

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO: SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO: XXVI

NUOVE STRATEGIE PER LA RILEVAZIONE AD ALTA SENSIBILITA' DI ANALITI BIOLOGICI

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Antonino Polimeno

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Alessandro Dolmella

Supervisore :Ch.mo Prof. Margherita Morpurgo

Dottorando : Davide Silvestri

INDICE

INDICE	0
1. RIASSUNTO	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUZIONE	7
3.1. I Biosensori	7
3.1.1. Biosensori ottici	7
3.1.2. La risonanza plasmonica di superficie (SPR) ed il suo impiego	10
3.1.3. Biosensori ottici per la rilevazione di acidi nucleici	13
3.1.4. L'acido peptidonucleico (<i>Peptide Nucleic Acid – PNA</i>)	14
3.1.5. La tubercolosi e la sua diagnosi	15
3.1.6. Realizzazione di un sensore SPR per la rilevazione di DNA di <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	16
3.2. Sviluppo di saggi immunodiagnostici	17
3.2.1. Avidina e Streptavidina	17
3.2.2. Le nanoparticelle ANANAS [®] : basi molecolari e caratteristiche	19
3.2.3. ANANAS in saggio omogeneo: set-up e principi generali del saggio	21
4. MATERIALI E METODI	24
4.1. Materiali	24
4.2. Strumentazione	26
4.3. Procedimenti generali	27
4.3.1. Determinazione della concentrazione in soluzione di composti diversi	27
4.3.1.1. Proteine, cromofori, DNA, PNA, e nanoparticelle	27
4.3.1.2. Biotina e suoi derivati non ingombrati – Saggio HABA	27
4.3.1.3. PEG – Saggio allo Iodio	28
4.3.1.4. Gruppi amminici primari – Saggio al TNBS e Saggio alla fluorescamina	28
4.3.2. Gruppi tiolici in soluzione – Saggio di Ellman	29
4.3.2.1. Analisi cromatografica e purificazione delle nanoparticelle	29
4.4. SINTESI DEI DIVERSI COMPONENTI	29
4.4.1. Derivati del PEG	29
4.4.1.1. (trt)Cys-mPEG _{2 e 5 kDa} - (I e II)	31
4.4.1.2. Fmoc-Cys(trt)-PEG _{2 e 5 kDa} -biotina - (III e IV)	31
4.4.1.3. Fmoc-Cys(trt)-PEG _{2 e 5 kDa} -COOH - (V e VI)	32
4.4.1.4. Biotin-PEG ₅₀₀₀ -(CH ₂) ₆ -HABA - (VII)	33

4.4.1.5. IgG-PEG ₄₀₀₀ -aminopropilfosfonato (APF) - (VIII)	33
4.4.1.6. Biotin-PEG ₅₀₀₀ -Alcalin fosfatasi (AP) - (IX)	34
4.4.2. Sintesi di nanoparticelle ANANAS [®]	35
4.5. Sintesi di sonda per rilevazione SPR di DNA: Fmoc-Cys(trt)-PEG _{2 e 5 kDa} -PNA - (X); (XI)	35
4.5.1. Condensazione in fase solida	36
4.5.2. Condensazione in soluzione	36
4.5.3. Purificazione del PNA-PEG dalla miscela di reazione	36
4.6. Studi di funzionalizzazione delle superfici, capacità di resistenza alle interazioni aspecifiche, rilevazione di analiti bersaglio	38
4.6.1. La piattaforma sperimentale	38
4.6.2. Esperimenti FT-IRRAS	38
4.6.3. Esperimenti SPR	39
4.6.3.1. Studi di funzionalizzazione	39
4.6.3.2. Rilevazione di elementi proteici: studi di <i>antifouling</i> e rilevazione di avidina	40
4.6.3.3. Rilevazione di acidi nucleici: ottimizzazione del layer mediante co- deposizione di sonda e <i>backfiller</i> , calcolo del rapporto segnale/rumore (S/N ratio) e rilevazione di DNA	40
4.6.4. Misure di fluorescenza	42
4.7. Saggio omogeneo con nanoparticelle ANANAS [®]	42
4.7.1. Verifica dell'attività enzimatica	42
4.7.2. Verifica del grado di biotinilazione mediante saggio ELISA	43
4.7.3. Verifica di inibizione enzimatica di AP con coniugato Ab-inibitore	43
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	44
5.1. Sintesi dei PEG-derivati	44
5.1.1. Derivati per la funzionalizzazione di superfici SPR	44
5.1.2. Derivati per l'utilizzo con nanoparticelle ANANAS	44
5.2. Sintesi di sonda per rilevazione SPR di DNA: Fmoc-Cys(trt)-PEG _{2 e 5 kDa} -PNA - (X); (XI)	45
5.2.1. Condensazione in fase solida	46
5.2.2. Condensazione in soluzione	46
5.3. Realizzazione di un sistema modello per rilevazione di biomolecole mediante GC-SPR	49
5.3.1. Studi di funzionalizzazione di superfici plasmoniche	49
5.3.2. Studi di <i>antifouling</i> e rilevazione di avidina	51
5.3.3. Rilevazione di DNA	53

5.3.3.1. Ottimizzazione dello strato polimerico superficiale	53
5.3.3.2. Rilevazione di oligo DNA a diversa concentrazione	55
5.3.3.3. Rilevazione di PCR-amplificato	56
5.4. Sviluppo di saggi immunodiagnostici con nanoparticelle ANANAS®	58
5.4.1. Saggio omogeneo con nanoparticelle ANANAS	58
6. CONCLUSIONI	61
6.1. Funzionalizzazione di nanostrutture di metalli nobili per rilevazione di biomolecole ad alta sensibilità.....	61
6.2. Saggio omogeneo con nanoparticelle ANANAS®	63
7. Bibliografia	64
8. APPENDICE	73
9.1. Appendice A - Modello predittivo di co-deposizione	73
9.1.1. Studi di deposizione di specie tiolate	73
9.1.2. Il modello di co-deposizione.....	74
9.2. Appendice B – Spettri di caratterizzazione dei derivati del PEG	78
9.2.1. Spettri ¹ H NMR	78
9.2.2. Spettri FPLC e MALDI	84
9.3. Appendice C – Spettri FT-IRRAS	86

1. RIASSUNTO

L'attività di dottorato, facente parte del progetto strategico di ateneo "PLATFORMS" ha riguardato lo studio e l'ottimizzazione di tecniche analitiche per la rilevazione di analiti di rilevanza biologica di diversa natura come proteine, acidi nucleici, piccole molecole.

La ricerca si è fondata essenzialmente sulle due piattaforme tecnologiche attualmente in studio presso i laboratori di riferimento, ed è stata condotta in stretta collaborazione con altri gruppi di ricerca dell'Università di Padova.

- La prima piattaforma ha sfruttato la risonanza dei plasmoni di superficie (SPR) per la rilevazione dell'interazione di un analita in soluzione con un recettore ancorato su superfici nanostrutturate di metalli nobili.

Obiettivo della ricerca è stato l'ottimizzazione della sintesi e la caratterizzazione chimica e funzionale di diverse molecole adatte all'ancoraggio di recettori biologici (DNA o i loro analoghi PNA) a superfici nanostrutturate (*gratings* sinusoidali) per analisi SPR; a tale scopo sono state ideate ed ottimizzate delle procedure di sintesi di derivati del polietilenglicole (PEG) atti a ciò, nonché delle strategie di funzionalizzazione per una facile ed economica processazione delle superfici stesse; sono state esplorate diverse condizioni di funzionalizzazione superficiale, individuando le più performanti per il set-up analitico allo studio in termini di capacità di rilevazione e resistenza alle interazioni aspecifiche; sono stati infine eseguiti dei test di rilevazione di analiti biologici impiegando il set-up ottimizzato, ed i risultati sono stati confrontati con una tecnica correntemente in uso, individuando vantaggi e svantaggi del sistema analitico allo studio.

- La seconda piattaforma ha visto l'impiego delle nanoparticelle poli-avidiniche ANANAS[®] di recente introduzione come elemento di amplificazione della sensibilità dei comuni saggi immunoenzimatici, basati sull'accoppiamento dell'interazione analita-recettore con l'attività di enzimi in grado di generare colore o quanti di luce.

Obiettivo della ricerca è stato l'esplorazione di diverse configurazioni analitiche impieganti le nanoparticelle per la rilevazione di analiti micro- o macro-molecolari in saggi diretti o indiretti.

A tal fine è stata perseguita la sintesi e la caratterizzazione chimica e funzionale degli elementi biotinilati necessari allo sviluppo di protocolli analitici comprendenti le nanoparticelle ANANAS; con particolare riguardo alla realizzazione e messa a punto di un saggio omogeneo per la rilevazione di un analita modello in soluzione.

2. ABSTRACT

The activities of this PhD, done in the context of the PLATFORM strategic project of the University of Padua, dealt with the study and optimization of analytical techniques for the detection of biologically relevant analytes of different kinds, as proteins, nucleic acids, small molecules.

The research relied essentially on two technological platforms currently under development in the laboratories of reference, and was carried in tight collaboration with other research groups of the University of Padua.

- The first platform exploited the surface plasmon resonance (SPR) for the detection of the interaction of an analyte in solution with a receptor grafted on nanostructured surfaces made of noble metals.

Objective of the research was the synthesis optimization and the chemical and functional characterization of various molecules suitable for the grafting of biological receptors (as DNA or its PNA analogue) on nanostructured surfaces (sinusoidal gratings) for SPR analysis; to this purpose protocols were developed and optimized for the synthesis of different Poly(Ethylene Glycol) (PEG) derivatives dedicated to this; also, functionalization strategies were developed, for an easy and economic processing of the surfaces.

Several superficial functionalization conditions were explored, finding the most performing for the analytical set-up in terms of detection capability and resistance to nonspecific interactions; finally, detection tests of biological analytes were performed employing the optimized set-up, and the results were compared with a technique currently in use, highlighting benefits and disadvantages of the studied analytical system.

- The second platform saw the use of the poly-avidin ANANAS[®] nanoparticles of recent introduction as a sensitivity amplification element of common immunoenzymatic assays, based on the coupling between the analyte-receptor interaction with the activity of enzymes capable of generating color or light quantum.

Objective of the research was the exploration of several analytical configurations exploiting the nanoparticles for the detection of micro- or macro-molecular analytes in direct or indirect assays; to this purpose the synthesis and the chemical and functional characterization was pursued of all the biotinylated elements necessary to the development of analytical protocols involving the ANANAS nanoparticles, with particular regard to the realization and setting of an homogenous assay for the detection of a model analyte in solution.

3. INTRODUZIONE

3.1. I BIOSENSORI

I biosensori sono sistemi di monitoraggio e controllo oggi di grande interesse, in grado di rilevare svariati parametri fondamentali relativi a processi fisici, chimici, e biologici.

Tra le svariate definizioni che sono state elaborate negli anni, una versione data dalla *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* nel 1999¹ recita: “Un biosensore è un dispositivo analitico compatto che incorpora un elemento di rilevazione biologico o derivato biologicamente, integrato con o intimamente associato ad un trasduttore chimico-fisico”; i biosensori quindi sono dispositivi analitici che accoppiano un sistema molecolare di riconoscimento specifico basato su fenomeni biologici con un sistema di trasduzione che converte l'evento di riconoscimento in un segnale elettronicamente misurabile, capace di venir raccolto ed elaborato da un apposito strumento.

La componente biologica, che costituisce il sistema di riconoscimento, può essere un enzima, un anticorpo, un acido nucleico o un'intera cellula; i sistemi di trasduzione più comuni si possono dividere in: ottici, quando sfruttano proprietà legate a variazioni di propagazione della luce²; elettrochimici, che sfruttano proprietà legate alle variazioni di potenziale elettrico o di corrente³; piezoelettrici, che si basano sulle variazioni di massa⁴.

Lo sviluppo dei biosensori è in costante ascesa, conseguentemente ai vantaggi offerti in termini di rapidità e semplicità di analisi, laddove le tecniche analitiche classiche richiedono lunghi tempi di esecuzione ed un numero variabile di passaggi; tra le varie classi di biosensori, applicazioni di particolare interesse sono fornite dagli immunosensori, e dai sensori ad acidi nucleici, basati rispettivamente sulla relazione di affinità tra un anticorpo ed il suo antigene, e sul processo di ibridazione tra sequenze di acidi nucleici complementari.

3.1.1. Biosensori ottici

Nelle ultime decadi, il campo dei biosensori ottici ha trovato particolare sviluppo; dalle sue prime applicazioni a metà degli anni '70⁵, sono state esplorate svariate metodologie di rivelazione basate sia su misure correlate a proprietà delle stesse molecole, come assorbanza, fluorescenza, o indice di rifrazione (RI); o affidandosi a proprietà chemo-ottiche di trasduzione come misure ellissometriche, di Raman *scattering*, interferometriche (interferometria a luce bianca o modale in guida d'onda...), o di Risonanza Plasmonica Superficiale (*Surface Plasmon Resonance – SPR*).

Più in generale, i biosensori ottici si possono dividere in due categorie: “*label-dependent*” e “*label-free*”.

I “*label-dependent*” si basano sulla rilevazione di segnali generati da specifiche molecole, che vengono ad associarsi all’evento di bioriconoscimento; è pertanto necessario avere a disposizione molecole in grado di riconoscere il complesso sonda-analita, e poter aggiungere ad esse la funzione generatrice di segnale. L’esempio più noto è l’uso della fluorescenza⁶: la molecola di interesse viene evidenziata marcandola con opportuni fluorofori, oppure vengono sfruttate metodiche di trasferimento del segnale, in modo radiativo e non, come il *quench* di fluorescenza usato nei *molecular beacons* (MBs), o la FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) tra due fluorofori o con l’ausilio di *Quantum Dots*. Sebbene questi metodi si siano affinati nel tempo, diventando estremamente sensibili⁷, essi comportano processi di marcatura che possono essere laboriosi o alterare le funzioni della molecola allo studio; inoltre la quantificazione del segnale può risultare difficoltosa, data la suscettibilità del segnale di fluorescenza nei confronti dell’ambiente ed il fatto che spesso il quantitativo di fluoroforo per molecola non può essere stimato con precisione⁸.

I biosensori “*label-free*” invece sono in grado di rilevare le molecole nella loro forma nativa, in quanto non necessitano dell’introduzione di ulteriori elementi di segnale; la rilevazione viene ad essere relativamente semplice ed economica, e permette determinazioni di tipo quantitativo e cinetico⁹. Esistono svariati metodi di rilevazione ottica “*label-free*”, basati ad esempio sulla rilevazione dell’indice di rifrazione, del Raman scattering, o su misure di assorbimento ottico; una panoramica viene fornita nella Tabella 1, unitamente alle relative sensibilità ed ai limiti di rilevazione (LOD).

Tabella 1: Confronto tra sensibilità e limiti di rilevazione (*LOD*) di diversi tipi di biosensori ottici (Tratto da Fan, X. et al.⁹).

Table 1 – Detection limits of various optical biosensors				
Technology platform	Optical structures	Analyte	Detection limit	Ref.
Surface plasmon resonance	Surface plasmon resonance	Bulk solution	10^{-5} - 10^{-8} RIU	[36–41]
	Long range SPR	Bulk solution	10^{-7} - 10^{-8} RIU	[43,45]
	Surface plasmon resonance imaging (SPRI)	Bulk solution	10^{-5} - 10^{-7} RIU	[53–56]
	SPRI	Protein	1 nM	[58]
	Optical heterodyne SPR	Protein	0.2 nM	[59]
	Phase sensitive SPR	Protein	1.3 nM	[60]
	Wavelength modulated SPR	DNA	10 pM (Note 1)	[63]
	SPRI	DNA and RNA	10 nM	[64]
	Flow injection SPR	DNA	54 fM, 1.38 fM (Note 1)	[65,66]
	Angle modulated SPR	Protein (PSA)	0.15 ng mL^{-1} (Note 1)	[67]
	SPR	Protein (CA19-9)	$66.7 \text{ unit mL}^{-1}$	[69]
	SPR	Protein (α -fetoprotein)	50 ng mL^{-1}	[70]
	Prism-based SPR	Bacteria (<i>E. coli</i>)	10^6 cfu mL^{-1}	[74]
		<i>Salmonella yphimurium</i>	100 cfu mL^{-1}	[75]
	Interferometer	BIAcore 2000 SPR	Bacteria	25 cfu mL^{-1}
Mach-Zehnder interferometer		Bulk solution	10^{-7} RIU	[83]
		Protein	20 pg mm^{-2}	[82]
Young's interferometer		Bulk solution	$\sim 1 \times 10^{-7}$ RIU	[89,90]
		Virus	$1000 \text{ particles mL}^{-1}$	[91]
Hartman interferometer		DNA	4 ng mL^{-1}	[95]
		Protein	5 ng mL^{-1} , 0.1 ng mL^{-1} (Note 1)	[95,96]
		Virus	10^7 pfu mL^{-1}	[95]
		Bacteria	$5 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$ (Note 1)	[95]
Backscattering interferometer		Porous silicon	DNA	2 pM
	BioCD	Protein	0.1 ng mL^{-1}	[100]
	Microchannel backscattering	Bulk solution	7×10^{-9} RIU	[105]
		Protein	femto-mole (Note 2)	[103]
		Protein	picomolar (Note 3)	[106]
Waveguide	Resonant mirror	Protein	$\sim 0.1 \text{ pg mm}^{-2}$	[113]
		Cell	$10^6 \text{ cells mL}^{-1}$	[108]
	Metal-clad waveguide	Bacterial spore	$\sim 10^5 \text{ spores mL}^{-1}$	[119]
		Cell	$\sim 10 \text{ cells mm}^{-2}$ (Note 2)	[121]
	Reverse symmetry waveguide	Cell	60 cells mm^{-2} (Note 2)	[123]
Symmetrical metal-clad waveguide	Bulk solution	2×10^{-7} RIU	[129]	
Ring resonator	Ring on a chip	Bulk solution	10^{-4} to 10^{-7} RIU	[168,171,185,189]
		DNA	$\sim 100 \text{ nM}$	[186]
		Protein	$20\text{--}250 \text{ pg mm}^{-2}$, 0.1 nM	[168,173,190]
		Bacteria	10^5 cfu mL^{-1}	[186]
	Dielectric microsphere	Bulk solution	10^{-7} RIU	[144]
		DNA	1 pg mm^{-2}	[134]
		Protein	10 pg mL^{-1} (trypsin), 1 unit mL^{-1} (thrombin)	[145,151]
		Virus	$\sim 1 \text{ pg mm}^{-2}$	[143]
	Bacteria	100 cfu mm^{-2} (Note 2)	[140]	

Table 1 (Continued)				
Technology platform	Optical structures	Analyte	Detection limit	Ref.
Optical fiber	Capillary opto-fluidic ring	Bulk solution	10^{-6} - 10^{-7} RIU	[152]
		DNA	4 pg mm^{-2} , 10 pM	[163]
		Protein	$\sim 1 \text{ pg mm}^{-2}$, 3 pM (Note 2)	[157]
		Virus	$1000 \text{ particles mL}^{-1}$	[164]
	Fiber Bragg grating	Bulk solution	$\sim 10^{-6}$ RIU	[204-209]
		DNA	$0.7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, 0.1 μM	[209]
	Long-period grating	Bulk solution	10^{-4} RIU	[219]
		Protein	$2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[218]
	Nanofiber	Bulk solution	10^{-7} RIU	[223]
	Fiber coupler	Bulk solution	4×10^{-6} RIU	[227]
Protein		$0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[227]	
Fiber Fabry-Perot cavity	Bulk solution	10^{-5} RIU	[207,231]	
	DNA	76 μM , 1.7 ng	[229]	
	Protein	$25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[228]	
Photonic crystal	2-D PC	Bulk solution	10^{-5} RIU	[240,241]
		Protein	0.4 pg mm^{-2} (Notes 2 and 4)	[240,241]
	2-D PC microcavity	Bulk solution	$\sim 10^{-3}$ RIU	[234,235]
		Protein	1 fg	[237]
	PC waveguide	Protein	0.15 μM	[239]
	1-D PC microcavity array	Bulk solution	7×10^{-5} RIU	[246]
PCF	Bulk solution	10^{-4} RIU	[219]	

Notes: (1) With gold nanoparticle amplification. (2) Adsorption result. (3) Binding takes place in free solution rather than on a solid substrate. (4) Results obtained after solution containing protein is dried.

Tra le varie metodologie, la variazione di indice di rifrazione ha guadagnato notevole interesse, grazie anche alla possibilità di analizzare volumi estremamente ridotti di soluzioni (nano-/femto-litri) senza avere ripercussioni negative sull'analisi, infatti la proprietà misurata si basa sulla concentrazione locale di sostanza, e non sulla sua quantità assoluta, ed è quindi sostanzialmente indipendente da essa (la fluorescenza ad esempio risente maggiormente del fenomeno in quanto il fenomeno è dipendente dalla quantità assoluta delle molecole generatrici di segnale).

Tra i vari tipi di biosensori impieganti la misurazione dell'RI (interferometrici, basati su guide d'onda, ecc.) particolare importanza rivestono oggi quelli basati sulla Risonanza Plasmonica Superficiale (Surface Plasmon Resonance), o SPR; tale tipologia di sensori si è rivelata essere estremamente sensibile¹⁰, e dalle sue prime applicazioni negli anni '80¹¹⁻¹⁴ importanti progressi sono stati fatti sia nello sviluppo della tecnologia che nelle applicazioni, fino al punto di guadagnare un posto di primo piano in ambiti quali la ricerca e sviluppo, la diagnostica, il monitoraggio ambientale e la sicurezza alimentare^{10, 15-21}.

3.1.2. La risonanza plasmonica di superficie (SPR) ed il suo impiego

I plasmoni di superficie si definiscono come oscillazioni collettive di elettroni liberi od onde di densità elettronica cariche, che si possono verificare all'interfaccia tra due mezzi con costanti dielettriche di segno opposto, come ad esempio un metallo ed un dielettrico; l'onda di densità elettronica è associata ad un'onda elettromagnetica, i cui vettori di

campo raggiungono la massima intensità all'interfaccia tra i due materiali e penetrano in essi decadendo esponenzialmente con la distanza (per tale motivo l'onda plasmonica viene anche definita "onda evanescente"); l'estensione all'interno dei mezzi risulta essere dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d'onda del plasmone per il dielettrico (quindi dell'ordine delle centinaia di nm), e di un ordine di grandezza inferiore per il metallo (Figura 1)²²⁻²³.

I plasmoni di superficie si possono dividere in due categorie: localizzati ed estesi (Figura 2); i primi sono dati dalle oscillazioni elettroniche confinate in nanoparticelle o nanostrutture metalliche; i secondi invece sono propri di sistemi estesi, come interfacce tra superfici o sistemi di nanostrutture continui²³⁻²⁸.

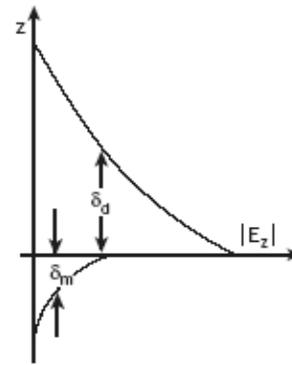


Figura 1: Rappresentazione di un'onda plasmonica: la sua intensità è massima all'interfaccia tra il metallo ed il dielettrico, e decade esponenzialmente allontanandosi da essa.

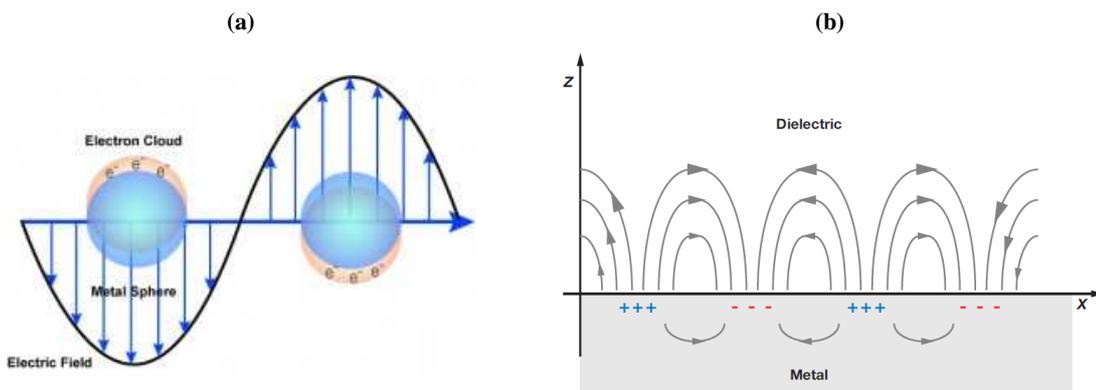


Figura 2: Rappresentazione di plasmoni localizzati (a) ed estesi (b).

I metalli con migliori proprietà plasmoniche risultano essere l'oro e l'argento, in particolare quest'ultimo ha le migliori proprietà di campo, ma nella realizzazione di biosensori viene preferito l'oro per la maggior stabilità fisico-chimica; il dielettrico è di solito costituito da una lastrina di vetro, su cui viene depositato un sottilissimo strato di metallo.

Se l'interfaccia metallo-dielettrico (es. oro-vetro) viene colpita da una radiazione elettromagnetica come la luce, in particolari condizioni di accoppiamento caratterizzate da uno specifico angolo di incidenza e lunghezza d'onda, parte dell'energia può essere trasferita al plasmone dando risonanza plasmonica; l'effetto netto è che in un profilo di riflettività della superficie si verrà a creare un *dip*, ossia un calo di riflettività ad uno specifico angolo (angolo di risonanza). Le condizioni di risonanza sono strettamente legate alle proprietà fisiche dei mezzi costituenti il sistema, e tra queste la loro differenza di indice di rifrazione; tale proprietà viene sfruttata in ambito analitico per rilevare il legame di biomolecole alla superficie d'oro; se infatti il metallo viene funzionalizzato con

un'opportuna sonda, il legame dello specifico ligando produrrà una variazione locale di RI, e se questa rientra nel *range* di ampiezza del plasmone, si avrà una variazione di angolo di risonanza (o una diminuzione del *dip* allo stesso angolo) correlabile con la quantità di materiale legato (Figura 3).

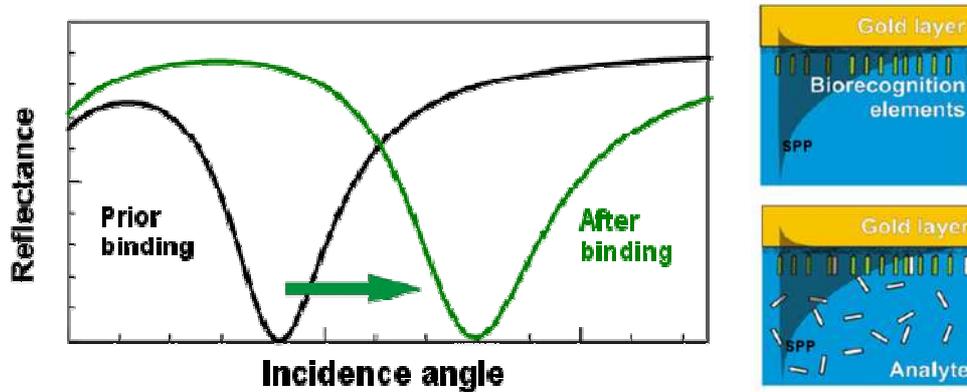


Figura 3: Variazione dell'angolo di risonanza plasmonica a seguito di un evento di bioriconoscimento sulla superficie del biosensore.

Le condizioni di coupling richiedono che il momento della luce incidente venga a coincidere con quello del plasmone; ciò si ottiene classicamente tramite *Prism-Coupled Surface Plasmon Resonance – PC-SPR*, ossia facendo passare la luce attraverso un prisma; la geometria di sistema più nota che impiega questo metodo è la configurazione denominata di Kretschman-Raether: la luce viene irradiata in un prisma e totalmente riflessa alla sua base (per il fenomeno della *total internal reflection*), che è a sua volta interfacciata ad un sottilissimo strato di oro; il plasmone esteso si propagherà quindi all'interfaccia tra il prisma e il metallo.

Un altro modo di ottenere l'eccitazione del plasmone è la nanostrutturazione della superficie metallica con un motivo periodico; a tal proposito sono state studiate numerose geometrie: arrays di nanoparticelle, nanorods, nanotriangoli, ecc^{10, 22, 29-30}.

L'uso di un *grating* sinusoidale è anch'esso un modo per promuovere l'eccitazione del plasmone senza l'uso del prisma (*Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance – GC-SPR*); tale geometria ha dimostrato di poter arrivare a livelli di sensibilità comparabili alle configurazioni impieganti un prisma^{28, 31-34}, ma gode altresì il vantaggio di poter ulteriormente aumentare la propria sensibilità ruotando il *grating* in senso azimutale rispetto al piano della luce incidente (Figura 4); la rotazione azimutale infatti non solo induce l'eccitazione di due plasmoni di superficie, dando un doppio *dip* di assorbimento nello spettro di riflettività, ma dà anche un allargamento degli *shift*, il risultato è un incremento della sensibilità fino ad un ordine di grandezza rispetto a quella ottenibile con configurazione ad azimuth nullo³⁵⁻³⁸; tale geometria inoltre, evitando il ricorso al prisma, dà un sistema almeno in linea di principio più adatto alla miniaturizzazione, con caratteristiche quindi più favorevoli alla realizzazione di un *device* capace di rispondere

alle esigenze di laboratori anche non perfettamente equipaggiati o in zone disagiate del mondo.

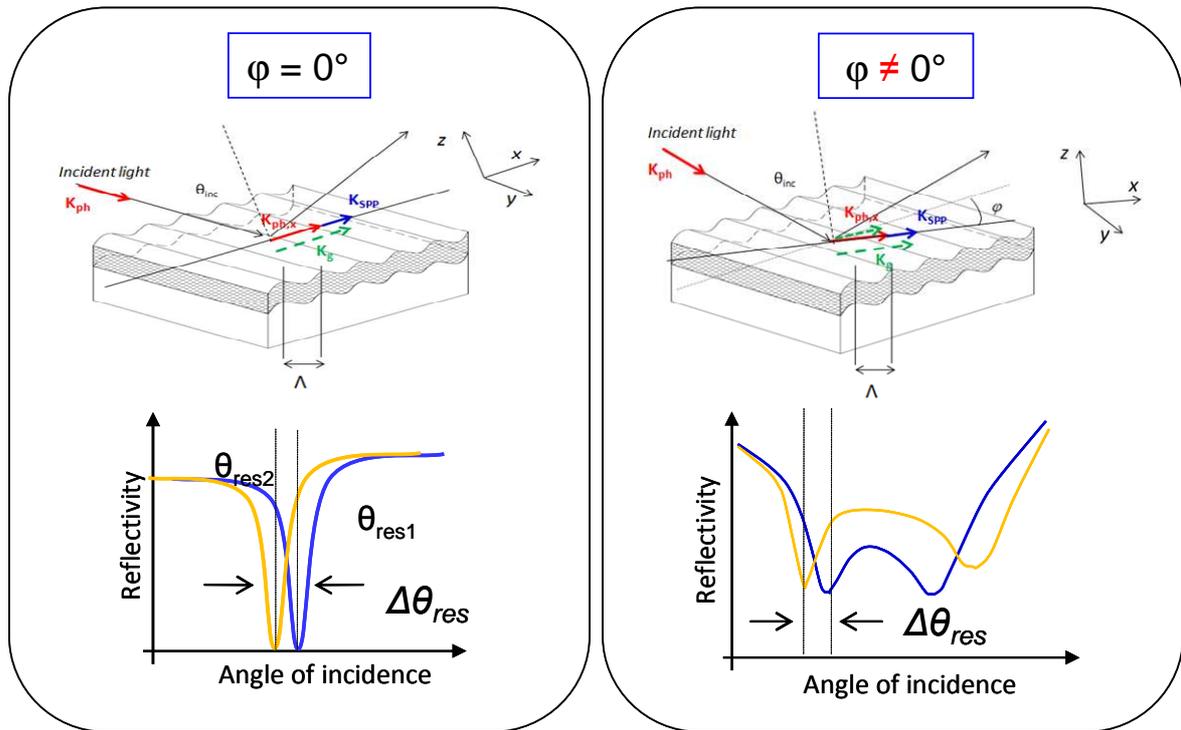


Figura 4: Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance ad azimuth nullo e ruotato: confronto tra le geometrie di sistema e tra i profili di riflettività dei set-up.

3.1.3. Biosensori ottici per la rilevazione di acidi nucleici

Gli acidi nucleici (DNA, RNA) hanno un ruolo fondamentale nei processi chiave della vita di tutti gli esseri viventi; sono infatti deputati alla conservazione e alla trasmissione dell'informazione genetica, e rientrano nei meccanismi coinvolti nella sua stessa espressione³⁹⁻⁴⁰; data la loro importanza, non è sorprendente che una parte significativa dello sviluppo dei biosensori abbia riguardato la loro rilevazione e lo studio delle loro interazioni⁴¹⁻⁶²; difatti, determinare la presenza di acidi nucleici di patogeni può ad esempio diagnosticare un'infezione non ancora conclamata, come lo studio dei polimorfismi genetici per la rilevazione di mutazioni genetiche può diagnosticare la presenza di patologie prima ancora che i sintomi si manifestino.

I biosensori per questi studi sono generalmente dei dispositivi ad acidi nucleici (biosensori ad acidi nucleici), vale a dire che utilizzano delle sonde costituiti da filamenti a singola catena di DNA, RNA o loro analoghi di lunghezza variabile (da 9 a 50 nucleobasi²⁰) capaci di ibridizzare con specifiche sequenze di DNA od RNA bersaglio, o di interagire con specifiche entità biologiche (es. proteine, fattori di trascrizione, enzimi, ecc.).

