



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Chimica e Tecnologie Sostenibili - CM7

Tesi di Laurea Magistrale

Sviluppo di una piattaforma biosensoristica per la rilevazione del marcatore tumorale h-uPA

Relatore

Dr. Federico Polo

Correlatore

Dr. Alessandro Angelini

Laureanda

Jessica Ghirardo

Matricola 857676

Anno Accademico

2019/2020

Abstract

La diagnosi precoce di forme tumorali è un fattore determinante per la cura di patologie oncologiche che richiede studi sempre più approfonditi e l'implementazione di strumenti analitici altamente performanti in termini di sensibilità, selettività e riproducibilità. Tra questi, i biosensori stanno dando risultati sempre più promettenti. Ad oggi, infatti, la presenza di diversi biomarcatori, fra cui quelli tumorali, viene rilevata efficacemente permettendo di diagnosticare eventuali neoplasie o di valutarne lo stato di avanzamento.

Il presente lavoro di tesi riguarda lo sviluppo di un biosensore elettrochimico per la rivelazione del marcatore tumorale h-uPA, sfruttando l'elevata affinità di due biorecettori peptidici biciclici (P_1 e P_2) sintetizzati ad-hoc per il riconoscimento del biomarcatore. Il biosensore si compone di una piattaforma costituita da microsferiche magnetiche funzionalizzate con P_1 e P_2 capaci di sequestrare h-uPA presente nel campione in esame. Successivamente, un anticorpo, anch'esso specifico per h-uPA viene introdotto nel sistema per creare un immunocomplesso. Infine, un secondo anticorpo, cui è legato l'enzima fosfatasi alcalina (ALP), viene fatto reagire con l'immunosensore per affinità con il precedente anticorpo. La rilevazione avviene attivando l'enzima fosfatasi alcalina con il proprio substrato (1-naftil fosfato) la cui conversione a prodotto viene seguita per via elettrochimica (voltammetria differenziale ad impulsi). Dal responso elettrochimico si può determinare la concentrazione di analita, h-uPA. Questo biosensore, attualmente testato su campioni sintetici, sarà presto utilizzato per testare campioni biologici reali quali siero e sangue.

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Il carcinoma mammario	1
1.2. Attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico umano (h-uPA)	3
1.3. Biosensori come tecnologia applicata in ambito oncologico	7
1.3.1. Tecniche voltammetriche	9
1.3.1.1. Elettrodi stampati (SPE, <i>Screen Printed Electrode</i>)	10
1.3.1.2. Voltammetria differenziale ad impulsi (DPV, <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)	12
1.3.2. Cenni storici	14
1.3.3. Biosensori e saggi immunologici	15
1.3.4. Peptidi come biorecettori per h-uPA	17
1.4. Scopo della tesi	20
2. Parte sperimentale	22
2.1. Reagenti e solventi	22
2.2. Strumentazione	23
2.3. Sintesi e caratterizzazione dei peptidi P ₁ e P ₂	24
2.4. Sviluppo della piattaforma biosensoristica	33
2.4.1. Funzionalizzazione delle MB con i peptidi P ₁ e P ₂	35
2.4.2. Assemblaggio della piattaforma biosensoristica	36
2.5. Svolgimento delle misure elettrochimiche	37
3. Risultati e discussione	40
3.1. L'immunocomplesso	40
3.2. Caratterizzazione degli SPE	41
3.3. Risultati delle misure elettrochimiche dell'immunocomplesso con il peptide P ₁	42
3.4. Risultati delle misure elettrochimiche dell'immunocomplesso con il peptide P ₂	48
3.5. Confronto dei risultati delle due piattaforme biosensoristiche	51
4. Conclusioni e prospettive	53
5. Bibliografia	55

1. Introduzione

1.1. Il carcinoma mammario

Il cancro al seno è una neoplasia che interessa il tessuto mammario e causa la crescita anomala ed incontrollata delle cellule della ghiandola mammaria. Si tratta di un tumore variabile in composizione, localizzazione e comportamento cellulare.

Una prima importante distinzione, dal punto di vista istologico, può essere fatta considerando le *forme invasive* e quelle *non invasive*. La *forma invasiva* consiste in un carcinoma in cui le cellule maligne sono in grado di estendersi oltre la regione di sviluppo iniziale mentre, in presenza della *forma non invasiva*, l'estensione dello stesso si limita alla regione di comparsa nel tessuto mammario. Si stima che il 75% dei casi totali di tale neoplasia siano di tipo *invasivo*.

L'avanzamento della neoplasia viene monitorato considerando i diversi stadi che ne caratterizzano lo sviluppo. Lo stadio iniziale (*stadio 1*) consiste nella comparsa delle prime cellule maligne. Quest'ultime, però, risultano ancora confinate nella parte di tessuto dove si sono sviluppate. Quando il tumore avanza e si estende oltre al tessuto adiposo del seno si parla di *stadio 2*. L'ulteriore progressione del tumore localmente, con il coinvolgimento anche di linfonodi sotto l'ascella oppure altri tessuti vicino al seno, consiste nello *stadio 3*. Infine, l'ultimo stadio (*stadio 4*) consiste nell'estensione della neoplasia anche in altre parti del corpo grazie alla migrazione cellulare nelle vie ematogene o linfatiche (metastasi). Le parti interessate subiscono un graduale mutamento delle normali funzioni biologiche.

Le cause di tale neoplasia sono molteplici e, spesso, comuni a tutte le altre forme tumorali. Fra le più comprovate vi sono l'obesità, l'esposizione a radiazioni ionizzanti, sviluppo precoce con la comparsa della prima mestruazione ed avere gravidanze in giovane o tarda età.¹ Per quanto riguarda, invece, lo sviluppo per geni ereditari, i casi attualmente registrati sono inferiori al 10%.²

Il processo di trasformazione di una normale cellula da strutturale a cancerosa richiede tempo (spesso decine di anni) ed il meccanismo non è, ad oggi, del tutto chiaro.

Pur essendo una forma tumorale che interessa solo la popolazione femminile, la neoplasia risulta comunque uno fra i tumori più frequenti e diagnosticati nel mondo. Il Global Cancer Observatory, GLOBOCAN, attraverso il programma CANCER TODAY, ha fornito una valutazione completa di tutte le neoplasie nel mondo nel 2020. Quest'analisi statistica su scala globale si basa su stime GLOBOCAN di incidenza, mortalità e prevalenza in 185 paesi o territori, per 36 tipi di cancro, suddivisi anche per sesso e fascia d'età.

Va comunque specificato che i dati risultano poco precisi in termini di qualità per quanto concerne i Paesi del terzo mondo.

In riferimento al tumore al seno, nel 2020 sono stati diagnosticati 2.261.419 di nuovi casi, ovvero 161.419 in più rispetto a quelli scoperti nel 2018. Inoltre, si tratta della neoplasia classificata come la principale causa di morte per cancro nelle donne in tutto il mondo. Infatti, nel solo anno 2020 sono stati registrati 684.996 decessi a causa di questa forma tumorale contro i 627.000 riscontrati nel 2018. Come si osserva in **Figura 1.1.**, i principali Paesi che hanno subito un graduale e consistente aumento dei casi di carcinoma mammario sono quelli più sviluppati (Stati Uniti, Europa Occidentale, Russia, Giappone, Australia), mentre una minore incidenza è registrata nei Paesi in via di sviluppo (Brasile, Messico, Algeria, Egitto, Sud Africa) ed ancor più inferiore in quelli del terzo mondo (Zambia, Madagascar, Mozambico, Bolivia, India, Nepal, Yemen).³

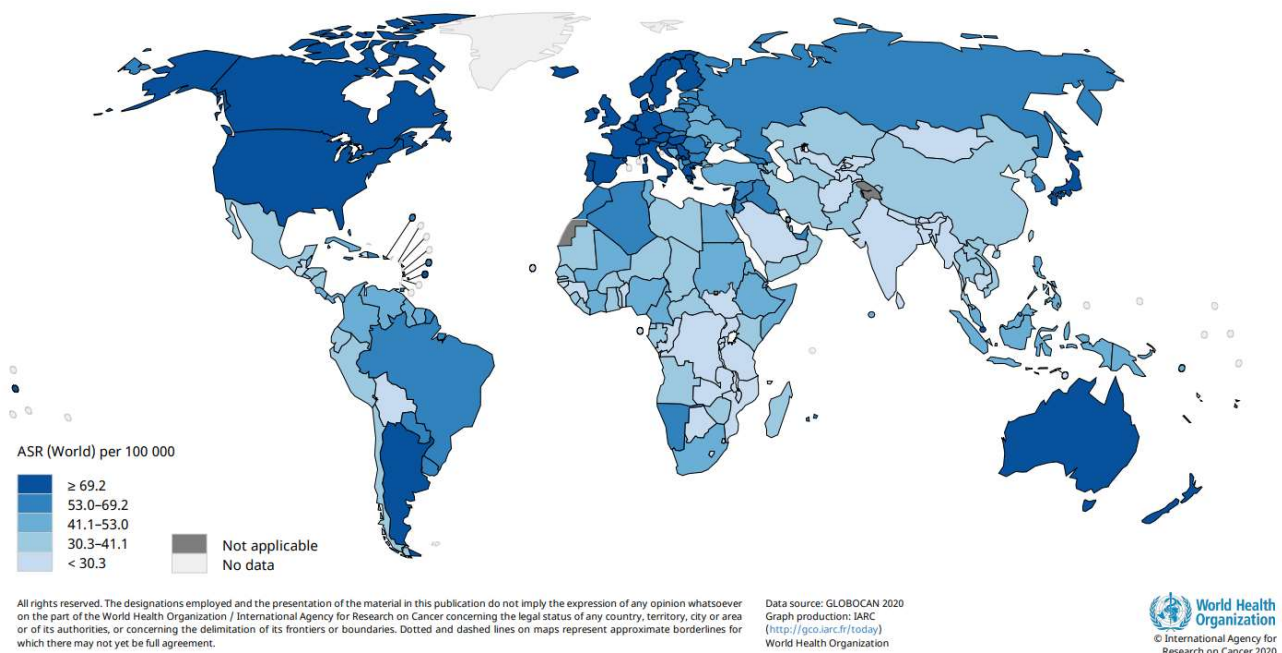


Figura 1.1. Mappatura globale dei tassi di incidenza, standardizzati per età, stimati nel 2020 in riferimento al carcinoma mammario.³

Per quanto riguarda la situazione italiana, nel 2020, l'Associazione Italiana Oncologica Medica (AIOM) ha registrato 376.611 nuovi casi di tumori, di cui il 14.6 % (54.976 casi) corrispondono a tumori al seno. Tale numero è in progressivo aumento, come dimostrato dal numero di casi totale del 2019 (53.800 casi) contro quelli del 2018 (52.800), del 2017 (50.600 casi) e del 2016 (48.758 casi).⁴ Oltre ad essere uno tra i più diffusi, è probabilmente anche la forma tumorale più riscontrata e studiata sin dai tempi meno recenti per la sua facile individuazione attraverso la palpazione, nei casi meno gravi, o per la sua visibilità esterna sotto forma di ulcerazioni e di necrosi, nei casi più gravi.

Il documento più antico che tratta tale neoplasia risale, infatti, al 1600 a.C. in Egitto, noto come il “Papiro Edwin Smith”. In questo scritto è riportata una descrizione dettagliata di otto donne nelle quali erano state identificate ulcerazioni della mammella trattate attraverso cauterizzazione.⁵

Fra le soluzioni ad oggi adottate, per i soggetti affetti da carcinoma mammario, vi sono la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e la terapia mirata. Importanti ai fini della prevenzione sono, inoltre, le mammografie periodiche e gli screening.

La diffusione di nuove tecnologie per la diagnostica ed i continui progressi delle terapie hanno consentito una progressiva diminuzione della mortalità per tumore al seno, dalla fine degli anni Novanta ad oggi (-0,8% per anno).⁶ Ciò nonostante, è possibile confermare che, dai dati dell’International Agency for Research on Cancer (IARC), negli ultimi cinquant’anni i tassi di incidenza sono aumentati progressivamente nei Paesi con redditi più alti e, solo recentemente, anche nei Paesi a basso reddito.³

È evidente che la situazione globale renda necessario approfondire ed investire sullo sviluppo di nuove metodologie, tecnologie e terapie che permettano la diagnosi precoce di queste patologie. Trattandosi di malattie degenerative, le probabilità di sopravvivenza sono dipendenti dal tempo. Una diagnosi affidabile che permetta di individuare i primi stadi della malattia permette, quindi, di sviluppare una prognosi efficace per pianificare un corretto trattamento della malattia.

Quando si fa riferimento ad un tumore, si valuta *in primis* quanto questo si sia esteso nei vari tessuti del corpo umano. I metodi diagnostici utilizzati convenzionalmente, come per esempio X-ray imaging, tomografia e biopsia, vengono solitamente impiegati per stadi avanzati del tumore o per casistiche in cui lo stesso risulta già formato. Con l’avanzare delle biotecnologie, ci si è focalizzati sempre di più sull’investigazione dei marcatori tumorali, siano essi proteine, frammenti di DNA, mRNA che, durante lo sviluppo della neoplasia, vengono prodotti ed escreti dalle cellule entrando in circolo nel sistema sanguigno. Grazie a questi elementi biologici è possibile, oltre che rilevare la presenza del carcinoma, analizzarne il livello di avanzamento e la capacità di crescita.

1.2. Attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico umano (h-uPA)

Fra i numerosi biomarcatori tumorali per la diagnosi e lo studio del tumore al seno, si distingue l’attivatore del plasminogeno di cui esistono due forme: quello tissutale (tPA) e quello urochinasico (uPA). Il primo è un enzima coinvolto nella formazione di plasmina in ambito di fibrinolisi nei vasi sanguigni. Il secondo consiste in una proteasi serina, appartenente alla classe degli enzimi idrolasi, naturalmente presente nell’uomo (h-uPA) ed in altri animali.

Questa fu isolata per la prima volta in un campione di urina umana nel 1947 dagli scienziati McFarlane e Pilling. Con il progredire degli studi, si scoprì la sua presenza anche nel sangue e nella componente extracellulare di numerosi tessuti del corpo umano.

La proteasi h-uPA è secreta nelle cellule sotto forma di zimogeno inattivo (pro-uPA). La forma attiva della proteasi può, però, catalizzare e favorire la conversione del plasminogeno, presente nella sua forma zimogena inattiva, in plasmina. Quest'ultima consiste in un enzima proteolitico, in grado di distruggere o rimodellare le proteine che costituiscono la matrice extracellulare (ad esempio la fibrina, la fibronectina, la laminina e la vitronectina) e generare, di conseguenza, una zona in cui il processo di espansione delle cellule tumorali risulta favorito. La plasmina è, perciò, un elemento fondamentale per la biologia tumorale.^{7,8}

A favorire la conversione del plasminogeno in plasmina, vi sono, inoltre, altri cofattori che assieme alla proteasi serina formano il sistema di attivazione del plasminogeno (PA). Questi sono il recettore di membrana UPAR e due proteasi-inibitori, PAI-1 e PAI-2. Il primo elemento consiste in una glicoproteina composta da tre domini identici (D1, in cui si forma il legame specifico con il terminale amminico di h-uPA, D2 e D3) ed è ancorato alla membrana extra-cellulare, o ECM, attraverso un particolare glicolipide, il glicosilfosfatidilinositolo o ancora GPI. UPAR forma un legame specifico con h-uPA ed è fondamentale per la conversione del plasminogeno. (**Figura 1.2**)

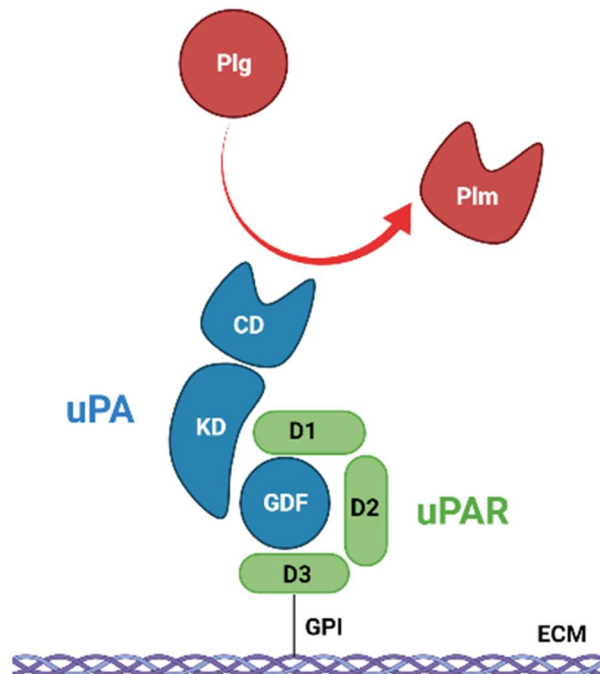


Figura 1.2.Raffigurazione del sistema PA con specificati i vari domini di composizione. Il dominio EFG-like (GDF), il dominio Kringle (KD) ed il dominio catalitico (CD) per la parte costituente la proteasi h-uPA. I domini strutturali D1, D2 e D3 del recettore di membrana uPAR. L'ancora GPI che collega il recettore alla matrice extracellulare (ECM). Una volta che uPA è legato al suo recettore è in grado di effettuare tagli proteolitici nella struttura del plasminogeno (Plg) e convertirlo in plasmina (Plm). Immagine creata con BioRender.com.

Dal punto di vista strutturale h-uPA consiste in una glicoproteina costituita da 411 amminoacidi (**Figura 1.3**).¹¹



Figura 1.3.Struttura 3D dell'h-uPA (in verde).¹¹

Come rappresentato in **Figura 1.2**, all'interno della struttura di uPA, si identificano tre *domini* distinti dal punto di vista strutturale e funzionale. Il primo è un dominio simile al dominio EFG (*Epidermal Growth Factor Domain*) chiamato per questo “*EGF-like*” o GDF, *Growth Factor Domain*, (aa 1-45). Esso è responsabile del legame specifico al recettore uPAR. Adiacente a quest'ultimo è presente il dominio “*kringle*” (KD, aa 45-135), il quale permette tutte le interazioni con le proteine della matrice extracellulare. Infine, il *dominio catalitico* (CD, aa 158-411), coinvolto nell'attività proteolitica di superficie, è separato dal dominio “*kringle*” attraverso un peptide (aa 135-158) all'interno del quale è presente il sito di attivazione del proenzima.^{12,13}

L'attivazione di h-uPA avviene attraverso la scissione del legame peptidico (tra Lys158-Ile159 in h-uPA). Tale processo può essere causato dall'attività catalitica di varie proteasi presenti in contemporanea alla pro-uPA, come per esempio l'elastasi e la trombina, oppure dalla stessa plasmina. Ciò che si forma sono due catene polipeptidiche unite da un ponte disolfuro. La prima catena (aa 1-158) è una catena a basso peso molecolare (18 KDa) e comprende la porzione ammino-terminale ed il dominio *EGF-like*. Tramite questo dominio la proteasi si attacca al suo recettore di membrana UPAR. La seconda (aa 159-411), di circa 33 KDa, contiene la componente carbossilica terminale ed il dominio catalitico (**Figura 1.2**).¹²

La proteina nella sua integrità è anche chiamata HMW-uPA (o uPA ad alto peso molecolare) e può essere ulteriormente trasformata nella sua forma a basso peso molecolare (o LMW-uPA) mediante scissione della catena a basso peso molecolare ed ottenendo un'altra catena corta ed un frammento amminoterminale.

Fra le varie funzionalità del sistema PA e, in particolare della proteasi serina, si sottolineano la capacità di stimolare crescita, motilità, adesione cellulare e trascrizione di specifici geni attraverso la generazione della plasmina. Dunque, è possibile stabilire che l'incrementata produzione di urochinasi e del suo recettore da parte di cellule tumorali nell'organismo possano aumentare il grado di invasività del tumore stesso. Questo fenomeno è spiegabile dal fatto che, con la conversione del plasminogeno in plasmina, i tessuti diventano più deboli e facilmente attaccabili, provocando l'insorgere ed il velocizzarsi della fase metastatica.

Non a caso è stata dimostrata una correlazione diretta tra un'elevata concentrazione della proteasi serina e la neoplasia. L'espressione del gene che codifica uPA (PLAU) è, infatti, molto bassa nelle cellule sane, mentre in quelle cancerose cresce notevolmente. La trascrizione del gene PLAU è regolata e mediata in base allo stato cellulare. Ogni variazione dal punto di vista strutturale della cellula o l'eventuale presenza di altri elementi extracellulari (ormoni, fattori di crescita, etc.) comportano la produzione di un maggior quantitativo di uPA.¹⁴

Come specificato, la concentrazione permette di ottenere informazioni sia sulla presenza del tumore sia sul relativo grado di avanzamento. Da uno studio tedesco del 2018 svolto su un campione di 252 pazienti, è possibile identificare un intervallo di concentrazione ematica di h-uPA compreso tra 0.21-16.06 ng/mL.⁸

Inoltre, h-uPA ha la capacità di sostenere il fenotipo maligno in vari modi. Anzitutto, operando la degradazione della matrice extracellulare, permette l'espansione del tumore. È altresì capace di stimolare la motilità cellulare, aumentando così le probabilità di distacco di cellule maligne del tumore primario. Infine, essendo in grado di proteggere le cellule dall'apoptosi, favorisce la sopravvivenza anche delle cellule malate.

Il recettore uPAR, a sua volta, oltre a concentrare l'attività proteolitica di h-uPA sulla superficie cellulare, è un mediatore di vari effetti sulla crescita, sulla motilità e sull'apoptosi della cellula. L'ancoraggio della proteasi incentiva anche le relative capacità catalitiche per l'attivazione del plasminogeno, grazie alla sua capacità di legarsi con elementi proteici tra cui, per esempio, anche i peptidi.¹⁵

L'uPA è stata negli anni sempre più l'oggetto di studi in cui sono stati analizzati e testati inibitori di tale enzima, come agenti antitumorali, e l'impiego della proteasi stessa al fine di riconoscere e diagnosticare varie tipologie di neoplasie ad essa correlate. Come sopra anticipato, la presenza eccessiva della proteasi h-uPA può, infatti, aumentare la capacità invasiva del tumore attraverso una maggiore espansione, crescita e/o motilità.

