

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000021557
Data Deposito	09/08/2021
Data Pubblicazione	09/02/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	14	435

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	19	08

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	8	64

Titolo

PEPTIDI BIOMIMETICI E LORO USO NELLA RIGENERAZIONE OSSEA

PEPTIDI BIOMIMETICI E LORO USO NELLA RIGENERAZIONE OSSEA

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione concerne peptidi biomimetici aventi una sequenza pentapeptidica in comune, che permettono la rigenerazione ossea mediante l'attivazione del processo di deposizione dell'idrossiapatite (HAp). Vengono altresì descritti i loro impieghi come medicamento, e nello specifico nel campo della rigenerazione ossea, dentale (dentina e smalto) e parodontale, e nella funzionalizzazione di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico. Viene descritta ulteriormente una composizione farmaceutica e una composizione cosmetica comprendente tali peptidi, l'uso come medicamento, nella rigenerazione ossea, dentale e parodontale, il suo uso cosmetico e l'uso nella funzionalizzazione di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico.

STATO DELLA TECNICA

L'assemblaggio di idrossiapatite (HAp) e proteine è un processo cruciale alla base della formazione delle ossa e dei denti nei vertebrati. Il corpo umano è in grado di produrre questi composti ibridi organici-inorganici, a struttura gerarchica, utilizzando molecole organiche come regolatrici della deposizione di HAp.

L'HAp $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, una forma cristallina di fosfato di calcio (CaP), è il componente principale dell'osso, della dentina e dello smalto. In questi tessuti duri, l'HAp, in abbinamento con vari tipi di proteine, forma strutture gerarchiche altamente organizzate, con proprietà morfologiche, strutturali e meccaniche uniche.

L'osso è formato per il 65-70% di componenti minerali, principalmente HAp, e per il 30-35% di molecole organiche. La componente organica comprende principalmente collagene di tipo I, varie altre proteine di tipo non collagenico e glicosaminoglicani.

L'organizzazione del collagene di tipo I è importante per la deposizione di HAp nel tessuto osseo. Due catene α -1 e una catena α -2 di collagene tipo I costituiscono l'unità fondamentale delle fibrille di collagene, il tropocollagene. Le unità di tropocollagene formano una struttura altamente allineata, e le regioni di gap tra le fibrille, chiamate "hole zones" ed aventi una alta densità di carica, sono i siti critici dove avviene la nucleazione

della componente minerale.

Le proteine di tipo non collagenico, come la sialoproteina ossea, l'osteonectina, l'osteopontina, l'osteocalcina e le proteine della matrice della dentina si legano al tropocollagene e controllano la mineralizzazione dell'HAp. Queste proteine includono
5 un'alta densità di residui di aminoacidi acidi nelle loro sequenze, che hanno un'alta affinità per ioni Ca^{2+} .

Lo smalto dei denti è costituito da componenti minerali per più del 95% in peso e per meno dell'1% da componenti organici. Invece che dal collagene di tipo I presente nell'osso, il ruolo più importante per la mineralizzazione dell'HAp nello smalto è svolto
10 dalla amelogenina, con il contributo di altre proteine (ameloblastina, amelina, sheathelina, enamulina, e metalloproteinasi di matrice 20). Nanosfere di amelogenina auto-assemblata e gruppi di pre-nucleazione minerale formano nanoparticelle composite che si assemblano poi in catene lineari e matrici parallele, portando alla formazione di fasci di cristalli allungati di smalto.

15 La riparazione di difetti e/o lacune ossee e dentali può essere eseguita mediante autotrapianto (utilizzo di osso derivato dal paziente stesso, prelevato in altri siti corporei) o allotrapianto (materiale osseo derivato da cadavere). In entrambi i casi possono sorgere problematiche spesso insormontabili dovute a carenza di siti di prelievo (autotrapianto) o problemi di immunogenicità (allotrapianto).

20 Per questi motivi, la ricerca e lo sviluppo di nuovi materiali per la riparazione ossea e dentale è un problema di stretta attualità. Avendo come riferimento i principi dell'ingegneria tissutale, la rigenerazione di tessuti e organi può essere ottenuta attraverso l'impianto di costrutti ingegnerizzati. Il successo di un costrutto ingegnerizzato dipende dall'uso di una combinazione appropriata di scaffold, fattori stimolanti ed
25 eventualmente cellule.

La comprensione dei meccanismi alla base della mineralizzazione dell'HAp con molecole organiche è stata fonte di ispirazione per la progettazione di nuovi materiali funzionali. Molti ricercatori hanno studiato la formazione di ibridi organici dell'HAp utilizzando molecole organiche, principalmente proteine, in condizioni biologiche che
30 imitano il processo di biomineralizzazione.

Per quanto riguarda le proteine, quelle legate alla biomineralizzazione dell'HAp *in vivo*

sono sempre state considerate candidati ideali per la produzione di ibridi proteina-HAp. Infatti, la mineralizzazione di HAp con collagene e amelogenina, che sono le componenti organiche che regolano la deposizione di HAp nell'osso e nei denti, è stata studiata in modo molto approfondito. Le proteine di tipo non collagenico e le proteine diverse
5 dall'amelogenina che concorrono al controllo della deposizione di HAp nell'osso e nello smalto sono state anch'esse utilizzate per la preparazione di ibridi proteina-HAp. Tutti questi ibridi organici-inorganici, impiegati come scaffold per la rigenerazione ossea, in presenza di cellule o meno, hanno fornito risultati positivi promuovendo la differenziazione osteogenica delle cellule e migliorando la formazione di nuovo osso e
10 l'integrazione.

Le proteine utilizzate per generare ibridi organici dell'HAp non si limitano a quelle relative alla mineralizzazione ossea e dentale. Le proteine della seta sono state utilizzate come proteine modello per la nucleazione e deposizione di HAp grazie alla loro elevata biocompatibilità e alle proprietà meccaniche e strutturali.

15 Oltre alle proteine, altre macromolecole naturali come i polisaccaridi (ad es.: chitina, chitosano, condroitin solfato) hanno destato un certo interesse come substrati in grado di indurre e regolare la precipitazione dell'HAp. Parimenti, nanofibre di cellulosa batterica sono state utilizzate come modello in grado di riprodurre le strutture a base di collagene per indurre la deposizione dell'HAp.