3.1.4. L'acido peptidonucleico (*Peptide Nucleic Acid – PNA*)

Tra gli analoghi sintetici di DNA ed RNA realizzati nel corso degli anni, una parte importante riveste l'impiego dell'acido peptidonucleico (*Peptide Nucleic Acid – PNA*): è questo un analogo strutturale sintetizzato negli anni '80 da Nielsen⁶³⁻⁶⁴ in cui lo scheletro di (desossi)ribosio-fosfato è sostituito da uno scheletro "simil-polipeptidico" costituito da unità ripetute di 2-aminoetil glicina, legate tra loro da legami amidici; le quattro nucleobasi proprie delle molecole naturali (adenina, guanina, timina, citosina, uracile) sono legate a catene laterali, e vengono ad avere una disposizione spaziale analoga a quella di DNA ed RNA (Figura 5)⁶⁵.

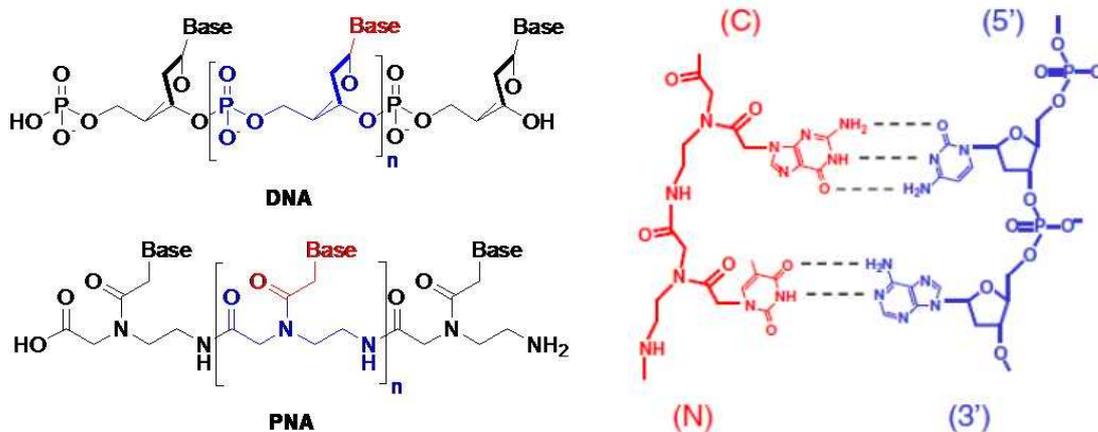


Figura 5: Confronto strutturale di DNA e PNA con evidenziata la differenza tra i monomeri costituenti le catene laterali delle due specie (sx); esempio di appaiamento con legami di tipo Watson-Crick tra una coppia di basi di DNA e di PNA (dx).

Il PNA presenta uno scheletro elettricamente neutro, ragion per cui, mancando la repulsione elettrostatica tra catene, il suo appaiamento a sequenze complementari di DNA o RNA è a maggior energia rispetto a quello dato dalle corrispondenti sequenze naturali: mediamente, la temperatura di *melting* (t_m) di un duplex PNA/DNA è maggiore di 1°C per paio di basi rispetto ad un analogo duplex DNA/DNA⁶⁵; la sua alta affinità per il DNA lo rende inoltre in grado di inserirsi nelle sequenze di DNA (*strand invasion*) formando strutture a tripla elica o a doppia-doppia elica⁶⁶⁻⁶⁸.

La stabilità termica delle sequenze appaiate presenta anche una maggior destabilizzazione in caso di appaiamenti imperfetti (*mismatch*): un *mismatch* di una singola base in una sequenza di 15 infatti comporta un abbassamento medio della t_m di 14.4°C per un duplex PNA/DNA rispetto agli 10.6°C di un analogo duplex DNA/DNA⁶⁹.

I PNA inoltre presentano una maggior stabilità chimico-biologica rispetto ai propri analoghi naturali: sono stabili in ambiente acido e moderatamente stabili in ambiente basico, non sono substrato di nucleasi, le loro proprietà di appaiamento sono conservate in un ampio *range* di pH e sono essenzialmente indipendenti dai valori di forza ionica delle soluzioni in

cui vengono a contatto; tutte queste caratteristiche danno ragione dell'ampia gamma di studi e dispositivi in cui vengono ad essere usati⁷⁰⁻⁷³.

Oltre a tanti vantaggi però, i PNA presentano degli inconvenienti, che devono essere debitamente tenuti in considerazione nel loro impiego nei biosensori^{70, 72-75}: essi hanno infatti una bassissima solubilità in ambiente acquoso, che rende necessario coniugarli a residui e/o a spaziatori idrofilici; presentano inoltre delle difficoltà in ambito sintetico:

- la lunghezza delle sequenze deve essere compresa tra 6 e 18 monomeri;
- per contrastare fenomeni di aggregazione, le sequenze non devono avere un contenuto di purine maggiore del 60%, con massimo 4 adenine o 3 guanine consecutive;
- data la forza delle interazioni PNA/PNA sono da evitare sequenze che possano dare autocomplementarità (come palindromi, ripetizioni inverse, forcine) se queste coinvolgono sei o più basi successive (quattro o più nel caso di guanine e citosine).

Tra i numerosi ambiti in cui il PNA è impiegato come sonda, particolare interesse ed importanza ha il suo utilizzo per la ricerca di biosensori in grado di diagnosticare la tubercolosi.

3.1.5. La tubercolosi e la sua diagnosi

L'insorgenza della tubercolosi, malattia provocata dal *Mycobacterium Tuberculosis*, negli ultimi anni ha conosciuto una rapida recrudescenza, dopo che l'infezione sembrava essere stata debellata verso la fine del 20° secolo⁷⁶.

Si stima che circa un terzo della popolazione mondiale sia infettata dal *M. Tuberculosis*; tale patogeno è responsabile di circa 3 milioni di decessi ogni anno (secondo solo all'HIV), e di circa 8 milioni di nuove infezioni⁷⁷, con una preoccupante crescita del numero di casi di infezione resistente al trattamento con i più comuni farmaci antitubercolari oggi utilizzati⁷⁸⁻⁸⁰.

L'ultimo rapporto preparato dalla *World Health Organization* (WHO) e dall'*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project*, basato su dati raccolti tra il 2002 ed il 2007 in 93 paesi e/o aree geografiche diverse, mostra che la percentuale di farmaco-resistenza è aumentata a più del 55%⁷⁷.

Cosa ancora più preoccupante, in alcuni paesi la percentuale di casi di resistenza multipla (*Multi Drug Resistance - MDR*) ai due più potenti antitubercolari di prima scelta rifampicina ed isoniazide, è salita a più del 20% dei casi, con Cina ed India aventi circa il 50% di tali casi di MDR, seguiti dalla Federazione Russa con un altro 7%⁷⁷.

La diagnosi di questa malattia è essenzialmente affidata a test di microscopia ottica e di coltura cellulare, dove viene anche saggiata la suscettibilità dei ceppi ai farmaci; tali metodi sono però imprecisi e/o richiedono lunghe tempistiche (2-9 settimane)⁸¹; per questi

motivi è evidente come lo sviluppo di un biosensore capace di rilevare in modo rapido, sensibile, specifico, ed a costi relativamente contenuti, il DNA del *M. Tuberculosis*, possa essere di grande beneficio per l'individuazione ed il corretto trattamento di questa malattia.

3.1.6. Realizzazione di un sensore SPR per la rilevazione di DNA di *Mycobacterium Tuberculosis*

Nel corso del dottorato è stata perseguita la realizzazione di un sistema modello per la rivelazione di DNA appartenente al micobatterio della tubercolosi (*Mycobacterium Tuberculosis*) con metodologia SPR.

Il bersaglio è stato individuato in un segmento di 15 nucleobasi appartenente al gene *rpoB* del *M. Tuberculosis*; tale gene codifica la subunità β della RNA polimerasi DNA-dipendente del batterio, ed è il bersaglio dell'antitubercolare di prima scelta rifampicina; inoltre, mutazioni a suo carico sono state dimostrate essere il principale meccanismo di resistenza a tale farmaco^{78-80, 82}, quindi tale bersaglio risulta interessante non solo per l'individuazione del patogeno stesso, ma anche per evidenziarne l'eventuale farmaco-resistenza.

Per avere un sistema ad alte prestazioni è stata combinata la superiore sensibilità assicurata dalla geometria a *grating-coupling* ad azimuth ruotato, con l'impiego di sonde (*probe*) a PNA, per avere la massima efficienza di *binding* possibile al DNA bersaglio.

La sonda è stata legata alle superfici di oro tramite la ben nota chimica tiolo-oro, coniugando dei residui di cisteina (con tiolo protetto, per evitare fenomeni di ossidazione) alle sonde, tramite uno spaziatore di polietilenglicole (PEG) ad alto peso molecolare (MW 2000 o 5000 Da); l'impiego di tale polimero si è reso opportuno non solo per solubilizzare il PNA, ma anche e soprattutto per garantire l'affidabilità del sistema assicurando un'adeguata protezione della superficie d'oro: questo è infatti capace di adsorbire in modo aspecifico biomolecole contaminanti di diversa natura che possono essere presenti nel campione da analizzare; ciò da luogo a segnali del tutto indistinguibili dall'evento di bioriconoscimento vero e proprio, in quanto va ricordato che l'SPR rileva le variazioni di RI in prossimità della superficie indipendentemente dalla loro origine.

Tale problema è ben noto in campo di applicazioni SPR^{22, 83-85}, ed un metodo normalmente adottato per fronteggiarlo è l'inserimento di uno strato polimerico tra il sonda e la superficie stessa; allo scopo vengono impiegati monostrati (SAM) di alcantioli, o vari tipi di polimeri ad alto MW, come ad esempio destrani, poliacrilati, polimeri zwitterionici ed, appunto, polietilenglicoli^{83, 86-88}.

L'uso del PEG per l'inibizione dell'adsorbimento proteico su superfici è ampiamente descritto e dimostrato fin dagli anni '80⁸⁹⁻⁹², inoltre la bifunzionalità delle catene di PEG

permette di combinare in un'unica entità le funzioni di aggancio all'oro, protezione superficiale (capacità *antifouling*) e sonda (Figura 6), la cui sintesi è stata un punto chiave nei lavori di dottorato⁹³.

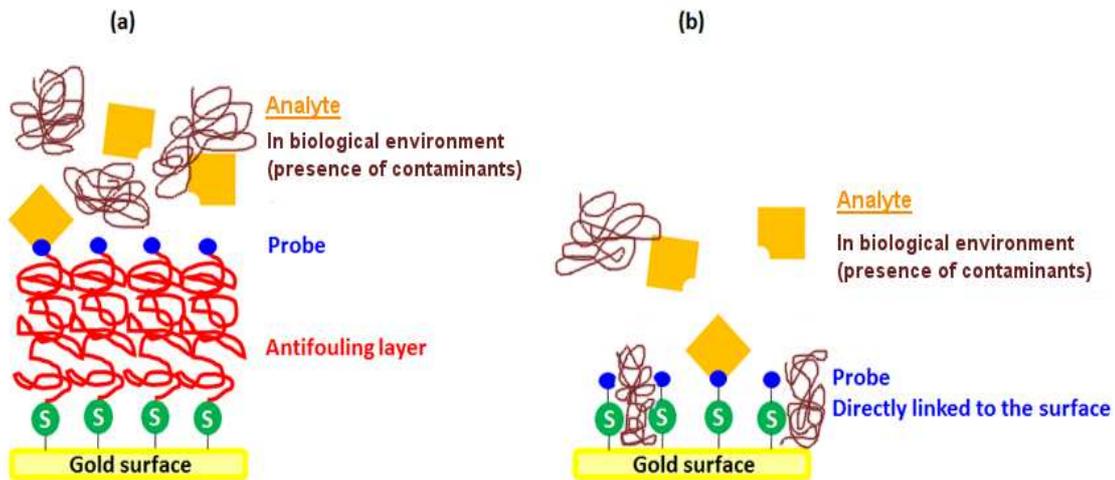


Figura 6: Meccanismo di *antifouling*: la presenza del layer polimerico permette di respingere gli elementi contaminanti presenti in soluzione, consentendo solo l'aggancio specifico dell'analita al suo sonda (a); l'assenza del layer permette invece ai contaminanti di raggiungere la superficie, in tali condizioni il segnale SPR rilevato sarà viziato dalla componente di aspecifico (b).

Sono quindi stati sintetizzati diversi derivati del PEG, con funzioni sia di protezione che di sonda; è stato definito un protocollo per la loro deposizione sui *gratings* d'oro e sono stati raccolti dati essenziali per caratterizzare il processo di funzionalizzazione ed il *layer* superficiale formatosi; è stata poi studiata l'efficienza di *antifouling* dei *layer* di PEG-derivati a diverso MW nei confronti di mezzi a composizione più o meno complesse.

Infine, sono stati effettuati degli studi di rilevazione, dapprima di elementi proteici come sistema modello, poi di DNA appartenente al *M. Tuberculosis*: sono state esplorate e trovate le condizioni ottimali per la rilevazione, ed i risultati raggiunti sono poi stati confrontati con una tecnica di corrente applicazione basata sulla fluorescenza.

Gli studi hanno portato alla realizzazione di un sistema SPR modello capace di rilevare DNA bersaglio in modo altamente sensibile, offrendo vantaggi rispetto a tecniche convenzionali, ed evidenziando dei limiti utili alla messa a punto del biosensore in studi futuri.

3.2. SVILUPPO DI SAGGI IMMUNODIAGNOSTICI

3.2.1. Avidina e Streptavidina

L'avidina (Av) è una proteina omotetramerica presente in varie specie di vertebrati ovipari, specialmente uccelli, rettili ed anfibi, ma nessuna proteina analoga si riscontra nei mammiferi. La sua caratteristica peculiare è la capacità di legare una molecola di biotina

(vitamina H) per subunità, con una costante di affinità pari a circa 10^{15} M; l'entità di tale costante è dello stesso ordine di grandezza di quella propria dei legami covalenti, cosa che fa considerare l'interazione avidina-biotina come praticamente irreversibile, salvo l'intervento di fenomeni di denaturazione⁹⁴.

L'avidina è una proteina basica, con punto isoelettrico di 10,5; ciascuna subunità pesa 16000 Da ed è glicosilata a livello dell'asparagina 17; la componente glucidica è eterogenea ma comunemente comprende 4-5 residui di mannosio e 3 residui di N-acetilglucosamina; non risulta comunque avere influenza sul legame con la biotina, e sua rimozione per via enzimatica: (che dà Ng-Av, "lite-avidina") ha l'unico apparente effetto di diminuire in piccola misura la solubilità della proteina⁹⁵.

L'Av è stata trovata nel tratto riproduttivo delle specie ovipare (uccelli, rettili, anfibi); è costitutivamente presente in altri tessuti come polmoni e reni, ma soprattutto la si ritrova nella maggior parte dei tessuti in seguito a lesioni, e viene indotta dalla presenza di microrganismi⁹⁶⁻⁹⁷; queste caratteristiche avvalorano la tesi secondo cui l'Av in natura svolge un ruolo antibatterico, limitando lo sviluppo di microrganismi tramite il sequestro della biotina necessaria al loro sviluppo ed esercitando effetti immunomodulatori e metabolici⁹⁸.

L'avidina possiede quattro triptofani per subunità⁹⁹; tre di essi, in posizione 70, 97 e 110, sono interessati al legame con la biotina. Mentre i primi due appartengono allo stesso monomero in cui si trova la biotina, il triptofano 110 è proprio del monomero adiacente, dove si trova in un *loop* che in assenza di biotina non è strutturato, ma che si struttura in sua presenza (Figura 7).

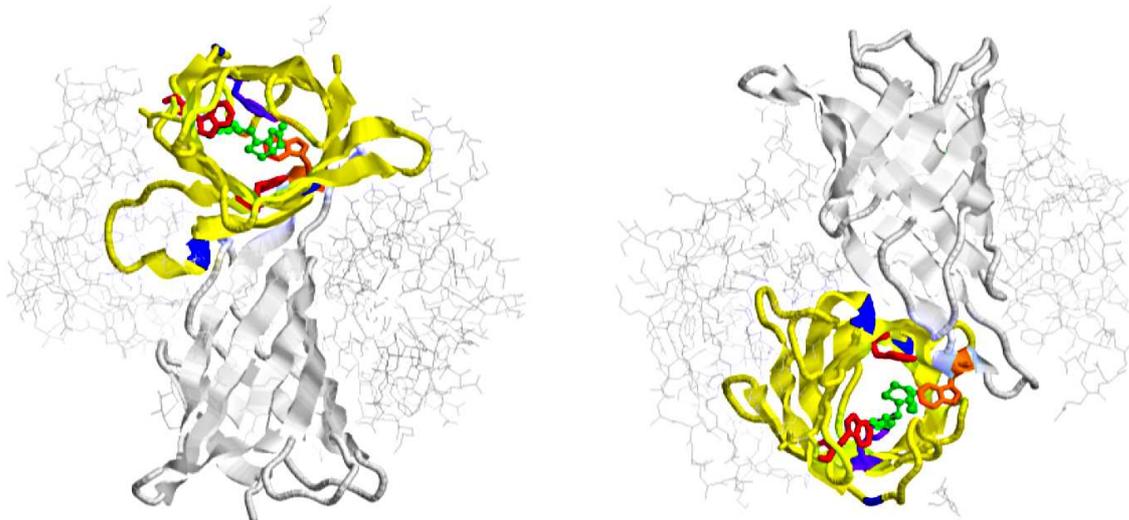


Figura 7: Schema tridimensionale del sito di legame per biotina con evidenziati i principali amminoacidi coinvolti nell'interazione con il ligando: in viola la tirosina 33, in rosso i triptofani 70 e 97, in arancione il triptofano 110, in blu lungo la catena sono indicate le lisine 45, 94 e 111; in verde la biotina. Per chiarezza è stato evidenziato un solo sito di legame e i due monomeri coinvolti (la stessa immagine è mostrata da due punti di vista opposti).

Modificazioni dei triptofani 70 e 110 con un reagente colorato e selettivo per questi amminoacidi, il 2-idrossi-5-nitrobenzil bromuro, che permette la localizzazione dei residui modificati, causano la perdita di affinità per la biotina¹⁰⁰ (in realtà, l'affinità viene persa con la modifica anche di uno solo dei triptofani).

Oltre ai triptofani, sono essenziali per il legame con la vitamina anche i residui di lisina 45, 94 e 111¹⁰¹.

La streptavidina (StAv) è invece una proteina di origine batterica che presenta molte omologie con l'avidina: è anch'essa un omotetramero ad elevata capacità di legare biotina ($K_d = 10^{-13}$) e presenta una struttura terziaria e quaternaria quasi sovrapponibili a quelle dell'avidina¹⁰²⁻¹⁰⁵ nonostante le due proteine abbiano una scarsa omologia di sequenza (30% di omologia) e caratteristiche chimico-fisiche diverse; infatti la StAv è più acida di Av, con un punto isoelettrico di 6,4; inoltre, essendo di origine batterica, non possiede la porzione glucidica.

La peculiare capacità di Av e StAv di legare 4 molecole di biotina con affinità tanto elevate ha fatto sì che esse siano ampiamente sfruttate per applicazioni pratiche in applicazioni di ambito biotecnologico, biomedico, e specialmente nel settore analitico, in protocolli per l'immobilizzazione e purificazione di affinità, come anche nel direccionamento di molecole bioattive¹⁰⁶⁻¹⁰⁸; le proteine sono anche state modificate in svariati modi, sia chimicamente che geneticamente, ottenendo proteine con caratteristiche fisico-chimiche diverse dalle entità naturali (es. Av con differenti punti isoelettrici, monomeriche, Av con capacità di legame per la biotina pH-dipendente, Av coniugata con polimeri di vario tipo, ecc...)¹⁰⁹.

Recenti studi hanno evidenziato anche altre proprietà di Av, tra cui la più interessante è la capacità di legare gli acidi nucleici con un'interazione ad alta affinità che aumenta in presenza di biotina; StAv invece, non possiede questa caratteristica.

3.2.2. Le nanoparticelle ANANAS[®]: basi molecolari e caratteristiche

L'affinità dell'avidina per il DNA non è semplicemente dovuta ad interazioni aspecifiche di tipo elettrostatico, ma è bensì il risultato di una interazione ad alta affinità, che coinvolge specifiche regioni della proteina. L'analisi della distribuzione aminoacidica sulla superficie di Av derivata da dati cristallografici, ha rivelato la presenza di una regione dove è localizzato un elevato numero di lisine e arginine (11); è probabile che esista una complementarità elettrostatica tra questa regione carica positivamente ed i gruppi fosfato del DNA. Oltre a questo ancoraggio, il complesso viene anche stabilizzato da legami ad idrogeno ed interazioni di Van der Waals, ad opera di altri residui all'interno della proteina (probabilmente le molte asparagine e glutammine e le sequenze thr-arg, arg-thr e arg-ser presenti tra il C terminale e la catena β)⁹⁹⁻¹⁰¹.

La presenza di biotina aumenta la stabilità dell'interazione avidina-DNA suggerendo un coinvolgimento del loop tra le catene β -3 e β -4.

Indagini ultrastrutturali e al *light scattering* hanno dimostrato che grazie alle interazioni sopracitate, l'avidina si autoassembla sul DNA in maniera organizzata, dando origine a nanoparticelle discrete. Immagini ottenute con il microscopio elettronico a

Trasmissione (TEM) ed analisi di *light scattering* dinamico (DLS), hanno evidenziato che i complessi assumono preferenzialmente conformazioni a bastoncino o toroidali, con una dimensione media di 50-100 nm (Figura 8).

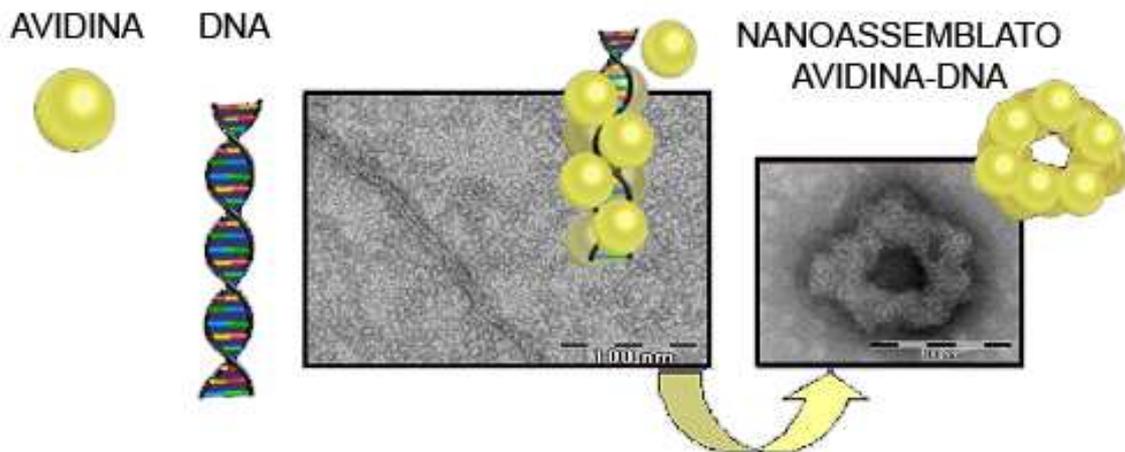


Figura 8: Rappresentazione schematica della formazione degli assemblati Avidina-DNA, con le immagini TEM che evidenziano le strutture a bastoncino ed a toroide assunte dagli assemblati

Forma e dimensioni del nanoassemblato variano comunque a seconda del tipo e della lunghezza del DNA utilizzato: un plasmide circolare favorisce la formazione di nanoassemblati toroidali, mentre usando plasmidi linearizzati si ottengono assemblati a bastoncino; inoltre la geometria degli assemblati dipende anche dalle condizioni in cui sono ottenuti: in ambiente acquoso ad esempio si ha la formazione di agglomerati poco solubili di grosse dimensioni ($>1\mu\text{m}$), caratterizzati da un'alta polidispersività ed una geometria non ben definita.

I complessi avidina – DNA, si sono dimostrati stabili ad elevate diluizioni ($[\text{DNA}] = 10 \text{ pM}$), e in condizioni di elevata forza ionica: la presenza di elettroliti in soluzione non destabilizza l'interazione fino ad una soglia di 200 mM in NaCl, oltre la quale le particelle iniziano a disassemblarsi; gli elettroliti comunque inducono un processo di aggregazione a seguito delle modifiche del potenziale di superficie, per cui in condizioni fisiologiche non si osservano particelle discrete, ma macroaggregati.

L'aggregazione in soluzione è un problema generale nel caso dei sistemi nanoparticellari ed il modo classico con il quale si cerca di prevenirla è quello di ancorare alla loro superficie polimeri idrofilici che offrono una protezione di natura sterica all'aggregazione¹¹⁰. A tal fine il polimero che viene più classicamente impiegato è il polietilenglicole (PEG)¹¹¹.

Il tipo e la quantità di PEG da aggiungere alla superficie è un punto critico, infatti una quantità eccessiva può compromettere l'attività biologica delle entità biologiche a cui viene applicato (es. proteine), se la quantità è invece insufficiente, il polimero non sarà in grado di prevenire i fenomeni di aggregazione.

Nel caso dell'avidina si possono utilizzare due strategie per legare le catene di PEG: la prima prevede la coniugazione covalente del polimero a specifici residui aminoacidici presenti sulla superficie proteica (es. lisine, cisteine); in questo caso si avrà però una diminuzione dell'affinità per il DNA linearmente dipendente dalla quantità di polimero aggiunto; l'altra strategia prevede di legare il PEG al sito di legame della biotina agganciando quest'ultima alla catena di polimero; in questo caso non si avrà perdita di affinità per il DNA¹¹².

Quest'ultimo metodo offre anche il vantaggio di poter definire stechiometricamente la quantità di polimero alla nanoparticella, occupando solo una piccola e ben definita percentuale di BBS, lasciando il resto libero di essere funzionalizzato con altre molecole biotinilate. In questo modo, il "core" ANANAS può essere trasformato in un assemblato multivalente con una precisa composizione, definita semplicemente dalla precisa quantità stechiometrica delle differenti (bio)molecole biotinilate utilizzate.

Gli studi effettuati negli ultimi anni hanno infatti dimostrato come sia possibile riunire in una singola entità nanoparticellare un largo numero di elementi biotinilati, anche di rilevante MW: è stato possibile caricare su di una singola particella fino a circa 200 enzimi del tipo Perossidasi di rafano (HRP) o fino a circa 60 Immunoglobuline G (IgG); è stato inoltre dimostrato che è possibile caricare elementi diversi su una stessa particella, controllandone stechiometricamente le quantità relative in modo semplice, preciso e riproducibile.

Il sistema è stato testato come amplificatore di segnale in saggi immunoenzimatici diretti di tipo ELISA, evidenziando un incremento di sensibilità fino a quasi tre ordini di grandezza rispetto a dei reattivi/kit attualmente disponibili in commercio¹¹³.

Nel corso di questo dottorato è stato effettuato un tentativo di sviluppo di un saggio immunoenzimatico omogeneo di tipo II, basato quindi sul principio della competizione tra l'analita ed un suo analogo legato ad un elemento modificatore dell'attività di un enzima; tale set-up prevede che tutte le componenti necessarie al saggio stesso vengano aggiunte nel medesimo ambiente di reazione senza bisogno di passaggi di separazione, e che la misurazione dell'analita venga calcolata dalla variazione di attività enzimatica.

3.2.3. ANANAS in saggio omogeneo: set-up e principi generali del saggio

Il saggio omogeneo ipotizzato ha previsto l'utilizzo delle nanoparticelle ANANAS[®] come *scaffold* per riunire in un unico assemblato: 1) un enzima, necessario alla rilevazione colorimetrica; 2) un analogo dell'analita ricercato, entrambi biotinilati per

l'immobilizzazione sulla nanoparticella; tale assemblato è stato posto nell'ambiente di saggio assieme all'analita ed a un inibitore enzimatico, legato tramite un opportuno spaziatore ad un anticorpo specifico per l'analita stesso; in tal modo l'anticorpo si è venuto a ripartire tra l'analita libero in soluzione ed il suo analogo legato alla particella.

In base a tale razionale sono dunque possibili due situazioni limite a seconda della quantità di analita libero: in caso di quantità limitata, l'anticorpo si dirigerà prevalentemente verso l'analogo legato, favorendo l'avvicinamento e l'interazione tra l'inibitore (legato all'Ab) e l'enzima; questo causerà una diminuzione dell'attività enzimatica e quindi del segnale da essa generato; in caso invece di un'elevata quantità di analita libero, l'anticorpo si dirigerà preferenzialmente verso quest'ultimo, allontanando l'inibitore dall'enzima che potrà quindi liberamente generare il proprio segnale (Figura 9).

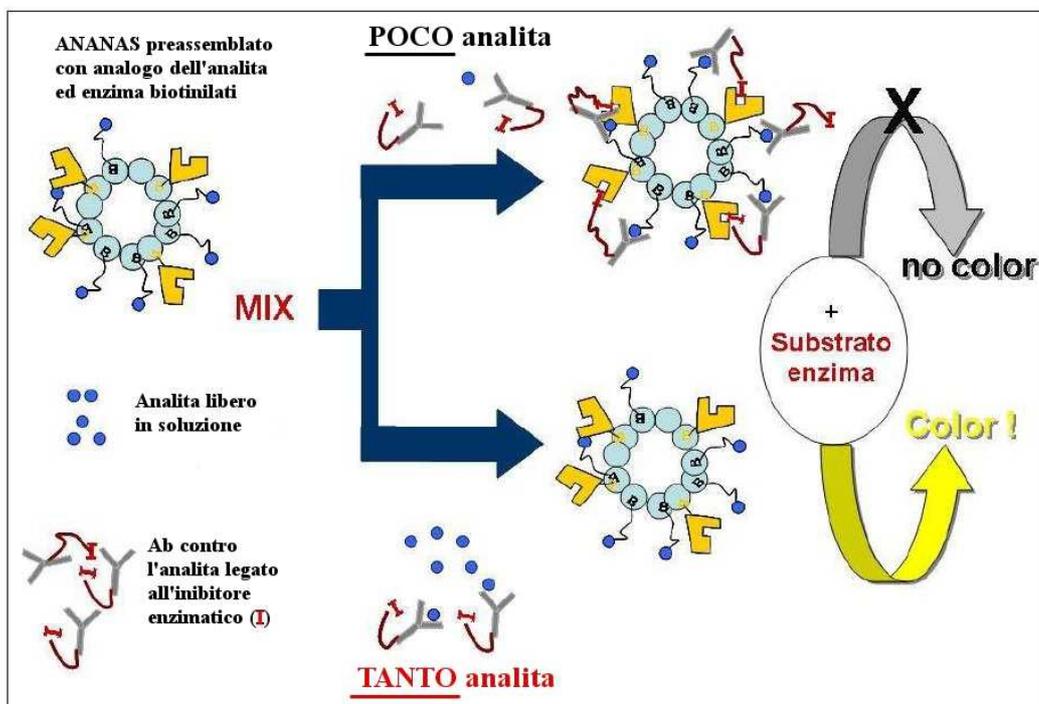


Figura 9: Schema generale del saggio omogeneo ipotizzato nel presente lavoro.

Le componenti necessarie per la realizzazione del saggio sono quindi:

1. Enzima biotinilato: i precedenti studi effettuati da ANANAS nanotech avevano sempre visto l'impiego di perossidasi di rafano (HRP)¹¹²⁻¹¹³; nel presente studio invece è stata studiata l'applicazione della Fosfatasi Alcalina (AP), enzima di MW=140 KDa ampiamente utilizzato in ambito analitico-diagnostico per la sua capacità di convertire, ad un pH ottimale di 9.6, il substrato 4-nitrofenilfosfato (NPP) a 4-nitrofenolo (NP), composto di colore giallo con un'assorbanza misurabile a $\lambda=405$ nm.
2. Analogo biotinilato dell'analita: si è scelto di utilizzare come molecola modello un derivato dell'acido idrossifenilazobenzoico (HABA) già disponibile in laboratorio; tale

derivato presenta una catena laterale necessaria all'ancoraggio del residuo di biotina tramite uno *spacer* di PEG₅₀₀₀;

3. Coniugato Anticorpo-inibitore: si sono impiegate IgG di coniglio specifiche per l'analita scelto già disponibili nel laboratorio di riferimento; come inibitore è stato impiegato l'acido 3-aminopropilfosfonico (APF), inibitore competitivo dell'AP appartenente alla classe dei fosfonati organici; tale sostanza è capace di inibire l'enzima a concentrazioni di ordine mM. L'APF è stato legato all'anticorpo attraverso uno *spacer* di PEG₄₀₀₀; tale lunghezza è stata scelta per assicurare una libera accessibilità dell'APF all'enzima, evitando impedimenti sterici dovuti alla massa dell'IgG.
4. Nanoparticelle ANANAS che fungano da scaffold per l'assemblato sopradescritto.

Le attività svolte in questo contesto hanno riguardato la sintesi e la caratterizzazione funzionale di tutte le sopracitate componenti; è stato poi definito il *design* generale del saggio e ne è stata elaborata e testata la procedura operativa.