Tuttavia, si sono manifestate numerose complicazioni negli studi clinici. Ad esempio, essendo l'urochinasi utilizzata anche dalle cellule sane del corpo umano per il rimodellamento dei tessuti e la crescita dei vasi sanguigni, si rende necessaria una distinzione delle caratteristiche dell'urochinasi associata al cancro rispetto a quelle dell'urochinasi associata alle cellule normali. Inoltre, non aiuta la notevole incompatibilità tra il corpo umano e quello murino, sul quale si basano la gran parte dei test di laboratorio.^{9,10,14,16}

Le tipologie di neoplasie correlate ad h-uPA sono molteplici. Oltre che nel tumore al seno, h-uPA è presente anche nella manifestazione di tumori alla tiroide, all'ovaio,¹⁷ alla vescica,¹⁸ al pancreas,¹⁹ ai polmoni²⁰ ed a cellule squamose del capo e del collo.²¹

1.3. Biosensori come tecnologia applicata in ambito oncologico

La IUPAC definisce il biosensore come “un dispositivo analitico in grado di convertire un'attività biologica in un segnale misurabile (elettrico, ottico, acustico), mediante l'integrazione tra un elemento biologico sensibile con un sistema strumentale di trasduzione, acquisizione e analisi dati”.²²

Un biosensore è, dunque, un dispositivo integrato, ad elevata specificità e sensibilità, per la rilevazione e lo studio di analiti in matrici semplici e complesse. Esso è costituito da due componenti principali: un sistema di riconoscimento specifico per l'analita che si vuole investigare ed un sistema di trasduzione il cui scopo è di trasformare l'evento di riconoscimento in un segnale misurabile dal quale è possibile ricavare informazioni di tipo quantitativo o semi quantitativo (**Figura 1.4**).

Per quanto riguarda il sistema di riconoscimento molecolare, questo è chiamato recettore e consiste in un elemento che presenta un'elevata affinità per una specifica molecola (analita), semplice o complessa. Il recettore forma lo strato di riconoscimento molecolare sulla superficie del trasduttore e modifica la natura di quest'ultimo al fine di creare una piattaforma a sua volta integrata con il sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati. Esempi di recettori biologici sono peptidi, enzimi, anticorpi, aptameri e ss-DNA.

L'interazione tra l'analita ed il recettore viene correlata a variazioni di massa, calore, correnti o indici di rifrazione. Quest'ultimi sono successivamente convertiti in un segnale elettrico o ottico dal trasduttore. Il segnale viene, infine, amplificato ed elaborato, al fine di acquisire un'informazione facilmente accessibile all'operatore.

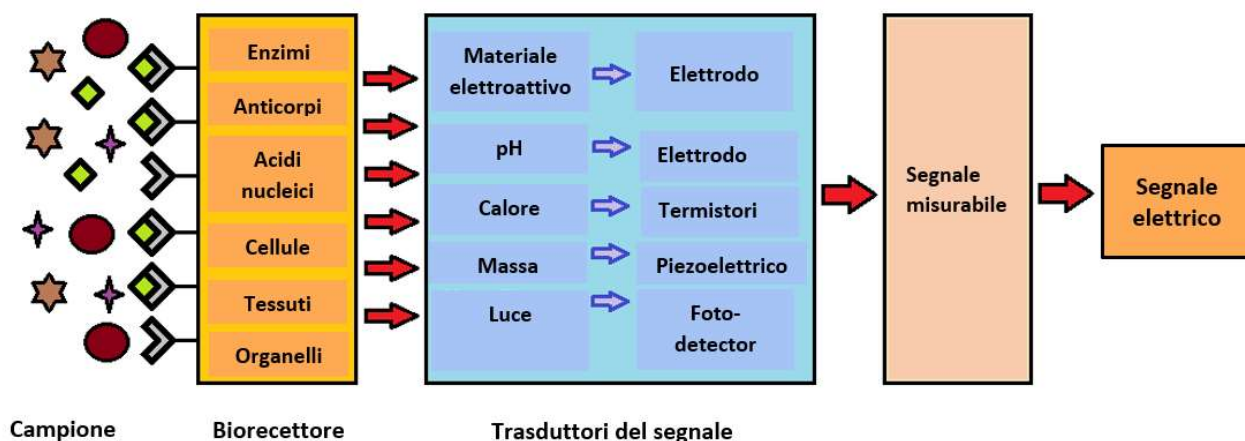


Figura 1.4. Schema a blocchi di un biosensore con suddivisione e descrizione delle singole componenti. Ad ogni variazione dell'ambiente di reazione corrisponderà uno specifico metodo di rilevazione. Immagine realizzata con BioRender.com.

Essendo l'interazione analita-recettore fondamentale per lo sviluppo di piattaforme biosensoristiche, è implicito che una costante di affinità elevata fra i due elementi sia un fattore determinante per un'ottimale rilevazione dell'analita.²³

Il trasduttore ha, quindi, il compito di convertire un cambiamento osservabile, chimico o fisico, in un segnale analitico misurabile (elettronico, ottico, optoelettronico, etc.), la cui ampiezza o intensità è proporzionale alla concentrazione della specie chimica in investigazione.²⁴

I trasduttori si possono raggruppare in diverse categorie: elettrochimici, ottici, acustici, magnetici, piezoelettrici e termici. Tra questi, quelli elettrochimici si contraddistinguono per una combinazione di vari parametri, tra cui il basso costo e la facilità di produzione, grazie agli avanzamenti tecnologici in elettronica e microelettronica, alla loro sensibilità, con limiti di rilevazione della concentrazione con range di 10^{-8} – 10^{-10} M, ed alla possibilità di effettuare analisi quantitative e semi-quantitative.

Nel caso di biosensori elettrochimici, l'analita interagisce selettivamente con l'elemento biologico, ad esempio un enzima, immobilizzato sulla superficie del trasduttore (elettrodo). A seguito di tale interazione, si forma un prodotto elettroattivo che diffonde verso la superficie dell'elettrodo generando un segnale misurabile correlato alla concentrazione dello stesso analita.²⁵

Altra caratteristica del recettore è che quest'ultimo, dovendo garantire un'elevata selettività nei confronti dell'analita (**Figura 1.5**) ed un corretto svolgimento delle misure, deve essere saldamente ancorato sulla superficie del trasduttore. Il recettore, per esempio, può essere inglobato all'interno di una matrice polimerica, potrebbe andare a reagire con particolari gruppi funzionali con cui la superficie elettrodica è stata opportunamente funzionalizzata oppure potrebbe essere adsorbito direttamente sulla superficie del trasduttore.²⁶

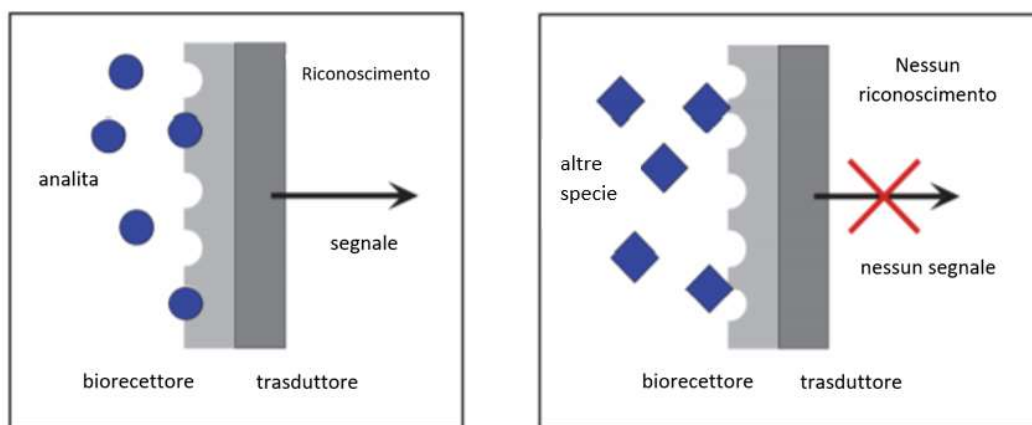


Figura 1.5.Rappresentazione schematica di un biosensore. Si nota come il biorecettore risulti sensibile verso uno specifico analita (figura a sinistra), mentre gli altri non daranno nessun tipo di interazione (figura a destra) e quindi nessun segnale.²⁶

Un biosensore è definito come tale in base ad una serie di caratteristiche che deve possedere. Come prima cosa, esso deve essere selettivo nel riconoscimento dell'analita. Il dispositivo deve anche presentare una buona sensibilità e riuscire a fornire un segnale misurabile e significativo del campione. Inoltre, è importante che il limite di rilevabilità, LOD (*limit of detection*) sia quanto più basso possibile. Infine, lo stesso deve garantire una sufficiente riproducibilità delle misure.²⁷

Grazie alla notevole varietà di recettori utilizzabili, gli ambiti di applicazione dei biosensori sono svariati e competono in ambiti multidisciplinari. In particolare, però, giocano un ruolo fondamentale nelle diagnosi cliniche, in quanto sono in grado di ridurre notevolmente costi, tempi e semplificare i test clinici. Va ricordata, infatti, la capacità di tale tecnologia di essere versatile e adatta per analisi di matrici complesse quali sangue, tessuti biologici etc.

In generale, la combinazione dell'elevata specificità dei biorecettori e l'accuratezza delle componenti elettroniche consentono di modificare e migliorare radicalmente i metodi analitici attraverso l'utilizzo di dispositivi a basso costo che forniscono un responso rapido e facilmente interpretabile dall'operatore.

1.3.1. Tecniche voltammetriche

Fra le metodologie elettrochimiche, quelle che fanno uso delle tecniche voltammetriche si basano sulla misurazione di variazioni di intensità di corrente nel tempo in funzione di un potenziale applicato all'elettrodo lavorante (*Working Electrode, WE*). A differenziare le varie tecniche voltammetriche è

la funzione d'onda del potenziale applicato. La procedura standard per misure di tipo voltammetrico prevede l'uso di una cella elettrochimica a tre elettrodi collegata ad un potenziostato. Gli elettrodi utilizzati sono: un elettrodo di lavoro (WE), alla superficie del quale avvengono le reazioni di ossidazione/riduzione che vengono registrate; un contro elettrodo (CE), che assieme a WE chiude il circuito elettrico all'interno della cella; un elettrodo di riferimento (RE), collegato con WE attraverso un circuito ad alta impedenza per evitare di modificarne il potenziale che rimane quindi noto e costante, e funge appunto da riferimento interno.

Tra WE e CE viene applicato un potenziale variabile nel tempo secondo una certa funzione. La corrente misurata al WE (I_{tot}) è data dalla somma del contributo capacitivo (I_c) e di quello faradico (I_f) come descritto nell'**Equazione 1**.

$$I_{tot} = I_f + I_c$$

Equazione 1

Le correnti capacitive sono dovute all'attrazione ed all'accumulo di cariche tra la superficie elettrodica e la soluzione. Le correnti faradiche, invece, sono generate dallo scambio di elettroni con le specie elettroattive in soluzione e sono correlate direttamente alla quantità di tali specie secondo la legge di Faraday.

Nel presente lavoro di tesi la tecnica voltammetrica utilizzata è la voltammetria differenziale ad impulsi (DPV, *differential pulse voltammetry*) con l'ausilio di elettrodi stampati su supporto rigido (SPE, *screen-printed electrode*). Il metodo voltammetrico impiegato è descritto nei paragrafi successivi.

1.3.1.1. Elettrodi stampati (SPE, *Screen Printed Electrode*)

Negli ultimi anni sono state sviluppate e validate una serie di metodologie analitiche che impiegano strumentazioni portatili di tipo elettrochimico.²⁸ Alcune di queste fanno uso di elettrodi stampati su supporto, noti come SPE (dall'acronimo inglese *screen-printed electrode*).

Gli SPE sono stampati con metodi serigrafici con vari tipi di inchiostri su superfici di plastica, carta o ceramica (**Figura 1.6**). Il supporto deve essere inerte e favorire la stabilizzazione degli inchiostri.

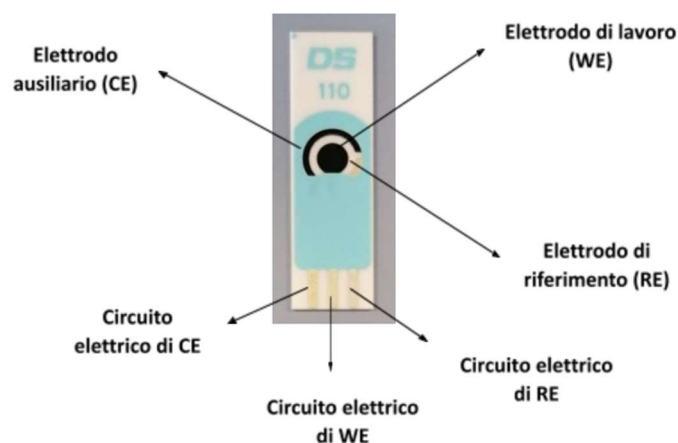


Figura 1.6.Elettrodo SPE in grafite utilizzato per le misure elettrochimiche con indicate le varie componenti elettrodiche.

Una volta stampati gli elettrodi, le tracce per il collegamento elettrico vengono isolate con uno speciale rivestimento, di solito polimerico, per evitare cortocircuiti una volta immersi nelle soluzioni in esame.

Gli SPE sono componenti relativamente economiche e grazie alla miniaturizzazione del sensore elettrochimico, permettono di lavorare con volumi minimi di campione, nell'ordine dei microlitri, e di sviluppare piattaforme portatili ideali per analisi *in situ*.²⁹ Questa tecnologia può essere, infatti, collegata direttamente ad un potenziostato portatile.

Come mostrato in **Figura 1.6**, gli SPE sono caratterizzati da WE, dall'elettrodo di riferimento (RE) e dal contro elettrodo (CE) come una tradizionale cella a tre elettrodi.

Gli SPE hanno un'ottima versatilità data la possibilità di variarne le componenti (es. materiali degli inchiostri). Fra i più comuni vi sono gli elettrodi stampati con inchiostri a base di grafite, ma sono molto diffusi anche quelli a base di oro e argento, utilizzati per lo più nella determinazione di metalli in matrici ambientali.³⁰

Gli SPE sono generalmente impiegati in analisi elettrochimiche di matrici complesse e multivariate ed in ambiti di applicazione molteplici, come per esempio in analisi cliniche, ambientali, chimiche, biologiche etc.

Infine, si deve menzionare il recente sviluppo di metodologie innovative che permettono, oltre che il recupero delle componenti di elettrodi SPE già utilizzati, anche una loro produzione attraverso materiali di scarto e riciclati (CD, DVD, circuiti stampati, batterie esaurite, etc.) e materiali rinnovabili (cellulosa, carta, etc.). Tale aspetto è fondamentale considerando la natura monouso degli elettrodi SPE ed il quantitativo ingente di rifiuti che ne consegue.³¹

1.3.1.2. Voltammetria differenziale ad impulsi (DPV, *Differential Pulse Voltammetry*)

Nella voltammetria differenziale ad impulsi (DPV acronimo per *differential pulse voltammetry*) si applica tra WE e CE una serie di impulsi di potenziale, con durata ed ampiezza costanti.^{32,33} Come indicato in **Figura 1.7**, per ogni impulso di potenziale applicato, l'intensità di corrente è campionata due volte: prima dell'applicazione dell'impulso, $I_1(t)$, ed un momento prima che questo termini $I_2(t_i)$.³⁴ In questo modo, per ogni valore di corrente misurato, il contributo di corrente faradica è massimizzato rispetto a quello di corrente capacitiva, essendo quest'ultimo minimo in entrambi i punti di campionamento e decadendo la corrente capacitiva molto più velocemente rispetto a quella faradica.

Grazie all'applicazione differenziale degli impulsi è possibile ridurre la corrente capacitiva apportando contributi trascurabili da parte di quest'ultima sulla corrente registrata.³⁵

L'intensità di corrente $I_1(t)$ è strumentalmente sottratta da $I_2(t_i)$ e la differenza (Δi) è riportata, in funzione del potenziale applicato, nel voltammogramma risultante al termine dell'esperimento.

(**Equazione 2**)

$$\Delta I = I_2(t_i) - I_1(t)$$

Equazione 2

Quest'ultimo consiste in un grafico, come quello rappresentato in **Figura 1.7**, in cui vengono rappresentati dei picchi di corrente simmetrici la cui altezza (I_p) è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in oggetto di studio ed è descritta dall'**Equazione 3**.

$$I_p = \frac{nFAD^{\frac{1}{2}}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right)$$

Equazione 3

dove $\sigma = e^{\left(\frac{nF}{RT}\right)\left(\frac{\Delta E}{2}\right)}$, n è il numero di elettroni coinvolti nel processo di ossido-riduzione, F è la costante di Faraday, A è la superficie dell'elettrodo, D è il coefficiente di diffusione dell'analita nel mezzo utilizzato, C è la concentrazione dell'analita, t_m è il tempo (s), ΔE è l'ampiezza dell'impulso applicato e R è la costante universale del gas (8,314 J/mol*K).³²

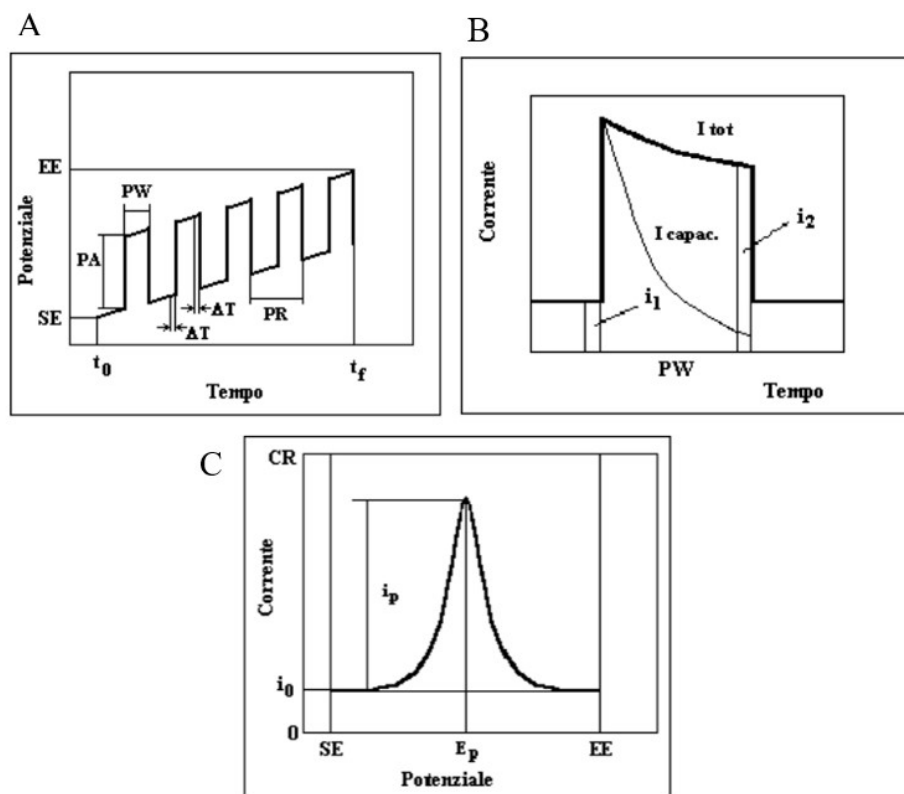


Figura 1.7.(A) Andamento del potenziale applicato all'elettrodo di lavoro in funzione del tempo durante un esperimento in DPV. (B) Andamento della corrente in un esperimento di DPV durante l'applicazione di uno della serie di impulsi di potenziale nel tempo. (C) Voltammogramma ottenuto da una misura in DPV in cui è raffigurato il picco di corrente relativo all'ossidazione o riduzione dell'analis in oggetto di studio dato in funzione del potenziale applicato nel tempo.³⁵

Altro parametro quantitativo è l'ampiezza del picco nel voltammogramma. In particolare, c'è una correlazione diretta tra l'ampiezza del picco a metà altezza ($W_{1/2}$) e il numero di elettroni partecipanti alla reazione di ossido-riduzione. Quest'ultima è descritta nell'**Equazione 4**.

$$W_{\frac{1}{2}} = \frac{3.52RT}{nF} \quad \text{Equazione 4}$$

La tecnica ad impulsi permette di aumentare il rapporto segnale/rumore (corrente faradica/ corrente capacitiva) abbattendo, come accennato sopra, proprio il contributo della corrente capacitiva permettendo analisi sensibili a livelli di concentrazione fino a 10^{-8} M.³⁴

Infatti, dall' **Equazione 5**, è possibile notare che il contributo di corrente capacitiva per la DPV differisce rispetto alle normali tecniche voltammetriche per il valore ΔE .

$$\Delta i_c \cong -0.00567C_i \Delta E m^{\frac{2}{3}} t^{-\frac{1}{3}} \quad \text{Equazione 5}$$

Il contributo di quest'ultimo può essere reso molto piccolo. Inoltre, il valore di C_i è costante in tutto l'intervallo di potenziale applicato all'elettrodo, garantendo un rumore di fondo con un andamento lineare e costante. Nel caso della DPV la corrente capacitiva è, quindi, minimizzata e la conseguente influenza sulla corrente totale è praticamente nulla, ottenendo un segnale reale corrispondente alla concentrazione di analita in esame.^{34,36}

Tale minimizzazione del rumore di fondo, in termini di corrente capacitiva, rende la DPV una tecnica eccellente per analisi di campioni semplici e complessi e per composti organici ed inorganici.

