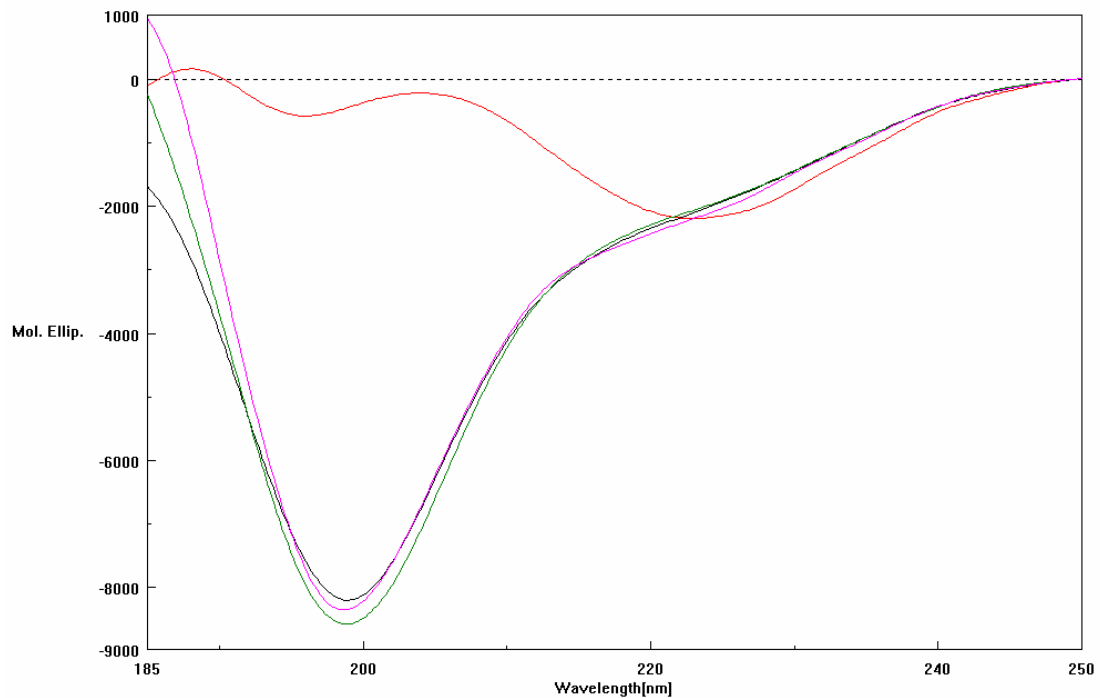
**Fig. 161:** Spettri CD di GRGDSPK in miscela TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).

### (GRGDSP)<sub>4</sub>K

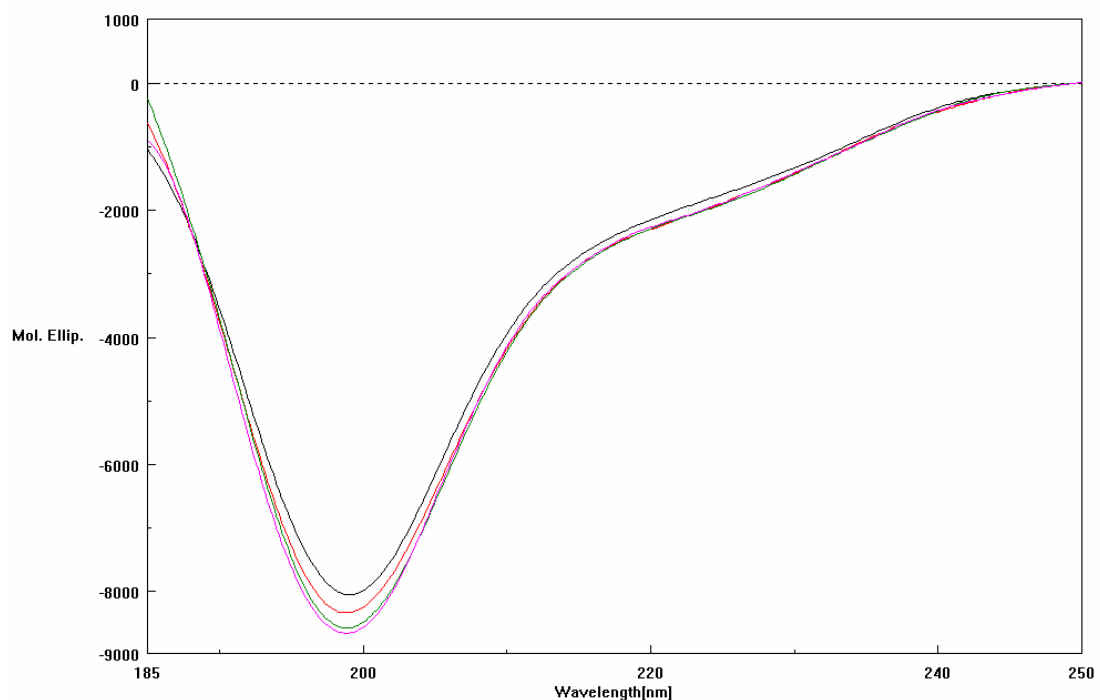
Come per il peptide GRGDSPK, gli spettri CD in H<sub>2</sub>O MilliQ, in soluzione tampone a differenti pH e in soluzione micellare mostrano una banda negativa intorno ai 197 nm,



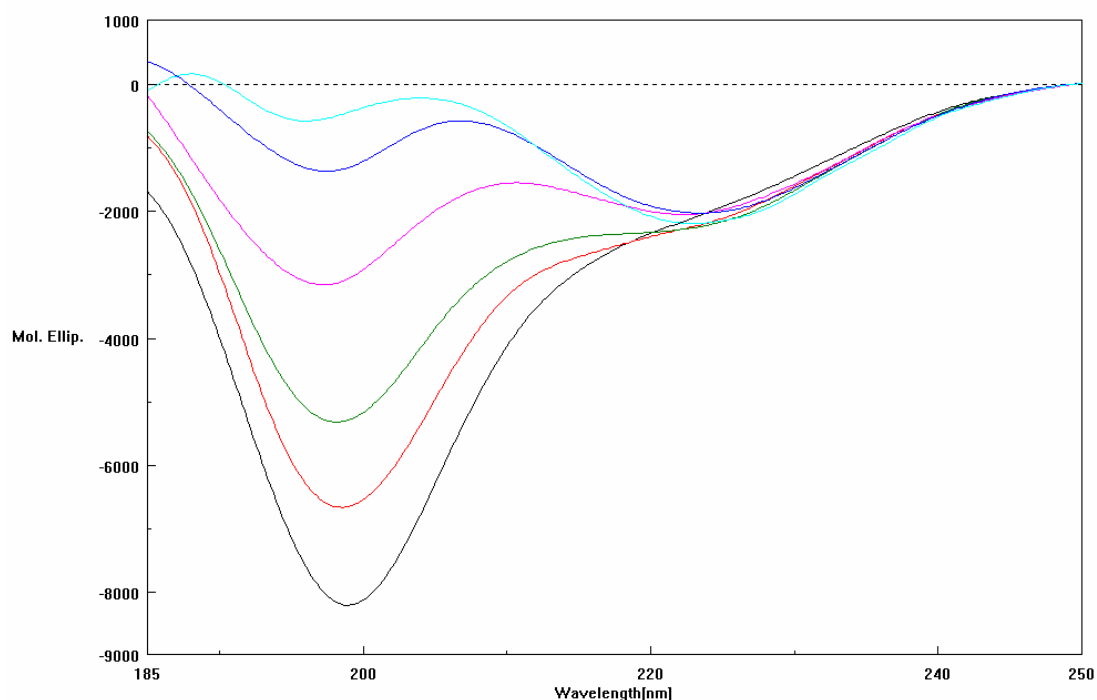
tipica della struttura disordinata (Figg. 162, 163), mentre in presenza di TFE il peptide fornisce uno spettro differente (Fig. 164) caratterizzato da una diminuzione dell'intensità della banda a 197 nm e dalla comparsa di una banda poco intensa a ~ 220 nm attribuibili alla comparsa di conformeri ordinati. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale.



**Fig. 162:** Spettri CD di (GRGDSP)<sub>4</sub>K in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



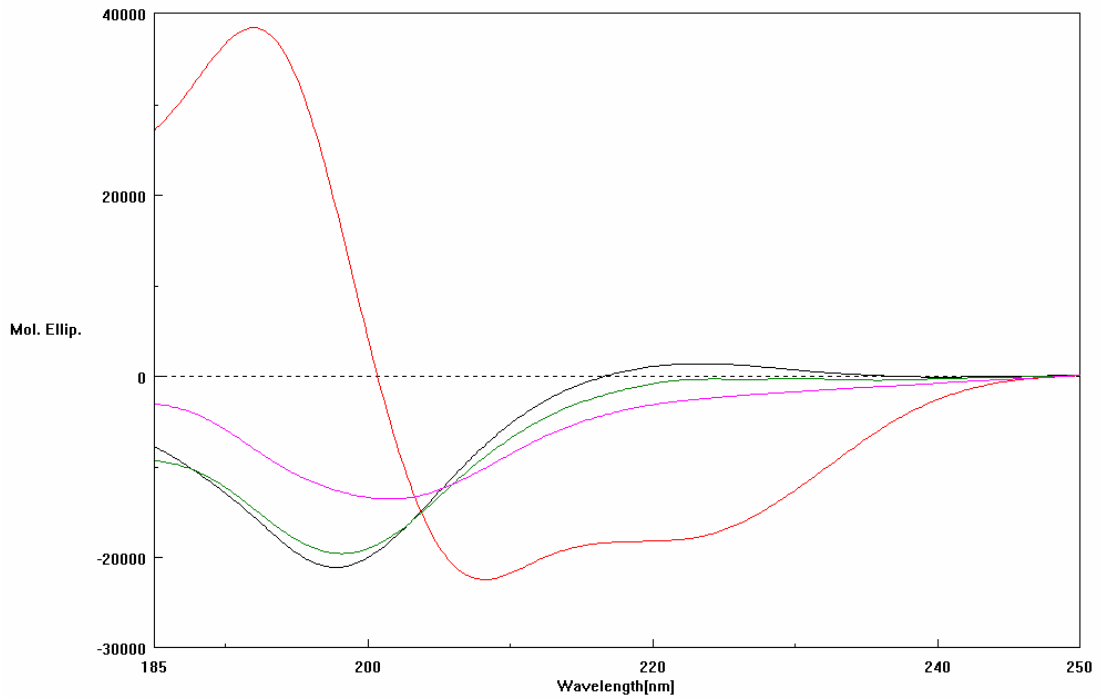
**Fig. 163:** Spettri CD di (GRGDSP)<sub>4</sub>K in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0(?).



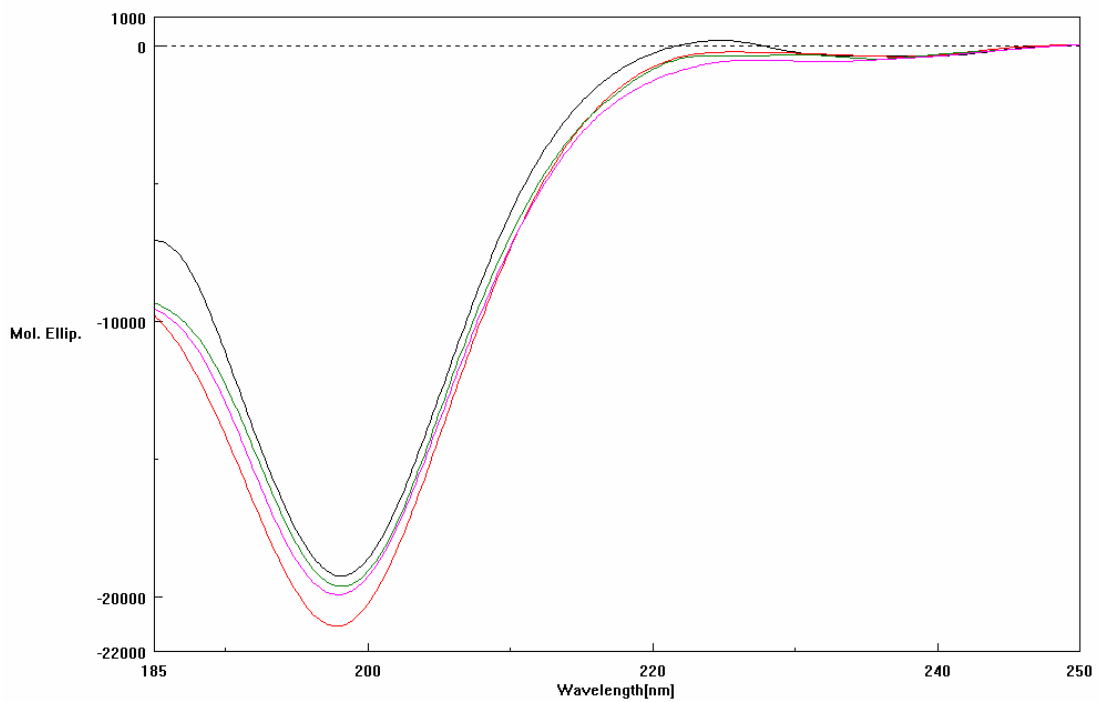
**Fig. 164:** Spettri CD di (GRGDSP)<sub>4</sub>K in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).

### **(340-365) HVP**

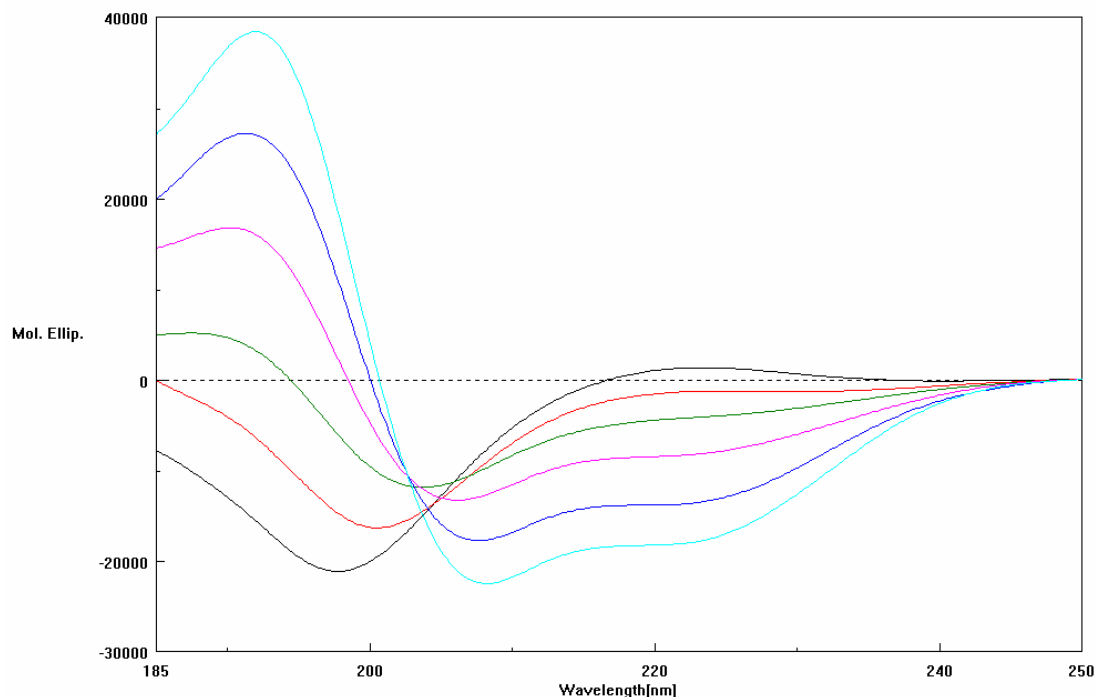
Gli spettri CD del peptide (340-365)HVP in H<sub>2</sub>O MilliQ e in soluzione tampone a differenti pH presentano un andamento tipico della conformazione aperiodica (banda negativa intorno ai 197 nm), mentre lo spettro in soluzione micellare mostra una debole tendenza alla strutturazione (*blu shift* della banda negativa) (Fig. 165). Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale (Fig. 166). Lo spettro misurato in TFE, con una intensa banda positiva a 192 nm e due bande negative a circa 208 e 222 nm, presenta un andamento tipico della conformazione  $\alpha$ -elicoidale (Fig. 167), il cui contenuto percentuale è stimato essere intorno al 63.74% in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167].



**Fig. 165:** Spettri CD di (340-365)HVP in diversi solventi:  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



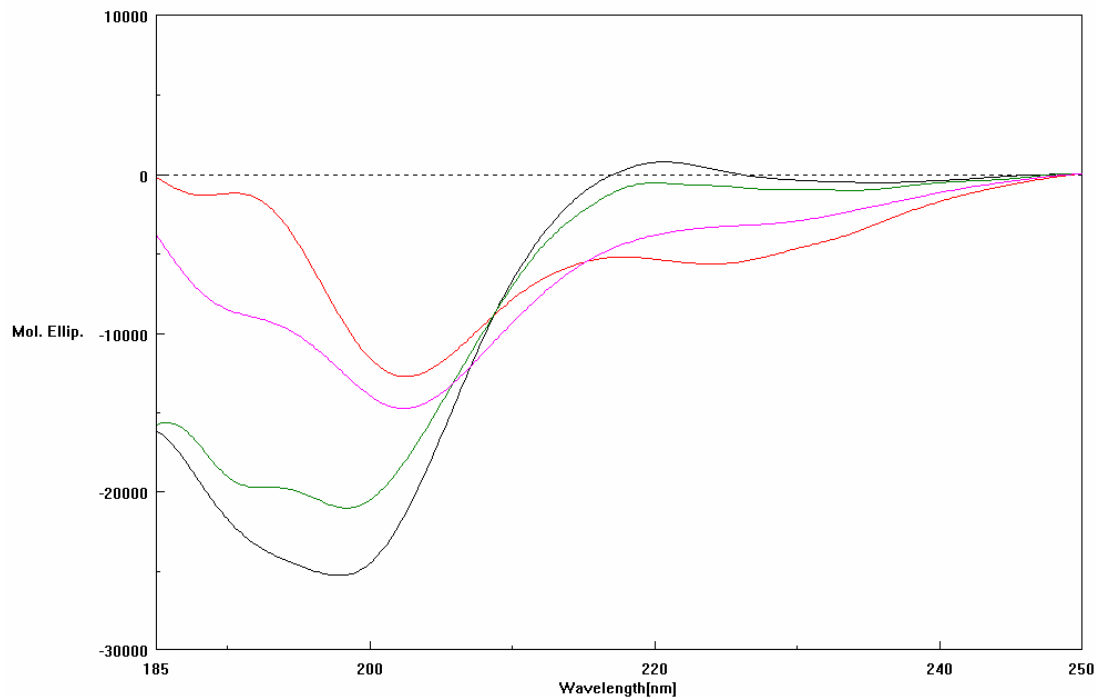
**Fig. 166:** Spettri CD di (340-365)HVP in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



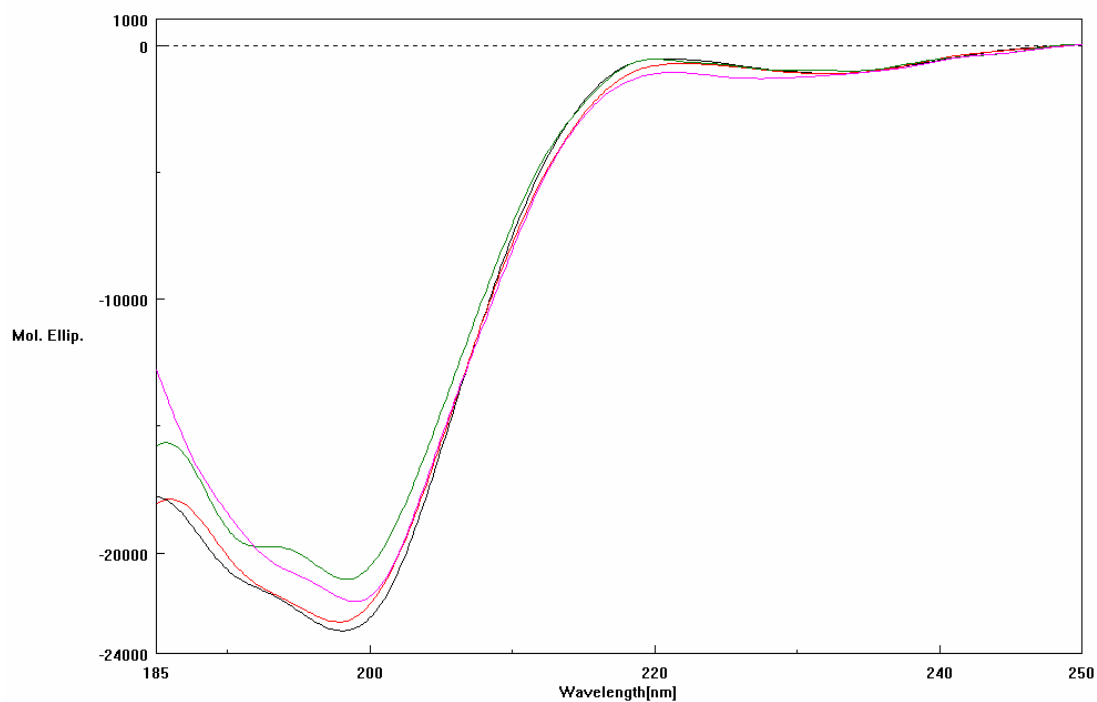
**Fig. 167:** Spettri CD di (340-365)HVP in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).

### (340-352)HVP

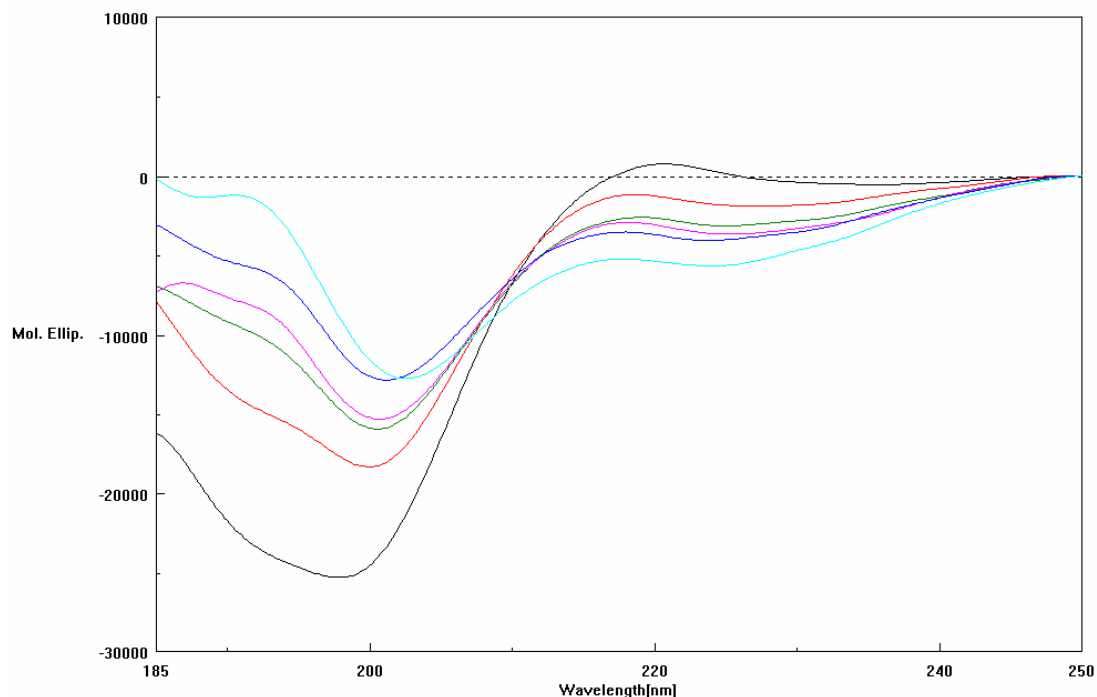
Dagli spettri del peptide (340-352)HVP eseguiti in H<sub>2</sub>O e in tampone fosfato a differenti pH (Figg. 168, 169), nei quali è presente una banda negativa intensa data dal contributo di due componenti, si può ragionevolmente presumere una conformazione prevalentemente *random* (componente principale a 198 nm) con una certa percentuale di conformeri ordinati, probabilmente riconducibili a una struttura  $\beta$ -turn di tipo II (spalla a 190 nm). Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. In soluzione micellare e all'aumentare del contenuto di TFE l'intensità della banda tra i 190 e i 200 nm diminuisce e contemporaneamente subisce un *blu shift* a 203 nm, compare inoltre una banda negativa intorno ai 222 nm indice di una certa strutturazione (Fig. 168, 170). La percentuale di  $\alpha$ -elica valutata utilizzando la formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167] risulta essere intorno al 20% per la misura in TFE.



**Fig. 168:** Spettri CD di (340-352)HVP in diversi solventi:  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



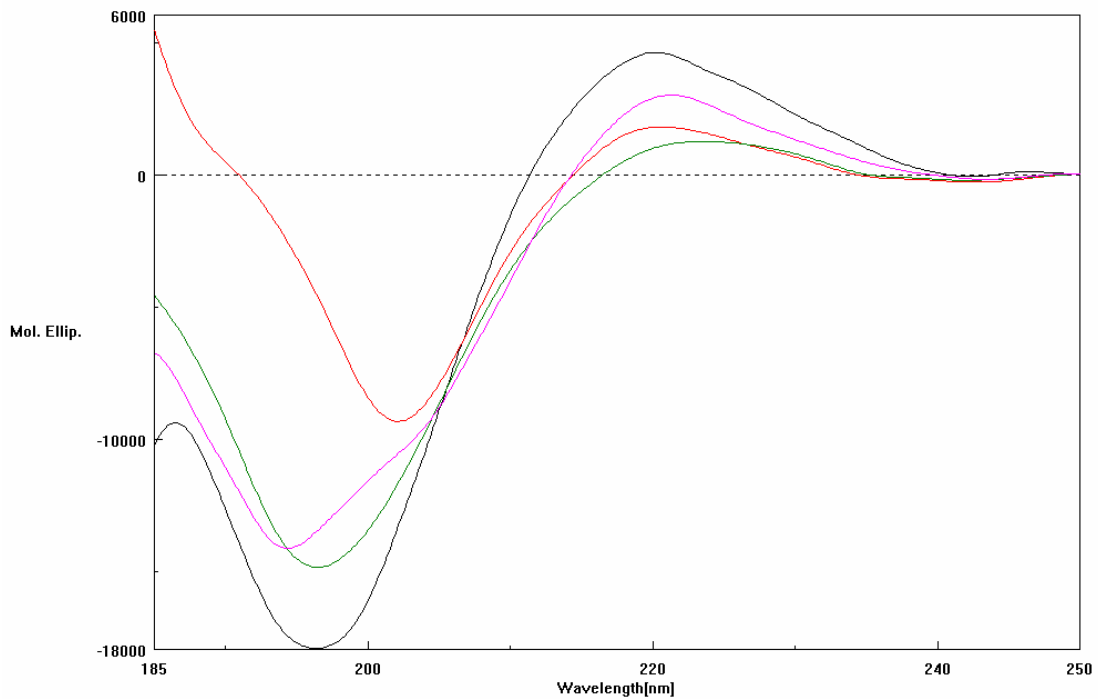
**Fig. 169:** Spettri CD di (340-352)HVP in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



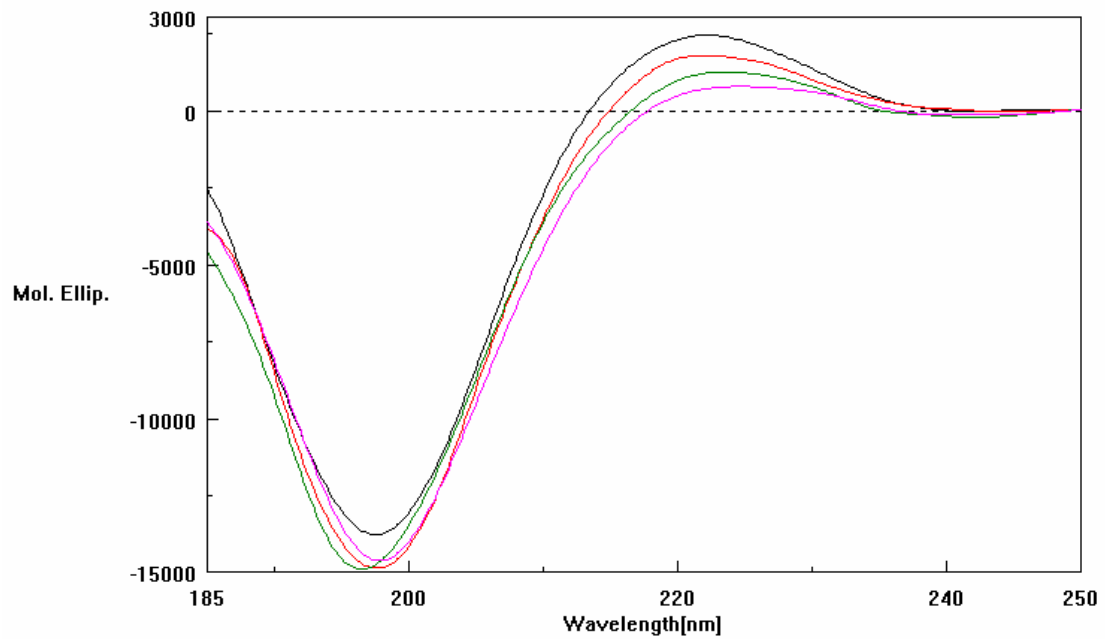
**Fig. 170:** Spettri CD di (340-352)HVP in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).

### (352-365)HVP

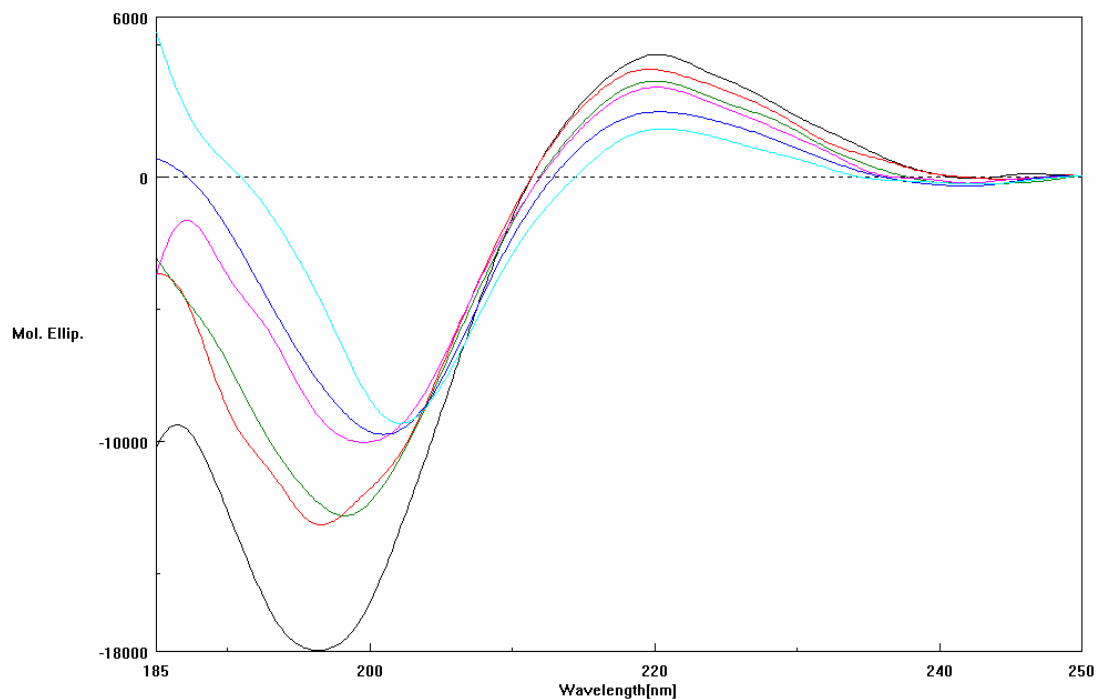
Tutti gli spettri mostrano una debole banda positiva intorno ai 220 nm che potrebbe essere dovuta al contributo aromatico del residuo Tyr della sequenza. Gli spettri CD del peptide (352-365)HVP in H<sub>2</sub>O MilliQ e in soluzione tampone a differenti pH presentano un andamento tipico della conformazione aperiodica (banda negativa intorno ai 197 nm), mentre lo spettro in soluzione micellare e in misura maggiore gli spettri misurati a percentuali crescenti di TFE mostrano una debole tendenza alla strutturazione, dato lo spostamento della banda negativa: *red shift* per la soluzione micellare e *blu shift* in presenza di TFE (Figg. 171-173). La strutturazione non sembra comunque dovuta all'apparire di conformeri in  $\alpha$ -elica il cui contributo, in base la formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], risulta essere inferiore all'8% in tutti i solventi. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale.



**Fig. 171:** Spettri CD di (352-365)HVP in diversi solventi:  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



**Fig. 172:** Spettri CD di (352-365)HVP in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).

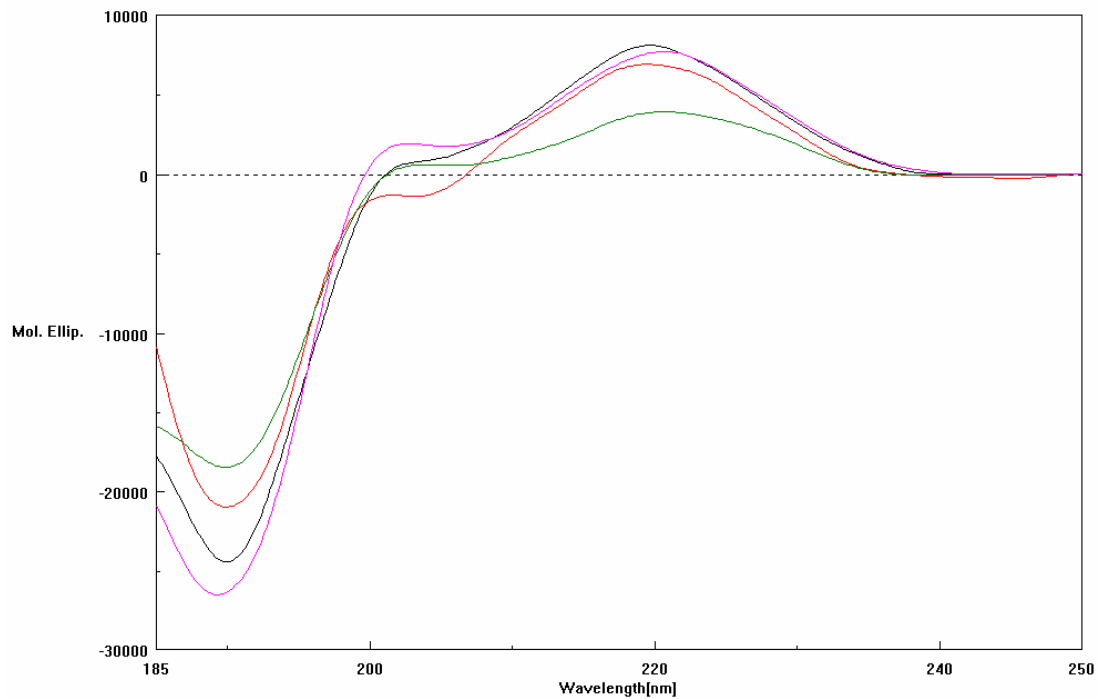


**Fig. 173:** Spettri CD di (352-365)HVP in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).

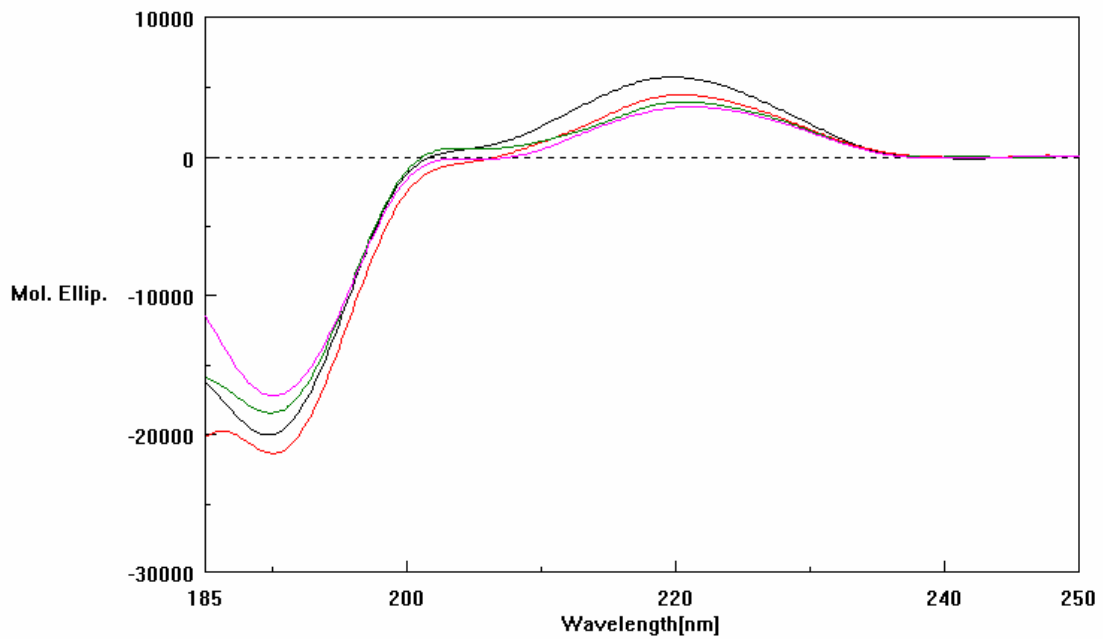
### (352-360)HVP

In analogia all'andamento degli spettri CD del peptide (352-365)HVP è presente una banda positiva intorno ai 220 nm probabilmente dovuta al residuo Tyr. Gli spettri CD di questo peptide mostrano un andamento praticamente identico nei diversi solventi, indice che il peptide (352-360)HVP è in grado di assumere una conformazione invariante. In base all'intensa banda negativa intorno ai 190 nm, probabilmente la conformazione in cui si trova il peptide è un  $\beta$ -turn di tipo II (Figg. 174-176).

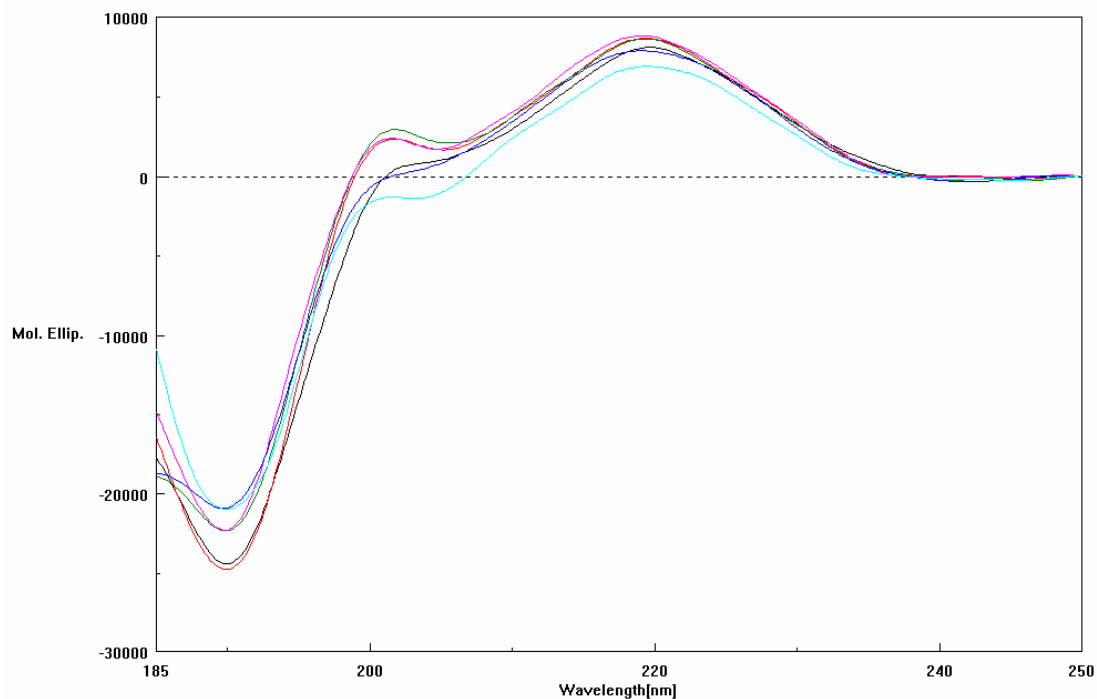




**Fig. 174:** Spettri CD di (352-360)HVP in diversi solventi:  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



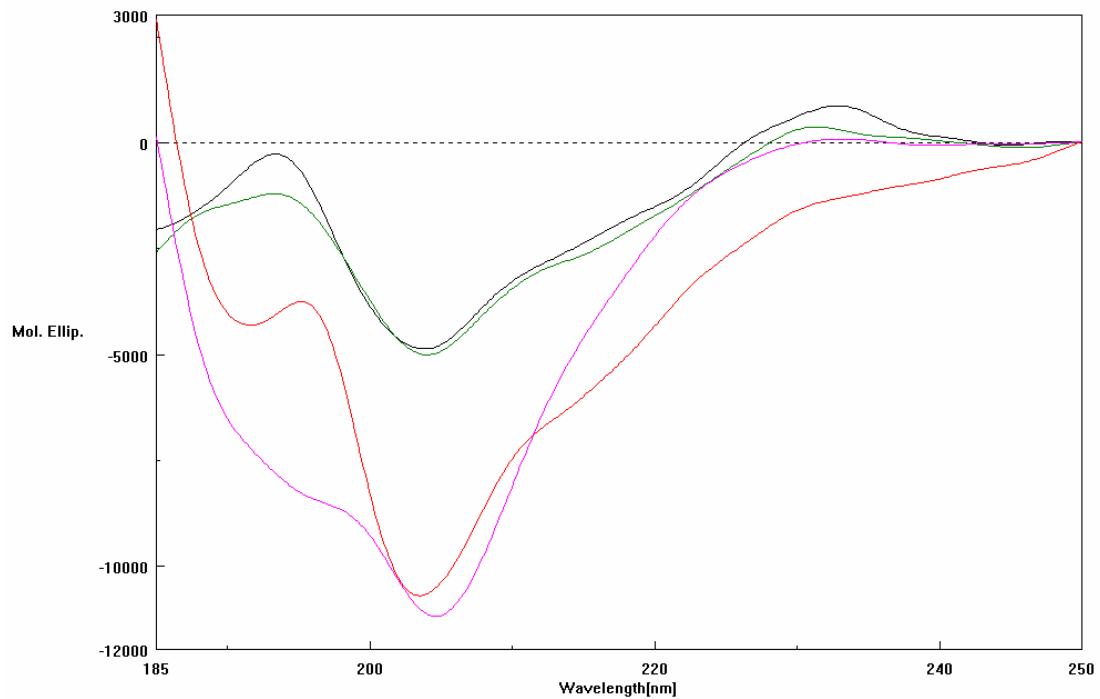
**Fig. 175:** Spettri CD di (352-360)HVP in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



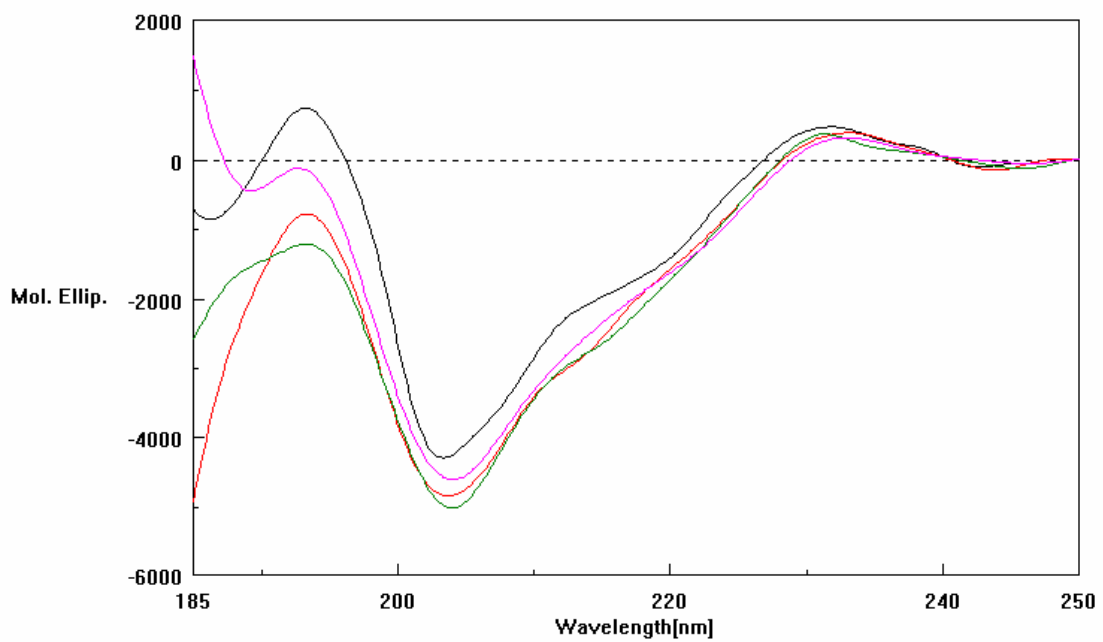
**Fig. 176:** Spettri CD di (352-360)HVP in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).

### (352-360)HVP ciclico

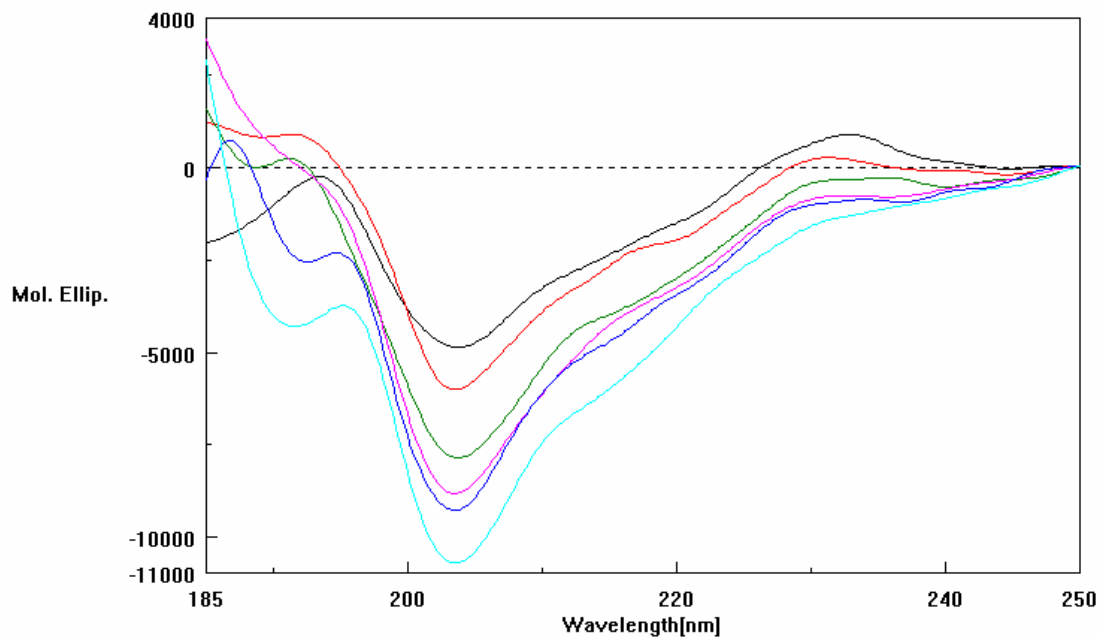
Come negli spettri dell'analogo lineare, è presente una banda positiva intorno ai 220 nm probabilmente dovuta al residuo Tyr. Tutti gli spettri CD del peptide (352-360)HVP ciclico sono caratterizzati principalmente dalla presenza di una banda negativa intorno ai 204 nm di difficile attribuzione (Figg. 177-179). In H<sub>2</sub>O MilliQ e in soluzione tampone a diversi pH la banda a 204 nm risulta meno intensa rispetto alla soluzione micellare e in presenza di percentuali elevate di TFE e si nota la scomparsa della banda intorno ai 190 nm (Fig. 179).



**Fig. 177:** Spettri CD di (352-360)HVP ciclico in diversi solventi:  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



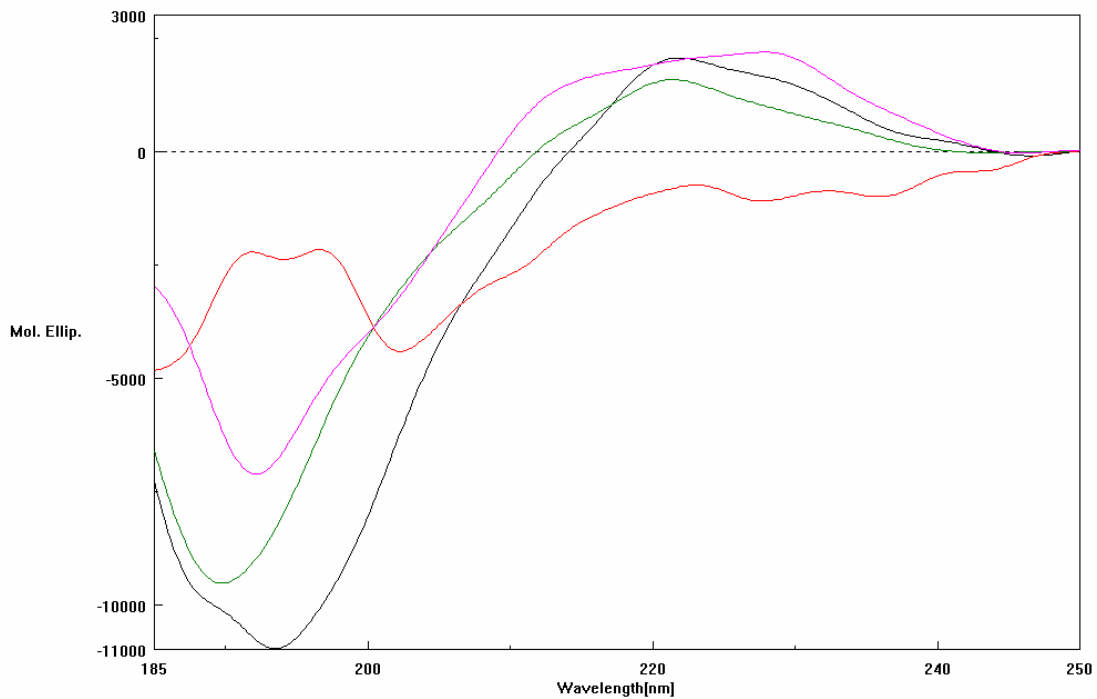
**Fig. 178:** Spettri CD di (352-360)HVP ciclico in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



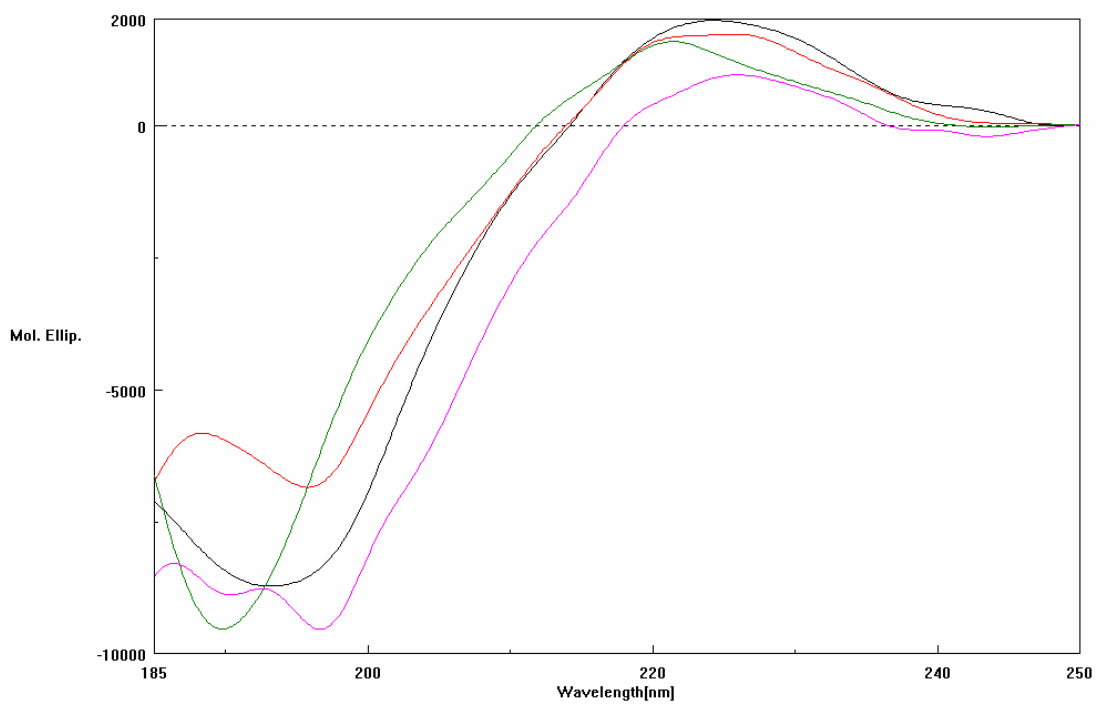
**Fig. 179:** Spettri CD di (352-360)HVP ciclico in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).