4. MATERIALI E METODI

4.1. MATERIALI

Avidina (Belovo)

Biotina (Fluka #14400)

Siero albumina bovina - BSA - (Sigma-Aldrich #D5905)

Lisozima (Sigma-Aldrich #62971)

Fosfatasi alcalina da mucosa intestinale bovina - AP - (Sigma-Aldrich #A2356)

Dicicloesilcarbodiimide - DCCI - (Sigma-Aldrich #36650)

Dimetilamminocinnamaldehyde (Sigma-Aldrich #015H1428)

di-tert-butyl-dicarbonato - di-Boc - (Fluka #34660)

N-Boc-1,6-diamino-esano cloridrato (Acros #15392)

N,N'-disuccinimidilcarbonato - DSC - (Sigma-Aldrich #43720)

Acido trinitrobenzensolfonico - TNBS - (Fluka #92822)

Acido 2-(4-idrossifenilazo)benzoico - HABA - (Sigma-Aldrich #H5126)

Acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico - DTNB - (Sigma-Aldrich #D8130)

Acido trifluoroacetico - TFA - (Sigma-Aldrich #T6508)

S-Tritil-L-cisteina - (trt)Cys - (Sigma-Aldrich #164739)

N-(9-Fluorenilmetossicarbonil)-S-tritil-L-cisteina - Fmoc-(trt)Cys - (Sigma-Aldrich #47695)

4-dimetilaminopiridina - DMAP - (Sigma-Aldrich #107700)

1-[Bis(dimetilamino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-oxid esafluorofosfato, - HATU - (Sigma-Aldrich #445460)

[Etil ciano(idrossiimino)acetato-O²]tri-1-pirrolidinilfosfonio esafluorofosfato - Pyoxim - (Sigma-Aldrich #728462)

Trietanolamina - TEOA - (Sigma-Aldrich #T58300)

Trietilamina - TEA - (Sigma-Aldrich #T0886)

Tris(2-carbossietil)fosfina*HCl - TCEP - (#Sigma-Aldrich #C4706)

mPEG₅₀₀₀-OH (Fluka #81323)

mPEG₅₀₀₀-NH₂ (Fluka #06679)

mPEG₆-SH (Plasmachem #MPEG THIOL)

Biotina-PEG₅₀₀₀-NHS (RAPP POLYMERE #135000-25-35)

Biotina-PEG₂₀₀₀-NH₂ (Laysan Bio Inc. #Biotin-PEG-NH2-2K)

Biotina-PEG₅₀₀₀-NH₂ (Laysan Bio Inc. #Biotin-PEG-NH2-5000)

Maleimido-PEG₄₀₀₀-NHS (Sigma-Aldrich #757853)

Fmoc-NH-PEG₅₀₀₀-CO-NHS (RAPP #13 5000 22-35)

H₂N-PEG₂₀₀₀-COOH (Laysan #NH2-PEG-CM-2000)
H₂N-PEG₅₀₀₀-COOH (Laysan #NH2-PEG-CM-5000)
N α ,N ϵ -di-BOC-L-Lisina-idrossisuccinimidilestere (Fluka #15131)
Ninidrina (Acros #415720250)
NH₂-PEG₅₀₀₀-COOH*HCl (Iris Biotech #PEG1097)
N-Idrossisuccinimide - NHS - (ABCR #AV1010312)
DNA plasmidico p-EGPF C1 4,7Kb (Clonotech #6084-1)
Acido etilendiamminotetracetico - EDTA - (Sigma-Aldrich #03609)
Acido citrico (Sigma-Aldrich #251275)
Cloruro di sodio (Sigma-Aldrich #S3014)
Fosfato monosodico biidrato (ACEF #002728)
MgSO₄ anidro (Riedel de Haen #13167)
Siero di capra - GOAT serum - (Sigma-Aldrich #G9023)
Polisorbato 20 - TWEEN 20 - (ACEF #001559)
Tris(idrossimetil)aminometano - TRIS - (Sigma-Aldrich #33742)
Avidina-Perossidasi - Avi-HRP - (Sigma-Aldrich #3151)
SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL #35-00-00)
Costar 3369 EIA/RIA plate, No Lid, 96 Well Easy Wash, Certified High Binding

Solventi: CH₂Cl₂ (DCM), acetato di etile (EtOAc) forniti da Carlo Erba reagenti; etere dietilico (Et₂O), CDCl₃, d₆-DMSO, DMSO, diossano, N-metil pirrolidone (NMP) forniti da Sigma-Aldrich; DMF fornita da ACROS organics; MeOH, EtOH, CHCl₃ forniti da AlanaR Normapure; Acetone fornito da J.T. Baker; l'acqua utilizzata è di grado milliQ o bi-distillata; il "Diluent Buffer" (DB) è stato fornito da ANANAS Nanotech.

La sequenze di PNA (H₂N-CTGTCGGCGCTGGGG-Ala-Ala-CONH₂ MW=4292,94) sono state sintetizzate e fornite dal laboratorio della Dott.ssa Dettin, del Dipartimento di Ingegneria Industriale.

Le superfici a *grating* sinusoidale sono state sviluppate, costruite, e fornite dal laboratorio del Prof. Filippo Romanato, del Laboratory of Nanofabrication and Nanodevices (LANN); Gli oligonucleotidi (DNA e DNA-Cy3) sono stati forniti dalla Integrated DNA Technologies (IDT; Leuven, Belgio).

Gli estratti purificati di genoma di *Mycobacterium Tuberculosis, wild type*, e gli estratti purificati di DNA umano genomico da cellule di carcinoma polmonare CCL-185 sono stati forniti dal laboratorio di Medicina Molecolare del Dott. Riccardo Manganelli, del Dipartimento di Medicina Molecolare;

4.2. STRUMENTAZIONE

Le analisi spettroscopiche sono state effettuate utilizzando uno spettrometro Varian Cary 50 Scan UV-Vis; la cromatografia per gel-filtrazione è stata condotta avvalendosi di colonne NAP-5 e NAP-10 con gel Sephadex G-25 DNA grade (G.E. Healthcare), oppure mediante cromatografo FPLC AKTApurifier (G.E. Healthcare) con colonne Superose 6 10/300 GL, Superdex Peptide 10/300, e HiPrep 26/10 Sepharose 6 FF (G.E. Healthcare), dotato di rivelatore UV-Vis. e collegato con un rivelatore RI Waters 2414 (Waters); la fluorescenza in soluzione è stata misurata mediante un fluorimetro JASCO-FP 6500; le analisi NMR sono state effettuate mediante Bruker AMX 300 MHz; Le rilevazioni SPR sono state effettuate utilizzando un ellissometro J.A. Woollam Co. VASE con una risoluzione angolare e di λ rispettivamente di 0.005° e 0.3 nm; per le analisi FT-IRRAS è stato usato un Equinox 55 FT (Buker); le analisi spettroscopiche di massa MALDI sono state effettuate con un Perseptive Biosystem MALDI-TOF Voyager DE-Pro usando una matrice costituita da acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB) sciolto a 10 mg/ml in 50% acetonitrile (v/v) 0.1% TFA; le incubazioni su superfici si sono avvalse di maschere Proplate[®] (Life Technologies); lo spottaggio di soluzioni su vetrini da microarray è stato effettuato mediante un VersArray Chip Writer Pro System (Biorad) con pins Telchem SMP3 per microspottaggio; tali vetrini sono stati incubati in un Array Booster AB410 (Advantix), lavati con un Advawash Station AW400 (Advantix) e la lettura in fluorescenza degli stessi è stata effettuata con un Genepix 4000B laser scanner (Molecular Devices) con laser a 532 e 635 nm; L'ultrafiltrazione si è avvalsa di una cella MILLIPORE AMICON 8010, con membrane MWCO a cut-off 30 kDa; i saggi ELISA sono stati effettuati utilizzando un lettore di micro piastre Thermo Scientific Multiskan FC, un agitatore per micro piastre termostatato WVR ed un apparato di lavaggio automatico per micropiastre Thermo Scientific Wellwash MK2.

4.3. PROCEDIMENTI GENERALI

4.3.1. Determinazione della concentrazione in soluzione di composti diversi

4.3.1.1. Proteine, cromofori, DNA, PNA, e nanoparticelle

La concentrazione di proteine pure in soluzione è stata ricavata mediante misure di assorbanza a 280 nm: per la determinazione dell'Avidina si è utilizzata una $E_{0,1\%(280\text{nm})} = 1,54$; per la determinazione della BSA si è utilizzata una $E_{0,1\%(280\text{nm})} = 0,69$; Per la determinazione delle IgG si è utilizzato il valore di $E_{0,1\%(280\text{nm})}$ classicamente riportato in letteratura, pari a 1,4.

La presenza di PNA è stata dedotta in base alla sua assorbanza UV-Vis. a 260 nm; per una determinazione quantitativa si è usata una $E_{0,1\%(260\text{nm})} = 34,8$ calcolata in base alla sua composizione nucleotidica e dei valori di assorbività delle singole basi. La concentrazione di DNA in soluzione, in assenza di ulteriori cromofori, è stata determinata attraverso la sua assorbanza tra 260 e 280 nm, sulla base della sua composizione nucleotidica e dei valori di ϵ molare delle singole basi.

La concentrazione in soluzione delle nanoparticelle pure o diversamente funzionalizzate è stata determinata mediante misure di assorbanza a diverse lunghezze d'onda, considerando l'assorbività molare dei loro diversi componenti.

4.3.1.2. Biotina e suoi derivati non ingombrati – Saggio HABA

La concentrazione di biotina o di elementi biotinilati non ingombrati in una soluzione è stata determinata mediante il saggio colorimetrico HABA¹¹⁴ basato sulla proprietà dell'acido idrossifenilazobenzoico (HABA) di legarsi ai BBS dell'avidina con una contemporanea variazione cromatica (la λ max. di assorbimento dello HABA si sposta da 340 a 500 nm una volta legato), e sulla capacità della biotina di spiazzarlo stechiometricamente dai BBS. A tale spiazzamento si accompagna una variazione di assorbanza a 500 nm la cui entità è direttamente correlata alla concentrazione di biotina nella miscela del saggio. Il reattivo HABA consta in una miscela di avidina 0,5 mg/ml e di HABA 0,072 mg/ml in tampone fosfato 10 mM, NaCl 150 mM pH=7,4 (PBS).

La soluzione a titolo ignoto di biotina viene addizionata al reattivo HABA in un rapporto volumetrico che può variare circa da 2:10 a 2:100 e si esegue una lettura spettrofotometrica a 500 nm prima e dopo l'aggiunta della soluzione contenente biotina. Il titolo di questa viene calcolato dalla differenza di assorbanza a 500 nm tenendo conto che la ϵ dello HABA legato all'avidina è di 34000¹¹⁴.

4.3.1.3. PEG – Saggio allo Iodio

La rilevazione della presenza di PEG in molecole modificate con tale polimero e la sua determinazione quantitativa sono state effettuate utilizzando il saggio allo Iodio secondo Sims & Snape¹¹⁵.

Il saggio viene eseguito mescolando 480 μ l di d.d. H₂O, 125 μ l soluzione BaCl 2 5% in HCl 1N, 125 μ l soluzione di Iodio (1,27 g Iodio in 100 ml di soluzione KI al 2%), e 20 μ l soluzione contenente il polimero. La miscela viene lasciata reagire per 15 minuti esatti e ne viene determinata l'assorbanza a 535 nm.

Il titolo del polimero viene calcolato rapportando il valore di pendenza della retta ottenuta analizzando i campioni incogniti a differenti diluizioni, rispetto alla pendenza di una appropriata retta di taratura realizzata con una soluzione di PEG a titolo noto (1-6 μ g/ml finali nel saggio).

4.3.1.4. Gruppi amminici primari – Saggio al TNBS e Saggio alla fluorescamina

La rilevazione dei gruppi amminici liberi in soluzione è stata eseguita mediante il saggio all'acido trinitrobenzensolfonico (TNBSA o TNBS) secondo Snyder & Sobocinsky¹¹⁶, in cui questo reattivo viene coniugato alle ammine libere in soluzione in ambiente alcalino (pH=9,3), formando un trinitrofenil derivato la cui assorbanza a 420 nm è direttamente correlabile alla sua concentrazione, e di conseguenza alla concentrazione in ammine della soluzione impiegata.

Volumi crescenti di soluzione contenente l'analita (da 0 a 400 μ l) sono portati a 1 ml con borato 0,1 M pH=9,3. Sono aggiunti 40 μ l di una soluzione 1 mg/ml di TNBSA e dopo 30 minuti viene misurata l'assorbanza a 420 nm. Il titolo delle ammine viene calcolato rapportando il valore di pendenza della retta così ottenuta rispetto alla pendenza di una appropriata retta di taratura realizzata con una soluzione di ammine a titolo noto.

Il saggio alla fluorescamina o Floram¹¹⁷ si basa sulla proprietà di questo composto di per sé privo di fluorescenza, di reagire con le ammine primarie dando un composto fluorescente; l'intensità del segnale è proporzionale alla concentrazione di ammine libere in soluzione.

Volumi crescenti di soluzione contenente l'analita (da 2 a 60 μ l) vengono portati a 2.25 ml con tampone fosfato 0.1 M pH=8 e vengono aggiunti sotto stirring 750 μ l di soluzione di fluorescamina 0.3 mg/ml in acetone; dopo 5 minuti viene letta la fluorescenza ai 3 diversi livelli di sensibilità dello strumento impiegando i seguenti parametri: $\lambda_{\text{abs}}=390$ nm, exc. bandwidth= 10 nm; $\lambda_{\text{exc}}=475$ nm, em. bandwidth= 5 / 10 nm. Il titolo delle ammine viene calcolato rapportando il valore di fluorescenza ottenuto per ciascun punto rispetto alla fluorescenza di una soluzione di ammine a titolo noto (tipicamente una soluzione dello

stesso analita prima della modifica delle ammine) sottraendo l'eventuale valore di fluorescenza dato da altri composti presenti in soluzione (soluzioni a zero analita).

4.3.2. Gruppi tiolici in soluzione – Saggio di Ellman

La determinazione quantitativa di gruppi tiolici è stata eseguita mediante saggio di Ellman¹¹⁸. L'acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico è un reattivo che reagisce stechiometricamente con i gruppi tiolici liberi dando un composto disolfuro più un prodotto, il TNB (acido 2-nitro-5-tiobenzoico) di colore giallo.

Il saggio viene eseguito mescolando 30 μ l di soluzione a concentrazione incognita in tioli, 970 μ l di, e 50 μ l di reattivo Ellman 4mg/ml in tampone fosfato /EDTA. Attesi 15 minuti si misura l'assorbanza a 412nm.

Volumi crescenti di soluzione contenente l'analita sono portati a 1 ml con tampone fosfato 100mM pH=7. Sono aggiunti 40 μ l di una soluzione 1 mg/ml (30mM) di DTNB e dopo 30 minuti viene misurata l'assorbanza UV-Vis. a $\lambda=412$ nm.

Il titolo dei gruppi tiolici viene calcolato facendo il rapporto tra l'assorbanza così ottenuta, dopo sottrazione del bianco, e il valore della ϵ mg/ml relativa all'acido 5-tio-2-nitrobenzene che è pari a 14150

4.3.2.1. Analisi cromatografica e purificazione delle nanoparticelle

Quando necessario, la purificazione delle nanoparticelle diversamente funzionalizzate è stata eseguita mediante cromatografia FPLC ad esclusione dimensionale usando uno strumento G.E. Healthcare AKTApurifier con colonne G.E. Healthcare - Superose 6 10/300 GL e G.E. Healthcare – HiPrep 26/10 Sepharose 6 FF; le soluzioni da purificare sono state caricate mediante loops da 1 a 5 ml; le corse cromatografiche sono state condotte in eluizione isocratica usando come eluente PBS (tampone 10 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH=7,4) con flussi di 0,5 o 2 ml/min; le corse sono state seguite registrando l'assorbanza a 220, 280, 300 nm.

4.4. SINTESI DEI DIVERSI COMPONENTI

4.4.1. Derivati del PEG

La Tabella 2 riassume i derivati del PEG sintetizzati nel corso dei lavori di dottorato ed il loro impiego; per i derivati dello stesso tipo ma impieganti PEG di MW diverso (2 e 5 kDa), di seguito verrà descritta una procedura di sintesi unica in quanto le sintesi sono state condotte in modo del tutto analogo.

Tabella 2: Riassunto dei PEG-derivati sintetizzati durante i lavori di dottorato e loro funzione.

PEG-derivato:	Funzione:
(I) (trt)Cys-mPEG ₂₀₀₀	Studi di funzionalizzazione delle superfici per esperimenti SPR; protezione da adsorbimento aspecifico di biomolecole; <i>backfiller</i> per esperimenti con sonda a PNA.
(II) (trt)Cys-mPEG ₅₀₀₀	Studi di funzionalizzazione delle superfici per esperimenti SPR; protezione da adsorbimento aspecifico di biomolecole.
(III) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₂₀₀₀ -biotina (IV) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₅₀₀₀ -biotina	Protezione da adsorbimento aspecifico di biomolecole e sonda per rilevazione di avidina.
(V) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₂₀₀₀ -COOH (VI) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₅₀₀₀ -COOH	Condensazione con PNA per l'ottenimento del sonda per rilevazione di DNA
(VII) Biotin-PEG ₅₀₀₀ -(CH ₂) ₆ -HABA	Funzionalizzazione di nanoparticelle ANANAS: analogo di analita modello in saggio omogeneo
(VIII) IgG-PEG ₄₀₀₀ -APF	Coniugato Ab-inibitore in saggio omogeneo
(IX) Biotin-PEG ₅₀₀₀ -AP	Funzionalizzazione di nanoparticelle ANANAS: elemento di rivelazione in saggio omogeneo.

Le sintesi dei composti contenenti cisteina sono state condotte in modo da avere una totale funzionalizzazione della stessa; non ci si è curati di separare l'eventuale eccesso di catene di PEG che resta quindi come "residuo inerte" nella miscela dei prodotti; la titolazione delle catene di PEG è stata effettuata mediante saggio allo iodio (par. 4.3.1.3.); il contenuto di biotina mediante saggio HABA (par. 4.3.1.2.), la verifica della funzionalizzazione dei residui amminici è stata condotta mediante saggio TNBS o alla fluorescamina (par. 4.3.1.4.).

L'andamento delle sintesi dei PEG-derivati (particolarmente le fasi di attivazione ad N-idrossisuccinimidil estere o a N-idrossisuccinimidilcarbonato) è stato seguito tramite *thin layer chromatography* (TLC). Sono state usate lastre per TLC in alluminio ricoperto da gel di silice 60 F254, usando come eluenti diverse miscele di solventi la cui composizione è stata adattata di volta in volta. I prodotti capaci di assorbire nell'UV-Vis sono stati evidenziati impiegando una lampada UV a 254 nm; i prodotti contenenti ammine primarie sono stati evidenziati mediante reazione con ninidrina; i prodotti contenenti biotina sono stati identificati mediante reattivo di Renz & Loew¹⁹, costituito da una miscela di

dimetilamminocinnamaldehyde acida per HCl, che reagisce con l'anello biciclico della biotina dando una colorazione rosa; eventuali altre caratterizzazioni (es. di tipo cromatografico) sono specificate laddove utilizzate.

4.4.1.1. (trt)Cys-mPEG₂ e 5 kDa - (I e II)

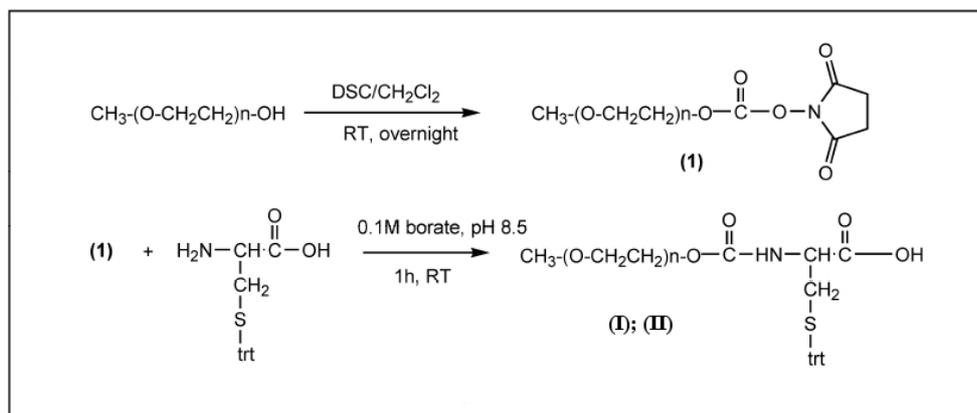


Figura 10: Schema di sintesi di (trt)Cys-mPEG₂₀₀₀ e (trt)Cys-mPEG₅₀₀₀; n = 45 e 113 per i derivati a MW 2 e 5 kDa rispettivamente.

Il mPEG-OH di partenza (2 o 5 kDa) è stato sciolto in DCM anidro ed attivato a N-idrossisuccinimidilcarbonato aggiungendo 2 equivalenti di DSC in presenza di 2 equivalenti di TEA; l'intermedio reattivo **(1)** è stato isolato per precipitazione in Et₂O anidro e successivamente aggiunto sotto stirring ad una soluzione 2 mM di (trt)Cys in borato 0.1 M pH=8.5; dopo 2 h a RT il prodotto finale **(I e II)** è stato estratto con DCM; la soluzione organica è stata anidrificata con MgSO₄, filtrata, e concentrata in evaporatore rotante; il prodotto finale è stato isolato tramite precipitazione in Et₂O anidro e caratterizzato tramite ¹H-NMR. Resa di recupero in PEG: 88.9 %; ulteriori dettagli sono riportati in letteratura¹²⁰.

4.4.1.2. Fmoc-Cys(trt)-PEG₂ e 5 kDa-biotina - (III e IV)

La biotinilamidoesanolamina (sintetizzata secondo una procedura presente in letteratura¹²¹) è stata sciolta in DMF anidra ed aggiunta di 1 equivalente di fmoc-NH-PEG-NHS (2 o 5 kDa) in presenza di 1 equivalente di TEA; dopo 2h a RT l'intermedio **(2)** è stato isolato per precipitazione in Et₂O anidro. Il gruppo protettore fmoc è stato rimosso mediante trattamento con 20% piperidina in DMF per 30 minuti, la miscela diluita con dd H₂O ed il prodotto con l'ammina libera **(3)** è stato estratto con DCM ed isolato mediante precipitazione in Et₂O anidro.

In un altro contenitore, la fmoc-(trt)Cys è stata attivata ad N-idrossisuccinimidil estere con 1 equivalente sia di DCCl che di HNS in DCM anidro. Il composto attivato **(4)** è stato aggiunto ad un equivalente del composto **(3)** preventivamente sciolto in DCM anidro, seguito da 2 equivalenti di TEA. Il prodotto è stato isolato a seguito di precipitazione in

Et₂O anidro. Tutti i prodotti sono stati identificati tramite ¹H-NMR. Resa di recupero in PEG: 85.7%; ulteriori dettagli sono riportati in letteratura¹²⁰.

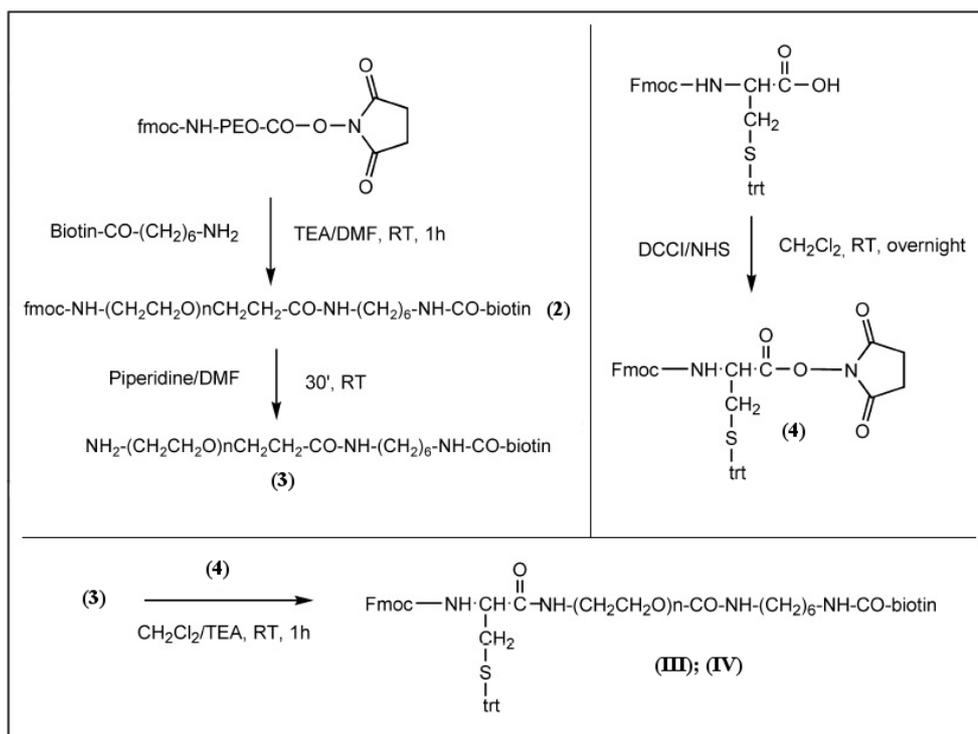


Figura 11: Schema di sintesi di Fmoc-Cys(trt)-PEG₂₀₀₀-biotina e Fmoc-Cys(trt)-PEG₂₀₀₀-biotina; n = 45 e 113 per i derivati a MW 2 e 5 kDa rispettivamente.

4.4.1.3. Fmoc-Cys(trt)-PEG₂ e 5 kDa-COOH - (V e VI)

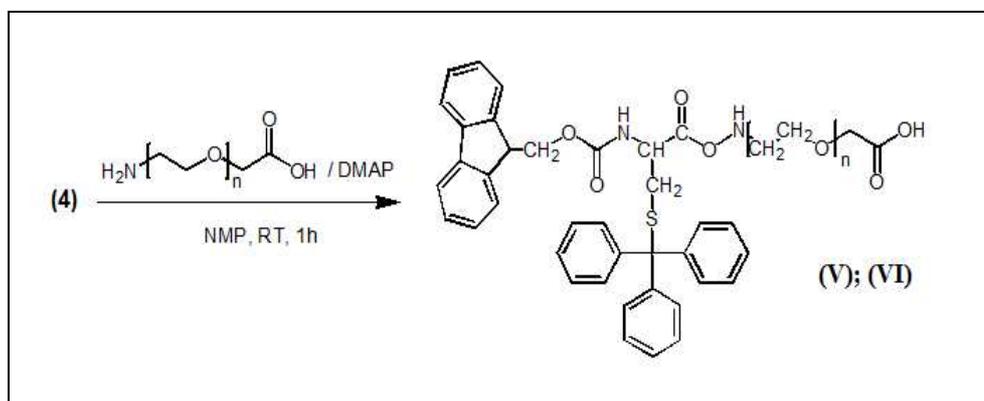


Figura 12: Schema di sintesi di Fmoc-Cys(trt)-PEG₂₀₀₀-COOH e Fmoc-Cys(trt)-PEG₅₀₀₀-COOH; n = 45 e 113 per i derivati a MW 2 e 5 kDa rispettivamente.

La fmoc-(trt)Cys è stata attivata ad N-idrossisuccinimidil estere in modo analogo di cui al paragrafo precedente per dare l'intermedio attivato **(4)**; questo è stato aggiunto in un rapporto di 1.5 equivalenti a del H₂N-PEG-COOH sciolto in NMP anidro assieme a 2 equivalenti di TEA. I prodotti sono stati isolati mediante precipitazione in Et₂O anidro; sono stati poi caratterizzati tramite ¹H NMR, analisi cromatografica di gel filtrazione via FPLC e

spettrometria di massa MALDI. Resa di recupero in PEG: 56% per il derivato a MW 5 kDa; 85% per derivato a MW 2 kDa; ulteriori dettagli sono riportati in letteratura⁹³.

4.4.1.4. Biotin-PEG₅₀₀₀-(CH₂)₆-HABA - (VII)

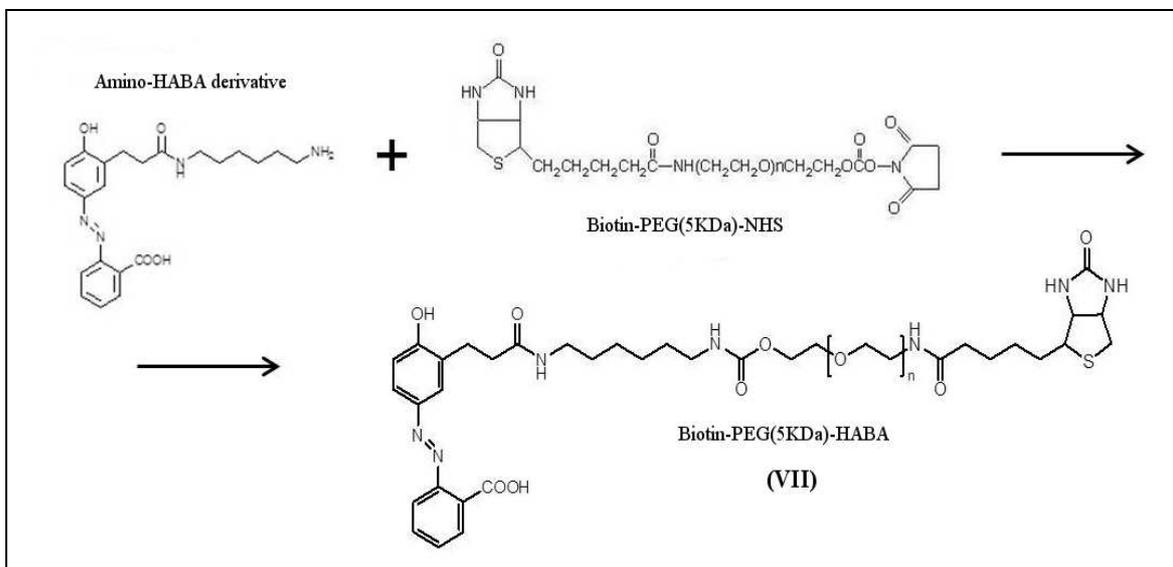


Figura 13: Schema generale di sintesi di Biotina-PEG5000-HABA.

Una soluzione in DMSO anidro di HABA-(CH₂)₆-NH₂, un derivato dello HABA recante una catena ammino-terminale sintetizzato secondo una procedura presente in letteratura¹²² vengono aggiunti a 2 equivalenti di Biotin-PEG₅₀₀₀-NHS; dopo 1h a RT la miscela è stata purificata mediante cromatografia di gel filtrazione con colonna NAP10 eluendo con tampone AP pH 7.6 (50 mM trietanolamina; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM ZnCl₂; pH 7.6); vengono raccolte frazioni da 0.5 ml che vengono analizzate mediante spettroscopia Uv-Vis ($\lambda = 340$ e 500 nm) e saggio allo iodio (par. 4.3.1.3.).

4.4.1.5. IgG-PEG₄₀₀₀-aminopropilfosfonato (APF) - (VIII)

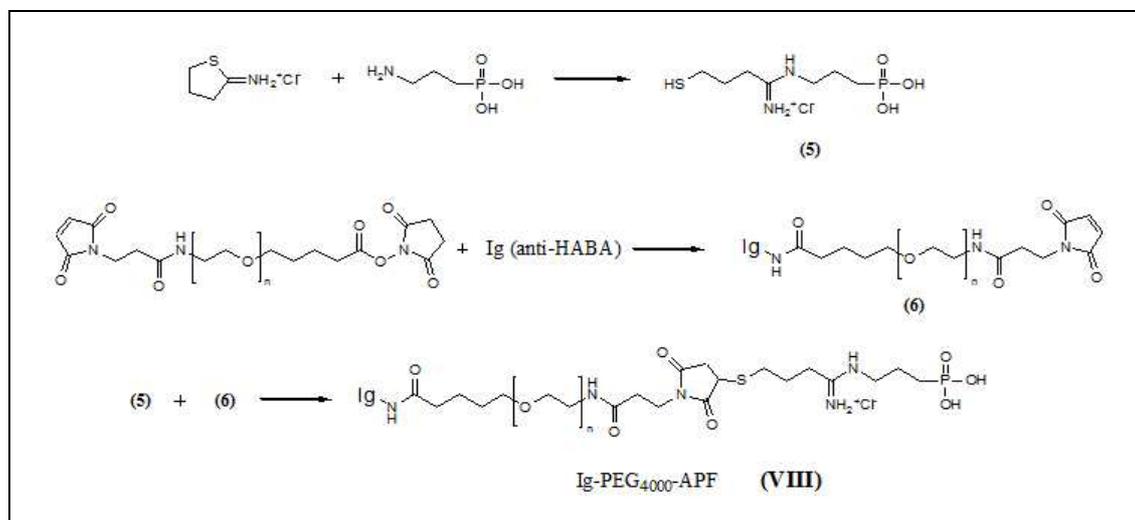


Figura 14: Schema generale di sintesi del derivato IgG-PEG₄₀₀₀-APF.

Per la modifica sono state utilizzate delle IgG di coniglio direzionate contro lo HABA sviluppate su commissione dalla Areta international secondo protocolli standard. Le IgG anti-HABA di coniglio in PBS sono state addizionate di 10 equivalenti di maleimido-PEG₄₀₀₀-NHS sciolti in DMSO anidro e lasciati in agitatore rotante a RT per 1 h; nel frattempo una soluzione di 2-iminotiolano (Reattivo di Traut) in PBS è stata addizionata di 10 equivalenti di APF sciolto in PBS, e lasciati a reagire per 50 min. a RT.

La miscela è stata poi addizionata di una soluzione di TCEP in PBS per un rapporto molare di 2 equivalenti tiolo:TCEP e subito aggiunti alla miscela di PEG-derivato (rapporto molare tiolo:PEG = 2:1); dopo 2h a RT la miscela è stata purificata dalle componenti a basso MW mediante cromatografia di gel filtrazione via FPLC; il picco corrispondente alle IgG è stato raccolto e purificato dagli equivalenti di PEG in eccesso mediante ultrafiltrazione in cella AMICON impiegando una membrana MWCO con cut-off 30 KDa eluendo con PBS. La soluzione purificata è stata ulteriormente eluita in colonna di gel filtrazione NAP10 eluendo con tampone AP pH 7.6; il picco corrispondente alle Ig è stato recuperato ed analizzato mediante spettroscopia UV-Vis. e saggio allo iodio (par. 4.3.1.3.)¹²³. Resa di recupero in PEG: 56.4%.