Oltre all'analisi quantitativa, la DPV permette di ottenere informazioni di tipo qualitativo sulle specie redox presenti in soluzione (potenziale di ossido-riduzione) attraverso lo studio dei potenziali di picco (**Equazione 6**).³⁴

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2$$

Equazione 6

1.3.2. Cenni storici

Nel 1953 il biochimico Leland C. Clark sviluppò quello che fu il primo sensore elettrochimico per la rilevazione diretta della concentrazione dell'ossigeno nel sangue seguendo l'andamento della corrente generata ad un elettrodo di platino per la riduzione di O_2 che diffondeva dal sangue al sensore attraverso una membrana di teflon®.³⁷

Pochi anni dopo, nel 1962, lo stesso scienziato presentò un secondo dispositivo, che faceva uso di un enzima (glucosio ossidasi) in grado di convertire il glucosio presente nel sangue in D-glucono lattone in presenza di ossigeno, producendo acqua ossigenata come prodotto di reazione. Quest'ultima poteva essere ossidata all'elettrodo di platino producendo una corrente la cui intensità era proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nel sangue. Così nasceva il primo biosensore della storia.³⁸ Da questo nuovo dispositivo, con opportune modifiche, vennero sviluppati molte altre tipologie di biosensori in grado di rilevare selettivamente altri analiti in matrici biologiche o campioni ambientali. Il biosensore per la determinazione del glucosio fu sviluppato e implementato negli anni per un ben preciso scopo: fornire informazioni sul livello di glicemia per pazienti diabetici, malattia molto diffusa che, nelle forme più gravi, causa invalidità e morte. Si può dunque dire che, nonostante oggi i biosensori siano impiegati in diversi campi (ambientale, chimico, biologico), il vero ambito che ha incentivato lo sviluppo della biosensoristica sia la diagnostica in ambito clinico-medico. Si ricordano in particolare i biosensori in grado di misurare la concentrazione di ormoni, vitamine, patogeni ed

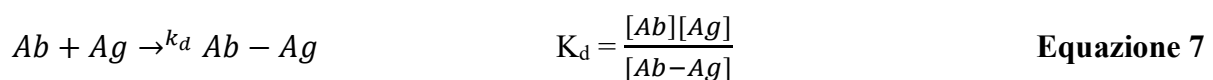
altre molecole di interesse clinico nei fluidi corporei per valutare la presenza di malattie, ma anche per riscontrare eventuali assunzioni di stupefacenti ed anabolizzanti.

Altri esempi sono i microarray di DNA ed RNA impiegati e sviluppati per facilitare le analisi genomiche, i test di gravidanza,^{26,39} che indagano la presenza della gonadotropina corionica, e quelli che indagano la presenza dell'anticorpo antitransglutaminasi (tTGA) per il monitoraggio e la diagnosi dell'infiammazione cronica dell'intestino tenue, la celiachia.⁴⁰

Infine, si ricordano i biosensori atti alla determinazione ed al riconoscimento di proteine plasmatiche o di bassi livelli d'ossigeno nel sangue, quest'ultimi utilizzati nelle stanze di rianimazione degli ospedali per un'immediata diagnosi di patologie come l'arresto cardiaco.

1.3.3. Biosensori e saggi immunologici

Fra le tante tipologie di biosensori, sono menzionati di seguito quelli che fanno uso di saggi immunologici derivati dal saggio ELISA (dall'acronimo inglese *enzyme-linked immunosorbent assay*). Questi si basano sull'interazione specifica tra un anticorpo (Ab) ed un antigene (Ag). L'interazione tra anticorpo ed antigene è permessa da specifici siti di riconoscimento, i paratopi. Questi riconoscono uno specifico epitopo dell'antigene, e permettono la formazione dell'immunocomplesso Ab-Ag. Le interazioni che permettono la formazione di tale complesso sono di tipo non covalente: interazioni di tipo elettrostatico, ponti ad idrogeno e forze di Van der Waals. L'affinità fra Ab e Ag è determinata da una costante di dissociazione K_d (compresa tra 10^{-4} e 10^{-12} mol/L) descritta nell' **Equazione 7**.



dove [Ab] è la concentrazione dell'anticorpo, [Ag] è la concentrazione dell'antigene e [Ab-Ag] è la concentrazione del complesso derivante dall'interazione tra i due.

La specificità e selettività tra recettore, Ab, ed analita, Ag, viene sfruttata per l'analisi di matrici complesse quali sangue, saliva ed urina. Inoltre, l'ottima affinità tra le due componenti biologiche permette la formazione del complesso anche con basse concentrazioni.

Nel saggio immunologico il recettore è immobilizzato su un supporto solido, il quale è a contatto con la soluzione contenente l'analita oggetto dell'analisi. Il recettore forma così il complesso con l'analita. È anche possibile che Ag venga immobilizzato quando è necessario studiare l'affinità di Ab verso

Ag. In questo caso l'analita sarà lo stesso Ab. Maggiore sarà il numero di molecole del recettore bloccate sul supporto solido e maggiore sarà la conseguente concentrazione di analiti che reagiranno e si legheranno con lo stesso. La rilevazione dell'analita è di solito permessa dall'utilizzo di particolari sistemi di marcatura coniugati con l'anticorpo o l'antigene. Questi danno luogo a fenomeni di assorbimento, fluorescenza e/o luminescenza che confermano la presenza dell'elemento in esame sulla piattaforma immunologica. (**Figura 1.8**)

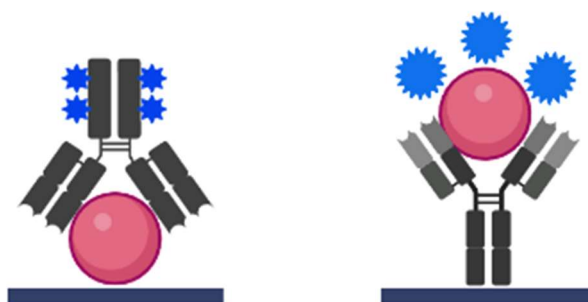


Figura 1.8. Schema del funzionamento di un saggio immunologico nelle sue due varianti. A sinistra, ad essere in indagine è l'antigene, il quale riconosce un anticorpo marcato che funge, invece, da recettore. A destra, è l'antigene marcato a fungere da recettore e l'anticorpo è, invece, l'analita. Immagine realizzata con BioRender.com.

Esistono numerose tecniche immuno-chimiche per lo studio e la rilevazione di analiti di interesse medico-oncologico. Fra le più importanti si ricorda la tecnica, sopramenzionata, ELISA. Essa si basa sulla affinità di legame degli anticorpi monoclonali (mAb) ad antigeni di varia natura (oncogeni, proteine nel sangue, antigeni batterici o virali etc).⁴¹

In un saggio ELISA, gli antigeni del campione sono ancorati ad una superficie rivestita con uno strato immobilizzante. Successivamente, viene aggiunta una soluzione contenente l'anticorpo di rilevamento. Il saggio è completato con l'aggiunta di un secondo anticorpo, quest'ultimo funzionalizzato con un enzima che permette lo sviluppo di un segnale visibile (di solito una variazione cromatica), dopo l'aggiunta di un substrato adatto. Per misurare quantitativamente la concentrazione del biomarcatore, l'analisi svolta è di tipo colorimetrico e correla l'intensità cromatica ottenuta con la concentrazione della proteina biomarcatore.²⁶

Fra le altre tecniche utilizzate vale la pena menzionare, ad esempio, tecniche *tissue-based*, come IHC (*Immunohistochemistry*) e FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) (**Figura 1.9**). Queste si basano sul riconoscimento di uno specifico analita (un antigene in IHC ed una sequenza RNA in FISH) direttamente nel tessuto cellulare utilizzando un elemento (un anticorpo o un frammento di RNA) funzionalizzato con un marcatore fluorescente che ne permetterà la rilevazione una volta formato il complesso con l'analita.⁴²

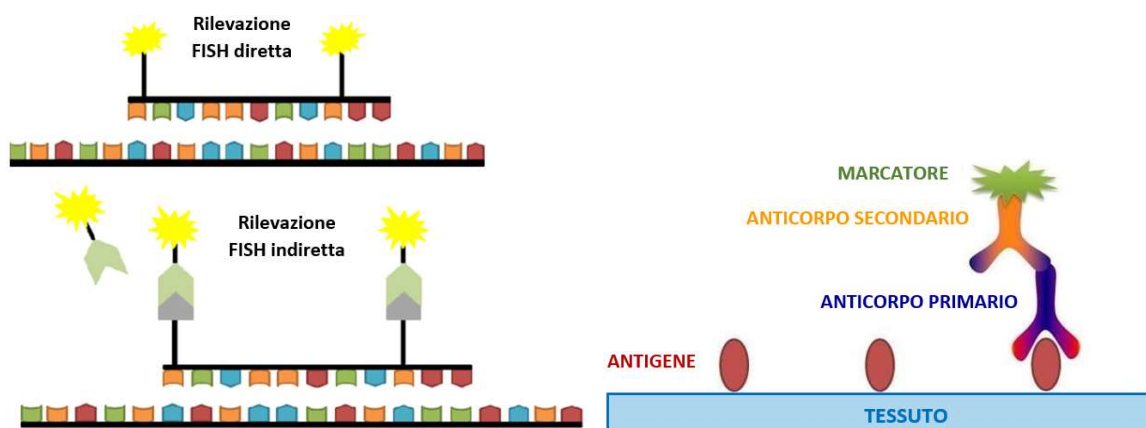


Figura 1.9. Schema del funzionamento della tecnica IHC (a destra) e della tecnica FISH (a sinistra).

Vi sono, però, una serie di problematiche che IHC e FISH hanno dal punto di vista dell'applicazione. Questi, infatti, sono test invasivi a causa dei quali i pazienti sono soggetti a disturbi di vario tipo come forte ansia. Per quanto riguarda il trattamento dei campioni di tessuto, esso richiede manualità e strumentazione all'avanguardia.

Nonostante i classici saggi immunologici presentino sensibilità ed accuratezza e garantiscano analisi qualitative e quantitative buone, anche tecnologie come i biosensori stanno dando ottimi risultati specialmente in ambito clinico-medico.^{43,44}

Infine, va sottolineata una buona sensibilità solo per stadi avanzati della malattia, ovvero quando l'antigene in indagine è presente in concentrazioni elevate.

1.3.4. Peptidi come biorecettori per h-uPA

Tra le numerose categorie di biorecettori, particolare interesse è dato ai peptidi. Essi sono polimeri naturali e/o sintetici, il cui peso molecolare è generalmente inferiore ai 5 KDa. La catena polimerica è variabile e si compone di sequenze di amminoacidi uniti tra loro attraverso un legame peptidico. Ad ogni specifica sequenza di amminoacidi corrisponderà dunque uno specifico peptide.⁴⁵

Più peptidi uniti fra loro formano le proteine come mostrato in **Figura 1.10**.

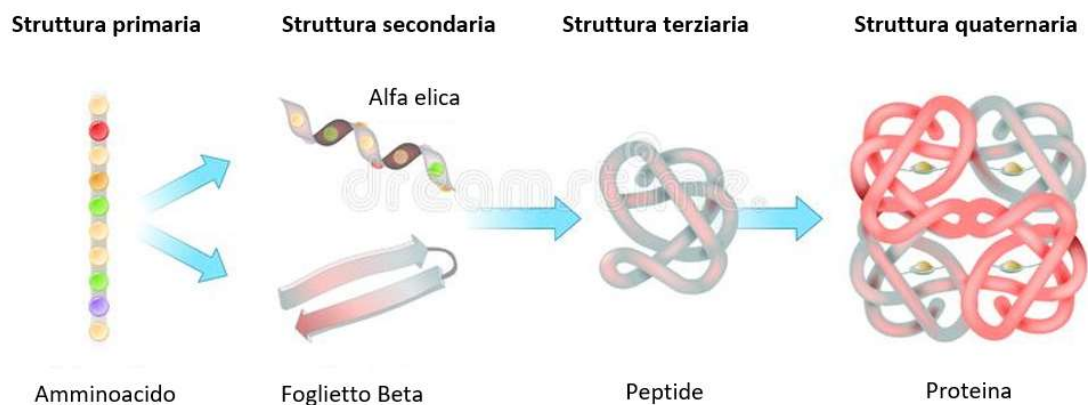


Figura 1.10. Strutture chimiche generiche di un amminoacido, di un peptide e di una proteina. Immagine creata con BioRender.com

Tra le altre proprietà di questi elementi vi sono la molteplicità delle possibili strutture e di siti attivi, che li rendono versatili, selettivi e specifici per varie categorie di biomolecole (enzimi, proteine, anticorpi, antigeni, acidi nucleici, ioni metallici etc.) ed avere notevole stabilità.

Per questo, i peptidi sono potenzialmente in grado di svolgere il ruolo di recettore biologico nelle piattaforme biosensoristiche ed essere impiegati in indagini cliniche come, per esempio, nei saggi di attività enzimatica e nello screening di inibitori enzimatici.

Grazie alla loro affinità con numerosi analiti di natura biologica, fra cui proteasi e chinasi, i peptidi sono degli ottimi recettori per varie tipologie di marcatori tumorali e, quindi, in grado di fornire informazioni circa la presenza od il relativo avanzamento di neoplasie.

Quando impiegati nei biosensori, non essendo i peptidi stessi in grado di generare un segnale misurabile dal trasduttore una volta formato il legame con l'analita, sono generalmente marcati con un elemento in grado di fornire un segnale misurabile; quest'ultimo direttamente correlato al legame formatosi tra la molecola indagata ed il peptide.⁴⁶

Un altro esempio di applicabilità dei peptidi è come inibitori di specifici marcatori tumorali, fra cui quello oggetto del presente lavoro di tesi, h-uPA. In questo caso, il peptide ha lo scopo di interagire selettivamente con la proteasi e di formare con essa un complesso stabile impedendone l'attivazione e la successiva attività nella biologia tumorale. Il vantaggio nell'utilizzare questo tipo di molecole è il fatto che presentino un'elevata affinità per l'antigene ed allo stesso tempo siano delle molecole piccole e facili da far permeare all'interno delle zone in cui il carcinoma è in atto.

Al fine di validare la capacità dei peptidi di fungere da recettori ottimali per h-uPA, nel presente progetto di tesi sono stati impiegati due peptidi biciclici biotinilati con diversa sequenza amminoacidica, denominati rispettivamente P₁ e P₂. Le rispettive strutture chimiche sono illustrate in

Figura 1.11.

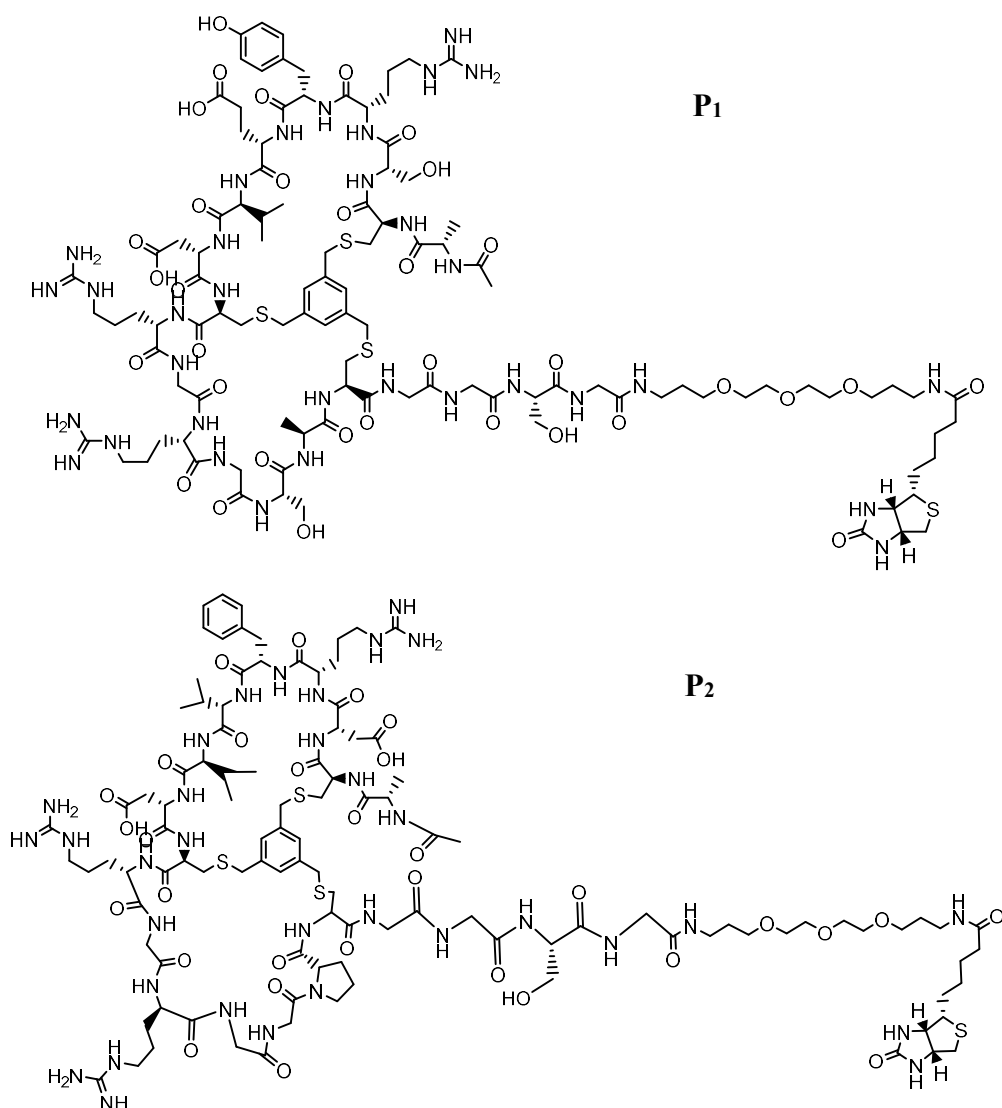


Figura 1.11. Strutture molecolari dei peptidi biciclici biotinilati, P₁ e P₂.

Essi si legano selettivamente e stabilmente con il marcatore tumorale h-uPA attraverso la formazione di legami idrogeno tra la due componenti oppure attraverso altre interazioni non covalenti. Le strutture peptidiche bicicclizzate favoriscono tali interazioni e contribuiscono a stabilizzare il complesso conseguentemente formatosi grazie al coinvolgimento di entrambi gli anelli peptidici nella formazione del legame proteina-peptide. Tale aspetto è fondamentale anche per favorire una maggiore affinità tra i due bioelementi.

Nel caso del peptide P₁ il numero di legami idrogeno potenziali è di 14, i quali sono per la maggior parte favoriti dai residui proteici Asp8, Arg10, e Arg12, come si evince in **Figura 1.12**. Grazie alla sua forma bicicclizzata P₁ favorisce una copertura di 702 Å² di superficie della proteina.¹¹

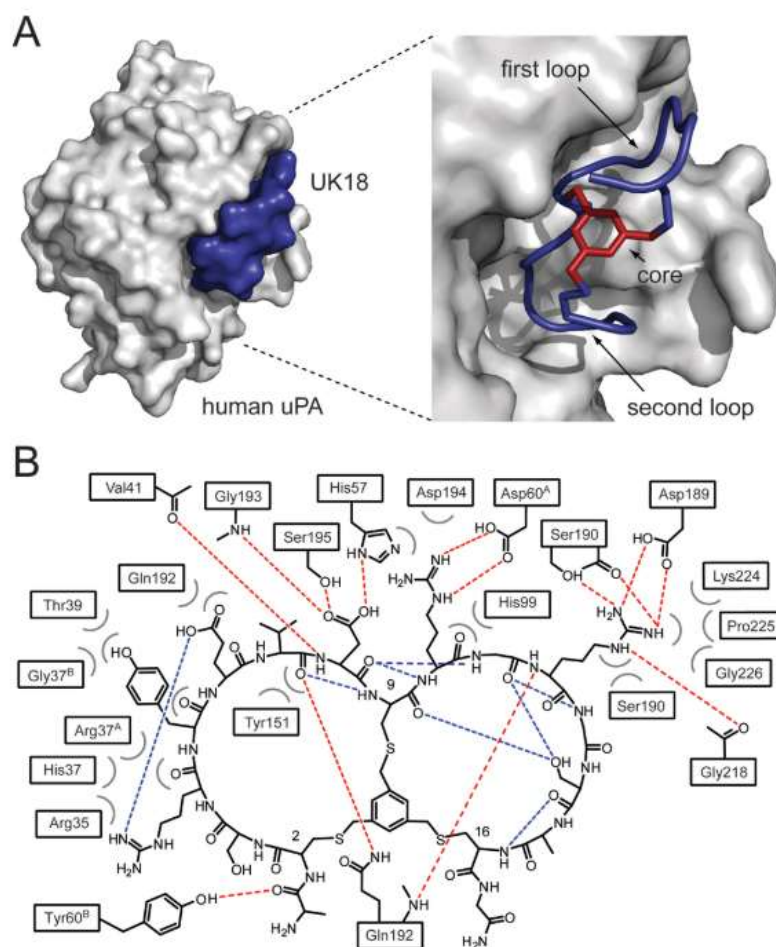


Figura 1.12. In figura A è riportata la struttura tridimensionale del complesso h-uPA/peptide P₁. In rosso è indicata la componente mesitilenica ed in blu lo scheletro peptidico. In figura B sono rappresentate le interazioni molecolari potenziali fra le due componenti del complesso in forma di legami idrogeno con indicati i residui della proteasi e del peptide interagenti. In rosso sono indicate le interazioni intermolecolari, in blu quelle intramolecolari e in grigio altre interazioni non-covalenti.¹¹

1.4. Scopo della tesi

Il presente progetto di Tesi ha come scopo quello di costruire e validare una piattaforma biosensoristica per il riconoscimento del marcatore tumorale h-uPA. Con tale tecnologia si vogliono, dunque, ottenere informazioni di tipo diagnostico per quanto concerne lo sviluppo e l'accrescimento di vari tipi di carcinomi, in particolare del tumore al seno.

Come specificato nei paragrafi precedenti la concentrazione della proteasi h-uPA è importante per valutare l'evoluzione della neoplasia e le attività biologiche ad essa correlate come l'adesione, la migrazione, l'espansione e metastasi delle cellule cancerose.

Si tratta, dunque, di una tecnologia potenzialmente applicabile in ambito medico e, in particolare, nella diagnostica oncologica. La piattaforma biosensoristica progettata ha un'architettura complessa che include vari elementi, dai biorecettori sintetici alle microparticelle magnetiche, come verrà descritto nei capitoli successivi. La struttura del biosensore è riportata in **Figura 1.13**.