### (352-360)HVP Sc

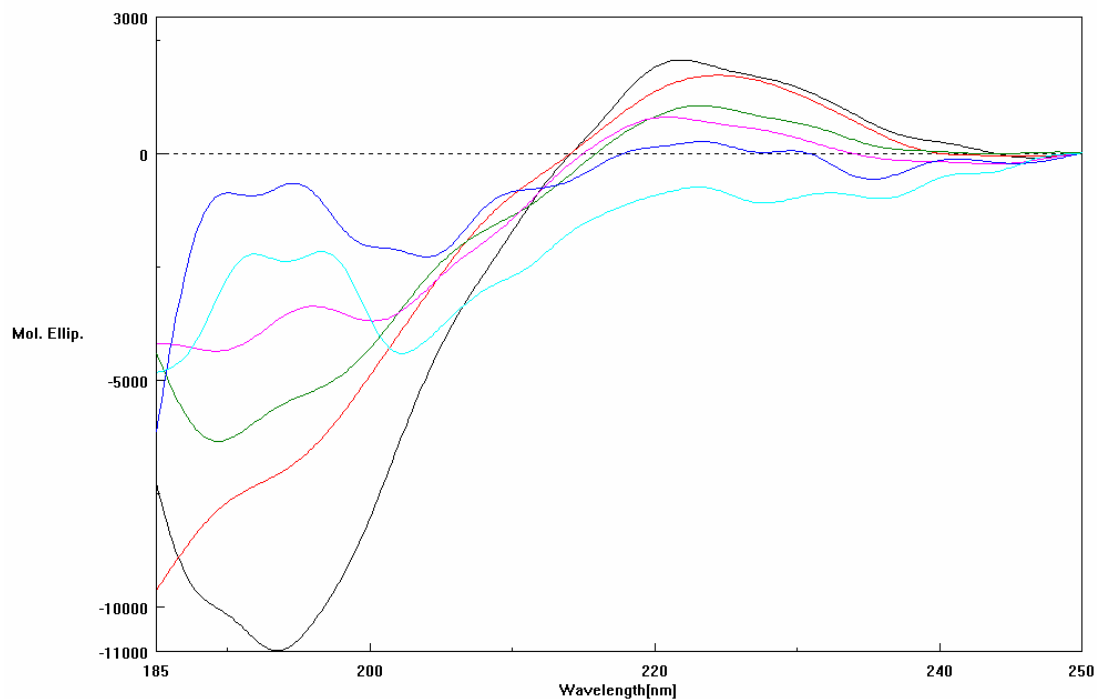
Lo spettro del peptide in differenti solventi mostra una banda positiva intorno ai 220 nm probabilmente dovuta al residuo Tyr. Dagli spettri CD del peptide (352-360)HVP Sc risulta che la conformazione assunta da questo peptide in soluzione è strettamente influenzata dalla natura del solvente utilizzato (Figg. 180, 182): in tampone fosfato a pH 7.4 e in soluzione micellare, anche se in misura inferiore, si nota la presenza di una banda centrata intorno ai 190 nm che potrebbe indicare la presenza di conformeri  $\beta$ -turn di tipo II. A differenza di quello che accade per gli altri peptidi di adesione analizzati, variando il pH della soluzione la banda a 190 nm si sposta facendo presumere la variazione delle popolazioni di conformeri presenti (Fig. 181). La banda negativa che si vede nello spettro CD misurato in H<sub>2</sub>O MilliQ è chiaramente dovuta a due diversi contributi, il primo centrato intorno ai 190 nm e il secondo centrato intorno ai 195 nm, probabilmente dovuto alla presenza di strutture aperiodiche. Lo spettro misurato in TFE, infine, mostra un andamento estremamente irregolare di difficile interpretazione.



**Fig. 180:** Spettri CD di (352-360)HVP Sc in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (? ), TFE (? ), tampone fosfato pH 7.4 (? ), soluzione micellare di SDS (? ).

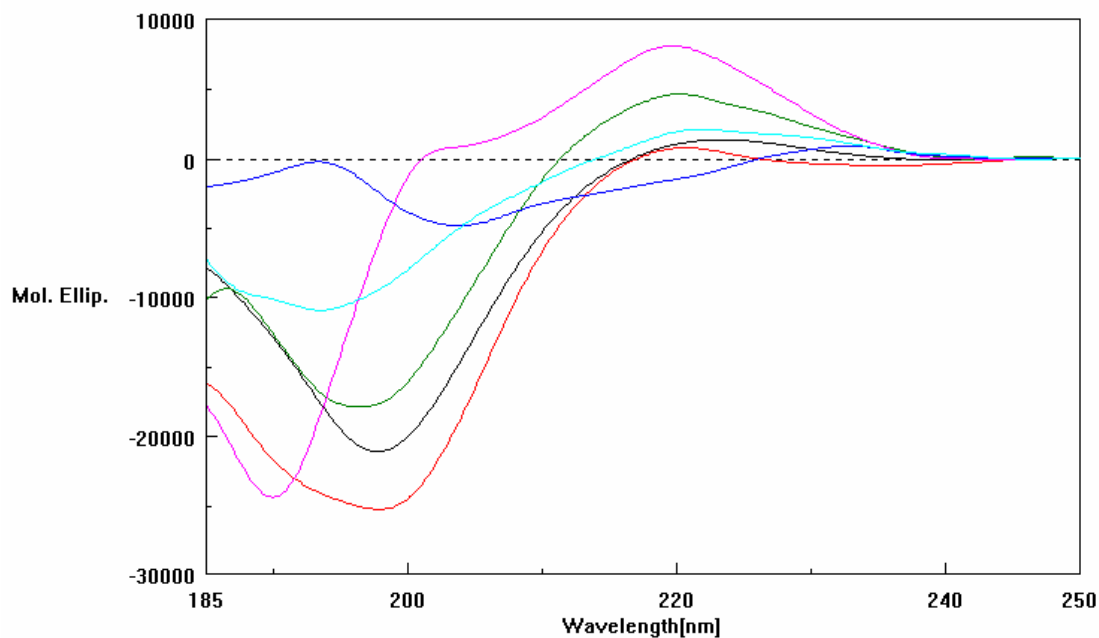


**Fig. 181:** Spettri CD di (352-360)HVP Sc in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).

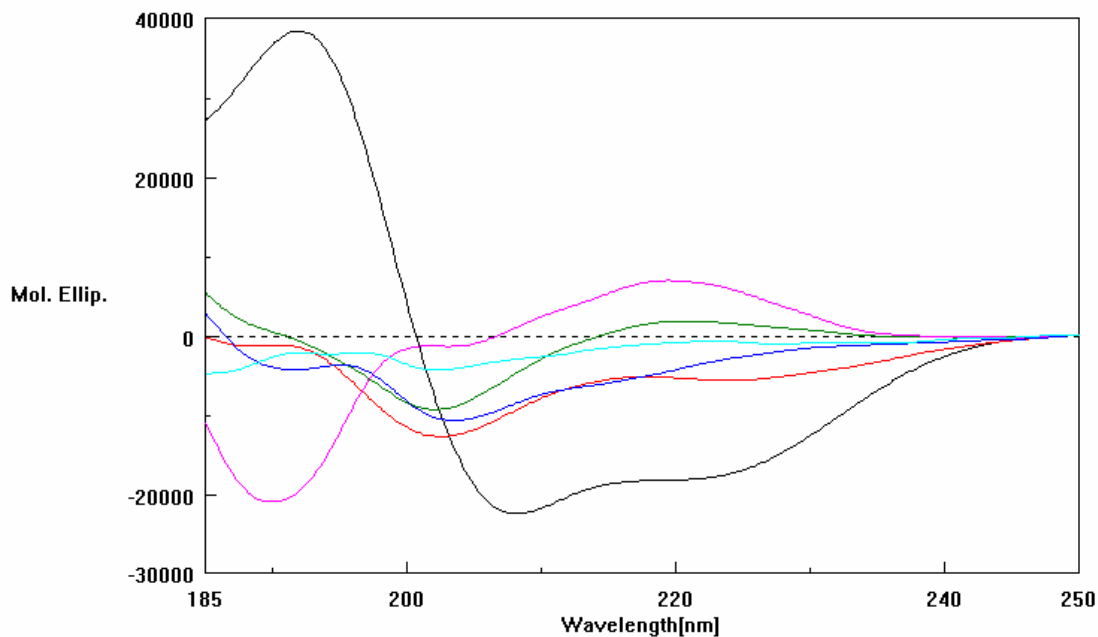


**Fig. 182:** Spettri CD di (352-360)HVP Sc in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).

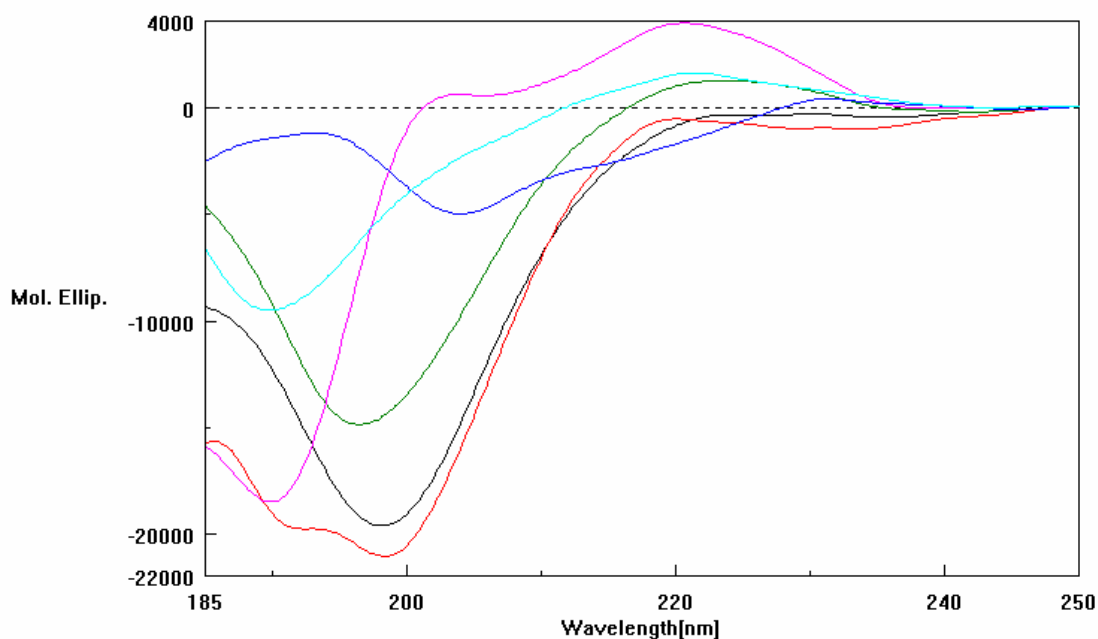
Nelle Figg. 183-186 sono riportati gli spettri CD in diversi solventi delle varie sequenze della vitronettina sintetizzate.



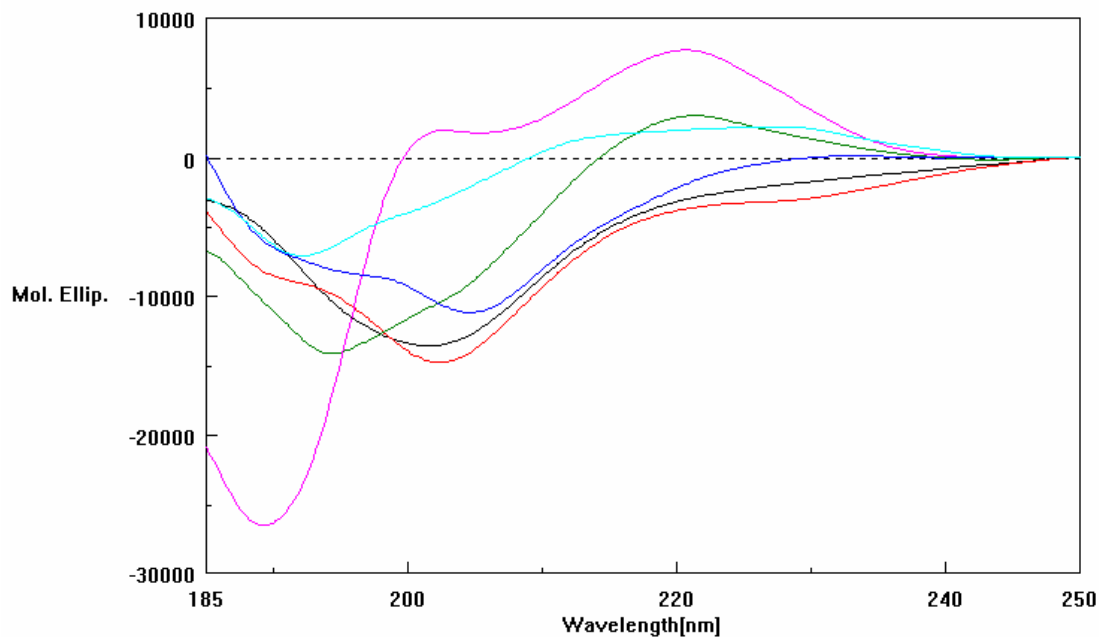
**Fig. 183:** Spettri CD in H<sub>2</sub>O dei seguenti peptidi: (340-365)HVP (? ), (340-352)HVP (? ), (352-365)HVP (? ), (352-360)HVP (? ), (352-360)HVP ciclico (? ), (352-360)HVP Sc (? ).



**Fig. 184:** Spettri CD in TFE dei seguenti peptidi: (340-365)HVP (? ), (340-352)HVP (? ), (352-365)HVP (? ), (352-360)HVP (? ), (352-360)HVP ciclico (? ), (352-360)HVP Sc (? ).



**Fig. 185:** Spettri CD in tampone fosfato a pH 7.4 dei seguenti peptidi: (340-365)HVP (? ), (340-352)HVP (? ), (352-365)HVP (? ), (352-360)HVP (? ), (352-360)HVP ciclico (? ), (352-360)HVP Sc (? ).



**Fig. 186:** Spettri CD in soluzione micellare di SDS dei seguenti peptidi: (340-365)HVP (?), (340-352)HVP (?), (352-365)HVP (?), (352-360)HVP (?), (352-360)HVP ciclico (?), (352-360)HVP Sc (?).

### *Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)*

Per l'analisi spettrofotometrica IR si sono utilizzati 1-2 mg di peptide preventivamente liofilizzato per due volte da una soluzione 0.06 N di HCl e per due volte da H<sub>2</sub>O MilliQ, ciò allo scopo di variare la salificazione da trifluoroacetato a cloruro.

Le soluzioni, preparate al momento della misura per rendere minimi gli scambi tra D<sub>2</sub>O e l'umidità atmosferica, sono state ottenute sciogliendo il liofilizzato con 10 µL di D<sub>2</sub>O, a cui sono stati aggiunti 90 µL di TFE. Le concentrazioni dei peptidi, determinate per pesata, sono risultate comprese tra  $3.0 \times 10^{-3}$  e  $1.8 \times 10^{-2}$  M.

Gli spettri IR sono stati acquisiti con spettrofotometro Jasco in trasformata di Fourier modello 300E; l'acquisizione e l'elaborazione dati è stata ottenuta tramite un programma specifico fornito dalla ditta Jasco.

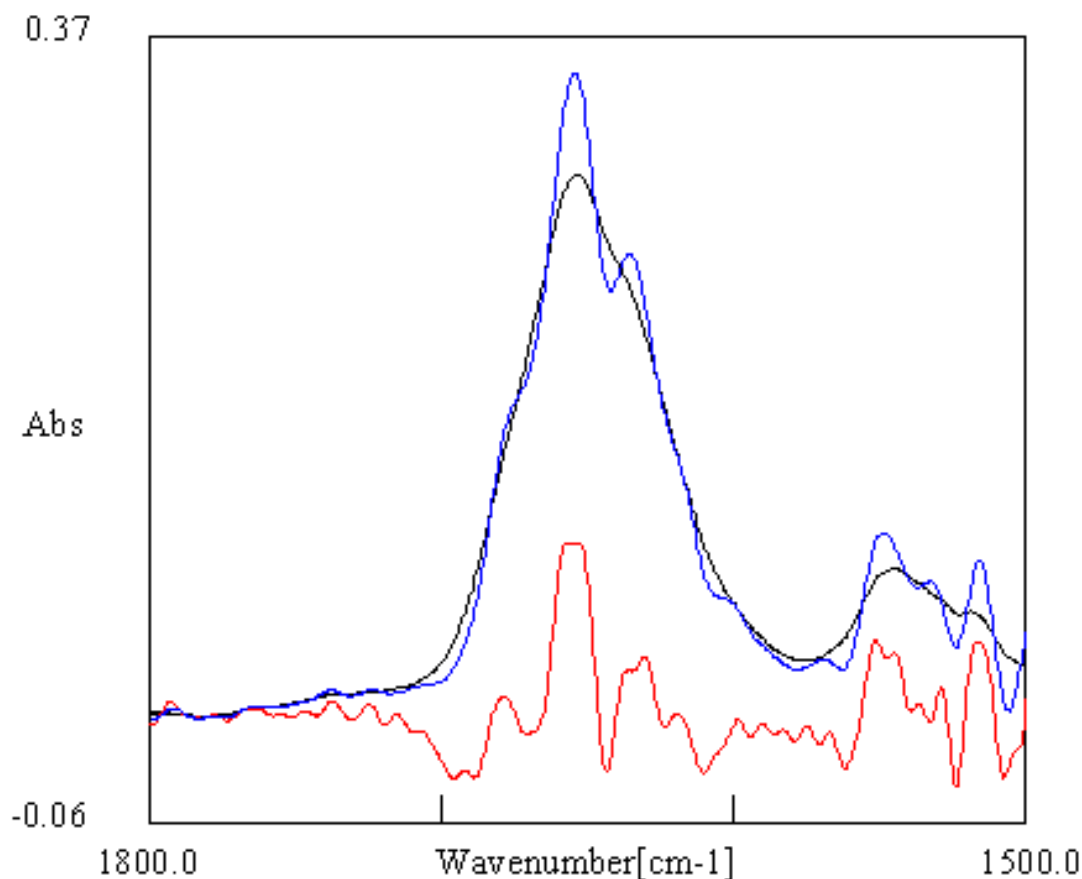
È stata utilizzata una cella con pareti ottiche di CaF<sub>2</sub> avente cammino ottico 0.1 mm fornita dalla ditta Hellma. Sono stati adottati i seguenti parametri per eseguire le misure: *scan speed*, 2 mm/sec; *resolution*, 2 cm<sup>-1</sup>; *accumulation*, 100. Gli spettri sono stati registrati a temperatura ambiente e in atmosfera di azoto per limitare le interferenze dovute all'assorbimento dell'aria nella zona di interesse.

I risultati relativi ai vari peptidi analizzati sono riportati di seguito.

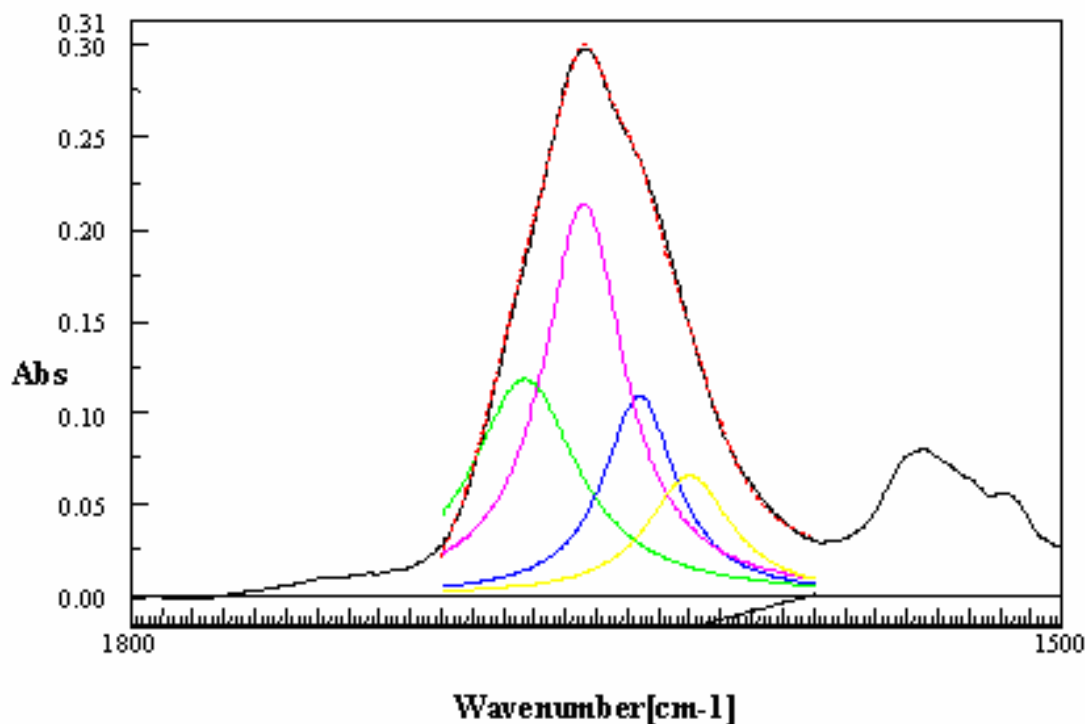


### (340-365)HVP

Nella Fig. 187 è riportato lo spettro FT-IR del peptide (340-365) HVP in soluzione 90 % TFE/D<sub>2</sub>O, la linea rossa sottostante lo spettro si riferisce all'opposto della derivata seconda operata sullo spettro stesso, mentre la linea azzurra riporta lo spettro dopo l'operazione di 'self deconvolution', processo matematico che permette di aumentare la risoluzione dei picchi restringendo l'ampiezza delle bande spettrali. Le bande componenti, evidenziate dalle tracce in colore (Fig. 188), sono state ricavate tramite il programma 'Curve Fitting Jasco FT'. Il contributo maggiore tra le bande componenti è dovuto alla banda situata a ~ 1654 cm<sup>-1</sup> attribuibile a struttura  $\alpha$ -elicoidale. La componente a numero d'onda maggiore, 1673 cm<sup>-1</sup>, potrebbe essere dovuta a strutture di tipo *turn* mentre le due componenti a numeri d'onda inferiori, 1620 cm<sup>-1</sup> e 1636 cm<sup>-1</sup> sono probabilmente dovute a strutture  $\beta$ -sheet/extended chain.



**Fig. 187:** Spettro FT-IR del peptide (340-365)HVP: spettro IR originale (?), opposto della derivata seconda (?), self-deconvolution (?).

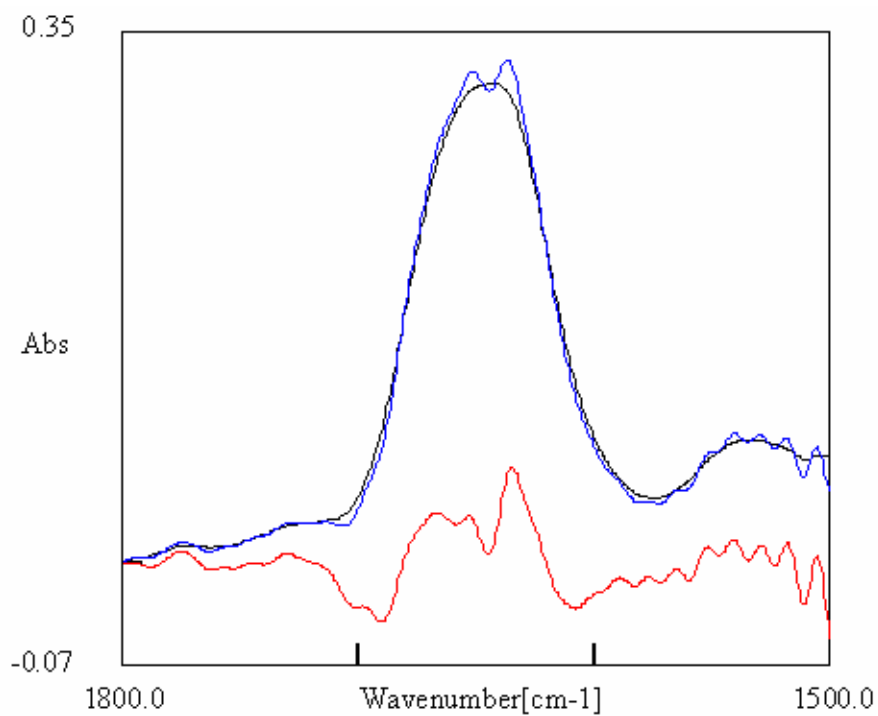


No.	Center	Width	Height	Area	Ratio(Area)[ %]	Function
1	1620.00	32.88	0.0652	3.365	12.72	Lorentz <span style="color: yellow;">—</span>
2	1636.00	28.42	0.1083	4.833	18.26	Lorentz <span style="color: blue;">—</span>
3	1654.00	31.60	0.2137	10.610	40.09	Lorentz <span style="color: magenta;">—</span>
4	1673.00	41.51	0.1174	7.656	28.93	Lorentz <span style="color: green;">—</span>

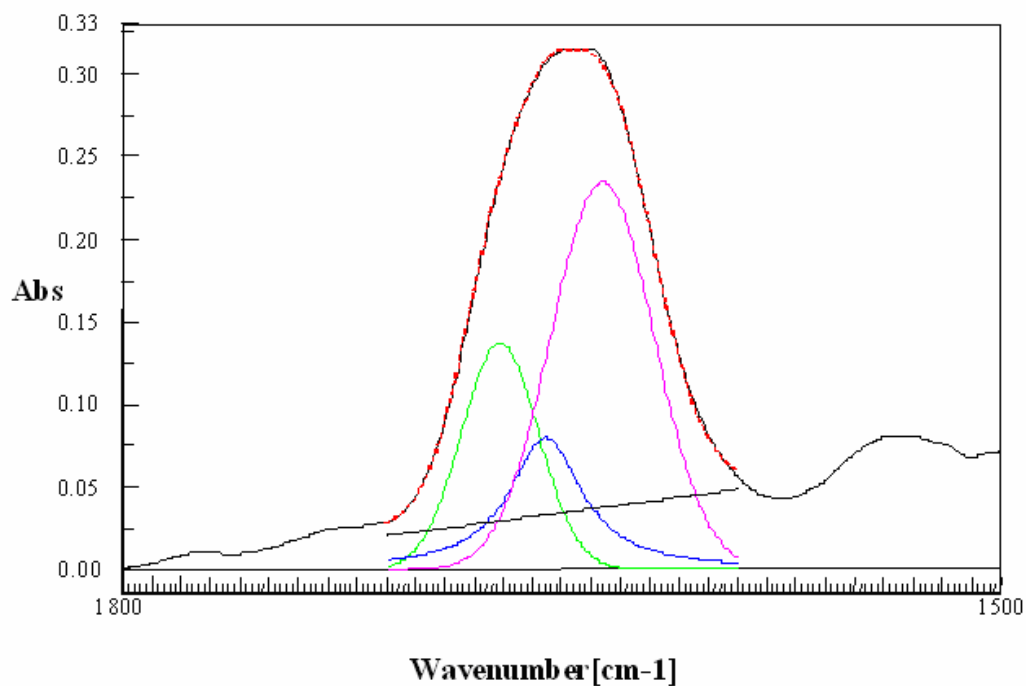
**Fig. 188:** Deconvoluzione dello spettro FT-IR del peptide (340-365)HVP utilizzando il programma 'Curve Fitting Jasco FT'. La linea nera corrisponde allo spettro IR originale mentre la linea rossa tratteggiata corrisponde alla curva somma delle bande componenti.

### (340-352)HVP

Come nel caso precedente lo spettro FT-IR in TFE/D<sub>2</sub>O (90 % v/v) del peptide (340-352)HVP (Fig. 189) è correlato all'opposto della sua derivata seconda (linea rossa) e alla risultante dell'operazione di 'self deconvolution' eseguita sullo spettro originario (linea blu). I tracciati in colore in Fig. 190 permettono di individuare le curve componenti la cui sommatoria determina lo spettro IR sperimentale. In particolare risultano di una certa rilevanza la banda a 1636 cm<sup>-1</sup>, probabilmente dovuta a  $\beta$ -sheet/extended chain, la banda a 1655 cm<sup>-1</sup>, imputabile a strutture  $\alpha$ -elicoidali e la componente a 1671 cm<sup>-1</sup>, attribuibile a turn.



**Fig. 189:** Spettro FT-IR del peptide (340-352)HVP: spettro IR originale (?), opposto della derivata seconda (?), *self-deconvolution* (?).

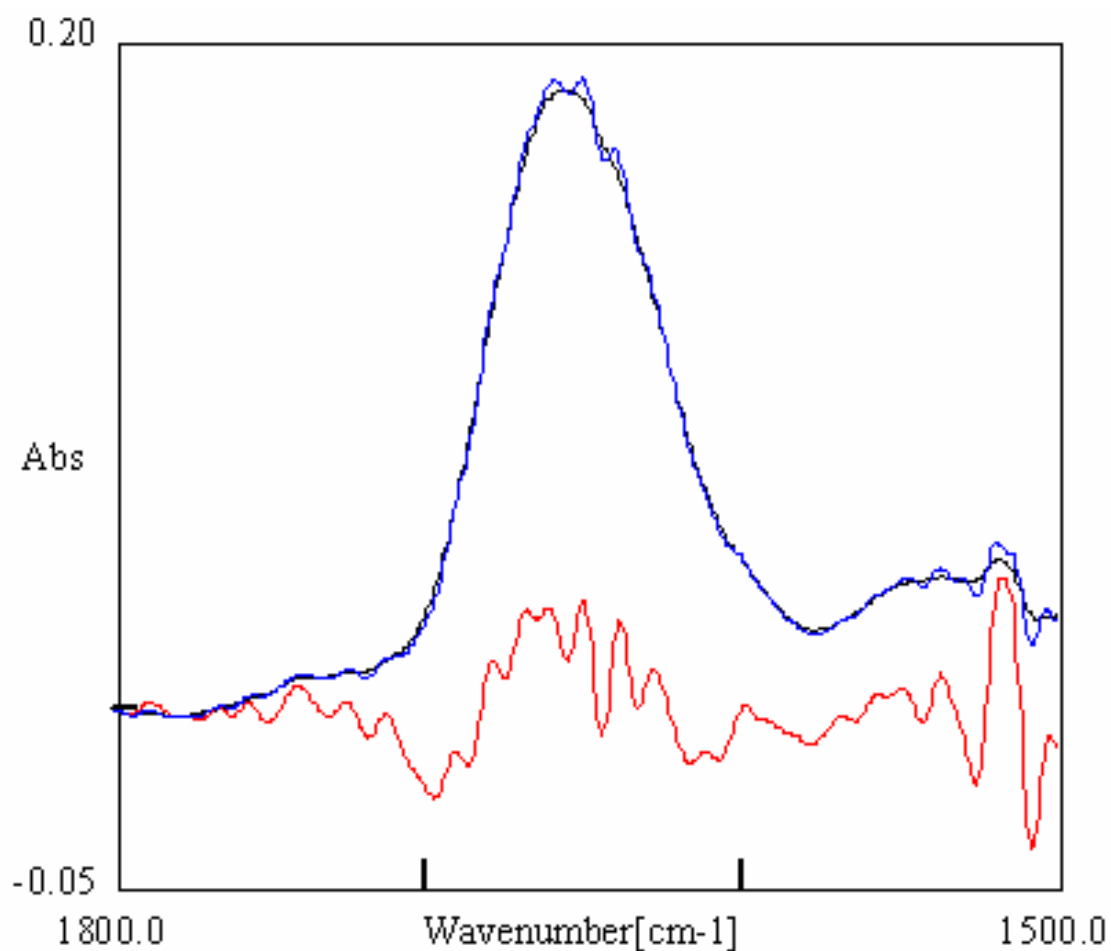


No.	Center	Width	Height	Area	Ratio(Area)[%]	Function
1	1636.00	41.41	0.2377	10.477	55.98	Gauss
2	1655.38	30.00	0.0784	3.695	19.74	Lorentz
3	1671.00	30.93	0.1380	4.544	24.28	Gauss

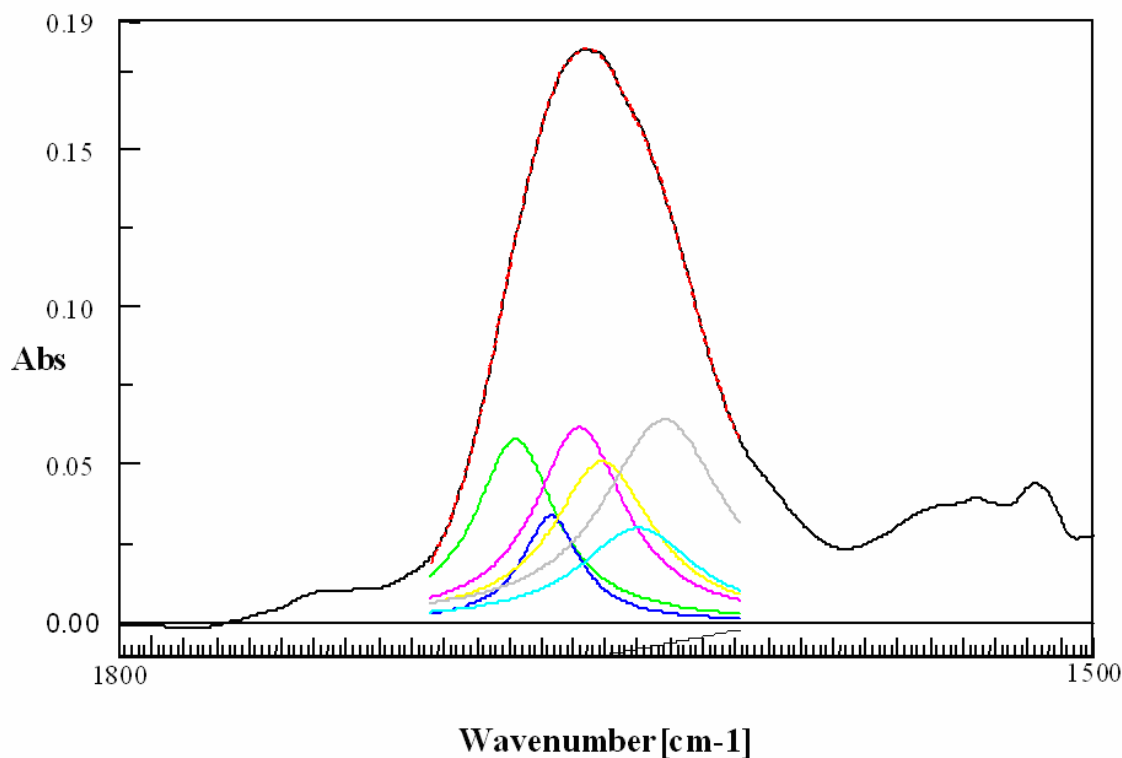
**Fig. 190:** Deconvoluzione dello spettro FT-IR del peptide (340-352)HVP utilizzando il programma 'Curve Fitting Jasco FT'. La linea nera corrisponde allo spettro IR originale mentre la linea rossa tratteggiata corrisponde alla curva somma delle bande componenti.

**(352-365)HVP**

La Fig. 191 mostra lo spettro FT-IR del peptide (352-365)HVP registrato in soluzione 90 % (v/v) TFE/D<sub>2</sub>O oltre all'opposto della derivata seconda eseguita sullo spettro (linea rossa) e alla risultante dello spettro dopo applicazione dell'operazione di 'self deconvolution' (linea blu). In entrambi i casi viene confermata una composizione complessa della banda IR dello spettro. Le bande principali tra quelle componenti (Fig. 192) possono essere così assegnate: 1632, 1640 e 1678 cm<sup>-1</sup>,  $\beta$ -sheet/extended chain; 1651 e 1658 cm<sup>-1</sup>, contributo di  $\alpha$ -elica e 1667 cm<sup>-1</sup>, turn.



**Fig. 191:** Spettro FT-IR del peptide (352-365)HVP: spettro IR originale (?), opposto della derivata seconda (?), self-deconvolution (?).

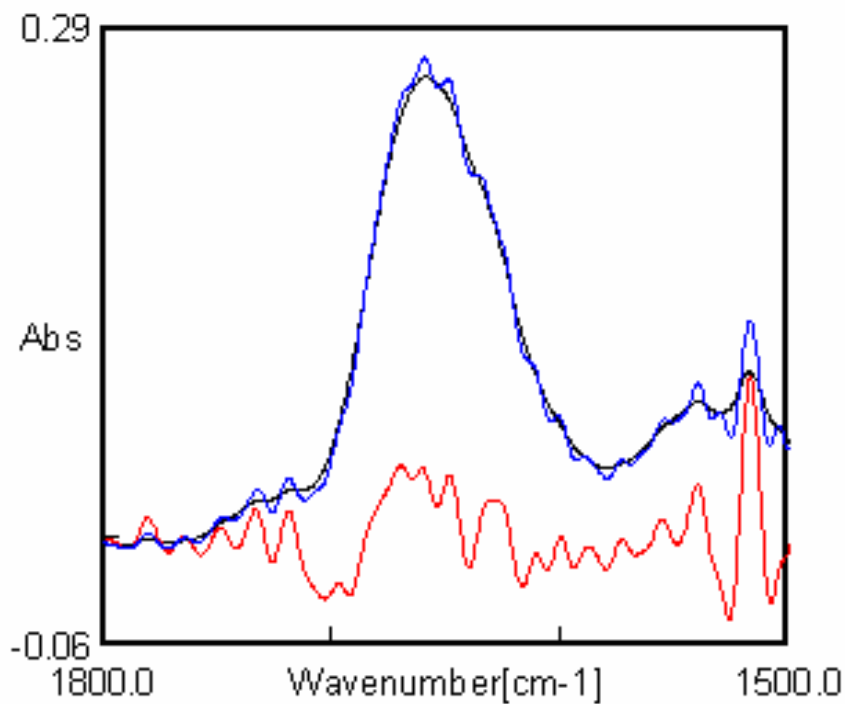


No.	Center	Width	Height	Area	Ratio(Area)[%]	Function
1	1632.00	45.63	0.0642	4.605	27.09	Lorentz <span style="color: grey;">—</span>
2	1640.00	43.95	0.0298	2.057	12.10	Lorentz <span style="color: cyan;">—</span>
3	1651.00	38.14	0.0509	3.047	17.92	Lorentz <span style="color: yellow;">—</span>
4	1658.00	34.51	0.0617	3.347	19.69	Lorentz <span style="color: magenta;">—</span>
5	1667.00	21.92	0.0338	1.163	6.84	Lorentz <span style="color: blue;">—</span>
6	1678.05	30.58	0.0579	2.781	16.36	Lorentz <span style="color: green;">—</span>

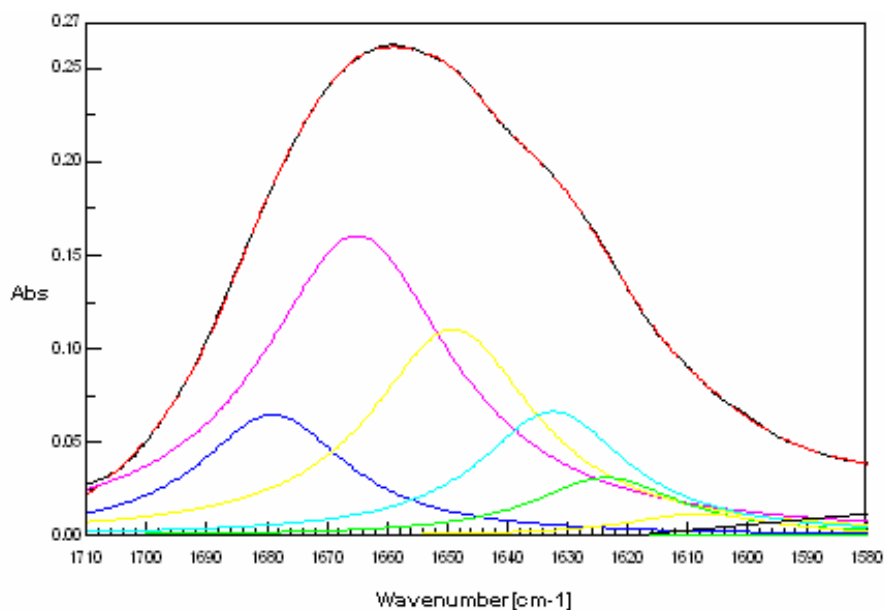
**Fig. 192:** Deconvoluzione dello spettro FT-IR del peptide (352-365)HVP utilizzando il programma 'Curve Fitting Jasco FT'. La linea nera corrisponde allo spettro IR originale mentre la linea rossa tratteggiata corrisponde alla curva somma delle bande componenti.

### (352-360)HVP

La Fig. 193 mostra lo spettro FT-IR del peptide (352-360)HVP registrato in soluzione 90 % (v/v) TFE/D<sub>2</sub>O oltre all'opposto della derivata seconda eseguita sullo spettro (linea rossa) e alla risultante dello spettro dopo applicazione dell'operazione di 'self deconvolution' (linea blu). La componente principale, centrata a 1665 cm<sup>-1</sup>, è probabilmente dovuta a conformazioni di tipo *turn* mentre il contributo intorno ai 1649 cm<sup>-1</sup> potrebbe derivare da conformazioni aperiodiche. Le altre componenti a 1623, 1632 e 1679 cm<sup>-1</sup> sono indicative di conformazioni di tipo  $\beta$ -*sheet/extended chain* (Fig. 194).



**Fig. 193:** Spettro FT-IR del peptide (352-360)HVP: spettro IR originale (?), opposto della derivata seconda (?), *self-deconvolution* (?).

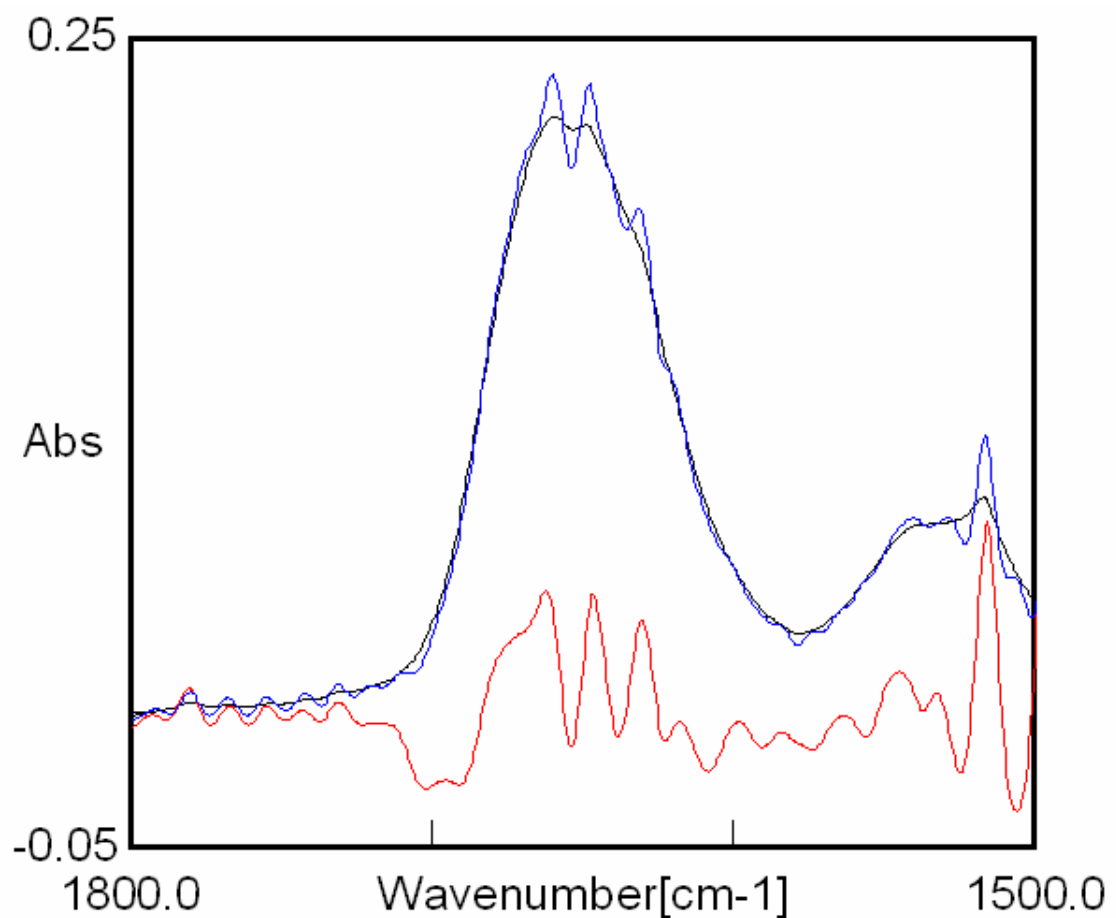


No.	Center	Width	Height	Area	Ratio(Area)[%]	Function
1	1623.50	30.00	0.0312	1.470	6.17	Lorentz
2	1632.38	30.00	0.0665	3.132	13.16	Lorentz
3	1649.00	33.33	0.1104	5.782	24.29	Lorentz
4	1665.00	38.75	0.1604	9.763	41.01	Lorentz
5	1679.05	30.00	0.0648	3.055	12.84	Lorentz

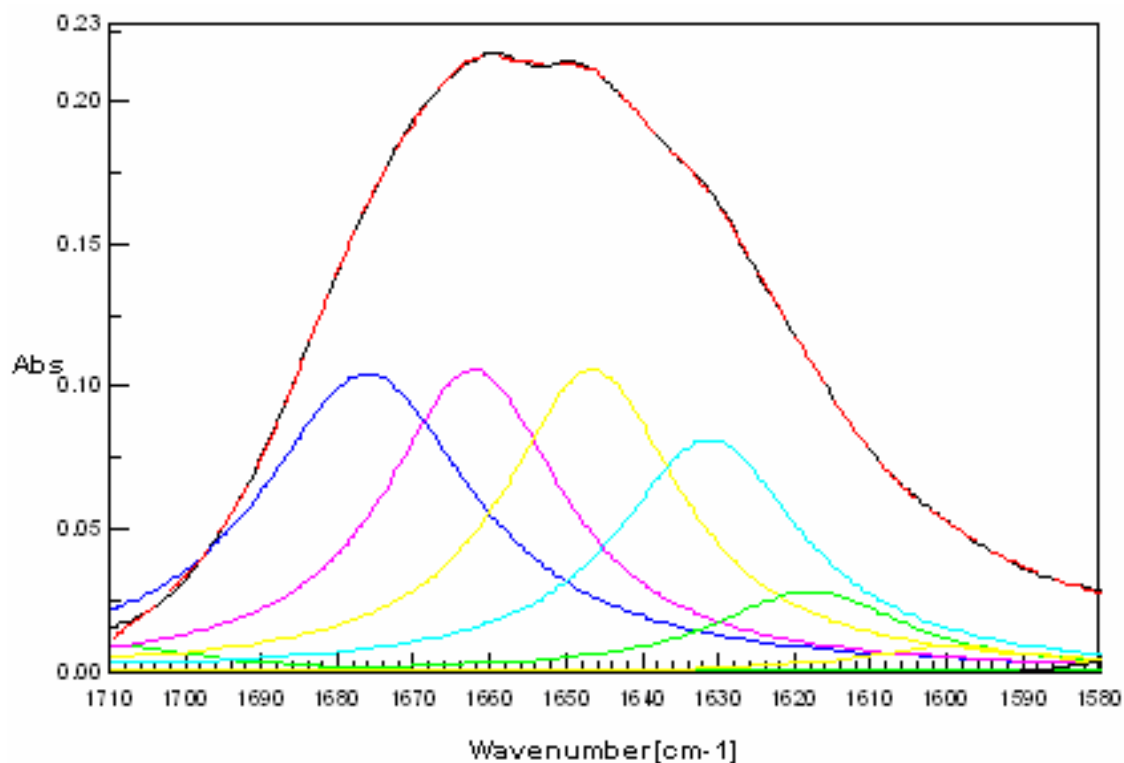
**Fig. 194:** Deconvoluzione dello spettro FT-IR del peptide (352-360)HVP utilizzando il programma 'Curve Fitting Jasco FT'. La linea nera corrisponde allo spettro IR originale mentre la linea rossa tratteggiata corrisponde alla curva somma delle bande componenti.

**(352-360)HVP ciclico**

La Fig. 195 mostra lo spettro FT-IR del peptide (352-360) HVP ciclico registrato in soluzione 90 % (v/v) TFE/D<sub>2</sub>O oltre all'opposto della derivata seconda eseguita sullo spettro (linea rossa) e alla risultante dello spettro dopo applicazione dell'operazione di 'self deconvolution' (linea blu). Lo spettro risulta principalmente dalla combinazione delle seguenti quattro bande con intensità simile: due bande attribuibili alla struttura  $\beta$ -sheet/extended chain centrate a 1631 e 1676 cm<sup>-1</sup>; una banda attribuibile alla struttura disordinata a 1647 cm<sup>-1</sup> e una banda imputabile alla conformazione di tipo *turn* a circa 1662 cm<sup>-1</sup> (Fig. 196).



**Fig. 195:** Spettro FT-IR del peptide (352-360)HVP ciclico: spettro IR originale (? ), opposto della derivata seconda (? ), self-deconvolution (? ).



No.	Center	Width	Height	Area	Ratio(Area)[%]	Function
1	1618.00	30.00	0.0286	1.349	6.35	Lorentz
2	1631.23	30.00	0.0817	3.850	18.13	Lorentz
3	1646.60	28.54	0.1059	4.750	22.37	Lorentz
4	1662.15	28.69	0.1059	4.771	22.47	Lorentz
5	1676.11	34.50	0.1047	5.675	26.73	Lorentz

**Fig. 196:** Deconvoluzione dello spettro FT-IR del peptide (352-360)HVP ciclico utilizzando il programma 'Curve Fitting Jasco FT'. La linea nera corrisponde allo spettro IR originale mentre la linea rossa tratteggiata corrisponde alla curva somma delle bande componenti.

### ***Risonanza magnetica nucleare in due dimensioni (NMR-2D)***

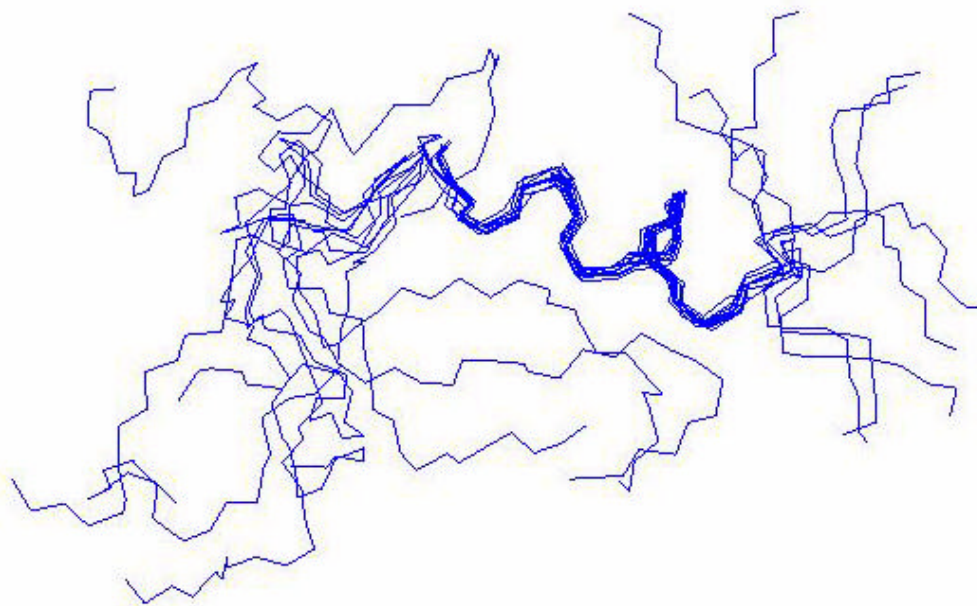
Una volta sintetizzati, tutti i frammenti della vitronettina sono stati caratterizzati attraverso tecniche spettroscopiche CD e FT-IR. Con l'obiettivo di definirne eventuali propensioni di struttura secondaria e costruirne plausibili modelli molecolari, i frammenti sono stati inoltre sottoposti ad analisi conformazionale attraverso tecniche NMR e procedure computazionali. Le analisi NMR sono state realizzate con uno strumento Varian Inova 500 MHz dal gruppo diretto dal Prof. Livio Paolillo, presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II. Per le misure NMR si sono utilizzate soluzioni di peptide di concentrazione pari a  $\sim 10^{-3}$  M 90% TFE/H<sub>2</sub>O. Nella fase computazionale si è ricorsi a DYANA, un programma di *torsion angle dynamic* che consente il calcolo di modelli molecolari sulla base dei dati sperimentali NMR. Per ciascun peptide sono stati calcolati 100 conformeri e



le 30 strutture migliori, in termini di accordo con l'insieme delle distanze interprotoniche individuate sperimentalmente via NMR (da dati NOE), sono state soggette a minimizzazioni di energia (*restrained energy minimization*) tramite il programma di meccanica molecolare AMBER 6.0. Le 10 strutture più stabili dopo il raffinamento AMBER sono state selezionate per rappresentare la conformazione del peptide analizzato. Questa procedura è stata seguita per tutti i frammenti della vitronettina ad eccezione del peptide (352-360)HVP ciclico, per il quale sono state eseguite delle simulazioni di dinamica molecolare (*restrained molecular dynamic simulations*) sotto vuoto a 300°K, per 210 ps, usando un pacchetto *software* DISCOVER/INSIGHT.