4.4.1.6. Biotin-PEG₅₀₀₀-Alcalin fosfatasi (AP) - (IX)

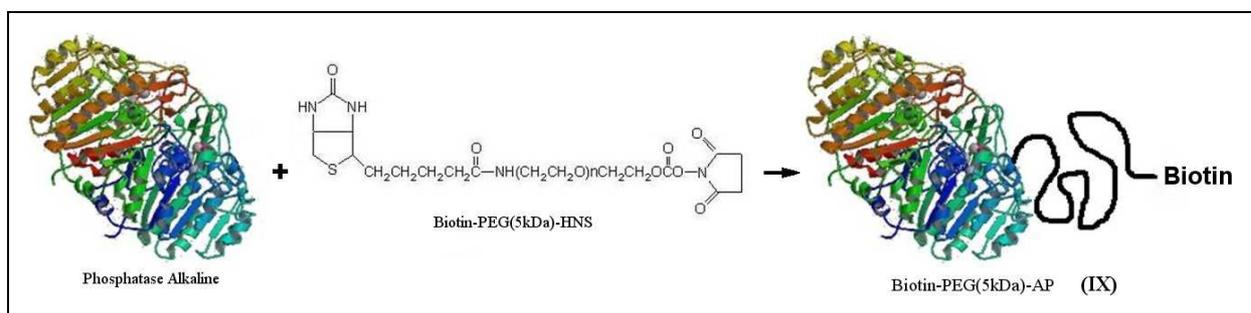


Figura 15: Schema di sintesi di Biotin-PEG₅₀₀₀-AP.

La soluzione stock di alcalin fosfatasi (AP) è stata purificata mediante gel filtrazione con colonna NAP5 eluendo con tampone AP pH 7.6 ed addizionata di 20 equivalenti di Biotin-PEG₅₀₀₀-NHS sciolto in DMSO anidro; L'eccesso di PEG è stato rimosso tramite ultrafiltrazione in cella AMICON con membrana MWCO a cut-off 30 KDa; la soluzione recuperata è stata analizzata tramite spettroscopia UV-Vis. e cromatografia di gel filtrazione via FPLC. La soluzione è stata dializzata per 3 giorni contro 2l di tampone borato 0.1 M pH 8.5 cambiando il tampone 3 volte; la soluzione recuperata analizzata all'UV-Vis. ed aggiunta ad altri 20 equivalenti di Biotin-PEG₅₀₀₀-NHS in DMSO anidro; dopo 1h di reazione a RT il PEG-derivato è stato precipitato aggiungendo alla soluzione un equivolume di una sol. satura di (NH₄)₂SO₄. Dopo 1h a 4°C la miscela è stata centrifugata (16600 g, 5 min., 4°C) ed il ppt rimosso in tampone AP pH 7.6; . L'eccesso di PEG non reagito è stato rimosso tramite ultrafiltrazione in cella AMICON con

membrana MWCO a cut-off 30 KDa; la soluzione recuperata è stata analizzata tramite spettroscopia UV-Vis., aggiunta di BSA ad una conc. finale 1 mg/ml e stoccata a 4°C. Recuperati 148 µg AP biotinilata. Resa di recupero in AP: 17.4%.

4.4.2. Sintesi di nanoparticelle ANANAS®

Le nanoparticelle necessarie agli esperimenti sono state preparate secondo il protocollo sviluppato da ANANAS nanotech® secondo una procedura descritta in letteratura¹¹²⁻¹¹³ impiegando avidina ed un plasmide di DNA pEGFP di 4.7 Kb di lunghezza; il composto **VII** ed i PEG-derivati Biotin-(CH₂)₆-Lys-mPEG₅₀₀₀ e Biotin-(CH₂)₆-Lys-(mPEG₅₀₀₀)₂ (sintetizzati secondo una procedura anch'essa descritta in letteratura¹¹²) sono stati utilizzati per formare lo strato polimerico superficiale con funzione antiaggregante-stabilizzante e presentante l'analogo dell'analita modello (nel caso del composto **VII**). Dato che l'aggancio del polimero alle particelle si realizza tramite il residuo di biotina, la quantità di PEG-derivato/nanoparticella viene espressa come percentuale di BBS occupati sul totale dei BBS disponibili; nello specifico, le particelle utilizzate presentavano un contenuto polimerico pari al 12,5% o al 25% dei BBS totali disponibili/nanoparticella.

4.5. SINTESI DI SONDA PER RILEVAZIONE SPR DI DNA: FMOC-CYS(TRT)-PEG_{2 E 5} KDA-PNA - **(X)**; **(XI)**

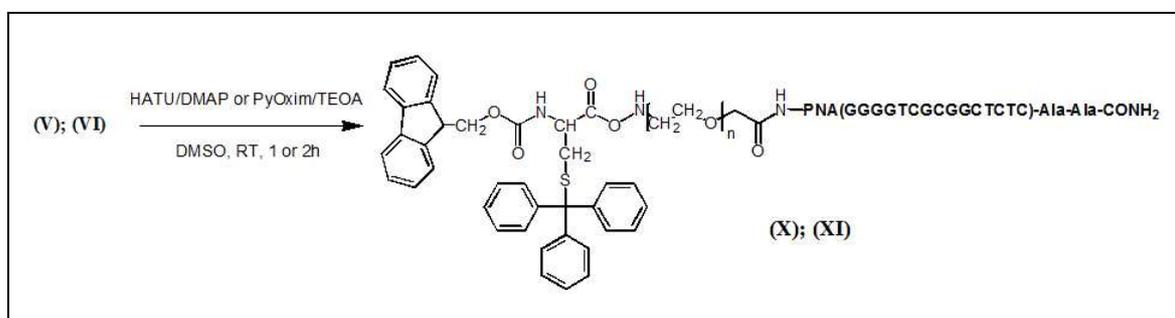


Figura 16: Schema di sintesi di Fmoc-Cys(trt)-PEG₂₀₀₀-PNA e Fmoc-Cys(trt)-PEG₅₀₀₀-PNA; n = 45 e 113 per i derivati a MW 2 e 5 kDa rispettivamente.

Per l'ottenimento delle molecole sonda necessarie agli studi di rilevazione SPR di DNA, la sequenza di PNA fornita dal gruppo della Prof. Dettin è stata coniugata ai prodotti **(V)** e **(VI)** condensando il gruppo ω-carbossile di questi con l'amino-terminale del PNA (i prodotti sono stati genericamente denominati PNA-PEG). La condensazione tra i e la sequenza di PNA è stata perseguita sia in fase solida che in soluzione; in quest'ultimo caso sono state investigate due diverse coppie di agenti condensanti e di basi organiche (vedi apposito paragrafo più avanti); le sintesi sono state condotte in modo da avere una totale modifica del PNA, usando un eccesso di PEG-derivati e di elementi condensanti, poi rimossi purificando i prodotti mediante estrazione differenziale in solventi diversi.

Di seguito viene riportata una procedura di sintesi unica sia per il derivato a MW 5 kDa che per quello a 2 kDa in quanto le sintesi sono state condotte in modo del tutto analogo.

4.5.1. Condensazione in fase solida

La prova di condensazione in fase solida è stata eseguita dal gruppo della Prof.ssa Dettin, del Dipartimento di Ingegneria Industriale, usando come materiali di partenza i PEG-derivati (**5**) a MW 5 kDa ed una porzione del PNA sintetizzato dagli stessi ancora attaccato alla resina: sono stati impiegati 10 equivalenti di prodotto (**5**) sciolti in DMF anidra usando DIPEA come base organica e una miscela di HATU/HOBt come agente condensante; la reazione è stata lasciata proseguire per 23h, poi la resina è stata lavata con DMF e DCM prima di essere seccata sottovuoto per 1h. La resa di *coupling* è stata determinata trattando una piccola porzione di resina con piperidina e misurando all'UV-Vis. l'addotto Fmoc-piperidina a $\lambda=301$ nm.

Il prodotto è stato staccato dalla resina trattandola per 30 min. con una miscela TFA-acqua milliQ-TES-1,2-etanditiolo (EDT) (94:2.5:2.5:1) e m-cresolo (m-cresolo:TFA = 1:4), recuperato mediante precipitazione in Et₂O anidro e seccato sottovuoto per un'ora; è stato poi analizzato mediante cromatografia di gel filtrazione via FPLC; ulteriori dettagli sono riportati in letteratura⁹³.

4.5.2. Condensazione in soluzione

Per la procedura di condensazione in soluzione sono stati impiegati due diversi tipi di condensanti: lo HATU, il condensante più usato nel *coupling* delle ammine, ed il PyOxim[®] un nuovo tipo di condensante in grado di evitare i fenomeni di guanidilazione possibili quando lo HATU viene usato in largo eccesso rispetto all'ammina in reazioni cineticamente sfavorite¹²⁴.

Il PNA è stato sciolto in DMSO anidro ed aggiunto di 2 equivalenti di prodotto (**V**) o (**VI**); Gli agenti condensanti e le relative basi organiche (DMAP per lo HATU e TEOA per il PyOxim[®]) sono state aggiunte progressivamente sotto forma di soluzioni stock in eguali volumi fino al completamento della reazione, seguita mediante saggio alla fluorescamina (par. 4.3.1.4.) prelevando aliquote di miscela di reazione (10 μ l) prima di ogni aggiunta ed analizzando i campioni dopo tempi prestabiliti (2h per la coppia HATU/DMAP, 1h per la coppia PyOxim[®]/TEOA); il materiale è stato poi precipitato in Et₂O anidro e sottoposto a purificazione.

4.5.3. Purificazione del PNA-PEG dalla miscela di reazione

Per la purificazione dei prodotti (**X**) e (**XI**) è stata messa a punto una procedura di purificazione mediante estrazione differenziale in solventi diversi (riassunta in Figura 17).

Il precipitato è stato isolato dall'Et₂O per centrifugazione (16600g, 25°C, 5 min.), addizionato di un ugual volume di EtOAc anidro scaldando a c.a. 60°C e nuovamente centrifugato isolando il solido, denominato residuo A. La soluzione di EtOAc è stata raffreddata overnight a -21°C dando un ulteriore precipitato, denominato residuo B, isolato dopo centrifugazione (16600 g, 4°C, 5 min.); la soluzione di EtOAc è stata quindi seccata sottovuoto ottenendo il residuo C.

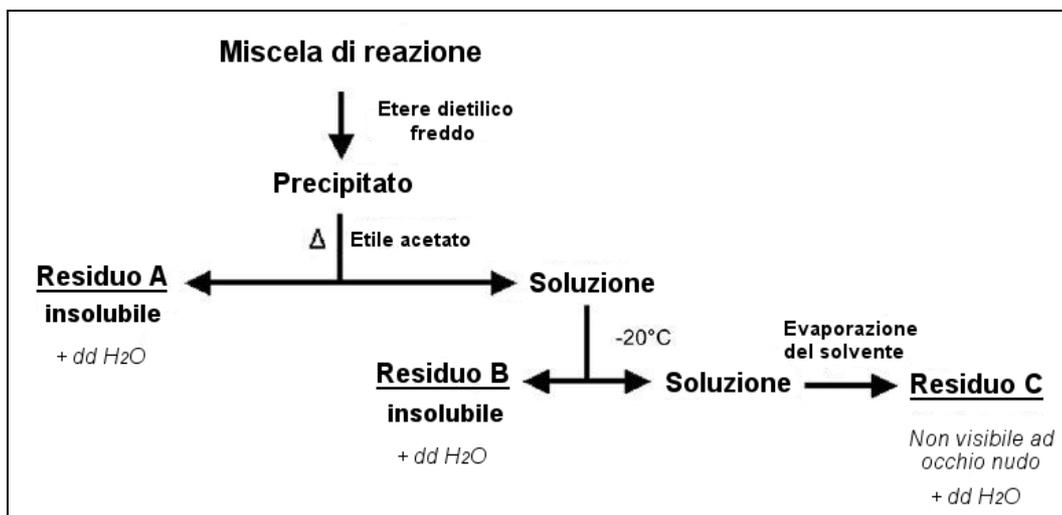


Figura 17: Schema di purificazione per estrazione differenziale dei prodotti di coniugazione PNA-PEG.

Tutti i residui sono stati ridisciolti in dd H₂O ed analizzati all'UV-Vis.; i campioni positivi all'UV a 260 nm (indice di presenza di PNA) sono stati anche analizzati tramite spettrometria di massa MALDI e cromatografia di gel filtrazione via FPLC (in alcuni casi per l'identificazione dei picchi le soluzioni eluite sono state raccolte in frazioni da 0.5 ml ed analizzate tramite spettrofotometria UV-Vis. e saggio allo I₂).

Il residuo A ottenuto dalla sola condensazione con HATU/DMAP è stato ulteriormente purificato mediante cromatografia di gel filtrazione usando colonne NAP5: i campioni sono stati sciolti in dd H₂O ed eluiti dapprima con dd H₂O e poi con PBS 2x (20 mM fosfato di sodio, 300 mM NaCl, pH 7.4) raccogliendo frazioni da 250 e 500 µl che sono state analizzate mediante spettrofotometria UV-Vis. e cromatografia di gel filtrazione via FPLC; ulteriori dettagli sono riportati in letteratura⁹³.

4.6. STUDI DI FUNZIONALIZZAZIONE DELLE SUPERFICI, CAPACITÀ DI RESISTENZA ALLE INTERAZIONI ASPECIFICHE, RILEVAZIONE DI ANALITI BERSAGLIO

Tutti i lavori riguardanti la funzionalizzazione di superfici SPR, la loro caratterizzazione, ed i test applicativi sono stati condotti in collaborazione con la Dott.ssa Agnese Sonato del LaNN; altre collaborazioni sono via via specificate per le specifiche attività interessate.

4.6.1. La piattaforma sperimentale

Tutti gli studi sono stati effettuati utilizzando le superfici nanostrutturate a *grating* sinusoidale sviluppate e fornite dal gruppo del Prof. Romanato del LaNN (solo per gli studi preliminari sono state utilizzate delle superfici piatte – vedi cap. 4.6.2.); tali superfici sono state realizzate combinando tecniche di litografia interferenziale a laser (LIL), replicazione per stampaggio, ed evaporazione termica dei metalli di copertura.

Una matrice (*resist*) viene realizzata mediante LIL, da questa viene ricavata una matrice di stampaggio in polidimetilsilossano (PDMS), che viene utilizzata per replicare il grating su vetrini da microscopio ricoperti da una resina tiolenica commerciale (NOA61 – Norland Products) poi indurita mediante esposizione a raggi UV, infine viene eseguito il ricoprimento del grating mediante evaporazione termica del metallo di copertura (5nm Cr come layer di adesione + 40 nm Au)¹²⁵. I parametri finali dei *gratings* vengono ad essere i seguenti: area superficiale c.a. 6 cm²; periodo ed ampiezza dell'onda rispettivamente 500 nm e 40 nm.

Per l'ancoraggio alla superficie d'oro dei diversi componenti è stata utilizzata la ben nota chimica tiolo-oro: i *gratings* sono stati incubati in soluzioni di derivati tiolati del PEG descritti più avanti; le modalità e le tempistiche di funzionalizzazione sono specificate per ciascuna tipologia di esperimento.

4.6.2. Esperimenti FT-IRRAS

Le misure di spettroscopia infrarossa di riflessione-assorbimento sono state effettuate su superfici di Si-Cr-Au piatte o vetro-NOA61™-Au nanostrutturate a *grating* realizzate e fornite dal LANN negli studi preliminari di funzionalizzazione delle superfici con i derivati (I) e (II) per verificarne l'effettiva funzionalizzazione e nei primi test di resistenza delle superfici all'adsorbimento aspecifico di biomolecole (*antifouling*), per determinare la lunghezza di PEG in grado di fornire la miglior protezione. A tal fine le superfici funzionalizzate sono state incubate con soluzioni di proteine di vario MW a diverse concentrazioni per tempi prestabiliti.

I PEG-derivati in polvere sono stati sciolti nella minima quantità di TFA per 15 min, e diluiti ad una concentrazione di 1 mM, centrifugati a 10625 g, 4°C per 10 min. per rimuovere i

gruppi tritile insolubili, ed il surnatante usato per incubare le superfici precedentemente pulite per 10 min in una soluzione perossidica basica (5:1:1 dd H₂O : 30% H₂O₂ : soluzione al 30% di NH₃) a RT con una tempistica variabile da 1 a 48h, poi stabilita a 24h; le superfici sono state sciacquate ripetutamente con dd H₂O, asciugate sotto flusso di azoto e sottovuoto per 1h e poi analizzate; in seguito sono state incubate nelle soluzioni di proteine (Lisozima: 14.3 kDa; BSA: 66 kDa; GOAT IgG: 140 kDa) a concentrazione 1, 5, 30 mg/ml in PBS pH=7.4 per 2 o 24h, sciacquate ed asciugate in modo analogo allo step precedente e di nuovo analizzate.

Le superfici funzionalizzate sono state analizzate raccogliendo spettri prima e dopo incubazione con le soluzioni di proteine, usando come controlli identiche superfici non funzionalizzate incubate in modo analogo; le bande di assorbimento a 1110 e a 1145 cm⁻¹ (ν C-O-C) sono state scelte come indicatori della presenza del PEG, quelle a 1545 e 1663 cm⁻¹ (δ e ν del carbonile amidico) sono invece state considerate come indice dell'adsorbimento proteico¹²⁶.

4.6.3. Esperimenti SPR

Gli esperimenti SPR hanno riguardato gli studi di funzionalizzazione dei *gratings* con PEG-derivati tiolati, la determinazione delle capacità antifouling delle superfici funzionalizzate rispetto a sostanze di varia natura (BSA, siero diluito, acidi nucleici diversi dal bersaglio), la rilevazione di proteine (avidina) e DNA bersaglio dopo incubazione di superfici funzionalizzate con opportuna sonda in soluzioni a varia concentrazione degli stessi.

I *gratings* sono stati analizzati prima della funzionalizzazione, dopo di questa, e dopo l'incubazione con le soluzioni contenenti biomateriali; sono state effettuate misure SPR di riflettività a scansione angolare allo stato secco determinando la posizione dell'angolo di risonanza (*dip*); la λ della luce incidente è stata settata a 625 nm con una polarizzazione di 140° ed angoli di incidenza variabili da 20° ad 80°; un goniometro con precisione di 0.1° montato sul porta-campioni ha permesso la regolazione azimutale delle superfici, fissata a 45°; le variazioni degli angoli di risonanza (*shifts*) sono state determinate sottraendo ad ogni *dip* il rispettivo valore dello step precedente.

4.6.3.1. Studi di funzionalizzazione

Per gli studi di funzionalizzazione è stato utilizzato il composto (II); il materiale in polvere è stato sciolto nella minima quantità di TFA per 15 min per lo sbloccaggio della funzionalità tiolica e poi diluito a 1 mM o ad una concentrazione variabile tra 500 nM a 2.5 mM; le soluzioni sono state centrifugate a 10625 g, 4°C per 10 min. per rimuovere i gruppi tritile insolubili, ed il surnatante usato per incubare le superfici precedentemente pulite per 10 min in una soluzione perossidica basica (5:1:1 dd H₂O : 30% H₂O₂ : soluzione al 30%

di NH_3) per tempi variabili da 1 a 48h o per 24h a RT; le soluzioni sono poi state rimosse e le superfici sciacquate ripetutamente con dd H_2O , asciugate sotto flusso di azoto e sottovuoto per 1h e poi analizzate.

4.6.3.2. Rilevazione di elementi proteici: studi di *antifouling* e rilevazione di avidina

Per gli studi di antifouling le superfici sono state funzionalizzate come al paragrafo precedente utilizzando una soluzione 1mM degli stessi mPEG-derivati cisteinilati, deposta in pozzetti creati montando sulle superfici delle maschere Proplate®; le funzionalizzazioni sono state condotte per tempi diversi fino ad un max di 24 h in modo da ottenere delle densità superficiali di polimero massimali e sub-massimali; le stesse condizioni sono state riprodotte per il derivato commerciale mPEG₆-SH; le soluzioni e le maschere sono state rimosse, e le superfici lavate ed asciugate come al paragrafo precedente e poi analizzate; in seguito, le maschere sono state rimontate e le superfici incubate per 2 h a RT in una soluzione 1 mg/ml di BSA in PBS (PBS-B) o in una soluzione all'1% di siero di capra in PBS (PBS-GS) per la determinazione delle capacità antifouling del sistema in presenza di mezzi di diversa complessità; le superfici sono poi state lavate ed asciugate come sopra ed analizzate.

Per la rilevazione di avidina le superfici sono state funzionalizzate in modo analogo utilizzando degli α -(trt)Cys-PEG ω -biotinilati (sintesi descritta nell'apposito paragrafo); le superfici sono poi state incubate negli stessi mezzi PBS-B e PBS-GS contenenti avidina alla concentrazione di 4 $\mu\text{g/ml}$.

4.6.3.3. Rilevazione di acidi nucleici: ottimizzazione del layer mediante co-deposizione di sonda e *backfiller*, calcolo del rapporto segnale/rumore (S/N ratio) e rilevazione di DNA

Per la rilevazione di acidi nucleici è stato impiegato un sonda a PNA di 15 basi di lunghezza ($\text{H}_2\text{N-CTGTCGGCGCTGGGG-Ala-Ala-CONH}_2$ MW=4292,94) realizzato e fornito dal laboratorio della Prof.ssa Dettin (Dip. di Ingegneria Industriale), coniugato ad un residuo di (trt)Cys mediante o in assenza di uno spaziatore di PEG (sondas definiti rispettivamente PEG-PNA e HS-PNA – la sintesi del PEG-PNA è stata descritta nell'apposito paragrafo; il HS-PNA è stato sintetizzato in fase solida⁹³).

Un secondo PEG-derivato, detto *backfiller* è stato utilizzato con funzione sia di elemento spaziatore tra le catene di sonda sulla superficie, sia di elemento conferente proprietà *antifouling* (vedi relativo paragrafo nella sezione “Risultati e discussione”).

E' stato scelto di impiegare una strategia di co-deposizione di sonda e *backfiller*., testando 7 diverse miscele di sonda/*backfiller*: 1/0; 0.43/0.57; 0.2/0.8; 0.1/0.9; 0.05/0.95; 0.02/0.98; 0/1; la presenza in soluzione di due specie a diverso MW (e conseguentemente con una

diversa cinetica di adsorbimento), ha però posto il problema di prevedere l'effettivo grado di ricoprimento delle superfici da parte delle due specie.

Per avere i rapporti superficiali desiderati (definiti come frazioni di ricoprimento relative) ci si è pertanto avvalsi di un algoritmo predittivo messo a punto dalla Dr.ssa Agnese Sonato e dai suoi collaboratori del LaNN basato sulla teoria di Langmuir sull'adsorbimento dei tioli in combinazione con dati sulle cinetiche di adsorbimento di vari composti tiolati; l'algoritmo fornisce le concentrazioni necessarie di sonda e *backfiller* nella soluzione di funzionalizzazione per avere il voluto rapporto superficiale tra le due specie dopo 24 h di deposizione (Appendice A); la validità del modello è stata verificata mediante test colorimetrico al Blu di Toluidina (TBO)¹²⁷.

Soluzioni stock di sonda e *backfiller* sono state propriamente diluite, mescolate, e seccate sottovuoto; i gruppi protettori (trt) sono stati rimossi dissolvendo il materiale nella minima quantità di TFA per 15 min. a RT; le mix sono state portate a volume con dd H₂O e centrifugate per 10 min. a 10625 g, 4°C per rimuovere i gruppi tritile insolubili;

i surnatanti sono stati usati per la funzionalizzazione, depositandoli su superfici precedentemente pulite per 10 min in una soluzione perossidica basica (5:1:1 dd H₂O : 30% H₂O₂ : soluzione al 30% di NH₃); maschere Proplate[®] sono state montate sulle superfici per creare i pozzetti in cui sono state condotte le incubazioni per 24h a 35°C; le soluzioni e le maschere sono poi state rimosse, e le superfici sciacquate ripetutamente con dd H₂O, asciugate sotto flusso di azoto e sottovuoto per 1h e poi analizzate; dopo rimontaggio delle maschere, per i test di ottimizzazione le superfici sono state incubate per 1h a 35°C più 1h a 50°C in soluzioni 1 µM in tampon e SSC (15 mM citrato di sodio, 150 mM cloruro di sodio, pH=7) di oligo DNA complementare al sonda (sequenza di 15 nt), o in soluzioni 1 µM di oligo DNA non complementare (sequenza da 22 nt); le stesse condizioni sono state adottate anche per incubazione di soluzioni di BSA 1 mg/ml in PBS; dopo le incubazioni le soluzioni e le maschere sono state rimosse, le superfici lavate ed asciugate sotto flusso di N₂ e poi analizzate.

Il rapporto segnale/rumore (S/N ratio) è stato calcolato rapportando gli *shifts* complessivi dati dall'oligo complementare e dall'oligo non complementare al termine delle 2h di incubazione; il segnale dato dell'incubazione con BSA è stato considerato come modello per determinare l'influenza sulle misurazioni di un eventuale tampone di diluizione contenente elementi proteici come stabilizzanti.

Gli esperimenti rilevazione di DNA hanno riguardato la rilevazione di: **1)** oligo DNA complementare in concentrazioni da 10 nM a 3.2 µM; **2)** sequenze PCR-amplificate contenenti la sequenza bersaglio di genoma di *Mycobacterium Tuberculosis* (c.a. 224 bp) in concentrazioni da 10 nM a 16 µM, con e senza DNA genomico umano frammentato come interferente (100 ng/campione).

Le superfici sono state funzionalizzate mediante la medesima procedura sopradescritta ma adottando unicamente la mix di sonda/*backfiller* selezionata nei precedenti esperimenti di ottimizzazione; le incubazioni con DNA sia oligo che PCR-amplificato, con e senza interferente, sono state eseguite per 3h a 50°C in camera umida; tutti gli step di lavaggio, asciugatura ed analisi delle superfici sono stati condotti in modo analogo a quello sopradescritto.

4.6.4. Misure di fluorescenza

Per confrontare il sistema modello allo studio con una tecnica classica di rivelazione di acidi nucleici sono stati effettuati degli esperimenti di rilevazione in fluorescenza; tali esperimenti sono stati effettuati dal gruppo della Dr.ssa Erica Cretaio di Veneto Nanotech immobilizzando su vetrini da microarray una sonda a DNA amino terminale con una sequenza di basi analoga a quella del sonda a PNA (DNA-NH₂), ed incubando le superfici funzionalizzate con campioni fluorescenti analoghi a quelli testati negli esperimenti SPR.

Vetrini commerciali da microarray (e-surf LifeLine 25x75 mm) sono stati funzionalizzati usando un apposito strumento per microarray; la sonda DNA-NH₂ è stata diluita a 20 µM con Printing Buffer 1.5x (Sigma-Aldrich) e spottata sui vetrini poi incubati in camera umida a 35°C overnight, bloccati e lavati con Blocking e Washing Buffers (Sigma-Aldrich) rispettivamente seguendo i protocolli standard indicati dal produttore; sono state poi eseguite incubazioni di: **1)** diluizioni di oligo DNA complementare in *hybridization buffer* (1X SSC, 0.1% SDS, 0.2X BSA) alle seguenti concentrazioni finali: 10 nM, 2 nM, 0.4 nM, 80 pM, 16 pM, 3.2 pM e 0 pM; **2)** diluizioni di PCR-amplificato in *hybridization buffer* alle stesse concentrazioni finali, con e senza DNA genomico umano interferente alla concentrazione di 100 ng/campione; tutti i campioni sono stati denaturati a 95°C per 5 min ed incubati a 50°C per 3 h in apposito incubatore; le superfici sono state lavate in apposito lava-vetrini per 5 minuti in 1x SSC 0.1% SDS a 50°C, 2 minuti in 0.2x SSC, 2 minuti in 0.1x SSC e 30 secondi in dd H₂O, asciugati mediante spin-dryer ed analizzati in apposito lettore di vetrini sottraendo alle letture il valore del bianco.

4.7. SAGGIO OMOGENEO CON NANOPARTICELLE ANANAS[®]

4.7.1. Verifica dell'attività enzimatica

L'attività dell'Alcalin Fosfatasi (AP) modificata è stata testata confrontandola con la proteina nativa: sono stati preparati 100 µl di soluzione di proteina nativa (AP) e modificata (b-AP) 0.5 µg/ml in tampone AP ph=7.6 BSA 0.1%; l'attività è stata testata su piastra ELISA eseguendo per ogni pozzetto delle mix con: 10 µl sol. AP o b-AP 0.5 µg/ml + 10 µl sol. NPP 0.4 M in tampone AP ph=9.6 BSA 0.1% +280 µl tampone AP ph=9.6

BSA 0.1%. La formazione dell'addotto colorato è stata misurata all'UV-Vis. ($\lambda=405$ nm) in lettore di piastre ogni 10 sec. per un totale di 5 min. (30 letture tot.).

4.7.2. Verifica del grado di biotinizazione mediante saggio ELISA

Il grado di biotinizazione dell'Alcalin Fosfatasi (AP) è stato verificato mediante saggio ELISA: l'enzima modificato (b-AP) è stato immobilizzato direttamente su piastra parallelamente ad una proteina a titolo noto di biotina (una IgG biotin-PEGhilata presente nel laboratorio di riferimento); dopo il blocco della piastra le proteine vengono incubate con dell'Avi-HRP e si sviluppa; il grado di biotinizazione è stato stimato rapportando l'intensità del segnale generato dalla proteina in esame rispetto a quello dato dalla proteina a grado di biotinizazione noto.

Di seguito viene riportata nel dettaglio la procedura di saggio dettagliata:

- Condizionamento piastra con b-AP e b-IgG in carbonato 0.1 M pH=9.6 (2 ng/ml, 6 diluizioni 1:3) overnight; lavaggio manuale piastra con PBST (x3 v.) + PBS (x1 v.)
- Blocco piastra con BSA 3% in PBS per 45 min., a 25°C, 250 rpm; lavaggio con PBST in lavapiastre (x3 v.) + PBS (x1 v.)
- Incubazione con Avi-HRP 2 μ g/ml in tampone DB – BSA 0.1% per 45 min. a 25°C, 250 rpm; lavaggio con PBST in lavapiastre (x3 v.) + PBS (x1 v.)
- Sviluppo con SureBlue per 5 min, 25°C, 250 rpm
- Blocco sviluppo con H₂SO₄ 0.5 N
- Lettura in lettore di piastre: $\lambda=450$ nm; 5 sec. shake, measurement mode: normal.

Il grado di modifica è stato calcolato in due modi: dal rapporto tra le intensità dei segnali e dalle quantità di proteina necessarie per la generazione di una stessa quantità di segnale.

4.7.3. Verifica di inibizione enzimatica di AP con coniugato Ab-inibitore

Sono state approntate delle pre-mix in cui le nanoparticelle appena preparate, ad una concentrazione di 4 μ g/ml, sono state caricate con 10, 20, 50 equivalenti (mol/mol) di biotina-PEG₅₀₀₀-AP (composto (VIII)) e lasciando le miscele a T ambiente per 1 h in blanda agitazione (Vf=100 μ l); le pre-mix sono state poi addizionate di una quantità di IgG-PEG₄₀₀₀-APF (composto (VII)) tale da avere un rapporto equimolare tra IgG e HABA e sono state lasciate a T ambiente per 1h.

Volumi di miscela corrispondenti a 15 ng di AP sono stati posti nei pozzetti di piastre ELISA assieme al substrato NPP (10 μ l sol. 0.4 M) e portando il volume a 300 μ l con tampone AP pH 9.6 (50 mM glicina; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM ZnCl₂; pH 9.6); è stata letta l'Abs. a 405 nm ad intervalli di 15 sec. per 25 min. Ogni punto è stato eseguito in triplicato; come soluzioni di controllo sono stati usati equivolumi di tampone di diluizione (tampone AP pH 7.6), e di pre-mix in assenza di inibitore.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1. SINTESI DEI PEG-DERIVATI

5.1.1. Derivati per la funzionalizzazione di superfici SPR

Per la funzionalizzazione di superfici SPR sono stati sintetizzati diversi derivati del PEG, sia a MW 2 che 5 kDa; per l'aggancio alla superficie d'oro si è scelto di utilizzare la nota chimica tiolo-oro, da cui l'impiego dei residui di cisteina, variamente protetta per esigenze sintetiche e per proteggere il tiolo dall'ossidazione.

I protocolli di sintesi sono stati indirizzati ad avere una totale funzionalizzazione della cisteina; non ci si è curati quindi di rimuovere l'eventuale eccesso di PEG dai prodotti, in quanto essi vengono rimossi durante gli steps di lavaggio e non inficiano le attività successive alla funzionalizzazione delle superfici.

Al fine di un utilizzo razionale dei prodotti è comunque stato necessario determinare esattamente il titolo dei residui di interesse in essi contenuti; la Tabella 3 riassume i dati di caratterizzazione ottenuti per ciascun prodotto, espressi come molarità percentuale relativa al PEG; gli spettri relativi alle caratterizzazioni dei prodotti sono riportati nell'Appendice B.

Tabella 3: Dati di caratterizzazione dei PEG-derivati per funzionalizzazione di superfici SPR; i dati sono espressi come molarità % relativa al PEG.