20 Un'alternativa molto interessante emersa di recente è l'uso di peptidi biomimetici quali substrati in grado di attivare la nucleazione dell'HAp se inclusi all'interno di scaffold per la rigenerazione ossea. I peptidi possono essere facilmente prodotti sia per sintesi diretta delle sequenze di interesse sia con metodi di ingegneria genetica. Le sequenze di interesse possono essere disegnate *in silico* o derivate da quelle dei domini attivi delle
25 proteine della matrice extracellulare e dell'ampia famiglia di proteine direttamente coinvolte nei processi di mineralizzazione ossea *in vivo* (ad es.: il collagene tipo I, le proteine non collageniche, l'amelogenina, ecc.), e quindi utilizzate per funzionalizzare scaffold per la rigenerazione ossea e/o direttamente per preparare ibridi peptide-HAp. Questi peptidi biomimetici possono svolgere varie funzioni all'interno della matrice per
30 la rigenerazione ossea: possono avere un'attività osteoconduttiva e favorire la nucleazione e deposizione di HAp, avere una attività osteoinduttiva e quindi favorire

l'adesione delle cellule, la loro proliferazione e differenziazione in linee osteoblastiche, e potrebbero anche essere implicati nei processi di neovascolarizzazione, che rappresentano un passaggio cruciale per la rigenerazione ossea *in vivo*. A seconda della funzione svolta, i peptidi biomimetici possono essere incorporati nello scaffold in
5 varie posizioni (sulla superficie, nella massa) e in forma libera o legata, a seconda che sia richiesta o no la loro diffusione nell'ambiente circostante all'impianto.

Il particolare interesse per lo sviluppo di nuovi materiali per la riparazione ossea, paradontale e dentale, unitamente alle difficoltà riscontrate nel caso di autotrapianto o di allotrapianto, sono alla base dell'esigenza di individuare nuovi approcci per la
10 riparazione di difetti nell'ambito della rigenerazione ossea.

Scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire dei nuovi peptidi biomimetici che permettono la rigenerazione ossea mediante l'attivazione e l'accelerazione di fenomeni di nucleazione dell'HAp, che non mostrino gli svantaggi rilevati per diversi peptidi o proteine noti per la medesima applicazione. In particolare, le proteine
15 appartenenti alla famiglia delle BMP (bone morphogenic protein) presentano diversi svantaggi legati alla estrema reattività *in vivo* e all'alto costo di produzione. Due diversi membri di questa famiglia sono stati sfruttati commercialmente: BMP-2 e BMP-7. I prodotti contenenti BMP-7, dopo aver ricevuto approvazioni regolatorie solo per l'uso in ambiti molto limitati, sono state ritirate dal mercato in seguito all'emergere di seri dubbi
20 riguardo la loro sicurezza; sono stati, infatti, riportati casi di svariati effetti collaterali a partire da semplici irritazioni sino ad arrivare a gravi infezioni che hanno richiesto interventi chirurgici riparatori. I prodotti basati invece su BMP-2 (in particolare la sua versione ricombinante rH-BMP-2) sono attualmente in commercio e rappresentano lo standard of care per un certo numero di applicazioni, spesso in competizione con
25 l'utilizzo di osso autologo. Nel corso del tempo, tuttavia, un numero piuttosto elevato di studi ha evidenziato molti effetti collaterali, anche piuttosto gravi, direttamente correlabili all'uso di questo peptide e non individuati nei primi trial clinici; fra i principali possiamo citare: osteolisi, problemi urologici, emersione di dolori e, nel caso dei dosaggi più elevati, un aumento nel rischio di sviluppare tumori [E.J. Carragee et al. The Spine
30 Journal 11 (2011) 471–491]. Inoltre, i prodotti contenenti rH-BMP-2 hanno un costo estremamente elevato. Per quanto riguarda i peptidi, invece, viene attualmente

utilizzata in clinica una sequenza derivante dal collagene di tipo 1; tale sequenza, nota come P-15, ha una elevatissima capacità di stimolare l'adesione cellulare [H. Nguyen et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 311 (2003) 179–186]; tuttavia, per essere efficace nel promuovere la formazione di tessuto osseo, deve
5 essere legata ad un supporto preformato, in genere matrice ossea, che fornisca alle cellule attratte un ambiente favorevole dove svilupparsi e differenziarsi.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

L'invenzione pertanto concerne peptidi biomimetici aventi la formula generale (I):

10 Xaa1-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr-Xaa2 (SEQ ID NO: 5)

in cui:

- quando Xaa1 è Val-Asn-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:6),
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7)
- 15 oppure
Xaa2 è Ala-Trp;
- quando Xaa1 è assente,
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7);
- e
- 20 - quando Xaa1 è Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:8),
Xaa2 è assente.

I peptidi biomimetici descritti sono di natura sintetica.

Sotto un altro aspetto, la presente invenzione descrive l'uso dei peptidi come medicamento.

25 In un altro aspetto l'invenzione riguarda l'uso dei peptidi della presente invenzione, nella rigenerazione ossea, dentale (dentina e smalto) e parodontale.

Sotto ancora un altro aspetto, la presente invenzione descrive una composizione comprendente uno o più peptidi, uguali o diversi tra loro, loro sali ed eccipienti o additivi accettabili in ambito biomedico, cosmetico o farmaceutico.

30 Viene altresì descritto l'uso della composizione secondo la presente invenzione come medicamento.

Sotto ancora un altro aspetto, la presente invenzione descrive l'uso della composizione,

nella rigenerazione ossea, dentale (dentina e smalto) e parodontale.

Sotto ancora un altro aspetto la presente invenzione descrive l'uso della composizione farmaceutica o cosmetica comprendente i peptidi qui descritti oppure l'uso dei peptidi stessi, per la funzionalizzazione superficiale di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico.

In una ulteriore forma di realizzazione viene descritto l'uso cosmetico della composizione comprendente i peptidi aventi la formula generale (I):

Xaa1-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr-Xaa2 (SEQ ID NO: 5) descritti dalla presente invenzione.

Le rivendicazioni dipendenti descrivono forme di realizzazione particolari dell'invenzione.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

L'invenzione verrà ora descritta in dettaglio e facendo riferimento alle Figure allegate.