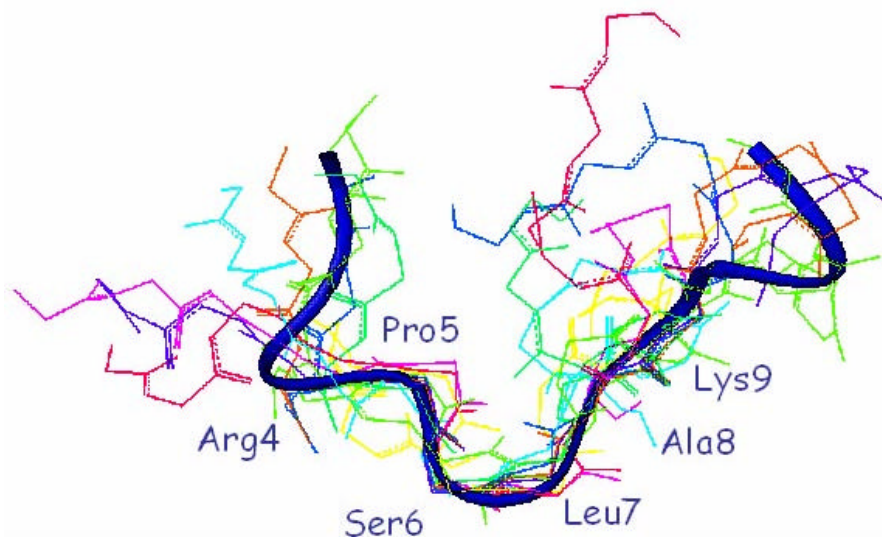
Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i dati raccolti durante gli ultimi 50 ps di simulazione.

Nelle Figg. 197-201 sono riportate le 10 strutture selezionate dopo i calcoli DYANA/AMBER per ogni frammento della vitronettina sintetizzato durante il dottorato; quando presente, il nastro blu scuro mostra la struttura media tra le dieci strutture selezionate.



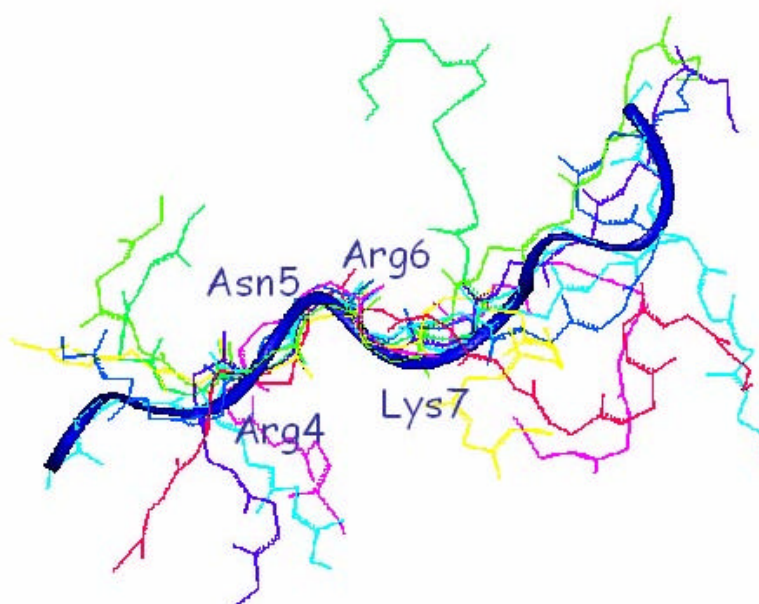
**Fig. 197:** (340-365)HVP. Sovrapposizione della catena principale del segmento che va dal 5° (Pro<sup>344</sup>) al 16° (Arg<sup>355</sup>) residuo della sequenza delle 10 migliori strutture selezionate dopo i calcoli DYANA/AMBER.

Il modello molecolare della sequenza (340-365)HVP mostra che il peptide è flessibile alle estremità N e C-terminale mentre presenta una discreta propensione per la struttura  $\alpha$ -elicoidale nella regione compresa tra Pro<sup>344</sup> e Arg<sup>355</sup>, tratto che comprende la maggior parte dei residui ritenuti importanti per l'interazione con gli osteoblasti.



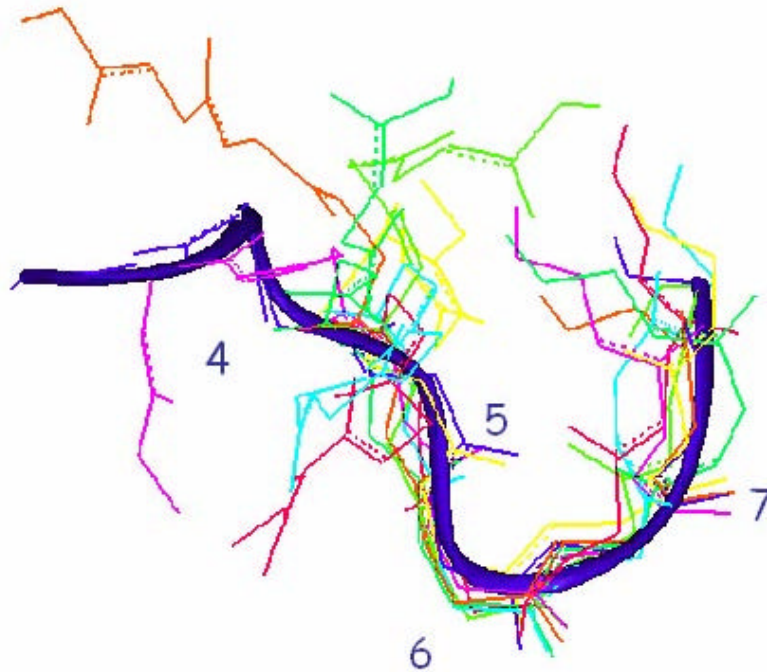
**Fig. 198:** (340-352)HVP. Sovrapposizione della catena principale del segmento che va dal 4° (Arg<sup>343</sup>) al 9° (Lys<sup>348</sup>) residuo della sequenza delle 10 migliori strutture selezionate dopo i calcoli DYANA/AMBER.

Il modello del peptide (340-352)HVP modello mostra un *bending* che coinvolge Ser<sup>345</sup> e Leu<sup>346</sup>. Il motivo *consensus* per l'adesione degli osteoblasti via eparansolfato (KKQR), all'estremità C-terminale del peptide, si trova in conformazione  $\beta$ -turn in 4 delle 10 strutture più rappresentative.



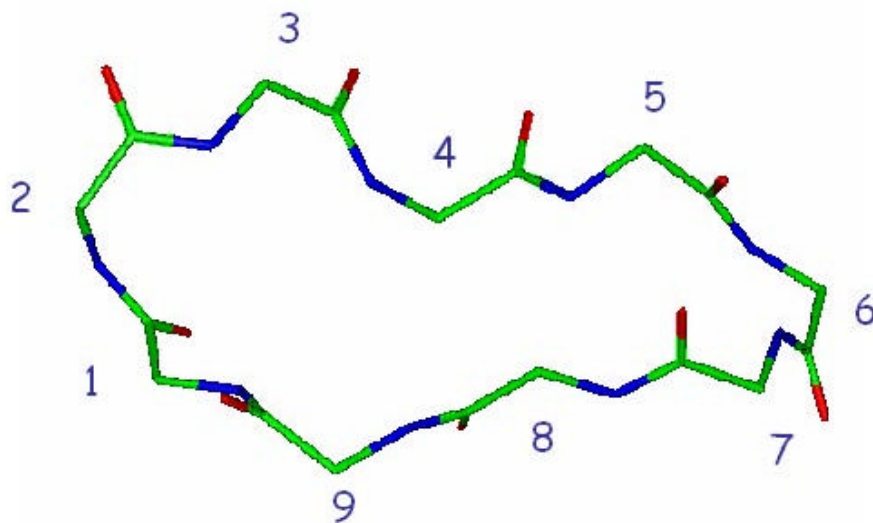
**Fig. 199:** (352-365)HVP. Sovrapposizione della catena principale del segmento che va dal 4° (Arg<sup>355</sup>) all'8° (Gly<sup>359</sup>) residuo della sequenza delle 10 migliori strutture selezionate dopo i calcoli DYANA/AMBER.

Il peptide (352-365)HVP modello mostra una conformazione estesa con un  $\gamma$ -turn che include Arg<sup>357</sup> (indicato come Arg6 in Fig. 199) in tutte le strutture selezionate.



**Fig. 200:** (352-360)HVP. Sovrapposizione della catena principale del segmento che va dal 4° (Arg<sup>355</sup>) all'8° (Gly<sup>359</sup>) residuo della sequenza delle 10 migliori strutture selezionate dopo i calcoli DYANA/AMBER.

Il peptide (352-360)HVP modello mostra una conformazione estesa nella regione N-terminale e un  $\beta$ -turn di tipo I attorno al 6° residuo (Arg<sup>357</sup>) in 4 delle 10 strutture selezionate.



**Fig. 201:** (352-360)HVP ciclico. Risultato delle simulazioni di dinamica molecolare (*restrained molecular dynamic simulations*) utilizzando il pacchetto DISCOVER/INSIGHT.

Il modello molecolare medio per il peptide (352-360)HVP ciclico nel complesso mostra una forma rettangolare, con il 1° e il 2° residuo della sequenza (Phe<sup>352</sup>-Arg<sup>353</sup>) e il 6° e 7° residuo (Arg<sup>357</sup>-Lys<sup>358</sup>) nelle posizioni di vertice. Dagli studi NMR si possono dedurre due  $\gamma$ -turn, uno di tipo equatoriale, prossimo al residuo Arg<sup>353</sup> e uno di tipo assiale, coinvolgente il residuo Arg<sup>357</sup>. I segmenti che vanno dal 3° al 5° residuo e dal 7° al 9° residuo appaiono in conformazione estesa.

## STUDI CONFORMAZIONALI DEI FRAMMENTI DELLA BMP-2

### *Dicroismo circolare (CD)*

Le misure di dicroismo circolare sono state ottenute con uno spettropolarimetro Jasco modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla medesima ditta.

Le misure CD sono state condotte a temperatura ambiente adottando i seguenti parametri: *range*, 185-255 nm; *step resolution*, 0.2 nm; *scan speed*, 5 nm/min; *accumulation*, 2; *response*, 2 sec; *band width*, 2.0 nm; *sensitivity*, 10 o 20 mdeg. È stata utilizzata una cella cilindrica in quarzo fuso con cammino ottico di 0.1cm.

Le misure CD sono state condotte negli stessi mezzi utilizzati per le misure sui peptidi di adesione, ovvero:

5. H<sub>2</sub>O MilliQ;
6. miscele TFE/H<sub>2</sub>O: 25 – 50 – 75 – 90 e 98% TFE in H<sub>2</sub>O;
7. tampone fosfato: soluzione 10 mM di sodio fosfato monobasico ai seguenti pH: 6.5 - 7.0 – 7.4 e 8.0;
8. soluzione 14 mM di SDS in tampone fosfato 10 mM, pH 7.0.

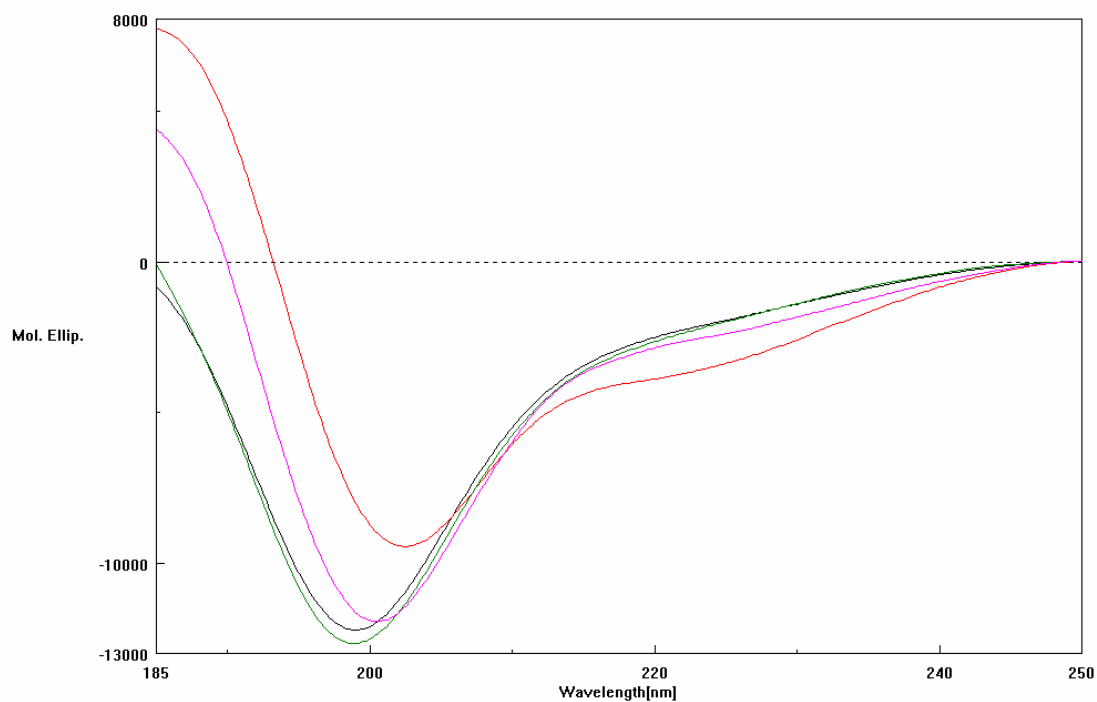
Le soluzioni sono state ottenute portando ad un volume di 500 µL, con opportuno solvente, 10 µL di una soluzione madre, preparata sciogliendo quantità pesate di peptide con H<sub>2</sub>O MilliQ in modo da ottenere una concentrazione pari a  $2.5 \times 10^{-3}$  M. Le concentrazioni esatte delle soluzioni di cui si è eseguita la misura CD, preparate in maniera tale da avere una concentrazione per pesata pari a  $5 \times 10^{-5}$  M, sono state determinate tramite analisi amminoacidica quantitativa seguendo la procedura riportata a pag. 61. Si sono ottenute le seguenti concentrazioni sperimentali:  $4.543 \times 10^{-5}$  M per il peptide (68-87)BMP-2,  $4.581 \times 10^{-5}$  M per il peptide (77-87)BMP-2 e  $2.402 \times 10^{-5}$  M per il peptide (58-87)BMP-2. La concentrazione dei cromofori, utilizzata per la normalizzazione degli spettri, è stata ottenuta moltiplicando la concentrazione esatta delle soluzioni CD ricavata sperimentalmente per il numero di legami peptidici.

Il contenuto di  $\alpha$ -elica è stato valutato utilizzando la formula messa a punto da Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167].

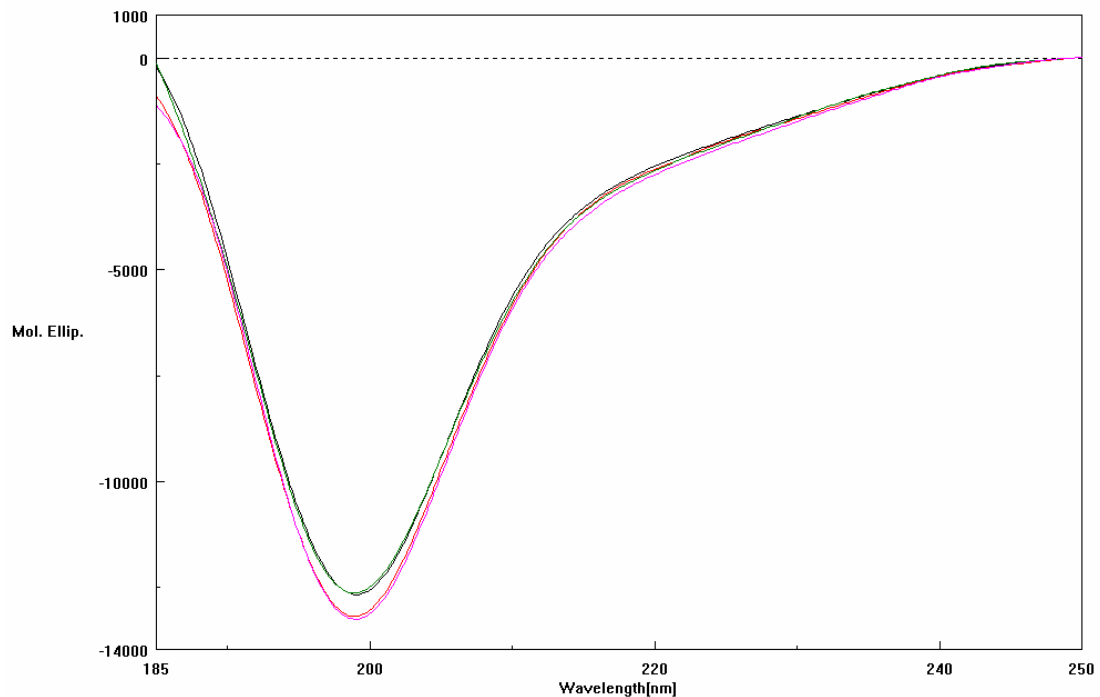
Sono riportati di seguito i risultati relativi a ciascun peptide.

## (68-87)BMP-2

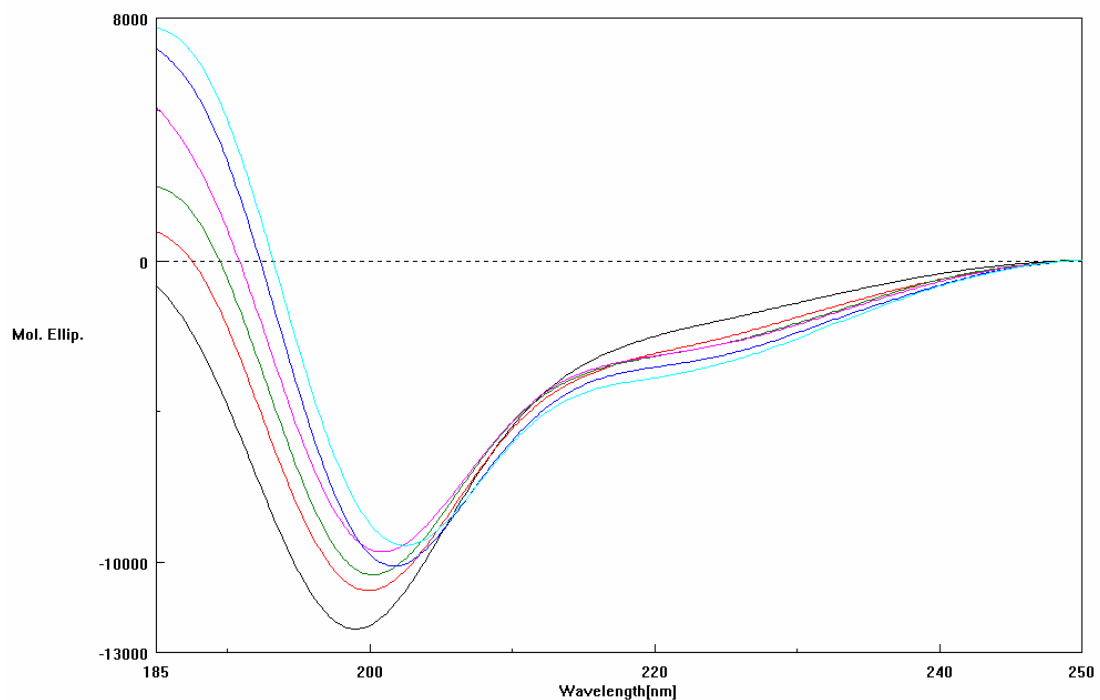
Gli spettri CD riportati nelle Figg. 202 e 203 mostrano come in soluzione acquosa il peptide sia estremamente flessibile: gli spettri presentano una banda negativa intorno ai 198 nm indicativa della struttura disordinata. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. In soluzione micellare e all'aumentare del contenuto di TFE il peptide mostra una certa tendenza a strutturarsi (Figg. 202, 204): in base allo spostamento della banda negativa verso lunghezze d'onda maggiori, al diminuire della sua intensità, alla comparsa di una banda positiva intorno a 185 nm e un'altra negativa intorno ai 220 nm ad elevate percentuali di TFE, si può ipotizzare un aumento di conformeri ordinati in questi solventi. Il contenuto di  $\alpha$ -elica, valutato in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], si mantiene basso e quasi costante passando dall' $H_2O$  (9.73%) al TFE (11.12%).



**Fig. 202:** Spettri CD di (68-87)BMP-2 in diversi solventi:  $H_2O$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



**Fig. 203:** Spettri CD di (68-87)BMP-2 in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0(?).

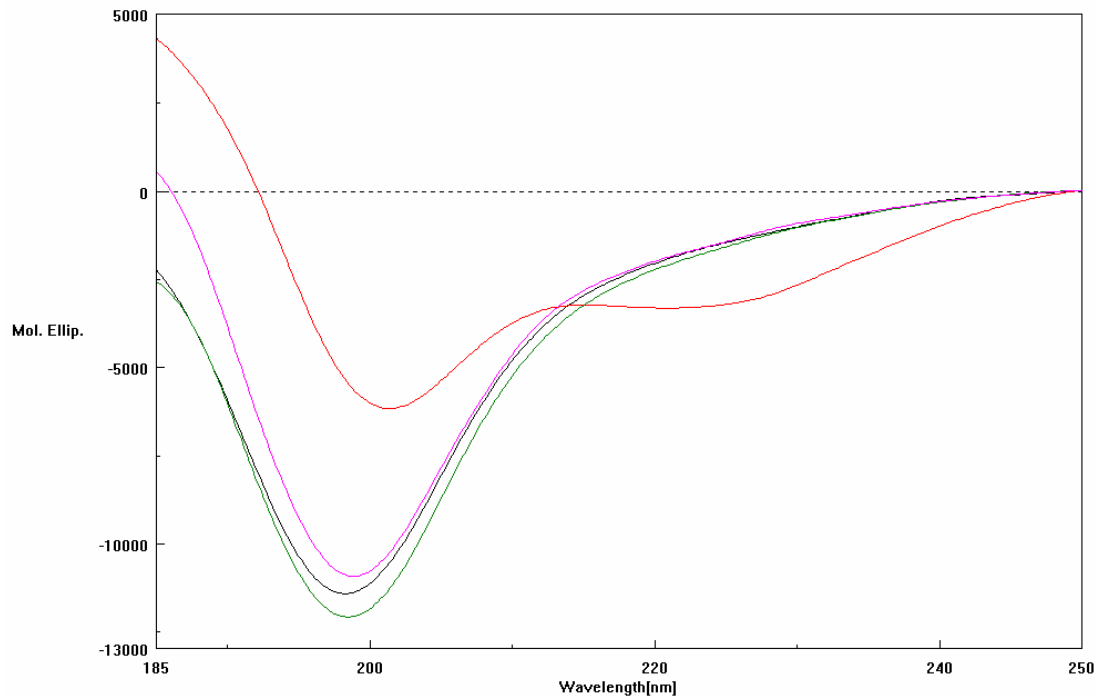


**Fig. 204:** Spettri CD di (68-87)BMP-2 in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE(?).

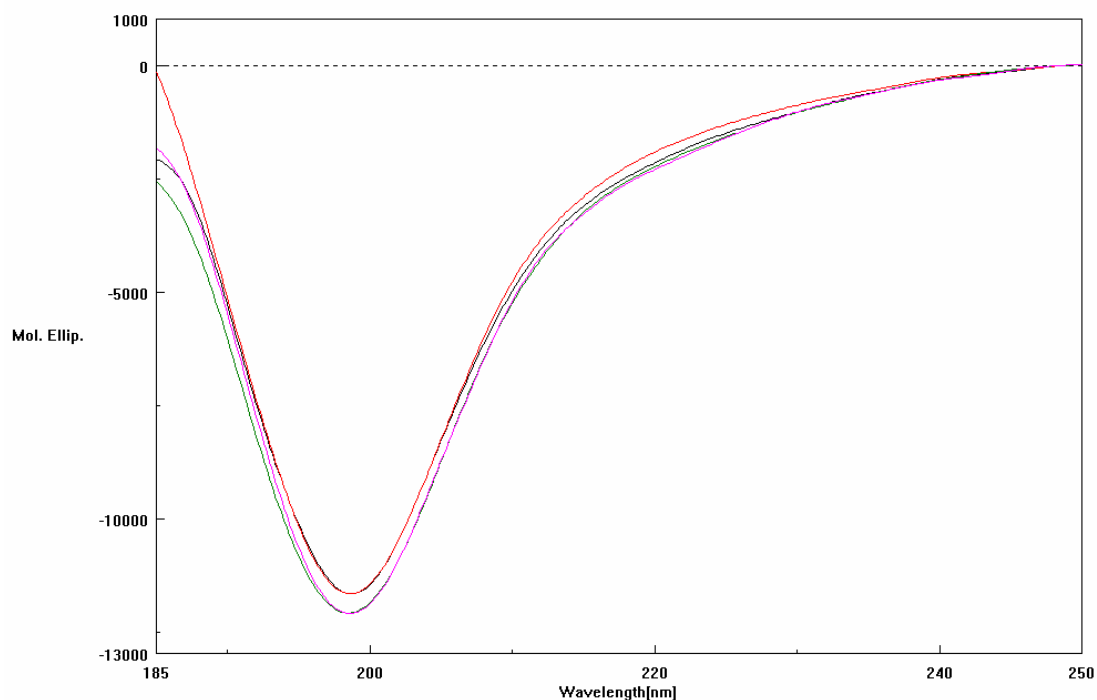
### (77-87)BMP-2

Gli spettri CD del peptide (77-87)BMP-2 in H<sub>2</sub>O MilliQ, in soluzione tampone e in soluzione micellare sono tutti caratterizzati da una banda negativa intorno ai 198 nm attribuibile ad una conformazione *random* (Fig. 205). Variazioni di pH non sembrano

influenzare l'andamento spettrale (Fig. 206). All'aumentare del contenuto di TFE, invece, il peptide mostra una certa tendenza a strutturarsi come il frammento (68-87)BMP-2 (Fig. 207). Il contenuto di  $\alpha$ -elica per questo peptide, valutato in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è risultato essere estremamente basso, inferiore al 7%.

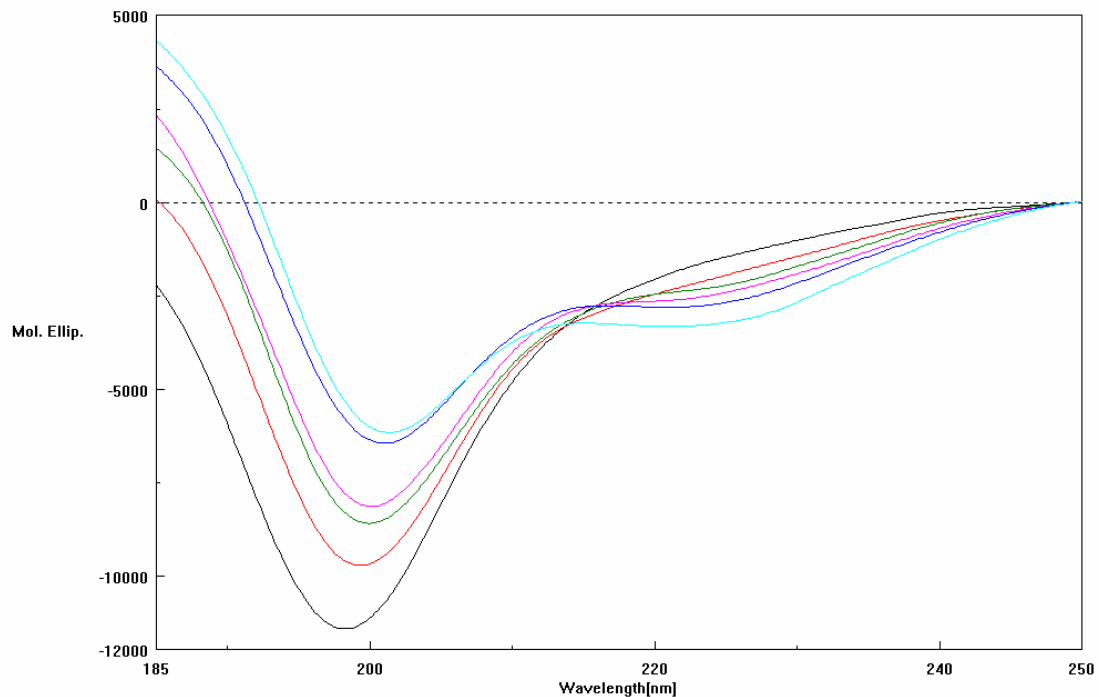


**Fig. 205:** Spettri CD di (77-87)BMP-2 in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



**Fig. 206:** Spettri CD di (77-87)BMP-2 in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0(?).

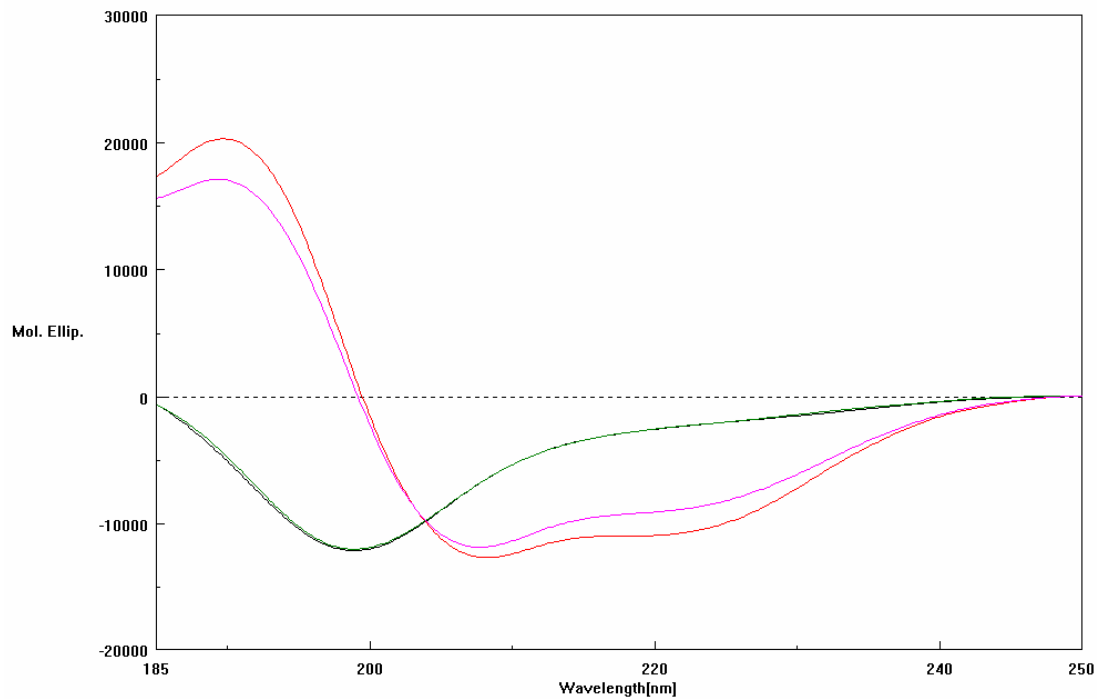




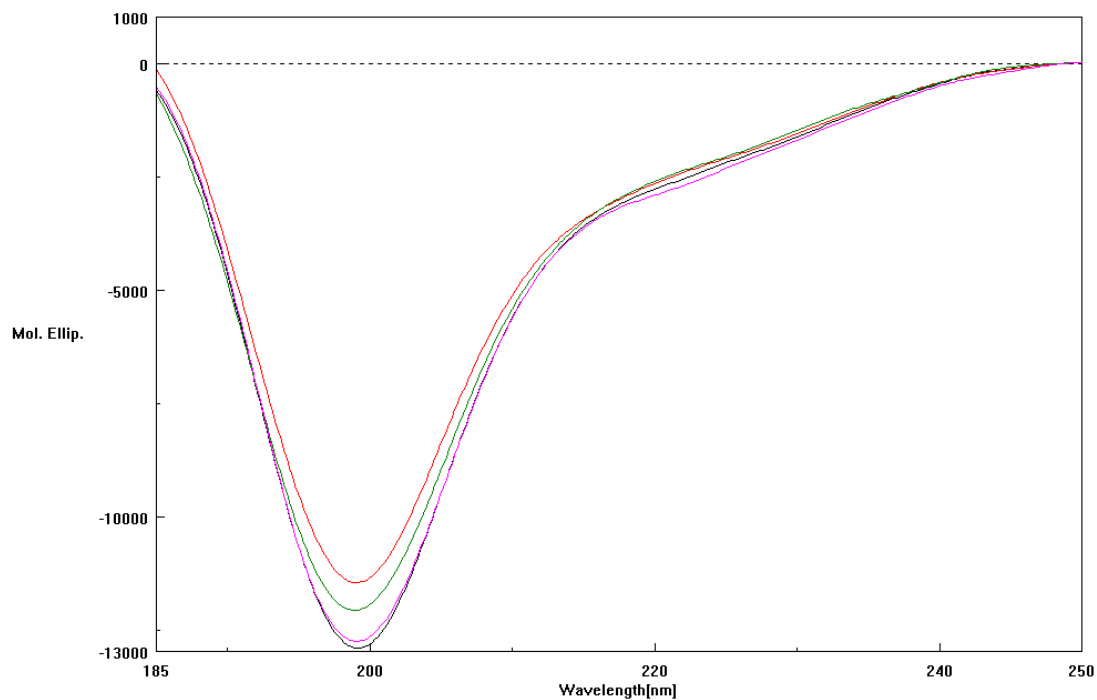
**Fig. 207:** Spettri CD di (77-87)BMP-2 in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).

### (58-87)BMP-2

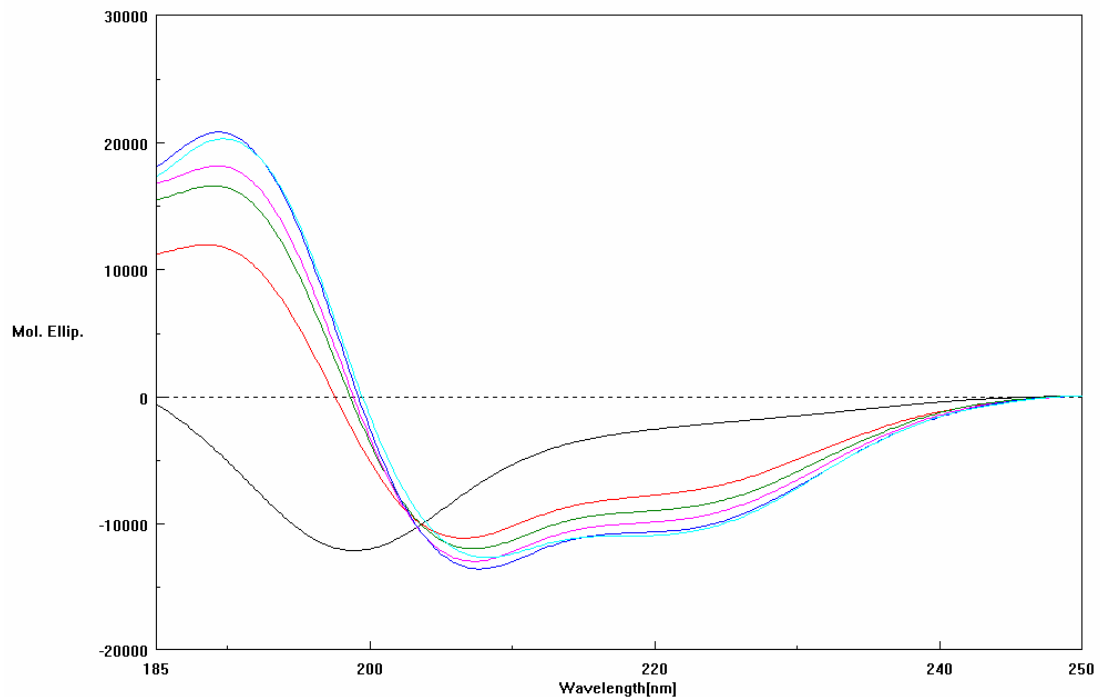
In H<sub>2</sub>O MilliQ e in soluzione tampone a diversi pH il peptide è estremamente flessibile, infatti gli spettri CD presentano una banda negativa intorno ai 198 nm indicativa della struttura disordinata (Figg. 208, 209). Anche in questo caso variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. In soluzione micellare e in presenza di TFE il peptide mostra una banda positiva a 192 nm e due bande negative centrate a 208 e 220 nm caratteristiche della conformazione  $\alpha$ -elicoidale (Fig. 210). Il contenuto di  $\alpha$ -elica, valutato in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è risultato essere del 30.11% in TFE. Data la variazione conformazionale netta passando dall'H<sub>2</sub>O a miscele contenenti percentuali relativamente basse di TFE (25%), si può dedurre un'elevata propensione di questo frammento della BMP-2 ad assumere, almeno parzialmente, una conformazione  $\alpha$ -elicoidale.



**Fig. 208:** Spettri CD di (58-87)BMP-2 in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).

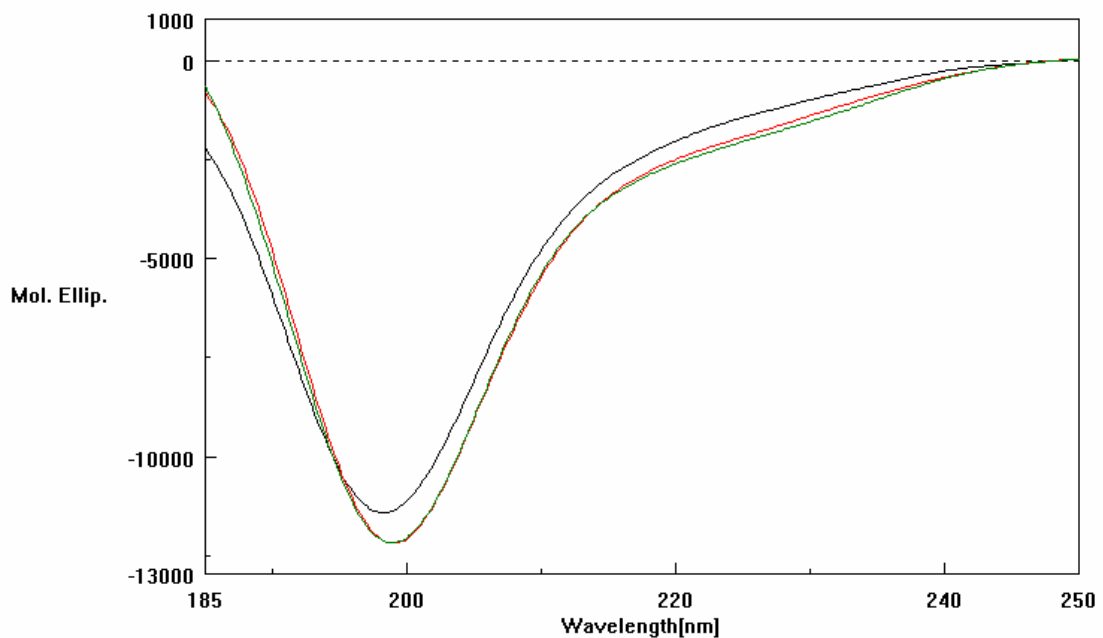


**Fig. 209:** Spettri CD di (58-87)BMP-2 in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).

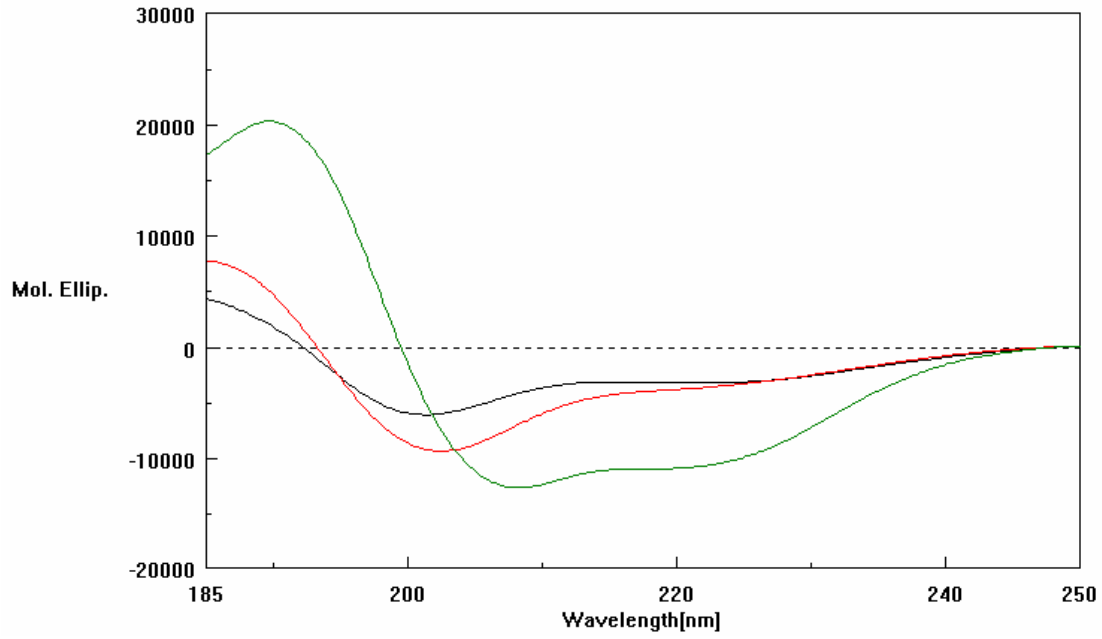


**Fig. 210:** Spettri CD di (58-87)BMP-2 in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).

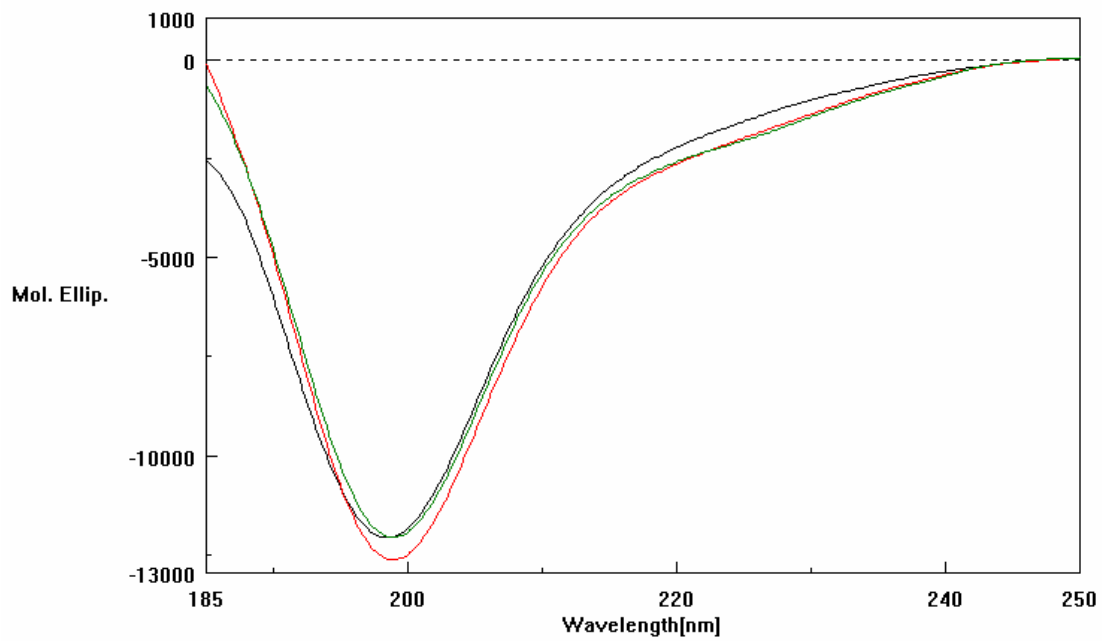
Nelle Figg. 211-214 sono riportati gli spettri CD in diversi solventi delle varie sequenze della BMP-2 sintetizzate.



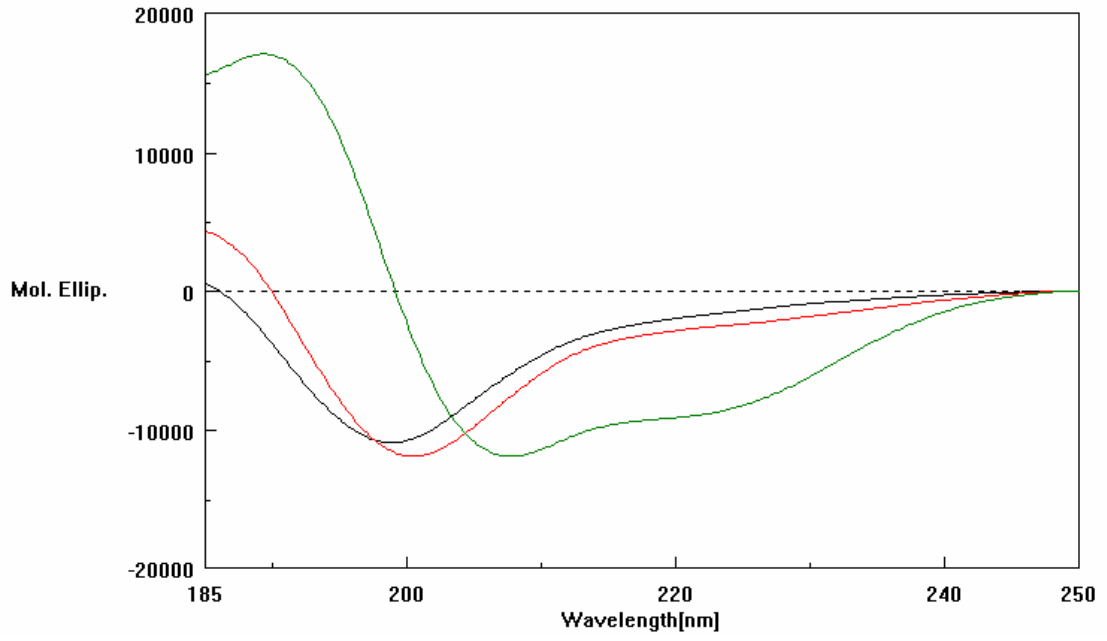
**Fig. 211:** Spettri CD in H<sub>2</sub>O dei seguenti peptidi: (77-87)BMP-2 (? ), (68-87)BMP-2 (? ), (58-87)BMP-2 (? ).



**Fig. 212:** Spettri CD in TFE dei seguenti peptidi: (77-87)BMP-2 (? ), (68-87)BMP-2 (? ), (58-87)BMP-2 (? ).



**Fig. 213:** Spettri CD in tampone fosfato a pH 7.4 dei seguenti peptidi: (77-87)BMP-2 (? ), (68-87)BMP-2 (? ), (58-87)BMP-2 (? ).



**Fig. 214:** Spettri CD in soluzione micellare di SDS dei seguenti peptidi: (77-87)BMP-2 (? ), (68-87)BMP-2 (? ), (58-87)BMP-2 (? ).

## ***STUDI CONFORMAZIONALI DEI PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI***

### ***Dicroismo circolare (CD)***

Le misure di dicroismo circolare sono state ottenute con uno spettropolarimetro Jasco modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla medesima ditta.

Le misure CD sono state condotte negli stessi mezzi utilizzati per le misure sui peptidi di adesione, ovvero:

9. H<sub>2</sub>O MilliQ;
10. miscele TFE/H<sub>2</sub>O alle seguenti percentuali: 25 – 50 – 75 – 90 e 98% TFE in H<sub>2</sub>O;
11. tampone fosfato: soluzione 10 mM di sodio fosfato monobasico ai seguenti pH: 6.5 - 7.0 – 7.4 e 8.0;
12. soluzione 14 mM di SDS in tampone fosfato 10 mM, pH 7.0.

Le misure CD sono state condotte a temperatura ambiente adottando i seguenti parametri: *range*, 185-255 nm; *step resolution*, 0.2 nm; *scan speed*, 5 o 20 nm/min; *accumulation*, 2 o 4; *response*, 2 sec; *band width*, 2.0 nm; *sensitivity*, 5, 10, 20 o 50 mdeg. Sono state utilizzate celle cilindriche in quarzo fuso con cammino ottico di 0.1 o 0.05 cm.

Le soluzioni sono state ottenute portando ad un volume di 500 µL, con opportuno solvente, 10 µL di una soluzione madre preparata sciogliendo quantità pesate di peptide con H<sub>2</sub>O MilliQ in modo da ottenere una concentrazione pari a  $2.5 \times 10^{-3}$  M. Le concentrazioni esatte delle soluzioni di cui si è eseguita la misura CD, preparate in maniera tale da avere una concentrazione per pesata pari a  $5 \times 10^{-5}$  M, sono state determinate tramite analisi amminoacidica quantitativa seguendo la procedura riportata a pag. 61. Si sono ottenute le seguenti concentrazioni sperimentali:  $2.626 \times 10^{-5}$  M per il peptide EAK 16-II,  $2.716 \times 10^{-5}$  M per il peptide EAK 8-II,  $3.057 \times 10^{-5}$  M per il peptide DAK 16-II,  $2.779 \times 10^{-5}$  M per il peptide DAK 8-II,  $2.123 \times 10^{-5}$  M per il peptide DAOrn 16-II,  $2.726 \times 10^{-5}$  M per il peptide DAOrn 8-II,  $2.490 \times 10^{-5}$  M per il peptide EAbuK 16-II,  $2.887 \times 10^{-5}$  M per il peptide EAbuK 8-II,  $1.392 \times 10^{-5}$  M per il peptide EYK 16-II,  $3.050 \times 10^{-5}$  M per il peptide EYK 8-II,  $3.474 \times 10^{-5}$  M per il peptide RGD-(EAK 16-II) e  $2.819 \times 10^{-5}$  M per il peptide RGD-(EAK 16-II) Sc. La concentrazione dei cromofori, utilizzata per normalizzare gli spettri, è stata ottenuta moltiplicando la concentrazione esatta delle soluzioni CD ricavata sperimentalmente per il numero di legami peptidici.

Per valutare la formazione di fibre in soluzione al passare del tempo e in presenza di cationi monovalenti, sono state eseguite le seguenti misure utilizzando il tampone impiegato nell'articolo di Zhang *et al.* [127] per la formazione di membrane (chiamato per comodità TB), ovvero: tampone fosfato 10 mM e NaCl 150 mM a pH 7.4:

- $t = 0$  min: la misura è stata fatta subito dopo aver aggiunto 490  $\mu\text{L}$  di tampone TB a 10  $\mu\text{L}$  della soluzione madre preparata per le altre misure e aver mescolato per 20 sec con il vortex;
- $t = 5$  min: la misura è stata fatta dopo aver centrifugando a 4000 rpm per 3 min una soluzione preparata aggiungendo 980  $\mu\text{L}$  di tampone TB a 20  $\mu\text{L}$  di soluzione madre e aver mescolato per 20 sec con il vortex. Sono stati prelevati in tutto 380  $\mu\text{L}$  di soluzione, dopo averla centrifugata, aspirandoli dalla superficie;
- $t = 24$  ore: l'analisi è stata fatta utilizzando la soluzione preparata per la misura a  $t = 5$  min ed esattamente 24 ore dopo. Prima di fare la misura, la soluzione è stata centrifugata a 4000 rpm per 3 min e se ne sono prelevati 380  $\mu\text{L}$  cercando di non toccare il fondo del contenitore.

Queste misure CD sono state condotte a temperatura ambiente adottando i seguenti parametri: *range*, 200-255 nm; *step resolution*, 0.2 nm; *scan speed*, 5 o 20 nm/min; *accumulation*, 2 o 4; *response*, 2 sec; *band width*, 2.0 nm; *sensitivity*, 5, 10, 20 o 50 mdeg. È stata utilizzata una cella cilindrica in quarzo fuso con cammino ottico di 0.1 cm.

È stata inoltre eseguita una serie misure in  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ a concentrazione crescente di peptide per valutare la presenza o meno di fenomeni di aggregazione all'aumentare della concentrazione. Sono state preparate le soluzioni in maniera tale da avere le seguenti concentrazioni per pesata:  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M e  $10^{-3}$  M. Sono stati impiegati gli stessi parametri impostati per le misure in diversi solventi e sono state utilizzate celle cilindriche in quarzo fuso con cammino ottico di 0.1, 0.05, 0.02 o 0.01 cm.

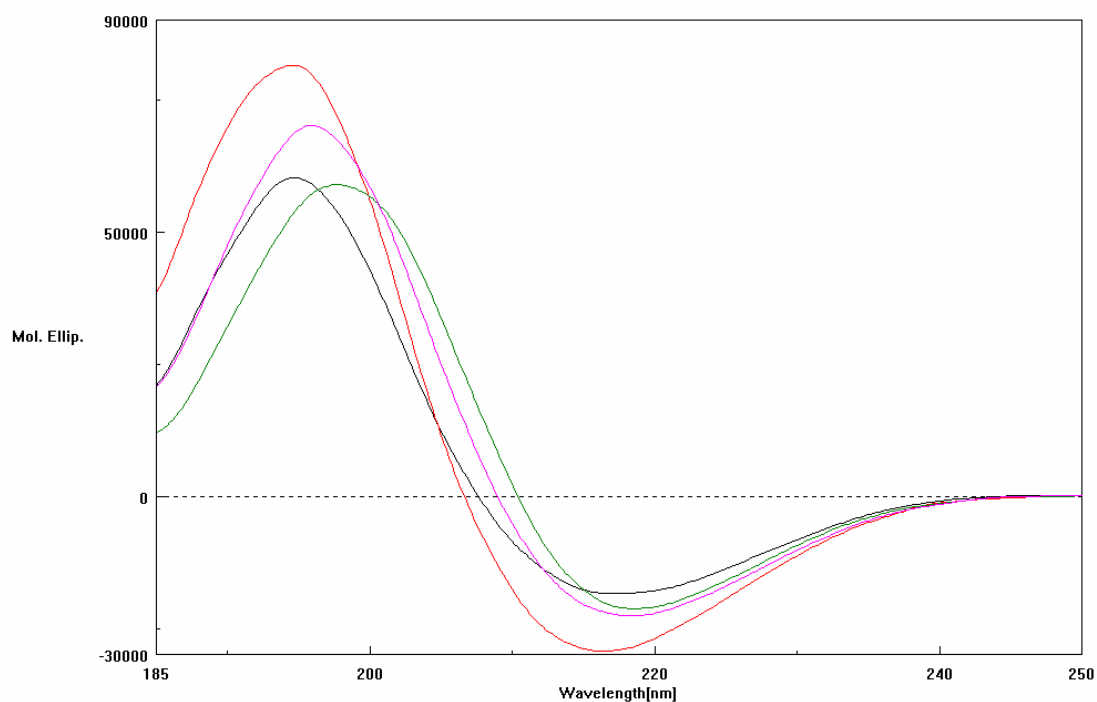
Il contenuto di  $\alpha$ -elica è stato valutato utilizzando la formula messa a punto da Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167].