Tipo di PEG-derivato:	-SH vs PEG:	biotina vs PEG:
(I) (trt)Cys-mPEG ₂₀₀₀	57%	---
(II) (trt)Cys-mPEG ₅₀₀₀	60%	---
(III) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₂₀₀₀ -biotina	25%	95%
(IV) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₅₀₀₀ -biotina	80%	50%
(V) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₂₀₀₀ -COOH	95 - 100%	---
(VI) Fmoc-(trt)Cys-PEG ₅₀₀₀ -COOH	95 - 100%	---

5.1.2. Derivati per l'utilizzo con nanoparticelle ANANAS

Le sintesi dei PEG-derivati per l'allestimento del saggio omogeneo hanno presentato delle difficoltà nella caratterizzazione degli intermedi di reazione/prodotti che non è stato interamente possibile risolvere, ma per motivi di tempistiche le sintesi sono comunque state portate a termine, riproponendosi di verificare la bontà dei reagenti in fase di esecuzione del saggio omogeneo stesso, e di colmare successivamente le deficienze riscontrate nei lavori eseguiti in questa sede. Qui di seguito vengono esposti nei dettagli i dati di caratterizzazione ottenuti per i prodotti e le problematiche riscontrate:

- Per il Composto (VII) L'analisi cromatografica del prodotto ha evidenziato la separazione del PEG-derivato dallo HABA-(CH₂)₆-NH₂ non reagito (è stata anche eseguita una cromatografia di controllo con il derivato ammino-terminale non modificato), ma una determinazione del titolo in HABA usando la ϵ tabulata¹¹⁴ è risultata impossibile in quanto il valore calcolato risulta non compatibile con le letture cromatografiche; ipotizzando una variazione di ϵ dovuta alla modifica della molecola (inserimento della catena laterale) si è tentato di realizzare un'apposita retta di taratura a $\lambda = 355$ e 500 nm utilizzando lo HABA-(CH₂)₆-NH₂ nativo, ma l'utilizzo dei coefficienti ottenuti ha dato risultati parimenti non affidabili; è stato verificato infatti un cambiamento nel profilo di assorbimento UV-Vis. del PEG-derivato rispetto al composto di partenza, con una conseguente variazione nei coefficienti di assorbimento. Per sopperire a tale carenza si è ipotizzato in futuro di calcolare la ϵ del prodotto allestendo una retta di taratura dopo ottenimento del composto in forma solida (nel presente lavoro è infatti stato ottenuto in soluzione tamponata)
- Per il Composto (VIII) una quantificazione dell'intermedio (5) viene tentata mediante determinazione dei tioli mediante saggio con reattivo di Elmann¹¹⁸; il tentativo è stato però frustrato a causa dell'evidente formazione nel tempo di ponti disolfuro tra i tioli liberi formati nella reazione; parimenti un test al TNBS, atto anch'esso a verificare l'efficienza della reazione, effettuato in precedenza su miscele in eccesso di APF (e quindi di ammine) non ha dato risultati per variazioni spettroscopiche dell'addotto dovute sembra all'APF stesso; si è pertanto scelto di ipotizzare la reazione come quantitativa e di proseguire comunque nella sintesi, riproponendosi in futuro di effettuare un tentativo di determinazione tramite spettroscopia di massa.
Nel prodotto finale è stato calcolato un rapporto molare di 2.54 catene di PEG/IgG.
- Il Composto (IX) risulta avere un'attività del 148.7% rispetto alla proteina nativa; il grado di biotinilazione finale è risultato pari a 3.1 biotine/AP (rapporto mol/mol).

5.2. SINTESI DI SONDA PER RILEVAZIONE SPR DI DNA: FMOC-CYS(TRT)-PEG_{2 E 5} K_{DA}-PNA - (X); (XI)

La sintesi della sonda PNA-PEG è stata condotta in modo da avere una totale modifica del PNA; a tale scopo la condensazione è stata operata in eccesso di PEG-derivato; essendo però questo portatore del residuo necessario al legame sull'oro, la permanenza dell'eccesso nel prodotto avrebbe complicato le successive attività di funzionalizzazione ed è quindi stata rimossa mediante opportuna procedura di purificazione.

La condensazione è stata condotta sia in fase solida che in soluzione, con gli esiti discussi qui di seguito (è trattata la sintesi del composto (XI), per il composto (X) i risultati sono stati del tutto analoghi).

5.2.1. Condensazione in fase solida

Tale attività è stata eseguita dal gruppo della Prof.ssa Dettin, del Dipartimento di Ingegneria Industriale, impiegando il PNA da loro sintetizzato ed il composto (VII).

La modifica di sequenze in fase solida è un metodo conveniente, usato nella sintesi di peptidi, acidi nucleici o PNA in quanto permette una semplice ed efficiente separazione dall'eccesso di reagenti tipicamente impiegato; tale metodo però risente di limiti sterici quando ci si trovi a legare gruppi relativamente ingombranti, in quanto l'ammina immobilizzata alla resina viene ad essere di difficile accessibilità da parte di un carbossile ingombrato (come per l'appunto è il caso dei PEG-derivati (VI) e (VII)).

Una condensazione di questo tipo è stata comunque tentata per confrontarne l'efficienza rispetto all'approccio in soluzione; le condizioni adottate hanno replicato quelle comunemente usate nella sintesi di peptidi (10 eq. di PEG-derivato rispetto al PNA).

La resa della reazione (calcolata in base all'assorbanza generata dalla rimozione del gruppo protettore Fmoc conseguente a trattamento con piperidina - "Fmoc assay"), si è attestata al 5.22%, confermando quindi di essere una strategia inadatta ai nostri scopi.

5.2.2. Condensazione in soluzione

La condensazione in soluzione è stata condotta aggiungendo al PNA 2 equivalenti di PEG-derivato; sono state testate due diverse coppie di condensanti e basi organiche: HATU con DMAP e PyOxim[®] con TEOA, i reagenti di *coupling* sono stati introdotti in aggiunte successive fino a totale modifica del PNA (Tabella 4).

Tabella 4: Equivalenti dei reagenti di condensazione usati nelle sintesi dei PNA-PEG e percentuali di modifica delle ammine ottenute; il n° di eq. è espresso come rapporto mol/mol rispetto al PNA.

Rapporto mol/mol HATU/DMAP:	% di modifica ammine (PNA):	Rapporto mol/mol PyOxim [®] /TEOA:	% di modifica ammine (PNA):
1	0	10:2	0
10	44	10:10	33
30	90	10:20	52.1
36	100	20:20	72.3
		40:30	100

I prodotti di reazione sono stati precipitati in Et₂O, cosa che ha provocato la precipitazione anche di altri elementi presenti nella miscela di reazione, dando un prodotto impuro; tra i vari contaminanti l'eccesso di PEG-derivato è il più importante da rimuovere in quanto portatore della funzionalità tiolica necessaria all'aggancio sull'oro e quindi capace di competere con il PNA-PEG per esso.

A tal fine è stata adottata la procedura di estrazione differenziale in solventi diversi descritta al par. 1.7.3.; per il suo sviluppo ci si è basati sulla solubilità conosciuta del PNA e del PEG in diversi solventi organici: quest'ultimo è solubile in EtOAc, ma solo a caldo, ed estremamente solubile in ambiente acquoso; il PNA invece è insolubile in entrambi. Al termine della procedura si sono ottenuti tre diversi precipitati denominati Residuo A, B, e C; tutti sono stati ripresi con dd H₂O ed analizzati all'UV-Vis. e tramite cromatografia di gel filtrazione via FPLC, assieme ad una porzione di miscela di reazione pre-precipitazione in etere (Figura 18).

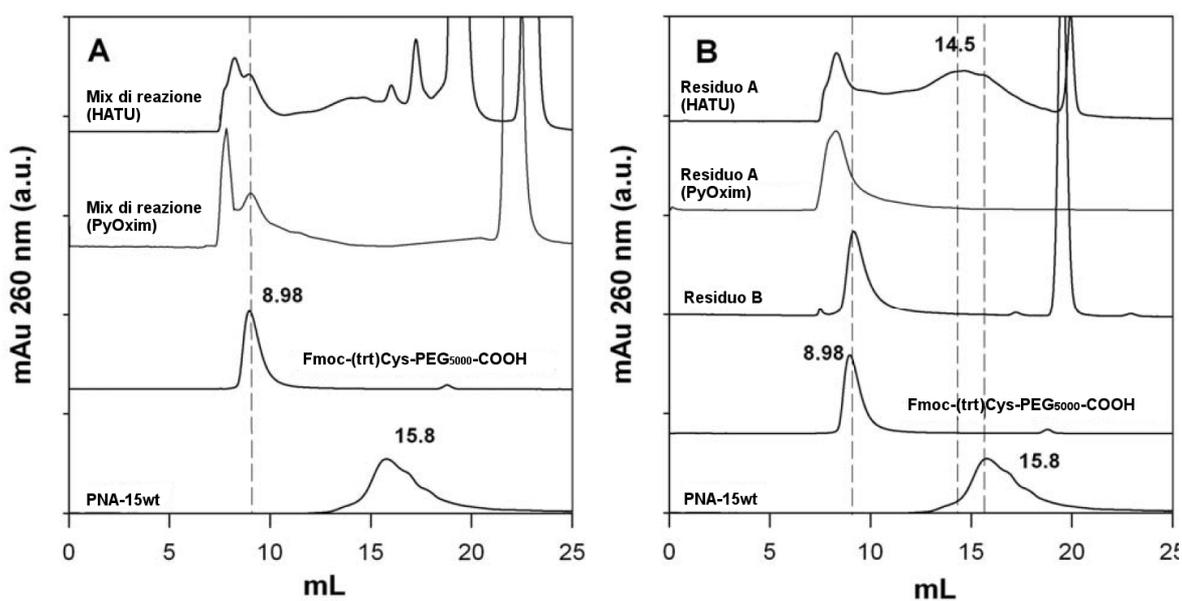


Figura 18: Cromatografie FPLC delle miscele di reazione (A) e dei Residui A e B (B) ottenuti dalle reazioni con HATU/DMAP e PyOxim®/TEOA; i profili di eluizione del PEG-derivato e del PNA di partenza sono anch'essi riportati come riferimento.

Il PEG-derivato di partenza ed i composti a basso MW sono eluiti a 8.98 e 15.8 ml rispettivamente; dato interessante è che il PNA nativo è eluito a volumi normalmente propri dei composti a basso MW, indicando la presenza di un'interazione con la matrice del gel, fenomeno non nuovo per le matrici a base polisaccaridica¹²⁸⁻¹²⁹; riteniamo che ciò sia dovuto ad una interazione con la componente di destrano della resina (Superdex Peptide), dato che con una matrice di puro agarosio (Superose) il fenomeno non è stato riscontrato (dati non mostrati). L'analisi dei residui, confrontata con le miscele di reazione, ha mostrato l'efficace rimozione dei composti a basso MW ad opera dell'estrazione differenziale, come anche dell'eccesso di PEG-derivato, rimosso ad opera dei lavaggi con EtOAc, esso è stato infatti individuato nel solo Residuo B, mentre il Residuo A ha mostrato di contenere il coniugato PNA-PEG. In particolare nella reazione con PyOxim/TEOA, il coniugato è apparso essere come l'unico prodotto di condensazione presente (8.28 ml); tale dato è stato anche confermato da analisi HPLC a fase inversa e spettroscopia di massa MALDI effettuate dal gruppo della Prof.ssa Dettin (Figura 19).

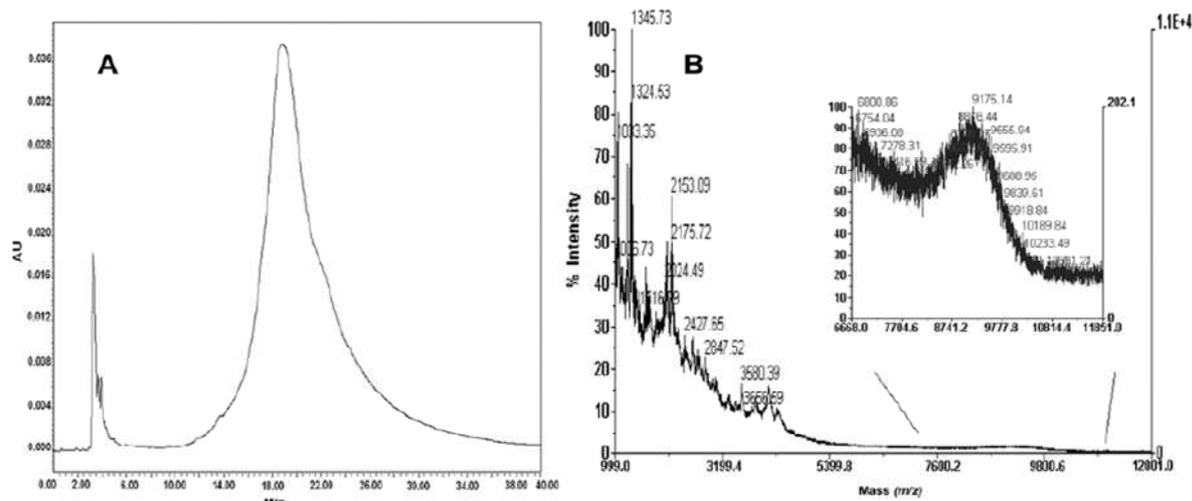


Figura 19: Analisi HPLC a fase inversa (RP-HPLC) (A) e MALDI (B) del Residuo A ottenuto dalla reazione con PyOxim[®]/TEOA (massa sperimentale: 9175 Da; massa teorica: 9430 Da); l'analisi RP-HPLC è stata effettuata con un Waters 600E System Controller con rivelatore UV-Vis. mod. 2487.

Per quanto riguarda l'analisi MALDI riteniamo che la bassa intensità del picco non sia stata dovuta alla purezza del prodotto, bensì alla bassa propensione di questo ad ionizzarsi e volare; inoltre va detto che la ionizzazione di un prodotto di questo tipo richiede di usare il laser a potenze superiori a quelle normalmente impiegate, cosa che induce fenomeni di clusterizzazione della matrice che creano picchi artefatti nella regione a basso m/z (precisamente il caso della nostra analisi).

L'analisi FPLC del coniugato ottenuto con HATU/DMAP ha evidenziato un largo picco centrato a circa 14.5 ml (Figura 18B); data l'assenza di ammine libere nel prodotto si è ipotizzata la formazione di un prodotto secondario, tale fenomeno è già stato descritto in letteratura per reazioni impieganti HATU in largo eccesso e cineticamente sfavorite: in tali condizioni lo HATU reagisce con la molecola recante il carbossile formando un derivato guanidilato¹²⁴.

Per tentare di purificare ulteriormente tale prodotto di reazione si è pensato di sfruttare l'affinità del sottoprodotto per la matrice di destrano evidenziatasi nelle cromatografie FPLC; è stata usata una colonna di gel filtrazione con matrice interamente di destrano (NAP5), eluendo inizialmente con dd H₂O per massimizzare le forze di interazione col gel, per poi passare al tampone PBS 2x. Sono state in tal modo isolate due specie, analizzate all'FPLC e al MALDI, confermando il successo dell'operazione: il PNA-PEG è risultato infatti presente solo nella specie recuperata con l'eluizione in acqua (Figura 20).

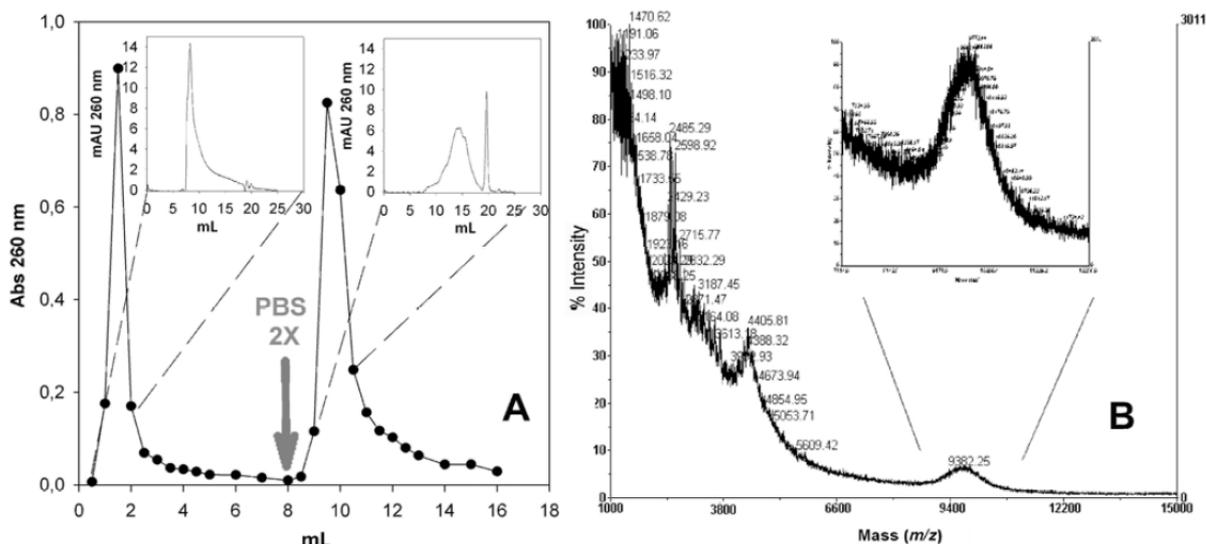


Figura 20: Eluizione in NAP5 del Residuo A derivante dalla condensazione con HATU/DMAP (A) e analisi MALDI della frazione recuperata con eluizione in dd H₂O (B); negli inserti sono riportati i cromatogrammi FPLC delle due frazioni isolate e l'ingrandimento del picco evidenziante la presenza del PNA-PEG nel MALDI.

Come già detto la sintesi del derivato a MW 2kDa è stata eseguita nel medesimo modo; gli spettri di caratterizzazione (cromatografia FPLC ed analisi di massa MALDI) di tale prodotto sono riportati nell'Appendice B.

5.3. REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA MODELLO PER RILEVAZIONE DI BIOMOLECOLE MEDIANTE GC-SPR

5.3.1. Studi di funzionalizzazione di superfici plasmoniche

Nonostante in letteratura sia riportata una vastità di studi riguardanti la deposizione di monolayers polimerici di varia natura, poco è disponibile riguardo ai PEG ad alto MW, e le informazioni disponibili sono caratterizzate da una variabilità di condizioni e tempistiche che ha reso difficoltoso individuare le condizioni operative di funzionalizzazione.

E' stato quindi necessario eseguire dei test di deposizione per capire le tempistiche di tale processo, usando il composto (II) come molecola modello. E' stato scelto di incubare le superfici in una soluzione 1 mM di PEG-derivato, in quanto tale condizione viene spesso riscontrata in letteratura; sono state eseguite funzionalizzazioni di superfici, sia piatte che *gratings*, per tempistiche variabili da 1 a 48 h osservando al FT-IRRAS l'incremento del picco a 1110 cm⁻¹ (ν C-O-C del PEG). Le analisi hanno evidenziato l'incremento del picco fino a 24h nel caso delle superfici piatte, 48h nel caso dei *gratings* (Figura 21), evidenziando quindi che la nanostrutturazione della superficie ha un impatto sul processo di deposizione, cosa di cui si dovrà tener debito conto nelle attività a seguire.

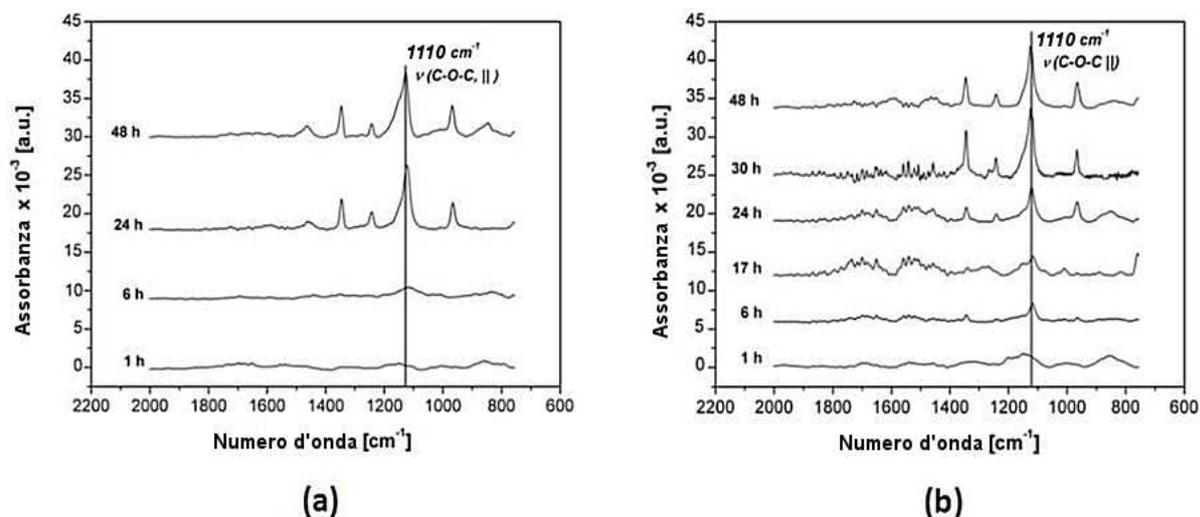


Figura 21: Spettri FT-IRRAS di superfici piatte (a) e gratings (b) funzionalizzati per tempi diversi.

In seguito sono state eseguite funzionalizzazioni variando la concentrazione del PEG-derivato (500 nM; 20 μ M; 400 μ M; 1 mM; 2 mM e 2,5 mM) ottenendo superfici a diverso grado di copertura, che sono state invece analizzate dalla Dott.ssa Agnese Sonato del LaNN tramite SPR e microscopia di forza atomica. I dati morfologici e gli *shifts* ottenuti dalle due tecniche sono stati combinati dalla Dott.ssa Sonato e dai suoi collaboratori usando la teoria di Jung per il ricoprimento non omogeneo di superfici¹³⁰; questo ha permesso di correlare gli *shifts* SPR alla densità superficiale di polimero, ottenendo quindi una curva di calibrazione capace di esprimere la quantità di PEG-derivato depositato in funzione dello shift rilevato (Figura 22).

Questa parte di lavoro non viene ulteriormente descritta nei dettagli in quanto è stata svolta interamente dalla Dott.ssa Sonato e dai suoi collaboratori del LaNN; i dettagli sono comunque disponibili in letteratura¹²⁵).

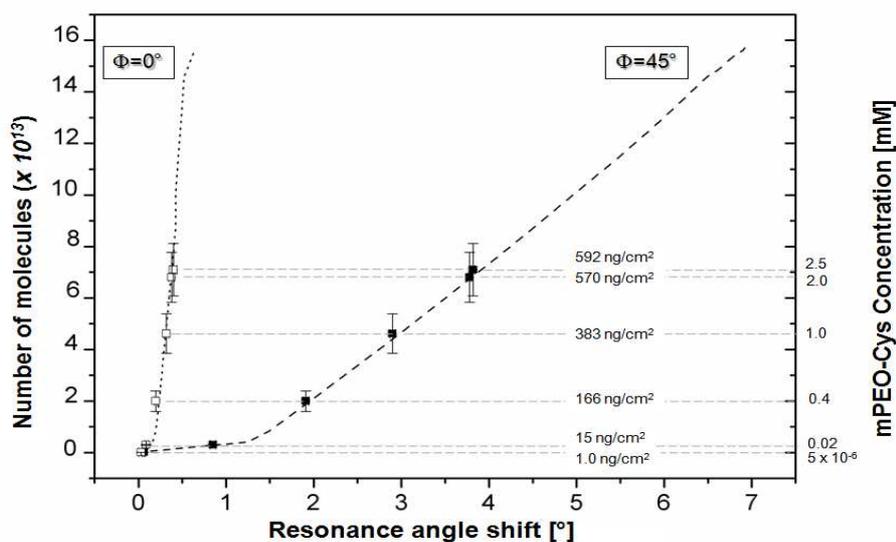


Figura 22: Curva di calibrazione che esprime la densità superficiale di PEG-derivato (II) in funzione dello shift rilevato all'SPR e della concentrazione dello stesso nella soluzione di funzionalizzazione; sono mostrate le curve ottenute con set-up ad azimuth nullo (\square) e ruotato di 45° (\blacksquare) (Tratto da Sonato, A. et al.¹²⁵).

5.3.2. Studi di *antifouling* e rilevazione di avidina

Scopo delle attività qui riportate è stato di studiare la capacità dei PEG-derivati **(I)** e **(II)** di proteggere le superfici d'oro da interazioni aspecifiche che si potrebbero venire a formare tra il metallo e materiali biologici di varia natura eventualmente presenti nelle soluzioni da analizzare. Una fase preliminare ha visto l'impiego della spettroscopia infrarossa FT-IRRAS: i due derivati a diverso MW sono stati usati per funzionalizzare le superfici e ne è stata saggiata la capacità di protezione a seguito di incubazioni con soluzioni di proteine a diverso MW a tempi diversi.

Le analisi, sebbene non abbiano fornito dei dati puliti, sembrano indicare un'efficienza di antifouling lievemente maggiore nel caso di impiego del polimero a MW 2kDa; questo è visibile particolarmente nel caso della BSA, per cui gli spettri sono risultati più puliti (Appendice C).

Dopo le analisi preliminari all'infrarosso sono stati effettuati gli esperimenti di riflettometria SPR. I *gratings* sono stati funzionalizzati con il PEG-derivato **(I)** ottenendo diversi gradi di ricoprimento (con densità superficiale di PEG massimale e sub-massimale); le superfici così ottenute sono quindi state incubate in due soluzioni di diversa complessità: una soluzione 1 mg/ml di BSA in PBS (PBS-B), mezzo di diluizione comunemente usato nella manipolazione di campioni biologici, ed una soluzione di siero di capra diluito 1:100 con PBS (PBS-GS), mezzo più complesso atto a simulare un campione biologico reale. L'insieme di tali esperimenti ha fornito un quadro della capacità *antifouling* del PEG-derivato a diverse densità superficiali, in funzione del mezzo con cui le superfici vengono poste a contatto.

L'analisi dei *gratings* con quattro diverse densità superficiali di PEG-derivato ha evidenziato un comportamento fortemente dipendente dal mezzo di incubazione (Figura 23): nel caso di basse densità superficiali di PEG infatti si è osservato che la resistenza al PBS-GS è stata nettamente inferiore a quella riscontrata col PBS-B, fenomeno in linea con quanto atteso essendo il PBS-GS un mezzo più

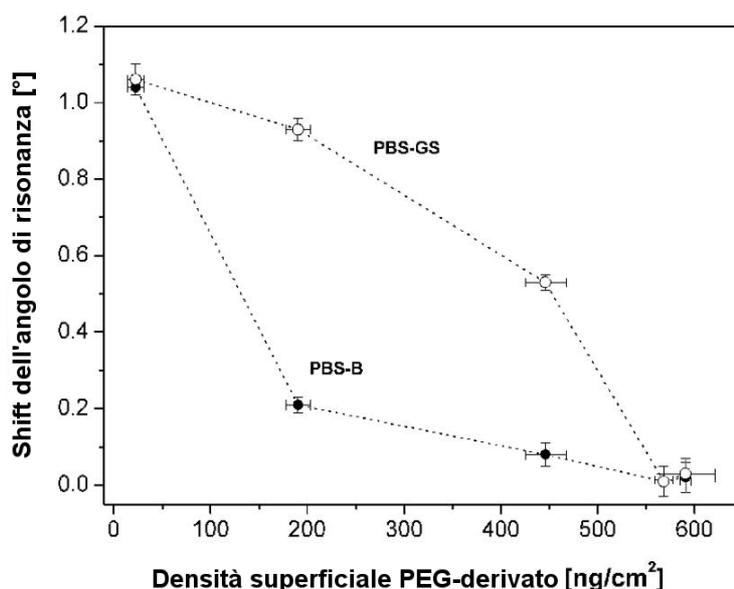


Figura 23: Test con 1 mg/ml BSA in PBS (PBS-B) e siero di capra diluito 1:100 con PBS (PBS-GS); shifts SPR in funzione alla densità di ricoprimento della superficie da parte del PEG-derivato (2)

complesso del PBS-B, con elementi a svariato MW e quindi con diversa capacità di penetrare attraverso le catene di polimero; a gradi di copertura crescenti comunque si è osservato un progressivo aumento dell'efficienza di protezione in entrambi i mezzi, che per densità superficiali prossime al valore massimo ($568.11 \pm 28.21 \text{ ng/cm}^2$) hanno restituito *shifts* consistenti con l'errore sperimentale, indice di un'efficace protezione in tali condizioni.

Si è poi voluto verificare la capacità delle superfici nanostrutturate di funzionare come biosensori: come sistema modello si è scelto di effettuare la rilevazione di una proteina, usando il ben noto sistema avidina-biotina¹³¹, sfruttando cioè la capacità della proteina avidina di legare residui di biotina legati a molecole di interesse; per questi esperimenti è stato quindi utilizzato il PEG-derivato biotinilato (**IV**).

I *gratings* sono quindi stati funzionalizzati ottenendo quattro diversi gradi di copertura polimerica, dello stesso ordine di quelli esaminati nei precedenti esperimenti; tali superfici sono poi state incubate in una soluzione 4 $\mu\text{g/ml}$ di avidina nei medesimi mezzi PBS-B e PBS-GS visti in precedenza: nello specifico le due superfici a minor grado di ricoprimento sono state incubate in 4 $\mu\text{g/ml}$ avidina PBS-B, le altre due in 4 $\mu\text{g/ml}$ avidina PBS-GS. Tale scelta è stata fatta in ragione dei comportamenti emersi nei test di *antifouling*, si è voluto infatti tener conto della diversa efficienza di protezione dei diversi gradi di copertura nei due differenti mezzi; è da puntualizzare comunque che tutte le densità superficiali di polimero biotinilato esaminate erano in grado di portare alla formazione di un monolayer di avidina a seguito del bioriconoscimento (distanza media tra le catene < diametro proteico).

I dati ottenuti dall'analisi dei *gratings* sono stati combinati con quelli provenienti dai test di *antifouling*; in tal modo è stato possibile calcolare per ogni condizione di ricoprimento il contributo netto di *shift* dato dal polimero, dall'avidina e dall'aspecifico (Figura 24); è stato così evidenziato che il contributo netto dell'avidina ($\Delta\theta_{\text{res}}$) è di $0,94 \pm 0,09^\circ$ e che esso è

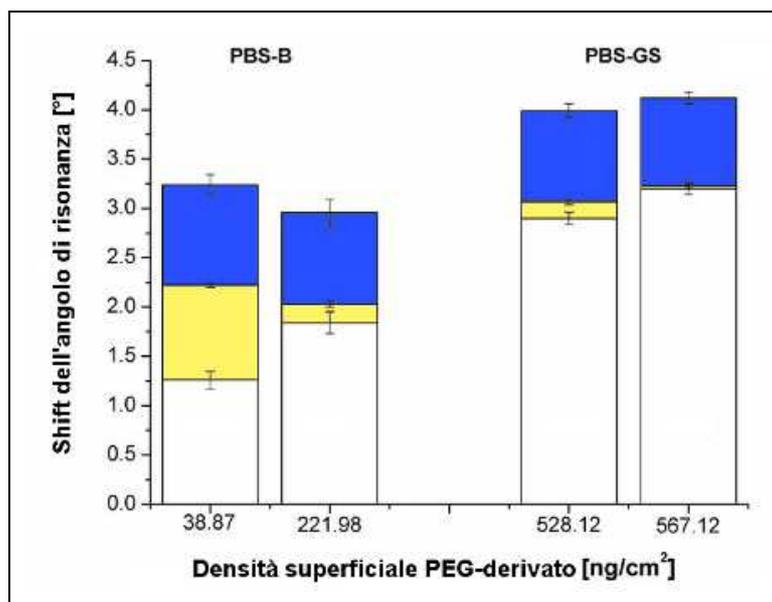


Figura 24: Sensing di avidina 4 $\mu\text{g/ml}$ in PBS-B/PBS-GS su superfici a 4 diversi gradi di ricoprimento con il composto (5): sono evidenziati i contributi di *shift* dati dalla funzionalizzazione (bianco), dall'aspecifico (giallo), e dall'avidina (blu).

indipendente dal grado di copertura della superficie. E' stata anche calcolata la sensibilità del sistema all'avidina, stabilita in $2.1 \times 10^{-3} \pm 0.0002$ %ng di proteina; l'esperimento ha inoltre confermato l'importanza di avere una superficie con un'elevata densità superficiale di polimero (> 500 ng/cm²), in modo da massimizzare il rapporto segnale/rumore.

5.3.3. Rilevazione di DNA

Per gli esperimenti di rilevazione di DNA ci si è avvalsi della sonda PNA-PEG; è stato tuttavia utilizzato il solo composto (XI) con PEG a MW 5 kDa, primariamente a causa di problemi di solubilità in ambiente acquoso da parte del derivato contenente PEG a minor MW; tale fenomeno ha infatti impedito l'ottenimento di soluzioni di funzionalizzazione con una concentrazione di sonda funzionale alle attività, e non è pertanto stato usato negli studi di seguito descritti.

5.3.3.1. Ottimizzazione dello strato polimerico superficiale

I primi esperimenti di rilevazione di DNA sono stati condotti funzionalizzando i gratings con un layer costituito interamente da PNA-PEG, ma questo set-up ha restituito valori di shift molto inferiori a quelli attesi; ciò si è dimostrato in accordo con dati di letteratura secondo cui l'utilizzo di un layer costituito interamente da sonda è controproducente, per l'insorgere di interazioni secondarie tra le catene di PNA quando esse sono presenti ad un'elevata densità superficiale; ciò porta ad una minor efficienza di ibridizzazione⁷⁰⁻⁷¹ e quindi ad un peggioramento delle prestazioni del sistema; inoltre l'elevato costo del PNA, renderebbe economicamente svantaggioso l'impiego di una copertura formata interamente da questo materiale (è da ricordare che l'economicità di realizzazione è uno degli obiettivi del progetto PLATFORMS, a cui i presenti lavori fanno riferimento).

Per diminuire la densità superficiale del sonda, è stato quindi adottato l'impiego di un secondo PEG-derivato, detto *backfiller* avente funzione sia di elemento spaziatore tra le catene sulla superficie, sia di elemento conferente proprietà *antifouling*.

E' stato scelto di impiegare una strategia di co-deposizione di sonda e *backfiller* in luogo della deposizione sequenziale in modo da evitare di dilungare oltremodo la procedura di funzionalizzazione e di introdurre variabilità intrinseche agli approcci multi-step.

Per individuare le migliori condizioni di funzionalizzazione superficiale per la rilevazione di DNA sono state testate 7 diverse miscele di sonda/*backfiller* ottenendo dei rapporti superficiali di 1/0; 0.43/0.57; 0.2/0.8; 0.1/0.9; 0.05/0.95; 0.02/0.98; 0/1. Come sonda è stata usata la sonda a PNA sia con che senza lo spaziatore di PEG₅₀₀₀ (denominati rispettivamente PNA-PEG e HS-PNA – la sintesi del PNA-PEG è stata descritta nell'apposito paragrafo, il HS-PNA è stato sintetizzato in fase solida dal gruppo della Prof.ssa Dettin⁹³); come *backfiller* è stato scelto il composto (I) in considerazione dei dati emersi negli esperimenti di *antifouling*, corroborati da dati di letteratura che evidenziano

come un *backfiller* più corto dello spaziatore utilizzato nella sonda (PEG₅₀₀₀ per il PEG-PNA, PEG₂₀₀₀ per il *backfiller*) sembra essere la configurazione migliore, in termini di rilevazione e capacità *antifouling*⁸⁴⁻⁸⁵.