Figura 1: Immagini SEM di schiume di fibroina. A: Schiuma di fibroina senza peptidi, incubata in SBF per 14 giorni. B: Schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:3, incubata in SBF per 14 giorni. C: Dettaglio a più alto ingrandimento dell'immagine B, che mostra la morfologia dei depositi minerali. D: Schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:4, incubata in SBF per 14 giorni. E: Schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:2, incubata in SBF per 14 giorni. F: Dettaglio a più alto ingrandimento dell'immagine E, che mostra l'accumulo dei depositi minerali.

Figura 2: Spettri IR di schiume di fibroina. (a) Schiuma di fibroina senza peptidi, non incubata in SBF. (b) Schiuma di fibroina senza peptidi, incubata in SBF per 14 giorni. (c) Schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:3, incubata in SBF per 14 giorni. (d) Schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:4, incubata in SBF per 14 giorni. (e) Schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:2, incubata in SBF per 14 giorni. L'area racchiusa nel rettangolo tratteggiato individua la regione spettrale 1100-900 cm⁻¹ caratteristica delle vibrazioni di stretching di gruppi fosfato e carbonato.

Figura 3: Spettri SEM/EDX di schiuma di fibroina funzionalizzata con peptide biomimetico SEQ ID NO:4 incubata in SBF per 14 giorni. L'immagine SEM in alto mostra

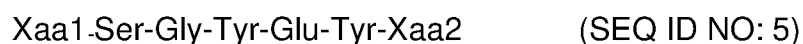
una zona del campione in cui sono presenti le due forme cristalline: a destra prevalgono i cristalli di grosse dimensioni e di forma regolare (Objects 10438), a sinistra si evidenziano gli aggregati cristallini costituiti dall'unione di cristalli di piccole dimensioni (Objects 10437). La composizione chimica dei cristalli "Objects 10438" è dominata dalla presenza degli elementi sodio (Na) e cloro (Cl), mentre calcio (Ca) e fosforo (P) sono completamente assenti. Al contrario, gli aggregati "Object 10437" presentano segnali intensi di calcio (Ca) e fosforo (P). I segnali relativi agli elementi carbonio (C), ossigeno (O), azoto (N), oro (Au) e palladio (Pd), comuni ad entrambi gli spettri, rispecchiano la natura organica della schiuma di fibroina (C, O, N) e la modalità di preparazione del campione (sputtering Au/Pd).

Figura 4: Le schiume di fibroina non funzionalizzate (SF) e funzionalizzate con peptidi biomimetici (SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4), incubate in assenza (NO MSC) o in presenza (+ MSC) di cellule staminali mesenchimali umane sono state mantenute in un mezzo completo per 7 giorni. In seguito, le schiume sono state decellularizzate e colorate con la colorazione von Kossa per evidenziare i depositi di calcio (A). L'area percentuale coperta dalla colorazione di von Kossa è stata calcolata utilizzando il software ImageJ e riportata nei grafici B e C. La quantità di calcio depositato è sempre superiore nelle schiume di fibroina funzionalizzate con peptidi biomimetici rispetto alla schiuma non funzionalizzata, sia in assenza (B) che in presenza (C) di cellule MSC.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'identificazione di nuovi peptidi biomimetici di natura sintetica, che hanno la caratteristica di permettere la rigenerazione ossea mediante l'attivazione e l'accelerazione dei processi di nucleazione e deposizione dell'HAp.

I peptidi biomimetici hanno la formula generale (I):



in cui:

- quando Xaa1 è Val-Asn-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:6),
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7)
oppure

Xaa2 è Ala-Trp;

- quando Xaa1 è assente,

Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7);

e

- 5 - quando Xaa1 è Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:8),
Xaa2 è assente.

Tutti i peptidi qui descritti hanno in comune la sequenza pentapeptidica di SEQ ID NO:5. Vantaggiosamente in una forma di realizzazione preferita i peptidi sono scelti dal gruppo consistente in:

- 10 SEQ ID NO:1 Val-Asn-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe,
SEQ ID NO:2 Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe,
SEQ ID NO:3 Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr, e
SEQ ID NO:4 Val-Asn-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp.

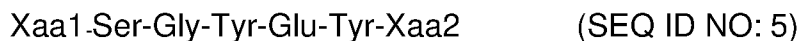
- 15 Tutti i peptidi di SEQ ID NO:1-4 hanno in comune il *core* amminoacidico di SEQ ID NO:5. Senza essere legati ad alcuna teoria, sembrerebbe che è proprio questo *core* di cinque amminoacidi (pentapeptide) che permette ai peptidi la capacità di rigenerazione ossea mediante l'attivazione e l'accelerazione di fenomeni di nucleazione del processo di deposizione dell'HAp.

- 20 Tali peptidi sono stati identificati dagli inventori mediante prove in cui a matrici in fibroina della seta vengono addizionati i peptidi descritti in US7193038, noti per agevolare l'adesione e la proliferazione cellulare.

- Le matrici (in particolare superfici elettrofilate, gel, paste e schiume) addizionate dei peptidi secondo la presente invenzione hanno favorito la proliferazione cellulare ed un
25 rapido avvio dei processi di mineralizzazione con deposizione di precursori di idrossiapatite anche sulle matrici funzionalizzate e incubate in ambienti favorevoli alla crescita ossea sia in presenza che in totale assenza di cellule.

- A conferma che tale risultato era ascrivibile alla presenza dei peptidi usati per la funzionalizzazione, sono stati condotti degli esperimenti nello stesso ambiente ma su
30 matrici non funzionalizzate e, come atteso, non c'è stata alcuna nucleazione (significativa) di componente minerale.

Un secondo aspetto della presente invenzione riguarda l'uso come medicamento dei peptidi aventi la formula generale (I):



in cui:

- quando Xaa1 è Val-Asn-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:6),
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7)
oppure
Xaa2 è Ala-Trp;
- quando Xaa1 è assente,
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7);
e
- quando Xaa1 è Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:8),
Xaa2 è assente.

Sotto ancora un altro aspetto viene descritto l'uso dei peptidi, aventi formula generale (I) secondo la presente invenzione, nella rigenerazione ossea, dentale (dentina e smalto) e parodontale, come substrato per la nucleazione di HAp.