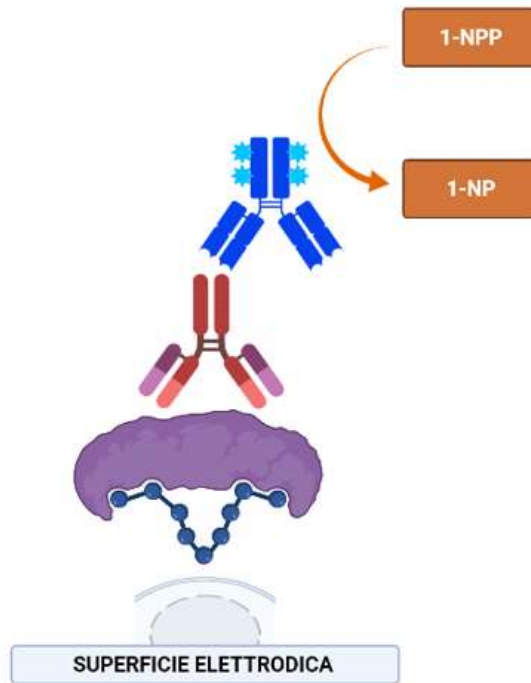


Figura 1.13.Rappresentazione della struttura del biosensore testato nel presente lavoro di tesi. Ogni blocco corrisponde ad una diversa componente. Immagine realizzata con BioRender.com.

2. Parte sperimentale

La parte sperimentale del progetto si divide in due parti. La prima riguarda la sintesi dei peptidi P₁ e P₂, effettuata nel laboratorio del gruppo di ricerca del Prof. Alessandro Angelini, presso il Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca' Foscari di Venezia. Per la sintesi dei peptidi P₁ e P₂, si è applicato il metodo su supporto solido o *Solid-Phase Peptide Synthesis* (SPPS), che offre tutti i vantaggi di un processo automatizzato.

La seconda parte del progetto consiste nell'assemblaggio e nella validazione della piattaforma biosensoristica utilizzando entrambi i recettori peptidici sintetizzati.

2.1. Reagenti e solventi

Resina Fmoc-PEG Biotin, alanina (Ala, A), cisteina (Cys, C), acido aspartico (Asp, D), arginina (Arg, R), serina (Ser, S), tirosina (Tyr, Y), valina (Val, V), acido glutammico (Glu, E), glicina (Gly, G), prolina (Pro, P), anisolo, dimetilformammide (DMF), diclorometano (DCM), esafluorofosfato benzotriazolo tetrametil uronio (HBTU), N-Metil-2-Pirrolidone (NMP), triisopropilsilano (TIPS), Octandiolo, tionisolo, acetonitrile, carbonato d'ammonio ((NH₄)₂CO₃), tert-butil 1,3,5-Tris (bromometil) benzene (TBMB), Piperidina, N-Metil Morfolina (NMM), etanolo, anidride acetica, acido trifluoroacetico (TFA) e metil tert-butil etere (MTBE), tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (TRIS-HCl), acido cloridrico (HCl), acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), tensioattivo non-ionico poliossietilensorbitano monolaurato (Tween 20), dietanolammina (DEA), cloruro di sodio (NaCl), cloruro di potassio (KCl), cloruro di magnesio (MgCl₂), l'anticorpo secondario Anti-Rabbit IgG, 1-naftil fosfato sale disodico e biotina sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (gruppo Merck KGaA).

Fosfato monoacido di sodio (NaH₂PO₄), fosfato di acido di sodio (H₂NaO₄P), acetonitrile per HPLC-MS e acido formico sono stati acquistati presso CARLO ERBA Reagents S.A.S.

Microparticelle magnetiche (MB) Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 e l'anticorpo policlonale per Urokinase (Urokinase Polyclonal Antibody) sono stati acquistati presso Invitrogen™-Thermo Fischer.

L'acqua ultra-pura, Milli-Q, è stata ottenuta con il sistema MilliPore (Merck) e presenta una resistenza di 18 MΩ.

L'attivatore plasminogeno di tipo urochinasico umano (LMW-h-uPA) è stato sintetizzato presso il laboratorio di ricerca del Prof. Alessandro Angelini (Università Ca' Foscari Venezia) e presso il laboratorio della Prof. Laura Cendron (Università di Padova).

Le soluzioni tampone impiegate nella preparazione delle MB modificate con i peptidi biciclici biotinilati e la loro preparazione sono descritte di seguito.

La soluzione tampone *Binding and Washing buffer 2X* (B&W2X), che consiste nel tampone di legame utilizzato per il lavaggio delle MB, è costituito da tris-HCl (idrossimetil amminometanocloridrato) (10 mM), EDTA (1 mM) e NaCl (2 M); la soluzione tampone deve avere pH 7.5.

La soluzione tampone *Binding and Washing buffer 1X* (B&W 1X) è ottenuto diluendo in rapporto 1:1 la soluzione tampone B&W 2X con acqua Milli-Q.

La soluzione tampone *Binding and Washing buffer 1X/0.01% Tween 20* (B&W 1X/0.01% Tween 20) è ottenuto aggiungendo al tampone B&W 1X, 0.01 g/mL di tensioattivo Tween 20. Lo scopo del tensioattivo è quello di migliorare la solvatazione e la solubilizzazione delle MB facilitandone quindi la successiva separazione magnetica.

La soluzione tampone di DEA si ottiene con dietilammina (0.1 M a pH 9.6), KCl (0.1 M), e MgCl₂ (1 mM).

La soluzione tampone DEA/0.01% Tween 20 è ottenuto aggiungendo alla soluzione tampone DEA 0.01 g/mL del tensioattivo Tween 20.

La soluzione di tampone fosfato (*phosphate buffer saline* o PBS) 0.5 M a pH 7 è stata ottenuta sciogliendo in acqua Milli-Q i seguenti sali: Na₂HPO₄ (64.4%, 3.97 mM), NaCl (136 mM), KCl (2.68 mM), KH₂PO₄ · H₂O (1.46 mM).

La soluzione tampone PBS/0.01% Tween 20, si ottiene aggiungendo alla soluzione tampone PBS 0.01 g/mL di tensioattivo Tween 20.

2.2. Strumentazione

Per la sintesi dei peptidi biciclici biotinilati è stato utilizzato un sintetizzatore automatizzato di peptidi INTAVISTM *ResPep SLi*.

La purificazione dei peptidi è stata condotta con cromatografo Waters Delta Prep, colonna preparativa SimmetryPrepTM C18 (19 mm x 150 mm), detector Waters 2489 UV/Visibile, flusso 20 mL/min. La fase mobile è composta da eluente A (99.9% v/v H₂O, 0.1% v/v TFA) ed eluente B (94.9% v/v acetonitrile, 5% v/v H₂O e 0.1% v/v TFA). Il peptide grezzo è sciolto in DMSO e l'iniezione è di 600 µL.

Per l'operazione di centrifugazione è stata impiegata una centrifuga Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ X1R, 4000 rpm, 25 °C.

Per il processo di liofilizzazione è stato impiegato un liofilizzatore LIO5PDGT della Cinquepascal S.r.l., pressione di 0.07 Torr e temperatura di -52 °C.

Il controllo della purezza e della massa molecolare dei peptidi, sia nella forma lineare che nella forma biciclizzata, sono state condotte con uno spettrometro di massa Agilent InfinityLab LC/MSD accoppiato con sistema HPLC Agilent 1260 Infinity II. La fase mobile è composta da eluente A (H₂O con 0.1% di HCOOH) ed eluente B (ACN con 0.1% di HCOOH). Per la preparazione del campione, 50 µL di analita sono diluiti con 200 µL di soluzione 1:1 H₂O/ACN.

Per le misure elettrochimiche è stato impiegato un bipotenziostato portatile modello µStat 300 ed un connettore per elettrodi serigrafici, modello Ref. VKIT, della Metrohm DropSens, interfacciati con il software DropView 8400. Il bipotenziostato portatile è applicabile per analisi voltammetriche ed amperometriche ed è alimentato da batteria a ioni di litio (1250 mAh). Il range di corrente va da ±1 nA a ±1 mA e la risoluzione è 0,025% del range di corrente.

I dati sperimentali ottenuti sono stati elaborati con il programma OriginLab®.

2.3. Sintesi e caratterizzazione dei peptidi P₁ e P₂

La sintesi dei peptidi biciclici biotinilati è stata realizzata via *Solid-Phase Peptide Synthesis* (SPPS) ovvero sintesi su supporto solido, seguendo la procedura descritta in letteratura.⁴⁷

La SPPS è stata scelta principalmente per i suoi vantaggi, fra cui la sua capacità di fornire peptidi variabili in dimensioni ed in costituenti amminoacidici utilizzando un sintetizzatore del tutto automatizzato nel quale le reazioni avvengono in maniera controllata e nello stesso ambiente di reazione. La procedura automatizzata consente, inoltre, di incrementare le rese, riducendo errori dovuti all'operatore, e di minimizzare tempi e costi di lavoro.

La procedura è ottimizzata sfruttando un eccesso di amminoacidi e di reagenti per favorire la conduzione delle reazioni al completamento, i quali sono successivamente filtrati dal sistema, eliminando la necessità di purificazione degli intermedi dopo ogni fase.

La sintesi sfrutta un supporto solido insolubile sul quale viene sviluppata la catena peptidica. Il fatto che il peptide rimanga covalentemente legato al supporto solido per tutta la sintesi, garantisce che i reagenti in eccesso ed i prodotti indesiderati vengano rimossi mediante semplici passaggi di lavaggio e filtrazione.

I supporti solidi vengono selezionati sulla base di alcune caratteristiche come resistenza, stabilità ed inerzia nei confronti dei reagenti e dei solventi utilizzati nella SPPS.

L'inerzia del supporto deve, comunque, essere limitata in modo che il supporto stesso sia in grado di gonfiarsi per favorire la penetrazione dei reagenti e l'attacco del primo amminoacido.

Nel presente lavoro di tesi il supporto scelto è una resina biotinilata. Si tratta di un polimero in grado di espandersi quando posto a contatto con un solvente organico. In questo modo è favorito un aumento della superficie attiva della stessa resina e, di conseguenza, dei siti di reazione dove il peptide potrà ancorarsi e crescere.

Il supporto è, inoltre, provvisto di un *linker* bifunzionale impiegato allo scopo di indirizzare l'attacco del primo amminoacido su una zona attiva specifica della resina impiegata.

La resina scelta è la Fmoc-PEG-Biotin Novatag™ (Figura 2.1) della Merk KGaA-Sigma-Aldrich.⁴⁸ Il grado di sostituzione è di 0.36 mmol/g. Quest'ultimo esprime la capacità di carico, ossia il quantitativo totale di peptide che la resina è in grado di supportare.

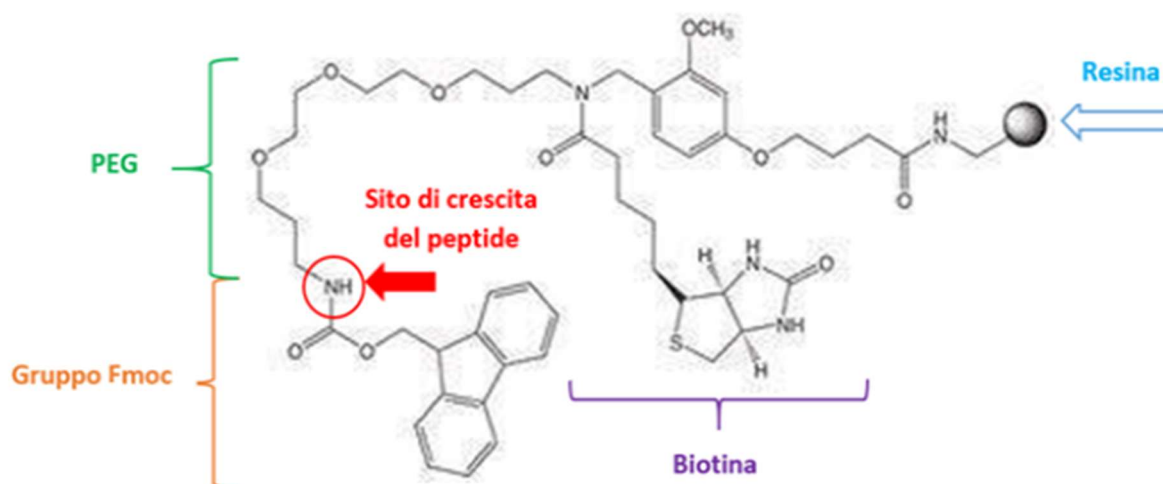


Figura 2.1. Rappresentazione della struttura della resina Fmoc-PEG-Biotin Novatag™ con specificate tutte le sue componenti ed il sito di crescita del peptide.⁴⁸

La scelta di tale resina trova spiegazione nella composizione particolare ed innovativa; un legante a base di glicole polietilenico (PEG), a sua volta funzionalizzato con un gruppo Fmoc (9-fluorenil-metilossi-carbonile), e biotina.

Per quanto riguarda la biotina, questa viene legata alla parte C-terminale in modo da liberare i siti ammino-terminali. Questa permette di ottenere il peptide biotinilato direttamente attraverso un processo di *cleavage* con soluzione mista di TFA e senza necessità di svolgere reazioni di biotinilazione. La presenza del PEG, invece, permette di ottenere, grazie alla sua idrofilicità, un complesso peptide-biotina molto più solubile e di ridurre l'ingombro sterico del complesso posizionandosi tra il peptide e la biotina.⁴⁹

Il PEG è a sua volta funzionalizzato con un *linker*, il gruppo Fmoc, che ha lo scopo di proteggere il gruppo N-terminale in posizione α in modo tale da ottenere la sequenza amminoacidica progettata e di evitare reazioni indesiderate che abbasserebbero notevolmente la resa. Per lo stesso motivo, le catene laterali sono protette da gruppi *tert*-butilici.

Durante il trattamento SPPS il gruppo Fmoc viene facilmente eliminato con una soluzione basica di Piperidina al 20% in DMF, mentre il gruppo protettore delle catene laterali con una soluzione acida di TFA. Con tale metodo, è dunque possibile lavorare in condizioni sia acide che basiche relativamente miti.

In base al tipo di gruppo protettore che si utilizza, si distinguono due possibili metodi SPPS.

A differenza di quello con il gruppo Fmoc appena enunciato, il secondo contempla l'utilizzo del gruppo Boc (*tert*-butyloxycarbonyl) per la protezione dei gruppi N-terminali e di gruppi benzilici per le catene laterali. In questo caso il gruppo Boc è eliminato mediante trattamento con TFA in DCM mentre il secondo gruppo con acido fluoridrico. Il gruppo Boc, il gruppo Fmoc e il gruppo *t*-Bu sono illustrati in **Figura 2.2**.

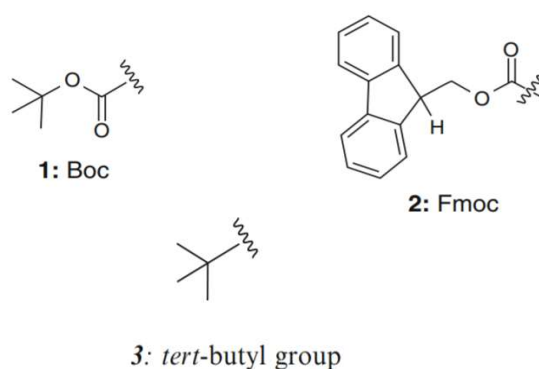


Figura 2.2.Struttura chimica dei gruppi protettori impiegati nel metodo SPPS.⁴⁷

Gli elementi innovativi in sinergia (PEG, Fmoc e biotina) permettono l'ottenimento di un peptide lungo, complesso e con una struttura tale da essere quanto più sensibile possibile per una sua applicazione come biorecettore per la rilevazione dell'h-uPA.

Le sequenze degli amminoacidi componenti ciascun peptide sono state selezionate in base all'affinità che queste presentano nei confronti del marcatore tumorale h-uPA. La prima sequenza corrisponde a quella del peptide P₁, già descritta in letteratura,¹¹ cui vengono aggiunti tre amminoacidi (G, S, G) all'estremità legata con il PEG. Lo scopo di questi ultimi è di fungere da ulteriori "spaziatori" fra la struttura peptidica e la biotina e di ridurre così eventuali ingombri per il successivo legame con la proteasi serina e con la streptavidina presente sulle microparticelle magnetiche.

La sequenza amminoacidica completa del primo peptide è ACSRYEVDRCRGRGSACGGSG. Per semplicità il peptide è chiamato "P₁". Per quanto riguarda il secondo, esso presenta la sequenza

amminoacidica ACDRFVVDCRGRGGPCGGSG ed è nominato “P₂”. Anche in questo caso sono presenti i tre amminoacidi spaziatori. Di seguito è illustrata in dettaglio la loro procedura di sintesi.

La prima fase consiste nel trascrivere nel software per l’elaborazione dei peptidi le due sequenze sopra enunciate. A questo punto il software calcola per ciascuna struttura il quantitativo esatto di tutti i reagenti e solventi necessari per la sintesi.

La seconda fase consiste nella preparazione di questi ultimi. Le soluzioni degli amminoacidi che comporranno la catena peptidica finale, contengono ciascuna uno specifico quantitativo in peso di amminoacido sciolto in DMF. I reagenti e solventi utilizzati sono piperidina, DMF, esafluorofosfato di benzotriazol-1-ilossi tris pirrolidino fosfonio (PyBOP), NMP, NMM ed anidride acetica. Successivamente, si pesano 27 mg di resina e si inseriscono nelle apposite cartucce. Quest’ultime sono inserite negli specifici alloggi del sintetizzatore.

Il quantitativo di resina necessaria, nonché il numero di cartucce, dipende da quanto peptide si vuole ottenere e dal grado di sostituzione della stessa resina (**Equazione 8**).

$$g \text{ di resina} = \frac{\text{mmol di peptide (desiderato)}}{\text{grado di sostituzione della resina (mmol/g)}} \quad \text{Equazione 8}$$

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate per ogni peptide 4 cartucce contenenti 27 mg ciascuna. Si programma, infine, la procedura di sintesi sequenziale automatizzata. La durata totale dell’intero processo di sintesi dipende dal numero di cartucce e dalla lunghezza delle sequenze amminoacidiche desiderate. In **Figura 2.3** è riportato lo schema delle reazioni che avvengono durante la SPPS.

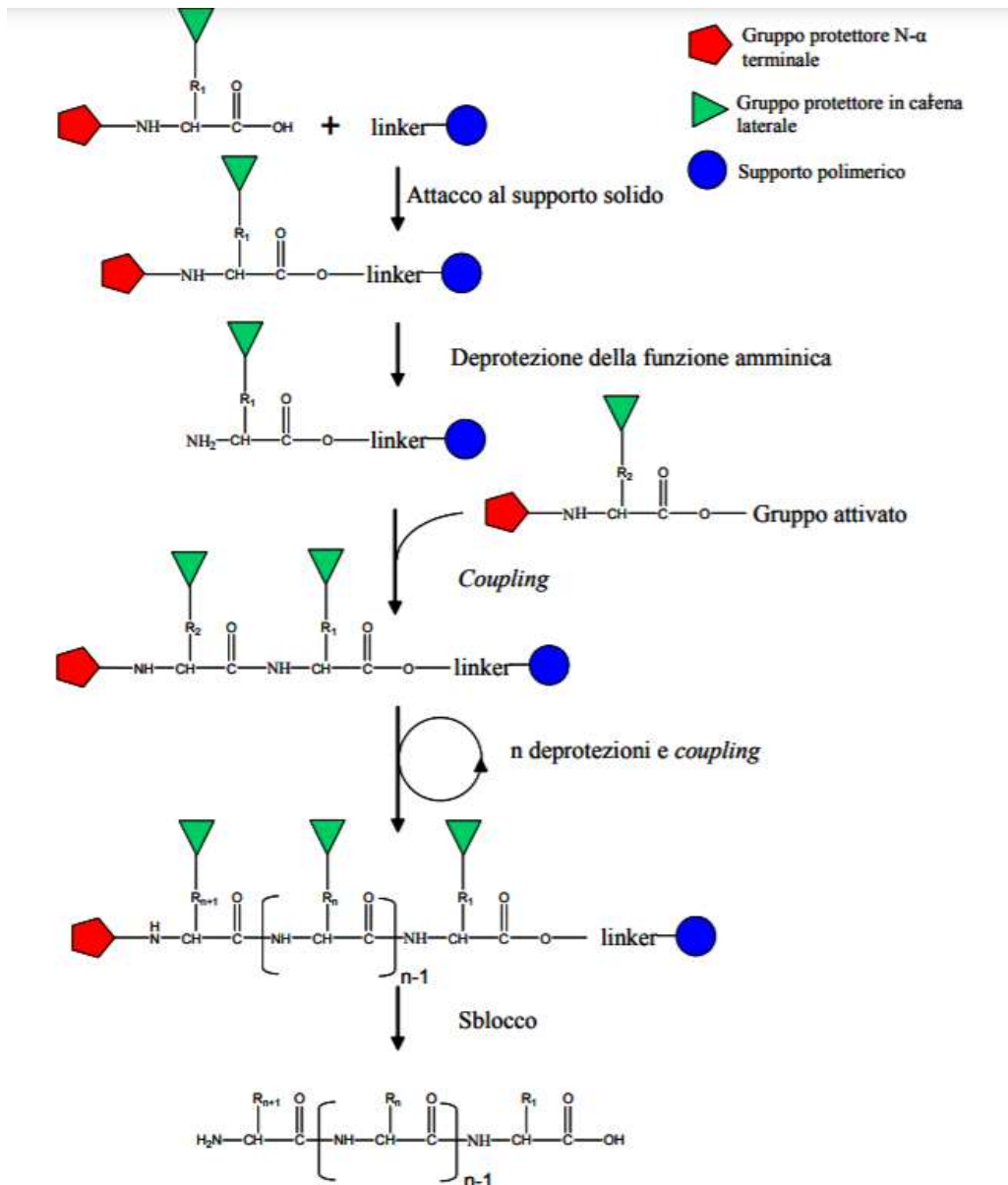


Figura 2.3. Schema generico del processo SPPS per la sintesi di peptidi.⁴⁷

La prima reazione che avviene nel sintetizzatore consiste nella de-protezione, in ambiente basico, della resina mediante la rimozione del gruppo protettore temporaneo Fmoc per lasciare così libero il residuo amminico sul PEG. (Figura 2.4)

Dal punto di vista pratico, si ha l'iniezione di una soluzione di piperidina al 20% in DMF per circa 30 minuti.