Sono riportati di seguito i risultati relativi a ciascun peptide.

## EAK 16-II

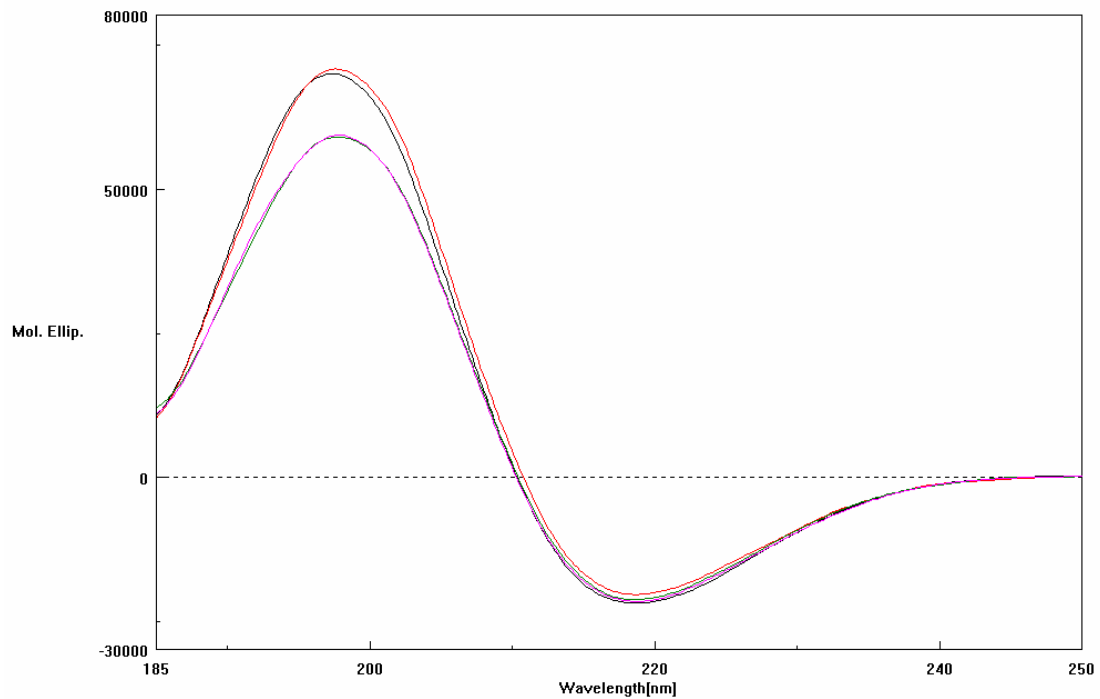
In  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, in soluzione micellare e nelle varie miscele TFE/ $\text{H}_2\text{O}$  gli spettri CD mostrano un andamento tipico della struttura  $\beta$ -sheet, con una banda positiva molto intensa intorno ai 195 nm e una banda negativa verso i 217 nm (Figg. 215, 217). Nelle soluzioni di

tampone fosfato a diversi pH gli spetti risultano leggermente spostati verso lunghezze d'onda maggiori (*red shift*) e la banda positiva risulta allargata rispetto agli altri solventi considerati; questo fa supporre la comparsa di contributi diversi oltre al  $\beta$ -*sheet*. L'unico effetto della variazione di pH è la diminuzione di intensità della banda positiva in ambiente leggermente basico (Fig. 216). Gli spettri delle varie miscele TFE/H<sub>2</sub>O si differenziano quasi esclusivamente per l'intensità delle bande la cui posizione relativa varia in misura limitata (Fig. 217). La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra una notevole diminuzione dell'intensità della banda negativa intorno ai 219 nm (Fig. 218) che potrebbe essere indice di una diminuzione di concentrazione di peptide in soluzione dovuta a fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 219, l'aumento di concentrazione sembra avere come effetto una leggera diminuzione della strutturazione ordinata di tipo  $\beta$ -*sheet*, data la diminuzione di intensità della banda positiva a 195 nm.

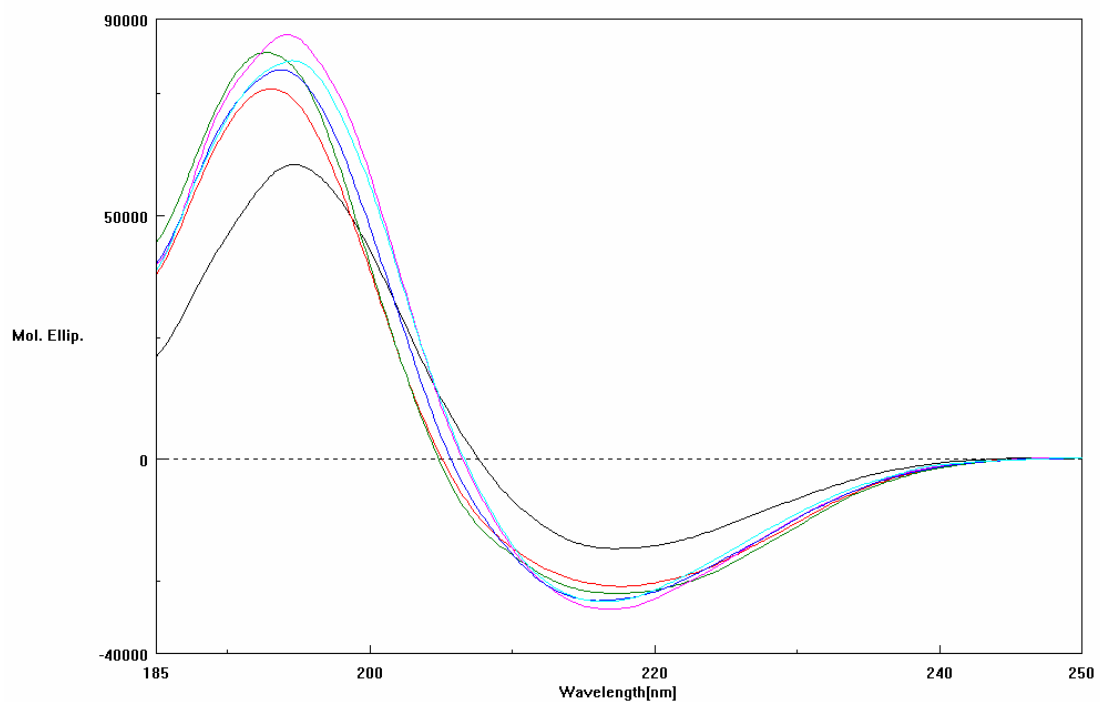


**Fig. 215:** Spettri CD di EAK 16-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).

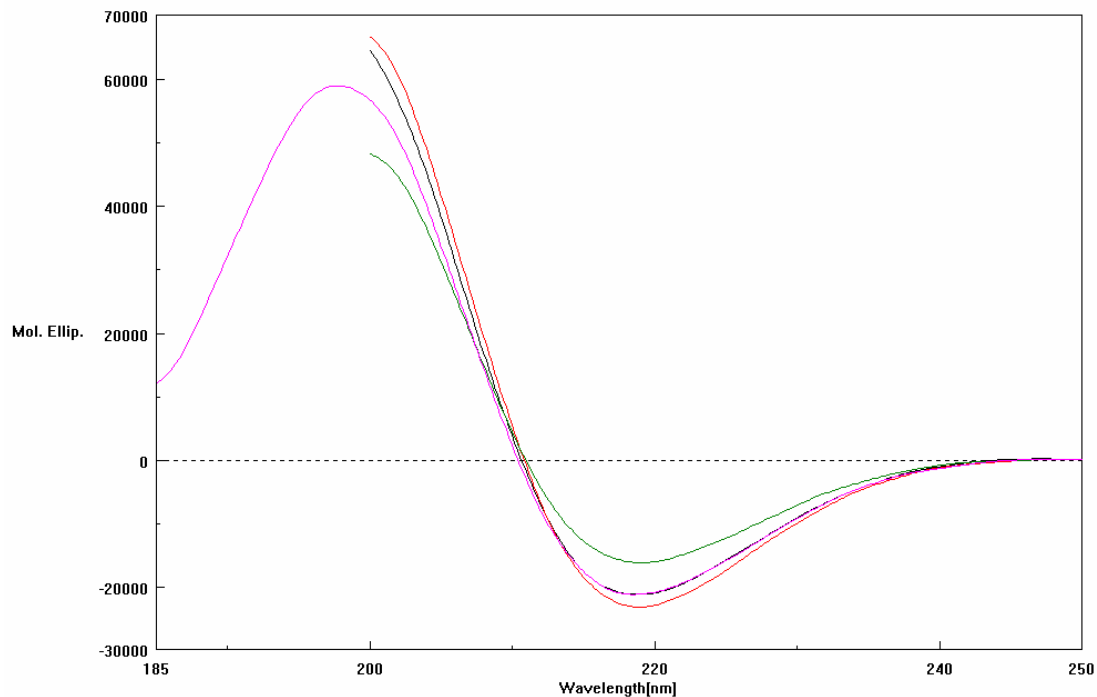




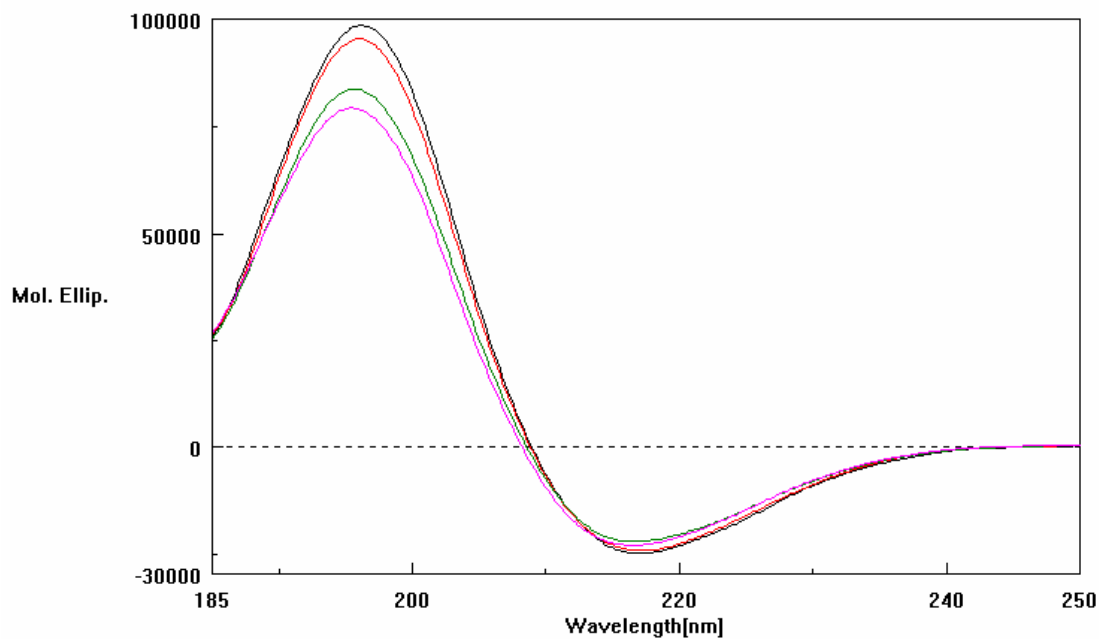
**Fig. 216:** Spettri CD di EAK 16-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).



**Fig. 217:** Spettri CD di EAK 16-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).



**Fig. 218:** Spettri CD di EAK 16-II in tampone TB a:  $t = 0$  min (black),  $t = 5$  min (red),  $t = 24$  ore (green), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (black).

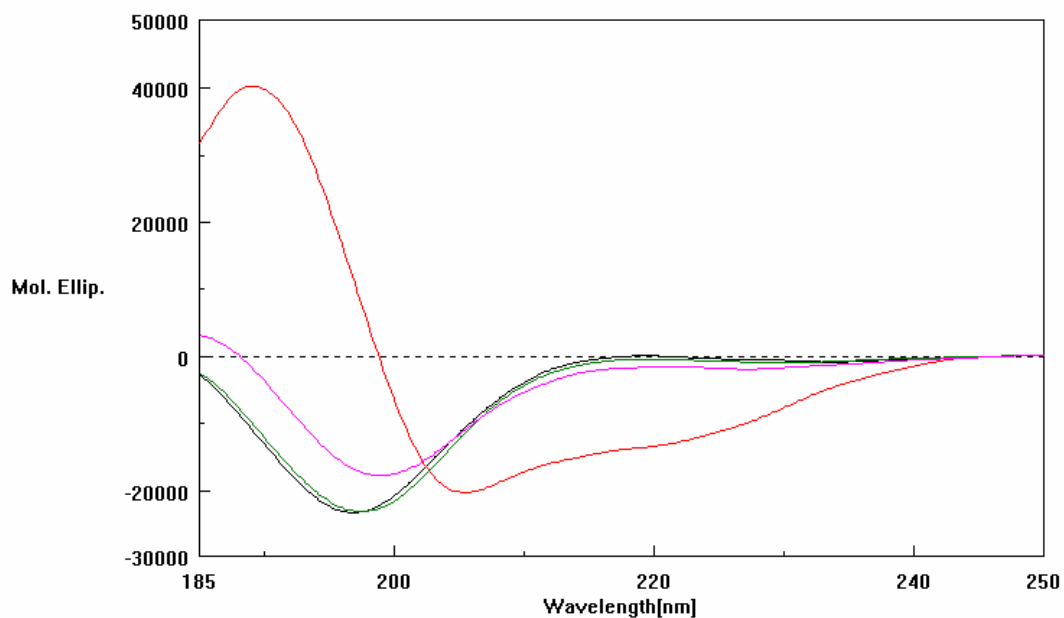


**Fig. 219:** Spettri CD di EAK 16-II a diverse concentrazioni in  $H_2O$ :  $5 \times 10^{-5}$  M (black),  $10^{-4}$  M (red),  $5 \times 10^{-4}$  M (green),  $10^{-3}$  M (magenta).

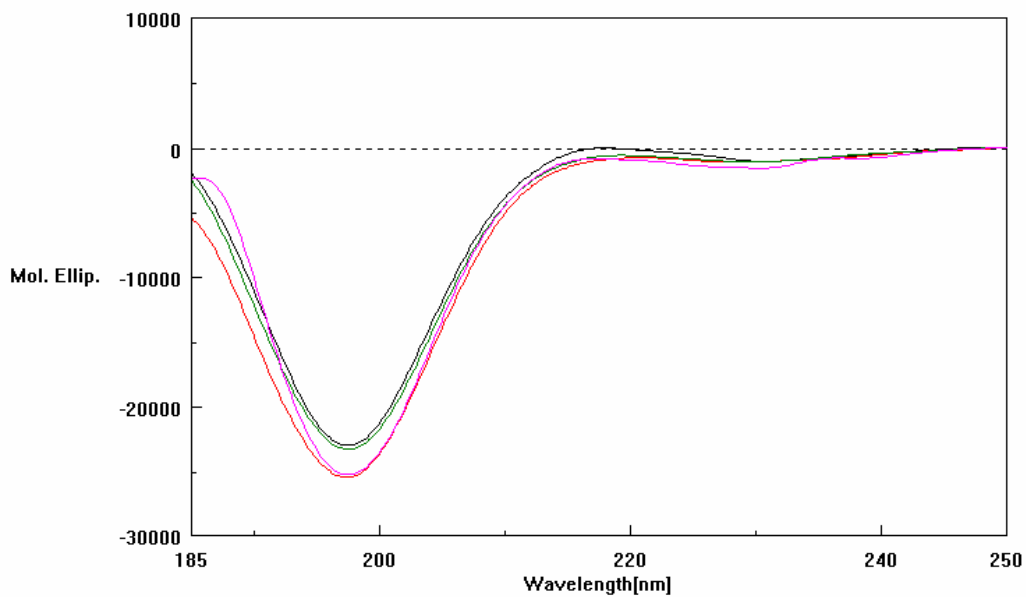
### EAK 8-II

Come si può vedere nelle Figg. 220 e 221, in  $H_2O$  MilliQ e nelle soluzioni di tampone fosfato ai vari pH fisiologici gli spettri mostrano andamenti tipici della conformazione *random coil*, in quanto è presente una singola banda negativa centrata intorno ai 197 nm.

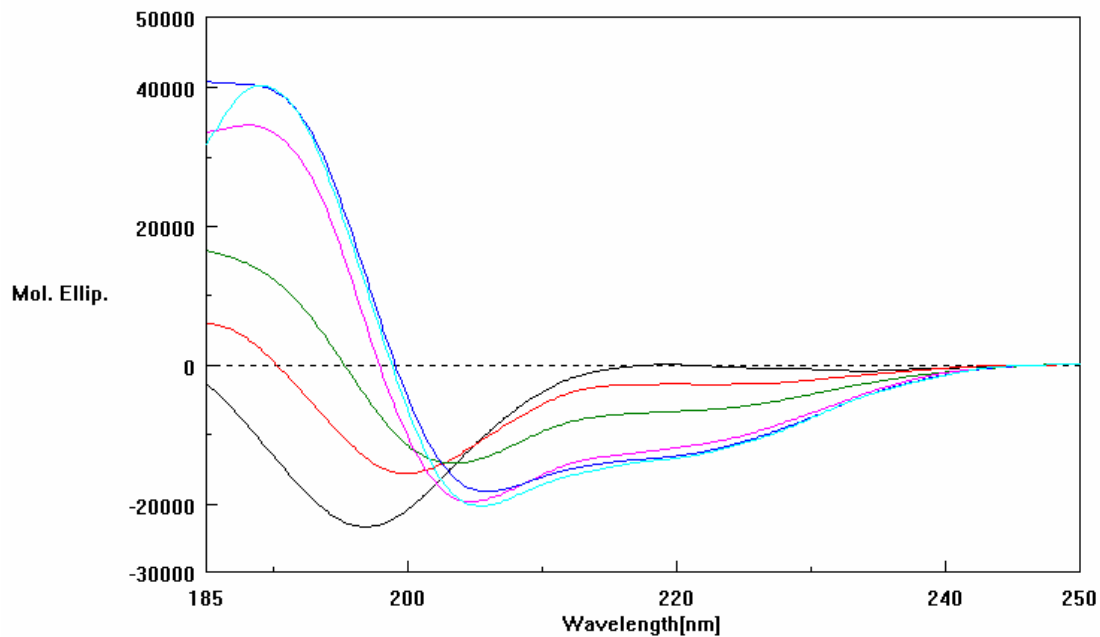
Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. In soluzione micellare si nota un leggero aumento di strutturazione che è più evidente al crescere della concentrazione di TFE nella soluzione (Fig. 222). In soluzione al 98% di TFE, lo spettro mostra le bande tipiche della conformazione  $\alpha$ -elicoidale il cui contenuto, in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è stato valutato essere del 51.95%. Non essendo presenti bande tra i 200 e i 250 nm non è possibile ricavare nuove informazioni dagli spettri fatti in tampone TB, anche se apparentemente il tratto visibile della banda negativa corrispondente alla conformazione *random coil* sembra meno intensa per la misura fatta dopo 24 ore (Fig. 223). Al crescere della concentrazione aumenta l'intensità della banda negativa a 197 nm (Fig. 224).



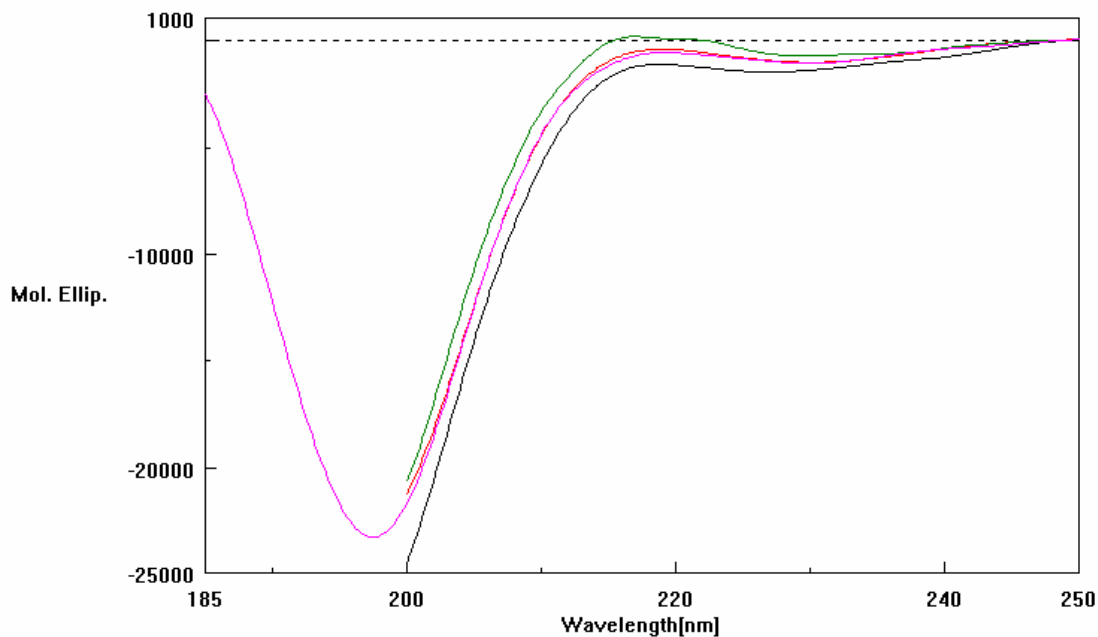
**Fig. 220:** Spettri CD di EAK 8-II in diversi solventi:  $H_2O$  MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



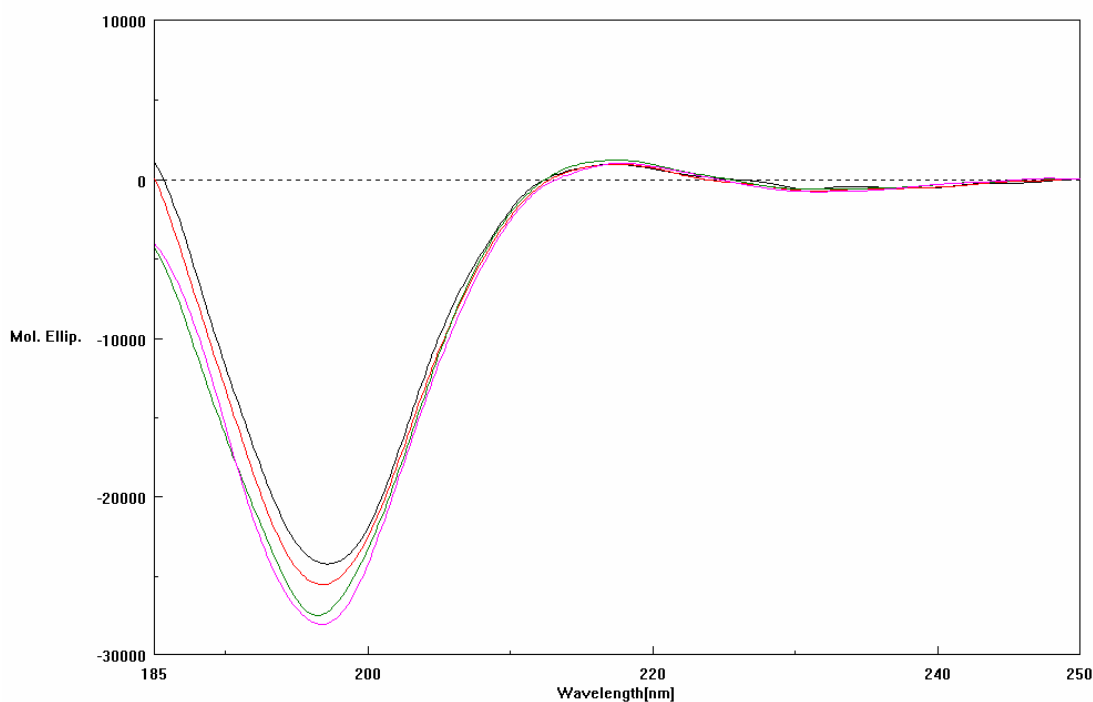
**Fig. 221:** Spettri CD di EAK 8-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



**Fig. 222:** Spettri CD di EAK 8-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).



**Fig. 223:** Spettri CD di EAK 8-II in tampone TB a:  $t = 0$  min (?),  $t = 5$  min (?),  $t = 24$  ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).

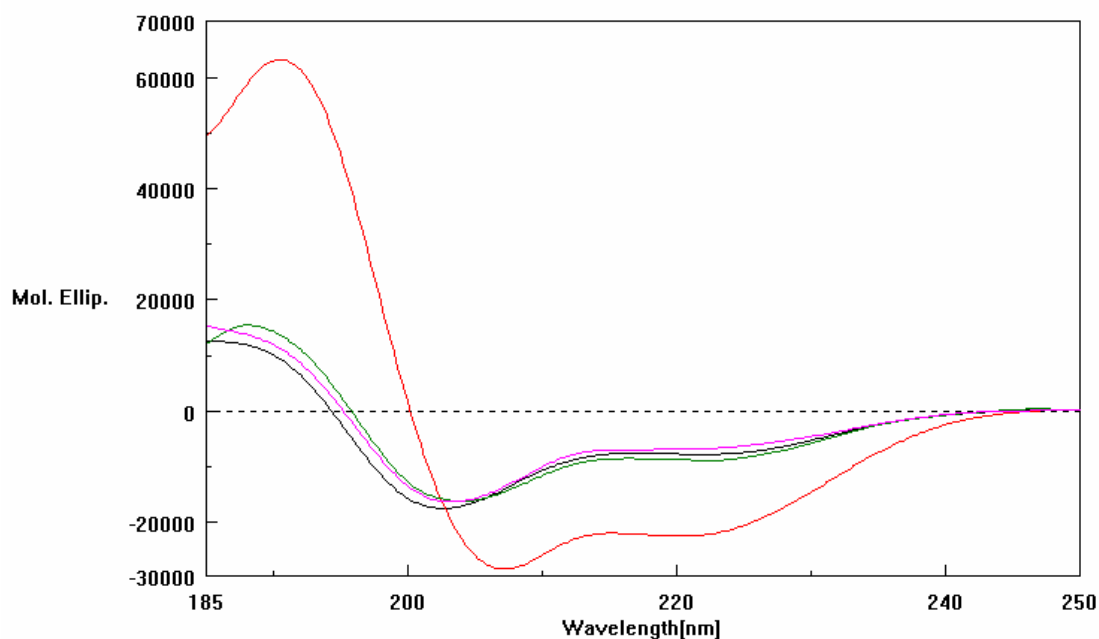


**Fig. 224:** Spettri CD di EAK 8-II a diverse concentrazioni in  $H_2O$ :  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

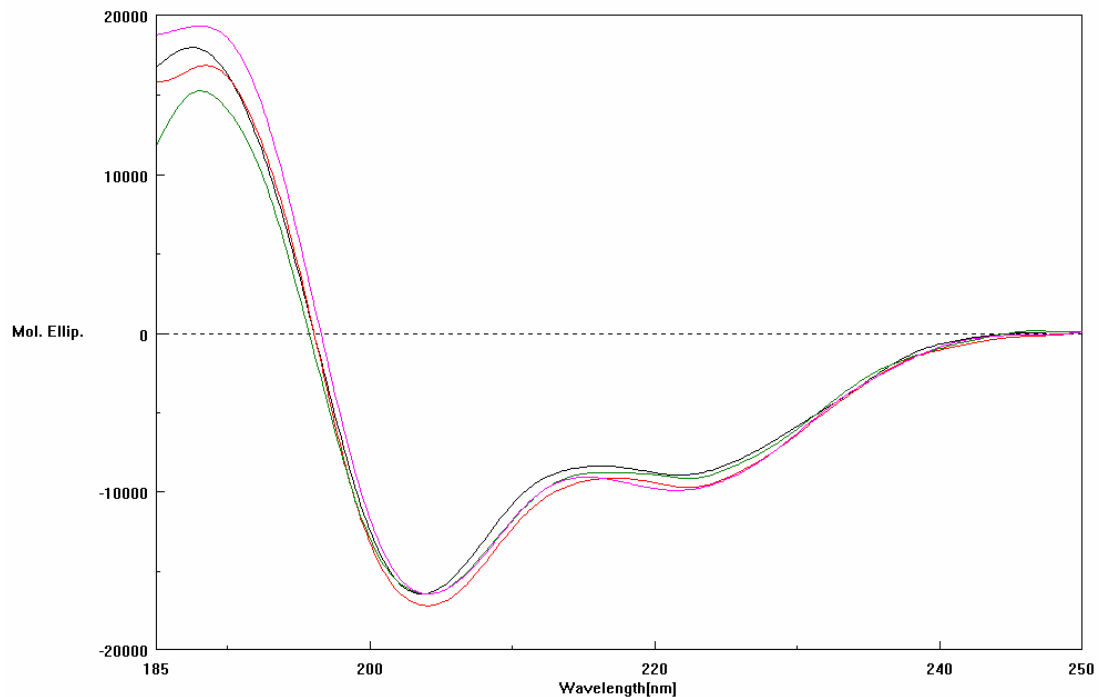
### DAK 16-II

In  $H_2O$  MilliQ, in soluzione micellare e nelle varie soluzioni tampone gli spettri CD mostrano un andamento probabilmente dovuto alla somma di due contributi:  $\alpha$ -elica e

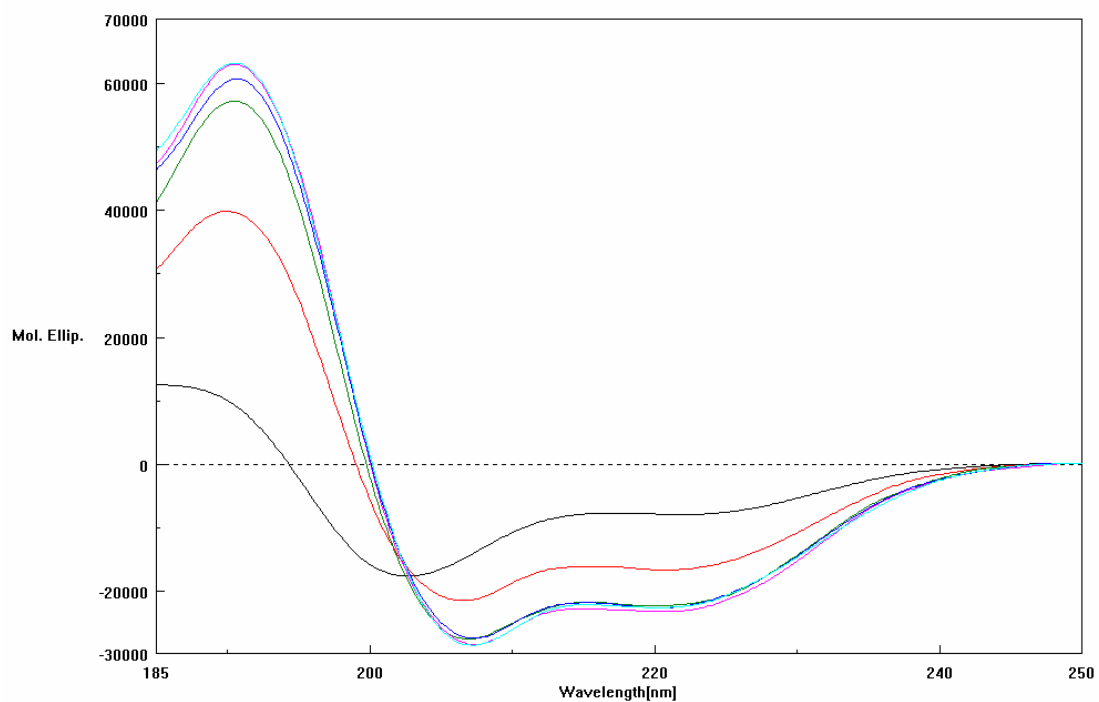
*random coil* (Figg. 225, 226). Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. Nella titolazione in TFE (Fig. 227) si nota che la percentuale di struttura  $\alpha$ -elicoidale cresce all'aumentare della percentuale di TFE nel solvente. Queste considerazioni sono confermate dai risultati forniti dalla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167] che stimano il contenuto di  $\alpha$ -elica in H<sub>2</sub>O pari al 32.47% mentre in soluzione al 98% di TFE dell'84.64%. La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra un andamento molto simile a quella fatta dopo 5 min (Fig. 228): questo potrebbe suggerire l'assenza di fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 229, l'aumento di concentrazione sembra avere come effetto una diminuzione della strutturazione in quanto si nota uno spostamento verso lunghezze d'onda minori della banda negativa che nella soluzione meno concentrata è centrata intorno ai 202 nm e una diminuzione di intensità della banda a 222 nm e di quella positiva.



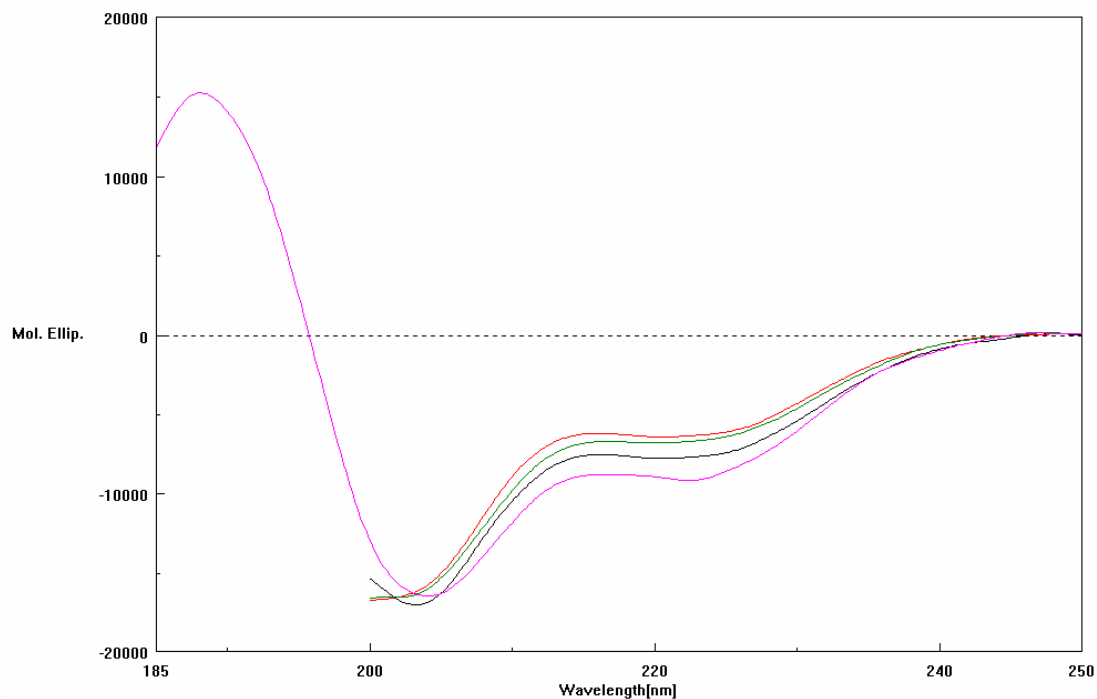
**Fig. 225:** Spettri CD di DAK 16-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



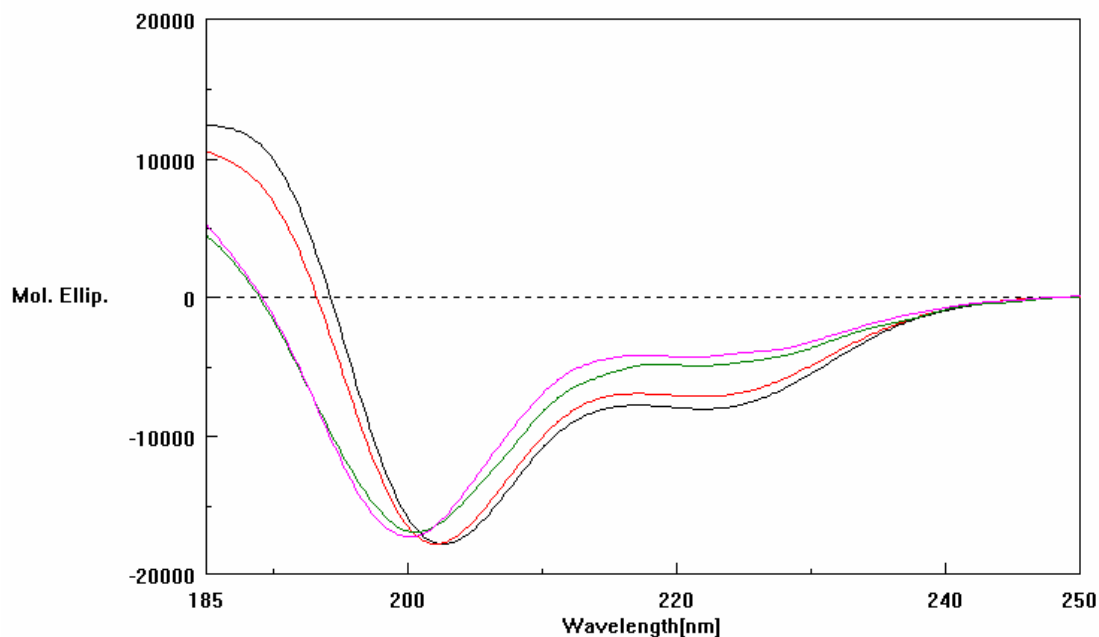
**Fig. 226:** Spettri CD di DAK 16-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).



**Fig. 227:** Spettri CD di DAK 16-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).



**Fig. 228:** Spettri CD di DAK 16-II in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).



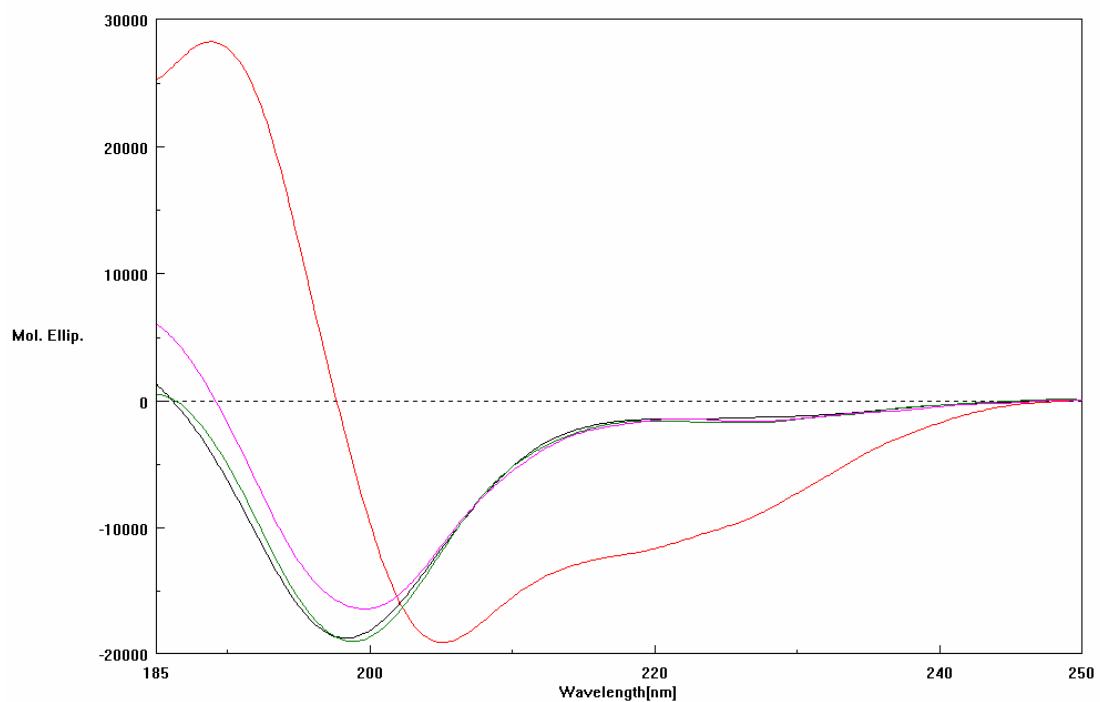
**Fig. 229:** Spettri CD di DAK 16-II a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

### DAK 8-II

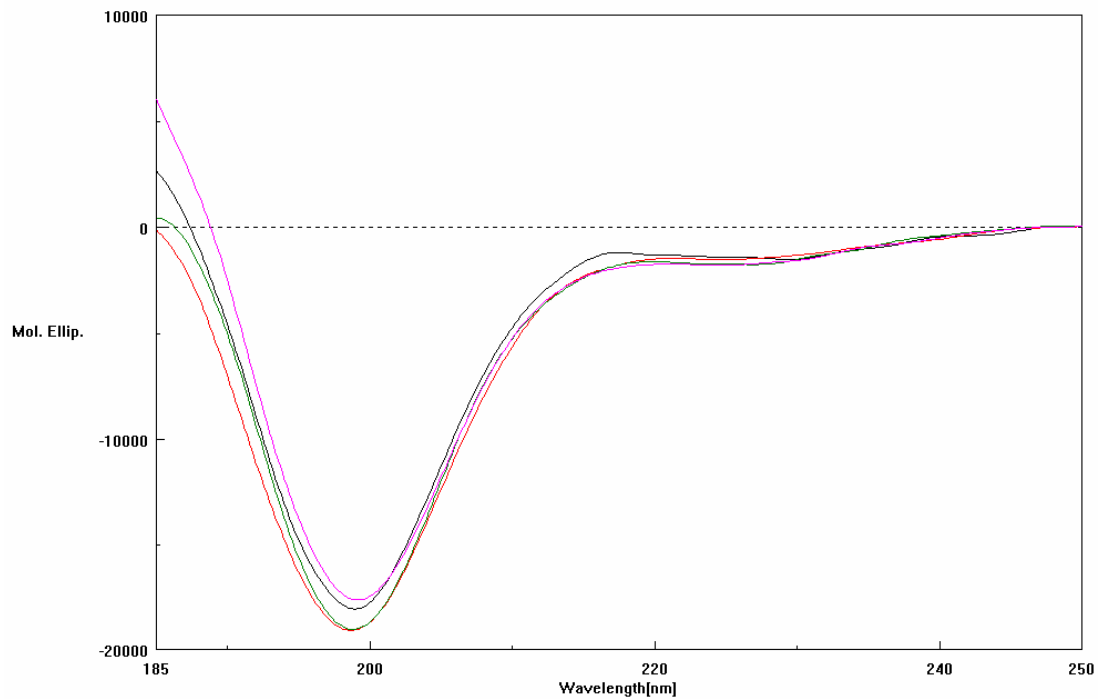
Gli spettri CD di questo peptide assomigliano molto a quelli ottenuti per il peptide EAK 8-II in quanto differiscono solo nell'intensità delle bande che risulta minore. Come si può vedere nelle Figg. 230 e 231, in H<sub>2</sub>O MilliQ e nelle soluzioni di tampone fosfato a diversi



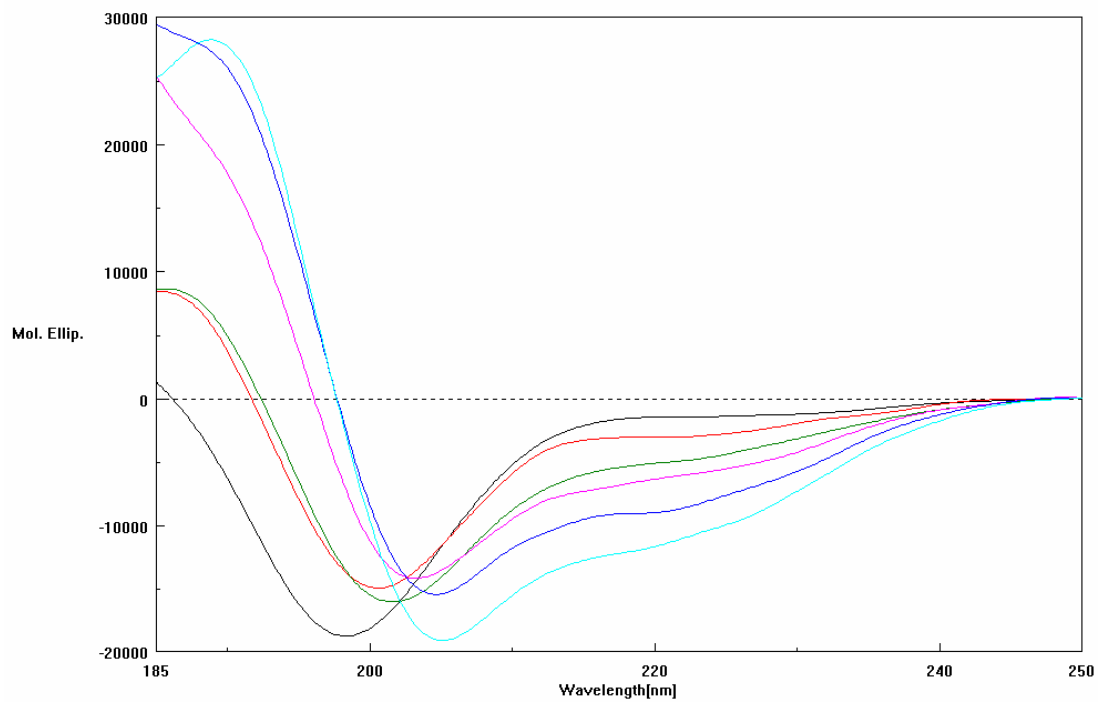
pH gli spettri mostrano andamenti tipici della conformazione *random coil*. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. In soluzione micellare probabilmente vi è la comparsa, percentualmente non rilevante, di popolazioni di conformeri ordinati. In soluzione al 98% di TFE (Fig. 232), lo spettro mostra le bande tipiche della conformazione  $\alpha$ -elicoidale il cui contenuto, in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è stato valutato essere del 46.54%. In tampone TB, le differenze tra gli spettri misurati dopo 5 min e dopo 24 ore sono praticamente irrilevanti, come pure tra gli spettri misurati all'aumentare della concentrazione (Figg. 233, 234).



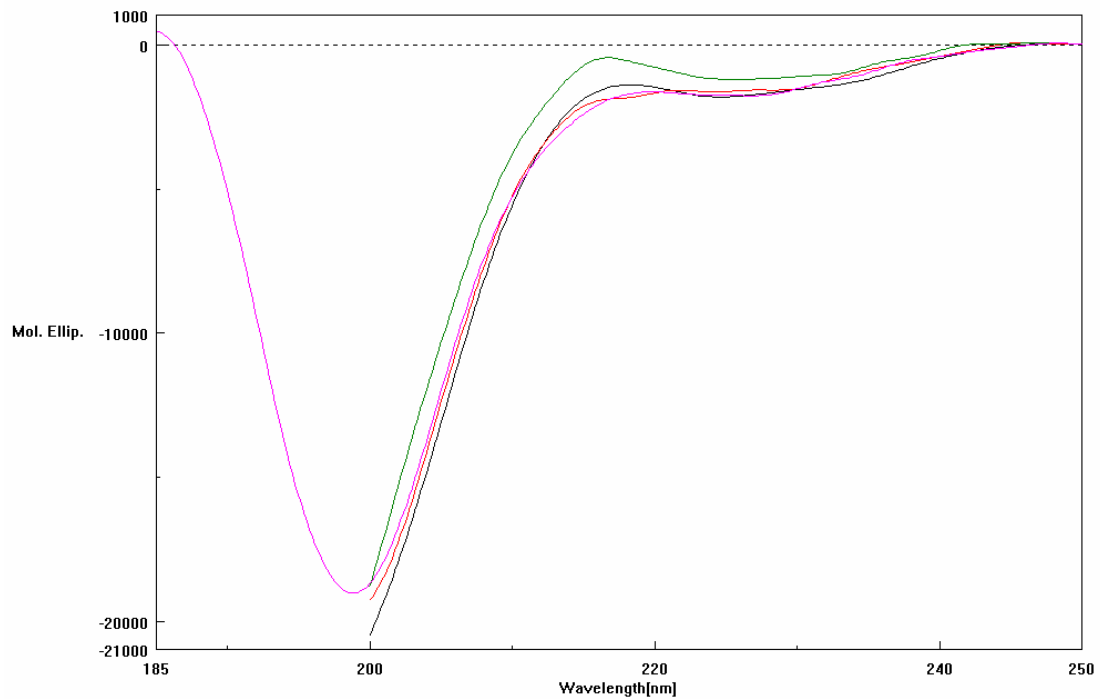
**Fig. 230:** Spettri CD di DAK 8-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



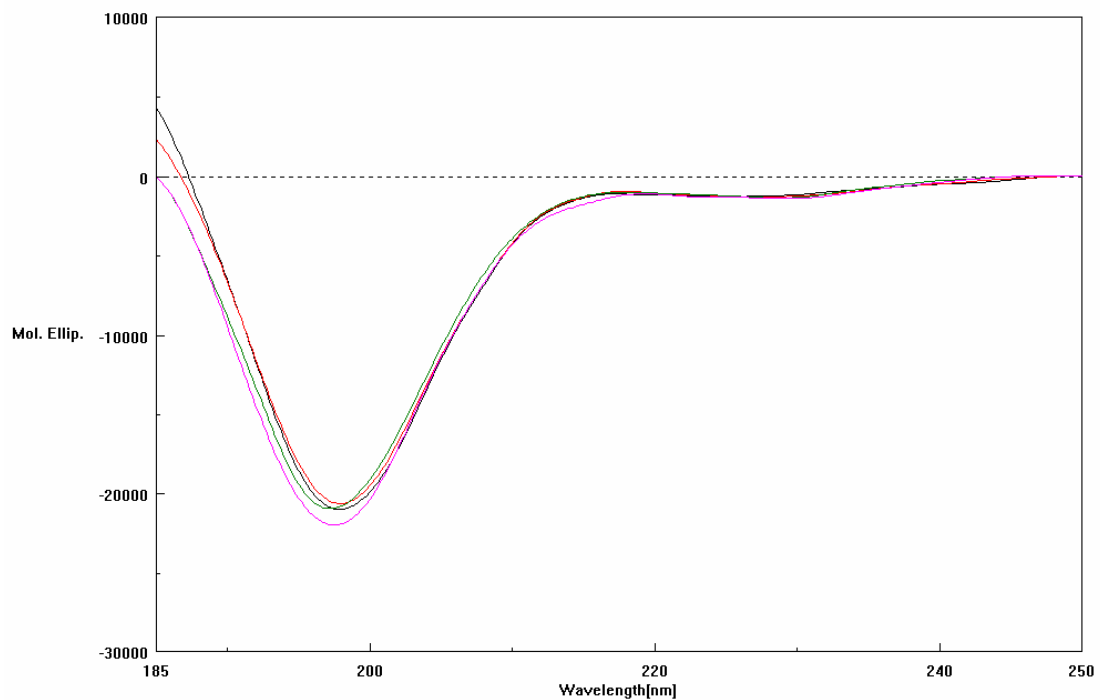
**Fig. 231:** Spettri CD di DAK 8-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).



**Fig. 232:** Spettri CD di DAK 8-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).



**Fig. 233:** Spettri CD di DAK 8-II in tampone TB a: t = 0 min (?), t= 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).