In una forma preferita, detta rigenerazione ossea, dentale e parodontale è nel trattamento di una patologia del tessuto osseo, dentale o parodontale o è richiesta da una particolare tecnica chirurgica.

In una forma ancora più preferita, detta patologia del tessuto osseo, dentale o parodontale è scelta dal gruppo comprendente: fratture, lacune ossee, sarcoma, ipersensibilità dentinale, piorrea, mentre la tecnica chirurgica può comprendere fusione spinale posterolaterale, dissettomia anteriore cervicale con fusione, fusione intervertebrale lombare posteriore, fusione intervertebrale lombare transforaminale, impianto di endoprotesi ortopediche, rialzo del seno mascellare, revisione di endoprotesi ortopediche, vertebroplastica, impianto dentale.

Sotto un quarto aspetto, la presente invenzione descrive una composizione comprendente uno o più peptidi, uguali o diversi tra loro, loro sali ed eccipienti o additivi accettabili in ambito biomedico, cosmetico o farmaceutico.

La composizione dell'invenzione può ulteriormente comprendere acido ialuronico e/o

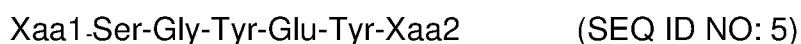
suoi sali, chitosano, acido alginico, fibroina di seta, glicole propilenico, alginato di glicole propilenico, polossameri, condroitin-solfato, collagene, gelatina, elastina, acido polilattico (PLA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), acido poliglicolico (PGA), alcol polivinilico (PVA), policaprolattone (PCL), biovetri, idrossiapatite e composti correlati, 5 sali di calcio, matrice ossea decellularizzata, pectina, sericina, cellulosa e suoi derivati, fibrina e loro combinazioni.

In una forma preferita la composizione farmaceutica comprendente uno o più peptidi, uguali o diversi tra loro, loro sali ed eccipienti farmacologicamente accettabili è sotto forma di gel, pasta, membrana, tessuto, schiuma, putty, polvere, grani, solido compatto, 10 film oppure è contenuta/adsorbita all'interno di elementi micellari o particellari, fibre, nanofibre, fibre cave, nanofibre cave, membrane, ceramiche, nanotubi, strutture metalliche porose e/o trabecolari, manufatti tessili, nanobolle, sol-gel, combinazioni di questi sistemi e compositi contenenti questi sistemi e loro combinazioni. Detta composizione sotto forma di gel o pasta può essere un dentifricio.

15 In una ulteriore forma preferita la composizione cosmetica comprendente uno o più peptidi, uguali o diversi tra loro, loro sali ed eccipienti accettabili per la formulazione cosmetica è sotto forma di gel, pasta, membrana, tessuto, schiuma, putty, polvere, grani, solido compatto, film oppure è contenuta/adsorbita all'interno di elementi micellari o particellari, fibre, nanofibre, fibre cave, nanofibre cave, membrane, ceramiche, 20 nanotubi, strutture metalliche porose e/o trabecolari, manufatti tessili, nanobolle, sol-gel, combinazioni di questi sistemi e compositi contenenti questi sistemi e loro combinazioni. Detta composizione sotto forma di gel o pasta può essere un dentifricio.

Sotto ancora un altro aspetto, la presente invenzione descrive l'uso della composizione, nella rigenerazione ossea, dentale e parodontale.

25 I peptidi di formula generale (I):



in cui:

- 30 - quando Xaa1 è Val-Asn-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:6),
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7)
oppure

Xaa2 è Ala-Trp;

- quando Xaa1 è assente,

Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7);

e

- 5 - quando Xaa1 è Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:8),
Xaa2 è assente,

e descritti mediante le sequenze SEQ ID NO:1-4 e utilizzati per la funzionalizzazione di matrici in fibroina della seta come descritto più sopra.

Viene altresì descritto l'uso della composizione secondo la presente invenzione come
10 medicamento.

Sotto ancora un altro aspetto la presente invenzione descrive l'uso della composizione farmaceutica o cosmetica comprendente i peptidi qui descritti, per la funzionalizzazione superficiale di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico.

- 15 La presente invenzione descrive ulteriormente l'uso della dei peptidi dell'invenzione, per la funzionalizzazione superficiale di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico. In una ulteriore forma di realizzazione viene descritto l'uso cosmetico della composizione comprendente i peptidi aventi la formula generale (I):

- 20 Xaa1-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr-Xaa2 (SEQ ID NO: 5) descritti dalla presente invenzione.

Si riportano di seguito Esempi di realizzazione della presente invenzione forniti a titolo illustrativo.

ESEMPI

- 25 Esempio 1:

Sintesi dei peptidi biomimetici

Sono stati sintetizzati alcuni peptidi in cui è presente il pentapeptide di SEQ ID NO:5. Le sequenze più promettenti, e che hanno mostrato la capacità di indurre un elevato grado di mineralizzazione con deposizione di precursori di idrossiapatite sono:

- 30 SEQ ID NO:1 Val-Asn-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe,

SEQ ID NO:2 Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe,

SEQ ID NO:3 Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr, e

SEQ ID NO:4 Val-Asn-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp.

I peptidi sono stati sintetizzati seguendo un protocollo di sintesi peptidica in fase solida con l'ausilio di microonde. Come supporto è stata utilizzata una resina di Wang. Ciascun coupling è stato effettuato lavorando con un eccesso di 5 volte rispetto al loading iniziale della resina e come agenti di coupling sono stati utilizzati N,N'-Diisopropilcarbodiimmide (DIC) (0.5 M in Dimetilformammide (DMF)) e l'agente di coupling Oxyma Pure® (1M in DMF). Il cleavage dalla resina è stato effettuato usando una miscela di Fenolo, triisopropilsilano (TIS), tioanisolo (TAN), H₂O e Acido trifluoroacetico (TFA) (4/4/4/2/86). Le sequenze sono state purificate tramite RP-HPLC semipreparativa

Esempio 2:

Preparazione di schiume di fibroina funzionalizzate con i peptidi biomimetici

Le matrici di fibroina funzionalizzata con i peptidi biomimetici sono state preparate in forma di schiuma liofilizzata, adottando la seguente procedura:

- a) per la preparazione della soluzione acquosa di fibroina, 5 g di seta sgommata sono stati addizionati con 50 ml di una soluzione acquosa di Litio Bromuro 9.3 M; la miscela è stata incubata in un bagno termostatico a 60°C, per 3 ore; al termine del periodo di incubazione, la soluzione è stata filtrata e diluita con 100 ml di acqua distillata, trasferita in un sacchetto da dialisi e dializzata per 2 giorni contro acqua distillata fino a completa rimozione del sale; la soluzione acquosa di fibroina così ottenuta è stata recuperata dal sacchetto di dialisi e filtrata prima di essere addizionata con i peptidi biomimetici;
- b) per la preparazione delle soluzioni acquose di peptidi biomimetici, 50 mg di peptide sono stati solubilizzati con 2.5 ml di acqua distillata;
- c) per la preparazione della soluzione di fibroina contenente peptidi biomimetici, 10 ml di soluzione acquosa di fibroina sono stati addizionati con 2,5 ml di soluzione acquosa di peptide biomimetico; per la preparazione della soluzione di fibroina senza peptidi biomimetici (bianco) 10 ml di soluzione acquosa di fibroina sono stati addizionati con 2,5 ml di acqua;
- d) per la preparazione delle schiume liofilizzate, 0,1 ml della soluzione (c) sono stati

prelevati con una micropipetta, trasferiti in un contenitore di volume corrispondente e congelati a -20°C per 24 ore; successivamente, i contenitori sono stati posti in liofilizzatore e lasciati a liofilizzare per 48 ore, fino a completa rimozione del ghiaccio per sublimazione; dopo liofilizzazione le schiume sono state consolidate per immersione in metanolo e lasciate ad asciugare a temperatura ambiente.

I campioni di schiuma di fibroina così ottenuti sono stati conservati in essiccatore a temperatura ambiente fino al loro successivo utilizzo.

Esempio 3:

Incubazione di schiume di fibroina funzionalizzate con i peptidi biomimetici in ambiente favorevole alla crescita ossea (in assenza di cellule)

La soluzione nella quale sono state incubate le schiume funzionalizzate con i peptidi biomimetici è stata preparata in accordo col metodo di Kokubo e Takadama (Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? Biomaterials 2006 27(15): 2907-2915). La soluzione sarà d'ora in avanti identificata con l'acronimo SBF (Simulated Body Fluid).

L'incubazione delle schiume in SBF è stata eseguita nelle seguenti condizioni sperimentali:

- peso della schiuma: 4 mg
- volume della soluzione SBF: 40 ml
- temperatura: 37°C
- durata massima dell'incubazione: 14 giorni
- cambio della soluzione SBF: ogni 3 giorni

Al termine del periodo di incubazione, le schiume sono state prelevate, risciacquate delicatamente con acqua distillata e lasciate asciugare a temperatura ambiente prima delle successive analisi.

Esempio 4:

Caratterizzazione morfologica in microscopia elettronica a scansione (SEM) delle schiume di fibroina incubate in SBF

I campioni di schiuma di fibroina sono stati fissati su portacampioni per SEM (stub) da 1 cm di diametro mediante nastro biadesivo. Gli stub sono stati quindi metallizzati per

esposizione in plasma di oro/palladio (sputter-coater Desk IV, Denton Vacuum, LLC) e analizzati con un microscopio elettronico a scansione (Zeiss EVO MA10). I risultati ottenuti sono riportati in Figura 1.

Tutti i campioni esaminati, schiuma di fibroina non funzionalizzata (bianco) e schiume di fibroina funzionalizzate con peptidi biomimetici, presentano una deposizione superficiale di materiale con struttura poliedrica simil-cristallina, che appare molto più brillante rispetto al materiale polimerico in background che costituisce la schiuma. Queste caratteristiche (struttura regolare ed elevata intensità di risposta per esposizione al fascio elettronico) sono tipiche di materiali inorganici.

La densità del deposito inorganico è nettamente maggiore nei campioni di schiuma di fibroina funzionalizzata rispetto al bianco (schiuma di fibroina non funzionalizzata).

Esempio 5:

Caratterizzazione in spettroscopia infrarossa (ATR-FTIR) delle schiume di fibroina incubate in SBF

Campioni di schiuma di fibroina sono stati analizzati in spettroscopia infrarossa con uno spettrometro ALPHA FTIR (Bruker) equipaggiato con accessorio ATR Platinum Diamond, nell'intervallo di numeri d'onda $4000-400\text{ cm}^{-1}$, alla risoluzione di 4 cm^{-1} . Gli spettri ottenuti sono riportati in Figura 2.

Confrontando gli spettri dei campioni incubati in SBF (bianco e schiume funzionalizzate con peptidi biomimetici) con il campione di riferimento (schiuma di fibroina non incubata in SBF) è possibile osservare che i campioni incubati presentano bande IR nell'intervallo spettrale $1100-900\text{ cm}^{-1}$ che sono assenti nel riferimento. Queste bande sono attribuite alla vibrazione di stretching di gruppi quali il fosfato e il carbonato. La presenza di queste bande IR è quindi attribuibile al processo di incubazione in SBF. Tutti i campioni di spugne incubati in SBF, sia il bianco che quelli funzionalizzati con peptidi biomimetici, presentano queste bande IR. Tuttavia, è interessante osservare che l'intensità delle bande è nettamente superiore nei campioni funzionalizzati con peptidi biomimetici, mentre rimane ad un livello basale nel bianco, in accordo con le osservazioni di tipo morfologico riportate nell'Esempio 4.

Esempio 6:

Caratterizzazione chimica in microscopia elettronica a scansione con rivelatore a raggi

X (SEM/EDX) delle schiume di fibroina incubate in SBF

Campioni di schiuma di fibroina sono stati analizzati in SEM/EDX allo scopo di individuare dal punto di vista morfologico e composizionale le formazioni minerali costituite da sali di calcio e fosfato. I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 3.