Il secondo passaggio consiste nella reazione di accoppiamento tra il primo amminoacido (Fmoc-protetto) ed il residuo amminico della resina formando così il primo legame peptidico.

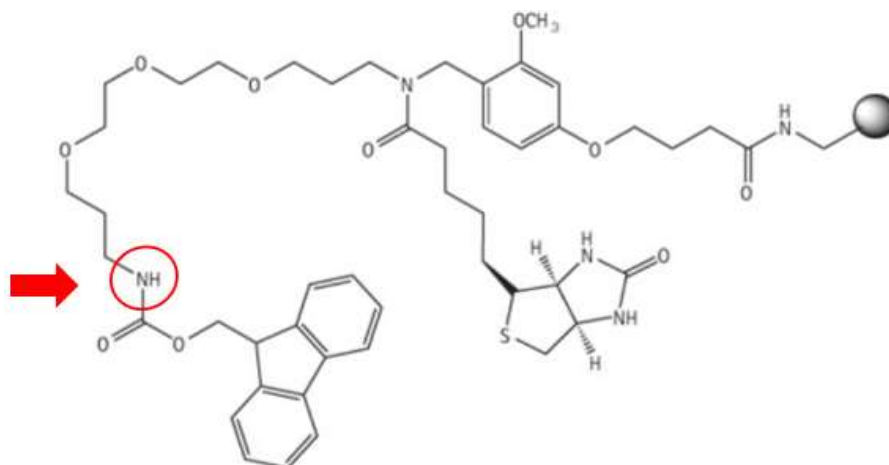


Figura 2.4.Raffigurazione della struttura della resina Fmoc-PEG-Biotin Novatag™ con indicato il sito in cui avviene la deprotezione dal gruppo Fmoc e in cui avviene la conseguente crescita del peptide.⁴⁸

Le reazioni seguenti che avvengono all'interno del reattore sono tre e si ripetono ciclicamente in base al numero di amminoacidi che compongono la struttura del peptide desiderato.

La prima delle tre consiste nella de-protezione del residuo amminico α -terminale del primo amminoacido dal gruppo temporaneo Fmoc attraverso l'iniezione di una soluzione di piperidina al 20% in DMF per circa 30 minuti.

La seconda reazione consiste nel *coupling* del primo amminoacido con il secondo della sequenza impostata. In questo passaggio si ha la formazione di un legame peptidico tra il residuo amminico del primo amminoacido ed il residuo carbossilico terminale del secondo. Al fine di favorire la reazione di condensazione, è necessario che il gruppo carbossilico in questione sia attivato con una serie di reagenti specifici: il PyBOP (9.6 g, 0.5 M in 37 mL di DMF), NMM (4 M) e NMP (5mL). Questo punto è fondamentale per aumentare l'efficienza della formazione del legame peptidico (>99%). L'introduzione di questi attivatori consente di avere a disposizione un buon gruppo uscente per la reazione. La combinazione di un acido carbossilico e di un'ammina comporterebbe, altrimenti, un semplice trasferimento protonico a causa delle loro proprietà acido/basiche.

Essendo, comunque, gli attivatori altamente instabili si preferisce prepararli direttamente *in situ*.

Il meccanismo di attivazione è illustrato in **Figura 2.5**.

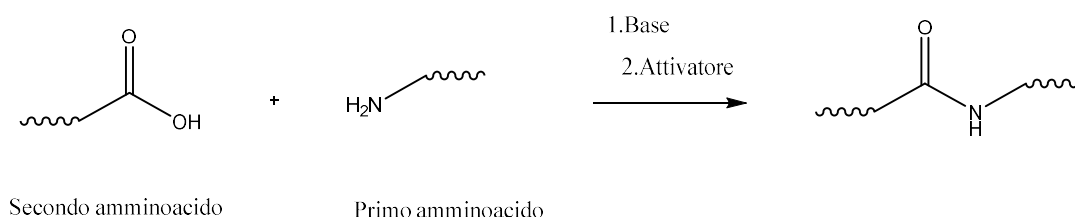


Figura 2.5.Meccanismo di attivazione della componente carbossilica di un amminoacido sfruttando una base ed un attivatore e conseguente reazione con il residuo amminico di un secondo amminoacido.

Inoltre, va ricordato che l'acido carbossilico è attivato verso reazioni di sostituzione con varie specie nucleofile. Quest'ultime sono spesso presenti nelle catene laterali di altri amminoacidi in soluzione e potrebbero, quindi, comportare reazioni indesiderate o sequenze amminoacidiche diverse da quelle selezionate. Per ovviare a tale incombenza, si ricorre all'utilizzo del gruppo protettore *-tBu* per le catene laterali dei vari amminoacidi.

La terza ed ultima reazione è quella di *capping*. Durante tale passaggio, si inietta una soluzione di anidride acetica al 5% in DMF (0.53 M) allo scopo di proteggere e, quindi, di disattivare i residui amminici che, nella precedente reazione, non hanno reagito. In questo modo è possibile prevenire ulteriori reazioni di condensazione indesiderate con gli amminoacidi dei cicli seguenti.

Alla fine di questa procedura si effettua un'ulteriore fase di lavaggio ed il ciclo di reazioni riprenderà, questa volta con l'iniezione del terzo amminoacido. I vari passaggi sono ripetuti finché la sequenza finale non sarà ottenuta.

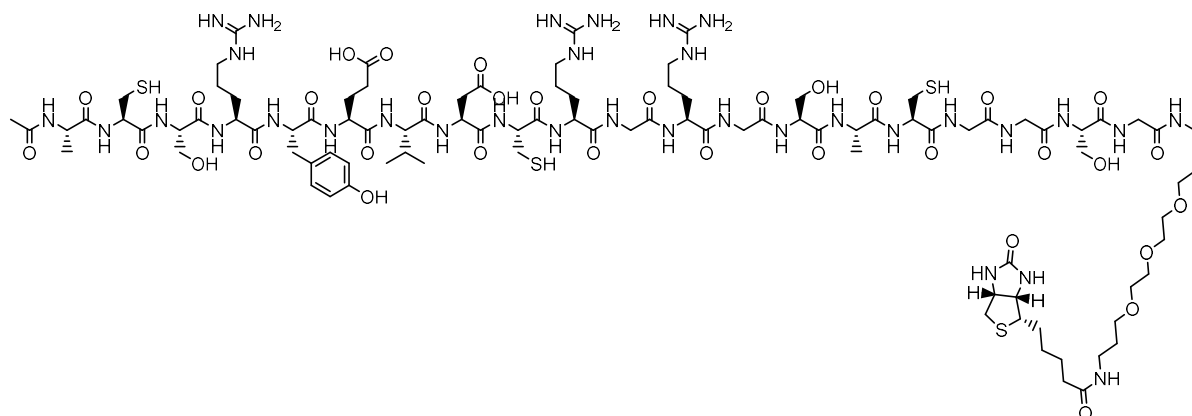
A questo punto, il peptide è stato separato dalla resina attraverso un processo di *cleavage*. Questo consiste in un trattamento con soluzione acida composta da TFA (95%v/v), H₂O (2.5%v/v), anisolo (2.5%v/v), 1,8-otandiolo (2.5%v/v), tionisolo (2.5%v/v). Escludendo il TFA, gli altri reagenti sono utilizzati per impedire eventuali reazioni indesiderate (delle catene laterali o delle cisteine presenti nello scheletro peptidico) durante la reazione di acidolisi stessa. In questo modo è possibile migliorare le rese nonché ridurre le impurità.⁵⁰

Dal punto di vista pratico, il peptide viene sciolto nella soluzione sopra descritta all'interno di siringhe munite di pistone e posto su una piattaforma ad agitare per 3h. Al termine, la soluzione contenuta nelle siringhe è riversata in 50 mL di etere dietilico freddo (-25 °C). Il tutto è centrifugato e la soluzione eterea è eliminata, lasciando un residuo gelatinoso sul fondo. Per permettere un recupero ottimale di tutto il peptide, la precipitazione e la centrifugazione sono stati eseguiti per un totale di tre volte. Infine, il prodotto è liofilizzato, ottenendo una polvere bianca.

Per verificare la correttezza della sequenza peptidica ottenuta con il sintetizzatore, il prodotto di reazione è stato analizzato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa, HPLC-MS, utilizzando una colonna NUCLEOSIL C18 100 Å, 5 µm, 250 mm x 4.0 mm e come fase mobile una soluzione composta da eluente A (H₂O con 0.1% di HCOOH) e da eluente B (ACN con 0.1% di HCOOH).

La struttura peptidica ottenuta è a catena lineare. In **Figura 2.6** sono illustrate ambedue le strutture di P₁ e P₂.

P₁



P₂

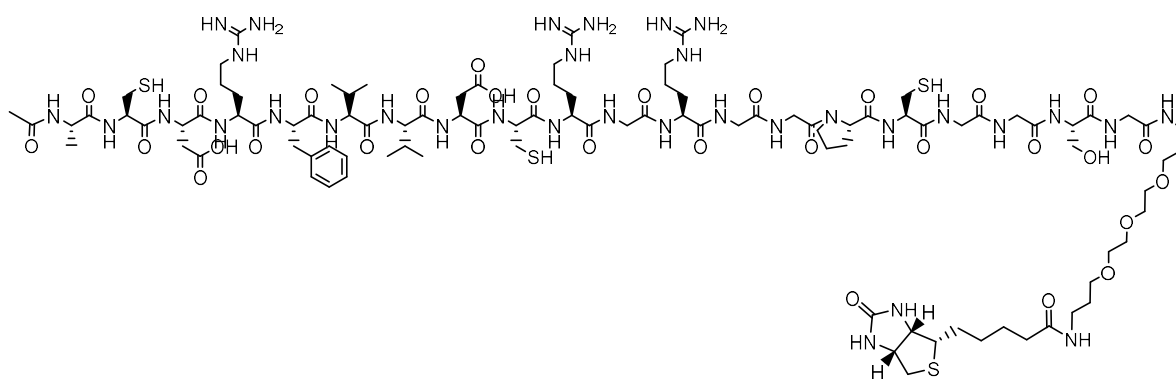


Figura 2.6.Struttura chimica lineare dei peptidi. In alto P₁ e in basso P₂.

Entrambe le strutture presentano al loro interno delle cisteine che porteranno alla formazione di una molecola biciclica.

La formazione di un biciclo garantisce una buona stabilità della struttura peptidica nonché una un'interazione ottimale con la proteasi h-uPA attraverso legami idrogeno.¹¹

È noto che le cisteine sono un tipo di amminoacido naturale in grado di proteggere e mantenere l'integralità strutturale e funzionale non solo dei peptidi, ma anche di gran parte dei tessuti proteici che compongono i vari sistemi cellulari.⁵¹

Nei peptidi, la presenza di cisteine, con i relativi residui tiolici -SH liberi, potrebbe, però, comportare la formazione di ponti disolfuro tra due diverse cisteine. Dal punto di vista dell'applicazione in campo biosensoristico tale aspetto è un problema. I ponti disolfuro sono, infatti, specie elettroattive con un potenziale di ossidazione relativamente basso (0.60 V) che, in opportune condizioni, possono reagire mediante reazione di ossidazione e provocare una variazione di corrente non correlata alla presenza dell'analita sotto indagine. Potrebbero, quindi, dare interferenza per quanto riguarda la rilevazione degli analiti di interesse mediante metodi elettrochimici.^{44,52,53}

Di seguito viene riportata la reazione tra due cisteine in ambiente ossidante. (**Figura 2.7**)

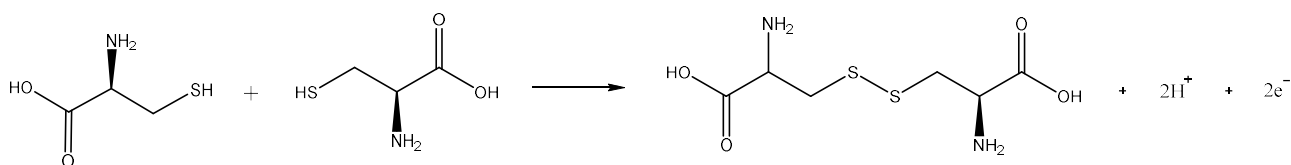


Figura 2.7. Reazione di formazione del ponte disolfuro tra due cisteine e conseguente ottenimento di una molecola di cistina.

Per ovviare a questo problema, i peptidi sintetizzati nel presente lavoro di tesi sono stati sottoposti ad un processo di bi-cicizzazione, tramite il quale la formazione della cistina verrà impedita. Tale processo contempla l'impiego di un agente alchilante, che nel nostro caso è stato il 1,3,5-tris(bromometil)benzene (TBMB). Quest'ultimo ha lo scopo di fornire un sito al quale i vari atomi di zolfo potranno legarsi e formare il prodotto bicicizzato attraverso una reazione di sostituzione nucleofila aromatica di tipo SN₂ (S_NAr₂). In **Figura 2.8** è illustrato il prodotto di reazione.

La bi-cicizzazione è stata svolta come già descritto in letteratura.¹¹

Il peptide lineare ottenuto è stato sciolto in una soluzione 70% v/v 20 mM di NH₄HCO₃ e 30% v/v di ACN a pH = 8, ottenendo una soluzione 1 mM. La soluzione viene agitata in modo blando per il tempo necessario a solubilizzare tutto il peptide. La breve e lieve agitazione è resa necessaria dalla presenza delle cisteine, la cui eccessiva perturbazione, unita anche ad un accumulo d'aria, comporterebbe la formazione di ponti disolfuro all'interno della catena peptidica. Segue l'aggiunta alla soluzione dell'agente alchilante, il TBMB (1.5 mM), sciolto in un volume minimo di ACN. Il tutto viene lasciato a reagire in agitazione per 1h.

La reazione viene poi interrotta aggiungendo 5 μL di HCl (3M) ed il prodotto di reazione è liofilizzato.

Il peptide biciclico ottenuto è stato poi purificato mediante un HPLC in fase inversa (RP-HPLC), utilizzando una colonna SymmetryPrep™ C18, 7 μm, 19x150 mm e come fase mobile una soluzione composta da un eluente A (99.9% v/v H₂O, 0.1% v/v TFA) ed un eluente B (94.9% v/v ACN, 0.1% v/v TFA).

Le strutture peptidiche ottenute sono illustrate in **Figura 1.11**.

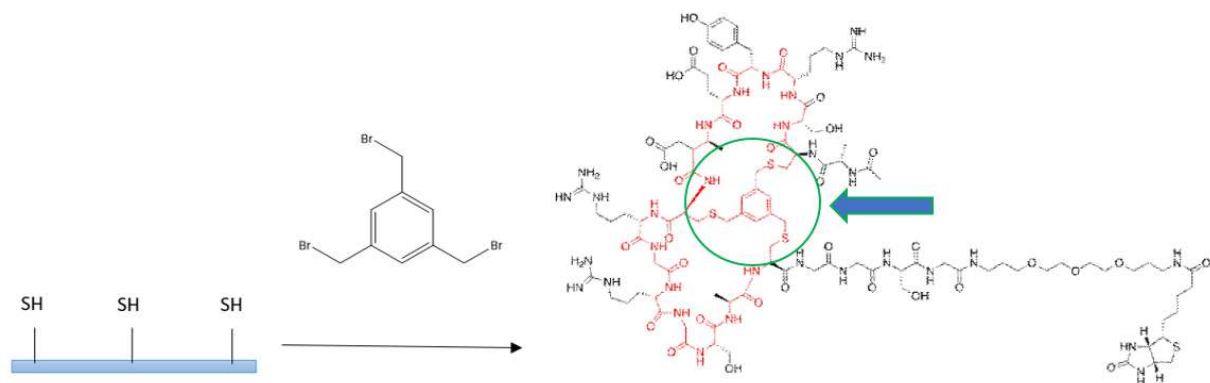


Figura 2.8. Reazione di bicicclizzazione del peptide P₁ con l'impiego dell'agente alchilante TBMB.

L'ultimo passaggio è il congelamento del prodotto in azoto liquido e la successiva liofilizzazione. Il prodotto ottenuto deve comunque garantire un grado di purezza il più elevato possibile in modo che i siti di reazione del peptide siano disponibili per l'interazione con h-uPA.

La purezza dei peptidi sintetizzati è maggiore del 95% sia per P₁ che per P₂. Quest'ultime sono state calcolate attraverso un'analisi HPLC-MS ed una conseguente elaborazione dei dati ottenuti con il software MestreNova®.

Al termine, sono ottenuti 3.5 mg di peptide P₁ (PM: 2574.1 g/mol) e 2.5 mg di peptide P₂ (PM: 2553.98 g/mol). Le rispettive strutture peptidiche in dettaglio sono illustrate in **Figura 1.11**.

2.4. Sviluppo della piattaforma biosensoristica

L'architettura della piattaforma biosensoristica sviluppata in questo lavoro di tesi è rappresentata in **Figura 2.9**.

Il biorecettore peptidico (P₁ o P₂), che rappresenta lo strato di riconoscimento biomolecolare della piattaforma, è legato alle microparticelle magnetiche (MB) via interazione streptavidina/biotina.

Ulteriori componenti del biosensore sono degli anticorpi: l'anticorpo primario policlonale, pAb anti-uPA, e l'anticorpo secondario, anti-rabbit IgG-ALP. Il primo permette un'interazione per affinità nei confronti dell'antigene h-uPA attraverso il dominio Fab dell'anticorpo stesso. Il secondo, invece, marcato con l'enzima fosfatasi alcalina (ALP), ha il compito di legarsi specificatamente al dominio Fc del primo anticorpo.

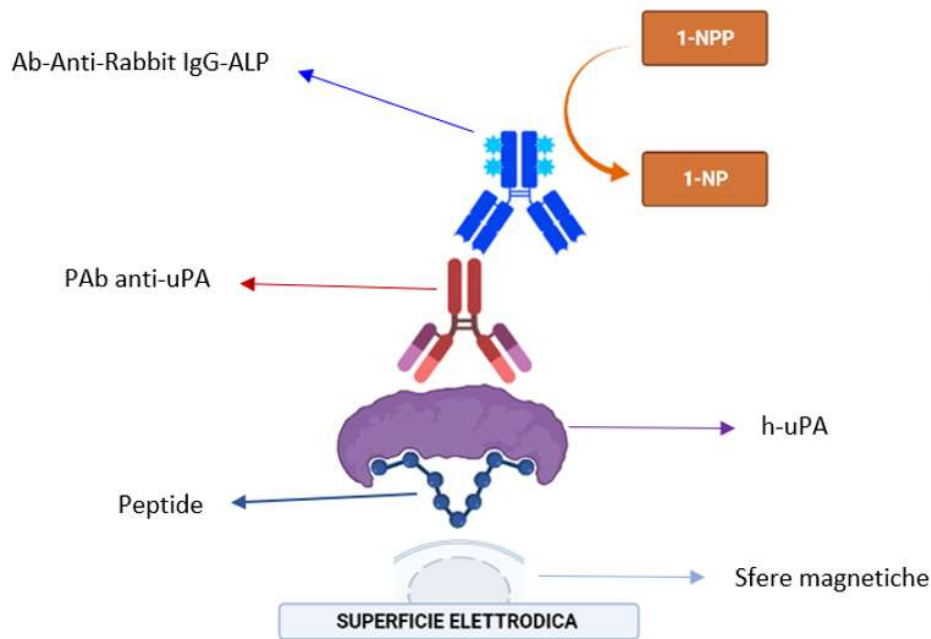


Figura 2.9. Architettura del biosensore testato nel presente lavoro di tesi con specificate le singole componenti. Immagine realizzata con BioRender.com.

La rilevazione elettrochimica dell'analita h-uPA avviene per via indiretta tramite la rilevazione del prodotto della reazione enzimatica tra ALP ed il proprio substrato. ALP, infatti, catalizza la reazione di idrolisi del substrato 1-naftil fosfato (1-NPP), il quale è aggiunto all'ambiente di reazione dopo che l'immunocomplesso, formato da peptide, h-uPA ed i due anticorpi si è formato ed è stato magneticamente depositato sulla superficie di SPE. Quindi, ALP idrolizza e rimuove i gruppi naftolo-fosfato da 1-NPP ottenendo un prodotto fenolico (1-naftolo, 1-NP). Quest'ultimo, essendo elettroattivo, viene successivamente ossidato elettrochimicamente a 1,4 Naftochinone permettendo di rilevare l'analita. Poiché le MB funzionalizzate dal peptide recettore possono catturare molte molecole di h-uPA il prodotto 1-NP dato da ALP favorirà l'amplificazione del segnale elettrochimico misurato permettendo una correlazione diretta con la concentrazione di analita stesso.^{30,54,55}

L'analita impiegato nel biosensore è h-uPA a basso peso molecolare (LMW-h-uPA) e non la proteina intera (HMW-h-uPA), ed è stata fornita dal Laboratorio di ricerca della Prof.ssa L. Cedron, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova.

In questo progetto, le MB scelte sono le Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 della Invitrogen™.⁵⁶ Esse sono microparticelle sferiche superparamagnetiche con diametro di 1 µm ricoperte da un monostrato di streptavidina ricombinante legato in modo covalente alla superficie. Il compito della streptavidina è di fungere da ligando per le molecole con cui si vogliono funzionalizzare le MB; in questo caso per i peptidi ciclici. La capacità magnetica è intensificata dalla presenza di un quantitativo costante di ferro (26% m/m) nelle biglie.