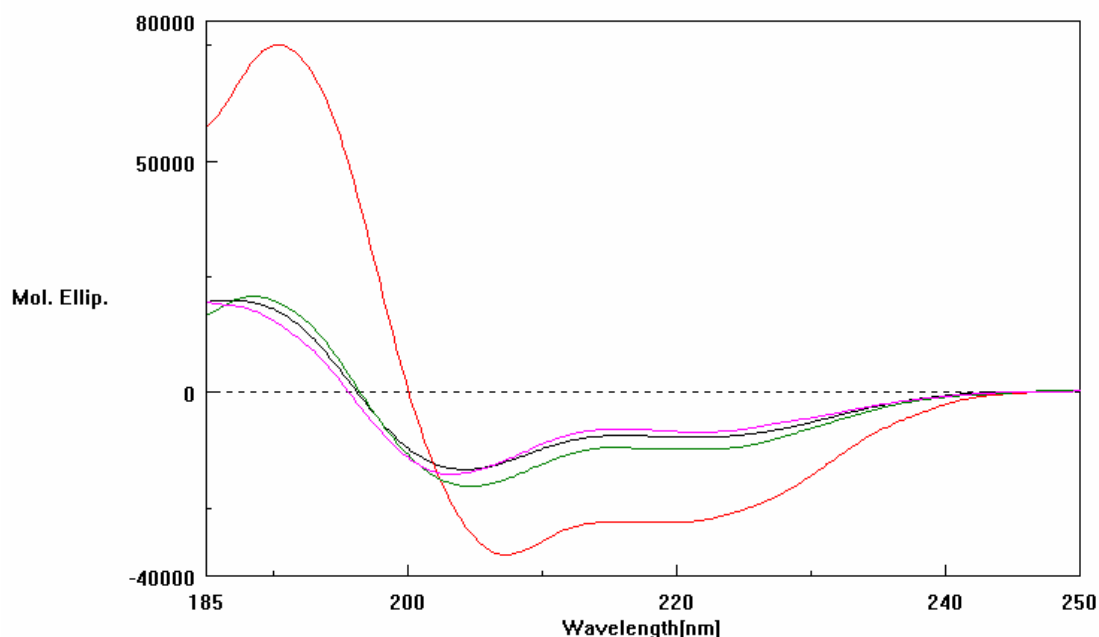


**Fig. 234:** Spettri CD di DAK 8-II a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

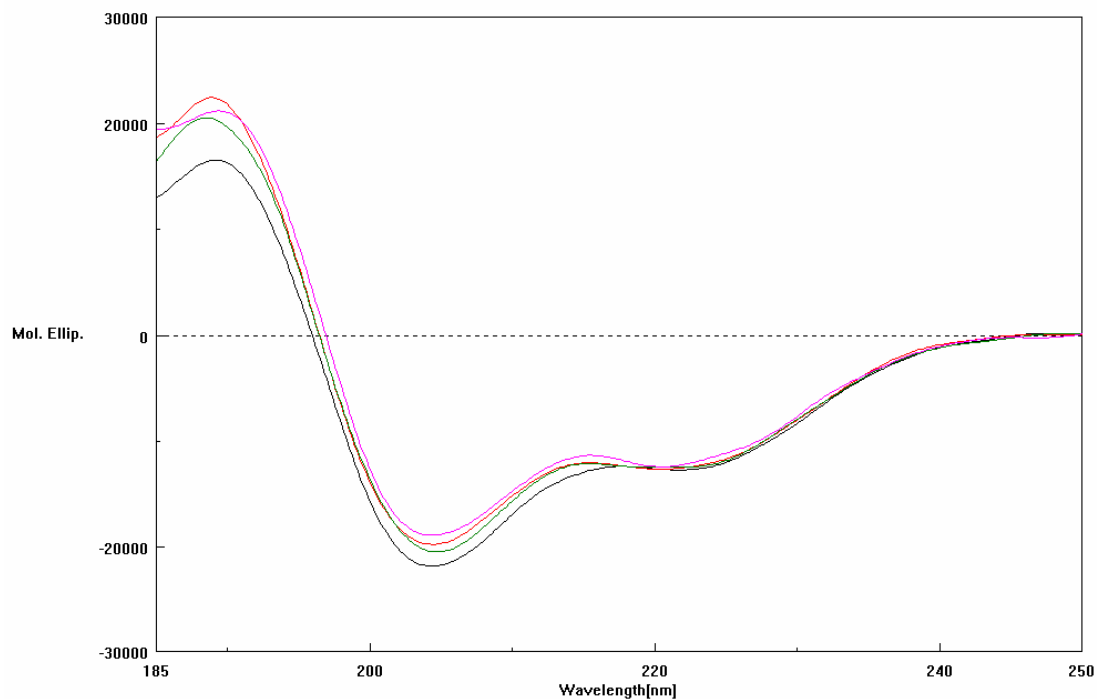
### DAOrn 16-II

Gli spettri CD del peptide DAOrn 16-II mostrano andamenti quasi uguali a quelli relativi agli spettri misurati per il peptide DAK 16-II, l'unica differenza è che il peptide che

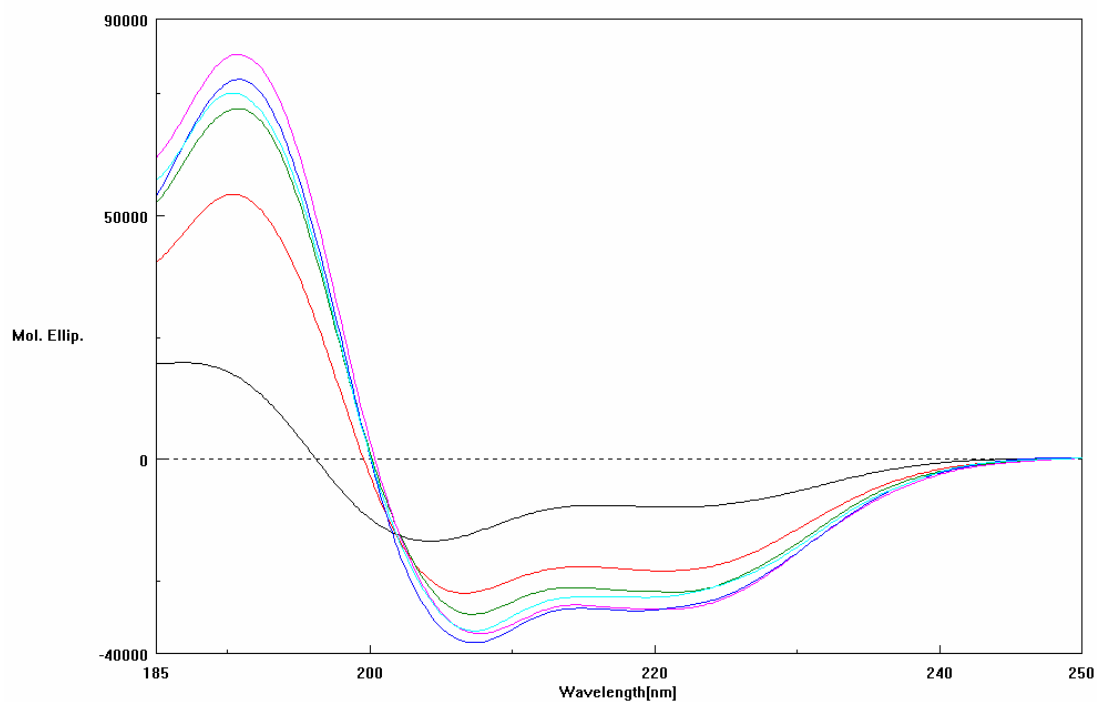
presenta Orn in sostituzione di Lys mostra segnali più intensi. In H<sub>2</sub>O MilliQ, in soluzione micellare e nelle varie soluzioni tampone gli spettri CD mostrano un andamento probabilmente dovuto alla somma di due contributi:  $\alpha$ -elica e *random coil* (Figg. 235, 236). Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. Come si può vedere dagli spettri in Fig. 237 il contenuto di  $\alpha$ -elica cresce velocemente all'aumentare del contenuto di TFE, probabilmente a spese della conformazione *random coil*. Queste considerazioni sono confermate dai risultati forniti dalla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167] che stimano il contenuto di  $\alpha$ -elica in H<sub>2</sub>O pari al 36.45% mentre in soluzione al 98% di TFE del 100%. La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra un andamento molto simile a quella fatta dopo 5 min (Fig. 238): questo potrebbe indicare l'assenza di fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 239, l'aumento di concentrazione sembra avere come effetto una diminuzione della strutturazione in quanto si nota uno spostamento verso lunghezze d'onda minori della banda negativa che nella soluzione meno concentrata è centrata intorno ai 204 nm e una diminuzione di intensità della banda a 222 nm e di quella positiva.



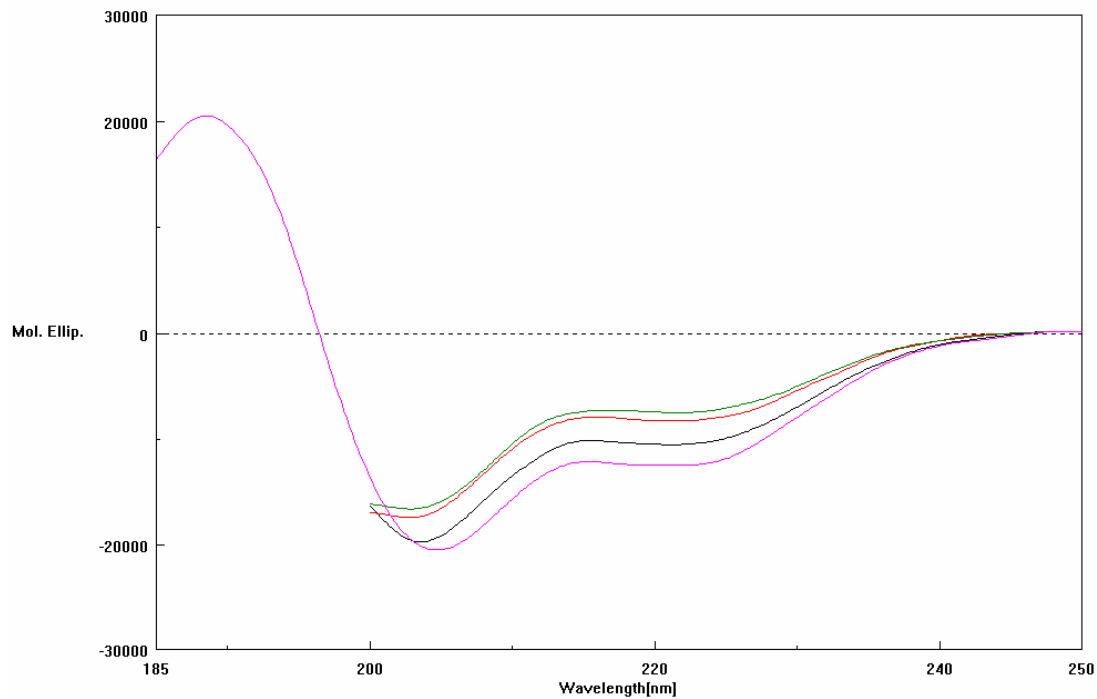
**Fig. 235:** Spettri CD di DAOrn 16-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



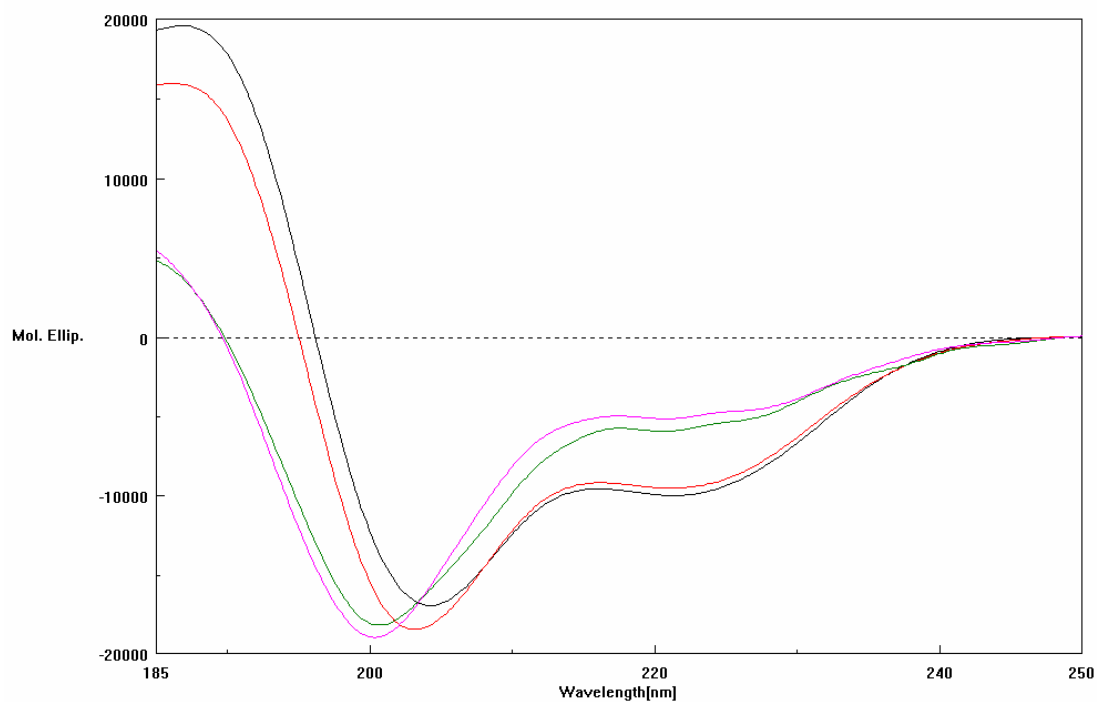
**Fig. 236:** Spettri CD di DAOrn 16-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).



**Fig. 237:** Spettri CD di DAOrn 16-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).



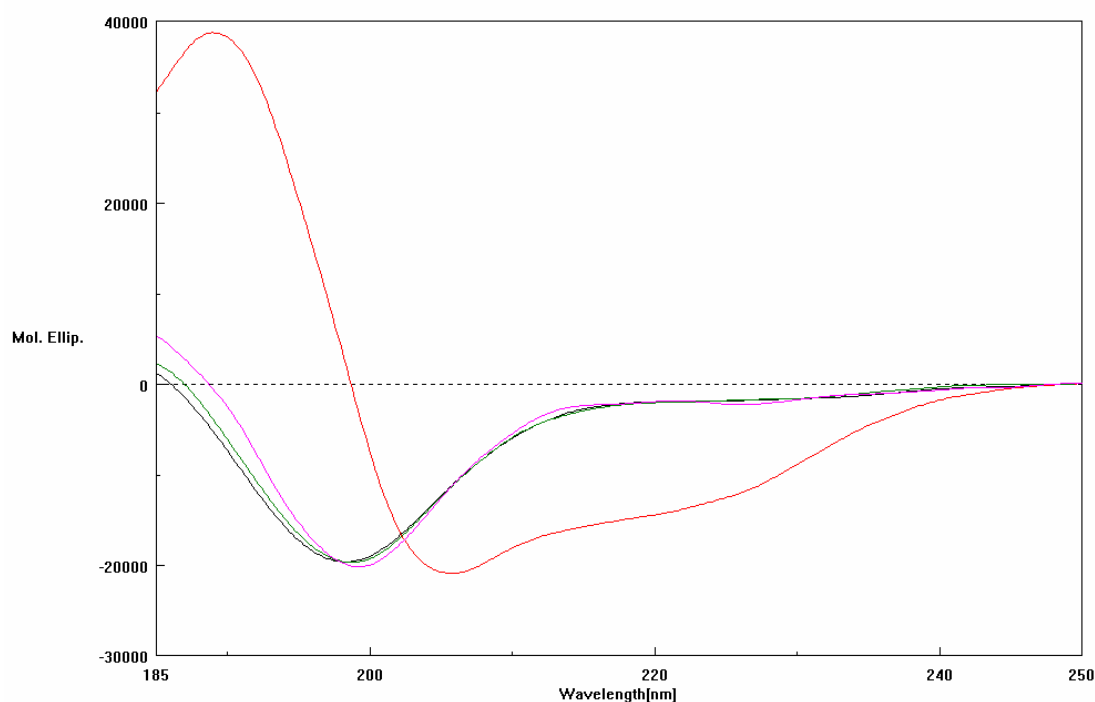
**Fig. 238:** Spettri CD di DAOrn 16-II in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).



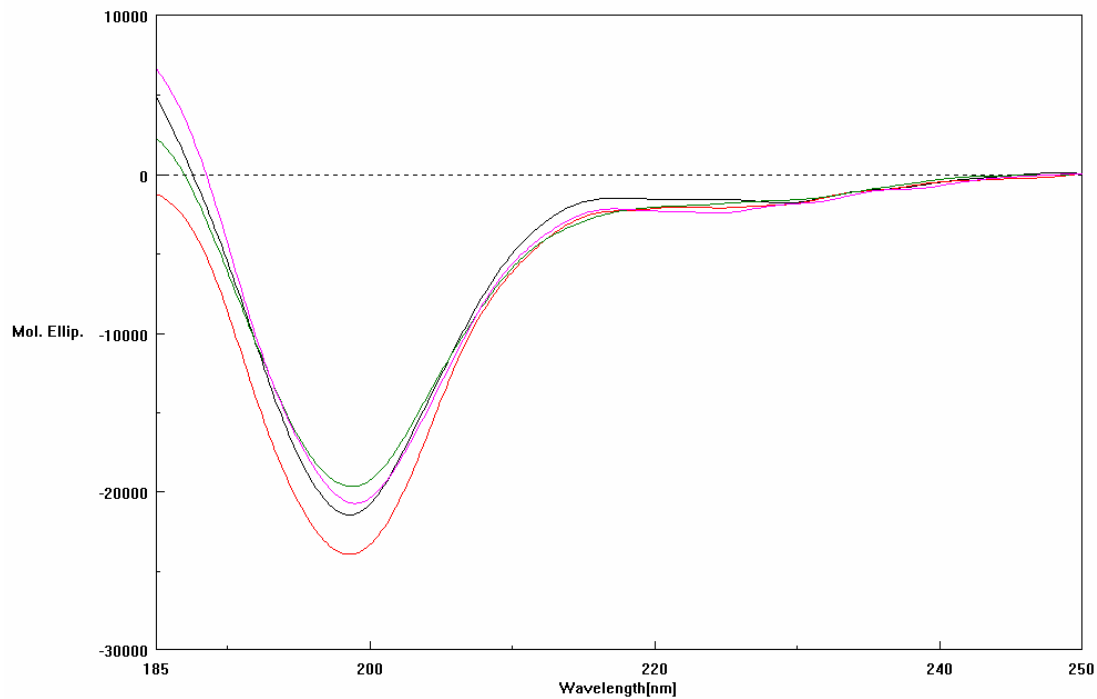
**Fig. 239:** Spettri CD di DAOrn 16-II a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

## DAOrn 8-II

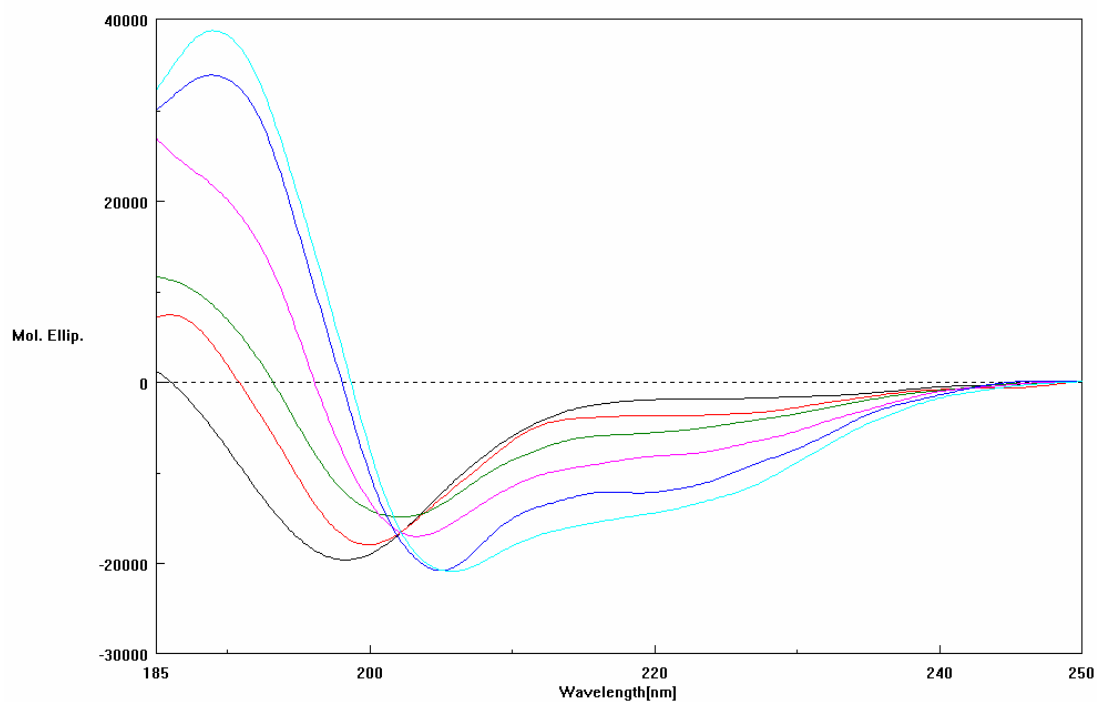
Come si può vedere nelle Figg. 240 e 241, in H<sub>2</sub>O MilliQ, in soluzione micellare e nelle soluzioni di tampone fosfato a diversi pH gli spettri mostrano andamenti riconducibili a conformazioni aperiodiche. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. Al crescere della concentrazione di TFE nella soluzione (Fig. 242) si nota un graduale aumento di strutturazione. In soluzione al 98% di TFE, lo spettro mostra le bande tipiche della conformazione  $\alpha$ -elicoidale il cui contenuto, in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è stato valutato essere del 54.76%. In tampone TB, le differenze tra gli spettri misurati dopo 5 min e dopo 24 ore sono scarse, anche se una valutazione è difficile in quanto la zona di spettro tra i 185 e i 200 nm, dove è centrata la banda relativa alla struttura *random* che è l'unica presente, è oscurata dalla presenza dell'NaCl nel tampone (Fig. 243). Gli spettri misurati all'aumentare della concentrazione mostrano un leggero spostamento della banda negativa da 198 a 197 nm e un aumento di intensità della stessa che potrebbe indicare un leggero aumento del grado di disordine del sistema (Fig. 244).



**Fig. 240:** Spettri CD di DAOrn 8-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).

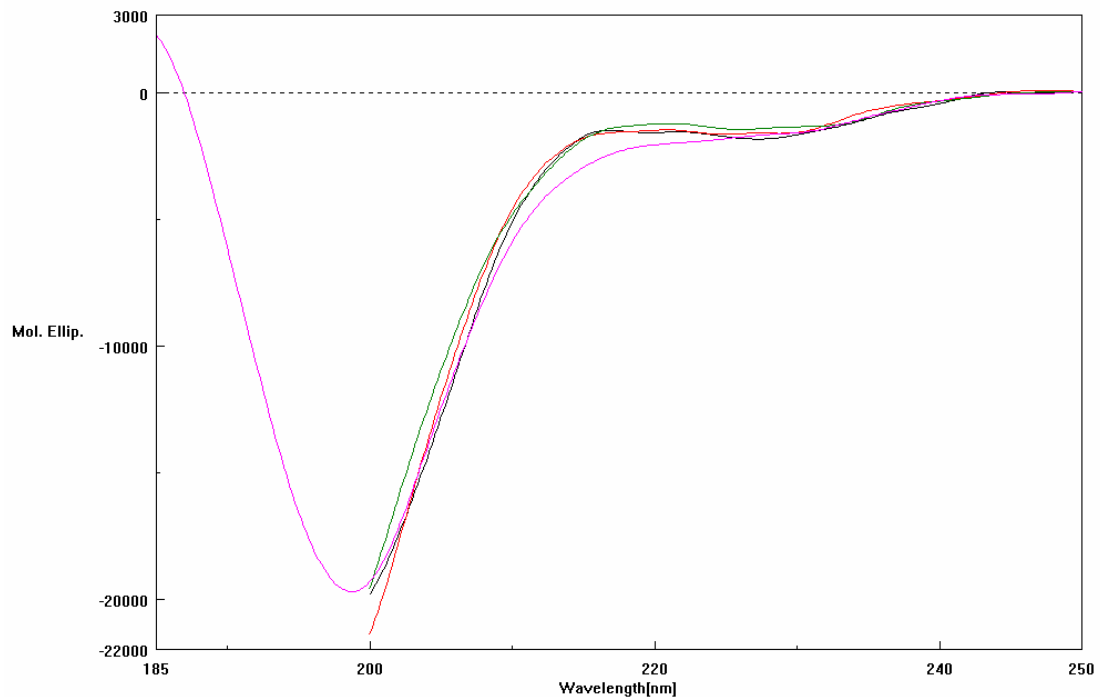


**Fig. 241:** Spettri CD di DAOrn 8-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).

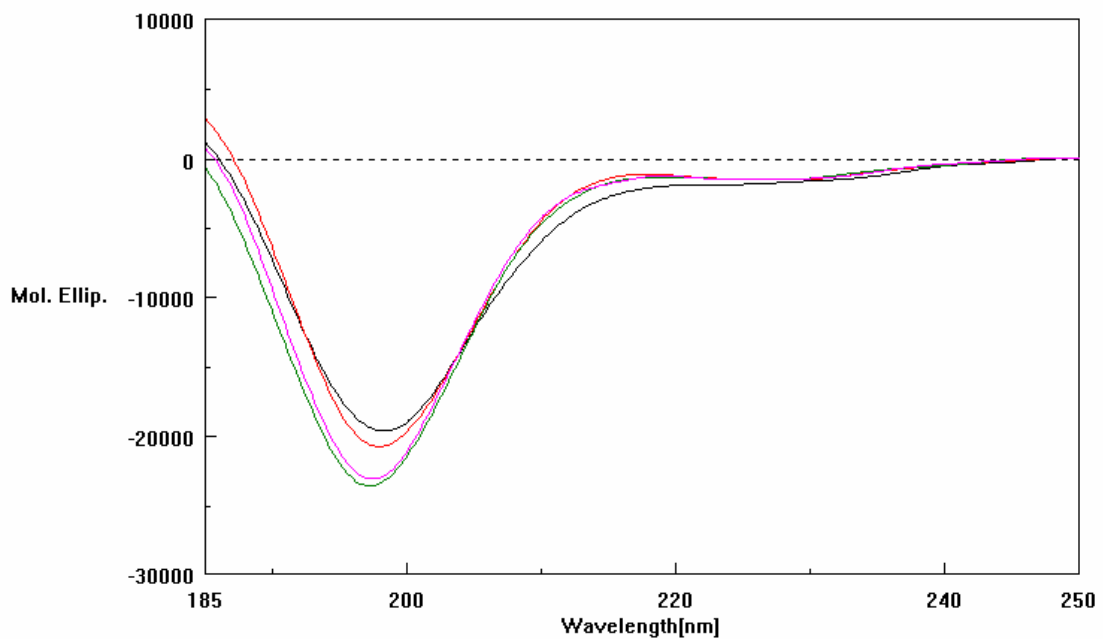


**Fig. 242:** Spettri CD di DAOrn 8-II in miscela TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).





**Fig. 243:** Spettri CD di DAOrn 8-II in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).

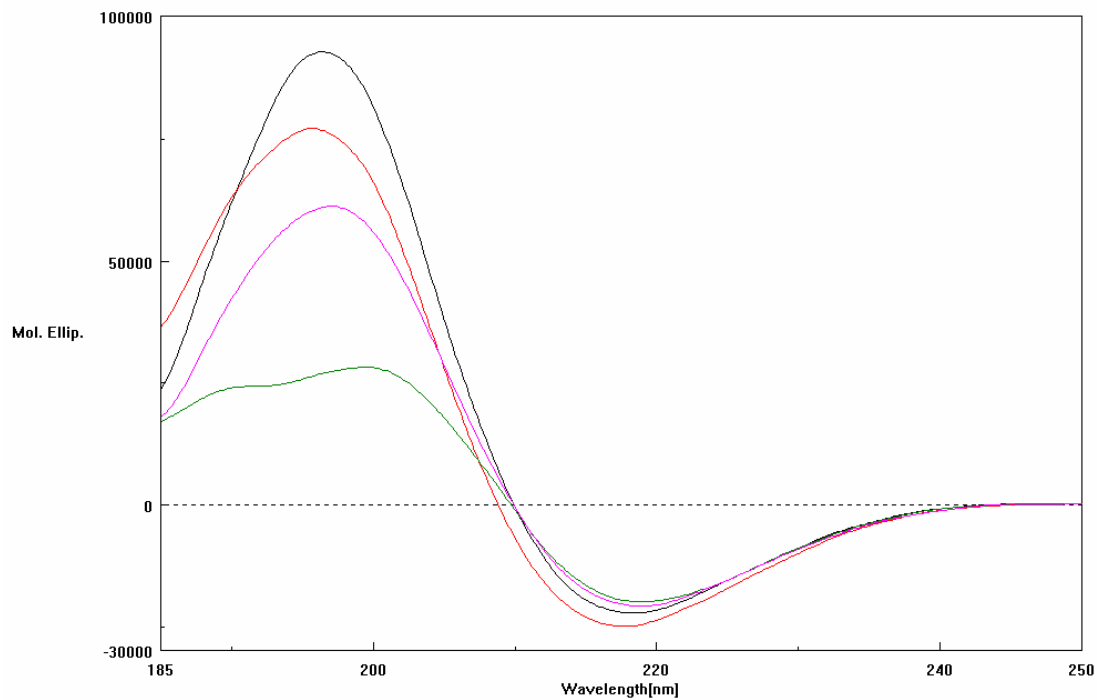


**Fig. 244:** Spettri CD di DAOrn 8-II a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

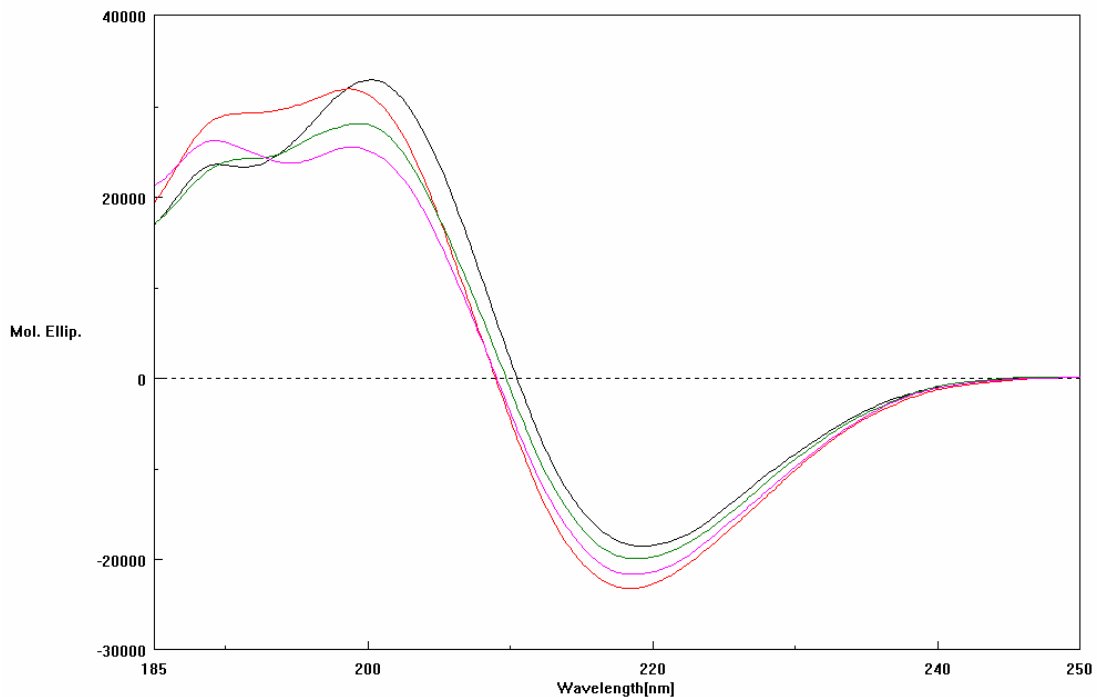
### EAbuK 16-II

Lo spettro CD in H<sub>2</sub>O MilliQ mostra un andamento principalmente dovuto a struttura  $\beta$ -sheet, con una banda positiva molto intensa intorno ai 197 nm e una banda negativa verso i 219 nm (Fig. 245). Passando dal TFE alla soluzione micellare e al tampone fosfato,

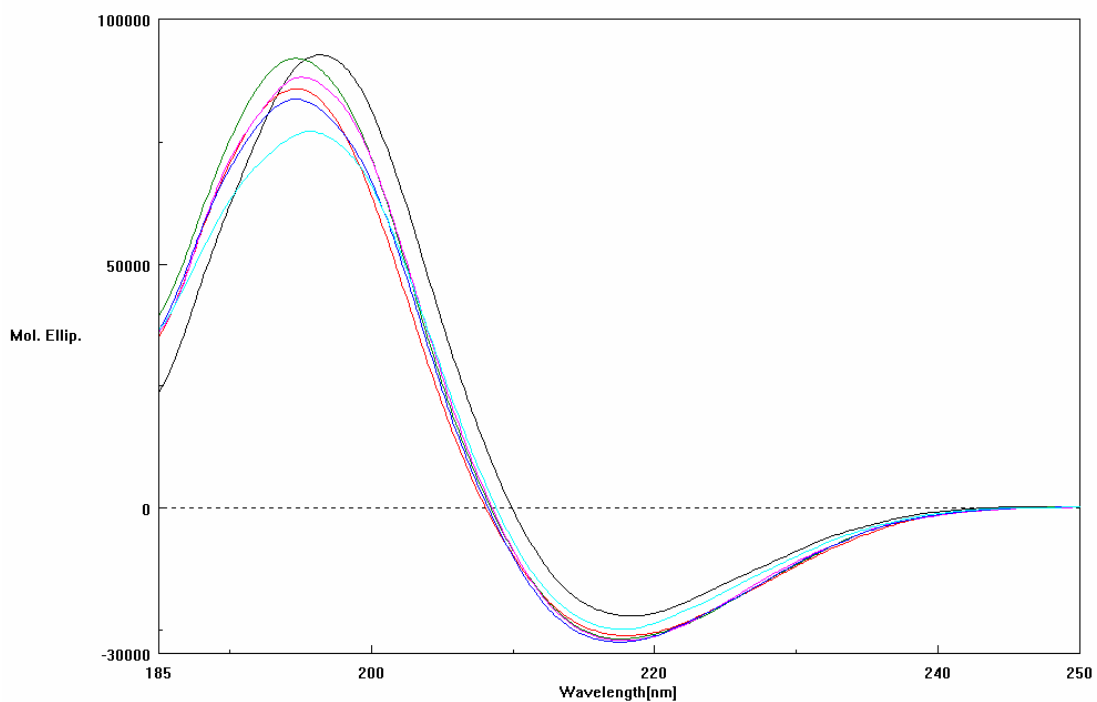
l'intensità della banda positiva diminuisce progressivamente e si sposta verso lunghezze d'onda maggiori (200 nm) e negli spettri in tampone fosfato la banda positiva risulta sdoppiata (Fig. 246). Variazioni di pH sembrano influenzare soprattutto la banda positiva, a lunghezze d'onda minori dello spettro. La variazione del contenuto di TFE in soluzione non sembra avere una grossa influenza sul tipo di struttura assunta dal peptide (Fig. 247). La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra una notevole diminuzione dell'intensità della banda negativa intorno ai 219 nm (Fig. 248) che potrebbe essere indice di una diminuzione di concentrazione di peptide in soluzione dovuta a fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 249, l'aumento di concentrazione sembra avere come effetto una diminuzione della strutturazione ordinata (prevalentemente di tipo  $\beta$ -sheet), data la diminuzione di intensità della banda positiva a 197 nm.



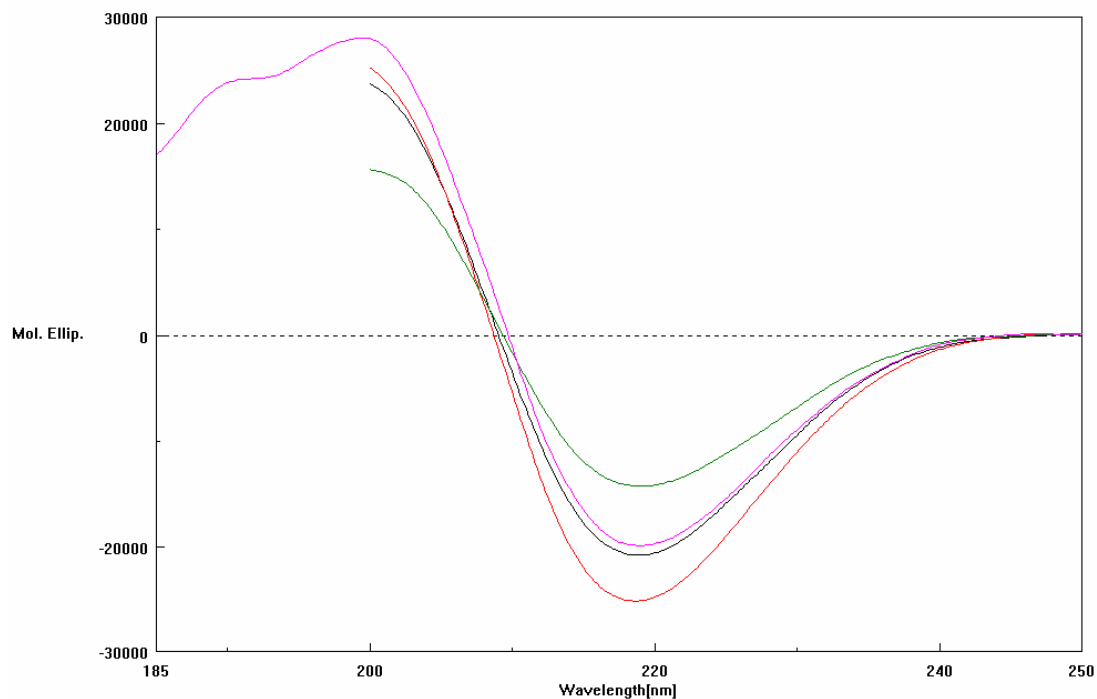
**Fig. 245:** Spettri CD di EAbuK 16-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



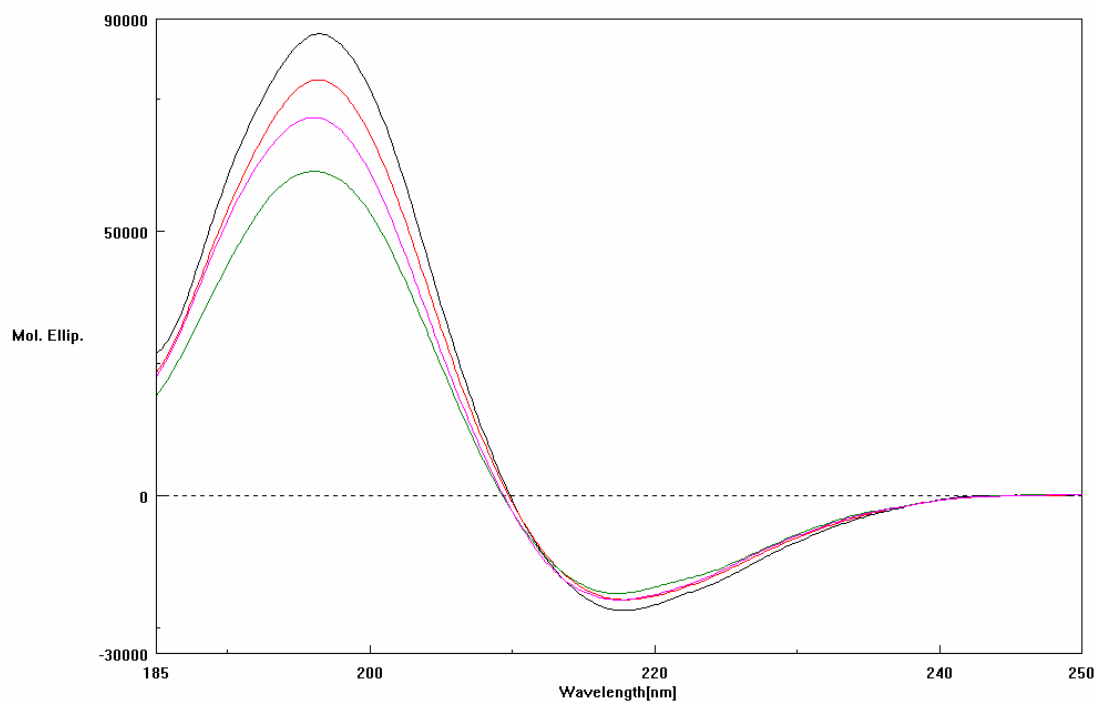
**Fig. 246:** Spettri CD di EAbuK 16-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).



**Fig. 247:** Spettri CD di EAbuK 16-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (? ), 25% TFE (? ), 50% TFE (? ), 75% TFE (? ), 90% TFE (? ), 98% TFE (? ).



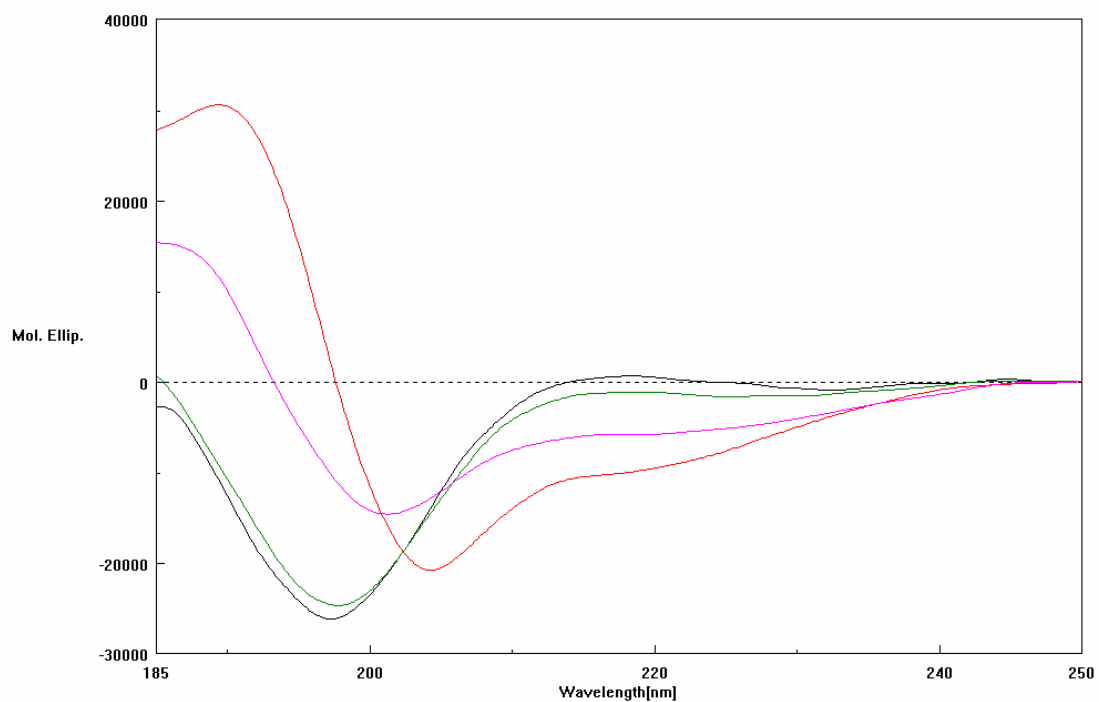
**Fig. 248:** Spettri CD di EAbuK 16-II in tampone TB a:  $t = 0$  min (?),  $t = 5$  min (?),  $t = 24$  ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).



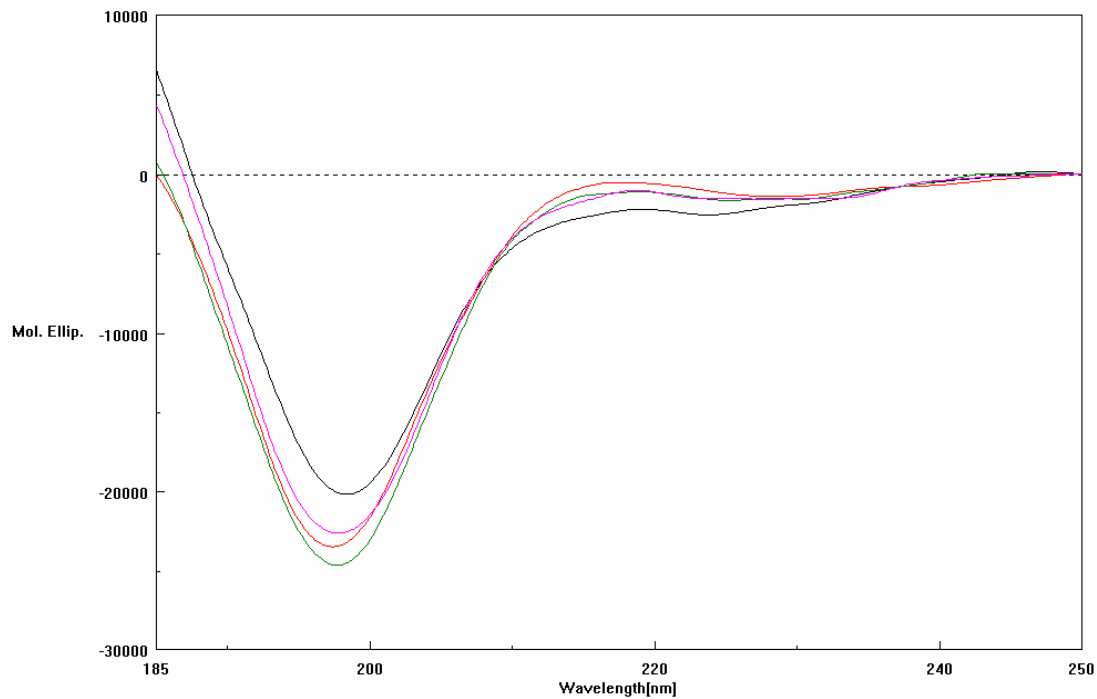
**Fig. 249:** Spettri CD di EAbuK 16-II a diverse concentrazioni in  $H_2O$ :  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

## EAbuK 8-II

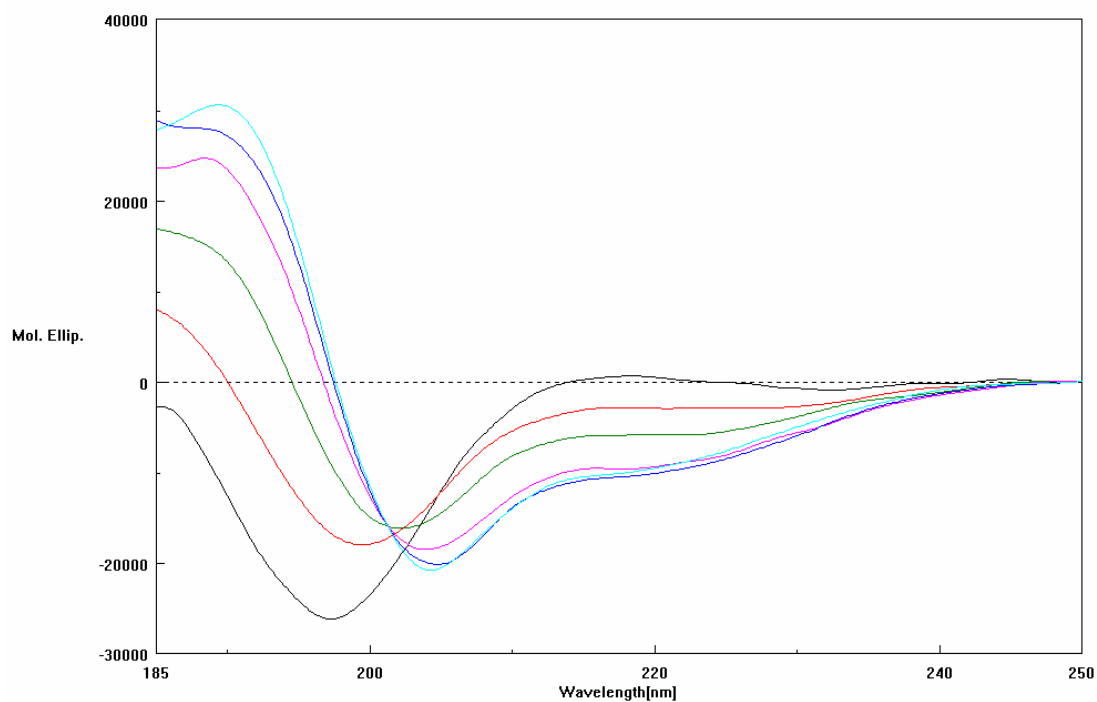
Come si può vedere nelle Figg. 250 e 251, in H<sub>2</sub>O MilliQ e nelle soluzioni di tampone fosfato a pH diversi gli spettri mostrano andamenti tipici della conformazione *random*, in quanto è presente una singola banda negativa centrata intorno ai 197 nm. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. In soluzione micellare si nota un aumento di strutturazione che è ancora più evidente al crescere della concentrazione di TFE nella soluzione (Fig. 252). In soluzione al 98% di TFE, lo spettro mostra le bande tipiche della conformazione  $\alpha$ -elicoidale il cui contenuto, in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è stato valutato essere del 44.00%. Gli spettri fatti in tampone TB mostrano andamenti quasi esattamente identici, nella zona tra i 200 e i 250 nm, ad indicare l'assenza di fenomeni di aggregazione (Fig. 253). Il crescere della concentrazione sembra avere effetti minimi sulla conformazione di questo peptide (Fig. 254).



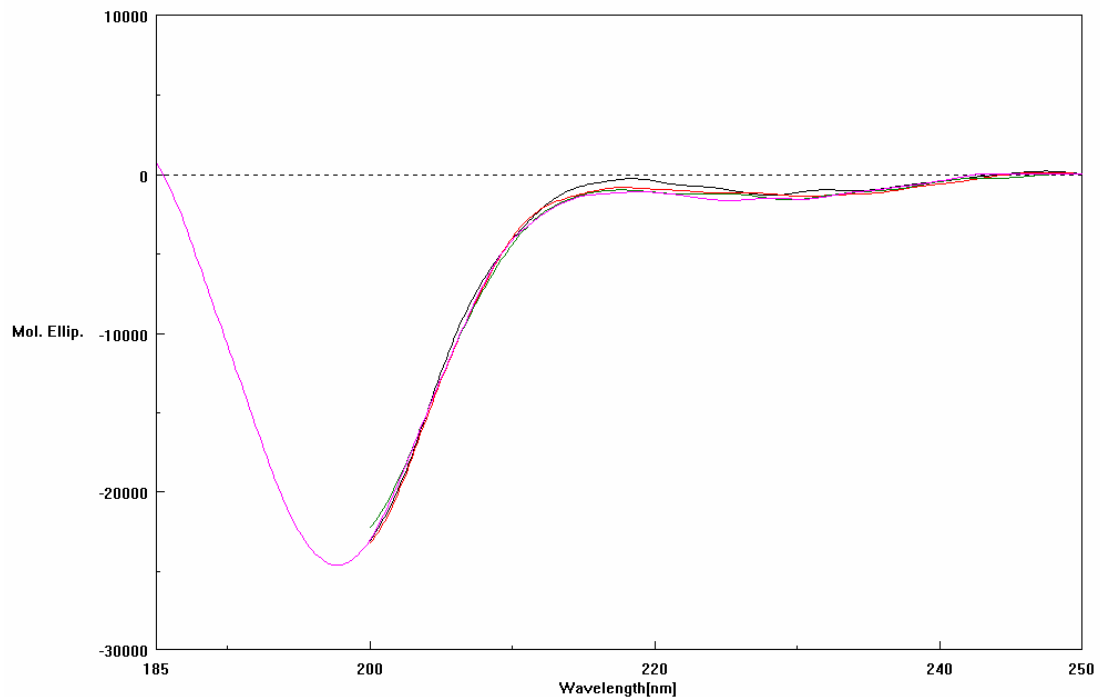
**Fig. 250:** Spettri CD di EAbuK 8-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



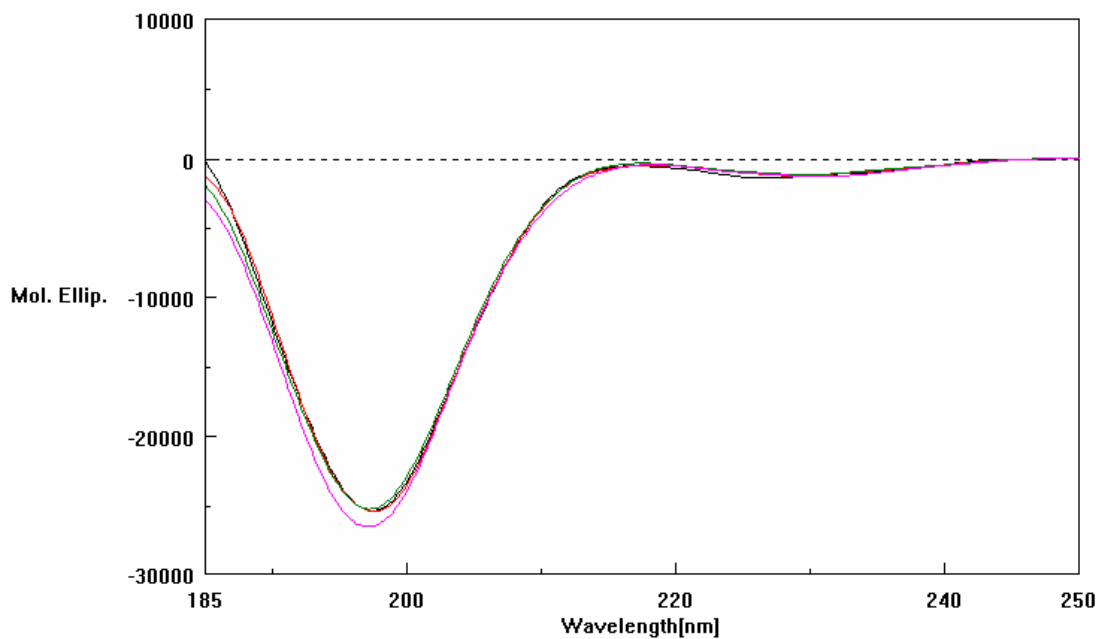
**Fig. 251:** Spettri CD di EAbuK 8-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



**Fig. 252:** Spettri CD di EAbuK 8-II in miscela TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).



**Fig. 253:** Spettri CD di EAbuK 8-II in tampone TB a:  $t = 0$  min (?),  $t = 5$  min (?),  $t = 24$  ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).