- 5 Come già evidenziato in Figura 1 (immagini C e F), sono presenti due tipologie di depositi minerali: una costituita da cristalli singoli e una da aggregati cristallini di dimensioni variabili. Mentre i cristalli singoli sono principalmente costituiti da sali di sodio (Na) e cloro (Cl), gli agglomerati sono principalmente caratterizzati da segnali di calcio (Ca) e fosforo (P) e, con minore intensità, di magnesio (Mg). Da notare che i segnali di
- 10 carbonio (C), ossigeno (O), azoto (N), oro (Au) e palladio (Pd) sono comuni a tutti gli spettri in quanto rispecchiano la natura organica della schiuma di fibroina (C, O, N) e la modalità di preparazione del campione (sputtering Au/Pd).

Esempio 7:

Test di mineralizzazione delle schiume di fibroina incubate in assenza e in presenza di cellule staminali mesenchimali umane

- 15 Le cellule staminali mesenchimali umane (MSC) sono state acquistate da Lonza e coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), integrato con il 10% di MSC Stimulatory Supplement, 100 U/mL di penicillina-streptomicina e aminoacidi non essenziali a 37°C in atmosfera completamente umidificata al 5% di CO₂. Le schiume di
- 20 fibroina sono state poste in una piastra da 96 pozzetti, immerse in etanolo al 70% per 30 minuti, lavate in soluzione tampone fosfato (PBS) tre volte, immerse in 100 U/mL di penicillina-streptomicina per una notte e lavate tre volte in PBS. MSC (10⁴/50 µL) sono state seminate pipettando su diversi punti della schiuma per migliorare la distribuzione delle cellule all'interno della schiuma e lasciate aderire per 30 minuti. In seguito, 150 µL
- 25 di terreno completo sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Come controllo negativo, le schiume di fibroina sono state mantenute nel mezzo completo senza cellule. Il mezzo è stato cambiato ogni due giorni.

- Il deposito di calcio sulle schiume di fibroina decellularizzate è stato rivelato mediante la colorazione di von Kossa. Le schiume sono state lavate due volte con PBS (non
- 30 contenente ioni magnesio/calcio) prima della lisi cellulare e dell'estrazione delle proteine. La lisi cellulare è stata eseguita utilizzando il buffer HEPES (50 mM HEPES,

pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glicerolo, 1% (v/v) Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) contenente 100 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 1 µg/mL leupeptina e 1 µg/mL aprotinina. Dopo 30 minuti in ghiaccio, gli estratti sono stati centrifugati per 10 minuti a 13.000g come lisato cellulare e conservati a -20°C. La matrice depositata rimanente è stata lavata due volte con PBS (non contenente ioni magnesio/calcio). Per fissare la matrice sulle schiume di fibroina è stato aggiunto il 25% di formaldeide in acqua ultrapura a temperatura ambiente per 10 minuti e poi sono stati eseguiti due lavaggi con acqua ultrapura. Ai pozzetti contenenti le schiume di fibroina è stata aggiunta una soluzione di nitrato d'argento al 2,5% e sono stati quindi posti sotto i raggi UV per 30 minuti. Infine, è stato utilizzato tiosolfato di sodio al 5% per rimuovere l'eccesso di argento non reagito.

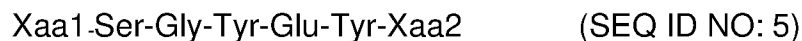
Le cellule staminali mesenchimali umane (MSC) sono state coltivate per 7 giorni nelle schiume di fibroina funzionalizzate con peptidi biomimetici, usando una schiuma di fibroina non funzionalizzata come riferimento. Per un tempo analogo sono state incubate le schiume senza cellule. L'entità del deposito di calcio è stata studiata mediante colorazione di von Kossa e quantificata mediante analisi d'immagine con software ImageJ. Brevemente, le immagini sono state convertite in immagini in scala di grigi a 16 bit. La soglia è stata regolata manualmente, e l'area percentuale coperta dal segnale sopra la soglia è stata misurata.

Come mostrato nella Figura 4, le schiume di fibroina funzionalizzate con peptidi biomimetici presentano quantità superiori di depositi di calcio rispetto alla schiuma non funzionalizzata. La quantità di calcio depositatasi per azione dei peptidi biomimetici è superiore nei campioni incubati in presenza di MSC, rispetto a quelli incubati senza MSC.

Dalla descrizione dettagliata e dagli Esempi sopra riportati, risultano evidenti i vantaggi conseguiti mediante i peptidi della presente invenzione. In particolare, tali peptidi si sono mostrati sorprendentemente e vantaggiosamente adatti all'impiego nella rigenerazione ossea, dentale e parodontale, favorendo una rapida ed efficace mineralizzazione.

RIVENDICAZIONI

1. Peptidi aventi la formula generale (I):



in cui:

- quando Xaa1 è Val-Asn-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:6),
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7)
oppure
Xaa2 è Ala-Trp;
- quando Xaa1 è assente,
Xaa2 è Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe (SEQ ID NO:7);
e
- quando Xaa1 è Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr (SEQ ID NO:8),
Xaa2 è assente.

2. I peptidi secondo la rivendicazione 1, scelti dal gruppo consistente in:

SEQ ID NO:1 Val-Asn-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe,

SEQ ID NO:2 Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp-Ser-Ser-Glu-Ser-Asp-Phe,

SEQ ID NO:3 Gly-Pro-Tyr-Val-Ala-His-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr, e

SEQ ID NO:4 Val-Asn-Gly-Gly-Tyr-Ser-Gly-Tyr-Glu-Tyr- Ala-Trp.

3. Peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2, per l'uso come medicamento.

4. Peptidi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, per l'uso nella rigenerazione ossea, dentale e parodontale.

5. I peptidi per l'uso secondo la rivendicazione 4, in cui detta rigenerazione ossea, dentale e parodontale è nel trattamento di una patologia del tessuto osseo, dentale o parodontale.

6. I peptidi per l'uso secondo la rivendicazione 5, in cui detta patologia del tessuto

osseo, dentale o parodontale è scelta dal gruppo comprendente: fratture, lacune ossee, sarcoma, ipersensibilità dentinale, piorrea.

5 7. Composizione comprendente uno o più peptidi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, loro sali ed eccipienti o additivi accettabili in ambito biomedico, cosmetico o farmaceutico.