La particolare composizione è scelta in modo che la maggioranza dei siti di legame della streptavidina siano stericamente disponibili per il legame con la biotina presente nella struttura dei peptidi sintetizzati (nella streptavidina delle biglie sono disponibili quattro siti di legame ad elevata affinità per la biotina). In questo modo è possibile favorire una massima funzionalizzazione delle MB attraverso il biorecettore di interesse grazie all'elevata affinità di legame tra streptavidina e biotina ($K_d = 10^{-15}$).

La dimensione della molecola che deve essere legata alle MB ed il suo grado di biotinilazione influenzeranno, dunque, la sua capacità di legame con le stesse MB. Importante è, inoltre, il grado di purezza della biomolecola, che permette di sfruttare un certo numero di siti attivi per il legame.

Le MB scelte sono materiali idrofili, caricati negativamente e presentano una cinetica di reazione molto rapida in fase liquida. Esse presentano un'ampia superficie di contatto, un'efficace trazione magnetica ed una lenta velocità di sedimentazione durante l'incubazione.

2.4.1. Funzionalizzazione delle MB con i peptidi P₁ e P₂

La funzionalizzazione delle MB avviene attraverso la formazione del legame streptavidina-biotina tra la superficie ricoperta delle MB e la biotina presente nei peptidi.¹³

Il procedimento di funzionalizzazione di seguito descritto è specifico per il peptide P₁, ma è uguale a quello utilizzato per il P₂.

Il primo passaggio consiste nel sottoporre ad agitazione rotativa le MB, precedentemente conservate in frigo ad una temperatura tra 0 e +4 °C, al fine di ottenere una sospensione omogenea delle stesse a temperatura ambiente. Vengono prelevati e trasferiti 25 µL di tale sospensione in un tubo Eppendorf da 1 mL. Quest'ultima viene posizionata in un separatore magnetico all'interno del quale, trascorsi circa due minuti, le MB vengono separate dalla soluzione in cui erano state stoccate dal fornitore. Il surnatante è eliminato tramite estrazione.

L'estrazione consiste in tre cicli di lavaggio, ciascuno dei quali costituito da una diversa soluzione tampone. Di seguito vengono elencate, in ordine di applicazione, le soluzioni tampone impiegate. B&W (2X), B&W (1X/0.01% Tween 20) e, infine, PBS/0.01% Tween 20. Composizioni e caratteristiche dei vari buffer sono riportate nel capitolo 2.1.

Per ciascun ciclo di lavaggio si ha il trattamento della soluzione contenente le MB con 200 µL di soluzione tampone, seguito da agitazione su vortex, separazione magnetica per 2 min ed eliminazione del surnatante.

Terminati i cicli di lavaggio, si procede con l'aggiunta di 1 μL di una soluzione di peptide P_1 in acqua Milli Q con concentrazione di 1.75 mg/mL e 199 μL di PBS. La soluzione peptidica è stata preparata precedentemente diluendo 3.5 mg di peptide in 2 mL di acqua Milli Q. Il tutto è lasciato ad incubare, sotto agitazione rotativa, per 30 min.

Una volta trascorso il tempo di incubazione, in cui il peptide ha potuto ancorarsi alla superficie delle MB, la sospensione ottenuta è sottoposta nuovamente a separazione magnetica ed il surnatante è stato di nuovo eliminato. Si procede con due ulteriori cicli di lavaggio a base di PBS/0.01% Tween 20.

Per impedire la formazione di legami aspecifici da parte degli eventuali siti streptavidinici rimasti liberi con molecole o interferenti estranei al peptide, si aggiungono 200 μL di soluzione 1 mM di biotina in PBS e si lascia il tutto sotto agitazione rotativa per 30 minuti. Lo scopo della biotina è di saturare eventuali siti streptavidinici rimasti liberi.

Terminata la procedura di protezione, la sospensione è nuovamente sottoposta a separazione magnetica e a due conseguenti cicli di lavaggio con la soluzione tampone PBS/0.01% Tween 20.

Il trattamento si conclude con l'inserimento di ulteriori 200 μL di PBS/0.01% Tween 20, che riportano in soluzione le MB, ora funzionalizzate con il primo peptide biciclico biotinilato.

L'intero procedimento viene ripetuto su delle nuove MB da funzionalizzare con il secondo peptide (P_2). Al fine di garantire una saturazione completa dei siti attivi delle sfere magnetiche, 1.20 mg disponibili di P_2 sono stati sciolti in 0.8 mL di Milli Q e di questa soluzione (1.5 mg/mL) è stato aggiunto alle MB 1 μL .

2.4.2. Assemblaggio della piattaforma biosensoristica

Una volta funzionalizzate le MB, si procede con l'assemblaggio della piattaforma biosensoristica che coincide con la formazione dell'immunocomplesso in cui l'analita (h-uPA) è catturato da MB- P_{102} da una parte e pAb-mAb-ALP dall'altra.

Il primo passaggio consiste nella preparazione di otto soluzioni di h-uPA in PBS (pH 7.4), partendo da una soluzione madre avente concentrazione di 1 mg/mL. Le soluzioni sono a concentrazione nota e rispettivamente di 0 $\mu\text{g/mL}$, 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$. La scelta di quest'ultime è fatta allo scopo di testare l'intervallo dinamico di concentrazioni rilevate dal biosensore. Questo intervallo deve essere in linea con quello relativo alle concentrazioni ematiche del marcatore tumorale (0.21–16.06 ng di h-uPA/mL di soluzione).⁸ Successivamente, si prelevano otto aliquote, da 15 μL ciascuna, di MB funzionalizzate con il peptide

biciclico e si pongono ciascuna all'interno di un tubo Eppendorf da 1.5 mL. Queste sono sottoposte a separazione magnetica per 2 min, all'eliminazione del surnatante e ad un ultimo lavaggio con PBS. Ad ogni soluzione di MB, vengono aggiunti 200 μ L di una delle soluzioni a concentrazione nota di h-uPA in PBS.

Al fine di favorire l'interazione tra proteina e peptide, le soluzioni vengono sottoposte ad incubazione in agitazione rotativa per 45 min a temperatura ambiente. Successivamente, le MB vengono separate magneticamente dalle soluzioni mediante agitazione magnetica per 2 min e sottoposte a due lavaggi con la soluzione tampone PBS/0.01% Tween 20 e ad un singolo lavaggio con solo PBS.

Una volta terminato il trattamento, a ciascuna aliquota si aggiungono 100 μ L di una soluzione 1:500 di pAb anti-uPA/PBS ed il tutto è lasciato in incubazione sotto agitazione rotativa per 45 min. Le soluzioni sono sottoposte a due lavaggi con la soluzione tampone DEA/0.01% Tween 20 ed uno con solo DEA. Si continua la composizione dell'immunocomplesso ("sandwich") con l'aggiunta di 200 μ L di una soluzione 1:1000 di Anti-Rabbit IgG-ALP/DEA a ciascuna soluzione di lavoro. Anche a seguito di questa aggiunta, tutte le aliquote sono sottoposte ad incubazione in agitazione rotativa per 30 min. L'assemblaggio della piattaforma si conclude con due lavaggi con la soluzione tampone DEA/0.01% Tween 20, due di solo DEA e con la sospensione finale delle MB in 50 μ L di DEA.

Per quanto concerne il substrato, questo è preparato solubilizzando 2 mg di 1-NPP nel tampone DEA in modo da ottenere una soluzione con concentrazione di 0.5 mg/mL. Quest'ultima è, poi, lasciata in incubazione per 5 min. Lo stesso procedimento è ripetuto per l'assemblaggio della piattaforma biosensoristica funzionalizzata con il peptide P₂ con la variante che, in questo caso, le concentrazioni testate di h-uPA sono: 0 μ g/mL, 0.01 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.075 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 0.2 μ g/mL, 0.5 μ g/mL e 1 μ g/mL.

A questo punto, i campioni sono pronti per le misure elettrochimiche, descritte nel paragrafo successivo.

2.5. Svolgimento delle misure elettrochimiche

Nel presente lavoro di tesi, le misure elettrochimiche sono svolte con gli SPE modello DRP 110 della Metrohm DropSens, aventi WE in grafite con diametro di 4 mm, pseudo-riferimento in argento Ag (AgQRE) e CE in grafite (**Figura 1.6**). L'immunocomplesso descritto nel paragrafo precedente è depositato sulla superficie di SPE ed attratto magneticamente ad essa grazie all'ausilio di un magnete posto sotto SPE stesso.

È fondamentale assicurare una copertura omogenea dell'intera superficie elettrodica. Come si osserva, infatti, in **Figura 2.10** l'area geometrica dell'elettrodo di lavoro (4 mm) non corrisponde all'effettiva area attiva del medesimo e la superficie elettrodica è piuttosto irregolare.

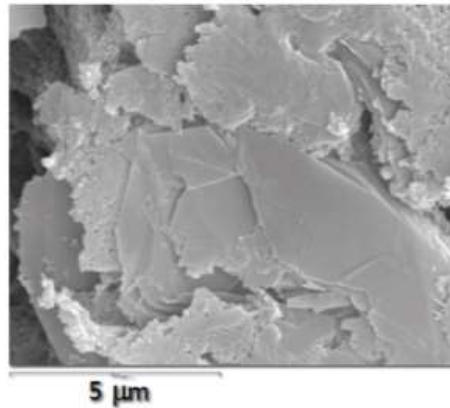


Figura 2.10. Immagine SEM della superficie dell'elettrodo di lavoro degli SPE a base di grafite della Metrohm DropSens.⁵⁷

Lo svolgimento delle misure elettrochimiche segue un protocollo ben preciso.

L'elettrodo SPE, bloccato su di un supporto che alloggia anche un magnete, viene inserito nell'apposito connettore, collegato al potenziostato, ed il potenziostato è collegato al computer ed acceso. La strumentazione impiegata è illustrata in **Figura 2.11**.



Figura 2.11. Strumentazione impiegata per le misure elettrochimiche del biosensore a base peptidica per la rilevazione del marcatore tumorale h-uPA.

Successivamente, con l'ausilio di una micropipetta, si depositano sull'elettrodo un'aliquota di 60 μL della soluzione di substrato ed un'aliquota di 10 μL della soluzione contenente l'analita. Il tutto è lasciato in incubazione per 5 min.

Durante la deposizione è necessario assicurarsi che la superficie elettrodica sia completamente ricoperta con il campione in analisi.

Trascorso il tempo di incubazione si fa partire la misura in DPV.

Per ciascuna misura, anche della medesima concentrazione, si utilizza un nuovo elettrodo SPE.

I parametri sperimentali utilizzati ed ottimizzati per le misure di DPV sono riportati nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Elenco dei parametri ottimizzati ed utilizzati per le misure di DPV.

Potenziale iniziale	-0.1 V
Potenziale finale	0.65 V
Step di potenziale	0.004 V
Impulso di potenziale	0.002 V
Durata dell'impulso	15 ms
Velocità di scansione	0.04 V/s

Al fine di garantire una caratterizzazione degli elettrodi e stabilire possibili interferenze elettrochimiche da parte del tampone DEA e del substrato, sono state effettuate delle misure di DPV del solo tampone DEA e del substrato (1-NPP) solubilizzato in quest'ultimo tampone. Per queste misure sono stati depositati sugli elettrodi SPE 60 μL di soluzione e si è fatta partire la misura.

Tutti i potenziali sono riferiti al potenziale di AgQRE.

3. Risultati e discussione

3.1. L'immunocomplesso

La scelta delle MB Dynabeads MyOne Streptavidin C1 permette una capacità di legame maggiore ed un minor livello di sedimentazione rispetto alle Dynabeads standard. Queste caratteristiche le rendono ideali per isolare grandi quantità di ligando biotinilato, nel nostro caso di peptide biciclico.

La quantità di peptide biciclico (P₁ o P₂) scelto per funzionalizzare le MB è tale da saturare completamente la superficie delle sfere magnetiche ed ottenere un loro ricoprimento omogeneo. In questo modo è favorita la riproducibilità delle misure del saggio elettrochimico.

Il quantitativo di peptide impiegato per la funzionalizzazione dipende dalla capacità legante delle MB. Quest'ultima è indicata nella scheda tecnica delle Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C in **Figura 3.1**.

Table 2 Typical binding capacities for one mg of Dynabeads™ magnetic beads.

Biotinylated target	Binding/mg
Free Biotin (pmol)	>2500
Biotinylated peptides (pmol)	~400
Biotinylated antibody (µg)	~20
ds DNA (µg)*	~20
ss oligonucleotides (pmol)*	~500

* Oligonucleotides and DNA fragments

For oligonucleotides, capacity is inversely related to molecule size (number of bases). Reduced binding capacity for large DNA fragments may be due to steric hindrance.

Figura 3.1. Tabella in cui sono elencate le varie capacità di legame di 1mg di sfere magnetiche con diversi elementi.

Immagine adattata dalla scheda tecnica della MB magnetiche fornita dalla ditta fornitrice InvitrogenTM.⁵⁶

Da essa si evince che 1 mg di MB è in grado di legare circa 400 pmoli di peptide biotinilato.

Ne consegue che per saturare completamente i 0.25 mg di MB impiegati per il saggio sono necessarie almeno 100 pmoli di peptide biciclico biotinilato. Nel presente progetto è utilizzato 1 µL di soluzione peptide/Milli Q, a concentrazione di 1.75 mg/mL per il peptide P₁ (2574.1 g/mol) e di 1.5 mg/mL per il peptide P₂ (2553.98 g/mol). Il quantitativo di pmoli impiegate è, dunque, di 680 pmoli di peptide P₁ e 587 pmoli di peptide P₂. In questo modo è possibile affermare con certezza che i siti di ancoraggio streptavidinici delle MB siano completamente saturati grazie all'impiego di un eccesso di pmoli di entrambi i peptidi biciclici.

3.2. Caratterizzazione degli SPE

Al fine di ottimizzare i parametri utilizzati per le misure dei campioni in esame e di fornire una caratterizzazione generale degli elettrodi stampati utilizzati nel presente lavoro di tesi, sono state effettuate preliminarmente delle misure di voltammetria differenziale pulsata. L'intervallo di potenziale è stato scelto in base al processo di ossidazione di 1-naftolo, prodotto per reazione enzimatica di 1-NPP ad opera dell'enzima fosfatasi alcalina. Soluzioni del solo solvente/elettrolita sono state analizzate per valutare possibili interferenze.

Per ciò che riguarda la scelta della corretta finestra di potenziale, 50 μL di soluzione di 1-naftil fosfato (0.5 mg/mL) e 15 μL di una soluzione anticorpo secondario in tampone DEA (1:1000) sono stati analizzati via DPV ed i risultati sono mostrati in **Figura 3.2**.

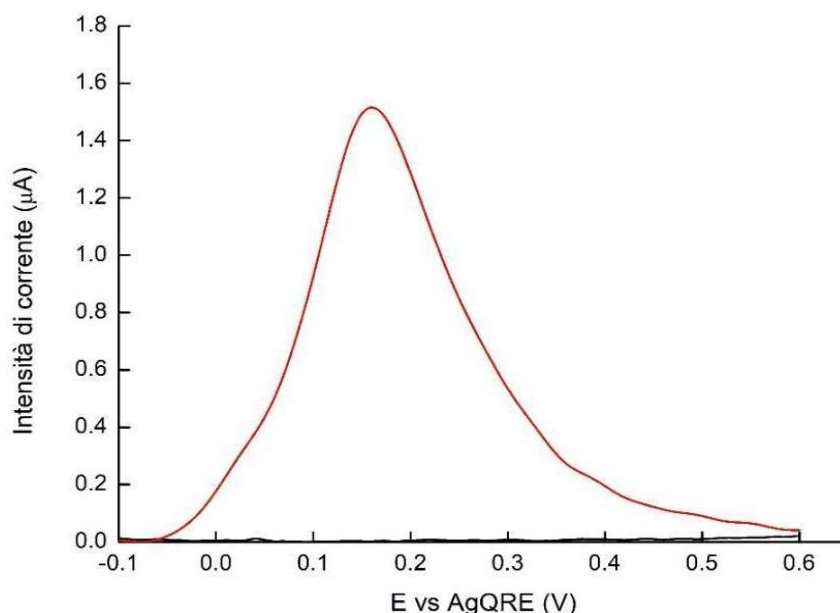


Figure 3.2. In rosso, voltammogramma DPV di 65 μL di campione (50 μL di soluzione di 1-NPP, 0.5 mg/mL, e 15 μL di una soluzione 1:1000 di anticorpo secondario in tampone DEA). Il voltammogramma riporta anche il segnale riferito al tampone DEA (nero).

Il prodotto di ossidazione presenta un picco a + 0.16 V vs AgQRE. Pertanto, per le misure svolte su campioni contenenti l'analita (h-uPA), è stata scelta come finestra di potenziale quella compresa tra -0.1 V e +0.65 V.^{43,58,59}

Nel dettaglio, come si evince dai voltammogrammi in **Figura 3.3**, sia il solvente/elettrolita che il substrato 1-NPP, non danno alcun segnale specifico. Ciò conferma che 1-NPP, in assenza dell'enzima ALP coniugato all'anticorpo secondario, non può contribuire in alcun modo al segnale che si avrebbe in presenza dell'enzima e, quindi, dell'analita h-uPA.

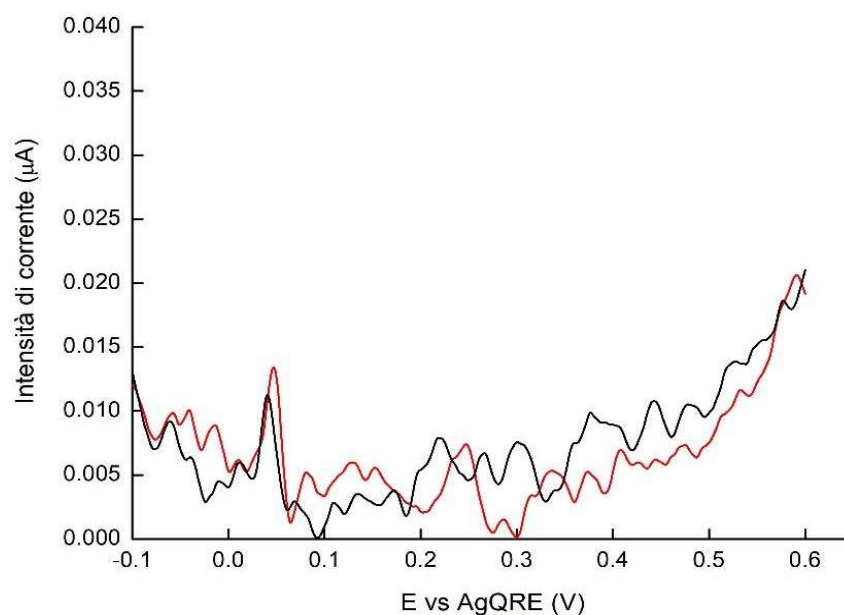


Figura 3.3. Sovrapposizione dei voltammogrammi registrati con misure in DPV, in 60µL di campione, della soluzione tampone DEA (nero) e di una soluzione di 1-NPP in tampone DEA con concentrazione di 0.5 mg/mL (rosso).

Una volta caratterizzati gli elettrodi, si procede con la determinazione dell'analita, h-uPA, in soluzioni sintetiche con tampone DEA. Le analisi di questi campioni sintetici sono state effettuate con entrambi i biorecettori proposti, P₁ e P₂.

3.3. Risultati delle misure elettrochimiche dell'immunocomplesso con il peptide P₁

Come descritto precedentemente, l'immunocomplesso MB-P₁-[h-uPA]-pAb-mAb-ALP è stato costruito variando la concentrazione di h-uPA e caratterizzato via DPV. Per ciascuna concentrazione sono state effettuate misure in triplicato ed i voltammogrammi risultanti sono riportati in **Figura 3.4**.

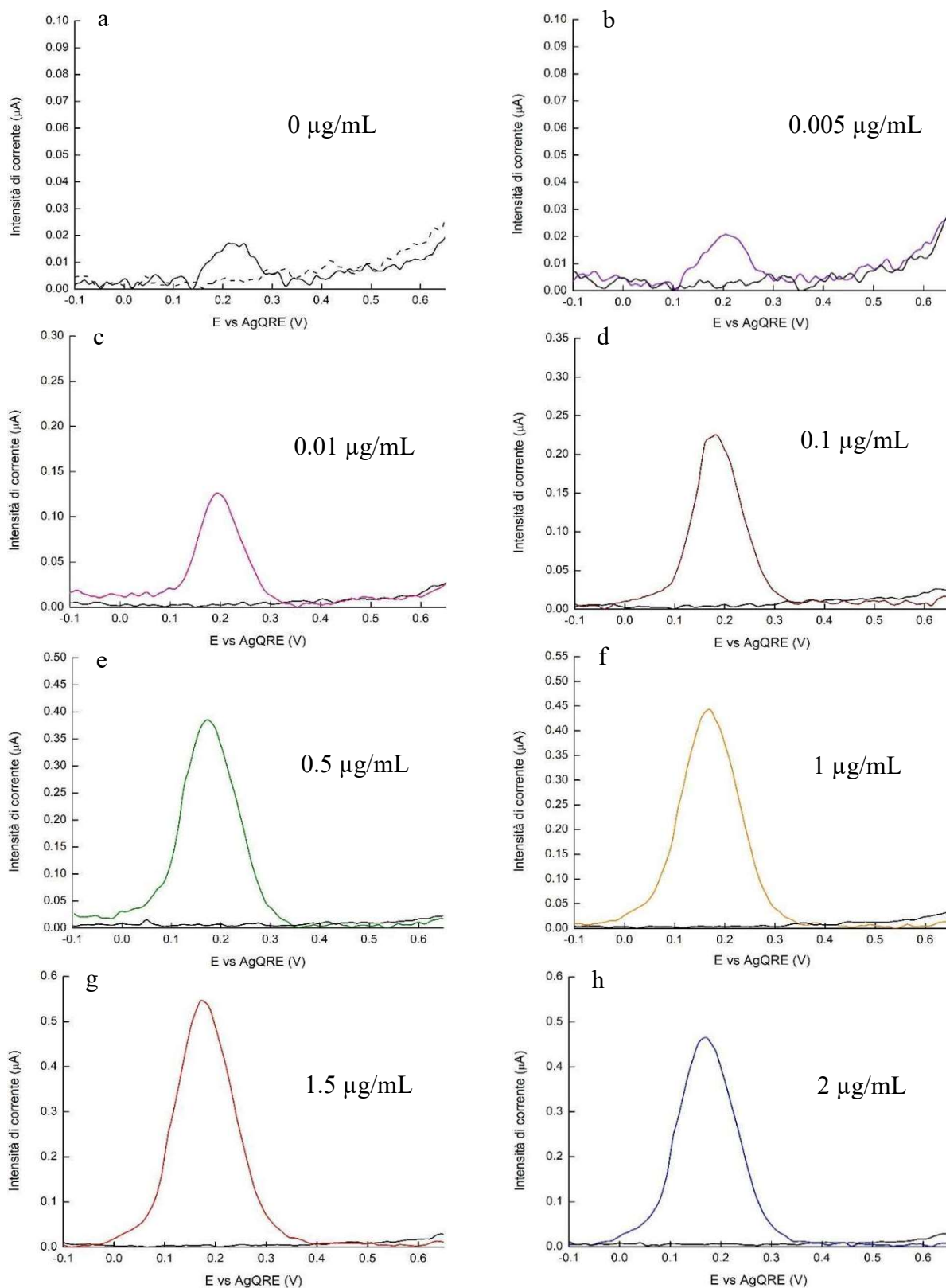


Figura 3.4.DPV registrati a concentrazioni di analita, h-uPA, crescenti: (a) 0 $\mu\text{g/mL}$, (b) 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, (d) 0.1 $\mu\text{g/mL}$, (e) 0.5 $\mu\text{g/mL}$, (f) 1 $\mu\text{g/mL}$, (g) 1.5 $\mu\text{g/mL}$ e (h) 2 $\mu\text{g/mL}$. Ogni voltammogramma riporta anche il segnale riferito al tampone DEA (nero o tratteggiato). Il biosensore utilizza il peptide P₁.