**Fig. 254:** Spettri CD di EAbuK 8-II a diverse concentrazioni in  $H_2O$ :  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

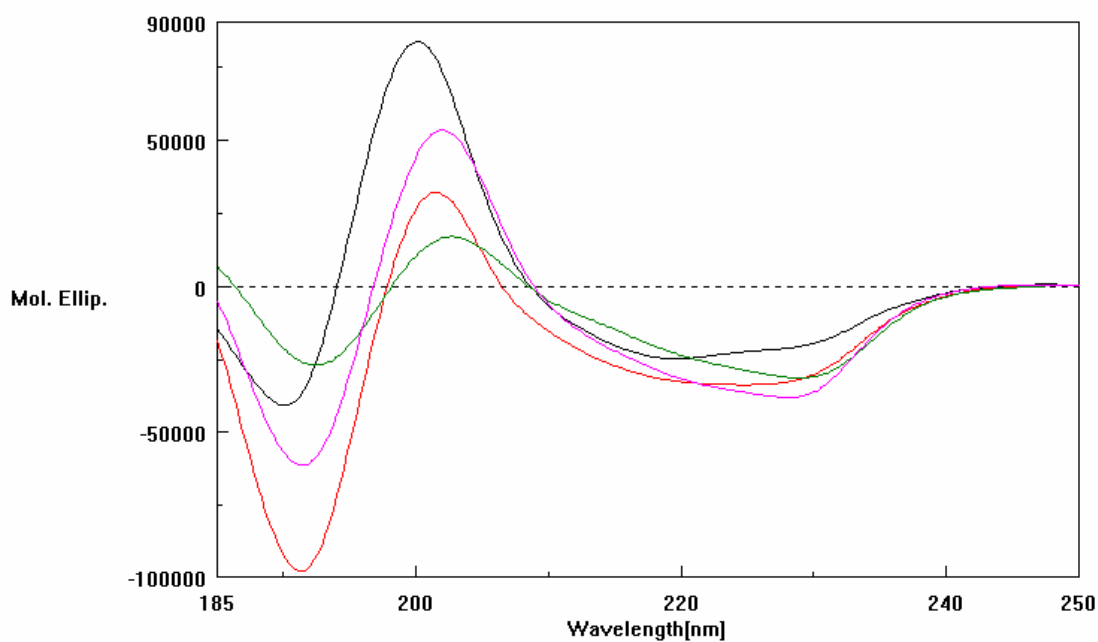
### EYK 16-II

Gli spettri CD relativi al peptide EYK 16-II misurati nei vari solventi sono tutti caratterizzati dalla presenza di tre bande: una banda negativa intensa centrata tra i 190 e i 192 nm; una banda positiva, anch'essa intensa, centrata tra i 200 e i 203 nm ed una

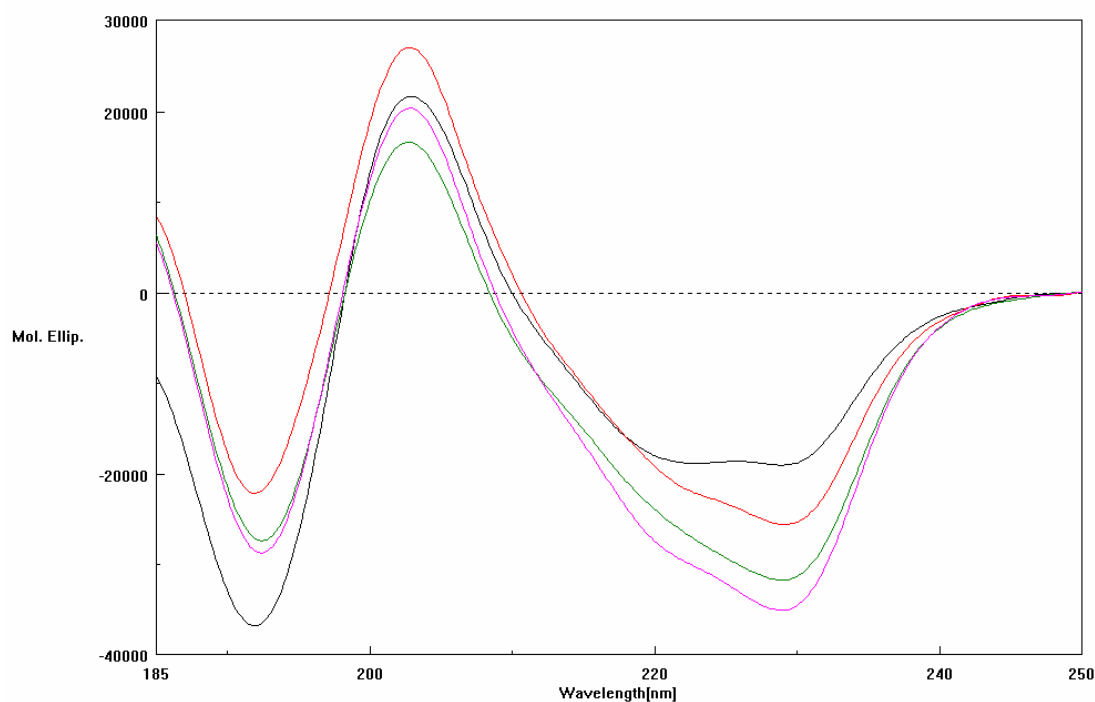
seconda banda negativa, meno intensa, derivante dalla somma di due contributi centrati a 220 e 230 nm. In base alla posizione e all'intensità delle bande, che collocano con buona approssimazione gli spettri nella classe B di Woody (cft. pag. 73), è lecito ipotizzare che questi spettri siano il risultato della somma di più contributi il principale dei quali è attribuibile a conformazioni  $\beta$ -turn di tipo II, il cui peso relativo varia in funzione del solvente utilizzato. Per quanto riguarda la banda negativa a lunghezze d'onda maggiori, essa probabilmente è il risultato della somma di un contributo negativo, dovuto alla conformazione  $\beta$ -turn di tipo II, e un contributo positivo, attribuibile ai residui aromatici Tyr. In H<sub>2</sub>O MilliQ, probabilmente, oltre al contributo della struttura  $\beta$ -turn di tipo II è presente anche un contributo dovuto a strutture di tipo  $\beta$ -sheet in quanto la banda negativa intorno ai 190 nm risulta spostata verso lunghezze d'onda minori rispetto agli altri solventi considerati ed il segnale risulta meno intenso per questa banda e più intenso per la banda positiva intorno ai 200 nm (Fig. 255). Anche contributi dovuti all' $\alpha$ -elica potrebbero avere un effetto simile ma dato che è del tutto assente la banda intorno ai 208 nm, caratteristica di questa conformazione, si può escludere la presenza di questa particolare struttura se non in percentuali estremamente basse. Gli spettri misurati in tampone fosfato sono quelli con un maggiore *red shift* rispetto agli spettri misurati in H<sub>2</sub>O e l'intensità delle bande è notevolmente ridotta rispetto agli altri solventi considerati: è possibile che questi spettri risultino dalla combinazione di tre o più contributi con bande di segno opposto la cui somma ha come effetto una riduzione del segnale. Inoltre, è noto che gli spettri dei residui Tyr e Trp sono pH dipendenti ed infatti, come si può vedere in Fig. 256, la variazione di pH influenza soprattutto il segnale a lunghezze d'onda maggiori. L'aumentare della concentrazione di TFE in soluzione sembra far diminuire la percentuale di conformazioni ordinate presenti in quanto il segnale negativo intorno ai 190 nm si sposta verso lunghezze d'onda maggiori ed aumenta di intensità mentre il segnale positivo intorno ai 200 nm si sposta anch'esso verso lunghezze d'onda maggiori ma diminuisce di intensità; entrambe queste variazioni sono compatibili con l'aggiunta di un contributo negativo centrato intorno ai 197 nm (Fig. 257). La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra una notevole diminuzione dell'intensità della banda negativa intorno ai 230 nm e di quella positiva intorno ai 203 nm (Fig. 258) che potrebbe essere indice di una diminuzione di concentrazione di peptide in soluzione dovuta a fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 259, all'aumentare della concentrazione la banda negativa intorno ai 190 nm si sposta verso lunghezze d'onda maggiori ed aumenta di intensità mentre non ci sono differenze rilevanti nelle bande a lunghezze d'onda maggiori: questo andamento potrebbe



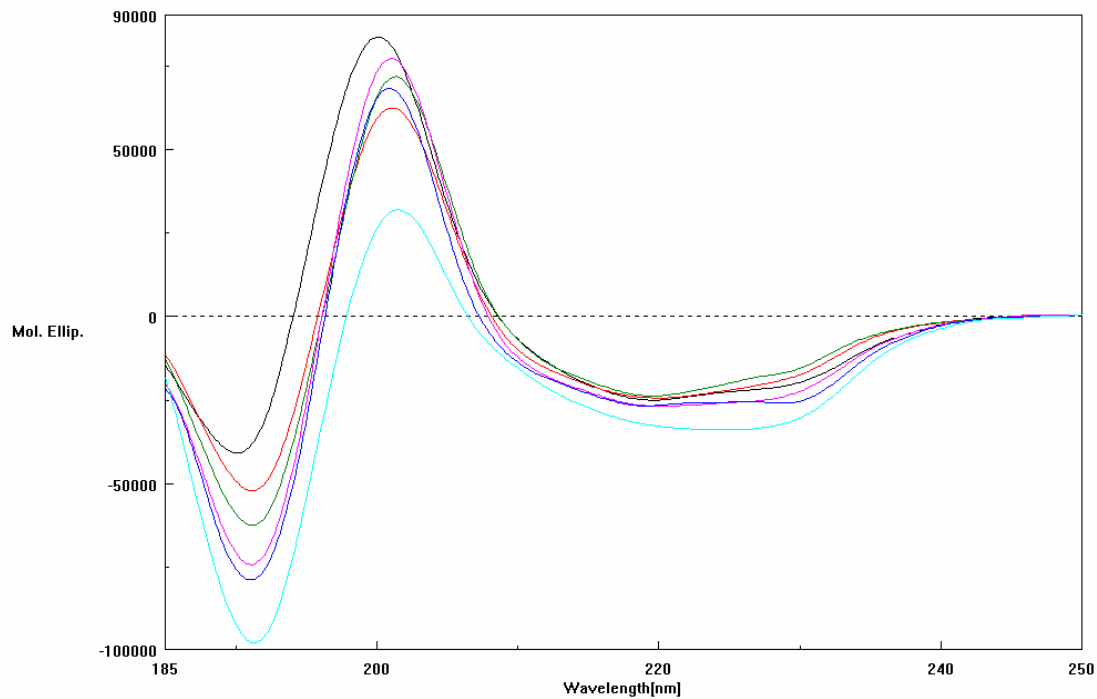
far pensare ad un aumento della percentuale di struttura  $\beta$ -turn di tipo II a spese dei conformeri in struttura  $\beta$ -sheet.



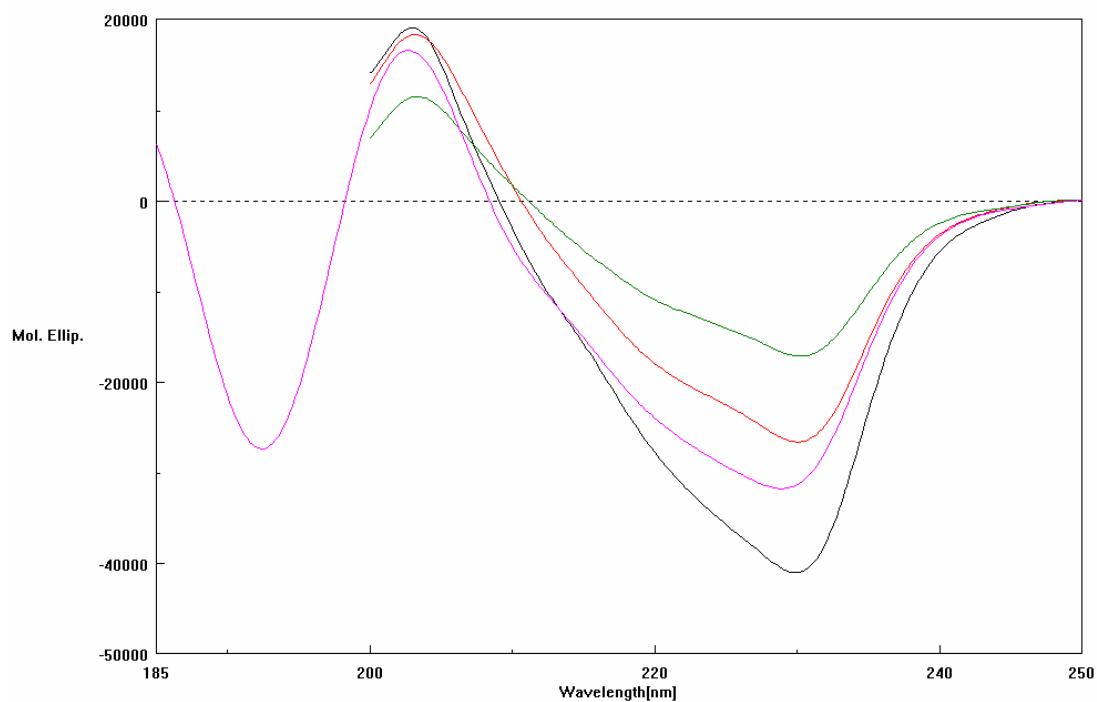
**Fig. 255:** Spettri CD di EYK 16-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



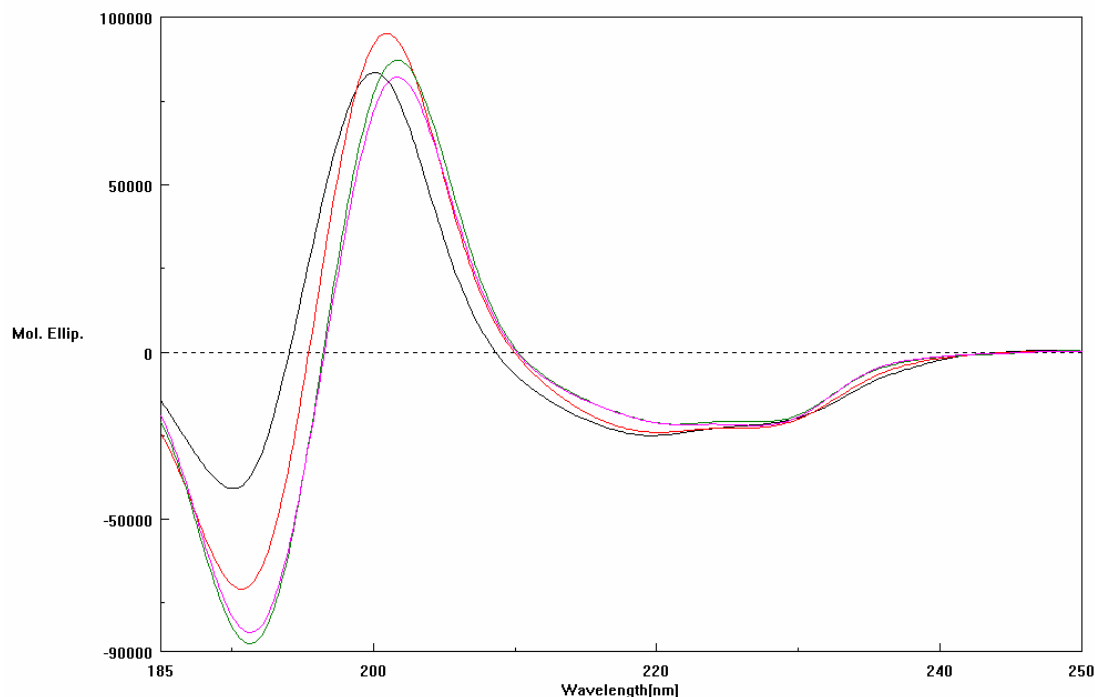
**Fig. 256:** Spettri CD di EYK 16-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



**Fig. 257:** Spettri CD di EYK 16-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).



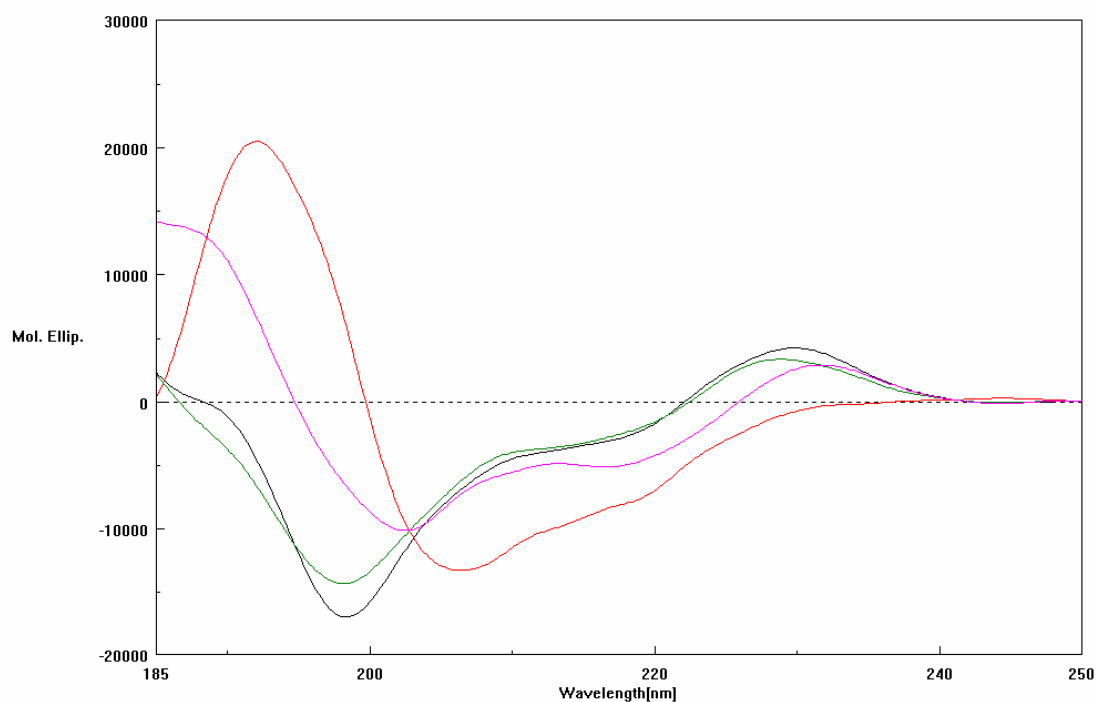
**Fig. 258:** Spettri CD di EYK 16-II in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).



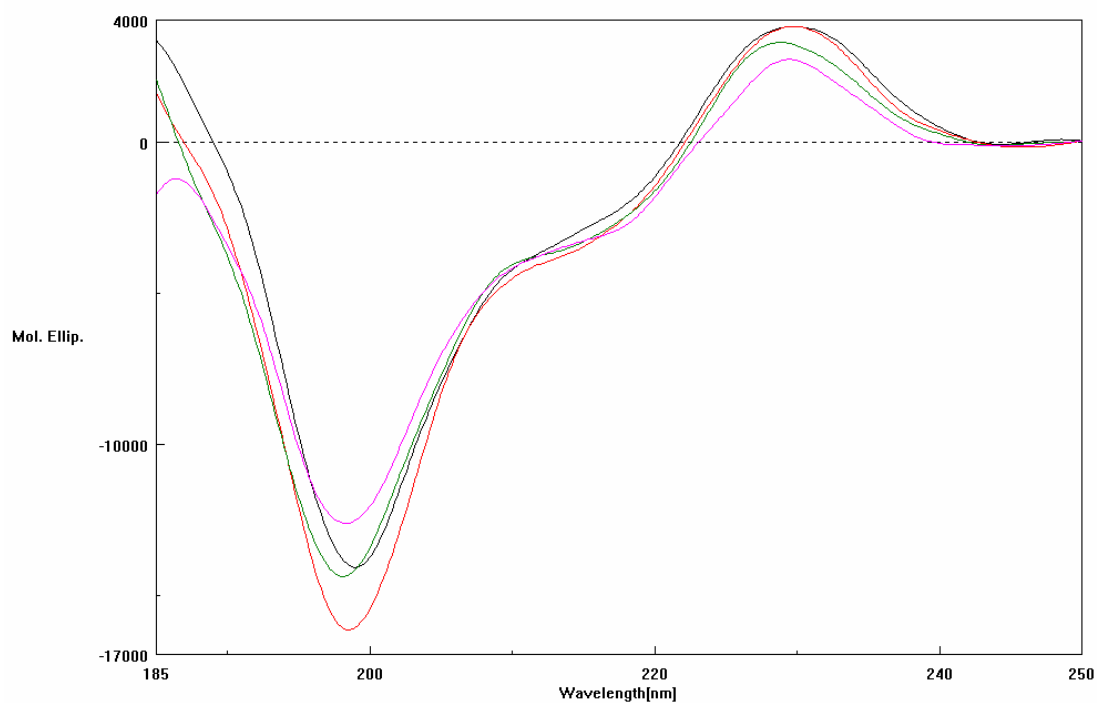
**Fig. 259:** Spettri CD di EYK 16-II a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (? ),  $10^{-4}$  M (? ),  $5 \times 10^{-4}$  M (? ),  $10^{-3}$  M (? ).

### EYK 8-II

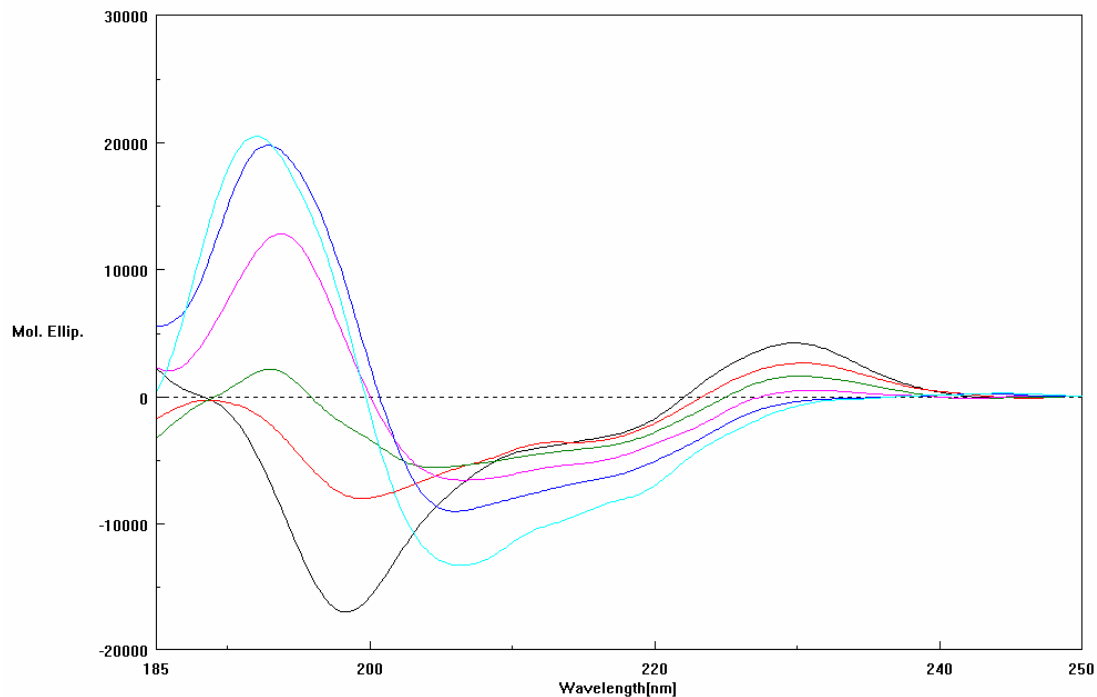
Come si può vedere nelle Figg. 260 e 261, in H<sub>2</sub>O MilliQ e nelle soluzioni di tampone fosfato a diversi pH gli spettri mostrano andamenti tipici della conformazione *random coil*, in quanto è presente una singola banda negativa centrata intorno ai 197 nm ed una banda positiva intorno ai 230 nm che potrebbe derivare da contributi aromatici dovuti a Tyr. In soluzione micellare si nota un aumento di strutturazione che è ancora più evidente al crescere della concentrazione di TFE nella soluzione (Fig. 262). In soluzione al 98% di TFE, lo spettro mostra le bande tipiche della conformazione  $\alpha$ -elicoidale il cui contenuto, in base alla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167], è stato valutato essere del 31.08%, inoltre, intorno ai 195 nm si nota una spalla che potrebbe essere indicativa della presenza di una certa percentuale di conformeri in struttura  $\beta$ -sheet, osservazione confermata dalla presenza di un'ulteriore spalla intorno ai 215 nm compresa tra le due bande negative caratteristiche della struttura ad  $\alpha$ -elica. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. La banda intorno ai 230 nm, dovuta ai residui aromatici Tyr, nelle misure eseguite in tampone TB non mostra alcuna variazione, indice dell'assenza di fenomeni di aggregazione (Fig. 263). Al crescere della concentrazione peptidica si osserva la conservazione della posizione delle bande dicroiche principali e la variazione nell'intensità delle stesse (Fig. 264).



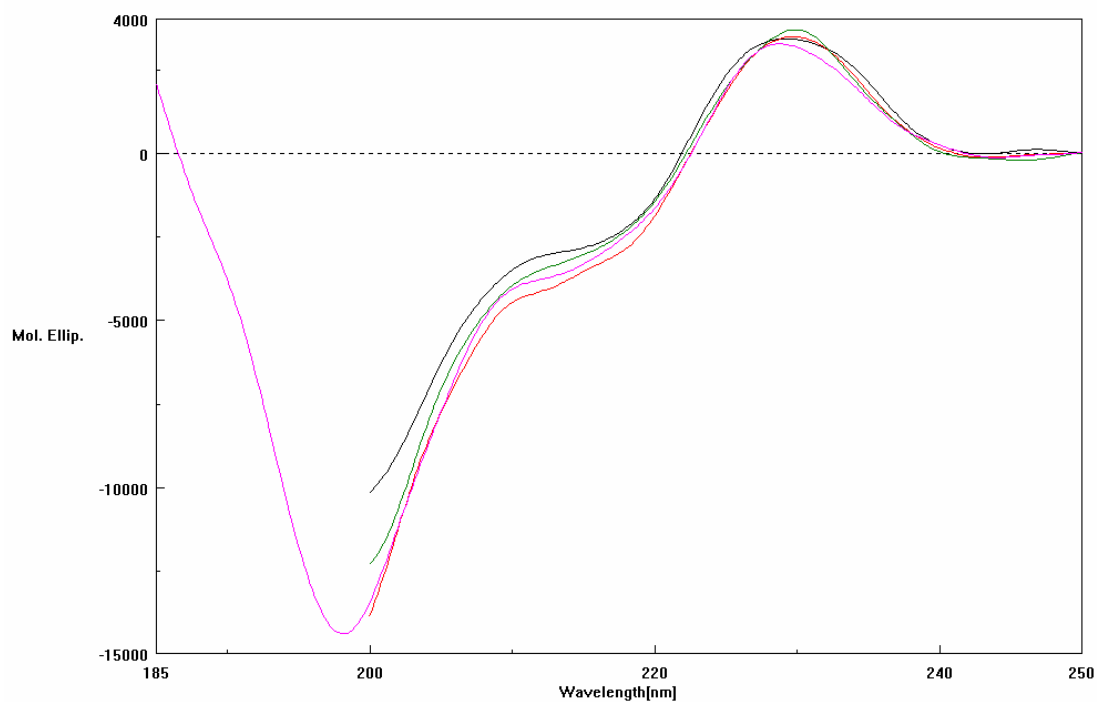
**Fig. 260:** Spettri CD di EYK 8-II in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



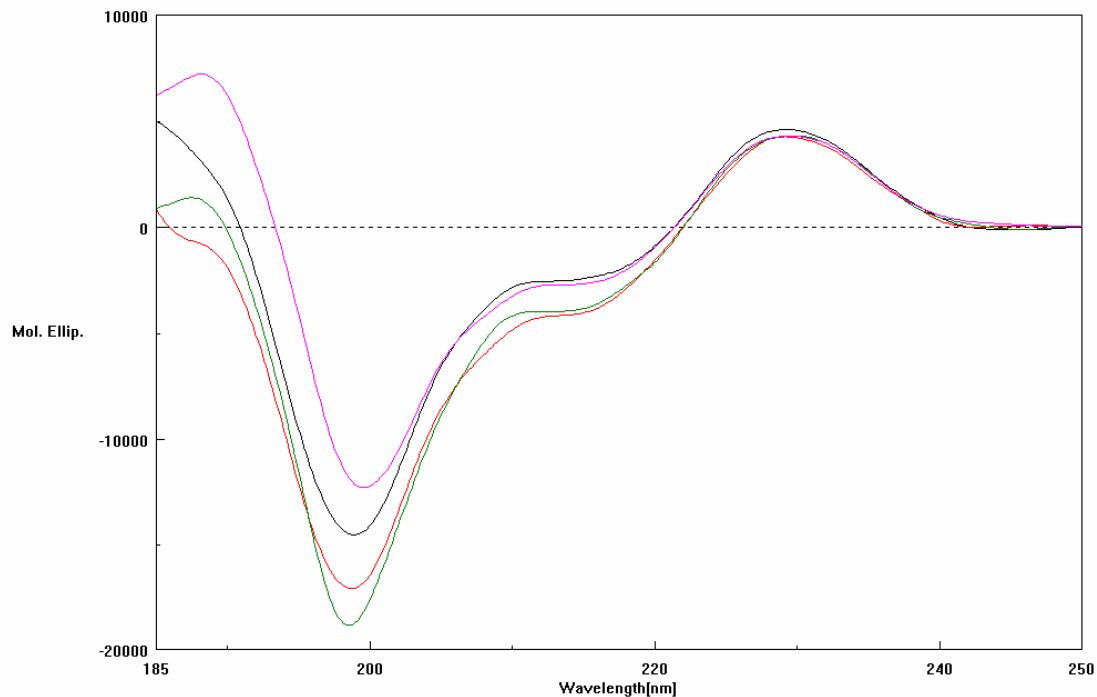
**Fig. 261:** Spettri CD di EYK 8-II in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



**Fig. 262:** Spettri CD di EYK 8-II in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).



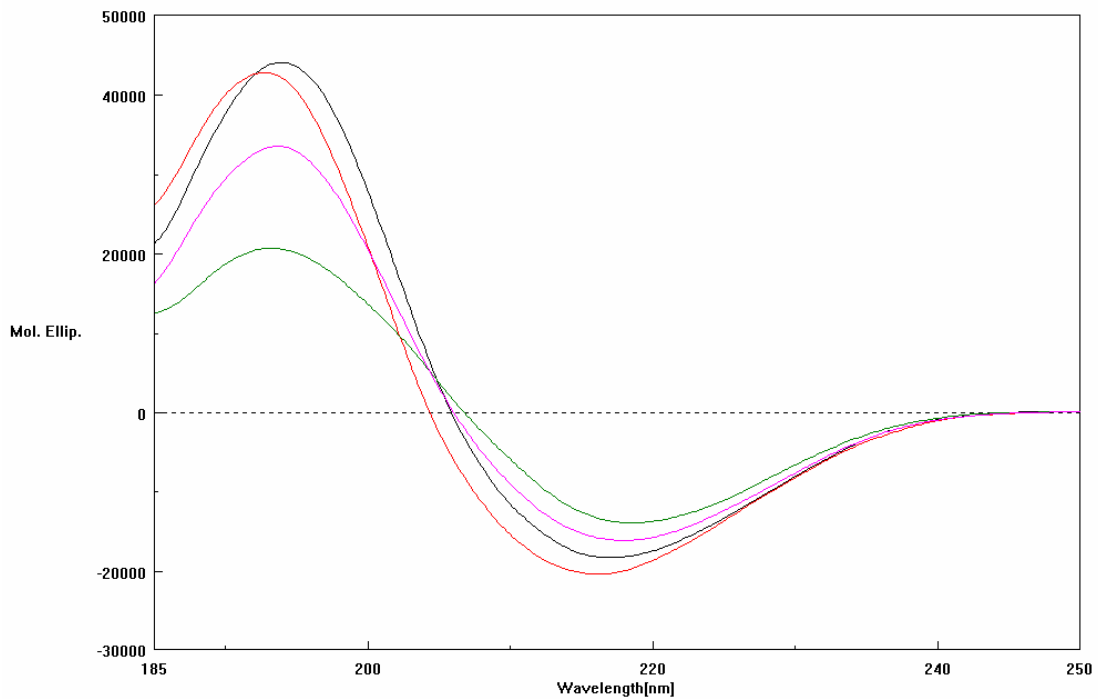
**Fig. 263:** Spettri CD di EYK 8-II in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).



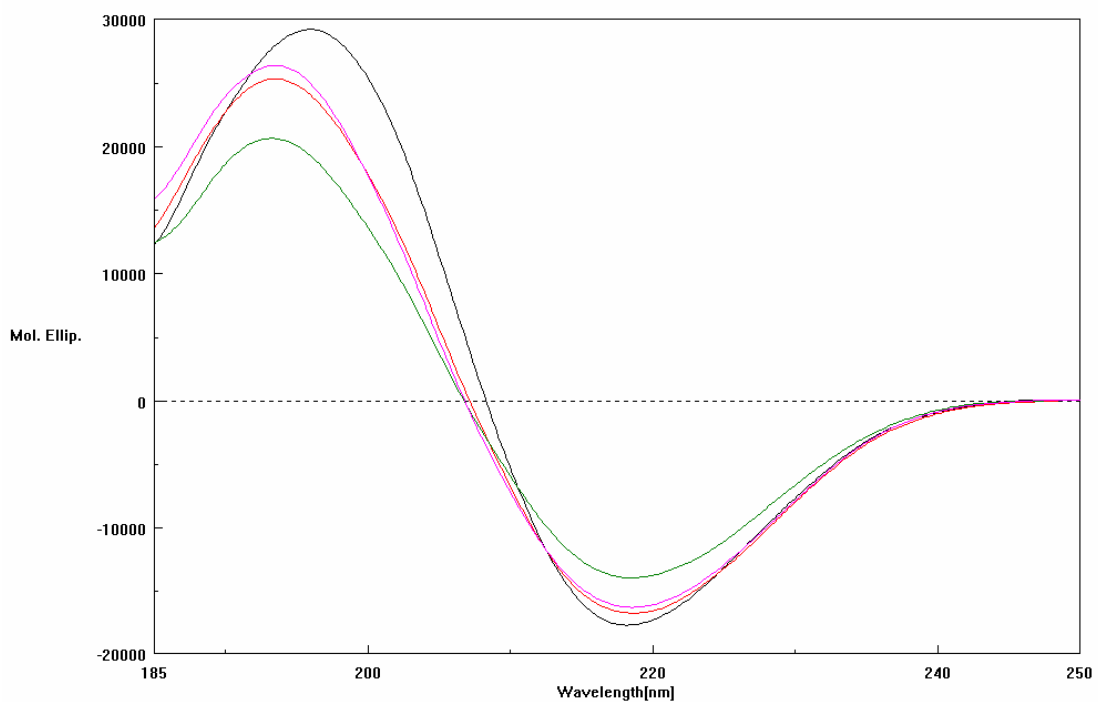
**Fig. 264:** Spettri CD di EYK 8-II a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

### RGD-(EAK 16-II)

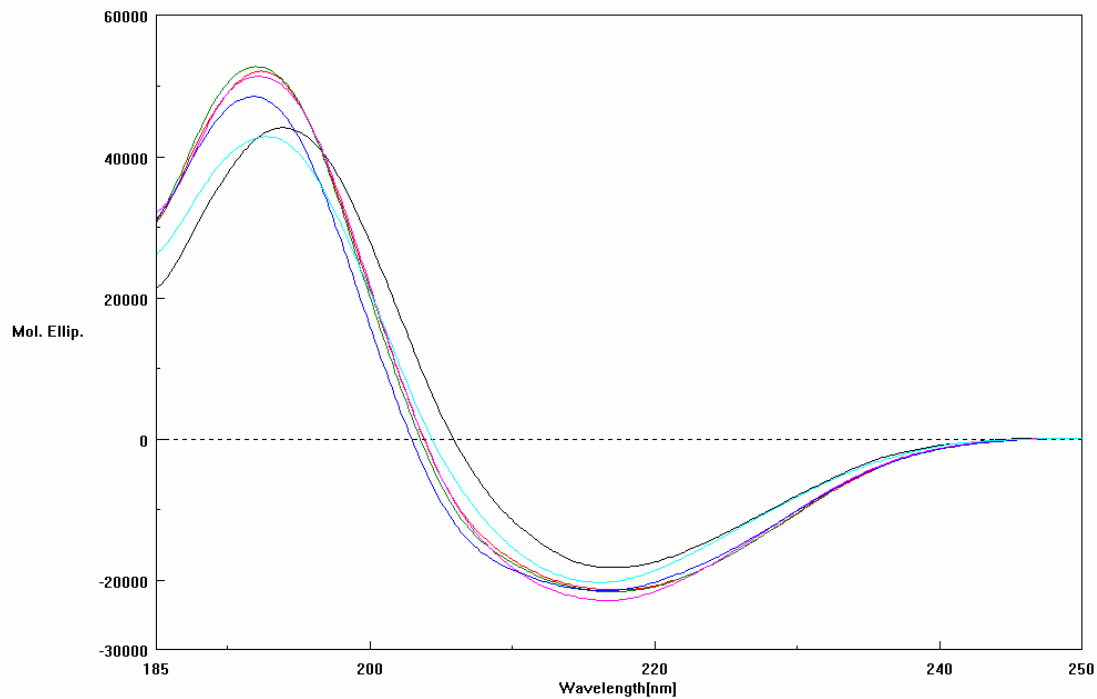
Tutti gli spettri CD misurati nei vari solventi mostrano un andamento tipico della struttura  $\beta$ -sheet, con una banda positiva intorno ai 195 nm e una banda negativa verso i 216-218 nm (Fig. 265-267); ciò che varia a seconda del solvente è l'intensità delle bande che diminuisce passando dalle soluzioni TFE/H<sub>2</sub>O alla soluzione micellare ed alle soluzioni di tampone fosfato, diminuzione probabilmente dovuta ad un aumento di conformeri in struttura *random coil*. La variazione di pH provoca lo spostamento delle bande e la variazione della loro intensità (Fig. 266). La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra una certa diminuzione dell'intensità della banda negativa intorno ai 218 nm (Fig. 268) che potrebbe essere indice di una diminuzione di concentrazione di peptide in soluzione dovuta a fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 269, l'aumento di concentrazione sembra avere come effetto una diminuzione della presenza di strutture ordinate in quanto si verifica la diminuzione dell'intensità della banda positiva a 195 nm.



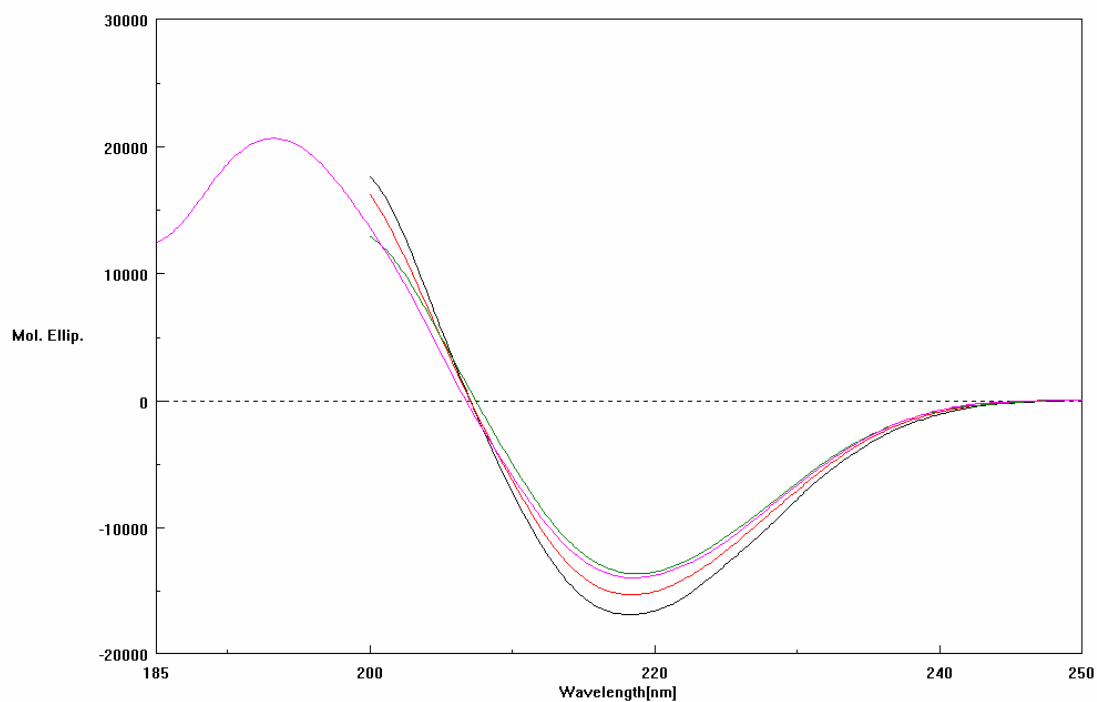
**Fig. 265:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (? ), TFE (? ), tampone fosfato pH 7.4 (? ), soluzione micellare di SDS (? ).



**Fig. 266:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (? ), pH 7.0 (? ), pH 7.4 (? ), pH 8.0 (? ).

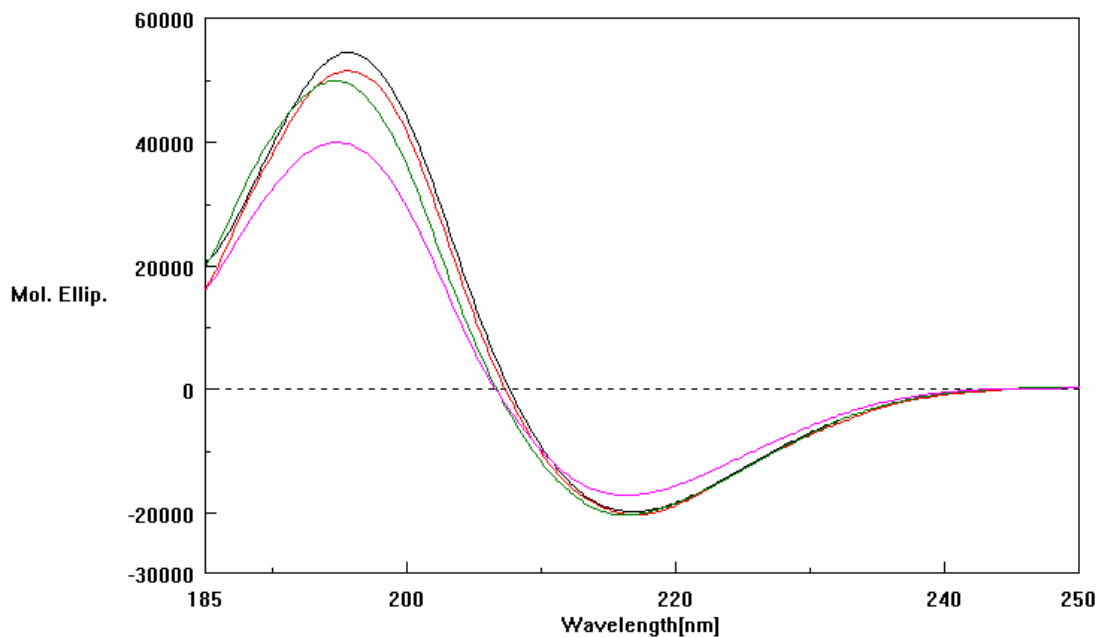


**Fig. 267:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).



**Fig. 268:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).

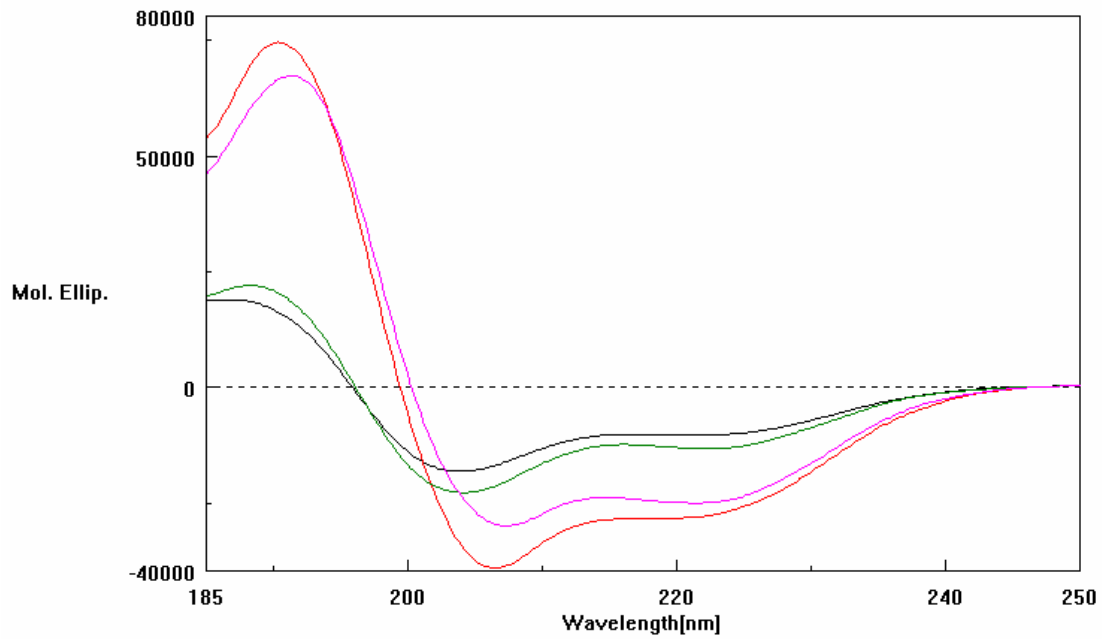




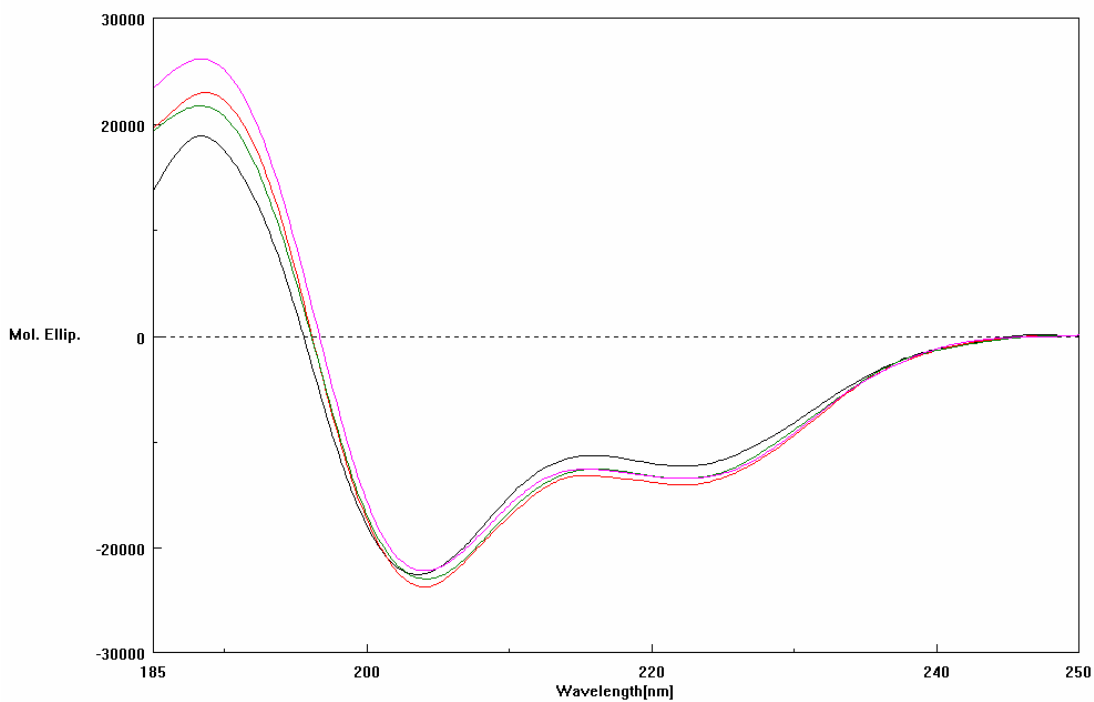
**Fig. 269:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

### RGD-(EAK 16-II) Sc

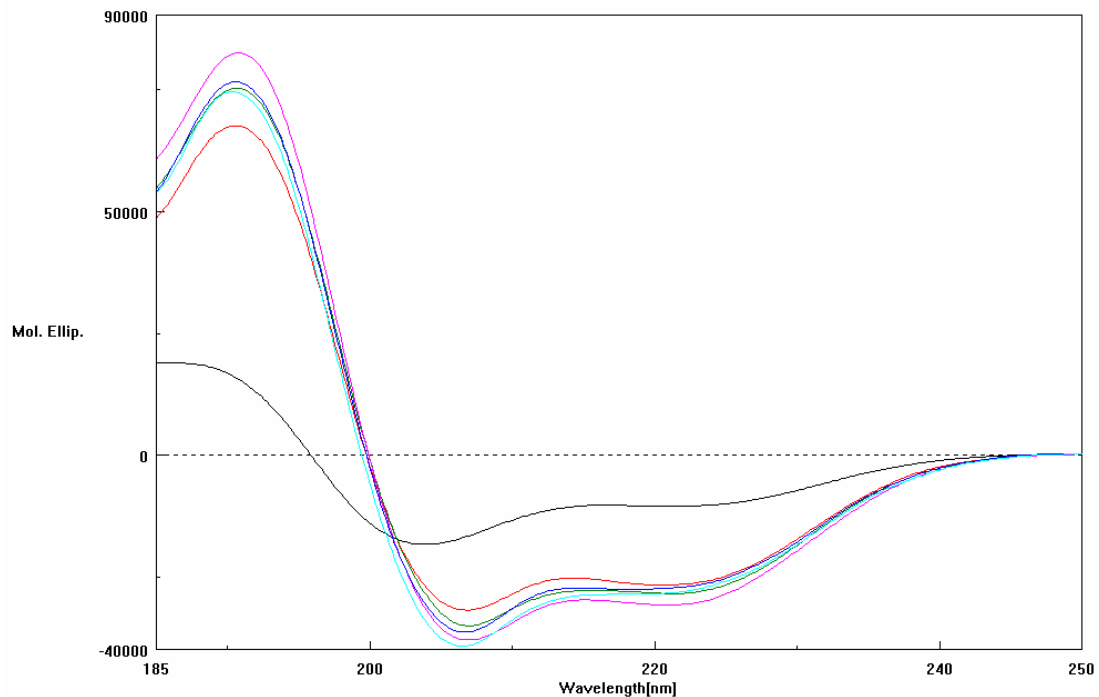
In H<sub>2</sub>O MilliQ e nelle varie soluzioni tampone gli spettri CD mostrano un andamento probabilmente dovuto alla somma di due contributi:  $\alpha$ -elica e *random coil*, mentre in miscele TFE/H<sub>2</sub>O, anche a percentuali relativamente basse di TFE (25%), e in soluzione micellare l'andamento dello spettro CD è tipico della struttura ad  $\alpha$ -elica con un massimo positivo a 192 nm e due bande negative a circa 208 e 222 nm (Figg. 270-272). L'aumento del contenuto di  $\alpha$ -elica passando dall'H<sub>2</sub>O al TFE è confermato anche dai risultati forniti dalla formula di Greenfield e Fasman (cft. pag. 75) [167] che stimano il contenuto di  $\alpha$ -elica in H<sub>2</sub>O pari al 40.44% mentre in soluzione al 98% di TFE del 100%. Variazioni di pH non sembrano influenzare l'andamento spettrale. La misura in TB eseguita dopo 24 ore mostra un andamento molto simile a quella fatta dopo 5 min (Fig. 273): questo potrebbe indicare l'assenza di fenomeni di aggregazione. Come si può vedere in Fig. 274, l'aumento di concentrazione sembra avere come effetto una leggera diminuzione della strutturazione in quanto si nota una diminuzione di intensità delle varie bande presenti.



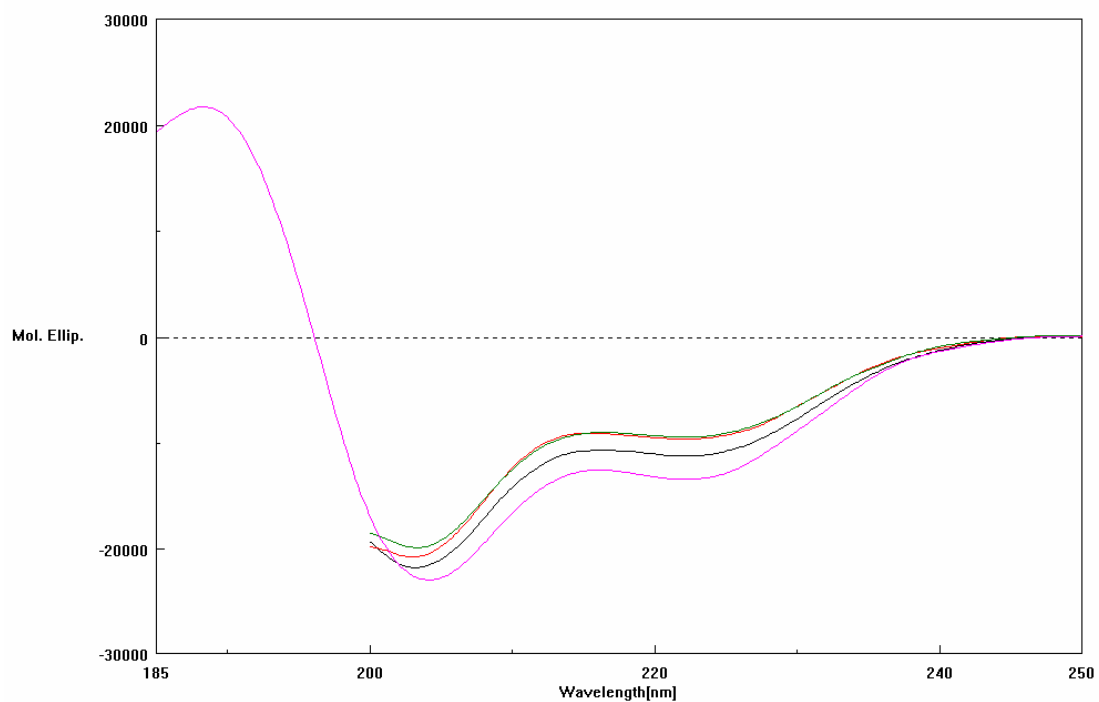
**Fig. 270:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) Sc in diversi solventi: H<sub>2</sub>O MilliQ (?), TFE (?), tampone fosfato pH 7.4 (?), soluzione micellare di SDS (?).