10 8. La composizione secondo la rivendicazione 7, ulteriormente comprendente acido ialuronico e/o suoi sali, chitosano, acido alginico, fibroina di seta, glicole propilenico, alginato di glicole propilenico, polossameri, condroitin-solfato, collagene, gelatina, elastina, acido polilattico (PLA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), acido poliglicolico (PGA), alcol polivinilico (PVA), policaprolattone (PCL), biovetri, idrossiapatite, sali di calcio, matrice ossea decellularizzata, pectina, sericina, cellulosa, fibrina e loro combinazione.

15

9. La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7 e 8, in cui detta composizione è sotto forma di gel, pasta, schiuma, putty, polvere, membrane, tessuto, grani solido compatto o film oppure è contenuta/adsorbita all'interno di elementi micellari o particellari, fibre o nanofibre cave, membrane, ceramiche o nanotubi, strutture
20 metalliche porose e/o trabecolari, manufatti tessili, nanobolle, sol-gel o loro combinazioni.

10. Composizione comprendente uno o più peptidi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, per l'uso come medicamento.

25

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 9, per l'uso nella rigenerazione ossea, dentale e parodontale.

12. Uso della composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 9, per
30 la funzionalizzazione di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico.

13. Uso cosmetico della composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 9.

- 5 14. Uso dei peptidi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, per la funzionalizzazione di protesi, viti, fissaggi, inserti o sostegni in metallo, ceramica o materiale polimerico naturale o sintetico.