La prima considerazione da fare riguarda la concentrazione 0 $\mu\text{g/mL}$. La procedura analitica applicata è la medesima utilizzata per tutte le altre concentrazioni, descritta nel paragrafo 2.4.2, con la differenza che si aggiungono solo 200 μL di PBS. In questo modo, l'architettura a "sandwich" dell'immunocomplesso non dovrebbe crearsi. Quindi, nessun processo elettrochimico può avvenire ed il segnale dovrebbe essere identico a quello corrispondente al solo tampone DEA. Come si evince dalla **Figura 3.4**, ciò non avviene e si può identificare un segnale che fornisce informazioni riguardo al rapporto segnale rumore. L'intensità di quest'ultimo è relativamente bassa, circa 20 nA.

Altro aspetto è che le intensità di corrente riferite alla concentrazione 0 $\mu\text{g/mL}$ e 0.005 $\mu\text{g/mL}$ differiscono solamente di circa 2.8 nA. Questa piccola variazione nell'intensità di corrente suggerisce che il segnale riferito alla concentrazione 0.005 $\mu\text{g/mL}$, come quello 0 $\mu\text{g/mL}$, siano dovuti alla somma di contributi faradici non significativi. Tali segnali (0 $\mu\text{g/mL}$ e 0.005 $\mu\text{g/mL}$) possono essere imputati a diversi fenomeni. In *primis*, il numero elevato di componenti del biosensore, che potrebbero adsorbirsi alla superficie delle MB o, successivamente, alla superficie elettrodica, può generare un segnale elettrochimico. Tale contributo potrebbe essere ulteriormente modificato variando le aliquote di lavaggio utilizzate nel protocollo analitico descritto nel sotto capitolo 2.4.2.

Un altro contributo può essere dovuto alle MB ed al loro effetto catalitico nei confronti di 1-NPP a causa della presenza di ossido di ferro nel loro nocciolo magnetico.⁶⁰

Premesse le osservazioni fatte per il bianco e la concentrazione di h-uPA più bassa analizzata, si può osservare che la corrente di picco anodica aumenta al crescere della concentrazione di analita (**Figure 3.4 e 3.5**).

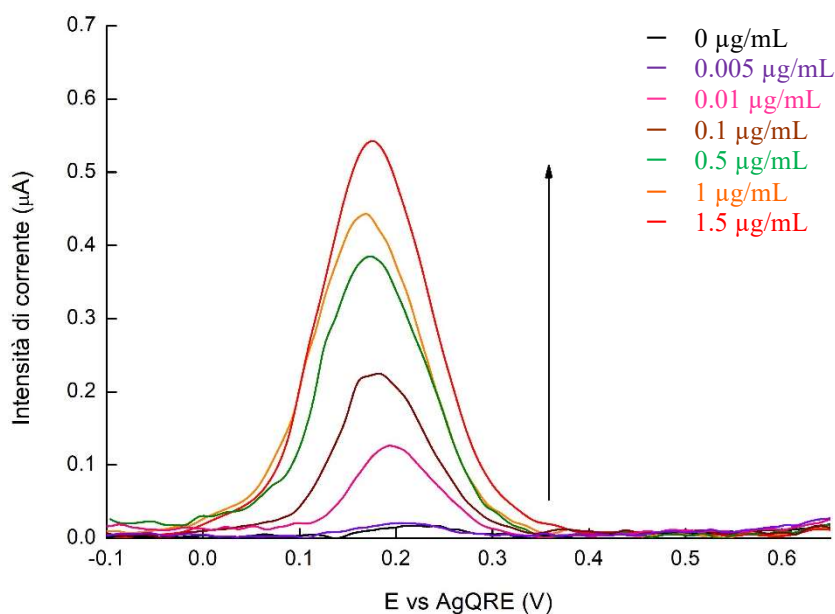


Figura 3.5. Sovrapposizione dei voltammogrammi delle concentrazioni 0 $\mu\text{g/mL}$, 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 1.5 $\mu\text{g/mL}$, riportati in **Figura 3.4**.

Nello sviluppo di un metodo analitico è auspicabile che vi sia una relazione di proporzionalità tra l'intensità del segnale misurato e la concentrazione di analita. Nel metodo proposto, tuttavia, tale andamento non vale se si osserva il segnale dovuto alla concentrazione 2 $\mu\text{g/mL}$, come mostrato in **Figura 3.6**.

Infatti, si può notare come la corrente registrata per la concentrazione di analita di 2 $\mu\text{g/mL}$ sia ben inferiore a quella attesa.

Generalmente un immunosaggio a sandwich, con o senza lavaggi intermedi, presenta un andamento lineare crescente che, all'aumentare della concentrazione di analita, aumenti anche il segnale di risposta. Inoltre, per concentrazioni elevate di target, il segnale tende a raggiungere un plateau.

Tuttavia, raggiunto un determinato valore di concentrazione, definito *hook point*, il segnale interrompe l'andamento crescente ed inizia a decrescere portando alla formazione di una curva ad uncino caratteristica dell'effetto Hook. Questo fenomeno è causato dalla saturazione del sistema e rappresenta una limitazione alle prestazioni dei saggi, determinando una sottostima delle concentrazioni elevate di analita che, in sede di analisi clinica, può risultare in un falso negativo.^{61,62}

Nel caso del presente progetto, l'eccesso di proteina, aggiunta al saggio con concentrazioni troppo elevate (2 $\mu\text{g/mL}$), comporta la saturazione del biosensore e lega gli anticorpi primari. Quest'ultimi vengono eliminati nelle fasi di lavaggio causando una perdita del segnale nei passaggi successivi della preparazione del saggio.

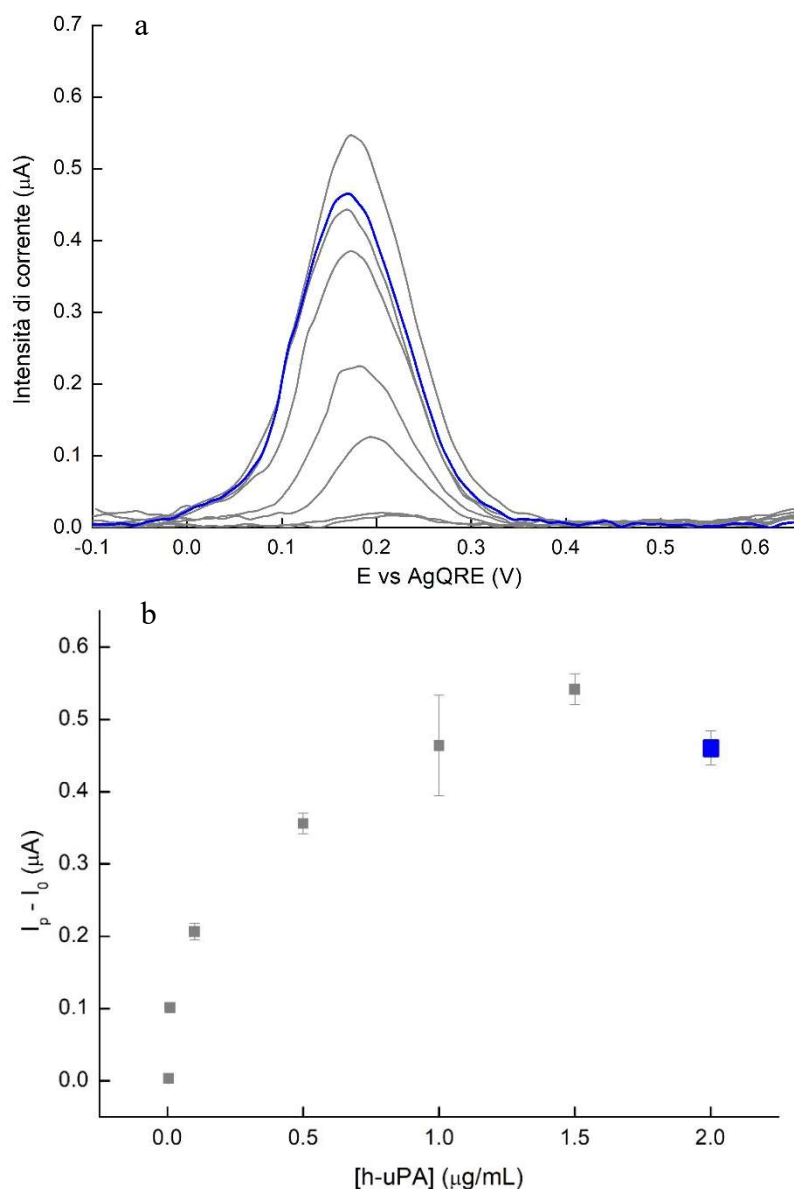


Figura 3.6.(a) Sovrapposizione dei voltammogrammi relativi alle concentrazioni riportate in **Figura 3.5** in cui è evidenziato il picco riferito alla concentrazione 2 µg/mL (blu). (b) Curva di calibrazione in cui viene riportata l'intensità di corrente (µA) in funzione della concentrazione di h-uPA. In blu è evidenziata la concentrazione 2 µg/mL.

Per verificare la relazione tra l'intensità di corrente e la concentrazione di h-uPA, è stato scartato il valore di 2 µg/mL (**Figura 3.7**). Inoltre, precisiamo che le intensità di corrente riportate nei grafici, e riferite a ciascuna concentrazione analizzata, si intendono come differenza (ΔI) tra la corrente di picco rilevata per una data concentrazione ed il valore dell'intensità di corrente della concentrazione 0 µg/mL (I_0), ovvero del bianco.

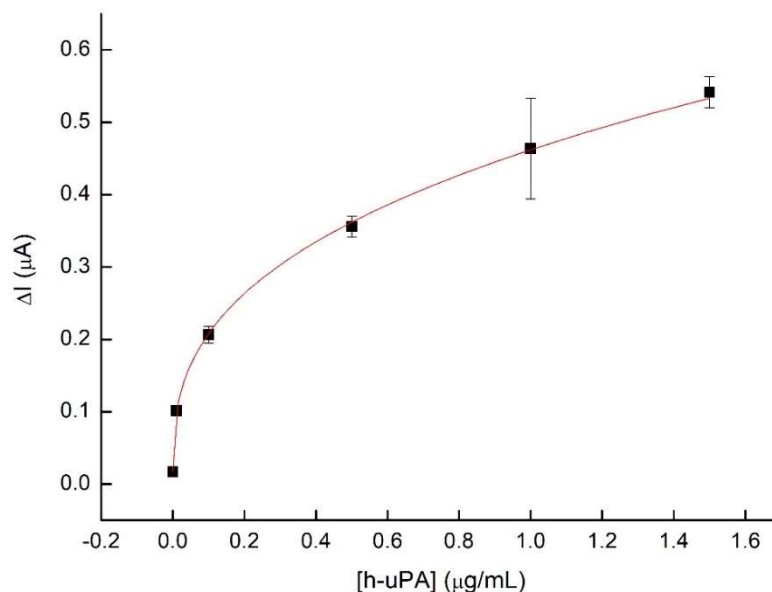


Figura 3.7. Curva di calibrazione in cui viene riportata l'intensità di corrente (μA) in funzione della concentrazione di h-uPA in cui la concentrazione di $2 \mu\text{g/ml}$ è stata scartata. La regressione dei dati (in rosso) è ottenuta utilizzando il modello logistico a 4 parametri (4PL).

L'andamento complessivo mostrato in **Figura 3.7** è caratteristico dei saggi immunochimici.

I dati ottenuti sono stati elaborati con il modello logistico a 4 parametri (4PL) che ha permesso di creare la curva di regressione mostrata in figura (linea rossa) con un coefficiente di regressione pari a 0.998. Il modello 4PL è definibile dalla seguente **Equazione 9**:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad \text{Equazione 9}$$

Dove y è la risposta, A_2 è la risposta a concentrazione infinita di analita, A_1 è la risposta a concentrazione nulla di analita, x è la concentrazione di analita, x_0 è il punto di flesso della curva, p è il fattore di pendenza (*slope factor*).

Altro parametro importante per definire la bontà del metodo analitico è il limite di rivelabilità, LOD. Questo permette di identificare il valore minimo di concentrazione di h-uPA rilevabile ed è stato calcolato in base all'**Equazione 10**.

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad \text{Equazione 10}$$

dove σ è la deviazione standard del bianco (μA) ed S è la pendenza della retta ottenuta considerando la porzione lineare (da $0.1 \mu\text{g/mL}$ a $1.5 \mu\text{g/mL}$) della curva di calibrazione della **Figura 3.7**.

Il LOD ottenuto è pari a 0.06 $\mu\text{g/mL}$.

Il valore teorico del LOD non concorda, però, con quanto visto sperimentalmente. Infatti, come si vede facilmente dalla **Figura 3.5**, concentrazioni inferiori a quella calcolata con il LOD sono nettamente distinguibili rispetto al bianco. Pertanto, abbiamo ipotizzato che tale aspetto potesse essere corretto lavorando sulla riproducibilità delle misure.

3.4. Risultati delle misure elettrochimiche dell'immunocomplesso con il peptide P₂

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalle misure elettrochimiche sui campioni contenenti l'analita h-uPA, questa volta riconosciuto utilizzando il peptide P₂. Per ciascuna concentrazione sono state effettuate misure in triplicato ed i voltammogrammi sono riportati in **Figura 3.8**.

Anche in questo caso, come per il biosensore con il peptide P₁, la concentrazione 0 $\mu\text{g/mL}$ presenta un'intensità di corrente diversa e maggiore rispetto a quella del tampone DEA.

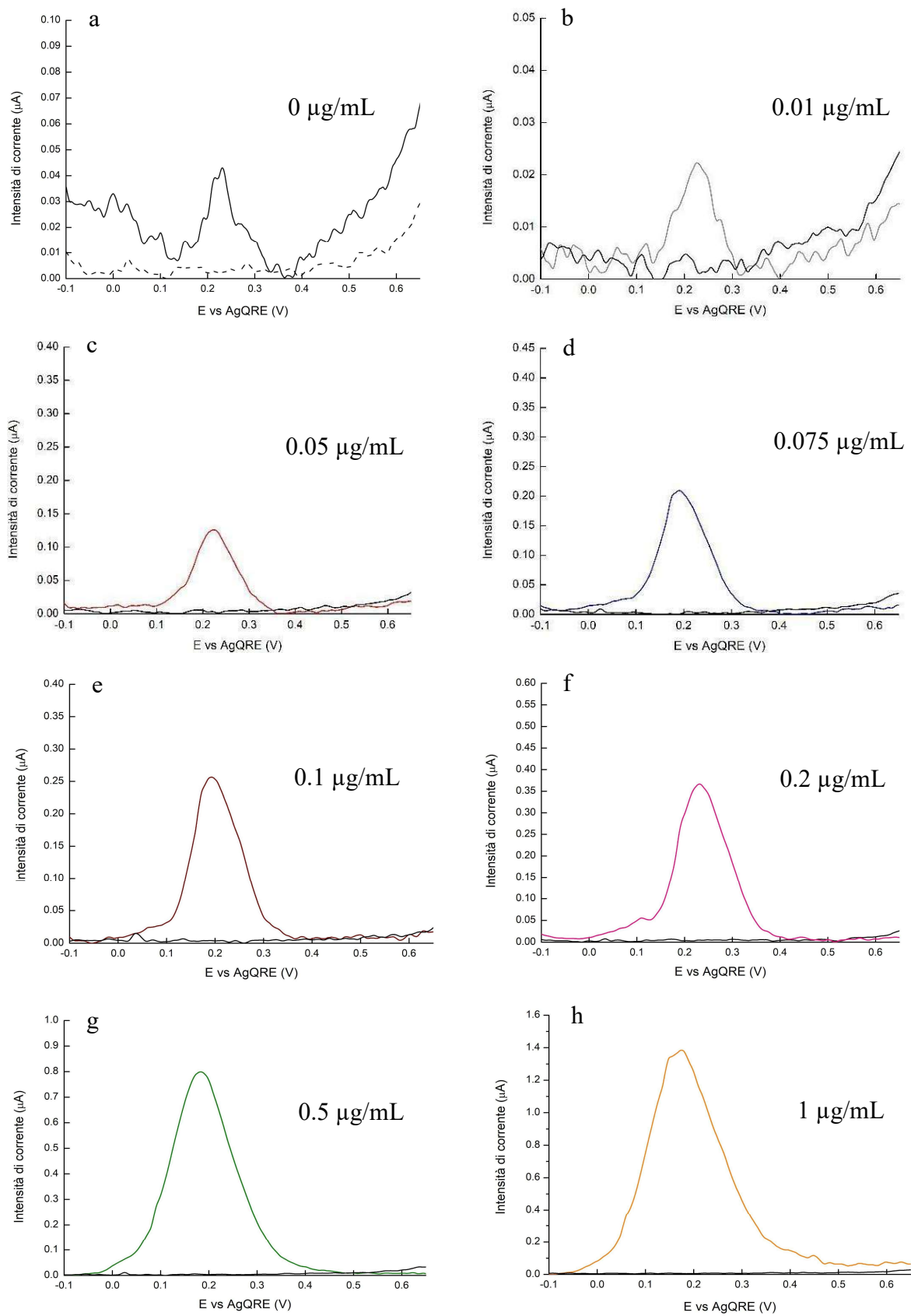


Figura 3.8. Voltammogrammi ottenuti dalle misure in DPV del biosensore con il peptide P₂ per le 8 concentrazioni scelte di h-uPA: a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 0.01 $\mu\text{g/mL}$, c) 0.05 $\mu\text{g/mL}$, d) 0.075 $\mu\text{g/mL}$, e) 0.1 $\mu\text{g/mL}$, f) 0.2 $\mu\text{g/mL}$, g) 0.5 $\mu\text{g/mL}$ e h) 1 $\mu\text{g/mL}$. Ogni voltammogramma riporta il picco riferito all'analita (colorato) e il segnale riferito al solo solvente DEA (nero o tratteggiato).

Altro aspetto congruente con quanto visto per il biosensore funzionalizzato con P₁ è che la corrente di picco aumenta progressivamente con la concentrazione h-uPA. Ciò è confermato dalla sovrapposizione dei voltammogrammi (**Figura 3.9**) riferiti a ciascuna concentrazione.

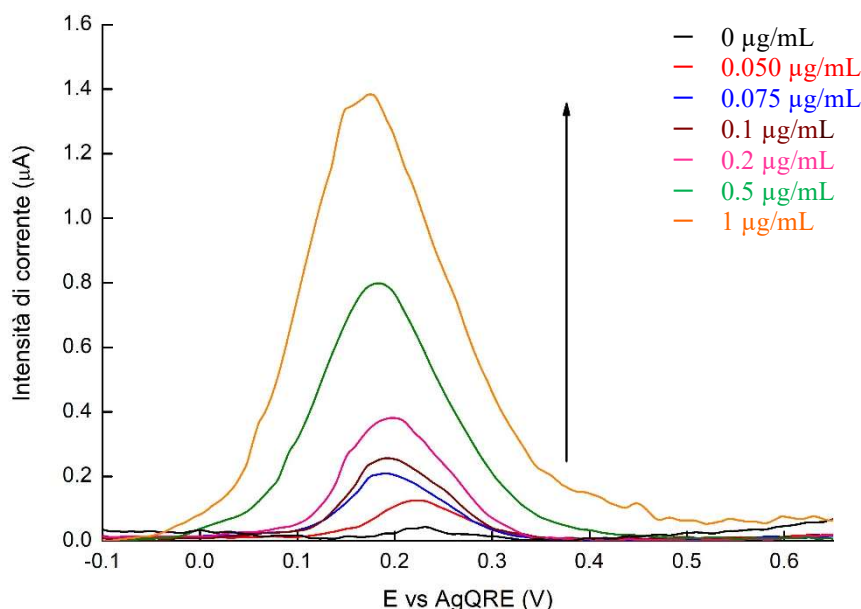


Figura 3.9. Sovrapposizione dei voltammogrammi delle concentrazioni 0 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.075 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.5 µg/mL e 1 µg/mL, riportate in **Figura 3.8**.

È evidente che anche in questo caso vi sia una relazione di proporzionalità tra la concentrazione di h-uPA e l'intensità di corrente ad essa riferita.