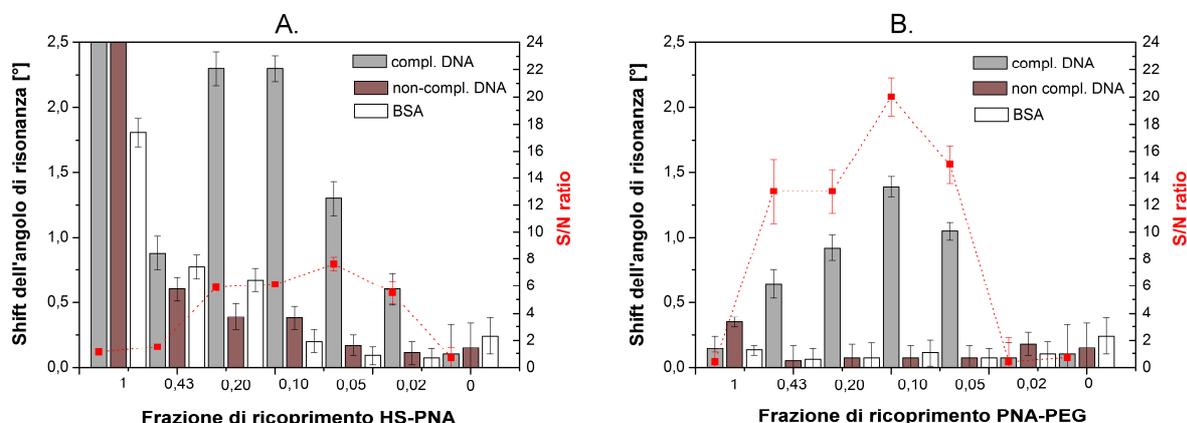


Figura 25: Grafici a barre riassuntivi degli shift dopo incubazioni in soluzioni di DNA complementare, DNA non complementare, BSA, di superfici funzionalizzate con miscele impieganti sonda a HS-PNA (A) o PNA-PEG (B); in sovrapposizione il S/N ratio calcolato per ciascun rapporto sonda/*backfiller* (linea rossa).

I risultati riassunti nella Figura 25 evidenziano come la sonda HS-PNA abbia restituito degli shift più alti, (Figura 25-A) rispetto alla sonda a PNA-PEG (Figura 25-B), verosimilmente in ragione della maggiore vicinanza della regione di appaiamento al *grating*, quindi in una regione a maggior interazione col campo plasmonico; risulta però maggiore anche il segnale di aspecifico dato sia dall'oligo DNA non complementare che dalla BSA, dovuto alla mancanza dello spacer di PEG, che ha diminuito progressivamente la capacità *antifouling* della superficie all'aumentare della densità superficiale di sonda (il massimo rumore si rileva quando la superficie è interamente ricoperta di HS-PNA, quindi priva del *backfiller* protettivo).

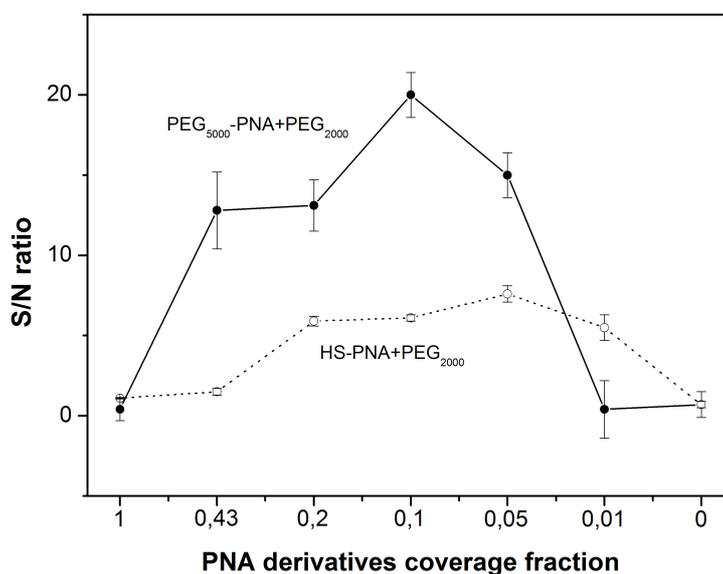


Figura 26: Confronto degli S/N ratios derivanti dall'impiego della sonda a PNA-PEG (linea continua) ed a HS-PNA (linea tratteggiata).

Il calcolo del S/N ratio in effetti ha evidenziato come la sonda PNA-PEG, nonostante valori di shift generalmente più bassi, abbia fornito letture ben più affidabili (max S/N ratio: 19.05) rispetto alla sonda HS-PNA (max S/N ratio: 7.65); il confronto degli S/N ratios ha

inoltre indicato come il rapporto sonda/*backfiller* 1/10 sia quello che assicura le prestazioni migliori (Figura 26); tale configurazione è stata quindi selezionata per il proseguo dei lavori.

5.3.3.2. Rilevazione di oligo DNA a diversa concentrazione

La configurazione selezionata negli studi di ottimizzazione è stata impiegata per testare la capacità del sistema di rilevare oligo DNA complementare a concentrazioni decrescenti (Tabella 5).

Tabella 5: Shifts dell'angolo di risonanza da rilevazione di oligo DNA complementari a concentrazione variabile

Conc. oligo DNA (nM):	Shift medio dell'angolo di risonanza (°):
10	$0,68 \pm 0,10$
2	$0,74 \pm 0,15$
0.4	$0,4 \pm 0,03$
0.08	$0,22 \pm 0,03$
0.016	$0,21 \pm 0,01$
0.0032	$0,11 \pm 0,02$

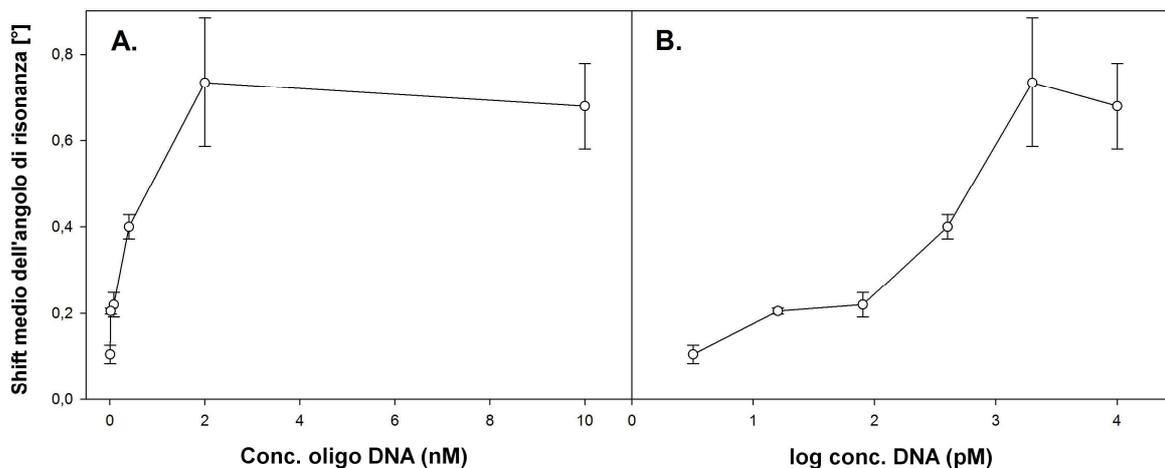


Figura 27: Shifts di risonanza ottenuti al variare della concentrazione di oligo DNA da 10 nM a 3.2 pM; l'andamento è mostrato in funzione della conc. nM (A) o del log della conc. pM (B).

L'analisi a seguito di incubazione ha evidenziato come il set-up allo studio sia riuscito a rilevare concentrazioni di oligo DNA da 3.2 pM a 2 nM, concentrazione oltre la quale il sistema arriva a saturazione con shifts oscillanti attorno al valore medio di 0.71° (Tabella 5 e Figura 27). Tale fenomeno è verosimilmente attribuibile alla totale occupazione della sonda, infatti per concentrazioni di DNA di ordine nanomolare il numero di molecole in soluzione inizia a superare, in termini di ordini di grandezza, il numero stimato di sonda ancorato alla superficie (10^{15} e 10^{13} rispettivamente); a concentrazioni inferiori invece le letture hanno mostrato una buona riproducibilità, con deviazioni std. pressoché costanti.

E' da sottolineare come probabilmente la minima concentrazione di DNA qui rilevata (3.2 pM) non sia la LOD del sistema: il valore di lettura ottenuto è infatti ancora un ordine di grandezza superiore all'errore strumentale (dell'ordine del centesimo di grado) e pari a 5.5 volte la deviazione std. delle letture (è stato considerato come valida una lettura con valore medio almeno doppio rispetto alla deviazione std.), è quindi ragionevole ritenere anche concentrazioni inferiori di oligo DNA bersaglio avrebbero potuto essere efficacemente rilevate.

5.3.3.2.1. Confronto con rilevazione in fluorescenza

I risultati ottenuti in SPR sono stati posti a confronto con una rilevazione in fluorescenza di oligo DNA (sequenza bersaglio) fluorescente, per confrontare i limiti di rilevabilità del set-up allo studio con quelli di una tecnica di uso corrente; le operazioni riguardanti questa parte del lavoro sono state eseguite dallo staff della Dott.ssa Cretaio, di Veneto Nanotech, depositando una sonda a DNA di sequenza analoga al sonda a PNA su vetrini da microarray.

I risultati del test (Tabella 6) hanno evidenziato una rilevazione affidabile dell'oligo DNA fluorescente fino ad una concentrazione 16 pM (è stato considerato come affidabile un valore almeno doppio rispetto allo zero, tenendo conto anche della deviazione standard); più in basso le letture si sono attestate sul valore di fondo dato dal bianco.

Tabella 6: Valori di fluorescenza da rilevazione di oligo DNA complementare a diverse concentrazioni.

Conc. oligo DNA (nM):	Fluorescenza media (AU):
10	31826.13 ± 4144.13
2	24002.38 ± 5472.95
0.4	8715.63 ± 1566.26
0.08	485.75 ± 27.98
0.016	85.63 ± 29.37
0.0032	20.88 ± 10.25
0 (tampone)	24.25 ± 1.71

Dal confronto delle due metodiche di rilevazione è sostanzialmente emersa la validità del set-up SPR allo studio; va precisato che sono stati anche eseguiti dei tentativi di rilevazione in fluorescenza utilizzando *gratings* funzionalizzati con la stessa miscela sonda/*backfiller* usata negli esperimenti SPR ma non è stato possibile raccogliere dei dati soddisfacenti a causa di due ordini di fattori: innanzitutto la disomogeneità superficiale dovuta agli stessi processi di fabbricazione ha reso impossibile avere una messa a fuoco ottimale per la raccolta del segnale di fluorescenza; si è poi evidenziato un forte problema di *quench* di fluorescenza dovuto all'oro (cosa peraltro ipotizzata in fase di pianificazione) che ha di fatto ristretto la comparazione al solo protocollo di uso corrente appena visto.

5.3.3.3. Rilevazione di PCR-amplificato

Il set-up allo studio è stato impiegato per la rilevazione di frammenti di DNA PCR amplificati di *Mycobacterium Tuberculosis* contenenti la sequenza bersaglio; le rilevazioni

sono state effettuate su soluzioni a concentrazione decrescente di amplificato, da solo o in presenza di una quantità predeterminata di DNA genomico umano frammentato, con funzione di elemento interferente, per mimare le condizioni di analisi di un ipotetico campione clinico reale (Tabella 7).

Tabella 7: Valori di shift da rilevazione di DNA di *mycobacterium tuberculosis* PCR-amplificato con e senza DNA genomico umano interferente (dati normalizzati).

Conc. DNA (nM):	Shift medio dell'angolo di risonanza (°) PCR:	Shift medio dell'angolo di risonanza (°) PCR+genomico :
10	1.51 ± 0.04	
2		0.89 ± 0.06
0.4	1.40 ± 0.02	0.80 ± 0.03
0.08		0.57 ± 0.02
0.016	0.83 ± 0.07	0.55 ± 0.09
100 ng DNA genomico	1.14 ± 0.119	

I risultati hanno evidenziato per le soluzioni di solo amplificato un andamento con degli shifts più pronunciati, a parità di concentrazione, rispetto all'esperimento con gli oligo DNA (range 1.51° a 0.83° per i primi; da 0.1° a 0.68° per i secondi - Tabella 7 e 5 rispettivamente); tale comportamento è compatibile con l'ibridizzazione di segmenti di dimensioni maggiori rispetto agli oligo DNA (maggiore cambio di indice di rifrazione locale = maggior shift di angolo di risonanza).

I dati restituiti dai campioni con DNA genomico interferente invece hanno dato dei risultati più singolari: gli shifts delle mix amplificato+DNA interferente sono risultati infatti più contenuti dei valori dati dalle equivalenti concentrazioni di PCR-amplificato senza DNA interferente; essi sono inoltre risultati inferiori agli shifts ottenuti incubando 100 ng di DNA genomico in assenza di PCR amplificato, per i quali si è ottenuto un valore di 1.14°, evidenziando un alto grado di adsorbimento aspecifico.

I test sembrano aver evidenziato la presenza di più equilibri competitivi: da un lato si è visto come sia il PCR-amplificato sia il DNA genomico interferente siano stati in grado di legarsi alla sonda a PNA, anche se con diversa efficienza (l'entità degli shifts indicano una preferenza della sonda per il PCR-amplificato); sembra inoltre che il DNA interferente abbia sequestrato parte del PCR-amplificato, competendo per esso con la sonda e restituendo quindi degli shifts più contenuti.

5.3.3.3.1. Confronto con rilevazione in fluorescenza

In collaborazione con Veneto Nanotech si è effettuata una prova di rilevazione fluorescente analoga a quella di cui al par. 5.4.2.1. anche per la rilevazione di PCR-amplificato fluorescente (*Fraction Of Incorporation* – FOI: 5.7 fluorofori / 1000 basi) a diverse concentrazioni (Tabella 8).

Il test ha evidenziato una capacità di rilevazione nettamente inferiore rispetto agli oligo DNA, infatti il valore di fluorescenza cade nel *range* dell'errore sperimentale già a 0.4 nM (anche qui è stato considerato come affidabile un valore almeno doppio rispetto allo zero, tenendo conto anche della deviazione standard),

inoltre anche in questa sede si è potuto verificare il calo di rilevabilità dovuto alla co-presenza del DNA genomico; i valori sono infatti caduti nel *range* dell'errore già per conc. sotto il 10 nM.

Tabella 8: Valori di fluorescenza da rilevazione di PCR amplificato con e senza genoma umano interferente.

Conc. DNA (nM):	Fluorescenza media (AU):	
	PCR	PCR + genomico
10	175.75 ± 12.42	67.50 ± 6.36
2	93.75 ± 15.20	15.75 ± 5.38
0.4	8.00 ± 15.38	35.75 ± 21.62
0.08	5.25 ± 11.38	0.25 ± 0.50
0.016	12.00 ± 9.63	20.50 ± 16.03
0 (buffer)	6.50 ± 13.00	
100 ng DNA genomico	27.75 ± 23.30	

5.4. SVILUPPO DI SAGGI IMMUNODIAGNOSTICI CON NANOPARTICELLE ANANAS®

5.4.1. Saggio omogeneo con nanoparticelle ANANAS

Il saggio è proposto di misurare una inibizione dell'attività enzimatica dell'AP legata alla nanoparticella, dovuta alla presenza in soluzione dell'inibitore APF coniugato all'anticorpo diretto contro l'analogo dell'analita (composto (VIII)); quest'ultimo è stato ancorato alla nanoparticella tramite un braccio spaziatore di PEG₅₀₀₀ biotinilato (composto (VII)) con cui si è andati a formare lo strato superficiale della nanoparticella stessa occupandone il 12,5 % dei BBS totali. Tale configurazione ha permesso di combinare l'effetto antiaggregante-stabilizzante del PEG con una ottima accessibilità dell'anticorpo alla molecola di HABA, essendo essa ben distanziata dalla superficie della nanoparticella dalla catena di PEG; la bassa percentuale di occupazione dei BBS ha inoltre permesso di caricare la nanoparticelle con un alto numero di AP biotinilate (composto (IX) – fino a 50/nanoparticella), a tutto vantaggio della sensibilità e della velocità del saggio.

In prima battuta si è voluto misurare la capacità inibente del coniugato IgG-PEG₄₀₀₀-APF (composto (VII)) aggiungendolo alle nanoparticelle, precaricate con biotina-PEG₅₀₀₀-AP (composto (IX)), in assenza di analita; per quest'ultimo sono stati usati tre diversi gradi di caricamento nanoparticellare per confrontare le tre diverse condizioni, specie in termini di velocità di saggio.

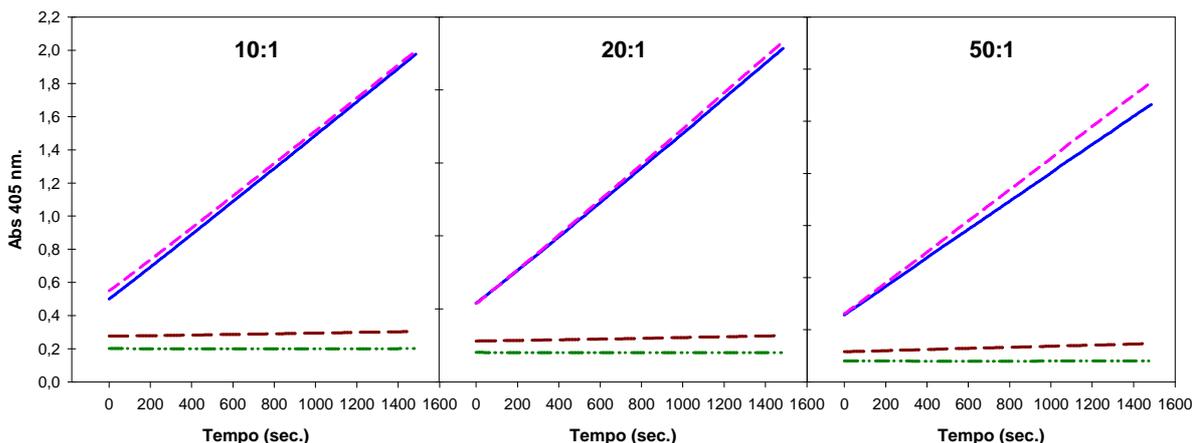


Figura 28: Esiti dei saggi omogenei impieganti 10, 20, 50 equivalenti di AP/nanoparticella e relativi riferimenti (linea blu continua: mix; linea fucsia tratteggiato corto: controllo senza inibitore; linea rossa tratteggiato lungo: controllo senza AP; linea verde punto-linea: controllo solo NPP).

La Figura 28 evidenzia come sostanzialmente non vi sia stata inibizione enzimatica, il valore medio di attività dell'AP risulta variare infatti tra l'89.3 ed il 99.4% rispetto al controllo in assenza di inibitore (linea fucsia a tratteggio corto), indicando il fallimento del tentativo di inibizione; inoltre le fluttuazioni dei valori di attività sono risultate prive di relazione tra il rapporto AP/ANANAS, e sono quindi imputabili a variazioni intra-saggio.

Per verificare comunque la capacità inibente del composto (VII) sono state eseguite ulteriori prove in presenza di un eccesso di inibitore rispetto all'analogo fino a 10 equivalenti (mol/mol); tali test hanno dato risultati contrari a quelli attesi, evidenziato un aumento di attività enzimatica fino al 149.2%, sembra quindi che tale effetto sia imputabile alla presenza del coniugato IgG-PEG₄₀₀₀-APF.

I tentativi finora effettuati di allestire un saggio omogeneo sono quindi stati infruttuosi; le ipotesi riguardanti la mancata inibizione sono molteplici: innanzitutto i *pitfalls* descritti nelle sintesi dei componenti (l'impossibilità di quantificare il grado di coniugazione tra il biotina-PEG e lo HABA-derivato; l'impossibilità di verificare la coniugazione tra l'IgG-PEG e l'APF), che non rendono possibile assicurare la bontà dei reagenti utilizzati; è comunque possibile che l'inibizione non si sia verificata perché sulla superficie della particella non si è venuta a realizzarsi una concentrazione locale sufficiente di inibitore.

Per quanto riguarda l'amplificazione di attività enzimatica osservata in presenza del coniugato inibitore-anticorpo, si è ipotizzato il verificarsi di un fenomeno di stabilizzazione della tasca di legame dovuto al PEG, oppure un'attivazione dell'AP dovuta all'interazione con le IgG, fenomeno quest'ultimo descritto in letteratura, anche se solo per anticorpi allotipici¹³².

I dati ottenuti hanno comunque indicato la necessità di rivedere i protocolli di sintesi ed analisi dei vari componenti del saggio, allo scopo di sopperire alle deficienze riscontrate nel presente lavoro; sono tuttora in corso valutazioni per la modifica/prosecuzione di tali

attività; si sta inoltre ipotizzando di verificare la fattibilità del saggio sostituendo la coppia enzima-inibitore mediante l'uso rispettivamente di Perossidasi di Rafano (HRP) e polimeri recanti residui azidici all' ω -terminale.

6. CONCLUSIONI

6.1. FUNZIONALIZZAZIONE DI NANOSTRUTTURE DI METALLI NOBILI PER RILEVAZIONE DI BIOMOLECOLE AD ALTA SENSIBILITÀ

Nel corso del presente dottorato è stata perseguita la realizzazione di un sistema modello di rilevazione di biomolecole basato sulla tecnologia SPR con accoppiamento a *grating* sinusoidale ad azimuth ruotato (GC-SPR); tali attività sono state svolte nel contesto del progetto strategico di ateneo PLATFORMS (*PLAsmonic nano-Textured materials and architectures FOR enhanced Molecular Sensing*), ed hanno visto un alto grado di collaborazione con diversi gruppi di ricerca allo scopo di riunire tutte le competenze necessarie allo svolgimento del progetto.

Scopo del lavoro di tesi è stato quello di perseguire la massima sensibilità e selettività analitica attraverso il controllo quantitativo della funzionalizzazione della superficie con elementi di bioriconoscimento e di protezione da interazioni aspecifiche. A questo scopo si sono sintetizzati diversi derivati del polietilenglicole (PEG) a MW 2 e 5 kDa, recanti un residuo di cisteina all' α -terminale (necessario per l'aggancio alle superfici tramite chimica tiolo-oro), ed un ω -terminale variamente funzionalizzato a seconda che avessero funzione di sonda o di elemento di protezione superficiale. Sempre per massimizzare le prestazioni del sistema, come sonda per la rilevazione di acidi nucleici è stato scelto di impiegare una sequenza di acido peptidonucleico (PNA) in ragione della sua superiore forza di legame al DNA complementare rispetto ai suoi omologhi naturali ed alla sua maggior stabilità chimico-fisica.

È stata elaborata una procedura per il controllo quantitativo della funzionalizzazione delle superfici attraverso la calibrazione del segnale SPR in funzione della densità superficiale raggiunta dai polimeri depositi, e lo studio delle cinetiche di deposizione delle singole molecole sintetizzate; grazie a questo lavoro preliminare è stato possibile correlare quantitativamente i dati di funzionalizzazione superficiale con i dati di sensibilità e specificità analitica del sistema.

I risultati sulla protezione dalle interazioni aspecifiche (capacità *antifouling*) hanno evidenziato come per avere un'efficace protezione della superficie siano necessarie alte densità superficiali di PEG metossilato ($> 500 \text{ ng/cm}^2$), e come il derivato a MW 2 kDa sia il più efficace allo scopo.

Il sensore GC-SPR funzionalizzato con elementi di bioriconoscimento ha dimostrato di fornire letture riproducibili e ad alta sensibilità: ad esempio, le rilevazioni di un monostrato

di avidina, (modello di analita proteico) hanno fornito *shifts* pari a $0.91 \pm 0.03^\circ$ usando un biotin-PEG derivato a MW 5 kDa ed a $1.05 \pm 0.02^\circ$ usando un biotin-PEG a MW 2 kDa.

Per la rilevazione analitica di DNA, i risultati hanno evidenziato come il segnale ed il rumore siano fortemente influenzati dal rapporto tra la concentrazione superficiale della sonda e dell'elemento di protezione dall'aspecifico, confermando l'importanza del controllo quantitativo della chimica di superficie. Il rapporto tra segnale e rumore è variato da un minimo di 1.00 in assenza di elemento protettore (segnale generato dall'analita indistinguibile dal rumore), ad un massimo 19.05, usando un rapporto PNA-PEG_{5kDa}/mPEG_{2kDa} pari a 1/10 (area/area); Inoltre, si è osservato che la sostituzione della sonda PNA-PEG_{5kDa} con una sonda di puro PNA (senza lo spaziatore di PEG), pur consentendo di ottenere *shifts* in assoluto più elevati (per via della maggior vicinanza al substrato plasmonico), di fatto peggiora le prestazioni perché genera un maggior rumore, che si traduce in un rapporto segnale/rumore massimo di 7.62.

Il sistema GC-SPR funzionalizzato con la miscela ottimizzata di PNA-PEG_{5kDa}/mPEG_{2kDa} ha permesso un'efficace rilevazione dell'oligonucleotide bersaglio (oDNA di 15 nt complementare alla sonda a PNA) nel range di concentrazioni qui analizzate (tra il 2 nM ed il 3.2 pM), senza che peraltro sia stato raggiunto il limite di rivelazione; un confronto con una tecnica di rilevazione basata sulla fluorescenza ha evidenziato la superiorità della rilevazione SPR (3.2 pM vs 16 pM della fluorescenza).

La rilevazione di frammenti PCR-amplificati di DNA del *Mycobacterium Tuberculosis* contenenti la sequenza bersaglio ha permesso di ottenere una sensibilità paragonabile, a fronte comunque di un segnale SPR, a parità di concentrazione, superiore a quello ottenuto con l'oligonucleotide, in ragione della maggior lunghezza della sequenza (c.a. 300 nt). Tuttavia, in presenza di DNA genomico umano frammentato, aggiunto al PCR amplificato come interferente per simulare un vero campione biologico, si sono evidenziati più equilibri competitivi che hanno diminuito l'efficacia analitica: infatti, il DNA genomico in soluzione a) compete con il PCR-amplificato per la sonda di superficie (anche se con diversa efficienza) e b) sequestra parte del PCR-amplificato. Ciò si traduce da una parte in un segnale rumoroso e, dall'altra, in una risposta meno efficiente alla presenza dell'analita. Questi risultati (confermati anche in un confronto con la metodica a fluorescenza) hanno evidenziato che per l'analisi di campioni complessi sarà necessario sviluppare ulteriormente il metodo, ad esempio individuando opportune condizioni di stringenza (es. variando la temperatura di lavoro o adottando l'uso di agenti denaturanti), o sostituendo le sonde a PNA con quelle più classiche a DNA.

6.2. SAGGIO OMOGENEO CON NANOPARTICELLE ANANAS®

In collaborazione con ANANAS nanotech è stato effettuato un tentativo di allestimento di un saggio omogeneo impiegando le nanoparticelle poliavidiniche ANANAS come scaffold per riunire in un'unica entità molecolare gli elementi necessari al saggio.

Questo ha previsto l'impiego di fosfatasi alcalina (AP) come elemento generatore di segnale e di un analogo di un analita modello (l'acido idrossifenilazobenzioco - HABA), entrambi capaci di venir ancorati alle nanoparticelle, nonché di un anticorpo direzionato verso l'analita/analogo, coniugato ad un inibitore dell'AP: l'acido aminopropilfosfonico (APF).

I tentativi finora effettuati di allestire il saggio sono però stati infruttuosi: non è stato infatti possibile ottenere inibizione enzimatica. Le ipotesi a questo riguardo sono molteplici; la più probabile è che la costante di inibizione dell'APF per l'AP sia troppo bassa, e che pertanto non si sia raggiunta una concentrazione locale di inibitore sufficiente.

Le attività finora svolte indicano comunque la necessità di rivedere i protocolli di sintesi ed analisi dei vari componenti allo scopo di colmare le deficienze riscontrate nel presente lavoro; sono in corso valutazioni per la modifica/prosecuzione di tali attività; si sta inoltre ipotizzando di verificare la fattibilità del saggio sostituendo la coppia enzima-inibitore mediante l'uso rispettivamente di perossidasi di rafano e polimeri recanti residui azidici.

7. Bibliografia

1. Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report). *Pure Appl Chem* **1999**, *71* (12), 2333-2348.
2. Mehrvar, M.; Bis, C.; Scharer, J. M.; Moo-Young, M.; Luong, J. H., Fiber-optic biosensors - Trends and advances. *Anal Sci* **2000**, *16* (7), 677-692.
3. Wang, J.; Jiang, M., Toward genoelectronics: Nucleic acid doped conducting polymers. *Langmuir* **2000**, *16* (5), 2269-2274.
4. Bunde, R. L.; Jarvi, E. J.; Rosentreter, J. J., Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta* **1998**, *46* (6), 1223-1236.
5. Lubbers, D. W.; Opitz, N., The pCO₂-/pO₂-optode: a new probe for measurement of pCO₂ or pO in fluids and gases (authors transl). *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences* **1975**, *30* (4), 532-3.
6. Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J., DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev* **2008**, *108* (1), 109-139.
7. Moerner, W. E., New directions in single-molecule imaging and analysis. *P Natl Acad Sci USA* **2007**, *104* (31), 12596-12602.
8. Cox, W. G.; Singer, V. L., Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. *Biotechniques* **2004**, *36* (1), 114-+.
9. Fan, X.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J. D.; Sun, Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal Chim Acta* **2008**, *620* (1-2), 8-26.
10. Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem Rev* **2008**, *108* (2), 462-493.
11. Homola, J.; Dostálek, J., *Surface plasmon resonance based sensors*. Springer: New York, 2006; p 251 p.
12. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I., Biosensing with Surface-Plasmon Resonance - How It All Started. *Biosens Bioelectron* **1995**, *10* (8), R1-R9.
13. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, *4* (0), 299-304.
14. Rich, R. L.; Myszka, D. G., Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. *J Mol Recognit* **2000**, *13* (6), 388-407.
15. Fratamico, P. M.; Strobaugh, T. P.; Medina, M. B.; Gehring, A. G., Detection of Escherichia coli O157 : H7 using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnol Tech* **1998**, *12* (7), 571-576.
16. Habauzit, D.; Chopineau, J.; Roig, B., SPR-based biosensors: a tool for biodetection of hormonal compounds. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387* (4), 1215-1223.
17. Palchetti, I.; Mascini, M., Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst* **2008**, *133* (7), 846-854.
18. Pejcic, B.; De Marco, R.; Parkinson, G., The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. *Analyst* **2006**, *131* (10), 1079-1090.
19. Shankaran, D. R.; Gobi, K. V. A.; Miura, N., Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensor Actuat B-Chem* **2007**, *121* (1), 158-177.

20. Sipova, H.; Homola, J., Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review. *Anal Chim Acta* **2013**, *773*, 9-23.
21. Situ, C.; Buijs, J.; Mooney, M. H.; Elliott, C. T., Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis. *Trac-Trend Anal Chem* **2010**, *29* (11), 1305-1315.
22. Homola, J.; Koudela, I.; Yee, S. S., Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensor Actuat B-Chem* **1999**, *54* (1-2), 16-24.
23. Maier, S. A., *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer: New York, 2007; p XXIV, 223 p.
24. Hutter, E.; Fendler, J. H., Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Adv Mater* **2004**, *16* (19), 1685-1706.
25. Liedberg, B.; Lundstrom, I.; Stenberg, E., Principles of Biosensing with an Extended Coupling Matrix and Surface-Plasmon Resonance. *Sensor Actuat B-Chem* **1993**, *11* (1-3), 63-72.
26. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu Rev Phys Chem* **2007**, *58*, 267-297.
27. Raether, H., Surface-Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings. *Springer Tr Mod Phys* **1988**, *111*, 1-133.
28. Shalabney, A.; Abdulhalim, I., Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors. *Laser Photonics Rev* **2011**, *5* (4), 571-606.
29. Hu, C. K., Surface plasmon resonance sensor based on diffraction grating with high sensitivity and high resolution. *Optik* **2011**, *122* (21), 1881-1884.
30. Roh, S.; Chung, T.; Lee, B., Overview of the Characteristics of Micro- and Nano-Structured Surface Plasmon Resonance Sensors. *Sensors-Basel* **2011**, *11* (2), 1565-1588.
31. Alleyne, C. J.; Kirk, A. G.; McPhedran, R. C.; Nicorovici, N. A. P.; Maystre, D., Enhanced SPR sensitivity using periodic metallic structures. *Opt Express* **2007**, *15* (13), 8163-8169.
32. Dostalek, J.; Homola, J.; Miler, M., Rich information format surface plasmon resonance biosensor based on array of diffraction gratings. *Sensor Actuat B-Chem* **2005**, *107* (1), 154-161.
33. Moon, S., Grating-based surface plasmon resonance detection of core-shell nanoparticle mediated DNA hybridization. *Biosens Bioelectron* **2012**, *32* (1), 141.
34. Ruffato, G.; Romanato, F.; Garoli, D.; Cattarin, S., Nanoporous gold plasmonic structures for sensing applications. *Opt Express* **2011**, *19* (14), 13164-13170.
35. Kim, D., Effect of the azimuthal orientation on the performance of grating-coupled surface-plasmon resonance biosensors. *Appl Optics* **2005**, *44* (16), 3218-3223.
36. Romanato, F.; Lee, H. K.; Kang, H. K.; Wong, C. C.; Zong, Y.; Knoll, W., Azimuthal dispersion and energy mode condensation of grating-coupled surface plasmon polaritons. *Phys Rev B* **2008**, *77* (24).
37. Romanato, F.; Lee, K. H.; Kang, H. K.; Ruffato, G.; Wong, C. C., Sensitivity enhancement in grating coupled surface plasmon resonance by azimuthal control. *Opt Express* **2009**, *17* (14), 12145-12154.
38. Ruffato, G.; Zacco, G.; Romanato, F., *Innovative Exploitation of Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance for Sensing*. 2012.