Figura 1

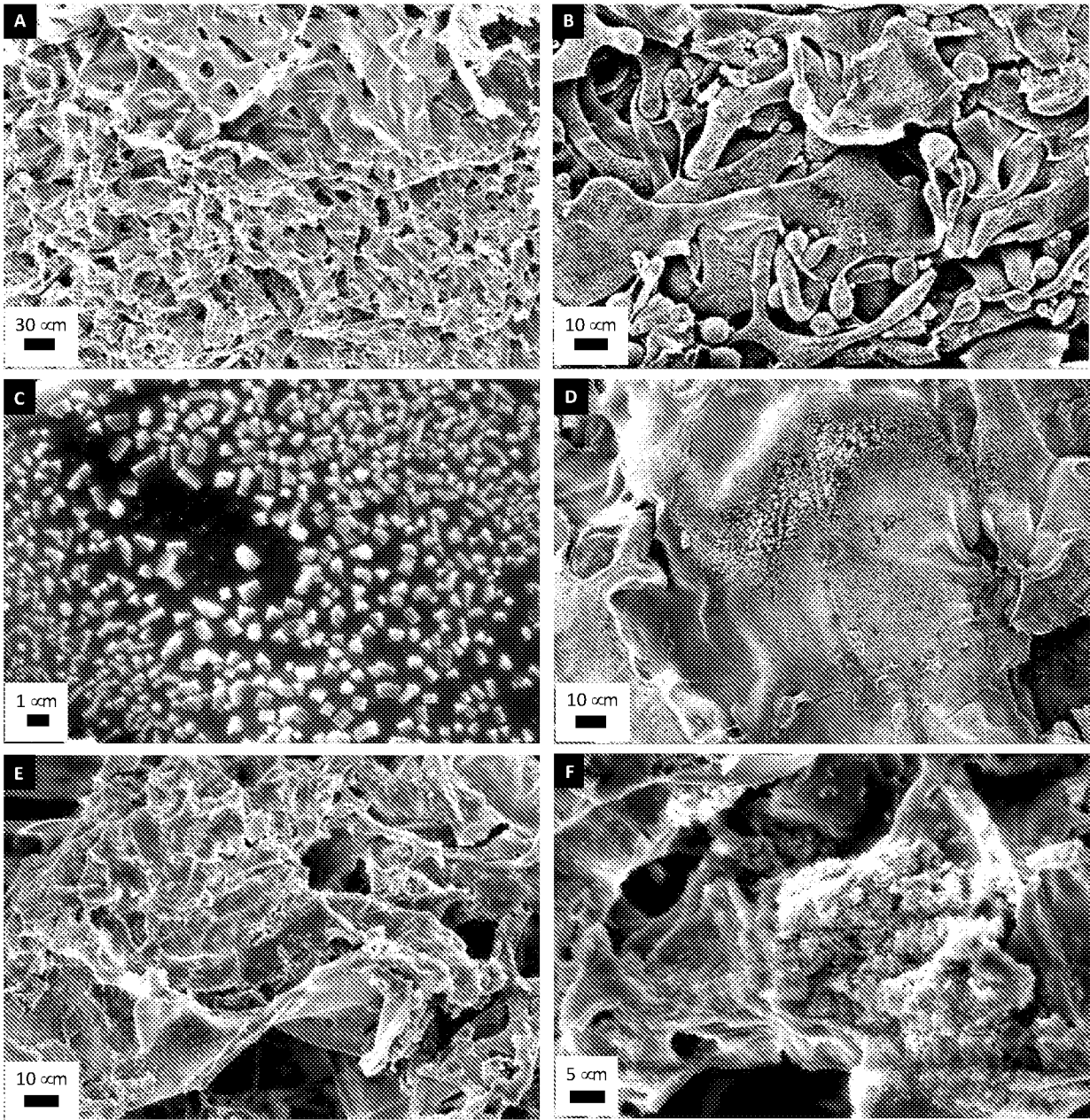


Figura 2

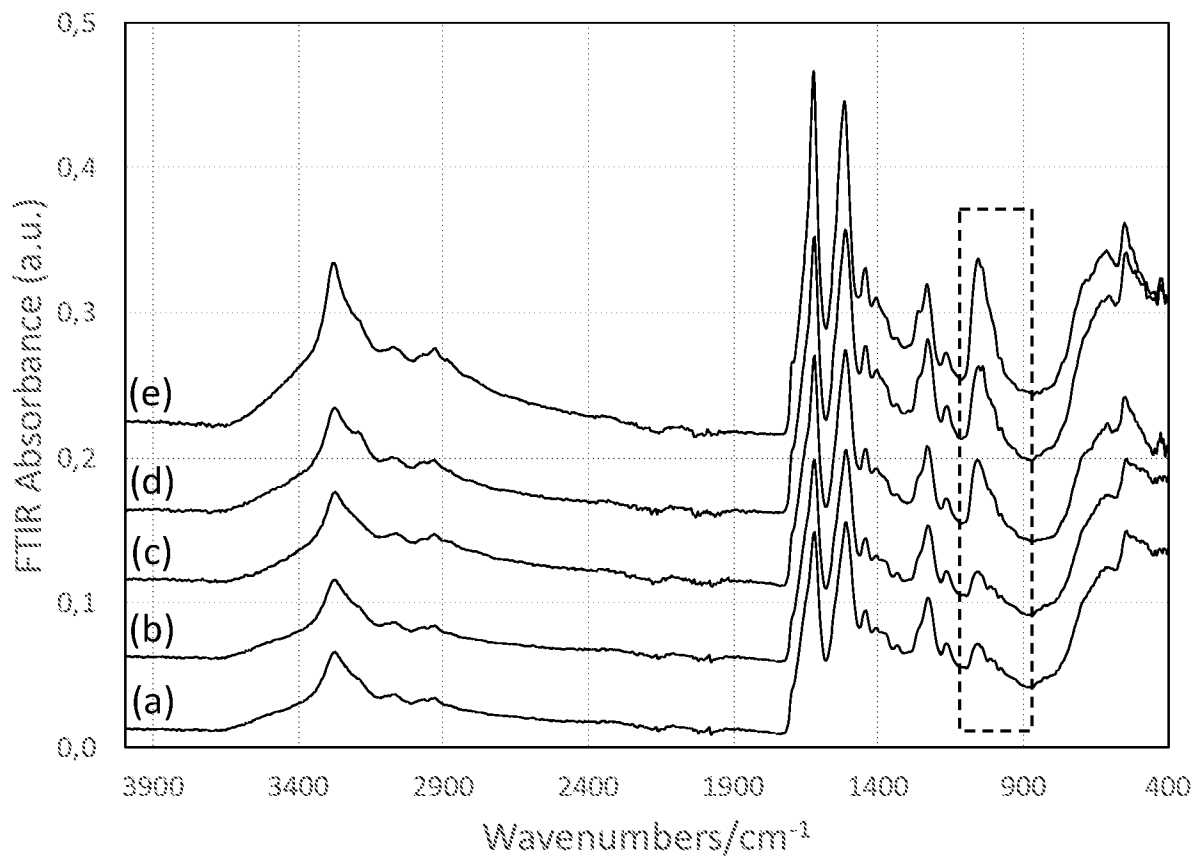


Figura 3

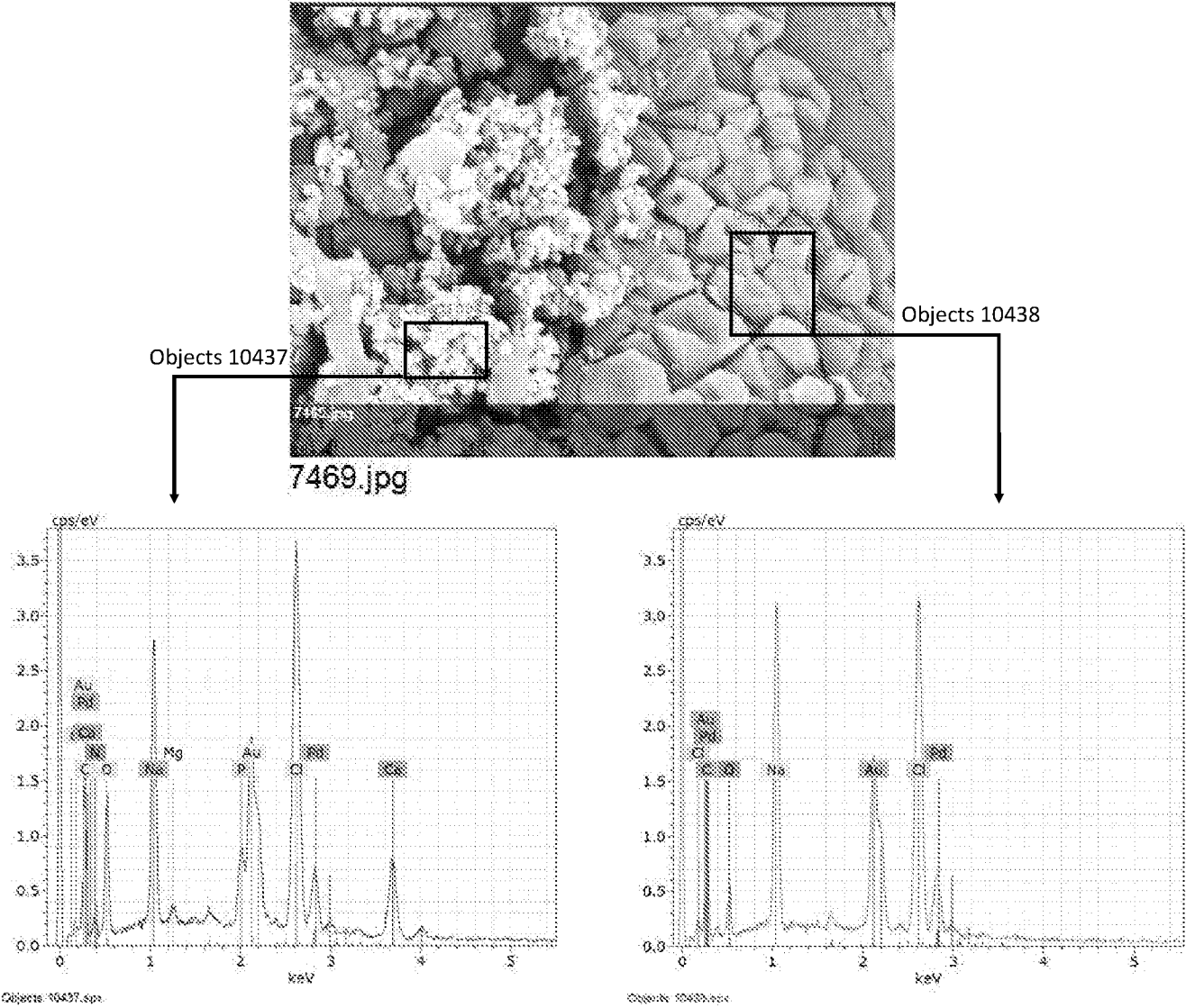


Figura 4