Un fattore interessante riguarda la concentrazione 0.01 µg/mL. Come si evince dalla figura sopra riportata, essa differisce in maniera non significativa dalla concentrazione 0 µg/mL. Come per la concentrazione 0.005 µg/mL nel biosensore funzionalizzato con il peptide P₁, si presume che il segnale derivante da tale concentrazione sia dovuto ad una serie di contributi faradici non significativi causati, probabilmente, dagli stessi fenomeni descritti per il biosensore con P₁. Per tale motivo la concentrazione 0.01 µg/mL presenta un valore di corrente non significativo ai fini qualitativi.

Come si vede in **Figura 3.9**, il resto delle concentrazioni presenta, invece, una relazione di proporzionalità diretta con i rispettivi valori di corrente registrati. Tale aspetto è confermato dal grafico in **Figura 3.10**. Le intensità di corrente riportate nei grafici (ΔI) sono riferite a ciascuna concentrazione analizzata e si intendono come differenza tra la corrente di picco rilevata per una data concentrazione ed il valore dell'intensità di corrente della concentrazione 0 µg/mL (I_0), intesa come bianco.

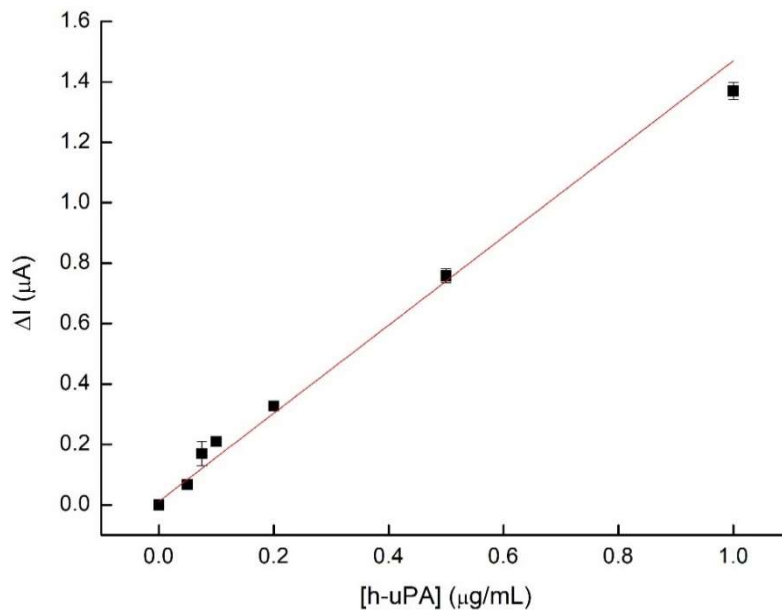


Figura 3.10. Curva di calibrazione in cui viene riportata l'intensità di corrente (μA) in funzione della concentrazione di h-uPA. I dati riportati sono analizzati con il modello di regressione lineare che viene espresso secondo la funzione $y = 0.0114 \pm 0.01238 + 1.4583 \pm 0.0733 * x$.

I dati sono stati analizzati utilizzando un modello di regressione lineare. Quest'ultimo permette di analizzare la relazione funzionale lineare tra due variabili secondo la funzione matematica $y = q + m * x$, in cui q corrisponde al valore assunto dall'intercetta nella retta ed m è il coefficiente angolare della retta. Nel caso in esame, i risultati hanno portato alla funzione di regressione $y = 0.0114 \pm 0.01238 + 1.4583 \pm 0.0733 * x$, che presenta un valore per il coefficiente di regressione lineare pari a 0.99.

Il LOD è pari a 0.01 $\mu\text{g/mL}$ e conferma il fatto che la concentrazione più bassa utilizzata, pari appunto a 0.01 $\mu\text{g/mL}$, non possa essere distinta rispetto al bianco.

3.5. Confronto dei risultati delle due piattaforme biosensoristiche

In questa sezione descriviamo un confronto dei risultati delle misure elettrochimiche delle due piattaforme biosensoristiche funzionalizzate rispettivamente con i peptidi P_1 e P_2 .

È interessante osservare come i due peptidi presentino una cinetica enzimatica completamente differente come si evince in **Figura 3.11**. Quest'ultima riporta un confronto dell'andamento delle due curve di calibrazione precedentemente riportate in **Figura 3.6** e **Figura 3.9**.

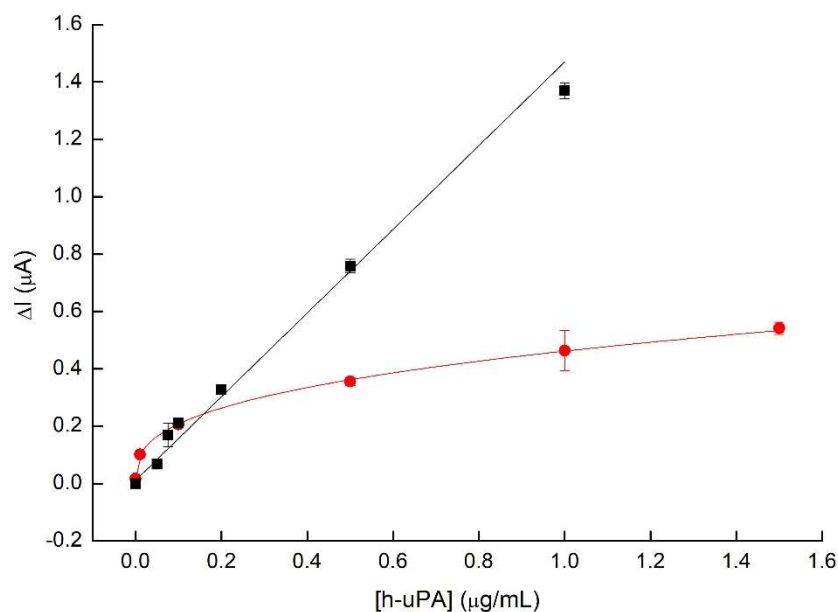


Figura 3.11. Confronto fra le due curve ottenute dalle misure elettrochimiche del biosensore a base peptidica riportate nei capitoli precedenti in cui è riportata l'intensità di corrente contro la concentrazione di h-uPA. In rosso, la curva riferita al biosensore funzionalizzato con il peptide P₁ e in nero quella riferita al biosensore a base di peptide P₂.

Osservando la curva riferita al biosensore funzionalizzato con il peptide P₁, si osserva un andamento simile a quello che si avrebbe per una cinetica enzimatica di tipo Michaelis-Menten. Tuttavia, raggiunta la saturazione, la curva tende a decrescere in accordo con quanto ascrivibile all'effetto Hook. Per quanto riguarda il peptide P₂, invece, l'andamento lineare della curva è più coerente con una cinetica di primo ordine.

Dal grafico è possibile notare anche una evidente differenza nella pendenza delle curve (nel tratto lineare). Nel caso del peptide P₂ questa presenta una pendenza visivamente maggiore rispetto a quella della curva riferita al peptide P₁. A tale aspetto è legata la sensibilità del saggio, maggiore nel caso del biosensore che utilizza il peptide P₂. È importante specificare che il protocollo analitico per l'assemblaggio della piattaforma biosensoristica è stato ottimizzato per l'impiego del peptide P₁. Una successiva ottimizzazione dello stesso per il peptide P₂ potrebbe favorire ulteriormente quest'ultimo in termini di sensibilità.

Le diverse cinetiche osservate nei due biosensori a base peptidica sono dovute alla diversa affinità peptide/h-uPA che i due componenti peptidici presentano. Le diverse strutture peptidiche come, di conseguenza, i diversi siti di legame presenti nello scheletro peptidico, consentono, infatti, una diversa capacità di interazione di un recettore rispetto all'altro.

4. Conclusioni e prospettive

Attraverso l'implementazione di metodologie e la sinergia di elementi innovativi (peptidi, microparticelle magnetiche, anticorpi policlonali e marcatori enzimatici) con tecniche elettrochimiche è stato possibile sviluppare un metodo analitico funzionante per la rilevazione della proteasi serina h-uPA in campioni semplici. L'impiego di due peptidi (P_1 e P_2) ha reso possibile un'ottimizzazione dei risultati in termini di intensità di corrente e di valutare il diverso comportamento del biosensore al variare della componente peptidica. È emerso che entrambi i peptidi risultano altamente sensibili alla proteina. Tuttavia, il biosensore che utilizza il peptide P_2 come recettore dimostra una maggiore sensibilità. Tale aspetto è imputabile ad una maggiore affinità del peptide P_2 nei confronti dell'analita, h-uPA.

Dal punto di vista pratico, un altro aspetto fondamentale è che il metodo analitico, sviluppato avvalendosi di una strumentazione portatile, permette di effettuare analisi veloci ed in loco.

Ciò lo distingue e lo renderebbe fruibile, una volta ottimizzato, per analisi di campioni reali in ambito clinico senza la necessità di avvalersi di grandi strutture o personale tecnico specializzato.

Per quanto riguarda le prospettive, queste sono molteplici. In primo luogo, avendo verificato la fattibilità di rivelare la LMW-h-uPA, il biosensore potrebbe essere testato anche con la proteina integrale h-uPA (HMW-h-uPA). Questo allo scopo di valutare la sensibilità del biosensore con l'analita nella sua integrità strutturale.

Altro aspetto fondamentale riguarda l'impiego in ambito diagnostico. Come specificato nel capitolo 1, la concentrazione ematica di uPA è compresa tra 0.21-16.06 ng/mL.⁸ Trattandosi di un intervallo di concentrazione limitato (ng/mL), la sensibilità del metodo analitico è sicuramente un fattore fondamentale. Per questo un altro obiettivo sarà quello di ottimizzare il metodo analitico utilizzando il peptide P_2 , che ha già mostrato di possedere un'affinità maggiore.

Inoltre, il metodo analitico potrà essere ottimizzato per renderlo applicabile a campioni reali (fluidi biologici). In questo modo sarà possibile valutare il comportamento di eventuali interferenti biologici presenti nella matrice e la loro concorrenza nell'interazione con l'analita.

Un'ultima considerazione va fatta sulla sostenibilità del metodo analitico. Valutando le nuove frontiere nell'utilizzo di materiali di scarto per la costruzione di elettrodi SPE, potrebbe essere valutata la sperimentazione della piattaforma biosensoristica con l'implementazione di questi nuovi elettrodi SPE al fine di limitare e diminuire gli scarti derivanti dall'utilizzo di tale metodo analitico. Per quanto concerne le MB, al termine delle misurazioni ed una volta raccolti tutti i dati necessari, è possibile effettuare un recupero integrale delle MB attraverso una serie di procedure che consistono

in una rottura del legame enzima-peptide ed una conseguente dissociazione del peptide dalla superficie delle MB.¹³

5. Bibliografia

1. Pasqualini, J. R. Breast Cancer: Prognosis, Treatment and Prevention. 2 Ed., New York, *Informa Healthcare USA* **2008**.
2. Breast Cancer Treatment (PDQ®): <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#section/all>.
3. International Agency for Research in Cancer: <https://gco.iarc.fr/>.
4. Associazione Italiana di Oncologia Medica: <https://www.aiom.it/>.
5. Breasted, J. H. The Edwin Smith surgical papyrus. *University of Chicago: Press Chicago* **1930**, 1.
6. Ministero della salute: <http://www.salute.gov.it/>.
7. Ześlawska, E.; Stürzebecher, J.; Oleksyn, B. J. Geometry of GPPE binding to picrate and to the urokinase type plasminogen activator. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 6212–6215.
8. Malgorzata, B. P.; Witzel, I.; Aktas, B.; Fasching, P. A.; Hartkopf, A.; Janni, W.; Kasimir-Bauer, S.; Pantel, K.; Schön, G.; Rack, B.; Riethdorf, S.; Solomayer, E. F.; Fehm, T.; Müller, V. The prognostic relevance of uPA in the blood of patients with metastatic breast cancer. *Scientific Reports* **2019**, 1-10.
9. Mignatti, P.; Rifkin, D. B. Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. *Physiological Review* **2014**, 73, 161-173.
10. Andreasen, P. A.; Egelund, R.; Petersen, H. H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci* **2000**, 57, 25-40.
11. Angelini, A.; Cendron, L.; Chen, S.; Touati, J.; Winter, G.; Zanotti, G.; Heinis, C. Bicyclic peptide inhibitor reveals large contact interface with a protease target. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 817-821.
12. Santibanez, J. F.; Obradović, H.; Kukolj, T.; Krstić, J. Transforming growth factor- β , matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. *Developmental Dynamics* **2018**, 247, 382-395.
13. Lowe, B. S.; Dick, J. A. G.; Cohen, B. E.; Stevens, M. M. Multiplex Sensing of Protease and Kinase Enzyme Activity via Orthogonal Coupling of Quantum Dot Peptide Conjugates. *ACS NANO* **2012**, 6, 851–857.
14. Mahmood, N.; Mihalcioiu, C.; Rabbani, S. A. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Frontiers in Oncology* **2018**, 8 , 1-21.

15. Morais, P. A.; Maia, F. F. Jr.; Solis-Calero, C.; Caetano, E. W. S.; Freiree, V. N.; Carvalho, H. F. The urokinase plasminogen activator binding to its receptor: a quantum biochemistry description within an in/homogeneous dielectric function framework with application to uPA–uPAR peptide inhibitors. *Phys. Chem* **2020**, *22*, 3570-3583.
16. Tang, L.; Han, X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed and Pharmacother.* **2013**, *67*, 179-182.
17. Cao, R.; Wu, H. L.; Linden, P.; Farnebo, J.; Shi, G. Y.; Cao, Y. Suppression of Angiogenesis and Tumor Growth by the Inhibitor K1-5 Generated by Plasmin Mediated Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1999**, *96*, 5728-5733.
18. Dohn, L. H.; Illemann, M.; Høyer-Hansen, G.; Christensen, J.; Hostmark, J.; Litlekalsoy, J.; Von der Maase, H.; Pappot, H.; Laerum, O. D. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression is associated with T-stage and survival in urothelial carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **2015**, *33*, 15-24.
19. Cantero, D.; Friess, H.; Deflorin, J.; Zimmermann, A.; Brundler, M. A.; Riesle, E.; Korc, M.; Buchlerl, M. E. Enhanced Expression of Urokinase Plasminogen Activator and its Receptor in Pancreatic Carcinoma. *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 388- 395.
20. LU, J. J.; Guo, H.; Gao, B.; Zhang, Y.; Lin, Q. L.; Shi, J.; Liu, J. J.; LIU, J. Prognostic value of urokinase plasminogen activator system in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncology* **2018**, *8*, 127-132.
21. Strojjan, P.; Budihna, M.; Šimid, L.; Vrhovec, I.; Šikrk, J. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) in Tissue and Serum of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *Eur J Cancer* **1998**, *34*, 1193-1197.
22. Nagel, B.; Dellweg, H.; Gierasch, L. M. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations), *Pure & Appl Chem* **1992**, *64*, 143-168.
23. Dawood, S.; Broglio, K.; Buzdar, A. U.; Hortobagyi, G. N.; Giordano, S. H. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and Trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncology* **2010**, *28*, 92-98.
24. Nirschl, M.; Reuter, F.; Vörös, J. Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis. *Biosensors* **2011**, *1*, 70-92.
25. Moretto, L.M.; Kalcher, K.; Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors Volume 1: Fundamentals. Nanostructure Science and Technology, *Springer* **2012**.
26. Manz, A.; Dittrich, P.S.; Pamme, N.; Iossifidis, D.; Bioanalytical chemistry. 2 Ed., *Imperial College Press* **2004**.
27. Karunakaran, C.; Bhargava, K.; Benjamin, R. Biosensors and Bioelectronics. *Elsevier* **2015**.

28. Soda, N.; Umer, M.; Kashaninejad, N.; Kasetsirikul, S.; Kline, R.; Salomon, C.; Nguyen, N. T.; Shiddiky, M. A. J. PCR-Free Detection of Long Non-Coding HOTAIR RNA in Ovarian Cancer Cell Lines and Plasma Samples. *Cancers* **2020**, *12*, 2233.
29. Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloun-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchim Acta* **2014**, *181*, 865–891.
30. Renedo, O. D.; Alonso-Lomillo, M. A.; Martínez, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. Review. *Talanta* **2007**, *73*, 202–219.
31. Moro, G.; Bottari, F.; Van Loon, J.; Du Bois, E.; De Wael, K.; Moretto, L. M. Disposable electrodes from waste materials and renewable sources for (bio) electroanalytical applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *146*.
32. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; Electrochemical methods: Fundamentals and Applications. 2 Ed., New York, *John Wiley & Sons* **2001**.
33. Savéant, J. M.; Costentin, C.; Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry. New York, *John Wiley & Sons* **2019**.
34. Wang, J.; Analytical Electrochemistry. 2Ed., New York, *John Wiley & Sons* **2000**.
35. Protti, P.; Introduzione alle moderne tecniche di Analisi Voltammetriche e Polarografiche. 4Ed., Milano, *AMEL Electrochemistry* **2001**.
36. Ciepiela, F.; Jakubowska, M. Faradaic and capacitive current estimation by means of Independent Components Analysis and 1 kHz sampling. *Talanta* **2017**, *170*, 158–164.
37. Clark, C. L.; Wolf, R.; Granger, D.; Taylor, Z.; Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Appl Physiol* **1953**, *6*, 189-193.
38. Clark, C. L. Jr. Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* **1962**, *102*.
39. Guo, Y.; Zhoua, Y.; Xiongb, X.; Zengc, L.; Huang, X.; Lenga, Y.; Xiong, Y. Natural enzyme-free colorimetric immunoassay for human chorionic gonadotropin detection based on the Ag⁺-triggered catalytic activity of cetyltrimethylammonium bromide-coated gold nanoparticles. *Sensors & Actuators: B. Chemical* **2020**, *35*, 127439.
40. Troncone, R.; Maurano, F.; Rossi, M.; Micillo, M.; Greco, L.; Auricchio, R.; Salerno, G.; Salvatore, F.; Sacchetti, L. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. *The Journal of Pediatrics* **1998**, *134*, 166-171.
41. Carney, W. P.; Neumann, R.; Lipton, A.; Leitzel, K.; Ali, S.; Price, C. P. Monitoring the Circulating Levels of the HER2/neu Oncoprotein in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **2004**, *5*, 105-116.

42. Hicks, D.; Kulkarni, S. HER2+ breast cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *Am J Clin Pathol* **2008**, *129*, 263-273.
43. Adornetto, G.; Fabiani, L.; Volpe, G.; De Stefano, A.; Martini, S.; Nenna, R.; Lucantoni, F.; Bonamico, M.; Tiberti, C.; Moscone, D. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407*, 7189–7196.
44. Khalilzadeh, B.; Shadjou, N.; Eskandani, M.; Charoudeh, H. N.; Omidiaç, Y.; Rashidi, M. R. A reliable self-assembled peptide based electrochemical biosensor for detection of caspase 3 activity and apoptosis. *RSC Adv* **2015**, *5*, 58316–58326.
45. Llinas, P.; Le Du, M. H.; Ga°rdsvoll, H.; Dan, K.; Ploug, M.; Gilquin, B.; Stura, E. A.; Me´nez, A. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *The EMBO Journal* **2005**, *24*, 1655–1663.
46. Liu, Q.; Wang, J.; Boyd, B. J. Peptide-based biosensors. *Talanta* **2015**, *136*, 114-127.
47. Hansen, P.R.; Oddo, A. Peptide Antibodies: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, New York, *Springer Science + Business Media* **2015**, *1348*, 33-47.
48. Sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/855145?lang=it®ion=IT>.
49. Sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/chemistry/biotinylationreagents.html>.
50. Singh, P. R.; Rajopadhve, M.; Clark, S. L.; Williams, N. E. Effect of Scavengers in Acidolytic Cleavage of Cys(Acm)-Containing Peptides From Solid Support: Isolation of an Ethanedithiol Disulfide Adduct. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 4117-4120.
51. Townsend, D. M.; Tew, K. D.; Tapiero, H. Sulfur containing amino acids and human disease. *Biomed Pharmacother* **2004**, *58*, 47–55.
52. Yang, S.; Li, G.; Xia, N.; Liu, P.; Wang, Y.; Qu, L. High performance electrochemical L-cysteine sensor based on hierarchical 3D straw-bundle-like Mn-La oxides/reduced graphene oxide composite. *J Electroan Chem* **2020**, *877*, 114654.
53. Centonze, D.; Quinto, M.; Carelli, D.; Di Paolo, S.; Montemurno, E.; Gesualdo, L. Interferenze nella determinazione della glicemia effettuata con i glucometri elettrochimici nel paziente ospedalizzato. *G It Diabetol Metab* **2006**, *26*, 160-171.
54. Guzmán, M.; Ojeda, I.; Villalonga, R.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sede, P.; Pingarrón, J. M. Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *35*, 82–86.

55. Panizza, M.; Cerisola, D. Influence of anode material on the electrochemical oxidation of 2-naphthol Part 1. Cyclic voltammetry and potential step experiments. *Electrochimica Acta* **2003**, *48*, 3491-3497.
56. www.thermofischer.com:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65001?SID=srchsrp65001#/65001?SID=srch-srp-65001>.
57. www.dropsens.com:
http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html.
58. Fabiani, L.; Saroglia, M.; Galatà, G.; De Santis, R.; Fillo, S.; Luca, V.; Faggioni, G.; D'amore, N.; Regalbuto, E.; Salvatori, P.; Terova, G.; Moscone, D.; Lista, F.; Arduini, F. Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. *Biosensors and Bioelectronics* **2021**, *171*, 112686.
59. Mandli, J.; Mohammadi, H.; Amine, A.; Electrochemical DNA sandwich biosensor based on enzyme amplified microRNA-21 detection and gold nanoparticles. *Bioelectrochemistry* **2017**, *116*, 17–23.
60. Li, C.; Wang, Z.; Li, Q.; Peng, L.; Zhanga, W.; Zhang, Y.; Qian, H. Improving catalytic activity of supported Au nanoparticles depending on its density. *J Mol Catalysis A: Chemical* **2017**, *427*, 18–24.
61. Tate, J.; Ward, G. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev* **2004**, *25*, 105-120.
62. Andrew, N.; Wener, M. H. The Fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods* **2009**, *347*, 3-11.