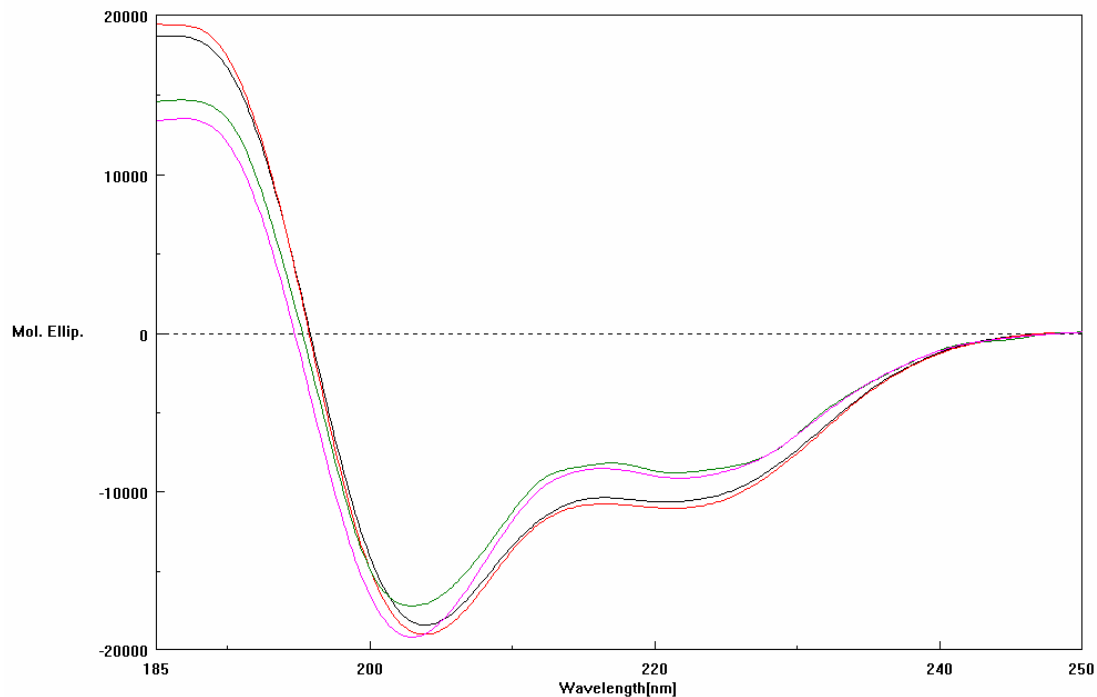
**Fig. 271:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) Sc in tampone fosfato a pH diversi: pH 6.5 (?), pH 7.0 (?), pH 7.4 (?), pH 8.0 (?).



**Fig. 272:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) Sc in miscele TFE/H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (?), 25% TFE (?), 50% TFE (?), 75% TFE (?), 90% TFE (?), 98% TFE (?).

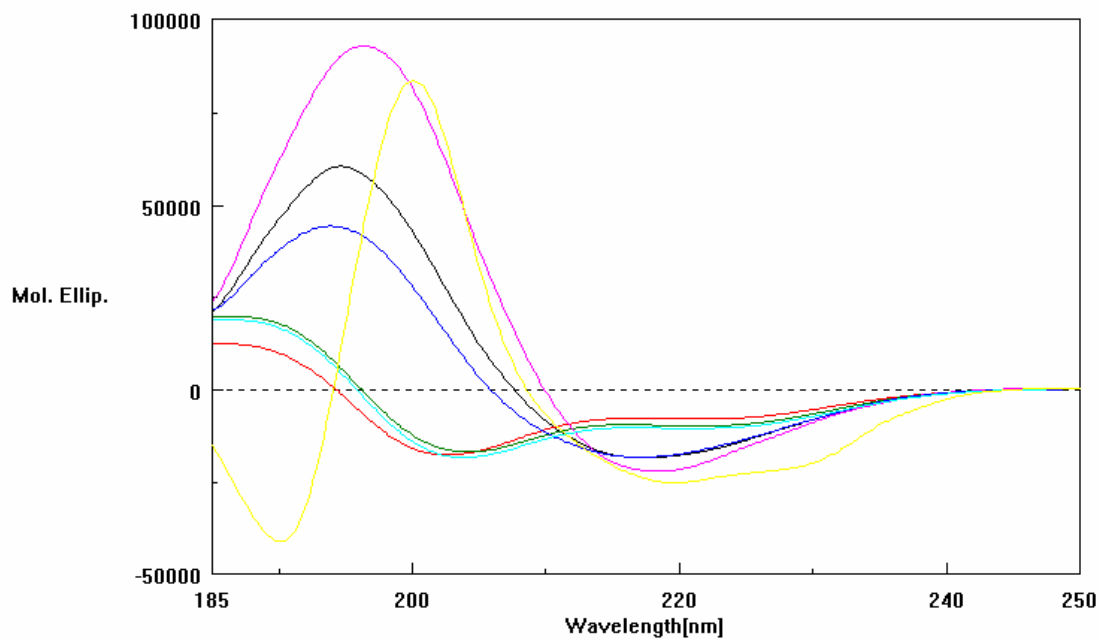


**Fig. 273:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) Sc in tampone TB a: t = 0 min (?), t = 5 min (?), t = 24 ore (?), tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 (?).

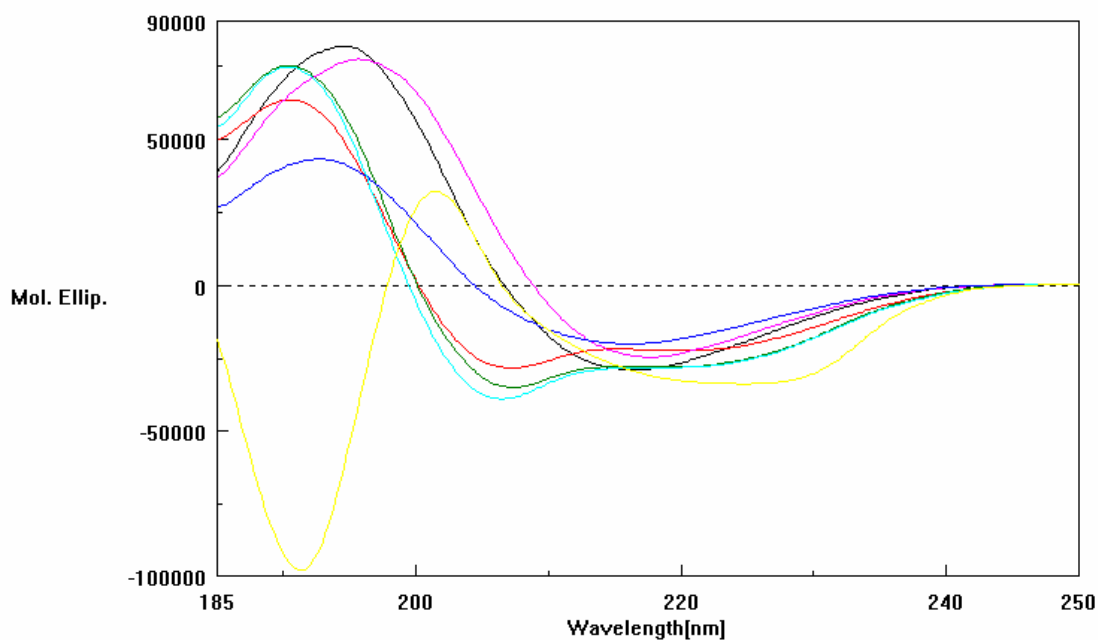


**Fig. 274:** Spettri CD di RGD-(EAK 16-II) Sc a diverse concentrazioni in H<sub>2</sub>O:  $5 \times 10^{-5}$  M (?),  $10^{-4}$  M (?),  $5 \times 10^{-4}$  M (?),  $10^{-3}$  M (?).

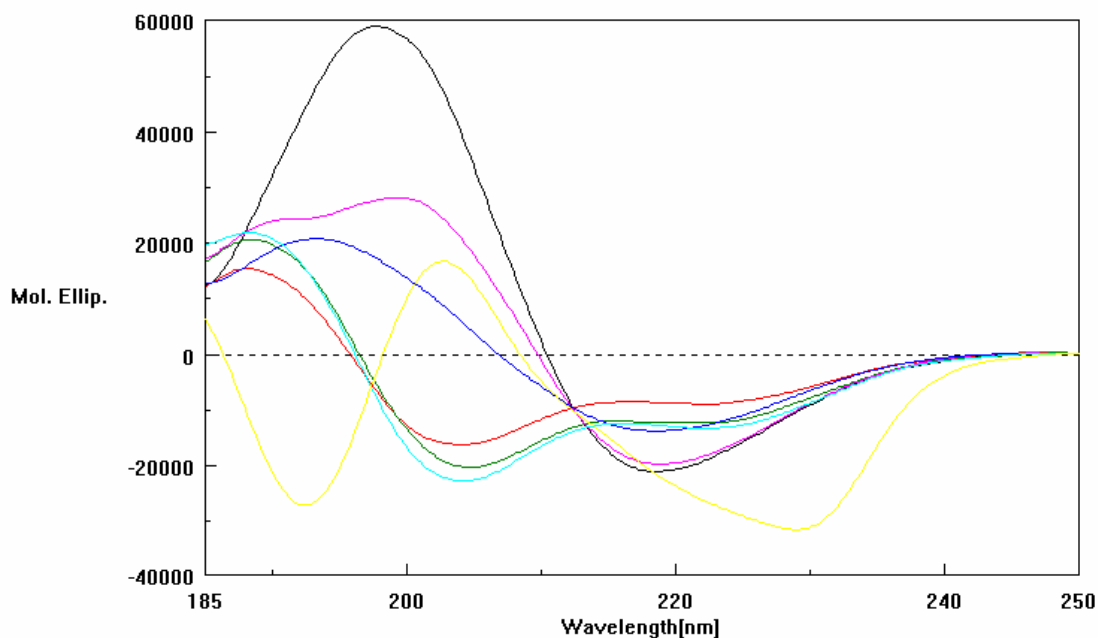
Nelle Figg. 275-278 sono riportati gli spettri CD in diversi solventi dei peptidi ionico-complementari da 16 residui sintetizzati mentre nelle Figg. 279-282 sono riportati gli spettri CD in diversi solventi dei peptidi ionico-complementari da 8 residui sintetizzati.



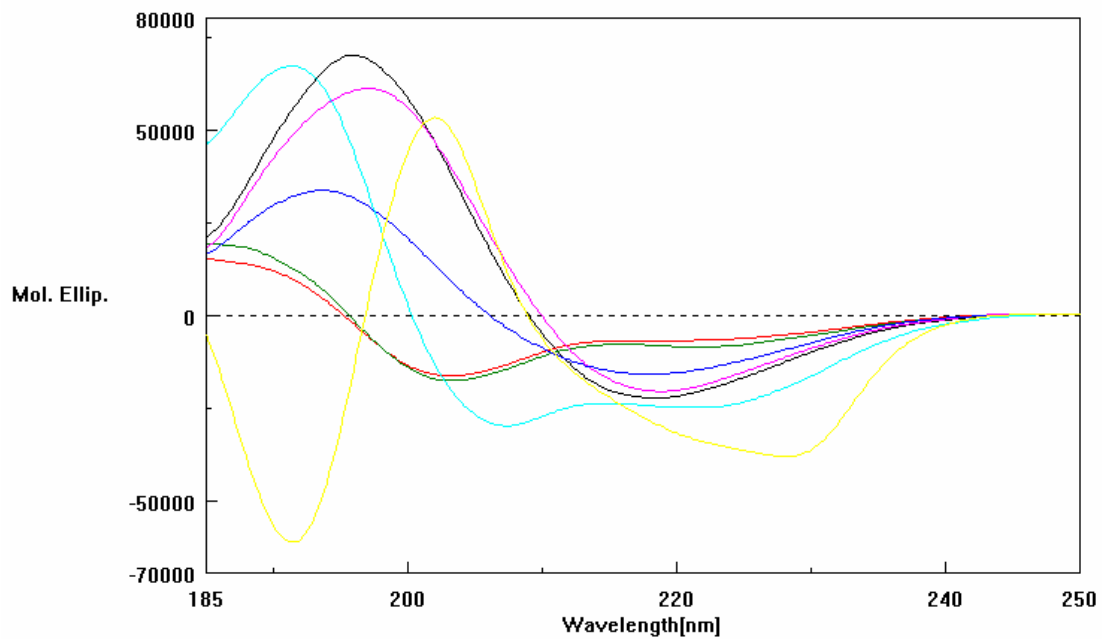
**Fig. 275:** Spettri CD in H<sub>2</sub>O dei seguenti peptidi: EAK 16-II (? ), DAK 16-II (? ), DAOrn 16-II (? ), EAbuK 16-II (? ), EYK 16-II (? ), RGD-(EAK 16-II) (? ), RGD-(EAK 16-II) Sc (? ).



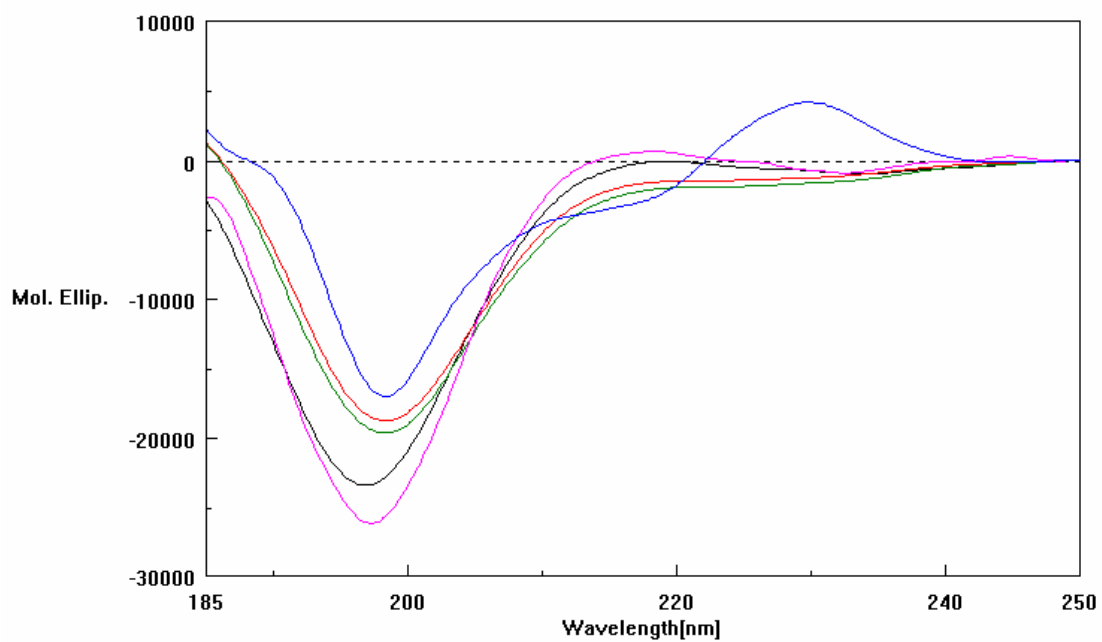
**Fig. 276:** Spettri CD in TFE dei seguenti peptidi: EAK 16-II (? ), DAK 16-II (? ), DAOrn 16-II (? ), EAbuK 16-II (? ), EYK 16-II (? ), RGD-(EAK 16-II) (? ), RGD-(EAK 16-II) Sc (? ).



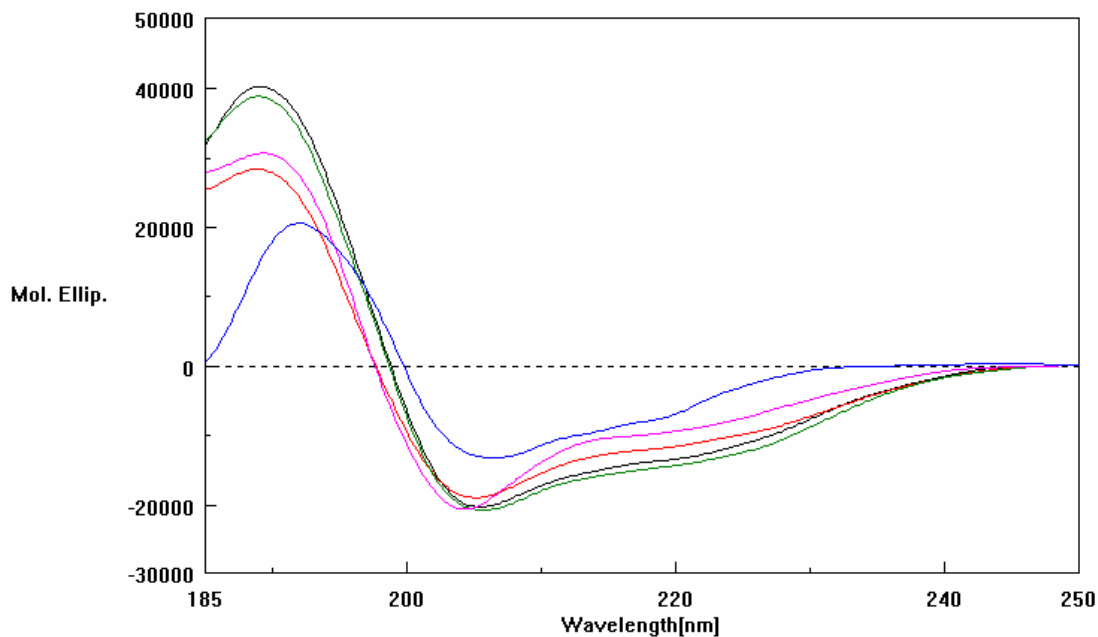
**Fig. 277:** Spettri CD in tampone fosfato a pH 7.4 dei seguenti peptidi: EAK 16-II (? ), DAK 16-II (? ), DAOrn 16-II (? ), EAbuK 16-II (? ), EYK 16-II (? ), RGD-(EAK 16-II) (? ), RGD-(EAK 16-II) Sc (? ).



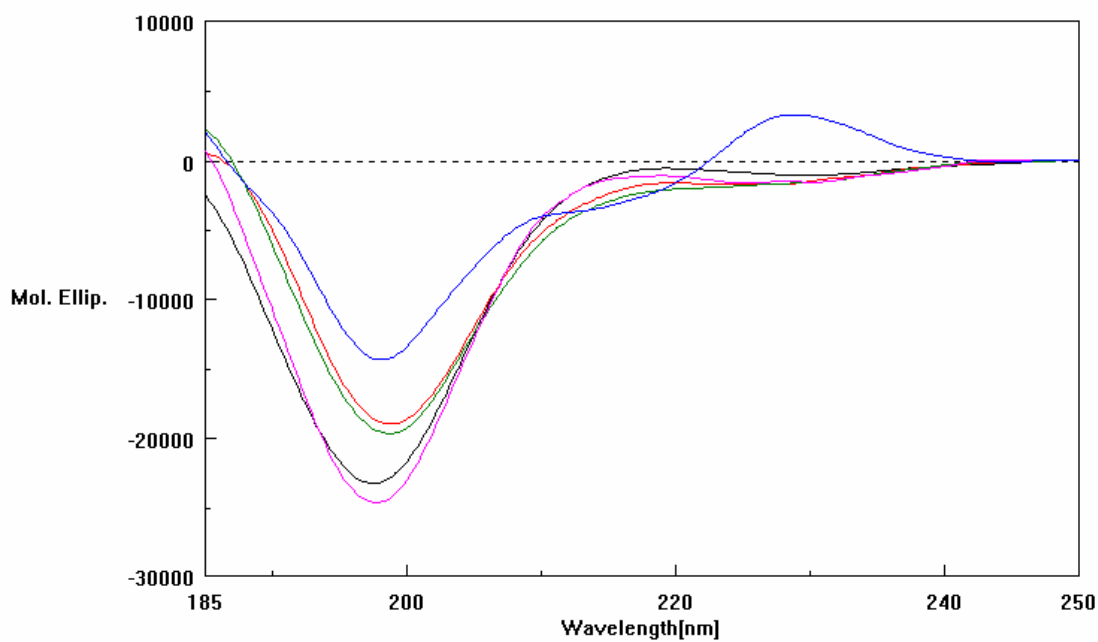
**Fig. 278:** Spettri CD in soluzione micellare di SDS dei seguenti peptidi: EAK 16-II (? ), DAK 16-II (? ), DAOrn 16-II (? ), EAbuK 16-II (? ), EYK 16-II (? ), RGD-(EAK 16-II) (? ), RGD-(EAK 16-II) Sc (? ).



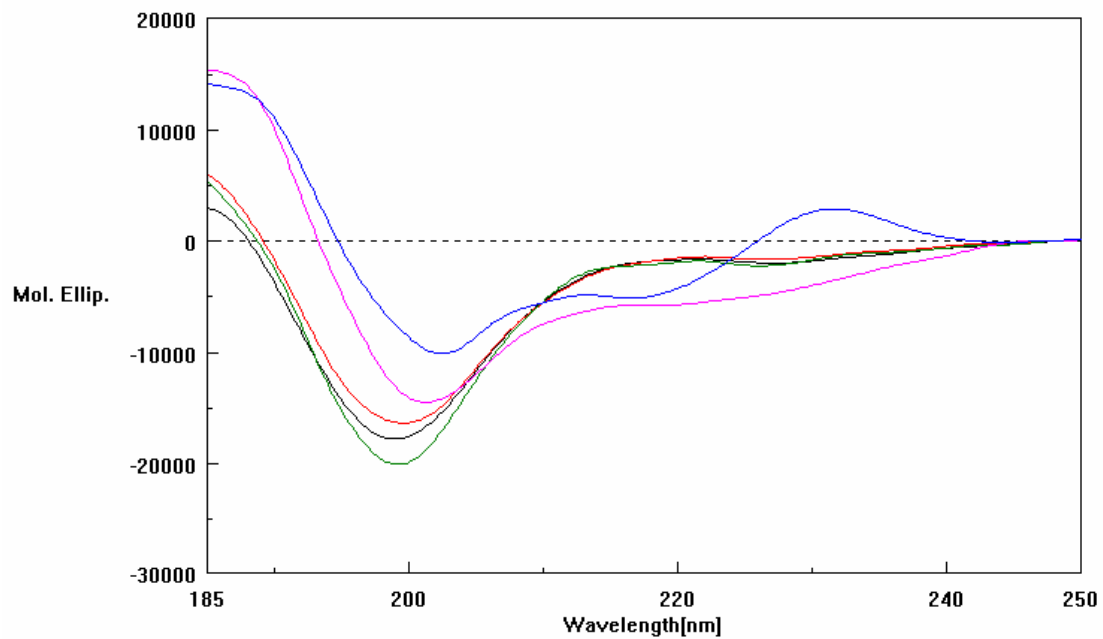
**Fig. 279:** Spettri CD in H<sub>2</sub>O dei seguenti peptidi: EAK 8-II (? ), DAK 8-II (? ), DAOrn 8-II (? ), EAbuK 8-II (? ), EYK 8-II (? ).



**Fig. 280:** Spettri CD in TFE dei seguenti peptidi: EAK 8-II (? ), DAK 8-II (? ), DAOrn 8-II (? ), EAbuK 8-II (? ), EYK 8-II (? ).



**Fig. 281:** Spettri CD in tampone fosfato a pH 7.4 dei seguenti peptidi: EAK 8-II (? ), DAK 8-II (? ), DAOrn 8-II (? ), EAbuK 8-II (? ), EYK 8-II (? ).



**Fig. 282:** Spettri CD in soluzione micellare di SDS dei seguenti peptidi: EAK 8-II (? ), DAK 8-II (? ), DAOm 8-II (? ), EAbuK 8-II (? ), EYK 8-II (? ).



## PREPARAZIONE DI MEMBRANE UTILIZZANDO PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI

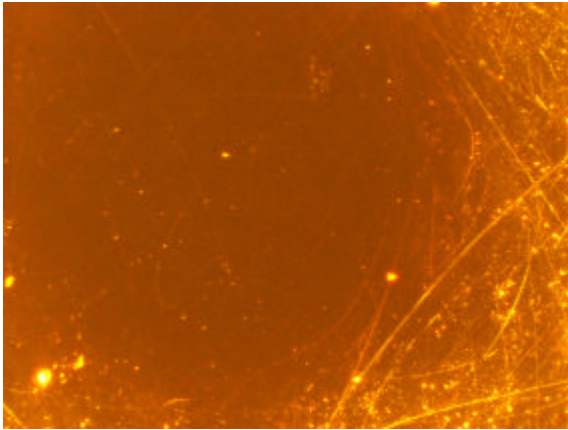
Per studiare l'effettiva capacità dei peptidi ionico-complementari sintetizzati di formare delle fibre, stadio iniziale nella produzione di membrane, sono state fatte seccare delle soluzioni tampone di fosfato di sodio e NaCl contenenti 12.5 nmoli di ogni peptide su una piastra in polistirene da 24 pozzetti (di quelle usate per i saggi biologici *in vitro*) e si è analizzata al microscopio ottico la struttura del residuo secco sul fondo di ogni pozzetto.

Si è utilizzato lo stesso tampone, denominato TB (cft. pag. 270), impiegato per eseguire le misure CD ed avente la seguente composizione: sodio fosfato 10 mM e NaCl 150 mM a pH 7.4.

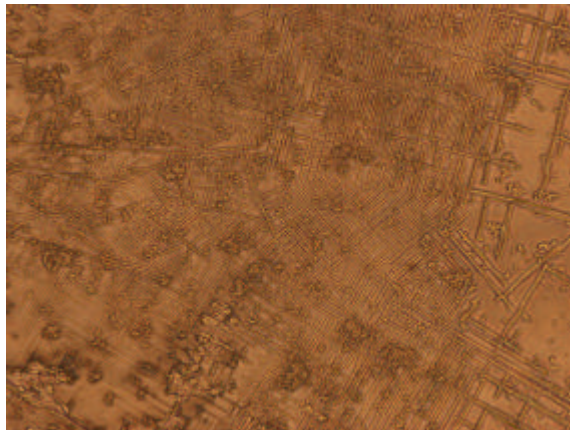
Le varie soluzioni sono state preparate nel seguente modo: a 245  $\mu\text{L}$  di tampone sono stati aggiunti 5  $\mu\text{L}$  di soluzione madre preparata per le misure CD (in modo da avere una concentrazione di peptide  $5 \times 10^{-5}$  M); la soluzione è stata mescolata velocemente prima del suo trasferimento in pozzetto. In un pozzetto sono stati posti 250  $\mu\text{L}$  di tampone quale riferimento. Sono stati inoltre usati come controlli dei peptidi non auto-assemblanti, (GRGDSP)<sub>4</sub>K, (352-360)HVP e (58-87)BMP-2, per escludere che quanto osservato potesse essere dovuto alla semplice presenza di un peptide. Le varie soluzioni sono state fatte asciugare a 60°C e il processo di essiccazione ha impiegato dalle 2 ore e 30 min alle 3 ore e 30 min. Si è notata la scomparsa del solvente prima al centro dei pozzetti e, solo in seguito, lungo i bordi. Per i peptidi EAK 16-II, EAbuK 16-II, EYK 16-II e RGD-(EAK 16-II) si sono osservati dei centri di nucleazione ad occhio nudo già dopo un'ora e 30 min dall'inizio dell'essiccazione e una volta terminato il processo i pozzetti corrispondenti a questi peptidi sono risultati opachi e ricoperti da tratti di membrana.

Sono state fatte diverse fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) a diversi ingrandimenti: 5 X, che corrisponde approssimativamente ad un'area di piastra pari a  $1.67 \times 1.25$  mm, 10 X, che corrisponde ad un'area di circa  $(8.35 \times 6.25) \times 10^{-1}$  mm e 40 X che riproduce un'area di piastra pari a  $(2.09 \times 1.56) \times 10^{-1}$  mm (questi valori di area sono stati ricavati eseguendo delle fotografie, nelle medesime condizioni di ingrandimento, di una camera di Burkner).

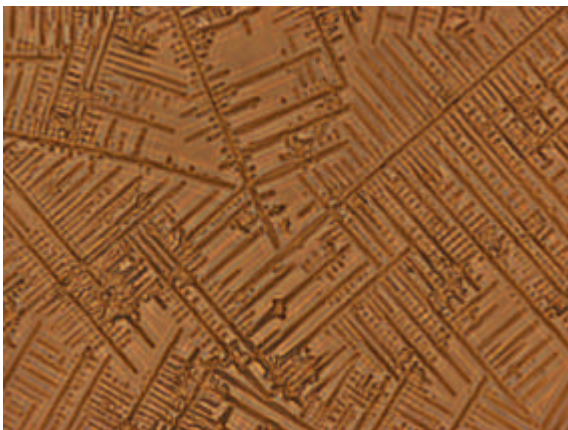
In Fig. 283 sono riportate alcune delle immagini più interessanti per ogni peptide considerato.



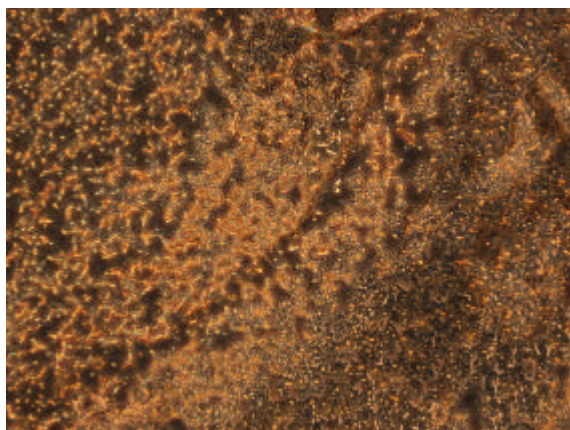
Polistirene senza niente (5 X)



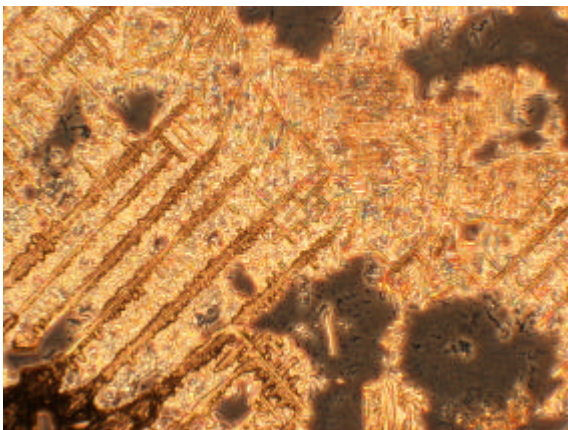
Tampone (5 X)



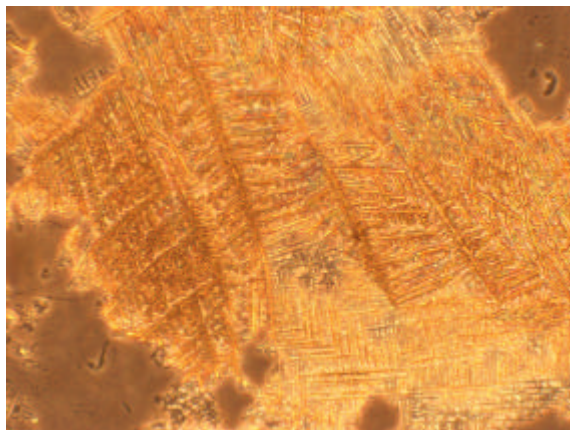
Tampone (10 X)  
(verso il bordo del pozzetto)



Tampone (5 X)  
(verso il centro del pozzetto)



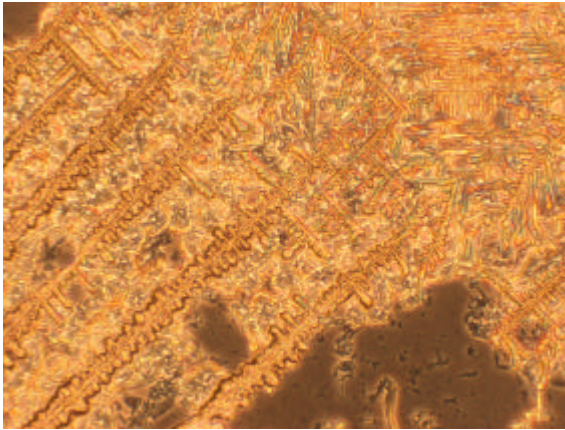
EAK 16-II (5 X)



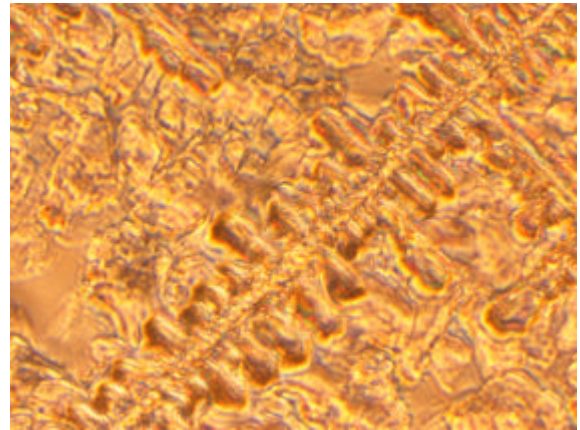
EAK 16-II (10 X)

**Fig. 283-1:** Fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) di ciò che rimane dopo aver portato a secco 250  $\mu$ L di soluzione salina contenente un peptide su una piastra in polistirene da 24 pozzetti.

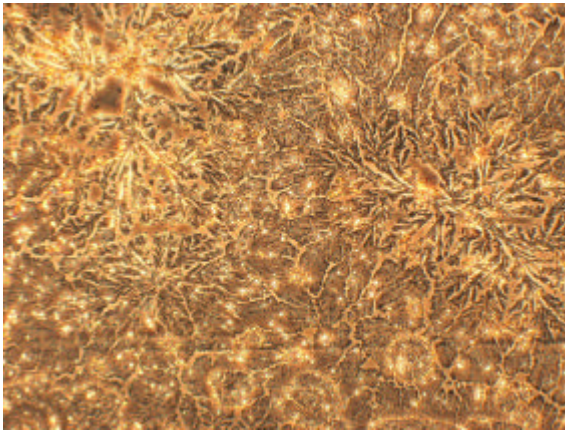




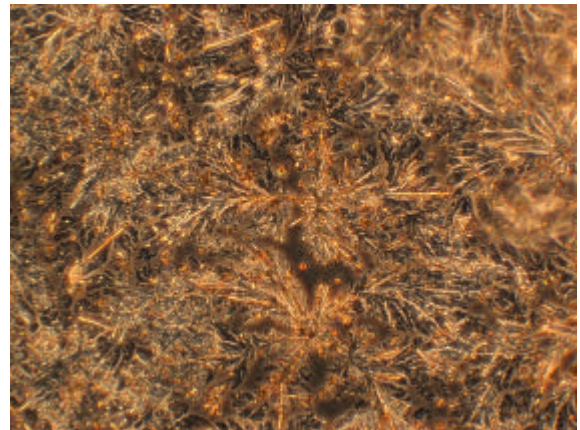
EAK 16-II (10 X)



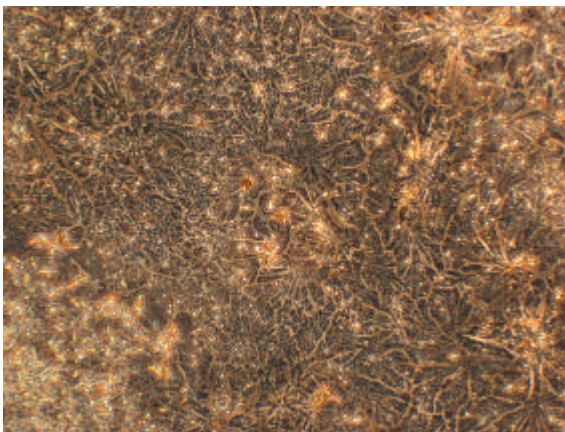
EAK 16-II (40 X)



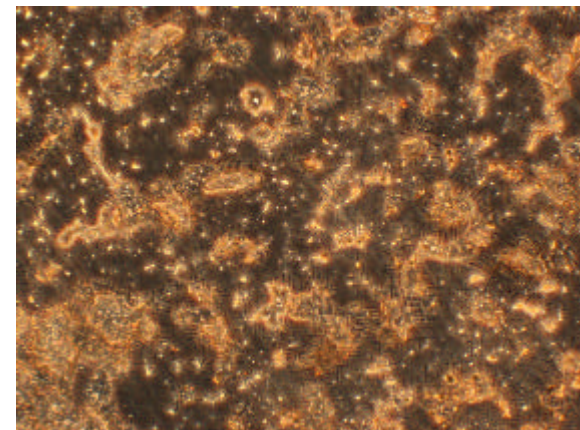
EAK 8-II (5 X)



DAK 16-II (5 X)



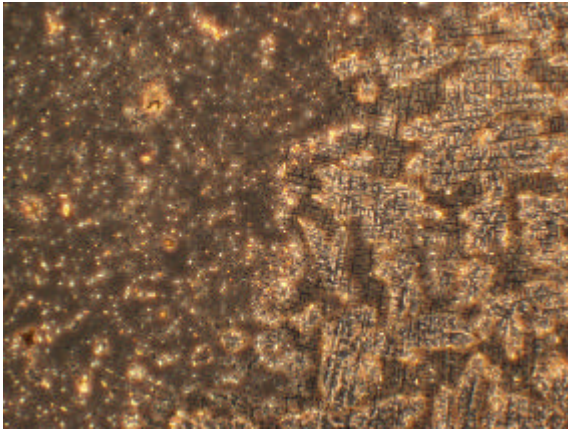
DAK 8-II (5 X)



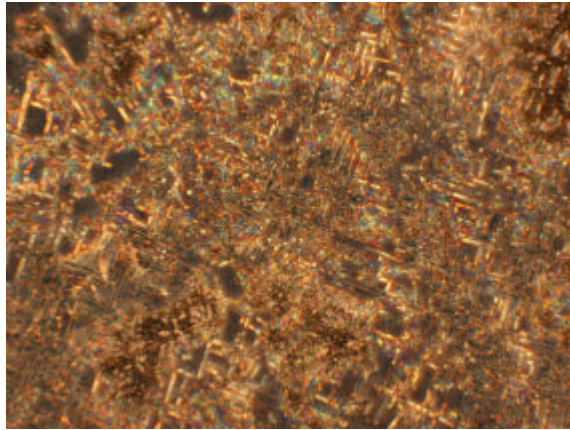
DAOrn 16-II (5 X)

**Fig. 283-2:** Fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) di ciò che rimane dopo aver portato a secco 250  $\mu$ L di soluzione salina contenente un peptide su una piastra in polistirene da 24 pozzetti.

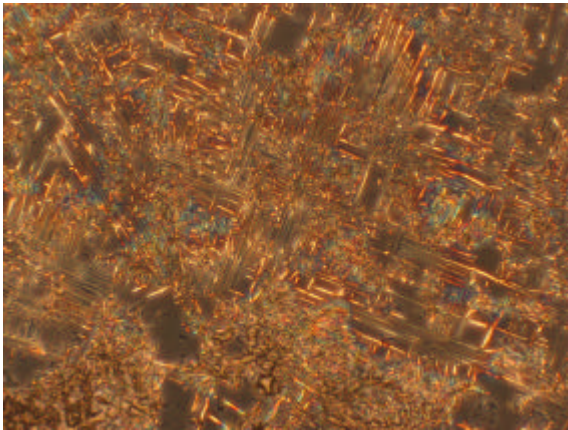




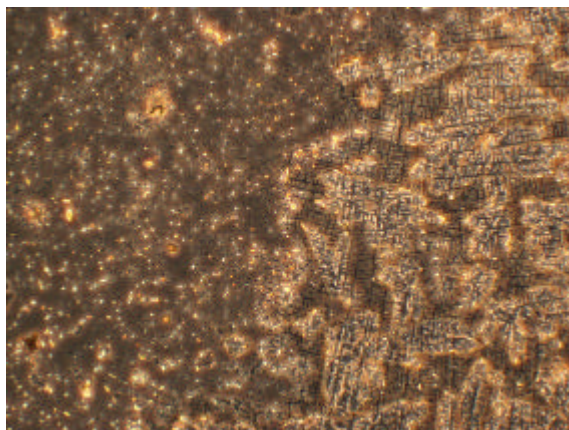
DAOrn 8-II (5 X)



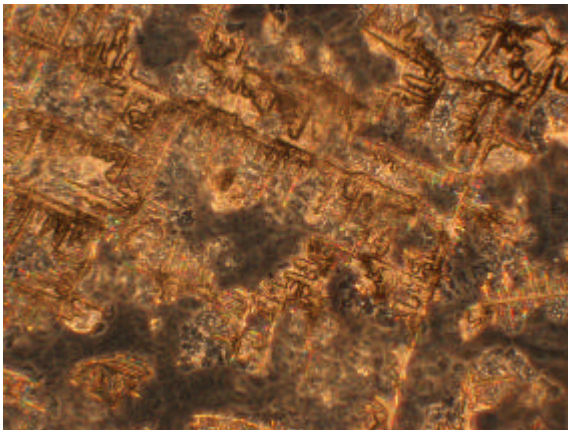
EAbuK 16-II (5 X)



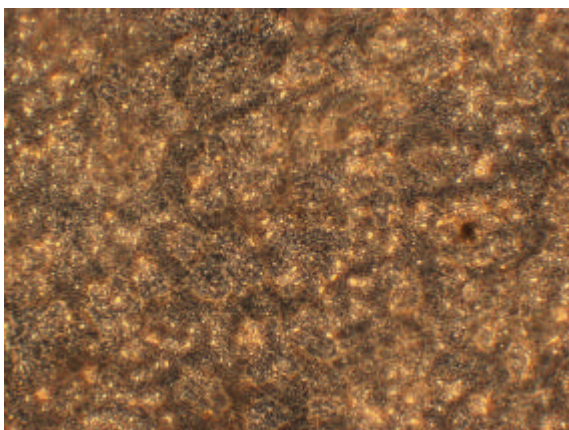
EAbuK 16-II (10 X)



EAbuK 8-II (5 X)



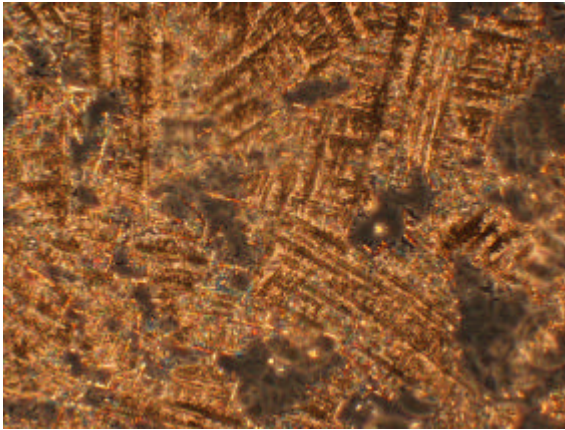
EYK 16-II (5 X)



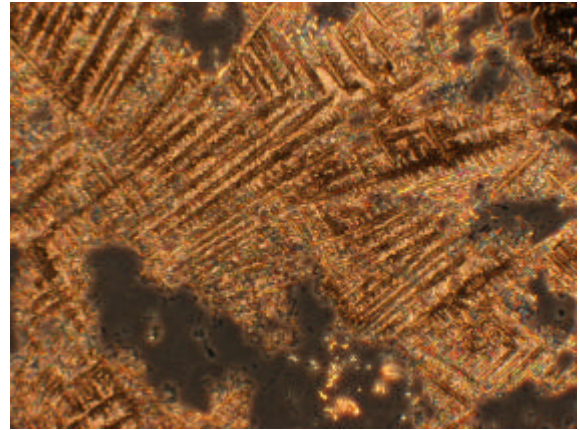
EYK 8-II (5 X)

**Fig. 283-3:** Fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) di ciò che rimane dopo aver portato a secco 250  $\mu$ L di soluzione salina contenente un peptide su una piastra in polistirene da 24 pozzetti.

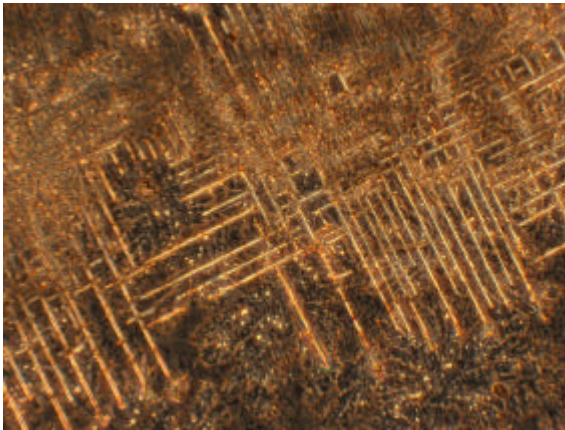




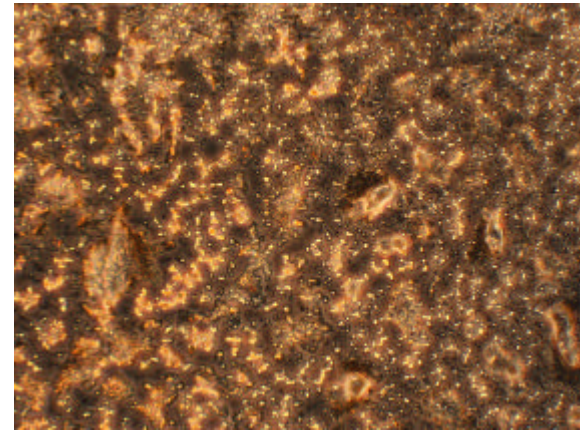
RGD-(EAK 16-II) (5 X)



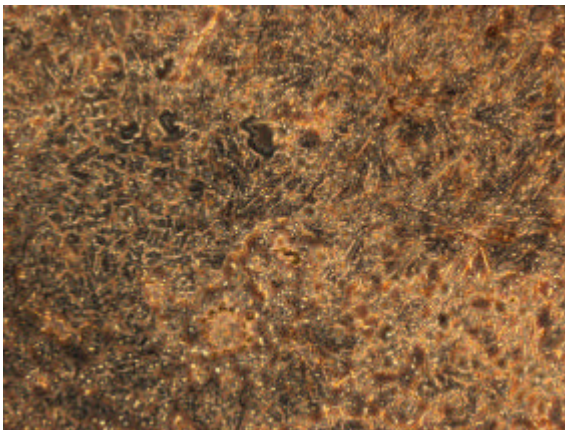
RGD-(EAK 16-II) (5 X)



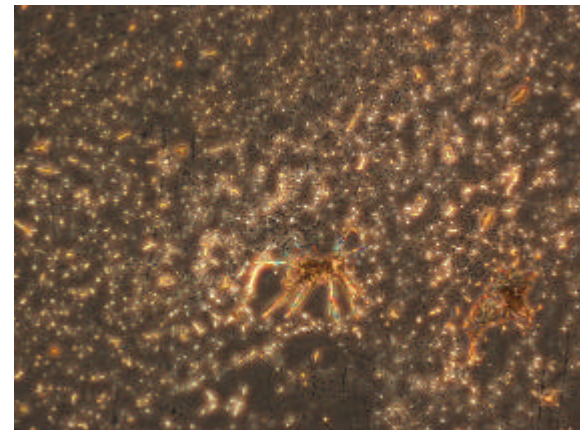
RGD-(EAK 16-II) (5 X) Sc  
(verso il bordo del pozzetto)



RGD-(EAK 16-II) (5 X) Sc  
(verso il centro del pozzetto)

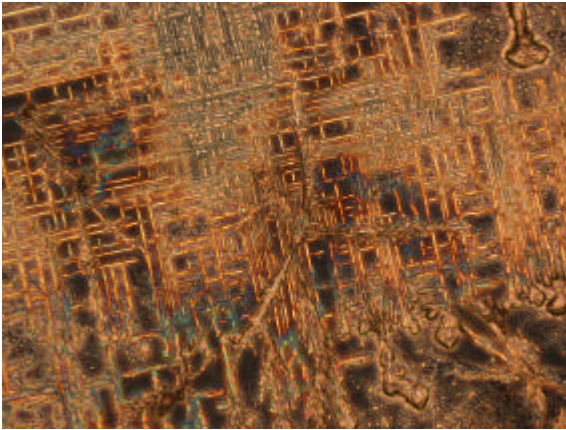


(GRGDSP)<sub>4</sub>K (5 X)

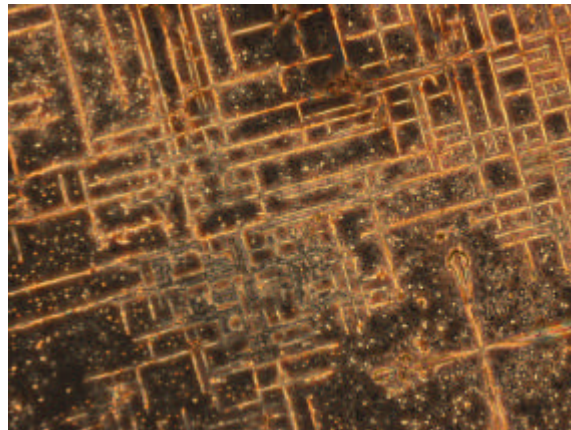


(352-360)HVP (5 X)

**Fig. 283-4:** Fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) di ciò che rimane dopo aver portato a secco 250  $\mu$ L di soluzione salina contenente un peptide su una piastra in polistirene da 24 pozzetti.



(58-87)BMP-2 (5 X)  
(verso il bordo del pozzetto)



(58-87)BMP-2 (5 X)  
(verso il centro del pozzetto)

**Fig. 283-5:** Fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) di ciò che rimane dopo aver portato a secco 250  $\mu$ L di soluzione salina contenente un peptide su una piastra in polistirene da 24 pozzetti.

Come si può vedere dall'immagine al microscopio ottico del pozzetto contenente il tampone, quest'ultimo sembra formare un reticolo in prossimità del bordo del pozzetto (2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> immagine) che scompare andando verso il centro (4<sup>a</sup> immagine). Le foto riportate (dove non specificato diversamente) corrispondono ad una zona intermedia tra il bordo del pozzetto, dove si concentrano i sali e si nota in genere un seppur piccola formazione di fibre anche per i peptidi che non formano membrane, e il centro del pozzetto dove sembra essere presente una minor concentrazione di peptide in tutti i pozzetti.

# ***DISCUSSIONE***





Recentemente la ricerca di biomateriali innovativi, sia per applicazioni in medicina rigenerativa che in ingegneria tissutale, si è focalizzata su superfici e materiali di tipo biomimetico. I materiali biomimetici sfruttano meccanismi specifici di tipo biochimico per migliorare o indurre rigenerazione o guarigione nei tessuti che circondano un impianto o per ricostruire un tessuto a partire da uno *scaffold* tridimensionale. Per promuovere tali effetti benefici, preludio ad una integrazione ottimale tra impianto e tessuto ricevente, vengono sfruttati segnali biochimici in grado di promuovere nelle cellule alcuni eventi-chiave nella formazione di nuovo tessuto quali l'adesione e la crescita cellulari. Poichè si rende sempre più necessario individuare sequenze peptidiche in grado di indurre quanto maggiormente possibile attività biologiche specifiche per un determinato sistema cellulare, il presente lavoro di dottorato si è occupato, in primo luogo, di selezionare sequenze segnale per l'adesione cellulare di tipo innovativo, specifiche per gli osteoblasti. In aggiunta, la strategia nota come *peptide mimicry* è stata applicata a un fattore di crescita quale la BMP-2.

Saggi di adesione *in vitro* hanno permesso di selezionare, tra gli 8 peptidi proposti, le sequenze più bioattive, che sono in seguito state utilizzate per ottenere superfici di titanio biomimetiche, e *scaffold* biomimetici sia di alginato di sodio reticolato sia costituiti di peptidi auto-assemblanti. La ricerca sulle matrici di peptidi auto-assemblanti biomimetiche è stata preceduta da uno studio riguardante sequenze ionico-complementari auto-assemblanti innovative.

## **PEPTIDI DI ADESIONE**

Una possibile strategia per rendere bioattiva la superficie di un impianto consiste nel rivestirla con molecole in grado di promuovere l'adesione cellulare. In particolare, per gli osteoblasti sono noti due differenti meccanismi di adesione ad un supporto: il primo, comune a diversi tipi di cellula, prevede l'interazione tra le integrine, presenti sulla membrana cellulare, e le proteine della matrice extracellulare contenenti il motivo RGD; il secondo meccanismo, specifico per gli osteoblasti, prevede l'interazione tra il proteoglicano eparan solfato e le proteine della matrice extracellulare contenenti il sito di legame per l'eparina. Sfruttando la tecnica denominata *peptide mimicry*, nel presente lavoro di dottorato si sono progettate e sintetizzate due serie di peptidi in grado di promuovere l'adesione degli osteoblasti mediante i due meccanismi appena citati.

Le sintesi dei vari peptidi (Tab. 1, pag. 30) con tecnica SPPS sfruttando la chimica Fmoc non hanno comportato particolari problemi, come pure le sintesi dei peptidi (340-365)HVP e (352-365)HVP utilizzando la chimica Boc: il cambiamento di chimica ha infatti permesso di risolvere le difficoltà che si erano riscontrate durante una sintesi precedente delle medesime sequenze condotta con chimica Fmoc. È stato possibile ottenere ogni peptide in quantità elevata e con un elevato grado di purezza (superiore al 98% in HPLC) tramite cromatografia in fase inversa.