39. Bartel, D. P., MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **2009**, *136* (2), 215-233.
40. Hanawalt, P. C.; Spivak, G., Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2008**, *9* (12), 958-970.
41. Chorley, B. N.; Wang, X.; Campbell, M. R.; Pittman, G. S.; Noureddine, M. A.; Bell, D. A., Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutat Res-Rev Mutat* **2008**, *659* (1-2), 147-157.
42. Corne, C.; Fiche, J. B.; Gasparutto, D.; Cunin, V.; Suraniti, E.; Buhot, A.; Fuchs, J.; Calemczuk, R.; Livache, T.; Favier, A., SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA N-glycosylase interactions with damaged DNA duplexes. *Analyst* **2008**, *133* (8), 1036-1045.
43. D'Agostino, V. G.; Minoprio, A.; Torreri, P.; Marinoni, I.; Bossa, C.; Petrucci, T. C.; Albertini, A. M.; Ranzani, G. N.; Bignami, M.; Mazzei, F., Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis. *DNA Repair* **2010**, *9* (6), 700-707.
44. Fisher, R. J.; Fivash, M. J.; Stephen, A. G.; Hagan, N. A.; Shenoy, S. R.; Medaglia, M. V.; Smith, L. R.; Worthy, K. M.; Simpson, J. T.; Shoemaker, R.; McNitt, K. L.; Johnson, D. G.; Hixson, C. V.; Gorelick, R. J.; Fabris, D.; Henderson, L. E.; Rein, A., Complex interactions of HIV-1 nucleocapsid protein with oligonucleotides (vol 34, pg 472, 2006). *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (3), 1082-1082.
45. Gao, Y.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M., Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (11), 3370-3377.
46. Hegde, V.; Wang, M.; Deutsch, W. A., Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1. *Biochemistry-Us* **2004**, *43* (44), 14211-14217.
47. Ioannou, C.; Schaeffer, P. M.; Dixon, N. E.; Soutlanas, P., Helicase binding to Dnal exposes a cryptic DNA-binding site during helicase loading in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (18), 5247-5258.
48. Jankowska-Anyszka, M.; Piecyk, K.; Samonina-Kosicka, J., Synthesis of a new class of ribose functionalized dinucleotide cap analogues for biophysical studies on interaction of cap-binding proteins with the 5' end of mRNA. *Org Biomol Chem* **2011**, *9* (15), 5564-5572.
49. Lamichhane, T. N.; Abeydeera, N. D.; Duc, A. C. E.; Cunningham, P. R.; Chow, C. S., Selection of Peptides Targeting Helix 31 of Bacterial 16S Ribosomal RNA by Screening M13 Phage-Display Libraries. *Molecules* **2011**, *16* (2), 1211-1239.
50. Li, X. P.; Grela, P.; Krokowski, D.; Tchorzewski, M.; Tumer, N. E., Pentameric Organization of the Ribosomal Stalk Accelerates Recruitment of Ricin A Chain to the Ribosome for Depurination. *J Biol Chem* **2010**, *285* (53), 41463-41471.
51. Metzinger, L.; Hallier, M.; Felden, B., The highest affinity binding site of small protein B on transfer messenger RNA is outside the tRNA domain. *Rna* **2008**, *14* (9), 1761-1772.
52. Mizuno, A.; In, Y.; Fujita, Y.; Abiko, F.; Miyagawa, H.; Kitamura, K.; Tomoo, K.; Ishida, T., Importance of C-terminal flexible region of 4E-binding protein in binding with eukaryotic initiation factor 4E. *Febs Lett* **2008**, *582* (23-24), 3439-3444.
53. Mori, D.; Sasagawa, N.; Kino, Y.; Ishiura, S., Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. *J Biochem* **2008**, *143* (3), 377-383.
54. Moyroud, E.; Reymond, M. C. A.; Hames, C.; Parcy, F.; Scutt, C. P., The analysis of entire gene promoters by surface plasmon resonance. *Plant J* **2009**, *59* (5), 851-858.

55. Ptushkina, M.; von der Haar, T.; Vasilescu, S.; Frank, R.; Birkenhager, R.; McCarthy, J. E. G., Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20. *Embo J* **1998**, *17* (16), 4798-4808.
56. Rachkov, A.; Patskovsky, S.; Soldatkin, A.; Meunier, M., Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Talanta* **2011**, *85* (4), 2094-9.
57. Rich, R. L.; Myszka, D. G., Spying on HIV with SPR. *Trends in Microbiology* **2003**, *11* (3), 124-133.
58. Sipova, H.; Vaisocherova, H.; Stepanek, J.; Homola, J., A dual surface plasmon resonance assay for the determination of ribonuclease H activity. *Biosens Bioelectron* **2010**, *26* (4), 1605-1611.
59. Tomoo, K.; Abiko, F.; Miyagawa, H.; Kitamura, K.; Ishida, T., Effect of N-terminal Region of eIF4E and Ser65-phosphorylation of 4E-BP1 on interaction between eIF4E and 4E-BP1 fragment peptide. *J Biochem* **2006**, *140* (2), 237-246.
60. Vaisocherova, H.; Snasel, J.; Springer, T.; Sipova, H.; Rosenberg, I.; Stepanek, J.; Homola, J., Surface plasmon resonance study on HIV-1 integrase strand transfer activity. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *393* (4), 1165-1172.
61. Wolf, L. K.; Gao, Y.; Georgiadis, R. M., Kinetic discrimination of sequence-specific DNA - Drug binding measured by surface plasmon resonance imaging and comparison to solution-phase measurements. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (34), 10503-10511.
62. Zhao, Y.; Kan, Z. Y.; Zeng, Z. X.; Hao, Y. H.; Chen, H.; Tan, Z., Determining the folding and unfolding rate constants of nucleic acids by biosensor. Application to telomere G-quadruplex. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (41), 13255-13264.
63. Egholm, M.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Berg, R. H., Recognition of Guanine and Adenine in DNA by Cytosine and Thymine Containing Peptide Nucleic-Acids (Pna). *J Am Chem Soc* **1992**, *114* (24), 9677-9678.
64. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O., Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, *254* (5037), 1497-1500.
65. Hyrup, B.; Egholm, M.; Nielsen, P. E.; Wittung, P.; Norden, B.; Buchardt, O., Structure-Activity Studies of the Binding of Modified Peptide Nucleic-Acids (Pnas) to DNA. *J Am Chem Soc* **1994**, *116* (18), 7964-7970.
66. Bates, P. J.; Reddoch, J. F.; Hansakul, P.; Arrow, A.; Dale, R.; Miller, D. M., Biosensor detection of triplex formation by modified oligonucleotides. *Anal Biochem* **2002**, *307* (2), 235-243.
67. Demidov, V. V., Kinetics and mechanism of the DNA double helix invasion by pseudocomplementary peptide nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (9), 5953.
68. Nielsen, P. E.; Egholm, M., An introduction to peptide nucleic acid. *Current issues in molecular biology* **1999**, *1* (1-2), 89-104.
69. Jensen, K. K.; Orum, H.; Nielsen, P. E.; Norden, B., Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry-US* **1997**, *36* (16), 5072-5077.
70. Briones, C.; Moreno, M., Applications of peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs) in biosensor development. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *402* (10), 3071-3089.

71. Mateo-Martí, E.; Pradier, C.-M., *A Novel Type of Nucleic Acid-based Biosensors: the Use of PNA Probes, Associated with Surface Science and Electrochemical Detection Techniques*. 2010.
72. Wang, J., DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review. *Biosens Bioelectron* **1998**, *13* (7-8), 757-762.
73. Wang, J.; Palecek, E.; Nielsen, P. E.; Rivas, G.; Cai, X. H.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D. B.; Farias, P. A. M., Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. *J Am Chem Soc* **1996**, *118* (33), 7667-7670.
74. Ermini, M. L.; Scarano, S.; Bini, R.; Banchelli, M.; Berti, D.; Mascini, M.; Minunni, M., A rational approach in probe design for nucleic acid-based biosensing. *Biosens Bioelectron* **2011**, *26* (12), 4785-4790.
75. Porcheddu, A.; Giacomelli, G., Peptide nucleic acids (PNAs), a chemical overview. *Curr Med Chem* **2005**, *12* (22), 2561-2599.
76. Bloom, B. R.; Murray, C. J., Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **1992**, *257* (5073), 1055-64.
77. Zignol, M.; van Gemert, W.; Falzon, D.; Sismanidis, C.; Glaziou, P.; Floyd, K.; Raviglione, M., Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010. *Bulletin of the World Health Organization* **2012**, *90* (2), 111-119D.
78. Hillemann, D.; Kubica, T.; Agzamova, R.; Venera, B.; Rusch-Gerdes, S.; Niemann, S., Rifampicin and isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients in Kazakhstan. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **2005**, *9* (10), 1161-7.
79. Kozhamkulov, U.; Akhmetova, A.; Rakhimova, S.; Belova, E.; Alenova, A.; Bismilda, V.; Chingissova, L.; Ismailov, S.; Ramanculov, E.; Momynaliev, K., Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Kazakhstan. *Japanese journal of infectious diseases* **2011**, *64* (3), 253-5.
80. Nimri, L.; Samara, H.; Batchoun, R., Detection of mutations associated with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *FEMS immunology and medical microbiology* **2011**, *62* (3), 321-7.
81. Heifets, L. B.; Cangelosi, G. A., Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis: a neglected problem at the turn of the century. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **1999**, *3* (7), 564-81.
82. Musser, J. M., Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clinical microbiology reviews* **1995**, *8* (4), 496-514.
83. Heuberger, M.; Drobek, T.; Spencer, N. D., Interaction forces and morphology of a protein-resistant poly(ethylene glycol) layer. *Biophys J* **2005**, *88* (1), 495-504.
84. Uchida, K.; Hoshino, Y.; Tamura, A.; Yoshimoto, K.; Kojima, S.; Yamashita, K.; Yamanaka, I.; Otsuka, H.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y., Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered-chain surface for preventing the nonspecific adsorption of proteins and peptides. *Biointerphases* **2007**, *2* (4), 126-130.
85. Uchida, K.; Otsuka, H.; Kaneko, M.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y., A reactive poly(ethylene glycol) layer to achieve specific surface plasmon resonance sensing with a high S/N ratio: The substantial role of a short underbrushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption. *Anal Chem* **2005**, *77* (4), 1075-1080.

86. Bozzini, S.; Petrini, P.; Tanzi, M. C.; Zurcher, S.; Tosatti, S., Poly(ethylene glycol) and Hydroxy Functionalized Alkane Phosphate Mixed Self-Assembled Monolayers to Control Nonspecific Adsorption of Proteins on Titanium Oxide Surfaces. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6529-6534.
87. Emmenegger, C. R.; Brynda, E.; Riedel, T.; Sedlakova, Z.; Houska, M.; Alles, A. B., Interaction of Blood Plasma with Antifouling Surfaces. *Langmuir* **2009**, *25* (11), 6328-6333.
88. Silin, V.; Weetall, H.; Vanderah, D. J., SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers (SAMs). *J Colloid Interf Sci* **1997**, *185* (1), 94-103.
89. Du, H.; Chandaroy, P.; Hui, S. W., Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Bba-Biomembranes* **1997**, *1326* (2), 236-248.
90. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *J Phys Chem B* **1998**, *102* (2), 426-436.
91. Harris, M. J.; Zalipsky, S., *Poly(ethylene glycol)*. ACS: Washington, DC, 1997; p XII, 489 p.
92. Sofia, S. J.; Premnath, V.; Merrill, E. W., Poly(ethylene oxide) grafted to silicon surfaces: Grafting density and protein adsorption. *Macromolecules* **1998**, *31* (15), 5059-5070.
93. Dettin, M.; Silvestri, D.; Danesin, R.; Cretajo, E.; Picariello, G.; Casarin, E.; Sonato, A.; Romanato, F.; Morpurgo, M., Synthesis and Chromatography-Free Purification of PNA-PEO Conjugates for the Functionalisation of Gold Sensors. *Molecules* **2012**, *17* (9), 11026-11045.
94. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Introduction to avidin-biotin technology. *Methods in enzymology* **1990**, *184*, 5-13.
95. Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Livnah, O., Essentials of biorecognition: the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunology letters* **2006**, *103* (1), 27-32.
96. Elo, H. A.; Janne, O.; Tuohimaa, P. J., Avidin induction in the chick oviduct by progesterone and non-hormonal treatments. *Journal of steroid biochemistry* **1980**, *12*, 279-81.
97. Elo, H. A.; Raisanen, S.; Tuohimaa, P. J., Induction of an antimicrobial biotin-binding egg white protein (avidin) in chick tissues in septic Escherichia coli infection. *Experientia* **1980**, *36* (3), 312-3.
98. Ashorn, R. G.; Eskola, J.; Tuohimaa, P. J.; Krohn, K. J., Effect of the progesterone-inducible proteins human lactoferrin and chicken avidin on lymphocyte proliferation. *Hum Reprod* **1986**, *1* (3), 149-51.
99. DeLange, R. J.; Huang, T. S., Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *J Biol Chem* **1971**, *246* (3), 698-709.
100. Gitlin, G.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Studies on the biotin-binding site of avidin. Tryptophan residues involved in the active site. *The Biochemical journal* **1988**, *250* (1), 291-4.
101. Gitlin, G.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Studies on the biotin-binding site of avidin. Lysine residues involved in the active site. *The Biochemical journal* **1987**, *242* (3), 923-6.
102. Nardone, E.; Rosano, C.; Santambrogio, P.; Curnis, F.; Corti, A.; Magni, F.; Siccardi, A. G.; Paganelli, G.; Losso, R.; Apreda, B.; Bolognesi, M.; Sidoli, A.; Arosio, P., Biochemical characterization and crystal structure of a recombinant hen avidin and its acidic mutant expressed in Escherichia coli. *European journal of biochemistry / FEBS* **1998**, *256* (2), 453-60.

103. Pugliese, L.; Coda, A.; Malcovati, M.; Bolognesi, M., Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *Journal of molecular biology* **1993**, *231* (3), 698-710.
104. Pugliese, L.; Malcovati, M.; Coda, A.; Bolognesi, M., Crystal structure of apo-avidin from hen egg-white. *Journal of molecular biology* **1994**, *235* (1), 42-6.
105. Weber, P. C.; Cox, M. J.; Salemme, F. R.; Ohlendorf, D. H., Crystallographic data for *Streptomyces avidinii* streptavidin. *J Biol Chem* **1987**, *262* (26), 12728-9.
106. Bayer, E. A.; Skutelsky, E.; Wilchek, M., The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. *Methods in enzymology* **1979**, *62*, 308-15.
107. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Applications of avidin-biotin technology: literature survey. *Methods in enzymology* **1990**, *184*, 14-45.
108. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Avidin-biotin mediated immunoassays: overview. *Methods in enzymology* **1990**, *184*, 467-9.
109. Laitinen, O. H.; Nordlund, H. R.; Hytonen, V. P.; Kulomaa, M. S., Brave new (strept)avidins in biotechnology. *Trends Biotechnol* **2007**, *25* (6), 269-77.
110. Florence, A. T.; Attwood, D.; Tortorella, V., <<Le>> *basi chimico-fisiche della tecnologia farmaceutica*. Edises: Napoli, 2002; p IX, 566 p.
111. Caliceti, P.; Chinol, M.; Roldo, M.; Veronese, F. M.; Semenzato, A.; Salmaso, S.; Paganelli, G., Poly(ethylene glycol)-avidin bioconjugates: suitable candidates for tumor pretargeting. *J Control Release* **2002**, *83* (1), 97-108.
112. Pignatto, M.; Realdon, N.; Morpurgo, M., Optimized avidin nucleic acid nanoassemblies by a tailored PEGylation strategy and their application as molecular amplifiers in detection. *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21* (7), 1254-63.
113. Morpurgo, M.; Facchin, S.; Pignatto, M.; Silvestri, D.; Casarin, E.; Realdon, N., Characterization of multifunctional nanosystems based on the avidin-nucleic acid interaction as signal enhancers in immuno-detection. *Anal Chem* **2012**, *84* (7), 3433-9.
114. Green, N. M., A Spectrophotometric Assay for Avidin and Biotin Based on Binding of Dyes by Avidin. *The Biochemical journal* **1965**, *94*, 23C-24C.
115. Sims, G. E.; Snape, T. J., A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal Biochem* **1980**, *107* (1), 60-3.
116. Snyder, S. L.; Sobocinski, P. Z., An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem* **1975**, *64* (1), 284-8.
117. Udenfriend, S.; Stein, S.; Bohlen, P.; Dairman, W.; Leimgruber, W.; Weigele, M., Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* **1972**, *178* (4063), 871-2.
118. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Reassessment of Ellman's reagent. *Methods in enzymology* **1983**, *91*, 49-60.
119. Renz, C.; Loew, K., Ueber α -Methyl-indol. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1903**, *36* (4), 4326-4330.
120. Sonato, A.; Silvestri, D.; Ruffato, G.; Zacco, G.; Romanato, F.; Morpurgo, M., Quantitative control of poly(ethylene oxide) surface antifouling and biodetection through azimuthally enhanced grating coupled-surface plasmon resonance sensing. *Appl Surf Sci* **2013**, *286*, 22-30.

121. Morpurgo, M.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *J Biochem Bioph Meth* **1999**, *38* (1), 17-28.
122. Hofstetter, H.; Morpurgo, M.; Hofstetter, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., A labeling, detection, and purification system based on 4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid: An extension of the avidin-biotin system. *Anal Biochem* **2000**, *284* (2), 354-366.
123. Morpurgo, M.; Veronese, F. M., Conjugates of peptides and proteins to polyethylene glycols. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **2004**, *283*, 45-70.
124. Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A., Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *J Org Chem* **1998**, *63* (26), 9678-9683.
125. Sonato, A.; Ruffato, G.; Zacco, G.; Silvestri, D.; Natali, M.; Carli, M.; Giallongo, G.; Granozzi, G.; Morpurgo, M.; Romanato, F., Enhanced sensitivity azimuthally controlled grating-coupled surface plasmon resonance applied to the calibration of thiol-poly(ethylene oxide) grafting. *Sensor Actuat B-Chem* **2013**, *181*, 559-566.
126. Tokumitsu, S.; Liebich, A.; Herrwerth, S.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Grunze, M., Grafting of alkanethiol-terminated poly(ethylene glycol) on gold. *Langmuir* **2002**, *18* (23), 8862-8870.
127. Sano, S.; Kato, K.; Ikada, Y., Introduction of Functional-Groups onto the Surface of Polyethylene for Protein Immobilization. *Biomaterials* **1993**, *14* (11), 817-822.
128. Golovchenko, N. P.; Kataeva, I. A.; Akimenko, V. K., Analysis of Ph-Dependent Protein Interactions with Gel-Filtration Medium. *J Chromatogr* **1992**, *591* (1-2), 121-128.
129. Ziegler, A.; Zaia, J., Size-exclusion chromatography of heparin oligosaccharides at high and low pressure. *J Chromatogr B* **2006**, *837* (1-2), 76-86.
130. Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S., Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir* **1998**, *14* (19), 5636-5648.
131. Lesch, H. P.; Kaikkonen, M. U.; Pikkarainen, J. T.; Yla-Herttuala, S., Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert opinion on drug delivery* **2010**, *7* (5), 551-64.
132. Shinozaki, T., Allotype immunoglobulin enhances alkaline phosphatase activity: implications for the inflammatory response. *J Lab Clin Med* **1998**, *132* (4), 320.
133. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev* **2005**, *105* (4), 1103-1169.
134. Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T., Determination of thickness, dielectric constant of thiol films, and kinetics of adsorption using surface plasmon resonance. *Langmuir* **2005**, *21* (2), 602-609.
135. DeBono, R. F.; Loucks, G. D.; DellaManna, D.; Krull, U. J., Self-assembly of short and long-chain n-alkyl thiols onto gold surfaces: A real-time study using surface plasmon resonance techniques. *Can J Chem* **1996**, *74* (5), 677-688.
136. Allara, D. L.; Nuzzo, R. G., Spontaneously Organized Molecular Assemblies .2. Quantitative Infrared Spectroscopic Determination of Equilibrium Structures of Solution-Adsorbed Normal-Alkanoic Acids on an Oxidized Aluminum Surface. *Langmuir* **1985**, *1* (1), 52-66.
137. Kim, Y. T.; Mccarley, R. L.; Bard, A. J., Observation of N-Octadecanethiol Multilayer Formation from Solution onto Gold. *Langmuir* **1993**, *9* (8), 1941-1944.
138. Allara, D. L.; Nuzzo, R. G., Spontaneously Organized Molecular Assemblies .1. Formation, Dynamics, and Physical-Properties of Normal-Alkanoic Acids Adsorbed from Solution on an Oxidized Aluminum Surface. *Langmuir* **1985**, *1* (1), 45-52.

139. Pan, W.; Durning, C. J.; Turro, N. J., Kinetics of alkanethiol adsorption on gold. *Langmuir* **1996**, *12* (18), 4469-4473.
140. Bain, C. D.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M., Comparison of Self-Assembled Monolayers on Gold - Coadsorption of Thiols and Disulfides. *Langmuir* **1989**, *5* (3), 723-727.
141. Karpovich, D. S.; Blanchard, G. J., Direct Measurement of the Adsorption-Kinetics of Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers on a Microcrystalline Gold Surface. *Langmuir* **1994**, *10* (9), 3315-3322.

8. APPENDICE

9.1. APPENDICE A - MODELLO PREDITTIVO DI CO-DEPOSIZIONE

9.1.1. Studi di deposizione di specie tiolate

Sono state studiate le cinetiche di deposizione di varie specie tiolate usate nel presente lavoro in modo da ottenere le relative costanti cinetiche di deposizione; sono state effettuate misurazioni SPR esaminando la variazione di angolo di risonanza in funzione del tempo di deposizione per: (trt)Cys-mPEG₅₀₀₀ (0.825 mM), (trt)Cys-mPEG₂₀₀₀ (0.93 e 1.86 mM), Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-biotina (1.84 mM); FMoc-(trt)Cys-PEG₅₀₀₀-PNA (0.5 mM), Cys-PNA-Lys₄ (0.1 mM).

Considerando il massimo *shift* dell'angolo di risonanza rilevato come funzione del massimo grado di ricoprimento ottenuto (θ_{\max}), lo *shift* rilevato all'istante t (θ_i) può essere convertito nella frazione di ricoprimento superficiale applicando la seguente equazione:

$$\theta(t) = \frac{\theta_i}{\theta_{\max}} \quad (8.1)$$

Sono state ricavate le frazioni di ricoprimento di tutte le molecole esaminate ad ogni tempo di deposizione, ottenendo la curva di $\theta(t)$ in funzione del tempo di deposizione (t [s]). I dati ottenuti sono riassunti in Figura A1.

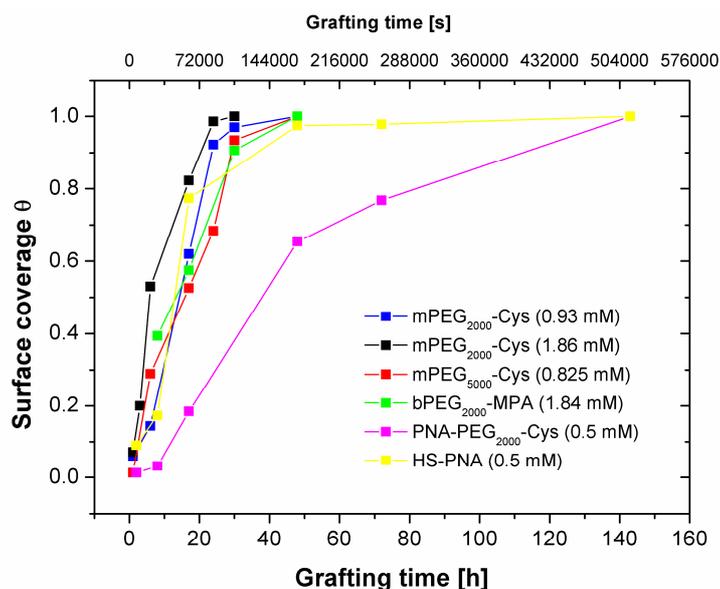


Figura A1: Cinetiche di deposizione come frazione di ricoprimento in funzione del tempo di deposizione.

La derivazione delle costanti di adsorbimento per ogni molecola in esame è stata ottenuta eseguendo il fitting delle curve sperimentali secondo il modello di adsorbimento di Langmuir; tale modello, normalmente adottato per la deposizione di tioli semplici o alcantioli¹³³⁻¹⁴⁰, viene esteso anche alla deposizione di PEG-derivati considerando gli assunti di Karpovich & Blanchard¹⁴¹:

- L'adsorbimento è limitato ad un monostrato di polimero;
- Tutti i siti superficiali di legame sono equivalenti
- L'adsorbimento in un sito non risente delle condizioni di occupazione del sito adiacente.

È stato impiegato il modello di adsorbimento di Langmuir basato sull'equazione:

$$\theta(t) = 1 - \exp(-k_{obs} \cdot t) \quad (8.2)$$

Dal fitting delle equazioni è stato derivato il valore di k_{obs} [s^{-1}] per ogni polimero usato; per eseguire il fitting il valore finale della cinetica è stato impostato ad un tempo di deposizione infinito.

Le costanti di adsorbimento sono state calcolate assumendo che $k_d \ll k_a$, di modo che k_a risulti:

$$k_a = \frac{k_{obs}}{C} \quad (8.3)$$

La Tabella A1 riassume le costanti ottenute per ciascuna specie:

Tabella A1: Costanti cinetiche ottenute per ciascuna specie tiolata esaminata.

Tipo di molecola:	Conc. [M]	$k_{obs} \times 10^5$ [s^{-1}]	$k_a \times 10^2$ [$L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$]
(trt)Cys-mPEG ₂₀₀₀	9.3×10^{-4}	1.86 ± 0.34	1.83 ± 0.02
	1.86×10^{-3}	3.07 ± 0.3	
(trt)Cys-mPEG ₅₀₀₀	8.25×10^{-4}	1.55 ± 0.184	1.88 ± 0.02
Fmoc-(trt)Cys-PEG ₂₀₀₀ -biotina	1.84×10^{-4}	1.71 ± 0.176	0.929 ± 0.02
Fmoc-(trt)-PEG ₅₀₀₀ -PNA	5×10^{-4}	0.523 ± 0.068	1.05 ± 0.002
Cys-PNA-Lys ₄	1×10^{-4}	1.59 ± 0.33	6.35 ± 0.02

9.1.2. Il modello di co-deposizione

Il modello è stato ottenuto adattando l'equazione di Langmuir descrivente l'adsorbimento superficiale dei tioli:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a(1 - \theta)C - k_d\theta \quad (8.4)$$

dove θ è la frazione di ricoprimento espresso come frazione, $(1 - \theta)$ è la porzione di superficie non coperta dal tiolo, t è il tempo di deposizione della molecola, C è la concentrazione di specie tiolata nella soluzione di deposizione [$mol \cdot L^{-1}$], k_a e k_d sono le costanti di adsorbimento e di desorbimento. Quando si verifica un adsorbimento competitivo di due specie differenti (specie 1 and specie 2), la frazione non ricoperta vista da una specie può essere espressa come:

$$1 - \theta_1 - \theta_2 \quad (8.5)$$

dove θ_1 e θ_2 sono le frazioni di ricoprimento della specie 1 e della specie 2, rispettivamente.

La descrizione del meccanismo di adsorbimento competitivo è data dal sistema di equazioni (8.6) e (8.7) in cui la frazione di ricoprimento di ciascuna molecola dipende non solo dalla sua concentrazione e dalle costanti di adsorbimento e desorbimento, ma anche dalla frazione occupata dall'altra molecola nel corso del processo di deposizione.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\theta_1}{dt} = k_{a,1}(1 - \theta_1 - \theta_2)C_1 - k_{d,1}\theta_1 \\ \frac{d\theta_2}{dt} = k_{a,2}(1 - \theta_2 - \theta_1)C_2 - k_{d,2}\theta_2 \end{array} \right. \quad (8.6)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\theta_1}{dt} = k_{a,1}(1 - \theta_1 - \theta_2)C_1 - k_{d,1}\theta_1 \\ \frac{d\theta_2}{dt} = k_{a,2}(1 - \theta_2 - \theta_1)C_2 - k_{d,2}\theta_2 \end{array} \right. \quad (8.7)$$

θ_1 e θ_2 sono le frazioni di ricoprimento della specie 1 e della specie 2.

Ri-arrangiando le equazioni di cui sopra otteniamo:

$$\frac{d\theta_1}{dt} = -(k_{a1}C_1 + k_{d1})\theta_1 - k_{a1}C_1\theta_2 + k_{a1}C_1 \quad (8.8)$$

$$\frac{d\theta_2}{dt} = -k_{a2}C_2\theta_1 - (k_{a2}C_2 + k_{d2})\theta_2 + k_{a2}C_2 \quad (8.9)$$

E quindi:

$$\begin{pmatrix} \dot{\theta}_1 \\ \dot{\theta}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{a1}C_1 - k_{d1} & -k_{a1}C_1 \\ -k_{a2}C_2 & -k_{a2}C_2 - k_{d2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \theta_1 \\ \theta_2 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} k_{a1}C_1 \\ k_{a2}C_2 \end{pmatrix} \quad (8.10)$$

$$\begin{pmatrix} \dot{\theta}_1 \\ \dot{\theta}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha & \beta \\ \gamma & \delta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \theta_1 \\ \theta_2 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -\beta \\ -\gamma \end{pmatrix} \quad (8.11)$$

Risolvendo le equazioni otteniamo le seguenti equazioni per le superfici di ricoprimento delle specie 1 e 2:

$$\theta_1(t) = -c_1\beta e^{\lambda_+ t} - c_2\beta e^{\lambda_- t} + \frac{\beta}{\lambda_+\lambda_-}(\lambda_+ + \lambda_- - \alpha - \gamma) \quad (8.12)$$

$$\theta_2(t) = c_1(\alpha - \lambda_+)e^{\lambda_+ t} + c_2(\alpha - \lambda_-)e^{\lambda_- t} + \frac{(\alpha - \lambda_-)(\alpha - \lambda_+) + \gamma\alpha}{\lambda_+\lambda_-} \quad (8.13)$$

dove:

- λ_{\pm} sono gli autovalori:

$$\lambda_{\pm} = \frac{\alpha + \delta \pm \sqrt{(\alpha - \delta)^2 + 4\gamma\beta}}{2} \quad (8.14)$$

- $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ sono le component della matrice:

$$\begin{pmatrix} \alpha & \beta \\ \gamma & \delta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{a1}C_1 - k_{d1} & -k_{a1}C_1 \\ -k_{a2}C_2 & -k_{a2}C_2 - k_{d2} \end{pmatrix} \quad (8.15)$$

- Definendo le condizioni iniziali (i. e. $\theta(t=0) = 0$), i coefficienti c_1, c_2 risultano:

$$c_1 = \frac{\alpha + \gamma - \lambda_-}{\lambda_+ (\lambda_+ - \lambda_-)} \quad (8.16)$$

$$c_2 = \frac{\alpha + \gamma - \lambda_+}{\lambda_- (\lambda_- - \lambda_+)} \quad (8.17)$$

Partendo da questo modello (Eq. (8.12) e (8.13)) è stato possibile predire le frazioni di ricoprimento per ogni specie tiolata in base alla loro concentrazione in soluzione ed al tempo di funzionalizzazione; il calcolo teorico è stato quindi implementato in un algoritmo di Mathematica e testato con saggio al blu di toluidina (TBO)¹²⁷:

Il saggio ha visto la co-deposizione di Fmoc-(trt)Cys-PEG₅₀₀₀-COOH e (trt)Cys-mPEG₂₀₀₀; esso si basa sulla capacità del colorante anionico TBO di legare elettrostaticamente con stechiometria 1:1 i carbossili di un polimero contenente tali residui ancorato su di una superficie, quando ci si trovi in condizioni basiche; virando il pH da basico ad acido, il colorante viene rilasciato in soluzione, dove viene quantificato misurandone l'assorbanza UV-Vis. ($\lambda=633$ nm) dopo taratura del sistema mediante opportuna retta di calibrazione.

Sono stati testati 5 diversi rapporti tra i due polimeri (0:1, 0.25:0.75, 0.5:0.5, 0.75:0.25, 1:0) regolando le concentrazioni delle due specie nelle soluzioni di deposizione secondo l'algoritmo; I parametri sono riassunti nella Tabella A2:

Tabella 9: Parametri di funzionalizzazione per esperimento TBO.

Campione	Frazione di ricoprimento superficiale predetta		Concentrazione della soluzione [mM]*	
	Fmoc-(trt)Cys-PEG ₅₀₀₀ -COOH	(trt)Cys-mPEG ₂₀₀₀	Fmoc-(trt)Cys-PEG ₅₀₀₀ -COOH	(trt)Cys-mPEG ₂₀₀₀
1	0.0	1.0	-	1
2	0.25	0.75	0.18	0.87
3	0.50	0.50	0.43	0.43
4	0.75	0.25	0.85	0.18
5	1.0	0.0	1.0	-

È stato stimato il numero teorico di molecole di PEG-derivati adsorbiti sulle superfici assumendo un valore di densità superficiale pari a 0.82 catene di polimero per nm² (N/nm²) al massimo grado di copertura (tale valore è la media dei valori 0.71 e 0.93 per il PEG₅₀₀₀ e PEG₂₀₀₀ rispettivamente, ed è stato derivato da studi di caratterizzazione del *layer* polimerico superficiale¹²⁵).

La Tabella A3 riporta il confronto sui valori stimati e riscontrati dal saggio TBO, in cui è riscontrabile la sostanziale validità del modello, i valori riscontrati sono infatti sempre dello stesso ordine di quelli teorici.

Tabella A310: Riassunto test TBO e comparazione con dati teorici.