Per cercare di studiare le cinetiche di rilascio di un peptide bioattivo da un *coating*, si è deciso di sintetizzare alcuni dei peptidi di adesione studiati nel corso del dottorato con un marcatore fluorescente legato in maniera specifica al terminale amminico. La prima strategia messa in atto prevedeva di far reagire il peptide protetto in catena laterale con FITC (fluorescein-5-isotiocianato). Questa reazione si è dimostrata avvenire con buone rese ma, nel caso del peptide (340-352)HVP, il successivo trattamento acido per rimuovere le protezioni in catena laterale ha comportato il distacco del residuo N-terminale con il gruppo fluoroforo legato a seguito di una reazione indesiderata analoga alla degradazione di Edman. Nel caso del peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K, invece, la reazione con il FITC ha portato all'isolamento di un prodotto marcato con il gruppo fluoroforo ma che non corrisponde al composto voluto in quanto presenta una massa di circa 118 Da inferiore al valore atteso. I peptidi marcati sono stati in seguito ottenuti con rese elevate e con un grado di purezza superiore al 98% mediante una strategia alternativa che prevede l'uso del composto CF (5-carbossifluoresceina). Tale metodica che comporta l'utilizzo del reagente CF per marcare in maniera specifica il terminale amminico di un peptide con il gruppo fluoroforo fluoresceina si è rivelata efficace, semplice e veloce.

Sui peptidi sintetizzati quali potenziali sequenze adesive sono stati eseguiti studi CD e FT-IR per mettere in luce eventuali correlazioni tra struttura secondaria ed attività biologica.

Com'era prevedibile date le sue dimensioni ridotte, il peptide GRGDSPK, in base alle misure CD, è risultato assumere una conformazione disordinata in soluzione acquosa mentre si nota una leggera strutturazione all'aumentare della percentuale di TFE in soluzione (cft. pag. 230).

In analogia con l'indagine sopra esposta, il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K presenta una struttura prevalentemente aperiodica in soluzione acquosa: la comparsa di conformeri ordinati si verifica a percentuali elevate di TFE ed è confermata dalla diminuzione di intensità della banda negativa centrata a 197 nm caratteristica della struttura disordinata (cft. pag. 231).

Entrambi i peptidi recanti la sequenza-segnale RGD si sono dimostrati attivi nel promuovere l'adesione di osteoblasti estratti da midollo osseo di ratto adulto ma con efficienze diverse. Le indagini conformazionali preliminari non hanno messo in luce una correlazione struttura-funzione.

Sui frammenti della vitronettina (Tab. 1, pag. 30), al fine di poter individuare una possibile correlazione tra struttura ed attività biologica, oltre agli studi CD e FT-IR, sono stati condotti degli studi NMR-2D in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Livio Paolillo [188].

Per ciò che riguarda il peptide (340-365)HVP, i dati CD (cft. pag. 233) e FT-IR (cft. pag. 248) concordano nell'assegnare un contributo di  $\alpha$ -elica significativo, pari rispettivamente al 47.4% e al 40.1%, in soluzioni al 90% TFE. Questi risultati sono in accordo con il modello molecolare per la sequenza (340-365)HVP ottenuto in base agli studi NMR-2D eseguiti in soluzione 90% TFE in H<sub>2</sub>O. Secondo tale modello il peptide è flessibile alle estremità N e C-terminale mentre presenta una discreta propensione per la struttura  $\alpha$ -elicoidale nella regione compresa tra Pro<sup>344</sup> e Arg<sup>355</sup>, tratto che comprende la maggior parte dei residui che si reputa siano importanti per l'interazione con gli osteoblasti (cft. pag. 256).

Per quanto riguarda le misure CD eseguite in H<sub>2</sub>O e soluzione tampone a pH diversi gli spettri mostrano andamenti tipici della conformazione aperiodica. In soluzione micellare si nota invece una leggera tendenza alla strutturazione.

Dagli spettri CD del peptide (340-352)HVP (cft. pag. 235) eseguiti in H<sub>2</sub>O e in tampone fosfato a differenti pH, nei quali è presente una banda negativa intensa data dal contributo di due componenti, si può ragionevolmente presumere che prevalga una conformazione *random coil* su una certa percentuale di conformeri ordinati, probabilmente riconducibili a una struttura  $\beta$ -turn di tipo II. In soluzione micellare ed in TFE, invece, si nota un leggero aumento di strutturazione. La deconvoluzione dello spettro FT-IR (cft. pag. 249) stima il contenuto di  $\beta$ -turn intorno al 24.3% mentre la componente principale dello spettro sembra dovuta a conformazioni di tipo  $\beta$ -sheet o *extended chain* (56.0%). Tale assegnazione trova conferma nel modello del peptide (340-352)HVP ottenuto in base ai dati NMR in soluzione 90% TFE in H<sub>2</sub>O che mostra un *bend* coinvolgente Ser<sup>345</sup> e Leu<sup>346</sup> e un  $\beta$ -turn che comprende il motivo *consensus* per l'adesione degli osteoblasti via eparansolfato (KKQR), all'estremità C-terminale del peptide, in 4 delle 10 strutture più rappresentative (cft. pag. 257).

Le misure CD relative al frammento (352-365)HVP mostrano una grande flessibilità del peptide in tutti i solventi considerati (cft. pag. 237). In accordo con tale interpretazione, lo spettro FT-IR ottenuto in soluzione 90% TFE in H<sub>2</sub>O (cft. pag. 251), in seguito a deconvoluzione, risulta generato dalla somma di un gran numero di componenti. Il peptide (352-365)HVP modello (cft. pag. 257) mostra una conformazione estesa più ordinata caratterizzata da un  $\gamma$ -turn che include Arg<sup>357</sup> in tutte le strutture selezionate. È difficile nel caso in esame correlare i dati CD ed NMR in quanto vi è un'alta varietà di profili CD individuati sperimentalmente per ciascuno dei vari tipi di *turn* esistenti [166].

Come per il peptide (340-365)HVP, gli spettri CD misurati in H<sub>2</sub>O e soluzione tampone a differenti pH presentano un andamento tipico della conformazione aperiodica, mentre lo spettro in soluzione micellare e in misura maggiore gli spettri misurati a percentuali crescenti di TFE mostrano una debole tendenza alla strutturazione.

Gli spettri CD ottenuti per il peptide (352-360)HVP mostrano un andamento praticamente identico nei diversi solventi, indice che questa sequenza è in grado di assumere una conformazione stabile nei confronti della competizione dei diversi solventi nella formazione dei ponti idrogeno e di altre interazioni intermolecolari. (cft. pag. 239); in base all'intensa banda negativa centrata intorno ai 190 nm si pensa sia presente un  $\beta$ -turn di tipo II. La componente principale dello spettro FT-IR deconvoluto (cft. pag. 252), centrata a 1665 cm<sup>-1</sup> e che contribuisce per il 41.0% allo spettro IR originale, potrebbe essere dovuta a conformazioni di tipo *turn* in accordo con i dati CD. In base agli studi NMR, però, il peptide (352-360)HVP modello mostra una conformazione estesa nella regione N-terminale e un  $\beta$ -turn di tipo I, e non di tipo II, attorno al residuo Arg<sup>356</sup> in 4 delle 10 strutture selezionate (cft. pag. 258). In particolare gli studi NMR evidenziano il raggrupparsi dei gruppi carichi e di quelli idrofobici in due zone distinte.

Gli spettri CD, relativi al frammento (352-360)HVP ciclico risultano di difficile interpretazione in quanto non appaiono bande caratteristiche di una particolare struttura secondaria. Tutti gli spettri sono caratterizzati principalmente dalla presenza di una banda negativa intorno ai 204 nm di difficile attribuzione. In H<sub>2</sub>O MilliQ e in soluzione tampone a diversi pH la banda a 204 nm risulta meno intensa rispetto alla soluzione micellare e in presenza di percentuali elevate di TFE e si nota la scomparsa della banda intorno ai 190 nm (cft. pag. 241). In base alla deconvoluzione dello spettro FT-IR (cft. pag. 254), è stato possibile individuare la presenza di 4 componenti principali: due attribuibili alla struttura  $\beta$ -sheet o *extended chain* centrate a 1631 e 1676 cm<sup>-1</sup> e che contribuiscono al 44.9% dello spettro; una banda attribuibile alla struttura disordinata a 1647 cm<sup>-1</sup>, che contribuisce al

22.4% dello spettro e una banda imputabile alla conformazione di tipo *turn* a circa 1662  $\text{cm}^{-1}$  che contribuisce al 22.5% dello spettro. Questi dati sembrano essere in accordo con i risultati ottenuti tramite gli studi NMR e di *molecular modeling* in base ai quali si possono individuare due  $\gamma$ -*turn*, uno di tipo equatoriale, prossimo al residuo Arg<sup>353</sup> e uno di tipo assiale, coinvolgente il residuo Arg<sup>357</sup>. I segmenti che vanno da His<sup>354</sup> a Asn<sup>356</sup> e da Lys<sup>358</sup> a Tyr<sup>360</sup> risultano in conformazione estesa (cft. pag. 258). Anche per questo peptide, nonostante la diversa conformazione rispetto all'analogo lineare, gli studi NMR suggeriscono la presenza di due facce, una idrofobica ed una idrofilica.

Per quanto riguarda il peptide (352-360)HVP Sc sono stati condotti esclusivamente studi di dicroismo circolare che evidenziano una dipendenza della conformazione sia dalla natura del solvente utilizzato per fare la misura che dal pH. In tampone fosfato a pH 7.4 e in soluzione micellare, anche se in misura inferiore, si nota la presenza di una banda centrata intorno ai 190 nm che potrebbe indicare la presenza di conformeri  $\beta$ -*turn* di tipo II. Lo spettro misurato in acqua è chiaramente dovuto a due contributi che potrebbero essere dovuti a strutture aperiodiche e  $\beta$ -*turn* di tipo II, mentre in TFE lo spettro mostra un andamento estremamente irregolare e di difficile interpretazione.

Riassumendo, a parte il peptide (340-365)HVP, che mostra assumere una conformazione  $\alpha$ -elicoidale coinvolgente i residui che si trovano nel tratto centrale della sequenza, le analisi conformazionali degli altri frammenti della vitronettina rivelano che tutti questi peptidi sono per la maggior parte flessibili, sebbene siano presenti corti frammenti localmente strutturati in *extended chain* o *bend*. Per quanto riguarda il frammento (352-360)HVP e l'analogo ciclico, questi peptidi tendono verso una struttura in cui è presente una zona idrofobica contrapposta ad una regione idrofilica: è ipotizzabile che questa particolare conformazione guidi un orientamento nell'adsorbimento del peptide ad un supporto che risulta nell'esposizione delle catene laterali cariche del peptide (che fanno parte del motivo *consensus*) verso i recettori di adesione presenti sugli osteoblasti e questo potrebbe giustificare la maggiore attività biologica di queste due sequenze rispetto alle altre considerate.

La valutazione conformazionale del tratto 340-365 della vitronettina umana costituisce in ogni caso un contributo allo studio della struttura secondaria della proteina intera; tale studio è di grande interesse in quanto la proteina presenta molti ligandi naturali. Gli ostacoli principali nello studio conformazionale della vitronettina sono relativi alla difficoltà di cristallizzare la proteina e al fatto che la proteina intera, formata da 459 residui, è troppo grande per determinazioni strutturali NMR ad alta risoluzione. Studi

SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) [189, 190] collocano il tratto da noi considerato a ponte tra il dominio centrale (a.a. 131÷342) e il dominio C-terminale (a.a. 347÷459).

Le differenti sequenze sintetizzate sono state utilizzate per saggi di adesione *in vitro* su polistirene e su matrice ossea acellulare, eseguiti utilizzando osteoblasti estratti da midollo osseo di ratti adulti Sprague-Dowley. I dati ottenuti dimostrano come alcune delle sequenze sintetizzate siano in grado di promuovere l'adesione cellulare in maniera ancora più efficace della proteina nativa fibronectina. In particolare, la sequenza contenente il motivo RGD che si è dimostrata più attiva nel promuovere l'adesione degli osteoblasti mediata dalle integrine è il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K, mentre il frammento della vitronectina che ha fornito i risultati di adesione migliori in assoluto è il peptide (352-360)HVP. Si è quindi deciso di utilizzare queste due molecole per studiare il metodo più efficace per veicolare un peptide bioattivo alla superficie di un impianto o di uno *scaffold*.

Dalle misure sulla quantità di peptide adsorbito al polistirene in seguito al trattamento delle piastre utilizzate per i saggi biologici di adesione, si nota l'elevata propensione di tutti i frammenti della vitronectina ad interagire con questo materiale (intorno al 90% del peptide viene assorbito), rispetto ai peptidi contenenti il motivo RGD.

Le superfici di Ti funzionalizzate covalentemente con i peptidi, seguendo la strategia riportata a pag. 224, si sono rivelate molto più efficaci nel promuovere l'adesione degli osteoblasti rispetto alle superfici non trattate (circa il 60% in più), nonostante i peptidi non siano stati legati in maniera specifica allo *spacer* ma tramite uno qualsiasi dei gruppi amminici liberi presenti nelle molecole.

Inoltre, tale strategia si è rivelata più efficace rispetto agli altri metodi studiati (cft. pag. 220), ovvero l'adsorbimento ad una superficie di Ti e il rilascio da *coating*. In particolare l'adsorbimento su superfici di Ti sabbiate ed ossidate (SLA) hanno evidenziato un incremento di adesione per il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K del 117% e del 112% per il peptide (352-360)HVP da confrontare con l'adesione a Ti SLA non trattato (100%) e a dischetto pretrattato con fibronectina (125%). Per quanto riguarda il rilascio da *coating*, i risultati migliori si sono avuti arricchendo un film di silice, abbastanza sottile da non mascherare la morfologia superficiale del Ti studiata per ottimizzare l'adesione cellulare [134], con i due peptidi biologicamente più attivi ai fini dell'adesione sintetizzati durante il dottorato. Saggi biologici di adesione degli osteoblasti utilizzando superfici di Ti rivestite con sol-gel arricchito con peptide bioattivo hanno fornito un valore di adesione massimo per il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K pari al 133% e del 141% per il peptide (352-360)HVP rispetto a Ti rivestito con film di sol-gel non arricchito (111%). Gli incrementi di adesione degli osteoblasti su

dischetti di Ti SLA alla cui superficie erano stati legati covalentemente i peptidi bioattivi sono risultati pari al 157% per il peptide (GRGDSP)<sub>4</sub>K e del 162% per il peptide (352-360)HVP rispetto al valore di adesione degli osteoblasti, considerato pari al 100%, su dischetti di Ti SLA.

Un protocollo di funzionalizzazione covalente specifica con il peptide (352-360)HVP è stato inoltre applicato a dischetti di alginato di sodio *cross-linkato* covalentemente con etilendiammina. Tale materiale è in corso di valutazione in saggi biologici *in vivo* su topi.

## FRAMMENTI DELLA BMP-2

Se l'adesione è un evento chiave per tutte le cellule ancoraggio-dipendenti, è pure dimostrato che uno strato di cellule non costituisce un tessuto, dunque le fasi seguenti all'adesione in grado di guidare la formazione di nuovo tessuto sono la crescita e la differenziazione cellulare.

Tra le proteine più importanti che intervengono a questo livello nello sviluppo del tessuto osseo troviamo il fattore di crescita BMP-2 che appartiene alla famiglia dei TGF- $\beta$ . Nel presente lavoro di dottorato sono stati sintetizzati, senza particolari problemi, alcuni frammenti della BMP-2 umana uno dei quali, il peptide (68-87)BMP-2, era noto conservare, almeno in parte, l'attività della proteina nativa [80] e altri due frammenti nella stessa zona della sequenza proteica che riproducono regioni caratterizzate da differenti strutture secondarie (cft. pag. 35) [63].

In base agli studi di dicroismo circolare si può affermare che tutti i peptidi sintetizzati mostrano un andamento tipicamente disordinato in soluzione acquosa mentre in presenza di TFE si ha un aumento di strutturazione che solo nel caso del frammento (58-87)BMP-2 può essere imputabile alla comparsa di conformeri in conformazione  $\alpha$ -elicoidale. Il contenuto di  $\alpha$ -elica per il peptide (58-87)BMP-2 in soluzione al 98% TFE in H<sub>2</sub>O è stato stimato pari a circa il 30%, dato in accordo con la percentuale di  $\alpha$ -elica prevista per questo tratto di sequenza nella proteina nativa. Gli spettri CD relativi ai 2 frammenti più corti in presenza di TFE non sono di chiara interpretazione: si può affermare che aumentano i conformeri ordinati in quanto la banda centrata intorno ai 197-198 nm in H<sub>2</sub>O subisce un *red-shift* e compare una banda positiva a lunghezze d'onda inferiori ma risulta evidente che gli spettri sono dovuti dalla somma di più contributi non chiaramente distinguibili tra loro con questa tecnica. Ulteriori indagini FT-IR e NMR-2D potranno

fornire ulteriori dati per chiarire più in dettaglio le conformazioni assunte dai vari peptidi in soluzione.

I dati preliminari sui saggi biologici *in vitro* utilizzando i 3 frammenti della BMP-2 indicano che tutti i peptidi sintetizzati sono in grado di incrementare la differenziazione degli osteoblasti estratti dal midollo osseo di femori di ratto Sprague-Dowley adulti rispetto ai riferimenti non trattati con peptide. Inoltre, l'attività biologica di questi peptidi è dose-dipendente. Ulteriori studi volti a determinare la crescita cellulare, la differenziazione e la deposizione di matrice sono previsti a breve e serviranno a supportare o meno i dati preliminari ottenuti con il saggio sull'attività della fosfatasi alcalina.

Saito *et al.* [65-67] hanno sintetizzato un frammento della BMP-2 umana appartenente alla medesima zona studiata nel presente lavoro di dottorato, ovvero il frammento 73-92, da loro indicato come biologicamente più attivo nel promuovere la calcificazione ectopica quando immobilizzato su un gel di arginato *cross-linkato* e impiantato nel muscolo di polpaccio di ratto. Questo frammento, rispetto al peptide (68-87)BMP-2, comprende un tratto che nella proteina nativa si trova in conformazione  $\beta$ -sheet [63], denominato in Fig. 10  $\beta$ 7 (pag. 35). Saito *et al.* hanno condotto unicamente studi sull'attività biologica di questo peptide tralasciando gli studi conformazionali. Sarà interessante comprendere anche questo frammento negli studi volti a correlare la struttura tridimensionale all'attività biologica dei frammenti sintetizzati durante il dottorato in quanto tutti si sono rivelati bioattivi nel promuovere la differenziazione degli osteoblasti *in vitro*.

## PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI

Una classe di molecole auto-assemblanti, costituita da peptidi formati dall'alternanza di residui carichi positivamente e negativamente alternati da residui idrofobici, sta recentemente emergendo nell'ambito della creazione di promettenti biomateriali da utilizzare nel campo dell'ingegneria tessutale, della medicina rigenerativa, del trasporto di farmaci (*drug delivery*) o come materiali biomimetici. I peptidi appartenenti a questa classe in genere assumono, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo  $\beta$ -sheet che, grazie ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico, può assemblarsi in fibre, membrane e idrogeli all'aumentare della concentrazione o variando altri parametri fisico-chimici. Il processo di auto-assemblaggio dipende fortemente dalla sequenza peptidica, dalla concentrazione, dal pH, dalla presenza di sali e dal tempo [113, 122, 124-126].



Dato che la sequenza amminoacidica è uno dei fattori più significativi nel determinare la struttura e le proprietà di un peptide, nel presente lavoro di dottorato si è deciso di studiare come i fenomeni di aggregazione sono influenzati dalla natura dei residui utilizzati nelle sequenze peptidiche lasciando inalterato il *pattern* di residui carichi e idrofobici. Si è inoltre risintetizzato il peptide EAK 16-II con l'aggiunta della sequenza RGD al terminale amminico per valutare la possibilità di creare uno *scaffold* costituito da peptidi auto-assemblanti recanti il motivo di adesione cellulare via integrine, RGD.

La sintesi dei peptidi ionico-complementari studiati nel presente lavoro di dottorato (Tab. 3, pag. 37) è stata eseguita utilizzando la tecnica SPPS con chimica Fmoc che ha permesso di ottenere tutti i peptidi voluti con rese in genere superiori al 90%. La purificazione del grezzo è stata realizzata sfruttando la tecnica RP-HPLC. Le sequenze da 16 residui hanno richiesto più passaggi in colonna cromatografica per ottenere un prodotto purificato con grado di purezza superiore al 98%.

Dagli studi conformazionali di dicroismo circolare risulta che tutte le sequenze da 8 residui sono estremamente flessibili in soluzione acquosa, in accordo con i dati riportati in letteratura [113, 126], mentre presentano un aumento di strutturazione all'aumentare del contenuto di TFE nella soluzione che può essere attribuibile in buona misura alla comparsa di conformeri in  $\alpha$ -elica. Il tampone denominato TB (10 mM Na fosfato e 150 mM NaCl, pH 7.4), che presenta una concentrazione di ioni monovalenti positivi ottimale per indurre la formazione di membrane, sembra non avere effetto sull'aggregazione di questi peptidi in quanto gli spettri misurati a distanza di 24 ore e dopo centrifugazione non presentano differenze rilevanti. Le misure di elettroforesi capillare in tampone sodio citrato, inoltre, mostrano un unico picco per il prodotto purificato a conferma dell'assenza di fenomeni di aggregazione.

I risultati sperimentali del lavoro di dottorato sui peptidi da 8 residui confermano quanto riportato in letteratura [127], ovvero che il numero di residui che formano il peptide è di fondamentale importanza ai fini dell'aggregazione.

Zhang *et al.* [120] aveva ipotizzato che le variazioni di pH avrebbero influenzato notevolmente la struttura assunta dal peptide EAK 16-II in soluzione, costituita dall'assemblaggio di  $\beta$ -sheet stabilizzati da interazioni idrofobiche e ponti ionici tra lisine e acidi glutammici. Inaspettatamente, le misure CD da lui condotte utilizzando soluzioni del peptide EAK 16-II a pH 1.5, 3.0, 7.0 e 11.0 mostrano differenze minime che sono giustificate solo da una grande stabilità della struttura aggregata presente in soluzione. In analogia a quanto pubblicato, anche gli analoghi sintetizzati sono stati sottoposti a studi

CD in un intervallo di pH che fosse però compatibile con l'ambiente fisiologico quale ambito per un'applicazione pratica.

Per tutti i peptidi sintetizzati, la variazione del pH delle soluzioni di tampone fosfato, da pH 6.5 a pH 8.0, non influenza la posizione delle bande CD ma solo, in alcuni casi, la loro intensità. Questi dati sono in accordo con quanto riportato in letteratura: in base agli studi di Hong *et al.* [125] l'abbassamento di pH al di sotto di 6.5 o l'aumento al di sopra di 7.5 provoca una transizione da globulare a fibrillare della struttura per gli aggregati formati a partire dal peptide EAK 16-IV mentre il peptide EAK 16-II non mostra alcuna variazione nella formazione di nanostrutture; entrambi questi peptidi, comunque, non mostrano variazioni a livello di struttura secondaria in soluzione, a conferma di quanto è stato riscontrato nelle misure CD dei peptidi studiati durante il dottorato. Apparentemente, le variazioni di pH non hanno effetto sulla struttura secondaria dei peptidi auto-assemblanti di tipo I ma solo sui fenomeni di aggregazione che portano alla formazione di fibre e membrane.

Diversi peptidi che formano  $\beta$ -sheet, come ad esempio le proteine  $\beta$ -amiloidi, mostrano una strutturazione concentrazione-dipendente [120]; per valutare questo aspetto sono stati eseguiti degli studi CD a diverse concentrazioni di peptide in H<sub>2</sub>O, da  $5 \times 10^{-5}$  M a  $10^{-3}$  M, dai quali risulta che l'aumento di concentrazione ha effetti minimi sul grado di strutturazione dei peptidi in soluzione.

Questi dati sono in accordo con gli studi CD eseguiti da Zhang *et al.* [120] sul peptide EAK 16-II: le misure CD per questo peptide in soluzione acquosa a concentrazioni comprese tra 0.62 e 20  $\mu$ M, hanno evidenziato una dipendenza lineare tra l'intensità del segnale e la concentrazione in accordo con i dati sperimentali ottenuti per i peptidi studiati durante il dottorato.

Gli spettri CD delle sequenze da 16 residui in soluzione, a differenza di quelli relativi alle sequenze da 8 residui che mostrano andamenti simili nei vari solventi considerati, risultano fortemente influenzati dalla sostituzione del residuo acido Glu con l'amminoacido Asp. Questa semplice modifica ha come effetto una drastica variazione nella conformazione assunta da questi peptidi in soluzione: mentre gli spettri dei peptidi EAK 16-II, EAbuK 16-II e RGD-(EAK 16-II) mostrano un andamento tipico della conformazione  $\beta$ -sheet, sia in H<sub>2</sub>O che in presenza di TFE, i peptidi DAK 16-II e DAO<sub>rn</sub> 16-II, come pure la sequenza *scramble* RGD-(EAK 16-II) Sc, mostrano di preferire, soprattutto ad elevate percentuali di TFE, una conformazione  $\alpha$ -elicoidale. Il peptide EYK 16-II, infine, sembra assumere una conformazione  $\beta$ -turn di tipo II, in percentuale più o meno elevata a seconda del solvente

utilizzato, in quanto presenta una banda negativa molto intensa intorno a 190 nm e una banda positiva centrata verso i 200 nm: la posizione di queste bande si avvicina molto a quella prevista per gli spettri appartenenti alla classe B secondo la classificazione di Woody.

Gli spettri CD misurati per le sequenze da 16 residui in tampone TB in tempi diversi mostrano una evidente diminuzione di intensità delle bande dello spettro eseguito dopo 24 ore per i peptidi EAK 16-II, EAbuK 16-II, RGD-(EAK 16-II) e EYK 16-II. Quindi solo i peptidi in grado di assumere una conformazione  $\beta$ -sheet o  $\beta$ -turn di tipo II possono aggregare per formare fibre che vengono quindi allontanate dalla soluzione per centrifugazione.

Osservando gli elettroferogrammi dei peptidi purificati da 16 residui misurati in tampone sodio citrato, quelli relativi a EAK 16-II, EAbuK 16-II, RGD-(EAK 16-II) e EYK 16-II mostrano più picchi, probabilmente dovuti a fenomeni di aggregazione, a differenza di quelli relativi a DAK 16-II, DAOrn 16-II e RGD-(EAK 16-II) Sc in cui si nota un solo picco principale.

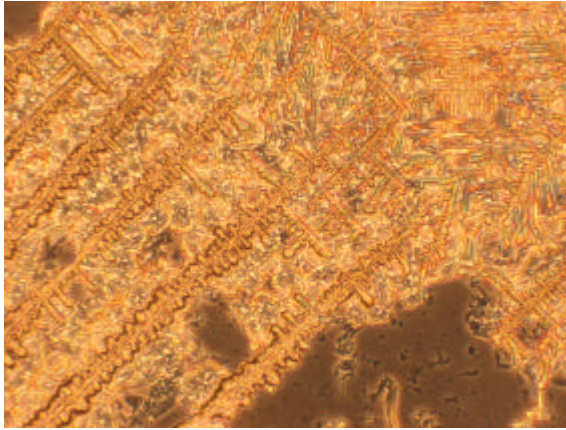
Questi dati sembrano essere confermati dagli studi sulla formazione di membrane in cui si vede chiaramente la formazione di fibre solo per i peptidi da 16 residui contenenti l'amminoacido Glu invece che Asp; com'era prevedibile anche il peptide RGD-(EAK 16-II) Sc, in cui è sconvolta l'alternanza tra residui carichi e idrofobici, non mostra alcuna propensione alla formazione di membrane.

Questi risultati sono in disaccordo con le generalizzazioni riportate in letteratura sul comportamento dei peptidi auto-assemblanti ionico-complementari appartenenti alla classe tipo I e fondati sulle osservazioni fatte studiando peptidi differenti da quelli sintetizzati durante il dottorato ma appartenenti alla medesima classe e costituiti dal medesimo numero di residui, ovvero 16.

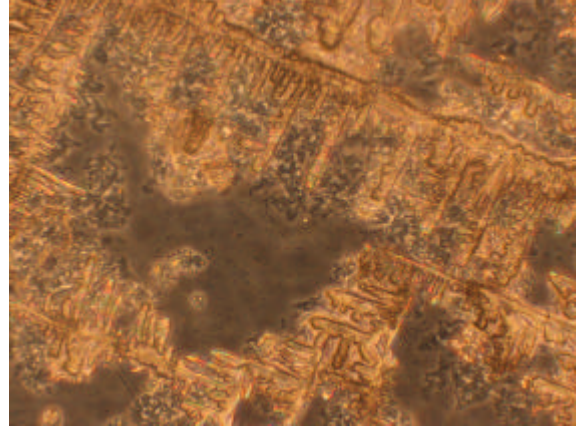
Secondo questi studi è la periodicità degli amminoacidi polari e non polari a determinare la struttura secondaria negli oligopeptidi auto-assemblanti [113, 122, 126]: la periodicità è in grado di sopraffare la propensione intrinseca dei residui amminoacidici nel determinare la struttura secondaria assunta da questa classe di peptidi in soluzione e quindi, in base a questa osservazione, tutti i peptidi da 16 residui di tipo I e modulo II sintetizzati durante il dottorato avrebbero dovuto trovarsi in conformazione  $\beta$ -sheet in soluzione, fatto non verificatosi sperimentalmente.

In base alle predizioni di struttura secondaria elaborate da Chou-Fasman risulta che l'amminoacido Asp presenta una notevole propensione intrinseca per la struttura *turn*

mentre l'amminoacido Glu è quello con una maggiore propensione intrinseca per la struttura  $\alpha$ -elica, ovvero, esattamente l'opposto di quanto osservato negli studi CD e in conformità a quanto riportato a questo riguardo in letteratura [122, 126]. In base a questa considerazione, una possibile spiegazione per l'incongruenza tra i dati ottenuti durante il dottorato e quanto generalizzato da Zhang potrebbe essere correlata ai meccanismi che portano all'assemblamento: oltre al peptide EAK 16-II, infatti, Zhang ha sintetizzato anche il peptide RAD 16-II che mostra una elevata propensione alla formazione di membrane. Se si sommano gli atomi in catena laterale dei residui carichi positivamente e negativamente risulta che la somma tra Glu e Lys e quella tra Asp e Arg è di 8 atomi mentre tra Asp e Lys e Asp e Orn è inferiore. Una possibile ipotesi è che le interazioni ioniche che portano all'assemblaggio richiedano una distanza di 8 atomi per potersi esplicare e portare all'aggregazione; la mancanza di questa interazione potrebbe comportare l'assenza di stabilizzazione alla conformazione  $\beta$ -sheet che a sua volta è indispensabile perché possa avvenire l'auto-assemblaggio. Anche il peptide EYK 16-II mostra un comportamento peculiare: tra i vari analoghi studiati da Zhang è presente anche il peptide EFK 16-II che in base alle misure di dicroismo circolare presenta una conformazione  $\beta$ -sheet in soluzione acquosa e quindi ci si aspettava che la sostituzione di Phe con Tyr avrebbe portato a peptidi con struttura secondaria analoga (la propensione intrinseca per la conformazione  $\beta$ -sheet, in base agli studi di Chou-Fasman, è simile per i due amminoacidi ed elevata). Le misure CD condotte durante il dottorato su questo peptide, invece, mostrano che in soluzione acquosa si formano strutture di tipo *turn* che potrebbero essere dovute al ripiegarsi del peptide a formare *hair-pin*. Gli studi CD condotti da Powers *et al.* sulla polifemusina I [191], infatti, mostrano uno spettro le cui bande sono molto simili a quelle ottenute per il peptide EYK 16-II, una banda negativa intensa centrata a circa 190 nm e una banda positiva intorno ai 200 nm, che possono essere attribuite alla conformazione *hair-pin* in base ai dati ottenuti tramite NMR-2D. Questa particolare conformazione può dare origine a fenomeni di auto-assemblaggio per formare nanostrutture [111] e quindi le fibre formate a partire da questo peptide osservate al microscopio ottico potrebbero essere state generate da meccanismi di aggregazione differenti dagli altri peptidi auto-assemblanti ionico-complementari studiati durante il dottorato. Se si confrontano le immagini al microscopio ottico relative ai peptidi EAK 16-II e EYK 16-II (Fig. 284), le fibre generate con il primo peptide appaiono più allungate e meno spesse rispetto a quelle generate con il secondo, ad indicare che l'ipotesi di un meccanismo differente di aggregazione è plausibile.



(a)



(b)

**Fig. 284:** Fotografie al microscopio ottico (LEITZ DM IRB, Leica) di ciò che rimane dopo aver portato a secco 250  $\mu\text{L}$  di soluzione salina posta su una piastra in polistirene da 24 pozzetti contenente (a) il peptide EAK 16-II e (b) il peptide EYK 16-II. Le immagini riproducono un'area pari a  $(8.35 \times 6.25) \times 10^{-1}$  mm.

È interessante infine notare che la sequenza RGD aggiunta al peptide EAK 16-II non ostacola eccessivamente la formazione di strutture supramolecolari ed è quindi ipotizzabile l'utilizzo del peptide RGD-(EAK 16-II) per la formazione di *scaffold* tridimensionali in grado di favorire, oltre che supportare, la crescita cellulare da utilizzare nella creazione di materiali per l'ingegneria tissutale.



# ***CONCLUSIONI***





Le principali conclusioni della ricerca svolta nell'ambito della realizzazione di biomateriali innovativi sono di seguito brevemente illustrate suddivise nelle tre tematiche trattate: peptidi di adesione per la messa a punto di superfici bioattive, frammenti della BMP-2 umana per la progettazione di impianti innovativi e *scaffold* biomimetici ottenuti con peptidi ionico-complementari auto-assemblanti da utilizzare nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa.

### **1. Peptidi di adesione:**

- Sono state individuate e caratterizzate due molecole, (352-360)HVP (specifico per l'adesione degli osteoblasti) e (GRGDSP)<sub>4</sub>K (efficace con diversi tipi di cellule), quali nuovi peptidi adesivi.
- Studi conformazionali CD, FT-IR e NMR-2D condotti sulle varie sequenze della vitronettina sintetizzate hanno permesso di correlare la maggiore attività biologica del frammento (352-360)HVP alla conformazione estremamente stabile assunta da questa molecola in solventi diversi e riconducibile ad un  $\beta$ -turn.
- È stato messo a punto un metodo per la funzionalizzazione covalente di superfici di titanio con i peptidi (GRGDSP)<sub>4</sub>K e (352-360)HVP. Tali superfici biomimetiche sono in grado di incrementare l'adesione degli osteoblasti *in vitro* del 60% rispetto al controllo e di promuovere l'osteointegrazione in saggi *in vivo*.
- Si è messo a punto un protocollo per la funzionalizzazione specifica di una matrice reticolata di alginato di sodio con il peptide (352-360)HVP.

### **2. Frammenti della BMP-2:**

- La *peptide mimicry* applicata al fattore di crescita BMP-2 ha permesso di individuare nei frammenti (77-87)BMP-2, (68-87)BMP-2 e (58-87)BMP-2 peptidi in grado di incrementare la differenziazione *in vitro* di osteoblasti di midollo osseo di ratto.

### **3. Peptidi auto-assemblanti:**

- Gli studi CD eseguiti sui vari analoghi del peptide EAK 16-II hanno chiarito che il pattern di residui acidi, basici e idrofobici, a differenza di quanto riportato in

letteratura, non è sufficiente ad assicurare la formazione della struttura  $\beta$ -sheet che determina in seguito l'auto-assemblaggio in presenza di sali. La modifica Glu  $\rightarrow$  Asp ha infatti come conseguenza una variazione della conformazione assunta dai peptidi in soluzione acquosa da  $\beta$ -sheet ad  $\alpha$ -elica che ne pregiudica l'auto-assemblaggio.

- La presenza della modifica Ala  $\rightarrow$  Tyr induce una variazione sostanziale nella conformazione assunta dal peptide in soluzione acquosa ( $\beta$ -sheet  $\rightarrow$  hair-pin) ma non pregiudica la formazione di membrane.
- L'aggiunta della sequenza-segnale RGD al peptide EAK 16-II non ostacola la formazione di membrane e costituisce un primo contributo alla messa a punto di scaffold di peptidi auto-assemblanti di tipo biomimetico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Langer R. *et al.* (1993) *Science*, **260**, 920-926;
2. Vacanti J.P. *et al.* (1999) *Lancet*, **354**, 32-34;
3. Baldwin S.P. *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews*, **33**, 71-86;
4. Thull R. (2002) *Biomol. Eng.*, **19**, 43-50;
5. Eisenbarth E. *et al.* (2002) *Biomol. Eng.* **19**, 243-249;
6. Matsuura T. *et al.* (2000) *Biomaterials* **21**, 1121-1127;
7. Sinha R.K. *et al.* (1994) *Clin. Orthop.* **305**, 258-272;
8. Larsson C. *et al.* (1996) *Biomaterials* **17**, 605-616;
9. Lange R. *et al.* (2002) *Biomol. Eng.* **19**, 255-261;
10. Kasemo B. *et al.* (1988) *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 145-158;
11. Kasemo B. *et al.* (1994) *Environ. Health Perspect.* **102**, 41-45;
12. Boyan B.D. *et al.* (1996) *Biomaterials* **17**, 137-146;
13. Dee K.C. *et al.* (1996) *Biomaterials* **17**, 209-215;
14. Macdonald D.E. *et al.* (1998) *Colloids Surf.* **11**, 131-139;
15. Liu G.Y. *et al.* (2002) *PNAS* **99**, 5165-5170;
16. Hanawa T. *et al.* (1999) *Mater. Sci. Eng.* **267**, 260-266;
17. Kasemo B. *et al.* (1999) *Adv. Dent. Res.* **13**, 8-20;
18. Ramires P.A. *et al.* (2002) *Biomaterials* **23**, 397-406;
19. Folch A. *et al.* (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 227-256;
20. Sarikaya M. *et al.* (2003) *Nature Materials* **2**, 577-585;
21. Sakiyama-Elbert S.E. *et al.* (2001) *Annu. Rev. Mater. Res.* **31**, 183-201;
22. Murphy W.L. *et al.* (1999) *J. Periodontal Res.* **34**, 413-419;
23. Whitaker M.J. *et al.* (2001) *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 1427-1437;
24. Richardson T.P. *et al.* (2001) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **11**, 47-58;
25. Babensee J.E. *et al.* (1999) *Pharm. Res.* **17**, 497-504;
26. Rezanian A. *et al.* (1997) *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 9-19;
27. Kouvroukoglou S. *et al.* (2000) *Biomaterials* **21**, 1725-1733;
28. Olbrich K.C. *et al.* (1996) *Biomaterials* **17**, 759-764;
29. Dee K.C. *et al.* (1999) *Biomaterials* **20**, 221-227;
30. Rezanian A. *et al.* (1999) *Biotechnol. Prog.* **15**, 19-32;
31. Massia S.P. *et al.* (1991) *J. Cell Biol.* **114**, 1089-1100;
32. Houseman B.T. *et al.* (2001) *Biomaterials* **22**, 943-955;

33. Humphries M.J. *et al.* (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 2637-2647;
34. Danilov Y.N. *et al.* (1989) *Exp. Cell Res.* **182**, 186-196;
35. Underwood P.A. *et al.* (1989) *J. Cell Sci.* **93**, 641-649;
36. Drumheller P.D. *et al.* (1994) *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 772-780;
37. Neff J.A. *et al.* (1999) *Biomaterials* **20**, 2377-2393;
38. Lee K.Y. *et al.* (2001) *Chem. Rev.* **101**, 1869-1879;
39. Putnam A.J. *et al.* (1999) *Nature Med.* **2**, 824-826;
40. Anselme K. (2000) *Biomaterials* **21**, 667-681;
41. Huttenlocher A. *et al.* (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 697-706;
42. Deane F. *et al.* (1984) *Ann. Rev. Med.* **35**, 561-575;
43. Hynes R. (1985) *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**, 67-90;
44. Thomas C.H. *et al.* (1997) *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 81-93;
45. Puleo D.A. *et al.* (1991) *Bone* **12**, 271-276;
46. Gronowicz G. *et al.* (1996) *J. Orthop. Res.* **14**, 878-887;
47. Baron M. *et al.* (1990) *Nature*, **345**, 642-646;
48. Alberts B. *et al.* (1995) *Biologia molecolare della cellula* (III ed.) Zanichelli;
49. Cheng S. *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* **37**, 1-8;
50. Caldwell E.E.O. *et al.* (1996) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 203-216;
51. Suzuki S. *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15307-15314;
52. Stockmann A. *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22874-22882;
53. Preissner K.T. *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12247-12253;
54. Lane D.A. *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16343-16348;
55. Kost C. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12098-12105;
56. Cardin A.D. *et al.* (1989) *Arteriosclerosis* **9**, 21-32;
57. Sobel M. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8857-8862;
58. Gibson A.D. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6432-6442;
59. Lin M. *et al.* (2001) *Biomaterials* **22**, 189-193;
60. Sakou T. (1998) *Bone* **22**, 591-603;
61. Vallejo L.F. *et al.* (2002) *J. Biotech.* **22**, 185-194;
62. Ruppert R. *et al.* (1996) *Eur. J. Biochem.* **237**, 295-302;
63. Scheufler C. *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* **287**, 103-115;
64. Urist M.R. (1997) *J. Bone Min. Res.* **12**, 343-346;
65. Saito A. *et al.* (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1651**, 60-67;
66. Saito A. *et al.* (2004) *J. Biomed. Mater. Res.* **70**, 115-121;

67. Saito A. *et al.* (2005) *J. Biomed. Mater. Res.* **72**, 77-82;
68. Puleo D.A. *et al.* (1999) *Biomaterials* **20**, 2311-2321;
69. Nanci A. *et al.* (1998) *J. Biomed. Mater. Res.* **40**, 324-335;
70. Malafaya P.B. *et al.* (2002) *Curr. Op. Solid State Mater. Sci.* **6**, 297-312;
71. Hersel U. *et al.* (2003) *Biomaterials* **24**, 4385-4415;
72. Vondele S.V. *et al.* (2003) *Biotech. Bioeng.* **82**, 784-790;
73. Tosatti S. *et al.* (2003) *Biomaterials* **24**, 4949-4958;
74. Heckman J.D. *et al.* (1999) *J Bone Joint Surg.* **81**, 1717-1729;
75. Miller R.A. *et al.* (1977) *J. Biomed. Mater. Res.* **11**, 711-719;
76. Glass J.R. *et al.* (1996) *Biomaterials* **17**, 1101-1108;
77. Smetana K. (1993) *Biomaterials* **14**, 1046-1050;
78. Suzuki Y. *et al.* (1998) *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 317-322;
79. Suzuki Y. *et al.* (1999) *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 522-527;
80. Suzuki Y. *et al.* (2000) *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 405-409;
81. Ito Y. *et al.* (1993) *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 901-907;
82. Massia S.P. *et al.* (1990) *Ann. NY Acad. Sci.* **589**, 261-270;
83. Dee K.C. *et al.* (1998) *J. Biomed. Mater. Res.* **40**, 371-377;
84. Rezanian A. *et al.* (1999) *Langmuir* **15**, 6931-6939;
85. Puleo D.A. (1996) *Biomaterials* **17**, 217-222;
86. Xiao S.J. *et al.* (1998) *Langmuir* **14**, 5507-5516;
87. Xiao S.J. *et al.* (1997) *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **8**, 867-872;
88. Gawalt E.S. *et al.* (2003) *Langmuir* **19**, 200-204;
89. Schwartz J. *et al.* (2003) *Mater. Sci. Eng. C* **23**, 395-400;
90. Zreiqat H. *et al.* (2003) *J. Biomed. Mater. Res.* **64**, 105-113;
91. Hayakawa T. *et al.* (2003) *J. Biomed. Mater. Res.* **67**, 684-688;
92. Ratner B.D. (1995) *Biosen. Bioelec.* **10**, 797-804;
93. Huang N.P. *et al.* (2001) *Langmuir* **17**, 489-498;
94. Healy K.E. *et al.* (1999) *Ann. NY Acad. Sci.* **875**, 24-35;
95. Ferris D.M. *et al.* (1999) *Biomaterials* **20**, 2323-2331;
96. Chechik V. *et al.* (2000) *Adv. Mater.* **12**, 1161-1171;
97. Sugawara T. *et al.* (1995) *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 1047-1052;
98. Shin H. *et al.* (2002) *J. Biomed. Mater. Res.* **61**, 169-179;
99. Stile R.A. *et al.* (2001) *Biomacromolecules* **2**, 185-194;
100. Borkenhagen M. *et al.* (1999) *J. Biomed. Mater. Res.* **40**, 392-400;

101. Rowley J.A. *et al.* (1999) *Biomaterials* **20**, 45-53;
102. Holmes T.C. *et al.* (2000) *PNAS* **97**, 6728-6733;
103. Holmes T.C. (2002) *TRENDS Biotech.* **20**, 16-21;
104. Hartgerink J.D. *et al.* (2001) *Science* **294**, 1684-1688;
105. Zhang S. (2003) *Nat. Biotech.* **21**, 1171-1178;
106. Aggeli A. *et al.* (1997) *Nature* **386**, 259-262;
107. Lashuel H.A. *et al.* (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5262-5277;
108. Xu G. *et al.* (2001) *PNAS* **98**, 3652-3657;
109. Hartgerink J.D. *et al.* (2002) *PNAS* **99**, 5133-5138;
110. Zhang S. *et al.* (2002) *Curr. Op. Chem. Bio.* **6**, 865-871;
111. Rajagopal K. *et al.* (2004) *Curr. Op. Struct. Bio.* **14**, 480-486;
112. Aggeli A. *et al.* (2001) *PNAS* **98**, 11857-11862;
113. Zhang S. (2002) *Biotech. Adv.* **20**, 321-339;
114. Schachner M. (2000) *Nature* **405**, 747-748;
115. Davis M.E. *et al.* (2005) *Circulation* **111**, 442-450;
116. Zhang S. *et al.* (2005) *Sem. Can. Bio.* **15**, 413-420;
117. Genové E. *et al.* (2005) *Biomaterials* **26**, 3341-3351;
118. Narmoneva D.A. *et al.* (2005) *Biomaterials* **26**, 4837-4846;
119. Yokoi H. *et al.* (2005) *PNAS* **102**, 8414-8419;
120. Zhang S. *et al.* (1994) *Biopolymers* **34**, 663-672;
121. Leon E.J. *et al.* (1998) *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* **9**, 297-312;
122. Xiong H. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6349-6353;
123. Jun S. *et al.* (2004) *Biophys. J.* **87**, 1249-1259;
124. Fung S.Y. *et al.* (1994) *Biophys. J.* **85**, 537-548;
125. Hong Y. *et al.* (2003) *Biomacromolecules* **4**, 1433-1442;
126. Chen P. (2005) *Coll. Surf. A* **261**, 3-24;
127. Zhang S. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3334-3338;
128. Zhang S. *et al.* (1999) *React. Funct. Polym.* **41**, 91-102;
129. Dettin M. *et al.* (2002) *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 466-471;
130. Gürsoy R.N. *et al.* (1999) *J. Pept. Res.* **53**, 414-421;
131. Chang P.-T. *et al.* (2000) *Brain Res. Prot.* **6**, 6-12;
132. Watanabe K. *et al.* (2001) *J. Pept. Res.* **58**, 342-346;
133. Kokubo T. *et al.* (2004) *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 99-107;
134. Bagno A. *et al.* (2004) *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 935-949;

135. Mizuno M. (2001) *Trends Glycosci. Glycotech.* **13**, 11-30;
136. Luo P. *et al.* (1997) *Biochemistry* **36**, 8413-8421;
137. Nelson J *et al.* (1986) *Prot. Struct. Funct. Genet.* **1**, 211-217;
138. Cammers-Goodwin A. *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 3082-3090;
139. Dong A. *et al.* (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 275-281;
140. Merrifield B. (1986) *Science* **232**, 341-347;
141. Fields G.B. *et al.* (1992) *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant G.A.(ed.), W.H. Freeman and Company;
142. *User Manual*, Model 431 A Peptide Synthesizer, Applied Biosystems (ed.), versione 1.12;
143. Schnölzer M. *et al.* (1992) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **40**, 180-193;
144. Carpino L.A. *et al.* (1972) *J. Org. Chem.* **37**, 3404-3409;
145. Fields G.B. *et al.* (1990) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **35**, 161-214;
146. Wang S.S. *et al.* (1981) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **18**, 459-467;
147. Sieber P. (1987) *Tetrahedron Letters* **28**, 6147-6150;
148. Knorr R. *et al.* (1989) *Tetrahedron Letters* **30**, 1927-1930;
149. *User Bulletin 33*, Model 431 A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystems (ed.);
150. Fields C.G. *et al.* (1991) *Pept. Res.* **4**, 95-101;
151. Ball H.L. *et al.* (1996) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **48**, 31-47;
152. Miranda L.P. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1181-1186;
153. Abdelmoty I. *et al.* (1994) *Letters in Peptide Science* **1**, 57-67;
154. Carpino L.A. *et al.* (1994) *Tetrahedron Letters* **35**, 2279-2282;
155. Sarin V.K. *et al.* (1981) *Analyl. Biochem.* **117**, 147-157;
156. Introduction to Cleavage Techniques (1990) *Strategies in Peptide Synthesis*, Applied Biosystems (ed.);
157. King D.S. *et al.* (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 255-266;
158. Sieber P. *et al.* (1987) *Tetrahedron Letters* **28**, 6031-6034;
159. Sieber P. *et al.* (1991) *Tetrahedron Letters* **32**, 739-742;
160. Pearson D.A. *et al.* (1989) *Tetrahedron Letters* **30**, 2739-2742;
161. Stulik K. *et al.* (1997) *Analytica Chimica Acta* **352**, 1-19;
162. Factor Affecting Capillary Electrophoresis Analysis, The Model 270 A (1990) Applied Biosystems (ed.);
163. Siuzdak G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 11290-11297;

164. Beavis R.C. *et al.* (1990) *Analytical Chemistry* **62**, 1836-1840;
165. Weber P.J.A. *et al.* (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 597-600;
166. Johnson W.C. Jr. (1988) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 145-166;
167. Greenfield N. *et al.* (1969) *Biochemistry* **8**, 4108-4116;
168. Greenfield N. (1996) *Analyt. Biochem.* **235**, 1-10;
169. Fiori S. *et al.* (1997) *J. Pept. Sci.* **3**, 336-346;
170. Perczel A. *et al.* (1992) *Prot. Struct. Funct. Gen.* **13**, 57-69;
171. Chakrabartty A. *et al.* (1993) *Biochemistry* **32**, 5560-5565;
172. Perczel A. *et al.* (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9772-9784;
173. Perczel A. *et al.* (1993) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **41**, 223-236;
174. Hollosi M. *et al.* (1994) *Biopolymers* **34**, 177-185;
175. Dettin M. *et al.* (2001) *J. Pept. Sci.* **7**, 358-373;
176. Woody R.W. (1968) *J. Chem. Phys.* **49**, 4797-4806;
177. Susi H. *et al.* (1986) *Met. Enzym.* **130**, 290-311;
178. Jackson M. *et al.* (1995) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 95-120;
179. Arrondo J.L.R. *et al.* (1993) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **59**, 23-56;
180. Byler M. *et al.* (1986) *Biopolymers* **25**, 469-487;
181. Dong A. *et al.* (1990) *Biochemistry* **29**, 3303-3308;
182. Hering J.A. *et al.* (2002) *Proteomics* **2**, 839-849;
183. Mantsch H.H. *et al.* (1993) *Biopolymers* **33**, 210-207;
184. Bagno A. *et al.* (2003) *Acta Bioeng. Biomech.* **5**, 35-42;
185. Dettin M. *et al.* (2005) *Biomaterials* **26**, 4507-4515;
186. Meeza E. *et al.* (1975) *Life Sciences* **17**, 1721-1732;
187. Bagno A. *et al.* (2004) *Biomaterials* **25**, 2437-2445;
188. Vacatello M. *et al.* (2005) *Biomaterials* **26**, 3207-3214;
189. Xu D. *et al.* (2001) *Proteins* **44**, 312-320;
190. Lynn G.W. *et al.* (2005) *Biochemistry* **44**, 565-574;
191. Powers J.-P.S. *et al.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 239-250.



## *Ringraziamenti*

Desidero ringraziare la Prof.ssa Gabriella D'Auria e il Prof. Livio Paolillo per la disponibilità e la competenza con cui mi hanno seguita nel corso del dottorato; la collaborazione di tutto il loro staff, a partire dalla Dott.ssa Lucia Falcigno, Dott.ssa Manuela Vacatello e Dott. Diego Gargiulo, è stata indispensabile.

Doveroso il grazie alla Prof.ssa Manuela De Castro che ha seguito con entusiasmo ed interesse le varie fasi del lavoro di dottorato.

La perfetta organizzazione e la disponibilità dimostrata dalla Prof.ssa Rosa Lanzetta mi ha permesso di arrivare a questo traguardo: ho molto apprezzato i consigli ricevuti e la tempestività nel rispondere alle mie richieste di informazioni.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Monica Dettin per l'assistenza e l'insostituibile contributo che mi ha offerto durante lo svolgimento e la stesura del presente lavoro e al Prof. Carlo Di Bello.

Un grazie anche alla Prof.ssa Maria Teresa Conconi e alla Dott.ssa Anna Michela Menti per aver condotto i saggi biologici sui peptidi da me sintetizzati, al Dott. Daniele Dal Zoppo che ha eseguito tutte le analisi di massa con tempestività ed accuratezza e alla Dott.ssa Francesca Ghezzi per le foto al microscopio ottico.

Desidero inoltre esprimere la mia gratitudine alla Dott.ssa Antonella Pasquato che in questi anni mi ha supportata, aiutata e incoraggiata e al Sig. Lorenzo Tonin, la cui bravura e praticità nell'aggiustare la strumentazione del laboratorio si è sempre rivelata insostituibile.

Ringrazio infine di cuore tutti i miei parenti e amici per la fiducia e il sostegno che mi hanno sempre dimostrato.