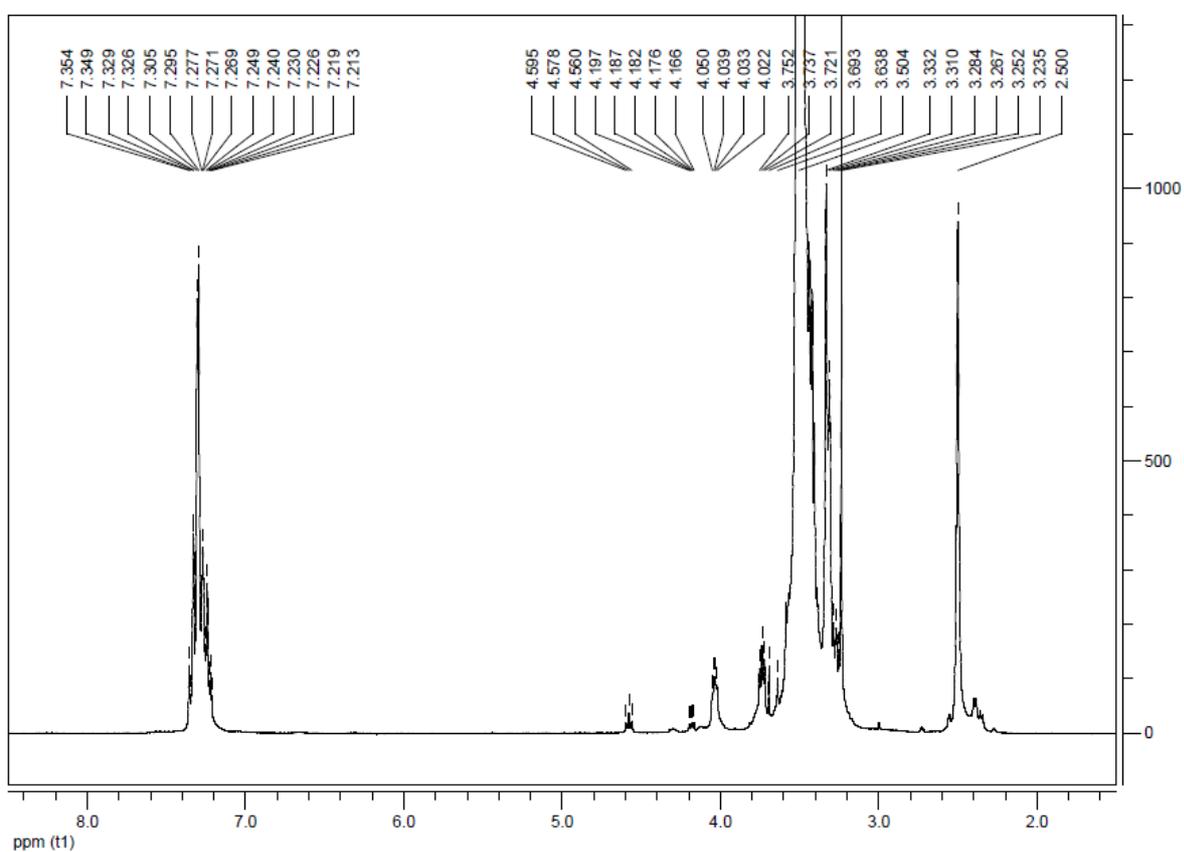
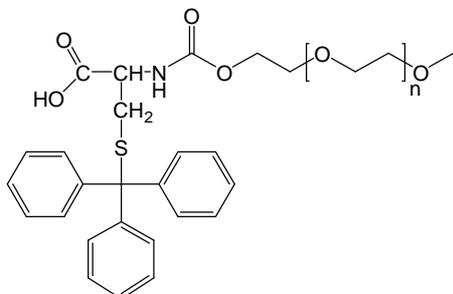
Campione:	Fraz. di ricoprimento di PEG ₅₀₀₀ -COOH predetta:	Densità superficiale di PEG ₅₀₀₀ -COOH predetta (N/nm ²):	Densità superficiale di PEO _{5kDa} -COOH da test TBO (N/nm ²):
1	0.00	0.00	0.00
2	0.25	0.20	0.18
3	0.50	0.41	0.36
4	0.75	0.62	0.54
5	1.00	0.82	0.71

Data la sostanziale validità riscontrata nel modello, esso è stato adottato per tutte le funzionalizzazioni impieganti la co-deposizione di una sonda e di un *backfiller*.

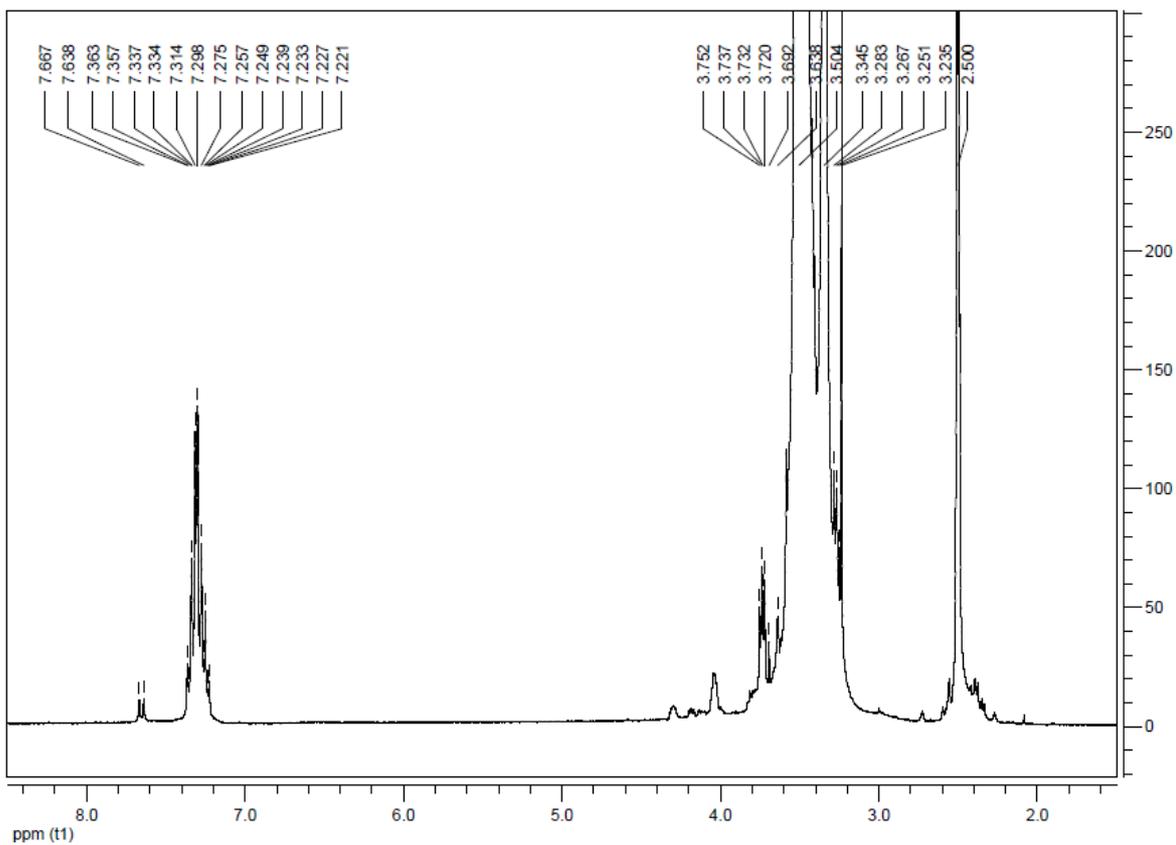
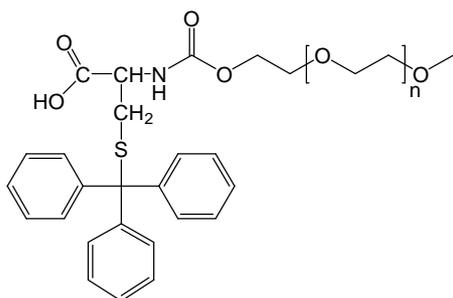
9.2. APPENDICE B – SPETTRI DI CARATTERIZZAZIONE DEI DERIVATI DEL PEG

9.2.1. Spettri ^1H NMR

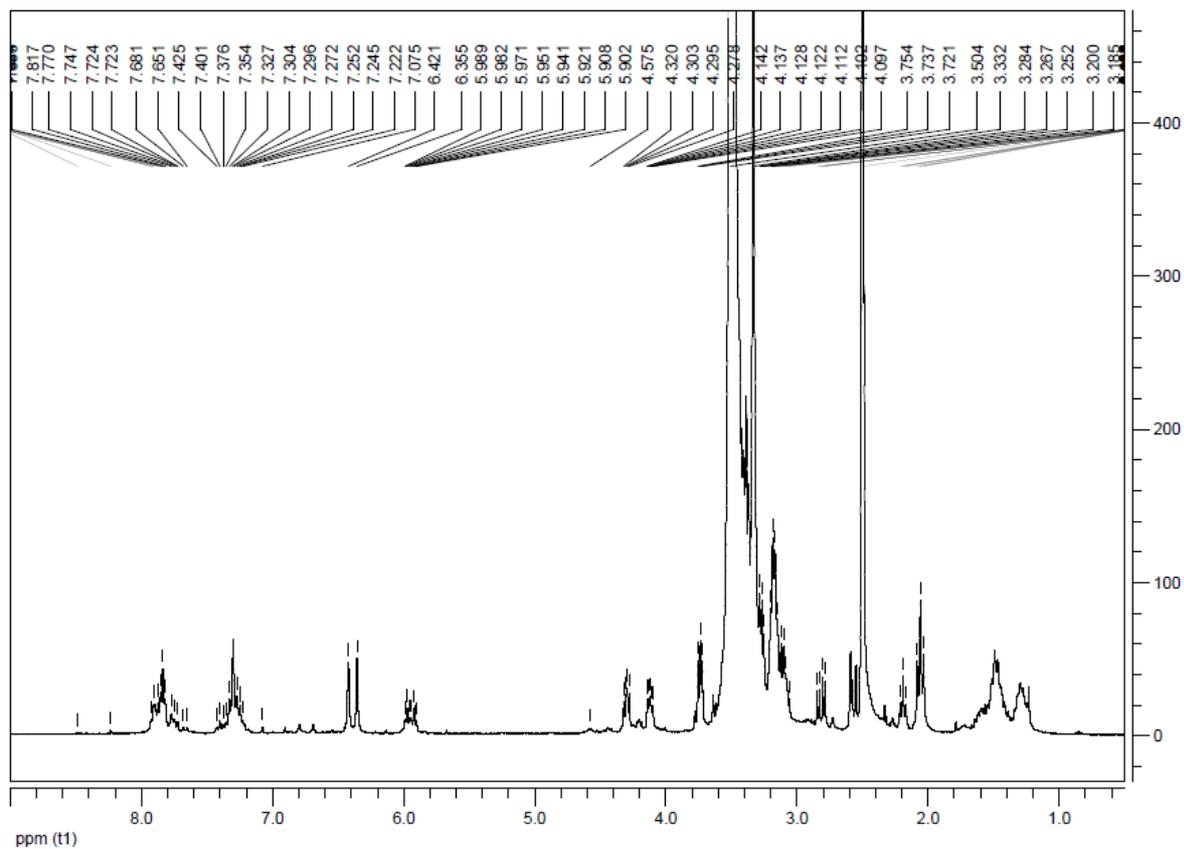
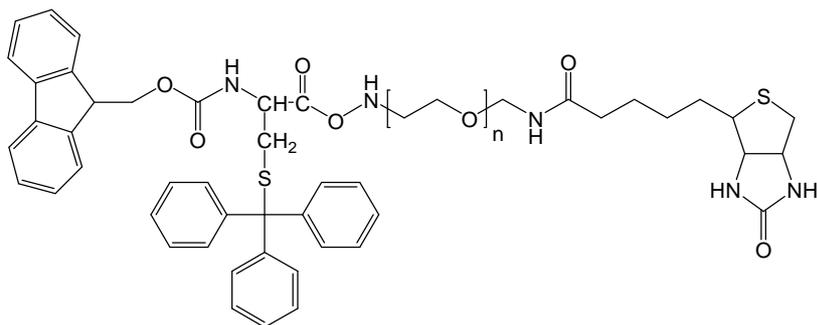
(I) (trt)Cys-mPEG₂₀₀₀



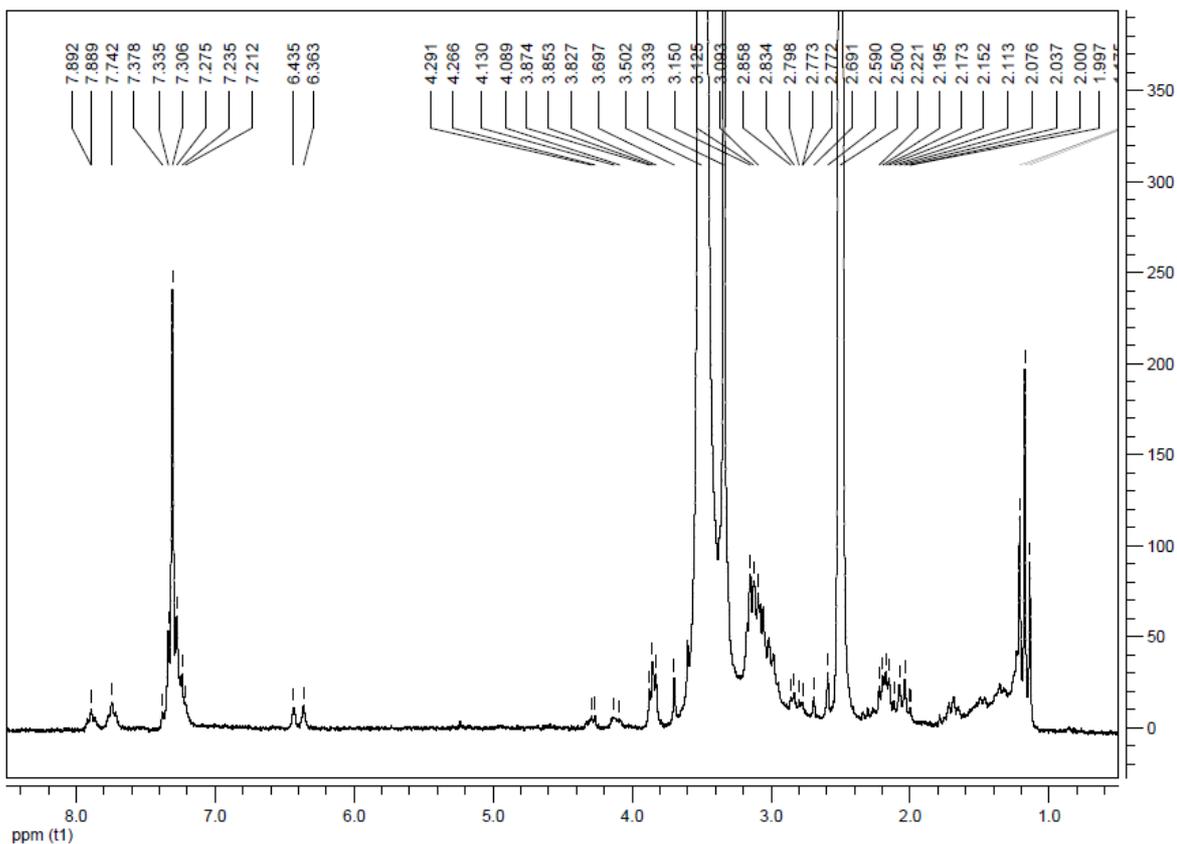
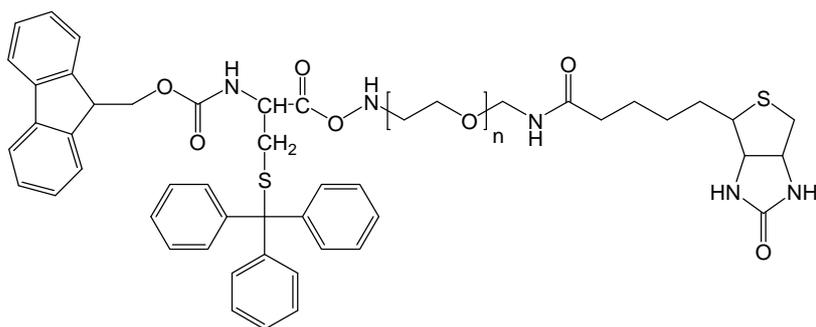
ppm	assegnazione
7.354 – 7.213	Gruppo tritile
3.737	Satellite PEG
3.504	Catena PEG
3.332	H ₂ O
3.267	Satellite PEG
3.235	Metossi-terminale del PEG
2.500	DMSO

(II) (trt)Cys-mPEG₅₀₀₀

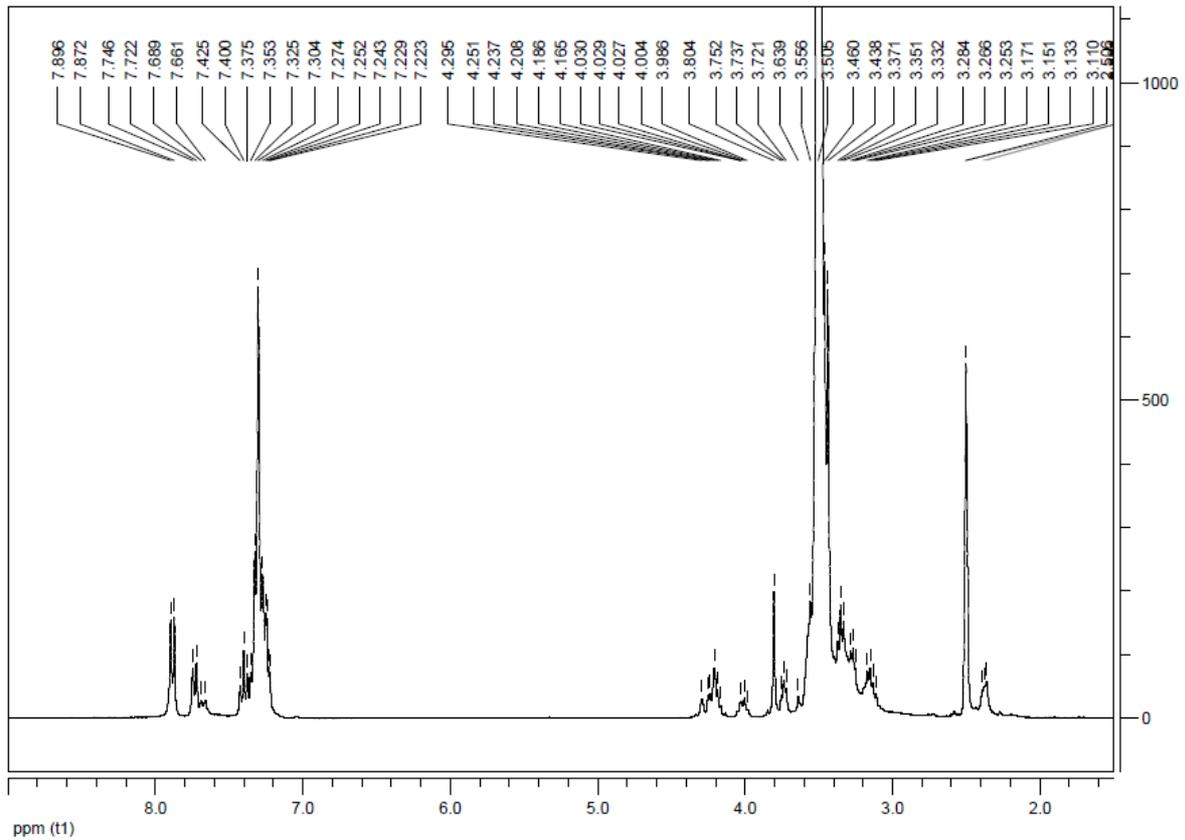
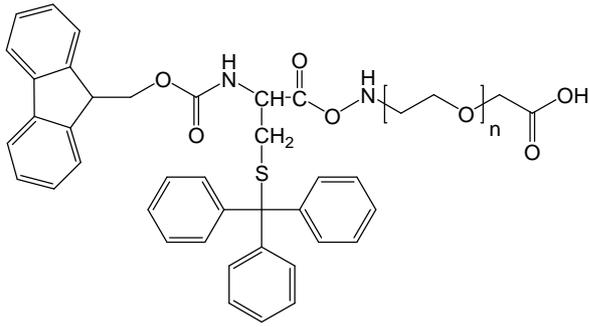
ppm	assegnazione
7.363 – 7.221	Gruppo tritile
3.737	Satellite PEG
3.504	Catena PEG
3.345	H ₂ O
3.267	Satellite PEG
3.235	Metossi-terminale del PEG
2.500	DMSO

(III) Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-biotina

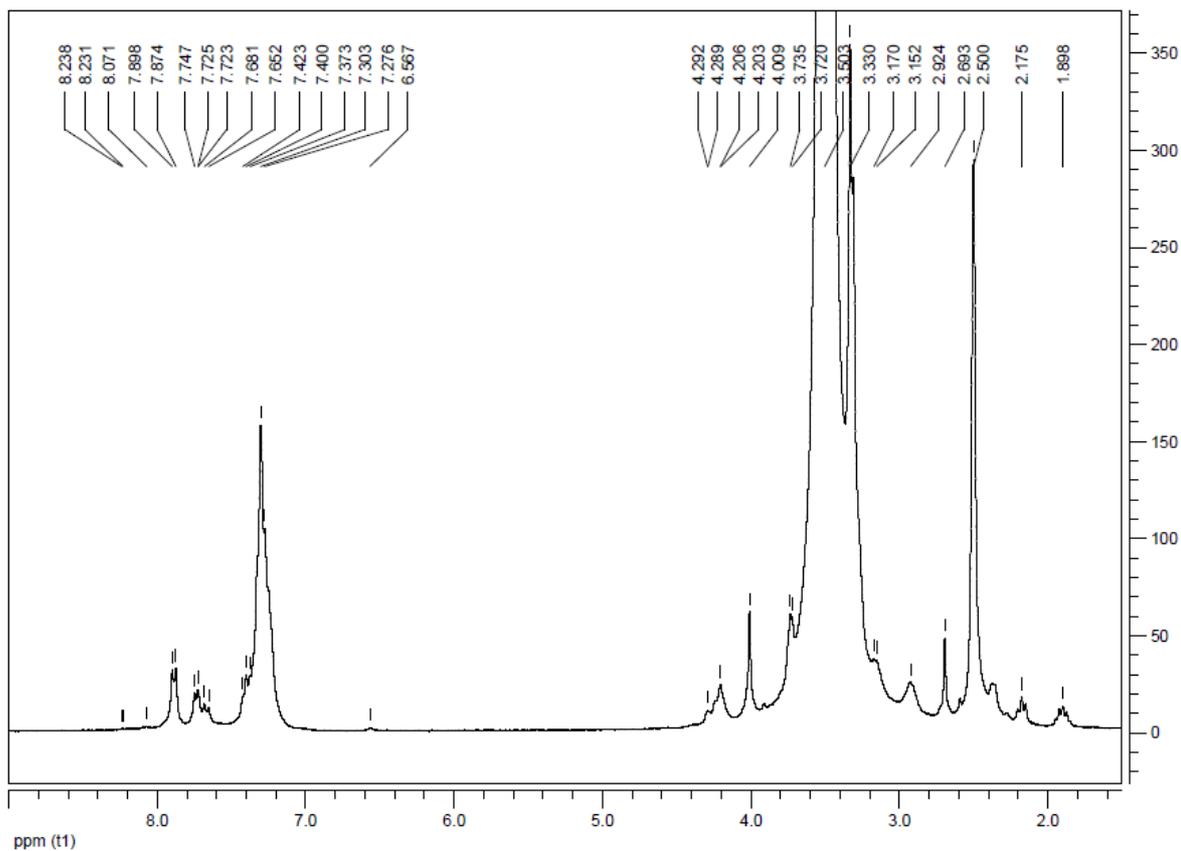
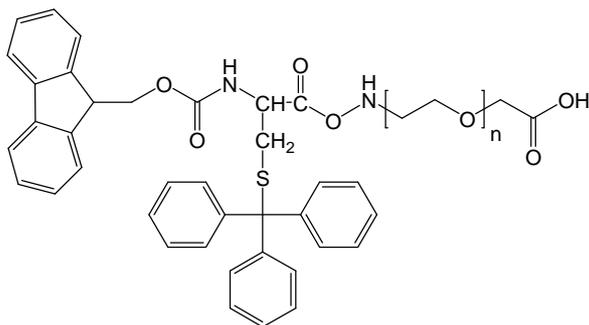
ppm	assegnazione
7.854 – 7.075	Gruppo tritile + Gruppo Fmoc
6.421 e 6.355	-NH-C=O-NH- in anello biotina
4.295 e 4.122	NH-CHR-CHR-NH congiunzione anelli biotina
3.737	Satellite PEG
3.504	Catena PEG
3.332	H ₂ O
3.267	Satellite PEG
2.500	DMSO

(IV) Fmoc-(trt)Cys-PEG₅₀₀₀-biotina

ppm	assegnazione
7.892 – 7.212	Gruppo tritile + Gruppo Fmoc
6.435 e 6.363	-NH-C=O-NH- in anello biotina
4.291 e 4.130	NH-CHR-CHR-NH congiunzione anelli biotina
3.853	Satellite PEG
3.505	Catena PEG
3.339	H ₂ O
3.150	Satellite PEG
2.500	DMSO

(V) Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-COOH

ppm	assegnazione
7.896 – 7.223	Gruppo tritile + Gruppo Fmoc
3.737	Satellite PEG
3.505	Catena PEG
3.332	H ₂ O
3.266	Satellite PEG
2.500	DMSO

(VI) Fmoc-(trt)Cys-PEG₅₀₀₀-COOH

ppm	assegnazione
7.898 – 7.276	Gruppo tritile + Gruppo Fmoc
3.735	Satellite PEG
3.503	Catena PEG
3.330	H ₂ O
3.170	Satellite PEG
2.500	DMSO

9.2.2. Spettri FPLC e MALDI

(V e VI) Fmoc-(trt)Cys-PEG₂ e 5 kDa-COOH

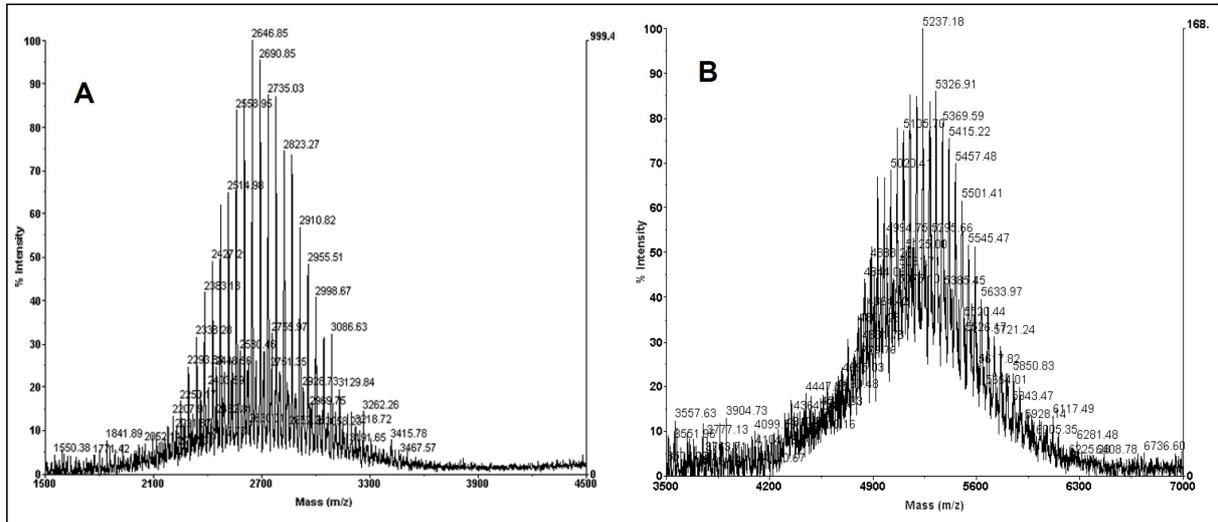


Figura B1: Spettri MALDI di Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-COOH (A) e Fmoc-(trt)Cys-PEG₅₀₀₀-COOH (B).

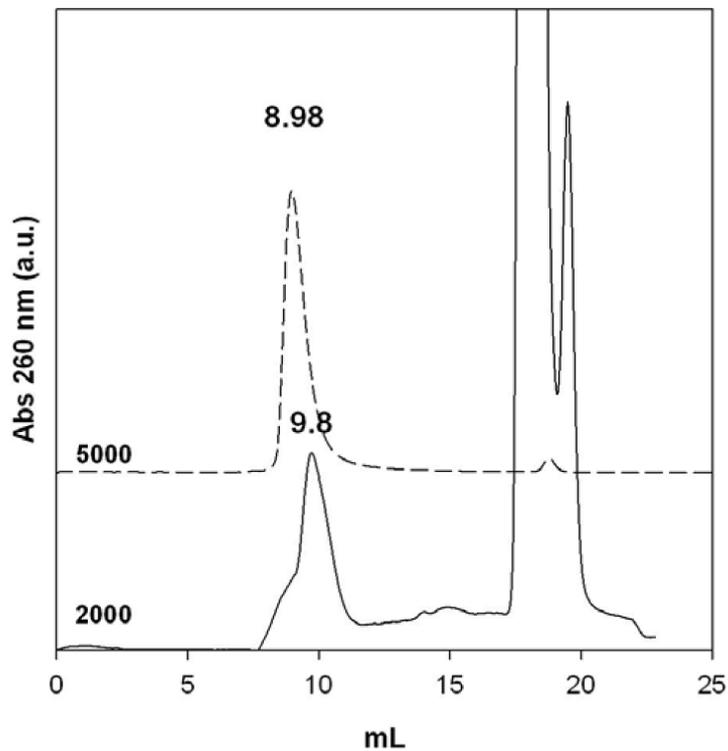


Figura B2: Cromatografia di gel filtrazione via FPLC di Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-COOH (linea continua) e Fmoc-(trt)Cys-PEG₅₀₀₀-COOH (linea tratteggiata) eluite con PBS in colonna Superdex Peptide (G.E Healthcare)

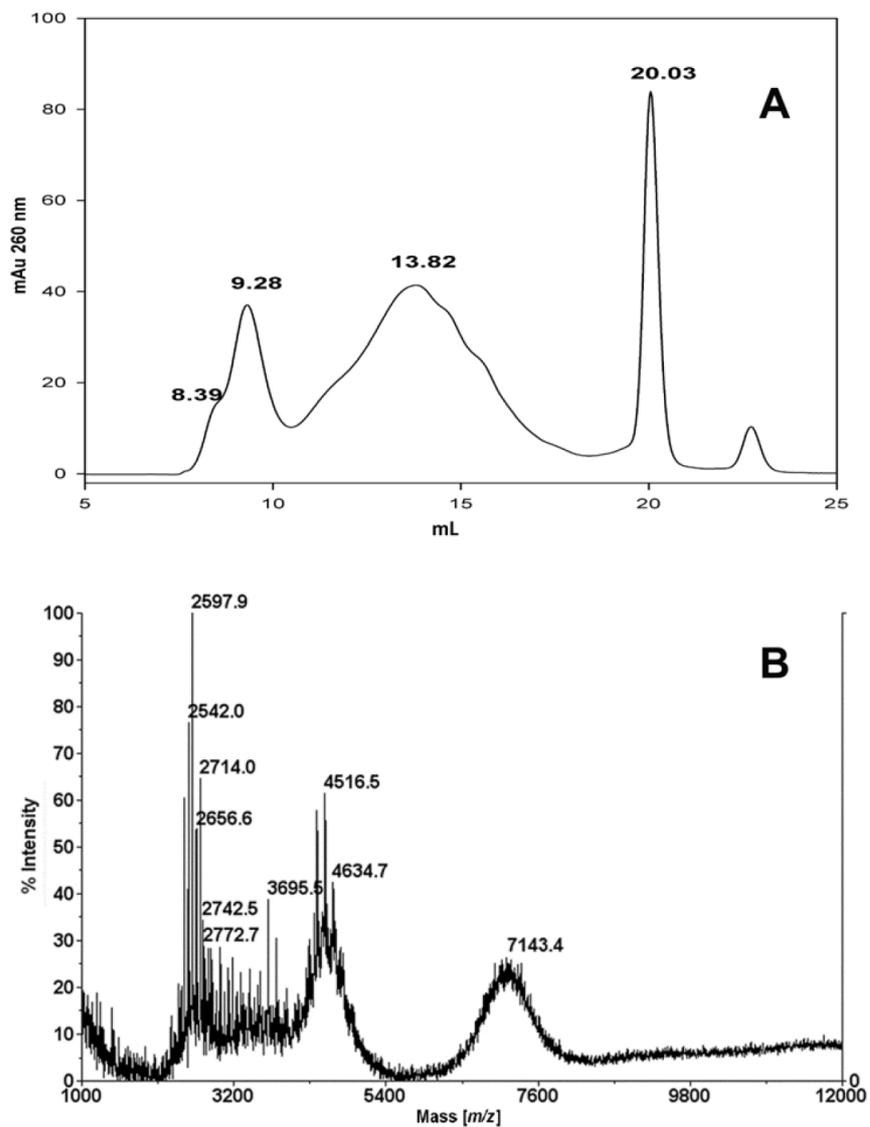
(VII) Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-PNA

Figura B3: Spettri di caratterizzazione del Residuo A ottenuto dalla coniugazione di PNA con Fmoc-(trt)Cys-PEG₂₀₀₀-COOH: cromatografia di gel filtrazione via FPLC con colonna Superdex Peptide **(A)** ed analisi di massa MALDI **(B)**.

9.3. APPENDICE C – SPETTRI FT-IRRAS

Legenda:

NP = superficie di controllo non funzionalizzata;

WP2 = superficie funzionalizzata con prodotto (1);

WP5 = superficie funzionalizzata con prodotto (2).

2h / 24h = tempi di incubazione della superficie nella soluzione di proteina di tipo e concentrazione riportata nei nomi dei rispettivi grafici

